

シブチ病に於けるトリ白血病毒種ウイルスの

免疫学的研究

柴田 忠司

①
主論文

S P F 鶏におけるトリ白血病肉腫ウイルスの
遺伝免疫学的研究

ワクチンの安全性の観点から

安藤 忠司

(1996)

目 次

第1章 序論	1
序節 鶏の高度SPF化とワクチンの安全性	1
第1節 本研究の背景1 - ALSVと内在性ウイルス -	3
第1項 トリ肉腫・白血病の概要	3
第2項 ALSV感染の確認方法	3
第3項 ALSV粒子の構造	4
第4項 ALSVの宿主域とpseudotype 形成	6
第5項 ニワトリの内在性ウイルスとワクチンの安全性	7
第2節 本研究の背景2 - SPF鶏について -	11
第1項 SPF鶏の歴史	11
第2項 SPF閉鎖鶏群の作出と維持	12
第3節 本研究の目的	14
第2章： SPF鶏のトリ白血病ウイルス抗体監視システムへの酵素 抗体法の応用	15
第1節 要旨	15
第2節 序論	16

第3節 材料と方法	16
第1項 SPF鶏及びSPF種卵	16
第2項 ウイルス株	16
第3項 固相化抗原	18
第4項 標準血清	19
第5項 被検血清	19
第6項 ELISA抗体価測定法	19
第4節 実験結果	21
第1項 SPF鶏血清の吸光度分布と相関	21
第2項 感染血清の吸光度差の相関	24
第3項 標準陽性血清の抗体価の決定	27
第4項 OD値の読み込みと抗体価の計算用ソフトの作成	29
第5節 考察	29
第3章： トリ白血病肉腫ウイルス抗体測定法としての酵素抗体法、 血清中和法、蛍光抗体法の比較	31
第1節 要旨	31
第2節 序論	32
第3節 材料と方法	32
第1項 被検血清	32

第2項	ELISA、SN及びFA抗体測定法	32
第3項	ELISA反応系の解析	33
第4節	実験結果	33
第1項	感染鶏血清抗体の解析	33
1)	ELISA, FA, SN抗体価の推移例	33
2)	ウエスタン・ブロッティングによる解析	36
第2項	ELISAとFA、SNの抗体価の相関	38
第3項	ELISAとFA、SNの抗体検出感度の比較	40
第5節	考察	41
第4章	トリ白血病肉腫ウイルスの群特異抗原を持たない細胞での ニワトリ介助因子の遺伝的制御	43
第1節	要旨	43
第2節	序論	44
第3節	材料と方法	44
第1項	ニワトリ及びウズラ	44
第2項	培養方法とウイルス	45
第3項	ニワトリの交配	45
第4項	群特異抗原の測定方法	46
第5項	chf 試験法	46

第6項	遺伝形質の異なる CEF でのウイルス増殖試験	47
第4節	実験結果	47
第1項	gs ⁻ ニワトリ系統の育成と gs 抗原の遺伝的制御の確認	47
第2項	gs ⁻ ニワトリ系統における chf 活性の遺伝的伝達	50
第3項	chf 遺伝子の発現による ALSV の E 亜群ウイルスに対する感受性の抑制	55
第4項	遺伝的に抑制された細胞での chf の誘発	58
第5節	考察	61
第5章	鶏白血病内在性ウイルス及びそれに対する細胞表面レセプターの鶏染色体上における遺伝子座連鎖について後代検定による解析	63
第1節	要旨	63
第2節	序論	64
第3節	材料と方法	64
第1項	試験鶏群	64
第2項	ウイルス及び感受性試験	66
第3項	gs 抗原試験法	67
第4項	chf 試験法	67

第4節 実験結果	67
第1項 遺伝子保存群の遺伝子型の推定	67
第2項 後代検定による遺伝子連鎖の推定	68
第5節 考察	70
第6章 総括	72
謝辞	74
参考文献	75

第1章 序論

序節 鶏の高度SPF化とワクチンの安全性

一般に医薬品の完成度は、その有効性と安全性の両側面に経済性を加えて評価される (93)が、特にワクチンについては、他の医薬品と異なり、感染症予防の目的で健康なヒトが接種の対象となる (139)。その中でも生ウイルスワクチンたとえば麻疹ワクチンについては、接種対象者が野外ウイルスに感染する以前に投与されなければならない、生後12~72月の乳幼児及び小児に接種するよう規定されている (94)。この時期は人の生涯の中でも比較的抵抗力が少ない期間であるため、その成分が生きたウイルスであるという特徴を持つこれらのワクチンについては、ウイルス不活化工程の設定ができない生物学的製剤である (113, 139) ため、HIV薬害問題に対処したような最終製品の加熱等の対策をとることはできない。

また、最近多発している医薬品に対するクレームは、製品中への異物混入という事故(92) についてであるが、これはヒトへの投与直前まで医療従事者によるチェックが可能であるが、ワクチンウイルス以外のウイルスの混入については目視でチェックすることは不可能である。これらワクチンによる事故や副作用を起こさないためには、特に製品の安全性保証のための細心の心配りが必要とされる (154)。ここではワクチン原液製造用の原料の段階からチェックが必要であるということについて述べる。つまり、ワクチン接種による事故を防ぐためには、原液製造工程における各工程検体の品質管理試験 (113) が必要なのはいうまでもなく、製造原料についての試験たとえば組織培養に使用する牛(胎児)血清中の牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス (153) や百日咳ワクチン製造に使用するカザミノ酸中の牛海綿状脳症のプリオン (91) も重要であるが、特にワクチンウイ

ルスを増殖させるニワトリ胎児細胞 (chick embryo fibroblast, C E F) 初代培養 (139) や、さらにその前段階として、受精卵を生産する specific pathogen free (S P F) 鶏の確立とその維持管理までさかのぼった検討もまた必要であるということである (152)。 製造工程で調製した C E F 初代培養について、ワクチンウイルス以外のウイルスの混入を否定する試験 (113) だけでは、未知のウイルス混入に対して対処することに限界があることは明らかであるので、鶏を外来性の病原微生物から隔離する飼育方法を確立した後、その清浄性が維持されていることをかなり多種類の病原微生物をマーカーとして定期的に確認するという方法が現在おこなわれている。 しかし、日本の生物学的製剤基準には具体的な病原微生物名が記載されていないので、マーカーとして世界保健機関 (world health organization, WHO) の基準 (152) 及び動物用医薬品の基準の中に列記されている病原微生物 (36) を対象とした試験が実施されている。

製品が国内にとどまらず、世界各国の人々に使われるようになると、その安全性保証の面からは、ワクチンウイルス以外のウイルスの検出方法について時代の進歩にあわせ精度・感度を向上させ試験の簡便さについても改良していく努力の必要性が望まれていた (139)。 そこで筆者はこれら病原微生物のうち、特に発癌遺伝子を持つといわれているトリ白血病肉腫ウイルス (avian leukosis sarcoma virus, ALSV) につき、その抗体検査法改良と内在性ウイルス検出法の開発・導入を試み、これらをもってさらに安全性の高いワクチン生産のための高品質 S P F 鶏群の確立・維持をめざした。

第1節 本研究の背景1—ALSVと内在性ウイルス—

第1項 トリ肉腫・白血病の概要

トリ肉腫・白血病は、レトロウイルス科、オンコウイルス亜科のC型オンコウイルス属、トリのC型オンコウイルス亜属、トリ白血病・肉腫ウイルス (ALSV) 群 (種) に属するラウス肉腫ウイルス (Rous sarcoma virus, RSV) あるいはラウス随伴ウイルス (Rous associated virus, RAV) (26) の感染によって引き起こされるトリの伝染病である。ALSVは、鳥類特にニワトリを中心とし、ウズラ、アヒル、七面鳥、キジ、ハト、ホロホロチョウ、インコ、さらに一部の顎歯類 (新生マウス、ラット、ハムスター) にも感染し、広い宿主域を保有している (17, 18, 57)。たとえばニワトリがALSVに接触すると、ニワトリにはその宿主感受性に基づき感染が成立し (28)、緑色下痢便、肝臓・ファブリキウス囊の腫大といった臨床像がみられ、剖検では肝臓の灰白色病巣、脾臓・腎臓・ファブリキウス囊の腫大及び白色結節形成、卵巣のカリフラワー状の腫大等が認められ、病理組織検査では腫瘍病巣と実質との境界が明瞭でリンパ小節状になっており、腫瘍細胞はほぼ均一な大型リンパ芽球様細胞である。しかし、心臓・肺・腺胃・筋胃等には腫瘍病変を観察する事はできない。また、他の動物についても感染成立と病変はほぼニワトリの場合と同様である (85)。野外の鶏群においては、A亜群及びB亜群のウイルスが広く伝播しており、感染鶏に種々の腫瘍を作る。ALSVによる腫瘍の中で最も多いのはリンパ性白血病 (lymphoid leukosis, LL) であり、そのほかの腫瘍の発生は比較的少ないが、いくつかの品種毎に特定系統の鶏に血管種やLLの高率な発生例が報告されている (56, 155)。

第2項 ALSV感染の確認方法

感染を確認する方法として以下の3通りの方法が一般的である。ま

ず、活性ALVの証明に干渉現象を利用した resistance inducing factor (RIF) テスト (111, 112, 145, 146)、non virus producing cell (NP細胞) を用いるNPテスト、ラウス肉腫ウイルスのブライアン高力価株 (Bryan high titer strain of Rous sarcoma virus, BH-RSV) とラウス随伴ウイルスO型 (Rous associated virus type 0, RAV-0) の偽型 (pseudotype) であるBH-RSV(RAV-0)を用いる phenotypic mixing (PM) テストがある (57)。活性ASVの証明については、感受性細胞でのフォーカス形成をみる focus assay がある (125, 141)。次に抗原の証明には、ALSVの群特異 (group specific, gs) 抗原の有無を補体結合反応を用いて調べる complement fixation of avian leukosis (COFAL) テストがある (115, 144)。そして3番目の方法として抗体の検出があり、これには血清中和試験 (serum neutralization, SN) が用いられている (60, 146)。しかし、これらの方法は検体を入手してから結果が出るまでに最短のもので1週間、長いものでは約3週間を必要とし (67)、これらウイルスに感受性のあるニワトリや抵抗性のあるニワトリを飼育し常に受精卵を準備しておくこと、さらに細胞培養の施設・設備が必要となる (57, 68, 124, 125)。

検査のためにこういった大がかりな施設や、多大な時間と労力を必要とせず、検体を受け取ったその日か翌日には結果の出せる方法として、抗体測定のための酵素抗体法 (enzyme linked immunosolvent assay, ELISA) が注目されていた (59)。そこで著者はALSVについてこの測定方法の開発を試み、その反応原理の解析や他の従来の測定方法と結果を比較するなかで、その実用における有用性を検討した。

第3項 ALSV粒子の構造

ALSVの粒子は、C型と呼ばれる形態をしており、細胞内においては完全な形では存在せず、電子顕微鏡観察によると、三日月型の電子密度の濃い部分が細胞表面に隆起し、次第に球形となり、細胞表面からちぎれる様に細胞膜からの出芽によって増殖する (57)。このような出芽時の

形態的な変化は、このウイルスがコードする *gag* 前駆蛋白質の分裂の結果であると言われている (26)。 図1-1の模式図に示すように、成熟したC型粒子は、中央にコアを持ち、その周りをエンベロープが取り囲んだ2重構造になっている。 エンベロープからは、レセプター結合糖蛋白 (SU, gp85) とトランスメンブラン糖蛋白 (TM, gp37) が突起し、コアはキャプシッドと呼ばれる内殻蛋白 (CA, p27) の中にRNA遺伝子、核蛋白 (NC, p12)、逆転写酵素 (RT, p68)、プロテアーゼ (PR, p15)、インテグラーゼ (IN, p32) を納めている。 そして、エンベロープと内殻の間にマトリックス蛋白 (MA, p19) が存在する (26)。

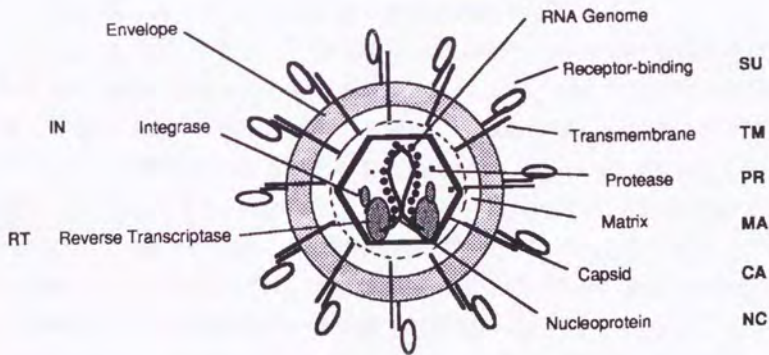


図1-1 ウイルス粒子構造の模式図
(Coffin, J.M. 1990 (26))

こういった蛋白、糖蛋白は、感染したニワトリの体内で抗原として働き、それぞれに対応する抗体を産生し、感染成立を確認することができる(5)。これらのウイルス蛋白、糖蛋白は、ウイルスの遺伝子によってコードされているが、ウイルスの遺伝子は2本鎖RNAであり、感染したウイルスのRNAが細胞内で開裂し、細胞のmRNA処理機構によってDNAが合成・加工されている(26)。こういった合成開始の機能を持ち、感染初期にmRNAが消滅するというプラス鎖RNAを持つウイルスというのは、レトロウイルス、パラレトロウイルス(複製中間体としてのRNA)の特徴である(76)。そして1本のRNAがウイルス構成遺伝子(*gag, pro, pol, env*)と、RSVの*src*のような発ガン遺伝子を持っている(13, 34, 80, 81, 82, 83)。

第4項 ALSVの宿主域とpseudotype形成

このウイルスはさらに、宿主域によってA~Iの9つの亜群に分けられており、そのうちA~E亜群ウイルスはニワトリ由来であるが、赤色野鶏、日本ウズラ、コリンウズラ、高麗キジ、顎輪キジ、七面鳥、アヒル、ガチョウにも感受性のあることが知られている(33, 43, 60, 80, 141, 144, 148)。これらのうち、E亜群ウイルスは内在性ウイルス(56)に起因するものであり(29, 51, 146)、その他のものは外来性のウイルスである。F、G亜群ウイルスについては、キジ由来の内在性ウイルスである(44)が、F亜群ウイルスは顎輪キジから分離されたものである。しかし、もう一方のG亜群ウイルスは黄金キジから分離されたものであるが、そのゲノムがALSVとは異なることから、後にALSVから除外された(55)。

ニワトリと特に近縁であるウズラ(98, 122)については、A、E亜群ウイルスに対する感受性を持つことが知られており(98)、I亜群ウイルスが分離されている。また、このウズラのウイルスに対する免疫反応については、特異反応として細胞性細胞傷害活性、抗体依存性細胞傷害作用、ウイルス中和抗体等があること、また非特異反応としてNK活性、インタ

一フェロンによる抗ウイルス活性、補体による細胞融解活性等が知られている (54, 112, 145, 156)。

これらごく近縁のウイルスのみならず、たとえば vesicular stomatitis virus (VSV) という分類上の科も異なるウイルスとは、一緒に培養するだけで、VSV (RAV-1) や VSV (RAV-49) などといった pseudotype を作ることが証明されており (90)、もしこういった pseudo-type を作るウイルスが生ウイルスワクチン製造工程において混入するようなことがあると、ワクチンウイルスとの pseudotype 形成の可能性についても懸念される。この考えは、発癌遺伝子を持つ生きたウイルスがワクチン中に混入する可能性を示唆するものであり、また外来性ウイルスの感染のないばあいでも、内在性ウイルスとの pseudotype である VSV (RAV-0) や、内在性ウイルスの部分発現であるニワトリ介助因子 (chick helper factor, chf) との pseudotype である VSV (chf) も作られている (71) ので、ワクチンウイルスと内在性ウイルス、あるいは内在性ウイルスの部分発現したものと pseudotype 形成についても同じく混入が懸念されることになる。

第5項 ニワトリの内在性ウイルスとワクチンの安全性

ところで、内在性ウイルス単独では腫瘍を引き起こさなくても外来性のウイルスとのリコンビナント (19) は腫瘍原性を持つ (30) ので、生ウイルスワクチンの製造に用いる受精卵を生産するニワトリ群の SPF 化にあたっては、外来性の病原体のみならず内在性のものを排除しておくこともワクチンの安全性確保のための品質管理上重要なことである。ワクチン製造に用いている鶏胚 (ニワトリ胎児線維芽細胞, CEF) で発現される内在性ウイルスの表現型及び略号とその遺伝子発現の関係について、日原の解説 (56) より次頁に引用した (表 1-1)。

そして、トリの内在性ウイルス遺伝子としては、その次の頁に示す表 1-2 のようなものがあるといわれているが、これらはニワトリの生殖細

胞中に組み込まれていて、ニワトリ体細胞染色体上のいろんな場所に位置しているとのことである (56)。しかし、現在までのところ、七面鳥やウズラなどでは見つかっていない (24, 83)。

表 1-1. 鶏胚で発現される内在性ALVの表現型

表現型	内在性ウイルス 遺伝子発現	略号
E亜群ウイルスのエンベロープ抗原の発現	<i>env</i>	$gs^- chf^+$
gs抗原とE亜群のエンベロープ抗原の両方の発現	<i>gag, env</i>	$gs^+ chf^+$
15 _B 系に特異的なウイルス粒子産生	<i>gag, pol</i>	V-15 _B ⁺
E亜群ウイルスの偶発的産生	完全な遺伝子	V-E ⁺ (V ⁺)

そのうちのいくつかは (ev-2, ev-10, ev-11, ev-12) 完全なウイルスRNAへと転写され、ALSVに似た機能的に完全なウイルス粒子を産生することが知られている。またニワトリの内在性ウイルス遺伝子が部分発現したものである gs 抗原及び chf 活性についても、ワクチン製造に用いるニワトリ群が生産する受精卵の胎児細胞についてこれを保持しているか否

表1-2. 白色レグホン種の内在性ウイルス遺伝子 (ev loci 1)

遺伝子名	別名	分子量 (kbp) ²⁾	表現型	遺伝子産物
ev-1	なし	10.7	gs ^L chf ^L	gag 蛋白質, gPr 92 ^{00v}
ev-2	V-E 7	6.5	V ⁺	感染性ウイルス (RAV-0)
ev-3	G s	6.9	gs ⁺ chf ⁺	P 120 ⁰⁰⁰⁻⁰⁰¹ , gp85, gp37
ev-4	なし	9.6	-	-
ev-5	なし	18.0	-	-
ev-6	H-E	18.0	gs ⁻ chf ⁺	gp85, gp37
ev-7	V-15B	14.0	V ⁺	非感染性ウイルス (15B-ILV)
ev-8	なし	16.5	-	-
ev-9	H-E	21.0	gs ⁻ chf ⁺	gp85, gp37
ev-10	V-E C	19.5	V ⁺	感染性ウイルス (C-ILV)
ev-11	V	12.0	V ⁺	感染性ウイルス
ev-12	V	7.5	V ⁺	感染性ウイルス
ev-15	なし	4.2	-	なし (LTRのみ?)
ev-16	なし	5.4	-	なし (LTRのみ?)
ev-21	なし	9.1	V ⁺ ?	感染性ウイルス?
ev-22	なし	?	?	?

1) WEISS et al., 1985; HUMPHRIES et al., 1984; SMITH & CRITTENDEN, 1986 を参照

2) Sst I (Sac I) で切断した時の主要なフラグメントの分子量

かを測定した。 *gag* 遺伝子にコードされた *gs* 抗原、*env* 遺伝子にコードされた *chf* 活性について、親の番号が明らかである受精卵 1 個 1 個についてまとめ、その成績を解析してそれらの内在性ウイルス遺伝子の存在様式について明らかにし、財団法人阪大微生物病研究会において維持されているこの鶏群から内在性ウイルス遺伝子発現を排除しようと試みた。

第2節 本研究の背景2—SPF鶏について—

第1項 SPF鶏の歴史

SPF鶏とは、特に指定された微生物・寄生虫のいない鶏のことで、指定以外の病原体については、かならずしも free とはいえない鶏のことであり、封鎖方式無菌の手技 (closed system sterile technique) を用いて得られた、検出するすべての微生物・寄生虫のいない無菌動物 (germ-free)、あるいは、もっている微生物叢 (植物ならびに動物) のすべてが明確に知られている、特別に飼育された生物 (ノトバイオート, gnotobiot) とは区別される (66, 73)。

しかし、研究初期においてはこれらの区別ははっきりせず、腸内細菌を指標とした無菌動物の研究として進められた (104)。ある環境から微生物を取り除くという無菌に関する研究は、19世紀の細菌学者や植物生理学者によって、強力に推進されてきた。病気の自然発生説と微生物説に関するパスツールらの研究は、閉鎖環境の完全な滅菌微生物の研究などについてのすぐれた方法を確立した。金内ら (61, 62) によると、ニワトリの無菌飼育の進歩について次のような記述がある。ニワトリの無菌飼育に関する研究は1895年から1897年にかけて、NUTTAL and THIERFELDER (87, 88, 89) によって、はじめて実験的に試みられた。1899年、SCHOTTELIUS (118) は雛の無菌的孵化に成功したが、飼料がまだ不十分であったため、その雛を飼育することはできなかった。1912年、COHENDY (27) は、いろいろな飼料を与えて無菌雛の飼育に成功し、腸内細菌を欠いても高等動物の生存と発育は可能であると報告している。1937年、BALZAM (16) は、COHENDY の成績を追試し59日間にわたる無菌雛の飼育を行い、さらに、腸内細菌のビタミンB産生能についても研究を行った。我が国においては、1936年内藤と小林 (81)、ついで1942年赤沢 (1) によって、無菌雛の研究が始められ、いろいろな飼料を混合して与え40日間にわたる

飼育が行われた。REYNIERS (106) とその共同研究者は、数十年にわたって無菌ニワトリの研究を行ったが、1949年にいたり、LUCKEY (72) の考案による無菌飼育用の特殊な飼料を用いて、無菌ニワトリの産卵とその孵化に成功している。このころの飼育装置はガラス製の小型で、使用範囲も限られていたが、大型のものとして、GUSTAFSSON (47) は薄いステンレス鋼板からなりガラス窓のつけられるもの、REYNIERS (107)、MIYAKAWA (77)、および中原 (82) は飼育装置自体が高圧蒸気滅菌器として役立つ厚い鋼鉄製の装置を考案した。PHILLIPS et al. (105) および TREXLER & REYNOLDS (136) は、プラスチック製の装置を考案した。

その後、ビニールチャンパーやHEPAフィルターも考案され (123)、飼育環境についても、鶏舎あるいは飼育装置をおく部屋に送る空気を濾過する (3, 37, 40, 41) ことで、飼育者の出入りがあってもほぼ無塵に近い状態が保てるようになり、滅菌消毒方法の改良 (11) もあいまって飼育規模の大型化 (64, 65) や飼育作業の簡便化が図られてきた (8, 9, 10, 12, 14, 45, 46, 157)。また、細菌、真菌、ウイルス、寄生虫等の研究も進み、あらゆる微生物のチェックをする事は事実上不可能となり、厳密な意味での無菌の証明は不可能であるので、現時点では無菌ニワトリではなくSPFニワトリというのが、よりの確な表現であろうと思われる (78, 116)。

第2項 SPF閉鎖鶏群の作出と維持

著者が携わったSPF鶏群の起源は、1964年に香川県観音寺市においてビニールアイソレーターの試験飼育から始まった。閉鎖群として維持しながらALSVのRIF試験やSN試験の試験方法の検討を続け、1967年にはCOFAL試験についても検討を始め、米国の数社からSPF卵を輸入して自家卵と比較検討した。1969年にはALSVに対する感受性試験の方法についても検討が始まり、麻疹ワクチン製造用としてRIF free卵の生産が開始された。1971年には、米国H&N社よりSP

F卵を導入して近交化が開始された。1975年には農林水産省よりSPF鶏のモニタリング案が出され、これに対応すべく検査対象病原体の拡大をはかった。1982年には、1969年より続けていたALSVに対する感受性をマーカーとした近交系が確立された。また、閉鎖群の生産効率低下がみられるようになったので、市販鶏をSPF化しその雄をこれまでの閉鎖鶏群に導入して雑種強勢による生産性回復を実現した。その後、農林水産省よりSPF鶏の検査対象病原体の追加があり(36)これに対応して検査項目を増やし現在に至っている。

第3節 本研究の目的

本論文は次の6章から構成される。第1章は本研究の背景を概説したものである。第2章はALSVの抗体測定にELISA法を応用する目的で固相化抗原を作製し、種々の血清との反応性をみて、標準血清を設定した成績を記載した。第3章は、第2章で開発した方法が正当なものであることを証明する目的で従来の方法である血清中和法・蛍光抗体法の成績と比較して、成績の連続性を示し、あわせてその反応原理をウエスタン・ブロッティング法により明らかにした成績を記載した。第4章は、第2章のSPF規格にあるニワトリ白血病ウイルスの項目のうち、さらに進んで、内在性ウイルスの部分発現であるgs抗原とchf活性について調べ、それらの宿主細胞内での働きを明らかにした成績を記載した。第5章は、第4章で明らかにしたgs抗原とchf活性を除いたニワトリ群育成のために、gag、env遺伝子のニワトリ染色体上の位置関係を明らかにした成績について記載した。第6章は本研究を総括したものである。

第2章：SPF鶏のトリ白血病ウイルス抗体監視システムへの酵素抗体法の応用

第1節 要旨

SPF鶏のトリ白血病肉腫ウイルス (avian leukosis sarcoma virus, ALSV) 抗体監視システムへの、マイクロプレートを用いた酵素抗体法応用の可能性を検討するために、roux associated virus type 2 (RAV-2) 抗原を用いた測定系確立を試みた。

中和抗体価が5倍以下のSPF鶏血清に関しては、A亜群抗原・B亜群抗原・正常細胞抗原に対する吸光度 (optical density, OD値) を較べると0.30以下でほぼ同じであった。そして、A亜群抗原・B亜群抗原どちらで測定した場合でも、正常細胞抗原に対するOD値を差し引くと、ほぼ同じ値 (0.05以下) となった。

次に、A亜群抗原及びB亜群抗原で測定した感染ニワトリ血清のOD値に相関が認められたので、固相化抗原としては、作製の容易なB亜群抗原を用いることとした。抗体測定の基準となる標準陽性血清のELISA価を測定すると、128,000となり、これをもとに標準曲線を作成し、被検血清とOD値を比較して、抗体価を算出する方法を確立した。

この方法は、SPF鶏血清のトリ白血病ウイルス抗体測定に有効であると思われる。

第2節 序論

SPF鶏の規格としては、農林水産省の定める基準(36)と、WHOが提唱する規格(152)がある。そこで、この2つの規格を満足するSPF鶏群の規格を制定した。このSPF鶏群の規格では、トリ白血病ウイルスの抗体測定はA及びB亜群についての血清中和法であるが、血清中和法は細胞培養を必要とし、結果が出るまでに約10日間を要する。そこで、この不便を解消する方法を検討した。ALSVに関する免疫組織化学的な検出方法についてはすでに報告がある(39)が、マイクロプレートを用いた抗原及び抗体の検出に用いられる酵素抗体法(59, 84, 138)は、測定操作が簡便・容易で1日で結果の出る方法である。それゆえ、このような酵素抗体法がSPF鶏血清のモニタリングに応用できるかどうかを検討した結果、RAV-2抗原を用いた場合に、その応用の可能性が示唆された。

第3節 材料と方法

第1項 SPF鶏及びSPF種卵

SPF鶏は、高性能(high efficiency particulate air, HEPA)フィルターで濾過した空気を供給する密封された室内に設置された、ホルマリン滅菌され濾過空気を強制換気できるビニール・アイソレーター内で、蒸気滅菌した飼料と飲水を用いて飼育している。SPF種卵は、次頁のSPF鶏群の規格(表2-1)にしたがう定期的な検査に続けて合格している上記の鶏群から生産したものをを用いた。

第2項 ウイルス株

我々の用いたトリ白血病ウイルスは、RAV-1株とRAV-2株で

表 2-1 S P F 規格：対象病原体と検出方法

病 原 体	検 出 方 法
ニューカッスル病ウイルス EDS-76ウイルス トリインフルエンザウイルス トリパラインフルエンザウイルス ヘモフィルス・パラガリナルム	赤血球凝集抑制反応
鶏伝染性気管支炎ウイルス 鶏伝染性喉頭気管炎ウイルス 細網内皮症ウイルス 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス トリレオウイルス トリアデノウイルス	二元免疫拡散法
鶏白血病ウイルス(サブグループ A,B)	血清中和法
鶏脳脊髄炎ウイルス ニワトリ腎炎ウイルス マレック病ウイルス	蛍光抗体法
ひな白痢菌 マイコプラズマ・ガリセプチカム マイコプラズマ・シノピエ ミコバクテリウム・アビウム	凝集反応
鶏痘ウイルス サルモネラ (ひな白痢菌を除く)	臨床観察

あり、またニワトリ肉腫ウイルスは、BH-RSV (RAV-1) 株, BH-RSV (RAV-2) 株及びSR-B株である (132)。いずれも、大阪大学微生物病研究所腫瘍ウイルス部門から分与されたものを継代して

使用した。

第3項 固相化抗原

固相化抗原は、A亜群及びB亜群に感受性をもつよう選抜されたSPF鶏群（white leghon type O chicken line, WL-O ニワトリ系統）の受精卵を10日間孵卵し、その胚細胞を培養瓶で培養し、RAV-1及びRAV-2を増殖させて作製したウイルス浮遊液を図2-1に示すような

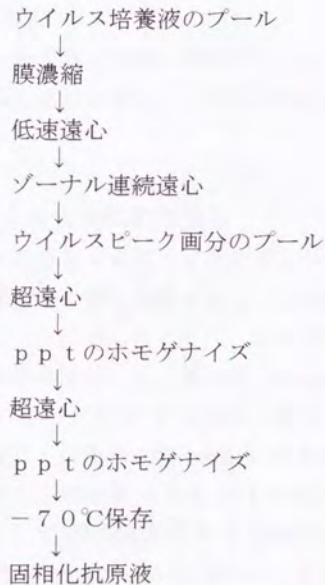


図2-1. 固相化抗原作製方法

方法で精製・調製した。また、対照固相化抗原については、ウイルス未感染細胞の培養液を膜濃縮と超遠心を用いて精製・調製した。

第4項 標準血清

標準陽性血清は、SPF初生雛に精製したRAV-1を接種し、これと同居させて感染の成立したSPF雛の血清より、抗体価が高く非特異反応の少ないものを選んだ。陰性血清は、通常の試験でSPF鶏群の規格に合格したアイソレーター飼育鶏の中から選んだ個体の血清を使用した。

第5項 被検血清

アイソレーター飼育鶏の血清、精製ウイルスを接種した鶏の血清及びそれと同居させた鶏の血清を用い、これを1,000倍に希釈して試料とした。

第6項 ELISA抗体価測定法

方法の概略は、抗原を96穴マイクロプレートに固相化する間接法で、被検血清と標準血清のOD値を比較することで抗体価を算出した。具体的には、次頁の図2-2に示したように、まずグライナー社製F型マイクロプレート(イムロン600)に、蛋白量 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のウイルス抗原及び正常細胞抗原を $100\mu\text{l}/1$ 穴ずつ入れ、 4°C 1夜静置して抗原の固相化をおこなう。翌日これを0.05% tween 20を添加したPBS(洗浄用PBS)で3回洗浄し、希釈液(10%仔牛血清, 0.2%ゼラチン, 0.05% tween 20加PBS)で標準陽性血清は1,000倍から2倍階段希釈を、検体は1,000倍希釈のみをおこない、 $100\mu\text{l}/1$ 穴ずつ添加して 37°C に1時間静置し、抗原抗体反応をさせる。その後、これを洗浄用PBSで3回洗浄して、希釈したhorse radish peroxidase(HRPO)標識抗鶏IgG(家兎IgG)を $100\mu\text{l}/1$ 穴ずつ添加して 37°C に1時間静置

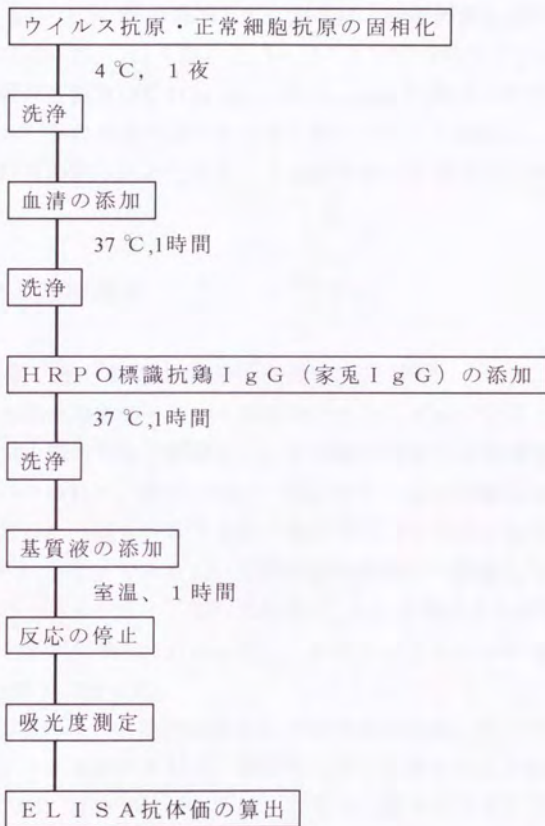


図 2 - 2 . 鶏血清中の ALV - ELISA 抗体価測定方法

し反応をさせる。再びこれを洗浄用PBSで3回洗浄した後、0.5 mg/ml の *o*-phenyldiamine と、2 μ l/ml の H₂O₂ solution を混合した基質液を 100 μ l/1穴 ずつ添加して、室温に1時間静置し反応させる。

この反応は4N-H₂SO₄ を 75 μ l/1穴ずつ添加することで停止させる。吸光度測定はOD_{492nm}-OD_{630nm} に設定したコロナ電機製マイクロプレートODリーダーをNEC製パソコンに接続し、自作のプログラムでOD値の読み込みとELISA抗体価の計算を行った。

第4節 実験結果

第1項 SPF鶏血清の吸光度分布と相関

SPF鶏の初生から1,016日齢までのランダムに採取した血清37検体を1,000倍希釈して試料とし、A亜群抗原及び正常細胞抗原と反応させた時のOD値は、次頁の図2-3に示すとおり精製RAV-1ウイルスを抗原とした(図2-3・上側)場合では0.2を少し越えるものが1検体認められただけであるが、正常細胞培養液から調製した抗原に対する反応を見た(図2-3・下側)場合では、0.2を越えるものが3検体ありそのうち1検体は0.3に近かった。しかし、どちらの抗原に対しても最高は0.3までであった。

同一の検体を、B亜群抗原そして正常細胞抗原と反応させた時のOD値も、図2-4に示すとおり、精製RAV-2ウイルスを抗原とした(図2-4・上側)場合では0.2を越えるものは見あらず、正常細胞培養液から調製した抗原に対する反応を見た(図2-4・下側)場合でも、図2-3と同じで全体的に精製ウイルス抗原との反応よりも高いように思われた。しかし、この場合も上下どちらの抗原に対しても最高は、0.3までであった。

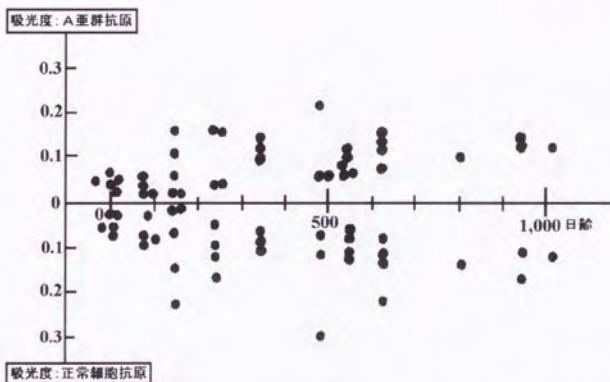


図 2-3. SPF 鶏血清のOD値の分布：A亜群抗原

縦軸上側：A亜群抗原に対するOD値
 縦軸下側：正常細胞抗原に対するOD値
 横軸：日齢

つまり、いずれの抗原に対してもSPF鶏血清の場合は、OD値は図2-3及び図2-4に示すとおり、0.3を越えることはなかった。しかし、SPF鶏血清が正常細胞抗原に対しても反応していることより、A亜群抗原及びB亜群抗原のOD値には非特異反応も含まれると思われるので、A亜群抗原及びB亜群抗原のOD値から正常細胞抗原のOD値を差し引いたOD値差について検討した。

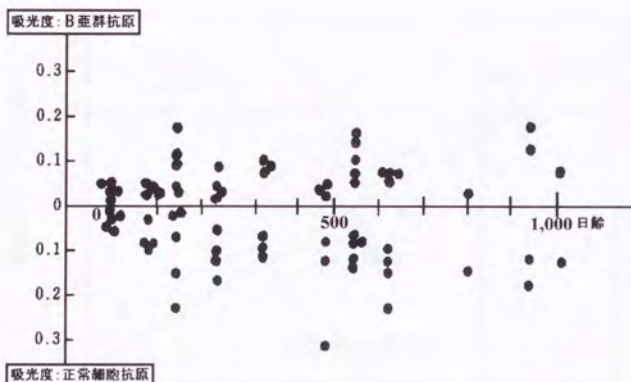


図2-4. SPF鶏血清のOD値の分布：B亜群抗原

縦軸上側：A亜群抗原に対するOD値
 縦軸下側：正常細胞抗原に対するOD値
 横軸：日齢

A亜群抗原と正常細胞抗原及びB亜群抗原と正常細胞抗原のOD値差について検体毎の分布を見たのが図2-5であるが、精製ウイルス抗原より正常細胞抗原の方がOD値の高い検体も多数見られたため、数値がマイナスになる例も見られたが、全例が0.05以下となった。これより、陽性と陰性の境界値を、たとえば0.05の2倍の0.1と定めておけば、正常細胞抗原との非特異反応による偽陽性を除去することができる。

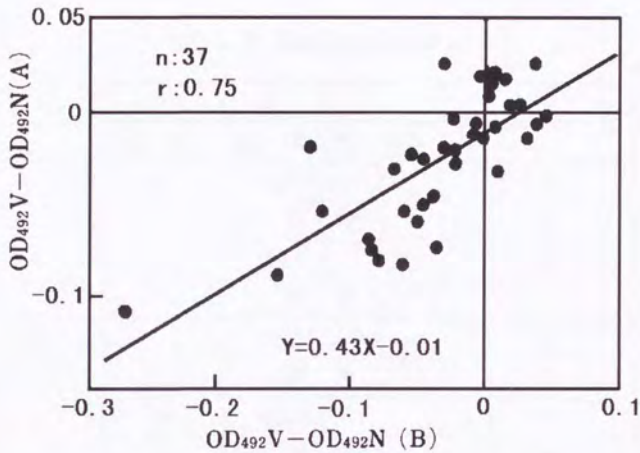


図2-5. SPF鶏血清のA亜群及びB亜群抗原に対する吸光度差の分布と相関

縦軸：A亜群抗原のOD値から正常細胞抗原のOD値を差し引いたOD値

横軸：B亜群抗原のOD値から正常細胞抗原のOD値を差し引いたOD値

また、A亜群抗原及びB亜群抗原のOD値差についての相関係数は、0.75でOD値差間に相関関係が認められた。

第2項 感染血清の吸光度差の相関

表2-2に示した構成での感染実験より得られたウイルス接種後3週目の全血清について、SPF血清の場合と同様にA亜群抗原、B亜群抗原

表2-2. 鶏感染実験の構成

ウ イ ル ス		試 験 羽 数
亜 群	接 種 株 名	
A	RSV(RAV-1)	10
	同居	5
	RAV-1	9
	同居	5
B	RSV(RAV-2)	8
	同居	4
	RAV-2	9
	同居	4
	SR-B	6
	同居	4

及び正常細胞抗原のOD値を測定し、それぞれのウイルス抗原のOD値差について図示して(図2-6)相関を調べたところ、相関係数は $r = 0.86$ ($n=64$)、回帰直線は縦軸を y 、横軸を x として、 $y = 0.31x - 0.01$ となり高い相関が認められた。なお、図2-6中の「○」はA亜群ウイルスを接種・感染させた血清、「●」はB亜群ウイルスを接種・感染させた血清を示すが、ばらつきはどちらも同じように見受けられた。

そこでSPF血清(図2-5)・感染血清(図2-6)の結果より、固相化抗原としてはA亜群抗原あるいはB亜群抗原のいずれでもよいが、

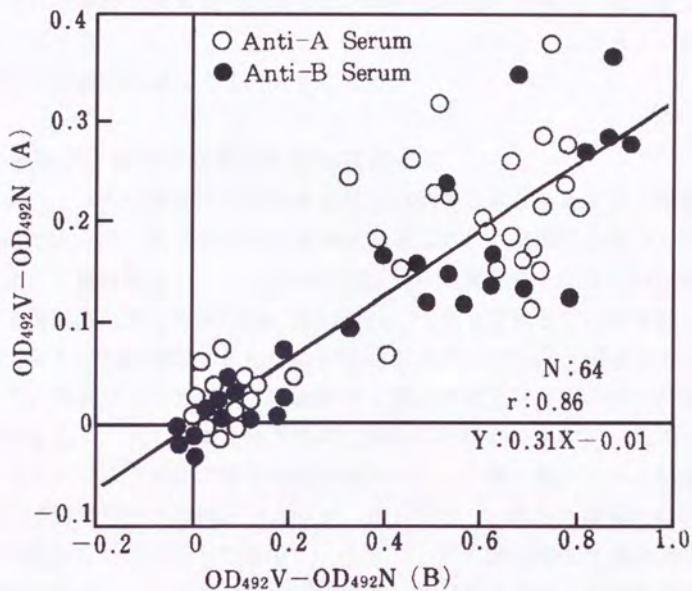


図2-6. ウイルス接種後3週のSPF鶏血清のA亜群及びB亜群抗原に対する吸光度差の分布と相関

縦軸：A亜群抗原のOD値から正常細胞抗原のOD値を差し引いたOD値

横軸：B亜群抗原のOD値から正常細胞抗原のOD値を差し引いたOD値

通常のSPF鶏モニタリングについては多量の抗原の得られたB亜群抗原を固相化抗原として用いることとした。このことは、1抗原での測定系で十分A亜群ウイルス及びB亜群ウイルスの感染の有無(抗体の有無)をチェックできるということなので、ALSVのSPFモニタリングにおける操作の簡素化も達成できたことになる。

第3項 標準陽性血清の抗体価の決定

ELISAの測定系で使用する抗原は前記の通りRAV-2精製抗原に決定したので、次に標準陽性血清を選定した。標準陽性血清としては、これまでの試験結果から、A亜群抗原及びB亜群抗原との反応性が特に高く、正常細胞抗原との反応性の低いもの、つまりできるだけ特異性の高いものであり、かつ亜群間の抗原の共通性もカバーするよう考慮するという事で、RAV-1接種鶏と同居させて感染の成立した鶏の血清を用いることにした。この血清を標準陽性血清とし標準曲線を作成したのが図2-9であるが、この図には2種類の横軸があり、●-●と△-△は血清を希釈して測定したOD値をプロットしたもので、これから換算したELISA単位を○-○で示してある。つまり、この標準陽性血清の抗体価は、標準陽性血清のOD値差(●)が、同じく2倍階段希釈した陰性血清のOD値差(△)の2倍以上になる最大希釈倍数が、128,000倍であるので、128,000とした。そこで、この標準陽性血清を128,000倍して測定したOD値差の値を1ELISA単位とし、64,000倍した時のOD値差の値を2ELISA単位、さらに32,000倍した時のOD値差の値を4ELISA単位というようにしていき、これから標準曲線(○-○)を決定した。

被検血清の抗体価は、抗原を固相化した1枚の96穴プレート毎に1ELISA単位から1,024ELISA単位まで希釈した標準陽性血清と検体を1,000倍希釈した試料を入れて反応させ、プレート毎の標準曲線と検体のOD値差の値を比較して、算出することとした。

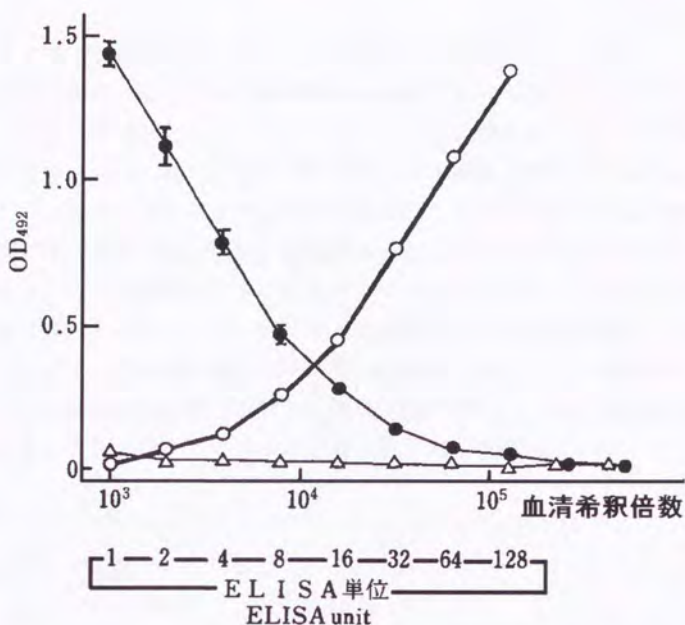


図 2-7. 標準陽性血清と標準陰性血清の吸光度と標準曲線の作成

縦軸：OD値、横軸：血清の希釈倍数

●：標準陽性血清を2倍階段希釈してB亜群抗原と正常細胞抗原でOD値を測定したときのOD値差

△：標準陰性血清を2倍階段希釈してB亜群抗原と正常細胞抗原でOD値を測定したときのOD値差

縦軸：OD値、横軸：ELISA単位

○—○：標準曲線 まず、2倍階段希釈した標準陽性血清のOD値が、おなじく2倍階段希釈した標準陰性血清のOD値の2倍以上となる最大希釈倍数の、標準陽性血清のOD値を1 ELISA単位とする。これより低い希釈倍数の各点の、標準陽性血清のOD値は、2, 4, 8・・・ELISA単位に対応する。この点をつなげて標準曲線とする。

第4項 OD値の読み込みと抗体価の計算用ソフトの作成

実際の測定には、コロナ電機製マイクロプレートODリーダーとNEC製パソコンを接続し、自作のプログラムでOD値の読み込みと抗体価の計算を行った。これらのプログラムは、日本電気(株)製のN-88BASIC(86)ディスクバージョンを使用して作成した。OD値の読み込みのプログラムは、コロナ電機製マイクロプレートODリーダーとNEC製パソコンを接続し、マイクロプレートODリーダーで読みとったデータをパソコンのフロッピーディスクに保存するまでの作業を行うものである。また、抗体価計算のプログラムは保存したデータを読み出し、ディスプレイ画面の片対数グラフ上に標準曲線を表示し、その後検体の抗体価を計算してプリントアウトする作業を行うものである。

第5節 考察

TSUKAMOTO et al. (137) 及び SMITH et al. (119) の報告では、酵素抗体法でALSVの抗体価を測定しているが、OD値の差をそのまま成績として用いている。しかし、OD値と抗血清の希釈の間には、一定の範囲以外では相関関係がない。そこで、標準血清を用い、希釈倍数とOD値の標準曲線を作成した後、これと被検血清のOD値を比較して被検血清の抗体価を表すシステムを考案した。また、SPF鶏血清にしばしば見られる非特異反応についてこれを排除するためウイルス精製抗原と正常細胞抗原の2抗原を用いそのOD値差について比較する方法とした。このシステムは、定量性及び特異性の点で、抗体量の測定にはより適切な方法であろうと考えている。また、標準曲線を毎回全プレートに再現することより、標準曲線が異常なく再現されているかどうかを確認することが可能と

なり、試験毎さらにプレート1枚1枚について、反応系の異常の有無を確認することが可能となった。

この方法では、ALSVの亜群特異抗体のみならずgs抗体を主に検出していると思われるので、ここで示したA、B両亜群以外の亜群ウイルスについても感染の有無のチェックができるものと推定された。

また、実験感染鶏群、野外感染鶏群の血清を用いて他の測定法（血清中和法、蛍光抗体法）と比較したところそれぞれの測定結果に相関が認められ、さらに感度についてもこの方法は、他の測定法（血清中和法、蛍光抗体法）に比べて約10倍高かった。そして、この方法を使い始めた1988年から現在に至る7年余りの間、SPF鶏群のモニタリング結果について不都合は認められていない。

以上のことより、SPF鶏血清のALSV抗体測定系が確立されたものと思われた。

この測定系について、その抗原抗体反応系はどうなっているのか、また、これまで用いられてきた測定法との関係はどうか、そして実際に応用可能であるのか、という点について次章で述べる。

第3章： トリ白血病肉腫ウイルス抗体測定法としての酵素抗体法、血清中和法、蛍光抗体法の比較

第1節 要旨

ALSV抗体測定法としてのELISAについて抗原抗体反応系の解析を行い、さらに血清中和法(SN)、蛍光抗体法(FA)との相関関係と感度の比較を行って、以下の結果を得た。

- 1) A亜群, B亜群2種の抗原に対する抗体価の推移を、ELISA, SN, FAで確認すると、ELISA, FAでは主として群特異抗体(gs抗体)を、SNは亜群特異抗体を検出していると思われた。
- 2) gs抗体を産生する主な抗原成分として3種の蛋白が確認された。そして、それぞれに対する抗体の発現順序は、まずp27、つぎにgp85、さらにp15に対する抗体であった。
- 3) 1野外鶏群について、3種の測定方法で算出した抗体価の関係をみると、いずれにも相関が認められた。
- 4) 測定方法による検出感度を比較すると、ELISAは、SNの約10倍、FAはSNとほぼ同感度であった。

第2節 序論

SPF鶏に病原性の強いウイルス、マイコプラズマ、細菌が感染し蔓延するようなことがあれば、SPF種卵生産は意味を失いSPF鶏飼育は続行不能となる。

ウイルスが鶏に感染すれば、鶏の血清中には、ウイルスの種々の構成蛋白に対する抗体が産生される。ALSVについては、これらの抗体を測定する方法として、SN・FAなどがある(132)。

著者は、マイクロプレートを用いたELISAでSPF鶏血清を測定する術式を確立したので、その抗原抗体反応系の解析を行い、さらにELISA・SN・FAの抗体価の関連を調べ、それらの感度の比較をして、その有用性を確認した。

第3節 材料と方法

第1項 被検血清

感染実験血清としては、精製ウイルスを接種した鶏群及びそれと同居させた鶏群の血清を用いた(表2-2)。同居鶏群を置いたのは、野外で実際に発生している水平感染を成立させ、筋肉内接種時の調製したウイルス抗原に由来する非特異反応を除去するためである。また、国内のある種鶏場から、白血病の疑いが持たれ、検査依頼のあった鶏(野外鶏と略す)群の血清も検体として用いた。試料とした血清の最低希釈倍数は、ELISAは1,000倍、SNは5倍、FAは20倍とした。

第2項 ELISA、SN及びFA抗体測定法

ELISA法は、被検血清のOD値を標準陽性血清で作成した標準曲

線のOD値と比較して抗体価を計算した。SN法は、RSV (RAV-1) 及びRSV (RAV-2) の肉腫ウイルスを被検血清と反応させた後、CEF細胞に接種、寒天培地を重層して培養し、フォーカス形成単位 (focus forming unit, FFU) を指標として50%に減少する被検血清の希釈倍数をリード・ミンチ法により計算して抗体価とした (60)。FA法は、被検血清を適当な倍数で段階希釈してカバースリップ抗原と反応させ、2次抗体としてFITC標識抗鶏IgG (山羊IgG) を用い、蛍光顕微鏡による観察を行って蛍光を示す被検血清の最高希釈倍数を抗体価とした (63)。

第3項 ELISA反応系の解析

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) は、分離用に12.5% アクリルアミドゲルを用い、約1時間120Vの電圧をかけて泳動 (69, 126) した。ウエスタンブロッティング (135) は、ゲルからニトロセルロースフィルターに検体及び分子量マーカーを転写後、3% カゼインでブロッキングを行い、1次抗体として被検血清、2次抗体としてHRPO標識抗鶏IgG (家兔IgG) を用い、発色剤としては4-クロロ-1-ナフトールを用いた。蛋白質染色として、銀染色(53, 75, 121)は第一化学薬品 (東京) の銀染色キットを用いた。糖蛋白質染色としては、PAS染色 (86) を用いた。

第4節 実験結果

第1項 感染鶏血清抗体の解析

1) ELISA, FA, SN抗体価の推移例

実験感染鶏群のうちの3群の血清の代表例について、我々の確立し

たELISA抗体価測定方法に従って測定した抗体価と、SNとFAで測定した抗体価の推移を図3-1に示した。

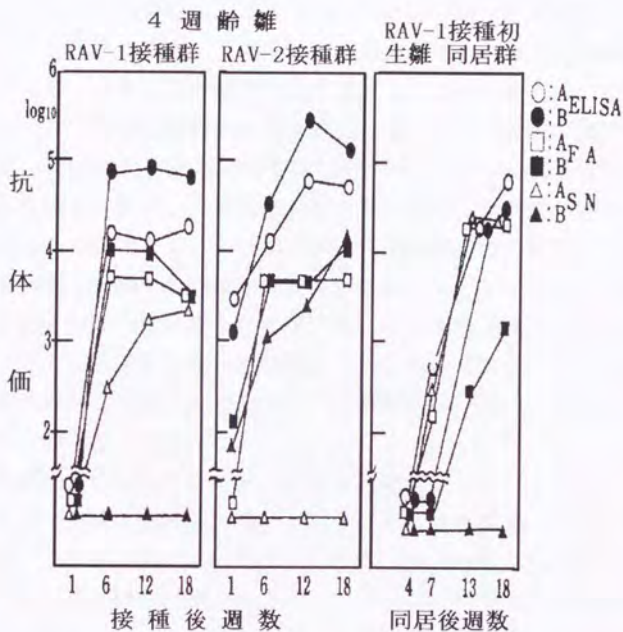


図3-1. ELISA, FA, SN抗体価の推移例

3枚の図は、縦軸が抗体価の対数、横軸がウイルス接種後あるいは接種鶏と同居後の週数である。

左の図は、4週齢の雛にRAV-1を接種して1, 6, 12及び18週目に採血し、A及びBの抗原に対する抗体価をELISA, FA及びSNで測定した結果。

中央の図は、4週齢の雛にRAV-2を接種して1, 6, 12及び18週目に採血し、A及びBの抗原に対する抗体価をELISA, FA及びSNで測定した結果。

右の図は、初生雛群の一部にRAV-1を接種し、残りの未接種同居雛から、4, 7, 13及び18週目に採血し、A及びBの抗原に対する抗体価をELISA, FA及びSNで測定した結果。

まず、図中の丸印はE L I S A抗体価で、「○」はA亜群抗原で測定したもの、「●」はB亜群抗原で測定したものである。四角印はF A抗体価で、「□」はA亜群抗原で測定したもの、「■」はB亜群抗原で測定したものである。また、三角印はF A抗体価で、「△」はA亜群抗原で測定したもの、「▲」はB亜群抗原で測定したものである。これら3枚の図のうち左2枚は4週齢のニワトリにRAV-1（左端）及びRAV-2（中央）の精製ウイルスを接種した群のニワトリから接種後1，6，12及び18週目に採血し、血餅と分離させて集めた血清について測定した結果を示したものである。右端の図は、初生雛群の1部にRAV-1ウイルスを接種し、残りの未接種同居雛から4，7，13及び18週目に採血し、血餅と分離させて集めた血清の内、水平感染が成立したと思われるニワトリからの血清を測定した結果を示したものである。この群で水平感染の発生源として使用したウイルス接種雛については、18週まで生存したものはいなかった。

抗体価の推移を見ていくと、まず左の図では、E L I S AとF Aの抗体価は6週ですでに最高値に達しており、その後は横這いか多少低下気味であった。S N抗体についてはホモの抗A亜群抗体のみが遅れて上昇し、ヘテロの抗B亜群抗体は産生されていなかった。次に中央の図では、F A抗体は6週で、E L I S A抗体は12週で最高値に達しており、その後は横這いか多少低下気味であった。S N抗体については、ホモの抗B亜群抗体が18週で最も高くなっているが、ヘテロの抗A亜群抗体は産生されていなかった。最後に右の図では、直接接種した個体（左と中央の図）よりは抗体上昇の立ち上がりが遅れているが、それは感染源となる接種雛の体内でウイルスがいったん増殖した後体外へ排出され、そこで同居雛への水平感染が成立し、その感染した雛の体内でウイルスが再び増殖して初めて採血する雛の抗体産生応答が始まるというプロセスを必要とするからであると思われる。しかし、直接接種した群のものよりは遅れているが、

13週ではヘテロであるSNの抗B亜群抗体以外はすべてが上昇していた。
他の鶏群についてもこれら鶏群の抗体価推移と同様の傾向を示した。

2) ウェスタン・ブロッティングによる解析

SN反応で、ウイルスが持つエピトープ間に交差反応が見られないA亜群とB亜群の各々の抗原・抗血清について共通のものを知るために、ウェスタン・ブロッティングによる解析をおこなった結果が図3-2である。

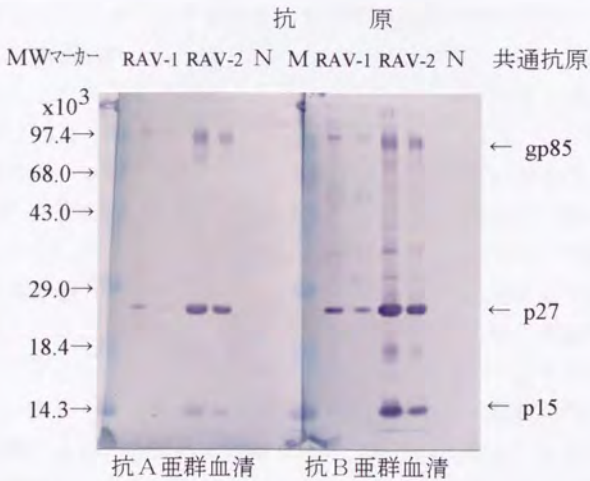


図3-2. 抗A, 抗B血清中の共通抗体

これについて見ると、左右2枚のニトロセルロース膜の各レーンは、そ

れぞれ左から RAV-1 抗原の原液と 2 倍希釈液、RAV-2 抗原の 10 倍希釈液と 20 倍希釈液、そして N で示した正常細胞抗原の原液を PAGE で泳動させた後この膜に転写させたものである。そして、左の膜は抗 A 亜群血清 (RAV-1 感染鶏血清) と、右の膜は抗 B 亜群血清 (RAV-2 感染鶏血清) と反応させたもので、標識抗体としては、ホースラディッシュパーオキシダーゼ標識抗鶏 IgG (家兎 IgG) を用いた。中央の M は分子量マーカーであり、図の左側に MW マーカーとして分子量を示してある。この図の右側の矢印で示した、A 亜群と B 亜群に共通する抗原として 3 種類の抗原が確認できた。更に、図は示していないがこれら分子量 15×10^3 、 27×10^3 、 85×10^3 の抗原が蛋白質であることは銀染色をして、また分子量 85,000 の抗原が糖を含むことは PAS 染色をして確認した。

次に、これらの抗原に対する抗体の産生が、ニワトリにウイルスを直接接種後どのように推移するかを調べた。次頁の図 3-3 に示したとおり、4 枚のニトロセルロース膜の各レーンは、それぞれ左から分子量マーカー (M) ・正常細胞抗原 (N) ・RAV-2 抗原 (B) である。これらをセットにして、PAGE で分離した後、ニトロセルロース膜に転写し、その膜を切り離したものである。それぞれに 1 次血清として、RAV-2 接種後 1, 6, 12 及び 18 週の血清を反応させた後、標識抗体として、ホースラディッシュパーオキシダーゼ標識抗鶏 IgG (ウサギ IgG) を用いた。これらを切り離す前の通りに並べ接種後の週数が異なる血清について比較すると、B 抗原を分離したレーンでは、まず、p 27 に対する抗体が検出でき、少し遅れて g p 85、さらに遅れて p 15 も検出された。しかし、N 抗原を分離したレーンは、なにも反応しなかった。

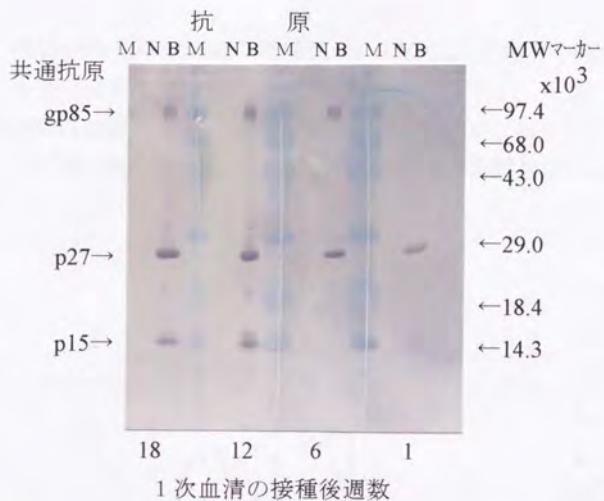


図3-3. 接種後週数による産生抗体の変化

第2項 ELISAとFA、SNの抗体価の相関

ある野外鶏群の血清について、ELISA、SN、FAの3種の測定方法で算出した抗体価の相関関係を見たのが次頁の図3-4である。X軸、Y軸とも対数表示の両対数グラフであるが、まず左側の図はX軸にELISA抗体価、Y軸にSN抗体価（抗A亜群のみ；抗B亜群については抗体は陰性であった。）を示しているが、

相関係数： $r = 0.826$ 、回帰式： $y = 1.12x - 1.57$ であり、高い相関が認められた。

また、右側の図はX軸にELISA抗体価、Y軸にFA抗体価を示しているが、

相関係数： $r = 0.864$ ， 回帰式： $y = 1.19x - 1.79$ であり、これについても高い相関が認められた。

感染実験鶏血清についても同様の計算を行ったが、抗体価の範囲が狭いためか、3種の測定方法で算出した抗体価の間に相関関係は認められなかった。

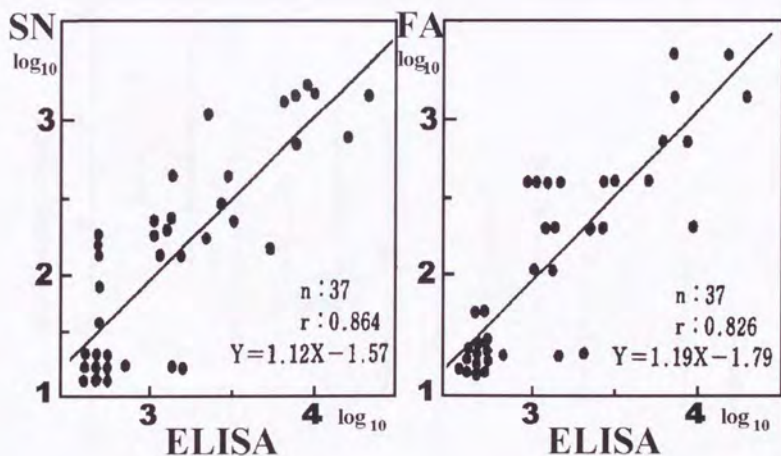


図3-4. 野外鶏のELISA抗体価とSN抗体価・FA抗体価の相関

第3項 ELISAとFA、SNの抗体検出感度の比較

感染実験鶏群83検体（SNの反応は亜群特異的であるので抗体価の平均値をみるために、ホモの系のみについて集計。A亜群：40検体，B亜群：43検体）の抗体価測定成績（図3-5左側）と、実験鶏群と較べると例数は少ないが、野外鶏群でA亜群SN抗体陽性の37検体（図3-5右側）について、ELISAとSN、FAの抗体価を測定した成績の平均値と標準偏差を比較した。

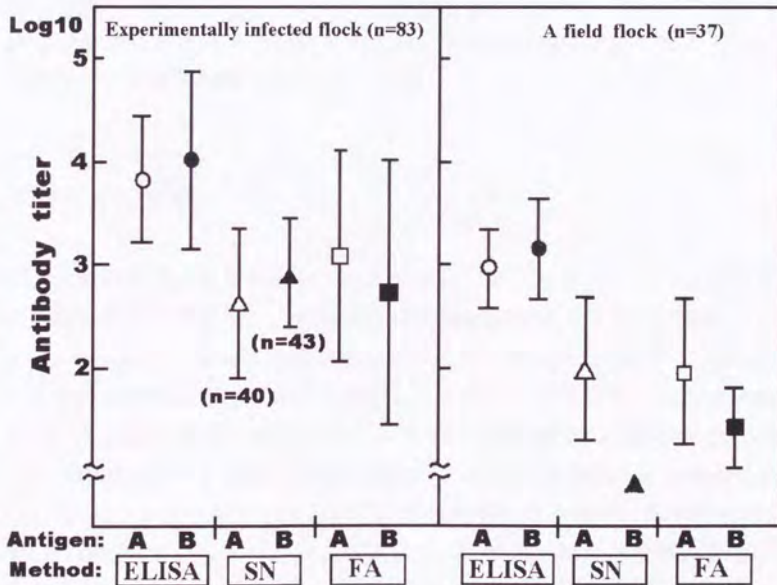


図3-5. ELISA, SN, FA抗体価の比較

縦軸に対数表示の抗体価、横軸には測定対象となるA亜群とB亜群の抗原とその下に測定方法を並べた。丸印はELISA抗体価(○, ●)、三角印はSN抗体価(△, ▲)、四角印はFA抗体価(□, ■)を示し、それぞれの白印はA亜群抗原、黒印はB亜群抗原について測定した結果の平均値を表し、上下に示した実線は標準誤差の範囲を示している。図3-5左側の感染実験鶏群の場合は、ELISAが約 10^4 単位/ml、SNとFAが約 10^3 単位/mlであり、図3-5右側の野外鶏群の場合は、ELISAが約 10^3 単位/ml、SNとFAが約 10^2 単位/mlという結果であった。測定方法によって検体の希釈倍数が異なるためか、あるいは他に原因があるのか、個々の検体で陽性・陰性の完全な一致が見られない場合もあるが、平均値でみると、ELISAはSNの約10倍、FAはSNとほぼ同感度であった。

第5節 考察

抗原抗体反応するスペクトルとしては、ELISAとFAで見える限りは亜群特異性抗体よりも、一般的には補体結合反応でみるgs抗体(抗gp85, 抗p27)のほうを主に検出していると思われた(42)。それに対しSNは亜群特異性抗体のみを検出していた。ところで、ARMSTRONG, D. (4)は、免疫拡散法を用いてハムスターgs血清で4種類の抗原、ニワトリ免疫血清で1種類の抗原を検出しており、MIZUNO and ITOHARA (79)は、ELISAで主としてALVの亜群特異抗体を測定し群特異抗体もわずかに検出しているが、これらの結果については使用した抗原が著者の調製法と多少異なること、また、被検血清の感染後日数の違いなどでこういう結論が得られたのではないかと思われた。著者の成績では、感染後の日数によって血清中に出現する抗体群(anti-gp85, anti-p27, anti-p15)

の組成が異なっているので、いずれの抗体をも検出できるような測定系が、とくに抗体陰性を確認するSPF鶏の検査には重要と思われた。また、gp85については、ウイルス表面に存在し中和反応に関係するが、亜群特異性を持つ抗原決定基のみならず、群特異性を持つ抗原決定基をも含んでいる(48, 74, 110)ため、ELISA, FAでもこのgs抗体を検出していると思われた。図3-2では、RAV-1抗原よりRAV-2抗原の方が濃く染色されているが、これは、STEPHENSON, J.R. ら(120)のハムスターgs血清を用いたradioimmunoassayの結果とも一致していた。平均的な感度の関係は、ELISAはSNの約10倍、FAはSNとほぼ同じという結果であった。

以上の諸点より、ELISAは簡便・迅速・高感度であるので、SPF鶏のALSV抗体モニタリングに適当な方法と結論づけられた。

ここでは外来性のALSV検出法について述べたが、ALSVは逆転写酵素を持つRNAウイルスであり、ウイルス遺伝子としてのRNAから、感染した細胞のDNA合成過程を利用して相補的DNA(complementary DNA, cDNA)を作っている。これが細胞のDNAに組み込まれてその細胞内でのウイルスの増殖や、そのcDNAの組み込まれた細胞の増殖とともにウイルス遺伝子の拡散が行われている。このことは、ALSV未感染のニワトリ細胞にもALSVの蛋白質が検出されることより証明されている(20)。SPF鶏特にALSV不在鶏群作出という観点からすると、ALSVの内在性ウイルスについても検討し、これも除去しておく必要がある。この点について次の章で述べる。

第4章 トリ白血病肉腫ウイルスの群特異抗原を持たない細胞でのニワトリ介助因子の遺伝的制御

第1節 要旨

細胞性のトリ白血病肉腫ウイルス群特異 (gs) 抗原を持たないニワトリ胎児線維芽細胞 (chick embryo fibroblast, CEF) でのニワトリ介助因子 (chf) の活性発現は、メンデルの法則に従った常染色体上の優性遺伝子によって支配されていた。

chfの有無は、WL-Oニワトリ系統のE亜群ウイルスに対する感受性を決定したが、C/BEの感受性形質に固定したWL-Bニワトリ系統では影響がなかった。

ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) は、BH-RSV (RAV-7) とともにCEFを長期間培養すると、 $gs^- chf^-$ のCEF中の chf 発現を促進した。

第2節 序論

一般に、トリ白血病肉腫ウイルス不在鶏群として維持されているニワトリについても、トリRNA腫瘍ウイルスの1部、あるいは完全な形での遺伝情報は発現されていると言われている(21)。多くのニワトリは、内在性ウイルス発現の1形態として群特異(gs)抗原を持っている(38)。

そして、いくつかの近交系鶏群においては、この抗原発現は常染色体上の1個の優性遺伝子によって支配されている事がわかっている(49, 101)。

大部分の gs^+ ニワトリ胎児線維芽細胞(CEF)で見つかった chf 活性は、常染色体上の1つの優性遺伝子によって gs 抗原とともに制御されている(151)。あるニワトリの系統では、RAV-0というトリ白血病の完全な形のウイルスを産生しており(142)、この産生についても、優性遺伝子によって制御されている(32)。しかしながら、 chf 活性は gs^+ 形質を持つCEFに限られるわけではなく gs^- のCEFにも見つけられ、逆に gs 抗原はいくつかの chf^- のCEFにも見つかっている(52, 143)。

$chf^+ gs^-$ の表現型が、 $chf^+ gs^+$ と $chf^- gs^-$ の表現型とは独立して遺伝している事を示唆している成績もある。(50, 108) ここでは、 gs 抗原の欠如した状況下での chf 活性の遺伝的制御と、遺伝的に抑制されたCEFでの chf 活性の誘発について述べる。

第3節 材料と方法

第1項 ニワトリ及びウズラ

使用したニワトリは、アメリカのH & N社由来の白色レグホン種(70)に地元で入手した市販鶏を交配させたものを起源とした交雑種である。その中で、ALS VのA~D亜群ウイルスに感受性のある系統は、

WL-Oニワトリ系統と名付け、B亜群に抵抗性の系統は、WL-Bニワトリ系統と名付けた。両系統とも、ALS V不在鶏群として維持されている。これらの系統のニワトリ胎児について調べたところ、大部分のものが gs 抗原陽性であった。ALS VのE亜群ウイルスに対するこれらのニワトリ胎児の感受性について調べたところ、WL-Oニワトリ系統の胎児の大部分のものと、WL-Bニワトリ系統の全部が、このE亜群ウイルスに抵抗性であった。

ウズラについては、ALS V不在の閉鎖群として維持されていた日本ウズラである。これらのニワトリ系統とウズラは、財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所で維持されている。

第2項 培養方法とウイルス

使用した細胞培養とフォーカスアッセイは、OWADA et al. の報告にある方法に従った (95)。CEF の感受性については、初代培養を調製して、ALS VのA~E亜群の肉腫ウイルスを接種し、フォーカス出現の有無を観察することによって決定した。使用したウイルス株は、ラウス肉腫ウイルス SCHMIDT-RUPPIN 株のA, B, D亜群 (SR-RSV-A, SR-RSV-B, SR-RSV-D) と、ラウス肉腫ウイルスのブライアン高力価株 (BRYAN high titer strain, BH) のRAV-7 とRAV-0の pseudotype であるBH-RSV (RAV-7) とBH-RSV (RAV-0) である。

BH-RSV (RAV-7) とBH-RSV (RAV-0) については、P. K. Vogt 博士から分与を受けたもので、 $chf^- gs^- C/BE\ CEF$ 及び QEF で1度増やしたものを使用した。BH-RSV (RAV-7) ストックのQEFでのフォーカス形成単位は、 $C/BE\ CEF$ での場合に比べて、 10^{-5} 以下である。毛根細胞の培養方法は、CRITTENDENらの手順 (35) に従って実施した。

第3項 ニワトリの交配

試験をする受精卵のCEF細胞について、両親の番号が区別できるように雌鶏はビニールアイソレーター内の個別飼育のケージに入れ、週1回の間隔で、特定の固定した雄との組み合わせになるよう人工授精した。交配の組み合わせをかえる場合は、以前の交配による精子が残らないよう、次の人工授精の前に2週間の期間をおいた。

第4項 群特異抗原の測定方法

10日～11日齢ニワトリ胎児から全内蔵をとりだし、0.5 ml のリン酸緩衝液 (PBS) でホモゲナイズし、1,500 rpm 5分間遠心した。この遠心上清を補体結合反応の抗原として用いた(114)。反応に用いる抗gs血清は、トリ肉腫ウイルス SR-RSV 株を接種して腫瘍形成がみられた後、その腫瘍が退縮した鳩から得たものである(117)。

第5項 chf 試験法

chfの試験は、Weissら(101)の方法をわずかに変更して実施した。まず、初代培養細胞にBH-RSV (RAV-7)を $2\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリブレン存在下で接種した(134)。接種時の細胞培養液は、2日後に新しい培養液に交換し、その培養液を3日後に採取して検体とした。この検体は、BH-RSV (RAV-7)が増殖している事を確かめるために、0.1ml/直径5cmシャーレをC/BE CEFに接種し、BH-RSV (chf)の有無を確かめるために0.1ml/直径5cmシャーレと1ml/直径5cmシャーレをウズラ胎児線維芽細胞 (quail embryo fibroblast, QEF) に接種して、フォーカス数を測定した。C/BE CEFでのフォーカス数が100個/直径5cmシャーレよりも少なかったものについては、その測定結果は成績の集計時に除外した。BH-RSV (RAV-7)を感染させたchf CEFから採取した培養液は、C/BE CEFでのフ

フォーカス数に較べて QEF でのフォーカス数は、 10^{-3} かそれ以下であった。

chf⁺ CEFから採取した培養液は、C/BE CEFでのフォーカス数に較べて QEF でのフォーカス数は、1/15より少なくなることはなかった。

第6項 遺伝形質の異なるCEFでのウイルス増殖試験

使用した手順は、chfの測定方法とほとんど同じである。ニワトリ胎児毎に調製したCEF細胞を培養した2枚のシャーレに、 4×10^3 フォーカス形成単位 (focus forming unit, FFU) のBH-RSV (RAV-7) を接種し、炭酸ガス培養器内に静置して培養した。シャーレの細胞培養液は毎日入れ替え、採取した培養上清は迅速に -80°C に凍らせた。

それぞれのシャーレの細胞は、適当な間隔で2枚のシャーレに継代した。

これらの採取した培養上清は、10倍階段希釈をして、Q/BC QEFとC/BE CEFでフォーカス数を測定した。

第4節 実験結果

第1項 gs⁻ ニワトリ系統の育成と gs 抗原の遺伝的制御の確認

いろいろな組み合わせの交配から得られたそれぞれのCEFについて、gs 抗原の有無を確認したところ、ほとんどのニワトリ胎児に抗原が検出された。この試験データを、ALSVのA~D亜群ウイルスに対する感受性の違いで分類して示したのが、表4-1及び表4-3である。

まず、このニワトリ胎児の gs 試験のデータ (表4-1) に基づき、gs⁻ の特性を持ったWL-Oニワトリ系統のもととなるニワトリが選抜された。つまり、表4-2に示す雄 52 と雌 31 である。

表4-1 WL-Oニワトリ系統のための gs 抗原スクリーニング

雄 番号	雌 番号	gs 抗原		推定遺伝子型 ^{a)}	
		陽性数 / 試験数		雄	雌
45	17	2/2		Gg	gg
	19	2/5			gg
	20	5/8			gg
46	22	4/11		Gg	gg
	24	4/6			Gg
	25	8/11			Gg
	26	6/14			gg
43	31	2/4		Gg	gg
	32	5/5			GG
	35	2/2			GG
	39	2/2			GG
	53	13/15			Gg
52	29	3/8		gg	Gg
	30	3/8			Gg
	33	2/7			Gg
	34	2/6			Gg

a) Gはgs抗原を発現する優性を表し、gはgs抗原を発現しない劣性を表す。

表4-2 後代検定によるWL-Oニワトリ系統の gs 抗原遺伝子型の推定

親番号	F1の		交配	gs 抗原		推定
	雄	雌		雌番号	雄	
52 31			344		0/21	gg
					0/5	gg
					0/13	gg
					0/11	gg
					0/8	gg
					0/18	gg
					0/3	gg
					0/9	gg

また、WL-Bニワトリ系統についても、前述のWL-Oニワトリ系統と同様の考えで、ニワトリ胎児の gs 試験のデータ（表4-3）に基づき、gs⁻ の特性を持ったWL-Bニワトリ系統のもとになるニワトリが選抜された。つまり、表4-4に示す雄 344 と雌 229 である。

表4-3 WL-Bニワトリ系統のための gs 抗原スクリーニング

雄 番号	雌 番号	gs 抗原 陽性数/試験数	雄 番号	gs 抗原 陽性数/試験数	推定遺伝子型		
					雄	雌	雄
344	227	0/7		N T	gg		
	228	0/2		N T	gg		
	229	0/7		N T	gg		
	230	2/3		N T	Gg		
	231	0/9		N T	gg		
	232	0/10		N T	gg		
344	233	4/11	346	15/23	gg		Gg
	234	0/10		12/25	Gg		
	235	4/8		17/23	gg		
	236	N T		14/19	Gg		
	237	N T		12/21	gg		
	238	0/12		13/27	gg		
344	329	0/11	339	0/9	gg		gg
	330	0/3		0/8	gg		
	331	N T		8/8	GG		
	332	N T		0/8	gg		
	334	0/6		0/6	gg		
	336	N T		1/4	Gg		
	337	N T		3/7	Gg		

表4-4 戻し交配によるWL-Bニワトリ系統の gs 抗原遺伝子型の推定

親番号 雄 雌	F1の 雌番号	gs 抗原		推定 遺伝子型
		陽性数/試験数		
344 229	1509	0/2		gg
	1525	0/5		gg
	1546	0/11		gg
	1586	0/21		gg
	4715	0/5		gg
	4731	0/8		gg
	4777	0/11		gg
	4783	0/3		gg

これら gs⁻のニワトリの子孫について次の世代の胎児の gs 抗原を試験し gg の遺伝子型のみであることを確認した。その成績が、前掲の表4-3及び表4-4である。そして、さらに遺伝子の固定化を確実なものにするためそれぞれの系統で兄妹交配による選抜を行った。

こうして、WL-Oニワトリ系統とWL-Bニワトリ系統の gs⁻鶏群を確立した。これらのニワトリ系統の gs 抗原は、単一の常染色体上の gs 抗原発現が優性であるメンデルの法則に従う遺伝子座によって決定されていたということをこれらの結果は示していた。WL-Oニワトリ系統のほとんどのCEF細胞培養は、選抜される以前はBH-RSV (RAV-0) に抵抗性であったが、選抜後はBH-RSV (RAV-0) に感受性のあるニワトリ胎児の割合が大変多くなった。

第2項 gs⁻ニワトリ系統における chf 活性の遺伝的伝達

chf 活性は、細胞性のgs抗原発現を除去した後でも、多くのCEF細

胞培養に存在した。そこで、 chf^+ あるいは chf^- の特性だけを持つ亜系を確立するために、 chf 試験をニワトリの各系統について実施した。

つまり、ニワトリ胎児間での chf 活性の分離を、WL-Oニワトリ系統の雄番号 52、雌番号 31 の両親の子孫と、WL-Bニワトリ系統の 1羽の雄と 2羽の雌の子孫について調べた。まず、WL-Oニワトリ系統の 1羽の雄の精液を、11羽の雌に人工受精することによって得た成績を表 4-5 に示した。

表 4-5 WL-O鶏系統での chf 活性の分離

雄 番号	雌 番号	chf 活性 陽性数/試験数	遺 伝 子 型 の 仮 定	
			1	2
533			h^-h^-	h^+h^+
	582	0/12	h^-h^-	H^-H^-
	277	13/13	H^+H^+	h^+h^+
	548	20/20		
	562	16/16		
	3956	19/19		
	276	7/13	H^+h^-	H^-h^+
	1459	8/12		
	1559	3/10		
	1582	13/31		
	2436	8/12		
	4720	3/8		

この表で H^+ あるいは h^+ は、 gs^- のニワトリでの chf 陽性のことで、それぞれ優性あるいは劣性であることを仮定した遺伝子を表しており、

一方、 H^- あるいは h^- は、 gs^- のニワトリでの chf 陰性のことで、それぞれ優性あるいは劣性であることを仮定した遺伝子を表している。

この雌番号 582 の 12 個のニワトリ胎児全部が chf 陰性であり、雌番号 562、277、548、3956 のニワトリ胎児全部が chf 陽性であった。

これらの結果は、番号 533 の雄は劣性ホモの遺伝子を持ち、番号 582 あるいは他の 4 羽の雌が、優性ホモの遺伝子をもっている、ということを示唆していた。これらの遺伝子は、他の 6 羽の雌では、得られた胎児の約半分 (42/86) が chf 陽性であるので、ヘテロになっているはずである。これらの結果から、我々は、 chf は 1 個のメンデルの法則に従う遺伝子によって決定されていると仮定した。

こうして、 chf^+ の性質が優性か劣性かを想定して、2 セットの遺伝子型を仮定した (表 4-5 右側)。

これらのニワトリのうち何羽かについては、 chf 活性の表現型は、毛根細胞培養法で決めた。得られた結果は、後代検定の結果と比較して、これらのニワトリの遺伝子型を推定した。

劣性ホモであると推定された 533 の雄は、 chf^- の表現型であった。

1459、1582、2436、4720 の雌は、ヘテロでその表現型は chf^+ であった。それ故、 chf^+ は優性であると結論した。また、 chf^+ の特性は伴性のもではなかった。というのは、鳥類の雌の性染色体は、ZO 型であるからである。これらのことより、表 4-6 の右端に示すように、 H は chf^+ で優性 (表 4-5 の H^+) を表し、 h は chf^- で劣性 (表 4-5 の h^-) を表す。

表 4-6 後代検定と毛根細胞培養法による chf 遺伝子型の推定

ニワトリ 系 統	雄 番 号	雌 番 号	chf 活性 表 現 型	推 定 遺 伝 子 型 ^{a)}
WL-O	533		-	h h
		286	-	h h
		1459	+	H h
		1582	+	H h
		2436	+	H h
		3956	+	HH
		4720	+	H h
WL-B	251 262 3930 3998		-	h h
			-	h h
			+	HH or H h
			+	HH or H h
		258	+	H h
		269	-	h h
		269	-	h h
		269	-	h h
		3902	+	HH or H h

WL-Oニワトリ系統での遺伝のパターンは、これら推定した遺伝子型と何の矛盾も認めなかった(図4-1, 図4-2)。図中に示した各ニワトリの遺伝子型は後代検定によって推定した。雌ニワトリの後代検定は、遺伝子型が劣性ホモであると推定された雄ニワトリとの交配によって行った。図4-1は、F₁及びF₂の遺伝パターンをまとめたもので、図4-2は、1羽の雄52番の子供の遺伝パターンをまとめたもの

である。

同じような家系図がWL-Bニワトリ系統についても作成でき（図は省略）、WL-Bニワトリ系統の chf 遺伝子の遺伝パターンも、WL-Oニワトリ系統と全く同じである事がわかった。

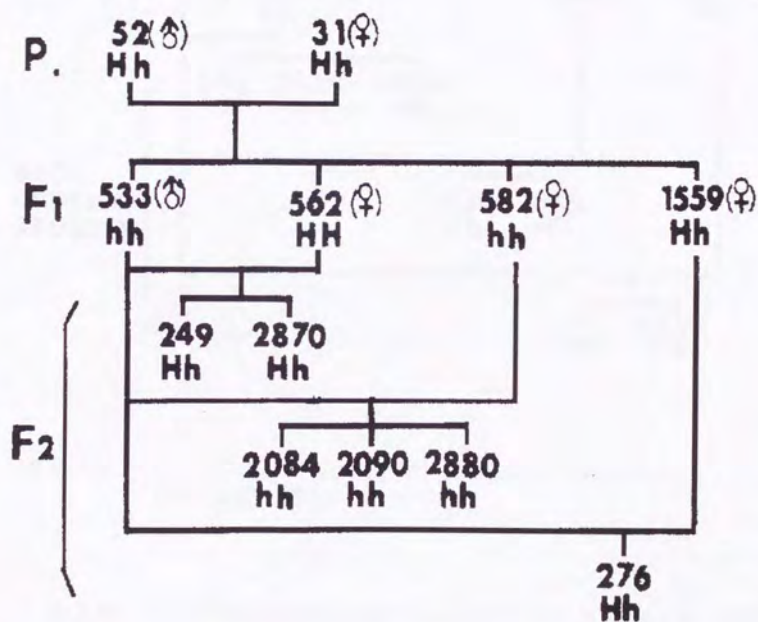


図4-1 WL-Oニワトリ系統での chf 遺伝子の遺伝様式 (F1 及び F2 の遺伝パターン)

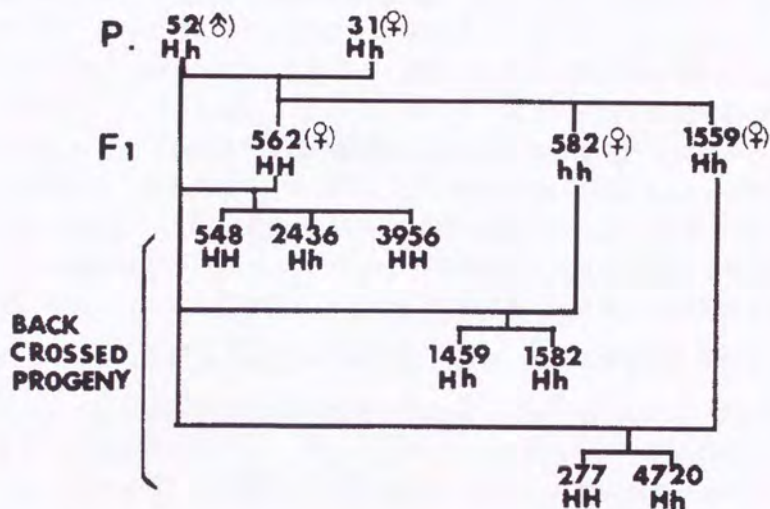


図4-2 W/Oニワトリ系統での chf 遺伝子の遺伝様式
(戻し交配の遺伝パターン)

第3項 chf 遺伝子の発現による ALSV の E 亜群ウイルスに対する感受性の抑制

ALSV の E 亜群ウイルスに対するニワトリ胎児の感受性を、chf 試験用に調製した細胞培養の 1 部を利用して試験した。その細胞培養に、chf⁻ C/O CEF で 500~1000 個/直径 5cm シャーレのフォーカスを作るように希釈した、BH-RSV (RAV-0) を接種した。すると、

WL-B ニワトリ系統のすべての培養した細胞は、chf 活性に関係なく、ALS V の B と E 亜群ウイルスに抵抗性であった。WL-O ニワトリ系統では、chf^r の胎児から得た培養細胞は、ALS V の E 亜群ウイルスに対して、ほとんどのものが QEF と同じように感受性をもっていたが、その一方で chf^r のニワトリ胎児から調製した培養細胞は抵抗性を示した (表 4-7)。しかし、この BH-RSV (RAV-0) に対する抵抗性は、WL-B ニワトリ系統の抵抗性に比べると厳密なものではなかった。

すなわち、ある程度フォーカス (1~85 FFU/直径 5 cm シャーレ) が、試験した chf^r 細胞の約 25% に観察された。これらの結果は、この細胞が既知の ALS V のすべての亜群のウイルスに感受性であるので、WL-O ニワトリ系統の ALS V に対するレセプターを決定する遺伝子は、 $a^s a^s b^s b^s c^s c^s e^s e^s$ (97) あるいは、B 亜群と E 亜群のレセプターは 1 対の遺伝子のみで決定される $a^s a^s b^{s2} b^{s2} c^s c^s$ (31) であることを示唆している。WL-O ニワトリ系統の chf^r の胎児は、ALS V の B 亜群と E 亜群ウイルスに感受性であり、gs 抗原発現がないので、 b^{s1} 遺伝子と言うよりは、 b^{s2} 遺伝子を持っていると考えられた。

WL-B ニワトリ系統の ALS V に対するレセプターを決定する遺伝子は、この細胞が ALS V の B 亜群と E 亜群ウイルスに抵抗性であるので、 $a^s a^s b^r b^r c^s c^s e^r e^r$ あるいは、 $a^s a^s b^r b^r c^s c^s$ であると考えられる。WL-O ニワトリ系統と WL-B ニワトリ系統の交配 (表 4-7 の最下欄) によって、 b^s (b^{s2}) と e^s 遺伝子は、 b^r と e^r に対して優性であることも示されている (34, 103)。chf 遺伝子 (H) は、gs⁻ の条件下で上位性遺伝子 I^e と同じ役割を果たしているように思われた (100, 103)。

表4-7 WL-O及びWL-Bニワトリ系統細胞での chf 発現とE亜群ウイルスに対する抵抗性の関係

両親の番号 雄 雌	細胞形質の 表現型	卵 の 番 号 ^{a)}									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
533 ×	582 chf 活性 細胞抵抗性 ^{b)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
277	chf 活性 細胞抵抗性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
562	chf 活性 細胞抵抗性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
3956	chf 活性 細胞抵抗性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
276	chf 活性 細胞抵抗性	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
		O	O	E	O	E	O	E	E	E	O
1559	chf 活性 細胞抵抗性	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
		O	E	E	O	O	E	O	O	O	O
1582	chf 活性 細胞抵抗性	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
		E	E	O	O	E	E	E	E	E	E
344 ^{c)} × 4777 ^{c)}	chf 活性 細胞抵抗性	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
		BE	BE	BE	BE	BE	BE	BE	BE	BE	BE
533 × 4777	chf 活性 細胞抵抗性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

a) 卵のgs抗原は、全例陰性であった。

b) ニワトリ白血病ウイルス亜群に対する細胞の抵抗性の表現型は以下のよう
に表す。

(E : C/E のことで、E 亜群に対してのみ抵抗性がある)

(O : C/O のことで、全亜群に感受性がある)

(BE : C/BE のことで、B 及び E 亜群に対してのみ抵抗性がある)

c) No.344 と No.4777 は、WL-B 系統のニワトリである。

第4項 遺伝的に抑制された細胞でのchfの誘発

chf試験で1 mlのサンプルを接種したQEF細胞培養に、時々数個のフォーカスが観察された。これらの細胞培養はchfとして分類したが、こう言った低レベルのchf発現は、さらに調べておく必要を感じた。

そこで、我々はBH-RSV (RAV-7)を接種したCEFでの、BH-RSV (RAV-7)の増殖とBH-RSV (chf)の出現を調べることにした。これらのウイルス増殖曲線を図4-3及び図4-4に示す。

chfに分類されたCEF培養で、BH-RSV (RAV-7)とBH-RSV (chf)は、接種後5日間は平行して増加し、その後は一定で推移した(図4-3)。chf細胞は、1%のDMSOを含んだ培地で培養した時に、感染後5日目から、QEFに感染できる検出可能なウイルスを産生し始めた。このウイルスの力価は、C/O CEFではBH-RSV (RAV-7)のレベルまで増加したが、C/BE CEFでは、BH-RSV (RAV-7)よりはかなり低レベルで安定していた。感染したchf C/O CEFが、DMSO抜きの増殖培地で培養されると、BH-RSV (chf)は感染後10~11日目までは出現せず、それから徐々に増加した。chf C/BE CEFがDMSO抜きて培養された時は、BH-RSV (RAV-7)の力価は、DMSOを1%含んだ培地でのRSV (RAV-7)の力価よりは5~10倍低かったが、QEFでのフォーカスは感染後17日目までは検出されず、検出されたBH-RSV (chf)の力価は、1%のDMSOを含んだ培地でのBH-RSV (RAV-7)感染後10日目のBH-RSV (chf)の力価の約1/100であった(図4-4)。chf CEFでのchfの誘発は、多分BH-RSV (RAV-7)の感染によって引き起こされたものであり、この誘発はDMSOを培養液に添加することによって促進されたものと思われる。

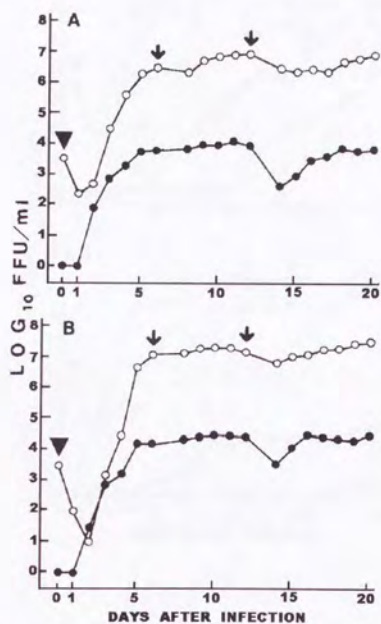


図4-3 chf^+ CEFでの chf の発現

培養細胞にRSV (RAV-7) を接種 (▼) し、図中に示した (↓) のように適当な間隔で継代した。採取した検体は、C/BE CEFでRSV (RAV-7) (○) を測定し、Q/BC QEF でRSV (chf) (●) を測定した。

A : C/E, gs^- , chf^+ CEF

B : C/BE, gs^- , chf^+ CEF

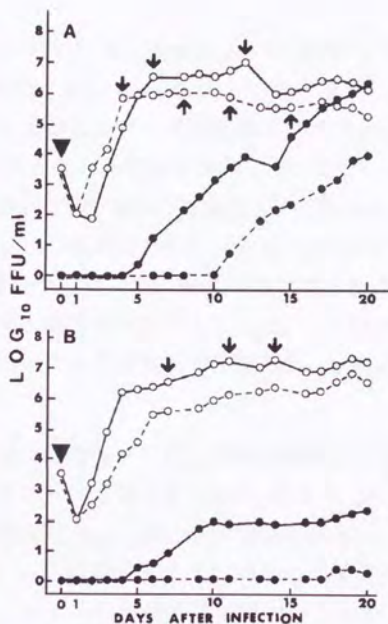


図4-4 chf⁻ CEFでの chf 誘発におけるDMSOの影響

最初の感染、継代、検体の測定は図4-3の表示と同じで、培養細胞に RSV (RAV-7) を接種 (▼) し、図中に示した (↓) ように適当な 間隔で継代した。採取した検体は、C/BE CEFでRSV (RAV-7) (○) を測定し、Q/BC QEFでRSV (chf) (●) を測定した。RSV (RAV-7) を接種したCEFは、1%DMSO入り (——) あるいはDMSO抜き (-----) の培地で培養した。

A : C/O, gs⁻, chf⁻ CEF

B : C/BE, gs⁻, chf⁻ CEF

第5節 考察

WEISS & PAYNE (151) は、Reaseheath C 系統と I 系統のニワトリの交配では、chf 活性は常に gs 遺伝子と一緒に遺伝していることを報告していた。しかしながら、データを見るといくつかのニワトリ胎児は、gs 抗原か chf 活性のどちらかだけを発現していた。WL-O と WL-B ニワトリ系統においては、chf の発現は gs 抗原のない細胞でも観察され、chf の発現は gs⁻ の直系においてメンデルの法則に従って遺伝していた。また、chf 遺伝子 (H) は、WL-O ニワトリ系統で ALSV の E 亜群ウイルスに対する感受性を妨害していた。PAYNE et al. (103) は、I 系統と C 系統のニワトリの交配で、彼らが gs 遺伝子と同じであるとみ

なしていた I^e 遺伝子の効果として、同様の抑制を報告していた。chf 遺伝子の存在が、WL-O ニワトリ系統の CEF を ALSV の E 亜群ウイルスに対して抵抗性にし、逆に chf 遺伝子がないことがこの系統の CEF を ALSV の E 亜群ウイルスに対して感受性にした。これらの結果は、gs 抗原は、WL-O ニワトリ系統の CEF を ALSV の E 亜群ウイルスに対して抵抗性にするのに必要ではないことを示唆している。

chf 活性は、chf の発現が遺伝的に抑制された WL-O と WL-B ニワトリ系統の細胞で、BH-RSV (RAV-7) の長期間の感染によって誘導された。この観察された chf 活性の誘発は、たぶん細胞からであろうと思われる。なぜなら、接種に使ったウイルスストックは、QEF でフォーカスを作ることのできる以上に高い希釈をしているからである。

この chf 活性の誘発は 1% の DMSO を培地に添加することによって促進された。BH-RSV (RAV-7) を感染させる前に DMSO で細胞を処理した場合は、gs⁻ chf⁻ C/O CEF では、わずかに BH-RSV (chf) の産生が増加したが、gs⁻ chf⁻ C/BE CEF では、B

H-RSV (chf) の産生に影響はなかった。DMSO 単独での処理については、さらに研究の必要があると思われる。gs⁻ chf⁻ の亜系である WL-O ニワトリ系統と WL-B ニワトリ系統の胎児の chf 活性の誘発についての解析をすることによって、正常なものと遺伝的に抑制された CEF での内在性ウイルス遺伝子の存在様式にさらに知見が加わるであろうと考えられる (15, 131, 140, 149)。

そのうち、gs 抗原と chf 活性が 1 個の遺伝子座で制御されているか数個の遺伝子座で制御されているかについての解析結果については、次の章で述べる。

第5章： 鶏白血病内在性ウイルス及びそれに対する 細胞表面レセプターの鶏染色体上における遺 伝子座連鎖について後代検定による解析

第1節 要旨

WL-Oニワトリ系統、WL-Bニワトリ系統及び内在性ウイルス遺伝子の部分発現のある個体群の3群を用いて、内在性ウイルス遺伝子と細胞表面レセプター遺伝子が鶏染色体上でどういう位置関係にあるのかを後代検定法を用いて調査した。

その結果、*gs* 抗原と *chf* 活性の分離比はそれぞれの遺伝子座が同一染色体上にある場合の期待値に近かったので、少なくとも一対の *gag* 遺伝子と *env* 遺伝子が同一染色体上にあるものと結論した。そして、これらの遺伝子は、*ev-3* 遺伝子座の *Gs* と *gs* の対立遺伝子と同じであろうと推定した。

一方、ALS VのB亜群ウイルスに対する細胞の感受性と、*gs* 抗原及び *chf* 活性の分離比については、両座位が独立の場合の期待分離比に近いので、ALS VのB亜群ウイルスに対する細胞のレセプター遺伝子座とこの内在性ウイルス遺伝子座とは異なる染色体上にあるものと推測された。

第2節 序論

ニワトリの培養細胞を薬剤で処理したり(109)、ある種のウイルスが感染したり(147)すると、外来性の感染がなくとも新しいウイルスが出てくる。この様なウイルスは、レトロウイルスの中のALSV群に分類される(51, 149)。正常なニワトリの染色体上には、これらのウイルスに共通な遺伝子 *gag*, *pol* 及び *env* の他に、発ガン遺伝子 *src*, *yes* 及び *erb B* 等も存在することが認められている (23, 25, 127, 128, 129, 130)。しかしながら、細胞のウイルス感受性遺伝子座連鎖に関する研究 (96, 99, 102) はあるが、これらの内在性ウイルス遺伝子とウイルスに対する感受性を決める細胞表面レセプター遺伝子との連鎖関係については十分な研究がなされていない。そこで、我々の維持している鶏群について、その遺伝的形質をさらに明らかにして有用な実験動物とするために、ニワトリ白血病内在性ウイルス遺伝子の連鎖と同定、更にこのニワトリ白血病内在性ウイルス遺伝子と細胞表面レセプター遺伝子の連鎖関係の解析をおこなった。

第3節 材料と方法

第1項 試験鶏群

SPF鶏は、ホルマリン滅菌したビニールアイソレーター内で、蒸気滅菌した飼料と水を自由に摂取させて飼育し、SPF鶏群の規格(表2-1)に合格した鶏群である。このSPF鶏群の中に、*gag* 遺伝子産物の *gs* 抗原及び *env* 遺伝子産物の *chf* 活性をもたない劣性ホモ(遺伝子型 *g g h h*) に固定し、ALSVのA、B、C及びE亜群に感受性をもつよう選抜された鶏群(WL-Oニワトリ系統)と、A亜群及びC亜群のみに

表5-1 鶏の系統の表現型と遺伝子型

鶏系統	表現型		遺伝子型					
	宿主域 a)	gs 抗原 活性	tv-a	tv-b	tv-c	tv-e	gag 遺伝子座	chf 遺伝子座
WL-O	C/O	-	d ^s a ^s δ b ^s c ^s c ^s e ^s e ^s				g g	h h
WL-B	C/BE	-	d ^s a ^s b ^r c ^s c ^s e ^r e ^r				g g	h h
遺伝子 保存	C/O	+	d ^s a ^s b [?] c ^s c ^s e [?] e [?]				g g	h h
	or C/BE	or -					G g G G	H h H H

- a) C/Oは各亜群ウイルスに対し感受性、C/BEはB(及びD)並びにE亜群に抵抗性を示す。
 b) 感受性(・s)が抵抗性(・r)に対し優性である。

感受性をもつよう選抜された鶏群 (WL-Bニワトリ系統) がいる。

実際に試験に用いたのは、表5-1に示す上記の2系統と、遺伝子保存用に維持していた閉鎖集団である。

第2項 ウイルス及び感受性試験

供試ウイルスは、表5-2に示したニワトリ白血病ウイルス及びニワトリ肉腫ウイルスである。これらのウイルスは、大阪大学微生物病研究所腫瘍ウイルス部門から分与されたものを継代したものである。

表5-2 使用したウイルス株の分類

亜群	鶏白血病ウイルス	鶏肉腫ウイルス ^{a)}
A	RAV-1	RSV (RAV-1)
B	RAV-2	RSV (RAV-2)
C	RAV-7	RSV (RAV-7)
D	—	SR-RSV-D
E	RAV-0	RSV (RAV-0)

a) D群の肉腫ウイルスは、SCHMIDT-RUPPIN 株である。

他の肉腫ウイルスは、BRYAN high titer 株の pseudotype ウイルスである。

これら各亜群のウイルスを、特定の組み合わせから得られたSPF種卵のニワトリ胎児線維芽細胞 (CEF) に接種し、フォーカス形成の有無でSPF種卵の感受性 (宿主域) (I44) を調べた。A, B, C, D及びE全群のウイルスに感受性があれば、C/Oと表記し、B, D及びE群に

抵抗性であればB群とD群の感受性は平行して変化するのでC/BEと表記する。また、ウイルスに対する細胞表面のレセプター遺伝子は、各亜群ごとに感受性が優性、抵抗性が劣性の1対の遺伝子を持つ遺伝子座の組み合わせで示される。

第3項 gs 抗原試験法

ゼラチン-ペロナル緩衝液を用いて、試験鶏間の交配によって得た10日齢ニワトリ胎児肝臓の50%乳剤を調製し(2)、検体とした。検出方法は、SR-RSV-Dウイルス株を鳩に接種し、大きな腫瘍が形成された後、その腫瘍が退縮した鳩の血清から得た抗gs血清を用いる補体結合反応(COFAI試験)(115, 117)である。

第4項 chf 試験法

chfの検体は、試験鶏の交配より得られた受精卵を10日間孵卵し、そのCEF細胞を培養して、BH-RSV(RAV-7)を感染させ、3日後に採取した細胞培養上清である。その検体中のRSV(chf)の有無によって陽性・陰性の判定をした。試験の方法はWEISS et al. (150)、豊島ら(133)によった。

第4節 実験結果

第1項 遺伝子保存群の遺伝子型の推定

遺伝子保存群7羽の雌とWL-Oニワトリ系統の雄との交配によって得た、10日齢ニワトリ胎児の肝臓のgs抗原を調べると、個体によって異なった陽性・陰性の分離が見られた。表4-2に示す如く、WL-Oニワトリ系統雄のgag遺伝子はggに固定しているので、gs陽性数と陰

性数の出現割合から、遺伝子保存群の雌の遺伝子型は3種類 (GG, Gg, gg) が考えられ、特に全例が gs 陽性であった E308 と E309 は GG ホモであると推定された。

この E308 と E309 には、WL-Oニワトリ系統及びWL-Bニワトリ系統の雄とそれぞれ交配して得られたF1がいた。これらのF1は、表5-1に示すように、WL-Oニワトリ系統及びWL-Bニワトリ系統の遺伝子型が gg hh であるので、表現型は gs 抗原陽性であるが、遺伝子型はヘテロ (Gg) のはずである。また chf に関しては母親の E308 及び E309 の遺伝子型が不明のため、表現型は特定できないが、少なくともWL-Oニワトリ系統及びWL-Bニワトリ系統由来の劣性遺伝子 h を持っているはずである。

第2項 後代検定による遺伝子連鎖の推定

これらのF1をWL-B系統の雄と交配し、その交雑ニワトリ胎児について、gs 抗原、chf 活性及びウイルスに対する感受性を調べた。

gs 抗原と chf 活性については表5-3に示すように $gs^+ chf^+$ 及び $gs^- chf^-$ の胎児が圧倒的に多く、ほぼ1:1の比率であった。更に、集計した結果でも同じ傾向を示した。この結果は、*gag* 及び *env* 両座位が独立の場合の期待分離比、1:1:1:1とは明らかに異なり、両座位は同一染色体上にあるものと推測された。これを既知の *ev-1* から *ev-22* までの遺伝子座の性質 (6, 7, 24, 58) と比較すると、 $gs^+ chf^+$ の表現型は、*ev-3* 遺伝子座の Gs 遺伝子にのみコードされているので、これと同じであろうと推定した。しかしながら、 $gs^+ chf^-$ 及び $gs^- chf^+$ の個体も少数ながら存在する (2.6%, 6.6%) ことは、この相同染色体の交差組み替えが起こっているか、あるいは、この1対の遺伝子以外に *gag* 遺伝子、または *env* 遺伝子が単独に存在する (127) ことを示唆している。

表5-3 後代検定による *gag* 遺伝子、*env* 遺伝子の推定

鶏番号	gs, chf の 表 現 型				<i>gag</i> 遺伝子座と <i>env</i> 遺伝子座の推定遺伝子型
	gs ⁺ chf ⁺	gs ⁺ chf ⁻	gs ⁻ chf ⁺	gs ⁻ chf ⁻	
I 294	12 ^{a)}	0	2	11	G g H h
I 314	16	1	0	16	G g H h
I 310	29	1	8	35	G g H h
I 349	23	3	2	15	G g H h
I 420	9	0	1	12	G g H h
合 計	89	5	13	89	

a) 胎児数

次に、tv-b 遺伝子座と ev-3 遺伝子座の連鎖関係を調べるために、WL-Bニワトリ系統の雄を用いた後代検定により、宿主域の分離と ev-3 遺伝子の発現を比較した(表5-4)。まずWL-Bニワトリ系統とのF1雌(I294, I314)の交配については宿主域はC/Bに固定し、gs⁺chf⁺とgs⁻chf⁻の割合が1:1の分離を示した。

しかし、WL-Oニワトリ系統とのF1雌(I310, I349, I420)の交配については、宿主域のC/OとC/Bの割合がほぼ1:1の分離を示し、それぞれの中で、gs⁺chf⁺とgs⁻chf⁻の割合もほぼ1:1の分離を示した。つまり、この結果は、tv-b及びev-3両座位が独立の場合の期待分離比の1:1:1:1に近く、両座位は異なる常染色体上にあるものと推測された。

表 5-4 後代検定による tv-b 遺伝子、ev 遺伝子の推定

鶏番号	宿主域 : C/O		C/B		tv-b 遺伝子座と ev 遺伝子座の 推定遺伝子型	
	evの発現 : gs ⁺ chf ⁺	gs ⁻ chf ⁻	gs ⁺ chf ⁺	gs ⁻ chf ⁻		
I 294	0 ^{a)}	0	11	11	b ^r b ^r	GH/g h
I 314	0	0	15	15	b ^r b ^r	GH/g h
合計	0	0	26	26		
	└───┬───┘ 0		└───┬───┘ 52			
I 310	14	20	12	14	b ^s b ^r	GH/g h
I 349	7	8	12	7	b ^s b ^r	GH/g h
I 420	2	1	6	8	b ^s b ^r	GH/g h
合計	23	29	30	29		
	└───┬───┘ 52		└───┬───┘ 59			

a) 胎児数

第5節 考察

WL-Oニワトリ系統、WL-Bニワトリ系統及び内在性ウイルス遺伝子の部分発現のある個体群においては、gs 抗原と chf 活性の分離比はそれぞれの遺伝子座が同一染色体上にある場合の期待値に近かったので、

gag 遺伝子座と *env* 遺伝子座は密接に連鎖しており、*ev-3* 遺伝子座の *G s* と *g s* の対立遺伝子と同じであろうと推定できた。

一方、ALS V の B 亜群ウイルスに対する細胞の感受性と、*gs* 抗原及び *chf* 活性の分離比については、両座位が独立の場合の期待分離比に近いので、ALS V の B 亜群ウイルスに対する細胞のレセプター遺伝子座 (*tv-b* 遺伝子座) とこの内在性ウイルス遺伝子座 (*ev-3* 遺伝子座) とは異なる染色体上にあるものと推測された。

そして、現在では、生ワクチン製造用原料として、WL-Oニワトリ系統、WL-Bニワトリ系統及びそれらの交雑群が生産するSPF種卵を用い、内在性ウイルス遺伝子の発現していない細胞を利用することができるようになっている。

第6章 総括

生ワクチン製造のためのSPFニワトリ群のALSV検査の簡便化とさらなる浄化をするための基礎知見を得ることを目的として、ALSV抗体のELISA価測定と、内在性ウイルスの部分発現であるgsとchfについて検討し、以下の成績を得た。

SPFニワトリのトリ白血病ウイルス抗体監視システムへの、マイクロプレートを用いた酵素抗体法の応用の可能性を検討して、ALSVのB亜群抗原を固相化し、感染鶏血清を標準血清とする抗体価算出方法を確立した。

SN、FAを加えて抗体価の推移を較べELISA、FAでは主としてgs抗体を、SNは亜群特異抗体を検出している事を示した。そして、この方法(ELISA)での抗原抗体反応系で検出しているgs抗体を産生する抗原成分として、p27、gp85、p15が確認され、その抗体誘導能力の強さ(認識され易さ)は、 $p27 > gp85 > p15$ である事を明らかにした。

ALSV抗体測定におけるELISA、SN、FAの検出感度を比較し、ELISAはSNの約10倍、FAはSNとほぼ同感度であることを明らかにした。

ALSVの抗原と交差反応する細胞性のgs抗原と、ALSVの感受性を変化させ、chf活性についてその遺伝様式を検討して、どちらも単純なメンデルの法則に従った常染色体上の優性遺伝子支配であることを示した。

さらに、chf活性の細胞への影響として、ALSVのE亜群ウイルスに対する感受性を持つニワトリ系統においては、その存在がニワトリ胎児線維芽細胞の感受性を阻害したが、元々感受性のない系統の細胞には影響

を及ぼさない事を明らかにした。また chf 活性は RSV (RAV-7) 感染下で DMSO によって、長期間培養された細胞からの誘導が促進されることを示した。

系統保存しているニワトリ及び gs 抗原、chf 活性の発現しているニワトリ群の交配によって、gs 抗原、chf 活性を支配する遺伝子が同一染色体上にありすでに異なるニワトリ系統で報告されている *ev-3* 遺伝子座の 1 対の対立遺伝子と同じものであると推定した。

一方、ALSV の B 亜群ウイルスに対する細胞のレセプター遺伝子座と、この内在性ウイルス遺伝子座とは異なる染色体上にあることを示唆した。

以上の結果より、SPF 検査項目の 1 つであり、ニワトリで発癌性の示されている ALSV の検査方法の改良と、さらに進んで、外来性の病原体のみならず内在性ウイルスとして発現される可能性のある、細胞に組み込まれたウイルス遺伝子発現産物についても排除できたものと思われる。

ワクチンウイルス以外のウイルスがワクチンの製品に混入する事は、非加熱血液製剤の HIV 混入の例にもあるように、製品の安全性という点からも厳に回避されていなければならない問題である。そこで、本著で述べたごとく高品質の SPF ニワトリの得られたことは、この SPF 種卵を用いて生産されるワクチンの安全性保証の点からも意義深いものと考えている。

謝辞

本研究を終わるにあたり、終始、実験の指導および協力を賜り、本研究遂行の便宜を図って下さった財団法人阪大微生物病研究会の方々に深甚の謝意を表するとともに、本研究の原点となる助言および指導を賜った大阪大学微生物病研究所の豊島久真男名誉教授に心よりお礼申し上げます。

また、本研究に関し有益な助言を賜った香川大学農学部の一色泰教授ならびに山内高円教授に謝意を表します。

参考文献

- 1) 赤沢 (1942) : 千葉医学会雑誌. 20 1884-1942.
- 2) ALLEN, D.W. and SARMA, P.S. (1972). Identification and localization of avian leukosis group-specific antigen within "leukosis-free" chick embryos. *Virology*. 48 : 624-626.
- 3) ANDERSON, D.P., KING, D.D., EIDSON, C.S. and KLEVEN, S.H. (1972). Filtered-air positive-pressure (FAPP) brooding of broiler chickens. *Avian Diseases* 16 : 20-26.
- 4) ARMSTRONG, D. (1969) Multiple group-specific antigen component of avian tumor viruses detected with chicken and hamster sera. *J. Virol.* 3 : 133-139.
- 5) 麻生芳郎 訳 (1993) 一目でわかる免疫学 —臨床医学の基礎知識—, 26章ウイルスに対する免疫, 52-53 頁, メディカルサイエンスインターナショナル, 東京.
- 6) ASTRIN, S.M., CRITTENDEN, L.B. and BUSS, E.G. (1979) ev3, a structural gene locus for endogenous virus, segregates with gs⁺ chf⁺ phenotype in matings for line 63 chickens. *Virology* 99 : 1-9.
- 7) ASTRIN, S.M. and ROBINSON, H.L. (1979) Gs, an allele of chickens for endogenous avian leukosis viral antigens, segregates with ev3, a genetic locus that contains structural genes for virus. *J. Virol.* 31 : 420-425.
- 8) AZUMA, Y., ITOH, H. and TSUBAKI, S. (1985) Production of Specific Pathogen free eggs I. SPF chicken houses. *Jpn. Poult. Sci.* 22 : 226-230
- 9) AZUMA, Y., MASU, S. and ITOH, H. (1985) Production of Specific Pathogen free eggs II. SPF chicken and laying performance. *Jpn. Poult. Sci.* 22 : 231-236

- 10) AZUMA, Y., KONDO, Y. and ITOH, H. (1990) Production of Specific Pathogen free eggs. III. comparison of egg laying performance of SPF chickens in three generations between the caged and floor feeding system. *Jpn. Poult. Sci.* 27 : 211-214
- 11) AZUMA, Y. and ITOH, H. (1990) Effect of disinfection of the slats in SPF chicken house by spraying disinfectant solutions and formaldehyde fumigation. *Jpn. Poult. Sci.* 27 : 385-388
- 12) AZUMA, Y. and ITOH, H. (1991) Production of Specific Pathogen free eggs. IV. Comparison of Egg Laying Performance of SPF chickens in three generations of K, H and T line. *Jpn. Poult. Sci.* 28 : 239-244
- 13) AZUMA, Y. and ITOH, H. (1991) Production of Specific Pathogen free eggs. V. Comparison of Egg Laying performance among crossbred SPF chicken flocks. *Jpn. Poult. Sci.* 28 : 228-235
- 14) AZUMA, Y. and ITOH, H. (1992) Production of Specific Pathogen free eggs. VI. effects of cage size and housing density on production of the chickens. *Jpn. Poult. Sci.* 29 : 35-40
- 15) BALUDA, M. A. (1972). Widespread presence, in chickens, of DNA complementary to the RNA genome of avian leukosis viruses. *Proc.Nat. Acad.Sci. USA* 69, 576-578.
- 16) BALZAM, N. (1937) : *Acta Biol. Exptl.* 11 43-56.
- 17) BAUER, H. and GRAF, T. (1969). Evidence for the possible existence of two envelope antigenic determinants and corresponding cell receptors for avian tumour viruses. *Virology* 37. 157-161.
- 18) BAUER, H. and JANDA, H. G. (1967). Group-specific antigen of avian leukosis virus. Virus specificity and relation to an antigen contained in Rous mammalian cells. *Virology* 33. 483-490.
- 19) CARLONI, G., KACZOREK, M. and HILL, M. (1980) Recombinants between avian sarcoma virus genome and chicken helper factor gene of the host

- cell : cloning by transfection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77 : 3014-3018.
- 20) CHEN, J. H. and HANAFUSA, H. (1974) Detection of a protein of avian leukoviruses in uninfected chick cells by radioimmunoassay. *J. Virol.* 13 : 340-346.
 - 21) CHEN, J.H., HAYWARD, W.S. and HANAFUSA, H. (1974) Avian tumor virus proteins and RNA in uninfected chicken embryo cells. *J. Virol.* 14 : 1419-1429.
 - 22) CHENG, H.H. (1994) The chicken genetic map: a tool for the future. *Poultry Digest* 53 : 24-31
 - 23) COFFIN, J. (1984) Structure of the retroviral genome. in : RNA tumor viruses, 2nd edition. WEISS, R., TEICH, N., VARMUS, H.E. and COFFIN, J. eds. pp 261-369 Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 - 24) COFFIN, J. (1984) Endogenous viruses of chickens. in : RNA tumor viruses, 2nd edition. WEISS, R., TEICH, N., VARMUS, H.E. and COFFIN, J. eds. 1/text pp 1133-1147. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
 - 25) COFFIN, J. (1985) Genome structure. in : RNA tumor viruses, 2nd edition. R. WEISS, N. TEICH, H. VARMUS, J. COFFIN, eds. 2/text pp 17-73. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
 - 26) COFFIN, J.M., (1990) Retroviridae and Their Replication. in : Virology, 2nd edition. B.N. Fields, D.M. Knipe et al., eds. 2/text pp 1438-1439 Raven Press, Ltd., New York.
 - 27) COHENDY, M. (1912) : *Ann. Inst. Pasteur.* 26 106-137.
 - 28) CRITTENDEN, L.B. (1968). Observation on the nature of genetic cellular resistance to avian tumor viruses. *J. Nat. Cancer Inst.* 41 145-153.
 - 29) CRITTENDEN, L.B., GULVAS, F.A. and EAGEN, D.A. (1980) Spontaneous Production and transmission of subgroup E retroviruses in line 15B chickens. *Virology*, 103 : 400-406.

- 30) CRITTENDEN, L.B., HAYWARD, W.S., HANAFUSA, H. and FADLY, A.M. (1980). Induction of neoplasms by subgroup E recombinants of exogenous and endogenous avian retroviruses (rou associated virus type 60). *J. Virol.* 33 : 915-919
- 31) CRITTENDEN, L.B. and MOTTA, J.V. (1975). The role of the tv-b locus in genetic resistance to RSV(RAV-0). *Virology* 67 : 327-334.
- 32) CRITTENDEN, L. B., SMITH, E. J., WEISS, R. A. and SARMA, P. S. (1974). Host gene control of endogenous avian leukosis virus production. *Virology* 57, 128-138.
- 33) CRITTENDEN, L.B., STONE, H.A., REAMER, R.H. and OKAZAKI, W. (1967). Two loci controlling genetic cellular resistance to avian leukosis-sarcoma viruses. *J. Virol.* 1 : 898-904.
- 34) CRITTENDEN, L.B., WENDEL, E.J. and MOTTA, J.V. (1973). Interaction of genes controlling resistance to RSV(RAV-0). *Virology* 52 : 373-384.
- 35) CRITTENDEN, L. B., WENDEL, E. J. and RATZSCH, D. (1970). Genetic resistance to the avian leukosis-sarcoma virus group : Determining the phenotype of adult birds. *Avian Dis.* 15 : 503-507.
- 36) 動物用生物学的製剤協会編(1993). 鶏用生ワクチン製造用材料, 動物用生物学的製剤基準, 431-433 頁, 動物用生物学的製剤協会, 東京.
- 37) DONAHOE, J.P., ANDERSON, D.P., KLEVEN, S.H., EDISON, C.S. and DRURY, L.N. (1974). Filtered air positive pressure rearing of broiler chickens. *Poultry Science* 53 : 1498-1506.
- 38) DOUGHERTY, R. M. and DISTEFANO, H. S. (1966). Lack of relationship between infection with avian leukosis virus and presence of COFAL antigen in chick embryos. *Virology* 29 : 586-595.
- 39) DOUGHERTY, R. M., MARUCCI, A. A. and DISTEFANO, H. S. (1972). Application of immunohistochemistry to study of avian leukosis virus.

J. gen. Virol. 15 : 149-162

- 40) DRURY, L.N., PATTERSON, W.C. and BEARD, C.W. (1969) Ventilating poultry houses with filtered air under positive pressure to prevent airborne diseases. *Poultry sci.* 48 : 1640-1646
- 41) DRURY, L.N.(1970). Filtered-air positive-pressure ventilation systems for preventing airborne diseases in poultry houses. Paper No. 70-914. American Society of Agricultural Engineers. St.Joseph, Michigan 49085
- 42) DUESBERG,P.H.,ROBINSON,H.L.,ROBINSON,W.S.,HUEBNER,R.J. and TURNER, H.C. (1968). Proteins of rous sarcoma virus. *Virology* 36 : 73-86
- 43) DUFF, R.G. and VOGT, P.K. (1969). Characteristics of two new avian tumour virus subgroups. *Virology* 39 : 18-30.
- 44) FUJITA, D.D., CHAN, T.C., FRISS, R.R. and VOGT, P.K. (1974). RNA tumor virus of pheasant : characterization of avian leukosis virus subgroup F and G. *Virology* 60 : 558-571
- 45) 古田賢治 (1979) S P F 鶏の利用. 家禽会誌 創立25周年記念号 45頁-47頁
- 46) FURUTA, K., OHASHI, H., OBANA, J. and SATO, S. (1980) Performance of successive generations of specified-pathogen-free chickens maintained as a closed flock. *Lab. Anim.* 14 : 107-112
- 47) GUSTAFSSON, B.E. (1959) : *Ann.N.Y. Acad. Sci.*, 78 ,166-173
- 48) HALPERN, M.S., BOLOGNESI, D.P., FRIIS, R.R. and MASON, W.S. (1975). Expression of the major viral glycoprotein of avian tumor virus in cells of chf(+) chicken embryos. *J. Virol.* 15 : 1131-1140.
- 49) HANAFUSA, H., HANAFUSA, T., KAWAI, S. and LUGINBUHL, R.E. (1974). Genetic control of expression of endogenous virus genes in chicken cells. *Virology* 58 : 439-448.
- 50) HANAFUSA, T., HANAFUSA, H., and KAWAI, S.(1974). Genetic control of expression of endogenous virus genes in chicken cells. *Virology*

58 : 439-448.

- 51) HANAFUSA, T., HANAFUSA, H. and MIYAMOTO, T. (1970) Recovery of a new virus from apparently normal chick cells by infection with avian tumor viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67 : 1797-1803.
- 52) HANAFUSA, T., HANAFUSA, H., MIYAMOYO, T. and FLEISSNER, E. (1972). Existence and expression of tumor virus genes in chick embryo cells. *Virology* 47 : 475-482.
- 53) HARLOW, E. and LANE, D. (1988). Antibodies a laboratory manual. 651-653, *Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. USA*.
- 54) 速水正憲 (1981). ラウス肉腫における腫瘍細胞表面抗原と免疫反応 ウイルス 31 : 1頁-20頁
- 55) 日原 宏 (1988) トリ白血病ウイルス. 伊沢久夫・清水悠紀巨編, 獣医学 1988 87頁-104頁. 近代出版 東京.
- 56) 日原 宏 (1989) トリ白血病ウイルス (ALV) に起因する疾病の発生と内在性ウイルス (eALV). 鶏病研報 25 : 5頁-12頁.
- 57) 日原 宏・山本春弥 (1982) リンパ性白血病. 堀内貞治 編 鶏病診断. 159頁-182頁 家の光協会 東京.
- 58) HUGHS, S.H., TOYOSHIMA, K., BISHOP, J. M. and VARMUS, H. E. (1981) Organization of the endogenous provirus of chickens : Implications for origin and expression. *Virology* 108 : 189-207.
- 59) 井上 栄 (1987) 抗体, 石川栄治・河合忠・宮井潔 編 酵素免疫測定法. 第3版 394頁-399頁. 医学書院 東京.
- 60) ISHIZAKI, R. and VOGT, P.K. (1966) Immunological relationships among envelope antigens of avian tumor viruses, *Virology*, 30 : 375-387.
- 61) 金内長司・光岡知足・山本脩太郎・瀬賀利夫 (1966) ニワトリの無菌飼育に関する研究 I. 新しい飼育装置について 日獣誌 28 : 1~9
- 62) 金内長司・光岡知足・山本脩太郎・瀬賀利夫 (1966) ニワトリの無

菌飼育に関する研究 II. 飼育成績について 日獣誌 28 : 229~236

- 63) 川村明義 (1972) 蛍光抗体法. 東昇, 石田名香雄編 新ウイルス学 2: 145頁-176頁 朝倉書店 東京.
- 64) KOBORI, N., MURAKAMI, K., KATSUKI, N., YAMADA, S. and ETO, M. (1985) Production of hatching eggs in large breeding specific pathogen free chicken flocks. *Jpn. Poult. Sci.* 22 : 279-285
- 65) KOBORI, N., MURAKAMI, K., OISHI, S., MORISHITA, E., YAMADA, S. and ETO, M. (1986) Effect of hatching egg weight selected on egg weight produced from chickens of subsequent generations of SPF chickens maintained as a closed flock. *Jpn. Poult. Sci.* 23 : 222-226
- 66) 近藤恭司・江崎孝三郎・田嶋嘉雄 (1965) ”実験動物関係用語の定義—ICLA”についての邦訳ならびに解説. *Lab. Anim.* 14 : 134-139
- 67) KOSKI, T.A., WENGER, D.R. and OSHEL, D.D. (1970). Testing vaccines by the complement fixation test for avian leukosis virus using a short cell culture passage interval. *Avian Dis.* 14 : 538-541
- 68) 黒田行昭 (1974). 動物組織培養法 7頁-118頁, 共立出版, 東京.
- 69) LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- 70) LINIAL, M. (1976) Infection of resistant avian cells by subgroup B rous sarcoma virus. *J. Virol.* 20 : 384-390.
- 71) LOVE, D.N. and WEISS, R.A. (1973) Pseudotypes of vesicular stomatitis virus determined by exogenous and endogenous avian RNA tumor viruses. *Virology* 57 : 271-278.
- 72) LUCKEY, T.D. (1963) : Germfree life and gnotobiology pp.1-212 Academic Press. New York.
- 73) 前島一淑・田嶋嘉雄・野村達次 (1970) Germfree, Gnotobioten なら

びに S P F. 田嶋嘉雄編 実験動物学—総論— 235頁-267頁 朝倉書店 東京

- 74) MCGINNIS, J., HIZI, A., SMITH, R.E. and LEIS, J.P. (1978) *in vitro* translation of a 180,000-dalton rous sarcoma virus precursor polypeptide containing both the DNA polymerase and the group specific antigens. *Virology* 84 : 518-522.
- 75) MERRIL, C. R., SWITZER, R. C. and KEUREN, M. L. V. (1979) Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* 76 : 4335-4339.
- 76) MESNARD, J. M. and CARRIERE, C. (1995) Comparison of packaging strategy in retroviruses and pararetroviruses. *Virology* 213 : 1-6.
- 77) MIYAKAWA, M. (1959) : *Ann.N.Y. Acad. Sci.*, 78 : 37-40
- 78) 水野喬介・立山幸男・山田進二・小原速美・佐藤伊佐夫・市原強・市原鶴雄 (1976) 鶏白血病不在鶏の開発と維持. 日獣会誌 29 : 449-453
- 79) MIZUNO, Y. and ITOHARA, I. (1986) Enzyme linked immunosorbent assay to detect subgroup-specific antibodies to avian leukosis viruses. *Am. J. Vet. Res.* 47 : 551-556.
- 80) MOTTA, J.V., CRITTENDEN, L.B., and POLLARD, W.O. (1973). The inheritance of resistance to subgroup C leukosis-sarcoma viruses in new hampshire chickens. *Poultry science* 52 : 578-586
- 81) 内藤, 小林 (1936) : 日本微生物学病理学雑誌. 30 1867-1887
- 82) 中原 (1959) : 千葉医学会雑誌. 35 791-802.
- 83) NEIMAN, P.E., PURCHASE, H.G. and OKAZAKI, W. (1975). Chicken leukosis virus genome sequences in DNA from normal chick cells and virus-induced bursal lymphomas. *Cell* 4 : 311-319
- 84) NICHOLAS, R.A.J. and THORNTON, D.H. (1986). The use of the enzyme

- linked immunosorbent assay in detecting antibodies to avian viruses :
a review, Commonwealth Agricultural Bureaux . 56 : 5, 337-343.
- 85) 農林水産省畜産局監修 (1985). 鶏白血病. 病性鑑定マニュアル,
210-211頁, 全国家畜保健衛生業績発表会協賛会, 東京.
- 86) 日本病理学会編 (1981). 染色法, 病理組織標本作製技術, 下巻,
122 頁- 127 頁, 医歯薬出版, 東京.
- 87) NUTTAL, G.H.F. and THIERFELDER, H. (1895) : *Z. Physiol. Chem. Hoppe-*
Seyler's 21 : 109-121
- 88) NUTTAL, G.H.F. and THIERFELDER, H. (1896) : *Z. Physiol. Chem. Hoppe-*
Seyler's 22 : 62-73
- 89) NUTTAL, G.H.F. and THIERFELDER, H. (1897) : *Z. Physiol. Chem. Hoppe-*
Seyler's 23 : 231-235
- 90) OGURA, H. and FRIIS, R. (1975) Further evidence for the existence of
a viral envelope protein defect in the Bryan high-titer strain of rous
sarcoma virus. *J. Virol* 16 : 443-446.
- 91) 小野寺節 (1995) 牛海綿状脳症. 山内一也・立石潤 監修 ス
ローウイルス感染とプリオン. 268頁-282頁 近代出版 東京
- 92) 大阪医薬品協会 GMP委員会 (1996) 異物混入. GMP教育
読本 不良医薬品防止策に関する事例研究. 45頁-50頁 大阪医薬
品協会 GMP委員会 大阪
- 93) 大友信也・水野喬介 (1987) ワクチン開発・製造における新技術
大谷明編 ワクチン学 87頁-115頁, 講談社サイエンティフィック,
東京.
- 94) 大谷明 (1987) 付表3. 予防接種法施行令 大谷明編 ワクチン学
316頁, 講談社サイエンティフィック, 東京.
- 95) OWADA, M., IHARA, S., TOYOSHIMA, K., KOZAI, Y. and SUGINO, Y. (1976).
UV-Inactivation of avian sarcoma viruses : Biological and biochemical
analysis. *Virology* 69 : 710-718.

- 96) PANI, P.K. (1974) Close linkage between genetic loci controlling response of fowl to subgroup A and subgroup C sarcoma viruses. *J.gen. Virol* 22 : 187-195.
- 97) PANI, P.K. (1974). Studies in genetic resistance to RSV(RAV-0) a third type of genetic resistance typified by the W line of fowl and further support for the two loci genetic model. *J. Gen. Virol* 23. : 33-40.
- 98) PANI, P.K. (1975). Genetic susceptibility of chicken \times quail hybrid embryos to avian RNA tumour viruses. *J. gen. Virol*, 28:159-163.
- 99) PANI, P. K. (1976). Further studies in genetic resistance of fowl to RSV(RAV-0) : Evidence for interaction between independently segregating tumour virus *b* and tumour virus *e* genes. *J. gen. Virol* 32 : 441-453.
- 100) PANI, P. K. and PAYNE, L. N. (1973). Further evidence for two loci which control susceptibility of fowl to RSV(RAV-0). *J. Gen. Virol*. 19 : 235-244.
- 101) PAYNE, L.N. and CHUBB, R.C.(1968). Studies on the nature and genetic control of an antigen in normal chick embryos which reacts in the COFA L test. *J. Gen. Virol* 3 : 379-391.
- 102) PAYNE, L.N. and PANI, P.K.(1971). Evidence for linkage between genetic loci controlling response of fowl to subgroup A and subgroup C sarcoma viruses. *J.gen. Virol* 13 : 253-259.
- 103) PAYNE, L.N., PANI, P.K. and WEISS, R.A. (1971). A dominant epistatic gene which inhibits cellular susceptibility to RSV(RAV-0). *J. Gen. Virol*. 13 : 455-462.
- 104) PHILLIPS, A.W., NEWCOMB, H.R. and SMITH, J.E. (1961). Serotonin in the small intestine of conventional and germ-free chicks. *NATURE* 192 : 380.
- 105) PHILLIPS, A.W., NEWCOMB, H.R., LACHAPELLE, R. and BALIS, H.E. (1962).

- Appl. Microbiol.* 10 : 224-230.
- 106) REYNIERS, J.A., TREXLER, P.C., ERVIN, R.F., WAGNER, M., LUCKEY, T.D. and GORDEN, H.H. (1949) : *Lobund Rept.*, No.2 1-116.
- 107) REYNIERS, J.A. (1959) : *Ann.N.Y. Acad. Sci.*, 78 ,47-49
- 108) ROBINSON,H.L. and LAMOREUX,W.F. (1976). Expression of endogenous ALV antigens and susceptibility to subgroup E ALV in three strains of chickens (endogenous avian C-type virus). *Virology* 69 : 50-62.
- 109) ROBINSON,H.L.,SWANSON,C.A.,HRUSKA,J.F.and CRITTENDEN,L.B. (1976) The production of unique C-type viruses by chicken cells grown in bromodeoxyuridine. *Virology* 69 : 63-74.
- 110) ROHRSCHEIDER,L.,BAUER,H. and BOLOGNSI,D.P. (1975) Group-specific antigenic determinants of the large envelope glycoprotein of avian oncornaviruses, *Virology* 67 : 234-241.
- 111) RUBIN, H. (1960) A virus in chick embryos which induces resistance *in vitro* to infection with rous sarcoma virus. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 46 : 1105-1119.
- 112) RUBIN, H. (1961) The nature of virus-induced cellular resistance to rous sarcoma virus. *Virology* 13 : 200-206.
- 113) 細菌製剤協会 (1993) 乾燥弱毒生麻しんワクチン. 厚生省薬務局監修 生物学的製剤基準. 172頁-176頁 細菌製剤協会 東京
- 114) SARMA, P.S., LOG, T., HUEBNER, R.J. and TURNER, H.C. (1969). Studies of avian leukosis group-specific complement fixing serum antibodies in pigeons. *Virology* 37 : 480-483.
- 115) SARMA,P.S., TURNER,H.C. and HUEBNER,R.J. (1964) An avian leucosis group-specific complement fixation reaction. Application for the detection and assay of non-cytopathogenic leucosis viruses. *Virology* 23 : 313-321.
- 116) 佐々木卓士・鳥谷部一成・渡辺紀之・中野克重・笹原二郎 (1986)

北里大学附属八雲牧場におけるSpecific Pathogen Free 鶏の血清学的ならびに微生物学的検査. 日獣会誌 39 : 378-382

- 117) SAZAWA,H., SUGIMORI,T., MIURA,Y., and SHIMIZU,T. (1966). Specific complement fixation test of Rous sarcoma with pigeon serum. *Nat.Inst. Anim.Health Q.* 6 : 208-215.
- 118) SCHOTTELIUS, M. (1899) : *Arch.Hyg.* 34 : 210-243
- 119) SMITH, E.J., FADLY, A.M. and CRITTENDEN, L.B. (1985). Observations on an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against avian leukosis-sarcoma viruses, *Avian Dis.*, 30 : 488-493.
- 120) STEPHENSON, J. R., WILSNACK, R. E. and AARONSON, S. A. (1973) Radioimmunoassay for avian C-type virus group-specific antigen : Detection in normal and virus-transformed cells. *J. Virol.* 11 : 893-899.
- 121) SWITZER,R.C.III, MERRIL,C.R. and SHIFRIN,S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 98 : 231-237
- 122) 田名部雄一(1973) 鶏およびその他の家禽, 家畜の品種と飼養管理, 佐々木清綱 監修, 畜産大事典 988-992頁, 養賢堂, 東京.
- 123) TANAMI,J. and HIRONO,H.(1967) Germfree hatching cage, a modification of sterile supply drum *Lab. Anim.* 16 : 99-102
- 124) TEMIN, H. M. (1960). The control of cellular morphology in embryonic cells infected with rous sarcoma virus *in vitro.* *Virology* 10 : 182-197.
- 125) TEMIN, H.M. and RUBIN, H. (1958). Characteristics of an assay for rous sarcoma virus and rous sarcoma cells in tissue culture. *Virology* 6 : 669-688.
- 126) 寺田弘 (1989) 電気泳動法 基礎と実験, 112頁-119頁, 廣川書店, 東京.
- 127) TEREBA, A. (1981) 5 -Terminal deletions are a common feature of endogenous retrovirus loci located on chromosome 1 of white leghorn

- chickens. *J. Virol.* 40 : 920-926
- 128) TEREBA, A., and ASTRIN, S. M. (1980) Chromosomal localization of ev 1, a frequently occurring endogenous retrovirus locus in white leghorn chickens by in situ hybridization. *J. Virol.* 35 : 888-894.
- 129) TEREBA, A., CRITTENDEN, L.B. and ASTRIN, S.M. (1981) Chromosomal localization of three endogenous retrovirus loci associated with virus production in white leghorn chickens. *J. Virol.* 39 : 282-289
- 130) TEREBA, A. and LAI, M.M.C. (1982). Cell oncogenes are located on the large microchromosomes in chicken cells. *Virology* 116 : 654-657.
- 131) TEREBA, A., SKOOG, L. and VOGT, P. K. (1975). RNA tumor virus specific sequences in nuclear DNA of several avian species. *Virology* 65 : 524-534.
- 132) TOOZE J. (1973). The molecular biology of tumor viruses, 534-539, *Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. USA*
- 133) 豊島久真男・安藤忠司・栗野正男・山口 勲・児山国明・菅 隆良・庄司 宏 (1976). 実験ニワトリと内在性ウイルス発現, 医学のあゆみ 96巻 5号 209頁-215頁.
- 134) TOYOSHIMA, K. and VOGT, P.K. (1969). Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology* 38 :414-426.
- 135) TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 4350-4354.
- 136) TREXLER, P.C. and REYNOLDS, L.I. (1957) : *Appl. Microbiol.* 5 : 406-412
- 137) TSUKAMOTO, K., KONO, Y., ARAI, K., KITAHARA, H. and TAKAHASHI, K. (1985) An enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to exogenous avian leukosis virus. *Avian Dis.* 29 : 1118-1129.
- 138) 塚本健司 (1989) 酵素抗体法とその応用. 鶏病研報, 25 : 1-12.

- 139) 常久芳直 (1987) ワクチンの品質管理 大谷明編 ワクチン学
164頁-189頁, 講談社サイエンティフィク, 東京.
- 140) VARMUS, H.E., WEISS, R.A., FRIIS, R.R., LEVINSON, W. and BISHOP, J.M. (1972).
Detection of avian tumor virus-specific nucleotide sequences in avian cell
DNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69 : 20-24.
- 141) VOGT, P.K. (1965) A heterogeneity of rous sarcoma virus revealed by
selectively resistant chick embryo cells. *Virology* 25 : 237-247.
- 142) VOGT, P.K. and FRIIS, R.R. (1971). An avian leukosis virus related to
RSV(0) : Properties and evidence for helper activity. *Virology* 43 : 223
-234.
- 143) VOGT, P.K., FRIIS, R.R. and WEISS, R.A. (1973). Cell genetics and growth
of endogenous viruses. *Proc. Nat. Cancer Conf.* 7 : 55-59.
- 144) VOGT, P.K. and ISHIZAKI, R. (1965) Reciprocal patterns of genetic
resistance to avian tumor viruses in two lines of chickens. *Virology*, 26 :
664-672.
- 145) VOGT, P.K. and ISHIZAKI, R. (1966) Patterns of viral interference in the
avian leukosis and sarcoma complex. *Virology* 30 : 368-374.
- 146) WEISS, R.A. (1969) Interference and neutralization studies with BRYAN
strain rous sarcoma virus synthesized in the absence of helper virus. *J.
gen. Virol.* 5 : 529-539.
- 147) WEISS, R.A. (1969) The host range of bryan strain rous sarcoma virus
synthesized in the absence of helper virus. *Virology* 5 : 511-528.
- 148) WEISS, R.A. and BIGGS, P.M. (1972). Leukosis and Marek's disease
viruses of feral red jungle fowl and domestic fowl in Malaya. *J. Natl.
Cancer Inst.* 49 : 1713-1725.
- 149) WEISS, R.A., FRIIS, R.R., KATZ, E. and VOGT, P.K. (1971). Induction of
avian tumor viruses in normal cells by physical and chemical carcinogens.
Virology 46, 920-938.

- 150) WEISS, R.A., MASON, S. and VOGT, P.K. (1973). Genetic recombinants and heterozygotes derived from endogenous and exogenous avian RNA tumor viruses. *Virology* 52 : 535-552.
- 151) WEISS, R.A. and PAYNE, L.N. (1971). The heritable nature of the factor in chicken cells which acts as a helper virus for Rous Sarcoma virus. *Virology* 45 : 508-515.
- 152) WORLD HEALTH ORGANIZATION (1988) Requirements for measles vaccine (Live). World health organization technical report series, 771 : 93-131, WHO.
- 153) WORLD HEALTH ORGANIZATION (1988) Tests for bovine viruses in serum. World health organization technical report series, 771 : Appendix 2, WHO.
- 154) 薬事日報社 (1989) 「医薬品の製造原料の製造管理及び品質管理に関する基準(原薬GMP)」の制定の経緯と概要. 厚生省薬務局監視指導課 監修 原薬GMP解説 医薬品の製造原料の製造管理及び品質管理に関する基準解説 1989年版. 1頁-12頁 薬事日報社 東京.
- 155) 山崎修一・山下秀幸・神山圭三・樋口勝治・岩渕功・岡崎好子・古屋美人・坂井利夫・長井伸也・野村吉利・日原宏 (1988) 卵用鶏における血管腫の発生と発症鶏からのトリ白血病毒の分離 鶏病研報 24 142-147
- 156) 矢田純一 (1995) 腫瘍と免疫, 医系免疫学 388-405頁, 中外医学社, 東京.
- 157) ZHU, G., WANG, L. L., ZHANG, X. M., SHI, W. X. and FURUTA, K. (1987) Problems on management of specific pathogen free (SPF) chickens maintained in china and their performance *Jpn. Poult. Sci.*, 25 : 241-248

