

平成 2 5 年 3 月 8 日

平成 2 4 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業
研究実績報告書

課題番号：2305

「弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルスの家きん肉内への出現の検証」

研 究 期 間：平成 2 3 年度～平成 2 4 年度（2 年間）

研究総括者名：西藤 岳彦

試験研究機関名：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所

I. 全体計画

1. 研究目的

本課題においては、弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルスが、単独感染で感染鶏の筋肉内に出現するか否かを明らかにする。さらに、鶏呼吸器疾患関連細菌との共感染により弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルスが感染鶏の筋肉内に移行するか否かを明らかにする。これまでの報告によれば、弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルスが単独感染で筋肉内に出現する可能性は低いと考えられる。しかしながら、そのような事象の有無を確認することは、我が国の現行の防疫措置を評価するにあたり重要な知見である。また、野外での実情を鑑みた際に、呼吸器疾患関連細菌の多くはタンパク分解酵素を産生しており、このような酵素による試験管内でのインフルエンザウイルス赤血球凝集素タンパク質の開裂活性化や、感染実験によるインフルエンザ性肺炎の増悪が知られている。このため、呼吸器疾患関連細菌と弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルスの共感染によって、鶏体内でのウイルス増殖が増強され、その結果ウイルスが鶏筋肉内に出現する可能性が考えられる。そこで野外で鶏に感染しそれ自体では重篤な症状を呈しない細菌と弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルスの共感染実験系を確立し、そのような条件下でのウイルス体内動態を検索する。

2. 研究内容

(1) 中課題1：弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5及びH7）の鶏におけるウイルス増殖能の検証

1) 小課題1：弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5及びH7）鶏実験感染系の確立

複数のH5及びH7亜型の弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス株を検索対象ウイルスとして選定し、それぞれ 10^6 EID₅₀（50%発育鶏卵感染量）のウイルスを、経鼻投与し各ウイルスの体内動態を明らかにする。すなわち、一群9羽の4週齢白色レグホン鶏にウイルスを感染後、2日、4日及び6日後に経時的に3羽ずつ安楽死させ、剖検後主要臓器を採取する。各臓器におけるウイルスの動態をウイルス力価測定、遺伝子検出、免疫組織染色法を行うことによって検索する。これらの検索によって、弱毒タイプウイルス単独での感染によって筋肉からウイルスが検出されるか否かを明らかにする。単独感染によって筋肉への移行が認められた場合、そのウイルスを以降の実験に用いることによって鶏呼吸器疾患関連細菌の複合感染による、ウイルスの筋肉内での増殖の増強の有無を解析する。単独感染による筋肉への移行が認められなかった場合、H5及びH7亜型ウイルスからそれぞれ一株、呼吸器での増殖能の最も高いウイルスを選抜し、以降の実験に用いることとする。

(2) 中課題2：弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5及びH7）と鶏呼吸器疾患関連細菌が複合感染した場合の筋肉中におけるウイルス出現・増殖の検証

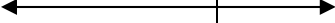
1) 小課題1：鶏呼吸器疾患関連細菌による鶏群感染実験系の確立

野外での細菌性鶏呼吸器疾患の状況を検討することによって、対象とする細菌種を決定する。現在の予備調査の結果から、マイコプラズマが適切であろうと想定している。想定される細菌複数種をそれぞれ鶏に投与することによって、感染後の呼吸器官における細菌増殖の解析を行い、実験に使用する細菌を選抜する。選抜基準としては、呼吸器官において典型的病理変化を呈し、十分量の細菌増殖が認められること、重篤な臨床所見を伴わないこと、急性致死性の感染帰結を取らないこと、等を基準とする。細菌の増殖の測定および病理診断法として、摘出臓器からの細菌回収や特異抗体による免疫組織染色を用いる。

2) 小課題 2 : 鶏呼吸器疾患関連細菌と弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5 及び H7) の共感染による鶏体内でのウイルス増殖

上記 1 - (1)、および 1 - (2) でそれぞれ確立された弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス感染実験系、および細菌感染系に基づき、ウイルスと細菌の共感染を行う。感染の組み合わせとしては、1) ウイルス感染後、ウイルス増殖が最大であると考えられる時点で、細菌を共感染させる、2) 細菌感染後、細菌増殖が最大であると考えられる時点で、ウイルスを共感染させる、3) ウイルス、細菌の増殖が最大になる時点が一致するようなタイミングで、両者を感染させる、等の時間差、またはまったく同時に両者を感染させるという条件で行う。ウイルス感染後経時的に複数の鶏を安楽死させ、剖検後主要臓器を採取する。各臓器におけるウイルスの動態をウイルス力価測定、遺伝子検出、組織免疫染色法を行うことによって検索する。これらの検索によって、弱毒タイプウイルス単独での感染によって筋肉からウイルスが検出されるか否かを明らかにする。

3. 年次計画

研究課題	23年度	24年度	25年度	計
1 弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5及びH7）の鶏におけるウイルス増殖能の検証 （1）弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5及びH7）鶏実験感染系の確立 2 弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5及びH7）と鶏呼吸器疾患関連細菌が複合感染した場合の筋肉中におけるウイルス出現・増殖の検証 （1）鶏呼吸器疾患関連細菌による鶏群感染実験系の確立 （2）鶏呼吸器疾患関連細菌と弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5 及び H7）の共感染による鶏体内でのウイルス増殖				
合 計	20,500	20,100		

4. 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	(独) 農研機構 動物衛生研究所	西藤 岳彦		10
1. 弱毒タイプ高病原性鳥 インフルエンザウイルス (H5 及び H7) の鶏におけ るウイルス増殖能の検証	動物衛生研究所	○	内田 裕子	15
(1) 弱毒タイプ高病原性 鳥インフルエンザウイル ス (H5 及び H7) 鶏実験感 染系の確立	動物衛生研究所	△	竹前 喜洋	15
2. 弱毒タイプ高病原性鳥 インフルエンザウイルス (H5 及び H7) と鶏呼吸器 疾患関連細菌が複合感染 した場合の筋肉中におけ るウイルス出現・増殖の検 証	動物衛生研究所	○	内田 裕子	前出
(1) 鶏呼吸器疾患関連細 菌による鶏群感染実験系 の確立	動物衛生研究所	△	小林 秀樹	10
(2) 鶏呼吸器疾患関連細 菌と弱毒タイプ高病原性 鳥インフルエンザウイル ス (H5 及び H7) の共感染 による鶏体内でのウイル ス増殖	動物衛生研究所	△	竹前 喜洋	前出

研究担当者欄について、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

合計 10 株 (表 1a) の H5 及び H7 亜型低病原性鳥インフルエンザウイルス (LPAIV ; 平成 24 年の家畜伝染病予防法改正により弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルスの名称が低病原性鳥インフルエンザウイルスに変更) を用いた鶏感染実験によって、LPAIV の鶏でのウイルス増殖性を検討した。それぞれ 10^6 50% Egg infectious dose (EID_{50}) のウイルスを、鶏に経鼻接種し、感染 2、4、6 日後の肺、胸筋、大腿筋および気管でのウイルス増殖を解析した (表 2)。その結果、H5 亜型 LPAIV A/turkey/Virginia/505477-17/2007 感染鶏で、感染 2 日後に 3 羽中 2 羽の肺からウイルスが分離されるとともに 12 羽中 1 羽において胸筋、大腿筋からウイルスが、2 羽からリアルタイム PCR でウイルス遺伝子が検出された (IV-1-(1))。また、ウイルス又はウイルス遺伝子が検出された胸筋、大腿筋で免疫組織化学的手法によってウイルス抗原が検出された (図 1)。これらの結果、ウイルス分離、遺伝子検出およびウイルス抗原検出という複数の方法によって、H5N1 亜型の LPAIV である A/turkey/Virginia/505477-17/2007 を経鼻感染させた鶏において、低頻度ではあるがウイルスの筋肉への移行が起こることが示された。また、筋肉に移行したウイルスの赤血球凝集素タンパク質の開裂部位のアミノ酸配列は弱毒型の配列を維持していた (図 2)。

呼吸器感染を引き起こす細菌の混合感染によって、LPAIV の筋肉への移行が増強されるか否かを検討するために、はじめにマイコプラズマの感染実験系を確立した。表 1b に示す *Mycoplasma gallisepticum* (MG) 4 株および *Mycoplasma synoviae* (MS) 3 株の気管内接種によって、感染 7 日後の気管、肺での菌の増殖が確認された (IV-2—(1)、図 3)。MG、MS のそれぞれの菌株の中で気管、肺で高い菌数を示した *Mycoplasma gallisepticum* R 株および *Mycoplasma synoviae* 1-3-SN 株を LPAIV との共感染試験に用いることとした。

LPAIV 感染一週間前に $2 \times 10^6 \sim 7 \times 10^7$ コロニー形成単位 (CFU) のマイコプラズマ株を気管内接種した鶏に、再度マイコプラズマ株を接種するとともに、H5 亜型の LPAIV である A/turkey/Virginia/505477-17/2007, A/chicken/Ibaraki/1/2005, H7 亜型 LPAIV A/chicken/Arkansas/918-10/2008 をそれぞれ経鼻接種した鶏で、マイコプラズマ共感染のウイルスの筋肉への移行を検討した (IV-2—(2)、表 3)。その結果、マイコプラズマの共感染は LPAIV の筋肉への移行を増強しなかった。

マイコプラズマ共感染実験において、H5 亜型の LPAIV である A/turkey/Virginia/505477-17/2007, H7 亜型 LPAIV A/chicken/Arkansas/918-10/2008 をそれぞれ気管内に接種することにより、気管からのウイルス分離率が上昇する傾向が認められたが、ウイルスの筋肉への移行は増強されなかった (IV-2—(2)、表 4)。

以上、今回用いたすべての LPAIV の鶏への感染による筋肉へのウイルス以降の結果をまとめると (表 5)、A/turkey/Virginia/505477-17/2007 の気管内接種で、54 羽中 1 羽の胸筋、大腿筋からウイルスが分離され、胸筋で 2 羽、大腿筋で 4 羽からウイルス遺伝子が検出された。ウイルス遺伝子が検出された胸筋では、2 羽中 1 羽、大腿筋では 4 羽中 3 羽でウイルス抗原が検出された。同ウイルスの気管内接種では、27 羽中 1 羽で大腿筋からウイルス遺伝子が検出された。その他のウイルスの感染では、筋肉へのウイルス移行は認められなかった。

2. 成果の活用

LPAI 発生国からの家きん生肉の輸入に関して、現行の防疫措置の評価を行う際の科学的背景の資料として活用される。

表1a 使用したウイルス株

株名	亜型	略号	供与機関
A/Turkey/Virginia/505477-17/2007	H5N1	Turkey/VA/07	National Veterinary Services Laboratories
A/Pheasant/Idaho/2590-63/2008	H5N8	Pheasant/ID/08	National Veterinary Services Laboratories
A/Wild Bird/South Dakota/2307-3/2007	H5N2	W.Bird/SD/07	National Veterinary Services Laboratories
A/Muscovy Duck/New Jersey/912-1/2008	H5N2	M. duck/NJ/08	National Veterinary Services Laboratories
A/Duck/New York/2670-2/2009	H5N2	Duck/NY/09	National Veterinary Services Laboratories
A/Duck/Pennsylvania/34322-1/2009	H5N2	Duck/PA/09	National Veterinary Services Laboratories
A/Chicken/Ibaraki/1/2005	H5N2	Ck/Ibaraki/05	動物衛生研究所
A/Turkey/Nebraska/505577-3/2007	H7N9	Turkey/NE/07	National Veterinary Services Laboratories
A/Chicken/Arkansas/918-10/2008	H7N3	Ck/AR/08	National Veterinary Services Laboratories
A/Turkey/Minnesota/14135-4/2009	H7N9	Turkey/MN/09	National Veterinary Services Laboratories

表1b 使用した菌株

株名	種	供与機関
C5PT	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	動物医薬品検査所
KP-13	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	動物医薬品検査所
KP-13	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	全農家畜衛生研究所
R	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	インターベット中央研究所
WVU1853	<i>Mycoplasma synoviae</i>	動物医薬品検査所
WVU1853	<i>Mycoplasma synoviae</i>	インターベット中央研究所
1-3-SN	<i>Mycoplasma synoviae</i>	全農家畜衛生研究所

表2. LPAIV 感染鶏内でのウイルス増殖及び排泄

グループ	感染後日	肺	胸筋		大腿筋		気管スワブ
		ウイルス分離 ^{*1}	ウイルス分離	qRT-PCR ^{*2}	ウイルス分離	qRT-PCR	ウイルス分離 ^{*3}
Turkey/VA/07	2	2/3 (3.2, 3.0)	1/12 (1.9)	2/12 (2.9, 2.6)	1/12 (2.2)	2/12 (3.2, 3.1)	0/3
	4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Pheasant/ID/08	2	0/3	0/3	N/A ^{*4}	0/3	N/A	1/3 (1.9)
	4	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	6	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
W.Bird/SD/07	2	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	4	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	6	1/3 (1.9)	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
M. duck/NJ/08	2	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	4	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	6	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
Duck/NY/09	2	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	4	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	6	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
Duck/Penn/09	2	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	4	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	6	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
Turkey/NE/07	2	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	4	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	6	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
Ck/AR/08	2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3 (0.9)
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Turkey/MN/09	2	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	4	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3
	6	0/3	0/3	N/A	0/3	N/A	0/3

^{*1}臓器乳剤を10%段階希釈後、発育鶏卵に接種し、ウイルス分離を行った。括弧は、50%卵感染価 ($\log_{10}$ EID₅₀/g) を示す。検出限界: $10^{1.7}$ EID₅₀/g

^{*2}臓器乳剤からRNAを抽出し、cDNA合成後、qRT-PCRを行った。括弧は、接種ウイルスを10倍段階希釈して検量線を引き、各検体のCt値をあてはめた相対50%卵感染価 ($\log_{10}$ EID₅₀/ml) を示す。

^{*3}括弧は、50%卵感染価 ($\log_{10}$ EID₅₀/ml) を示す。検出限界: $10^{0.7}$ EID₅₀/ml

^{*4} データ無し

表3. LPAIV を経鼻接種した際の共感染鶏内でのウイルス増殖及び排泄

グループ	感染後日	肺	胸筋		大腿筋		気管スワブ
		ウイルス分離 ^{*1}	ウイルス分離	qRT-PCR ^{*2}	ウイルス分離	qRT-PCR	ウイルス分離 ^{*3}
Turkey/VA/07	2	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	4	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6 (2.7)	1/6 (2.2)
	6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6 (3.3)	0/6
Turkey/VA/07 + R	2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3 (2.0)
Turkey/VA/07 + 1-3-SN	2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Ck/Ibaraki/05	2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3 (2.8±0.4)
	4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3 (4.3±0.6)
	6	2/3 (2.9, 2.5)	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3 (3.0±0.8)
Ck/Ibaraki/05 + R	2	1/3 (4.2)	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3 (2.4±1.4)
	4	2/3 (7.3, 2.3)	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3 (3.6±0.7)
	6	1/3 (2.9)	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3 (1.9, 2.4)
Ck/AR/08	2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3 (2.5)
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Ck/AR/08 + R	2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3 (1.0, 4.9)
	4	1/3 (3.5)	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3 (2.1, 2.9)
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

*¹臓器乳剤を10%段階希釈後、発育鶏卵に接種し、ウイルス分離を行った。括弧は、50%卵感染価 ($\log_{10}$ EID₅₀/g) を示す。検出限界: $10^{1.7}$ EID₅₀/g

*²臓器乳剤からRNAを抽出し、cDNA合成後、qRT-PCRを行った。括弧は、接種ウイルスを10倍段階希釈して検量線を引き、各検体のCt値をあてはめた相対50%卵感染価 ($\log_{10}$ EID₅₀/ml) を示す。

*³括弧は、50%卵感染価 ($\log_{10}$ EID₅₀/ml) を示す。検出限界: $10^{0.7}$ EID₅₀/ml

表4. LPAIV を気管内接種した際の共感染鶏内でのウイルス増殖及び排泄

グループ	感染後日	肺	胸筋		大腿筋		気管スワブ
		ウイルス分離 ^{*1}	ウイルス分離	qRT-PCR ^{*2}	ウイルス分離	qRT-PCR	ウイルス分離 ^{*3}
Turkey/VA/07	2	3/3 (4.2±1.8)	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3 (1.9, 1.2)
	4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Turkey/VA/07 + R	2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3 (2.8±0.5)
	4	3/3 (4.2±1.2)	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3 (1.3±0.2)
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Turkey/VA/07 + 1-3-SN	2	1/3 (2.2)	0/3	0/3	0/3	1/3 (2.3)	2/3 (0.7, 0.7)
	4	3/3 (2.4±0.4)	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3 (4.0, 3.5)
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Ck/AR/08	2	4/6 (3.6±0.8)	0/6	0/6	0/6	0/6	4/6 (1.7±0.7)
	4	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6 (0.7)
	6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Ck/AR/08 + R	2	3/3 (3.3±0.9)	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3 (1.9±1.0)
	4	1/3 (2.2)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Ck/AR/08 + 1-3-SN	2	3/3 (4.2±0.3)	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3 (2.2, 2.1)
	4	1/3 (4.2)	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3 (1.5, 0.7)
	6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

*1臓器乳剤を10%段階希釈後、発育鶏卵に接種し、ウイルス分離を行った。括弧は、50%卵感染価 ($\log_{10}$ EID₅₀/g) を示す。検出限界: $10^{1.7}$ EID₅₀/g

*2臓器乳剤からRNAを抽出し、cDNA合成後、qRT-PCRを行った。括弧は、接種ウイルスを10倍階段希釈して検量線を引き、各検体のCt値をあてはめた相対50%卵感染価 ($\log_{10}$ EID₅₀/ml) を示す。

*3括弧は、50%卵感染価 ($\log_{10}$ EID₅₀/ml) を示す。検出限界: $10^{0.7}$ EID₅₀/ml

表5. 鶏筋肉内でのウイルス出現頻度

グループ	ウイルス投与方法	胸筋			大腿筋		
		ウイルス分離 ^{*1}	qRT-PCR	抗原検出 ^{*2}	ウイルス分離 ^{*1}	qRT-PCR	抗原検出
Turkey/VA/07	経鼻接種	1/54	2/54	1/2	1/54	4/54	3/4
Turkey/VA/07	気管内接種	0/27	0/27	N/A	0/27	1/27	0/1
Ck/Ibaraki/05	経鼻接種	0/18	0/18	N/A	0/18	0/18	N/A
Ck/AR/08	経鼻接種	0/27	0/27	N/A	0/27	0/27	N/A
Ck/AR/08	気管内接種	0/36	0/36	N/A	0/36	0/36	N/A
Pheasant/ID/08	経鼻接種	0/9	N/A	N/A	0/9	N/A	N/A
W.Bird/SD/07	経鼻接種	0/9	N/A	N/A	0/9	N/A	N/A
M. duck/NJ/08	経鼻接種	0/9	N/A	N/A	0/9	N/A	N/A
Duck/NY/09	経鼻接種	0/9	N/A	N/A	0/9	N/A	N/A
Duck/PA/09	経鼻接種	0/9	N/A	N/A	0/9	N/A	N/A
Turkey/NE/07	経鼻接種	0/9	N/A	N/A	0/9	N/A	N/A
Turkey/MN/09	経鼻接種	0/9	N/A	N/A	0/9	N/A	N/A

^{*1} ウイルス分離陽性検体は、qRT-PCR陽性であり、ウイルス抗原が検出された

^{*2} qRT-PCR陽性検体のみウイルス抗原を検索した

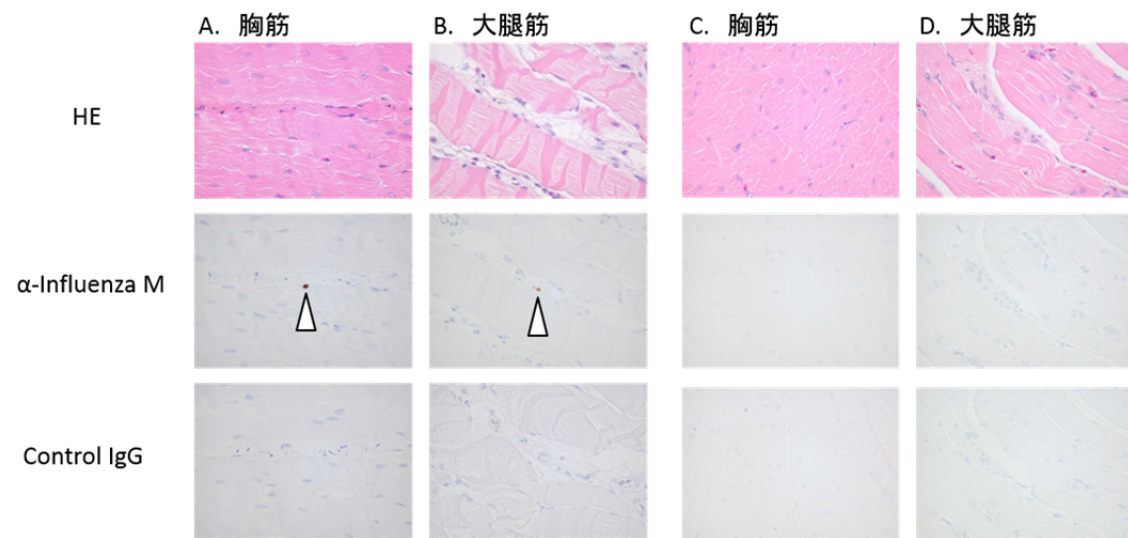


図1. Turkey/VA/07 感染鶏でのウイルス抗原の検出(×400)
 (A-C) Turkey/VA/07 感染 2 日目の鶏 (A) 胸筋及び (B) 大腿筋
 (C-D) 正常鶏 (C) 胸筋及び (D) 大腿筋
 矢頭は、ウイルス抗原を示す

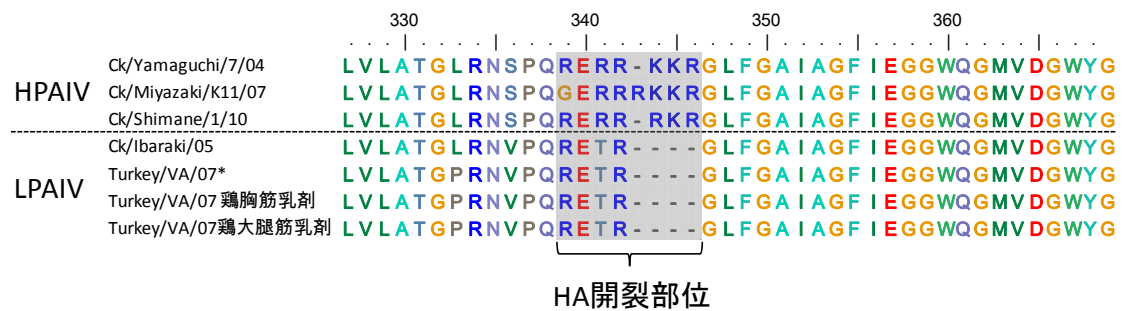


図2. 筋肉乳剤中のウイルス HA 開裂部位のアミノ酸

* 鶏に接種したウイルスの HA 配列を示す。

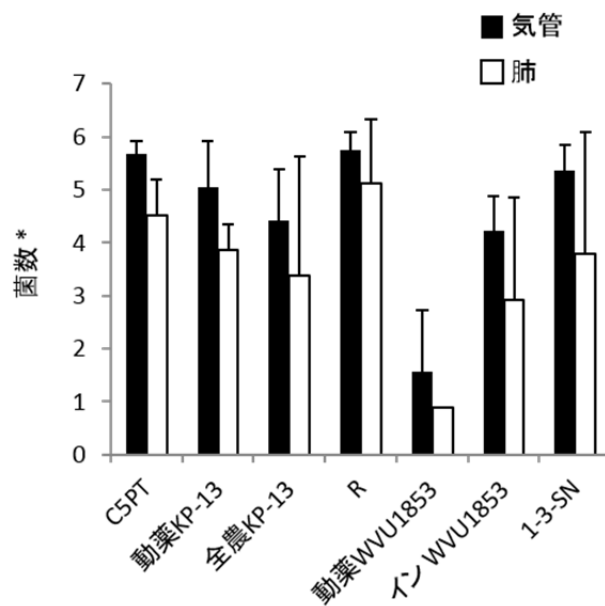


図3. 鶏マイコプラズマ感染鶏 7 日目の気管及び肺内の菌数

*相対菌数値: 接種菌液を 10 倍階段希釈して検量線を引き、各サンプルの Ct 値をあてはめて算出した。

気管内菌数 (CFU/mL), 肺内菌数 (CFU/mL, 100mg)

IV. 研究実績報告

1. 中課題名「弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5 及び H7）の鶏におけるウイルス増殖能の検証」

米国から導入した 9 株の H5 及び H7 亜型低病原性鳥インフルエンザウイルス（LPAIV；平成 24 年の家畜伝染病予防法改正により弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルスの名称が低病原性鳥インフルエンザウイルスに変更）および A/chicken/Ibaraki/1/2005 について発育鶏卵での増殖、ニワトリでのウイルス増殖を調べた。

A/turkey/Virginia/505477-17/2007 は、4 週令白色レグホンへの経鼻感染の結果、ウイルス感染 2 日後に 12 羽中 1 羽において胸筋、大腿筋からウイルスが、2 羽からリアルタイム PCR でウイルス遺伝子が検出された。

(1) 小課題名「弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5 及び H7）鶏実験感染系の確立」

1) 平成 23 年度までの研究実績概要

米国から導入した 6 株の H5 亜型ウイルスおよび A/chicken/Ibaraki/1/2005 について発育鶏卵での増殖、ニワトリでのウイルス増殖を調べた。A/turkey/Virginia/505477-17/2007 は、4 週令白色レグホンへの経鼻感染の結果、ウイルス感染 2 日後に 3 羽中 2 羽の肺、1 羽の直腸からウイルスが検出された。さらに、12 羽中 1 羽において胸筋、大腿筋からウイルスが、2 羽からリアルタイム PCR でウイルス遺伝子が検出された。A/chicken/Ibaraki/1/2005 は、ウイルス感染 6 日後に、3 羽中 2 羽で肺からウイルスが検出されたが、筋肉からはウイルス分離、遺伝子検出はされなかった。その他の 5 株の輸入 H5 ウイルスについては、感染 6 日目の肺で A/wild bird/South Dakota/2307-3/2007 感染の 3 羽中 1 羽でウイルス分離がされた以外は、肺でのウイルス増殖が認められなかった。

以上の結果から、マイコプラズマ共感染実験には A/turkey/Virginia/505477-17/2007、A/chicken/Ibaraki/1/2005 を使用することとした。

2) 平成 24 年度における研究実績概要

米国から導入した 3 株の H7 亜型 LPAIV の経鼻感染試験で、A/Chicken/Arkansas/918-10/2008 を感染させた鶏 9 羽中 1 羽でのみ気管でのウイルス増殖が認められたことから、共感染実験には同ウイルスを用いることとした。

3) 成果の内容

1. H5 亜型 LPAIV A/turkey/Virginia/505477-17/2007 (H5N1) の経鼻感染によって、低い頻度ながら筋肉からウイルスが検出されることが明らかになった。
2. H7 亜型 LPAIV3 株の鶏での増殖性は低く、筋肉へのウイルスの移行も認められなかった。

2. 中課題名「弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5 及び H7）と鶏呼吸器疾患関連細菌が複合感染した場合の筋肉中におけるウイルス出現・増殖の検証」

(1) 小課題名「鶏呼吸器疾患関連細菌による鶏群感染実験系の確立」

1) 平成 23 年度までの研究実績概要

動衛研保有の *Mycoplasma gallisepticum* および *Mycoplasma synoviae* 各 4 株の経

鼻接種では、菌の増殖が認められなかった。一方、外部機関（動物医薬品検査所、全農家畜衛生研究所、インターベット）から導入した *Mycoplasma gallisepticum* 4株および *Mycoplasma synoviae* 3株の気管内接種では、感染7及び9日後の気管、肺での菌の増殖が認められた。これらの結果をもとに、LPAIV との共感染実験には *Mycoplasma gallisepticum* R株および *Mycoplasma synoviae* 1-3-SN株を使用することとした。

2) 平成24年度における研究実績概要

Mycoplasma gallisepticum R株の気管内投与によって、感染7日後に気管、肺、胸筋、大腿筋でマイコプラズマ抗原が免疫組織化学法によって検出された。

3) 成果の内容

1. 気管内投与法による *Mycoplasma gallisepticum* および *Mycoplasma synoviae* の呼吸器感染実験法を確立した。
2. 気管内投与により、*Mycoplasma gallisepticum* R株が全身移行することを示した。

(2) 小課題名「鶏呼吸器疾患関連細菌と弱毒タイプ高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5及びH7）の共感染による鶏体内でのウイルス増殖」

1) 平成23年度までの研究実績概要

A/turkey/Virginia/505477-17/2007 と *Mycoplasma gallisepticum* R株との共感染は筋肉へのウイルス移行を増強しなかった。Ck/Ibaraki/05 (H5N2) 株と *Mycoplasma gallisepticum* R株との共感染でも、ウイルスは筋肉に移行しなかった。しかしながら、共感染により肺でのウイルス増殖を示す個体数の増加が認められた。

2) 平成24年度における研究実績概要

H7 亜型 LPAIV A/Chicken/Arkansas/918-10/2008 と *Mycoplasma gallisepticum* R株および *Mycoplasma synoviae* 1-3-SN株の共感染試験、*Mycoplasma synoviae* 1-3-SN株と H5 亜型 LPAIV A/turkey/Virginia/505477-17/2007 との共感染試験でも、細菌の共感染はウイルスの筋肉への移行を促進しなかった。

3) 成果の内容

1. *Mycoplasma gallisepticum* R株と H5 亜型 LPAIV である A/turkey/Virginia/505477-17/2007、A/chicken/Ibaraki/1/2005 および H7 亜型 LPAIV A/Chicken/Arkansas/918-10/2008 の共感染は、ウイルスの筋肉への移行を増強させなかった。
2. *Mycoplasma synoviae* 1-3-SN株と H5 亜型 LPAIV である A/turkey/Virginia/505477-17/2007、亜型 LPAIV A/Chicken/Arkansas/918-10/2008 の共感染でも、同様の知見を得た。

V. 論文、特許等の実績等

別添のとおり。

別添

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

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