

氏名(本籍)	山口剛士(岐阜県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博乙第11号
学位授与年月日	平成9年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Serological and Molecular Biological Studies on Highly Virulent Infectious Bursal Disease Virus
審査委員	主査 岐阜大学教授 平井克哉 副査 帯広畜産大学教授 品川森一 副査 岩手大学教授 岡田幸助 副査 東京農工大学教授 本多英一 副査 岐阜大学教授 源宣之

論文の内容の要旨

鶏伝染性ファブリキウス嚢病(IBD)は、鶏の免疫組織、特にファブリキウス嚢の壊死性病変を主徴とする急性のウイルス性疾患である。病因のIBDウイルス(IBDV)は3週齢以下の雛に重篤な免疫抑制を惹起する。IBDV感染雛は主に不顕性で免疫不全による他病の誘発やワクチンブレイクが問題であった(従来型)。しかし、1987年以降、致死率の極めて高いIBD(超強毒型)が世界各地で流行し、養鶏産業に甚大な被害を与えた。しかし超強毒型IBDVの抗原性状、病原性および起源に関する分子生物学的研究は進展していない。本研究では、超強毒型IBDVの抗原性状を解明するため、単クローン性抗体の作出と鶏線維芽(CEF)細胞による超強毒型IBDVの馴化・弱毒化を行った。また、超強毒型IBDVゲノム両分節の塩基配列を決定し、超強毒型IBDVの病原性および起源について分子生物学的解析を行った。

1. 単クローン性抗体によるウイルス構造タンパク質の抗原解析

血清型1の従来型IBDVに対する20種の単クローン性抗体(MAb)を作出した。これらのMAbは、ウイルスの主要な構造タンパク質であるVP2およびVP3を認識し、VP2を認識するMAbには中和活性が認められた。エピトープマッピングの結果、VP2のほぼ中央に位置する156アミノ酸残基から成る領域には、少なくとも2ヶ所の血清型1特異的な立体構造依存性の抗原部位が、またVP3のC末端の105アミノ酸残基から成る領域には、立体構造非依存性の抗原部位が存在することが明らかになった。VP2には、その他に1ヶ所の血清型1特異的な立体構造依存性の抗原部位が認められた。

2. 超強毒型IBDVの弱毒化および血清学的性状の解析

超強毒型IBDVを発育鶏卵で継代馴化後、鶏胚馴化株の感染した鶏胚からCEF細胞を調製し細胞馴化株を確立した。鶏胚およびCEF細胞馴化株の雛に対する病原性は著明に減弱していた。超強毒型IBDVは、ポリクローナル抗体による交差中和試験およびMAbによる中和試験で従来型IBDVと異なる反応性を示し、抗原性状が従来型IBDVとは異なることが示唆された。

3. 超強毒型IBDVゲノムの塩基配列の解析

超強毒型IBDVゲノムの分節AおよびBの塩基配列を決定し、前駆タンパク質(NH₂-VP2-VP4-VP3-COOH)およびVP1の推定アミノ酸配列を従来型IBDVの配列と比較した。さらに、超強毒株由来CEF細胞馴化弱毒株の前駆タンパク質コード領域の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を親株の病原株と比較解析した。超強毒型IBDVに特異的なアミノ酸残基が前駆タンパク質に9ヶ所およびVP1に8ヶ所認められ、弱毒化に伴うアミノ酸置換がVP2の変異領域に4ヶ所(256、279、284および315番目)およびVP3に1ヶ所(805番目)認められた。このうち、279および284番目の置換は、他の細胞馴化弱毒株にも共通に認められた。また、弱毒化により超強毒型IBDV特異的な256番目のアミノ酸に置換が認められ、超強毒型IBDVの病原性発現に256、279および284番目のアミノ酸残基が関与している可能性が推察された。

4. 超強毒型IBDVの系統解析

決定した塩基配列から前駆タンパク質、VP1、VP2、VP3およびVP4の分子系統樹を作製し、超強毒型および従来型IBDVの系統関係を解析した。国内分離超強毒型IBDVはヨーロッパ分離超強毒株とクラスターを形成し、日本の超強毒株がヨーロッパに由来することが強く示唆された。分節Aにコードされている前駆タンパク質、VP2、VP3およびVP4の塩基配列から作製した系統樹は、すべて同様の樹型を示し、超強毒型IBDVは従来型IBDVと近縁なクラスターを形成した。一方、分節BにコードされるVP1の塩基配列から作製した系統樹は、上記の系統樹とは樹型が大きく異なり、超強毒型IBDVは従来型IBDVと明らかに異なるクラスターを形成した。このことから、超強毒型IBDVゲノムの各分節は異なる起源に由来していることが示唆され、超強毒型IBDVの出現が遺伝子再集合による可能性が推察された。

以上の成績を総合すると、超強毒型IBDVは抗原性状が従来型IBDVと異なり、遺伝子再集合により出現した可能性が示唆された。また、超強毒型IBDVの病原性に前駆タンパク質のVP2領域に位置する256、279および284番目のアミノ酸残基が関与する可能性が示唆された。超強毒型IBDVの血清学的および分子生物学的性状を解析した本研究は、超強毒型IBDVの予防および制御に貢献するとともに、IBDVの病原性発現機構および新型株出現機構の解明に極めて有用な基礎資料を提供する。さらに、本研究で確立した超強毒型IBDV由来の弱毒株は、将来の超強毒型IBDV感染に対する新しい生ワクチンとして極めて有用と思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

鶏伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) は、鶏の免疫組織、特にファブリキウス嚢の壊死性病変を主徴とする急性のウイルス性疾患である。病因のIBDVウイルス (IBDV) は3週齢以下の雛に重篤な免疫抑制を惹起する。IBDV感染雛は主に不顕性で免疫不全による他病の誘発やワクチンブレイクが問題であった(従来型)。しかし、1987年以降、致死率の極めて高いIBDV(超強毒型)が世界各地で流行し、養鶏産業に甚大な被害を与えた。しかし超強毒型IBDVの抗原性状、病原性および起源に関する分子生物学的研究は進展していない。本研究では、超強毒型IBDVの抗原性状を解明するため、単クローン性抗体の作出と鶏線維芽(CEF)細胞による超強毒型IBDVの馴化・弱毒化を行った。また、超強毒型IBDVゲノム両分節の塩基配列を決定し、超強毒型IBDVの病原性および起源について分子生物学的解析を行った。

1. 単クローン性抗体によるウイルス構造タンパク質の抗原解析

血清型1の従来型IBDVに対する20種の単クローン性抗体(MAb)を作出した。これらのMAbは、ウイルスの主要な構造タンパク質であるVP2およびVP3を認識し、VP2を認識するMAbには中和活性が認められた。エピトープマッピングの結果、VP2のほぼ中央に位置する156アミノ酸残基から成る領域には、少なくとも2ヶ所の血清型1特異的な立体構造依存性の抗原部位が、またVP3のC末端の105アミノ酸残基から成る領域には、立体構造非依存性の抗原部位が存在することが明らかになった。VP2には、その他に1ヶ所の血清型1特異的な立体構造依存性の抗原部位が認められた。

2. 超強毒型IBDVの弱毒化および血清学的性状の解析

超強毒型IBDVを発育鶏卵で継代馴化後、鶏胚馴化株の感染した鶏胚からCEF細胞を調製し細胞馴化株を確立した。鶏胚およびCEF細胞馴化株の雛に対する病原性は著明に減弱していた。超強毒型IBDVは、ポリクローナル抗体による交差中和試験およびMAbによる中和試験で従来型IBDVと異なる反応性を示し、抗原性状が従来型IBDVとは異なることが示唆された。

3. 超強毒型IBDVゲノムの塩基配列の解析

超強毒型IBDVゲノムの分節AおよびBの塩基配列を決定し、前駆タンパク質(NH₂-VP2-VP4-VP3-COOH)およびVP1の推定アミノ酸配列を従来型IBDVの配列と

比較した。さらに、超強毒株由来CEF細胞馴化弱毒株の前駆タンパク質コード領域の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を親株の病原株と比較解析した。超強毒型IBDVに特異的なアミノ酸残基が前駆タンパク質に9ヶ所およびVP1に8ヶ所認められ、弱毒化に伴うアミノ酸置換がVP2の変異領域に4ヶ所(256、279、284および315番目)およびVP3に1ヶ所(805番目)認められた。このうち、279および284番目の置換は、他の細胞馴化弱毒株にも共通に認められた。また、弱毒化により超強毒型IBDV特異的な256番目のアミノ酸に置換が認められ、超強毒型IBDVの病原性発現に256、279および284番目のアミノ酸残基が関与している可能性が推察された。

4. 超強毒型IBDVの系統解析

決定した塩基配列から前駆タンパク質、VP1、VP2、VP3およびVP4の分子系統樹を作製し、超強毒型および従来型IBDVの系統関係を解析した。国内分離超強毒型IBDVはヨーロッパ分離超強毒株とクラスターを形成し、日本の超強毒株がヨーロッパに由来することが強く示唆された。分節Aにコードされている前駆タンパク質、VP2、VP3およびVP4の塩基配列から作製した系統樹は、すべて同様の樹型を示し、超強毒型IBDVは従来型IBDVと近縁なクラスターを形成した。一方、分節BにコードされるVP1の塩基配列から作製した系統樹は、上記の系統樹とは樹型が大きく異なり、超強毒型IBDVは従来型IBDVと明らかに異なるクラスターを形成した。このことから、超強毒型IBDVゲノムの各分節は異なる起源に由来していることが示唆され、超強毒型IBDVの出現が遺伝子再集合による可能性が推察された。

以上の成績を総合すると、超強毒型IBDVは抗原性状が従来型IBDVと異なり、遺伝子再集合により出現した可能性が示唆された。また、超強毒型IBDVの病原性に前駆タンパク質のVP2領域に位置する256、279および284番目のアミノ酸残基が関与する可能性が示唆された。超強毒型IBDVの血清学および分子生物学的性状を解析した本研究は、超強毒型IBDVの予防および制御に貢献するとともに、IBDVの病原性発現機構および新型株出現機構の解明に極めて有用な基礎資料を提供する。さらに、本研究で確立した超強毒型IBDV由来の弱毒株は、将来の超強毒型IBDV感染に対する新しい生ワクチンとして極めて有用と思われる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。