

学 位 論 文 題 名

Demonstration of a common antigen in chickens
infected with infectious bronchitis virus and
differentiation of the virus strains with a DNA probe

（鶏伝染性気管支炎ウイルス共通抗原の検出および
DNA プローブを用いたウイルス株の型別）

学位論文内容の要旨

鶏伝染性気管支炎ウイルス（IBV）はコロナウイルス科に属し、粒子は直径80-120nmで、エンベロープを有して多形性を示し、表面には涙滴状の突起（スパイク）を持っている。核酸は一本鎖の感染性+鎖 RNAである。構造蛋白はスパイク（S）ならびにマトリックス（M）糖蛋白およびヌクレオカプシッド（N）蛋白の3種がある。

本ウイルスは鶏に呼吸器病、腎炎、腎症、さらに産卵率低下を引き起こす。また、本病の血清学的診断には中和試験が最もよく用いられてきた。この試験は血清型特異的試験方法であり、また本ウイルスには多くの血清型が存在するため、その的確な診断には多くの抗血清あるいはウイルス株が必要できわめて煩雑である。近年、抗原抗体反応の検出方法として固相酵素抗体法（ELISA）が広く種々の感染症の抗体あるいは抗原の検出に用いられるようになった。本研究では、ELISA を用い、IBV 感染症の簡易で確実な診断法を確立することを目的として検討を行った。

中和試験で交差性の低い種々の株に対する抗血清を用いて、IBV B42 株のトリトン X-100による可溶化抗原に対する ELISAを行ったところ、これらの抗血清も強く反応した。この結果は ELISAにより、中和試験では検出できない他の株に対する抗体をも検出し得ること

を示すものと思われる。従来の ELISAでは血清の多段階希釈法を用いていたために多くの検体数を処理することは困難であったが、今回著者が開発した ELISAでは一定希釈の血清を用いているため操作がより簡便で、1度に扱える検体数も格段に増え、鶏群のモニタリングにはより適していると思われる。

一方、より迅速な診断のため、感染鶏からのウイルス抗原の検出のためにモノクローナル抗体を用いたELISA について検討した。IBV B42 株に対する5つのモノクローナル抗体について、交差反応性の少ない9株および B42株と同じ血清型に属する2株との反応性を、ELISA で調べたところ、N蛋白を認識するクローン1Fがすべての株に対して強く反応した。そこで本モノクローナル抗体と抗 B42 鶏 IgG を用いて抗原検出のための ELISAを確立した。その結果、B42 株あるいは血清学的に異なる A5968株を接種した発育鶏卵の尿膜腔液ばかりでなく、上記の2種のウイルスをそれぞれ接種した鶏の気管乳剤からも、ウイルスをより高感度に検出することができた。

以上のように、単一の株の抗原あるいは抗体を用いた ELISAにより、血清型とは関係なく、抗体や抗原を検出することができ、IBVの血清学的診断が大きく簡易化改善された。

一方、IBV 診断では分離ウイルスの血清型を決定する必要がある。これまで血清型別は交差中和試験で行われてきたが、明瞭な血清型別が困難な株があり、結果が明瞭でないことが、しばしばあった。そこで、cDNAプローブを用いたドット・プロット・ハイブリダイゼーションによる血清型の同定について検討した。

B42 株と同じ血清型に属するM41 株のS蛋白をコードしている遺伝子のcDNAを作製し、制限酵素を用いてS蛋白の1つの領域(S1)をカバーするcDNA断片を作製した。本cDNA断片をジゴキシゲニン-dUTP で標識し、S1プローブとして試験に供した。可検ウイルスのRNAはプローブに用いた M41株ならびにそれと同じ血清型に属する4株および互いに交差性の少ない14株から得た。S1プローブは68℃では、M41 株以外とはまったく反応せず、同一血清型に属する株でも

変異の度合いが高いことが示された。また56℃では M41株を含むそれと同じ血清型に属する5株とのみ反応し、中和試験による血清型と一致した。すなわち、SS株および7073株と中程度の交差性を示す Tochigi 株に対しても本プローブは反応せず、ハイブリダイゼーションによって明瞭に型別できる可能性が示唆された。また、プローブさえ用意できれば、本手技は中和試験と比べて容易であり、さらに早く結果が得られることが明らかとなった。

以上の実験成績により、ELISAによる IBVの抗体および抗原の検出がより簡素化され、IBの血清診断がより容易になった。また血清型別についてもS1遺伝子のcDNAプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、明瞭にできることが示唆された。このように本研究によって IBVの同定から血清型別までの診断が容易かつ確実に行うことが可能となった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 悠紀臣

副 査 教 授 橋 本 信 夫

副 査 教 授 板 倉 智 敏

副 査 教 授 小 沼 操

学 位 論 文 題 名

Demonstration of a common antigen in chickens
infected with infectious bronchitis virus and
differentiation of the virus strains with a DNA probe

(鶏伝染性気管支炎ウイルス共通抗原の検出および
DNA プローブを用いたウイルス株の型別)

鶏伝染性気管支炎 (IB) ウイルスには多くの血清型があるため、その診断には多種類の抗血清とウイルス株を必要とし、きわめて煩雑であった。本論文は酵素抗体法 (ELISA) を用い、IB の簡易確実な診断法の確立について検討して得られた新知見について述べたものである。

ウイルスをトリトン X-100 で可溶化した抗原と種々のウイルス株に対する抗血清との間で ELISA を行ったところ、中和試験では抗体が検出されない抗血清からも抗体が検出された。中和試験とは異なり、ELISA では一定希釈の血清で抗体測定が可能なので、手技が大巾に簡易化された。

血清型の異なるウイルスを検出するため、ウイルスの N 蛋白を認識するモノクローナル抗体のなかから全てのウイルス株に対して強く反応する抗体を選別した。このモノクローナル抗体と抗鶏 IgG を用いて抗原検出のための ELISA を確立した。この方法によって血清型の異なる全てのウイルスの検出が可能となり、実験感染鶏の気管乳剤からもウイルスを高感度に検出することができた。

一方、IB の診断では分離ウイルスの血清型を決定する必要があり、これまで中和試験が用いられてきたが、結果がしばしば明確でなく手技も煩雑であった。この欠点を改善するため、ウイルスの S 蛋白の cDNA プロブを用いたドット・ブロットハイブリダイゼーションを用いたところ、血清型別ばかりでなく株の分別も可能となった。

以上、本論文には ELISA による IB の抗体および抗原の検出がより簡易化された

ことが示されているばかりでなく、cDNAプローブを用いたハイブリダイゼーションによって血清型別もより簡易化されたことが明示されている。このように本研究によって鶏のウイルス病のなかで最重要疾病の一つであるIBの診断が容易かつ確実となった。よって著者は博士（獣医学）の学位を授与される資格があるものと認めた。