

氏 名 (本籍) おお 太 た 田 しゅう 修 いち 一

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 292 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 60 年 10 月 11 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目 鶏 伝 染 性 気 管 支 炎 の 血 清 反 応 と 免 疫  
に 関 する 研 究

論 文 審 査 委 員 (主 査)

教 授 勝 野 正 則 教 授 水 間 豊

教 授 玉 手 英 夫

# 論 文 内 容 要 旨

鶏伝染性気管支炎（以下IBと略す）は鶏伝染性気管支炎ウイルス（以下IBVと略す）によって起こり、呼吸器のみならず、腎臓、卵巣、卵管などに障害を与え、生産性の著しい低下を招く重要な鶏病の一つである。

この予防のため、1977年以来、ワクチンが用いられてきたが依然として、その被害は跡を絶たない。それはIBVには多くの血清型があり、野外流行株と使用ワクチン株の血清学的性状が必ずしも一致せず、十分な防御が得られないためと考えられている。しかし、本邦のIBワクチン株の血清型についての報告は少なく、その感染防御効果についての報告も殆どない。

それは、従来血清学的検索に常用されていた中和試験が簡便でないこと、株間の血清学的交差が複雑で血清型を同定し難いこと、感染防御試験の攻撃株として適したIBV株が維持されていないことなどによるためと思われる。

そこで著者は、我が国のIB対策として、ワクチン株の血清型の同定、中和試験の簡易化、中和試験に代る簡便な血清反応の検討を行い、さらに感染防御効果を簡易、迅速に判定し得る指標の検討を行った。以下はその知見の概要である。

## 1. 我が国のワクチン株の血清型

### 1) 発育鶏卵を用いた中和試験とそれによる血清型

我が国で使用されているIBVのワクチン株は十指に達するが、その大半の血清型は不明であった。そこで、先ず、その血清型を同定するため、発育鶏卵・ウイルス希釈法により、ワクチン10株と実験室保存株3株について11種の抗血清を用いて交差中和試験を行い、各株間の中和指数の相関を求めて加重対群法によるSimilarity indexを算出し、クラスター分析を行った。

その結果、供試株は5群に大別された(図1)。第I群の7株(SI>0.88)は、マサチューセッツ型である既知の株を含むもので、これらはマサチューセッツ型と同定された。また第V群の1株はコネチカット型として既知のもので、両群の血清型は明らかに異なること(SI=0.06)が確認されたが、他の5株は両群の中間に位置する3群に類別された。

これは我が国のIBVのワクチン株はマサチューセッツ型とコネチカット型のほかに、これらとは異なる血清型が含まれていること、国内分離株はコネチカット型以外の血清型であることを明らかにしたものである。

## 2) 鶏腎培養細胞を用いた中和試験とそれによる血清型

一方、IBVの発育鶏卵継代株は鶏腎培養細胞（以下CK細胞と略す）を用いたブラック法による中和試験が可能なが知られてきたが、我が国のワクチン株では2株を除き、そのブラック形成能さえ不明でCK細胞のブラック法による中和試験は一般に行われていなかった。そこで、前記13株のブラック形成能を常法により調べたところ、5株が明瞭、比較的大型のブラック、4株は不明瞭、小型のブラックを形成し、他の4株はその形成がみられなかった。

そこで、他のウイルスで知られている一次重層寒天培地にトリプシンを添加するブラック増強法を応用したところ、常法で小型のブラックを形成する株は全て明瞭なブラックを形成し計数が容易となり、中和価の測定に適することを知った。

つぎに、ブラック形成能を有する9株につき常法と増強法を適用して前述の11種の抗血清との交差中和試験を行った。CK細胞による中和価は一般に発育鶏卵法との中和指数より低い値を示したが、両測定間には高い相関（ $r=0.83$ ,  $p<0.01$ ）が認められ、本法によって免疫血清の力価を評価して支障ないことを知った。

つぎに、このCK細胞による交差中和価から、発育鶏卵法と同様に供試株のクラスター分析を行い、近似性の異なる5群の血清型に大別し得た。この第I、第II群は発育鶏卵法でマサチューセッツ型と同定された株を主として含み、第V群はコネチカットの株で、大略その血清型の位置づけは両法で一致した（図2）。

すなわち、CK細胞によっても、我が国のワクチン株にはマサチューセッツ型とコネチカット型の株があり、国内分離株にはこれらの血清型とは異なる株のあることが確かめられた。

なお、一般にIBV株は発育鶏卵継代により維持されていること、継代の反復によりCK細胞にブラックを形成し易くなる（Kawamuraら、1961）ことを考えると本細胞による中和試験の応用範囲はより広がるものと思われる。

## 2. IBVの赤血球凝集（HA）反応と赤血球凝集抑制（HI）反応

### 1) 我が国のワクチン株のHA能

上述のように、IBVの血清反応は、発育鶏卵法に代って、簡便なブラック法が多く

の株に適用し得ることを知ったが、ウイルスの血清反応で最も簡易、迅速な方法はHA能を有するウイルスに用いられるHI反応である。しかし、IBVのHI反応は本邦では全く検討されていなかった。

IBVは従来、HA能はないものとされていたが、IBVを濃縮しホスホリパーゼCで処理すると特定の株にHAがみられることが知られてきた。そこでワクチン株7株、実験室保存株3株の計10株のHA能を調べた。その結果、本酵素処理により6株がHA価32~512倍と明らかなHA能を示し、その中には国内分離株で固有の血清型を有するON株も含まれていた(表1)。HA能は酵素処理前のウイルス価とHA能の有無、高低と相関せず、株本体の性状によるものと思われた。

なお、このHA反応は赤血球表面に吸着ウイルス粒子を介して発現すること、ホスホリパーゼC処理の有無に拘わらず、ウイルス粒子の突起および数に変化がみられないことが電子顕微鏡的に確かめられた。

## 2) 鶏血清中の非特異反応の除去

一般にHI反応において問題となるのは被検血清中の非特異的赤血球凝集抑制物質による非特異反応であるが、IBV感染歴のないSPF鶏群の血清について、非特異反応の出現状況を調べたところ、供試血清の全てが4倍以上の非特異反応を示し、50日齢以上の血清では16倍~64倍を示すものが過半数に達した(表2)。これは本反応の実施には、この非特異反応の除去が必要なことを示している。

そこで、各種ウイルスで用いられている血清処理〔56°C 30分加温、カオリン、RDE (Receptor destroying enzyme)、トリプシン、KIO<sub>4</sub>、アセトン〕を比較検討した結果、RDE処理のみが非特異反応を除去でき、しかも特異抗体価の低下をきたさないこと(表3)を知り、IBVのHI反応に供試する鶏血清はこれで前処理することとした。

## 3) IBV免疫鶏のHI反応

つぎに、血清型がマサチューセッツ型に属し、HA能を有するM41株とそれを有しないBe42株を接種した2群のHI抗体価の推移をM41株のHA抗原で測定した。

その結果、Be42株接種群の抗体価はやや低いが、M41株接種群と同様の消長を示し、HA能を有しない株の感染でもHI抗体が産生されることを知った。これはHA能を有しないウイルス粒子はHA抗原を欠除するのではなく、それがホスホリパーゼC非感受性の物質にマスクされていることを示唆している。

また、血清型の群別に用いた11種の抗血清についてF404株(マサチューセッツ型)と

L<sub>2</sub>株（コネチカット型）を用いて交差HI反応を行ったところ、それはIBVの血清型に特異性を示し、特にCK細胞法の血清型と関連する傾向があった。

また、HI価と中和指数との間に、有意な高い相関（ $r=0.89$   $p<0.01$ ）があり、中和試験に代ってHI反応でワクチンの評価が可能なが示された（表4）。

#### 4) HA抗原の保存性と不活化IBVのHA能

つぎに、HA抗原（チメロサル 0.01%含有）の保存性を検討したが、4°C保存で1年間、安定した力価を維持した。

一方、ホスホリパーゼC処理後のIBVは感染性を保持していたが、これをホルマリン（0.5%）で不活化してもHA能は変化しないことを知った。これは、強毒株や野外新鮮分離株で作製したHA抗原の安全性を示唆するもので、HI反応の応用範囲の拡大に資するものと思われる。

### 3. 気管線毛運動を指標としたIBVの感染防御試験

#### 1) IB41・F404・T(F404・T)株の病原性

現在、IBワクチンの評価はワクチン接種後の中和抗体の上昇を指標に行われているが、抗体価と感染防御試験の成績は必ずしも一致せず、感染防御試験を行うのが望ましいとされている。しかし、我が国ではこの試験に用いる適当な保存強毒株がなく、また野外新鮮分離株を用いて迅速に行い得る簡便な試験方法も確立されていない。

このため、著者は攻撃株として適当な株を得るため、鶏に呼吸器症状を呈するよう馴致したIB41・F404・T株（F404・T株）を作出した。本株の病原性をひな、産卵鶏を用いて確認すると共に、気管を病理組織学的、電子顕微鏡的に検討した。その結果、F404・T株接種鶏の気管は、カタル性炎、線毛の脱落、上皮細胞の変性剥離など野外流行時の病鶏と同様の変化が高率にみられ、本株が感染防御試験の攻撃株として用い得ることを知った。

#### 2) F404・T株による気管線毛運動の消失と症状、ウイルス回収との関係

一方、上述のような気管病変の生じたIBV感染鶏の気管リングを生鮮標本で観察すると線毛運動の低下、消失がみられることが知られていた。

そこで、5週齢の鶏に気管内、点眼、点鼻、経口の各種経路でF404・T株を接種し、気管からのウイルス回収率、症状発現率、線毛運動消失率を経日的に調べたところ、経口接種を除き、それらの値は略同様に推移し、接種4～7日後に最高値（100%）に達し（図3）、観察時期を選べば線毛運動の消失は感染の指標になるものと思われた。

### 3) 気管線毛運動を指標とした感染防御試験

そこで、ワクチン株を接種した免疫鶏を用いて、F404・T株で攻撃し、攻撃4日および7日後の気管線毛運動の有無とウイルス回収率の関係を調べたところ、線毛運動を消失した気管からは全て攻撃ウイルスが回収されたのに対して、線毛運動を有した気管からは僅か（5.8%）に回収されたにすぎず、感染防御試験においても、この線毛運動の観察がウイルス検出に代用し得るものと思われた。

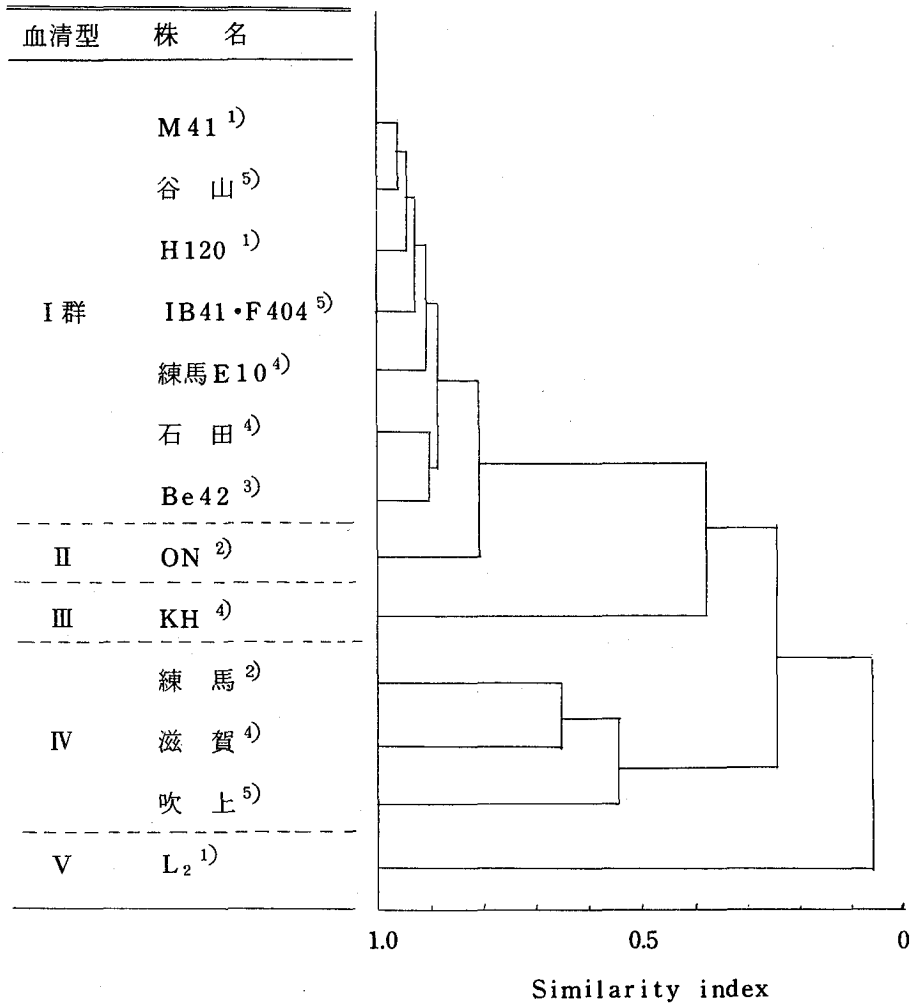
さらに、血清型の異なる4種の市販ワクチンを用いて、感染防御率をウイルスと線毛運動を指標に調べたところ、両者間には高い有意な相関（ $r=0.81$   $p<0.01$ ）がみられ、また血清型が近似するもの程、その防御能は高いことを知った（表5）。

これらのことから、気管線毛運動の消失の指標は、気管からのウイルス回収と同様ワクチン効果判定に応用出来るものと思われた。

IBVの野外株の分離は発育鶏卵で数代から十数代の継代を要し、流行時のIBVに対する感染防御試験は即時に実施出来なかったが、気管線毛運動を指標とする感染防御試験は、ワクチン免疫鶏に流行時の病鶏の気管材料を直接、接種することにより短時間で容易に効果を判定し得る方法で、本病の予防対策に寄与することが大きいと思われる。

研究資料

図1 発育鶏卵法による鶏伝染性気管支炎ウイルスの血清型



- 1) 生ワクチン製造用株 (輸入)      2) 生ワクチン製造用株 (国内分離)  
 3) 不活化ワクチン製造用株 (輸入)      4) 不活化ワクチン製造用株 (国内分離)  
 5) 実験室保存株

図2 CK細胞法による鶏伝染性気管支炎ウイルスの血清型

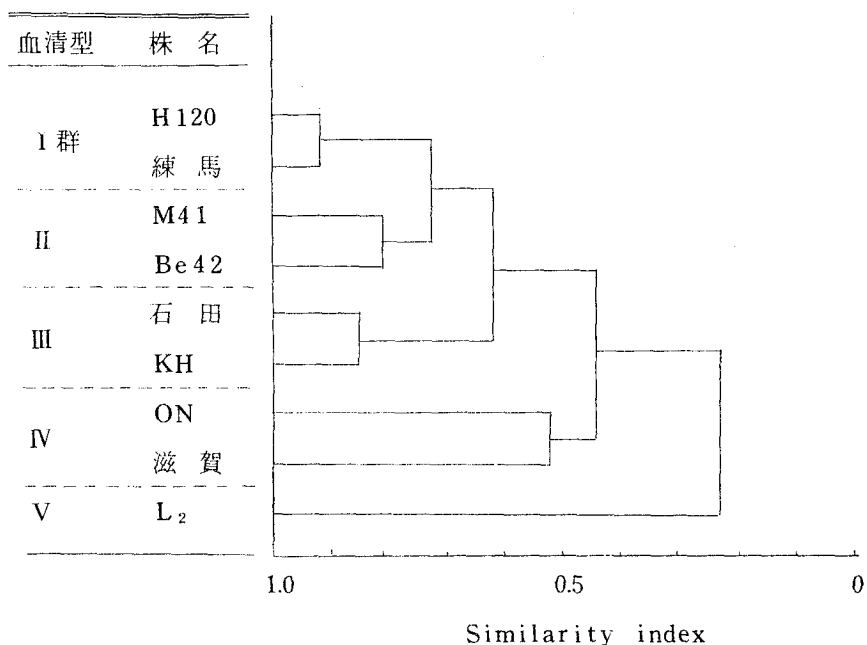


表1 ホスホリパーゼC処理各種鶏伝染性気管支炎ウイルス株の赤血球凝集(HA)価

ウイルス株	ウイルス価 (log)		HA 価 (C)	B-logC
	尿膜腔液 (A)	濃縮ウイルス液 (B)		
谷山	7.9	9.5	512	6.8
M41	7.7	9.3	128	7.2
IB41・F404	6.7	8.3	128	6.2
ON	6.9	8.1	32	6.6
H120	7.7	9.1	32	7.6
L <sub>2</sub>	7.2	8.7	32	7.2
練馬	7.3	9.1	2	8.8
Be42	7.5	9.1	< 2	9.1
吹上	7.5	9.3	< 2	9.3
8957	6.9	8.3	< 2	8.3

A : 感染尿膜腔液のウイルス価 (logEID<sub>50</sub>)

B : 28,000×950分間遠心し, 100倍に濃縮した時のウイルス価 (logEID<sub>50</sub>)

HA 反応条件 : 1%新鮮鶏赤血球浮遊液を用い, 4°C 60分間静置後判定



表2 正常鶏血清中にみられた非特異的赤血球凝集抑制物質の分布

SPF 鶏 の 日 齢	供試羽数	非特異的赤血球凝集抑制物質 (HI 価) <sup>1)</sup>					平均値 <sup>2)</sup>
		4 倍	8	16	32	64	
3	42 例	21 例	10	9	2		$2^{2.80 \pm 0.30}$
30	20	7	8	2	3		$2^{3.50 \pm 0.49}$
50	15	2	3	7	2	1	$2^{3.80 \pm 0.60}$
280	36	8	9	11	2	6	$2^{3.69 \pm 0.46}$

抗原：M41

血清：56°C，30分間加温

1)：赤血球凝集抑制価

2)：危険率 0.05 の平均値の信頼限界を示す。

表3 鶏伝染性気管支炎ウイルスM41株感染前後の血清の  
各種血清処理法における赤血球凝集抑制 (HI) 価

血清処理	M 4 1 抗原		F 4 0 4 抗原 <sup>1)</sup>	
	正常血清 <sup>2)</sup>	感染後血清 <sup>3)</sup>	正常血清	感染後血清
未 処 理	$2^{5.67 \pm 0.36}$ <sup>4)</sup>	$2^{7.67 \pm 0.59}$	$2^{5.16 \pm 0.86}$	$2^{6.00 \pm 1.03}$
56 °C 30 分	$2^{5.17 \pm 0.87}$	$2^{7.33 \pm 0.12}$	$2^{4.83 \pm 0.86}$	$2^{5.83 \pm 0.86}$
カ オ リ ン	$2^{4.00 \pm 2.17}$	$2^{7.67 \pm 0.97}$	$2^{3.33 \pm 1.39}$	$2^{5.50 \pm 1.41}$
R D E 2 容	$<2^{2.00 \pm 0.00}$	$2^{6.83 \pm 1.35}$	$<2^{2.00 \pm 0.00}$	$2^{5.67 \pm 0.94}$
0.8% トリプシン	$<2^{2.00 \pm 0.00}$	$2^{3.67 \pm 3.27}$	$<2^{2.00 \pm 0.00}$	$2^{3.50 \pm 1.05}$
K I O <sub>4</sub>	$2^{7.33 \pm 0.59}$	$2^{8.50 \pm 0.96}$	$2^{7.00 \pm 1.03}$	$2^{7.17 \pm 1.13}$
ア セ ト ン	$2^{7.50 \pm 0.63}$	$2^{8.83 \pm 0.86}$	$2^{7.83 \pm 1.19}$	$2^{8.50 \pm 1.21}$

1) F404抗原：IB41・F404株のHA抗原

2) 正常血清：感染前血清6例

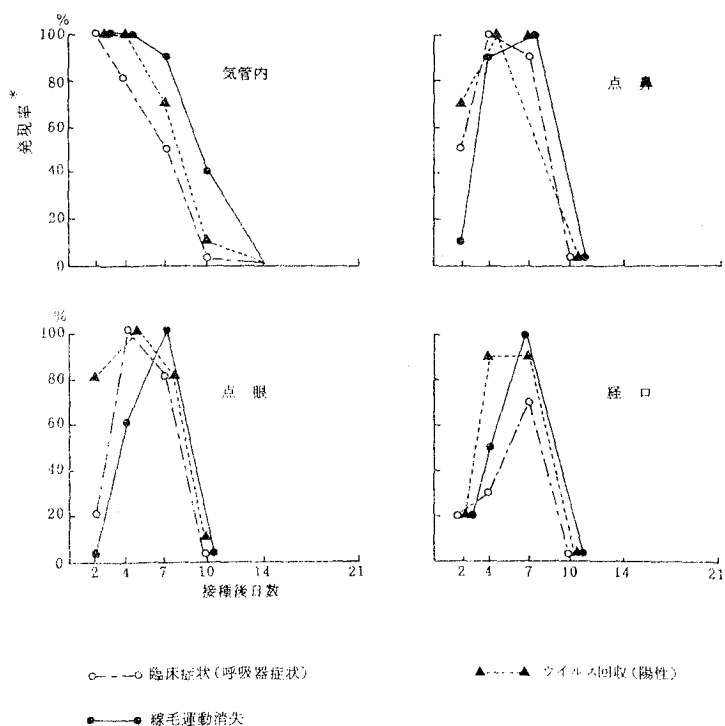
3) 感染後血清：M41株感染後の血清6例

4) 表中の数字は平均値と危険率5%の信頼限界を示す。

表 4 鶏伝染性気管支炎ウイルスM41抗原による赤血球凝集抑制抗体(HI)価と中和抗体価の関係

HI 価	血清例数	中和指数			中和指数 2以上の%
		≥2.0	1.1~1.9	<1.0	
≥64	22	22	0	0	100
32	13	11	2	0	84.6
16	9	6	3	0	66.7
≤8	30	0	14	16	0

図 3 各接種経路による鶏伝染性気管支炎ウイルスF404株接種鶏の臨床症状，気管からのウイルス回収，線毛運動消失の出現率



\* 発現率：各時点の試験鶏(5週齢)10羽中の陽性率  
供試ウイルス：F404・T株  $10^{3.5}$  EID<sub>50</sub>/羽

表 5 鶏伝染性気管支炎ワクチンの血清型とウイルス回収，  
線毛運動消失を指標にした防御率

ワクチン	血 清 型		試験区数	感 染 防 御 率	
	発 育 鶏 卵 法	攻 撃 株 と の 近 似 性 <sup>1)</sup>		ウ イ ル ス 指 標	線 毛 指 標
A <sup>2)</sup>	第 1 群 (マサチューセッツ型)	0.94	1	90 %	80 %
B	第 2 群 (ON型)	0.80	5	58.5±8.1	45.5±15.5
C	第 4 群 (滋賀型)	0.23	3	58.1±26.6	40.7±16.0
D	第 5 群 (コネチカット型)	0.06	3	38.9±24.2	26.3±13.2

攻撃株：ワクチン接種 3 週後に IB41・F404・T 株を点眼経路により  $10^{3.5}$ EID<sub>50</sub>/羽で攻撃。

1) 攻撃株と各ワクチン株間の Similarity index。

2) A ワクチン：H120 株， B ワクチン：ON 株， C ワクチン：練馬株， D ワクチン：L<sub>2</sub> 株。

## 審 査 結 果 の 要 旨

鶏伝染性気管支炎（IB）はワクチンの普及にも抱わらず、その被害は跡を絶たない。それは、鶏伝染性気管支炎ウイルス（IBV）には多くの血清型があり、野外流行株と使用ワクチン株の血清学的性状が一致しないことがあるためと考えられている。しかし、本邦ではIBVの血清学的検査に常用される中和試験が簡便でないこと、株間の血清学的交叉が複雑なこと。感染防御試験の攻撃株として適した株が維持されていないこと等から、IBワクチン株の血清型や感染防御効果についての知見は極めて乏しかった。

そこで、著者は先ず、本邦で使用されているワクチン株10株と実験室保存株3株について、11種の抗血清を用いて、発育鶏卵法による交差中和試験を行ない中和指数から各株間の Similarity index を求めクラスター分析により供試株の血清型の位置付けを明らかにした。ついで、前記13株中9株はトリプシン添加によるブラック増強法を併用することにより鶏腎培養細胞を用いた中和試験が可能なことを明らかにし、本法によって容易に免疫血清の力価を評価し得ることを示した。また本法による交叉中和価から各株の血清型をクラスター分析し、発育鶏卵法の場合同様の成績を得た。

つぎに、IBVのHA能を調べ、供試10株中6株がホスホリパーゼC処理によりHA能を発現すること、被検血清をRDE処理して非特異的HI反応を除去して供試すればHI反応により簡易、迅速にIBV抗体を検出し得ることを明らかにした。

さらに、実験室保存株を鶏気管に継代し、野外強毒株同様の症状、病理的变化を安定して生ずる株を作出した。そして本株感染鶏の気管リングを生鮮標本で観察すると線毛運動の消失がみられることから、これを指標にワクチンの感染防御効果を知り得ることを明らかにした。

以上の知見はIBのワクチン評価、疫学調査に資すること大きく、著者は農学博士の学位を得るに値するものと認めた。