

論文の内容の要旨

論文題目 牛ウイルス性下痢ウイルス遺伝子の多様性に関する研究

氏名 長 井 誠

牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)はフラビウイルス科のペスチウイルス属に分類され、豚コレラウイルス、ボーダー病ウイルスとともに畜産経営に損失をもたらす重要な病原体である。健康な牛が BVDV の感染を受けると症状を示さない場合が多いが、1990 年代の前半に北米で出血性病変、激しい血小板減少および高い死亡率を特徴とした損耗率の高い BVDV 感染症が発生した。この流行から分離された BVDV は、従来の BVDV(BVDV 1)とは遺伝子型および抗原性状が異なることから BVDV 1 とは区別され、BVDV 2 と名付けられた。BVDV は容易に垂直感染を起こし、胎子に様々な障害を引き起こす。胎子が後期の組織発生が進行しつつある胎齢 100～150 日に感染を受けた場合、水頭症、小脳形成不全などの先天異常や発育遅延などがみられ、免疫応答能を獲得する前の胎齢 90～100 日以前に感染した場合、流産やミイラ化胎子が発生する。また、胎齢初期の感染では感染ウイルスに対する免疫寛容が誘発され、持続感染 (PI) 牛が誕生する。PI 牛は重要な感染源であるばかりではなく、発病するとほとんどが死亡する粘膜病の高リスク群となる。BVDV は培養細胞に対する病原性の有無から細胞病原性(cp)と非細胞病原性(ncp)の 2 タイプに分けられている。粘膜病からは cp および ncp 両タイプのウイルスが分離されるが、cp ウイルスは普通粘膜病以外から分離されない。粘膜病は PI 牛以外から発生しないことから、cp ウイル

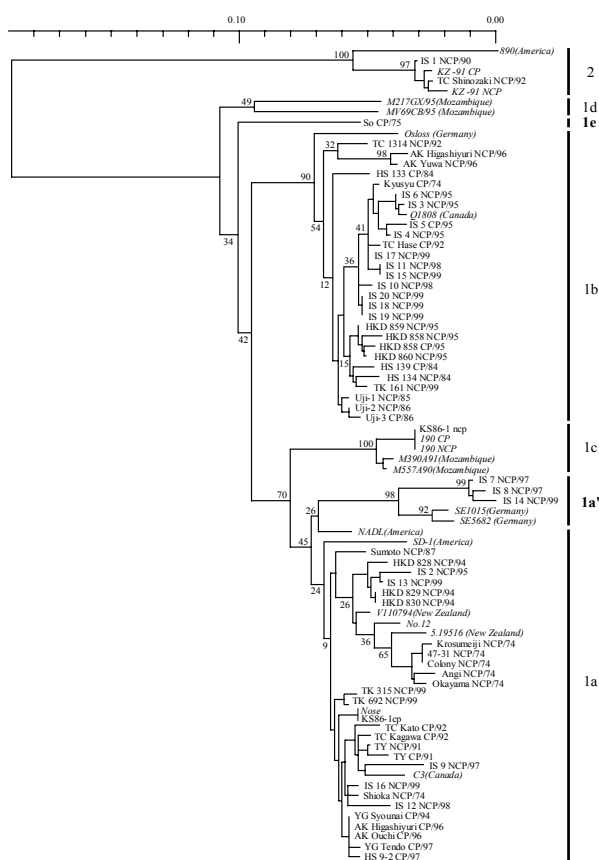
スは持続感染している ncp ウイルスの変異または組換えを起こすことにより生じると考えられている。BVDV は多様な遺伝子型および抗原性状を示すが、わが国の BVDV について遺伝子型および抗原性状を関連づけて調べた報告や遺伝子型別を詳細に行った報告はない。そこで著者は、わが国でこれまでに分離された BVDV について、遺伝子型および抗原性状について詳細な解析を実施した。

1989 年から 1991 年に石川県および栃木県で分離された 4 株(OY-89 株、SW-90 株、KZ91-CP 株および KZ91-NCP 株)は、従来のわが国の BVDV とは抗原性状が異なり、新しい血清型と考えられた。これらの株の 5'非コード領域(NCR)の塩基配列を調べたところ、これらの株は BVDV 1 ではなく BVDV 2 に相同性の高い塩基配列を示した。わが国における BVDV 2 の浸潤状況は不明であったが、今回初めてわが国に BVDV 2 が浸潤していることが明らかになった。BVDV 2 (KZ91-CP 株) を用いて石川県内において牛、豚、めん羊、山羊および鹿の抗体調査を実施したところ、BVDV 2 特異抗体は成牛 1,625 頭中 16 頭(1.0%)に認められたに過ぎず、BVDV 2 の流行はごく一部に限られていることが明らかになった。

わが国で分離された BVDV 62 株について 5'NCR の部分的な配列を決定し、系統樹解析

を実施したところ、わが国の BVDV は BVDV 1 と BVDV 2 に分類され、BVDV 1 はさらに 4 つのサブグループに分類された(図 1)。わが国の BVDV は、ほとんどが BVDV 1a(46.8%)および BVDV 1b(43.5%)に分類され、BVDV 1 の他のサブグループおよび BVDV 2 は少なかった。BVDV 1a の中の 3 株はブーツストラップ値 98%で BVDV 1a とは異なった分岐を示し、抗原性状も BVDV 1a とは異なることから BVDV 1a 内のサブグループ(BVDV 1a')とした。KS86-1ncp 株およびこれと似た抗原性状を示すウイルス株は、わが国の BVDV の中では抗原性状が異なることから K 群と呼ばれている。

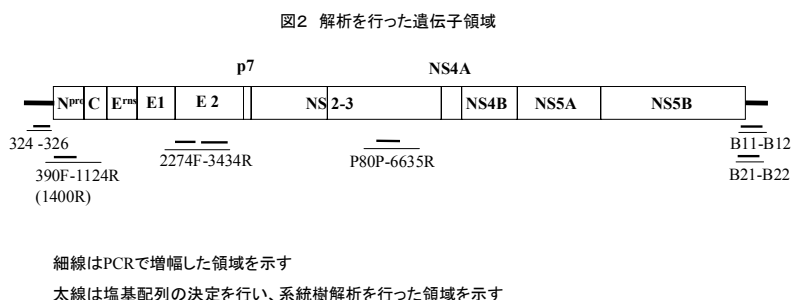
図1 BVDV日本分離株の5'NCRにおける分子系統樹



各グループの分岐にブーツストラップ値を記入した。
イタリックで記載した株はGenBankデータベースから得た。

このグループは Baule らが BVDV 1c と定義したグループと相同性が高かった。So CP/75 株はいずれの株ともクラスターを形成しなかった。各遺伝子型の代表株に対する免疫血清を作成し、交差中和試験を実施したところ、遺伝子型に分けられたグループ内の株はグループ代表株に対する免疫血清に中和されたが、他のグループの免疫血清に対する反応性は弱かった。

わが国の BVDV をさらに詳しく分類し世界各地の株と比較するため、5'NCR、N^{pro}、E2、NS3 および NS5B ~3'NCR の5つの遺伝子領域(図 2)において系統樹解析を実施した。それぞれの領域の系統樹は互いによく似たグループ分類を示したが、5'NCR



の解析で BVDV 1 a' と定義したグループは 5'NCR 以外では BVDV 1a とは異なった分岐を示し、N^{pro} および E2 領域において Becher らが BVDV 1c と定義したグループと相同性を示した。5'NCR で Baule らの BVDV 1c と相同性を示した K 群のウイルス株は N^{pro} および E2 領域において Becher らが BVDV 1e に定義した英国で分離された鹿からの分離株 (BVDV Deer-GB-1) と相同性を示した。2001 年の分離株である IS25CP/01 株および IS26NCP/01 株は、わが国の分離株の中では大きく異なった分岐を示したが、E2 領域の解析においてヨーロッパのいくつかの株と類似した分岐を示した。So CP/75 株は、いずれの領域においても他のグループと分岐をともしなかった。KS86-1cp 株および 190CP 株は感染実験により粘膜病を発症した牛から分離された (Shimizu ら, 1989)。KS86-1cp 株では E2、NS3、NS5B~3'NCR は持続感染していた株とほぼ同一な塩基配列を示したが、5'NCR は重感染させた株と同一な配列を示した。一方、190CP 株は 5'NCR、N^{pro} および E2 領域は持続感染していた株とほぼ同一な塩基配列を示したが、NS5B~3'NCR は重感染させた株と同一な塩基配列を示した。また、GenBank データベースで検索した細胞病原性株 ILLC 株および非細胞病原性株 ILLNC 株 (米国分離株) は、5'NCR、N^{pro}、E2 および NS5B~3'NCR 領域は 1b への分岐を示したが、NS3 領域は 1a に分岐した (表 1)。これらの株は解析した領域によってサブグループ分類が異なることから、サブグループの異なる株の組換えによるゲノムを保有するものと思われた。

表1 解析した領域によるKS86-1cp、190CP、ILLCおよびILLNCのグループ別

ウイルス	解析領域				
	5'NCR	N ^{pro}	E2	NS3	NS5B~3'NCR
KS86-1cp	1a	- *	1c**	1e	1e
190CP	1e	1e	1e	-	1a
ILLC	1b	1b	1b	1a	1b
ILLNC	1b	1b	1b	1a	1b

*: データ得られず **: Becherら (1999)による分類

5カ所の遺伝子解析の結果から、190CP株の遺伝子相同性組換えは既報のとおりNS3領域内に存在することが推察されたが、BVDV KS86-1cp株はこれまでに報告のない構造蛋白コード領域で組換えを起こしていることが予想された。そこで著者は、KS86-1cp株の遺伝

子組換え領域を特定するため Nose 株、KS86-1ncp 株および KS86-1cp 株ゲノムの全塩基配列を決定し遺伝子構造の比較を行った。ノーザンブロット解析から、Nose 株および KS86-1cp 株のゲノムは KS86-1ncp 株よりも若干長く、決定した全塩基配列の結果 (KS86-1ncp 株 : 12,306bp、Nose 株 : 13,196bp、KS86-1cp 株 : 13,203bp) と一致した。また、Nose 株および KS86-1cp 株の C 蛋白遺伝子領域に宿主細胞由来遺伝子の挿入と N^{pro} および C 蛋白遺伝子の重複が認められた。さらに、KS86-1ncp 株、Nose 株および KS86-1cp 株の遺伝子の比較から、KS86-1cp 株のゲノムは宿主細胞由来遺伝子およびその上流(5'NCR、N^{pro} および C 蛋白領域)は Nose 株、下流(重複している N^{pro}、C 蛋白遺伝子、それに続く蛋白コード領域および 3'NCR)は KS86-1ncp 株に由来するキメラ体であることがわかった(図3)。KS86-1cp 株は、KS86-1ncp 株の抗原性を維持することで免疫寛容状態を維持し、さら

に Nose 株由来の遺伝子を得ることで病原性を獲得したものと考えられた。

図3 (a) KS86-1ncp、Nose および KS86-1cp のウイルスRNAの構造
(b) KS86-1ncp および Nose の組換え部位の塩基配列

