



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス感染による免疫抑制機構に関する分子生物学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平井, 克哉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/265

目 的

鶏伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD) は、IBDウイルスによるリンパ組織の壊死性病変を主徴とする鶏の急性伝染病である。罹患鶏は、各種ワクチンに対する抗体産生が妨げられたり、他病に対する抵抗性が失われるなど、いわゆる免疫抑制状態を起こす。このため、養鶏産業における本病の潜在的な影響は計り知れない。我々はこれまでに、我が国で初めてIBDVを分離し(Jpn. J. Vet. Sci., 34, 1973、Infect. Immun., 10, 1974; J. Virol., 14, 1974, 32, 1979)、感染鶏は感染防御能が著しく減退し種々のワクチンに対し抗体産生が抑制されること(Avian. Dis., 18, 1974)、B細胞が著名に減少し血中免疫グロブリン (IgM) も著名に減少すること(Avian Dis., 23, 1979)、およびウイルス増殖の標的細胞が免疫グロブリン (IgM) を膜表面に持つB細胞であることを解明した(Infect. Immun., 25, 1979; Avian Dis., 25, 1981)。これまでの知見から、本ウイルスによる免疫抑制は幼弱なB細胞のウイルス感染による直接破壊が原因と考えられている。しかし感染鶏には、胸腺の病変やTリンパ球のマイトジェン刺激に対する反応性の低下など、B細胞の直接破壊だけでは説明できない現象も報告されている。さらに、最近流行の超強毒型IBDウイルス感染では、胸腺や骨髄に重篤な病変が認められ、従来型のウイルスと異なる免疫抑制も推測されている。現在我々は、本ウイルスによる免疫抑制の分子生物学的機序を解明する第一歩として、ウイルスと宿主細胞との相互関係を理解する上で極めて重要なウイルスレセプターの解析を行っている。その結果、本ウイルスの感染はB細胞特定のレセプターを介して起こること、弱毒株と強毒株のウイルスでは認識レセプターが異なること、およびウイルスレセプターがプロテアーゼに感受性であることなどが明らかになった(J. Gen. Virol., 投稿中)。さらに現在、感受性細胞のレセプターに対するモノクローナル抗体を作出し、ウイルスレセプターの解析も進めている。

本研究は、IBDウイルスのウイルスレセプター、標的細胞、宿主体内におけるウイルスの伝播過程および免疫担当細胞間における調節機能異常を解析し、本ウイルスによる免疫抑制の機序を分子生物学的に解明することを目的としている。すなわち、ウイルスレセプター分子の同定とレセプター遺伝子のクローニングによる遺伝子構造の解析、レセプター分子陽性細胞の分布と感染後のレセプター分子陽性細胞の挙動解析、各リンパ球サブセットの変動解析および未知の液性因子を含む免疫系の調

節に関わるサイトカインの検出・変動の解析を行う。レセプターの分子生物学的解析は、ウイルスの標的細胞、標的細胞への感染過程、宿主体内での増殖様式を明らかにすることになる。各リンパ球サブセットの変動解析は、宿主免疫系に対するIBDV感染の影響を、細胞表面の抗原型により分類される詳細な細胞群について解析し、ウイルス感染の免疫担当細胞に対する影響を明らかにすることになる。未知の液性因子を含め、免疫機能の調節に関与するサイトカインの検出およびウイルス感染による変動の解析は、ウイルス感染が宿主の免疫調節機構に与える影響を明らかにする。以上の3点の総合的解析は、IBDV感染による免疫抑制および病態発生のメカニズムを明らかにし、近い将来、ウイルスレセプター遺伝子を欠如したIBDVウイルス非感受性鶏の作出や薬剤による免疫抑制の治療へと道を拓くことにもなる。

ウイルス感染による免疫抑制の分子レベルの機序解明は、本病の予防および治療法の確立に極めて重要な情報を提供し、本病によるワクチンブレイクや他病誘発などの解決に大きく貢献する。本研究は、未解決なIBDVウイルスのレセプターを同定し、レセプター分子およびレセプター陽性細胞の挙動、免疫担当細胞間のネットワークを構築しているサイトカイン、およびリンパ球サブセットの変動を分子レベルで解析し、これら相互の関連を総合的に検討することによりIBDVウイルス感染による免疫抑制の機序を解明する独創的かつ重要な研究である。

最近、IBDVの遺伝子構造については2・3報告がなされているが、ウイルス感染による宿主の免疫抑制機序の分子生物学的知見はほとんど明らかにされていない。ウイルスによる免疫抑制は、ウイルス感染による幼弱B細胞の直接的な破壊が原因と考えられているが、感染鶏には、B細胞の直接破壊だけでは説明できない現象がいくつか知られている。最近になって、感染鶏における末梢リンパ球のアポトーシスが報告され、IBDVウイルスによる免疫抑制がB細胞の破壊だけでは説明できないことが示唆されている。ウイルスレセプターの分子生物学的解明と免疫系に影響を与える未知の液性因子を含むサイトカインの検出と動態およびリンパ球サブセットのウイルス感染による変動の総合的解析は、未解決の本ウイルスによる複雑な免疫抑制のメカニズムを解き明かし、本病の予防・治療に大きく貢献する。

総 括

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) による免疫抑制の機序を分子生物学的に解明するため、IBDVの病原性因子およびウイルスレセプターの解析を行った。

1. 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。

2. 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番目のアミノ酸残基に置換が認められ、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。

3. 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。

4. 弱毒生ワクチンの鶏継代による変化

弱毒生ワクチンを鶏で継代し、継代前後の病原性と塩基配列の変化を解析した。ワクチン接種鶏には、継代過程でファブリキウス嚢の萎縮が観察された。また、継代過程で前駆蛋白質VP2領域の253番目のアミノ酸残基にHis->Glnのアミノ酸置換の生じることが予測され、ウイルスの病原性および鶏体内での増殖に前駆蛋白質VP2領域の253番目のアミノ酸残基が重要な役割を持つことが推察された。

5. ウイルスレセプターの解析

ビオチン標識した超強毒型IBDV OKYM株を用い、各種細胞に対する吸着およびレセプターの生化学的性状をフローサイトメトリーにより解析した。細胞は、鶏白血病由来B細胞株およびマレック病由来T細胞株を用い、感受性細胞のプロテアーゼ、ホスホリパーゼ、グリコシダーゼ、ツニカマイシンおよび過ヨウ素酸処理によりウイルスレセプターの生化学的性状を検討した。また、ウイルス吸着と細胞表面(s)IgMとの関連についても検討を行った。各細胞への吸着率は感染率と良く相関し、B細胞由来のLSCC-BK3細胞が最も感受性が高かった。また、ウイルス吸着陽性細胞はsIgM陽性で、ウイルスの吸着はプロテアーゼおよび蛋白質への糖鎖修飾を阻害するツニカマイシンにより阻止され、IBDVのレセプターがsIgM陽性細胞に特異的に発現される糖蛋白質である可能性が推察された。