

氏名(本籍)	嶋崎 智章(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第423号
学位授与年月日	平成21年10月26日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	Studies on antigenic and pathogenic characterizations and detection of Bovine viral diarrhoea virus 2 (牛ウイルス性下痢ウイルス2の抗原性および病原性並びに検出法に関する研究)
論文審査委員	(主査) 原 元 宜 (副査) 福 安 嗣 昭 和 田 恭 則 田原口 智 士

## 論 文 内 容 の 要 旨

牛ウイルス性下痢症(BVD)は1946年にアメリカで初めて報告され、その後カナダで粘膜病を伴う重篤なBVDが報告された。BVDはその数年後に牛ウイルス性下痢-粘膜病として広く知られるようになった。現在、BVDは牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)の感染による重要な疾病として世界中で報告され畜産経営に甚大な被害を及ぼしている。

BVDVは、フラビウイルス科ペスチウイルス属に属するプラス1本鎖RNAウイルスである。ペスチウイルス属は、BVDV1、BVDV2、ポーター病ウイルスおよび豚コレラウイルスの4種からなり、その遺伝子の長さは約12.3Kbである。5'末端の非翻訳領域の塩基配列は属内で最も保存され、特異的であるため遺伝子検査に適している。

BVDVには2つのバイオタイプがあり、1つは培養細胞に細胞変性効果(CPE)を引き起こす細胞病原性株で、もう1つはCPEを引き起こさない非細胞病原性株である。一般的に非細胞病原性株のみが牛に持続感染し、その持続感染牛に細胞病原性株が重感染すると粘膜病を発症するとされている。

1980年代後半、北米で食用子牛に出血を主徴とする高病原性を呈するBVDV感染が頻繁に発生した。その分離株について遺伝子の系統樹解析を行ったところ、従来の野外流行株、ワクチン株、診断用抗原、若しくは研究材料として一般的に用いられていた株とは異なるグループであることが判明した。このグループは新しい種とされBVDV2と命名され、既知の株が属するグループはBVDV1と命名された。その後、BVDV2の流行は北米だけにとどまらず欧州や南米にも広がった。したがって、我が国においても早急にBVDVを型別し、BVDV2の抗原性状、病原性について検討する必要があるが生じた。また、

BVDV1を製造用株とする現行ワクチンはBVDV2感染を予防できないとする報告があったことから、ワクチンの製造用株にBVDV2を加えることが言及されるようになった。そこで、著者は我が国で使われているBVDV1を製造用株としているワクチンがBVDV2感染症の予防に対して有効かどうかを明らかにする必要があると考えた。

一方、1970年代から細胞培養に使用していた牛胎子血清にBVDVが混入するケースが増加傾向にあり、培地および培養細胞への汚染が目立つようになった。このため、BVDVが迷入していないワクチンの製造を確保するためには、ワクチンの各製造工程における適切な検査の実施が効果的な品質の確保に必要不可欠であると思われた。

上述のように、BVDV、とりわけ新たなBVDV2は家畜衛生およびワクチンの品質管理において重要な病原因子である。そこで、我が国におけるBVDV2の確認およびBVDV2に対する現行ワクチンの効果について究明し、並びにRT-PCRによる牛用ワクチン中に迷入する活性BVDV検出法の確立を目的として以下の研究を行った。

本論文は3章から構成される。第1章において我が国で分離されたBVDVを遺伝子型別した。第2章では、我が国で使用されているBVDワクチンのBVDV2に対する効果を評価した。第3章では、BVDVの複製過程で生成されるマイナス鎖RNAをRT-PCRにより検出する方法を確立し、牛用生ウイルスワクチン中に迷入する活性BVDVの検出に有用か検証した。

## 第1章 我が国で分離された牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝子型別

BVDV2の5'末端非翻訳領域にはBVDV1に存在する*Pst*Iサイトがない。このことを指標にBVDVは容易にBVDV1とBVDV2に型別できる。そこで、著者は我が国で分離されたBVDVをBVDV1若しくはBVDV2に型別し、検出されたBVDV2の病原性および抗原性を検討した。

その結果、野外の持続感染牛から分離された3株の5'末端非翻訳領域に*Pst*Iサイトがなかったことから、これら3株はBVDV2と型別された。これら3株を牛に実験感染させたところ、発熱およびロイコペニーと共にBVDV2に特徴的な血小板減少が認められた。以上の結果から、これらの3株は、我が国において初めて確認されたBVDV2であった。また、実験感染牛の血清中和抗体価を測定したところ、ホモの株に対する抗体価とBVDV1である既知株に対する抗体価に差が認められ、抗原性の相違が明らかとなった。

## 第2章 牛ウイルス性下痢ウイルス2-890株に対する我が国で使用されている牛ウイルス性下痢症ワクチンの有効性

前章においてBVDV2であることが明らかとなった3株の抗原性はワクチン株であるNo.12-43株のそれと異なることを示した。このことから、BVDV2がワクチン抗体をすり抜けることで既存のワクチンが無効となることが危惧された。そこで、BVDV1を製造用株とし我が国で汎用されているBVDワクチンのBVDV2の代表株かつ強毒株である890株に対する有効性を調べた。ワクチン接種牛および未接

種牛に890株を攻撃したところ、ワクチン接種牛には未接種牛に診られた臨床症状や血液学的変化が観察されず、攻撃株も分離されなかった。我が国のBVDワクチンはBVDV2感染に対しても有効であることが示唆された。

### 第3章 牛用ウイルスワクチンに迷入する活性牛ウイルス性下痢ウイルスの迅速検出法の検証

多くのウイルスワクチンは細胞や牛胎子血清などの生物由来原料を使って培養したウイルスをワクチン株として製造されている。しかし、それは生物由来原料を介して感染因子が迷入するリスクを常に持っているということの意味するものである。BVDVは牛血清や細胞に混入することがよく知られている。活性BVDVに汚染された生物由来原料を使ってワクチンを製造した場合、それは家畜衛生上、非常に重篤な問題が生じることになるかもしれない。

従来用いられたRT-PCRは、血清や培養細胞、シードウイルス、ワクチンからBVDVを検出できる非常に感度の高い方法であるが、これまでのRT-PCRはランダムプライマー若しくは特異的なアンチセンスプライマーを用いるため、その混入しているBVDVが活性を有しても有していなくてもPCR産物が増幅される。そこで、BVDVが感染細胞で複製する際に生じるマイナス鎖RNAに対するセンスプライマーを用いて増幅することで活性を有するBVDVのみを検出するRT-PCR法を開発し、この新しいRT-PCR法を用いて牛用生ウイルスワクチン中に迷入する活性BVDVの検出について試験した。

その結果、新たに開発したRT-PCR法は、動物用生物学的製剤基準において採用されている干渉法に比べ簡便かつ迅速で、同程度の感度であることが確認された。さらに、供試した全ての非細胞病原性BVDVを検出することができ、牛用ウイルス生ワクチン中に含まれる成分の干渉を受けなかった。このRT-PCR法は牛用ウイルス生ワクチンの品質管理法として有用であると考えられた。

我が国で初めて著者がBVDV2と型別した3株の病原性は北米で分離されたウイルスに比べて弱いものであったが、抗原性は既知のBVDV1とは異なるものであった。そこで、著者は我が国のBVDワクチンがBVDV2の発症を防御できるか明らかにするために、ワクチン接種牛および未接種牛にBVDV2-890株を攻撃した。その結果、ワクチン接種牛には未接種牛に診られた臨床症状や血液学的変化が観察されず、攻撃株も分離されなかった。このことから我が国のBVDワクチンはBVDV2に対しても有効であることが示唆された。

BVDをコントロールする上で最も効果的なことは持続感染牛の摘発淘汰である。非細胞病原性のBVDVが迷入したワクチンを妊娠牛に接種すると、不幸にも持続感染牛が生まれてくる恐れがある。したがって、牛用ウイルスワクチンにBVDVが迷入していないか調べることは重要なことである。そこで、著者は新しいRT-PCR法を開発し、牛用生ウイルスワクチン中に迷入した活性BVDVを検出できるか検証したところ、このRT-PCR法は牛用生ウイルスワクチンの品質管理に有用であることが示唆された。

この研究成果は我が国におけるBVDV2感染症の防疫対策を可能にし、牛の感染症対策において重要

なツールである牛用ワクチンの品質管理に応用可能で、家畜衛生の向上に大きく貢献できるものである。

## 論文審査の結果の要旨

牛ウイルス性下痢症（BVD）は、1946年にアメリカで初めて報告され、その後カナダで粘膜病を伴う重篤なBVDが発症し、牛ウイルス性下痢-粘膜病として広く知られるようになった。BVDは牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）の感染による重要な疾病として世界中で発生の報告があり畜産経営に甚大な被害を及ぼしている。

BVDVはフラビウイルス科ペスチウイルス属プラス1本鎖RNAウイルスで、その遺伝子の長さは12.3Kbである。5'末端の非翻訳領域の塩基配列は属内で最も保存され、特異的であるため遺伝子検査に用いられている。BVDVは培養細胞に対して細胞変性効果（CPE）を引き起こす細胞病原性株とCPEを引き起こさない非細胞病原性株の2つのバイオタイプがあり、一般的に非細胞病原性株のみが牛に持続感染し、その持続感染牛に細胞病原性株が重感染すると粘膜病を発症するとされている。

さらに、1980年代後半、北米で子牛に出血を主徴とする高病原性を呈するBVDV感染が頻繁に発生した。その分離BVDVは遺伝子の系統樹解析により従来の野外流行株、ワクチン株、診断用抗原および研究用株とは異なるグループであることが明らかとなり、新しい種、BVDV2とし、既知のウイルス株が属するグループはBVDV1と命名された。その後、BVDV2の流行は欧州や南米にも拡がったことが明らかにされているが、我が国におけるBVDV2の実態については不明であった。そこで、我が国において分離されたBVDVの遺伝子型別およびBVDV2の抗原性や病原性を明らかにするとともに、BVDV1を製造用株とする現行ワクチンのBVDV2感染の予防効果について検証した。

一方、1970年代から細胞培養に使用する牛胎子血清へのBVDVの迷入が増加傾向にあり、ワクチン製造用血清および牛用ワクチンの品質管理としてRT-PCRによる検査が実施されている。しかし、本PCRによる検査では活性ウイルスのみならず不活化ウイルスも反応することから活性ウイルスの検出法の確立を目的として研究を行った。

本論文は3章からなっている。まず、我が国で分離されたBVDVの遺伝子型別を行なった。次に、我が国で使用されているBVDワクチンのBVDV2感染に対する効果を検討した。さらに、BVDVの複製過程で生成されるマイナス鎖RNAをRT-PCRにより検出する方法を確立し、牛用生ウイルスワクチン中の活性BVDVの検出について検討した。

第1章では、BVDV2の5'末端非翻訳領域にはBVDV1に存在する*Pst*Iサイトが存在しないことからこれを指標として、我が国で分離されたBVDVを遺伝子型別し、BVDV2の病原性および抗原性について検討した。その結果、野外の持続感染牛から分離されたBVDV17株中3株がBVDV2に型別された。これら3株を実験的に牛に感染させた結果、発熱およびロイコペニーと共にBVDV2に特徴的な血小板減少を認めた。さらに、実験的感染牛の血清中和抗体価は、ホモの株に対する抗体価とBVDV1の既知

株に対する抗体価に差を認め、これら3株の抗原性の相違を明らかにした。以上のことから、これら3株は、我が国において初めて確認されたBVDV2であった。

第2章では、前章でBVDV2であることが明らかとなったBVD罹患牛から分離した3株の抗原性がワクチン株であるNo.12-43株のそれと異なることから、BVDV2に対して既存のワクチンが無効となることが危惧された。そこで、BVDV1を製造用株としたBVDワクチンのBVDV2感染に対する有効性について、BVDV2の代表株かつ強毒株である890株を用いて試験した。ワクチン接種牛および未接種牛に890株を攻撃したところ、ワクチン接種牛には未接種牛に診られた臨床症状や血液学的変化が観察されず、攻撃株も分離されなかった。以上のことから、我が国の現行BVDワクチンはBVDV2感染に対しても有効であることが示唆された。

第3章では、ワクチン製造用血清および牛用ワクチンの品質管理のために、従来用いられたRT-PCRは、BVDVを検出できる非常に感度のいい方法であるが、本法は直接BVDVのRNAをRT-PCRを行なうため、混入しているBVDVが活性であっても、不活化されていてもPCR産物が増幅する。そのため活性BVDVのみを検出することはできない。そこで、BVDVが感染細胞で複製する際に生じるマイナス鎖RNAに対するセンスプライマーを用いたRT-PCRにより活性BVDVのみを検出する方法を検証した。その結果、新しいRT-PCR法は、牛用ウイルス生ワクチン中に含まれる成分の干渉を受けることなく、迷入する活性BVDVを特異的に検出でき、動物用生物学的製剤基準において採用されている干渉法に比べ簡便かつ迅速で、同程度の感度であることを確認した。以上のことから、本法は牛用ウイルス生ワクチン中に迷入する活性BVDVを特異的に検出できることを明らかにした。

本研究により、我が国で分離されたBVDVを初めて遺伝子型別し、BVDV2が既存することおよびその抗原性が既知のBVDV1とは異なることを明らかにした。BVDV2の抗原性が異なることからBVDV2感染に対する我が国のBVDワクチンの有効性を明らかにするために、ワクチン接種牛および未接種牛にBVDV2-890株を攻撃した。その結果、ワクチン接種牛では臨床症状や血液学的変化が改善され、攻撃株も分離されなかった。このことから我が国のBVDワクチンはBVDV2に対しても有効であることを明らかにした。さらに、牛のウイルス感染症の防疫対策として牛用ウイルスワクチンは必須であるが、ワクチン製造用牛血清や製造過程で非細胞病原性BVDVが迷入し、BVDV迷入ワクチンを妊娠牛に接種するとBVD持続感染子牛となる恐れがある。したがって、牛用ウイルスワクチンにBVDVが迷入していないことを確認することは重要なことである。そこで、牛用生ウイルスワクチン中に迷入した活性BVDVを簡便、迅速かつ特異的に検出することができる新しいRT-PCR法を開発し、牛用生ウイルスワクチンの品質管理に有用であることを明らかにした。

この研究の成果は、我が国におけるBVDV2感染症の防疫対策並びに牛用ワクチンの品質管理に応用

でき、牛ウイルス感染症の防疫と家畜衛生の向上に大きく貢献できるものであり、博士（獣医学）を授与するのに相応しい業績であると判定した。