

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)

西根 薫

日本獣医生命科学大学大学院 獣医生命科学研究科

(指導教員：近江 俊徳 教授)

平成 27 年 3 月

目次

諸言	-----	1
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	--	6
要旨	-----	7
序文	-----	8
材料および方法	-----	10
結果		
1. BVDV 野外分離株からの CP ウイルスの検出と定量	-----	14
2. BVDV 野外分離株からの END ⁺ ウイルスの検出と定量	-----	14
3. BVDV 野外分離株からの END ⁻ ウイルスの検出と定量	-----	14
4. BVDV 野外分離株の主要構成準種による分類と北海道野外株との比較	-----	15
図表	-----	16
考察	-----	19
小括	-----	23
第2章 牛ウイルス性下痢ウイルス分離株の継代培養がウイルス株内の準種構成に及ぼす影響	-----	24
要旨	-----	25
序文	-----	26
材料および方法	-----	28
結果		
1. ウイルス継代培養による全 BVDV 及び END ⁺ ウイルス感染価の定量	-----	31
2. ウイルス継代培養による END ⁻ ウイルスの感染価の定量	-----	31
3. ウイルス継代培養によるウイルス構成の変動	-----	32
4. ウイルス継代培養ごとの N ^{pro} 領域のアミノ酸配列の比較	-----	32
図表	-----	33
考察	-----	36
小括	-----	39

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	40
要旨	41
序文	42
材料および方法	43
結果	
1. BVDV 持続感染牛からの活性ウイルス検出及びウイルス遺伝子型別	46
2. 血液材料からの全 BVDV、END ⁺ 及び END ⁻ ウイルスの検出	46
3. 血液材料に含まれる準種の構成と分布	46
4. N ^{pro} 領域の推定アミノ酸配列の比較	47
図表	48
考察	52
小括	55
第4章 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の経過血清中の準種構成の変動	56
要旨	57
序文	58
材料および方法	59
結果	
1. 持続感染牛の血清中のウイルス構成の変動	62
2. 持続感染牛の経過血清中の N ^{pro} 領域のディープシーケンス	63
図表	64
考察	69
小括	72
総括	73
謝辞	76
参考文献	77

緒 言

牛ウイルス性下痢ウイルス(bovine viral diarrhoea virus; BVDV)は、豚コレラウイルス(classical swine fever virus; CSFV)および羊のボーダー病ウイルス(border disease virus; BDV)とともにフラビウイルス科ペスチウイルス属に分類される。BVDV 感染症は、牛群の体重の低下、産乳量の減少、繁殖成績の低下など慢性的な経済損失を招くことから、畜産経営に大きな経済損失をもたらす重要疾病であると考えられている[Fourichon *et al.*, 2005; Valle *et al.*, 2005]。現在、北欧諸国では BVDV の撲滅に成功しているが、日本を含む世界各地で発生が報告されている。農林水産省統計[農林水産省, 2014]による日本における BVDV 感染症の発生数は、2009 年から 2013 年で年間平均 100 件、頭数では 107 頭である。しかし、急性感染や持続感染の牛は臨床症状を示さないことが多いため、報告されている数よりも多くの感染牛が摘発を逃れている可能性が高いと考えられる。BVDV 感染症の予防には、確実なワクチン接種による集団免疫の向上と持続感染牛の摘発・淘汰が有効であると考えられている。そのため、BVDV 感染症を撲滅するためには、迅速な診断・検査系及び効果的なワクチンが必須であり、その開発や改良のためには BVDV の病態解明が求められている。

BVDV のウイルスゲノムの塩基配列により BVDV-1 と BVDV-2 の遺伝子型に大別され、BVDV-1 はさらに、1a~1r の 18 亜型に、BVDV-2 は 2a~2c の 3 亜型に分類される[Peterhans *et al.*, 2010; Yeşilbağ *et al.*, 2014]。日本での流行が確認されている亜型は 1a、1b、1c、2a である[Matsuno *et al.*, 2007]。本ウイルスは、直径 40–60nm でエンベロープを有しており[Moennig *et al.*, 1992]、ウイルスゲノムとしてプラス鎖の一本鎖 RNA を保有している[Colett *et al.*, 1988]。Internal ribosomal entry site (IRES) を含む 5'非翻訳領域 (5'UTR) と 3'非翻訳領域の間に約 12kb のオープンリーディングフレームがコードされている。ウイルス RNA は、一本のポリプロテインとして翻訳された後、細胞およびウイル

ス由来のプロテアーゼに切断され、成熟した構造および非構造蛋白になる。ゲノムは、N末端側から非構造蛋白 N^{pro}、その後4種の構造蛋白 C、E^{ns}、E1 及び E2、次いで7種の非構造蛋白 p7、NS2-3、NS4A、NS4B、NS5A 及び NS5B がコードされている [Colett *et al.*, 1988; Neill, 2013]。非構造蛋白はウイルス RNA の複製に重要であるが、N^{pro}、p7、NS2 および構造蛋白はウイルス RNA の複製には関与しないこと報告されている [Tratschin *et al.*, 1995; Behrens *et al.*, 1998]。

BVDV が健康な成牛に急性感染した場合、不顕性感染で終わるか、一過性の下痢や発熱を示した後、宿主自身の免疫により回復へ向かう。しかし、急性感染であっても、呼吸器症状や消化器症状、免疫抑制や繁殖障害、出血性の重篤な症状など、様々な臨床症状を呈することが報告されており [Pellerin *et al.*, 1994; Baker, 1995; Hessman *et al.*, 2012]、臨床症状の多様性が生じるメカニズムは明らかになっていない。また、妊娠牛に感染した場合、経胎盤感染が高率に起こり、感染時の胎齢により流産、死産、奇形等が見られ [Brownlie *et al.*, 1989; Ross *et al.*, 1986]、免疫機能が形成される胎齢 100 日前後の胎子にウイルスが感染した場合は、ウイルス抗原に対して免疫学的寛容になった子牛、すなわち持続感染牛が娩出される。持続感染牛は、臨床症状をほとんど示さずまま、自身の分泌物や排泄物から終生大量のウイルスを排出し続けるため、BVDV の慢性的な汚染と流行拡大の重要なリスク因子となる。さらに、持続感染牛は、致死的な粘膜病を発症するリスクを有することが分かっている [Brownlie *et al.*, 1984]。しかし、持続感染や胎盤感染が成立するメカニズムや、粘膜病の発症機序は未だ不明な点が多い。

本ウイルスは、遺伝子型とは別に培養細胞に対する細胞病原性の有無によって細胞病原性 (cytopathogenic; CP) と非細胞病原性 (noncytopathogenic; NCP) の二つの生物型に分類される。一般的に、野外に流行している BVDV は NCP

ウイルスである。持続感染を成立させることができるのは NCP ウイルスに限られているが、粘膜病を発症した牛からは NCP ウイルスと共に CP ウイルスが検出される [McClurkin *et al.*, 1985; Howard *et al.*, 1987]。持続感染牛に、感染している NCP ウイルスと同じ、或いは類似した抗原の CP ウイルスを実験的に重感染させることによって、粘膜病を再現することが可能であるが [Brownlie *et al.*, 1984; Boin *et al.*, 1985; Shimizu *et al.*, 1989]、野外における粘膜病の発症は、持続感染している NCP ウイルスから変異した CP ウイルスの出現が関与していると考えられている [Corapi *et al.*, 1988; Shimizu *et al.*, 1989]。

NCP ウイルスは、さらに2つの生物型に分類される。BVDV と同属の CSFV において、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus; NDV) の増殖を増強する END (exaltation of NDV) 現象を示す END 陽性 (END⁺) ウイルスと、END 現象を示さずに異種ウイルスに対する干渉現象を示す END 陰性 (END⁻) ウイルスに大別できることが明らかとなり、同時にこれらの生物性状を利用した END 法 (END⁺ウイルスの検出・定量法) や干渉法 (END⁻ウイルスの検出・定量法) が確立された [Kumagai *et al.*, 1958; Kumagai *et al.*, 1960; Shimizu *et al.*, 1970]。これらの生物性状は先に CSFV で見つかかり、後に BVDV にも合致できることが確認され、END 法や干渉法ともに BVDV の NCP ウイルスの検出定量法としても応用されるようになった [Inaba *et al.*, 1963; Nakamura *et al.*, 1993; 1997]。さらに、ペスチウイルスの干渉現象を利用した逆プラック (reverse plaque formation; RPF) 法が開発され、ウイルス株に混在する NCP ウイルス、あるいは END⁻ウイルスを単離することが可能となった [Fukusho *et al.*, 1976; Itoh *et al.*, 1983; Nakamura *et al.*, 1993; Muhsen *et al.*, 2013]。その後、END⁺ウイルスは感染細胞の I 型インターフェロン (interferon; IFN) の産生を抑制し、END⁻ウイルスは感染細胞の IFN 産生を誘導することが明らかとなった [Nakamura *et al.*, 1995; Ruggli *et al.*, 2009]。すなわち、END

⁺ウイルスと END⁻ウイルスの感染細胞における自然免疫応答は相反するため、その分布や動態が本感染症の多様な病態に関連していると推察される。しかし、これまでの END⁺ウイルスや END⁻ウイルスに係る研究には培養細胞等で繰り返し継代されている実験室株が用いられていたため、得られる知見が限られていた。そのため、野外で分離された流行株や感染動物においてこれらのウイルスがどのような分布や動態をとっているのか、また BVDV 感染症の病態とどのように関連しているのかなど不明な点が多い。

一般的に、RNA ウイルスは、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの精確性が低く、またプルーフリーディングを受けないことから遺伝子の複製エラーが高い頻度で起こる。このような小変異が蓄積することで、同種同一株であっても遺伝的多様性に富む動的なウイルス集団が形成される。これを *quasispecies* (準種) と呼び[Eigen, 1993]、ウイルスの増殖環境や選択圧によって、新たな変異ウイルスが生まれるため、病勢や薬剤感受性及び検査感度等が変化するリスクを有している[Domingo *et al.*, 2012]。準種は単に多様な変異の集団ではなく、相互に作用し合う変異体の集合であり、それらは全体としてのウイルス株の特性に寄与すると考えられている[Vignuzzi *et al.*, 2006]。このような準種概念は RNA ウイルスである BVDV にも合致すると考えられ[Collins *et al.*, 1999]、同一株に CP ウイルスや END⁺および END⁻ウイルスが混在するとの報告は、BVDV の準種を生物学的に示している。これらの知見を踏まえ、本研究では BVDV 感染が多様な病態や症状を引き起こす要因として、相反する生物性状を示す準種の混在が関連するものと仮説を立てた。

本論文は 4 章から構成されている。第 1 章では、北海道で分離された野外流行株と、石川県で分離された野外流行株を用いて、準種の分布調査を行うとともにその地域性を調べた。第 2 章では、野外流行株に含まれる準種を定量的に解析するには、ウイルスの継代培養による準種量の変動を調べる必要があると

考えられたため、野外株を培養細胞で繰り返し継代した際の END^+ 及び END^- ウイルスの量的変動を調べた。第3章では、BVDV に持続感染している牛の血液を収集し、血清に含まれる END^+ 及び END^- ウイルスの直接的な検出を試み、牛と準種の直接的調査を行なった。最後の第4章では、3頭の持続感染牛の経過血清に含まれる END^+ 及び END^- ウイルスの定量を行い、同一個体における経時的な準種量の変動を調査し、準種構成の変動と病態との関連性について検討を行なった。

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

要 旨

BVDV の実験室株には END⁺ウイルスと END⁻ウイルスが混在しており、また、著者らは、これまでに野外流行株にもそれら準種が様々な割合で混在することを明らかにしたが、その調査範囲は北海道に限定されていた。そこで、調査範囲を拡大し、END⁻ウイルスなどの準種が野外に恒常的に分布するかを調査した。石川県で分離された BVDV 野外流行 39 株を収集し、細胞変性効果 (cytopathic effect; CPE) 法、END 法、RPF 法を用いて生物性状の異なる準種を検出、定量し、分離株内の準種構成を調べた。その結果、調査した 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⁻ウイルスを含むが 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。以上の結果より、野外では稀であると考えられていた END⁻ウイルスは野外に恒常的に分布していることが明らかとなった。しかしながら、石川県の野外株の結果は、END⁺ウイルス優勢の野外株が半数以上を占めた北海道の結果とは大きく異なっており、野外分離株における準種の分布には地域差がある可能性が示唆された。

序 文

BVDV は、培養細胞に対する病原性の違いから、CP ウイルスと NCP ウイルスに分類される。CP ウイルスは感染細胞に CPE を示すが、NCP ウイルスは CPE を示さない。NCP ウイルスは、さらに、END 現象を示す END⁺ウイルスと、END 現象を示さず異種ウイルスを干渉する END⁻ウイルスに細分される。

ウイルス株に混在する END⁻ウイルスを検出する RPF 法が開発され、生物性状の異なるウイルスが準種として同一株に混在していることが明らかになった [Nakamura *et al.*, 1993]。1980、1990 年代の日本で行われていた BVDV の準種に関する研究は、実験室で維持・継代されている、いわゆる実験室株が用いられていた。その結果、一般的に NCP ウイルス株を構成するウイルスの多くが END⁺ウイルスであり、END⁻ウイルスはマイナーな存在であると考えられていた [Itoh *et al.*, 1983; Nakamura *et al.*, 1993]。しかし、野外で流行する BVDV においては、END⁻ウイルスの存在や分布については調査されておらず、実態は不明であり、病態との関連性も未知であった。そこで、筆者らは北海道内の 5 地域で分離された野外流行 90 株を用いて END⁺ウイルス及び END⁻ウイルスの存在および分布の調査を行った [Nishine *et al.*, 2014; 新井ら, 未発表]。その結果、調査した野外流行株の 52.2%が END⁺ウイルスを優勢に含んでおり、END⁻ウイルスはマイナーであるという実験室株での知見を支持する結果が得られた。一方で、END⁻ウイルスが検出された株は全体の 86.7%に至り、END⁻ウイルスで構成された流行株も存在したことから、野外には END⁻ウイルスが広く分布している可能性が示唆された。準種構成と関連する明確な疫学特性は確認されていないものの、野外流行株に生物性状の異なる準種が様々な割合で混在しているという結果から、準種の混在が BVDV の多様な病態の形成に関連する可能性が示唆された。この可能性を追求するためには、症例数を拡大した更なる解析が必要であると考えられた。そこで本研究では、調査対象地域を拡大し、

石川県で分離された BVDV 野外流行 39 株における各株の準種の検出及び定量
を行い、準種構成を求めた。

材料と方法

1. 培養細胞

初代培養細胞の牛精巣 (bovine testicular; BT) 細胞を使用した。BT 細胞の維持・継代には Eagle's minimum essential medium (MEM) (日水製薬, 東京, 日本) 基礎培養液に、牛胎子血清 (fetal bovine serum; FBS) 10%、 NaHCO_3 0.1125%、L-glutamine 2mM、硫酸ペニシリン (Meiji Seika ファルマ, 東京) 20 単位/mL 及び硫酸ストレプトマイシン (Meiji Seika ファルマ) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、を添加した細胞増殖用培養液を使用した。BT 細胞は RT-PCR 法によりペスチウウイルスの迷入がないこと、FBS はペスチウイルスおよび抗 BVDV 抗体がいずれも陰性であることをした [Kozasa *et al.*, 2011]。

2. ウイルス

野外材料に、石川県南部家畜保健衛生所で分離された BVDV 野外分離 39 株を用いた。その内訳は、急性感染牛由来 3 株、持続感染牛由来 29 株、粘膜病発症牛由来 4 株であった。粘膜病発症牛由来のうち 3 株では、CP と NCP が両方単離されており (IS25CP/01 と IS26NCP/01、IS27CP/01 と IS28NCP/01、IS30CP/03 と IS31NCP/03)、これらはそれぞれを 1 株としてカウントした。残りの 1 株 (IS5CP/95) と同一の牛由来で粘膜病を発症する前の持続感染の分離株 (IS3NCP/95) も含まれており、それぞれを別の分離株としてカウントした。これらのウイルス分離に用いられた培養細胞やウイルスの継代歴は分離株によって異なっていた。各株は本研究において BT 細胞を用いて、5 日間培養され、その培養上清を調査材料とした。回収した培養上清は -80°C で保存し、解析時に融解して使用した。BVDV の培養並びに感染価の測定には NaHCO_3 を 0.15% の割合で加えた維持培養液を使用した。

NDV 宮寺株、VSV ニュージャージー株を使用した。NDV は SPF 発育鶏卵を

用いて、VSVはアフリカミドリザル腎臓上皮由来（Vero）細胞でそれぞれ培養し、攻撃用ウイルスとして使用した。

3. 準種の検出と定量

3-1. CPE法

CPウイルスの検出及び定量はBT細胞におけるCPEを指標とする限界希釈法（CPE法）により実施した。調査材料を維持培養液で 10^{-1} から 10^{-8} まで10倍階段希釈し、BT細胞浮遊液0.1mLと同時に96ウェルプレート（Corning, New York, USA）に1希釈当たり5ウェル、1ウェルあたり50 μ Lずつ添加した。37°Cの5%CO₂インキュベーターで5日間培養し、CPEの出現の有無を観察した。CPEの出現したウェルをCPウイルス陽性としてBehrens-Kärber法[Kärber, 1931]により50%組織培養感染価（50% Tissue Culture Infectious Dose; TCID₅₀）を算出し、CPウイルス感染価とした。

3-2. END法

END⁺ウイルスの検出及び定量はBT細胞におけるEND現象を指標とする限界希釈法（END法）で実施した。本法はInabaら[Inaba *et al.*, 1963; 1968]の方法に準じて実施した。CPE法において培養5日目にCPEが確認されなかった細胞に、 10^6 TCID₅₀に調整したNDV浮遊液を1ウェルあたり0.1mLずつ加えた。さらに37°Cの5%CO₂インキュベーターで4日間培養し、END現象（NDVのCPEの増強）の有無を確認した。END現象が確認されたウェルはEND⁺ウイルス陽性としてTCID₅₀を算出し、END⁺ウイルス感染価とした。

3-3. ペルオキシダーゼ標識検査法（peroxidase-linked assay; PLA）

生物性状を問わないBVDVの検出・定量はペルオキシダーゼ標識検査法（peroxidase-linked assay; PLA）で行った[OIE, 2014]。維持培養液で調査材

料を 10^{-1} から 10^{-8} まで 10 倍階段希釈し、BT 細胞浮遊液 0.1mL と同時に 96 ウェルプレートに 1 希釈当たり 4 ウェル、1 ウェルあたり 50 μ L ずつ添加し、37°C の 5%CO₂ インキュベーターで培養した。培養 5 日後の細胞をリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline; PBS) で洗浄し、乾燥させた後、75°C で 1 時間熱固定した。一次抗体に抗ペスチウイルス NS3 モノクローナル抗体 JCU/BVD/CF10 (TropBio, Queensland, Australia) を使用し、抗体希釈液 (Tween20 0.05%加 PBS、牛血清アルブミン (フラクション V) 1%) で 1000 倍に希釈して使用した。一次抗体液は 1 ウェルあたり 50 μ L ずつ添加し、37°C のインキュベーター内で反応させた。1 時間反応させた後、抗体液を除去し、PBS で細胞を洗浄した。二次抗体には西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (SurModics, Eden Prairie, MN, USA) を抗体希釈液で 1000 倍に希釈して使用した。PBS を除去し、二次抗体液を 1 ウェルあたり 50 μ L ずつ添加した後、再び 37°C のインキュベーター内で反応させた。1 時間反応させた後、抗体液を取り除き、PBS で細胞を洗浄した。PBS を取り除き、基質液 (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol 1 錠を N,N-Dimethyl formamide 2.5mL に溶解したもの 0.25mL、50mM Acetate Buffer (pH5.0) 5mL、30% H₂O₂ 7 μ L) を 1 ウェルあたり 50 μ L ずつ添加し、37°C のインキュベーター内で反応させた。反応時間は約 30 から 40 分とした。発色した細胞が確認されたウェルを BVDV 陽性として TCID₅₀ を算出し、BVDV 感染価とした。

3-4. 逆ブラック (RPF) 法

END⁻ウイルスの検出及び定量は、Fukusho ら[Fukusho *et al.*, 1976]及び Nakamura ら[Nakamura *et al.*, 1993]が報告した RPF 法を一部改良して実施した。維持培養液で調査材料を 10 倍階段希釈し、END⁺ウイルス感染価を参考に任意の希釈域の材料を接種した。6 ウェルマルチプレートに単層に培養した BT

細胞に 1 希釈あたり 2 ウェル、1 ウェルあたり 50 μ L ずつ接種した。なお、細胞の乾燥を防ぐために各ウェルに 500 μ L の維持培養液を追加した。37 $^{\circ}$ C \cdot 5%CO $_2$ 条件下で 1 時間静置した後に、接種液を取り除き、3%メチルセルロース加重層培養液を 1 ウェルあたり 4mL 重層し、37 $^{\circ}$ C \cdot 5%CO $_2$ 条件下で培養した。培養 5 日目に、細胞面からメチルセルロース加重層培養液を除去し、multiplicity of infection (MOI) ≥ 2 plaque formation unit (PFU) となるように調整した VSV 浮遊液 1mL を添加し、37 $^{\circ}$ C \cdot 5%CO $_2$ 条件下で静置した。接種 1 時間後に、接種液を除去し、2%メチルセルロース加重層培養液を 4mL 再び重層し、37 $^{\circ}$ C \cdot 5%CO $_2$ 条件下で培養した。培養 3 日目に、メチルセルロース加重層培養液の上からメタノールを加えて、3~4 時間室温で静置し、細胞の固定及びウイルスの不活化を実施した。流水でメチルセルロース維持培地を除去し、0.25%クリスタルバイオレット溶液（クリスタルバイオレット 0.25%、ホルマリン 7.5%、メタノール 10%、蒸留水）で染色後、逆プラックの数を測定した。逆プラックが検出された最高希釈の 2 ウェルの平均逆プラック数から PFU を算出し、END-ウイルス感染価とした。

4. 石川県の野外流行株のウイルス構成の決定及び北海道の野外流行株との比較

CPE 法、END 法、RPF 法、PLA で得られた感染価を比較し、各分離株の推定主要ウイルスを決定した。なお、感染価の差が 2 倍以内の場合は同等量であると判断し、PLA と同等量であった場合、そのウイルスを主要ウイルスとした。

次に、北海道 5 地域で分離された野外流行株の調査結果と [Nishine *et al.*, 2014; 新井ら,未発表]、石川県の野外流行株の準種定量の結果を比較した。北海道の流行株調査では、PLA を実施していない株が存在したため、地域間の比較には、END 法及び RPF 法による感染価の比較を行った。なお、CP ウイルスが検出された場合、その感染価に関係なく CP ウイルス検出株と分類した。

結 果

1. BVDV 野外分離株からの CP ウイルスの検出と定量

調査材料を作成するために野外分離 39 株を BT 細胞で 1 代継代した結果、IS25CP/01、IS27CP/01、IS30CP/03 の 3 株で CPE が認められた。次に、1 代継代して得た調査材料で CPE 法を実施した結果、IS5CP/95、IS25CP/01、IS27CP/01 及び IS30CP/03 の 4 株で CP ウイルスが検出された（表 1）。そのうち、IS5CP/95、IS25CP/01 及び IS27CP/01 では CP ウイルスを定量することができたが、IS30CP/03 では、CP ウイルス陽性ウェルが少なかったため、感染価を求めることができなかった。

2. BVDV 野外分離株からの END⁺ウイルスの検出と定量

CP ウイルスを含む材料で END 法を実施する場合、BVDV の CPE が出現するため END 現象の判定が困難となる。そのため、END 法は CP ウイルスが検出された 4 株を除く野外分離株 35 株について実施した。その結果、19 株から END⁺ウイルスが検出された（表 1）。19 株のうち 6 株で END⁺ウイルス感染価を求めることができたが、他の 13 株は、END⁺ウイルス陽性のウェルは確認できるものの、その出現が用量依存的でなかったため、感染価を求めることができなかった。

3. BVDV 野外分離株からの END⁻ウイルスの検出と定量

野外分離株 39 株について、RPF 法による END⁻ウイルスの検出と定量を行った。その結果、CP ウイルスが検出された分離株も含め、すべての分離株から END⁻ウイルスが検出された（表 1）。END⁻ウイルス感染価の幅は $10^{3.0} \sim 10^{7.7}$ PFU/mL であり、もっとも高い感染価を示した株は IS25CP/01 であった。

4. BVDV 野外分離株の主要構成準種による分類と北海道野外株との比較

各検査法によって得られたウイルス感染価から、各野外分離株を構成する主要なウイルスをもとに分類した。その結果、END⁺ウイルスを主要ウイルスとする野外株が1株(2.6%)、END⁻ウイルスを主要ウイルスとする野外株が18株(46.1%)、PLAによるウイルス感染価が最も高かった野外株が20株(51.3%)であった。

次に、END法とRPF法によるウイルス感染価のみを用いて各野外分離株の主要ウイルスを決定し、これまでに得られている北海道の5地域で分離された野外分離株のウイルス構成と比較した(表2, 図1)。北海道の地域A、B及びCでは、END⁺ウイルスを主要ウイルスとして含んでいる株の割合が多く、END⁻ウイルス優勢の分離株は地域Bの2株のみであった。地域DとEではEND⁻ウイルス優勢の分離株が約半数を占め、同じ北海道内においても準種の分布に差があることが判明した[Nishine *et al.*, 2014; 新井ら, 未発表]。北海道全体と石川県を比較すると、END⁺ウイルス優勢の株は北海道では全体の52.2%であるのに対し、石川県ではわずか2.6%に留まり、END⁻ウイルス優勢株については北海道では26.7%であったのに対し、石川県では全体の82.0%であった。

表1 野外分離株の各準種量と準種構成

ウイルス株名	生物型	ウイルス量				主要準種
		PLA ¹⁾	CPE法 ¹⁾	END法 ¹⁾	RPF法 ⁴⁾	
IS1NCP/90	NCP	5.69	- ²⁾	+ ³⁾	5.00	BVDV ⁵⁾
IS2NCP/95	NCP	5.69	-	+	4.48	BVDV
IS3NCP/95	NCP	4.69	-	+	5.30	END ⁻
IS4NCP/95	NCP	4.94	-	+	3.90	BVDV
IS5CP/95	CP	5.64	4.84	-	4.48	BVDV
IS6NCP/95	NCP	5.19	-	+	6.00	END ⁻
IS7NCP/97	NCP	6.69	-	+	7.00	END ⁻
IS8NCP/97	NCP	5.69	-	5.64	4.00	END ⁺
IS9NCP/97	NCP	4.69	-	4.24	4.00	BVDV
IS10NCP/98	NCP	5.94	-	-	5.60	BVDV
IS11NCP/98	NCP	3.69	-	-	4.48	END ⁻
IS12NCP/98	NCP	5.19	-	+	5.00	END ⁻
IS13NCP/99	NCP	5.69	-	+	6.00	END ⁻
IS14NCP/99	NCP	6.19	-	+	6.00	END ⁻
IS15NCP/99	NCP	3.19	-	-	4.48	END ⁻
IS16NCP/99	NCP	6.19	-	5.44	6.00	END ⁻
IS17NCP/99	NCP	4.94	-	-	5.70	END ⁻
IS18NCP/99	NCP	5.44	-	-	4.00	BVDV
IS19NCP/99	NCP	5.19	-	-	4.30	BVDV
IS20NCP/99	NCP	5.69	-	-	3.00	BVDV
IS21NCP/00	NCP	6.69	-	-	6.70	END ⁻
IS22NCP/00	NCP	7.19	-	+	7.60	END ⁻
IS23NCP/00	NCP	7.19	-	+	6.48	BVDV
IS24NCP/00	NCP	6.19	-	-	5.00	BVDV
IS25CP/01	CP	7.24	7.24	-	7.70	END ⁻
IS26NCP/01	NCP	6.94	-	-	4.90	BVDV
IS27CP/01	CP	4.84	4.84	-	6.00	END ⁻
IS28NCP/01	NCP	6.44	-	-	6.60	END ⁻
IS29NCP/03	NCP	6.69	-	5.24	6.60	END ⁻
IS30CP/03	CP	4.44	+	-	4.90	END ⁻
IS31NCP/03	NCP	6.69	-	-	6.60	BVDV
IS32NCP/03	NCP	6.94	-	-	4.00	BVDV
IS33NCP/03	NCP	7.44	-	+	4.70	BVDV
IS34NCP/03	NCP	6.44	-	-	4.30	BVDV
IS35NCP/03	NCP	7.19	-	-	4.78	BVDV
IS36NCP/04	NCP	7.44	-	+	6.00	BVDV
IS37NCP/05	NCP	7.19	-	6.24	6.48	BVDV
IS38NCP/04	NCP	6.94	-	6.04	6.70	END ⁻
IS39NCP/06	NCP	5.44	-	-	4.60	BVDV

1) $\log_{10}(0.69 \times \text{TCID}_{50})/\text{mL}$ 2) 不検出 3) 検出されたが定量不可 4) $\text{Log}_{10}\text{PFU}/\text{mL}$

5) PLAによる感染価が最も高いため判定不能

表2 北海道および石川県で分離されたBVDV野外分離株の準種構成(PLAの結果を除く)

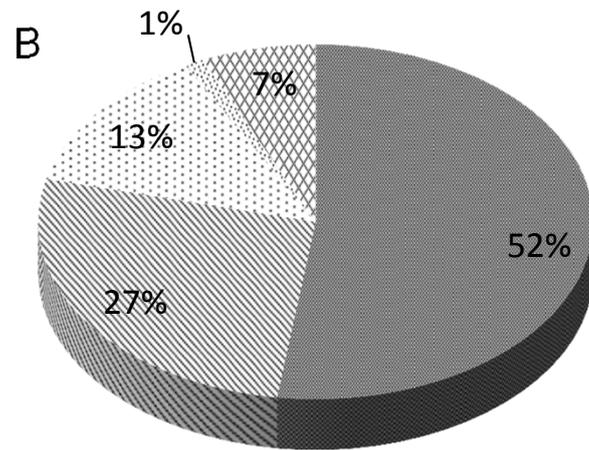
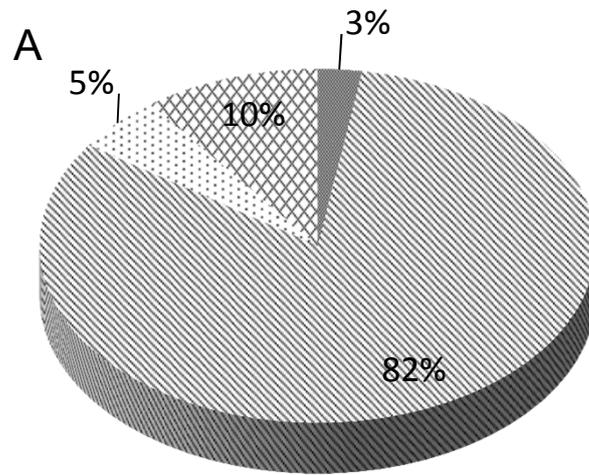
分離地域	主要準種					合計
	END ⁺	END ⁻	END ⁺ = END ⁻³⁾	不明 ⁴⁾	CP検出	
北海道全体	47 ¹⁾ (52.2) ²⁾	24 (26.7)	12 (13.3)	1 (1.1)	6 (6.7)	90
A	19 (95.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.0)	20
B	8 (57.1)	2 (14.3)	4 (28.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	14
C	8 (72.7)	0 (0.0)	3 (27.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	11
D	7 (35.0)	10 (50.0)	2 (10.0)	1 (5.0)	0 (0.0)	20
E	5 (20.0)	12 (48.0)	3 (12.0)	0 (0.0)	5 (20.0)	25
石川県	1 (2.6)	32 (82.0)	2 (5.1)	0 (0.0)	4 (10.3)	39

1) 株数

2) パーセント(%)

3) ウイルス感染価の差が2倍以内

4) PLA陽性, END⁺及びEND⁻ウイルス不検出



■ END+ ■ END- ■ END+=END- ■ CP ■ 不明

図1 BVDV野外分離株の主要構成ウイルスによる分類

北海道及び石川県の野外分離株を構成する主要な準種の分布。(A)石川県分離株39株:END⁺:1株、END⁻:32株、END⁺=END⁻:2株、CP:4株。(B)北海道分離株90株:END⁺:47株、END⁻:27株、END⁺=END⁻:9株、不明:1株、CP:6株。

考 察

RNA ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼは、正確性が低く、プルーフリーディング機能がないためゲノム複製中のエラー率が高い。そのため、複製が繰り返されることで小変異が蓄積し、宿主体内では遺伝的に多様なウイルス集団が形成、維持されると考えられる。この現象は準種と呼ばれ、1971年に Eigen によって提唱された [Eigen, 1993]。この高い遺伝的多様性は、ウイルスが宿主の免疫応答や抗ウイルス治療薬を回避することを可能にする、「適応」という利点になると考えられている [Thiel *et al.*, 2002]。また、口蹄疫ウイルス、ポリオウイルス、ウエストナイルウイルス及び CSFV において、準種が病原性に影響するという報告がある [Sanz-Ramos *et al.*, 2008; Vignuzzi *et al.*, 2006; Jerzak *et al.*, 2007; Töpfer *et al.*, 2013]。これらの報告では、いずれも準種の多様性や動態をゲノム配列の多様性で捉えているが、それらを活性ウイルスとして捉えることは未だ困難である。日本における BVDV と CSFV の研究では、ウイルスが培養細胞に対していくつかの異なる生物学的性状を示すことが知られており、CPE 法や END 法、RPF 法により、同一株内に混在する少なくとも 3 種類の準種を活性ウイルスとして検出、定量することが可能である [Nakamura *et al.*, 1993]。

BVDV 感染における NCP ウイルスによる持続感染の成立と、CP ウイルスの出現による粘膜病の発症を考えると、本感染症が多様な病態や臨床症状示すメカニズムも準種の変動が関与している可能性が示唆されている。そのメカニズム解明の基礎データを得るために、野外で流行する BVD ウイルス株に含まれる END⁺ウイルスや END⁻ウイルスの分布調査を継続的に行ってきた。これまでの分布調査は、いずれも調査地域が北海道に限定されていたが [Nishine *et al.*, 2014; 新井, 未発表]、本章では、対象地域を拡大し、石川県で分離された野外株を用いて END⁺及び END⁻ウイルスの分布調査を行なった。

石川県で分離された野外流行株に含まれる CP ウイルス、NCP ウイルスである END⁺及び END⁻ウイルスのそれぞれの含有量を調査した。その結果、39 株中 4 株から CP ウイルスが検出され、うち 3 株 (IS5CP/95、IS25CP01、IS27CP/01) で定量することができた。これら 3 株から END⁺ウイルスは検出されなかったが、RPF 法で END⁻ウイルスが検出され、その感染価は CPE 法の感染と同等か、それ以上であった。また、3 株中 2 株ではペアウイルス (IS26NCP/01、IS28NCP/01) からも END⁺ウイルスは検出されず、END⁻ウイルスのみが検出された。これらの結果から、粘膜病発症時のウイルス構成は CP ウイルス及び END⁻ウイルス主体で構成されている可能性が考えられた。CP ウイルスを定量することができなかった株 (IS30CP/03) は、BT 細胞で最初に培養した際に CPE の出現が認められたが、その培養上清を用いた CPE 法では、CPE が確認されなかった。これは、最初に BT 細胞で培養した際に、CP ウイルスよりも NCP ウイルスが優勢になった可能性が考えられた。

RPF 法では、調査した 39 株すべてから END⁻ウイルスが検出された。北海道 5 地域の野外流行株においても END⁻ウイルスが全体の 83.3%から検出されたことから、END⁻ウイルスが野外に広く分布している可能性が高いと考えられた。一方、END 法によるウイルス定量では、CP ウイルス検出株を除く 35 株中 19 株で END 現象が確認されたが、定量ができたのは 6 株のみであった。北海道 5 地域の野外流行株では全体の 77.8%で END⁺ウイルスが定量できたのに対し、石川県の流行株で END⁺ウイルスを定量できたのはわずか 15.4%に留まり、大きく異なる結果であった。END 現象が認められた分離株では、低希釈領域で END 現象が消失するゾーン現象が認められた。ゾーン現象の出現は、END⁻ウイルスの干渉作用により END 現象が消失することに起因すると考えられている [Shimizu *et al.*, 1971]。榎戸ら (未発表) は、END⁺ウイルスと END⁻ウイルスが混在する状況下での END 法の検出限界は END⁺:END⁻=10:1~50:

1 の間にあり、これ以上差が近づくと END 現象が出現しにくくなると報告している。このことから、END⁺ウイルスの定量ができなかった 13 株は、END⁻ウイルスに対し、END⁺ウイルス量が END 法の検出限界以下であると考えられた。しかしながら、調査した 39 株の中には、END⁺ウイルスと END⁻ウイルスの感染価が同等の分離株が 2 株存在し、END 法の検出限界の報告に矛盾する。また、このような分離株は、北海道の野外流行株調査でも確認されている[Nishine *et al.*, 2014]。その原因は不明であるが、野外流行株は異なった性状のウイルスが多様に混在するウイルス集団であると推察され、END⁻ウイルスの混在とは別の要因が END 法の検出感度に影響していると考えられる。

続いて、CPE 法、END 法、RPF 法および PLA の 4 種類の検査法で得られたウイルス感染力価を比較し、各野外流行株を構成する推定主要ウイルスを決定したところ、PLA による感染力価が最も高い野外株が全体の半数以上を占める結果となった。この結果は、END⁺ウイルスと END⁻ウイルスの混在による生物性状の相殺が生じ、得られた感染価が見かけ上の感染価になっている可能性が考えられた。特に、先述したように END 法は END⁻ウイルスの影響を受けるため、END⁻ウイルスが優勢である場合、混在する END⁺ウイルスを定量することは困難であり、見かけ上、不検出となる可能性がある。また、野外分離株が多様なウイルス集団であることから、END 現象も VSV 干渉も示さない新たな性状の BVDV が存在する可能性も考えられた。

北海道の野外流行株を用いた調査では、PLA を実施していない野外株が存在するため、CPE 法と END 法、RPF 法で得られたウイルス感染力価を用いて、北海道と石川県の地域間での準種構成を比較検討した。その結果、石川県の野外株は全体の約 8 割が END⁻ウイルス優勢で、やはり END⁺ウイルス優勢が半数を占める北海道の野外分離株の結果とは大きく異なる結果であった。準種の分布に多様性及び地域差が生じる要因として、病原体側の要因（調査に用いる

までの野外分離株の継代歴、遺伝子型など) や宿主側の要因 (採材時の牛の年齢、品種、ワクチン接種状況など)、時間的要因 (分離された時期など) 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と考えられた。地域差が生じる要因についてより詳細な解析を行うためには、分離株に係る各特性を統一化する等より体系的な調査を行なっていくことが必要であると考えられる。

小 活

これまでに行なってきた BVDV 野外流行株を用いた準種の分布調査は、対象地域が北海道に限定されていたため、石川県で分離された野外流行株を用いて同様の調査を行なったところ、以下の成績を得た。

1. CP ウイルスが定量できた 3 株は、いずれも CP ウイルスの感染価と同等かそれ以上の END⁻ウイルスが検出された。また、ペアウイルスにあたる NCP 株からは END⁺ウイルスが検出されず、END⁻ウイルス優勢であったことから、粘膜病発症時の分離株では CP ウイルス及び END⁻ウイルスが主要構成ウイルスである可能性が考えられた。
2. 19 株において END 現象が認められ、そのうち 6 株で END⁺ウイルスを定量することができた。END⁺ウイルスが定量できなかった 13 株は、END⁻ウイルスの混在により END 現象が抑制されたと考えられた。
3. 調査したすべての野外流行株から END⁻ウイルスが検出された。この結果から、北海道のみならず石川県の野外でも END⁻ウイルスが広く分布していることが明らかとなった。
4. ウイルス構成は、北海道の野外流行株では END⁺ウイルス優勢株が 52.2%、END⁻ウイルス優勢株が 30.0%であったが、石川県の野外流行株では END⁻ウイルス優勢株が 82%を占めた。この結果から、野外流行株のウイルス構成は地域間で差があることが明らかとなった。

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

要 旨

BVDV 野外流行株の多くに、END⁺ウイルスと END⁻ウイルスが様々な割合で混在しているが、本研究で用いた野外分離株は、いずれも培養細胞で数代継代されている、或いはその可能性が高い。従って、使用した材料のウイルス構成と、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、準種と病態の関連解析に支障をきたす恐れがある。そこで、ウイルス分離の際にのみ培養細胞で培養されたことが明らかな野外分離 4 株を BT 細胞を用いて 4 日間隔で 20 代継代し、各継代時に採取した培養上清中の全 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、ウイルス構成の変動を調べた。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。本研究に用いた野外分離株は全て、家畜保健衛生所から分与されたウイルス株であり、継代数は 10 代以下である可能性が高いと考えられたことから、野外流行株における準種の分布に関する結果は、宿主体内のウイルス構成と反映している可能性が強く示唆された。しかしながら、継代 10 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。これらの結果から、準種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を考慮する必要があると考えられた。

序 文

ペスチウイルスをはじめ多くの RNA ウイルスは、遺伝的に多様なウイルス集団であると考えられ、準種と呼ばれる[Eigen, 1993]。従って、準種は様々な変異ウイルスを含んでおり、様々な内的・外的要因で変異株の構成が変動していると考えられる。特に、宿主から受ける様々な選択圧で準種の構成が変動することはよく知られ、ウイルスの性状変化、病原性の変化[Vignuzzi *et al.*, 2006; Töpfer *et al.*, 2013]、薬剤耐性[Thiel *et al.*, 2002; Sheldon *et al.*, 2014]、ウイルス検査感度の変化に深く関わっていると考えられる。

非細胞病原性 BVDV は、END⁺ウイルスと END⁻ウイルスの少なくとも 2 種類の準種に分類され、両ウイルスが同一株内に混在していることが知られる。実験室株を構成するウイルスの大部分を END⁺ウイルスが占めていることから、END⁻ウイルスは稀な準種と考えられていた[Nakamura *et al.*, 1993]。しかし、野外流行株の多くが END⁻ウイルスを含んでおり、END⁺ウイルスとの割合も様々であることが明らかとなった[Nishine *et al.*, 2014]。この事実は、I 型 IFN 産生を抑制する END⁺ウイルス[Nakamura *et al.*, 1995; Ruggli *et al.*, 2009]と、IFN 産生を誘導する END⁻ウイルス[Ruggli *et al.*, 2009]が同一株内に混在して野外で流行していることを意味し、BVDV 感染症の多様な病態に関与している可能性を有している。一方、野外流行株の分離において、通常 1 回から数回の細胞を用いたウイルス継代を行う。従って、牛体内の元来のウイルス構成が宿主としての培養細胞から受ける影響によって変動している可能性があり、病態解析の支障になる可能性が残った。すなわち、株内のウイルス構成と BVDV 感染症が引き起こす病態多様性との関連を解析するためには、培養細胞を用いるウイルス継代によってウイルス構成がどれだけ変動するかを予め調査する必要があると考えた。そこで、継代歴が明らかな野外分離株を培養細胞で長期に亘って継代し、継代毎の培養上清中の END⁺ウイルス及び END⁻ウイルスの感染

価を定量することで、ウイルス継代がウイルス構成に及ぼす影響を調べることが目的とした。

材料と方法

1. 培養細胞

培養細胞には、BT 細胞を使用した。細胞増殖用培養液は、第一章で用いた培養液と同じ組成のものを使用した。なお、BVDV の継代及び感染価の測定には第 1 章で用いた維持用培養液と同様、 NaHCO_3 を 0.15% の割合で加えた培養液を使用した。

2. ウイルス

石川県で分離された BVDV 野外流行株のうち、臨床材料からウイルスを分離する操作でのみ細胞で培養したことが明らかな 4 株 (IS22NCP/00、IS36NCP/04、IS37NCP/05 及び IS38 NCP/04) を用いた (表 3)。

END 法を実施するために NDV の宮寺株を、RPF 法を実施するために VSV のニュージャージー株を使用した。それぞれ、第 1 章に記載の方法で調整した。

3. BVDV 野外株の継代培養

6 ウェルマルチプレートに単層に培養した BT 細胞に $500\mu\text{L}$ の新しい維持用培養液を加え、BVDV 野外流行株 4 株を $50\mu\text{L}$ ずつそれぞれ接種し、 37°C の $5\%\text{CO}_2$ インキュベーターに静置し。接種 1 時間後に接種液を吸引除去し、新たに 2mL の維持用培養液を加え、 37°C の $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター内で 4 日間培養した。培養上清を遠心管に回収し、 $1,000$ revolution per minute (rpm) で 5 分間遠心した後、遠心上清を passage number 2 (p.2) とした。遠心上清 $100\mu\text{L}$ を 6 ウェルプレートに新たに単層培養した BT 細胞に新しい維持用培養液 $500\mu\text{L}$ と共に接種した。残りの上清は -80°C で保存した。遠心上清 p.2 を接種した BT 細胞を、 37°C の $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター内で 1 時間静置した後、接種液を吸引除去し、新たに 2mL の維持用培養液を加え、4 日間培養し、ウイルス

継代を行った。この継代を培養上清 p.20 が得られるまで繰り返した。

4. 各準種の検出と定量 (END 法、PLA、RPF 法)

END 法、PLA、RPF 法は、それぞれ第 1 章の「材料と方法」の「3-2. END 法」、「3-3. ペルオキシダーゼ標識検査法 (PLA)」、「3-4. 逆ブラック (RPF) 法」と同様に行った。

5. N^{pro} 遺伝子配列の決定

5-1. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

ウイルス継代中に保存した各培養上清のうち IS22NCP/00 株、IS37NCP/05 株及び IS38NCP/06 株については p.2、p.10、p.20、IS36NCP/04 については p.3、p.9、p.20 から全 RNA を抽出した。抽出には High Pure Viral RNA Kit (Roche, Basel, Switzerland) を使用し、添付のマニュアルに従い実施した。

抽出した全 RNA を鋳型に RT-PCR 法による N^{pro} 遺伝子領域の増幅を行った。RT-PCR 法には、Prime Script RT-PCR kit (タカラバイオ, 大津, 日本) を用い、添付のマニュアルに従って実施した。プライマーは、既報の NADL 株 [accession number M31182] および Osloss 株 [accession number M96687] の塩基配列を基に、I 型 IFN 産生制御を担っているとされる N^{pro} をコードする領域を挟むように、上流プライマーを 277F (5'-AGG GCA TGC CCA AAG CAC ATC TT-3')、下流プライマーを 1028R (5'-CCT GGT ATT TGA CTC CAT CTA CCA CTA T-3') と設計し、使用した。遺伝子の増幅は、PCR Thermal Cycler (タカラバイオ) を用いて、94°C で 3 分加熱した後、94°C・30 秒、56°C・30 秒、72°C・1 分を 1 サイクルとして、30 サイクル反応させ、最後に 72°C・3 分の追加伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、2.0% アガロースゲル (関東化学, 東京, 日本) を用いて、100V で 30 分間の電気泳動を行い、泳動後、紫外線照射撮影により PCR 増幅産物の有無を確認した。

5-2. PCR産物の塩基配列の決定

得られた PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hiden, Germany)を用いて、添付のマニュアルに従って精製した。精製した PCR 産物の濃度を分光光度計 Nano Drop 1000 (Thermo fisher scientific, Massachusetts, USA) を用いて濃度を測定した。濃度調整した精製 PCR 産物と 1.6 μ M に調整した各プライマーをそれぞれ混合し、塩基配列の決定は ユーロフィンジェノミクス株式会社 (ユーロフィンジェノミクス株式会社, 東京, 日本) に委託した。塩基配列の解析は GENETYX version 9.0.7 ソフトウェア (Genetyx, 東京, 日本) を用いて行った。

結 果

1. ウイルス継代培養による全 BVDV 及び END⁺ウイルス感染価の定量

BVDV 野外流行株 4 株を 20 代まで継代し、各継代時の培養上清について、抗 NS3 モノクローナル抗体を用いた PLA および END 法による、全 BVDV 及び END⁺ウイルスの感染価をそれぞれ求めた。その結果、いずれの株も p.1 から p.20 までの全てで PLA により BVDV が検出され、その感染価は $10^{4.0} \sim 10^{8.2}$ TCID₅₀/mL で推移した (図 2)。END⁺ウイルスの検出では、IS22NCP/00 および IS38NCP/04 では p.1 から p.20 まで連続的に検出され、その感染価は $10^{5.4} \sim 10^{8.0}$ TCID₅₀/mL の範囲にあった (図 2 - A 及び D)。IS37NCP/05 では、p.1 および p.4 において END 現象が用量依存的な出現ではないために END⁺ウイルスを定量できなかつたものの、p.5 以降は持続的に END⁺ウイルスが検出、定量された (図 2 - C)。IS36 NCP/04 では、p.1 から p.11 まで END 現象が全く認められない又は非用量依存的で定量できなかつたものの、p.12 以降は断続的であるものの END⁺ウイルスが定量可能な培養上清が増えた (p.12、13、15、17 及び 20) (図 2 - B)。

2. ウイルス継代培養による END⁻ウイルス感染価の定量

継代培養した BVDV 野外分離 4 株の継代毎の培養上清について、RPF 法による END⁻ウイルス感染価の測定を行った。その結果、全 4 株においていずれの培養上清からも逆ブラックが出現し、END⁻ウイルスが検出された (図 2)。逆ブラックの出現は、用量依存的ではないものも多く、野外株や継代ポイントにより様々であった。

3. ウイルス継代培養によるウイルス構成の変動

得られた継代毎の END⁺ウイルス及び END⁻ウイルス感染価をもとに準種構成を求め、ウイルス継代培養によるその変動を解析した (図 2)。その結果、IS22NCP/00、IS37NCP/05 および IS38NCP/04 の 3 株は、p.1 から p.20 まで安定的に END⁺及び END⁻ウイルスが検出され、継代の前半では全 BVDV の感染価と、END⁺及び END⁻ウイルスの感染価が近似していた (図 2-A、C 及び D)。しかし、p.10 以降には、END⁺ウイルス感染価が、END⁻ウイルスのそれより約 10 倍高い値で推移した。IS36NCP/04 では、p.1 から p.11 まで END⁺ウイルスが検出されない、あるいは定量できなかったが、p.12 以降からは END⁺ウイルスの検出率が上がり、p.12、13、15、17、20 で定量することができた (図 2-B)。その時の準種構成は、いずれも END⁺ウイルス感染価の方が優位で、END⁻ウイルスは END⁺ウイルスのそれより約 10 から 100 倍低い感染価であった。

4. ウイルス継代培養ごとの N^{pro}領域のアミノ酸配列の比較

ウイルス継代培養した 4 株の継代初期 (p.2 または p.3)、中期 (p.9 または p.10) および後期 (p.20) の培養上清から RNA を抽出し、ダイレクトシーケンス法を用いて N^{pro}領域 (504nt) の塩基配列を決定し、継代毎の推定アミノ酸の配列 (aa168) を比較した。その結果、最も感染価の高い準種が変化しているにもかかわらず、N^{pro}のアミノ酸配列に変化は認められなかった (表 4)。また、同一株由来の END⁺と END⁻ウイルスの間で N^{pro}のアミノ酸の相違が報告されているが [Muhsen *et al.*, 2013]、本研究で得られた N^{pro}のアミノ酸配列においては、報告されているアミノ酸相違点はいずれも END⁺ウイルスで認められたアミノ酸であった。

表3 ウイルス継代培養に供したBVDV野外分離株

ウイルス株名	生物型	遺伝子型	病態	ウイルス 継代歴
IS22NCP/00	NCP	1a	持続感染	1
IS36NCP/04	NCP	1b	持続感染	1
IS37NCP/05	NCP	1c	持続感染	1
IS38NCP/04	NCP	1c	持続感染	1

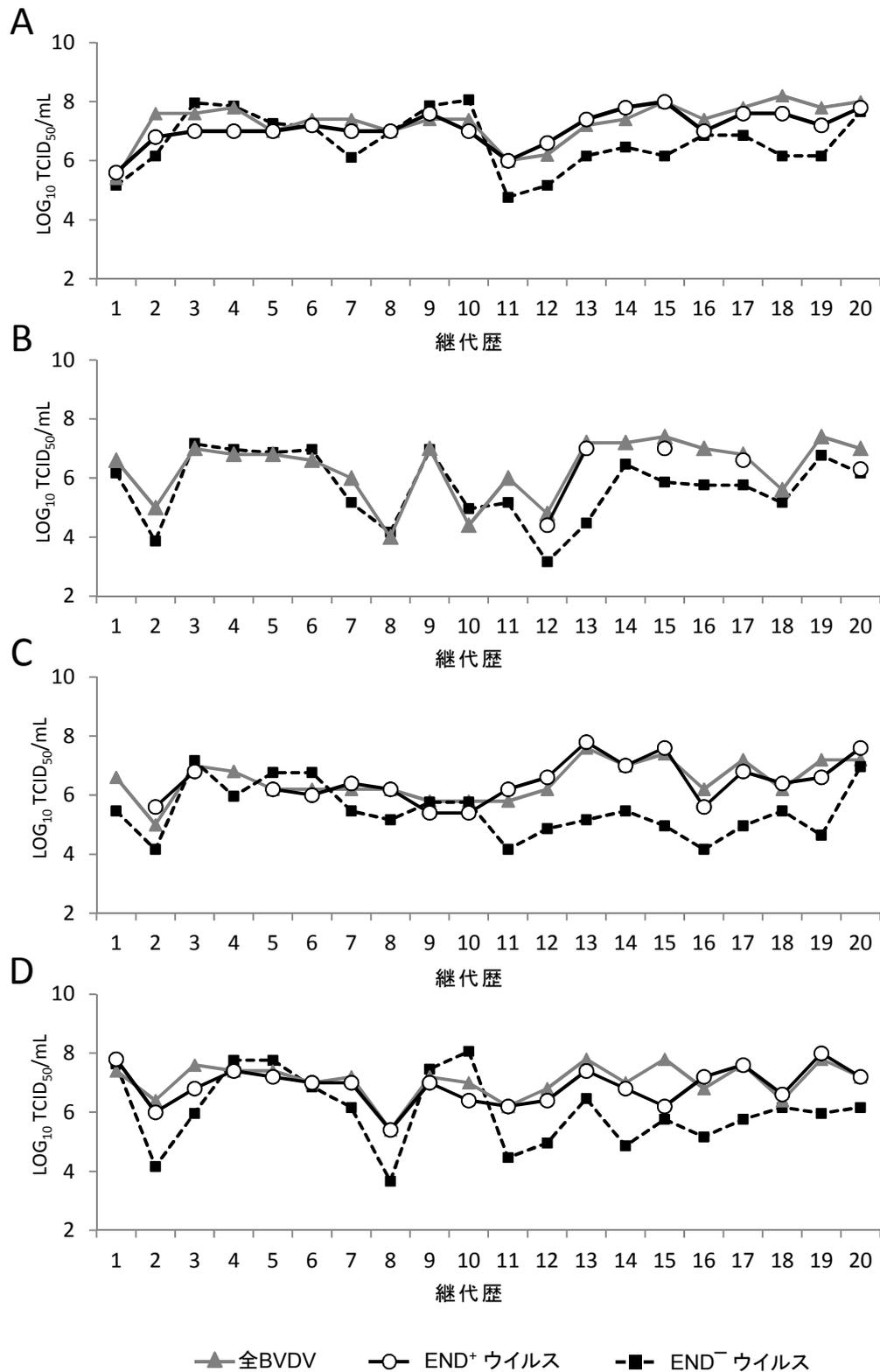


図2 ウイルス継代による培養上清中の準種構成の変動

BT細胞で上清継代したBVDV野外分離株4株(A) IS22NCP/00、(B) IS36NCP/04、(C) IS37NCP/05、(D) IS38NCP/04の上清中の全BVDV(▲)、END⁺ウイルス(○)及びEND⁻ウイルス(■)の感染価の推移を示す。

表4 培養上清中の推定主要ウイルスの変動とN^{pro}のアミノ酸配列の相同性

株名	継代歴	感染価から 推定された主要ウイルス	p.2又はp.3のN ^{pro} の アミノ酸配列との相同性(%)
IS22NCP/00	p.2	END ⁺ 1)	-
	p.10	END ⁻ 2)	100
	p.20	END ⁺ = END ⁻ 3)	100
IS36NCP/04	p.3	END ⁻	-
	p.9	END ⁻	100
	p.20	END ⁺ = END ⁻	100
IS37NCP/05	p.2	END ⁺	-
	p.10	END ⁻	100
	p.20	END ⁺	100
IS38NCP/04	p.2	END ⁺ = END ⁻	-
	p.10	END ⁻	100
	p.20	END ⁺	100

- 1) END法による感染価がRPF法の感染価より2倍以上高い
- 2) RPF法による感染価がEND法お感染価より2倍以上高い
- 3) END法とRPF法による感染価が2倍以内

考 察

野外分離 4 株を培養細胞に接種して得られた野外流行株 (p.1) を、培養細胞でさらに 19 回連続的に培養上清を継代し、継代毎に全 BVDV、END⁺及び END⁻ウイルス感染価を定量した。IS22NCP/00、IS37NCP/05、IS38NCP/04 の 3 株において、継代開始の p.1 の時点で既に END⁻ウイルス或いは END⁺及び END⁻ウイルスの両方がともに検出されたことから、これらの準種が感染牛体内に既に混在している可能性が強く示唆された。また、継代培養したいずれの野外株も、数回の継代では大きなウイルス構成の変動は認められなかった。本研究のために収集した野外流行株は、いずれも家畜保健衛生所から分与された株であり、ウイルス分離までに一般的な 3 代盲継代、あるいはその前後の回数で継代されていると考えられる。また、石川県の家畜保健衛生所から分与された野外分離 39 株の継代歴は、最少で 1 回、最多で 7 回、平均 3.3 回であることがわかっている。すなわち、家畜保健衛生所における BVDV 検出・診断において野外流行株の継代数が 10 回を上回る可能性は極めて低いと考えられる。従って、これまで及び本研究の「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」の結果は、BVDV 感染牛体内のウイルス構成と大きく違わない可能性が高いと考えられた。一方、4 株中 3 株において、継代数が増えると END⁺ウイルスが優勢になる傾向が認められたことから、準種を定量的に評価・解析する際には、分離株の継代歴を考慮する必要性が示唆された。また、この結果は、実験室内で維持、継代されているいわゆる「実験室株」を構成するウイルスは、END⁺ウイルスが優勢であり、END⁻ウイルスは END⁺ウイルスよりも少数であるとするこれまでの報告を支持する結果と言える。ウイルス継代を重ねることで END⁺ウイルスが次第に優位に変動する要因として、END⁺ウイルスと END⁻ウイルスの I 型 IFN 産生制御能が関与していると考えられる。END⁺ウイルスは感染細胞の I 型 IFN 産生を抑制し、抗ウイルス反応を阻害す

ることで自身を効率良く増殖させるが、END⁻ウイルスはI型IFN産生を誘導するため、自身の増殖も抑制してしまうものと推察される。その結果、END⁺ウイルスが優勢となり、END⁻ウイルスが低い感染価で推移したのではないかと考えられた。一方で、全ての株のいずれの培養上清においてもEND⁻ウイルスが検出限界以下になることはなかった。この結果から、END⁺ウイルスが優勢の状態であってもEND⁻ウイルスが一定の割合で維持されるメカニズムが存在すること示唆され、END⁺とEND⁻ウイルスの割合の決定には、両ウイルスのI型IFN制御能以外の要因も関与していると考えられた。また、ウイルス継代に伴うウイルス構成の変動には、継代時のウイルスの感染多重度（MOI：感染を受ける細胞に対する感染性ウイルスの比率）[Ojosnegros *et al.*, 2010]や、培養細胞の種類[Combe *et al.*, 2014]も関与している可能性が考えられ、今後さらに詳細な検討が必要であると考えられた。

また、IS36NCP/04の継代の前半ではEND⁺ウイルスがまったく検出されず、継代の後半で検出されるようになっても断続的かつ非用量依存的であった。同様の現象は、IS37NCP/05のp.1及びp.4でも認められた。IS36NCP/04と他の3株が明らかに異なるウイルス構成であったことから、感染牛によっても体内の準種構成が異なることが推察された。また、IS36NCP/04及びIS37NCP/05で認められた非用量依存的で断続的なEND現象は、END⁻ウイルスの混在に起因するものと考えられた。そのため、準種の定量的解析を行う際は、ウイルス株の継代歴に加え、IS36NCP/04やIS37NCP/05で認められたような準種の相互反応による見かけ上の感染価にも注意する必要があると考えられた。ただし、IS22NCP/00、IS37NCP/05、IS38NCP/04では、野外分離株を用いた準種の分布調査でも認められたような、END⁺ウイルスとEND⁻ウイルスの感染価が同等の継代上清が多数存在したことから、END⁻ウイルスの混在以外の要因が関与する可能性も考えられた。

ウイルス継代を重ねたところ、ウイルス構成の変動が認められたため、それに伴うウイルスゲノム上の塩基配列の変化の探索を試みた。END⁺ウイルスとEND⁻ウイルスは感染細胞のI型IFN産生制御が異なることから、I型IFN産生制御に関与するとされているウイルスの非構造蛋白N^{pro}領域に着目し、継代毎のアミノ酸配列を比較した。その結果、継代した4株の継代の初期、中期、後期の培養上清中の主要な準種が変化したにも関わらず、その上清に含まれるウイルスが有するN^{pro}のアミノ酸配列に、変化は認められなかった。CSFVを含め、これまで同一株に由来するEND⁺とEND⁻のペアウイルスでそれぞれアミノ酸配列が決定されたものがあり、両者の間で異なるアミノ酸も決定されている[Ishikawa *et al.*, 1995; Muhsen *et al.*, 2013]。ペアウイルス間で異なっていたアミノ酸に着目し、本研究で得られた4株のN^{pro}の推定アミノ酸配列上で調べたところ、いずれの株の配列もEND⁺ウイルスで認められたアミノ酸であった。すなわち、IS36NCP/04のようにEND⁻ウイルスが推定主要ウイルスであったウイルス株においても、N^{pro}遺伝子のアミノ酸配列はこれまでに報告されているEND⁻ウイルスの特徴は認められなかった。近年、ペスチウイルスのI型IFN産生抑制のメカニズム解明が進み、N^{pro}の関与やN^{pro}内の責任アミノ酸も推定されている[Gil *et al.*, 2006; Ruggli *et al.*, 2009; Szymanski *et al.*, 2009]。しかし、これまでの報告ではEND⁺とEND⁻ウイルス間で異なっているアミノ酸部位は、全てのウイルス株に共通ではなく、さらに、既報でI型IFNの産生抑制に重要とされるN^{pro}のアミノ酸置換に一致しないウイルス株も多く見つかっている。すなわち、すべてのEND⁺ウイルス或いはEND⁻ウイルスに共通のアミノ酸配列またはアミノ酸は同定されていない。本研究の結果とこれまでの知見を踏まえると、END⁺ウイルスとEND⁻ウイルスを区別する遺伝子学的特徴は、複数のアミノ酸部位或いはN^{pro}以外のウイルス蛋白領域も関与している可能性があると考えられた。

小 括

継代歴の少ない BVDV 野外分離 4 株をそれぞれ BT 細胞で連続継代し、継代毎の培養上清中のウイルス構成を調べることで、培養細胞を用いたウイルスの継代培養がウイルス構成に与える影響を評価し、以下の成績を得た。

1. 継代歴の少ない分離株からも、END⁺ウイルスや END⁻ウイルスが検出された。性状の異なるこれらの準種が、既に牛体内に存在していることが示唆された。
2. 数回のウイルス継代（～p.10）では、ウイルス構成が大きく変動しないことが明らかとなった。家畜保健衛生所から分与された野外分離株を用いた準種の分布に関する結果は、感染牛体内のウイルス構成と大きく乖離していないと考えられた。
3. 10～10 数代ウイルス継代を重ねると、END⁺ウイルスが END⁻ウイルスより優勢となって維持されることが判明した。従って、END⁺ウイルスや END⁻ウイルスの定量結果を解析に用いるためには、分離株のウイルス継代歴を考慮する必要がある。
4. ウイルス株を構成するウイルスの構成が変わったにもかかわらず、N^{pro}のアミノ酸配列に変化は見られなかった。END⁺と END⁻ウイルスを区別可能な遺伝的要因は、N^{pro}領域だけでなく、複数の領域が関与する可能性が示唆された。

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

要 旨

これまで準種の調査は、ウイルス分離後の野外流行株を用いて行われてきた。本章では、野外で摘発された持続感染牛の血液から準種の直接的検出を試みた。無症状の持続感染牛から採取した血液 50 検体を収集し、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。それら検体について PLA、END 法および RPF 法の各々で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。ウイルス構成を調べたところ、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他法より高い 16 検体、PLA でのみ検出された 3 検体に分けられた。以上の結果から、持続感染牛の体内には既に END⁺や END⁻ウイルスなどの準種が様々な割合で混在していることが明らかになった。自然免疫反応の異なる準種が混在しているが、症状や持続感染期間との関係は不明であり、今後さらなる解析が必要であると考えられた。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。この結果から、この 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両方が考えられた。

序 文

BVDV 野外分離株には、END⁺ウイルスと 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った。また、継代数の少ない野外分離株からも END⁺ウイルス及び END⁻ウイルスが検出されたことから、感染宿主の体内には、既にこれらの準種が存在している可能性が高いと考えられた。しかし、これまでの準種の分布調査に用いた野外分離株は、培養継代が施された調査材料で評価されていたため、END⁻ウイルスが培養によって出現した可能性も否定できない。また、CSFV も含め、これまでにペスチウイルスに感染した動物から END⁻ウイルスが検出された報告はほとんどない。

END⁺ウイルスと END⁻ウイルスは、感染細胞において自然免疫応答が相反することから [Nakamura *et al.*, 1995; Ruggli *et al.*, 2009]、牛体内に混在した場合、病態や臨床症状に影響を及ぼすものと推察される。準種と病態との因果関係を解明するためには、感染牛から直接準種を検出し、宿主体内における準種の分布を検証する必要がある。そこで本章では、BVDV に持続感染している牛の血液材料を用いて、感染牛体内における END⁺および END⁻ウイルスの存在の有無及びその分布を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1. 培養細胞

培養細胞には BT 細胞を使用し、増殖用培養液は、第 1 章で用いた増殖用培養液と同じ組成の培養液を使用した。BVDV の分離及び感染価の測定には、第 1 章で用いた維持用培養液と同じ組成のものを使用した。

2. 血液材料

北海道の大動物臨床獣医師及び民間検査センターによって BVDV 持続感染牛と診断された牛 50 頭から採取された全血又は血清を解析に用いた。なお、これらの牛は、臨床症状を示していなかったことが確認されている。各試料は -80°C で保存し、解析時に融解して用いた。

3. ウイルス分離

試料中の活性ウイルスを検出するために、ウイルス分離を行った。24 ウェルプレートに単層に培養した BT 細胞に各試料 0.5mL を接種した。細胞の乾燥を防ぐため、各ウェルに維持用培養液 450 μL を追加し、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 1 時間静置した。接種液を取り除いた後、新しい維持培養液を 500 μL 添加し、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 条件下で 4 日間培養した。培養上清を除去し、PBS で細胞を洗浄した後、 75°C で 1 時間熱固定し、その後 PLA を実施した。PLA は、第 1 章の「材料と方法」における「3-3. ペルオキシダーゼ標識検査法 (PLA)」と同様の手順で行った。なお、一次抗体は、抗ペスチウイルス NS3 モノクローナル抗体#46/1 [Kameyama *et al.*, 2006] を使用し、抗体希釈液、二次抗体及び基質液は、第 1 章と同じものを使用し、第 1 章と同じ手順で実施した。陰性だった検体は、培養上清を新たな BT 細胞に接種し、4 日間培養した。この細胞をについて再び PLA を実施し、陰性であった検体は活性ウイルス陰性と判断した。

4. 血液材料中の各準種の検出と定量 (PLA、END 法、RPF 法)

全血又は血清について PLA、END 法及び RPF 法を用いてウイルス分離と定量を行った。各方法の手順は、第 1 章の「材料と方法」の「3-3. ペルオキシダーゼ標識検査法 (PLA)」、「3-2. END 法」及び「3-4. 逆ブラック (RPF) 法」の記載に従って実施した。なお、END 法及び PLA は、各血液材料を階段希釈し、1 希釈当たり 4 ウェル、各 50 μ L ずつ接種した。RPF 法は、12 ウェルプレートを使用し、階段希釈した血液材料を、1 希釈当たり 2 ウェル、各 50 μ L ずつ接種した。

5. 5'UTR 及び N^{pro} 遺伝子配列の決定と遺伝子型別

5-1. RT-PCR 及び PCR 産物の塩基配列の決定

RNA 抽出、RT-PCR 法及び PCR 産物の塩基配列の決定は、第 2 章の「材料と方法」の「5-1. RT-PCR」及び「5-3. PCR 産物の塩基配列の決定」に記載の手順で実施した。なお、RNA 抽出には、活性ウイルスが分離された検体は分離時の培養上清を、それ以外の検体は血液材料を用いた。5'UTR を増幅するためのプライマーは Vilcek らの報告に従い、上流プライマーは 324 (5'-ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA-3')、下流プライマーは 326 (5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC-3') を使用し[Vilcek *et al.*, 1994]、N^{pro} 遺伝子領域の増幅は第 2 章で使用した 277F と 1028R を使用した。得られた塩基配列は、No.12/E⁺、No.12/E⁻、Nose/E⁺ (accession number: AB558133, 未公開)、Nose/E⁻ (AB558134, 未公開)、RK13/E⁺ (JX419398) 及び RK13/E⁻ (JX419397) の N^{pro} 領域の塩基配列と共に Clustal W を用いてアライメントを実施した [Thompson *et al.*, 1994]。

5-2. 分子系統樹解析による遺伝子型別

BVDV 遺伝子型は、5'UTR を用いて分子系統樹を作成し決定した。参照株として、BVDV-1a 型に No12-43 株 (accession number: AB359923)、Nose 株 (AB019670) 及び NADL 株 (M31182)、BVDV-1b 型に Osloss 株 (M96687) 及び CP7 株 (U63479)、BVDV-1c 型に Bega 株 (AF049221) 及び IS7NCP (AB359925)、BVDV-2a 型に 890 株 (U18059) 及び KZ91CP 株 (AB359933) の塩基配列を用いた。得られた塩基配列は参照株の塩基配列とともに Clustal W を用いてアラメントし、MEGA5 を用いて近隣結合法による分子系統樹解析を行った [Saito & Nei, 1987; Thompson *et al.*, 1994; Tamura *et al.*, 2011]。なお、ブートストラップ値は 1,000 回に設定した。

結 果

1. BVDV 持続感染牛からの活性ウイルス検出及びウイルス遺伝子型別

活性ウイルス分離を試みた結果、50 検体中 26 検体 (52.0%) から BT 細胞に感染するウイルスが検出された (表 5)。また、活性ウイルスが検出された検体については培養上清から、それ以外の検体は血液材料を用いて、ペスチウイルスの 5'UTR を増幅する RT-PCR 法を実施した結果、50 検体中 45 検体 (90.0%) から約 290nt の PCR 増幅産物が得られた。PCR 産物の塩基配列を決定し、分子系統樹解析を行った結果、45 検体はいずれも BVDV に分類され、その内訳は BVDV-1a 亜型が 20 検体 (44.4%)、BVDV-1b が 18 検体 (40.0%)、BVDV-2a が 4 検体 (8.9%)、BVDV-1c が 3 検体 (6.7%) であった。

2. 持続感染牛血液からの END⁺及び END⁻ウイルスの検出

活性ウイルスが分離可能な血液材料 26 検体について、PLA、END 法及び RPF 法によるウイルス感染価の測定を行ったところ、PLA により 26 検体全てから BVDV が検出され、その感染価は $10^{3.4} \sim 10^{6.1}$ ($0.69 \times \text{TCID}_{50}$)/mL のであった (表 6)。一方、END 法を用いた結果、26 検体中 22 検体 (84.6%) から END⁺ウイルスが検出され、その感染価は $10^{2.1} \sim 10^{4.9}$ ($0.69 \times \text{TCID}_{50}$)/mL であった。4 検体には END 現象は認められなかった。RPF 法を用いた結果では、26 検体中 13 検体 (50.0%) から END⁻ウイルスが検出され、感染価は $10^{2.0} \sim 10^{4.6}$ PFU/mL であった。

3. 持続感染牛の血液に含まれる準種の構成と分布

各手法によるウイルス検出の結果をまとめ、各検体のウイルス構成を求めたところ、END⁺ウイルス主体が 5 検体 (19.2%)、END⁻ウイルス主体が 1 検体

(3.8%)、END⁺と END⁻ウイルスが同量の 1 検体 (3.8%)、PLA の感染力価が END 法や RPF 法による感染価より 10 倍以上高い 16 検体 (61.5%)、PLA でのみ検出される 3 検体 (11.5%) に分類された (表 7)。

4. N^{pro}領域の推定アミノ酸配列の比較

活性ウイルスのウイルス蛋白 N^{pro}の塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸配列とウイルス構成を比較し検討した。その結果、株を構成する主要なウイルスが END⁺ウイルスである 5 株でのみ共通するアミノ酸残基は認められなかった。一方、PLA でのみ検出された 3 株 (YL41、YL45、YL47) に特異的と考えられるアミノ酸残基が 3 ヲ所 (Val53、Leu118、Agr153) 認められた (表 8)。No.12 株、Nose 株及び RK13 株のそれぞれの END⁺と END⁻ウイルス間で認められた N^{pro}のアミノ酸の置換部分においては、3 検体は、いずれも END⁺ウイルスで見られたアミノ酸であった。

表5 BVDV持続感染牛の血液からのBVDV遺伝子の検出
及び活性BVDVの分離

遺伝子型	陽性検体数 (%)	
	RT-PCR	活性ウイルス分離
1a	20 (44.4)	15 (57.7)
1b	18 (40.0)	9 (34.6)
1c	3 (6.7)	0 (0.0)
2a	4 (8.9)	2 (7.7)
計	45	26

表6 持続感染牛の血液から検出された各準種の感染価及び推定される主要な準種

試料番号	ウイルス量			推定主要準種
	PLA法 ¹⁾	END法 ¹⁾	RPF法 ²⁾	
YL3	3.9	2.7	4.3	END ⁻
YL7	3.4	3.7	2.3	END ⁺
YL10	4.7	4.4	4.6	END ⁺ & END ⁻⁴⁾
YL14	4.7	2.9	3.6	BVDV ⁵⁾
YL15	3.4	3.6	— ³⁾	END ⁺
YL18	4.4	2.4	2.8	BVDV
YL23	5.4	3.1	2.5	BVDV
YL28	3.6	2.4	2.0	BVDV
YL31	4.1	3.1	—	BVDV
YL32	3.6	3.6	—	END ⁺
YL33	4.9	4.9	—	END ⁺
YL34	4.9	3.9	—	BVDV
YL35	4.1	2.9	—	BVDV
YL37	4.6	2.9	—	BVDV
YL38	4.6	—	3.5	BVDV
YL39	4.6	2.9	—	BVDV
YL40	4.6	2.6	3.2	BVDV
YL41	4.1	—	—	BVDV
YL42	5.1	3.1	2	BVDV
YL43	6.1	2.6	4.6	BVDV
YL44	5.4	4.1	2.6	BVDV
YL45	4.1	—	—	BVDV
YL46	4.1	1.9	—	BVDV
YL47	4.1	—	—	BVDV
YL48	4.1	3.9	—	END ⁺
YL50	6.1	2.1	3.9	BVDV

1) log₁₀ (0.69 TCID₅₀)/mL 2) log₁₀ PFU/mL 3) 不検出 4) 全ての定量法による感染価が同等 5) PLAの感染価が最も高くEND⁺又はEND⁻のいずれとも判定されない

表7 持続感染牛の血液に含まれる準種の分布

推定主要準種	株数	%
END ⁺	5	19.2
END ⁻	1	3.8
END ⁺ = END ⁻	1	3.8
判定不能*	16	61.5
PLAでのみ検出	3	11.5

*PLAの感染価が最も高くEND⁺又はEND⁻のいずれとも判定されない

表8 PLAでのみ検出された3株とその他のウイルス株のN^{pro}領域における推定アミノ酸配列の比較

アミノ酸番号 ¹⁾	8	18	53	97	118	130	148	153
PLAでのみ検出 (3株)	Leu	Ile	Val	Val	Leu	His	Gln	Arg
その他の株	Leu	Val/ Thr	Glu	Val	Ile	His	His	Lys
No.12/E ⁺	Leu²⁾	Val	Glu	Val	Ile	His	His	Lys
No.12/E ⁻	Pro²⁾	Val	Glu	Val	Ile	His	His	Lys
Nose/E ⁺	Leu	Val	Glu	Val³⁾	Ile	His	His	Lys
Nose/E ⁻	Leu	Val	Glu	Phe³⁾	Ile	His	His	Lys
RK13/E ⁺	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	His⁴⁾	Arg	Lys
RK13/E ⁻	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	Pro⁴⁾	Arg	Lys

1) BVDVの全アミノ酸配列中におけるN末端からの位置

2) No.12/E⁺とNo.12/E⁻のN^{pro}アミノ酸配列で異なるアミノ酸

3) Nose/E⁺とNose/E⁻のN^{pro}アミノ酸配列で異なるアミノ酸

4) RK13/E⁺とRK13/E⁻のN^{pro}アミノ酸配列で異なるアミノ酸

考 察

感染牛の組織や血清からのウイルス分離に END 現象を指標とする END 法が用いられていたとの報告がある[大森ら, 1963; 1965]。一方、干渉法及び RPF 法は、実験室株や純化された END⁻ウイルス株の分離などに用いられてきた [Fukusho *et al.*, 1976; Nakamura *et al.*, 1993]。すなわち、牛血清等の臨床材料から干渉法や RPF 法で END⁻ウイルスを検出した報告はない。また、CSFV の調査研究によれば、野外株を異種動物の細胞で継代すると END⁻ウイルスが出現又は優位に検出できるとの知見もある [Sasahara *et al.*, 1969; Shimizu *et al.*, 1970; 小川, 1981]。従って、BVDV の END⁻ウイルスが牛の体内に存在するという成果はないことから、持続感染牛からの END⁻ウイルスの検出を試みた。

収集した 50 検体の BVDV 持続感染牛の血液材料のうち 45 検体 (90%) から BVDV 遺伝子が検出され、26 検体 (52%) から活性ウイルスが検出された。両者で検出率が一致しない理由として、血液材料の保存状態が影響している可能性が考えられ、実際、保存期間が長い血液、冷蔵保存された血液の検出率が低かった。しかし、増幅されたウイルス遺伝子を用いた分子系統樹解析は可能であり、亜型の分布は 1a、1b、1c および 2a に分類された。これらの遺伝子型の分布は Matsuno らの報告 (2007) を支持するものであり、使用したウイルスが野外流行を反映しているものと考えられる。

活性ウイルスが検出された 26 検体について END⁺及び END⁻ウイルスの検出を行い、そのウイルス構成を調べた。END⁺ウイルスの検出率は 84.6% と高いものの、その感染価は PLA で得られた BVDV 総感染価よりも低い傾向にあり、END 現象が全く確認されない検体も存在した。すなわち、細胞を用いて分離された後の野外株と同様、牛体内においても END 現象を示さないウイルスが存在することが推察された。END 法では検出され難い NCP BVDV が存在すること

から、これまで見逃されたウイルスもある可能性が高い。また、BVDV の診断には、国際獣疫事務局 (OIE) の Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014 に記載される PLA を用いるのが適当であると考えられた。

RPF 法で BVDV を検出したところ、13 検体 (50.0%) から END⁻ウイルスが検出された。この結果は、END⁻ウイルスが感染牛の体内に既に存在し、その割合も様々であることを示しており、また、そのうちの 12 株では END⁺ウイルスも検出されたことは、*in vitro* で I 型 IFN 産生を抑制する END⁺ウイルスと I 型 IFN 産生を誘導する END⁻ウイルスが持続感染牛体内で不安定に混在していることを意味している。持続感染牛は、BVDV に対する抗体を産生しないものの、自然免疫応答は正常であるため[Yamane *et al.*, 2008]、その体内で起きている自然免疫応答は準種同士又は準種と宿主との相互作用で複雑に変化していることが推察され、多様な病態に影響している可能性も考えられた。

各検査法で得られた感染価をもとに、ウイルス構成を解析したところ、PLA で得られた感染価が最も高い検体が 26 検体中 16 検体 (73%) を占め、野外流行株の調査結果と同様の傾向が認められた。これら 16 検体は、END⁺ウイルスと END⁻ウイルスの各々の生物性状の相殺が生じているものと推察された。注目すべきは、END 現象も逆ブラックも確認されない検体が 3 検体で発見されたことである。これらは PLA で検出されていることから、準種同士の生物性状の相殺の可能性のあるものの、RPF 法が準種間の相殺に影響しない方法であることを踏まえると、新たな性状を持ったウイルスである可能性が残されていると考えられた。今後、当該ウイルスのウイルス学的性状及び遺伝学的性状を明らかにしていく必要があると考えられる。

分離された 26 の活性ウイルスの N^{pro} の推定アミノ酸配列とそれぞれのウイルス構成と比較して解析した。しかしながら、今回の結果では END⁺ウイルスに

特有又は END⁻ウイルスに特有のアミノ酸配列を見つけることができなかった。RT-PCR 法及びダイレクトシーケンス法で得られる塩基配列は、プライマーの結合が均一であるならば、最も優位に存在するウイルスのものであると考えられる。END 現象又は干渉現象を決定づけるアミノ酸配列は N^{pro} 領域内の単一置換では無く、複数の置換又は他の遺伝子領域が関与する可能性が考えられた。一方、PLA でのみ検出された 3 検体で共通する N^{pro} のアミノ酸残基が 3 ヶ所確認された。この 3 ヶ所のアミノ酸が 3 検体で認められた生物性状と関与するの
か、今後、生物性状と併せてさらに解析する必要がある。

小 括

BVDV 持続感染牛から直接 END⁺ウイルス及び END⁻ウイルスの検出を試みた結果、以下の成績を得た。

1. 感染牛体内でも END 現象を示さないウイルス株が存在したことから、BVDV の診断には END 法よりも PLA の方が適切であると考えられた。
2. END⁻ウイルスが感染牛の体内に既に混在していることが証明され、その割合も様々であったことから、これら準種の混在が BVDV 感染症の病態に関与する可能性があると考えられた。
3. PLA でのみ検出され、END 現象及び逆プラックが認められないウイルスが 3 検体で存在した。ウイルス同士の生物性状の相殺が生じている可能性、或いはこれまでに確認されていない新たな生物性状を示すウイルスである可能性が示唆された。

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

要 旨

BVDV の野外分離株や持続感染牛の血液中には、END⁺と END⁻ウイルスが様々な割合で混在しており、BVDV 感染症の病態やウイルスの伝播様式に関与するものと考えられる。本章では、END⁺及び 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ことを目的に、隔離飼育されている 3 頭の持続感染牛の経過血清を用いて、ウイルス構成の経時的な変動を調査した。

3 頭中、同一流行中に生まれた同月齢の 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 頭は END⁺と END⁻の両ウイルスが連続的に定量できたが、もう 1 頭では 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ができなかった。この結果より、同一流行中に生まれた同月齢の牛であっても個体間で準種構成に差があることが明らかになった。また、これら以外の長期間生存しているもう 1 頭では、23 ヶ月齢までの血清では連続的に END 現象が認められていたが、24 ヶ月齢以降の血清では END 現象が一切認められず、END⁻ウイルスが優勢になる可能性が考えられた。さらに、この長期生存個体の経過血清のうち 5 検体から RNA を抽出し、N^{pro} 領域について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 血清において I 型 IFN 産生を誘導する塩基配列が増加する傾向が認められ、遺伝子配列上でも END⁻ウイルスの増加を示唆する結果が得られた。以上の結果より、持続感染牛体内の準種構成は経時的に変動し、個体間でもその構成に差があることが明らかになった。さらに、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にあることが示唆された。

序 文

粘膜病を発症した牛からは、NCP ウイルスと共に同じ抗原性を示す CP ウイルスが分離される [Corapi *et al.*, 1988; Shimizu *et al.*, 1989]。また、隔離飼育され、外的影響を受けにくい環境におかれた持続感染牛でも自然発生的に粘膜病を発症することから、CP ウイルスは NCP ウイルスの変異して生じるものであると考えられている [Gunn & Weavers, 1992]。これらの知見から、粘膜病を発症する要因として、細胞病原性の準種が出現する、という準種構成の変動が深く関与している可能性が示唆される。NCP ウイルスは単一な性状のウイルスではなく、感染細胞の I 型 IFN 産生を抑制する END⁺ウイルスと [Nakamura *et al.*, 1995; Ruggli *et al.*, 2009]、I 型 IFN 産生を誘導する END⁻ウイルス [Ruggli *et al.*, 2009] が存在する。これら準種は野外流行株に混在し、持続感染牛の血清からも検出されている。検出された準種の構成はウイルス株や感染牛によって様々であったことから、END⁺ウイルスや END⁻ウイルスの混在が BVDV 感染症の多様な病態形成に関与していることが推察される。しかし、野外流行株の調査及び持続感染牛の血清を用いた調査は、いずれも採材された一時点だけを解析した横断的な調査であったため、得られた結果から同一個体内における準種の経時的な変化を解析することは不可能であり、さらに準種の動態や構成の変化が粘膜病発症にどのように関与しているのかを明らかにすることも困難であった。そこで本章では、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変動し、そしてその構成の変化が病態形成とどう関与しているのかを明らかにすることを目的として、隔離飼育された持続感染牛の経過血清に含まれる END⁺ウイルス及び END⁻ウイルスを定量し、ウイルス構成の経時的な変動を調査した。

材料と方法

1. 培養細胞

培養細胞には、BT 細胞を使用した。細胞増殖用培養液及び BVDV の感染あ
の測定に用いる維持用培養液は、第 1 章で用いた培養液と同じ組成のものを使
用した。

2. ウイルス

END 法を実施するために NDV の宮寺株を、RPF 法を実施するために VSV
のニュージャージー株を使用した。それぞれ、第 1 章に記載の方法で調整した。

3. 持続感染牛及び血清材料

独立行政法人動物衛生研究所で隔離飼育されている BVDV 持続感染牛 3 頭の
(B113、B114、B115) の経過血清を解析に用いた。血清材料は、動物衛生研
究所で採材されたものを分与して頂き、 -80°C で保存し、解析時に融解して用
いた。持続感染牛及び血清についての詳細は表 9 に示す。3 頭の持続感染牛は、
いずれも野外で摘発され動物衛生研究所に持ち込まれた牛で、B114 と B115 は
同一農場で同一の流行中、同じ日に出生したことが分かっている。なお、B115
は 2012/12 に動物衛生研究所にて安楽殺されている。

4. 各準種の検出と定量 (END 法、PLA、RPF 法)

END 法、PLA、RPF 法は、それぞれ第 1 章の「材料と方法」の「3-2. END
法」、「3-3. ペルオキシダーゼ標識検査法 (PLA)」、「3-4. 逆プラック (RPF)
法」と同様に行った。なお、RPF 法には 12 ウェルプレートを使用し、1 希釈あ
たり 2 ウェル、1 ウェルあたり $50\mu\text{L}$ の材料を接種し、細胞の乾燥を防ぐために、

各ウェルに 200 μ L の維持培養液を追加した。

5. ディープシーケンシング

B113 の 2009/1/27、2011/3/24、2012/6/25、2012/4/25 及び 2013/1/22 に採材された 5 血清、B114 の 2012/5/1 及び 2012/6/25 に採材された 2 血清、B115 の 2012/5/1 及び 2012/6/25 に採材された 2 血清について、N^{pro} 領域のディープシーケンシングを試みた。血清からの全 RNA の抽出には High Pure Viral RNA Kit (Roche) を使用し、添付のマニュアルに従い施した。抽出した全 RNA を鋳型に RT-PCR 法による N^{pro} 遺伝子領域の増幅を行った。RT-PCR 法には、PrimeScript RT-PCR kit (タカラバイオ) を用い、添付のマニュアルに従って実施した。プライマーは、N^{pro} 遺伝子をコードする領域を挟むように設計し、上流プライマーは第 3 章で使用した 324、下流プライマーは 1400 (5'-ACC AGT TGC ACC AAC CAT G-3') を使用した。遺伝子の増幅は、PCR Thermal Cycler (タカラバイオ) を用いて、94°C で 3 分加熱した後、94°C・30 秒、56°C・30 秒、72°C・1 分を 1 サイクルとして、35 サイクル反応させ、最後に 72°C・3 分の追加伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、2.0%アガロースゲル (関東化学) を用いて電気泳動を行い、紫外線照射撮影により PCR 増幅産物 (1341nt) の有無を確認し、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製した。

次に、精製した PCR 産物を用いて、DNA ライブラリーの作製を行った。作製には Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) を使用し、操作は添付のマニュアルに従った。PCR 産物のタグメンテーションを行った後、12 サイクルの PCR 反応を行うことでエンリッチ (濃縮) を行った。その後、Agencourt AMPure Beads (Beckman Coulter, Pasadena, CA) を用いて PCR 産物を精製し、Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA)

を用いて濃度が 2nM になるよう調整した。MiSeq (Illumina) に 50 サイクルでアプライし、得られたリードは、CLC Genomics Workbench software (CLC bio, Aarhus, Denmark)を用いてマッピング解析を行ない、N^{pro} をコードする各塩基についてデプスに対する割合を求め、経時的な変動を調べた。なお、これまでに BVDV 及び CSFV で報告されている、END⁺と END⁻ウイルス間で認められたアミノ酸の置換位置を重点的に比較解析した。

結 果

1. BVDV 持続感染牛の血清中におけるウイルス構成の変動

隔離飼育されている3頭の持続感染牛から経時的に採材された血清を用いて、BVDV 全体量、END⁺及び END⁻ウイルスをそれぞれ定量し、経時的なウイルス構成の変動を調査した。

B113 の血清は、15 から 68 ヶ月齢の間に採材された 28 検体を用いて解析した (表 9)。END 法では最初の採材日 2008/8/29 (15 ヶ月齢) から 2009/04/28 (23 ヶ月齢) までの 6 検体で連続的に END 現象が確認され、そのうち 1 検体 (2009/01/27 : 20 ヶ月齢) で END⁺ウイルスを定量することができた (図 3 - A)。しかしながら、2009/5/26 から 2013/1/22 (24~68 ヶ月齢) までの 22 検体では、END 現象が一切認められなかった。RPF 法では、28 検体中 26 検体において連続的に END⁻ウイルスが検出・定量されたが、2012/4/25 及び 2012/6/25 の 2 検体では END⁺ウイルスも END⁻ウイルスも検出されなかった。

B114 の血清は、6 から 16 ヶ月齢の間の 13 検体を解析に用いた (表 9)。END 法では、13 検体中 12 検体で比較的明瞭な END 現象が認められ、連続的に END⁺ウイルスを定量することができた (図 3 - B)。なお、END⁺ウイルスが定量されたいずれの血清においても低希釈領域で NDV の CPE が抑制されるゾーン現象が認められた。END⁺ウイルスが定量されなかった 1 検体 (20012/05/21 : 8 ヶ月齢) においても END 現象は確認することができた。RPF 法では、13 検体すべてから END⁻ウイルスが検出され、連続的に定量することができた。ウイルス構成は、END⁺、END⁻ウイルス量いずれも PLA の感染価と近似した値で推移することはなかった。

B115 の血清は、6 から 15 ヶ月齢の間の 13 検体を解析に用いた (表 9)。END 法では、13 検体すべてにおいて END 現象が確認されたが、いずれの検体も陽

性ウェルが非用量依存的であり、その数も少なかったため、END⁺ウイルスの定量には至らなかった（図3-C）。一方、RPF法では全検体において連続的にEND⁻ウイルスが検出定量され、PLAで得られた感染価と近似する値で推移した。

2. N^{pro}領域のディープシーケンシング

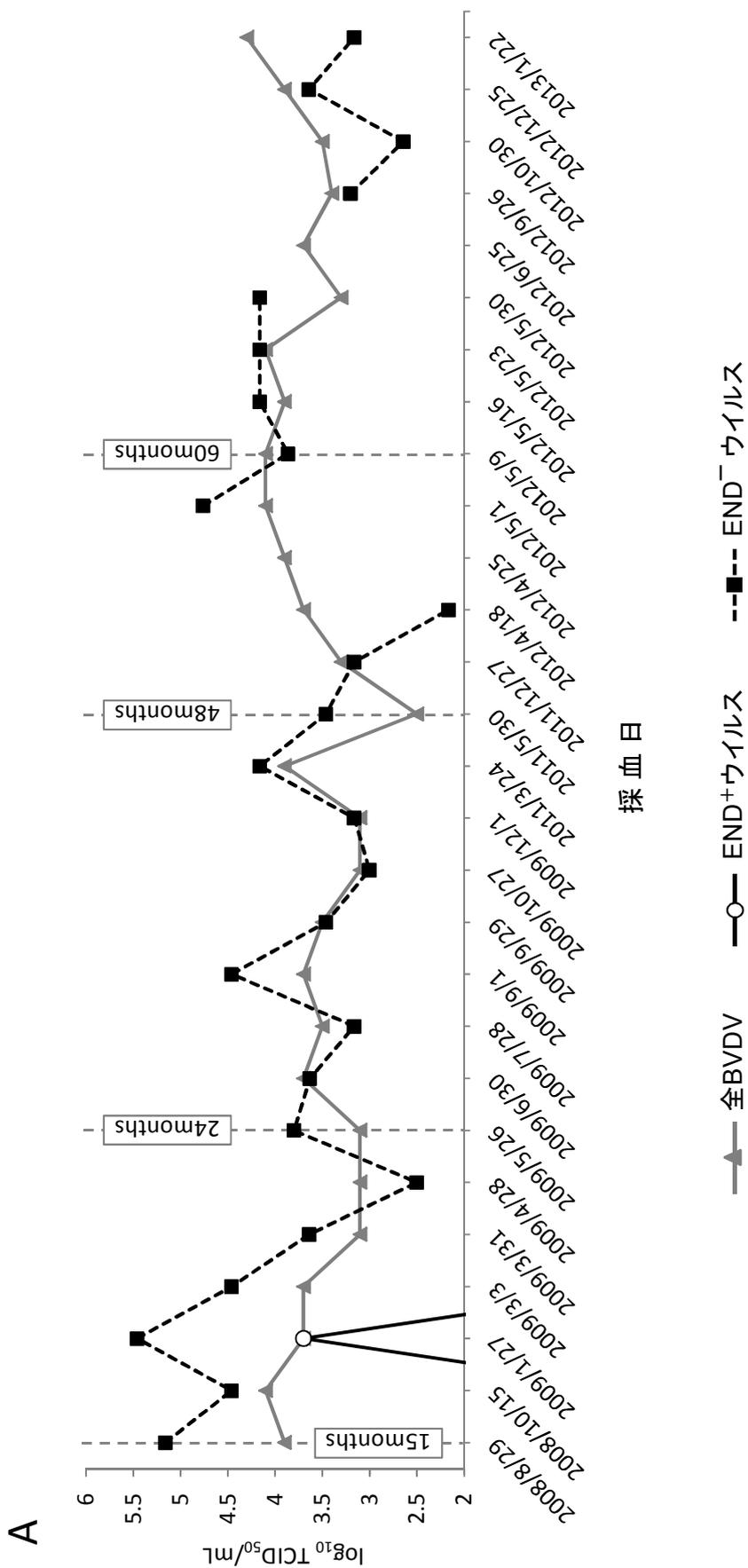
持続感染牛体内における準種構成の変動を遺伝子学的に捉えるため、経過血清の中からウイルス構成パターンが異なる血清を選び、各血清からRNAを抽出し、N^{pro}領域のディープシーケンシングを試みた。

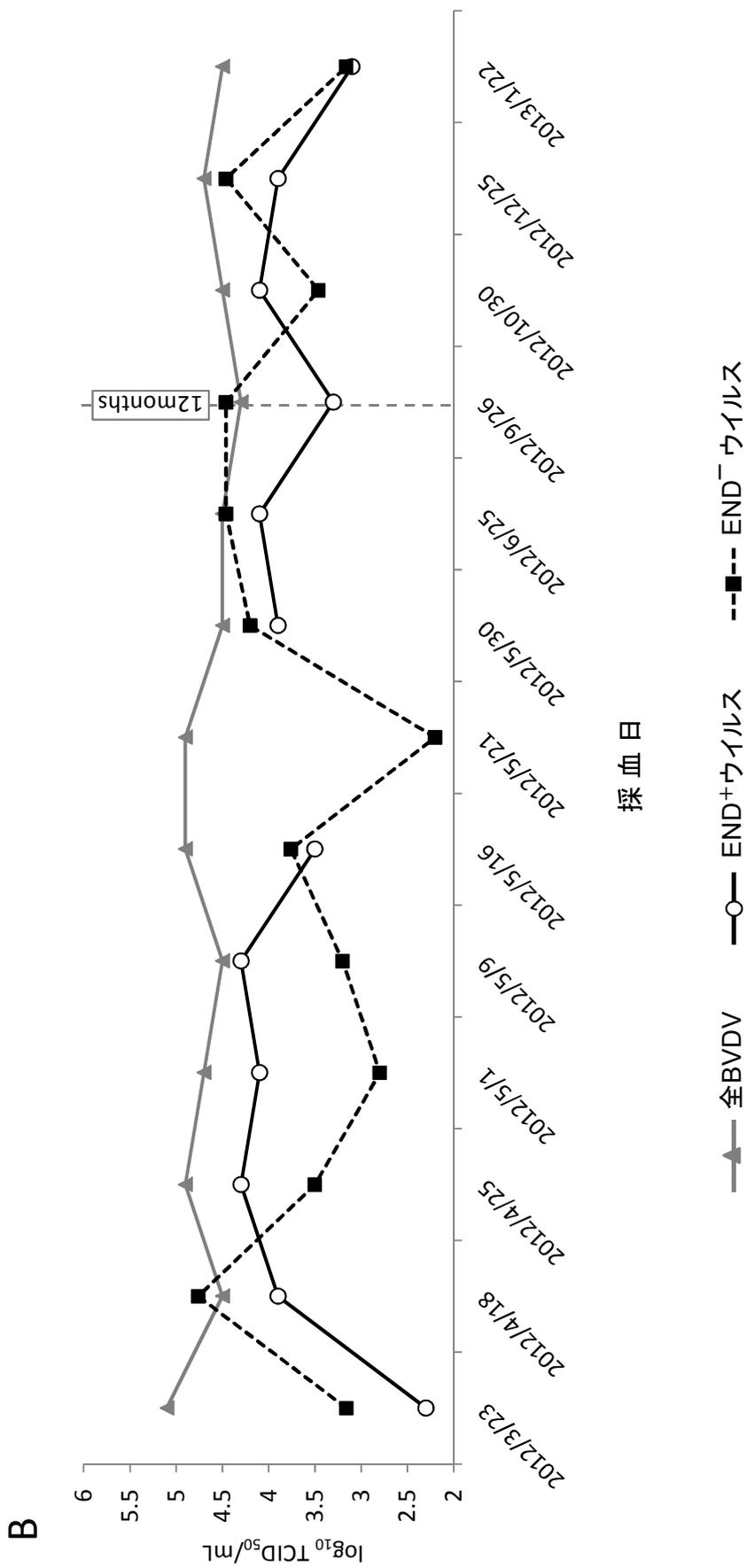
B114及びB115ではそれぞれ2検体ずつ解析した。得られたリードをマッピングした結果、コンセンサス配列は各2検体間で完全に一致した。コンセンサス配列以外の塩基についても、デプスに対する割合が経時的に変動した塩基は、いずれも同義置換であった。

B113の血清については、5検体を解析に用いたが、コンセンサス配列は5検体すべてで一致していた。しかし、N^{pro}の406番目にあたる塩基が2009/1/27（20ヵ月齢）の血清では、デプスに対するグアニンの割合が99.92%で、アデニンの割合がわずか0.05%であったが、2012/6/25（61ヵ月齢）では、グアニンの割合が97.26%で、アデニンの割合が2.71%とわずかに増加していた。さらに、2013/1/22（68ヵ月齢）の血清ではグアニンが95.99%となり、アデニンが3.97%まで増加していた。なお、406番目の塩基がグアニンである場合、N^{pro}の136番目のアミノ酸がアスパラギン酸（Asp）となり、アデニンである場合はアスパラギン（Apn）となる非同義置換であった。

表9 経過血清および持続感染牛のプロファイル

持続感染牛	品種	性別	生年月日	経過血清			感染ウイルス	
				採材期間	採材ポイント	採材時月齢	生物型	遺伝子型
B113	ホルスタイン	雌	2007/5/12	2008/8/29 - 2013/1/22	28	15 - 68	NCP	1b
B114	黒毛和種	雌	2011/9/16	2012/3/23 - 2013/1/22	13	6 - 16	NCP	2a
B115	黒毛和種	雄	2011/9/16	2012/3/23 - 2012/12/18	13	6 - 15	NCP	2a





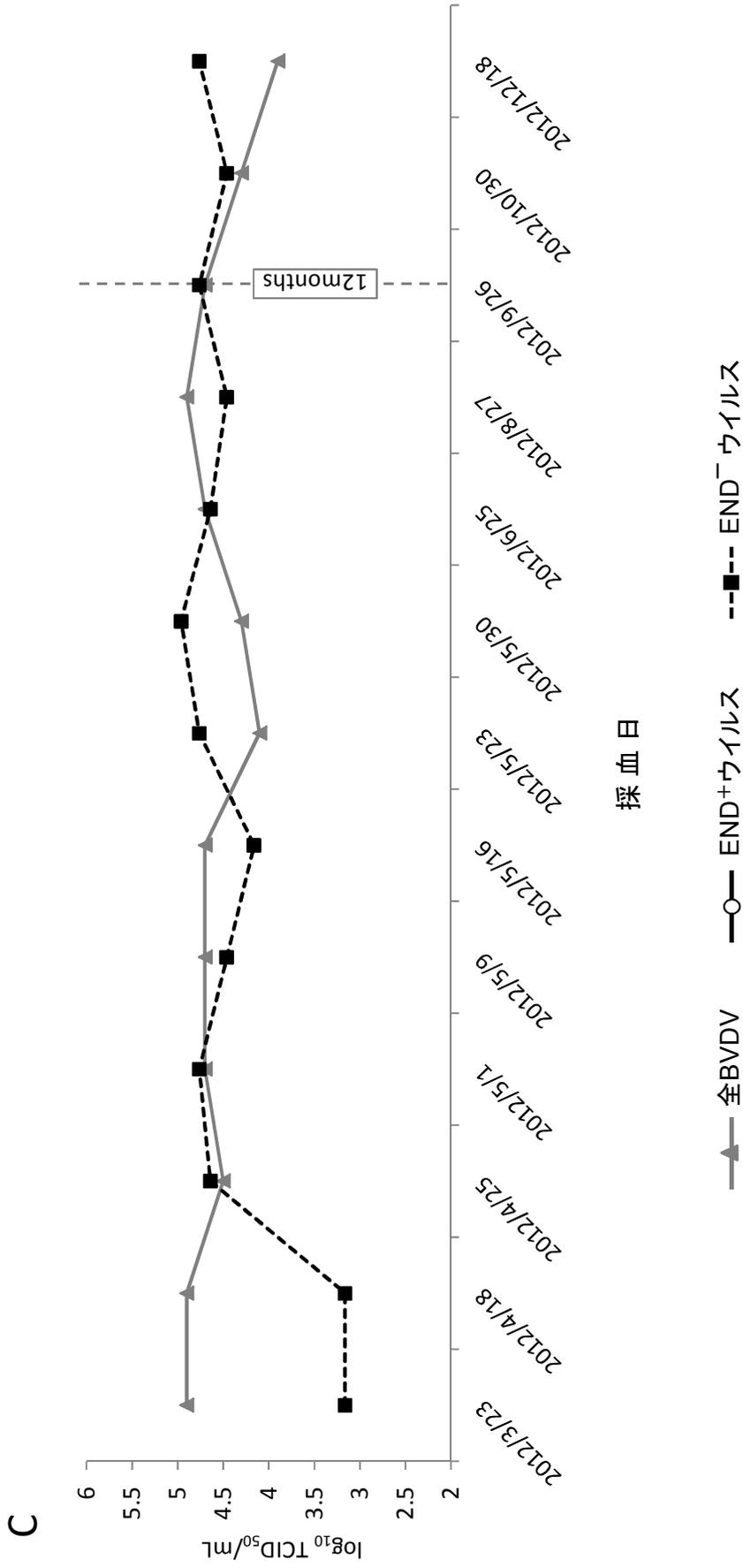


図3 持続感染牛の血清中の準種構成の変動

3頭の持続感染牛の血清に含まれる全BVDV量、END⁺ウイルス及びEND⁻ウイルス量の経時的変動を定期的に調査した。

(A)B113; 15~68ヵ月齢の28検体、(B)B114; 6~16ヵ月齢の13検体、(C)B115; 6~15ヵ月齢の13検体。

表10 N^{pro}領域のPCR産物のディープシーケンスによる塩基の変動及び
推定アミノ酸

406番目 塩基	Rate (%)					136番目 アミノ酸
	09/01/27	11/03/24	12/04/25	12/06/25	13/01/22	
G	99.92	99.92	99.93	97.26	95.99	Asp
A	0.05	0.04	0.04	2.71	3.97	Asn

G: グアニン A: アデニン Asp: アスパラギン酸 Asn: アスパラギン

考 察

持続感染牛から継続的に採材された血清に含まれる END⁺ウイルス及び END⁻ウイルスを定量し、持続感染間の牛体内のウイルス構成の変動を解析した。解析した 3 頭の持続感染牛のうち B114 と B115 は、同一農場で同一の流行中に感染し、同じ日に生まれている。この 2 頭のウイルス構成の変動を比較すると、B114 の血清では END⁺ウイルスが連続的に定量できたのに対し、B115 の血清では連続的に END 現象が確認されたが、いずれの血清においても定量には至らなかった。また、B114 のウイルス構成は不規則な変動であったが、B115 の血清では END⁻ウイルスが主要構成ウイルスとして維持された状態で推移した。これらの結果から、同一の流行中に生まれた同じ月齢の持続感染牛であっても、個体によって準種構成とその変動は異なると考えられた。

B114 と B115 の血清では、少なくとも 15、16 ヶ月齢まで連続的に END 現象が認められた。最も長期間生存している B113 の血清においても、15 から 23 ヶ月齢まで END 現象が認められたが、24 ヶ月齢以降の 44 か月間の血清では、一切の END 現象が認められなかった。すなわち B113 のウイルス構成は、23 ヶ月齢までは END⁻ウイルスが主要構成ウイルスで END⁺ウイルスが混在している状態であったが、24 ヶ月齢以降は、END⁻ウイルスのみで推移した。これらの結果から、長期生存した持続感染牛の体内では、END⁻ウイルスの量、或いは性状が優位になることで END⁺ウイルスの存在、或いは性状が消失している可能性が示唆された。さらに、遺伝学的にこの変動を捉えるために I 型 IFN 産生制御を担うとされる N^{pro} 遺伝子領域のディープシーケンスを実施した。その結果、B113 の血清において、N^{pro} の 136 番目のアミノ酸がアスパラギン酸(Asp)となる塩基配列が大多数を占める中、アスパラギン (Asn) となる塩基配列の割合が 61 ヶ月齢から 9 か月間で約 0.04%から 3.97%に増加する変動が見られた。CSFV と BVDV の N^{pro} は interferon regulatory factor 3 (IRF3) をプロテアソ

ーム系で分解することで IFN- α/β を抑制することが報告されているが[La Rocca *et al.*, 2005; Hilton *et al.*, 2006; Bauhofer *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Seago *et al.*, 2007]、なかでも N^{pro} の 112 番目のシステイン (Cys)、134 番目の Cys、136 番目の Asp 及び 138 番目の Cys で構成される亜鉛結合ドメインが N^{pro} と IRF3 との相互作用及び IRF3 の分解に重要であることがわかっている[Ruggli *et al.*, 2009; Szymanski *et al.*, 2009; Gottipati *et al.*, 2013]。つまり、このモチーフの構成の一つである 136 番目の Asp に置換が生じると、IRF3 が分解されなくなり、I 型 IFN が産生される。これらの知見から、N^{pro}136 番目のアミノ酸が Asn となる割合の増加は、I 型 IFN の産生を誘導し得るウイルスの増加を示唆するものと考えられ、長期間生存する持続感染牛の体内では次第に END⁻ウイルスの性状が優勢になっていく可能性が示唆された。これらの結果は、野外分離株を培養細胞で連続継代すると、培養上清中のウイルス構成が次第に END⁺ウイルスが優勢になる第 2 章の結果とは異なるものである。この違いが生じる要因は不明であるが、牛の体内と単一の組織由来の培養細胞ではウイルスに対する選択圧が大きく異なることが予想され、その差異が影響していると考えられる。

ディープシーケンシングの結果から、長期生存個体の血清において I 型 IFN 産生を誘導し得る配列の割合が上昇したことが明らかになった一方で、宿主の月齢に関係なく N^{pro} 領域のデプスの約 9 割が IFN 産生を抑制する配列であったことは、END 法及び RPF 法で求めたウイルス構成と矛盾する。この矛盾から、END⁺ウイルスと END⁻ウイルスを区別する遺伝学的要因が N^{pro} 領域だけでなく他の蛋白領域も関与している可能性が考えられる。或いは、同量の END⁺ウイルスと END⁻ウイルスであっても、それぞれが END 現象を引き起こす、又は VSV 干渉を引き起こす能力が等しくない可能性が考えられた。つまり、ウイルスの遺伝子配列の割合と生物学的手法で定量した準種の割合が相関していない

可能性が考えられる。この矛盾を解明していくためには、**END⁺**及び**END⁻**ウイルスの感染性クローンを作出し、人為的に混在させ、培養細胞における生物現象と遺伝子配列の変動とを並行して解析していく必要がある。

本研究に用いた3頭の持続感染牛は、採材期間中、顕著な臨床症状は示しておらず、粘膜病も発症しなかった。今後、持続感染牛の経過血清の解析を継続し、粘膜病発症時やその前後のウイルス構成の変動を明らかにすることで、準種と粘膜病発症との関連性が明らかになると期待される。特に、本研究で解析した持続感染牛のうち長期生存している個体は1頭のみであったため、持続感期間と**END⁻**ウイルスの含有率の関係についても、今後、症例数を増やした継続的な調査が必要である。

小 括

隔離飼育された持続感染牛の経過血清に含まれるウイルス構成の経時的な変動を調査し、以下の成績を得た。

1. 同一の流行中に生まれた 2 頭の持続感染牛間で体内のウイルス構成の変動を比較したところ、END⁺ウイルスが持続的に定量できる牛とできない牛が存在したことから、同一流行中に生まれた同月齢の持続感染牛の間であっても個体によって準種構成やその変動が異なることが分かった。
2. 15、16 ヶ月齢までの持続感染牛血清では連続的に END 現象が認められたが、長期間生存している持続感染牛の 24 ヶ月齢以降の血清では END 現象が全く認められなかったことから、持続感染が長期化した場合、感染牛体内では次第に END⁻ウイルスの性状が優勢になる可能性が示唆された。
3. 長期生存個体の 61 ヶ月齢以降の血清で I 型 IFN の産生の誘導に関与するアミノ酸配列を持つ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、次第に END⁻ウイルスが増加する傾向にあることが示唆された。
4. 準種構成の変動と病態（特に粘膜病の発症）との関連性を明らかにするためには、経過血清調査の継続と症例数の拡大が必要である。

総 括

本研究では、BVDVの準種であるEND⁺ウイルス及びEND⁻ウイルスが、野外分離株においてどのように分布しているのか、また、持続感染牛の体内でどのように分布、維持されているのかを調査し、以下の成績を得た。

1. BVDV 野外分離株は様々な割合で END⁺ウイルス及び END⁻ウイルスを含んでおり、END⁻ウイルスは北海道のみならず他県の野外においても広く分布していることが明らかとなった。
2. 北海道と石川県では野外分離株のウイルス構成が異なっていたことから、野外分離株における準種の分布には地域性があると考えられた。
3. 数回のウイルス継代では、ウイルス構成は大きく変動しないことが明らかとなった。本研究に供した家畜保健衛生所から分与された野外分離株は、継代歴が少なくと予測されることから、調査で得られた結果は、感染牛体内のウイルス構成と大きく乖離していないと考えられた。
4. 10代以上のウイルス継代を行うと、END⁺ウイルスがEND⁻ウイルスより優勢となって維持される傾向が認められたため、野外分離株を用いて準種の定量的な解析を行う際には、ウイルス継代歴を考慮する必要がある。
6. END⁻ウイルスが、実験室株や野外分離株だけでなく持続感染牛の体内にも様々な割合で混在していることが証明され、病態と関連する可能性が高いと考えられた。

7. 持続感染牛の血液から、PLA でのみ検出され END 現象も逆ブラックも認められないウイルスが見つかり、END⁺ウイルスと END⁻ウイルスが混在することによる生物性状の混在が生じている可能性、或いはこれまで確認されていない新たな生物性状の準種が存在する可能性のいずれかが考えられた。
8. 持続感染牛体内に混在する準種の構成は、経時的に変動していることが判った。
9. 同一農場で同一流行中に出生した持続感染牛であっても、END⁺ウイルスを定量できる牛とできない牛とが存在するなど、血清中の準種構成及びその変動は個体によって異なることが判った。
10. END 法及び RPF 法で得られた結果と、ディープシーケンシングの結果から、持続感染期間が長くなるにつれて、持続感染牛の体内では END⁻ウイルスの *in vitro* の性状が優位に現れる可能性が示唆された。
11. 以上の結果から、自然免疫応答が相反する準種の混在とその構成の変動が、BVDV の病態の多様性の要因、又は粘膜病の形成の要因の一つである可能性が高いと推察された。

現段階では、END⁺ウイルスと END⁻ウイルスの混在が BVDV 感染症の病態とどのように関連しているかは不明である。今後、病態との関連解析へ展開していくためには、持続感染牛の経過血清の解析を継続するとともに、急性感染や胎子感染時、粘膜病発症時等、症例数を拡大して解析する必要があると考えられる。

本研究で得られた成果は、BVDV 感染症の疫学的な基礎データとなるだけでな

く、病態解明の基盤となる重要なデータであり、検査や予防及び撲滅に寄与するものである。

謝 辞

稿を終えるにあたり、論文のご校閲を賜りました、指導教官である日本獣医生命科学大学 獣医保健看護学科基礎部門 近江俊徳教授に敬意を表します。また、本研究の遂行並びに論文執筆に際し、博士前期課程より終始ご指導を賜りました同大学 青木博史准教に深甚の謝意を表します。また、多くのご助言を賜りました同大学 塩川舞助教に心より深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援、ご指導を賜りました日本獣医生命科学大学 獣医保健看護学科 福所秋雄客員教授、北海道大学大学院 獣医学研究科 迫田義博教授、東京農工大学 農学部 獣医学科 長井誠特任准教授、独立行政法人 動物衛生研究所 亀山健一郎博士に心より深謝致します。また、次世代シーケンサー解析においてご協力賜りました東京農工大学 国際家畜感染症防疫研究教育センター 水谷哲也教授、大松勉講師、片山幸枝氏に心より感謝致します。そして、BVDV 野外分離株の分与並びに情報提供等、多大なるご協力を賜りました石川県家畜保健衛生所 早川裕二氏並びに所員各位に感謝申し上げます。

最後に、院生生活を温かく見守り、辛抱強く支援し続けてくれた両親に心から感謝致します。

参考文献

1. Baker JC. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 11: 425-445.
2. Bauhofer O, Summerfield A, Sakoda Y, Tratschin JD, Hofmann MA, Ruggli N. 2007. Classical swine fever virus N^{pro} interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J Virol.* 81: 3087-3096.
3. Behrens SE, Grassmann CW, Thiel HJ, Meyers G, Tautz N. 1988. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol.* 72: 2364-2372.
4. Bolin SR, McCurkin AW, Cutlip RC, Coria MF. 1985. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res.* 46: 573-576.
5. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec.* 114: 535-536.
6. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. 1989. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res Vet Sci.* 46: 307-311.
7. Chen Z, Rijnbrand R, Jangra RK, Devaraj SG, Qu L, Ma Y, Lemon SM, Li K. 2007. Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by N^{pro} from a cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Virology.* 366: 277-292.
8. Colett MS, Larson R, Belzer SK, Retzel E. 1988. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: The genomic organization of a pestivirus. *Virology* 165: 200-208.
9. Collins ME, Desport M, and Brownlie J. 1999. Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. *Virology.* 259: 85-98.

10. Combe M, and Sanjuán R. 2014. Variation in RNA Virus Mutation Rates across Host Cells. *PLoS Pathog.* 10 (1).
11. Corapi WV, Donis RO and Dubovi EJ. 1988. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from bovine viral diarrhoea virus infections. *J. Virol.* 62: 2823-2827.
12. Domingo E, Sheldon J and Perales C. 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76: 159-216.
13. Eigen M. 1993. Viral quasispecies. *Sci Am.* 269: 42-49.
14. Fourichon C., Beaudreau F., Bareille N., Seegers H. 2005. Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. *Prev Vet Med.* 72: 177-181.
15. Fukusho A, Ogawa N, Yamamoto H, Sawada M, Sazawa H. 1976. Reverse plaque formation by hog cholera virus of the GPE strain inducing heterologous interference. *Infect Immun.* 14: 332-336.
16. Gil LH, Ansari IH, Vassilev V, Liang D, Lai VC, Zhong W, Hong Z, Dubovi EJ, and Donis RO. 2006. The amino-terminal domain of bovine viral diarrhoea virus N^{pro} protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism. *J Virol.* 80: 900-911.
17. Gottipati K, Ruggli N, Gerber M, Tratschin JD, Benning M, Bellamy H, Choi KH. 2013. The structure of classical swine fever virus N^{pro}: a novel cysteine autoprotease and zinc-binding protein involved in subversion of type I interferon induction. *PLoS Pathog.* 9(10).
18. Gunn M, Weavers E. 1992. Mucosal disease in cattle housed in isolation. *Vet Rec.* 131: 376.
19. Hessman BE, Sjeklocha DB, Fulton RW, Ridpath JF, Johnson BJ, McElroy DR. 2012. Acute bovine viral diarrhoea associated with extensive mucosal lesions, high morbidity, and mortality in a commercial feedlot. *J Vet Diagn Invest* 24: 397-404.

20. Howard CJ, Brownlie J, Clarke MC. 1987. Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet Microbiol.* 13: 361-369.
21. Hilton L, Moganeradj K, Zhang G, Chen YH, Randall RE, McCauley JW, Goodbourn S. 2006. The N^{pro} product of bovine viral diarrhoea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation. *J Virol.* 80: 11723-11732.
22. Inaba Y, Omori T and Kumagai T. 1963. Detection and measurement of non-cytopathogenic strain of virus diarrhoea of cattle by the END method. *Arch Gesamte Virusforsch.* 13: 425-429.
23. Inaba Y, Tanaka Y, Kumagai T, Omori T, Ito H, and Matumoto M. 1968. Bovine diarrhoea virus. II. END phenomenon: exaltation of New castle disease virus in bovine cells infected with bovine diarrhoea virus. *Jpn J Microbiol.* 12: 35-49.
24. Ishikawa K, Nagai H, Katayama K, Tsutsui M, Tanabayashi K, Takeuchi K, Hishiyama M, Takagi M, Gotoh K, Muramatsu M and Yamada A. 1995. Comparison of the entire nucleotide and deduced amino acid sequences of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE- and the wild-type parental strain ALD. *Arch Virol.* 140: 1385-1391.
25. Itoh O, Sasaki H and Hanaki T. 1983. Reverse plaque formation method for titration of non-cytopathogenic bovine diarrhoea-mucosal disease virus. *Natl Inst Anim Health Q.* 23: 27-31.
26. Jerzak GV, Bernard K, Kramer LD, Shi PY, and Ebel GD. 2007. The West Nile virus mutant spectrum is host-dependant and a determinant of mortality in mice. *Virology.* 360: 469-476.
27. Kameyama K, Sakoda Y, Tamai K, Igarashi H, Tajima M, Mochizuki T, Namba Y, Kida H. 2006. Development of an immunochromatographic test kit for rapid detection of bovine viral diarrhoea virus antigen. *J Virol Methods.* 138: 140-146.

28. Kärber, G. 1931. Beitrag zur kollektiren Behandlung pharmakologisuche. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **162**: 480-483.
29. Kozasa T, Aoki H, Nakajima N, Fukusho A, Ishimaru M, Nakamura S. 2011. Methods to select suitable fetal bovine serum for use in quality control assays for the detection of adventitious viruses from biological products. *Biologicals.* **39**: 242-248.
30. Kumagai T, Shimizu T and Matumoto M. 1958. Detection of hog cholera virus by its effect on Newcastle disease virus in swine tissue culture. *Science.* **128**: 366.
31. Kumagai T, Shimizu T, Ikeda S, Matumoto M. 1960. A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. *J Immunol.* **87**: 245-256.
32. La Rocca SA, Herbert RJ, Crooke H, Drew TW, Wileman TE, Powell PP. 2005. Loss of interferon regulatory factor 3 in cells infected with classical swine fever virus involves the N-terminal protease, N^{pro}. *J Virol.* **79**: 7239-7247.
33. Matsuno K, Sakoda Y, Kameyama K, Tamai K, Ito A and Kida H. 2007. Genetic and pathobiological characterization of bovine viral diarrhea viruses recently isolated from cattle in Japan. *J Vet Med Sci.* **69**: 515-520.
34. McClurkin AW, Bolin SR, Coria MF. 1985. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* **186**: 568-569.
35. Moennig V, Plagemann PG. 1992. The pestivirus. *Adv Virus Res.* **41**: 53-98.
36. Muhsen M, Aoki H, Ikeda H, Fukusho A. 2013. Biological properties of bovine viral diarrhea virus quasispecies detected in the RK13 cell line. *Arch Virol.* **158**: 753-763.

37. Nakamura S, Fukusho A, Inoue Y, Sasaki H and Ogawa N. 1993. Isolation of different non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea (BVD) virus from cytopathogenic BVD virus stocks using reverse plaque formation method. *Vet Microbiol* 38: 173-179.
38. Nakamura S, Sakamoto K, Sakoda Y, Shimazaki T, Inoue Y, Ogawa N, Fukusho A. 1997. Variation from cytopathogenic biotype to non-cytopathogenic biotype is correlated with the deletion of cellular sequence from bovine viral diarrhea viruses. *J Vet Med Sci.* 59: 361-370.
39. Nakamura S, Shimazaki T, Sakamoto K, Fukusho A, Inoue Y, and Ogawa N. 1995. Enhanced replication of orbiviruses in bovine testicle cells infected with bovine viral diarrhea virus. *J Vet Med Sci.* 57: 677-681.
40. Neill JD.2013. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals.* 41: 2-7.
41. Nishine K, Aoki H, Sakoda Y, and Fukusho A. 2014. Field distribution of END phenomenon-negative bovine viral diarrhea virus. *J Vet Med Sci.* in press.
42. 農林水産省, 監視伝染病の発生状況. 2014/11/27 アクセス.
<http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html>
43. 小川信雄. 1981. 豚コレラウイルス株変異に関する研究. 博士論文. 東京大学
44. Ojosnegros S, Beerenwinkel N, Antal T, Nowak MA, Escarmís C, and Domingo E. 2010. Competition-colonization dynamics in an RNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107: 2108-2112.
45. 大森常良, 稲葉右二, 熊谷哲夫, 守本富昭, 田中義夫, 黒木 洋, 甲野雄次. 1963. BEND ウイルス : I. ウシ組織からのウイルス分離とウシ下痢症ウイルス Oregon C24V 株との関係. *日本獣医学雑誌.* 25: 495.
46. 大森常良, 稲葉右二, 田中義夫, 守本富昭, 宗形光蔵, 松田一男, 黒木洋. 1965. 牛の BEND ウイルス感染. *日本獣医師会雑誌.* 18: 401-406.

47. Pellerin C, Hurk JVD, Lecomte J, Tijssen P. 1994. Identification of a New Group of Bovine Viral Diarrhea Virus Strains Associated with Severe Outbreaks and High Mortalities. *Virology* 203: 260-268.
48. Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, Schweizer M. 2010. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet Res.* 41: 44-58.
49. Ross CE, Dubovi EJ, Donis RO. Herd problem of abortions and malformed calves attributed to bovine viral diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* 188: 618-619.
50. Ruggli N, Summerfield A, Fiebach AR, Guzylack-Piriou L, Bauhofer O, Lamm CG, Waltersperger S, Matsuno K, Liu L, Gerber M, Choi KH, Hofmann MA, Sakoda Y, and Tratschin JD. 2009. Classical swine fever virus can remain virulent after specific elimination of the interferon regulatory factor 3-degrading function of N^{pro}. *J Virol.* 83: 817-829.
51. Saito N, and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
52. Sanz-Ramos M, Diaz-San SF, Escarmis C, Domingo E, Sevilla N. 2008; Hidden virulence determinants in a viral quasispecies in vivo. *J Virol.* 82: 10465-10476.
53. Sasahara J, Kumagai T, Shimizu Y, Furuuchi S. 1969. Field experiments of hog cholera live vaccine prepared in guinea-pig kidney cell culture. *Natl Inst Anim Health Q.* 9: 83-91.
54. Seago J, Hilton L, Reid E, Doceul V, Jeyatheesan J, Moganeradj K, McCauley J, Charleston B, Goodbourn S. 2007. The N^{pro} product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3. *J Gen Virol.* 88: 3002-3006.

55. Sheldon J, Beach NM, Moreno E, Gallego I, Piñeiro D, Martínez-Salas E, Gregori J, Quer J, Esteban JI, Rice CM, Domingo E, and Perales C. 2014. Increased replicative fitness can lead to decreased drug sensitivity of hepatitis C virus. *J Virol.* 88: 12098-12111.
56. Shimizu M, Murakami K and Satou K. 1989. Serological comparison of cytopathogenic and non-cytopathogenic bovine viral diarrhoea-mucosal disease viruses isolated from cattle with mucosal disease. *Jpn J Vet Sci.* 51: 157-162.
57. Shimizu M, Satou K, Nishioka N, Yoshino T, Momotani E and Ishikawa Y. 1989. Serological characterization of virus isolated from experimental mucosal disease. *Vet Microbiol.* 19: 13-21.
58. Shimizu Y, Furuuchi S, Kumagai T, Sasahara J. 1970. A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle. *Am J Vet Res.* 31: 1787-1794.
59. Szymanski MR, Fiebach AR, Tratschin JD, Gut M, Ramanujam VM, Gottipati K, Patel P, Ye M, Ruggli N, Choi KH. 2009. Zinc binding in pestivirus N^{pro} is required for interferon regulatory factor 3 interaction and degradation. *J Mol Biol.* 391: 438-449.
60. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28: 2731-2739.
61. Thiel J, Peters T, Mas MA, Rosler B, Peter HH, Weiner SM. 2002. Kinetics of hepatitis C (HCV) viraemia and quasispecies during treatment of HCV associated cryoglobulinaemia with pulse cyclophosphamide. *Ann Rheum Dis.* 61: 838-841.
62. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

63. Töpfer A, Höper D, Blome S, Beer M, Beerenwinkel N, Ruggli N, Leifer I. 2013. Sequencing approach to analyze the role of quasispecies for classical swine fever. *Virology*. 438: 14-19.
64. Tratschin JD, Moser C, Ruggli N, Hofmann MA. 1995. Classical swine fever virus leader proteinase N^{pro} is not required for viral replication in cell culture. *J Virol*. 72: 7681-7684.
65. Valle PS., Skjerve E., Martin SW., Larssen RB., Østerås O., Nyberg O. 2005. Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Prev Vet Med*. 72: 189-207.
66. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE and Andino R. 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature*. 439: 344-348.
67. Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. 1994. Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction endonuclease analysis. *Arch Virol*. 136: 309-323.
68. World Organization for Animal Health (OIE): 2014. Chapter 2.4.8. Bovine viral diarrhoea. *In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE, Paris, France.
69. Yamane D, Kato K, Tohya Y, Akashi H. 2008. The relationship between the viral RNA level and upregulation of innate immunity in spleen of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol*. 129: 69-79.
70. Yeşilbağ K, Förster C, Ozyiğit MO, Alpay G, Tuncer P, Thiel HJ, König M. 2014. Characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from an outbreak with haemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Vet Microbiol*. 169: 42-49.