

学 位 論 文 題 名

Characterization of Cytopathogenic Classical Swine Fever Virus

（細胞病原性を示す豚コレラウイルスの性状解明）

学位論文内容の要旨

豚コレラウイルスはフラビウイルス科ペスチウイルス属の+鎖 RNA ウイルスであり、培養細胞に病原性（cytopathic effect : CPE）を示さず、END（The exaltation of Newcastle disease virus ; ニューカッスル病ウイルスの増強）現象を示すとされていた。しかし、近年、ウイルス株を構成する集団の中に CPE を示すウイルスが含まれていることがわかった。一つは、subgenomic RNA を有する不完全干渉ウイルスであり、それを含むウイルス株は、豚コレラウイルスに感受性の豚由来培養細胞に CPE を示す。もう一つは、END 現象を示さないウイルスであり、無血清培養細胞（FS-L3 細胞及び CPK-NS 細胞）に明瞭な CPE を示す。これらの CPE を示すウイルスが培養細胞や生体に対して病原性を発揮するメカニズムは不明である。

著者は 1982 年に日本国内で豚コレラの症状を示したイノシシから分離された豚コレラウイルス WB82 株の遺伝子構造を明らかにし、培養細胞や生体に病原性を顕すメカニズムを明らかにした。さらに、豚コレラウイルス非構造蛋白質 NS2-3 の NS2 と NS3 への開裂と、WB82 株及び END 現象を示さないウイルス株が有する細胞病原性との関係を解明した。

1. 細胞変性効果を示す豚コレラウイルス WB82 株の性状解明

WB82 株は、試験に用いた 6 種類の豚腎及び精巣由来培養細胞（CPK 細胞、PK-15 細胞、SK-L 細胞、CPK-NS 細胞、FS-L3 細胞及び ST 細胞）に強い CPE を示した。本株は、END 現象を示す非細胞病原性(nCPE)ウイルス（WB82/E⁺ウイルス）と、その約 100 分の 1 の量の CPE ウイルス両方を含んでいることが判明した。この WB82 株のウイルス遺伝子の構造を解析した結果、本株は、通常のペスチウイルスにみられる約 12,300 塩基の RNA を持つ完全ウイルスと、N^{pro} から構造蛋白（C、E^{pro}、E1 及び E2）、p7 及び NS2 までの 4764 塩基の遺伝子領域を欠損した約 7,600 塩基の subgenomic RNA を持つ不完全ウイルスの両方を含んだものであった。さらに、階段希釈した WB82 株を感染させた細胞のうち、CPE を示す細胞から subgenomic RNA が検出され、CPE を示さない細胞からは通常のウイルス遺伝子 RNA のみが検出された。また、WB82 株中の nCPE ウイルスを他の nCPE 豚コレラ

ウイルスに置換しても CPE がみられ、細胞病原性が subgenomic RNA に依存していることが判明した。以上の成績は、豚コレラウイルス WB82 株が nCPE 完全ウイルスと不完全干渉ウイルスの両方を含む細胞病原性豚コレラウイルス株であり、さらに、その細胞病原性が subgenomic RNA を有する不完全干渉ウイルスに依ることを示す。

2. 豚コレラウイルス WB82 株の豚に対する病原性とウイルス複製の解析

不完全干渉ウイルスを含む豚コレラウイルス WB82 株の豚に対する病原性を調べる目的で感染試験をおこなったところ、本株は急性型の豚コレラの症状を引き起こした。すなわち、感染した豚は、高熱、顕著な白血球減少及び重度な下痢などの症状を呈し、感染後 2～3 週間内に死亡した。WB82 株中から単離した nCPE WB82/E⁺ウイルス（完全ウイルス）の豚に対する病原性の試験でも急性型の豚コレラの症状が見られた。しかし、両方の結果を比較したところ、WB82 株に含まれる不完全干渉ウイルスが完全ウイルスによって引き起こされる急性症状を遅延・軽減することがわかった。本株に感染した豚から得た血清及び各種臓器の材料を調べた結果、完全ウイルスの増殖に続く不完全干渉ウイルスの複製が豚コレラの症状の遅延・軽減に関与することがわかった。また、それらの材料に、完全ウイルスとその約 100～1,000 分の 1 の量の不完全干渉ウイルスが含まれることが判明した。さらに、直腸ぬぐい液から通常の豚コレラウイルス RNA とともに subgenomic RNA が検出され、不完全干渉ウイルスが体外に排泄されていることが判明した。以上の成績は、WB82 株は致死性の豚コレラウイルス株であるが、株の中に含まれる subgenomic RNA を有する不完全干渉ウイルスが、豚コレラウイルスの豚に対する病原性を低減させる作用をもつことを示している。

3. 非構造蛋白 NS2-3 の開裂と細胞病原性の関係解明

豚コレラウイルス非構造蛋白 NS2-3 の NS2 と NS3 への開裂と、不完全干渉ウイルスを含む WB82 株及び END 現象を示さないウイルスが示す細胞病原性の関係を、抗 NS3 モノクローン抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、WB82 株は試験に用いた全ての豚由来培養細胞（FS-L3 細胞、CPK-NS 細胞、PK-15 細胞、SK 細胞及び ST 細胞）に強い CPE を示し、それらの細胞内に NS3 蛋白が NS2-3 蛋白より優位に検出された。また、END 現象を示さないウイルス株（ALD-END⁻株、Ames-END⁻株及び GPE⁻株）が感染した細胞では、CPE を示した FS-L3 細胞及び CPK-NS 細胞内に NS3 蛋白が NS2-3 蛋白より優位に検出され、CPE を示さない他の細胞内には主に未開裂の NS2-3 蛋白が検出された。END 現象を示すウイルス株（ALD 株、Ames 株、WB82/E⁺株、Fukushima/80 株、Miyazaki/80 株、Shimane/80 株、Yamagata/80 株、Chiba/80 株及び Ogatamura/68 株）では、試験に用いたいずれの細胞にも CPE を

示さず、細胞内に未開裂の NS2-3 が優位に検出された。ALD 株（END 現象陽性株）及び ALD-END⁻株（END 現象陰性株）に感染した FS-L3 細胞を経時的に解析した結果、ALD-END⁻ウイルスの NS2-3 蛋白の開裂が進むにつれて CPE が強くなることが明らかとなった。以上の成績は、不完全干渉ウイルスを含む豚コレラウイルス株の細胞病原性だけでなく、END 現象を示さない豚コレラウイルスが FS-L3 細胞や CPK-NS 細胞で示す細胞病原性においても非構造蛋白質 NS2-3 の NS2 と NS3 への開裂が重要であることを示している。

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 教 授 梅 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

Characterization of Cytopathogenic Classical Swine Fever Virus

(細胞病原性を示す豚コレラウイルスの性状解明)

豚コレラウイルスは培養細胞に病原性 (CPE) を示さず、END (exaltation of Newcastle disease virus ; ニューカッスル病ウイルスの増強) 現象を示す (END⁺) とされていた。しかし近年、ウイルス株を構成する集団の中に細胞病原性ウイルスが含まれることがわかってきた。すなわち、多くの豚由来培養細胞に細胞変性効果 (CPE) を示す不完全干渉ウイルスと、END 現象陰性 (END⁻) で、無血清培養細胞 (FS-L3 細胞および CPK-NS 細胞) に CPE を示すウイルスである。これらのウイルスが培養細胞と生体に対して病原性を発揮するメカニズムは不明である。

著者は豚コレラの症状を示したイノシシから分離した豚コレラウイルス WB 82 株の遺伝子構造を明らかにし、培養細胞と生体に対する病原性との関係を解析した。さらに、豚コレラウイルス非構造蛋白 NS2-3 の開裂と WB 82 株及び END⁻ウイルスが示す細胞病原性の関係を解析した。

多くの豚由来培養細胞で強い CPE を示す WB 82 株には、通常の遺伝子 (12,364 塩基の RNA) を持つ完全ウイルス粒子 (END⁺, non CP) と 4,764 塩基の遺伝子領域を欠損した 7,600 塩基の RNA を持つ不完全干渉粒子の両方が 100 : 1 の比で含まれることが判った。階段希釈した WB 82 株を感染させた細胞のうち、CPE を示す細胞から欠損 RNA が検出され、CPE を示さない細胞からは通常のウイルス遺伝子構造をもつ RNA のみが検出された。また、WB 82 株中の非細胞病原性ウイルスを他の非細胞病原性豚コレラウイルスに置換しても CPE がみられたことから、細胞に対する病原性が不完全粒子に依ることがわかった。

CPE を示す豚コレラウイルス WB 82 株を実験感染させた豚は、典型的な急性豚コレラの症状を呈した。しかし一方で、不完全干渉粒子は完全ウイルス粒子による急性豚コレラの症状を遅延・軽減することもわかった。

ウイルス非構造蛋白 NS 2-3 の開裂と細胞病原性の関係を解析した結果、CPE を示さないウイルス感染細胞内に NS 2-3 の開裂はほとんど見られないが、WB 82 株や END⁻株の感染によって CPE を示した培養細胞内に NS 2-3 の開裂産物である NS 3 が優位に検出された。また、END⁻ウイルスの NS 2-3 の開裂が進むにつれて CPE が出現することがわかった。以上の成績は、不完全干渉粒子を含む WB 82

株と同様に、END⁻ 株が無血清培養細胞で示す細胞病原性においても NS 2-3 蛋白の NS 2 と NS 3 への開裂が重要であることを示す。

本研究成果が豚コレラウイルスの病原性の分子基盤の解明に資するところが大きいのので、審査員一同は青木博史氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。