

学 位 論 文 題 名

# Studies on the Pathogenesis and Rapid Diagnosis of Bovine Viral Diarrhea

（牛ウイルス性下痢症の病理発生および迅速診断に関する研究）

## 学位論文内容の要旨

牛ウイルス性下痢ウイルス（bovine viral diarrhea virus; BVDV）はフラビウイルス科ベスチウイルス族に属する。このウイルスのゲノムは約12.3kbの+極性を持つ1本鎖RNAからなり、5'および3'非翻訳領域の間に一つの大きな翻訳領域を持つ。この翻訳領域より生成されたポリプロテインはウイルスもしくは細胞の蛋白分解酵素により11または12のウイルス蛋白に切断される。

BVDVは全世界に浸潤しており、このウイルスにより引き起こされる牛ウイルス性下痢症（bovine viral diarrhea; BVD）は発熱、水様下痢、呼吸器症状、粘膜の糜爛などを主徴とする。妊娠牛がBVDVに感染すると経胎盤感染が容易に起こる。胎齢約80～100日の胎児がncpBVDVに感染すると免疫寛容となり、持続感染仔牛として生まれる。このような持続感染牛は一見健康であるが、周囲にウイルスを排泄し続けるため牛群内の感染源となる。さらに、持続感染牛は致死的な粘膜病を発症することが多い。

BVDのコントロールには感染源となる持続感染牛の早期発見と淘汰が最も重要である。現在、BVDの診断にはウイルス分離、RT-PCRおよび市販のELISAキットなどが用いられている。本研究では、BVDのコントロールと分子基盤の解明を目的として、BVD迅速診断法の開発、BVDVの新規遺伝子組換えメカニズムの解明および生体内におけるBVDV蛋白のプロセッシングの解析を行った。

### 1. イムノクロマトグラフィ法を用いてBVDV抗原を迅速に検出するキットの開発

本章では、BVDVのNS3蛋白に対するモノクローン抗体を用いてBVDを迅速に診断するイムノクロマトキットを開発した。このキットは*in vitro*において様々な遺伝子型のBVDVのNS2-3蛋白を検出し、また、*in vivo*においてもBVDVに持続感染した牛の白血球抽出液からウイルス抗原を検出した。ウイルス分離と比較したこのキットの感度と特異度はそれぞれ100%および97.2%であった。さらに、BVDVを急性感染させた牛からもウイルス抗原を検出した。本キットは1mlの血液から比較的簡単な手順でBVDV抗原を検出することから、BVDの迅速診断に有用であると考えられる。

## 2. 牛ウイルス性下痢ウイルスのN<sup>pro</sup>遺伝子領域における遺伝子組換えとウイルスの抗原性と病原性の変化の関連

cpBVDV KS86-1cp株は、ncpBVDV KS86-1ncp株に持続感染した牛にcpBVDV Nose株が重感染し、牛が粘膜病を発症した際に分離された株である。cpBVDV 799cpおよび839cp株はこのcpBVDV KS86-1cp株の重感染により粘膜病を発症した牛から分離された。本章ではこれらのウイルスの遺伝子構造を解析し、cpBVDV 799株および839株が、牛に持続感染していたncpBVDVと重感染したKS86-1cp株の間での遺伝子組換えにより生じたキメラウイルスであることを明らかにした。また、799cpおよび839cp株を生んだ遺伝子組換えはそれぞれ異なる部位で起こっていたにも関わらず、両ウイルスは共にKS86-1cp株の持つJiv遺伝子と牛に持続感染株していたncpウイルスの膜糖蛋白遺伝子を受け継いでいた。さらに、中和試験により、799cpおよび839cp株の抗原性はそれぞれの持続感染ウイルスと類似していることが分かった。これらの結果は5'非翻訳領域にJiv遺伝子を持つ外来性cpBVDVは牛に持続感染しているncpBVDVと様々な部分で遺伝子組換えを起こし、抗原性と病原性を変化させる能力を持つことを示している。

## 3. 生体内における牛ウイルス性下痢ウイルスNS2-3蛋白の開裂

cpBVDVが感染した培養細胞中において、その非構造蛋白2-3 (NS2-3) は開裂し、ncpBVDVが感染した培養細胞中ではそのNS2-3は開裂しないことが知られている。しかし、生体内におけるNS2-3蛋白の開裂は未だ調べられていない。本章では粘膜病発症の分子基盤を明らかにするため、BVDVに持続感染している牛の体内におけるNS2-3蛋白の開裂を調べた。実験に用いた持続感染牛から分離したBVDVの生物型は全てncpであり、これらのウイルスを感染させた培養細胞からは約120 kDaのNS2-3蛋白が検出された。一方、これらの持続感染牛の白血球からはNS2-3蛋白の開裂により生ずる約80 kDaのNS3蛋白が検出され、健康牛から分離した白血球にBVDVを感染させた場合にも同じ現象が確認された。さらに、NS3蛋白は持続感染牛のリンパ系組織、甲状腺、肺および腎臓などの多くの組織からも検出された。以上の結果から、*in vitro*ではNS2-3が開裂しないncpBVDVであっても、牛の体内においてはNS2-3が開裂することが分かった。このNS2-3蛋白の開裂は粘膜病の発生と直接的な関連はないものの、発育不良、下痢、呼吸器症状などのBVDの一般症状の発症に関与しているものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	喜田	宏
副査	教授	澤	洋文
副査	助教授	田島	誉士
副査	助教授	迫田	義博

## 学位論文題名

# Studies on the Pathogenesis and Rapid Diagnosis of Bovine Viral Diarrhea

(牛ウイルス性下痢症の病理発生および迅速診断に関する研究)

牛ウイルス性下痢症 (bovine viral diarrhea; BVD) は、BVDウイルス(BVDV)の感染によって、発熱、水様下痢、呼吸器症状、粘膜の糜爛などを主徴とする届出伝染病である。BVDVに持続感染した牛は周囲にウイルスを排泄し続けるため他の牛の感染源となる。さらに持続感染牛は致死的な粘膜病を発症するため、BVDVの蔓延による経済的損失は大きい。本研究は、BVDのコントロールと病理発生の分子基盤の解明を目的として、BVD迅速診断法を開発して、感染牛の摘発に適用するとともに、牛生体内におけるBVDVの遺伝子組換えおよび蛋白のプロセッシングを解析したものである。

初めにBVDVのNS3蛋白に対するモノクローン抗体を用いてBVDを迅速に診断するイムノクロマトグラフィーキットを開発した。本キットは高い感度と特異度を持ち、少量のサンプルから従来法より迅速に診断が行えることから、BVDの迅速診断に有用であると考えられる。次に、粘膜病を発症した牛から分離されたウイルスの遺伝子構造を解析し、5'非翻訳領域にJiv遺伝子を持つ細胞病原性 (cp) BVDVが持続感染牛に感染すると、持続感染している非細胞病原性 (ncp) BVDVと遺伝子組換えを起こし、抗原性の異なる新たなcpBVDVが生まれ、粘膜病を発症することを明らかにした。最後に、粘膜病発症の分子基盤を明らかにするため、BVDVに持続感染している牛の体内におけるNS2-3蛋白の開裂を調べた。持続感染牛から分離したBVDVの生物型は全てncpであったが、これらの持続感染牛の白血球からはNS2-3蛋白の開裂により生ずる約80 kDaのNS3蛋白が検出された。さらに、持続感染牛の臓器内でも高い割合でNS2-3蛋白が開裂することが明らかとなった。以上の結果から、*in vitro*ではNS2-3が開裂しないncpBVDVであっても、牛の生体内においては、NS2-3が開裂することが分かった。従ってNS2-3蛋白の開裂は粘膜病の発生と直接的な関連はないものの、発育不良、下痢、呼吸器症状などのBVDの一般症状の発症に関与しているものと考えられる。

本研究成果はBVDの発症メカニズムの解明と対策に有用である。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者亀山健一郎氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。