

原 著

岩手県で分離された伝染性気管支炎ウイルスの遺伝子学的および血清学的解析

関 慶久, 清宮幸男, 本川正人, 八重樫岳司

要 約

2004年および2005年に岩手県内4農場の病鶏から分離された伝染性気管支炎ウイルス4株を遺伝子学的および血清学的に解析した。S1蛋白領域の分子系統解析により、4株 (IW 1~4) は同順序でJP-I, -II, -IIIおよびUK/4/91遺伝子型に分類された。HaeII, EcoRIおよびPstIを用いたRFLP解析により、3株 (IW 1, 3, 4) の切断像はそれぞれ既存の同一遺伝子型株のそれと一致した。他の1株 (IW 2) のHaeII切断像は既存のJP-I, -II, -III, UK/4/91, MassachusettsおよびGray遺伝子型株のそれらと相違した。交差中和試験では、4株 (IW 1~4), H120およびGrayの各指示ウイルスは、同一遺伝子型株に対する免疫血清により強く中和される傾向がみられた。得られた成績から、分離株の遺伝子型と抗原性状は関連することが示唆された。

キーワード：伝染性気管支炎ウイルス, 中和試験, 分子系統解析, RFLP解析, S1蛋白。

伝染性気管支炎ウイルス (IBV) は感染鶏に呼吸器症状や産卵低下を含む様々な臨床症状を引き起こす [5]。IBVは他の病原体感染の誘発因子としても関与して、しばしば大腸菌の気道感染を促す [6, 19]。本病予防にワクチンが用いられているが、IBVの抗原性は多様であり [2, 7, 9, 10, 15, 20]、流行株の抗原性に近似したワクチン株を選択する必要がある。

IBVのスパイク蛋白はS1およびS2蛋白から構成され [1]、中和抗体を誘導する主要な抗原決定基はS1蛋白に含まれる [3, 11, 13]。この事実から、S1蛋白コード遺伝子の変異がIBVの抗原性状の変化に帰することが示唆され [4, 18, 24, 25]、同遺伝子の解析がIBVの抗原性の推測に応用されている [8, 12, 14-17, 22, 23]。

Maseら [17] は1951~2003年のわが国で分離されたIBV31株のS1蛋白領域を分子系統学的に解析し、分離株がJP-I, -II, -III, MassachusettsおよびGrayから成る5種類の遺伝子型に分類され、近年の主要な流行株は前3者に属し、欧米諸国における流行株のそれと相違することを報告している。IBV株の遺伝子型と抗原性状の関連性について、諸外国の分離株で検討されているが [15, 23]、わが国の分離株では十分に検討されていない。

この報告では、岩手県内で分離されたIBV4株の遺伝子学的および血清学的検査成績を述べる。

材料および方法

供試株：2004年および翌年に、4株のIBV

(IW 1～4) が岩手県内4農場の病鶏から2～3代の発育鶏卵培養により分離された。2株(IW 1, 4)は大腸菌症と診断された約50日齢の肉用鶏の気管から、他の2株(IW 2, 3)は産卵低下が観察された約15ヶ月齢の採卵鶏の腎臓および卵管から分離された。4農場ではIBVワクチンを用いていなかった。

遺伝子学的解析には発育鶏卵で2～3代培養して得た尿膜腔液を供試した。中和試験には発育鶏卵を用いた16～20代培養後の尿膜腔液を、さらに鶏初代腎(CK)細胞で3代継代し、明瞭な細胞変性効果(CPE)を確認した培養上清を使用した。

遺伝子学的解析：供試4株のRNAをTRIzol LS試薬^{a)}を用いて抽出した。Maseら[17]の方法に従い、IBVのS1蛋白コード遺伝子を標的としたプライマー組(IBV-S1：5'-AGG AAT GGT AAG TTR CTR GTW AGA G-3', IBV-S2：5'-GCG CAG TAC CRT TRA YAA AAT AAG C-3')を用い、Super Script One-Step RT-PCR with Platinum Taq^{a)}によりRT-PCRを実施した。増幅産物をMicrocon-PCR^{b)}により精製後、前述のプライマー組およびBigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit^{c)}を用いてシーケンス反応を行った。反応産物をCentriSep Spin Columns^{c)}により精製し、ABI377 DNA Sequencer^{c)}を用いて塩基配列を解読し、推定アミノ酸配列を得た。わが国のIBV生ワクチン株(C78, JP9758, TM86, Miyazaki, UK/4/91, H120, KU, Kita-1, Nerima, ON/74)および後述の抗血清作成に用いた免疫株(JP/Toyama/2000, TM86, JP/Fukui/2000, UK/4/91, H120, Gray)を含む既存の50株の同配列をGenBankから入手した。計54株の系統樹をDNASTARソフトウェア^{d)}を用いて近隣接

合法[21]により作成した。

RT-PCR産物のRFLP解析[17]を実施した。制限酵素にはHaeII^{e)}およびEcoRI^{e)}[17]とともに、MassachusettsおよびUK/4/91の両遺伝子型株を識別し得るPstI^{e)}(真瀬ら、未公表)を用いた。本解析の参照株として、GenBankからわが国の既存株、UK/4/91, UK/7/93およびGray株の塩基配列を得て、それぞれのRFLP像を推測し、供試株のそれと比較した。

交差中和試験：96穴マイクロプレートで単層培養したCK細胞を用いて、血清希釈法により中和試験を行った。指示ウイルスにはIW1～4, H120およびGrayの6株を、抗血清にはJP/Toyama/2000, TM86, JP/Fukui/2000, UK/4/91, H120およびGrayの各株で免疫し、56℃, 30分間の非働化処理を施した鶏血清を用いた。2倍階段希釈した抗血清を200 TCID₅₀/0.1mlに調整した等量の各指示ウイルスと混合し、37℃で60分間感作させた。2穴のCK細胞にそれぞれ0.1mlの感作液を接種し、37℃で3日間培養した。CPEの出現を抑制した血清の最高希釈倍数の逆数を抗体価とし、5倍以上を陽性とした。

成 績

遺伝子学的解析：S1蛋白の推定アミノ酸配列に基づく分子系統樹を図1に示す。供試4株(IW1～4)は同順序でJP-I, -II, -IIIおよびUK/4/91の4種類の遺伝子型に分類された。わが国の生ワクチン株および中和試験に供した抗血清の免疫株のうち、C78, JP9758およびJP/Toyama/2000株はJP-Iに、TM86およびMiyazaki株はJP-IIに、JP/Fukui/2000株はJP-IIIに、UK/4/91株はUK/4/91に、H120, KU, NerimaおよびKita-1株はMassachusetts

^{a)} Invitrogen, USA. ^{b)} Millipore, USA. ^{c)} Applied Biosystems, USA. ^{d)} DNASTAR, USA.

^{e)} Promega, USA.

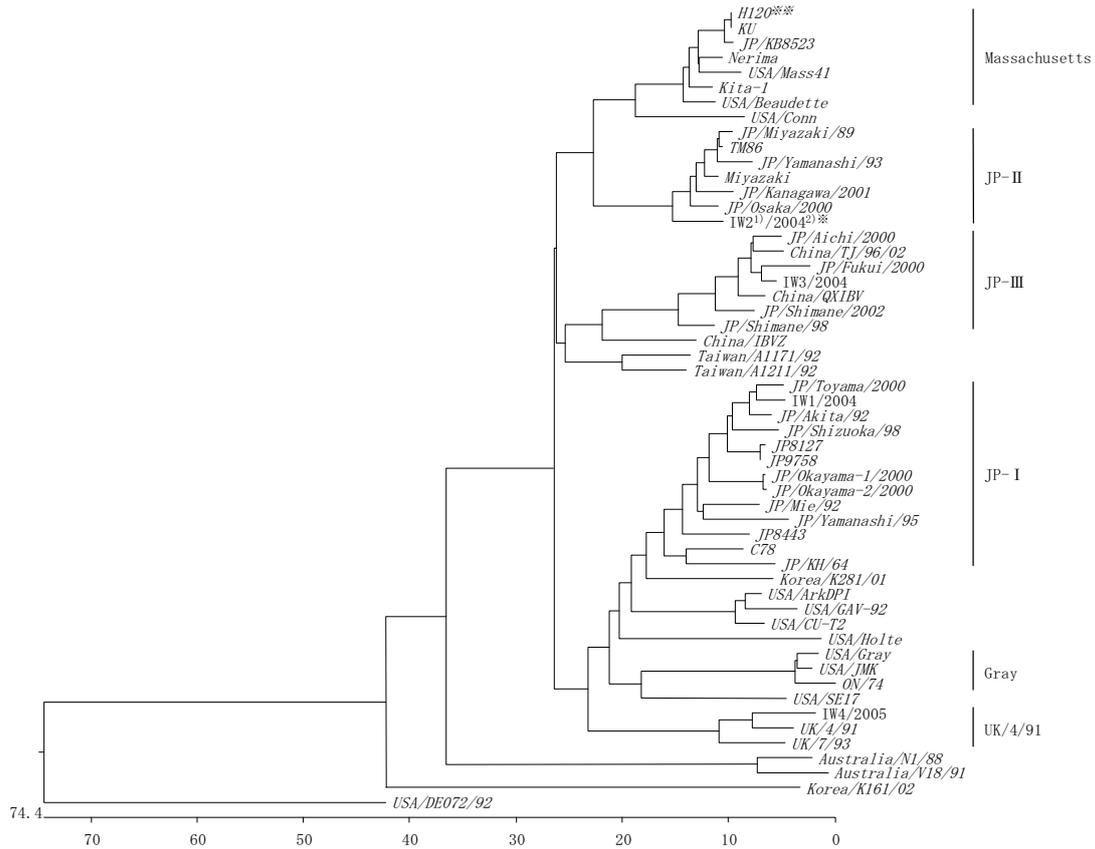


図1 S1蛋白の分子系統樹

※：供試株；1) 分離順位，2) 分離年。

※※：イタリック体はデータベース上の参照株を示す。

に、ならびにON/74およびGray株はGrayの各遺伝子型に属した。

供試4株 (IW 1~4) および参照株のRFLP解析成績を表1に示す。3株 (IW 1, 3, 4) の切断パターンは、それぞれ同一の遺伝子型株のいずれかのそれと一致した。すなわち、IW 1はJP-I 遺伝子型に属する6株 (JP/Toyama/2000, JP/Okayama-1/2000, JP/Okayama-2/2000, JP/Mie/92, JP/KH/64, C78) と、IW 3はJP-III 遺伝子型に属する2株 (JP/Fukui/2000, JP/Aichi/2000) と、IW 4はUK/4/91 遺伝子型に属する同株と同一の切断パターンを示した。これら3株 (IW 1, 3, 4) の切断パターンは、互いに他の遺伝子型のそれと相違していた。

他方、他の1株 (IW 2) のHaeII 切断像は287, 225および162bpを示し、JP-II 遺伝子型の

既存株 (JP/Yamanashi/93, JP/Miyazaki/89, JP/Kanagawa/2001, Miyazaki, TM86, JP/Osaka/2000) の287, 175, 162および50bpあるいは287, 212および175bpと相違していた (表1)。同株 (IW 2) の増幅産物の塩基配列上、5'末端側から212番目のシトシンがチミンに置換され、JP-II 遺伝子型の既存株に存在するHaeII 認識部位が消失していた (図2)。HaeII を含む各制限酵素による同株 (IW 2) のRFLP像はJP-II 以外の各遺伝子型株のそれとも相違していた。

交差中和試験：JP/Toyama/2000, TM86, UK/4/91およびGray株の各抗血清は、同一遺伝子型の指示ウイルスであるIW 1, 2, 4およびGrayの各株に対して最も高い中和抗体価を示した。抗H120株血清は指示ウイルスがH120およびGrayの際に、抗JP/Fukui/2000株

表1 RFLP解析成績

遺伝子型*	株	増幅産物 (bp)	制限酵素別切断片 (bp)		
			<i>Hae</i> II	<i>Eco</i> R I	<i>Pst</i> I
JP-I	IW1	692	461, 231	ND**	ND
	JP/Toyama/2000				
	JP/Okayama-1/2000				
	JP/Okayama-2/2000				
	JP/Mie/92				
	JP/KH/64				
	C78				
	JP/Akita/92	692	461, 231	ND	237, 229, 226
	JP9758				
	JP8127				
JP8443	692	461, 162, 69	ND	463, 229	
JP/Shizuoka/98	689	305, 228, 156	ND	237, 229, 223	
JP/Yamanashi/95	692	461, 231	381, 311	ND	
JP-II	IW2	674	287, 225, 162	ND	586, 88
	JP/Yamanashi/93	674	287, 175, 162, 50	ND	586, 88
	JP/Miyazaki/89				
	JP/Kanagawa/2001				
	Miyazaki				
TM86					
JP/Osaka/2000	674	287, 212, 175	ND	586, 88	
JP-III	IW3	680	ND	502, 178	ND
	JP/Fukui/2000				
	JP/Aichi/2000				
	JP/Shimane/2002	674	ND	502, 172	ND
JP/Shimane/98	677	ND	502, 175	589, 88	
UK/4/91	IW4	677	ND	ND	ND
	UK/4/91				
	UK/7/93	677	599, 78	ND	ND
Massachusetts	H120	671	ND	ND	583, 88
	KU				
	JP/KB8523				
	Nerima	671	ND	409, 262	583, 88
Kita-1	665	ND	ND	577, 88	
Gray	Gray	689	566, 123	ND	ND
	ON/74				

*: 分子系統解析に基づく分類, **: 切断されず.

表2 交差中和試験成績

ウイルス	抗血清					
	Toyama	TM86	Fukui	4/91	H120	Gray
IW1	320	5	40	<5	<5	<5
IW2	20	10	20	5	5	<5
IW3	10	<5	40	<5	5	<5
IW4	10	5	20	20	5	<5
H120	10	<5	40	<5	40	<5
Gray	20	5	40	5	40	20

血清は指示ウイルスがIW 1, IW 3, H120およびGrayの際に最も高い中和抗体価を示した(表2).

考 察

岩手県内で分離された4株のIBV (IW1~4)は, S1蛋白の分子系統解析によりJP-I, -II, -IIIおよびUK/4/91の各遺伝子型に分類された. 限られた供試株数ではあるものの, 同県内に存在するIBV株の遺伝子型は多様であり, これまでわが国で確認されていないUK/4/91 [17,

22] も含まれていた.

供試4株中3株のRFLP像は同一遺伝子型の既存株のそれと一致した. また, 4供試株のRFLP像は異なる遺伝子型の既存株のそれと相違しており, 互いに識別可能であった. 得られた結果は, RFLP解析がIBVの遺伝子型を迅速かつ簡便に識別し得る手法であることを示唆するMaseら [17] の見解を支持するに思われた.

他方, JP-II 遺伝子型に分類された1供試株 (IW2) の*Hae*II切断像は, JP-II 遺伝子型の既存株のそれと相違し, 同酵素認識部位に点変異が存在していた. Gelbら [8] は分子系統解析あるいはRFLP解析に基づく両遺伝子型が相違したIBV株が, 既存株が有する制限酵素認識部位を点変異により消失していることを確認し, 分子系統解析がより精度高く遺伝子型を識別す

```

26  ATGTTGGTGAGGTCAGTCTTTTTAGCGACTCTTTTCGTTTGCACATGTAGTGCAATTCCTTTATGATAATGGTAGTTACGT  JP/Yamanashi/93
    ..... A..... A... T..... T..... T. A. T. A..... C..... T..  JP/Osaka/2000
    ..... A. AAC. T.. T.. A..... T..... T..... TG.. T. G..... C... A... TC.....  IW2

106  TTATTACTATCAGAGTGCTTTTAGGCCCCAGATGGTGGCATTGCGAGGAGGCGCTTATGCAGTAGTAAATGTTTCTT
    ..... C..... C..... C..... A. A. TA..... A. A..... T.....
    ..... C... A..... C..... A. A. TA..... A. A..... T.....

186  CTGTAACAAACATGACGGCAGCGCTGTGTGTATAGGTGGTAGTCTCCAAGGCAGCCGTGTAGTAAATGCTTCTTCT
    ..... A..... T..... T..... C..... G.....
    ..... A..... T. A..... T..... T..... C..... TC. G.

266  ATAGCTATGATTGCACCGGTGACGGTATGACTTGGTCTACATCACAATTTTGTACTGCACACTGCAATTTTTCGCAAGT
    ..... C.....
    ..... C.....

346  TACAGTGTGGTTACACATTGTTATAACTCATCGCAAGGCGCTTGTCTACGGGTTTGTCCACGGAATCATATACGTA
    ..... A.....
    ..... T..... A. C... A. T...

426  TTTCTGCTATGAAAAATGGTCTCTGTTTATAATTTAACAATTAGTGTGTCCAAACACCCCTAAATTTAAGTCATTTACG
    ..... T.....

506  TGTGTTAACAATTATACATCTGTCTATCTGAATGGTGACCTTGTTTACACTTCTAATGAGACCACAGATGTTACATCTGC
    ..... T.....
    ..... T.....

586  AGGTGTTCAATTTTAAAGCCGGTGGGCCTATAACTATAAAAATTATGAGAGAAGTTAAAGCCTTA
    ..... T..... T.....
    ..... T.....

```

図2 JP-II 遺伝子型の既存株および供試株のS1蛋白遺伝子の比較
HaeII 認識部位を枠線で示す。

ると述べている。得られた成績からも、既報 [17] のRFLP像と異なるIBV株の遺伝子型の分類にはシークエンシングが必要であった。

交差中和試験では、指示ウイルスと抗血清免疫株の遺伝子型が同一の際に、前者の増殖がより強く抑制される傾向が得られた。分子系統解析により、JP-I, -II, UK/4/91, MassachusettsおよびGrayの各遺伝子型にはひとつ以上のわが国の生ワクチン株が含まれていた。この結果から、S1蛋白の分子系統解析に基づく遺伝子型と中和試験に基づく血清型との関連性を検討した諸外国の報告 [15, 23] と同様に、Maseら [17] の型別法に基づく各遺伝子型が抗原性状と関連性を有する分類であり、同法により、野外流行株の抗原性状を考慮したワクチンの選択が可能であるように思われた。

抗JP/Fukui/2000株血清は、異なる遺伝子型に属する指示ウイルスに対して広範な交差中和反応を示した。本成績の正確な原因は不明であ

るが、中和抗体を誘導し得るS2蛋白 [13] の関与が要因のひとつとして考えられる。

終わりに、抗血清を分与して頂いた（独）動物衛生研究所の真瀬昌司博士および動物医薬品検査所鶏病製剤第一検査室の諸氏ならびにシークエンシングのご協力を得た岩手県農業研究センター畜産研究所家畜工学研究室の佐藤洋一氏に深謝する。

引用文献

- [1] Cavanagh D: J Gen Virol, 64, 2577-2583 (1983)
- [2] Cavanagh D, Davis PJ, Cook JKA, Li D, Kant A, Koch G: Avian Pathol, 21, 33-43 (1992)
- [3] Cavanagh D, Davis PJ, Darbyshire JH, Peters RW: J Gen Virol, 67, 1435-1442 (1986)
- [4] Cavanagh D, Davis PJ, Mockett APA:

- Virus Res, 11, 141-150 (1988)
- [5] Cavanagh D, Naqi SA : Diseases of Poultry, Calnek BW, et al eds, 10th ed, 511-526, Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa (1997)
- [6] Cook JKA, Smith HW, Huggins MB : J Gen Virol, 67, 1427-1434 (1986)
- [7] Doi M, Yamakami T, Koimaru H, Yoshimura M, Masu S, Shirai J, Kawamura H: Avian Dis, 26, 946-956 (1982)
- [8] Gelb J, Weisman Y, Ladman BS, Meir R : Avian Pathol, 34, 194-203 (2005)
- [9] Hofstad MS : Avian Dis, 25, 650-654 (1981)
- [10] Hopkins SR : Avian Dis, 18, 231-239 (1974)
- [11] Ignjatovic J, Galli L : Arch Virol, 138, 117-134 (1994)
- [12] Keeler CL, Reed KL, Nix WA, Gelb J : Avian Dis, 42, 275-284 (1998)
- [13] Koch G, Hartog L, Kant A, van Roozelaar DJ : J Gen Virol, 71, 1929-1935 (1990)
- [14] Kwon HM, Jackwood MW, Gelb J : Avian Dis, 37, 194-202 (1993)
- [15] Lee CW, Hilt DA, Jackwood MW : J Vet Diagn Invest, 15, 344-348 (2003)
- [16] Lee SK, Sung HW, Kwon HM : Arch Virol, 149, 481-494 (2004)
- [17] Mase M, Tsukamoto K, Imai K, Yamaguchi S : Arch Virol, 149, 2069-2078 (2004)
- [18] Moore KM, Jackwood MW, Hilt DA : Arch Virol, 142, 2249-2256 (1997)
- [19] Nakamura K, Cook JKA, Frazier JA, Narita M : Avian Dis, 36, 881-890 (1992)
- [20] Parsons D, Ellis MM, Cavanagh D, Cook JKA : Vet Rec, 131, 408-411(1992)
- [21] Saitou N, Nei M : Mol Biol Evol, 4, 406-425 (1987)
- [22] Shieh HK, Shien JH, Chou HY, Shimizu Y, Chen JN, Chang PC : J Vet Med Sci, 66, 555-558 (2004)
- [23] Wang CH, Huang YC : Arch Virol, 145, 291-300 (2000)
- [24] Wang L, Junker D, Collisson EW : Virology, 192, 710-716 (1993)
- [25] Wang L, Junker D, Hock L, Ebiary E, Collisson EW : Virus Res, 34, 327-338 (1994)

