

平成25年3月18日

平成24年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業
事後評価用報告書

課題番号：2306

「野鳥が保有するニューカッスル病ウイルスに関する研究」

研究期間：平成23年度～平成24年度（2年間）

研究総括者名：真瀬 昌司

試験研究機関名：（独）農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

I. 試験研究の全体計画

1. 研究目的

我が国ではニューカッスル病ワクチンの使用によって養鶏産業では大規模な発生は抑えられているが、ワクチン未使用の愛玩鶏やワクチン接種不適宜群等で散発的な発生がしばしば認められている。ニューカッスル病ウイルスも高病原性鳥インフルエンザウイルスと同様、野鳥による伝播が主要な感染ルートとして考えられているが、我が国では野鳥のサーベイランスがあまり行われていないことから、野鳥におけるウイルス保有状況と我が国における発生との関連性は明らかでない。

本研究では、

1. 全国規模の野鳥におけるニューカッスル病ウイルスのサーベイランスを実施することによって、我が国の野鳥内における本ウイルスの保有状況等を明らかにする。
2. 分離されたニューカッスル病ウイルスについて、遺伝子レベルでの解析ならびに国際基準に沿った病原性試験を実施する。

以上により我が国の野鳥内における本ウイルスの保有状況およびその性状を明らかにすることを目標とする。

その結果、

1. これまでの我が国における発生例と野鳥が保有しているウイルス株との関連性が明らかになる。また外国で分離されたウイルス株との性状比較も容易に行えるようになる、
2. ニューカッスル病の発生を監視するためのサーベイランスの規模の検討や予防的ワクチン接種の必要性の検証など、国が今後のニューカッスル病防疫のあり方について具体的な検討を行うために活用できる基礎データが得られる、ことが期待される。

2. 研究内容

1. 野鳥におけるニューカッスル病ウイルス保有状況の調査

(1) 野鳥糞便からのニューカッスル病ウイルス分離

現在我が国では鳥インフルエンザのサーベイランスが野鳥の糞便を収集することで実施されている。このサーベイランスの採材地点において、各地方環境部局と連携して県家畜保健衛生所がニューカッスル病ウイルスの検査を目的とした採材を実施する。採材した糞便は動物衛生研究所に送付し、発育鶏卵を用いてニューカッスル病ウイルスを対象とした分離検査を実施する。ハト糞便については原則的に6,8,10,12,2月に採材する(場所によっては採取状況や天候によって必ずしも採材できない場合もありうる)。水禽糞便については渡り鳥が飛来する10月以降、環境省の実施する鳥インフルエンザサーベイランスプログラムに準じて行う。従って、10,11,1,3月に採取する県と、10,12,2月に採取する県に分かれる。採取状況を別紙表1(ハト)と別紙表2(水禽)にまとめた。水禽糞便においても採取状況や天候によって必ずしも採材できない場合もありうる。

(2) 分離ウイルスの同定および培養

発育鶏卵で分離されたウイルスを、標準診断法である抗ニューカッスル病ウイルス免疫血清を用いた鶏赤血球凝集抑制試験(HI)にてニューカッスル病ウイルスと同定する。ニューカッスル病ウイルスと同定された検体は、以下の性状解析に用いるため発育鶏卵を用いて継代培養を実施する。

2. 分離されたニューカッスル病ウイルスの性状解析

(1) 野鳥糞便からのニューカッスル病ウイルス分離

1で分離されたニューカッスル病ウイルスについて、本ウイルスの病原性に深く関与しているとされるF蛋白開裂部位の遺伝子解析を実施する。この遺伝子解析結果を既知のニューカッスル病ウイルスやワクチン株と比較し、野鳥が保有するウイルスの遺伝学的特徴を明らかにする。

(2) 分離ニューカッスル病ウイルスの病原性検定

1で分離されたニューカッスル病ウイルスについて、国際獣疫事務局(OIE)が定める病原性ニューカッスル病ウイルスに該当するか検証するため国際基準に基づく病原性試験である1日齢ヒナ脳内接種試験(Intra Cerebral Pathogenicity Index:ICPI)を実施する。この病原性試験結果および上述の遺伝子解析結果から野鳥が保有するウイルスの疫学的特徴を明らかにする。

3. 達成目標及び期待される成果

ニューカッスル病の発生を監視するためのサーベイランスの規模の検討や予防的ワクチン接種の必要性の検証など、国が今後のニューカッスル病防疫のあり方について具体的な検討を行うために活用できる基礎データを得る。

4. 年次計画

項目	2011年度	2012年度
1. 野鳥におけるニューカッスル病ウイルス保有状況の調査		
(1) 野鳥糞便からのニューカッスル病ウイルス分離	ウイルス分離 (動物衛生研究所)	
(2) 分離ウイルスの同定および培養	ウイルス同定 (動物衛生研究所)	
2. 分離されたニューカッスル病ウイルスの性状解析		
(1) 分離ニューカッスル病ウイルスの遺伝子解析	遺伝子解析 (動物衛生研究所)	
(2) 分離ニューカッスル病ウイルスの病原性検定	病原性検定 (動物衛生研究所)	
所要経費 (合計)	5,000 千円	5,000 千円

II. 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	動物衛生研究所	◎ 真瀬 昌司	40
1. 野鳥におけるニューカッスル病ウイルス保有状況の調査	動物衛生研究所	○ 真瀬 昌司	前出
(1) 野鳥糞便からのニューカッスル病ウイルス分離	動物衛生研究所	△ 彦野 弘一 金平 克史	20 20
(2) 分離ウイルスの同定および培養	動物衛生研究所	△ 金平 克史 彦野 弘一	前出
2. 分離されたニューカッスル病ウイルスの性状解析	動物衛生研究所	○ 真瀬 昌司	前出
(1) 分離ニューカッスル病ウイルスの遺伝子解析	動物衛生研究所	△ 金平 克史 彦野 弘一	前出 前出
(2) 分離ニューカッスル病ウイルスの病原性検定	動物衛生研究所	△ 彦野 弘一 金平 克史	前出 前出

(注) 研究総括者には◎、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

III. 主要な成果

1. 成果の内容

1) ハト糞便からのニューカッスル病ウイルス(NDV)の分離

2011年6月から2013年3月の約2年間の研究期間中、1,021検体のハト糞便から1株のNDVが分離された。ハト糞便を対象としたサーベイランスはこれまであまり実施されていなかったが、採取糞便から実際にウイルスが分離されたことから、サーベイランスの重要性が確認された。2013年2月にK県で採材されたハト糞便から分離されたのは病原性NDVであり、遺伝子解析の結果Class II Genotype VIに属していた。ハトから分離されたウイルスはほとんどがこの系統に属することから、この系統のウイルスが野外ハト間で流行維持されていることを示唆する。

2) Class Iに属するNDVの分離

2011年10月から2013年3月の約2年間の研究期間中、662検体の水禽糞便から6株のNDVが分離された。遺伝学的性状・病原性検定からすべて非病原性株であった。分子系統解析の結果、B,C,H,L県で分離された4株はこれまで我が国でもしばしば分離されてきたClass II Genotype Iの系統であったが、2012年10月および2013年2月にF県で採材された水禽糞便(オナガガモ・カルガモ)から分離されたウイルスは、Class Iに属していた。ロシアや中国、米国等ではClass Iウイルスの分離は報告されていたが、我が国ではあまり報告されていない。

2. 成果の活用

1) ハト糞便からの病原性NDVの分離

野外のハト糞便からウイルスが分離されたことは、家禽へのウイルス感染源となる可能性を示唆するため、家禽農家における日常の野鳥に対する衛生対策が重要である

ことを示す基礎資料となる。

2) Class I に属する NDV の分離

我が国における NDV の遺伝的多様性が明らかになったことから NDV の生態学的解析の基礎資料となる。分離されたウイルスはいずれもロシアや韓国で分離されたウイルスと遺伝的に近縁であることは、これらの国からのウイルス侵入の可能性を示すものであり、ワクチンを中心とした防疫対策が今後も必要であることを示す。

IV. 研究実績報告

1. 中課題名「野鳥におけるニューカッスル病ウイルス保有状況の調査」

5 羽分の糞便を 1 本の試験管に採材し 1 検体とした。研究期間中にハト糞便では合計 1,021 検体のハト糞便を受領した。水禽糞便は合計 662 検体を受領した。発育鶏卵を用いた分離検査の結果、15 検体から HA 性を有するウイルスが分離された。これらは、7 株がニューカッスル病ウイルス(NDV)、7 株が鳥インフルエンザウイルス(AIV)(H2N3 亜型 1 株、H7N7 亜型 1 株、H4N6 亜型 1 株、H7N1 亜型 1 株、H11N3 亜型 2 株、H1N3 亜型 1 株)、1 株がトリパラミクソウイルス 6 型(APMV-6)と同定された(表 1)。なお、分離された AIV H7 亜型のウイルスはすべて弱毒であった。

(1) 小課題名「野鳥糞便からのニューカッスル病ウイルス分離」

1) 平成 23 年度までの研究実績概要

ハト糞便は平成 23 年 6 月から平成 24 年 2 月にかけて全国 38 県から 486 検体が送付された。

水禽糞便は平成 23 年 10 月から平成 24 年 3 月にかけて全国 38 県から合計 290 検体が送付された。

送付された材料について、発育鶏卵を用いて NDV を対象とした分離検査を実施したところ、ハト糞便材料から鶏赤血球凝集 (HA) 活性を有するウイルスは分離されなかった。

一方、水禽糞便材料からは HA 活性を有するウイルスが 8 株分離された。

2) 平成 24 年度における研究実績概要

ハト糞便は平成 24 年 6 月から平成 25 年 2 月にかけて全国 39 県から 535 検体が送付された。

水禽糞便は平成 24 年 10 月から平成 25 年 3 月にかけて全国 37 県から 372 検体が送付された。

送付されたハト糞便材料から鶏赤血球凝集 (HA) 活性を有するウイルスが 1 株分離された。

一方、送付された水禽糞便材料からは HA 活性を有するウイルスが合計 6 株分離された。内訳を、表 1 に示した。

3) 成果の内容

1. 送付されたハト糞便材料から鶏赤血球凝集 (HA) 活性を有するウイルスが合計 1 株分離された。(表 1)。

2. 送付された水禽糞便材料から鶏赤血球凝集 (HA) 活性を有するウイルスが合計 14 株分離された。(表 1)。

(2) 小課題名「分離ウイルスの同定および培養」

1) 平成23年度までの研究実績概要

水禽糞便から分離された HA 活性を有するウイルスは、3 株がニューカッスル病ウイルス(NDV)、4 株が鳥インフルエンザウイルス(AIV)(H2N3 亜型 1 株、H7N7 亜型 1 株、H7N1 亜型 1 株、H4N6 亜型 1 株)、1 株がトリパラミクソウイルス 6 型(APMV-6) と同定された (表 1)。

2) 平成24年度における研究実績概要

ハト糞便から分離された HA 活性を有するウイルスは、NDV と同定された。一方、水禽糞便から分離された 6 株のうち、3 株が NDV、残り 3 株が AIV(H11N3 亜型 2 株、H1N3 亜型 1 株)と同定された (表 1)。

3) 成果の内容

1. 研究期間中に送付されたハト糞便材料から NDV が合計 1 株分離された。
2. 研究期間中に送付された水禽糞便材料から NDV が合計 6 株、AIV が合計 7 株 (H2N3 亜型 1 株、H7N7 亜型 1 株、H4N6 亜型 1 株、H7N1 亜型 1 株、H11N3 亜型 2 株、H1N3 亜型 1 株)、APMV-6 が 1 株分離された (表 1)。

表 1.分離されたウイルスとその由来

県	採材月日	種	同定されたウイルス
A	2011年10月13日	水禽	APMV-6
B	2011年11月12日	マガモ・カルガモ	NDV
C	2011年11月27日	オナガガモ	NDV
D	2011年12月19日	カモ類 オナガガモ・キンクロハジロ・ハシビロガ	AIV (H2N3)
E	2011年12月19日	モ	AIV (H7N7)
F	2011年12月28日	オナガガモ・カルガモ	AIV (H4N6)
G	2012年1月24日	カモ類	AIV (H7N1)
H	2012年3月11日	カモ類	NDV
F	2012年10月25日	オナガガモ・カルガモ	NDV
I	2012年11月27日	カモ類	AIV (H11N3)
I	2012年11月27日	カモ類	AIV (H11N3)
J	2012年12月24日	カモ類	AIV (H1N3)
F	2013年2月12日	オナガガモ・カルガモ	NDV
K	2013年2月18日	ハト	NDV
L	2013年3月19日	ヒドリガモ	NDV

2. 中課題名「分離されたニューカッスル病ウイルスの性状解析」

水禽糞便から分離された6株のNDVはそのF蛋白開裂部位のアミノ酸配列(113番目から117番目)は全て非病原性株(弱毒型)の配列であった(表2)。同遺伝子を用いた分子系統樹解析の結果、B,C,H,L県で採取された材料から分離された4株はClass II Genotype Iの系統であった。また遺伝的にロシアや韓国等のウイルスと近縁であった。一方、F県で採取された材料から分離された2株はその塩基配列は同一であり、その遺伝子型Class Iの系統であった。

またNDV病原性検定の国際標準法である1日齢ヒナ脳内接種試験(ICPI)の結果、水禽糞便から分離された6株のNDVのICPI指数は0~0.2であり、非病原性株(弱毒型)と判定された(表2)。

一方、ハト由来糞便から分離されたウイルスはそのF蛋白開裂部位のアミノ酸配列(113番目から117番目)は病原性株の配列であり(RQKR-F)、分子系統樹解析の結果Class II Genotype VIの系統であった。この系統のウイルスはそのほとんどがハトから分離されていることから、ハト内で流行維持されていると考えられた。また、1日齢ヒナ脳内接種試験(ICPI)の結果、そのICPI指数は1.1で病原性株(中等毒)と判定された(表2)。

(1) 小課題名「分離ニューカッスル病ウイルスの遺伝子解析」

1) 平成23年度までの研究実績概要

水禽糞便から分離されたNDV 3株のF蛋白開裂部位のアミノ酸配列の113番目から117番目の配列はすべて弱毒型(非病原性株)の配列であった。またこれら3株の遺伝子型は共にClass II genotype Iであった。

2) 平成24年度における研究実績概要

水禽糞便から分離されたNDV 3株のF蛋白開裂部位のアミノ酸配列の113番目から117番目の配列はすべて弱毒型(非病原性株)の配列であった。またF県で採取された材料から分離された2株の遺伝子型はClass Iであった。

一方、ハト糞便から分離されたNDVのF蛋白開裂部位のアミノ酸配列の113番目から117番目の配列は病原性株の配列であった。またこの株の遺伝子型はClass II genotype VIであった。

3) 成果の内容

1. 水禽糞便材料から分離されたNDVはすべて非病原性株の配列であった。しかしその遺伝子型は、H23年度に分離された3株がClass II genotype I、H24年度に分離された2株がClass I、1株がClass II genotype Iであった(表2)。

2. ハト糞便材料から分離されたNDVは病原性株の配列であり、その遺伝子型はClass II genotype VIであった。

(2) 小課題名「分離ニューカッスル病ウイルスの病原性検定」

1) 平成23年度までの研究実績概要

水禽糞便から分離されたNDV3株の病原性指数は0~0.2と算出されたことから弱毒株(非病原性株)と判定された(表2)。

2) 平成24年度における研究実績概要

水禽糞便から分離された NDV3 株の病原性指数は 0~0.2 と算出されたことから弱毒株（非病原性株）と判定された。

一方、ハト由来糞便から分離された NDV の病原性指数は 1.1 と算出されたことから病原性株（中等毒）と判定された。

3) 成果の内容

1. 水禽糞便から分離された 6 株の NDV はその F 蛋白開裂部位のアミノ酸配列(113 番目から 117 番目)は全て非病原性株（弱毒型）の配列であり（表 2）、またその ICPI 指数も 0~0.2 で非病原性株のものであった。

2. ハト由来糞便から分離されたウイルスの F 蛋白開裂部位のアミノ酸配列(113 番目から 117 番目)は病原性株の配列であり（RQKR-F）、またその ICPI 指数も 1.1 で病原性株のものであった。

表2. 分離されたNDVの性状

県	採材月日	種	ICPI	F蛋白の113番目から 117番目のアミノ酸	病原性	遺伝子型
B	2011年11月12日	マガモ・カルガモ	0.0	KQGR-L	非病原性	Class II Genotype I
C	2011年11月27日	オナガガモ	0.0	KQGR-L	非病原性	Class II Genotype I
H	2012年3月11日	カモ類	0.2	KQGR-L	非病原性	Class II Genotype I
F	2012年10月25日	オナガガモ・カルガモ	0.1	RQER-L	非病原性	Class I Genotype 5
F	2012年2月12日	オナガガモ・カルガモ	0.1	RQER-L	非病原性	Class I Genotype 5
K	2013年2月18日	ハト	1.1	RQKR-F	病原性	Class II Genotype VI
L	2013年3月19日	ヒドリガモ	0.0	KQGR-L	非病原性	Class II Genotype I

V. 論文、特許等の実績等

別添のとおり

これまでの論文、特許等の実績等

学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名
Simple differentiation of avirulent and virulent strains of avian paramyxovirus serotype-1 (Newcastle disease virus) by PCR and restriction endonuclease analysis in Japan. Mase M., and Kanehira K. J Vet Med Sci.74巻12号, p1661-4, 2012年12月	動物衛生研究所

口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
PCR産物の制限酵素切断パターンを利用した病原性ニューカッスル病ウイルス株の簡易識別、真瀬昌司 & 金平克史、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月	動物衛生研究所
野生水禽およびハト糞便からのニューカッスル病ウイルス分離状況、真瀬昌司 & 金平克史、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月	動物衛生研究所

出版図書

区分:①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名
②	ニューカッスル病、真瀬昌司、あおもり農業、青森県農業改良普及会、2012年7月	動物衛生研究所
②	ニューカッスル病、真瀬昌司、ながの農業と生活、青森県農業改良協会、2012年7月	動物衛生研究所

②	ニューカッスル病、真瀬昌司、農業普及(岩手)、岩手県農業改良普及会、2013年1月	動物衛生研究所
②	ニューカッスル病、真瀬昌司、農業いばらき、茨城県農業改良協会、2014年1月	動物衛生研究所
②	世界のニューカッスル病の発生と対策、真瀬昌司、鶏病研究会、2014年10月	動物衛生研究所

国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名