

氏名(本(国)籍)	嶋 崎 洋 子(東京都)
推 薦 教 員	東京農工大学 教授 本 多 英 一
学 位 の 種 類	博士(獣医)
学 位 記 番 号	獣医博乙第95号
学位授与年月日	平成21年9月11日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学 位 論 文 題 目	Studies on Genetic Characterization and Prevention by Vaccine of Infectious Bronchitis Virus (伝染性気管支炎ウイルスの遺伝子的性状とワクチン による予防に関する研究)
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 本 多 英 一 副査 帯広畜産大学 教授 猪 熊 壽 副査 岩 手 大 学 教授 津 田 修 治 副査 東京農工大学 教授 白 井 淳 資 副査 岐 阜 大 学 教授 福 士 秀 人

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

伝染性気管支炎(IB)は、伝染性気管支炎ウイルス(IBV)を原因とする鶏の急性伝染病であり、呼吸器症状、産卵率低下や死亡率上昇など養鶏産業において問題になっている疾病である。IBの予防には、多種類のワクチン株が使用されているが、ワクチン株と抗原的に関連性のない血清タイプに対しては交差防御しないため、未だにIBによる被害が養鶏産業において問題となっている。

申請者は、ワクチンを用いた効果的なIBの予防を検討する目的で、IBV野外分離株の遺伝子タイプとワクチン免疫血清に対する血清学的反応性を調査し、遺伝子タイプと血清タイプの関連性を明らかにするための試験を行ない、また、新たに確認された抗原変異型のIBV株について、遺伝子性状及び病原性状を確認し、ワクチンの効果に関する研究を実施した。

### 第1章：IBワクチンの各種遺伝子タイプのIBV国内分離株に対する血清学的反応性に関する研究

IBの予防には、野外株の抗原性状にあったワクチンを使用することが効果的であるが、IBVの血清学的性状は複雑であり、また、抗原性状を調べる中和試験の試験方法は煩雑であり、抗血清や中和用ウイルス等を準備する必要があり汎用的ではない。一方、IBVの構造蛋白であるスパイク(S)蛋白のうちウイルス粒子表面に存在するS1蛋白部位は、ウイルスの中和抗体や防御及びIBV間の血清学的差異に主に関与していることが知られているため、S1蛋白の遺伝子配列に基づいた遺伝子型による分類が行われている。しかし、国内の野外分離株及びワクチン株を用いた遺伝子タイプと血清学的性状の関連性は十分明らかになっていないことから、申請者は、国内の野外分離株の遺伝子タイプを調査し、ワクチン免疫血清に対する反応性について確認した。超可変領域を含むS1の部分

配列に基づく遺伝子型別の結果、野外分離株は、主に3つの遺伝子タイプ、JP-I、JP-II及びJP-IIIに分類され、新たに4/91遺伝子タイプの株が確認された。中和試験の結果、JP-I、JP-II及び4/91遺伝子タイプのワクチン免疫血清は、それぞれホモの遺伝子タイプの野外株に対し高い割合（JP-Iの75%、JP-IIの100%及び4/91タイプの100%）で反応した。これらの結果から、申請者は、血清学的性状と遺伝子タイプの間に関連性があることを明らかとし、遺伝子タイプを指標としたワクチン選択の有用性を示唆した。

## 第2章：日本で分離された4/91遺伝子タイプのIBVの遺伝学的性状解析

新たに確認された4/91遺伝子タイプのIBVの由来について、同タイプのワクチン株との関連性も含めて確認する目的で、申請者は、本タイプの国内分離株のS1蛋白の遺伝子性状をワクチン株及び海外分離株と比較解析した。S1蛋白の遺伝子系統樹解析の結果、4/91遺伝子タイプの国内分離株は、4/91ワクチンとは異なり、フランスやスペインの分離株と近縁な同一のクラスターに分類されることを確認した。また、4/91遺伝子タイプの国内分離株は、Maseら(2004)により報告されているPCR-RFLP法の遺伝子型別法に新たに*Bal*I、*Pst*I及び*Bgl*IIの制限酵素を追加することで、他の遺伝子型及びワクチン株と識別された。申請者は、これらの研究により、国内で確認された4/91遺伝子タイプのIBVは、ワクチン株とは異なる海外の分離株に由来していることを示唆し、本タイプの遺伝子タイプの型別方法を明らかにした。

## 第3章：日本における4/91遺伝子タイプの伝染性気管支炎ウイルスの性状とワクチンの効果

申請者は、国内で新たに確認された4/91遺伝子タイプのIBVの性状を明確にするため、4/91遺伝子タイプのIBV分離株の鶏に対する病原性及び本タイプの分離株に対するワクチンの効果について調べた。4/91タイプの分離株を4日齢のSPF鶏由来のヒナに接種した鶏群では、4/91ワクチン株接種鶏群と比べて重度の呼吸器症状が確認され、接種3週後の体重に有意差が認められた。C78、TM-86、H120、北-1及び4/91のワクチン株でそれぞれ免疫した鶏群を、免疫後5週目に4/91遺伝子タイプの野外分離株で攻撃する攻撃試験を実施した結果、4/91及びTM-86wのワクチン免疫群において、臨床症状スコア、気管纖毛運動スコア及び気管スワブからのウイルス分離において他のワクチン免疫群に比べ有意な防御効果が確認された。申請者は、本成績から、国内で分離された4/91遺伝子タイプのIBVの鶏に対する病原性を明らかにし、本タイプのIBVに対し既存のワクチンに予防効果があることを示した。

近年発生しているIBの予防には、流行株の性状を把握し、交差防御する効果的なワクチンを選択することが重要であるが、申請者が実施した一連の試験研究は、国内のIBVの野外分離株の性状及びワクチン効果との関係を明らかにしたものであり、IBVの的確な診断及び予防という観点から、養鶏産業におけるIBVによる被害軽減に貢献できる知見である。

## 審 査 結 果 の 要 旨

伝染性気管支炎（IB）の原因ウイルスである伝染性気管支炎ウイルス（IBV）は、鶏に呼吸器症状、腎炎及び産卵異常を引き起こす伝染性の強い病原体である。本病の防疫には、ワクチンが有効であり多種類のワクチンが使用されている状況であるが、本ウイルスの抗原性は複雑かつ多様であるため、野外の流行株に合わせたワクチンの選択が重要となつて

いる。申請者は、ワクチンを用いた効果的な IB の予防を検討する目的で、伝染性気管支炎ウイルスの野外流行株及びワクチン株を用いて、抗原性に関与する S 蛋白の遺伝子解析を実施し、血清学的性状と免疫効果について調査を行った。第 1 章において、IBV のワクチン株及び野外分離株の遺伝子タイプとワクチン免疫血清に対する反応性について検討した結果、血清学的性状と遺伝子タイプの間に関連性があることを確認した。

また、野外で分離された IBV において、従来の遺伝子タイプとは異なる新たな遺伝子タイプ (4/91 タイプ) を確認したことから、第 2 章において、申請者は本遺伝子タイプの IBV の由来を検討するため、S 蛋白の遺伝子学的性状を解析するとともに、本タイプの IBV の型別法について検討を行った。遺伝子解析の結果、4/91 タイプの国内分離株は、フランスやスペインの分離株と近縁であり、4/91 ワクチンとは異なるクラスターに分類されたことから、国内で確認された 4/91 遺伝子タイプの IBV は、ワクチン株とは異なる海外の分離株に由来していることを示唆した。また、本タイプの IBV の遺伝子型別法として既存の PCR-RFLP 法の改良を行った。

さらに、4/91 遺伝子タイプの IBV の性状を明確にするため、本タイプの IBV 分離株の鶏に対する病原性を明確にし、既存のワクチンの本タイプの分離株に対する効果について、鶏を用いた感染試験及び感染防御試験を行い検討した。感染試験の結果、本タイプの IBV 分離株は、鶏に対する病原性がワクチン株と比較して明らかに強いことを確認し、さらに、本タイプの IBV 分離株に対しては、既存のワクチンのうち、同タイプのワクチンが最も防御効果が高いことを明らかにした。

本内容は、IBV の野外株とワクチン株の遺伝子学的性状による型別を行うと共に、ワクチン効果との関係を明らかにしたものであり、IBV の診断及び予防という観点から、養鶏産業における IBV の防疫対策に有用と考えられた。

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があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1 ) 題 目 : Isolation of 4/91 type of infectious bronchitis virus as a new variant  
in Japan and efficacy of vaccination against 4/91 type field isolate  
著 者 名 : Shimazaki, Y., Horiuchi, T., Harada, M., Tanimura, C., Seki, Y.,  
Kuroda, Y., Yagyu, K., Nakamura, S. and Suzuki, S.  
学術雑誌名 : Avian Diseases  
巻・号・頁・発行年 : 52 (4) : 618-622, 2008

2) 題 目 : Genetic analysis of S1 gene of 4/91 type infectious bronchitis virus isolated in Japan

著 者 名 : Shimazaki, Y., Watanabe, Y., Harada, M., Seki, Y., Kuroda, Y.,  
Fukuda, M., Honda, E., Suzuki, S. and Nakamura, S.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 71 (5) : 583-588, 2009

3) 題 目 : Serological studies of infectious bronchitis vaccines against Japanese field isolates of homologous and heterologous genotypes

著 者 名 : Shimazaki, Y., Harada, M., Horiuchi, T., Yoshida, K., Tanimura, C.,  
Nakamura, S., Mase, M. and Suzuki, S.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 71 (7) : 891-896, 2009

#### 既発表学術論文

1) 題 目 : Occurrence of zoonotic bacteria in retail game meat in Japan with special reference to *Erysipelothrix*

著 者 名 : Kanai (Shimazaki), Y., Hayashidani, H., Kenichi, K., Ogawa, M.,  
Takahashi, T. and Nakamura, M.

学術雑誌名 : Journal of Food Protection

巻・号・頁・発行年 : 60 (3) : 328-331, 1997

2) 題 目 : Functional analysis of an epitope in the S2 subunit of the murine coronavirus spike protein: involvement in fusion activity

著 者 名 : Taguchi, F. and Shimazaki, K. Y.

学術雑誌名 : Journal of General Virology

巻・号・頁・発行年月 : 81 (12) : 2867-2871, 2000

3) 題 目 : Immune response to Japanese rabies vaccine in domestic dogs

著 者 名 : Shimazaki, Y., Inoue, S., Takahashi, C., Gamoh, K., Etoh, M.,  
Kamiyama, T. and Makie, H.

学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medicine B

巻・号・頁・発行年 : 50 (2) : 95-98, 2003

4) 題 目 : Chronological antigenic survey of canine parvovirus in Japan

著 者 名 : Gamoh, K., Senda, M., Shimazaki, Y., Makie, H., Inoue, Y. and Itoh, O.

学術雑誌名 : Veterinary Record

巻・号・頁・発行年 : 152 (2) : 142-143, 2003

- 5) 題 目 : Establishment of a potency test by ELISA for a rabies vaccine for animal use in Japan  
著 者 名 : Gamoh, K., Shimazaki, Y., Senda, M., Makie, H., Itoh, O., Muramatsu, M., Hirayama, N. and Hatakeyama, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 65 (6) : 685-688, 2003
- 6) 題 目 : The pathogenicity of canine parvovirus type-2b, FP84 strain isolated from a domestic cat, in domestic cats  
著 者 名 : Gamoh, K., Shimazaki, Y., Makie, H., Senda, M., Itoh, O. and Inoue, Y.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 65 (9) : 1027-1029, 2003
- 7) 題 目 : Antigenic type distribution of parvovirus isolated from domestic cats in Japan  
著 者 名 : Gamoh, K., Shimazaki, Y., Senda, M., Makie, H., Itoh, O. and Inoue, Y.  
学術雑誌名 : Veterinary Record  
巻・号・頁・発行年 : 153 (10) : 751-752, 2003
- 8) 題 目 : Detection of antibodies to *Erysipelothrix* in stray dogs in Japan  
著 者 名 : Shimazaki, Y., Gamoh, K., Imada, Y., Makie, H., Kanzaki, M. and Takahashi, T.  
学術雑誌名 : Acta veterinaria scandinavica  
巻・号・頁・発行年 : 46 (3) : 159-161, 2005