

数株の鶏伝染性気管支炎ウイルス(IBV)抗原を用いた酵素抗体法によるIBV株間の抗原性の比較

誌名	鶏病研究会報
ISSN	0285709X
著者	野牛, 一弘 太田, 修一
巻/号	24巻2号
掲載ページ	p. 43-48
発行年月	1988年6月

数株の鶏伝染性気管支炎ウイルス (IBV) 抗原を用いた 酵素抗体法による IBV 株間の抗原性の比較

Comparison of Antigenicity among Several Infectious Bronchitis Virus (IBV)
Strains by Enzyme-linked Immunosorbent Assay
with Several IBV Strain Coating Plates

野 牛 一 弘 ・ 太 田 修 一

農林水産省動物医薬品検査所, 東京都国分寺市戸倉 1-15-1

Kazuhiro YAGYU and Shuichi ONTA

National Veterinary Assay Laboratory, 1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185

要 約

ウイルス中和法で株特異性が認められる3株の鶏伝染性気管支炎ウイルス (IBV) (M41株, C-78株およびA-5968株)を蔗糖密度勾配遠心法を用いて精製し, この精製ウイルス (未処理) と精製ウイルスをNonidet P-40で可溶化した (処理) 抗原を, それぞれELISAプレートに吸着させた。これらのプレートを用いて, 酵素抗体法 (ELISA) で, 数種の抗IBV抗体の抗体価を, ある一定の抗体希釈倍数での吸光度で表す方法 (吸光度法) および測定曲線が吸光度0.2を示す抗体希釈倍数で表す方法 (抗体希釈法) で算出し, 各株間の関係率を調べた。

まず抗体価算出法として吸光度法を用いた場合, 未処理抗原吸着プレートでの各株間の関係率は, C-78株と他の2株の間では54%以下であり, C-78株の抗原特異性が認められた。また, M41株とA-5968株の間では91%であり, この2株は非常に抗原性が類似していた。一方, 処理抗原吸着プレートを用いると, C-78株と他の2株との間の関係率は90%以上であり, 前述の株特異性は認められなくなった。次に, 抗体価算出法として抗体希釈法を用いた場合は, いずれのプレートを用いても各株間の関係率は80%以上であり, 株特異性は全く認められなかった。

この未処理抗原吸着プレートと抗体価算出に吸光度法を用いたELISAの成績から, 日本分離株のC-78株はマサチューセッツ型のM41株やコネチカット型のA-5968株とは抗原性が異なっていることおよびM41株とA-5968株は抗原性が非常に類似していることが類推された。

緒 言

酵素抗体法 (ELISA) は, 鶏伝染性気管支炎ウイルス (IBV) に対する抗体検出に応用されている⁹⁾。特定のIBV抗原を吸着させたプレートを用いて, 中和反応で株特異性の認められる数株のIBVに対する免疫血清の交差反応試験をELISAで行った場合, 高い交差反応が認められたことが既に報告されている⁵⁾。しかし,

ウイルス中和法で血清型の異なるIBV抗原をそれぞれ吸着させた数種類のIBV抗原吸着プレートを用いてIBV株間の抗原性を比較した報告はまだない。そこで, ウイルス中和法での株特異性の認められた数株のIBVをそれぞれ吸着させた数枚のプレートを用いて, IBV株間の抗原性の比較を行ったので報告する。

材料と方法

ウイルス: M41株 (マサチューセッツ型), A-5968株 (コネチカット型)^{3,8)} および C-78株 (日本分離株)

1987年11月13日受付

鶏病研報, 24巻2号, 43-48 (1988)

を用いた。これらのウイルスを、11日齢のSPF発育鶏卵（日生研，Line-M）の尿膜腔内にそれぞれ 10^2 EID₅₀ ずつ接種した。ウイルス接種卵を37°Cで48時間培養後、尿膜腔液を採取し、4°Cで5,000 rpm 30分間遠心し、ウイルス液とした。

ウイルスの精製法：ウイルス液を19,000 rpm（日立，RP19ローター）で1時間遠心し、ウイルス濃縮液とした。ウイルス濃縮液を、不連続な蔗糖密度勾配（50%，45%，40%，30%，20%，および10%）を用い、27,000 rpm（日立，RPS27-3ローター）で4時間遠心し、形成されたウイルスバンドを採材し、PBS⁻を加え、さらに20,000 rpm（日立，RPS27-3ローター）で1時間遠心し精製ウイルスとした¹²⁾。

鶏抗-IBV IgGの調製：IBVに対する抗体は、20日齢のSPF鶏（日生研，Line-M）を免疫して作製した。鶏の免疫は、 $10^{4.5}$ - $10^{6.0}$ EID₅₀ のIBVを経鼻接種し、接種2週後に精製不活化ウイルス（蛋白量100-200 μg）を2週間隔で2~3回筋肉内接種した。さらに、接種2週後に精製不活化ウイルスを静脈内接種し、接種10日後に採血し血清を分離した。これ等の血清をDEAE-セルロース（生化学工業）およびセファデックス G-200（ファルマシア）を用いてIgGを分離した^{1,2)}。

ELISA法：SNYDERらの方法に準じた¹⁰⁾。抗体希釈にはPBS⁻（pH 7.2）、プレート洗浄溶液には0.05% Tween 20加PBS⁻（pH 7.2）を用いた。固相抗原には精製IBV（未処理抗原）および可溶性精製IBV（処理抗原）を用いた（固相用蛋白量は5-10 μgとした）。

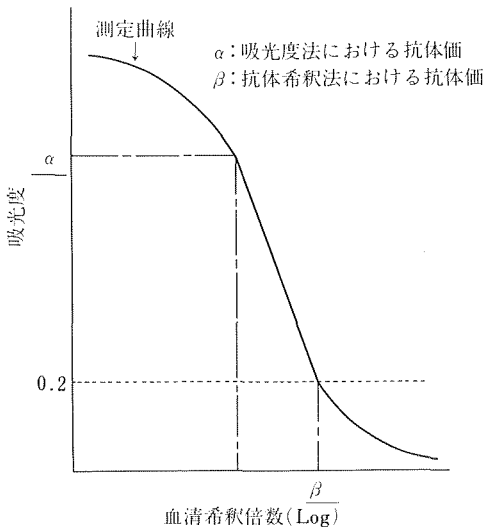


図1. ELISAにおける抗体価算出法

処理抗原は、精製IBV（蛋白量5 mg/0.2 ml以上）に最終濃度1%になるようにNonidet P-40（シグマ社）を加え、室温で2時間処理して作製した。吸光度は同一血清につき3回試験し、その平均値を測定値とした。精製IBVはネガティブ染色を行い¹²⁾、電子顕微鏡を用いて観察し、こわれている粒子が1%以下であることを確認した。

ELISA 価の算出：ELISA 価の算出法を図1に示す。ひとつは、抗体溶液のある一定希釈点における吸光度をELISA抗体価として用いた（吸光度法）。すなわち、抗体希釈により得られる逆S字型のELISA吸光度測定曲線の直線減少部分のうち、最大吸光度を認める抗体希釈倍数（抗M41，抗A-5968および抗C-78株のそれぞれ400倍，20倍および200倍）での吸光度をELISA抗体価とした（ここで用いた吸光度は、IBVを吸着させたプレートで測定された吸光度から正常尿膜腔液を吸着させたプレートで測定された吸光度を減じて求めた）。もう一つの抗体算出法は、吸光度測定曲線が吸光度0.2を示す抗体希釈倍数をELISA抗体価とした（抗体希釈法）。（吸光度0.2は、96羽の10倍希釈SPF鶏血清について測定した吸光度から算出した95%上側信頼限界値である。）

ウイルス中和法：太田らの方法に準じた⁷⁾。すなわちSPF発育鶏卵を用いたウイルス希釈法で行った。

ウイルス中和法およびELISAにおけるIBV株間の抗原性の比較：IBV株間の抗原性の比較は、近縁率（近縁率（R%）= $\sqrt{\text{抗原間相関係数} \times \text{抗体間相関係数}} \times 100$ ）⁹⁾を用いて行った。相関係数はウイルス中和法およびELISAで求められる抗体価から算出した。また、未処理抗原または処理抗原を用いた場合および異なった抗体価算出法を用いた場合のELISA反応と中和反応との相関を、多次元尺度構成法（MDSCAL）^{11,13)}により検討した。MDSCALの計算に用いた各反応間の類似性を表すデータとして、各反応間の相関係数を用いた。また、コンピューターでの計算に用いたパラメータは、P-METRIC, MAX DIM および MIN DIM には2, MAX ITERATION は50である。

成 績

ウイルス中和試験：供試3株（M41，C-78株およびA-5968株）の交差免疫原性をウイルス中和法で比較した（表1）。用いたどの抗IBV抗体もホモの株に対して高い中和活性（6.2，3.1および2.6）を示した。また、鶏抗M41抗体はC-78株に対して極めて低い中和価（0.1）しか認められなかったが、A-5986株に対しては

弱い交差 (2.1) が認められた。また、鶏抗 C-78 抗体は A-5968 株に対して極めて低い中和価 (0.3) しか認められなかったが、M41 株に対しては弱い交差 (2.5) が認められた。また、鶏抗 A-5968 抗体は M41 株および A-5968 株のいずれに対しても弱い交差 (1.4 および 1.0) が認められた。これらの成績から、供試株間ではウイルス中和法で株特異性のあることが確認された。

未処理抗原吸着プレートおよび処理抗原吸着プレートを用いた ELISA 反応の比較：3 種類のいずれの抗体を用いて ELISA 反応を行っても、処理抗原吸着プレートを用いた場合のほうが、未処理抗原吸着プレートを用いた場合より高い吸光度が認められた (図 2)。この未処理抗原吸着プレートを用いた場合と処理抗原吸着プレートを用いた場合の吸光度の差は、C-78 株を用いたときに特に顕著であった。

各プレートを用いた試験において、抗体希釈にともない逆 S 字型に近い吸光度測定曲線が認められた。また、どのプレートを用いても抗 M41、抗 C-78、抗 A-5968 の順に高い吸光度が認められた。

ELISA 抗体価の比較：未処理抗原または処理抗原吸着プレートを用いて ELISA を行い、吸光度法または抗体希釈法で各抗 IBV 抗体の ELISA 抗体価を求め比較した (表 2)。吸光度法および抗体希釈法のいずれの抗体価算出法を用いても、抗体価は必ずしもホモの株に対して高くなるとは限らなかった。抗体価は、いずれのプレートおよびいずれの抗体算出法を用いても、抗 M41、抗 C-78 および抗 A-5968 の順に高かった。

次に、同一株内で、未処理抗原吸着プレートと処理抗原吸着プレートでの ELISA 抗体価の比較を行った。まず、抗体希釈法では処理抗原吸着プレートを用いた場合は未処理抗原吸着プレートを用いた場合より抗体価が 1.02-1.32 高かった。吸光度法においては、後者のプレートを用いた場合と前者のプレートを用いた場合の抗体価の差はさらに大きかった。すなわち、処理抗原吸着プレートを用いた場合の ELISA 価は未処理抗原吸着プレートを用いた場合の 1.67-3.88 倍であった。

近縁率 (R%) を用いての IBV 抗原間の比較：未処理抗原吸着プレートおよび処理抗原吸着プレートを用いて ELISA を行った場合の IBV 抗原間の近縁性を、近縁率を用いて調べた (表 3)。まず、吸光度法において未処理抗原吸着プレートを用いた場合、C-78 株は M41 株および A-5968 株に対して低い R (54% および 36%) を示した。しかし、処理抗原吸着プレートを用いた場合、C-78 株は M41 株および A-5968 株に対して高い R (94% および 99%) を示した。M41 株と A-5968 株は、

表 1. 供試ウイルスの交差中和試験

抗体 \ 抗原	M 41	C 78	A-5968
抗-M 41	6.2 ¹⁾	0.1	2.1
抗-C 78	2.5	3.1	0.3
抗-A-5968	1.4	1.0	2.6

¹⁾：発育鶏卵を用いたウイルス希釈法による抗体価

処理抗原吸着プレートおよび未処理抗原吸着プレートのいずれを用いても、お互いに高い R (91% および 92%) を示した。

抗体希釈法においてこれらの株は、処理抗原吸着プレートおよび未処理抗原吸着プレートのいずれを用いても、お互いに高い R (83% 以上) を示した。

各株における ELISA 反応と中和反応との類似性の検討：ELISA を行うと、プレート固相用抗原の処理の有無および抗体価算出法の相違により、同一の抗 IBV 抗体に対して異なった抗体価が得られた。そこで、同一株内での ELISA 反応と中和反応との類似性を調べるため、まず、各反応間の相関係数をもとめ、さらに、各反応の相対的な位置関係を MDSCAL を用いて 2 次元平面に表し検討した (図 3)。

この MDSCAL により表された 2 次元平面における各反応の位置関係をみると、どの株を用いても、ELISA においてウイルス中和法の成績に近い成績をもたらす抗原吸着プレートと抗体価算出法は、未処理抗原吸着プレートを用い吸光度法で抗体価を算出する組合わせであった。

考 察

今回の試験において、精製ウイルス粒子を吸着させたプレートを用いて抗体価を吸光度法を用いて算出すると、C-78 株と M41 株および A-5968 株との間で近縁率の値が 54% 以下という低い値をとったことより、日本分離株の C-78 株には、マサチューセッツ型の M41 株およびコネチカット型の A-5968 株とは異なった抗原領域があることが類推された。一方、M41 株と A-5968 株の間の近縁率の値は 91% と高いことより、M41 株と A-5968 株は、ELISA では、抗原性が非常に類似していると思われた。またこの成績は、ウイルスをこわさないで吸着させたプレートを用いて行った試験より得られていることより、この C-78 株特異性を決定する抗原部位と M41 株および A-5968 株の共通抗原部位はウイルス粒子の表面にあるものと考えられた。

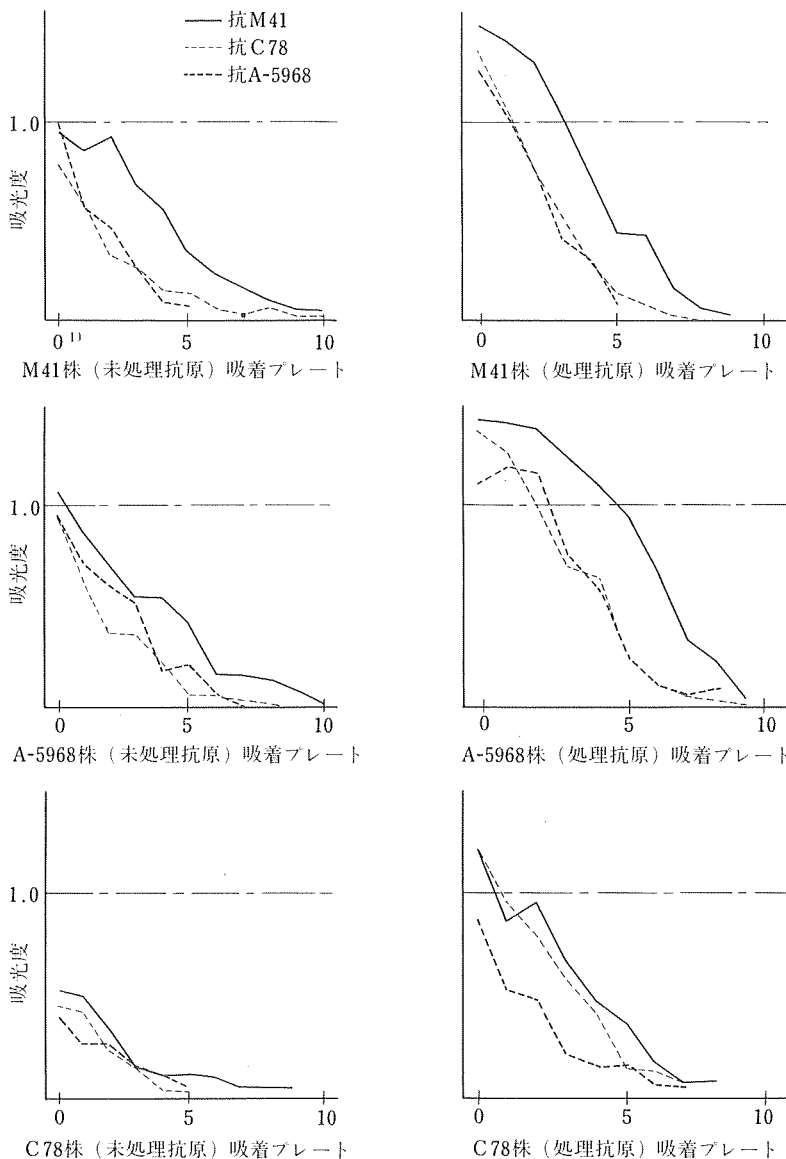


図 2. 未処理抗原および処理抗原吸着プレートにおける抗 IBV 抗体希釈に伴う吸光度の変化

¹⁾: 抗 IBV 抗体希釈倍数 (抗 M41 および抗 C78 は $2^n \times 100$ 倍, 抗 A-5968 は $2^n \times 10$ 倍)

さらに、どの株もこのプレートとこの抗体価算出法の組み合わせを用いた場合が一番中和法に近いという成績を MDSCAL を用いた解析より得た。このことより、表在部の蛋白抗原の一部が中和に関与していると考えられ、MOKETT らの IBV の表在蛋白である S1 蛋白に対するモノクローナル抗体を用いての研究報告⁴⁾と同様に、ウイルス粒子の表面に中和領域があることを示唆しているものと思われる。

一方、IBV を Nonidet P-40 で処理しウイルス粒子本体をこわしてから吸着させたプレートを用いて ELISA を行うと、吸光度が精製ウイルスを吸着させたプレートを用いたときより高くなった。この現象は、ウイルス粒子をこわすことによりウイルス内部の抗原が放出されることが考えられることから、それらのウイルス粒子内部の抗原に対する反応がウイルス粒子表面の抗原に対する反応に加算されるためではないかと類推された。また、

表 2. 未処理抗原および処理抗原吸着プレートにおける各抗 IBV 抗体の ELISA 抗体価
抗体希釈法

抗 体	抗 原	未処理抗原吸着プレート			処理抗原吸着プレート ¹⁾		
		M 41	C 78	A-5968	M 41	C 78	A-5968
抗-M 41		3.91	2.86	3.87	4.01	3.78	4.46
抗-C 78		2.91	2.74	3.12	3.35	3.46	3.70
抗-A-5968		1.92	1.78	2.26	2.32	1.93	2.81

吸光度法

抗 体	抗 原	未処理抗原吸着プレート			処理抗原吸着プレート		
		M 41	C 78	A-5968	M 41	C 78	A-5968
抗-M 41		0.76	0.33	0.71	1.27	1.28	1.37
抗-C 78		0.56	0.41	0.62	1.07	0.96	1.25
抗-A-5968		0.46	0.26	0.60	0.76	0.48	1.15

¹⁾ : 精製 IBV を最終濃度 1% の Nonidet P-40 で可溶化した抗原を吸着させたプレート。

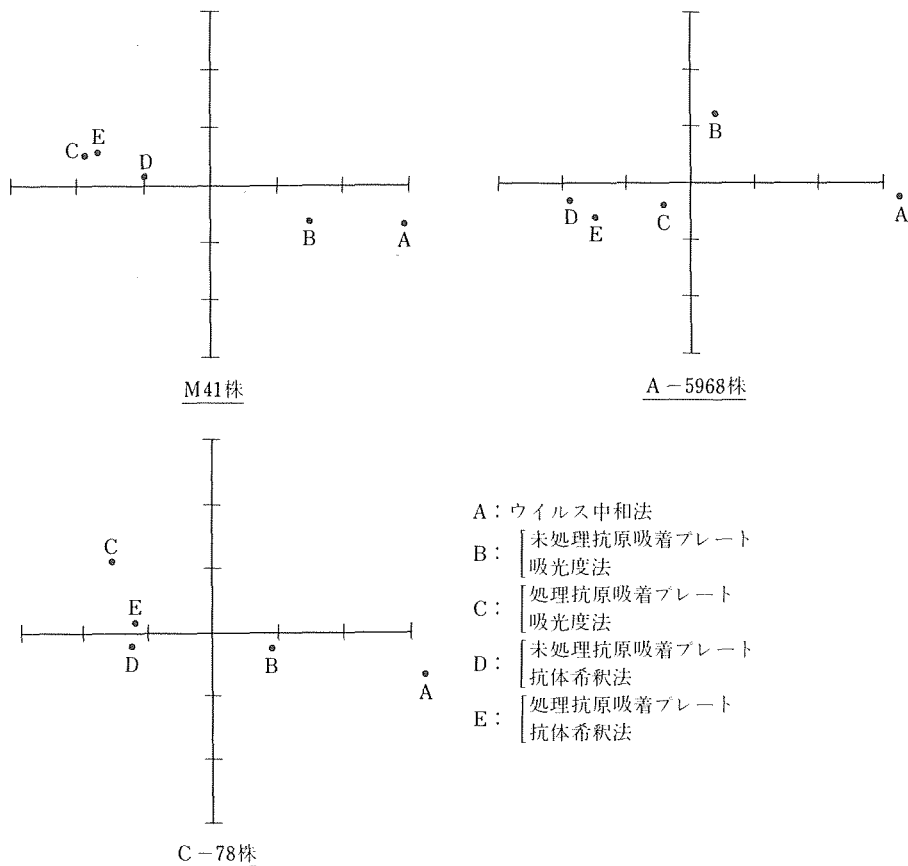


図 3. MDSCAL による ELISA 反応と中和反応の類似性の比較

表 3. IBV 抗原吸着プレートの間の関係率
吸光度法

株 名	未処理抗原			処理抗原		
	M 41	C 78	A-5968	M 41	C 78	A-5968
M 41	100 ¹⁾			100		
C 78	54	100		94	100	
A-5968	91	36	100	92	99	100

抗体希釈法

株 名	未処理抗原			処理抗原		
	M 41	C 78	A-5968	M 41	C 78	A-5968
M 41	100 ¹⁾			100		
C 78	86	100		88	100	
A-5968	87	96	100	99	83	100

1) : 関係率 (%) = $\sqrt{(\text{抗原間相関係数}) \times (\text{抗体間相関係数})} \times 100$

このウイルス処理により、C-78 株と他の 2 株との近縁率は高くなり、C-78 株の特異性は失われた。このことより、処理により放出されるウイルスの内部抗原は、共通抗原性を持つのではないかと類推された。

今回の試験法において抗体希釈法を用いると、未処理抗原吸着プレートを用いていずれの株も近縁率は高く株特異性が認められなかった。なぜこのような現象が認められるのかはまだ不明である。このことについては更に検討する必要があると思われる。今後は IBV に対するモノクローナル抗体を作出し、IBV の抗原性について検討を重ねてゆきたいと思っている。

文 献

- 1) FORSGREN, A. & SJOQUIST, J.: "PROTEIN A" from *S. aureus*. III Reaction with rabbit γ -globulin. *J. Immunol.*, **99**, 19-24 (1967)
- 2) GOLD, E.F. & BENEDICT, A.A.: Comparison of polypeptide chains of gamma-G-globulin from bursectomized and normal chickens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **125**, 535-538 (1967)
- 3) HOPKINS, S.R.: Serological comparisons of strain of infectious bronchitis virus using plaque purified isolants. *Avian Dis.*, **18**, 231-239 (1974)

- 4) MOKETT A.P.A. *et al.*: Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. *J. Gen. Virol.*, **65**, 2281-2286 (1984)
- 5) 長野秀樹ら: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による鶏伝染性気管支炎ウイルス各株間の交差反応性. *日獣誌*, **49**, 491-497 (1987)
- 6) 越智勇一監修: 最新家畜伝染病, 南江堂
- 7) 太田修一ら: 発育鶏卵を用いた中和試験による鶏伝染性気管支炎ウイルスの株間の相関. *動薬検年報*, **19**, 19-25 (1982)
- 8) PURCHASE, H.G. *et al.*: Identification and epizootiology of infectious bronchitis in a closed flock. *Avian Dis.*, **10**, 111-121 (1966)
- 9) SNYDER, D.B.: Latest development in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Avian Dis.*, **30**, 19-23 (1986)
- 10) SNYDER, D.B. *et al.*: Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. II. Comparison of computational methods for measuring antibody titer in a single serum dilution. *Avian Dis.*, **27**, 474-484 (1983)
- 11) 渡 正堯・岸 学: 多変量解析プログラム集 (増補改訂版). 工学図書 (1981)
- 12) 野牛一弘・太田修一: 鶏伝染性気管支炎ウイルスワクチン株の形態的比較. *動薬検年報*, **22**, 3-8 (1985)
- 13) 野牛一弘ら: 多次元尺度構成法による鶏伝染性気管支炎の流行株の検討. *動薬検年報*, **22**, 9-14 (1985)