

野鳥から分離されるニューカッスル病ウイルスの性状解析

藤本佳万

鹿児島大学共同獣医学部附属越境性動物疾病制御研究センター

鹿児島市郡元 1-21-24

TEL: 099-285-8724

E-mail: k7639981@kadai.jp

要旨

高病原性鳥パラミクソウイルス血清型 1 (APMV-1)、別名ニューカッスル病 (ND) ウイルスは、現在も世界中の家禽業界に深刻な経済的損失をもたらす病原体である。本研究において鹿児島県出水市野の野生鳥類越冬地における APMV-1 の浸淫状況を調査した結果、合計 11 株の APMV-1 が分離された。4 株は subtype class I、7 株は class II genotype I b の遺伝子系統に分類され、いずれも極東アジア諸国の水禽で循環するウイルス株と近縁であることが明らかとなった。また、市販 ND ワクチン接種を受けたニワトリの血清を用いて、分離ウイルスに対する中和試験を実施した結果、ワクチン株に対して 40-160 倍程度の抗体価を示した一方、野外分離株に対する抗体価は検出限界値の 10 倍以下であった。以上の結果、鹿児島県出水市野には近隣諸国から様々な遺伝子型の APMV-1 が浸淫していることが示唆された。今後も野生鳥類越冬地における APMV-1 の分離および、分離株に対するワクチン有効性の評価を継続していくことが当該地域周辺養鶏場における防疫対策に重要である。

1. 緒言

ニューカッスル病(Newcastle Disease:ND)は、呼吸器、消化器および神経症状を主徴とする伝播力の強い鳥類感染症であり、世界中の家禽業界に深刻な経済的損失をもたらす獣医学上重要な病気のひとつである。本疾病を引き起こすニューカッスル病ウイルス(NDV)は、鳥パラミクソウイルス血清型 1(Avian paramyxovirus serotype-1:APMV-1)の高病原性ウイルスの通称名であり、パラミクソウイルス科、エイブラウイルス属に分類されている。APMV-1 の自然宿主である野生水禽は、家禽に高病原性を示すウイルス株に感染した場合においても、無症状もしくは軽微な臨床症状で経過する事が知られている。そのため、野生水禽の長距離移動は、ND 発生地域から清浄地域へのウイルス侵入経路のひとつと考えられている¹⁾。

鹿児島県出水平野は、アラスカや極東ロシア、シベリア、モンゴルおよび中国などの極東アジア地域から多種にわたる水禽類が飛来する国内最大規模の越冬地である。その一方、越冬地周辺は養鶏産業が盛んな地域でもあり、野鳥由来の家禽感染症対策が強く求められている。鹿児島大学共同獣医学部では、当該地域における鳥インフルエンザ疫学調査を継続して実施し、野生鳥類の糞便およびそのねぐら水から多数の鳥インフルエンザウイルスを分離してきた²⁾。しかし、この事業において、APMV-1 を対象としたウイルス分離は実施されておらず、どのような性状の APMV-1 が当該地域に浸淫しているかは明らかでない。また、家禽の防疫対策に使用される ND ワクチンは、少なくとも 25 年以上前に分離されたウイルス株を用いて製造されており、国内に浸淫するウイルスの感染防御に対するワクチンの適合性については近年評価されていない。以上の点を明確にするためには、野外で循環している APMV-1 を対象とした疫学調査が必要である。

本研究では、出水平野の越冬地における APMV-1 の浸淫状況の把握とその性状解析を実施するため、2018-2020 年度にかけて上記の鳥インフルエンザ疫学調査で用いた検体を利用して、APMV-1 の分離およびウイルスの遺伝子解析を実施した。

2. 材料および方法

2.1. ウイルス分離

鹿児島大学共同獣医学部では、毎年 10 月中旬から翌年 3 月下旬までの間、出水平野に飛来した野鳥のねぐら水(以下、環境水)検体からのインフルエンザウイルス分離検査を実施している。検体採取および発育鶏卵を用いたウイルス分離は、既報の論文に従い実施された²⁾。インフルエンザウイルス分離検査において陰性と判定された検体接種卵の漿尿液を回収し、APMV-1 の分離材料として本研究に使用した。

回収された漿尿液を孔径 0.45 μm の Millex®-HP シリンジフィルター(Merck Millipore)で濾過後、抗菌薬溶液(10,000 units/ml ペニシリン G カリウム、10 mg/ml ストレプトマイシン硫酸塩、2.5 $\mu\text{g/ml}$ アムホテリシン B)添加リン酸緩衝整理食塩水を加えて合計約 1 ml の混合液を調整した。混合液を 2 個の 9-11 日齢発育鶏卵に尿膜腔内接種し、37°C で 3 日間培養した。接種卵を 4°C で数時間冷却した後、漿尿液を回収し、定法に従いニワトリ赤血球凝集試験を実施した。赤血球凝集活性が認められた漿尿液については、エスプライン®インフルエンザ A&B-N キット(富士レ

バイオ)を用いた簡易検査を実施し、インフルエンザウイルス混入の有無を確認した。簡易検査において陰性が確認された漿尿液は、APMV-1 を含む可能性のあるウイルス液として、以下の実験に使用するまで-80℃にて保存した。

2.2. 遺伝子解析

分離ウイルス液からの核酸抽出は、innuPREP Virus DNA/RNA Kit(アナリティックイエナ)を用いて実施した。抽出 RNA を鋳型に Random Primer (6-mers) および PrimeScript™ Reverse Transcriptase (タカラバイオ)を用いた逆転写酵素反応を実施し、cDNA を合成した。続いて、APMV-1 同定プライマー³⁾および TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase (タカラバイオ)を用いて、逆転写産物 cDNA を鋳型に Polymerase chain reaction (PCR) 法を実施した。PCR 反応産物のアガロース電気泳動後、特異的増幅遺伝子の切り出しおよび Monarch® DNA Gel Extraction Kit (ニュー・イングランド・バイオラボ)による DNA 精製を行い、サンガー法によるダイレクトシーケンス解析を実施した。シーケンス解析により得られた遺伝子配列情報については、National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースを用いた BLAST 検索を実施し、分離ウイルスが APMV-1 であることを確認した。

APMV-1 分離株の F 遺伝子における一部塩基配列を基に、塩基配列解析ソフト Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 10.1.6 を用いて近隣接合法による分子系統樹を構築した。

2.3. 中和試験

鹿児島県内の農場で飼育された外見上健康なブロイラー6羽から採血し、遠心分離により回収した血清を使用するまで-20℃以下にて保存した。これらブロイラーは、鶏病研究会の推奨する総合ワクチネーションプログラムに従いワクチン接種が実施されている⁴⁾。すなわち、孵化後0日齢において VG/GA 株の噴霧接種、および21日齢において B1 株の飲水投与により ND ワクチンの接種を受けた個体である。

被検鶏血清中の非特異的血球凝集阻害物質を除去するため、製造元推奨プロトコールに従い血清を RDE II (デンカ)にて処理した。RDE 処理した各被検鶏血清の希釈液および 100 TCID₅₀ に調整したウイルス液を等量混合し、4℃で2時間静置後、48 ウェルプレートに播種した Vero 細胞に接種した。37℃で1時間静置後、1 μg/ml TPCK 処理済トリプシン添加培地を各ウェルに加えて 37℃、5%CO₂ 存在下で細胞を培養した。細胞変性効果の有無を接種後3日目に観察し、ウイルス増殖を完全に抑制した血清の最高希釈倍率の逆数を中和抗体価として算出した。

3. 結果

3.1. ウイルス分離

2018年11月から2021年3月にかけて採取された環境水436検体を用いて、発育鶏卵接種法によるウイルス分離と遺伝子解析を実施し、合計11株の APMV-1 が分離された (Table 1)。シーケンス解析の結果、APMV-1 分離株の F 蛋白質開裂部位の推定アミノ酸配列は ¹¹²E-R-

Q-E-R-L¹¹⁷ もしくは ¹¹²G-K-Q-G-R-L¹¹⁷ であり、全ての分離株が低病原性もしくは非病原性ウイルスである事が予想された。

Table 1. APMV-1 isolates in Kagoshima prefecture between 2018–2020.

Isolated virus	Subtype	Genotype	Cleavage site ^a
Environment/Kagoshima/KU-1934/2019	II	Ib	GKQGRL
Environment/Kagoshima/KU-1936/2019	II	Ib	GKQGRL
Environment/Kagoshima/KU-195D/2019	I	— ^b	ERQERL
Environment/Kagoshima/KU-195I/2019	I	—	ERQERL
Environment/Kagoshima/KU-198G/2019	I	—	ERQERL
Environment/Kagoshima/KU-1995/2020	II	Ib	GKQGRL
Environment/Kagoshima/KU-199E/2020	I	—	ERQERL
Environment/Kagoshima/KU-202E/2020	II	Ib	GKQGRL
Environment/Kagoshima/KU-2032/2020	II	Ib	GKQGRL
Environment/Kagoshima/KU-203D/2020	II	Ib	GKQGRL
Environment/Kagoshima/KU-2011G/2021	II	Ib	GKQGRL

^a Amino acid residues at 112–117 in F protein.

^b — : Not determined.

3.2. APMV-1 分離株の分子系統解析

本研究で分離された 11 株の APMV-1 および NCBI データベースに登録されている APMV-1 の F 遺伝子における一部塩基配列を基に、分子系統樹解析および BLAST 検索を実施した。本研究で分離された APMV-1 のうち、Env/195D、Env/195I、Env/198G および Env/199E の 4 株は subtype class I の遺伝子系統に分類された (Fig. 1)。BLAST 検索の結果、class I に属する APMV-1 分離株のうち 3 株 (Env/195D、Env195I および Env/198G) は中国分離株 (Ruddy Shelduck/CH/JL07/2016: Accession No.KX664673) と相同性が最も高く (98.9%–99.2%)、1 株 (APMV-1/199E) は台湾分離株 (Anseriformes/Taiwan/AHRI132/2018 : Accession No.MN632514) と最も高い相同性を示した (99.18%)。Env/1934、Env/1936、Env/1995、Env/202E、Env/2032、Env/203D および Env/2011G の 7 株は subtype class II genotype Ib の遺伝子系統に分類された (Fig. 1 and Fig. 2)。これら 7 株全ての分離株は、中国分離株 (NDV/Duck/CN/JX/79C2/2016: Accession No.MH289834) と最も高い相同性を示した (98.94%–100%)。

我が国の家禽から分離された NDV の F 遺伝子配列を用いて分子系統樹を作成した結果、本研究における APMV-1 分離株のうち、過去に ND を発症したニワトリから分離されたいずれのウイルス (class II genotype II、III、VI、VII および VIII) とも遺伝的に近縁のものは認められなかった (Fig. 3)。

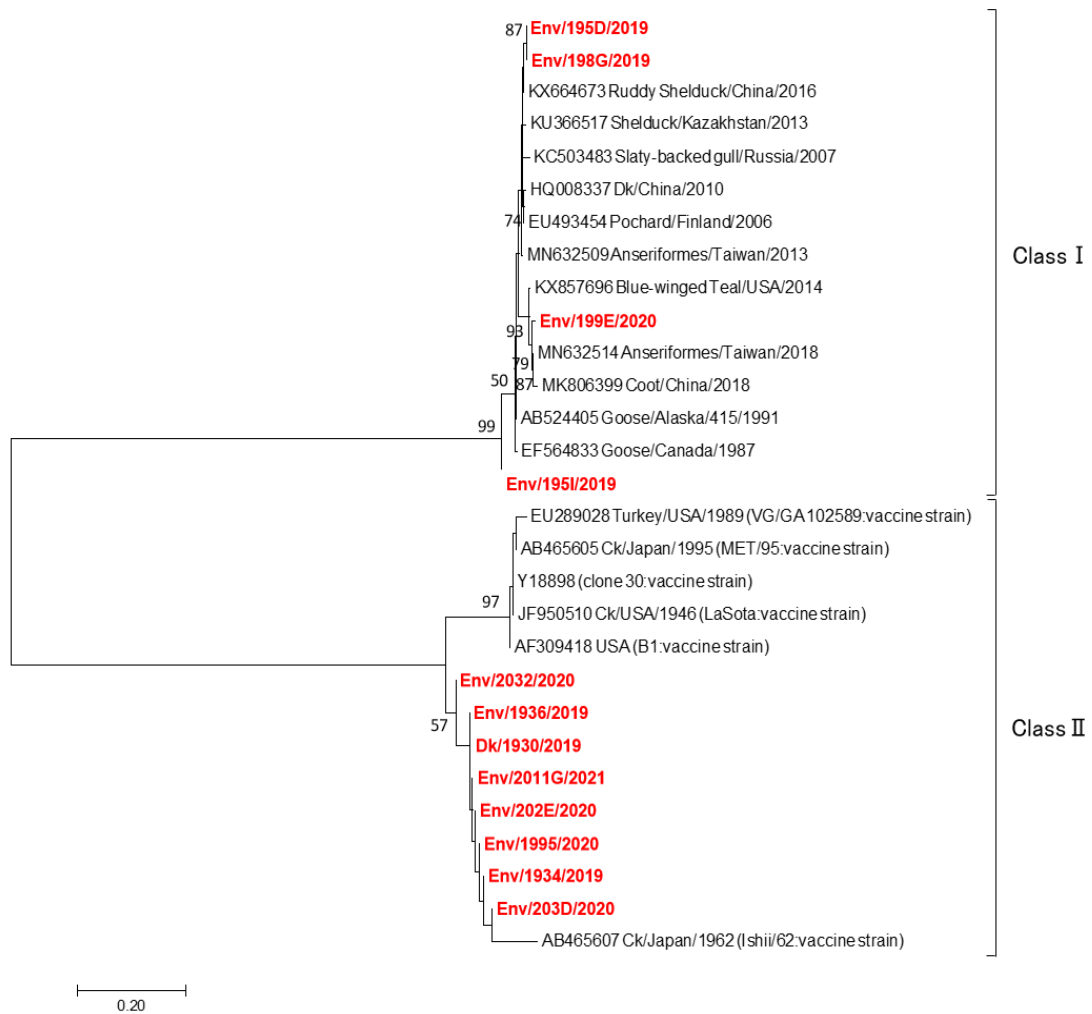
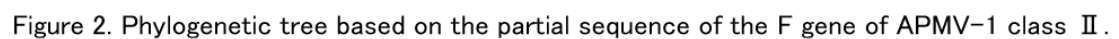


Figure 1. Phylogenetic tree based on the partial sequence of the F gene of APMV-1.



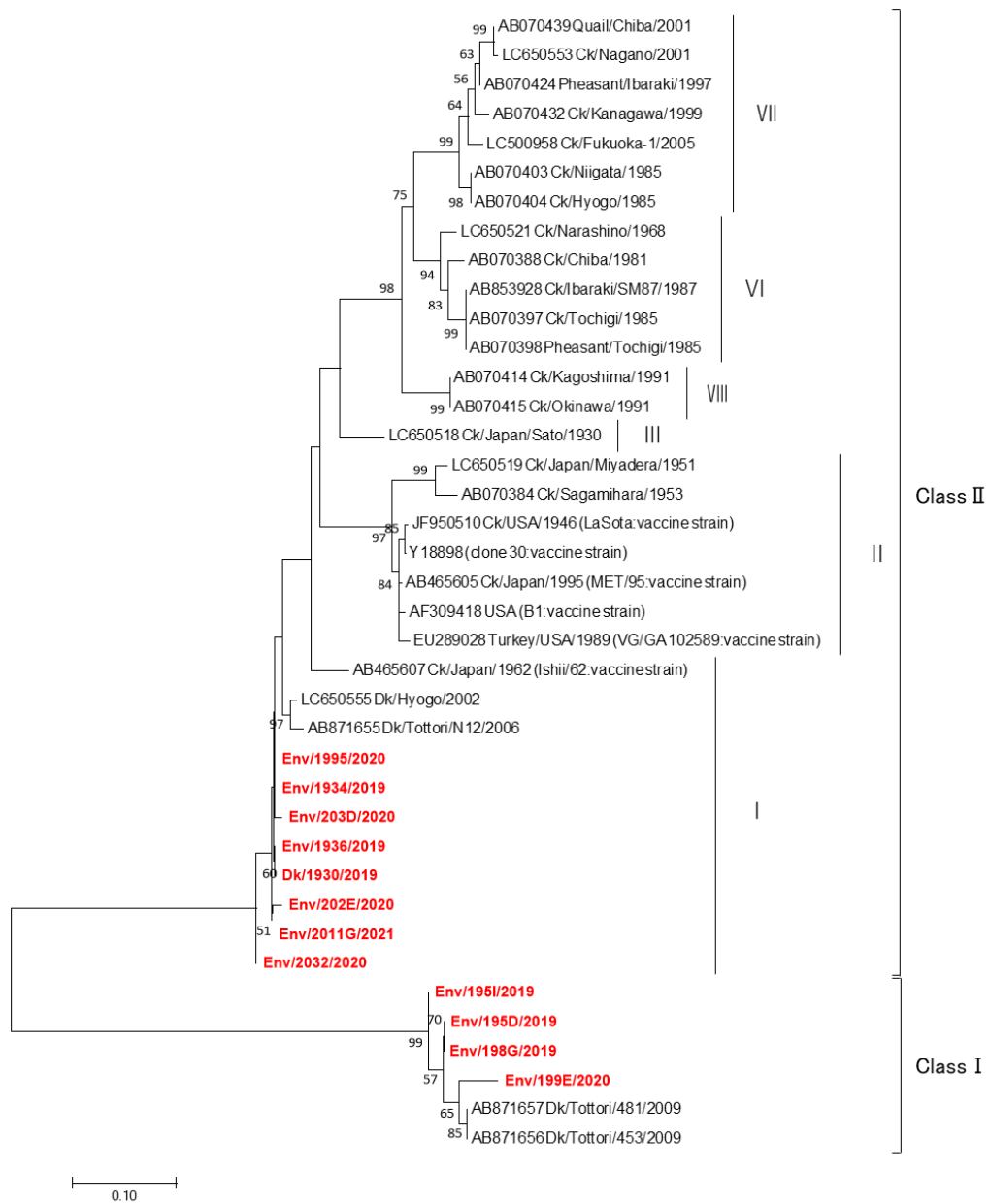


Figure 3. Phylogenetic tree based on the partial sequence of the F gene of APMV-1 isolated in Japan.

3.3. APMV-1 分離株に対する ND ワクチンの適合性の評価

中和試験には、ワクチン株の B1 および VG/GA 株、class I 分離株の Env/199E 株および class II 分離株の Dk/1930 株を用いた。中和試験結果を Table 2 に示す。1 検体(No.2-10)を除くいずれの被検血清とも、両 ND ワクチン株に対する 20 倍以上の中和抗体価が確認された。一方、APMV-1 分離株に対しては、多くの血清で検出限界以下(10 倍以下)を示した。以上の結果から、市販 ND ワクチンを接種されたニワトリの血清は、近年出水平野で分離された APMV-1 分離株に対する感染中和能が低いことが明らかとなった。

Table 2. Neutralization titer against ND vaccine strains and APMV-1 isolates in sera of vaccinated chickens.

Serum	Vaccine strains		APMV-1 isolates	
	B1	VG/GA	Env/199E	Dk/1930
1-2	40	20	<10	<10
1-4	40	40	<10	<10
1-6	160	160	20	40
1-9	40	160	20	<10
2-10	<10	40	<10	<10
2-14	40	80	<10	<10

4. 考察

2012 年以降、我が国は ND の清浄国として OIE から認められており、家禽からの APMV-1 分離例は報告されていない。また、水禽類からの APMV-1 分離例についても、2012 年度を最後に報告はなく⁵⁾、海外のどのような地域で流行し、どのような鳥種(家禽、陸生野鳥もしくは水禽類など)で循環するウイルスが我が国に浸淫しているのかについては近年把握されていない。本研究では、鹿児島県出水平野における APMV-1 を対象とした疫学調査を実施し、2018-2020 年度に回収した野鳥のねぐら水検体から合計 11 株の APMV-1 を分離した(Table 1)。F 遺伝子の一部塩基配列に基づく分子系統解析の結果、class I に分類された 4 株(Env/195D、Env/195I、Env/198G、Env/199E)および class II に分類された 7 株(Env/1934、Env/1936、Env/1995、Env/202E、Env/2032、Env/203D、Env/2011G)のいずれも、主に台湾、中国、樺太、シベリアなどの極東アジアで分離されたウイルスと近縁であった(Fig. 1 および Fig. 2)。また、本研究で分離された APMV-1 と遺伝的近縁関係にあるウイルスは、いずれも水禽類で維持されていたものであることが BLAST 検索により示唆されたことから、東アジア地域の野生水禽類で流行するウイルスが野鳥の渡りと共に我が国に浸淫していると考えられた。なお、本研究で分離した APMV-1 class II と近縁に位置するウイルス株の中には、アフリカや北欧で分離されたウイルス(Spur-

wingered goose/Nigeria/2008, Ruddy-Shelduck/Ukraine/2011, Mallard/Sweeden/2011) も含まれていたことから (Fig. 2)、東アジア地域以外における APMV-1 の流行状況やその病原性等についても、我が国への侵入に備えて情報を得ておくことが重要である。

現在、我が国では 5 種の生ワクチンと 1 種の不活化ワクチンが認可および販売されており、鶏病研究会が推奨する総合ワクチネーションプログラムがワクチン対策の基準となっている⁴⁾。市販の生ワクチンで使用される NDV 株には、海外でも一般的に使用される Hitchiner-B1 株、VG/GA 102589 株および La Sota clone30 株以外に、我が国で分離された MET95 株および Ishii/62 株が用いられている。本研究では、B1 株および VG/GA 株によるワクチネーションを受けたニワトリから採材した血清を供試している。これら被検血清を用いて中和試験を実施した結果、本研究で野外から分離された APMV-1 class I および class II genotype I のいずれに対する中和抗体価は、B1 株および VG/GA 株に対するものより非常に低値を示した (Table 2)。この結果は、ワクチン株の遺伝子型 (B1 および VG/GA 株: class II genotype II) が野外分離株と異なることに起因している可能性が考えられる。また、中和試験では、HN 蛋白質や F 蛋白質が持つウイルス吸着、侵入および膜融合などの様々な機能を阻害する抗体量が結果に影響するため、被検血清のホモウイルスである NDV ワクチン株と APMV-1 野外分離株間で中和抗体価に大きな違いがみられた可能性もある。現在、ND の国内発生は 10 年以上報告されていないため、現行のワクチネーション法を直ちに変更する必要はない。一方、海外では様々な遺伝子型の NDV が分離され、これらウイルスに対するワクチン有効性の検証成績が多数報告されている⁶⁾⁻⁹⁾。我が国においても、野外で流行する APMV-1 の性状を正確に把握し、防疫対策の主軸である現行ワクチンの有用性を継続して調査しておくことが重要であると考えられる。

本研究において、2018-2020 年度にかけて鹿児島県出水平野の野鳥の越冬地における APMV-1 の疫学調査を実施し、分離されたウイルスの性状解析を実施した。近隣諸国の野生水禽類で循環する低病原性あるいは非病原性 APMV-1 が野鳥の渡りとともに出水平野に侵淫していることを明らかにした。一方、本調査では高病原性 APMV-1 (NDV) は分離されなかった。出水平野に飛来する野生水禽の営巣地である東アジアでは、野鳥から NDV が近年も分離されている。そのため、出水平野周辺地域の養鶏場へのウイルス侵入防止対策の徹底が重要であり、今後も同地域に侵淫する APMV-1 の監視を継続する必要があると考えられる。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただきました公益財団法人サンケイ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

6. 引用文献

1. Alexander DJ. 1995. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. J Comp Pathol. 112(2): 105-126.

2. Okuya K, Kawabata T, Nagano K, Kohara K, Kusumoto I, Takase K, Ozawa M. 2015. Isolation and characterization of influenza A viruses from environmental water at an overwintering site of migratory birds in Japan. *Arch Virol.* 160: 3037–3052.
3. Liu H, Zhao Y, Zheng D, Lv Y, Zhang W, Xu T, Li J, Wang Z. 2011. Multiplex RT–PCR for rapid detection and differentiation of class I and class II Newcastle disease viruses. *J Virol Methods.* 171: 149–155.
4. 鶏病研究会. 総合ワクチネーションプログラム 2017. 鶏病研究会報, 53-2, 82–95
5. Mase M, Kanehira K. 2015. Surveillance of avian paramyxovirus serotype-1 in migratory waterfowls in Japan between 2011 and 2013. *J Vet Med Sci.* 77(3): 381–385.
6. Liu XF, Wan HQ, Ni XX, Wu YT, Liu WB. 2003. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985–2001. *Arch Virol.* 148(7): 1387–1403.
7. Miller PJ, King DJ, Afonso CL, Suarez DL. 2007. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine.* 25(41): 7238–7246.
8. Dortmans JC, Venema–Kemper S, Peeters BP, Koch G. 2014. Field vaccinated chickens with low antibody titres show equally insufficient protection against matching and non–matching genotypes of virulent Newcastle disease virus. *Vet Microbiol.* 172(1–2): 100–107.
9. Sarcheshmei M, Dadras H, Mosleh N, Mehrabanpour MJ. 2016. Comparative Evaluation of The Protective Efficacy of Different Vaccination Programs Against a Virulent Field Strain of the Newcastle Disease Virus in Broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science.* 18(03): 363–370.

Characterization of Newcastle disease virus isolates from wild birds

Yoshikazu Fujimoto

Transboundary Animal Diseases Research Center, Joint Faculty of Veterinary Medicine,
Kagoshima University

Newcastle disease (ND) viruses, formerly known as avian paramyxovirus serotype 1 (APMV-1) viruses, cause serious economic losses in the poultry industry worldwide. In this study, we surveyed APMV-1 in wild birds in winter during their migratory seasons in the Izumi plain, Kagoshima prefecture, Japan. Among 11 strains of APMV-1 isolates, four strains were classified as subtype class I and seven strains were classified as class II genotype Ib. All isolates were closely related to virus strains circulating in waterfowl in Far East Asian countries. Neutralization titer of sera from chickens that had received ND vaccination against APMV-1 isolates showed less than 10 times (under the detection limit). These results suggest that various genotypes of APMV-1 are prevalent in the Izumi plain in Kagoshima Prefecture. It is important to continue the surveillance of APMV-1/ND viruses in this area and the evaluation of vaccine efficacy against the virus isolates to prevent ND outbreaks.