

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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ペスチウイルス属に分類され、養牛経営に損失をもたらす重要な病原体である。BVDVは多様な遺伝子型および抗原性状を示し、北米では近年、損耗率が高く従来のBVDV(BVDV-1)とは遺伝子型の異なるBVDV(BVDV-2)が報告されている。また、致死的な病型である粘膜病から分離される細胞病原性(cp)株は、ウイルス遺伝子組換えによって生じることが明らかにされている。本研究は、日本で分離されたBVDVの遺伝子型および抗原性状の多様性を明らかにすること、遺伝子組換えの可能性が示唆された株について組換えメカニズムを解明することで細胞病原性獲得機序に関する知見を得ることを目的としている。本論文は、以下の4章により構成される。

第1章 5'NCRにおいてBVDV-2の塩基配列と相同性を示すBVDVの分離と石川県におけるBVDV-2の浸潤状況

1989年から1991年に石川県および栃木県で分離されたKZ91-CP株など4株は、交差中和試験の結果、従来のわが国のBVDVとは抗原性状が異なることが明らかとなった。これらの株の5'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ため、BVDV-2に分類されたと考えられた。わが国におけるBVDV-2の確認は今回が初めてである。BVDV-2(KZ91-CP株)を用いて石川県内の各家畜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。

第2章 わが国で分離されたBVDVの遺伝子および抗原性状の多様性

わが国で分離されたBVDV62株について5'非翻訳領域(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に分類された。BVDV-1はさらにサブグループに分類され、ほとんどがBVDV-1a(46.8%)およびBVDV-1b(43.5%)に分類された。BVDV-1aの中の3株は、分岐や抗原性状が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。わが国において血清学的にK群と分類されているグループは独立したクラスターを形成した。So CP/75株は独立した分岐を示した。各遺伝子型の代表株に対する免疫血清で行った交差中和試験では、遺伝子型で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強く中和されたが、他のグループの免疫血清に対する反応性は弱かった。この

ことから、5'NCR のグループ分けで抗原性状の多様性を反映することは可能と考えられた。

第3章 わが国で分離された BVDV の異なる 5つの遺伝子領域における系統樹解析

わが国の BVDV をさらに詳しく分類するため、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。わが国の BVDV-1 は5'NCR 以外では6つのサブグループが認められた。実験感染で発生させた粘膜病から分離された KS86-1cp(Kcp)株および 190CP 株、GenBank データベースで検索した cp 株 ILLC 株および非細胞病原性(ncp)株 ILLNC 株 (米国分離株) は、解析した領域によって遺伝子型が異なっていた。このことから、これらの株は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。

第4章 BVDV cp 株の構造蛋白コード領域に挿入されていた宿主細胞由来遺伝子と遺伝子相同性組換え

第3章で Kcp 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ことから、Kcp 株の遺伝子組換え領域を特定するため持続感染していた KS86-1ncp(Kncp)株、重感染させた Nose 株および Kcp 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 Kcp 株のゲノムは Kncp 株よりも若干長く、決定した全塩基配列の結果(Kncp 株 : 12,306、Nose 株 : 13,196、Kcp 株 : 13,203)と一致した。また、Nose 株および Kcp 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、Kncp 株、Nose 株および Kcp 株の遺伝子の比較から、Kcp 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 Kncp 株に由来するキメラ体であることがわかった。Kcp 株は、Kncp 株の抗原性を維持することで免疫寛容状態を持続し、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。

以上本論文は、わが国の BVDV 遺伝子の多様性を明らかにし、さらに、世界的にこれまで報告のなかったユニークな遺伝子組換えを発見することで BVDV の細胞病原性獲得機序の新知見を与えたもので、学術上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) 論文として価値あるものと認めた。