

学 位 論 文 要 旨

氏名 Dennis Villaseñor Umali

題 目 : Molecular epidemiology of Newcastle disease virus in Japan

(日本におけるニューカッスル病ウイルスの分子疫学的研究)

論文要旨 :

Newcastle Disease (ND) is a highly contagious and economically devastating disease of poultry. At present, limited molecular epidemiological data are available regarding the causes of ND outbreaks in vaccinated commercial poultry farms. Molecular epidemiological data on the relationships of Japanese NDV strains to other strains from different parts of the world are also lacking. Therefore in the present study, a molecular epidemiological investigation was conducted to characterize field strains of NDVs isolated from vaccinated commercial poultry flocks from different prefectures from different time periods in Japan. Mean death time (MDT: 48-56hr), Intracerebral Pathogenicity Index (ICPI: 1.7-1.9) and deduced amino acid sequences of the cleavage site of the fusion (F) protein (¹¹²RRQKR¹¹⁶) revealed that all field isolates were velogenic. Phylogenetic analysis showed that these isolates could be classified into three or two genetic groupings, depending on the classification system namely, genotypes VIa, VIc and VIId or genotypes VIc and VIId. Comparison with other isolates from different regions of the world demonstrated that all the field isolates from vaccinated poultry in non-epidemic areas of Japan were part of much bigger outbreaks in provinces and regions and, in some cases, continents. In general, four ND panzootics occurred in Japan and that these outbreaks were characterized by co-circulation of genetically distinct virus lineages due to involvements of infected wild birds.

To guide poultry clinicians in their understanding of disease profiles of ND in vaccinated poultry and to help them identify hidden NDV risk factors in the field, a case of velogenic ND in vaccinated commercial poultry farm was described. Despite extensive vaccination, an atypical infection of velogenic ND in vaccinated layer flock was observed, however, compared to “textbook” cases, only mild respiratory disease with mild to moderate decrease in egg production similar to infectious bronchitis was observed. This case demonstrated that atypical velogenic ND may exist and may become potential threats to commercial poultry.

Cases of ND outbreaks in vaccinated poultry have been mostly attributed to improper vaccination, immunosuppression and flocks that were challenged with more velogenic viruses. However, very limited studies are available regarding the possible roles of genomic factors in

these cases. To determine the possible influence of the genetic make-up of NDVs in cases of breakthrough infection, the complete genome sequences of NDVs from vaccinated poultry were analyzed. It was demonstrated that NDVs infecting vaccinated chickens possess several important amino acid substitutions at the neutralizing epitopes and functional domains of the F and hemagglutinin-neuraminidase (HN) proteins. Although virus neutralization test showed that poor flock immunity due to vaccination failure or partial and non-uniform immunization maybe the major factors involved in the mechanism of breakthrough infection of the Japanese field strains, the 31 amino acid substitutions at the F and HN proteins observed in this study, particularly the E347K/G substitution at the linear epitope of the HN protein, could have also influenced the dynamics of the breakthrough infection of the field viruses.

It was demonstrated using the field strains in this study that wild birds played an important role in the transmission and dynamics of spread of NDVs not only in Japan but also in the Far East region. Because of the important role that wild birds play in the circulation of NDV, a seven-year surveillance of NDVs from wild waterfowl in the San-in region was conducted. A total of 16 avian paramyxoviruses (APMV) consisting of three lentogenic NDVs, 12 APMV-4, and one APMV-8 were isolated. These results showed that NDV and APMV-4 were relatively widely distributed among wild waterfowl that migrate to Japan from northern regions. Continuous surveillance of APMV in wild waterfowl is therefore necessary due to the pathogenic potential of these isolates in domestic poultry.

In conclusion, this study was able to elucidate the molecular epidemiology of NDV in Japan, as well as its transmission mechanisms, clinical profile, molecular characteristics and infection dynamics in vaccinated chickens. Consequently, a seven-year surveillance of NDVs from wild waterfowl was conducted, in which several NDV and APMV strains were isolated. This study may be a useful reference in characterizing future NDV outbreaks in vaccinated poultry flocks and as a genetic map for future investigations regarding vaccine designs, reverse genetics systems and development of molecular diagnostic tools to prevent future ND outbreaks in vaccinated chickens.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	デニス・ヴィラセニョール・ウマリ DENNIS VILLASEÑOR UMALI
審査委員	主 査： 鳥取大学 教授 伊藤 壽啓
	副 査： 鹿児島大学 教授 高瀬 公三
	副 査： 鳥取大学 教授 山口 剛士
	副 査： 鳥取大学 教授 村瀬 敏之
	副 査： 鳥取大学 准教授 伊藤 啓史
題 目	Molecular Epidemiology of Newcastle Disease Virus in Japan (日本におけるニューカッスル病ウイルスの分子疫学的研究)
審査結果の要旨： ニューカッスル病 (ND) は一度流行すれば経済的被害が極めて大きいことから、家禽における最も重要な伝染病の1つとされている。さらに近年、ワクチンを接種しているにもかかわらず、本病が流行してしまったケースがいくつも報告されている。その原因ウイルスの分子疫学的な情報は未だ限られている。また、日本における流行株と世界各地の流行株との間の分子疫学的な解析もあまり行われていない。そこで、本研究ではまず、日本の異なる地域で、異なる年代に、ワクチン接種農場の家禽から分離された野外株を分子疫学的に比較解析した。鶏胎仔平均致死時間(MDT：48-56hr)、鶏脳内病原性値(ICPI：1.7-1.9)およびF蛋白開裂部位のアミノ酸配列(¹¹² RRQKR ¹¹⁶)から、このとき分離された株はすべて強毒型であることが明らかとなった。一方、系統進化学的な解析では、これらのウイルスは遺伝子型VIa、VIbおよびVIIIdとVIcおよびVIIeの2つのグループに区別された。世界各地の分離株との比較解析では、日本の非流行地でワクチンを接種した鶏から分離された株はみな、遺伝的には比較的近い地域の流行株に近縁であった。日本では過去に4つの大きな流行が記録されているが、それらのウイルスは野鳥の間で循環しているウイルスの系統とは明らかに異なる系統として進化してきたことも確かめられた。 次にワクチン接種家禽におけるNDの病態を明らかにするために、また野外における隠れたNDウイルスの感染を明らかにするために、過去にさかのぼって、ワクチンを接種した養鶏場における強毒NDV発生の状況を調査した。広範囲なワクチン接種にも関わらず、採卵養鶏場における強毒ウイルスの発生が認められたケースでは、軽度な呼吸器症状と軽度な産卵率低下が認められたのみで、その症状は鶏の伝染性気管支炎(IB)に近似していた。すなわち野外ではワク	

チン接種によって、ウイルスの増殖がある程度抑えられ、典型的な ND の症状が出にくい状態になっている場合、強毒 ND ウイルスの存在を見落とす危険性があることが明らかとなった。

ワクチン接種鶏群における ND 発生の原因は不適切なワクチン投与、免疫不全、あるいは最強毒株の出現などが考えられている。しかしながら、それらに関わる遺伝的要因は未だ明らかではない。そこでワクチン接種鶏から分離された ND 株の代表株について、全遺伝子の塩基配列を決定し、比較解析した。合計 31 個のアミノ酸置換が HN および F 遺伝子に認められたことから、それらがウイルス蛋白の機能的な変化を促し、宿主の免疫応答を抑制して、ウイルスの増殖を促進している可能性が考えられた。

一方、自然界における ND ウイルスの循環あるいは家禽への流行拡大における野鳥の役割を明確にする目的で、7 年間にわたって、日本の山陰地方における野鳥由来パラミクソウイルスの疫学調査を実施した。合計 16 株の鳥パラミクソウイルス (APMV) が分離され、その内訳は弱毒 ND ウイルス 3 株、4 型 APMV 12 株、8 型 APMV 1 株であった。これらの成績から ND ウイルスおよび 4 型 APMV が北方圏から日本に渡ってくる渡り鳥の間に比較的多く循環していることが示唆された。

本研究によって得られたこれらの成績は世界中の養鶏産業界で今尚多大な経済的損失をあたえ続けている ND の予防、防遏上、極めて重要な情報を提供するものと考えられた。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位を受けるにふさわしいと判断された。