

## 10 国内で初めて発生したうずらの H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) の検査成績についての考察

中央家畜保健衛生所

○村田 拓馬・小泉 舜史郎・松本 裕治・森谷 翠

### 1 はじめに

鳥インフルエンザはオルソミクソウイルス科 A 型インフルエンザウイルス属に分類されるウイルスに起因する疾病で、高病原性鳥インフルエンザ(以下、HPAI)、低病原性鳥インフルエンザ、鳥インフルエンザの 3 つが家畜伝染病予防法及び特定家畜伝染病防疫指針(令和 2 年 7 月 1 日 農林水産大臣公表 (一部変更: 令和 3 年 10 月 1 日)<sup>1)</sup>、以下、指針)により規定されている。また、指針では、これらの対象鳥種について特定症状を確認した場合、家きんの所有者や獣医師は都道府県に通報をするように記載されている。家きんにおいて HPAI を疑う症状として、死亡羽数の増加、鶏冠、肉垂等のチアノーゼ、沈うつ、産卵率の低下、うずくまり等がある<sup>1)</sup>。一方、ウイルスへの感受性や症状の程度は鳥種によって差があり、あひるでは感染しても重篤な臨床症状を示すことなく生存することもある<sup>2)</sup>。うずらでは、鶏と同様、致死率が高く、神経症状を呈するといった報告<sup>4,5)</sup>があるが、元気消失等の非特異的な症状のみで死亡するといった報告<sup>5)</sup>もある。

令和 4 年まで国内うずら農場での HPAI 発生は、平成 21 年の愛知県の H7N6 亜型の弱毒タイプのウイルスによる 1 例のみであったが、令和 5 年 2 月、埼玉県内のうずら農場で H5N1 亜型、強毒タイプのウイルスによる HPAI が発生した。うずら農場における H5N1 亜型の HPAI 発生は国内初であるため、その検査成績について報告する。

### 2 農家概要及び発生状況

当該農場は成鶏舎 2 棟、幼雛・中雛舎 1 棟を保有し、約 14.9 万羽のニホンウズラ及びフランスウズラを飼養していた。また、地理的に農場の南西側 3~5m の付近に川が流れていた。令和 5 年 1 月 31 日に鶏舎 A で 3 か月齢のフランスウズラの死亡羽数が増加しているとの通報を受けたため、病性鑑定を実施した。

### 3 材料と方法

#### (1)材料

死亡鶏 11 羽、生鶏 5 羽を検査に供した。抗原検査、抗体検査及び病理学的検査の材料と採材個体番号は表 1 のとおり。

表 1 検査項目、検査材料及び採材個体番号

検査	材料	No.															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
		死	死	死	死	死	死	死	死	死	死	死	生	生	生	生	生
簡易検査	気管・クロアカスワブ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	NT	NT	NT
リアルタイム PCR		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	NT	NT	NT
コンベンショナル PCR		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	NT	NT	NT
ウイルス分離		○	○	○	○	○	NT	NT	NT	○	○	○	○	○	NT	NT	NT
ゲル内沈降反応	血清	NT	○	○	○	○	○										
剖検	死体または生体	○	○	○	○	○	NT	NT	NT	NT	NT	NT	○	○	NT	NT	NT
病理組織学的検査		○	○	○	○	○	NT	NT	NT	NT	NT	NT	○	○	NT	NT	NT
免疫組織化学的検査 (IHC)		NT	NT	○	○	NT	NT										

NT：検査未実施

(2) 方法

ア 抗原検査

(ア) 簡易検査

採取した気管スワブ及びクロアカスワブについて、エスプライン A インフルエンザ(富士レビオ株式会社)の用法に従い検査を実施した。

(イ) リアルタイム PCR 及びコンベンショナル PCR

採取した気管スワブ及びクロアカスワブについて、指針の方法に従い検査を実施した。

(ウ) ウイルス分離検査

採取した気管スワブ及びクロアカスワブについて、指針の方法に従い検査を実施した。採取した尿膜腔液について、鶏血球を用いた HA 試験を実施した。

分離されたウイルスは、シーケンス解析を国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門(以下、動衛研)に依頼し行った。

イ 抗体検査

指針の方法に従い、A 型インフルエンザウイルスのヌクレオカプシド(NP)抗原とマトリックス(M)抗原に対する抗体を標的としたゲル内沈降反応を実施した。

ウ 病理学的検査及び免疫組織化学的検査

死体及び生体の臓器からホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを作成し、薄切したパラフィン切片についてヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)を実施した。No. 3、4 のパラフィン包埋切片について、マウス抗インフルエンザ A 抗体(NP)(HYB-340-05、Statens Serum Institut 社)を用いて A 型インフルエンザウイルスに対する免疫組織化学的検査を動衛研に依頼して実施した。

3 検査成績

(1) 臨床検査及び抗原検査

立入直後の臨床検査では鶏舎 A の北側 1 列においてまとまった死亡が確認され、出入口から奥にかけて死亡数が増加していた。また、死亡数の増加以外の臨床症状は観察されなかった。

簡易検査では生体は 2 羽とも陰性、死体では全羽で陽性であった。(表 2)

表 2 簡易検査の結果

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10	No. 11	No. 12	No. 13
	死	死	死	死	死	死	死	死	死	死	死	生	生
気管スワブ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
クロアカスワブ	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-

リアルタイム PCR 及びコンベンショナル PCR では検査を実施した死体 10 羽でいずれも陽性であり、H5 亜型の A 型インフルエンザと判定した。(表 3)

表 3 リアルタイム PCR 及びコンベンショナル PCR の結果

コンベンショナル PCR	対象遺伝子	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10	No. 11
		死	死	死	死	死	死	死	死	死	死
気管スワブ	NP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
クロアカスワブ		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
気管スワブ	H5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
クロアカスワブ		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

リアルタイム PCR	対象遺伝子	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10	No. 11
		死	死	死	死	死	死	死	死	死	死
気管スワブ	M	21.20	22.54	19.72	21.79	20.20	24.22	26.94	21.93	21.95	20.62
クロアカスワブ		19.17	20.10	21.63	20.97	19.37	22.24	25.38	16.49	16.17	24.35
気管スワブ	H5	22.00	23.28	20.21	22.55	20.85	25.57	27.87	23.02	22.90	21.89
クロアカスワブ		19.24	20.72	21.57	20.87	19.15	22.53	26.75	16.89	16.52	24.81

リアルタイム PCR の結果から比較的ウイルス量が多いと考えられた 10 検体について、発育鶏卵を用いたウイルス分離を実施した。HA 試験によりウイルスの有無を確認したところ、分離初代で全検体 HA 試験陽性となり、HA 価は 8 倍から 128 倍以上であった。(表 4)

分離ウイルス 2 検体について実施したシーケンス解析では、遺伝子配列は H5 亜型かつ N1 亜型であり、HA タンパク質開裂部位の推定アミノ酸配列 (PLREKRKKR/GLFG) が強毒タイプであったことから、当該ウイルスは H5N1 亜型の HPAI ウイルスと判定された。

表 4 ウイルス分離の結果

ウイルス分離 (HA/50 $\mu$ L)	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 9	No. 10	No. 11
	死	死	死	死	死	死	死	死
気管スワブ	NT	NT	128 $\leq$	NT	8	NT	NT	32
クロアカスワブ	128 $\leq$	NT						

NT：検査未実施

(2) 抗体検査

5 検体についてゲル内沈降反応を実施したところ、全検体陰性であった。(表 5)

表 5 ゲル内沈降反応の結果

ゲル内沈降反応	No. 12	No. 13	No. 14	No. 15	No. 16
	生	生	生	生	生
判定	-	-	-	-	-

(3) 病理学的検査及び免疫組織化学的検査

剖検所見は表 6 及び図 1 のとおりであった。死体は、外貌に著変は認められず、全羽で麦稈色透明胸水の軽度貯留と胸腔壁の線維様物付着、肝臓及び肺の暗赤色化が認められた。また、5 羽中 2 羽で脾臓に針先大白色斑の散在が認められた。生体 1 羽で肝臓辺縁の暗赤色化は認められたが、その他の特徴的な所見は認められなかった。

表 6 剖検所見

部位	剖検所見	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 12	No. 13
		死	死	死	死	死	生	生
胸腔	麦稈色透明胸水	+	+	+	+	+	-	-
	線維様物付着	+	+	+	+	+	-	-
肝臓	暗赤色化	+	+	+	+	+	+	-
肺	暗赤色化	+	+	+	+	+	-	-
脾臓	針先大白色斑散在	-	+	+	-	-	-	-

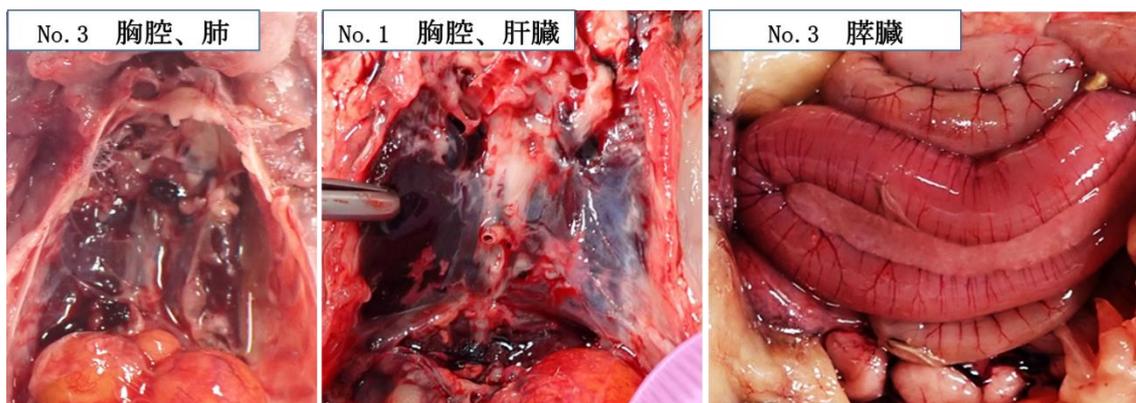


図 1 剖検写真 (No. 1、3)

- 左：胸腔内の線維様物付着と肺の暗赤色化
- 中央：胸腔の線維様物付着と肝臓の暗赤色化
- 右：脾臓の針先大白色斑散在

病理組織学的検査の結果は表 7 及び図 2 のとおりであった。死体 1 羽で脾臓の巣状壊死、生体を含む全羽で脾臓の小血管内皮細胞腫大が見られた。

表 7 病理組織学的検査結果

部位	組織所見	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 12	No. 13
		死	死	死	死	死	生	生
脾臓	巣状壊死	-	-	+	-	-	-	-
脾臓	小血管内皮細胞腫大	+	+	+	+	+	+	+

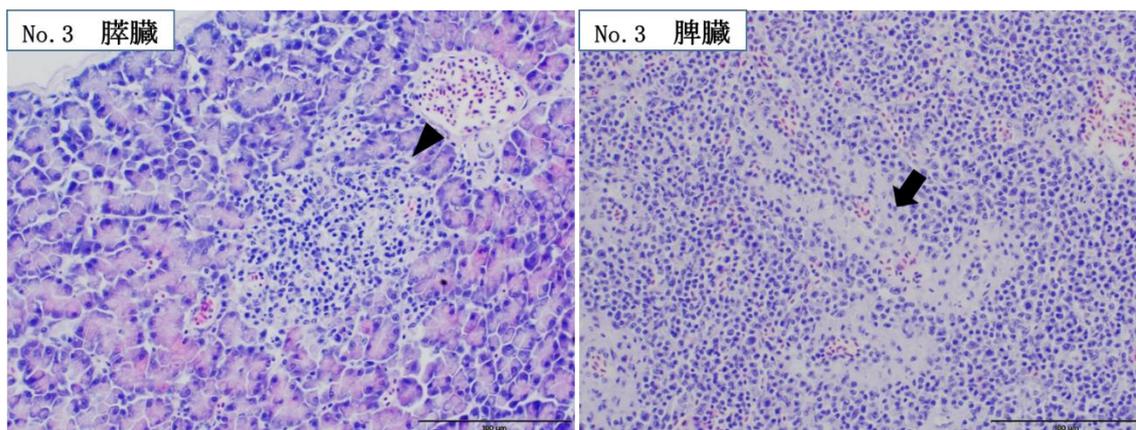


図 2 HE 染色像

左：膵臓 右：脾臓

矢頭：巣状壊死 矢印：小血管内皮細胞腫大

免疫組織化学的検査の結果は図 3 のとおりであった。全身諸臓器の小血管内皮細胞、腹腔内臓器漿膜面、膵臓の巣状壊死、大脳の 3 か所の神経細胞で A 型インフルエンザ抗原が検出された。また、脳では神経細胞の変性は認められなかった。

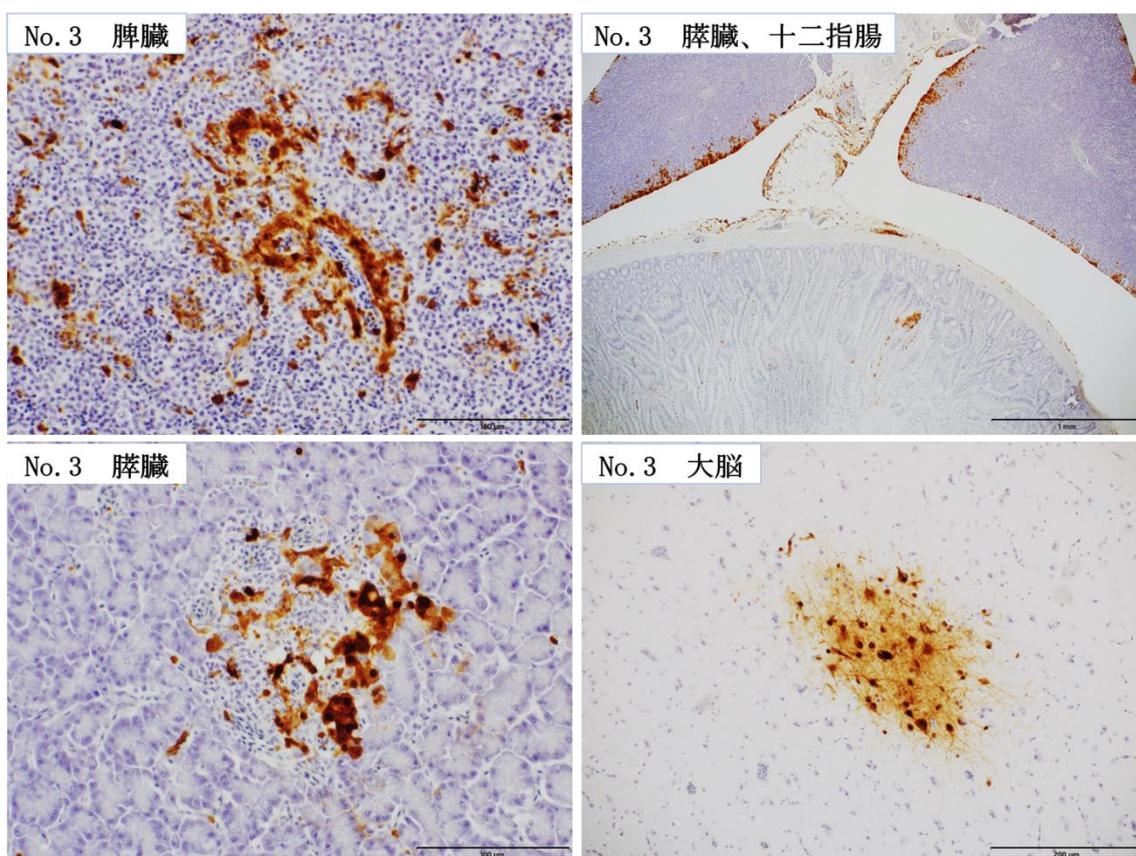


図 3 免疫組織化学的染色像

#### 4 まとめと考察

死体では簡易検査及び遺伝子検査が全羽陽性かつ H5N1 亜型の HPAI ウイルスが分離された一方、生体は簡易検査、血清抗体検査ともに全羽陰性であった。このことから、感染個体はほぼ 100%死亡したものと考えられた。既報では 6 週齢のうずらに  $10^6$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml の HPAI ウイルス (A/whooper swan/Aomori/1/2008 (H5N1)) を経鼻接種した場合、感染個体の平均死亡時間は 91.2 時間であった<sup>4)</sup>。また、別の報告では、うずらの抗体は感染後 5 日から検出可能であったとされている<sup>5)</sup>。このことから、本事例もうずらは感染後 3~4 日程度で死亡に至り、感染個体の多くは、抗体が産生される前に死亡したと推察された。また、本事例では免疫組織化学的検査は 2 検体しか実施していないため事例の積み重ねが必要であるが、1 羽の全身諸臓器の血管内皮細胞で抗原が検出された。鳥種は異なるが、鶏において、血管内皮の免疫組織化学的検査の染色性は感染後 4~5 日で顕著に減少するという報告<sup>6)</sup>があり、ウイルスが感染してから 3~4 日程度で死亡に至ったという先の考察と合致している。

また、 $10^6$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml の HPAI ウイルス (A/whooper swan/Aomori/1/2008 (H5N1)) を経鼻接種した鶏では全羽で神経症状なく死亡し、脳のウイルス力価は他の臓器と比較して低いことが示されている。一方でうずらでは 11 羽中 6 羽で神経症状を示したのち死亡し、脳のウイルス力価は他の臓器と比較して高かったとされている<sup>4)</sup>。本症例では免疫組織化学的検査で大腦の一部で抗原が検出されたが、神経症状や神経細胞の変性は認められなかった。ウイルス株の組織親和性や、品種の違い、宿主要因等、複数の要因が関与している可能性に留意する必要があるが、本事例ではウイルスがうずらに感染した後、死亡までの経過が短く、神経症状等が発現する前に死亡したと推測された。

最後に、今回の事例で確認された特定症状は死亡羽数の増加のみであり、その他の特徴的な症状は見られなかった。剖検、病理組織学的検査では、脾臓の白色斑、巣状壊死等のうずらの HPAI で報告されている所見<sup>7)</sup>は認められたが、その頻度は低く、外貌にも異状は認められなかった。結論として、今回うずらにおいても死亡羽数増加をきっかけとして、指針に沿った摘発・診断は可能であったが、今後、死亡羽数増加以外の所見が乏しい可能性に留意して初動対応に臨むとともに、平時から農家への啓発、指導を行っていく必要がある。

#### 5 引用文献

- 1) 農林水産省：高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針. 2021.
- 2) World Organisation for Animal Health: Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). WOAHP Terrestrial Manual. 2021; Chapter 3.3.4.
- 3) Ok-Mi Jeong *et al.*: Experimental infection of chickens, ducks and quails

- with the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus. J. Vet. Sci. 2009; 10(1): 53-60.
- 4) Uno Y *et al.* : The Pathogenicity and Host Immune Response Associated with H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus in Quail. J. Vet. Med. Sci. 2013; 75(4): 451-457.
- 5) K Bertran *et al.* : Pathobiology and transmission of highly and low pathogenic avian influenza viruses in European quail (*Coturnix c. coturnix*). Vet Res. 2013; 44(1): 23.
- 6) Y. Kobayashi : Pathological studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza viruses. Avian Pathology. 1996; 25: 285-304.
- 7) K Bertran *et al.* : Pathobiology of Clade 2.3.4.4 H5Nx High-Pathogenicity Avian Influenza Virus Infections in Minor Gallinaceous Poultry Supports Early Backyard Flock Introductions in the Western United States in 2014-2015. Journal of Virology. 2017; 91(21): e00960-17.