

8 県内に浸潤している鶏伝染性気管支炎ウイルスの シーケンス結果と特徴

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○佐藤 宏樹 林 敏展
米田 有希 高橋 優
金野 加奈 太田 智恵子
角田 裕美 中村 成宗

1 背景

鶏伝染性気管支炎ウイルス（以下、「IBV」という。）は、野外に常在化し、家きんに感染した場合、呼吸器症状、産卵異常及び腎炎などを引き起こす。

IBV 対策は、主に血清型別に応じたワクチン接種が行われており、初生からワクチン接種を実施している農場も多い。しかし、IBV は血清型別のための交差中和試験として指定された試験方法がなく、株の反応性も多様性に富んでいるため、明確に血清型を区別することは難しい³⁾。また、IBV はワクチンの種類が多く、農場に侵入している野外株に合致したワクチンを選択しなければ十分な効果を得られず、変異しやすいことから、対応が難しいウイルスとして知られている。

そのため、近年では、血清型と一定の関連性があり、IBV の抗原性状と関連するスパイク (S) 蛋白の遺伝子解析により、相同性を比較し系統樹解析した遺伝子型別が広く行われている^{1,2,3,4)}。

今年度、本県では IBV の関与を疑う病性鑑定依頼が増加したが、これまで IBV の遺伝子型について県内の状況を調査し、系統樹解析を行った報告はなかった。

そこで、農場に対する指導の一助とするため、県内農場で検出された IBV について遺伝子型別を実施したので、その概要を報告する。

2 材料及び方法

(1) 材料

材料は、病性鑑定材料と健康鶏由来の気管及びクロアカスワブを用いた。

病性鑑定材料は、令和2年4月から12月に肉用鶏から採材した気管11検体、腎臓11検体、腸管5検体を用いた。

健康鶏は採卵鶏と肉用鶏について実施した。採卵鶏は、令和元年4月から令和2年9月に定点モニタリングの材料として、15戸から1か月に1回採材し、農場ごとに10羽分プールし1検体とした各270検体のほか、採卵鶏農場1戸から採材した気管及びクロアカスワブ

各 1 検体を用いた。

肉用鶏は、令和 2 年 11 月から 12 月に 24 戸から採材し、農場ごとに 5 羽分プールし 1 検体とした各 24 検体を用いた。

(2) 方法

ア 材料処理

病性鑑定材料の気管、腎臓及び腸管は 10% 臓器乳剤とした。

採卵鶏の気管及びクロアカスワブは発育鶏卵尿膜腔接種により 2 日間 2 代継代した後、その尿膜腔液を材料とした。肉用鶏の気管及びクロアカスワブはそのまま材料とした。

各種材料は、市販の RNA 抽出キットを用いて常法により核酸抽出を実施した。

イ 遺伝子検査

図 1 に IBV の分子構造を示した。遺伝子検査については、比較的保存性が高く変異の少ないヌクレオカプシド (N) 蛋白と抗原性状に関連する S1 領域遺伝子について、以下の方法に従い、それぞれ実施した。

(ア) N 蛋白遺伝子

nested RT-PCR を実施し、増幅結果から IBV 遺伝子の検出率を計算した。

(イ) S1 領域遺伝子

真瀬らの方法⁵⁾を用いた RT-PCR により増幅された特異遺伝子について、系統樹解析を実施し、各産物とワクチン株との比較を行った。なお、同一鶏舎から採材されたものは 1 検体とした。

また、病性鑑定材料については、臓器ごとの遺伝子増幅の強度を比較した。

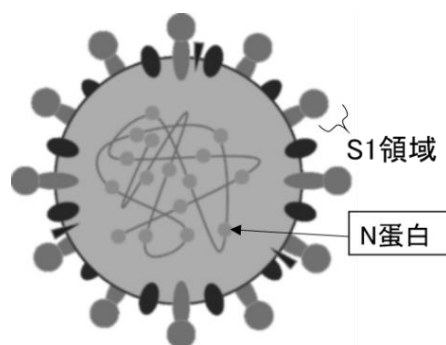


図 1 IBV の分子構造

3 結果

(1) N 蛋白遺伝子の検出率

病性鑑定材料における検出率は、気管、腎臓及び腸管でそれぞれ 27.3% (3/11)、81.8% (9/11) 及び 60% (3/5) であった。

気管及びクロアカスワブにおける検出率は、採卵鶏でそれぞれ 1.85% (5/271) 及び 2.95% (8/271)、肉用鶏でそれぞれ約 45.83% (11/24) 及び 41.67% (10/24) であり、各スワブに用途による違いはなかった。

(2) 系統樹解析

系統樹解析は病性鑑定材料 2 検体、気管及びクロアカスワブ 10 検体について、実施した。

図 2 に採卵鶏の系統樹、図 3 に肉用鶏の系統樹を示した。図内ではそれぞれワクチン株を四角、増幅された株を楕円で囲った。

採卵鶏は、4 検体で増幅され、すべて JP-I 型に分類された。詳細は GN ワクチン株近縁が 2 株、S95 ワクチン株に近縁が 1 株、C78 ワクチン株に近縁が 1 株であった。

肉用鶏は、検体で増幅され、JP-I 型に 7 株、JP-II 型に 1 株が分類された。詳細は、JP-I 型の S95 ワクチン株近縁が 4 株、GN ワクチン株に一致した株が 1 株、近縁が 1 株、C78 ワクチン株近縁が 1 株であり、JP-II 型に分類

された1株は TM86 ワクチン株に一致していた。また、S95 ワクチン株に近縁であったもののうち、2株は病性鑑定材料由来であった。

種しており、病性鑑定材料由来の Aomori/Broiler_1 及び Aomori/Broiler_6 の2株についても一致しなかった。

表 近縁株と農場接種ワクチン株

用途	株名	近縁ワクチン株	接種ワクチン株
採卵鶏	Aomori/Layer_1	GN	S95, TM86, H120, AK01
	Aomori/Layer_2	C78	練馬
	Aomori/Layer_3	GN	GN, S95, ON, TM86, H120, AK01, 4/91
	Aomori/Layer_4	S95	練馬
肉用鶏	Aomori/Broiler_1	S95	TM86 / 練馬
	Aomori/Broiler_2	GN	GN
	Aomori/Broiler_3	GN	GN
	Aomori/Broiler_4	C78	C78
	Aomori/Broiler_5	S95	GN
	Aomori/Broiler_6	S95	GN
	Aomori/Broiler_7	TM86	TM86
	Aomori/Broiler_8	S95	C78 / TM86

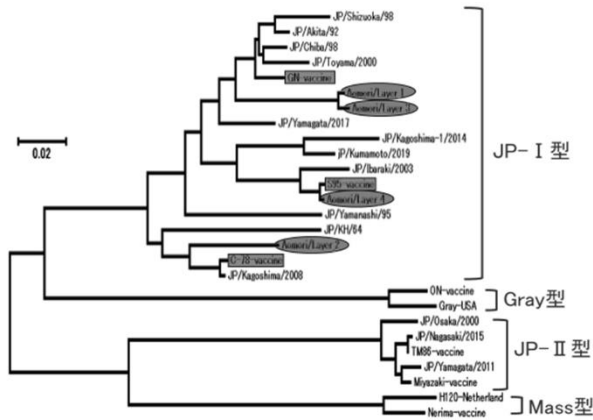


図2 採卵鶏における系統樹

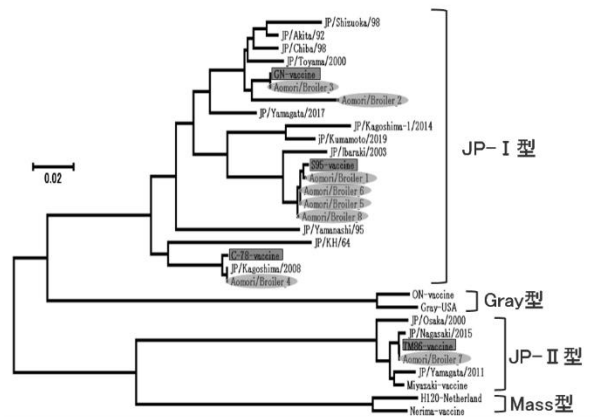


図3 肉用鶏における系統樹

(3) ワクチン株との比較

本調査の検出株と各株が採材された農場で接種されたワクチンを比較した。各株の近縁ワクチン株と農場接種ワクチン株を表に示した。

近縁ワクチン株と接種ワクチン株は採卵鶏1株、肉用鶏4株で一致した。また、採卵鶏の3株と肉用鶏の4株が検出された農場では近縁ワクチン株と異なるワクチンを接

(4) 各臓器の S1 領域遺伝子の確認

図4に同個体から採材された各臓器における S1 領域遺伝子の増幅像を示した。S1 領域遺伝子が増幅された場合、約 670bp に増幅産物が見られる。

結果は、気管において増幅が見られなかった個体についても、全個体の腎臓及び No. 1、No. 3、No. 4 の腸管で増幅が見られた。

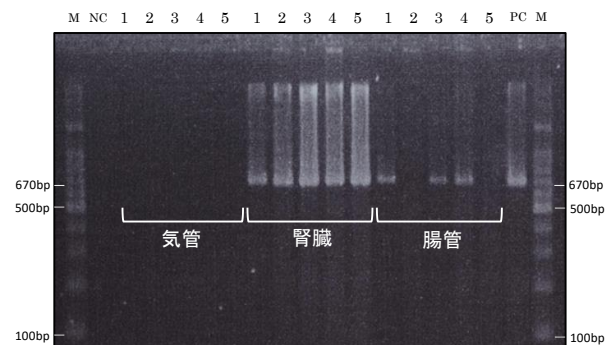


図4 各臓器における S1 遺伝子の増幅

4 まとめ及び考察

N 蛋白遺伝子の検出率は病性鑑定材料で腎臓、腸管、気管の順に高く、スワブでは気管

及びクロアカで同程度であった。

また、S1 領域遺伝子は、腎臓および腸管で明瞭な増幅産物を確認したことから、これらの臓器に親和性の高い株の存在が示唆された。Cavanagh は、腸管組織への感染では、臨床症状に直結することはなく、IBV の株により腎臓病変を生じると報告しており⁶⁾、その後も複数の報告で IBV の臓器における親和性について言及している^{7,8)}。

さらに、IBV は呼吸器からのウイルス排出は 1～2 週間で終了するが、糞便からの排出は長期間続くこともあるとする報告⁴⁾もある。

本調査では、クロアカスワブから IBV 遺伝子が検出されていることから、無症状ながらも IBV への感染が考えられ、このような鶏が感染源となっている可能性が示唆された。

検出率は採卵鶏で 2% 程度、肉用鶏で 40% 程度と肉用鶏で高率であり、増幅された S1 領域の約 9 割を JP-I 型が占めた。嶋崎は、野外分離材料について、S1 領域を検索したところ、83 例中 48 例が肉用鶏から分離されたこと、遺伝子型では JP-I 型が最多であったことを報告しており²⁾、本調査と似た傾向にあった。

系統樹解析を実施した検体のうち、増幅された 2 株は接種ワクチンと近縁であり、ワクチン株の影響が考えられたが、それ以上の考察には至らなかった。

一方、半数以上は農場接種のワクチン株と合致しておらず、農場に対しワクチン接種に係る指導が必要であると考えられた。

今後は、さらに詳細な検討を加え、有効なワクチン接種に係る指導を充実させていく所存である。

5 謝辞

本調査実施にあたり、系統樹解析を実施していただいた国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 ウイルス・疫学研究領域 疾病防除基盤ユニット 真瀬昌司先生に深謝する。

参考文献

- 1) 伝染性気管支炎ウイルスの型別と予防, 鶏病研報 46 巻 1 号, 1-12 (2010)
- 2) 嶋崎洋子: 最近の伝染性気管支炎の発生状況とワクチンによる対策, 鶏病研報 52 巻増刊号, 21-25 (2016)
- 3) 伝染性気管支炎の最近の野外発生状況とワクチン, 鶏病研報 52 巻 4 号, 231-241 (2016)
- 4) 真瀬昌司: 鶏のコロナウイルス病: 伝染性気管支炎 (Infectious bronchitis: IB), NIAH ニュース No. 70 (2021)
- 5) M. Mase et al.: Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Japan, Arch Virol, 149, 2069-2078 (2004)
- 6) D. Cavanagh : Coronavirus avian infectious bronchitis virus, Vet. Res., 38, 281-297 (2007)
- 7) Ambepitiya Wickramasinghe et al.: Binding of Avian Coronavirus Spike Proteins to Host Factors Reflects Virus Tropism and Pathogenicity., J. Virol., 85, 8903-8912 (2011)
- 8) Ambepitiya Wickramasinghe et al.: Novel Receptor Specificity of Avian Gammacoronaviruses That Cause

Enteritis., J. Virol, 89, 8783-
8792(2015)