

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05949

研究課題名（和文）鶏の体内における鶏貧血ウイルスの持続感染の検証とその感染機構に関する解析

研究課題名（英文）Analysis of infection dynamics of chicken anemia virus in infected chickens

研究代表者

山本 佑（Yamamoto, Yu）

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・上級研究員

研究者番号：30462542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、鶏に慢性的な発育不良や免疫不全を起こす鶏貧血ウイルスが、鶏の体内において持続的な感染を起こし得るかを明らかにすることである。本研究で我々はin situ hybridization法による病理組織学的な高感度ウイルス検出技術を確立した。また鶏を用いた長期のウイルス感染実験を実施し、鶏貧血ウイルスに対する中和抗体を体内に保有する鶏の一部の臓器において、ウイルスの遺伝子や抗原が発現し得ることを実験的に証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鶏貧血ウイルス感染症は鶏に発育不良や免疫不全を起こすことで養鶏産業に慢性的な悪影響をもたらす疾病である。鶏貧血ウイルスは養鶏施設からの根絶が難しく、これにはウイルスの何らかの特性が関与している可能性がある。本研究では、in situ hybridization法を用いた高感度ウイルス遺伝子検出技術が新たに開発された。また鶏を用いたウイルス感染試験により、鶏の体内における鶏貧血ウイルスの未知なる持続感染機構の存在を示唆する重要な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Chicken anemia virus (CAV) infection is a viral disease that causes growth problem and immunodeficiency in infected chickens, resulting in chronic adverse effects on the poultry industry. In this study, we established a new highly sensitive histopathological CAV gene detection technique using the ISH method. We also experimentally demonstrated that CAV can be detected in some organs of chickens that have neutralizing antibodies against CAV after infection. These findings imply the existence of an unknown infection mechanism of CAV in the chicken body.

研究分野：家禽疾病学

キーワード：鶏 鶏貧血ウイルス 感染機構

1. 研究開始当初の背景

鶏貧血ウイルス(CAV)は国内外に広く蔓延するウイルスであり、鶏に感染して発育不良や免疫力の低下を起こすことで養鶏の生産性に慢性的な悪影響を及ぼす。CAVは鶏を飼養する施設に侵入すると撲滅が困難なウイルスである。この原因として、CAVの非常に強い環境抵抗性や介卵感染と呼ばれる種鶏から雛への特殊なウイルス伝播経路などが考えられている。

一般的に、CAVに感染した鶏では、感染後に体内においてウイルスを不活化する中和抗体が産生されウイルスは排除されると考えられている。従って、現在の養鶏施設でのCAV対策として、卵を産む種鶏へのワクチン接種を行い、種鶏の免疫や雛への移行抗体付与が実施されている。一方、興味深いことに、海外では中和抗体を保有する鶏の体内でCAVの遺伝子が検出されたとする学術論文が数報ある。もしCAVが鶏の体内で持続的な感染が可能ならば、その特性が野外におけるCAVの蔓延に深く関与している可能性がある。本研究では、鶏の体内においてCAVが持続感染する可能性に注目して研究を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、鶏の体内におけるCAVの持続感染の可能性を検証することである。具体的には、鶏へのCAVの長期感染試験を行い、体内における経時的なウイルスの動態を解析する。本研究に取り組むことで、対策が難しいCAV感染症の制圧に貢献できる知見を収集する。

3. 研究の方法

(1) CAV高感度検出技術の確立

本研究では、近年の野外発症例から分離されたウイルス株CAV/Japan/HS1/17(CAV/HS1株)を使用することとし、このウイルスの遺伝子情報を利用して病理組織標本上のウイルス遺伝子を高感度で検出可能な*in situ* hybridization (ISH)法の確立を試みた。また定量PCR法によるCAV遺伝子の検出系の確立を試みた。

(2) 鶏を用いた長期感染試験

SPF鶏受精卵を孵化させ、アイソレーターで飼育する7日齢の雛にCAVを接種する感染試験を実施した。観察期間は6カ月(24週)とし、経時的に臓器や血液などの解析用サンプルを採材して、病理組織学的・ウイルス学的解析を行った。病理組織学的解析として、上述のISH法とCAV抗原(タンパク質)を検出する免疫組織化学法を実施した。ウイルス学的解析として、PCRによるウイルス遺伝子検出と中和抗体検査を実施した。正常対照としてウイルス非接種鶏から解析用サンプルを調整した。感染試験は所属機関による試験計画の承認を得た後に実施した。

4. 研究成果

(1) CAV高感度検出技術の確立

CAV/HS1株のVP1遺伝子配列からISHプローブを作製し、ISH法による病理組織標本上のCAV遺伝子の検出が可能となった。確立したISH法は、32年前(1992年)に作製された古い検査材料からの遺伝子検出も可能であった。ISH陽性シグナルの分布は、免疫染色による

ウイルス抗原の検出部位と同様の傾向を示したが、感度は ISH 法が高かった。ウイルス非感染鶏（陰性対照）では ISH 法は陰性であった。

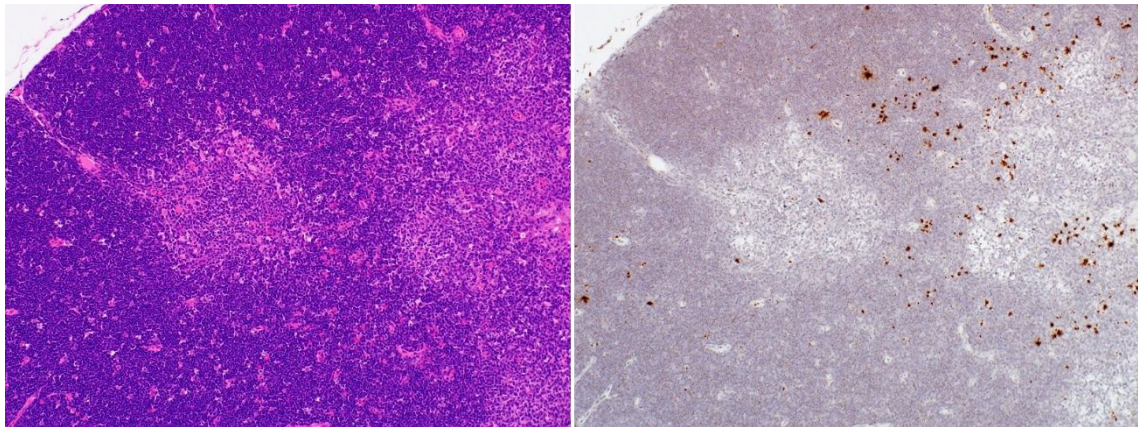
HS1/17 株の遺伝子を検出可能な定量 PCR 法を確立した。ISH 法と同じく検出対象を VP1 遺伝子とし、これを検出可能な MGB プローブおよび PCR プライマーを設計した。

（ 2 ） 鶏を用いた長期感染試験

6 カ月間の感染試験において、ウイルスを接種した鶏には臨床的な異常はほとんど認められず、発育も正常であった。病理組織学的解析によって検出されたウイルスの遺伝子や抗原の発現量は、組織学的な病変を形成する 2 週から 4 週目の解析サンプルで最も高かった。その後は実験終了時点である 6 カ月目まで、一部のリンパ臓器などにおいて断続的に微弱から軽度の発現がみられた（図）。ウイルス学的検査では、PCR 法によるウイルス遺伝子検出結果は病理組織学的検査結果と類似していた。また中和抗体検査によって、ウイルス接種鶏は接種後 4 週から 6 カ月目にかけて中和抗体を高力価で保有していることが明らかになった。ウイルス非接種鶏ではウイルス検出や中和抗体は陰性であった。

（ 3 ） 総括

研究期間を通じて、本研究で我々は ISH 法による病理組織学的な高感度 CAV 検出技術を新たに確立した。また鶏を用いた長期のウイルス感染試験を実施し、CAV 感染後に中和抗体を保有する鶏の体内において、CAV の遺伝子や抗原が一部の臓器の細胞で発現することを実験的に証明した。本研究で得られた知見は、鶏の体内における CAV の未知なる持続感染機構の存在を示唆していると考えられる。今後はウイルス感染機構の詳細について研究を進める必要がある。本研究で得られた知見の一部は国内学会で報告された。



写真：左）ウイルス接種から 2 カ月経過した鶏の胸腺組織。HE 染色。右）左図と同部位において散在性に発現する CAV 遺伝子（茶褐色）。ISH 法。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 山本 佑	4. 巻 12
2. 論文標題 鶏の大量死に關する鶏貧血ウイルスの解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 畜産技術	6. 最初と最後の頁 32-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.57546/livestocktechnology.2022.811-Dec._32	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 DONG Hieu Van, TRAN Giang Thi Huong, KUROKAWA Aoi, YAMAMOTO Yu, TAKEDA Yohei, OGAWA Haruko, IMAI Kunitoshi	4. 巻 84
2. 論文標題 Genetic characterization of chicken anemia viruses newly isolated from diseased chicks in Japan in 2020	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 166 ~ 170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本佑、黒川葵、小川晴子、武田洋平、今井邦俊
2. 発表標題 鶏貧血ウイルス実験感染鶏の体内ウイルス動態に関する病理組織学的解析
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------