

令和2年及び4年に発生した高病原性鳥インフルエンザ発生事例と検査対応

香川県東部家畜保健衛生所

○中津弥乃梨 上村圭一

1. 背景・目的

香川県では、令和2年に13事例、令和4年に4事例の高病原性鳥インフルエンザが発生した。令和2年11月から発生農場検査、発生状況確認検査、清浄性確認検査及び家きん再導入検査を実施し、令和5年12月に全検査を終了したので、その概要を報告する。

2. 材料・方法

発生に関わる図1のI-Vの検査について、簡易検査、遺伝子検査(リアルタイムPCR(RT-qPCR)、コンベンショナルPCR(cRT-PCR))、ウイルス分離(分離)、抗体検査(ELISA及び寒天ゲル内沈降反応)を実施した(図1.)

図1. 検査項目、検査人員

	簡易検査	遺伝子検査		ウイルス分離(分離)	抗体検査	
		リアルタイムPCR(RT-qPCR)	コンベンショナルPCR(cRT-PCR)		ELISA	寒天ゲル内沈降反応(ゲル沈)
I. 発生農場検査	○	○	○	○	○	○
II. 鶏卵等出荷検査	-	○(M遺伝子)	-	-	-	-
III. 発生状況確認検査	-	-	-	○	○	○
IV. 清浄性確認検査	-	-	-	○	○	○
V. 家きん再導入検査	-	-	-	○	○	○
	検体	気管/クローアカ/環境スワブ			血清	
検査人員	農場立入者	ウイルス、細菌		病理ウイルス細菌	生化学	

2-I. 発生農場検査(図2)：全17事例で簡易検査26~30検体、遺伝子検査のRT-qPCRとcRT-PCR、ウイルス分離は8~26検体、ELISAは10検体で、陽性の場合寒天ゲル内沈降反応を実施した。

2-II. 鶏卵等出荷検査(図3)：RT-qPCRのM遺伝子のみ、令和2年は延べ55農場452検体、令和4年は34農場150検体実施した。

2-III. 発生状況確認検査、IV. 清浄性確認検査、V. 家きん再導入検査(図4)：分離は計267農場、環境スワブ397検体、家きんスワブ2126検体、抗体検査(病性鑑定室実施分)247農場4015検体を実施した。

図2. 発生農場の検査項目及び検体数

事例No.	簡易検査	遺伝子検査		ウイルス分離(分離)	抗体検査		
		リアルタイムPCR (RT-qPCR)	コンベンショナルPCR (cRT-PCR)		ELISA	寒天ゲル内沈降反応(ゲル沈)	
I. 発生農場検査							
1	26	10	10	10	10	0	
2	26	-	-	-	10	0	
3	26	10	10	10	10	0	
4	26	10	10	-	10	0	
5	26	10	10	10	10	4	
6	26	10	10	10	10	0	
7	30	10	10	10	10	0	
8	26	10	10	10	10	0	
9	26	10	10	10	10	1	
10	26	10	10	10	10	5	
11	26	10	10	10	10	0	
12	26	10	10	10	10	0	
13	26	10	10	10	10	1	
R4							
1	26	10	10	10	10	0	
2	26	10	10	10	10	0	
3	26	8	8	8	10	0	
4	26	26	26	26	10	0	

図3. 鶏卵等出荷検査(RT-qPCR)農場数及び検体数

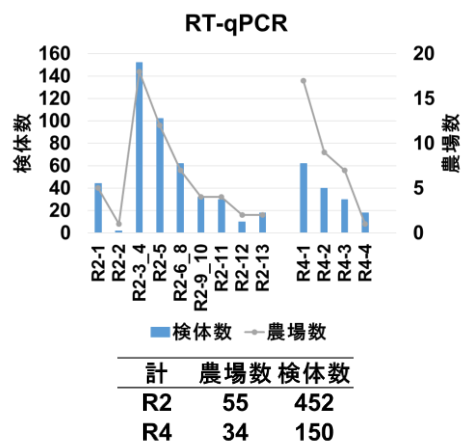


図4. 発生状況確認検査、清浄性確認検査、家きん再導入検査農場数及び検体数

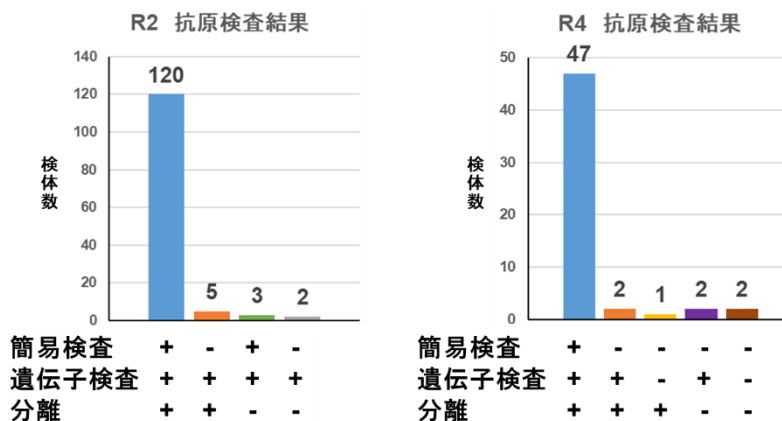
		分離		抗体検査		
		農場数	検体数	農場数	検体数	
発生状況確認検査	R2	115	842	120	2180	
	R4	44	226	45	580	
清浄性確認検査	R2	35	258	35	645	
	R4	47	244	47	610	
家きん再導入検査		農場数	環境スワブ	モニター家きん	農場数	検体数
	R2	19	318	472	-	-
R4	7	79	84	-	-	
計		267	397	2126	247	4015

3. 結果

3-I. 発生農場検査

【簡易検査、遺伝子検査、分離検査】大半が全項目陽性だが、簡易検査陰性でも感度の高い遺伝子検査や分離で12検体陽性となる等、一部検体では各検査の結果が一致しないことを再確認した。

図5. 発生農場検査 抗原検査結果



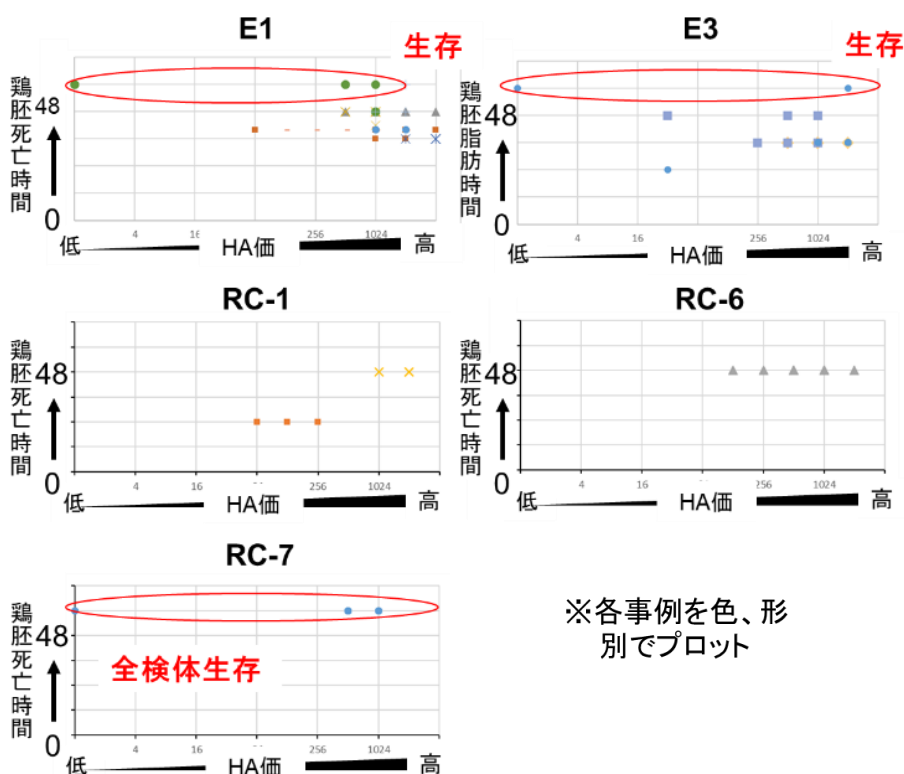
検出されたウイルスは、令和 2 年は H5N8 亜型、令和 4 年は H5N1 亜型であり、その中でも令和 2 年は 2 種類(E1, E3)、令和 4 年は 3 種類(RC-1, RC-6, RC-7)の遺伝子型による発生であった(図 6) [1、2、3]。さらに、鶏へのウイルス接種試験の平均死亡日数の結果から、ウイルス

図 6. 各事例のウイルス詳細

亜型	R2		R4		
	H5N8		H5N1		
事例	1-10	11-13	1, 3	2	4
遺伝子型	E1	E3	RC-1	RC-6	RC-7
平均死亡日数	5.6	3.2	2.0	3.1	2.0

の遺伝子型の違いで鶏の病態が異なることが明らかとなっている。この病原性が分離の鶏胚生死、赤血球凝集 (HA) 価に影響するか調べるため、発生農場検査結果を用いて各遺伝子型の分離結果とウイルス量(M 遺伝子 RT-qPCR の Ct 値)を比較した。はじめに、5 種類の遺伝子型別に鶏胚死亡時間と HA 価の相関を図 7 に示した。鶏胚死亡時間は培養時間 48 時間までで、生存胚を図 7. の赤枠で示す。鶏胚死亡時間は各事例でまとまって分布している印象はあるものの、遺伝子型別で傾向は無く、同一の遺伝子型でも鶏胚死亡時間や HA 価に相関はなかった。さらに、RC-7 株では全検体で鶏胚生存したが高 HA 価を示した。このことから、鶏胚の生死にかかわらず HA 陽性となることが示された。

図 7. 鶏胚死亡時間と HA 価



鶏胚死亡時間と HA 価に相関が無いため、次にウイルス量による影響に着目した。HA 価とウイルス量の相関(図 8)では、各遺伝子型でばらつきが多く、HA 価とウイルス量に相関は認められなかった。また、Ct 値 30 以上の低ウイルス量(図 8 斜線部)でも高 HA 価を示す検体が見受けられた。最後に、鶏胚死亡時間とウイルス量の相関(図 9)について、いずれもばらつきがあり、相関は認められなかった。

以上のことから、今回の検査結果を用いた解析からは、事例と鶏胚死亡時間以外は相関が認められなかった。

図 8. HA 価とウイルス量(Ct 値)の相関の相関

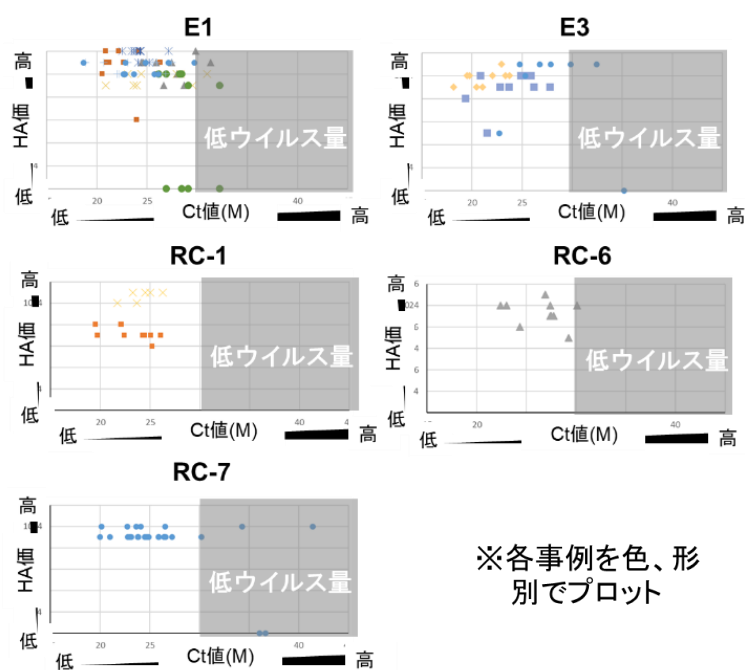
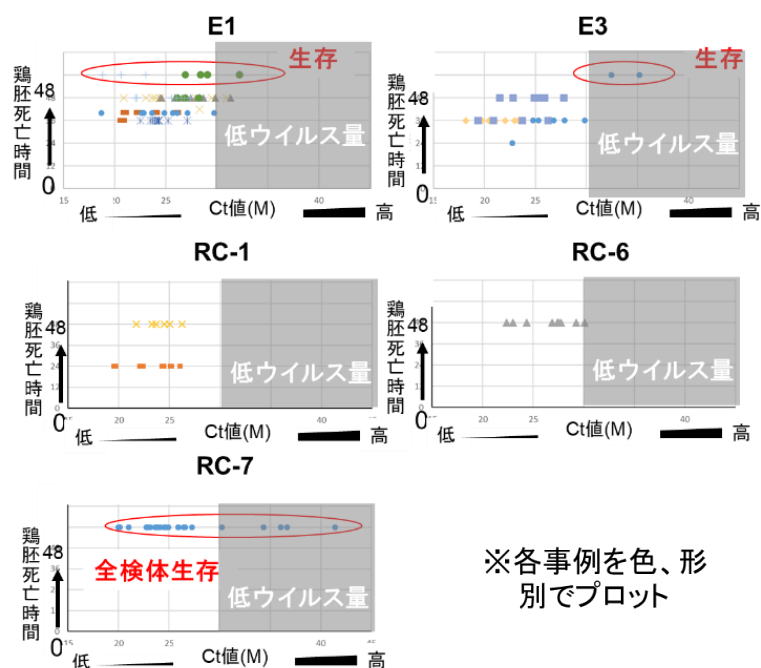
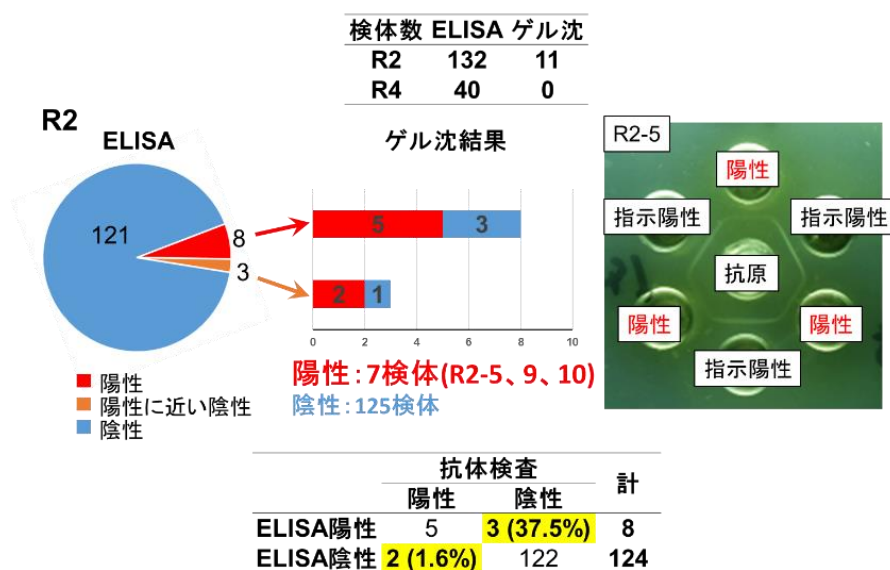


図 9. 鶏胚死亡時間とウイルス量の相関



【抗体検査(図10)】令和2年132検体、令和4年40検体実施し、令和2年の4事例でELISA陽性8検体、陽性に数値が近い陰性3検体となったため、寒天ゲル内沈降反応を実施したところ、陽性像が3事例7検体確認され、抗体検査陽性と判定した。このように、ELISA陽性検体中3検体(37.5%)が寒天ゲル内沈降反応陰性、ELISA陰性検体で2検体(1.6%)が寒天ゲル内沈降反応陽性となった。抗体検査陽性の3事例は、ウイルス感染後抗体産生まで1週間程度のため、感染後1週間経過が示唆された。3事例のウイルスの遺伝子型はE1で、鶏へのウイルス接種後5.6日で死亡する[1]ことから、死亡時期と同時に抗体産生されたと考えられた。

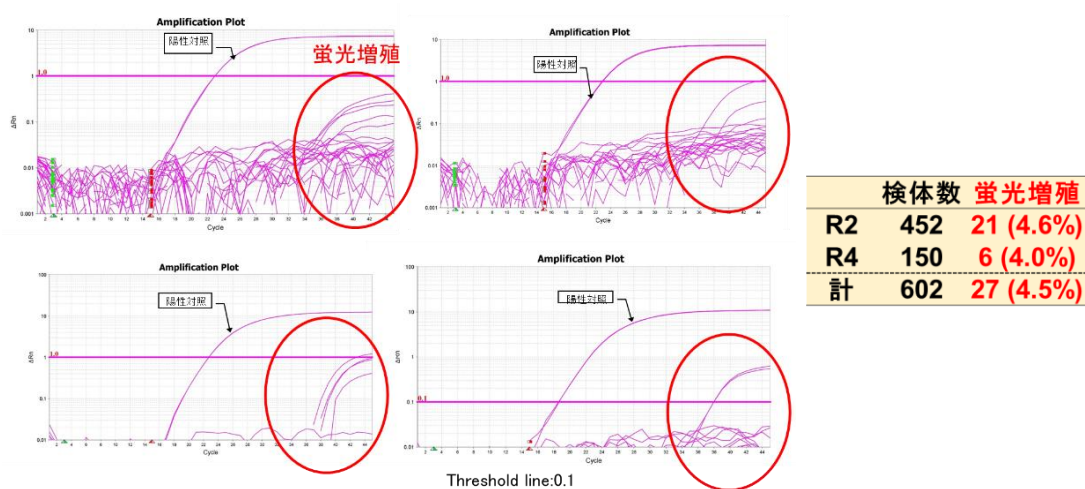
図10. 発生農場抗体検査結果



3-II. 鶏卵等出荷検査

【M 遺伝子の RT-qPCR】 図 11 の赤枠で示す蛍光増殖が確認されたが、判定基準で陽性とならない、もしくは同一農場と結果が一致せず、判定に迷う事例があった。同様の蛍光増殖は令和 2、4 年併せて 27 検体 (4.5%) で認められた。蛍光増殖確認の際、当初 RT-qPCR 再検査、または分離初代培養の漿尿膜腔液を用いた RT-qPCR で陰性確認をしていたが、再度蛍光増殖が認められるリスクを考慮し、最終的に分離結果をもって RT-qPCR の結果を判断することとなった。分離結果は全検体陰性だったため、蛍光増殖は非特異反応と判断し、全検体陰性と判定した。

図 11. 鶏卵等出荷検査 M 遺伝子の RT-qPCR 結果



3-III. 発生状況確認検査、IV. 清浄性確認検査、V. 家きん再導入検査

【分離】一部検体はHA陽性のためニューカッスル病赤血球凝集抑制反応(ND-HI)試験を実施した(図12のオレンジで示す)。延べ2126検体中110検体(5.2%)がHA陽性かつND-HI陽性であり、NDワクチン接種の影響と判断し、全検体陰性と判定した。

【抗体検査】4015検体中12検体0.3%でELISA陽性、寒天ゲル内沈降反応陰性となり、全検体陰性と判定した。

図12. 発生状況確認検査、清浄性確認検査、家きん再導入検査の分離結果

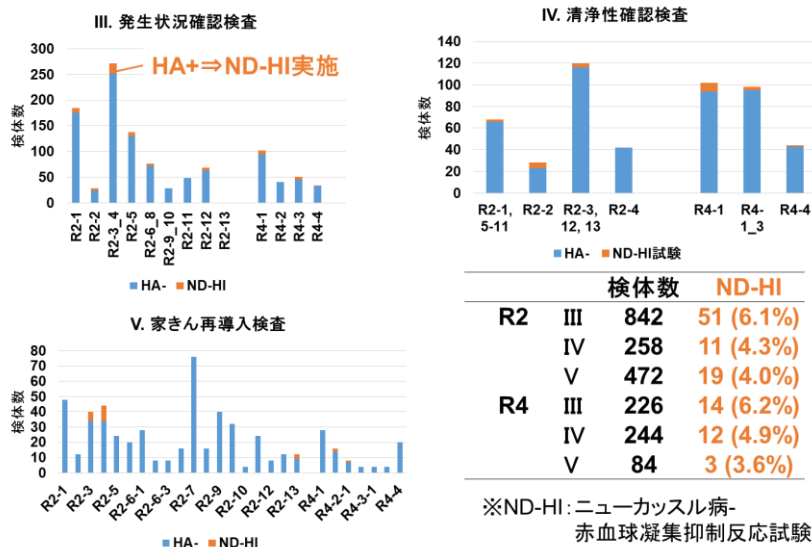
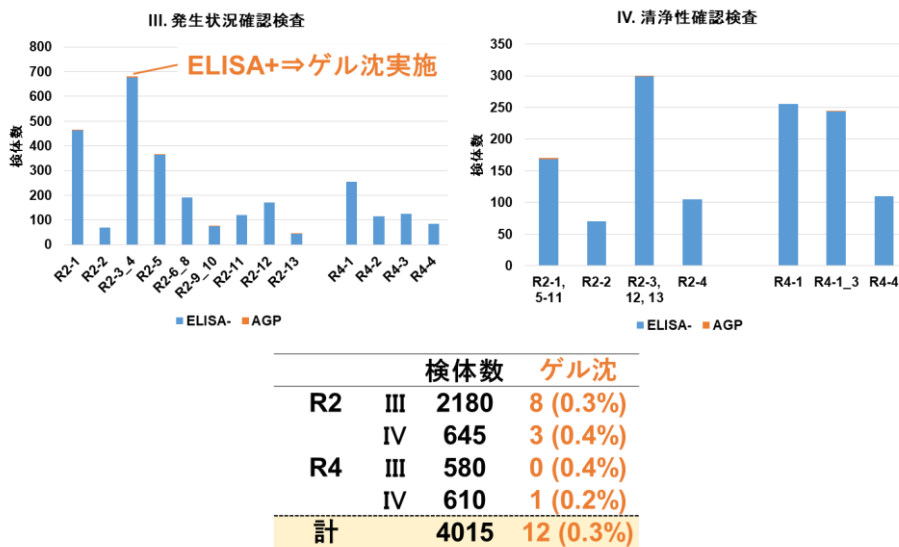


図13. 発生状況確認検査、清浄性確認検査、家きん再導入検査の抗体検査結果



4. 考察

発生農場検査では、一部検体で簡易検査、遺伝子検査または分離検査の結果が一致しなかった。発生農場検査で実施する検査項目のうち、簡易検査は発生農場立入者が実施している。事例によっては簡易検査陽性と陰性が混在するため、発生農場立入者が検査結果に不安を感じることもあるが、より高感度な遺伝子検査、分離と併せて最終判断することを留意して発生農場での作業を実施することが望ましい。

発生農場の検査結果を用いた解析の結果、鶏胚死亡時間、HA 価やウイルス量の関係については、各事例と鶏胚死亡時間に若干関連は見受けられたものの、他は関係が無く、各遺伝子型による鶏への病原性は鶏胚死亡時間、HA 価やウイルス量に反映されなかった。このことから、HPAI 発生時の現場検査では、同じ遺伝子型でも、各事例で鶏胚死亡時間、HA 価、ウイルス量が異なるため、各検査の結果に惑わされず、総合的に判断することが重要である。なおこの解析結果は、各事例で検査条件にばらつき（鶏卵、ウイルス量、検査人員等）が認められるため、あくまで現場検査でみられる傾向であることに留意する必要がある。次に抗体検査では令和2年に7検体陽性となった。これは、感染から死亡まで5.6日を要するウイルスが侵入したため、鶏の死亡増加と同時期に抗体上昇し、農場内外のウイルス拡散リスクも上昇したと推察された。

発生状況確認、清浄性確認、家きん再導入検査では、再検査の割合がRT-qPCRで4.5%、分離で5.2%、ELISAで0.3%だった。RT-qPCR再検査の原因は非特異反応である。よって、RT-qPCRは非特異反応が4.5%程度出る検査系であることを考慮し、分離の結果で最終判断が妥当だと考えられた。また、分離はNDワクチンによるHA陽性事例を考慮し、家きん再導入検査では、NDワクチン接種後時間の経過したモニター家きんの導入を農家に協力依頼することが望ましい。

今後も県内では各シーズンで複数種のウイルスによるHPAI発生の恐れがあり、過去の検査傾向やトラブルシューティングを把握し、円滑な検査遂行に備えることが重要である。

5. 参考文献

農林水産省 HP :

- [1] 令和2年度における高病原性鳥インフルエンザの発生に係る疫学調査報告書
- [2] 令和4年シーズンにおける高病原性鳥インフルエンザの発生に係る疫学調査報告書
- [3] 参考7 発生農場由来の高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子型の分布