

日 生 研 報

第 64 卷 第 3 号 (通卷 608 号)
2018 年 (平成 30 年) 7 月

挨拶・巻頭言

石崎良太郎先生の思い出
..... 土屋耕太郎 (2)

発表論文紹介

豚胸膜肺炎血清型 15 抗体検出系としての
ELISA の確立 手島香保 (3)

論文紹介

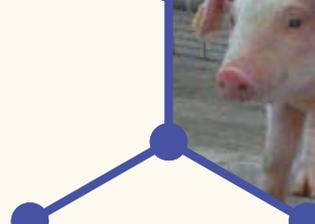
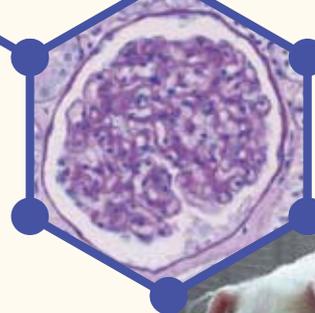
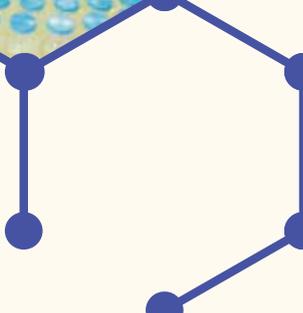
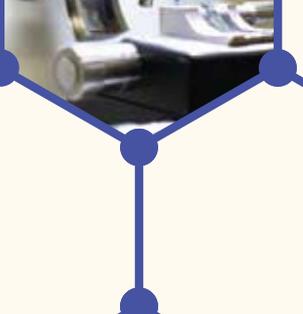
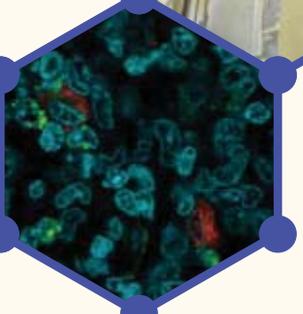
鶏のカンピロバクターワクチンの可能性
..... 古澤貴章 (6)

レビュー

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の
遺伝子多様性と遺伝子全長解析
..... 長井 誠 (13)

お知らせ

研修者・見学者受け入れ状況 (18)
平成 30 年度定時評議会開催 (19)



石崎良太郎先生の思い出

土屋耕太郎

30年余りも前になりますが学生の頃、年に1度石崎良太郎先生が集中講義にいらしていました。失礼ながら講義の内容はよく覚えていないのですが、「ピペット1本持って世界中どこへでも行ける、ウイルスの培養ならどこへ行っても任せてもらえる。」と豪語したり、逆転写酵素発見の功績でノーベル医学賞を受賞したテミン博士の名刺を財布から取り出して学生に披露したりしていたことは今でも覚えています。講義ではいつも首を右左に振りながら「石崎ちゃんちえいは云々」という口調でこの様なことを話していました。

その当時、私は微生物学研究室におりましたので講義終了後、研究室で先生のお話を伺ったり、一緒に会食したりすることができました。その折に「これからは **Humanism** と **Generalism** が大事だ」と仰っていたことは今でも覚えております。この2つについて先生は細かなことは仰らなかった（私が先生の話をかきちんと聞いていなかった?）ので今でも気になって思い出すのかもしれませんが。「自分は〇〇主義者」と名乗ったところで本質が直ぐについてくるわけではないので、先生は「これからの人は **Humanist** たれ、**Generalist** たれ」と仰っていたのだと思います。

それでは、はて「**Humanist** たる」にはどうすればよいかなどと考えてみてもわからないのです。それでもなお愚考を弄してみると、例えば、批評家の小林秀雄が「パスカルが人間は考える葦であると言っているが、あれは、人間は弱いものだということを認めるように考えるのが正しい考え方で、人間は考える力があるから強くなれるというような考えは間違いである。パスカルはそう言っているのだ。」とか「個性というものは一人で居ても現れない。人と交わることで自ずと現れてくるものだ。」と言っており、このようなことも **Humanist** たるための一つのヒントになるかなと思ったりします。一方、石崎先生が **Humanist** であったのは、一人ひとりをそれぞれ個人と認めて尊重し、グループの構成員というような十把一絡げにはしないことだったのではなかったかと、この頃は感じています。

もう一方の「**Generalist** たる」ためにはどうしたらよいか。石崎先生のことを想ってみると、自分の携わっている仕事に真摯であること、その本質を常に追求していることで **Generalist** に近づけるのではないかと思ったりします。先生は、何かに名前を付けるときはカッコいい名前がいいと仰って、その当時の御自身の研究室を「分子腫瘍学研究室」と命名されていました。常に時代の流れを掴むことを大事にいらっしゃいました。研究室には新たな時代の仕事をする優秀な研究者を招聘して最先端の研究を進めながら、ご自身はウイルス培養を大事にされていました。自分の仕事をずっとやっていけば一生に一度は時代に遇う時期が来るものだと仰っていました。いつも個々の感染症の本質は何かということを考えていらした先生でした。日生研の主任研究員として毎月弊所の研究会にいらっしゃると、我々が報告する研究課題一つひとつに「今、報告した仕事のポイントとそれを取り巻く状況は〇〇である。以上!」ということをいつもの調子で助言してくださいました。

上の研究会のような議論ではいつもニコニコと話される先生でしたが、いざ研究の突っ込んだ部分の相談をすると、急に目をキラキラして厳しくなり、相談に付き合ってくれる先生でした。改めて石崎良太郎先生の御冥福をお祈りいたします。

(常務理事)

発表論文紹介

豚胸膜肺炎血清型 15 抗体検出系としての ELISA の確立

手島香保

Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15 in pig sera.

Teshima K *et al.*

J Vet Med Sci. 2017. **79**(12) : 1968–1972.

要約

豚胸膜肺炎菌 (A.pp) 血清型 15 に対する抗体を検出する為に LPS 抽出抗原を用いた間接 ELISA を作出しその有用性を評価した。作出した A.pp 血清型 15 特異的 ELISA (血清型 15 ELISA) の感度および特異度を実験感染豚血清と非感染血清を用いて算出し、ラテックス凝集法 (LA) と比較した結果、LA より血清型 15 ELISA の方が感度及び特異度ともに高値であった。野外豚血清を用いて、血清型 15 ELISA の野外への応用を検証した結果、A.pp 血清型 15 が豚から分離された発生農場由来の豚血清は高い陽性率を示したのに対して、A.pp 非発生農場由来の豚血清はいずれも陰性であった。これらの結果から、作出した血清型 15 ELISA は野外における A.pp 血清型 15 の浸潤調査に有用であることが示唆された。

本文

豚胸膜肺炎菌 (A.pp) は、豚に伝染性の肺炎を起こし、養豚産業に経済的損失を与える重要な細菌疾病として知られている。これまでに、15 の血清型が存在することが知られており、これらは、莢膜 (CPS) とリポ多糖 (LPS) の O 抗原の抗原性、化学構造および遺伝子構造の違いに基づき型別される。更に、新たに抗原性や遺伝子構造が異なる血清型として血清型 16 が提唱された。これらの血清型によって病原性も異なると言われており、同血清型でも発生国によって病原性が異なることも知られている。

感染予防のためにワクチンが市販されているが、異なる血清型に対して十分な効果を示さない為、血清型別にモニタリングができる抗体検査は生前診断

法として重要な検査であると言える。血清型別特異的な抗体検査法として、補体結合反応、スライド凝集反応、ラテックス凝集反応および ELISA が広く用いられている。これらの抗体検査法の中でも ELISA は、簡便でかつ感度や特異度が高く、近年粗加熱抽出物 (CBE)、CPS および LPS を抗原とした ELISA が開発されている。

日本において、血清型 2 の分離が最も多く、次いで血清型 1、5、15 が多い。このうち A.pp 血清型 15 の感染例は愛知県、千葉県、愛媛県、福岡県、北海道、香川県で報告されている。そのため、血清型 15 に対するワクチンや血清学的診断方法の開発が望まれている。近年、Biovet 社から血清型 3-6-8-15 型特異的な ELISA として、Swinecheck mix-APP ELISA が海外では市販されている。しかし日本では市販されていない。本研究では、A.pp 抗体価を測定する為に、血清型 15 の LPS を抗原とした ELISA を作製した。この APP15 ELISA の感度及び特異度を調べる為に、実験感染した豚血清を用い、ラテックス凝集反応と比較した。更に野外血清への応用も調べた。

LPS は A.pp 血清型 15 の参照株である HS143 株からホットフェノール法で抽出した。簡単に説明すると、菌体を 5mM EDTA 0.05% sodium azide を含む 50 mM sodium phosphate buffer で懸濁し、リゾチームを添加して 4°C 1 晩反応させた。懸濁液に RNase、DNase、ProK を順々に添加した後、68°C のフェノールを 50% (v/v) で混合して 30 分間反応させ、ホットフェノール抽出を行った。抽出後、30 分間水上で冷却し、遠心分離した。上の水層を回収し、このフェノール抽出を 2 回繰り返した。2 回抽出し、遠心分離した水層の回収液は、フェノールを除去する為に、4°C 72 時間透析を行った。得ら

れた LPS は ELISA および LA の抗原として使用した。LPS の純度や抗原性は SDS-PAGE とイムノブロット法で確認した。

0.9 μm polystyrene beads (アイカ工業) に LPS を付加させ LA 法を既出の方法を用いて実施した。

ELISA のプロトコールを簡単に述べる。Polysorp イムノプレートに LPS 抗原 (50 μl /well) をコートし 4 $^{\circ}\text{C}$ 1 晩反応させた。プレートは、0.05% Tween20 PBS (PBST) で 1 回洗浄後、1% BSA PBST (200 μl /well) で 25 $^{\circ}\text{C}$ 1 時間ブロッキングした。1 回洗浄後、1% BSA PBST で 100 倍希釈した豚血清 (50 μl /well) を 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 分反応させた。2 回洗浄後、10000 倍に希釈した HRP 標識抗豚 IgG 抗体 (50 μl /well) を 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 分反応させた。2 回洗浄後、OPD 溶液 (50 μl /well) を 30 $^{\circ}\text{C}$ 30 分発色させ、4.0 N H₂SO₄ (50 μl /well) で発色停止した。プレートリーダーで吸光度 (波長 490–650 nm) を測定した。ELISA 値 (E 値) は、次式に基づいて算出した。

$$E \text{ 値} = (S - N) / (P - N)$$

P : 陽性血清の奇数列の OD 値 - 偶数列の OD 値
(それぞれ 2 列の平均)

N : 陰性血清について P と同様

S : 被検血清について P と同様

陰性血清には、A.pp 非感染農場から導入した豚から採取した血清を、陽性血清には、A.pp 非感染農場から導入し、A.pp 血清型 15 HS143 株を実験感染させた豚から採取した血清を用いた。陰性血清の OD 値は、0.00 から 0.07 の間を示し、陽性血清の OD 値はおよそ 1.0 を示した。

カットオフを決定する為に、血清型 15 と共通の LPS の O 抗原をもつ血清型 3、6、8 をそれぞれ気管内投与し実験感染させた豚血清 32 検体、血清型 1、2、5、7、11 をそれぞれ気管内投与し実験感染させた豚血清 31 検体、感染前の SPF 豚血清 40 検体、血清型 3、6、8、15 感染のない野外農場の豚血清 40 検体を測定し、カットオフを設定した。(図 1) また、野外への応用を調べる為に、血清型 15 発生農場 A と B と、A.pp の発生がない農場の豚血清 454 検体を用いた。

その結果、血清型 3、6、8、15 の発生がない農場の豚血清 111 検体の平均値 + 3SD を算出したところ、0.14 であった。しかし、2 検体において 0.15、0.17 を示したことから、より高い特異性を担保する

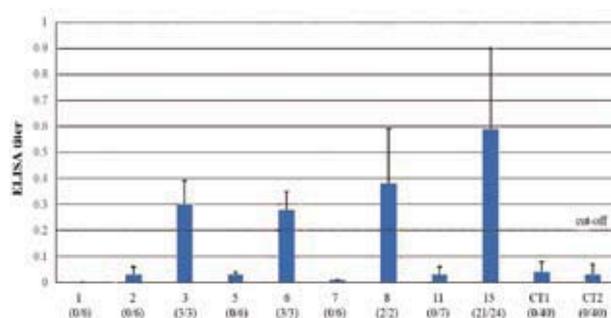


図 1 血清型 1、2、3、5、6、7、8、11、15 の実験感染血清および非感染血清を用いた ELISA の特異性の比較

各棒の高さは、豚血清の ELISA titer の平均値および SD を示す。最も右側の 2 本の棒は、実験感染前の豚血清 (CT1) と、血清型 3、6、8、15 に感染していない野外の豚血清 (CT2) を示している。破線は、カットオフ値を表している。カッコ内の数字は、陽性検体数 / 測定した検体数を表している。

為に、カットオフ値は 0.2 と設定した。

このカットオフ値に基づいて、血清型 3、6、8、15 の感染血清 32 検体と非感染血清 111 検体を用いて、ELISA と LA の特異度および感度を比較した結果、ELISA では、感染血清 32 検体中 29 検体が陽性であった。一方ラテックス凝集反応において、カットオフ値である凝集抗体価 8 倍以上となった検体は、32 検体中 24 検体であった。非感染血清 111 検体は、血清型 1、2、5、7、11 の実験感染血清、ワクチン免疫野外血清 (使用ワクチン; グレーサー、豚丹毒、プラズマ肺炎) であり、いずれも陰性であった。このことから、感度は ELISA の方が LA より高く、特異度はいずれも 100% と同等であることが示された。(表 1) また、血清型 3、6、8、15 の実験感染血清 32 検体、血清型 1、2、5、7、11 の実験感染血清 31 検体、感染前の SPF 豚血清 40 検体、血清型 3、6、8、15 の発生がない野外農場の豚血清 40 検体を用いて、LA と ELISA の相関を調べた結果、 $R^2 = 0.94$ と高い相関を示した。(図 2)

野外への応用を検証する為に、A.pp 血清型 15 が分離された A.pp 発生 2 農場の豚血清 454 検体と A.pp 非発生農場の豚血清 215 検体を用いて、陽性率を調べたところ、発生農場は 50.9% (A)、88.7% (B) に対して、非発生農場は 0% であった。また陽性検体のうち、発生年前の検体が、47.2% (A) および 82.9% (B) と高い割合で検出された。(表 2)

型別 ELISA として、これまで CBE、CPS および LC-LPS 抗原を用いた ELISA が報告されている。CPS 抗原は高い特異性を示すが、CPS の作製には、

多くの時間とコストがかかり、工程も煩雑である。LC-LPS 抗原は、CBE 抗原よりもより感度および特異度が高いことが知られている。血清型 15 の LC-LPS と short O-chain は、血清型 3、6、8 および 15 を実験感染させた豚血清に反応するが、血清型 1、2、5、7、11 を実験感染させた豚血清には反応せず、今回の結果は Perry らの既報とも一致していた。

また、血清型 3、8、15 の O 側鎖多糖の化学的構造は同じだが、血清型 6 は、その他と比べて少々異なることが報告されている。過去には、血清型 2、6、12 の LC-LPS を抗原とした間接 MIX-ELISA によって、血清型 8 の抗体価が検出されることが報告されている。しかし、血清型 3、8、15 と 6 の O 側鎖多糖の化学的構造には違いがあることから、報告されている、血清型 6 を用いた ELISA よりも、血清型 15 の LC-LPS と O 側鎖多糖を含む抗原を用いた、今回の APP15ELISA は、血清型 15 の抗体価の検出系として適していると考えられる。更にこれらの抗原は、既出の方法より少ない工程で大量に抽出することが可能であった。我々の試験において、

表 1 ELISA と LA の感度、特異度、的中率の比

	ELISA result		LA result	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Sera from pigs experimentally infecte with <i>A. pleuropneumoniae</i> serovars 3, 6, 8 and 15	29	3	24	8
Sera from pigs not infected with <i>A. pleuropneumoniae</i> serovars 3, 6, 8 and 15	0	111	0	111
Sensitivity (%)	91		75	
Specificity (%)	100		100	
Positive predictive value (%)	100		100	
Negative predictive value (%)	97		93	

作製した ELISA を、その他の血清学的診断法 (チューブ凝集反応法、寒天ゲル内沈降反応、補体結合反応) よりも特異度および感度が高いとされている、LA 法と比較し評価した。その結果、血清型 15 の LPS を抗原とした ELISA と LA は、血清型 15 の抗体だけでなく、血清型 3、6、8 の抗体も検出した。一方血清型 1、2、5、7、11 の抗体とは交差反応しなかった。また、今回感染 7 日後に陽転し、陽性率は、LA 法では 75%、ELISA 法では 91%であった。二つの測定法には高い相関が認められたが、このうち 5 検体は結果が一致しなかった。すなわち、血清型 3 (n=1)、血清型 6 (n=1)、血清型 8 (n=1)、血清型 15 (n=2) を感染させた 5 検体は、LA では陰性であったが、ELISA では陽性であった。こ

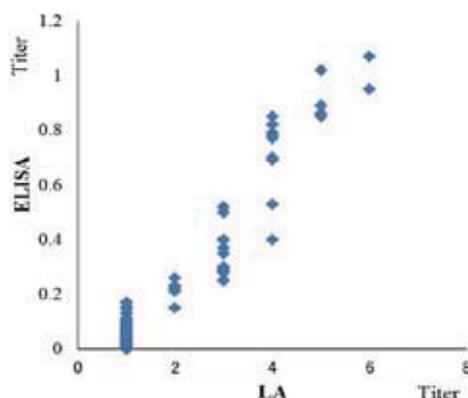


図 2 ELISA と LA の相関

App に非感染血清 80 検体、App 血清型 1、2、5、7 および 11 の感染血清 31 検体、および App 血清型 3、6、8 および 15 の感染血清 32 検体を用いて、ELISA と LA の相関を調べた。回帰直線 (R-squared value=0.94) は、 $[y(\text{ELISA titer})=0.2081 \times \log_2(\text{LA titer}) + 0.1812]$ を示し、ELISA と LA は高い相関を示した。両法には、lysozyme-phenol-water 法によって抽出された血清型 15 の LPS が使用された。

表 2 ELISA による A,pp 血清型 15 感染農場における感染抗体の検出

Farms (Number of farms)	The time of sample collection	Number of pigs tested (Sows+Growing pigs ^{a)})	Number of positive pigs (Sows+Growing pigs)	Positive (%)	Mean ELISA titer in pigs tested	SD ^{b)}
Affected (2)						
A	During the occurrence of the disease (2013)	34 (16+18)	20 (8+12)	58.8	0.39	0.13
	During the occurrence of the disease (2004-2012)	72 (48+24)	34 (24+10)	47.2	0.26	0.19
	Total	106 (64+42)	54 (32+22)	50.9	0.36	0.28
B	During the occurrence of the disease (6/2015-9/2015)	63 (23+40)	60 (22+38)	95.2	0.64	0.41
	During the occurrence of the disease (2010-5/2015)	70 (9+61)	58 (9+49)	82.9	0.66	0.35
	Total	133 (32+101)	118 (31+87)	88.7	0.66	0.36
Free (12)		215	0	0	0.03	0.03

a) Growing pigs in Farm A and Farm B were 4-5 and 6 months of age, respectively.

b) SD, standard deviation.

の結果は、LA法では感染7日後は早い段階である為に検出できなかったと説明しうるかもしれない。更に、血清型15を低濃度感染させた豚の血清3検体は、ELISAとLAにおいて共に陰性であった。これらの3頭は、臨床症状や典型的な肺病変を呈さなかった。これらの豚は症状を誘発するよりも低い濃度で投与したため、感染しないまま抗体価も検出できなかったかもしれない。この他にも、菌の病原性、攻撃菌濃度、宿主側の細胞性免疫や液性免疫の反応の違いが要因となって、発症や抗体の陽転といった結果が異なってくる。

今回の結果から、作出したAP15LPS ELISAは、血清型3、6、8および15の感染血清中抗体の検出に有効であり、もしかするとA.pp血清型15の成分を含むワクチンの免疫血清中抗体の検出にも有効かもしれないことが示唆された。これまで、血清型3、6、8および15の感染血清中の抗体を型別できる検査法は開発されていない。従って、ELISAで陽性であった場合、どの血清型に感染しているか確定診断する為には、菌分離を行い、型別検査を実施しなければならない。幸いなことに、A.pp血清型3、6、8は日本ではほとんど分離されず、一方血清型15は2003年から日本各地で分離報告がある。

今回のELISAをA.pp血清型15感染農場および非感染農場の野外血清に応用した結果、感染農場では高い陽性率を示した一方、非感染農場では示さなかった。更に加えて、A.pp血清型15感染農場において発生前に遡って調査した所、2004年から高い

陽性率を示した。これら知見によって、Morioka Aらの報告(2008)やShimazaki Yらの報告(2016)と同様に、血清型15が同定される前から、血清型15による感染は存在していたことが示唆された。また、今回のELISAを用いてA. suisの感染血清との交差反応について明らかにしなかった。LPSのlipid-Aの抗原エピトープや構造の類似性を除いて、CPSやLPSの抗原エピトープや構造は、A. suisとA. pleuropneumoniaeでは異なることが知られている。これらの報告により、A. suisに対する感染抗体は、A. pleuropneumoniaeのLPSのlipid-Aには反応するが、lipid A以外のCPSやLPSには反応しないことが示唆された。我々の過去の報告では、リゾチーム処理後、フェノール抽出したLPS中に、LPSのcore-lipidAに関連する低分子物質は認められなかった。我々の方法では主に血清型15のLPS O-chainが抽出され、このLPS抗原を用いたELISAは、血清型15に対する抗体検出の為に高い特異性および感度を保持しうるであろう。

結論として、血清型15のLPSを抗原とした間接ELISAは、最適な感度と高い特異性を示し、野外におけるA.pp血清型15のサーベイランスにとって有用な手法となりうることが示唆された。

参考文献は割愛させていただきます。

本稿は *J Vet Med Sci.* 2017. **79**(12):1968-1972. に掲載された論文を編集・日本語訳したものである。

論文紹介

鶏のカンピロバクターワクチンの可能性

古澤貴章

Reducing *Campylobacter jejuni* Colonization of Poultry via Vaccination.

Jason M. Neal-McKinney, Derrick R. Samuelson, *et al.*

PLoS ONE **9**(12): e114254. doi: 10.1371/journal.pone.0114254 (Dec. 4. 2014)

論文紹介の意図

現在、カンピロバクターによる胃腸炎は先進国、後進国問わず世界中で問題になっています。我が国

も例にもれず問題になっており、毎年300～400件ほど発生しノロウイルスに続き2番目に多い食中毒の原因微生物です。また、農場や食鳥処理場で分離されたカンピロバクターは近年薬剤耐性化が進んで

います。カンピロバクターは鶏に症状が現われずに定着していることから対策が難しく、未だ世界でそのワクチンは販売されていません。子供や高齢者、免疫不全患者などでは重症化することもあるため一刻も早いワクチンの開発が望まれている感染症の一つです。このような現状でカンピロバクターに対するワクチンの可能性を示した下記の論文を紹介いたします。原文は PLoS ONE からダウンロードすることができるので興味を持たれた方は、原文も参考にしてください。

要約

Campylobacter jejuni は世界中で人の胃腸疾患の主要な原因の一つである。*C. jejuni* は鶏の常在菌である一方、症例研究によって、*C. jejuni* の感染と未調理品や生焼けの鶏肉と交差汚染した食品の摂食の関係が明らかになっている。筆者らは鶏に *C. jejuni* の表面暴露定着蛋白 (surface-exposed colonization proteins ; SECP) を免疫することで *C. jejuni* の鶏への定着能力を低下させ、小売店レベルでの鶏肉製品の汚染を減らし、消費者に安全な食品を提供できる可能性があるとして仮定した。この仮説を確かめるために *C. jejuni* のたんぱく質である CadF、FlaA、FlpA、CmeC、および CadF-FlaA-FlpA の融合蛋白を発現し鶏に投与した。攻撃から7日後に鶏を安楽殺し、盲腸内容物を段階希釈し平板上で培養して材料1g当たりの *C. jejuni* の菌数を決定した。免疫血清は *C. jejuni* の SECP に対する抗体の濃度と特異性を決定して解析した。鶏への CadF、FlaA、および FlpA 蛋白の免疫によって盲腸内の *C. jejuni* の数がコントロール群と比較して少なくなった。最も *C. jejuni* の定着の減少が大きかったものは FlaA、FlpA または CadF-FlaA-FlpA の融合蛋白を投与した鶏で見られた。様々な SECP を鶏に投与することで *C. jejuni* 特異的 IgY 抗体が産生された。まとめると、筆者らは *C. jejuni* が保有する個々の SECP や組み合わせた SECP を鶏に免疫することで鶏への *C. jejuni* 定着を阻止することができる、ということを示した。

背景

Campylobacter 属は世界中の細菌性胃腸炎で最も

一般的に検出され、下痢症状で毎年4億~5億件に上る。アメリカでの *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) の感染は一年で240万~400万件発生していると見積もられている。2013年のアメリカではカンピロバクター症の発生は国民10万人当たり13.82件発生していたが、実際の感染者の数はより多い可能性がある。

(<http://www.cdc.gov/foodnet/data/trends/tables/2013/table2a-b.html#table-2b>)

C. jejuni 感染症は欧州連合 (EU) でも最も一般的な人獣共通感染症であり、2008年から2012年の5年間で顕著な増加傾向がみられている。2012年のEUの報告によると10万人あたり55.49件に上るといふ。急性の胃腸炎に加えて、特定の *C. jejuni* 株に感染するとギラン・バレー症候群 (GBS) の発症の可能性が高まる。末梢神経系に影響する自己免疫疾患である GBS はポストポリオ時代における弛緩性麻痺の主要な原因になっている。現在、急性の *C. jejuni* 感染症と GBS の治療に関連するコストはアメリカでは一年で12億ドル、EUでは24億ユーロと見積もられている。

C. jejuni は鶏に盲腸内容物1gに対して 10^8 コロニー形成単位 (CFU) かそれ以上の密度で病気を起こすことなく定着している。*C. jejuni* は鶏舎の数羽に定着したのち、鶏舎全体に急速に蔓延するうえ、鶏の生涯を通して存在し続ける。部位や季節にもよるが、驚くことにアメリカ国内の鶏肉の90%以上が販売の時点で *C. jejuni* に汚染されている。その対策として *C. jejuni* の量を減らす方法が、鶏の *C. jejuni* 暴露阻止や、定着した *C. jejuni* を減らす処置、食鳥処理場での汚染減少、肉製品の表面からの *C. jejuni* 除去などすべての生産段階で開発されつつある。量的リスクアセスメントによると鶏の腸管内の *C. jejuni* を1000分の1まで減らすか、と体表面の菌数を100分の1まで減らすことができれば公衆衛生リスクを90%減らすことができると見積もられている。

C. jejuni の保菌鶏を減らすための戦略としては以下の4つが考えられている：1) 抗 *C. jejuni* 活性を持つ化合物の投与；2) *C. jejuni* と競合関係にある菌や抑制物質を産生する菌を使用したプロバイオティクス；3) *C. jejuni* 特異的なバクテリオファージの応用；4) 鶏への *C. jejuni* 抗原のワクチネーション。本研究で、筆者らは *C. jejuni* が保有する

たんぱく質のワクチネーションを介して鶏の *C. jejuni* 定着を減少させるという戦略を描いている。鶏の *C. jejuni* に対抗するために様々なワクチネーション戦略が現在開発されている。不活化全菌体経口ワクチンでは定着を中程度の減少という結果に至った一方で、組み換え CmeC の経口投与では血清の抗体反応を引き起こしたが *C. jejuni* 定着阻止には至らなかった。一部の研究では CjaA、CjaD または Dps を弱毒したサルモネラに組み込んだ生ワクチンとしての使用の有効性が示されている。弱毒化したアイメリア属寄生虫は CjaA 抗原を運ぶもう一つの手段である。Annamalai らは *C. jejuni* の外膜蛋白を封入したナノ粒子の投与によって鶏への定着が減少することを十分に証明した。鶏卵から得た *C. jejuni* 特異的 IgY 抗体を受動免疫として投与する方法も現在調査されている。*C. jejuni* の定着を効果的に抑制する抗原や投与形態の決定に関してはまだ研究の余地がある。

ここ数年で鶏に対する *C. jejuni* 定着に関する理解がかなり深まっている。孵化後 3~4 日は移行抗体のレベルが高く保たれ、2~3 週間かけて徐々に検出限界以下まで減少していくことが知られている。従って、鶏への *C. jejuni* の定着は特異的な抗体の減少（消失）と同時に起こる。鶏が *C. jejuni* に暴露される前までに抗 *C. jejuni* 抗体を産生することが *C. jejuni* の定着能力を減少させるに至るということが分かっている。筆者らは防御効果のある移行抗体を作らせる *C. jejuni* のたんぱく質を同定している。具体的には、*C. jejuni* のアドヘジン（CadF、FlpA など）や鞭毛蛋白（FlaA、FlaB など）、膜関連蛋白に対する抗体を筆者らは新たに孵化した幼鶏の血清から検出した。カンピロバクター特異抗体を産生させることで鶏の *C. jejuni* 定着を減少、さらには阻止できる可能性がある。

C. jejuni の鶏への定着が促進されるたんぱく質の同定によって大きな進歩がなされた。*C. jejuni* の表面暴露定着蛋白（surface-exposed colonization proteins; SECP）として鶏への定着に寄与する表面に曝されたたんぱく質に言及する。これらのたんぱく質は宿主細胞への付着（アドヘジン）、運動性、宿主腸管での生存性などの役割を果たすたんぱく質のグループに細分化することができる。*C. jejuni* のアドヘジンは細菌体内で恒常的に合成されているが、

CadF（Campylobacter adhesion to fibronectin (Fn)）、FlpA（Fibronectin-like protein A）および CapA（Campylobacter adhesion protein A）を含む。アドヘジンに加えて、細菌の運動性も動物への定着の面で重要な役割を果たす。*C. jejuni* の運動性を最大にするには FlaA（メジャー）と FlaB（マイナー）の線維性たんぱく質を必要とする。最後に、CmeC や主要外膜蛋白（PorA）などの膜関連蛋白が存在し、鶏の腸管内での生存性に関する機能に関与するかもしれない。

本研究で使用されたこれらのたんぱく質（CadF、FlpA、FlaA および CmeC）は以下の基準に 1 つ以上当てはまるものが選抜された：1) *C. jejuni* の鶏への定着にかかわる（細菌の運動性、細胞への付着、栄養の獲得に必要ななど）；2) 外界にエピトープが曝されていると予測され、抗体が細菌表面のたんぱく質に結合し、定着に不可欠な段階を阻止する可能性がある（腸管の細胞への結合や運動性など）；3) 移行抗体が産生されることによって示されるように、自然な定着の流れで免疫反応が刺激される。以前の研究によると、CadF と FlpA は *C. jejuni* の定着を大きく減少させる可能性が報告された。これら 2 種類のフィブロネクチン結合たんぱく質は上記の基準を 3 つとも満たし、*C. jejuni* による腸管の培養細胞への結合を促進することが知られている。FlaA も 3 つの基準を満たすため、同様に優先度の高いターゲットだと考えられている。*C. jejuni* の鞭毛は FlaA と FlaB と呼ばれる 2 種類のたんぱく質で構成されている。FlaA は鞭毛線維の主要な構成成分で、細菌の運動性に必要とされている。CmeC は多剤排出システム（CmeABC）の構成成分である。CmeABC 排出システムはデオキシコール酸耐性に関与し、鶏への定着を可能にしている。

本研究の目標は鶏の消化管内の *C. jejuni* 量の減少における *C. jejuni* の SECP ワクチネーションの有効性を評価することだった。筆者らはターゲットとして鶏への十分な定着に必要で、*C. jejuni* 株間でよく保存されており、細菌表面に存在する CadF、FlpA、FlaA および CmeC を選出した。筆者らの中心となる仮説は鶏の腸管内の *C. jejuni* の総数を減少させることによって人への感染リスクを減少させるだろう、ということである。

材料・方法については割愛させていただきます。

成績

C. jejuni 組み換え抗原の選抜と確認

この試験系のデザインの根拠は *C. jejuni* の SECP に内包される目的の部分を 30 アミノ酸残基以内に狭めることと様々なたんぱく質の断片を組み合わせることで個々の SECP を投与するのと比べて防御効果 (*C. jejuni* 定着減少など) が強まるかどうかを試験することだった。筆者らは CadF、FlaA、FlpA の外界に面して免疫原性があり、防御効果 (たんぱく質の機能に必要であるなど) が最も期待できる「目的の部分」を明確にした。筆者らの戦略は GST タグ結合 90 残基と CadF、FlaA、FlpA、CmeC の His タグ結合全長蛋白 (シグナルペプチドを削ったもの) の両方を作成することを含む (図 1)。3 つの 30 アミノ酸残基で構成された trifecta (CadF-FlaA-FlpA) は GST タグ結合蛋白としてのみ発現させた。異なる 2 種類のペプチドを使用した根拠は最初の GST タグ結合 90 アミノ酸残基の投与で使用したたんぱく質の特異的な部分に対して免疫反応が引き起こされるということである。ブースト投与では免疫反応の強化に 26 kDa の GST タグを含まないように

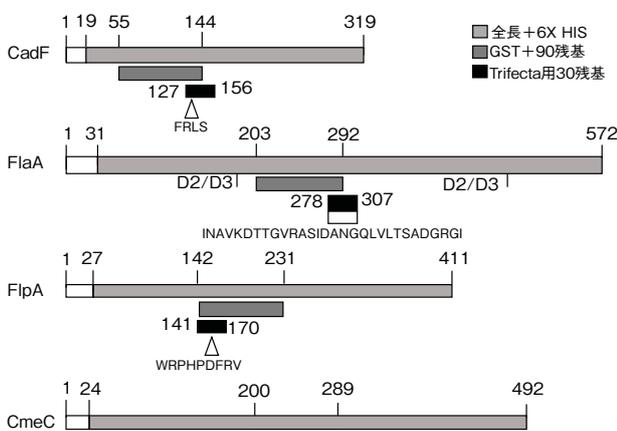


図 1 ワクチンのターゲットとする *C. jejuni* のたんぱく質のドメイン

His タグ結合ペプチドで使われた部分を明るいグレーで、GST タグ結合 90 残基で使われた部分を濃いグレーで、trifecta ペプチドを構成する 30 残基を黒で示した。シグナルペプチド (CadF、FlpA、CmeC) または 3 型分泌系 (FlaA) の部分は His タグ結合ペプチドからは削られており、白で示されている。CadF と FlpA の図の下の矢頭はフィブロネクチンへの結合に必要なアミノ酸残基を示している。FlaA の図の箱は下に示された配列に基づいて FlaA30 残基ペプチドを設計するのに選ばれた部分を示す。この領域は FlaA の D2 および D3 ドメインの間にあり、元のたんぱく質では外界に面すると予測されている。CmeC の 90 残基の部分は親水性領域にあり、外界に面すると予測されている。

全長のペプチドを使用した。その結果、(GST を含まない) 90 アミノ酸残基の断片に対して特異的な反応になった。今回使用した 90 アミノ酸残基の部分は表面に存在している (親水性付与など) と推定され、*C. jejuni* 間で保存されており、たんぱく質の機能にその配列が必要であるということに基づいて選抜された。

注目すべきことは CadF と FlpA を構成する 30 アミノ酸残基が *C. jejuni* NCTC 11168 株がコードする CadF および FlpA と一致していることである。対照的に FlaA を構成する 30 アミノ酸残基は多数の *C. jejuni* から得られた配列と一致していた。図 1 では 24 株の *C. jejuni* および 2 株の *C. coli* から得られた FlaA 蛋白の一致した配列が示されている。重要なことに、FlaA の一致した配列には調べたすべての *C. jejuni* の FlaA の配列に存在する一連のエピトープが含まれる。

精製した CadF、FlaA、FlpA、CmeC の GST タグ結合 90 アミノ酸残基と His タグ結合全長蛋白 (シグナルペプチドなし) の SDS-PAGE 解析が図 2 に示されている。図 2 には精製した GST タグ結合 CadF-FlaA-FlpA の trifecta 蛋白も示されている。CadF の 90 アミノ酸残基のペプチドには FRLS ドメインが含まれ、フィブロネクチンへの結合に必要とされている。FlaA の 90 アミノ酸残基のペプチドは表面に存在すると推定され、フラジェリンの D2 ドメインと D3 ドメインの間に位置することから選抜された。FlpA の 90 アミノ酸残基のペプチドにはフィブロネクチンで認められる Type III repeat (WRPHPDFRV 残基) があり、これはフィブロネクチンとの結合に必要とされる。CmeC の 90 アミノ

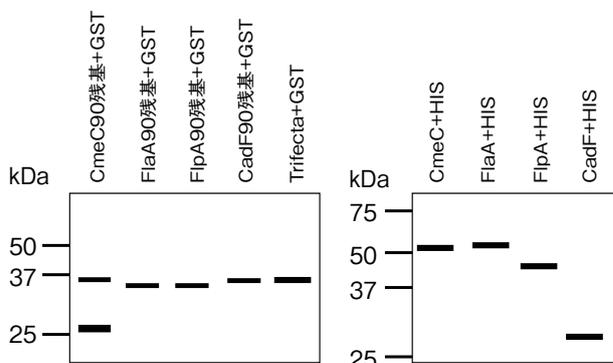


図 2 精製された GST タグおよび His タグ結合蛋白。精製された蛋白抽出物は 12.5% のポリアクリルアミドゲルで分離されクーマシーブリアントブルーで染色された。

酸残基のペプチドは細胞外環境に曝露されていると推定され親水性の付与に関連している。

C. jejuni の組み換え蛋白の防御効果

鶏へのワクチン投与実験のデザインは図3に示されている。1日齢のひなを7つのグループに分け、アイソレータに導入した。6日齢のときに240 μ gのGSTタグ結合90残基ペプチド(GST-CadF、GST-FlaA、GST-FlpA、GST-CmeC)およびGST-trifectaを投与した。16日齢で240 μ gの全長のCadF-His、FlaA-His、FlpA-His、CmeC-Hisも

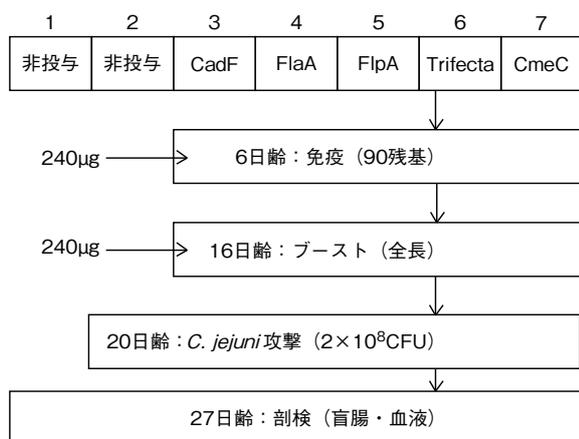


図3 鶏のワクチン投与試験のスケジュール
最初のペプチドの投与(GST-CadF、GST-FlaA、GST-FlpA、GST-CmeC および CadF-FlaA-FlpA の GST-trifecta) は240 μ gで行った。ブースト投与は240 μ gのCadF-His、FlpA-His、GST-FlaA、GST-CmeC、CadF-FlaA-FlpA の GST-trifectaで行った。グループ1および2はC. jejuni のSECPは投与しなかった。グループ2から7の鶏には20日に2 $\times 10^8$ CFUのC. jejuniを投与した。27日齢で剖検を行った。

しくは80 μ gずつのCadF-His、FlaA-His、FlpA-His、CmeC-Hisを混合した240 μ gのブースト投与が行われた。2グループの非ワクチン群の鶏はコントロール群(1グループが非攻撃コントロール群、もう一方が攻撃コントロール群)として扱った。20日齢で2 $\times 10^8$ CFUのC. jejuni F38011株(野生株)の経口投与を実施した。1週間後(27日齢)にひなを剖検し、盲腸と血液を採取して解析した。

C. jejuni 攻撃/非ワクチン群のC. jejuni 定着の中央値5.35 $\times 10^7$ CFU/gだった(図4A)。trifectaワクチン群ではC. jejuni 定着は有意に減少し、7/9羽のみに定着し、その中央値は4 $\times 10^4$ CFU/gだった。FlaAワクチン群とFlpAワクチン群も同様にC. jejuniが定着した鶏が減少した(それぞれ11/12羽および9/10羽)。FlaAワクチン群およびFlpAワクチン群の菌数の中央値はそれぞれ2.55 $\times 10^4$ CFU/gおよび4.5 $\times 10^4$ CFU/gだった。興味深いことに、CadFワクチン群では全羽でC. jejuniの定着が確認されたが菌数は1.1 $\times 10^6$ CFU/gに減少していた。CmeCワクチン群では菌数に大きな幅がみられ、中央値はほんのわずかな減少を示した。

C. jejuni 菌体蛋白に対する抗体反応

C. jejuni WCLに対するELISAによって非攻撃コントロール群と比較して攻撃コントロール群において有意な抗体反応が示された(図4B)。2つの95%信頼区間は2グループのコントロール群に基づいて確立された。攻撃コントロール群と比較してすべての

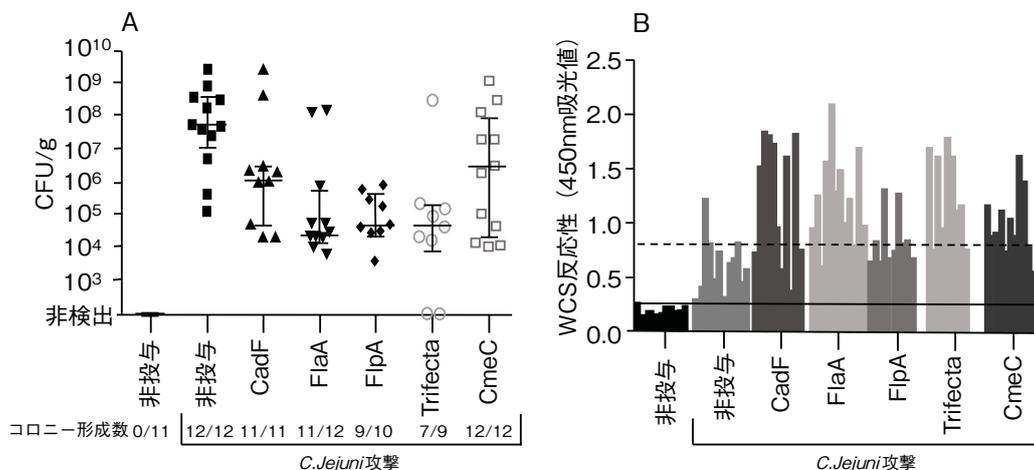


図4 CadF、FlaA、FlpA および trifecta ペプチドのワクチンによってC. jejuniの定着が減少した。A: C. jejuniのCFUは盲腸内容物の希釈系列を作成し、Campy-Cefex培地を用いてカウントした。それぞれのグループで中央値と四分位範囲が示されている。B: 剖検時に採取した血液から血清を分離し、C. jejuniの全菌体可溶化液でコートしたマイクロタイタープレートを用いてELISAを実施した。各ウェルに吸着したIgYをHRP標識ウサギ抗ニワトリIgY抗体で検出した。非ワクチン・非感染コントロール群(実線)および非ワクチン・攻撃コントロール群(破線)の血清の反応のレベルから95%信頼区間を算出した。

ワクチン群で有意に血清の反応が増加した。FlaA ワクチン群は SECP ワクチン群の血清の反応の中で一番低かった。血清の反応は鶏の定着のレベルと正確には一致しなかった。

観察された抗体反応がワクチンに使用した抗原特異的なのかを確かめるために、CadF、FlaA、FlpA および *trifecta* を投与した鶏の血清を用いてイムノブロットを行った。CmeC は試験には含まれていない。これは CmeC 投与が *C. jejuni* 定着減少を起こさなかったからである。*C. jejuni* の野生株および変異株の WCL に対して鶏の血清を調べたところ、CadF 投与群の 7/11 羽の血清は *C. jejuni* 野生株の WCL に対して反応したが、cadF/flpA 変異体の WCL に対して反応しなかった。対照的に FlpA 投与群の中で 1 羽のみが FlpA に対して特異的には反応しなかった。面白いことに、筆者らは FlaA 投与群の血清からは *C. jejuni* 野生株の WCL における FlaA に対して特異的な反応を検出できなかった。特異性を増加させる試みにおいて、FlaA 投与群の血清を外膜抽出物及び FlaA-GST ペプチドに対して試験を行った。*trifecta* 投与群のすべての血清で FlpA に対して非常に強い反応を示したが、CadF および FlaA の分子量のたんぱく質には反応を示さなかった。まとめると、これらのデータは FlpA によるワクチネーションが最も特異的な抗体反応を引き起こすということを示している。

考察

C. jejuni 研究者の目標は人での感染症発生減少と安全な食物の提供を保証することである。鶏肉製品の処理中の交差汚染やキッチンでの鶏肉と生ものの交差汚染のレベルは鶏の盲腸内の *C. jejuni* の量と関連している。*C. jejuni* 感染の可能性は曝露量に相関し、わずか 500 個の菌で病気を発生させる。それゆえ、鶏から食品へ移行する *C. jejuni* の数を減らすことによって人での感染症の発生を減らすことができるはずである。本論文中に説明したワクチン戦略は結果として *C. jejuni* 定着のレベルにおいて 2 log₁₀ を超える減少に至った。リスク分析研究によると、この定着の減少は公衆衛生的なリスクを減らすのに十分である。

本研究では高レベルの *C. jejuni* を投与した非ワ

クチン群の鶏は抗 *C. jejuni* 抗体を産生したが、これらの抗体は *C. jejuni* 定着を阻止または減少させることはなかった。対照的に事前に *C. jejuni* の抗体を産生させた鶏では定着を減少または阻止することができた。筆者らは FlaA 鞭毛蛋白だけでなく CadF や FlpA アドヘジンの割合が鶏における *C. jejuni* 定着に対して防御効果のある免疫反応を引き起こすのに影響を与えるということに気が付いた。FlpA および FlpA を含む *trifecta* のペプチドは *C. jejuni* の攻撃に対して強い防御効果を示した。これは flpA 変異株の *C. jejuni* が鶏に定着できないことから驚くことではない。FlpA がフィブロネクチンに結合するのに必要な残基は外表面に位置していて、抗 FlpA 抗体によって *C. jejuni* がフィブロネクチンに結合するのを減少させることができる。重要なことに、FlpA のたんぱく質は調査された *C. jejuni* すべてにおいて 100% 保存されていた。これは広い範囲の *C. jejuni* の分離株に対してこのたんぱく質が防御効果のある免疫を引き起こすのに利用できるということを示している。*trifecta* 投与群の鶏の血清は FlpA に最も強く反応した。それどころか、イムノブロット法では CadF や FlaA に対する反応を検出することができなかった。CmeC を投与した鶏では *C. jejuni* 攻撃後の定着を防ぐことはほとんどできなかった。CmeC に対する抗体はたんぱく質の機能を阻害しない可能性がある。FlaA、FlpA および *trifecta* 投与群で同程度の防御効果が観察されたことを踏まえ、エピトープの組み合わせがワクチン戦略の効果を強めるかどうかを確かめるためにさらなる研究が必要とされる。エピトープの組み合わせは、遺伝に多様な SECP を産生する広範囲の *C. jejuni* 分離株に対して防御効果をもたらすかもしれない。鶏での *C. jejuni* 定着が減少することは SECP ワクチン投与の予備実験で観察されていた。

筆者らは *C. jejuni* の WCL の FlaA に対して特異的な抗体を検出することができなかった。対照的に ELISA では FlaA ワクチン投与によって *C. jejuni* の WCL に対する抗体の産生を引き起こしたことが示された。より具体的に言うと、精製された FlaA-GST に対して反応性が観察された。これは、ワクチン投与で使用されたペプチドに特異的な免疫反応が引き起こされたことを示す。この明確な矛盾を説明できる可能性としては 2 つの試験における FlaA

たんぱく質のコンフォーメーションが異なるということである。にもかかわらず FlaA ワクチン投与によって *C. jejuni* の定着は減少するに至った。

本研究の限界としては鶏に投与された *C. jejuni* が単一の株でしか攻撃試験をしていないことである。したがって、今回のワクチンは別のペプチド配列を持つ *C. jejuni* に対して有効でない可能性がある。CadF および FlpA のアミノ酸配列は筆者らが試験した全ての *C. jejuni* 株間で一致していたが、FlaA および CmeC には様々な配列が含まれていた。このワクチン戦略の有効性は *C. jejuni* 分離株の多様性を利用して広範囲な防御効果を示すペプチドを同定する必要があるだろう。

本研究で利用したワクチン戦略における重要な懸念は筋肉内投与によって抗原を輸送したため、強い IgY 反応が引き起こされたことである。しかしながら、*C. jejuni* は鶏の消化管内にのみ局在するため、粘膜の抗体だけが *C. jejuni* に到達して中和することができるはずである。筆者らのワクチンの輸送方法によって *C. jejuni* の定着減少に至った一方で、IgA 産生を強化する輸送方法（粘膜輸送など）では *C. jejuni* の定着をさらに減少させるかもしれない。たとえば、インフルエンザワクチンの粘膜輸送は筋肉内投与と比較して粘膜の抗体産生の強化を引き起こした。数千羽の鶏に筋肉内投与を行うことは非常に多大な労力とコストを要するため、もう一つのペプチド輸送の方法は多数の鶏のワクチン投与がより便利になるかもしれない。先述のように抗原の輸送に弱毒化サルモネラを用いる方法が現在調査されている。非病原性の抗原輸送法の一つは *Lactobacillus* のプロバイオティクスであり、これは *C. jejuni* のたんぱく質を生産するようデザインされている。組み換え *Lactobacillus* の腸管への定着は抗原の粘膜表面への輸送に至る。この方法はコストのかかるたんぱく質の精製や投与が必要ない。にもかかわらず、筆者らは抗原の筋肉内投与によって防御効果のある粘膜反応を引き起こし、*C. jejuni* の定着の減少によってそれが証明された。

本研究で行われた試験はコントロールされた環境で、小グループを用いて行われた。ウインドレス鶏舎や開放鶏舎のような異なる環境で飼育されている鶏へのワクチン投与は防御のレベルが異なる結果に至る可能性がある。その理由としては鶏の数やスト

レスレベル、温度、湿度、初めて *C. jejuni* に曝露された日齢などが異なるということがある。さらに、本研究の成績は工業的な鶏の処理の間に発生する交差汚染の影響を反映していない。今後の研究では生産環境でのこのワクチン投与方法の効果を調べる必要がある。

筆者らは4種類の SECP、すなわち CadF、FlaA、FlpA、CmeC および組み換え CadF-FlaA-FlpA ペプチドが *C. jejuni* に対する獲得免疫の反応を引き起こすか、および鶏への定着を減少させるかどうかを評価した。CadF、FlaA および FlpA を個々に投与すると *C. jejuni* の定着を減少させた一方で、CadF-FlaA-FlpA の *trifecta* のペプチドは最も強く防御効果を示した。イムノプロット解析によると、個々のペプチドとして、および CadF-FlaA-FlpA の *trifecta* ペプチドとしての両面で FlpA ペプチドが最も強力で特異的な抗体反応を引き起こした。加えて、FlpA ペプチドの 30 アミノ酸残基はエピトープを中和するのに十分な抗体反応を引き起こした。FlpA は *C. jejuni* 株間で非常によく保存されているため、今後の免疫を介した戦略には FlpA を含めることを筆者らは提案する。本研究では調べていないが、FlpA ワクチンによってもたらされる防御効果が *C. jejuni* の全株に及ぶ可能性が考えられる。要するに、鶏に対する FlpA の免疫によって盲腸内に存在する *C. jejuni* が減少すれば、より安全な食糧供給が作り出せるだろう。

文献紹介者の所感

カンピロバクターは鶏に対して病原性を持たず、また腸管内に定着して細菌叢を構成することから、これまで注射をはじめとする通常のワクチン投与の方法では難しいと考えられてきました。しかし本論文ではカンピロバクターの表面に存在し、腸管上皮との接着に関わるたんぱく質で免疫することでその定着を阻止することを示しています。カンピロバクターが問題となるのはブロイラーであることから、注射によるワクチンは敬遠されるため現場で使用するにはまだ障壁があります。2011年の欧州食品安全機関の報告によると、通常は鶏の盲腸内容物 1g 当たり 10^8 個のカンピロバクターが存在するが、1000分の1まで減らすことができれば公衆衛生リ

スクが10分の1になると言われていることから、さらなる研究によってワクチン使用に対する壁を克服し、食の安全が確保されることを望んでいます。

私もワクチンメーカーの一員としてとして新たなワクチン開発を推し進めていきたいと感じました。

(研究員)

レビュー

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の遺伝子多様性と遺伝子全長解析

長井 誠 (石川県立大学生物資源環境学部生産科学科、現所属：麻布大学獣医学部獣医学科)

はじめに

牛ウイルス性下痢ウイルス感染症 (BVD) は養牛経営に与える経済損失が大きいことから、北欧諸国では国家を挙げた清浄化対策が行われ、清浄化に成功しており、オーストリアやスイスがそれに続いて国家的な清浄化策を進めている。我が国においては BVD の経済被害に対する認識が高まりつつあるものの、原因ウイルスである牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) は全国的に浸潤しているのが現状である。BVDV は抗原性状が多様であり、ワクチン株との抗原性状の差はワクチンの効果に影響を与える。また、BVDV の動物に対する病原性にウイルス遺伝子の変異が関連することが報告されており、遺伝子全長にわたる解析が求められる場合がある。本稿では、BVDV の遺伝子多様性および BVDV の病原性解明への遺伝子全長解析の有用性についてまとめた。

5'UTR の遺伝子配列の違いにより分類されたが、BVDV-1 と BVDV-2 の間には血清学的な差があることが明らかにされている。BVDV-1 および BVDV-2 それぞれの中にはさらにサブグループが存在し、現在、BVDV-1 は 21 (1a ~ 1u) サブグループ、BVDV-2 は 4 (2a ~ 2d) サブグループに分かれている [2]。遺伝子全長が登録されているサブグループの代表株の塩基配列による分子系統樹 (近隣接合法で作成) を図 1 に示した。色を付けてあるグループ (1a, 1b, 1c, 1j, 1n, 1o および 2c) は我が国で株が確認されているグループである。KZ-91 株に代表される我が国の BVDV-2 株はこれまで BVDV-2a と分類されていたが、近年このグループを 2c と分類する報告が多くなってきたことから、ここでは 2c とした。我が国で分離された株と免疫血清を用いて行った交差中和試験成績を R 値で表 1 に示した。R 値は血清学的性状の差を客観的に判断

1. BVDV の遺伝子多様性

(1) BVDV のサブグループ

BVDV は豚コレラウイルスやボーダー病ウイルスとともにフラビウイルス科ベステチウイルス属に分類される。BVDV は、1990 年代に北米で致死率の高い BVDV 感染症が発生し、分離ウイルスの 5'非翻訳領域 (UTR) の遺伝子配列が従来の株のものと約 25% の違いを認めたため、新しい型を BVDV-2 として従来の株 (BVDV-1) と区別された [1]。その後、国際ウイルス分類委員会により、BVDV-1 と BVDV-2 はそれぞれ独立した種として認定された。BVDV-1 と BVDV-2 は蛋白質をコードしない

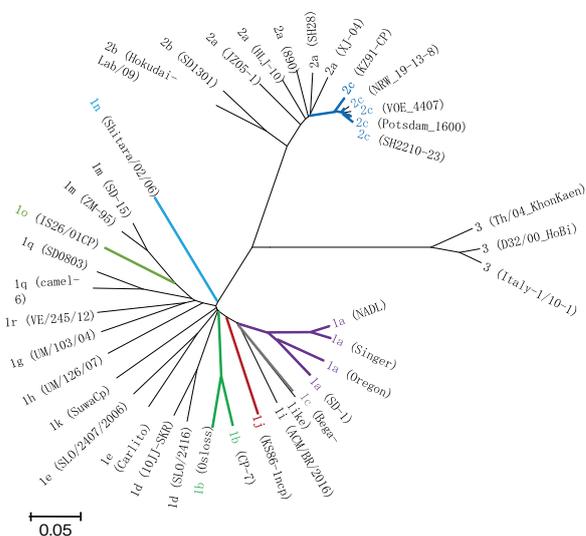


図 1 BVDV 遺伝子全長による分子系統樹

表1 BVDV サブグループ代表株の交差中和抗体価

ウイルス	BVDVに対する免疫血清						
	1a (No. 13-40)	1b (12287/00)	1c (12287/07)	1j (12287-1a)	1o (12287/06)	1n (12287/02)	2c (12-28-07)
1a	100	12.1	23.9	3.6	15.9	10.2	0.6
1b		100	8.8	1.0	3.4	7.4	0.3
1c			100	3.5	5.3	11.1	1.1
1j				100	1.0	2.2	0.6
1n					100	4.4	0.8
1o						100	0.5
2c							100

$$R \text{値} = 100 \times \sqrt{\frac{\text{抗B血清に対するA株の抗体価} \times \text{抗A血清に対するB株の抗体価}}{\text{抗A血清に対するA株の抗体価} \times \text{抗B血清に対するB株の抗体価}}}$$

* R 値で表す

する数値で、25 未満で有意な抗原性状の差があると判断することができる。表1の R 値から、我が国の BVDV-1 のいずれのサブグループ間にも有意な抗原性状の差があると考えられる。BVDV-1 のワクチンは世界的にも BVDV-1a で作られたものが多いが、この表からも 1a と 1b には血清学的性状に有意な差があることがわかり、BVDV-1b ワクチンの必要性が示されている。

(2) BVDV の遺伝子変異

RNA ウイルスは全く均一な遺伝子集団を形成するのではなく、準種 (quasispecies) と呼ばれる塩基配列がごくわずかに違った個体の集合体を形成する。RNA ウイルスが持つ遺伝子 RNA の合成を触媒する酵素である RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (BVDV の場合、NSP5B がコードしている) のエラー率が高いため、高い突然変異率で複製し多様な遺伝子集団である準種が生ずる。この高い突然変異率は RNA ウイルスに正の選択圧による遺伝子の点変異を起こし、進化することによりサブグループが形成される。BVDV-1n および BVDV-1o に分類される BVDV は我が国や韓国および中国といったアジアの国に限局して分布している。BVDV-1n および BVDV-1o の代表株として Shitara/02/06 株 (1n) および IS26NCP/01 株 (1o) の全遺伝子配列を決定し [3]、全塩基配列が DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている他の遺伝子型およびサブグループとの相同性を SimPlot 解析により比較し

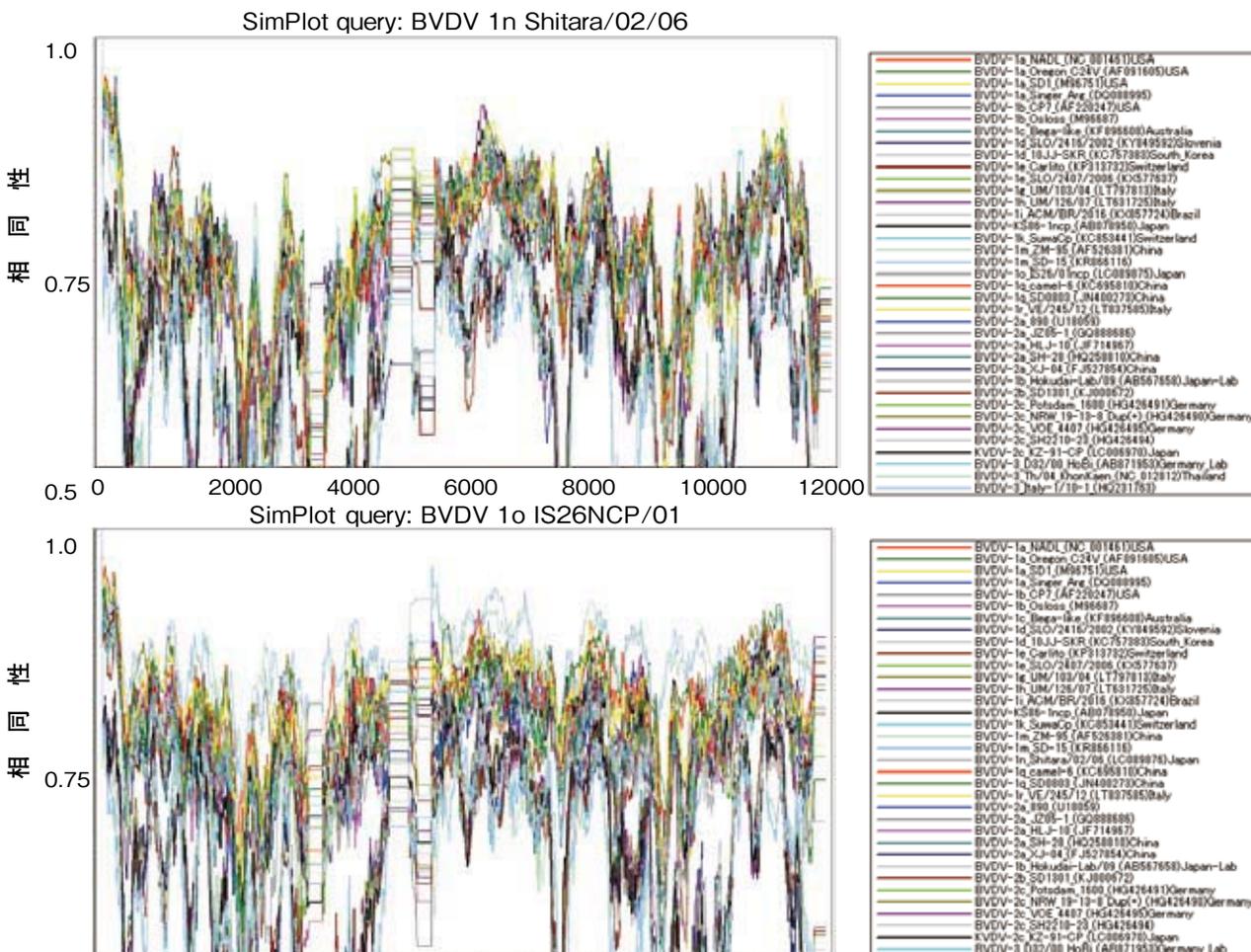


図2 BVDV-1n Shitara/02/06 株および BVDV-1o IS26NCP/01 株と他の遺伝子型およびサブグループとの遺伝子の相同性

た(図2)。Shitara/02/06株およびIS26NCP/01株は、全遺伝子領域にわたり他の遺伝子型およびサブグループとは相同性は高くなく、東アジアで独自に進化したサブグループであることが示唆された。

RNAウイルスは遺伝子の点変異による変異だけではなく、ウイルス遺伝子の相同性組換えによっても進化する。著者らは以前、BVDV遺伝子の5'UTRから3'UTRまでの間の5領域(5'UTR、N^{pro}、E2、NS3およびNS4~3'UTR)の部分配列を決定し、系統樹解析での比較を行った[4]。ほとんどの株が、どの領域も同じサブグループに分類されたが、米国の分離株であるILLNCは5'UTR、N^{pro}、E2およびNS4~3'UTRはBVDV-1bに分類されたのに対し、NS3ではBVDV-1a株のグループとクラスターを形成した。この株は遺伝子全長がDDBJ/EMBL/GenBankに登録されているので、遺伝子組換え解析ソフトRDP4を用いてBVDV-1aの代表株NADLとBVDV-1bの代表株CP-7との遺伝子組換えを調べたところ、NS3およびNS4Bに遺伝子組換えのブレイクポイントが見つかった(図3)。これらの遺伝子組換えがウイルス株の増殖や宿主に対する病原性などに関わるかは不明であるが、BVDVにおいても他のRNAウイルス同様、相同性遺伝子組換えが起こることがわかった。相同性組換えは、1つの細胞に同時に2種類以上のウイルスが

同時に感染した時に発生するので、BVDVの持続感染(PI)牛にBVDV生ワクチンを接種した時にも遺伝子組換えウイルスが発生する可能性があると考えられる。

(3) BVDV細胞病原性(CP)株とBVDV遺伝子の変異

野外で流行しているほとんどのBVDVは培養細胞に細胞変性効果を起こさない非細胞病原性(NCP)株であり、PI牛が主な感染源となり水平感染および垂直感染で流行を繰り返している。PI牛は、BVDVに対する抗体を保有しない妊娠初期の牛にBVDVが感染した時に、免疫機能が十分でない胎子が垂直感染し、感染BVDVに対して免疫寛容となることで発生し、生涯にわたり持続感染しているウイルスを排泄し続ける。粘膜病はPI牛のみが発症する致死的な病型で、粘膜病発症前には持続感染しているNCP株しか分離されないのに対し、粘膜病を発症すると培養細胞に細胞変性効果を起こすCP株が分離される。CP株はNCP株のウイルス遺伝子に変異を起こし、NS2-3蛋白が開裂してNS3蛋白が発現することで発生する。実際のところ他の遺伝子がコファクターとして働くことが必要で、NS3蛋白のみを細内に発現させても細胞変性効果は起こらないが、全てのCP株でNS3蛋白の発現

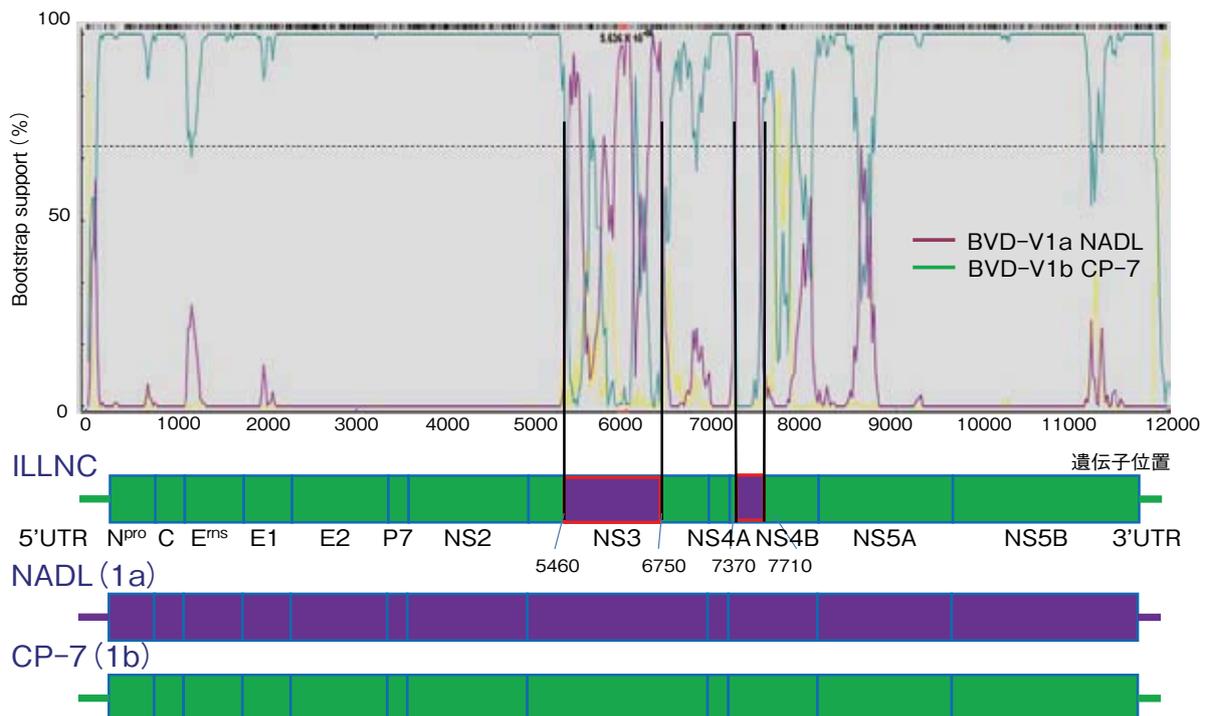
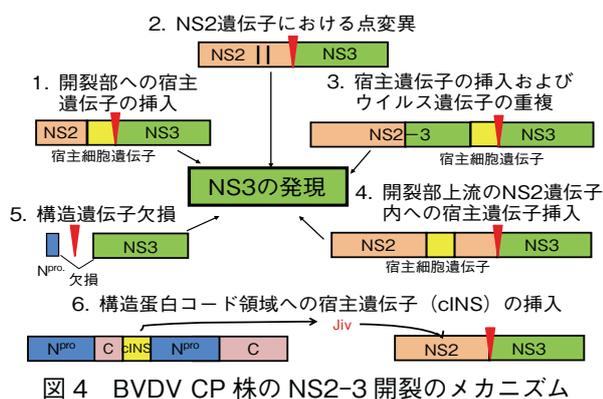


図3 BVDV-ILLNC株に認められたBVDV-1aとBVDV-1bの遺伝子相同性組換え



が認められることは事実である。これまでにNS2-3蛋白が開裂するメカニズムとして、1. NS2-3蛋白コード遺伝子領域開裂部位への宿主遺伝子(ユビキチン、GABA (A) -RAP、GATE-16)の挿入、2. NS2 遺伝子内での点変異によるNS2-3蛋白の構造変化、3. 宿主遺伝子の挿入およびウイルス遺伝子の重複、4. ヘルパーウイルス存在下におけるウイルス構造遺伝子の欠損、5. 開裂部上流のNS2 遺伝子内への宿主遺伝子(cINS)挿入、6. 構造蛋白(Core)コード領域への宿主遺伝子(cINS)の挿入

があり、6は著者らが発見したメカニズムである[5](図4)。

2. BVDV の遺伝子全長解析

(1) BVDV CP 株の遺伝子全長解析

近年、次世代型シーケンシングまたは「第2世代」シーケンシングと言われるゲノムを短い配列(ショートリード)で大規模に取得する配列解析技術が普及し、ウイルス遺伝子の全長解析に用いられている。図5AはIllumina社のMiSeqで、50bpのシングルエンドリードを用いてあるウイルスの遺伝子を解析した結果である。ウイルス遺伝子のランダムな領域を50bpずつシーケンスし、その配列の相同性をもとにアセンブリして全長配列を決定する。この方法で我が国のBVDV-2代表株であるKZ91-CP株や、前述のShitara/02/06株(1n)およびIS26NCP/01株(1o)の全遺伝子配列を決定した[3、6](この時は300bpのペアエンドリードを用いた)。BVDV CP株の全遺伝子配列の決定にショートリー

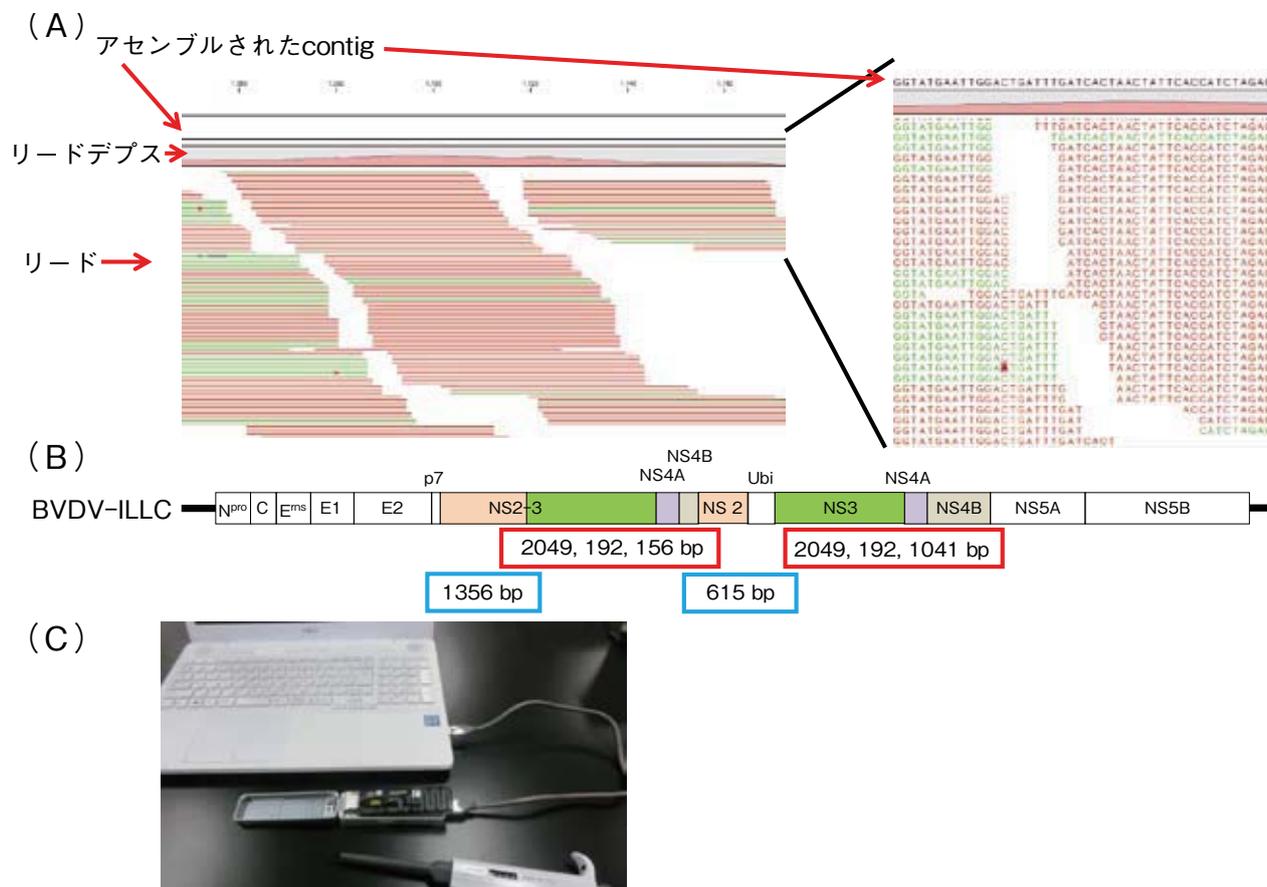


図5 BVDV の遺伝子全長解析法と問題点。

(A) Illumina社MiSeqによる解析結果。(B) BVDV-ILLC株の遺伝子構造。(C) Oxford社の小型のシーケンサーMinION。

ドによるシーケンシングを応用する場合、注意が必要である。CP株であるBVDV ILLC株は、宿主遺伝子の挿入およびウイルス遺伝子の重複のパターンの遺伝子配列を有し、NS2およびNS3～NS4Bにそれぞれ615 bpおよび2397 bp (2049 bp+192 bp+156 bp)の重複領域が存在する(図5B)。これをIllumina社のMiSeqで300 bpのペアエンドリードでシーケンスした場合、どちらの重複領域を読んだリードであるかを識別することができず、正確なアセンブリを行うことができない。ごく最近、長い分子の配列を解析可能な技術、「第3世代」シーケンシングが登場したが解析価格が高額であり、利用は限られている。このような中、他のゲノム解析技術と異なり専用機器を必要とせず、USBケーブルでパーソナルコンピュータに専用アダプターを接続するだけでゲノム配列を解析できる、Oxford社のNanopore技術による小型のシーケンサーMinION(ミナイオン)が発売された(図5C)。MinIONはフローセル中にあるナノポアの近くを、生体分子が通過するときに発生する電流の変化を計測することで塩基を識別し、物理的にロングリードを取得する。実際にCP株BVDVの遺伝子解析はまだ実施していないが、重複領域のあるCP株の解析にMinIONの活用を期待している。しかし、CP株は粘膜病を発症した動物からしか分離されず、CP株は垂直感染するがPIすることはなく、健康な動物の間に水平感染により拡散することはない。したがって、CP株は粘膜病を発症した動物から新たに発生するが、その株は存続することなく滅亡する運命にあると言える。このことからCP株の全長解析で遺伝子構造を決定することは限られた価値しかないと思われる。

(2) BVDVの病原性と遺伝子全長解析

BVDV感染症は粘膜病を除き致死率は高くないが、BVDV NCP株の感染による高死亡率を示す集団発生が報告されており、このような症例からの分離株について遺伝子全長解析が行われている。SD-15株は、中国山東省の320頭飼養規模の養牛農場で発生した激しい下痢症例から分離された。本症では、症状を示した214頭の約60%にあたる128頭が10～15日の経過で死亡した。BVDV-1mに分類されたこの株のウイルス遺伝子全長解析では、遺

伝子挿入や欠損は認められなかったが、E2糖蛋白のアミノ酸配列においてBVDV-1に共通する保存性の高い4つのグリコシル化サイト以外に、他の株にないもう一つのグリコシル化サイトが存在することが確認され、さらにErns糖蛋白にユニークなアミノ酸配列およびエピトープの変異が認められた。グリコシル化やRNase活性はペスチウイルスの毒性に関わることから、これらの変化がウイルスの生存性、伝播性および病原性に関連した可能性があるとして報告している[7]。北米で1990年代に流行した高病原性のBVDV-2(BVDV-2a)について、弱毒のBVDV-2a株との比較で5'UTRに存在するIRESの二次構造の微妙な差が見いだされ、この構造の差がウイルスの転写効率に影響し、ウイルス毒性に関わることを示唆された[8]。その後、2013年にドイツのノルトライン＝ヴェストファーレン州およびニーダーザクセン州で子牛、育成牛および搾乳牛に発生した死亡率の高い集団発生例から分離されたBVDV-2(BVDV-2c)は、ディープシーケンシングによる遺伝子全長解析で3タイプのウイルスが共存していることが確認された[9]。その中で95%を占める最も大きな集団はp7～NS2の222塩基の遺伝子重複を保有し、重複のない小さな集団のp7～NS2は3パターン配列を示した。リバーシジェネティック技術を用いた実験で、重複のないウイルスは重複のあるウイルスの複製の課程で発生することが判明した。p7はウイルスの組み立てや放出に関わると考えられており、重複しているp7によりウイルスの組み立てと放出の効率が増加し、これが高病原性に関連するのではないかと考察している。この報告では、北米の高病原性BVDV-2aの代表株である890株の解析も併せて行っており、890株にも同様なp7～NS2の重複があり、リバーシジェネティクス解析では同様な動向を示すことから、この重複遺伝子も高病原性に関わる可能性があることを示唆している。

おわりに

本原稿ではBVDVの遺伝子および抗原性状の多様性と病原性に関わる遺伝子変異について述べた。抗原性状については最も外側のウイルス構造蛋白をコードするE2遺伝子で推定することが可能である

が、ウイルスの病原性については遺伝子全長を解析する必要があることが示唆されている。近年シーケンス技術の発展は目覚ましく、様々な方法が応用できるようになった。BVDVの多様性や病原性を解明するために、利用可能な方法を駆使し、できるだけ詳細に解析することが重要と考えられる。

引用文献

- Ridpath, J.F., Bolin, S.R. and Dubovi, E.J. 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* **205** : 66–74.
- Yeşilbağ, K., Alpay, G. and Becher, P. 2017. Variability and Global Distribution of Subgenotypes of Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Viruses* **26** ; 9(6) . pii : E128.
- Sato, A., Tateishi, K., Shinohara, M., Naoi, Y., Shiokawa, M., Aoki, H., Ohmori, K., Mizutani, T., Shirai, J. and Nagai, M. 2016. Complete Genome Sequencing of Bovine Viral Diarrhoea Virus 1, Subgenotypes 1n and 1o. *Genome Announc.* **18** ; 4 (1) . pii : e01744–15.
- Nagai, M., Hayashi, M., Sugita, S., Sakoda, Y., Mori, M., Murakami, T., Ozawa, T., Yamada, N. and Akashi, H. 2004. Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus Res.* **99** : 103–113.
- Nagai, M., Sakoda, Y., Mori, M., Hayashi, M., Kida, H., and Akashi, H. 2003. Insertion of cellular sequence and RNA recombination in the structural protein coding region of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol.* **84** : 447–452.
- Sato, A., Kameyama, K., Nagai, M., Tateishi, K., Ohmori, K., Todaka, R., Katayama, K., Mizutani, T., Yamakawa, M. and Shirai, J. 2015. Complete genome sequence of bovine viral diarrhoea virus 2 Japanese reference and vaccine strain KZ–91CP. *Genome Announc.* **12** ; 3(1) . pii : e01573–14. doi.
- Zhu, L., Lu, H., Cao, Y., Gai, X., Guo, C., Liu, Y., Liu, J, and Wang, X. 2016. Molecular Characterization of a Novel Bovine Viral Diarrhoea Virus Isolate SD–15. *PLoS One.* **20** ; 11(10) : e0165044.
- Topliff, C.L., Chon, S.K., Donis, R.O., Eskridge, K.M. and Kelling, C.L. 2005. In vitro and in vivo translational efficiencies of the 5' untranslated region from eight genotype 2 bovine viral diarrhoea virus field isolates. *Virology.* **331** : 349–356.
- Jenckel, M., Höper, D., Schirrmeier, H., Reimann, I., Goller, K.V., Hoffmann, B. and Beer, M. 2014. Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus detected by deep sequencing. *J Virol.* **88** : 6983–6992.

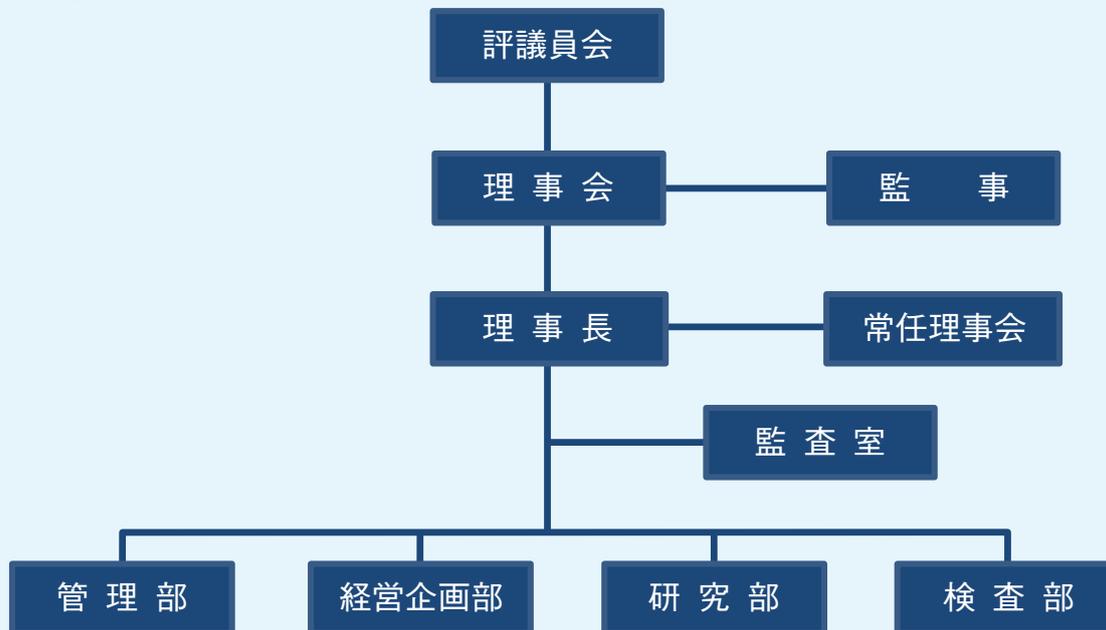
研修者・見学者受け入れ状況 (平成29年4月から平成30年3月まで)

来所日・期間		所属機関・人数		研修・見学内容
平成29年	4月24日～4月28日 5月15日～5月19日	株式会社ジャパンファーム	1名	技術習得
	5月10日	東京都立青峰学園	2名	現場実習
	6月16日、6月19日、6月20日	東京都立青峰学園	1名	現場実習
	9月11日	岩手大学農学部	1名	施設見学
	10月5日～10月13日	鹿児島大学農学部	1名	技術習得
	10月10日～10月12日	イセファーム株式会社	1名	技術習得
	10月18日	宮崎大学農学部	1名	施設見学
	12月4日～12月8日	東京都立青峰学園	1名	現場実習
平成30年	1月17日	麻布大学獣医学部	2名	施設見学
	1月29日、1月30日、2月1日、2月2日	東京都立青峰学園	1名	現場実習
	2月23日	農林水産省動物医薬品検査所	3名	施設見学

平成 30 年度定時評議会開催

当研究所の平成 30 年度定時評議員会が、去る平成 30 年 6 月 20 日に開催され、平成 29 年度の事業報告及び決算報告が承認されると共に、次期の理事及び監事が選任されました。現在の組織、評議員、理事及び監事は下記のとおりです。

1. 組織

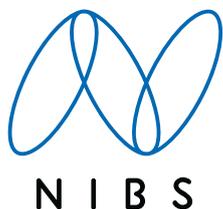


2. 評議員

杉浦 勝明 真板 敬三 佐々木 伸雄 山手 丈至 古我 知史

3. 理事・監事

氏名	役職	担当
笹川 千尋	理事長	研究及び検査
長井 伸也	所長	経営統括
土屋 耕太郎	常務理事	経営企画
朱通 市次郎	常務理事	管理
小坂 善三	監事	
加藤 哲雄	監事	



—— テーマは「生命の連鎖」——
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより 昭和 30 年 9 月 1 日創刊(年 4 回発行)
 (通巻 608 号) 平成 30 年 6 月 25 日印刷 平成 30 年 7 月 1 日発行(第 64 巻第 3 号)
 発行所 一般財団法人日本生物科学研究所
 〒 198-0024 東京都青梅市新町 9 丁目 2221 番地の 1
 TEL : 0428(33)1520(経営企画部) FAX : 0428(31)6166
 URL : <http://nibs.lin.gr.jp/>
 発行人 土屋耕太郎
 編集室 委員/小野浩輝(委員長)、近内将記、安田早織
 事務/経営企画部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)



第161回日本獣医学会学術集会
The 161st Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science

One Health

人と動物の健康と共生



第 161 回

日本獣医学会学術集会

会期 2018年9月11日(火) ~ 13日(木)

会場 つくば国際会議場 〒305-0032
茨城県つくば市竹園2-20-3

会長 長井伸也
(一般財団法人日本生物科学研究所)



一般財団法人 日本生物科学研究所
NIBS NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

第161回日本獣医学会学術集会事務局

〒198-0024 東京都青梅市新町9-2221-1 一般財団法人日本生物科学研究所 事務局長: 渋谷 一元
TEL 0428-33-1042 FAX 0428-33-1080 ✉ jsvs161@meeting-jsvs.jp

<http://www.meeting-jsvs.jp/161/>