

業績ノート

アミノ酸変異を伴うワクチン類似株による 伝染性ファブリキウス嚢病

齋藤拓海¹⁾, 山梨祐未¹⁾

1) 宮城県仙台家畜保健衛生所

1 はじめに

伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) は、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) による急性感染症であり、移行抗体の消失する3～5週齢の鶏に多発⁷⁾し、本病に感染すると、ファブリキウス嚢 (F嚢) を中心としたリンパ組織が障害を受け、免疫抑制により大腸菌症及び封入体肝炎等の他疾病を誘発する場合がある。IBDVは2分節 (分節A及びB) の2本鎖RNAウイルスで、分節Aには構造蛋白であるVP2及びVP3、ウイルスプロテアーゼであるVP4がコードされ、このうちVP2は、病原性及び抗原性に関与している³⁾。VP2の特定のアミノ酸領域 (aa206-350) は変異の多い領域であり、この領域の塩基配列に基づき、7つの遺伝子型 (G1～G7) に分類されている²⁾。

今回、県内の肉用鶏農場において、病原性に関与するアミノ酸変異を伴うワクチン類似株によるIBDが確認されたので、その概要を報告する。

2 症例概要

農場はブロイラーを3鶏舎で3.6万羽を飼養し、セミウィンドウレスで平飼いの農場であった。鶏種はチャンキー種で、県外の孵卵場から導入していた。導入は3鶏舎を7日間程度で行い、各鶏舎約50日齢で出荷後、空舎期間 (6日間) が設けられていた。

農場のワクチンプログラムは、14及び28日齢でニューカッスル病、19日齢でIBDワクチン (K株)

を接種していた。

令和5年7月3日に第2及び3鶏舎で下痢及び死亡羽数増加 (2羽→60羽) が確認されたため、直ちに現場家保が農場立入を行い、鳥インフルエンザ簡易検査を実施して、全羽陰性を確認した。その後7月5日に再度立入し、下痢が続いていた2号鶏舎で病性鑑定を実施した。

3 材料と方法

(1) 病理学的検査

2号鶏舎の生鶏3羽 (38日齢, No.1～3) を病理解剖に供した。病理解剖後、定法に従い10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、組織標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、病理組織学的検査を実施した。またF嚢の組織切片に対し市販キット (シンプルステインMAX-PO (MULTI), ニチレイバイオサイエンス社) 及びマウス抗IBDVモノクローナル抗体 (IBD92, 2000倍希釈, HyTest社) を用いた免疫染色を実施した。抗原賦活化は0.1%アクチナーゼ処理 (PBS, 37℃, 30分) にて実施し、一次抗体は4℃で一晩反応させた。

(2) 細菌学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺を5%羊血液寒天培地及びDHL寒天培地で好気培養、小腸内容物を5%卵黄加変法GAM寒天培地で嫌気培養を実施した。

(3) 生化学的検査

EDTA加血液で血球計測し、また、血液塗抹標本を作製し、メイギムザ染色を実施した。血清で富士ドライケムNX500V（富士フイルム株式会社）による血液生化学的検査を実施した。

(4) ウイルス学的検査

① ウイルス分離

9～11日齢の発育鶏卵を用いた尿膜腔接種法（鳥インフルエンザウイルス（AIV）・ニューカッスル病ウイルス（NDV）及び漿尿膜上接種法（IBDV）を実施した。漿尿膜上接種法は、F囊の10%乳剤を漿尿膜上接種し、37℃で7日間継代培養し、鶏胚の変化を確認した。

② 遺伝子検査

肝臓、腎臓、肺、気管、F囊の10%乳剤を作製し、鶏伝染性気管支炎ウイルス（IBV）、鶏アデノウイルス（FAV）、鶏貧血ウイルス（CAV）、伝染性喉頭気管炎ウイルス（ILT）及びIBDV⁴⁾の特異的プライマーを用いてPCRまたはRT-PCRを実施した。分離されたIBDVについては、制限酵素*Acc I*（タカラバイオ株式会社）を用いたRFLP解析による遺伝子型別を実施した。VP2領域の塩基配列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に依頼し、分子系統樹解析を行った。

4 結 果

(1) 病理学的検査

肉眼所見では全羽でF囊の萎縮及び腫大は認められなかったが、病理組織所見ではNo. 1 及びNo. 3 においてF囊のリンパ球の減少及びマクロファージ浸潤が認められ、IBDV抗体を用いた免疫染色ではIBDV抗原の陽性像が病変部位に一致して認められた（図1）。

(2) 細菌学的検査及び生化学的検査

好気培養によりNo. 3 の肺から大腸菌が分離された。血液塗抹では全検体で偽好酸球比増加及びリンパ球比減少、血液生化学的検査ではTP高値及びA/G比低値が認められた（表1）。

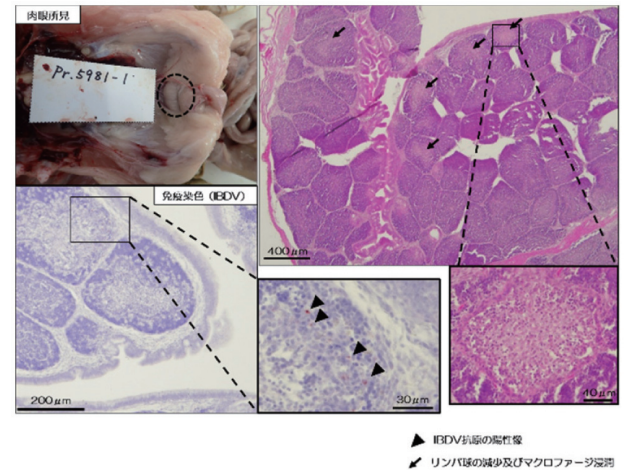


図1 F囊の肉眼・組織所見・免疫結果（No.1）

表1 細菌及び生化学的検査結果まとめ

細菌学的検査					
区分		No.1	No.2	No.3	
一般細菌検査		—	—	—	大腸菌（肺）
定量培養検査		—	—	—	
生化学的検査					
区分	項目	単位	No.1	No.2	No.3
血球計測	Ht	%	31.5	33.0	34.0
白血球百分比	Bas.	%	0.0	0.0	0.0
	Eos.	%	0.5	0.5	0.0
	Hetero.	%	60.5	49.0	44.0
	Ly.	%	15.5	36.5	43.5
	Mono.	%	23.5	14.0	12.5
血液生化学的検査	TP	g/dl	4.2	4.3	4.3
	Alb	g/dl	1.5	1.7	1.6
	A/G	—	0.56	0.65	0.59
	UA	mg/dl	7.9	14.0	12.3
	GLU	mg/dl	184	205	200
	T-CHO	mg/dl	178	168	180
	TG	mg/dl	19	36	48

(3) ウイルス学的検査

① ウイルス分離

F囊の漿尿膜上接種法ではNo. 1 及びNo. 3 がIBDV陽性となり、接種7日目において鶏胚の矮小化及びカーリングを認めた（表2）。

② 遺伝子検査

No. 1 及びNo. 3 のF囊からIBDV遺伝子が検出された（表2、図2）。

RFLP解析では、2検体で検出されたPCR産物（474bp）は、制限酵素*Acc I* で297bpと177bpに切断され、ワクチンK株と同一の切断パターンが確認された。分子系統樹解析では、既報の従来型

(G1) のウイルス株と同じクラスターに属し、K株と近縁であることが判明した (図3)。

塩基配列解析の結果、分離株No. 1 及びNo. 3 の塩基配列の相同性は100%一致したが、分離株とK株を比較すると1塩基の変異 (K株: チミン, 分離株: グアニン) が確認され、相同性は99.7%となった。この変異により、253位アミノ酸がヒスチジンからグルタミンに変異した。その他の病原性及び抗原性に関わるアミノ酸の変異は確認されなかった。

表2 ウイルス学的検査結果まとめ

材料	遺伝子検査					ウイルス分離		
	IBV	FAV	CAV	ILTV	IBDV	AIV	NDV	IBDV
	気管 腎臓	肝臓	肝臓	気管 肺	F囊	気管スワブ クロアスワブ		F囊
No.1	—	—	—	—	+	—	—	+ 様小化 カーリング
No.2	—	—	—	—	—	—	—	—
No.3	—	—	—	—	+	—	—	+ 様小化 カーリング

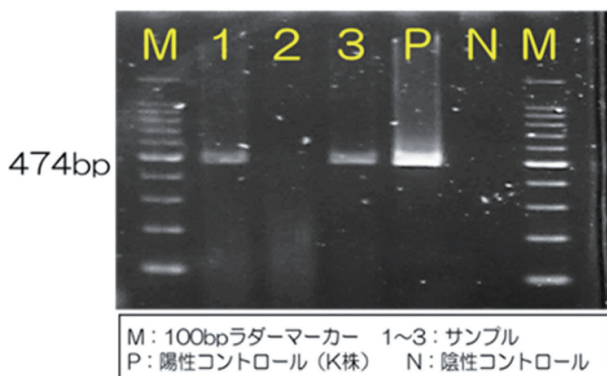


図2 RT-PCR泳動像 (IBDV)

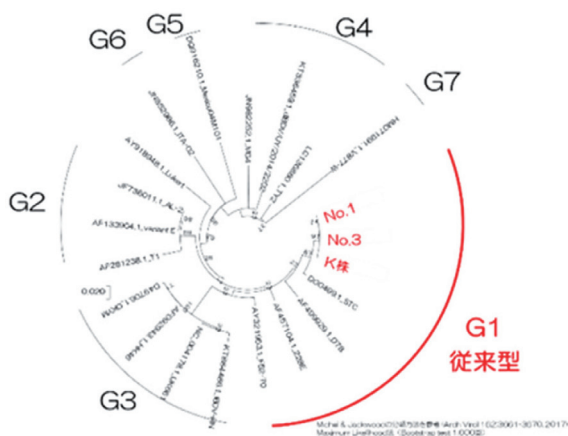


図3 分子系統樹解析結果 (VP2領域)

5 まとめ及び考察

本症例は、病理学的検査及びウイルス学的検査結果から、アミノ酸変異を伴うワクチン類似株によるIBDと診断した。

VP2領域の253位アミノ酸のヒスチジンからグルタミンへの変異はIBDVの病原性において重要とされ、この253位アミノ酸の変異を伴うIBDVの検出事例は国内でいくつか報告されている^{1, 2, 3, 6)}。またSPF鶏を用いた感染実験においても、鶏内でワクチン株の継代を繰り返すことで253位アミノ酸の変異が起こり、病原性が増強されることが報告されている^{1, 2)}。本症例では肉眼的に全羽のF囊の萎縮は確認されなかったものの、組織学的にF囊のリンパ球減少及びマクロファージ浸潤並びにIBDV陽性抗原が認められた。しかし、今回の病性鑑定の実施は、死亡羽数増加が漸減している時期だった点及び感染実験による検証ができない点を鑑みると、253位アミノ酸の変異がウイルスの病原性にどの程度の影響を与えたかは不明である。

IBDVに感染した鶏は、糞便中に大量のウイルスを排泄する⁷⁾ことから、本症例では、ワクチン投与後、鶏から排泄されたK株が環境中に残存し、その後、再感染に伴い変異が発生した可能性が考えられた。IBDVはエンベロープを持たない消毒耐性が高いウイルスであり、0.05%水酸化ナトリウムを添加したpH12.9以上のアルカリ条件下での逆性石鹼製剤が有効であった報告及び石灰乳の使用によるアルカリ環境がIBDVに有効である可能性が報告されている¹⁾。農場への聞き取りでは、逆性石鹼製剤を使用していたものの、アルカリ性製剤の添加や石灰乳は使用していなかった。洗浄・消毒後の空舎期間は長いほど感染リスクは低くなり、3週間程度が推奨されている⁵⁾が、農場では6日間と短かったことから、感染リスクが高まっていた可能性が考えられた。洗浄・消毒不足や乾燥不足により、環境中に残留したIBDVは連続的な発生の原因となる⁷⁾ことから、有効な消毒方法で環境中に残留したウイルスを除去し、再感染によるウイルスの変異機会を与えないことが重要である¹⁾。

IBDV感染予防のためには、雛への高度の抗体付

与が必要であることから、免疫された種鶏からの移行抗体が消失する時期に雛への確実なワクチン接種が重要となる⁸⁾。ワクチン接種する際は、接種前の断水時間、飲水量、飲水時間に留意する必要がある。

分離株では抗原性に関与するアミノ酸の変異は確認されなかったが、複数のアミノ酸変異がみられる抗原変異型 (G2) では、従来型 (G1) に対する中和モノクローナル抗体が結合する抗原決定基を消失したウイルスであることが確認されており、従来型 (G1) のワクチン効果への影響が懸念される^{2,4)}。分離株は従来型 (G1) であり、抗原性に関与するアミノ酸の変異は確認されなかったことから、抗原性への影響はないと推測され、農場で使用しているワクチンK株は、分離株に対して効果が期待できると考えられた。

以上のことから、本病の再発防止のためには、ウイルスの環境中への残留を防ぐため、鶏舎環境の消毒に重点を置いた飼養衛生管理基準遵守を再徹底するとともに、鶏群への確実な免疫付与を目的としたワクチン接種を継続していくことが重要である。

6 謝 辞

本稿を終えるにあたり、遺伝子解析にご協力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の谷川太一郎先生に深謝いたします。

7 引用文献

- 1) 長千恵, 柄裕子, 黒田萌黄ほか. 鳥取県で検出された伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) に関する調査と養鶏場における対策について. 鶏病研究会報. 56 (3), 122-127 (2020)
- 2) 秦祐介, 寺山好美, 長崎県内で2019~2021年に検出された伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの分子系統樹解析. 鶏病研究会報. 52 (2), 80-85 (2022)
- 3) 井上大輔, 早島彬美, 重國由起子: 国内で確認された抗原変異型伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの性状と市販ワクチンの有効性. 令和元年度長崎県家畜保健衛生業績発表会集録. 60, 48-61 (2019)
- 4) 林志鋒. 伝染性ファブリキウス嚢病の検査法 (2). 鶏病研究会報. 30 (3), 144-148 (1994)
- 5) 日本チャンキー協会: バイオセキュリティ. Aviagen. (2018)
- 6) 坂下奈津美, 北本英司, 瀬尾泰隆ほか. 採卵育成鶏に発生した従来型伝染性ファブリキウス嚢病の一症例. 鶏病研究会報. 53 (4), 232-236 (2017)
- 7) 山口剛士: 伝染性ファブリキウス嚢病. 56-58. 家禽疾病学. 第二版. 鶏病研究会編. つくば (2022)
- 8) 山口剛士. 伝染性ファブリキウス嚢病の予防. 鶏病研究会報. 28, 31-39 (1992)