

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05260

研究課題名(和文) アジア・アフリカの研究者との連携による重要家禽疾病の疫学調査研究

研究課題名(英文) Epidemiological surveillance study in collaboration with researchers in African and Asian countries for important poultry diseases

研究代表者

小川 晴子 (OGAWA, HARUKO)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：10400079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：アジア・アフリカの研究者と協力し、高病原性鳥インフルエンザウイルス及びニューカッスル病ウイルスについて各国で疫学調査研究を実施した。分離ウイルスについてウイルス学および遺伝学的に詳細に調べ、ウイルスの由来、進化、病原性などについて解析した。多くの遺伝子系統のH5亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに反応するモノクローナル抗体を作出し、診断への応用を目指している。エジプト及びキルギスのニューカッスル病ウイルスは、ワクチン株と遺伝的に大きく異なり、ワクチン効果の減弱の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：International collaborative studies were performed on the epidemiological surveillance of the highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) and Newcastle disease virus (NDV) in Vietnam, Egypt, and Kyrgyz. Virological and genetical analyses were conducted on the isolated viruses, and the viral origin and evolution, and viral pathogenicity were further analyzed. Monoclonal antibodies reacting with various genotypes of H5 HPAIV were produced, which may be utilized in the diagnosis of HPAIV. The NDV strains obtained in Egypt and Kyrgyz were genetically distinct from the vaccine strains, suggesting a possible reduction in vaccine efficacy.

研究分野：ウイルス学、免疫学

キーワード：ウイルス 感染症 疫学 進化 家禽 鳥インフルエンザ ニューカッスル病

1. 研究開始当初の背景

家禽は、先進国、途上国を問わず、重要なタンパク質供給源の一つである。その家禽に対して甚大な被害をもたらす疾病として、高病原性鳥インフルエンザおよびニューカッスル病があげられる。いずれも病原性の強いウイルスの感染伝播によって引き起こされるため、その制御は世界共通の重要課題である。また、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染は人へも致死的な病気を引き起こすことから、その制御は公衆衛生上も重要である。2003年に始まった高病原性鳥インフルエンザの世界的流行を背景に、世界中で家禽や野鳥の疫学調査研究が精力的に行われた。その結果、鳥インフルエンザウイルスならびにニューカッスル病ウイルスに関する新たな学術的情報が過去にないスピードで蓄積され、この分野の研究の発展および疾病制御に大きく貢献したと考えられる。しかし、高病原性鳥インフルエンザの初発生から時が経過し、感染拡大がある程度抑えられ、疫学調査研究の機運は衰えつつあるように感じられる。野外の疫学調査研究には、膨大な労力と資金が求められるため、継続するのは難しいのも現実である。一方、アジアやアフリカでは、完全な封じ込めが果たせないままに、高病原性鳥インフルエンザやニューカッスル病が常在化している国々が存在する。それらの国々では、両疾病の予防のために家禽へワクチン接種が行われているが、完全には発生が抑えられない状況が続いている。ウイルスの感染が繰り返されるとその過程で変異ウイルスが生まれ、その結果、偶発的に病原性や伝播性が高まったウイルスが生まれて新たな脅威となる可能性がある。さらに懸念されるのは、それらのウイルスが野鳥等によって越境性に伝播される可能性がある点である。実際のところ、過去に我が国に高病原性鳥インフルエンザウイルスが侵入したはずれの事例でも、野鳥によって海外からウイルスが伝播されたと考えられている。

このような背景のもと、高病原性鳥インフルエンザやニューカッスル病のような重要家禽疾病を制御するには、国内の対策だけでなく世界的視野に立った継続的な監視が必要であり、多国間の協力関係の構築が極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究は、アジア及びアフリカ地域の研究者と協力して、高病原性鳥インフルエンザおよびニューカッスル病について海外疫学調査を実施し、各地域におけるウイルス進化に関する新たな疫学的情報を蓄積し、疾病制御に寄与することを目的とした。

私達は、アジアを中心とした高病原性鳥インフルエンザの発生拡大を背景に、約10年前から北海道東部地域で、野鳥の鳥インフルエンザウイルス疫学調査研究を実施してきた。疫学調査を通じて交流の機会をもった、

アラスカ地域の米国研究者らとともにアラスカ・ロシア・アジア環太平洋地域における野鳥のインフルエンザサーベイランス研究も行ってきた。さらに、高病原性鳥インフルエンザやニューカッスル病の発生が続くベトナム、エジプト、ブルキナファソ、インドネシアなどの国々の研究者との研究交流も行なってきた。アジア・アフリカの国々では、経済発展を背景に畜産振興が続いているが、家畜防疫・衛生の知識と技術が未だ不十分なために、家畜や家禽の感染症が制御しきれない状況が続いている。特に高病原性鳥インフルエンザやニューカッスル病は家禽に重篤な疾病を引き起こし、甚大な経済的被害をもたらすため、発生が続くことはその国にとって大きな問題となる。加えて、病原ウイルスが野鳥によって運ばれる越境性疾病であることから、その制御には国際的な協力が不可欠である。国際的な視野に立ってアジア・アフリカ地域の越境性動物疾病の制御に取り組むことは、発展途上にある国々を利するにとどまらず、我が国を含む地域全体の家畜・家禽産業を発展させ、人の健康を守ることにつながる。

本研究では、アジア・アフリカ地域に存在する家畜・家禽疾病の問題が根本的に解決される事を最終目標とし、各国の研究者と共に高病原性鳥インフルエンザおよびニューカッスル病について疫学調査研究を実施する。新たな学術的知見の蓄積とともに、海外研究者との信頼関係とネットワークの構築に努め、将来的に国際共同研究の研究拠点となることを目指している。

3. 研究の方法

ベトナムの国立獣医学研究所、エジプトのサウスバリー大学、キルギスの獣医学研究所の研究者と協力し、高病原性鳥インフルエンザおよびニューカッスル病について各国で疫学調査研究を実施した。いずれの国の研究者も、過去に当研究室における研究経験を持ち、その後も継続した研究交流を保ってきた。本研究については、各国研究者が所属する研究機関と共同研究契約書及び材料提供同意書を取り交わし、研究試料の日本への輸送は法に従い実施した。

ベトナムにおける検体収集は、家禽飼養地域、生鳥市場及びその周辺で行い、現地においてそれら検体からウイルス分離試験を行った。検体としては、家禽個体からのスワブ検体に加え、飼養集団の糞便や飲水などの環境検体も採集した。野鳥生息地域の環境検体も採集した。環境検体は、赤血球へのウイルス吸着を用いて濃縮して試験に供した。ベトナムへは、日本から大学院生を派遣し、野外における検体収集や実験室内での試験について現地研究者と共に作業を行った。キルギスおよびエジプトでは、ワクチン接種によって予防が行われているにもかかわらずニューカッスル病の発生があった農場において

検体採集を行った。死亡または淘汰された家禽の臓器を採取して乳剤化し、ウイルス分離試験を行った。遺伝子検査でニューカッスル病ウイルスの存在を確認した検体を日本へ送付した。日本では、海外から受け入れた検体から分離したウイルスについて、次世代シーケンス解析により全遺伝子配列を明らかにし、ウイルスの病原性の推測を行うとともに、分子疫学的にウイルスの進化について解析した。鶏胚を用いた病原性解析、抗血清を用いた抗原性解析も行った。さらに、ウイルスに対するモノクローナル抗体を作製してワクチン株との抗原性の違いについて解析を行った。

4. 研究成果

(1) アジア地域における高病原性鳥インフルエンザの発生例では、原因ウイルスが H5N1 亜型ウイルスから H5N6 亜型ウイルスへと変化してきており、昨年我が国へ侵入したウイルスも H5N6 亜型ウイルスであった。本研究においても、ベトナムの家禽から H5N6 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離された。生鳥市場で採取した環境検体からも H5 亜型ウイルスの遺伝子が検出された。ベトナムでは、顕著な発生例は減少しているものの未だ H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスが循環しており、変異の蓄積によってさらなる進化を遂げる可能性が危惧された。野外調査の現場において、迅速かつ簡便に H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの存在を確認できる方法があれば広く野外へ応用でき、疫学情報の収集に大きく寄与すると考えられる。既存の簡易診断キットは、インフルエンザウイルスの存在は確認できても、高病原性ウイルスであるかは判定できない。そこで、H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを野外で検出するための診断キットの開発を目標に、モノクローナル抗体の作製を行った。作製したモノクローナル抗体と様々なウイルス株との反応性を調べた結果、広い遺伝子系統の H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに反応するモノクローナル抗体を選抜できた。野外応用可能な診断キットの開発に向けて研究を推進している。

(2) キルギス及びエジプトにおいて、ワクチン接種された農場におけるニューカッスル病発生例から、多数の強毒性ニューカッスル病ウイルスを分離した。キルギスの家禽検体から分離されたニューカッスル病ウイルスは、中国分離株に近縁の遺伝子型 d に属するウイルスであることが明らかとなった。過去にキルギスで分離されたニューカッスル病ウイルスとは遺伝子系統がやや異なることから、国外から新たなウイルスが侵入した可能性が考えられた。エジプト分離ウイルスも多くが遺伝子型 d に属したが、遺伝子型の異なるウイルスとの共感染が確認された

個体も存在した。他のウイルスとの共感染が確認された個体も存在した。キルギス分離株、エジプト分離株のいずれも、ワクチン株とは遺伝的に大きく異なっており、中和抗体の認識部位のアミノ酸に変異も確認された。ウイルスの抗原性がワクチン株とどれほど異なるのかを確認するためにモノクローナル抗体の作製を進めている。

(3) 本研究において、海外研究者とともに疫学調査研究を実施することにより、より一層の信頼関係を構築することができた。高病原性鳥インフルエンザ及びニューカッスル病は、いずれも越境性の重要家禽疾病であり、その制御に向けて国際協力が必須であるという点についての共通認識を再確認した。構築された協力関係およびネットワークを基盤に、より大きな国際共同研究へ発展させたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件) 全て査読有

Gronsang D, Bui AN, Trinh DQ, Bui VN, Nguyen KV, Can MX, Omatsu T, Mizutani T, Nagai M, Katayama Y, Thampaisarn R, Ogawa H, Imai K. Characterization of cross-clade monoclonal antibodies against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus and their application to the antigenic analysis of diverse H5 subtype viruses. Arch. Virol. 162, 2257-2269, 2017.

DOI:10.1007/s00705-017-3350-0
Bui VN, Trinh DQ, Abao LNB, Ozeki Y, Runstadler J, Nakamura K, Ogawa H, Imai K. Evaluation of the replication and pathogenicity of a variant avian paramyxovirus serotype 6 in mice. Arch. Virol. 162, 3035-3043, 2017.

DOI:10.1007/s00705-017-3459-1
Sharshov KA, Yurlov AK, Li X, Wang W, Li L, Bi Y, Liu W, Saito T, Ogawa H, Shestopalov AM. Avian influenza virus ecology in wild birds of Western Siberia. Avian Res. 8, 12, 2017.

DOI:10.1186/s40657-017-0070-9
Bui VN, Nguyen KV, Pham NT, Bui AN, Dao TD, Nguyen TT, Nguyen HT, Trinh DQ, Inui K, Uchiumi H, Ogawa H, Imai K. Potential of electrolyzed water for disinfection of foot-and-mouth disease virus. J. Vet. Med. Sci. 79(4), 726-729, 2017.

DOI:10.1292/jvms.16-0614
Thampaisarn R, Bui VN, Trinh DQ, Nagai M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y,

Gronsang D, Le DHT, Ogawa H, Imai K. Characterization of avian paramyxovirus serotype 14, a novel serotype, isolated from a duck fecal sample in Japan. *Virus Res.* 228, 46-57, 2017.
DOI:10.1016/j.virusres.2016.11.018
Sultan S, Bui VN, Hill NJ, Hussein ITM, Trinh DQ, Inage K, Hashizume T, Runstadler JA, Ogawa H, Imai K. Genetic characterization of H5N2 influenza viruses isolated from wild birds in Japan suggests multiple reassortment. *Arch. Virol.* 161(12), 3309-3322, 2016.
DOI:10.1007/s00705-016-3023-4
Baatartsogt T, Bui VN, Trinh DQ, Yamaguchi E, Gronsang D, Thampaisarn R, Ogawa H, Imai K. High antiviral effects of hibiscus tea extract on the H5 subtypes of low and highly pathogenic avian influenza viruses. *J. Vet. Med. Sci.* 78(9), 1405-1411, 2016.
DOI:10.1292/jvms.16-0124
Reeves AB, Poulson RL, Muzyka D, Ogawa H, Imai K, Bui VN, Hall JS, Pantin-Jackwood M, Stallknecht DE, Ramey AM. Limited evidence of intercontinental dispersal of avian paramyxovirus serotype 4 by migratory birds. *Infect. Genet. Evol.* 40, 104-108, 2016.
DOI:10.1016/j.meegid.2016.02.031
Trinh DQ, Ogawa H, Bui VN, Nguyen TT, Gronsang D, Baatartsogt T, Kizito MK, AboElkhair M, Yamaguchi S, Nguyen VK, Imai K. Development of a blocking latex agglutination test for the detection of antibodies to chicken anemia virus. *J. Virol. Methods* 221, 74-80, 2015.
DOI:10.1016/j.jviromet.2015.04.027
Sassa Y, Bui VN, Saitoh K, Watanabe Y, Koyama S, Endoh D, Horie M, Tomonaga K, Furuya T, Nagai M, Omatsu T, Imai K, Ogawa H, Mizutani T. Parrot bornavirus-2 and -4 RNA detected in wild bird samples in Japan are phylogenetically adjacent to those found in pet birds in Japan. *Virus Genes* 51(2), 234-243, 2015.
DOI:10.1007/s11262-015-1240-7

〔学会発表〕(計 10 件)

尾關佑樹, Dao DT, 五島万記子, 大松勉, 片山幸枝, 水谷哲也, 小川晴子, 今井邦俊. 十勝地方の野生水鳥から分離された低病原性 H5N2 亜型鳥インフルエンザウイルス(AIV)の Mausにおける馴化とその遺伝子学的特徴. (口演) 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017/9/13-15, 鹿児島市
五島万記子, 尾關佑樹, Dao DT, 大松勉,

片山幸枝, 水谷哲也, 小川晴子, 今井邦俊. 島根で分離されたハクチョウ由来低病原性 H5N3 亜型鳥インフルエンザウイルスの Mausにおける馴化と遺伝子学的特徴. (口演) 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017/9/13-15, 鹿児島市
山口英美, 藤井啓, 門平睦代, 小川晴子, 今井邦俊. 野生アライグマから検出されたインフルエンザ A ウイルス遺伝子の解析. (口演) 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016/9/6-7, 藤沢市
是枝幸太郎, Bui VN, Trinh DQ, 尾關佑樹, 大松勉, 片山幸枝, 水谷哲也, 小川晴子, 今井邦俊. 野生水鳥由来の H5N2 亜型低病原性鳥インフルエンザウイルス(AIV)の Maus継代感染による遺伝子変異と病原性の変化. (口演) 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016/9/6-7, 藤沢市
Dao DT, Bui VN, Nguyen KV, Pham NT, Bui AN, Nguyen TT, Nguyen HT, 内海洋, 小川晴子, 今井邦俊. Evaluation of acidic and alkaline electrolyzed water (EW) for the disinfection potential on Foot and Mouth Disease virus (FMDV). (口演) 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016/9/6-7, 藤沢市
Thampaisarn R, 小川晴子, Bui VN, 長井誠, 水谷哲也, 大松勉, 片山幸枝, Trinh DQ, 今井邦俊. Characterization of a proposed novel avian paramyxovirus serotype 14 isolated from a duck fecal sample. (口演) 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016/9/6-7, 藤沢市
Dulyatad G, Trinh DQ, 小川晴子, 今井邦俊. Production of monoclonal antibodies (mAbs) against hemagglutinin (HA) of H5N1 avian influenza virus (AIV) and antigenic analysis of the H5 viruses using the mAbs. (口演) 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015/9/7-9, 十和田市
Baatartsogt T, 小川晴子, 今井邦俊. Antiviral effects of the herbal teas against H5 subtype low and highly pathogenic avian influenza viruses (AIVs). (口演) 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015/9/7-9, 十和田市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 晴子 (OGAWA HARUKO)
帯広畜産大学・動物・食品検査診断センター・教授
研究者番号: 10400079

(2) 研究分担者

水谷 哲也 (MIZUTANI TETSUYA)
東京農工大学・農学部・教授
研究者番号: 70281681

(3)連携研究者

今井 邦俊 (IMAI KUNITOSHI)

帯広畜産大学・動物・食品検査診断センター・教授

研究者番号： 70374767

大松 勉 (OHMATSU TSUTOMU)

東京農工大学・農学部・講師

研究者番号： 60455392

(4)研究協力者

Jonathan Runstadler

(ジョナサン ランスタドラー)

マサチューセッツ工科大学・准教授

Bui Nghia Vuong

(ブイ ニア ヴォン)

ベトナム国立獣医学研究所・ウイルス学
研究部門長