

学 位 論 文 題 名

Development of Novel Diagnostic
Methods of Classical Swine Fever

（豚コレラの新しい診断法の開発）

学位論文内容の要旨

豚コレラウイルス（CSFV）はフラビウイルス科、ペスチウイルス属の＋鎖 RNA ウイルスである。CSFV は同属の牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）と共通抗原性を有するので、試験に用いる細胞の培養液に添加する牛血清は抗 BVDV 抗体陰性でなければならない。しかし、牛ウイルス性下痢病は世界中に蔓延しているため、抗 BVDV 抗体陰性血清の入手はきわめて難しい。また、BVDV 持続感染牛から採取された血清には感染性 BVDV を含むことが多いので、診断やワクチン製造のための細胞の培養に用いることはできない。また、このような血清には加熱非働化して感染性ウイルスを不活化しても、BVDV RNA 断片は残存するので、誤った遺伝子検出成績を得るおそれがある。

ほとんどの CSFV 株は、培養細胞に対して明らかな細胞変性効果（CPE）を示さない。そのため、ウイルスと抗体の検出には酵素抗体法、蛍光抗体法、END [ニューキャッスル病ウイルス（NDV）の CPE を増強させる] 法および干渉法などが用いられていた。酵素抗体法と蛍光抗体法は抗 CSFV 特異抗体を用いてウイルス抗原を検出するもので、煩雑な作業を要する。また、END 法および干渉法は強毒の CSFV や NDV、および海外悪性伝染病である水疱性口炎ウイルスや西部馬脳炎ウイルスなどをそれぞれ使用するので、ウイルス拡散を防止することができる施設において実施しなければならない。

本研究はまず、無血清培地で増殖可能な豚腎臓由来株化細胞を樹立した。次にこれを用いて安全、簡便かつ信頼性の高い豚コレラ診断法を確立した。

1. 無血清培地で増殖可能な細胞株の樹立とその性状解析

豚腎上皮由来の株化 SK-L 細胞および CPK 細胞を培養液中の血清濃度を徐々に減少させて継代した。継代を約 50 代繰り返した結果、最終的にイーグル MEM に 0.5% Bacto Peptone、0.295% Tryptose Phosphate Broth、10 mM N, N-Bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid のみを加えた無血清培養液で増殖可能な細胞株、FS-L3 細胞および CPK-NS 細胞を樹立した。FS-L3 細胞は継代 3 日目から単層形成後に本細胞特有なドームを形成し、この数は培養時間とともに増加し

た。さらにこのドームは、長期間培養すると球状の形態をとって培養液中に浮遊し、増殖した。これらの両細胞にはペスチウイルス属のすべてのウイルスの迷入がないことを確認した。さらに FS-L3 細胞には、豚サイトメガロウイルス、豚レトロウイルス、豚サーコウイルス、マイコプラズマが存在しないことも確認した。

2. 新しい豚コレラウイルスの感染価と中和抗体価の定量法の確立

FS-L3 細胞に CSFV ワクチン株 (GPE⁻株) を感染させたところ、ウイルス接種 3 日後より CPE を認め、ウイルスの増殖に伴って FS-L3 細胞に特有な球状のドームが消失した。CPK-NS 細胞もまた、GPE⁻株の感染によって明瞭な CPE を示した。両細胞は END 現象を示さない (END⁻) すべての CSFV 株の感染により明瞭な CPE を示し、END 現象を示す (END⁺) CSFV 株の感染では CPE を示さなかった。この END⁻株の感染による CPE は、アポトーシス誘導の結果と想定された。

FS-L3 細胞におけるドームの消失と CPK-NS 細胞における明瞭な CPE をウイルス感染のマーカーとして、END⁻ CSFV 株の感染価定量法を確立した。また、このウイルス感染マーカーと豚コレラウイルス株間の干渉現象を利用して、単独では CPE を示さない END⁺ CSFV 株の感染価の定量法を確立した。さらに、GPE⁻株をマーカーウイルスとして用いた中和抗体価測定法を確立した。これらの方法で求めたウイルス感染価と中和抗体価は、従来法による値と高い相関を示した。

3. 豚コレラウイルスと反芻動物のペスチウイルスの遺伝子解析による分類

RT-PCR 法により、豚ならびに反芻動物由来のペスチウイルスの 5'非翻訳領域のウイルス遺伝子を増幅し、PCR 産物を検出した。さらにこれらのウイルス遺伝子核酸の塩基配列を決定し、分子系統樹解析を行った。豚由来ペスチウイルス 42 株はすべて CSFV グループに分類され、大半は 2 つのサブグループ (CSFV-1 と CSFV-2) に区分された。日本の分離株を含む 4 株は塩基配列が他の CSFV 株とは大きく異なり、新しいサブグループ (CSFV-3) に区分された。

反芻動物由来ペスチウイルス 31 株はその大半が BVDV 遺伝子型 I (BVDV-I) に分類され、さらに 2 つのサブグループ (BVDV-Ia と BVDV-Ib) に分かれた。それ以外の反芻動物由来 3 株は BVDV 遺伝子型 II (BVDV-II) として分かれた。また、制限酵素を用いた PCR 産物の切断片長解析から CSFV、BVDV-I、BVDV-II の遺伝子グループを容易に区別することが可能となった。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	喜 田	宏
副 査	教 授	小 沼	操
副 査	教 授	高 島	郁 夫
副 査	助教授	岡 崎	克 則

学 位 論 文 題 名

Development of Novel Diagnostic Methods of Classical Swine Fever

(豚コレラの新しい診断法の開発)

豚コレラウイルス (CSFV) は牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) と共通抗原を有するので、試験に用いる細胞の培養液に添加する牛血清は抗 BVDV 抗体陰性でなければならない。しかし、抗 BVDV 抗体陰性血清の入手はきわめて難しく、また、BVDV 持続感染牛から採取された血清には感染性 BVDV またはその RNA 断片を含むので、診断やワクチン製造のための細胞の培養に用いることはできない。

CSFV と抗体の検出には酵素抗体法、蛍光抗体法、END 法および干渉法などが用いられていた。酵素抗体法と蛍光抗体法は抗 CSFV 特異抗体を用いてウイルス抗原を検出するもので、煩雑であり、END 法および干渉法は強毒の CSFV やニューキャッスル病ウイルス (NDV)、および水胞性口炎ウイルスや西部馬脳炎ウイルスなどをそれぞれ使用するので、ウイルス拡散を防止することができる施設において実施しなければならない。

本研究は、無血清培地で増殖可能な豚腎臓由来株化細胞を樹立し、これらを用いて安全、簡便かつ信頼性の高い豚コレラ診断法を確立したものである。

まず、豚腎上皮由来の株化 SK-L 細胞および CPK 細胞を培養液中の血清濃度を徐々に減少させて継代を繰り返し、無血清培養液で増殖可能な細胞株、FS-L3 細胞および CPK-NS 細胞を樹立した。次に、FS-L3 および CPK-NS 細胞を用いて CSFV 株の感染価と中和抗体価の定量法を確立した。これらの細胞を用いて得た成績は従来法による値と高い相関を示すことを確かめた。

さらに、RT-PCR 法により、豚ならびに反芻動物由来のペスチウイルスの 5' 非翻訳領域のウイルス遺伝子を増幅し、PCR 産物を検出した。これらのウイルス遺伝子核酸の塩基配列を決定し、分子系統解析を行った結果、豚由来ペスチウイルス 4 2 株はすべて CSFV グループに分類された。日本の分離株を含む 4 株は塩基配列が他の CSFV 株とは大きく異なり、新しいサブグループ (CSFV-3) に区分された。また、PCR 産物の制限酵素による切断片解析によって、CSFV と反芻動物由来ペスチウイルスを遺伝子グループに区別することが可能となった。

本研究によって開発された CSFV のウイルス感染価と抗体価の定量法は安全、簡便かつ信頼性の高い豚コレラ診断法であり、本病の予防と治療に多大な貢献を果たすものと期待される。よって、審査員一同は迫田義博氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。