

## 11. 鶏伝染性気管支炎ウイルスの遺伝子型別法の比較

大分家畜保健衛生所、1)豊後大野家畜保健衛生所  
○病鑑 榎園秀平・病鑑 大木万由子・病鑑 梅田麻美  
(病鑑) 壁村光恵・1) (病鑑) 河上友

### 【はじめに】

鶏伝染性気管支炎(IB)は IB ウイルス (IBV) の感染で呼吸器症状、腎炎、産卵率低下、細菌等の 2 次感染による死亡率の上昇を引き起こす慢性疾病である。IBV は抗原変異しやすく、野外の流行株の抗原性状は多様である[1]。IBV の表面にあるスパイク (S) タンパクは 2 つの糖ペプチド (S1 および S2) から構成されており[2]、S1 には中和抗体を誘導する主要な抗原決定基が含まれているため、S1 蛋白のアミノ酸配列の相違によって、抗原性の異なる多様なウイルス株が生じるものとみられている[3]。Mase ら[4, 5]、有吉ら[6]は S1 蛋白の塩基配列に基づく分子系統学解析による型別法を開発しており、IBV 分離株は JP-I, JP-II, JP-III, JP-IV, Gray, Mass, 4/91 から成る 7 種類の遺伝子型に分類されている。また、分子系統学解析より簡便に遺伝子型を識別する方法として、IBV の S1 遺伝子を標的とした RT-PCR の産物を用いた制限酵素切断パターン (RFLP (Restriction fragment length polymorphism)) の手法がある[1, 7, 8]。さらに、各遺伝子型に特異的な PCR プライマーを設計し、PCR 産物の検出のみで遺伝子型を判定する方法[6, 9] (以下、S1 遺伝子型別 RT-PCR) も報告されており、PCR 産物の有無で容易に判定することが可能である。従来から当病性鑑定部では、死亡を主徴とする病性鑑定で IBV 特異遺伝子が検出され、RFLP により使用ワクチン株と異なる遺伝子型と判定された場合、病理組織検査等の結果と合わせて総合的に判断し IB と診断しているが、判定しやすい S1 遺伝子型別 RT-PCR は実施していなかった。今回、当県の 2022 年度 IB 診断事例及び 2022 年度 IB モニタリング検査について、RFLP と S1 遺伝子型別 RT-PCR による遺伝子型別方法の比較検討を行ったので、その検査成績を報告する。

### 【材料および方法】

#### 1. 材料

2022 年度 IB 診断事例について、病性鑑定材料として 30 日齢肉用鶏 (1 戸、JP-I 型ワクチン接種農場) から採材した気管乳剤 1 検体及び 2022 年度モニタリング検査材料として 19~35 日齢肉用鶏 (計 14 戸) から採材した気管・クロアカスワブプール 36 検体、気管・肺・腎臓プール乳剤 27 検体 (計 63 検体) を用いた。

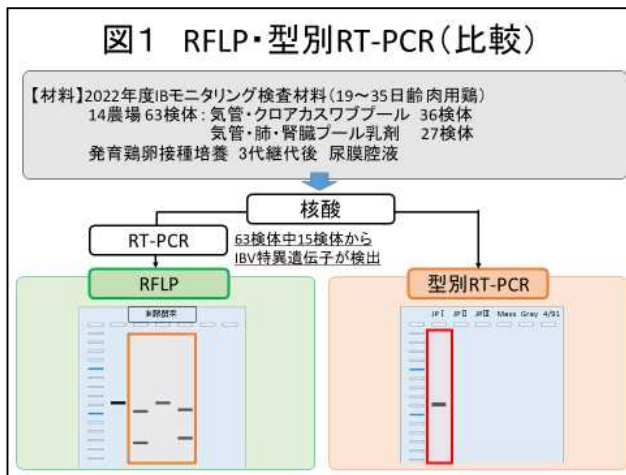
#### 2. 方法

材料を 9~11 日齢の発育鶏卵の尿膜腔に接種し、38℃2~5 日間培養を 3 代継代後、発育鶏卵の尿膜腔液を回収し、既報のプライマー情報[5]に基づき IBV S1 遺伝子を標的

とした RT-PCR を実施。IBV 特異遺伝子が検出された場合、PCR 産物について RFLP 解析及びダイレクトシーケンス法で塩基配列（538 塩基）を決定し、得られた遺伝子情報と既報の遺伝子情報から分子系統樹解析を行った。また、既報のプライマー情報[6, 9]に基づき尿膜腔液を用いた S1 遺伝子型別 RT-PCR を実施した。

**【結果】**

IBV S1 遺伝子を標的とした RT-PCR の結果、病性鑑定材料 1 検体（Oita2022）及びモニタリング検査材料 63 検体中 15 検体（Oita1～Oita15）（気管・クロアカスワブプール 12 検体、気管・肺・腎臓プール乳剤 3 検体）から IBV 特異遺伝子が検出された（計 16 検体）（図 1）。モニタリング検査材料のうち IBV 特異遺伝子が検出された 15 検体中 13 検体（Oita1～12, Oita15）は初生で IB ワクチンを接種していた農場から分離され、残り 2 検体（Oita13, 14）は IB ワクチン未接種農場から分離された。



RFLP 型別の結果、病性鑑定材料 1 検体は Mass 型と判定され（図 2）、モニタリング検査材料は JP-I 型 6 検体、JP-II 型 1 検体、Mass 型 2 検体、4/91 型 4 検体、型別不能 2 検体と判定された。モニタリング検査材料のうち、使用ワクチン株と同じ遺伝子型と判定されたのは 15 検体中 5 検体であった（図 3）。

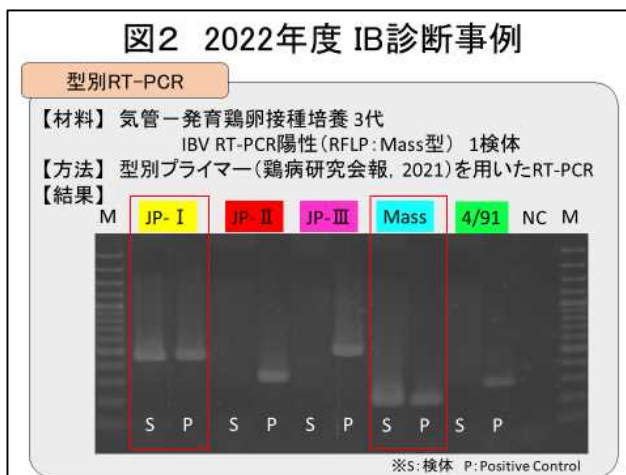


図3 2022年度 IBモニタリング検査

No.	農場	日齢	材料	IBワクチン歴	RFLP	型別RT-PCR			
						JP-I	JP-II	Mass	4/91
1	GK-1	31	気管・クローアカ	初生 Mass(練馬)	Mass	○		○	
2	GK-2	24	気管・クローアカ	初生 Mass(練馬)	JP-I	○			
3	GK-2	31	気管・クローアカ	初生 Mass(練馬)	JP-I	○			
4	GK-2	31	気管・クローアカ	初生 Mass(練馬)	JP-I	○			
5	H	32	気管・クローアカ	初生 JP-I (C78)	4/91				○
6	H	30	気管・肺・腎臓	初生 JP-I (C78)	4/91	○		○	○
7	H	30	気管・肺・腎臓	初生 JP-I (C78)	JP-I	○		○	○
8	H	32	気管・クローアカ	初生 JP-I (C78)	型別不能	○			○
9	H	32	気管・クローアカ	初生 JP-I (C78)	型別不能				○
10	H	34	気管・クローアカ	初生 JP-I (C78)	JP-I	○	○	○	
11	H	34	気管・クローアカ	初生 JP-I (C78)	JP-I	○		○	
12	K-1	35	気管・クローアカ	初生 JP-II (TM-86)	4/91				○
13	K-1	29	気管・肺・腎臓	IB未接種	未定			○	
14	K-1	19	気管・クローアカ	IB未接種	4/91				○
15	NK	24	気管・クローアカ	初生 Mass (H120) 4/91 (4/91)	Mass	○		○	

JP-I 型6検体、JP-II 型1検体、Mass型2検体、  
4/91型4検体、型別不能2検体

S1 遺伝子型別 RT-PCR の結果、病性鑑定材料 1 検体から JP-I 型および Mass 型が検出された (図 2)。モニタリング検査材料 15 検体中 7 検体では 2~3 つの複数の遺伝子型が検出され、RFLP 型別不能の 2 検体についてはそれぞれ JP-I 型と 4/91 型が検出された。モニタリング検査材料のうち、使用ワクチン株と同じ遺伝子型と判定されたのは 15 検体中 7 検体であった。また、RFLP 型別で使用ワクチン株と同じ遺伝子型と判定された検体について、S1 遺伝子型別 RT-PCR でも同様の遺伝子型が検出された。

分子系統樹解析の結果、JP-I 型に分類された 6 検体 (Oita2, 3, 4, 7, 10, 11) のうち 2 検体 (Oita3, 4) は C-78 ワクチン株と同一、残り 4 検体は C-78 ワクチン株や野外株の JP/Kagoshima/2008 及び JP/Wakayama-3/2004 株に近縁であり、4/91 型に分類された 4 検体 (Oita5, 6, 12, 14) は 4/91 ワクチン株に近縁であった (図 4)。また、Mass 型に分類された 3 検体 (病性鑑定材料 : Oita2022、モニタリング検査材料 2 検体 : Oita1, Oita15) Oita2022, Oita1, Oita15 は H120 ワクチン株、JP/Nerima/53 ワクチン株、Ma5 ワクチン株にそれぞれ近縁で、野外株では Oita2022, Oita1 が、2004 年に和歌山県の鶏から分離された JP/Wakayama-4/2004 株に近縁であり、JP-II 型に分類された 1 検体 (Oita13) は TM86 ワクチン株や野外株の JP/Nagasaki/2015 株に近縁であった (図 5)。

図4 分子系統樹解析

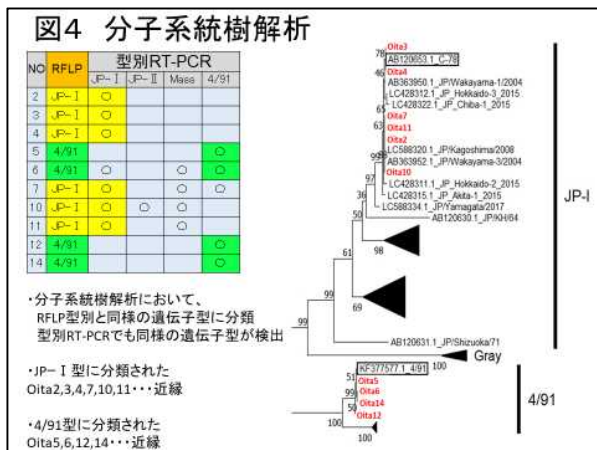
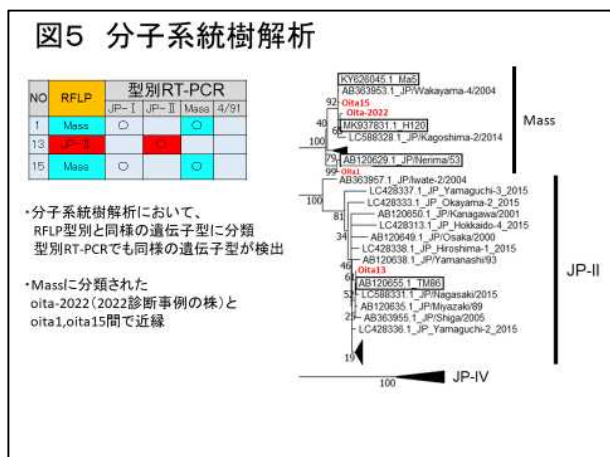


図5 分子系統樹解析



### 【考察】

S1 遺伝子型別 RT-PCR では 1 つの検体から複数の遺伝子型が検出され、野外では多くの遺伝子型が異なる IBV 感染が示唆された。ただし、IBV の症状として、呼吸器からのウイルス排泄は 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の報告 [10] もあり、モニタリング検査材料では気管・クロアカスワブプールを用いたことから、気管スワブおよびクロアカスワブそれぞれ検査を実施することにより、詳細な状況を調査できることが考えられた。

S1 遺伝子型別 RT-PCR により使用ワクチン株と同じ遺伝子型が検出された 7 検体について、2 検体を除き RFLP でも同様の遺伝子型と判定されたが、生ワクチンのワクチン株は発育鶏卵や鶏由来細胞に継代し作出されるため、発育鶏卵に順応したワクチン株が容易に分離される可能性が高く [11]、系統樹解析の結果ではワクチン株との相同性 99% 以上と非常に高い結果であったため、本試験ではワクチン由来株が分離されたものと考えられた。

分子系統樹解析の結果では、IB ワクチン接種農場における 2 検体 (Oita3, 4) は C-78 ワクチン株と同一であったが、当該農場は初生時に Mass 型のワクチン接種 1 回のみであった。また、IB ワクチン未接種農場において、ワクチンと近縁な株が分離された (Oita13, 14)。ワクチン接種鶏から排出された IB の生ワクチンが鶏群内において常在化していた可能性のある事例も報告されており [12]、別鶏群におけるワクチン接種歴を把握することは、IBV 遺伝子検査の結果を整理する上での検討材料として重要であると考えられた。

今後は、発育鶏卵培養においてワクチン株が分離される可能性が高いことを考慮した上で、臨床症状やワクチン接種歴、病理組織学的検査の結果を踏まえ、農場に常在している可能性のある IBV の遺伝子型を確認する一つ的手段として S1 遺伝子型別 RT-PCR を実施していきたいと考える。

### 【参考文献】

- [1] 鶏病研究会： 伝染性気管支炎ウイルスの型別と予防，鶏病研究会報，46-1，1-12 (2010)
- [2] Cavanagh, D. Coronavirus IBV: structural characterization of the spike

- protein. J. Gen. Virol. 64: 2577-2583 (1983)
- [3] 鶏病研究会 編：カラーマニュアル 鳥の病気, 鶏病研究会. 18-19(1995)
- [4] Mase M et al: Genotyping of infectious bronchitis viruses isolated in Japan during 2008-2019, J. Vet. Med. Sci. 83, 522-526 (2021)
- [5] Mase M, Tsukamoto K, Imai K, Yamaguchi S : Arch Virol. 149, 2069-2078 (2004)
- [6] Ariyoshi, R et al., Classification of IBV S1 genotypes by direct reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and relationship between serotypes and genotypes of strains isolated between 1998 and 2008 in Japan, J. Vet. Med. Sci. 72, 687-692(2010)
- [7] Mase, M. et al., Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Japan, ArchVirol. 149, 2069-2078 (2004)
- [8] Shimazaki Y, Watanabe Y, Harada M, Seki Y, Kuroda Y, Fukuda M, et al., Genetic analysis of the S1 gene of 4/91 type infectious bronchitis virus isolated in Japan, J Vet Med Sci. 71(5):583-588(2009)
- [9] 鶏病研究会：鶏伝染性気管支炎ウイルスの遺伝子型特異的 PCR プライマーを用いた型別, 鶏病研究会報, 57-1, 17-21 (2021)
- [10] 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)
- [11] 有吉理佳子ら：伝染性気管支炎の最近の野外発生状況とワクチン防疫, 鶏病研究会報, 52, 231-241 (2017)
- [12] 嶋崎洋子ら：2003～2005年に国内で分離された伝染性気管支炎ウイルスの性状, 鶏病研究会報, 44, 21-27 (2008)