

牛ウイルス性下痢ウイルス感染症における
ウイルス準種の分布と動態

(Distribution and Dynamics of Quasispecies Related with Bovine Viral Diarrhea Virus Infection)

学位論文の内容の要約

獣医生命科学研究科獣医保健看護学専攻博士後期課程 平成 24 年入学

西根 薫

(指導教員：近江 俊徳 教授)

牛ウイルス性下痢ウイルス (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鎖の一本鎖 RNA ウイルスである。本ウイルスにより引き起こされる BVDV 感染症は、畜産業界に慢性的な経済損失をもたらす牛の重要伝染病とされている。本感染症は、急性感染、持続感染及び持続感染から展開する粘膜病など、多様な病態や臨床症状を示すことを特徴とするが、そのような多様性が生じるメカニズムは解明されていない。BVDV は、細胞病原性 (CP) と非細胞病原性 (NCP) の 2 つの生物型に分類され、一般に野外に流行する BVDV は NCP である。BVDV の持続感染は NCP ウイルスでのみ成立するが、粘膜病を発症した持続感染牛からは NCP ウイルスと共に CP ウイルスが分離されることから、本感染症の病態形成には生物性状の異なるウイルスの出現や混在が関与していると考えられる。NCP ウイルスはさらに、感染細胞の抗ウイルス作用を抑制する END 陽性 (END⁺) ウイルスと、抗ウイルス作用を誘導する END 陰性 (END⁻) ウイルスに細分され、これらのウイルスが実験室株や北海道地域で分離された野外流行株に混在することが報告されている。しかし、北海道以外の野外流行株における分布や、宿主体内の分布及び変動は調査されておらず、病態との因果関係は不明である。本研究では、野外流行株及び持続感染牛体内における END⁺及び END⁻ウイルスの分布や変動を調査し、準種と BVDV 感染症の病態形成との関連性解明のための基礎的データを収集することを目的とした。

第 1 章 牛ウイルス性下痢ウイルス野外分離株を用いた準種の分布調査

BVDV の実験室株には END⁺ウイルスと END⁻ウイルスが混在し、また、野外分離株にもこれらのウイルスが様々な割合で混在することが明らかになっているが、その調査範囲は北海道に限定されていた。そこで、石川県で分離された野外株について END⁺及び END⁻ウイルスの分布を調査した。石川県で分離

された BVDV 野外流行 39 株を収集し、各株に含まれる CP ウイルス、END⁺ 及び END⁻ ウイルスの検出と定量を実施した。CP ウイルスの検出及び定量には cytopathic effect (CPE) 法、END⁺ ウイルスには END 法、END⁻ ウイルスには 逆ブラック (RPF) 法を用い、全 BVDV の定量には抗 NS3 蛋白モノクローナル抗体を用いたペルオキシダーゼ標識検査法 (PLA) を用いた。CPE 法、END 法、RPF 法により得られた各ウイルス感染価から野外流行株のウイルス構成を求めた結果、39 株は、END⁻ ウイルス優勢の 32 株 (82.0%)、END⁺ ウイルスと END⁻ ウイルスが同等量検出された 2 株 (5.1%)、END⁺ ウイルス優勢の 1 株 (2.6%)、CP ウイルスを含む 4 株 (10.3%) に分類された。以上のことから、稀であると認識されていた END⁻ ウイルスは、野外に広く分布し、END⁻ ウイルス優勢の流行株も多く存在する可能性が高いと考えられた。一方、石川県の調査結果は、END⁺ ウイルス優勢の野外株が全体の 52% を占める北海道の調査結果とは異なっていた。北海道の地域間においてもウイルス構成に差が認められたことから、準種の分布には地域性があると考えられた。地域性が生じる要因として、病原体側の要因、宿主側の要因及び時間的要因などが関与する可能性が考えられるが、現段階では不明であり、今後さらなる解析が必要である。

第 2 章 牛ウイルス性下痢ウイルスの継代培養がウイルス株内の準種構成に及ぼす影響

BVDV 野外分離株が、END⁺ ウイルスと END⁻ ウイルスを様々な割合で含んでいることが明らかとなったが、調査に用いたウイルス株は、いずれも培養細胞で数代継代されているか、あるいはその可能性が高い。そのため、野外分離株のウイルス構成と、感染牛体内のウイルス構成が異なっている可能性が残され、準種と病態の因果関係の解明に支障をきたす恐れがある。そこで、ウイルス分離継代歴が明らかな BVDV 野外分離 4 株を牛精巣細胞に接種し、20 代まで

上清継代を行った。各継代時に培養上清を回収し、全 BVDV、END⁺ウイルス及び END⁻ウイルスの各感染価をそれぞれ測定した。その結果、継代 10 代目まではウイルス構成は大きく変動しないことが確認された。一般的にウイルス分離時の継代数は 3 代前後であることから、それを加味しても、野外流行株の準種の分布に関する結果は、宿主体内のウイルス構成と大きく離れていないと考えられた。しかしながら、継代 11 代目以降から、END⁺ウイルスが優勢となり、END⁻ウイルスより 10~100 倍高い値で安定する傾向が認められた。また、2 株において END⁻ウイルスの混在によるものと考えられる END⁺ウイルスの見かけ上急激な力価変動が観察された。これらのことから、END⁺及び END⁻ウイルスを定量的に解析するためには、解析するウイルス株の継代歴や指標となる生物性状が消失する可能性を考慮する必要があると考えられた。

第 3 章 牛ウイルス性下痢ウイルス感染牛からの準種の直接的検出

これまでの調査では、ウイルス分離後の野外流行株を用いてきたが、本章では、持続感染牛の血液から END⁺及び END⁻ウイルスの直接的検出を試みた。症状が確認されていない持続感染牛 50 頭から採取した血液について、PLA 及び 5'非翻訳領域の塩基配列を増幅する RT-PCR 法を実施し、活性ウイルスを含む血液材料 26 検体を選別した。それら 26 検体について、PLA、END 法及び RPF 法により各ウイルス感染価を測定したところ、13 検体から END⁻ウイルス、22 検体から END⁺ウイルスが検出された。ウイルス構成を求めたところ、END⁺ウイルス優勢 5 検体、END⁻ウイルス優勢 1 検体、END⁺と END⁻ウイルスが同量検出された 1 検体、PLA で測定した感染価が最も高い 16 検体、PLA でのみ検出された 3 検体に分けられた。以上のことから、持続感染牛の体内に既に END⁺や END⁻ウイルスが様々な割合で混在していることが証明された。しかしながら、抗ウイルス反応の異なる準種が混在しているにもかかわらず、無症

状であることや持続感染期間が不明であることから、稟告の明瞭な検体を用いて継続的に調査していく必要があると考えられた。興味深いことに、END 法や RPF 法ではウイルスが検出できない株が 3 株確認された。これら 3 株は、既存の生物学的方法では検出できない新たな性状を持ったウイルスである可能性と、自然免疫応答が相反するウイルス同士の生物現象の相殺が生じている可能性のいずれかが考えられた。

第 4 章 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の血清中の準種構成の変動

BVDV 持続感染牛の血液中に、END⁺と END⁻ウイルスが様々な割合で混在していることが明らかになり、その混在が BVDV 感染症の病態やウイルスの伝播様式に關与する可能性が高まった。そこで、END⁺ウイルスや END⁻ウイルスが持続感染牛の体内でどのように維持されているのかを明らかにするために、その経過血清を用いてウイルス構成の経時的な変動を解析した。隔離飼育されている 3 頭の持続感染牛の経過血清について、PLA、END 法及び RPF 法を実施し、各ウイルス感染価を測定した。調査した 3 頭中、同一流行中に生まれた 2 頭の持続感染牛間でウイルス構成の変動を比較したところ、1 頭では END⁺と END⁻の両ウイルスが連続的に定量できたが、他方では、END⁻ウイルスは連続的に定量できたものの、END⁺ウイルスを定量することはできなかった。すなわち、同一流行中に生まれた個体間でもウイルス構成に差があることが明らかになった。長期間生存している 1 頭では、23 ヶ月齢までの血清では連続的に END 現象が認められたが、24 ヶ月齢以降の血清では END 現象が一切認められず、68 ヶ月齢の血清まで END⁻ウイルスのみが連続的に検出された。さらに、この長期生存個体の経過血清のうち 5 検体を選択し、N^{pro}領域について次世代シーケンサーを用いたディープシーケンシングを実施した。その結果、61 ヶ月齢以降の 2 時点において I 型インターフェロン産生の誘導に關与するアミノ酸配列

を持ったウイルス遺伝子の割合が増加する傾向にあり、遺伝学的にも END⁻ウイルスの含有率増加を示唆する結果が得られた。以上のことから、持続感染牛体内のウイルス構成は経時的に変動し、長期生存個体になると次第に END⁻ウイルスの性状が優位に現れる傾向があることが示唆された。

本研究により、END⁺ウイルスのみならず END⁻ウイルスも野外に広く分布し、野外流行株に混在していることが明らかとなった。また、これらのウイルスはともに持続感染牛体内に既に混在し、その構成も変動していることが判った。さらに、持続感染期間と END⁻ウイルスの含有率の間に関連がある可能性が見つかった。以上のことから、BVDV の準種の混在とその含有率の変動が、本病の病態の多様性の要因、又は粘膜病の形成の要因の 1 つである可能性が高いと推察された。今後、持続感染の経過中と粘膜病発症時の準種の分布を継続して調査することにより、本病の発病メカニズムが明らかになると考える。