

14 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

県南家畜保健衛生所

井上 大輔・早島 彬美

県北家畜保健衛生所

重國 由起子

伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) は、昭和 32 年に米国で最初に発生したヒナの急性ウイルス性伝染病で¹⁰⁾、現在、世界中でその発生が見られる。本病は、ビルナウイルス科アピビルナウイルス属に属する伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) の感染により引き起こされ、わが国では届出伝染病に指定されている。3～6 週齢のひなで感受性が高く^{4, 5)}、ファブリキウス (F) 嚢を中心としたリンパ器官を障害することで免疫抑制を惹起し、他病の誘発やワクチン不応答の原因となる^{19, 40)}。IBDV はエンベロープを有さず、熱や消毒薬等に対して抵抗性が強いいため、環境中で長期間感染性を維持し、しばしば農場に常在化する^{1, 3, 14, 33, 53)}。

IBDV は 2 分節 (分節 A および B) の 2 本鎖 RNA ウイルスであり、分節 A は構造タンパクである VP2 および VP3、ウイルスプロテアーゼである VP4、ならびに非構造タンパクである VP5 の 4 つのウイルスタンパクをコードしている^{8, 14, 34)}。このうち VP2 はウイルスカプシドを構成し、病原性、細胞親和性および抗原性と関連している^{7, 18, 23, 38, 48)}。VP2 の立体構造は、3 つの異なる領域 (ドメイン) (base; B, shell; S, projection; P) に折り畳まれている^{2, 11)}。このうち P ドメインは、VP2 領域の 206-350 残基のアミノ酸からなる超可変領域 (HVR) により構成され、4 つの親水性領域 (210-225; peak A, 247-254; minor peak 1, 281-292; minor peak 2, 312-324; peak B) を含む^{6, 28)}。ウイルスの主要な中和エピトープはこの VP2-HVR に存在するが、上記親水性領域はウイルス粒子表面に突出し、中和反応に関連するため、この領域の特定の amino 置換により IBDV は中和抗体を回避するような変異を起こす

^{2, 13, 18, 25, 28, 46)}。

IBDV は、主に鶏に病原性を示す血清型 1 と、七面鳥から分離され、鶏には病原性の低い血清型 2 の 2 つの血清型に分けられる^{21, 24, 32)}。この血清型 1 の株は、病原性と抗原性の違いにより、従来型 (cIBDV)、強毒型 (vvIBDV) および抗原変異型 (vIBDV) に大別される。このうち、vvIBDV は、鶏の免疫の中核である F 嚢を中心としたリンパ器官を標的とし、鶏に重篤な免疫抑制と急性致死性を引き起こすが、cIBDV と抗原性が類似しているため、cIBDV から調整されたワクチンで制御できる⁴⁵⁾。一方、vIBDV は、昭和 59～60 年に米国の肉養鶏農場に出現したウイルスで、cIBDV と異なる抗原性状を示し、Delaware 抗原変異株ともよばれた⁴²⁾。このウイルスは、中和抗体が結合する抗原決定基が消失しており、当時北米で使用されていたワクチンで制御できず、大きな問題となった^{17, 22, 42, 43, 46)}。本ウイルスは、単独感染でひなに症状や死亡を引き起こすことは少なく、cIBDV や vvIBDV と較べて F 嚢の炎症性反応が弱いものの、他の型と同様に強い免疫抑制を引き起こし、大腸菌等の他病原体との混合感染により高い損耗率を示した^{41, 42)}。その後、市販されていた cIBD ワクチンで vIBDV の発症を防御できないものの、分離された vIBDV から作出されたワクチンであれば防御できることが見出され、米国ではこのワクチンにより野外発生が制御された⁴²⁾。しかしながら、近年も北米で検出される IBDV の大半は vIBDV であり、直接的および間接的に、深刻な経済被害を引き起こしている^{36, 53)}。一方、アジアでは少なくとも平成 26 年まで vIBD の大規模な流行は確認されていなかったが、平成 27 年以降、中国東部の広範な地

域で vIBDV が検出され、特に平成 29 年 9 月には複数のブロイラー農場で大きな経済被害が確認されている¹⁶⁾。

わが国における最初の cIBD の発生報告は、昭和 45 年である⁵²⁾。その後、昭和 46～47 年に実施された大規模な調査により全国的な IBDV の浸潤が確認された²⁰⁾。平成 2 年以降、vvIBD が流行し、甚大な被害が発生した^{35,44)}。その後、Yamaguchi らは、平成 5～16 年に国内で検出された 20 株の IBDV の VP2-HVR の遺伝子解析を行い、供試株はすべて cIBDV もしくは vvIBDV のいずれかに分類されたことを報告している⁴⁹⁾。vIBDV については、平成 14 年に南九州における分離報告がある⁵¹⁾。このウイルス株は、抗原性が cIBDV と異なるものの、感染鶏に炎症性反応を伴う典型的な IBD の F 嚢病変をつくるユニークな株で、北米で流行した vIBD とは病原性が異なっていた。さらに、cIBDV、vvIBDV のほか、北米の vIBDV とも遺伝子性状が異なり、新しいタイプの vIBDV である可能性が示唆されている。一方、これまで日本で北米や中国のような vIBDV の流行が確認されたことはなかったため、わが国では米国で市販されているような vIBD ワクチンは承認されておらず、現在国内で市販されている IBD ワクチンの vIBDV に対する有効性に関する報告も見当たらない。さらに、vIBDV がわが国の養鶏産業に及ぼす影響についても不明であった。そのような状況の中、平成 29 年 12 月および平成 30 年 1 月に管内の 2 ブロイラー農場で発生した鶏大腸菌症、あるいは鶏大腸菌症と伝染性気管支炎 (IB) の混合感染例から vIBDV と考えられるウイルスが検出された。そこで、我々はこのウイルスを分離し、その病原性や遺伝子

性状を解析することで、わが国の養鶏産業への影響やウイルスの由来を分析した。さらに、本ウイルスに対する対策法を考えるにあたって、国内で市販されている IBD の弱毒および中等毒ワクチンの有効性について検証を行った。

1 材料および方法

(1) 各症例の概要および臨床検体

vIBDV を疑うウイルスは、平成 29 年 12 月および平成 30 年 2 月に、管内の肉養鶏農場 2 戸で発生した 3 例の鶏大腸菌症例、あるいは鶏大腸菌症と伝染性気管支炎の混合感染症例から検出された (表-1)。農場 A および B では、ともにオールイン・オールアウト形式で鶏が飼養されていた。農場 A では IBD 弱毒ワクチンが 21 日齢で接種されていた。農場 B では、症例 2 の発生群に IBD ワクチンが接種されていなかったため、次回導入群では 14 および 21 日齢時に IBD 弱毒ワクチンが接種されたが、再び同様の症例が発生した。症例 1 では 3 羽、症例 2 および 3 では各 4 羽の鶏から F 嚢を採取し、100 単位/ mL ペニシリン、100 単位/ mL ストレプトマイシン (Penstrep、Thermo Fisher Scientific)、50 μg/ mL 硫酸ゲンタマイシン (和光純薬工業) および 2.5 μg/ mL アンホテリシン B (Fungizone、Bristol-Myers Squibb) を添加したイーグル MEM 培地 (日水製薬) で 10% (w/v) 乳剤を作製した後、10,000×g で 15 分間遠心分離を行い、その上清を孔径 0.22 μm のフィルターで濾過したものを供試 F 嚢乳剤とした。なお、すべての供試 F 嚢乳剤から PCR-RFLP²⁹⁾ で、接種されたワクチン株とは異なる同一の切断パターンの IBDV 遺伝子が検出された。すべての材料は、使用時以外は

表-1 各症例の概要

症例	農場	発生年月	用途	日齢	主症状	供試羽数	診断	接種 IBD ワクチン株 (接種日齢)
1	A	平成 29 年 12 月	肉用	47	死亡	3	鶏大腸菌症 IBDV 関与疑い	D78 (21)
2	B	平成 29 年 12 月	肉用	34	死亡	4	鶏大腸菌症 IB IBD	無接種
3	B	平成 30 年 2 月	肉用	27	呼吸器症状 死亡	4	鶏大腸菌症 IB IBD	Taishu (14 および 21)

-80℃で凍結保存した。

(2) 供試鶏

SPF 鶏（白色レグホン、KM バイオロジクス維持系統）を用いた。ウイルス分離には 36 日齢、病原性試験には 32 日齢、ワクチンの有効性試験には 32 日齢を用いた。

(3) 供試発育鶏卵

上記系統の SPF 鶏群由来の 11 日齢発育鶏卵を用いた。

(4) 供試ウイルス

病原性試験およびワクチンの有効性試験には、症例 2 で SPF 鶏を用いて分離された IBDV Nagasaki/MH-1/2017 株 (MH-1 株) を用いた。また、vvIBDV である F539 株をワクチン有効性試験における対照ウイルスとした。

(5) 供試ワクチン

国内市販ワクチンである、IBD 生ワクチン「KMB」L（血清型 1 に属する cIBDV 弱毒株である K 株を抗原とする弱毒ワクチン、KM バイオロジクス）およびアビテクト IBD/TY2（血清型 1 に属する vIBDV 弱毒株である TY2C 株を抗原とする中等毒ワクチン、KM バイオロジクス）を用いた。

(6) 遺伝子解析

IBDV の遺伝子が検出された供試 F 囊乳剤のうち各症例 1 検体を選抜し、High Pure Viral RNA Kit (ロシュ) を用い RNA を抽出した。RT-PCR は、TAKARA PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2（タカラバイオ）を用い実施した。すなわち、抽出 RNA 2 μl と、20 μM のフォワードおよびリバースプライマー各 1 μl、ジメチルスルホキシド 2.5 μl、ならびに蒸留水 16.5 μl を混合し、97℃で 7 分間の熱変性後、50℃で 5 分間アニーリングを行い、4℃で急速冷却した。その後、氷上で 2 × 1 step Buffer 25 μl および PrimeScript 1 step Enzyme Mix 2 μl を添加し、50℃で 30 分間の逆転写反応後、94℃で 2 分の熱変性を行った後、94℃で 30 秒間の熱変性、50℃で 30 秒間のアニーリングおよび 72℃で 30 秒間の伸長反応を 35 サイクル実施し、最後に 72℃で 10 分間の伸長反応を行った。この RT-PCR および IBDV 分節 A 遺伝子のシーケンスのために用いたプライマーは表-2 のとおりである。各 RT-PCR

産物のシーケンスは、(株) ファスマック（神奈川県）に外注した。そこで得られた各症例における検出株の各 VP2 コード領域の遺伝子全長（1.4kb）の塩基配列を比較するとともに、遺伝子解析ソフト MEGA7 を用いて、ジーンバンクに登録されている 30 株の cIBDV、7 株の vvIBDV、北米での流行当初に検出された 3 株の vIBDV、近年北米で検出された 13 株の vIBDV および近縁な株、平成 14 年に日本で分離された 1 株の vIBDV、平成 6 年および平成 9 年に韓国で分離された 2 株の vIBDV、ならびに平成 23~30 年に中国で検出された 18 株の IBDV の塩基配列とともに、VP2-HVR コード領域（322 塩基）の分子系統樹解析を実施した。さらに、VP2-HVR の中で、抗原性に関与するとされる 213、222、249、254、270、286、318 および 323 番目のアミノ酸¹⁸⁾、ならびに病原性に関与するとされる 253、279 および 284 番目のアミノ酸⁴⁸⁾ について、Nagasaki/MH-1/2017 株とジーンバンクに登録されている 4 株の国内市販 IBD ワクチン株、2 株の cIBDV、4 株の vIBDV および 4 株の vvIBDV との比較を行った。また、症例 2 由来の MH-1 株の分節 A 遺伝子全長（3.2kb）の配列について、MEGA7 を用いた BLAST 解析を実施し、ジーンバンクに登録されている既知の IBDV の塩基配列との比較を行った。

(7) ウイルス分離

供試 F 囊乳剤を症例ごとに 1 プールとしたものをウイルス分離材料とした。ウイルス分離は、

表-2 IBDV 遺伝子分節 A 全長の増幅およびシーケンス解析に用いたプライマー

プライマー ¹⁾	配列 5'→3'	位置
SegA-1F	GAATTCCAGGATGGAACCTCCTCC	1-23
SegA-1R	TGAGAACAGTGTGATTGTTAC	749-769
SegA-2F	CCCATACCTGCTRTAGGGCTCGAC	613-636
SegA-2R	GAGTTGAGGTCGGCCACCTCCATG	1346-1369
SegA-3F	CTTCGAGCTGATCCCAAATCCTG	1173-1195
SegA-3R	GGATCCTCTTTGAGATGGAGGTTG	1838-1861
SegA-4F	AATCTATTCCAGGTGCCCCAGAATC	1639-1664
SegA-4R	CAGATTGGAACAGTGGGTCCACATTG	2394-2419
SegA-5F	ACCCAATGCAGGACGCCAGTACCAC	2304-2328
SegA-5R	CGCAGTCAAGAGCAGATCTTTCATC	2949-2973
SegA-6F	AAGGGCAGCTACGTCGATCTAC	2842-2864
SegA-6R	AGGGGACCCGCGAACGGATCC	3187-3207

1) プライマーは、北米の vIBDV (Genbank accession number: Variant E 株 (AF133904)) および中国で 2011 年に検出された IBDV (GX-NNZ-11 株 (JX134483)) の塩基配列を元に設計した

SPF 鶏と SPF 発育鶏卵を用いた 2 種類の方法で実施した。SPF 鶏を用いた方法は、各症例 4 羽の SPF 鶏に、ウイルス分離材料を 1 ml/羽で経口投与した。その接種 4 日後 (dpi) に全羽解剖し、回収した F 嚢を症例ごと 1 プールとして F 嚢乳剤と同様の方法で 10%乳剤を作製した。発育鶏卵を用いた方法は、各症例 5 個の SPF 発育鶏卵の漿尿膜 (CAM) 上にウイルス分離材料を 0.2ml/個で接種し、4 dpi で開卵を行い、その鶏胚について、F 嚢乳剤と同様の方法で 20%乳剤を作製した。これら F 嚢乳剤および鶏胚乳剤は、上記の方法で IBDV の VP2 遺伝子全長の RT-PCR およびシーケンスに供し、接種された IBDV の遺伝子が検出されたものはウイルスが分離されたと判定し、各乳剤は-80℃で凍結保存した。

(8) ウイルス攻撃試験

供試鶏 16 羽を 8 羽ずつの 2 群に分け、1 群をウイルス攻撃群、1 群を無接種対照群とした。ウイルス攻撃群には、供試ウイルス 1 ml/羽 ($10^{5.0}EID_{50}/ml$) を経口投与した。接種 4 および 14 日後に各群 4 羽ずつ剖検を行い、F 嚢および脾臓を回収し、F 嚢重量/体重比 (F 嚢重量 \times 1,000/体重) および脾臓重量/体重比 (脾臓重量 \times 1,000/体重) を測定した。また、F 嚢における肉眼的および組織学的病変を観察し、リンパ球減少度をスコア化した。このスコア化は Sharma ら⁴¹⁾の方法に準じ、リンパ球の壊死あるいは減少度が 5%未満のものをスコア 0、5~25%のものをスコア 1、25~50%のものをスコア 2、50~75%のものをスコア 3、75%以上のものをスコア 4 とした。

(9) ワクチン有効性試験

供試鶏 90 羽を 30 羽ずつの 3 群に分け、1 群を弱毒ワクチン免疫群、1 群を中等毒ワクチン免疫群とし、各ワクチン 1 ml/羽 (弱毒ワクチン; $10^{5.0}TCID_{50}/ml$ および中等毒ワクチン; $10^{1.7}EID_{50}/ml$) を経口投与した。残る 30 羽は無免疫群とした。ワクチン投与後 14 日目にすべての鶏から採血を行うとともに、供試ウイルス ($10^{3.9}EID_{50}/ml$) および対照ウイルス ($10^{4.2}EID_{50}/ml$) を、各群 10 羽ずつに、1 ml/羽で経口投与した。また、各群の残る 10 羽を非攻

撃群とした。攻撃後 4 日目に全ての鶏の体重測定および剖検を行い、F 嚢における肉眼的および組織学的病変を観察するとともに、F 嚢重量/体重比および脾臓重量/体重比を測定した。免疫後 14 日目に採取された血清は、56℃、30 分間の非働化を行った後、弱毒ワクチン株である K 株を抗原とした中和試験により、中和抗体価を測定した。

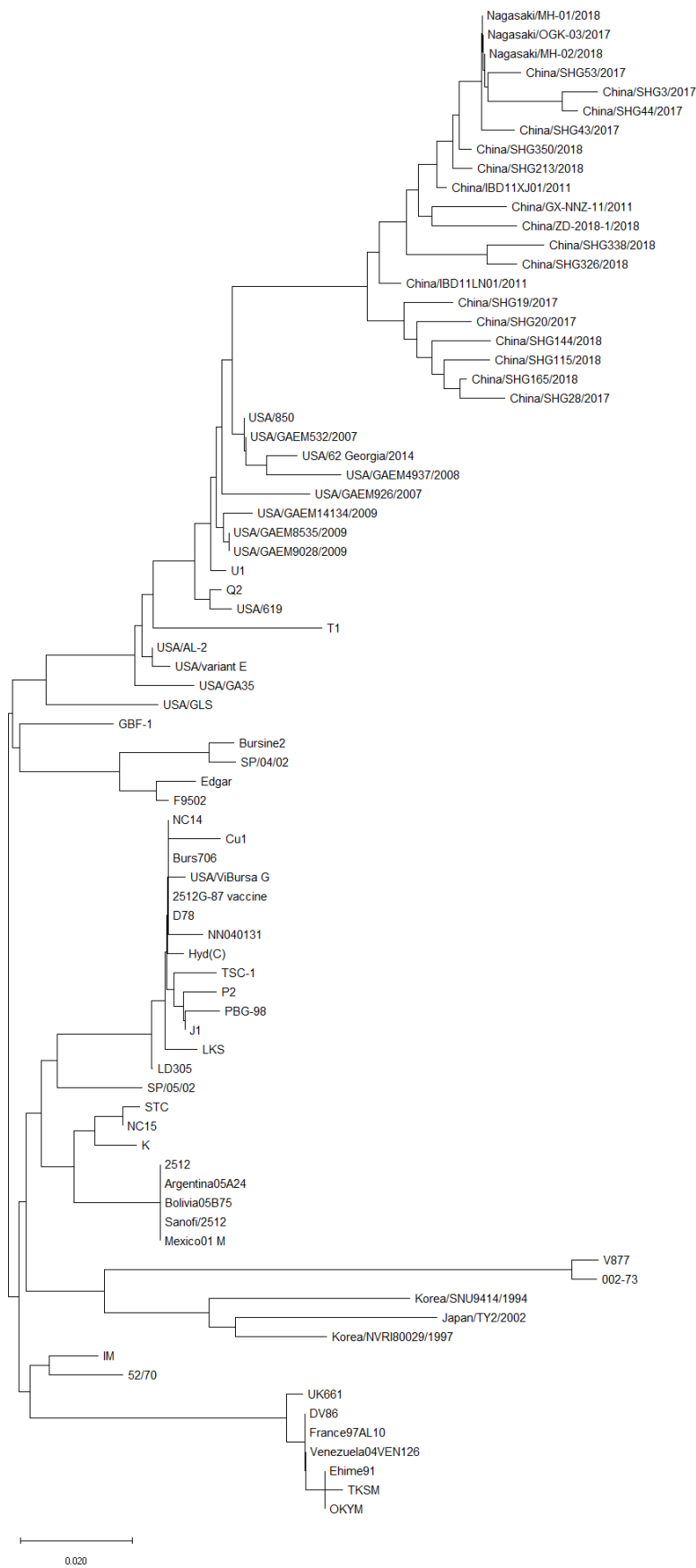
(10) 統計解析

観察された変数間の有意差の判定は、R (ver. 3.6.3, 自治医科大学, 埼玉) の機能を拡張した統計ソフトウェアである EZR (ver. 1.4.1)²⁷⁾ を使用して、Mann-Whitney U 検定により行った。この判定については、 $P < 0.05$ の場合を有意差ありとした。また、幾何平均 (GM) を使用して、正規分布していない変数 (抗体価) の中心傾向を記述し、算術平均を残りの変数に使用した。

2 結果

(1) 遺伝子解析

本県の 3 症例で検出された VP2 遺伝子全長の塩基配列は 100%一致していた。VP2-HVR の塩基配列に基づく系統樹を図-1 に示す。今回検出された株は、北米の vIBDV から派生した株で、中国での検出株と近縁であり、韓国や日本で過去に分離された vIBDV とは異なる系統であった。VP2-HVR のうち、今回解析を行った抗原性および病原性に関連するアミノ酸を表-3 に示す。MH-1 株の抗原性に関連するアミノ酸は、ワクチンや従来型株とはすべて異なっていた一方で、中国の vIBDV と完全に一致しており、北米の vIBDV とも非常によく一致していた。また、MH-1 株の病原性に関連するアミノ酸は、中等毒ワクチン株、cIBDV および vIBDV と同じであった。分節 A の遺伝子全長の塩基配列に基づく BLAST 解析の結果、今回本県で検出された MH-1 株と最も近縁なジーンバンク登録株は、平成 30 年および平成 29 年に中国で分離された vIBDV である ZD-2018-1 株⁴⁷⁾ および SHG19 株^{15, 16)}、平成 23 年に中国で検出された IBDV である GX-NNZ-11 株¹²⁾、次いで米国での流行当初に検出された vIBDV



長崎株

**中国野外株
(vIBDV を含む)**

**北米野外株
(vIBDV を含む)**

cIBDV

vIBDV(韓国・日本)

vvIBDV

図-1 IBDV VP-HVR の塩基配列(322 塩基)に基づく系統樹

表-3 MH-1 株とジーンバンクに登録された IBDV の VP2-HVR の抗原性および病原性に関するアミノ酸の比較

株	分類	抗原性に関する ¹⁸⁾								病原性に関する ⁴⁸⁾		
		213	222	249	254	270	286	318	323	253	279	284
MH-1	長崎株	N	T	K	N	A	I	D	E	Q	N	A
K	ワクチン	D	P	Q	G	T	T	G	D	H	.	T
D78		D	P	Q	G	T	T	G	D	H	.	T
Burs706		D	P	Q	G	T	T	G	D	.	.	T
TY-2		D	S	Q	S	T	T	G	D	.	.	.
STC	cIBDV	D	P	Q	G	T	T	G	D	.	D	.
GBF-1		D	P	H	S	T	T	G	D	.	.	.
VariE	vIBDV	.	.	.	S
AL-2		.	.	.	S
T1		N	D	.	.	.
SHG19	
Henan	vvIBDV	D	A	Q	G	.	T	G	D	.	D	.
HK46		D	A	Q	G	.	T	G	D	.	D	.
OKYM		D	A	Q	G	.	T	G	D	.	D	.
UK661		D	A	Q	G	.	T	G	D	.	D	.

である variant E 株⁴²⁾ および GLS 株⁴²⁾ となった (表-4)。

(2) ウイルス分離

ウイルスの分離状況を表-5 に示す。症例1ではウイルスが分離されなかったが、症例2では SPF 鶏で、症例3では SPF 鶏卵および SPF 鶏でウイルスが分離された。SPF 鶏卵では、接種した鶏胚に肝臓の緑色化や変性壊死が認められた (写真-1) 各症例の分離株の塩基配列は、それぞれの症例の F 囊から検出された IBDV 株の配列と一致していた。この症例2由来株を MH-1 株および症例3由来株を MH-2 株とした。

(3) ウイルス攻撃試験

臨床症状、死亡状況、F 囊および脾臓の肉眼所見、F 囊重量/体重比、ならびに脾臓重量/体重比を表-6 に示す。MH-1 株接種による明瞭な症状や死亡は認められなかった。ウイルス攻撃群の F 囊は、写真-2 に示すとおり、4 dpi、14dpi とともに顕著な萎縮が認められた。F 囊重量/体重比は、4 dpi で対照群のおよそ 1/2 となっており、14dpi にはさらに萎縮していた。また、脾臓においては、4 dpi および 14dpi とともに腫大が認められ、脾臓重量/体重比は 4 dpi で増加傾向となり、14dpi では有意な増加と判定された。また、4 dpi では、MH-1 株を接種した全羽に F 囊の膠様化が認められた。F 囊の病理組織学所見を表-7 に示す。4 dpi で半数の個体に 50%以上のリ

表-4 MH-1 株の分節 A 遺伝子全長の塩基配列 (3.2kb) に基づく BLAST 解析結果

ジーンバンク登録株	一致率(%)	
	塩基	アミノ酸
中国/ZD-2018-1/2018(MN485882)	98.4	99.6
中国/SHG19/2017 株(MN393076)	97.2	99.5
中国/GX-NNZ-11/2011 株(JX134483)	97.0	98.2
米国/variant E(AF133904)	95.9	97.5
米国/GLS(AY368653)	95.2	98.0

表-5 各症例におけるウイルス分離状況

症例	SPF 鶏卵			SPF 鶏	
	1 代目	2 代目	3 代目	1 代目	2 代目
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	+
3	+	+	+	+	+



写真-1 症例3の F 囊乳剤を接種した SPF 鶏卵3代目の鶏胚。肝臓の緑色化と変性壊死が認められた。

表-6 MH-1 株接種による F 囊および脾臓への影響

接種試料	接種後日数	供試羽数	臨床症状	死亡	F 囊肉眼所見(羽数)			F 囊重量/体重比 ¹⁾	脾臓重量/体重比 ²⁾
					膠様化	出血	水腫		
MH-1	4	4	0	0	4	0	0	2.33±0.67*	3.02±0.22
無接種		4	0	0	0	0	0	5.57±0.71	1.77±0.13
MH-1	14	4	0	0	0	0	0	0.94±0.20*	2.15±0.19**
無接種		4	0	0	0	0	0	4.56±1.58	1.40±0.05

1) F 囊重量/体重比: F 囊重量×1,000/体重. 平均値±SD.

2) 脾臓重量/体重比: 脾臓重量×1,000/体重. 平均値±SD.

* 同じ接種後日数の無接種対照群と比較して、有意に小さい(p<0.05)

** 同じ接種後日数の無接種対照群と比較して、有意に大きい(p<0.05)

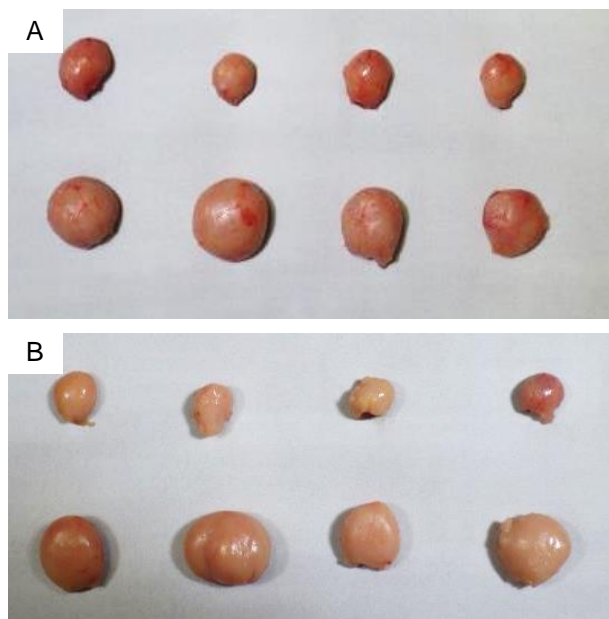


写真-2 MH-1 株接種鶏の F 囊の肉眼所見。(A)および(B)は、それぞれ 4dpi および 14dpi に回収されたもの((A)、(B)ともに上段がウイルス攻撃群、下段が無接種対照群)。ウイルス攻撃群では、4dpi および 14dpi ともに著しい F 囊の萎縮が認められた。

リンパ球の減少が確認され、うち 1 羽では 75%以上の著しい減少が認められた。14dpi には F 囊の状態の回復傾向がみられたが、依然としてリンパ球数が 50%以下の個体も確認された。F 囊の病理組織像を写真-3 に示す。4 dpi でリンパ濾胞の萎縮とリンパ球の減少が顕著で、3/4 の個体で

リンパ濾胞の壊死が認められたが、炎症性細胞のリンパ濾胞の壊死が認められたが、炎症性細胞の浸潤や水腫、出血は少なかった。14dpi ではリンパ球の増数がみられたが、中にはリンパ球の回復が認められず、濾胞の形態が崩れたままの個体も確認された。

(4) ワクチン有効性試験

表-8 にワクチン接種 14 日後の IBDV に対する中和抗体価を示す。弱毒、中等毒いずれのワクチンを接種した個体においても抗体の産生が認められ、その抗体価は、弱毒ワクチン接種鶏で 1,024 倍以上、中等毒ワクチン接種鶏で 256 倍以上であった。表-9 にワクチン免疫後に攻撃ウイルスを接種された鶏の 4 日間増体重、F 囊重量/体重比および脾臓重量/体重比を示す。ワクチン非免疫群を MH-1 株で攻撃したところ、顕著な増体の遅延が認められた。一方、弱毒あるいは中等毒ワクチン免疫群では、MH-1 株攻撃後の増体遅延が認められなかった。弱毒ワクチン免疫群を MH-1 株で攻撃した鶏群では、ワクチン非免疫かつ非攻撃の鶏群と比較して有意な F 囊重量/体重比の減少が認められたが、ワクチン非免疫かつ MH-1 株攻撃群よりも F 囊萎縮への影響が小さい傾向にあった。一方、中等毒ワクチン

表-7 MH-1 株接種による F 囊の病理組織所見

接種試料	接種後日数	供試羽数	F 囊組織所見(羽数)						F 囊リンパ球減少度 ¹⁾ (羽数)					
			リンパ濾胞				間質							
			萎縮	壊死	細網細胞置換	偽好酸球浸潤	線維化	水腫	0	1	2	3	4	
MH-1	4	4	4	3	1	0	4	4				2	1	1
無接種		4	0	0	0	0	0	0				4		
MH-1	14	4	4	0	4	0	0	2			1	2	1	
無接種		4	0	0	0	0	0	0			4			

1) F 囊におけるリンパ球減少度が 5%未満のものをスコア 0、5~25%のものをスコア 1、25~50%のものをスコア 2、50~75%のものをスコア 3、75%以上のものをスコア 4 とした

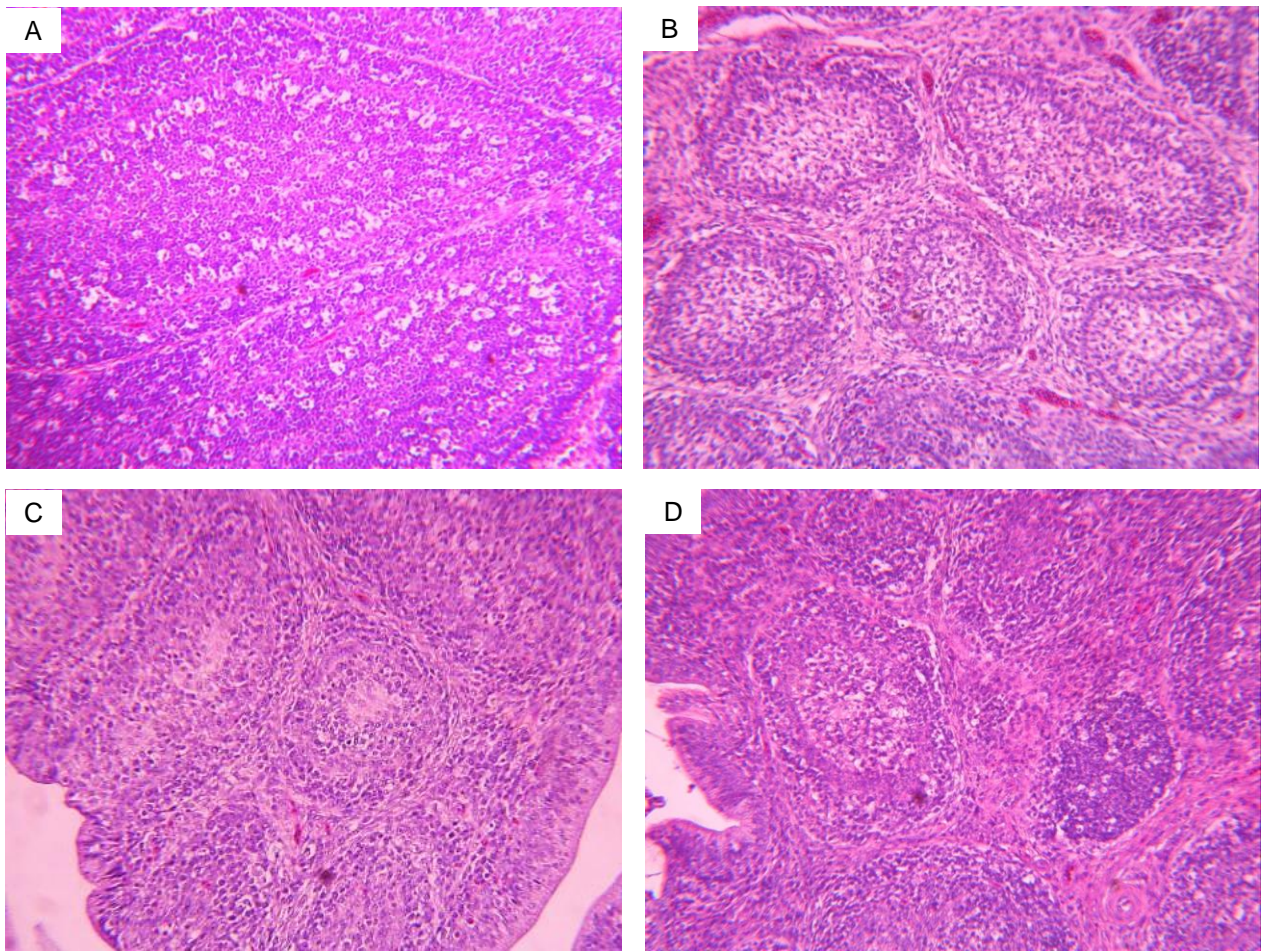


写真-3 MH-1 株接種鶏の F 嚢病理組織像。(A)無接種対照。(B)接種 4 日後、顕著なリンパ濾胞の萎縮およびリンパ球の減少が認められた一方で、炎症性細胞の浸潤は少なかった。(C)および(D)接種 14 日後、リンパ球の増数が認められたが、濾胞の形態が崩れたままで、十分な回復の認められない個体も認められた。

表-8 ワクチン接種 14 日後の中和抗体価

攻撃ウイルス	ワクチン	羽数	平均中和抗体価 (最低値-最高値)
MH-1	弱毒	10	4,096.0 (2,048-8,192)
	中等毒	10	2,521.4 (256-16,384)
	非免疫	10	<2.0 (すべて<2.0)
F539	弱毒	7	2,756.4 (1,024-8,192)
	中等毒	10	1260.7 (512-4,096)
	非免疫	5	<2.0 (すべて<2.0)
無接種	弱毒	9	5,160.6 (2,048-32,768)
	中等毒	10	2521.4 (512-16,384)
	非免疫	10	<2.0 (すべて<2.0)

免疫群では、攻撃の有無に関わらず、顕著な F 嚢重量/体重比の減少が認められた。脾臓について、弱毒あるいは中等毒ワクチン免疫群では、MH-1 株攻撃後の脾臓重量/体重比が、ワクチン非免疫かつ非攻撃の鶏群と比較して有意に大きくなってはいたが、ワクチン非免疫群で攻撃した群よりも有意に小さかった。次に F 嚢の肉眼所見および組織所見を表-10 に示す。攻撃した非免疫鶏には全羽で F 嚢の膠様化が確認された。攻撃した免疫群でも膠様化が認められたが、その割合は中等毒で 10%、弱毒で 40%と低かった。また、非免疫鶏ではリンパ濾胞の壊死と急性期のリンパ球減少像も全羽で認められたが、中等毒ワクチン免疫群ではそれぞれ 10%および 30%、弱毒ワクチン免疫群では 30%および 50%の割合であった。

表-9 ワクチン有効性試験における死亡状況ならびに、増体、F 嚢重量および脾臓重量への影響

攻撃ウイルス	ワクチン	攻撃後 日数	羽数	死亡	増体重 ¹⁾	F 嚢重量/体重比 ²⁾	脾臓重量/体重比 ³⁾
MH-1	弱毒	4	10	0	73.0±9.8 ^b	2.8±1.4 ^a	2.3±0.4 ^{abc}
	中等毒	4	10	0	73.5±28.8 ^b	1.0±0.3 ^{ab}	2.3±0.3 ^{abc}
	非免疫	4	10	0	15.5±28.4 ^a	2.1±0.7 ^a	3.3±0.6 ^a
F539	弱毒	4	7	0	70.0±16.1 ^b	3.9±1.1 ^a	2.0±0.3
	中等毒	4	10	0	57.5±12.7 ^{ab}	1.2±0.2 ^{ab}	2.3±0.4 ^{ac}
	非免疫	4	10	5	0.0±26.2 ^a	3.2±1.1 ^a	2.5±1.0 ^a
非接種	弱毒	4	9	0	73.3±12.2	3.5±0.6 ^a	2.0±0.4
	中等毒	4	10	0	69.5±22.4	1.2±0.2 ^a	1.8±0.4
	非免疫	4	10	0	70.0±10.3	4.6±0.6	1.8±0.2

1) 攻撃ウイルス接種後 4 日間の増体重の合計。平均値±SD で示す。

2) F 嚢重量/体重比: F 嚢重量×1,000/体重。平均値±SD で示す。

3) 脾臓重量/体重比: 脾臓重量×1,000/体重。平均値±SD で示す。

a 非攻撃/非免疫群と有意差あり(p<0.05)

b 同ウイルス攻撃/非免疫群と有意差あり(p<0.05)

c 非攻撃/同ワクチン免疫群と有意差あり(p<0.05)

表-10 ワクチン有効性試験で認められた F 嚢の肉眼病変および組織病変

攻撃ウイルス	ワクチン	攻撃後 日数	羽数	肉眼所見			組織所見	
				膠様化	出血	水腫	濾胞壊死	リンパ球減少 (急性期)
MH-1	弱毒	4	10	4	0	0	3	5
	中等毒	4	10	1	0	0	1	3
	非免疫	4	10	10	0	0	10	10
F539	弱毒	4	7	0	0	0	0	0
	中等毒	4	10	0	0	0	0	2
	非免疫	4	5	5	2	0	5	5
非接種	弱毒	4	9	0	0	0	0	2
	中等毒	4	10	0	0	0	0	2
	非免疫	4	10	0	0	0	0	0

3 まとめおよび考察

現在、わが国における IBD 対策は、主にワクチンによる免疫賦与と、飼養環境の消毒や鶏舎へのウイルス侵入防止対策等による一般衛生対策の組み合わせにより行われている。国内でヒナ用として市販されている IBD ワクチンは、弱毒ワクチンと中等毒ワクチンの 2 種類に分類されるが、ワクチンの使用にあたっては、農場やその地域に浸潤している IBDV の性状を正確に把握し、適切なワクチンを選択することが重要である。今回、長崎県のブロイラー農場 2 戸で発生した 3 例の鶏大腸菌症あるいは鶏大腸菌症と伝染性気管支炎の混合感染症の症例において、ワクチン株と異なる同一 RFLP パターンを示す IBDV 遺伝子が検出されたため、このウイルスの詳細な性状解析を行った。

最初に、IBDV の分子生物学的性状解析に広く利用され、抗原変異や病原性の主要な決定要因である VP2 領域^{2, 7, 13, 18, 23, 25, 28, 38, 46, 48)}の全長のシーケンス解析を実施した。その結果、上記 3 症例で検出された IBDV は同一由来株と考えられ、VP2-HVR の推定アミノ酸配列から、これらの株の抗原性および病原性は vIBDV と類似していることが示唆された。さらに、系統樹解析の結果、これらの株は北米の vIBDV を起源とする株と考えられ、中国の野外株と近縁であった。そこで、ウイルス株の由来についてより詳細に調べるため、分節 A の遺伝子全長を増幅後、その塩基配列を決定し、Blast 解析を実施したところ、ジーンバンク登録株の中で最も一致率が高かったのは中国の vIBDV で、次いで北米の vIBDV となった。本県の分離株は、中国の vIBDV である SHG19

株と同じ遺伝子の特徴を有しており、分節 A 全長のアミノ酸配列も非常によく一致していたことから、両ウイルスの性状は非常に近い可能性が高いと考えられた。わが国では、これまで北米や中国で流行している系統の vIBDV が検出された例はなく、今回本県で検出された株の塩基配列は、過去に国内で検出された cIBDV や vvIBDV、vIBDV さらに市販されているワクチン株のいずれとも大きく異なっていた。これらのことから、本県の複数の農場で検出された IBDV は、日本国内で変異したものであるというよりも、海外に浸潤する vIBDV 株が新たに侵入したものであることが強く示唆された。中国では平成 3 年頃から北米由来と考えられる vIBDV が検出されており^{9, 30)}、平成 27 年以降広範な地域で流行が認められている¹⁶⁾。本県で検出された株は、遺伝子の一致率の高さから、中国で流行している vIBDV との関連が強く疑われた。本ウイルスのわが国への侵入経路は不明であるが、IBDV が渡り鳥から分離された報告²⁶⁾ や一定割合の野鳥に IBDV の感染歴が認められた報告もあり³⁷⁾、中国国内でウイルスが広く流行した時期と、本県でウイルスが検出された時期が一致していることから、こうした野鳥の媒介により侵入した可能性も疑われる。

次に、さらに詳細なウイルス性状を調べるため、ウイルスを分離し、SPF 鶏に対する病原性について検証を行った。その結果、分離されたウイルスである MH-1 株を接種した鶏に目立った臨床症状や死亡は認められず、F 囊における出血、水腫および炎症反応が乏しかった。その一方で、肉眼的に F 囊の膠様化および顕著な萎縮が確認されたほか、脾臓の腫大が認められ、組織学的に F 囊で顕著なリンパ球減少や壊死が認められた。そして、接種 2 週間後には、F 囊はさらに萎縮し、リンパ球の減少は完全には回復しなかった。北米で vIBDV が流行した当初、Sharma ら⁴¹⁾ は SPF 鶏を用いた攻撃試験を実施し、免疫抑制能と病変形成能について cIBDV との比較を行っている。その結果、vIBDV は cIBDV と同様に、リンパ球幼若化反応の低下および抗体産生性の低下と著しい F 囊の萎縮が認められ、この萎縮は 20dpi で

も回復が認められなかった。病理組織検査では、両ウイルスとも高率に F 囊のリンパ濾胞壊死とリンパ球減少が認められたが、vIBDV は F 囊の炎症反応、出血および水腫、ならびに胸腺における病変が乏しいのが特徴であった。また、中国で分離された vIBDV についても同様の病原性が報告されている¹⁶⁾。上記のことから、MH-1 株は過去に報告された vIBDV と同様の特徴的な病原性を有することが確認された。vIBDV は単独でヒナに臨床症状や死亡の増加を引き起こすことが少ないため^{41, 42)}、農場へウイルス侵入しても、二次感染による被害が発生するか、ワクチンによる免疫応答の低下が起きてから気づかれることが多い。カナダの 58 戸のプロイラー農場で、平成 19 年から 5 年間にわたって行われた調査では、43%の農場で IBDV の感染が認められ、その半数で vIBDV が分離され、さらに IBDV の浸潤農場の 92%で 4 年以上のウイルスの常在化が確認されている⁵³⁾。これらの農場では、F 囊の萎縮、飼料効率と産肉成績の低下、死亡率および廃棄率の増加が確認されており、年間 390 万トンの鶏肉の損失と、1,300 万ドルの経済損失が発生していると試算されている。また、vIBDV の先行感染により、低病原性鳥インフルエンザウイルスに対する鶏の感受性が高まることで、鶏から鶏への継代が可能となり、鶏体内での増殖力が高い変異株が誕生することも実験的に確認されており³⁹⁾、高病原性および低病原性鳥インフルエンザの発生につながるおそれもある。これらのことから、本ウイルスは、浸潤地域の養鶏産業にとって非常に大きな脅威となりうる。そのため、vIBDV の浸潤が確認された際には、近隣地域、あるいは県内の浸潤状況調査を実施し、状況に応じた対応を行うことが望ましい。なお、vIBDV の感染鶏は、cIBDV で認められるような F 囊の炎症反応が乏しく、典型的な IBD の組織像がみられないため、診断を行うにあたっては、特に病理組織検査成績の評価に注意が必要である。最後に、この新たにわが国に侵入してきたウイルスに対する有効な対策法を考えるにあたって、国内で市販されているワクチンの有効性について検証を行った。弱毒および中等毒ワクチンで

免疫した SPF 鶏を、MH-1 株で攻撃したところ、両ワクチンともに MH-1 株による増体遅延の軽減効果が認められた。また、弱毒ワクチンでは、MH-1 株による障害を完全に防ぐことはできなかったものの、非免疫鶏と比較して F 囊萎縮および脾臓腫大の軽減が認められ、約半数の個体で F 囊におけるリンパ濾胞の壊死やリンパ球の減少を防ぐことができた。さらに、中等毒ワクチンでは、ワクチンのリアクションによると考えられる F 囊の萎縮が認められたが、MH-1 株に対して非常に高い防御効果が確認された。vIBDV には、cIBDV や vvIBDV との間に共通抗原が存在し、低いながらも血清学的交差性が認められている^{15, 28, 30, 42, 51})。また、高濃度の不活化 cIBDV を接種した鶏は、少量の vIBDV の攻撃を防ぐことができたことや²²)、中国で市販されているワクチンの中にも vIBDV による F 囊の萎縮や脾臓の腫大を軽減したものがあつたことが報告されている¹⁵)。これらのことから、cIBDV から調整した弱毒ワクチンであっても、接種後一定期間が経過し十分な免疫を獲得した状態であれば、vIBDV の感染を受けても、その免疫抑制を軽減できる可能性がある。したがって、平常時は、鶏への大量のウイルス暴露が起きないように、鶏舎内へのウイルス侵入防止対策を徹底した上で、弱毒ワクチンを複数回接種し、群全体を免疫しておくことで、万一少量の vIBDV が鶏舎内に侵入しても、その被害を最小限に抑えることができると期待される。しかしながら、vIBDV は非常に高い抗体価の鶏にも感染し、発症させるため²²)、ウイルスの常在化した農場では、移行抗体の影響を受けやすい弱毒ワクチン^{14, 50}) を接種しても、十分な免疫を獲得する前にウイルスの暴露を受け、被害を防げない恐れがある。一方、中等毒ワクチンはある程度の移行抗体レベルでもテイク可能であるため⁵⁰)、わが国ではこれまで移行抗体存在下でも感染し、高致死率を示す vvIBDV の対策に用いられてきた¹⁴)。今回、vIBDV に対して、中等毒ワクチンが高い防御効果を示すことが明らかとなったことから、vIBDV の農場浸潤が確認された際には、ワクチンを中等毒に切り替えることで、ウイルスが常在化した環境下であつて

も、早い日齢でワクチンをテイクさせ、被害を防げる可能性がある。ただし、中等毒ワクチンを接種すると、ワクチンリアクションによる F 囊の萎縮やリンパ球減少等が生じる可能性があり^{31, 45})、使用の必要性については、農場やその地域に浸潤した IBDV の性状を正確に把握した上で、慎重に判断する必要がある。また、今回試験に使用していないワクチンについては、同等の防御効果が得られるか不明であるため、その有効性について改めて検証が必要である。今回、海外で流行している vIBDV の浸潤が県内の複数農場で確認され、そのウイルスの由来、病原性、さらに国内市販ワクチンの有効性について一定の知見が得られ、わが国の養鶏産業に及ぼす影響について分析を行うとともに、対策法についても検討を行った。今後は、管内の養鶏場における vIBDV の浸潤状況を調査するとともに、実際に野外の養鶏場で対策を行い、今回考案した対策法の有効性を検証する予定としている。

4 謝辞

稿を終えるにあたり、各種試験の実施にあたって、多大なるご支援、ご協力をいただきました、KM バイオロジクス株式会社の山崎憲一先生、柴田裕子先生、末永清剛先生に深く御礼申し上げます。

5 文献

- 1) Alexander DJ *et al*: Heat inactivation of serotype 1 infectious bursal disease virus, *Avian Pathol*, 27, 97-99 (1998)
- 2) Bayliss CD *et al*: A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2, *J Gen Virol*, 71, 1303-1312 (1990)
- 3) Benton WJ *et al*: Studies on the transmission of the infectious bursal agent (IBA) of chickens, *Avian Dis*, 11, 430-438 (1967)
- 4) Berg TP *et al*: Acute infectious bursal

- disease in poultry: Isolation and characterisation of a highly virulent strain, *Avian Pathol*, 20, 133-143 (1991)
- 5) Berg TP *et al*: Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains, *Avian Pathol*, 33, 470-476 (2004)
- 6) Boot HJ *et al*: Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype, *J Virol*, 74, 6701-6711 (2000)
- 7) Brandt M *et al*: Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus, *J Virol*, 75, 11974-11982 (2001)
- 8) Brown MD *et al*: Coding sequences of both genome segments of a European 'very virulent' infectious bursal disease virus, *Virus Res*, 40, 1-15 (1996)
- 9) Cao YC *et al*: Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains, *Avian Dis*, 42, 340-351 (1998)
- 10) Cosgrove AS *et al*: An apparently new disease of chickens-avian nephrosis, *Avian Dis*, 6, 385-389 (1962)
- 11) Coulibaly F *et al*: The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses, *Cell*, 120, 761-772 (2005)
- 12) Cui P *et al*: Genomic sequence analysis of a new reassortant infectious bursal disease virus from commercial broiler flocks in Central China, *Arch Virol*, 158, 1973-1978 (2013)
- 13) Durairaj V *et al*: Investigation of the antigenic evolution of field isolates using the reverse genetics system of infectious bursal disease virus (IBDV), *Arch Virol*, 156, 1717-1728 (2011)
- 14) Eterradossi N *et al*: Infectious bursal disease, *Disease of Poultry*, Saif YM *et al* eds, 12th ed, 185-208, Blackwell Publ, Iowa (2008)
- 15) Fan L *et al*: Novel variants of infectious bursal disease virus can severely damage the bursa of fabricius of immunized chickens, *Vet Microbiol*, 240, 108507 (2020)
- 16) Fan L *et al*: Novel variant strains of infectious bursal disease virus isolated in China, *Vet Microbiol*, 230, 212-220 (2019)
- 17) Giambrone JJ *et al*: Efficacy of live vaccines against serologic subtypes of infectious bursal disease virus, *Avian Diseases*, 34, 7-11 (1990)
- 18) Heine HG *et al*: Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains, *J Gen Virol*, 72, 1835-1843 (1991)
- 19) Hirai K *et al*: The immunodepressive effect of infectious bursal disease virus in chickens, *Avian Dis*, 18, 50-57 (1974)
- 20) Hirai K *et al*: Isolation of infectious bursal disease virus and distribution of precipitating antibodies in chicken sera, *Jpn J Vet Sci*, 35, 105-113 (1973)
- 21) Ismail NM *et al*: Infectious bursal disease virus variant from commercial Leghorn pullets, *Avian Dis*, 34, 141-145 (1990)
- 22) Ismail NM *et al*: Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chickens, *Avian Dis*, 35, 460-469 (1991)
- 23) Jackwood DJ *et al*: Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity, *Virology*, 377, 110-116 (2008)
- 24) Jackwood DJ *et al*: Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys, *Avian Dis*, 26, 871-882 (1982)

- 25) Jackwood DJ *et al*: Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV), *Virology*, 409, 33-37 (2011)
- 26) Jeon WJ *et al*: Very virulent infectious bursal disease virus isolated from wild birds in Korea: epidemiological implications, *Virus Res*, 137, 153-156 (2008)
- 27) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics, *Bone Marrow Transplant*, 48, 452-458 (2013)
- 28) Letzel T *et al*: Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus, *J Virol*, 81, 12827-12835 (2007)
- 29) 林志鋒: PCR 法による伝染性ファブリキウス 囊病ウイルスの検出と株型別, *鶏病研報*, 30, 144-148 (1994)
- 30) Liu J *et al*: Antigenic and molecular characterization of recent infectious bursal disease virus isolates in China, *Virus Genes*, 24, 135-147 (2002)
- 31) Mazariegos LA *et al*: Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease "intermediate" strains, *Avian Dis*, 34, 203-208 (1990)
- 32) McFerran JB *et al*: Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype, *Avian Pathol*, 9, 395-404 (1980)
- 33) Meulemans G *et al*: Efficacy of some disinfectants against infectious bursal disease virus and avian reovirus, *Vet Rec.* 111, 412-413 (1982)
- 34) Müller H *et al*: Research on infectious bursal disease--the past, the present and the future, *Vet Microbiol*, 97, 153-165 (2003)
- 35) Nunoya T *et al*: Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in specific-pathogen-free chickens, *Avian Dis*, 36, 597-609 (1992)
- 36) Ojkic D *et al*: Genotyping of Canadian field strains of infectious bursal disease virus, *Avian Pathol*, 36, 427-433 (2007)
- 37) Orakpoghenor O *et al*: Research Note: Detection of infectious bursal disease virus antibodies in free-living wild birds in Zaria, Nigeria, *Poult Sci*, 99, 1975-1977 (2020)
- 38) Qi X *et al*: Naturally occurring mutations at residues 253 and 284 in VP2 contribute to the cell tropism and virulence of very virulent infectious bursal disease virus, *Antiviral Res*, 84, 225-233 (2009)
- 39) Ramirez-Nieto G *et al*: Adaptation of a mallard H5N2 low pathogenicity influenza virus in chickens with prior history of infection with infectious bursal disease virus, *Avian Dis*, 54, 513-521 (2010)
- 40) Saif YM: Immunosuppression induced by infectious bursal disease virus, *Vet Immunol Immunopathol*, 30, 45-50 (1991)
- 41) Sharma JM *et al*: Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens, *Avian Dis*, 33, 112-124 (1989)
- 42) Snyder DB: Changes in the field status of infectious bursal disease virus, 19, 419-423 (1990)
- 43) Snyder DB *et al*: Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates, *Avian Dis*, 32, 535-539 (1988)
- 44) Tsukamoto K *et al*: Isolation of virulent infectious bursal disease virus from field outbreaks with high mortality in Japan, *J Vet Med Sci*, 54, 153-155 (1992)
- 45) Tsukamoto K *et al*: Efficacy of three live

vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies, Avian Diseases, 39, 218-229 (1995)

46) Vakharia VN *et al*: Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus, Virus Res, 31, 265-273 (1994)

47) Xu A *et al*: Phylogenetic analyses and pathogenicity of a variant infectious bursal disease virus strain isolated in China, Virus Res, 276, 197833 (2020)

48) Yamaguchi T *et al*: Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus, Virology, 223, 219-223 (1996)

49) Yamaguchi T *et al*: Nucleotide sequence analysis of VP2 hypervariable domain of infectious bursal disease virus detected in Japan from 1993 to 2004, J Vet Med Sci, 69, 733-738 (2007)

50) 山口 剛士ら: 伝染性ファブリキウス嚢病の予防, 鶏病研報, 28, 31-39 (1992)

51) Yamazaki K *et al*: Characterization of variant infectious bursal disease virus from a broiler farm in Japan using immunized sentinel chickens, J Vet Med Sci, 79, 175-183 (2017)

52) 横山利郎ら: 伝染性Fのう炎(ガンボロ病)様疾患について, 鶏病研報, 5, 27-29 (1970)

53) Zachar T *et al*: A 5-year study of the incidence and economic impact of variant infectious bursal disease viruses on broiler production in Saskatchewan, Canada, Can J Vet Res, 80, 255-261 (2016)