



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Title                       | Molecular Biological Studies on the Epidemiology and Virulence Factors of Infectious Bursal Disease Virus( 内容の要旨 (Summary) ) |
| Author(s)                   | Min Thein Maw  |
| Report No.(Doctoral Degree) | 博士(獣医学) 甲第280号   |
| Issue Date                  | 2009-03-13   |
| Type                        | 博士論文   |
| Version                     |  |
| URL                         | <a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/33592">http://hdl.handle.net/20.500.12099/33592</a>                              |

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

|            |   |           |       |
|------------|---|-----------|-------|
| 氏名(国籍)     | Min Thein Maw (ミャンマー連邦)   |           |       |
| 学位の種類      | 博士(獣医)  |           |       |
| 学位記番号      | 獣医博甲第280号   |           |       |
| 学位授与年月日    | 平成21年3月13日  |           |       |
| 学位授与の要件    | 学位規則第3条第1項該当  |           |       |
| 研究科及び専攻    | 連合獣医学研究科<br>獣医学専攻   |           |       |
| 研究指導を受けた大学 | 岐阜大学  |           |       |
| 学位論文題目     | Molecular Biological Studies on the Epidemiology and Virulence Factors of Infectious Bursal Disease Virus (伝染病ファブリキウス嚢病ウイルスの疫学および病原性決定因子に関する分子生物学的研究) |           |       |
| 審査委員       | 主査  | 岐阜大学 教授   | 福士 秀人 |
|            | 副査  | 帯広畜産大学 教授 | 猪熊 壽  |
|            | 副査  | 岩手大学 教授   | 品川 邦汎 |
|            | 副査  | 東京農工大学 教授 | 本多 英一 |
|            | 副査  | 岐阜大学 教授   | 石黒 直隆 |
|            | 副査  | 鳥取大学 教授   | 山口 剛士 |

### 論文の内容の要旨

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV)は若齢の鶏に高い伝染力を持つ疾患である伝染性ファブリキウス嚢病(IBD)の原因ウイルスである。近年、IBDVワクチン接種を行なわない農場が増加している。このような農場においてもIBDは発生しているが、疫学調査はほとんど行なわれていない。発展途上国において、IBDの分子生物学に基づく疫学調査成績は乏しい。簡単で生物学的に安全なサンプリング方法はIBDVの診断や分子生物学的研究のための海外の研究機関への輸送の面における課題の解決にもつながる。アポトーシスは強毒型IBDVによるIBDの症状の重篤度に直接的に関わっていることが明らかになってきた。しかし、強毒型IBDVによって誘導されるアポトーシスに関与するウイルスタンパク質についてはほとんど報告がない。アポトーシス誘導との関連性が示唆されているウイルス構造タンパク質の一つであるVP4の核移行に関する分子生物学的機構はまだ解明されていない。

このようなIBDVの疫学および病原性に関与するウイルスタンパク質の機能を解明するため、本研究では以下に示す4つの研究を行った。

第1章では日本におけるIBDの疫学検索を行った。IBDに対するワクチン接種を行っていない養鶏の中から2種類のIBDVが検出され、どちらも血清型1に分類された。またIBDの罹病率はVNTの結果では78%、RT-PCRの結果では80.4%であった。塩基配列の解読およびその系統学的解析の結果、検出されたIBDVは生ワクチンと同じ遺伝子型であった。臨床症状を示していない鶏からワクチン様IBDVが検出されたことから日本においてIBDV生ワクチンが拡散していることが示唆された。

第2章では、IBDの分子診断のために通常の紙を用いたファブリキウス嚢の実用的なサンプリング法を開発した。IBDVが感染したファブリキウス嚢を直接クロマトグラフィ紙、フィルター紙および通常の紙にスタンプし、無水エタノール、Tris—HCl飽和フェノールまたはフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)で固定した。Flinders Technology Associates(FTA)カードも同様に使用した。37°Cで30日間まで保存した後、全RNAを紙およびFTAカードに固定した臓器から抽出し、IBDV RNA検出を行った。さらに様々な固定法とFTAカードについてIBDVの不活化についても検討した。紙の品質、保存期間および固定法に関わらずIBDV RNAはすべてのサンプルから検出された。またIBDVはフェノールでは不活化されたが、エタノールやFTAカードに含まれる成分では不活化されなかった。以上の結果から、通常の紙はFTAカードと同様にウイルスRNAを保持することができ、IBDVの不活化に関してはFTAカードよりもフェノール固定の方が優れていることがわかった。

第3章では、古典型IBDVと強毒型IBDVを比較することによってウイルスのアポトーシス関連タンパク質の機能を解明した。OKYM株(強毒型)およびGBF1 (古典型)のタンパク質を組み換えGFP発現ベクターを用いて発現させた。その結果、VP4およびVP2がアポトーシスの誘導に関わり、vvOKYM株およびcvGBF1株の病原性に関与していることが示された。しかし、このアポトーシス誘導に関してvvOKYM株およびcvGBF1株の間にはVP2、VP4共に違いは認められなかった。ウイルスの致死性に関してはアポトーシス誘導タンパク質だけでなくいくつかの要因が関与していることが示唆された。

第4章では、VP4の核移行に関する分子生物学的基礎および核移行を決定するドメインの特定を行った。VP4のC末端の83-163番目のアミノ酸を欠損させた場合、針状構造物は消失したが、核移行は阻害されなかった。N末端の76アミノ酸を削ると針状構造物の集合は消え、核移行も大部分が阻害された。IBDV感染においてVP4は核または細胞質に局在し、N末端から76番目のアミノ酸がVP4の核移行を決めていることが示唆された。

本研究によってIBDVの疫学的、診断、およびウイルスタンパク質の機能解析について新たな知見が得られた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究では伝染性ファブリキウス嚢病(IBD)の原因ウイルスである伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV)の疫学および病原性に関与するウイルスタンパク質の機能を解明するための研究を行った。

本研究は4章から構成されている。

第1章では日本におけるIBDの疫学検索を行った。IBDに対するワクチン接種を行っていない養鶏の中から2種類のIBDVが検出され、どちらも血清型1に分類された。またIBDの罹病率はVNTの結果では78%、RT-PCRの結果では80.4%であった。塩基配列の解読およびその系統学的解析の結果、検出されたIBDVは生ワクチンと同じ遺伝子型であった。臨床症状を示していない鶏からワクチン様IBDVが検出されたことから日本においてIBDV生ワクチンが拡散していることが示唆された。

第2章では、IBDの分子診断のために通常の紙を用いたファブリキウス嚢の実用的なサンプリング法を開発した。IBDVが感染したファブリキウス嚢を直接クロマトグラフィー紙、フィルター紙および通常の紙にスタンプし、無水エタノール、Tris-HCl飽和フェノールまたはフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)で固定した。Flinders Technology Associates(FTA)カードも同様に使用した。37°Cで30日間まで保存した後、全RNAを紙およびFTAカードに固定した臓器から抽出し、IBDV RNA検出を行った。さらに様々な固定法とFTAカードについてIBDVの不活化についても検討した。紙の品質、保存期間および固定法に関わらずIBDV RNAはすべてのサンプルから検出された。またIBDVはフェノールでは不活化されたが、エタノールやFTAカードに含まれる成分では不活化されなかった。以上の結果から、通常の紙はFTAカードと同様にウイルスRNAを保持することができ、IBDVの不活化に関してはFTAカードよりもフェノール固定の方が優れていることがわかった。

第3章では、古典型IBDVと強毒型IBDVを比較することによってウイルスのアポトーシス関連タンパク質の機能を解明した。OKYM株(強毒型)およびGBF1(古典型)のタンパク質を組み換えGFP発現ベクターを用いて発現させた。その結果VP4およびVP2がアポトーシスの誘導に関わり、vvOKYM株およびcvGBF1株の病原性に関与していることが示された。しかし、このアポトーシス誘導に関してvvOKYM株およびcvGBF1株の間にはVP2、VP4共に違いは認められなかった。ウイルスの致死性に関してはアポトーシス誘導タンパク質だけでなくいくつかの要因が関与していることが示唆された。

第4章では、VP4の核移行に関する分子生物学的基礎および核移行を決定するドメインの特定を行った。VP4のC末端の83—163番目のアミノ酸を欠損させた場合、針状構造物は消失したが、核移行は阻害されなかった。N末端の76アミノ酸を削ると針状構造物の集合は消え、核移行も大部分が阻害された。IBDV感染においてVP4は核または細胞質に局在し、N末端から76番目のアミノ酸がVP4の核移行を決めていることが示唆された。

本研究によってIBDVの疫学的、診断、およびウイルスタンパク質の機能解析について新たな知見が得られた。

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： A practical tissue sampling method using ordinary paper for molecular detection of infectious bursal disease virus RNA by RT-PCR  
著 者 名： Maw, M.T., Yamaguchi, T. Kasanga, C.J, Terasaki, K. and Fukushi, H.  
学術雑誌名： Avian Diseases  
巻・号・頁・発行年： 50(4):556-560, 2006
- 2) 題 目： Detection of vaccine-like infectious bursal disease (IBD) virus in IBD vaccine-free chickens in Japan  
著 者 名： Maw, M.T., Yamaguchi, T. Ohya, K. and Fukushi, H.  
学術雑誌名： The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年： 70(8):833-835, 2008

既発表学術論文

- 1) 題 目： Nucleotide sequence analysis of VP2 hypervariable domain of infectious bursal disease virus detected in Japan from 1993 to 2004  
著 者 名： Yamaguchi, T., Kasanga, C.J, Terasaki, K. Maw, M.T, Ohya, K. and Fukushi, H.  
学術雑誌名： The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年： 69(7):733-738, 2007
- 2) 題 目： Chicken B lymphoma DT40 cells as a useful tool for in vitro analysis of pathogenic infectious bursal disease virus  
著 者 名： Terasaki. K., Hirayama. H, Kasanga. C.J, Maw M.T, Ohya. K, Yamaguchi T. and Fukushi, H.  
学術雑誌名： The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年： 70(4):407-410, 2008