

牛ウイルス性下痢ウイルスの変異に関する研究

中村 欣 幸

牛ウイルス性下痢ウイルスの変異に関する研究

中村 成 幸

# 目 次

緒 言	1
第1章 細胞病原性牛ウイルス性下痢ウイルスストックからの非細胞病原性牛ウイルス性下痢ウイルスの検出とその性状	4
1. 要旨	5
2. 序文	6
3. 材料と方法	7
4. 実験結果	11
(1) CP BVDウイルスストック中からのNCP BVDウイルスの検出及び分離	11
(2) 分離ウイルスのEND現象の発現とウイルス干渉性	11
(3) 分離ウイルスの抗原性	12
5. 考察	13
第2章 細胞病原性牛ウイルス性下痢ウイルスから非細胞病原性牛ウイルス性下痢ウイルスへの復帰変異	16
1. 要旨	17
2. 序文	18
3. 材料と方法	20
4. 実験結果	22
(1) CP BVDウイルスのクローニング試験	22
(2) 純化CP BVDウイルスからのNCP BVDウイルスの検出及び分離	22
(3) 純化CP BVDウイルスの無希釈継代によるCPE発現への影響	23
(4) RT-PCR法による宿主細胞由来mRNA遺伝子の検索	24

(5) 宿主細胞由来mRNAを挟む領域の塩基配列及びアミノ酸残基の比較	25
5. 考察	27
第3章 非細胞病原性牛ウイルス性下痢ウイルスのオルビウイルス増殖増強作用	31
1. 要旨	32
2. 序文	33
3. 材料と方法	34
4. 実験結果	36
(1) NCP BVDウイルス感染B T細胞におけるオルビウイルス増殖増強作用	36
(2) 各種NCP BVDウイルスのイバラキウイルス増殖増強作用	36
(3) END現象陽性及び陰性NCP BVDウイルス感染B T細胞におけるイバラキウイルスの増殖曲線	37
(4) BVDウイルス感染B T細胞におけるイバラキウイルスによるインターフェロンの誘導	38
5. 考察	39
総 括	41
謝 辞	42
参 考 文 献	43
表及び図	57

## 緒 言

牛ウイルス性下痢(BVD: Bovine viral diarrhea)ウイルスは、その物理化学的性状からトガウイルス科ベスチウイルス属に分類されていた(49)。しかし、遺伝子の構造や機能、非構造蛋白質の前駆蛋白質のアミノ酸配列の疎水性・親水性パターンから共通抗原を有する豚コレラウイルス及びボーダー病ウイルスとともにフラビウイルス科ベスチウイルス属に分類され、同ウイルス属のプロトタイプウイルスとされている(11,24,35,61,82)。BVDウイルスはエンベロープを有する直径40-60nmのウイルスで、約12.5キロベースからなるプラスセンスの1本鎖RNAを保有する(12,18,67)。BVDウイルスは培養細胞に対する病原性から、細胞病原性(CP)と非細胞病原性(NCP)の2つのバイオタイプが存在する。細胞病原性ウイルスは、感染細胞に空胞化や細胞死を起こすのに対し、非細胞病原性ウイルスは細胞変性効果(CPE)を示さない(2,26)。BVDウイルスの血清型は確立していないが、抗原性は多様である(4,15,75)。

BVDウイルスは、牛の流行性下痢と粘膜病から別々に分離されたが、その後同一のウイルスにより起こることが判明したことから牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルスとも呼ばれている。BVDウイルスが牛に感染すると発熱と白血球減少症を伴う消化器病や呼吸器病、免疫抑制、繁殖障害などが認められることがある。ウイルス株や牛の状態により多様な病態を示すことがBVDウイルス感染の特徴である(2)。しかし、これらの症状は軽く、一過性であったり、不顕性感染で終わることが多い。一方、BVDウイルスは妊娠牛に感染すると経胎盤感染が高頻度に行き、感染時の胎齢により胎仔死、奇形、免疫寛容に基づく持続感染などの発生がみられる。粘膜病は血液や粘液の混ざった下痢と発熱、消瘦などを主徴とし、致死性である。妊娠牛がNCPウイルスに感染すると胎仔感染が起こる。胎仔感染の影響は、感染の成立時期、特に胎仔の免疫機能の発達状況と密接に関連する(2)。特異免疫応答能を獲得する以前、胎齢90日以前に感染した場合、胎仔死の他、免疫寛容を示し持続感染牛となり、生後、粘膜病を発症する例が多い。胎齢100から150日で感染すると胎仔は免疫応答があり炎症反応により基幹細胞の破壊に伴う水頭症、小脳形成不全などの先天性異常、流産などがみら

れる。胎齢150日以降に感染した場合胎仔は、免疫応答でウイルスを排除し正常仔として生まれる。

本ウイルスの感染による特徴的な粘膜病と呼ばれる致死的な病態がある。粘膜病の発生機構は、長い間不明であったが、近年、粘膜病の病態発生には、持続感染牛が密接に関わり合っていることが明らかにされた。持続感染牛は、持続感染ウイルスに対し特異的免疫不応答、つまり免疫寛容となっている。粘膜病はNCPウイルス持続感染牛（免疫寛容状態）にのみ発生し、CPウイルスがこれらの粘膜病を発症した牛からのみ分離され、分離されたCPとNCPウイルスは類似した抗原性を示すことが報告された（8,15,37,51,73）。このCPウイルスの起源については、不明な点が多い（6）。持続感染牛に持続感染NCPウイルスと同一の抗原性を有するCPウイルスを重感染させることにより粘膜病を発症することが実験的に証明された（5-8,74）。CPウイルスはNCPウイルスと異なり、粘膜病以外の症例から分離されたことはなく、野外における存続と生態は明らかではない。また、CPウイルスが牛の間で存続するとしても、本ウイルスの抗原性が多様であることから、持続感染ウイルスと抗原性が一致するCPウイルスが重感染する確率は低いと思われる。このことから、粘膜病の発現は、外部からのCPウイルスの重感染によるものではなく、本来持続感染しているNCPウイルスがCPウイルスへ変異することによってCPウイルスが出現し、そのCPウイルスの増殖によることが示唆されている（15,35,37）。

近年、遺伝子工学的技術の進歩に伴い、BVDウイルスの遺伝子及びその機能に関する知見が蓄積されつつある。BVDウイルスは、単一の1本のオープンリーディングフレームから前駆蛋白質が翻訳される。前駆蛋白質は修飾を受け、構造蛋白質と非構造蛋白質となる。CPウイルスでは、非構造蛋白質p125は更に修飾され、p54とp80に開裂するが、NCPウイルスでは、この開裂は起こらない（12,21）。CPウイルスの感染ではp125及びp80が検出されるが、NCPウイルス感染細胞からはp80は検出されないことから、p80と細胞病原性の関連が注目されている（21,69）。また、非構造蛋白質p125をコードする遺伝子領域に数株のCP BVDウイルスに短いRNAのインサクションがあることが報告されている（16,52,57,66,80）。CPウイルスであるNADL株及びOsloss株は全塩基配列が決定され、p12

5コード領域に宿主細胞由来mRNA (270bp) またはユビキチン遺伝子 (228bp) のインサクションがあることが明らかとなっている (12, 14, 67, 68)。CPとNCPウイルスの遺伝子解析からNCPウイルスが宿主細胞由来mRNAをウイルスRNAのp125コード領域中に取り込むことによってCPウイルスに変異するという仮説が提唱されている (52-57)。しかしながら、持続感染ウイルスと抗原性の一致するCPウイルスの重感染あるいは出現がどのような機序で粘膜病を誘起するかについてはまだ完全に解明されていない。粘膜病の発生機序の解明のためにも、このバイオタイプの変異機序の解明は残された問題となっている。

そこで、著者は、BVDウイルスのCPウイルスからNCPウイルスへの変異機構を解明する目的で、真に親子関係にあるCP及びNCPウイルスペアを用いてウイルスRNA中に取り込まれている宿主細胞由来mRNAの動向について研究した。

更に、分離したNCPウイルスの生物学的性状を調べる目的で、NCP BVDウイルスとオルビウイルスの培養細胞における相互作用についての研究を企画した。

本論文は次の3章から構成される。第1章では、CPウイルスストック中のNCPウイルスの検出に関する成績を記載した。第2章では、第1章で検出されたNCPウイルスの起源及びCPウイルスとの遺伝子の差異を知る目的で純化CPウイルスとそれから分離したNCPウイルスの遺伝子の塩基配列の解析に関する成績を記載した。第3章では、第1章及び第2章で分離したNCPウイルスとオルビウイルスとの培養細胞における相互作用に関する成績を記載した。



# 第1章 細胞病原性牛ウイルス性下痢ウイルスストックからの非細胞病原性牛 ウイルス性下痢ウイルスの検出とその性状



## 1. 要旨

CP BVDウイルスストック中から干渉現象を利用したリバーブラック法によりNCP BVDウイルスを分離し、分離ウイルスのEND現象の発現、ウイルス干渉能及び抗原性について検討し、以下の結果を得た。

用いた4株全てのCP BVDウイルスストックからリバーブラック法によりNCP BVDウイルスが検出された。分離されたNCP BVDウイルスには、END現象陽性と陰性の2種類の性状の異なるものが同時に含まれていることが明らかとなった。END現象陽性NCP BVDウイルスは、CP BVDウイルスを干渉したが、END現象陰性のウイルスはCP BVDウイルスのみならず水胞性口炎ウイルスも干渉することが明らかとなった。CP BVDウイルス間の抗原性に差異が認められたが、CP BVDウイルスとそれから分離されたNCP BVDウイルスとでは抗原性の区別はできなかった。

これらの現象から、分離されたNCPウイルスの起源については不明であるが、CPウイルスからNCPウイルスへの変異の可能性が示唆された。

## 2. 序文

BVDウイルスはフラビウイルス科ベスチウイルス属に分類されるプラスセンスの1本鎖RNAウイルスである(61)。BVDウイルスにはCPとNCPの2種類のバイオタイプが存在する。CPバイオタイプは、牛由来培養細胞に空胞化や細胞死などCPEを起こすが、NCPバイオタイプはCPEを起こさない。CP BVDウイルスは、通常のCPE法またはブラック法によりウイルスの検出、ウイルス価の測定及びクローニング等を行うことができる(26)。しかし、NCP BVDウイルスはCPEを起こさないことから、ウイルスの検出等には、蛍光抗体法やELISA法のほか、ウイルスの干渉現象を利用した同種(27)及び異種ウイルス干渉法(42)、ニューカッスル病ウイルス(NDV)の増殖増強作用を利用したEND法(38,39,65)などの間接的な方法が必要とされている。同種及び異種ウイルス間干渉を応用したリバースブラック(RPF)法(25,47)は、NCP BVDウイルスのウイルス価の測定等に利用されている(40,41)。また、BVDウイルスのウイルス干渉能やEND現象の発現の有無は、BVDウイルスの生物学的性状の1つとなっている。

一方、BVDウイルスゲノムの構造や機能の解析並びにBVDウイルスによる粘膜病の発生机序の解明が進み、バイオタイプを異にするCPとNCPウイルスの重感染と粘膜病の発病とが密接に関係していることが明らかにされている(5,8,74)。しかしながら、これらウイルス相互の関係については不明な点が多く、粘膜病の発生机序を考えるうえからも残された問題となっている。CPウイルスを *In vitro* で継代するとCPEの出現が弱まり、CPEの出現とゾーン現象が認められることが経験的に知られている。これは、CPウイルスを干渉するNCPウイルスが出現している可能性が考えられた。

そこで、CPとNCPウイルス相互の関連を知るため、まず、CPウイルスストックからNCPウイルスの検出と分離を試みるとともに分離ウイルスの性状について調べた。

### 3. 材料と方法

培養細胞： 実験に用いた培養細胞は、牛精巢(BT)を常法により、0.25%トリプシン液で消化し、増殖用培養液で約 $2 \times 10^5$ 個/mlとなるように調製した。実験には継代歴が6代から12代目の細胞を使用した。増殖用培養液として牛胎仔血清(FBS)を10%、トリプトースホスフェイトブロス(ディフコ)を0.295%、硫酸ストレプトマイシン(明治製菓)を $100 \mu\text{g/ml}$ 、硫酸カナマイシン(明治製菓)を $50 \mu\text{g/ml}$ となるように加え、7.5%炭酸水素ナトリウム液でpHを7.2に調製したイーグルMEM培地(日水製薬、No.1)を用いた。維持用培養液はFBSを2%に減量したものを使用した。BT細胞及びFBSはRT-PCR法(33)によりBVDウイルスの迷入が無いことを、また、FBSは中和試験によりBVDウイルスに対する抗体が陰性であることを確認して用いた。

ウイルス： CP BVDウイルスは日本で分離された2株及び外国で分離された2株を用いた。

Nose株： Kodamaら(44)により日本で最初に分離されたCP BVDウイルスで、BEF細胞で4代継代されたものを分与され、BT細胞で継代したものをを用いた。

KS86(+)株： Shimizuら(75)により日本で分離され、農林水産省家畜衛生試験場清水実嗣博士から分与を受け、BT細胞で継代したものをを用いた。

NADL株： GutekunstとMalmquist(31)により米国で分離され、American Type Culture Collectionから購入し、BT細胞で継代したものをを用いた。

Osloss株： ドイツ・ハノーバー獣医科大学 B. Liess教授から分与を受け、BT細胞で継代したものをを用いた。

その他のウイルスとして、農林水産省家畜衛生試験場から分与された水胞性口炎ウイルス(VSV) New Jersey Serotypeを鶏胚胎児線維芽細胞で、NDV宮寺株をSPF発育鶏卵でそれぞれ継代したものをを用いた。

CP BVDウイルスの定量法： CP BVDウイルスの定量はBT細胞を用いたCPE法またはブラック法で行った。

a) CPE法： ウイルス液を維持用培養液で10倍階段希釈し、0.5mlのBT細胞浮遊液を含む48ウェルプレート（スミロン、MS-80480）に1希釈当たり4ウェル、各0.1mlずつ接種した。37℃の5%炭酸ガス培養器で7日間培養し、CPEの出現の有無を観察した。CPEの出現したウェルをウイルス陽性として50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID<sub>50</sub>)を算出し、ウイルス価を決定した。

b) ブラック法： 直径60mmのプラスチックシャーレ（スミロン、MS-11600）に1～2日間培養し単層を形成したBT細胞を用いた。維持用培養液で10倍階段希釈したウイルス液をシャーレ1枚につき0.2mlずつ接種した。37℃1時間吸着後、接種したウイルス液を除去し、5mlの1.5%のメチルセルロースを含む維持用培養液を加えて37℃の5%炭酸ガス培養器で7日間培養した。培養終了後にメチルアルコールで固定後0.2%クリスタルバイオレット液で染色し、出現ブラック数からブラック形成単位(PFU)を算出した。

NCP BVDウイルスの定量法： NCP BVDウイルスの定量はBT細胞を用いた干渉法、END法またはRPF法で行った。

a) 干渉法： 干渉法はGillespie (27) の方法に準じて実施した。即ち、維持用培養液でウイルス液を10倍階段希釈し、BT細胞浮遊液0.5mlを含む48ウェルプレートに各希釈毎に4ウェルを用いて、各ウイルス液の0.1mlずつを接種した。37℃の5%炭酸ガス培養器で5日間培養した後、培養液を吸引除去し、Nose干渉法ではCP BVDウイルスNose株を、VSV干渉法ではVSVをそれぞれ維持用培養液で約 $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/mlに調製し、各ウェル0.5mlずつ重感染させた。37℃の5%炭酸ガス培養器で3日間培養し、CPEの出現の有無を観察した。Nose株またはVSVのCPEが出現しなかったウェルをNCP BVDウイルス陽性としてTCID<sub>50</sub>を算出し、ウイルス価を決定した。

b) END法： END法はInabaら (38,39) の方法に準じて実施した。即ち、維持用培養液でウイルス液を10倍階段希釈し、BT細胞浮遊液0.5mlを含む48ウェルプレートに各希釈当たり4ウェルを用いて、各ウイルス液の0.1mlずつを接種した。37℃の5%炭酸ガス培養器で5日間培養した後、培養液を吸引除去し、約

$10^{4.5}$  50% Egg Infectious Dose/mlとなるように調製したNDV宮崎株を含む維持培養液を各ウェルに0.5mlずつ加えた。更に37°Cの5%炭酸ガス培養器で4日間培養し、CPEの出現の有無を観察した。NDVのCPEの出現したウェルをNCP BVDウイルス陽性としてTCID<sub>50</sub>を算出し、ウイルス価を決定した。

c)RPF法： RPF法はFukushoら(25)、小川(63)及びItohら(40)の方法に従い、以下の方法で実施した(図1-1)。直径60mmのプラスチックシャーレ(スミロン、MS-11600)に1~2日間培養し単層を形成したBT細胞を用いた。維持用培養液で10倍階段希釈したウイルス液をシャーレ1枚につき0.2mlずつ接種した。37°Cで1時間吸着後、接種したウイルス液を除去し、5mlの1.5%のメチルセルロースを含む維持用培養液を加えて37°Cの5%炭酸ガス培養器で5日間培養した。温めた維持用培養液で細胞面からメチルセルロースを除去後CP BVDウイルスNose株またはVSVをM.O.I 2で重感染させた。37°Cで1時間吸着後、重感染したウイルス液を除去し、5mlの1.2%のメチルセルロースを含む維持用培養液を加えて37°Cの5%炭酸ガス培養器で2日間培養した。培養終了後にメチルアルコールで固定後0.2%クリスタルバイオレット液で染色し、出現したリバーブラック数からPFUを算出した。

免疫血清： 抗BVDウイルス免疫血清の作製には、Nose株及びNADL株を用いた。BT細胞で増殖させたBVDウイルス液をBVDウイルスに対する中和抗体陰性の約150kgのウシ(ホルスタイン種)の静脈内に接種し、4週後に採血し血清を分離して抗血清とした。この抗血清の中和抗体価は、それぞれの免疫ウイルスに対して4,096倍であった。また、Nose株については、家兎に頻回接種して作製した中和抗体価2,048倍の血清も用いた。

抗VSV免疫血清は農林水産省家畜衛生試験場から分与されたものを使用した。VSV New Jersey serotypeを家兎に頻回接種して得られた血清で、同ウイルスに対する中和抗体価は4,096倍であった。

CP BVDウイルスストックからのNCP BVDウイルスの分離法： 小川(63)の報告したRPF法によるウイルス分離法をもとに以下のように行った(図1-2)。

上述した方法によりリバースブラックの形成されたシャーレを選び、縁にグリースを付着させた径8mmのペニシリンカップをリバースブラックを囲むようにのせ、0.23%トリプシン液と5,000倍EDTA液の等量混合液を0.3ml加え、37°Cで5分間反応させた。リバースブラックを形成していた細胞がシャーレ面から剥離したことを確認後、採取し、その細胞浮遊液を遠心管に移した。CPウイルス及び攻撃ウイルスを除去するために細胞を維持用培養液で3回遠心洗浄後、RPF法の攻撃ウイルスにNose株を用いた場合は抗BVDウイルスNose株免疫家兔血清を1ml、VSVを用いた場合は抗BVDウイルスNose株免疫家兔血清と抗VSV免疫血清を等量混合したものを1ml加え、37°Cで1時間感作後、維持用培養液を用いて5回遠心洗浄を行った。維持用培養液を1ml加えた細胞浮遊液を3回凍結融解し、その遠心上清を10倍階段希釈し、BT細胞浮遊液を0.5ml含む培養用試験管に0.1mlずつ接種した。37°Cで5日間培養後、その培養上清は各々の試験管毎に保存用の試験管にそれぞれ回収し、4°Cで保存した。感染細胞は、維持用培養液で約 $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/mlに調製したNose株またはVSVを重感染させた。37°Cで3日間培養し、CPEの出現の有無を観察した。CPEが抑制された最高希釈の試験管から回収、保存した培養上清を次代の純化材料とした。同様の操作を3回繰り返し、最終の培養上清をBT細胞で増殖させて、分離ウイルス液を作製した。

中和試験： 被検血清を維持用培養液で2倍階段希釈列をつくり、200 TCID<sub>50</sub>/0.1mlに調製したBVDウイルス液と等量混合し、37°Cで1時間感作後、1希釈2ウェルを用いBT細胞浮遊液0.5mlを含む48ウェルプレートに各々0.1mlずつ接種した。37°Cの5%炭酸ガス培養器で培養し、CPウイルスを指示ウイルスとした場合には7日間にCPEの出現したウェルを、NCPウイルスを指示ウイルスとした場合には5日目にNose株またはVSVを重感染させ、これらウイルスのCPEを抑制したウェルをそれぞれウイルス陽性とした。中和抗体価は1ウェル以上でBVDウイルスの増殖が抑制された血清の最高希釈倍数の逆数で示した。

#### 4. 実験結果

##### (1) CP BVDウイルスストック中からのNCP BVDウイルスの検出及び分離

CPウイルスとして知られている4株のCPウイルスストックについてブラック法、Nose-RPF法及びVSV-RPF法によりCP及びNCPウイルスの検出を行った。4株のCPウイルスストックはB T細胞に明瞭なCPEが認められるとともにブラックも形成され、培養細胞に対する態度からCPウイルスと判断された。しかしながら、表1-1に示すように実験に用いた4株すべてのCPウイルスストック中には、RPF法によりNCPウイルスが検出された。Nose、NADL及びOsloss株では、CPウイルスのブラック法によるウイルス価は、重感染ウイルスにNose株またはVSVを用いたRPF法によるウイルス価に比べ10倍から100倍高かった。しかし、KS86(+)株では、両者に差は認められなかった。

CPウイルスストック中にNCPウイルスの存在が確認された4株のCPウイルスからNose株またはVSVを用いたRPF法により、それぞれNCPウイルスを分離した。

##### (2) 分離ウイルスのEND現象の発現とウイルス干渉性

分離されたNCPウイルスのEND現象の発現とウイルス干渉性をNose株を用いた同種干渉法及びVSVを用いた異種干渉法により比較した成績を表1-2に示した。分離ウイルスはEND法により陽性と陰性の2つのグループに分けられた。END現象陽性ウイルスはNose-END<sup>+</sup>、NADL-END<sup>+</sup>、KS86(+)END<sup>+</sup>、Osloss-END<sup>+</sup>、END現象陰性ウイルスはNose-END<sup>-</sup>、NADL-END<sup>-</sup>、KS86(+)END<sup>-</sup>、Osloss-END<sup>-</sup>株とそれぞれ命名した。CP BVDウイルスNose株を用いた同種干渉法では全ての分離ウイルスがNose株を干渉したが、VSVを用いた異種干渉法ではEND現象陰性分離ウイルスのみがVSVを干渉した。これらの干渉現象は、重感染ウイルス量をM.O.I. 1以上とした場合でも認められ、1週間以上持続した。



### (3) 分離ウイルスの抗原性

CPウイルスと分離NCPウイルスとの抗原性をウイルス中和試験により比較した成績を表1-3に示した。試験に用いたCPウイルス間には抗原性に差異が認められたが、CPウイルスとそのウイルスストックから分離されたNCPウイルスとは、抗原性を区別することはできなかった。

## 5. 考察

培養細胞に種々の組み合わせのウイルスが感染した場合についてはMatumoto (50) 及びFennerら (23) により報告されている。一般的には、2種類の異なるウイルスがともに感染する場合、1つのウイルスが他のウイルスを干渉または増強する場合がある。BVDウイルスの干渉についてはGillespieら (27) により初めて発見されたBVDウイルス間の同種干渉 (20, 42, 77, 79) 及びBVDウイルスが他のウイルスを干渉する異種干渉 (28, 42) が報告されている。増強については、Kumagaiら (45) によりはじめてBVDウイルスと同じベスチウイルスに属する豚コレラウイルス感染豚精巢培養細胞においてNDVの増殖が増強されることを、また、SodaとMatumoto (78) は同細胞において風疹ウイルスが増強されることを報告している。Inabaら (39) はBVD NCPウイルスをB Tまたは牛腎培養細胞に感染させた後NDVを重感染させると著しいNDVのCPEが発現し、豚コレラウイルスと同様にBVDウイルスがNDVの増殖を増強することを報告している。更に、AnguloとSavan (1) は、BVDウイルスのパラインフルエンザ3型ウイルスの増殖増強を観察している。これらベスチウイルスの生物学的性状はBVDウイルスの生物学的性状の1つとなっているほか、これらの現象はNCPウイルスの検出等に利用されている。RPF法は、BVDウイルスの干渉現象を利用したBVDウイルス (40, 41) 及び豚コレラウイルス (25, 47, 63) の高感度の検出法であることが証明されている。RPF法の重感染ウイルスにNose株を用いる場合、END現象陽性及び陰性ウイルスによりリバーブラックは形成される。しかし、重感染ウイルスにVSVを用いる場合、END現象陰性ウイルスのみによりリバーブラックは形成される。そのため、今回のRPF法のように重感染ウイルスを選択することにより、CPウイルスから性状の異なるNCPウイルスを検出・分離することが可能となった。既知のCPウイルスは、通常行われているように試験管に培養したB T細胞に接種した場合CPEが発現し、たとえ低率にNCPウイルスが混入していても検出できない。これは、CPウイルスとNCPウイルスは互いに干渉し合い増殖するが、NCPウイルスの比率が低いと、CPウイルスのCPEが発現することによりCPEを起こしていないNCPウイルス感染細胞もはがれてしまい試験管全体ではCPE

陽性になってしまうからである。RPF法は、干渉し合い増殖するCPとNCPウイルスを重層培地を用いることによりリバースブラックを形成しているNCPウイルス感染細胞だけをCPEを起こしている細胞の中から検出するものである。

この方法により既知のCPウイルスからNCPウイルスの検出を試みた。その結果、CPウイルス4株全てにNCPウイルスが混在していることが明らかとなった。更に、分離されたNCPにはEND法及びウイルス干渉性から異なる2種類のNCPウイルスが同時に含まれていたことは興味深い。同じベスチウイルス属に分類される豚コレラウイルスでは、END現象陽性株から陰性株がShimizuらにより1株(76)、小川により4株分離されている(63)。今までに調べられた限りでは、NCP BVDウイルスは1例を除き(42)、全てEND現象陽性であることが報告されている(39)。そのほかCP BVDウイルス中にVSVを干渉するウイルスが混入していたという報告があるが、そのウイルスのEND現象の発現の有無については調べられていない(28)。今後、RPF法を用いることにより、CPウイルスからNCPウイルスの分離だけでなく、END現象陽性株からEND現象陰性株の分離への応用の可能性も考えられる。

実験にはBT細胞とFBSを使用している。培養細胞はベスチウイルスの汚染の危険があり(3,32)、FBSは特に、BVDウイルスの汚染が多く報告されている(2,36,62,86)。このため、BT細胞は最高15代まで細胞を継代しCPEの発現の無いこと及びNose株を用いた干渉法によりCP及びNCPウイルスの汚染が無いことを確認した。また、RT-PCR法によりBT細胞及びFBSはBVDウイルスに汚染されて無いことを確認して用いた。更に、FBSはガンマー線滅菌したものを使用した。従って、今回分離されたウイルスは外来性のBVDウイルスでないと考えられる。また、一部のCP BVDウイルスは干渉性欠損粒子(Defective interfering particle)を含んでいると報告(46,81)されているが、NADL株は干渉性欠損粒子を含まないことが確認されている(81)。今回用いたその他のCPウイルスは、限界希釈法によるクローニングによってもその性状は変化しないことから干渉性欠損粒子は、含まないものと思われる。

持続感染牛からはNCPウイルスしか分離できないが、粘膜病を発症している牛からはNCPウイルスとともに常にCPウイルスが分離される(5,8,74)。野外分離

株の抗原性は多様だが、1個体の粘膜病牛から分離されるNCPウイルスとCPウイルスは同一の抗原性を示すことが知られている(4,5,15,37,73)。これらのことから、粘膜病牛から分離されるCPウイルスは、持続感染していたNCPウイルスがCPウイルスに変異したとする仮説が提唱されている(15,37)。しかしながら、粘膜病の発症機構にCPウイルスとNCPウイルスがどのように関わり合っているか、また、CPとNCPというバイオタイプの相互の関係はまだ完全に解明されていない。今回、B T細胞に明瞭なC P Eを発現する既知の4株のCPウイルスからそれぞれ性状の異なる2種類のNCPウイルスが分離された。CPウイルス間には抗原性に差異が見られたが、CPウイルスと2種類の分離NCPウイルス間では抗原性は同一であった。以上のことから、分離されたNCPウイルスの起源については不明であるが、CPウイルスからNCPウイルスへの変異の可能性が示唆された。

## 第2章 細胞病原性牛ウイルス性下痢ウイルスから非細胞病原性牛ウイルス性

### 下痢ウイルスへの復帰変異

## 1. 要旨

BVDウイルスのCPウイルスからNCPウイルスへの変異機構の解明を目的とし、CPウイルスの宿主細胞由来のmRNAのインサージョンに注目し、CPウイルスであるNADL株及びOsloss株と真に親子関係にある2種類のNCPウイルスのベアーウイルスを用い、ウイルスRNAの非構造蛋白質(P125)コード領域における宿主細胞由来mRNAのBVDウイルスRNAへのインサージョンの動向について検討した。純化NADL株から分離されたNCPウイルスNADLE<sup>-</sup>及びNADLE<sup>+</sup>株の塩基配列には、NADL株にある宿主細胞由来mRNA (270 bp) がそのまま完全に欠損していた。また、純化Osloss株と分離したNCPウイルスのベアーでは、Osloss株に認められた宿主細胞由来mRNA (228 bp) が、NCPウイルスOslossE<sup>-</sup>及びOslossE<sup>+</sup>ではそのまま完全に欠損していた。以上の遺伝子解析の結果、親株のCPウイルスに認められた宿主細胞由来mRNAのインサージョンが、NCPウイルスには欠損していることが明らかとなった。即ち、CPウイルスに取り込まれている異種RNAの脱落によってCPバイオタイプからNCPバイオタイプに復帰変異することが証明された。

## 2. 序文

BVDウイルスにはCPとNCPウイルスの2つのバイオタイプが存在する。CPウイルスとNCPウイルスの関連については不明な点が多いが、粘膜病はCPウイルスとNCPウイルスの2つのバイオタイプの関わり合いにより起こることが明らかとなってきた(2,5,8,74)。即ち、妊娠のあるステージでNCPウイルスが母牛に感染した場合、ウイルスは経胎盤感染し、新生牛はNCPウイルスが感染した持続感染牛となる。この持続感染牛は免疫寛容に陥り易く、当該ウイルスに対する抗体を産生しない。この持続感染牛にCPウイルスが重感染(出現)した場合に粘膜病が起こるといわれている。このCPウイルスの起源については、NCPウイルスが増殖の過程で宿主細胞由来のmRNAをNCPウイルスRNAの非構造蛋白質(p125)コード領域に取り込み、CPウイルスに変異するという仮説が提唱されている(52-54,56,)。これらの現象が粘膜病の発病における鍵を握っていると考えられる。

近年、NADL株(10,13)及びOsloss株(67,68)のCPウイルス2株の全塩基配列が決定され、その遺伝子配列の研究から、これらCPウイルスRNAの非構造蛋白質(p125)コード領域にインサクションがあることが明らかにされた(12,14)。NADL株のインサクション部分は、機能は不明であるが牛の細胞由来mRNAと高い相同性を示し(14)、また、Osloss株のp125コード領域には、ユビキチン遺伝子のインサクションがある(52,54)ことから、持続感染牛の体内で宿主細胞由来mRNAとNCP BVDウイルスとの間でリコンビネーションが起こりCPウイルスに変異するという仮説が提唱されている(52-57)。しかしながら、BVDウイルスゲノム中にインサクションの認められないCPウイルスが存在すること(16,19,29,66)など、この仮説はBVDウイルスの細胞病原性を完璧に説明することはできていない。

一方、第1章の結果からCPウイルスストック中に性状の異なるNCPウイルスが混在していることが判明し、CPウイルスからNCPウイルスへの変異の可能性が示唆された。そこで、これらNCPウイルスの起源を知るために、Nose株及びNADL株を限界希釈法及びブラック法によりクローニングを行い、各ステップ毎のサンプルについてNCPウイルスの検出を試みた。更に、CPウイルスからNCPウイルス



への復帰変異と宿主細胞由来mRNAの関連を知る目的で、純化NADL株及びOslloss株とこれらCPウイルスから分離した真に親子関係にあるNCPウイルスのペアーウイルスを用い宿主細胞由来mRNAのBVDウイルスRNAへのインサージョンの動向について検討した。

### 3. 材料と方法

培養細胞： 第1章と同様のB T細胞及び培養液を用いた。

ウイルス： Nose株、NADL株及びOsloss株のCP BVDウイルス、NDV宮寺株及びVSV New Jersey Serotypeを用いた。

BVDウイルスの定量法： 第1章記載と同様の方法により行った。

細胞病原性ウイルスのクローニング： 維持用培養液で10倍階段希釈したCPウイルス液の0.1mlずつを各希釈毎に4本のB T細胞浮遊液0.5mlを含む試験管に接種した。37℃で5日間培養した後、CPEを観察しCPEが発現した最高希釈の培養上清を回収した。その上清は新たに準備したB T細胞浮遊液を含む試験管に接種した。この限界希釈法で3回のクローニングを繰り返した。更に、純粋なウイルスを得るためにブラック法による純化を行った。最高希釈で形成された1個のブラックを注意深く拾い1mlの維持用培養液に浮遊させ、これを希釈後新しいB T細胞に接種した。この方法で3回のブラック純化を繰り返した(図2-1)。各クローニングのステップ毎のサンプルは-80℃に保存し、C P及びNCP BVDウイルスの検出を行った。

純化CP BVDウイルスストックからのNCP BVDウイルスの分離： 第1章で記載した方法、つまり重感染ウイルスにCP BVDウイルスNose株またはVSVを用いたRPF法により行った。

RNAの抽出： ウイルスRNAの抽出は、BVDウイルスを感染させたB T細胞の培養上清からグアニジン-フェノール-クロロホルム法(9)により行った。抽出されたRNAはエタノール沈澱後、変性を防ぐため0.2% ジエチルポリカーボネート処理水に溶解した。

プライマー： プライマーはフォスホアミダイト法によりABI DNA synthesizer (Applied Biosystems, USA)で合成した。プライマーは既報のNADL株 (13) 及びOsloss株 (67,68) の塩基配列を基に、非構造蛋白質のp 125コード領域の宿主細胞由来mRNAのインサクション部分を挟むように設計した。また、ベスチウイルスに広く保存されている5'側の非翻訳領域についても作製した(17)。作製したプライマーを表2-1に示した。

RT-PCR法： RT-PCR法は、DNA Thermal CyclerとGeneAmp RNA Kit (Perkin-Elmer Cetus, USA)を用い、マニュアルに従い実施した(71)。RT-PCR産物は、2%アガロースゲルで電気泳動を行った。

塩基配列の決定： RT-PCR産物は、電気泳動後アガロースゲルから回収し、*Pst* Iで切断したpGEM 3Z (Promega, USA)ベクタープラスミドにクローニングした。塩基配列の決定はSequenase version 2.0 (東洋紡)を用いたダイデオキシ法により行った。塩基配列のコンピューター解析はDNASIS software (日立)により行った。

#### 4. 実験結果

##### (1) CP BVDウイルスのクローニング試験

第1章でCP BVDウイルスストック中にNCP BVDウイルスが含まれていることが明らかとなった。そのNCP BVDウイルスの起源を知る目的でCP BVDウイルスのクローニングを行った。CP BVDウイルスのクローニングは連続して合計6回行った(図2-1)。CP BVDウイルスのNose株及びNADL株は、まず試験管を用いた限界希釈法で3回クローニングを行い、更にブラック法により3回純化を行った。

Nose株及びNADL株のクローニング段階サンプルのブラック法によるウイルス価の比較を表2-2及び表2-3に示した。限界希釈を3回終了したサンプルのウイルス価は、Nose株が  $2.2 \times 10^5$  PFU/0.2ml、NADL株では  $1.8 \times 10^5$  PFU/0.2mlであった。ブラック法により得た1個のブラック中のウイルス価は、両株とも0.2ml当たり $10^3$ 代であった。合計6回のクローニング終了後BT細胞で1回増殖させて得たウイルスストック(Nose BT-1及びNADL BT-1)のウイルス価は、約 $10^7$  PFU/0.2mlであった。

##### (2) 純化CP BVDウイルスからのNCP BVDウイルスの検出及び分離

Nose株及びNADL株のクローニング段階のサンプル中にNCP BVDウイルスが存在するか否かをNose-RPF法及びVSV-RPF法により調べた。限界希釈法を3回終了したNose株では、Nose-RPF法によりNCP BVDウイルスが検出された。NCP BVDウイルスのウイルス価は、CP BVDウイルスのウイルス価より約100倍低かった(表2-2)。第1回目と第2回目のブラック純化では、1個のブラック中にはCPウイルスの他Nose-RPF法及びVSV-RPF法によりNCPウイルスが検出された。このときのNCPウイルスのウイルス価はCPウイルスのそれより約100倍低かった。第3回目のブラック純化では、Nose-RPF法のみでNCP BVDウイルスが検出された。合計6回のクローニングにより得た純化ウイルスをBT細胞で1回増殖させウ

イルスストックを作り、Nose BT-1とした。このNose BT-1ウイルスストックから、Nose-RPF法及びVSV-RPF法により再びNCPウイルスが検出され、これらのウイルス価はCPウイルスのそれに比べ約100または1000倍低かった。

NADL株のクローニング段階のサンプル中のNCP BVDウイルスの検出の結果は表2-3に示した。限界希釈法を3回終了したNADL株では、Nose-RPF法及びVSV-RPF法によりNCP BVDウイルスが検出され、これらのウイルス価はCPウイルスに比べ約100または1000倍低かった。しかしながら、ブラック純化の過程ではNCP BVDウイルスは検出されなかった。合計6回のクローニングにより得た純化ウイルスをBT細胞で1回増殖させウイルスストックを作り、NADL BT-1とした。このNADL BT-1ウイルスストックには、Nose-RPF法及びVSV-RPF法によりNCPウイルスが再び検出され、これらのウイルス価はCPウイルスのそれに比べ約100または500倍低かった。

純化ウイルス3株(Nose、NADL、Osloss株)をBT細胞で1回継代し作製したウイルスストックから第1章に述べた方法により新たにNCP BVDウイルスを分離した。3株のウイルスからそれぞれEND現象陽性とEND現象陰性の2種類のウイルスが分離された。これら分離ウイルスのウイルス生物学的性状は、END現象陽性株は同種干渉、END現象陰性株は同種及び異種干渉を示し、クローニング前のCP BVDウイルスストックから分離したウイルス(第1章の結果)と性状は全く同じであった。

新たに分離したEND現象陽性ウイルスは、NoseE<sup>+</sup>、NADLE<sup>+</sup>、OslossE<sup>+</sup>、END現象陰性ウイルスは、NoseE<sup>-</sup>、NADLE<sup>-</sup>、OslossE<sup>-</sup>株と命名した。

### (3) 純化CP BVDウイルスの無希釈継代によるCPE発現への影響

限界希釈法及びブラック法により純化したNose株から作製したNose BT-1ウイルスストックを単層BT細胞に接種し、5日目に培養上清を回収した。その上清を無希釈のまま新しいBT細胞に接種し5日目に培養上清を回収する方法によりウイルス継代を6代目まで繰り返して、CPEの発現を観察するとともにCP及びNCPウイルスの定量を行った。

CP BVDウイルスNose株はBT培養細胞で無希釈継代を重ねるとCPEを示さなくなるという現象が認められた。継代4代目まではNose株の明瞭なCPEが観察されたが、5代目以降CPEは不明瞭となった(表2-4)。各継代毎のウイルスをCPE法、ブラック法、Nose-RPF法及びVSV-RPF法によりウイルス価を測定した。CPE法による定量では、 $10^{5.3}$ から $10^{5.6}$  TCID<sub>50</sub>/0.1mlのウイルス価であったが、CPEが不明瞭となった5及び6代目のサンプルではウイルスのタイトレーション・パターンにゾーン現象が見られた(表2-5)。つまり、低希釈域ではCPEが認められないにもかかわらず、高希釈域ではNose株の明瞭なCPEが観察された。また、ブラック法による定量でも5及び6代目のサンプルではゾーン現象が見られた。NCPウイルスは、Nose-RPF法及びVSV-RPF法により各サンプルで検出され、継代が進むに従いNCPウイルスの含有率が高くなる傾向が認められた(表2-4)。

#### (4) RT-PCR法による宿主細胞由来mRNA遺伝子の検索

BVDウイルスゲノム中の宿主細胞由来mRNAの存在を調べるために純化CP BVDウイルスと真に親子関係にあるNCP BVDウイルスの2組のペアウイルスを用い、宿主細胞由来mRNAのインサクション周辺領域をRT-PCR法により増幅した。宿主細胞由来mRNAを広く挟むプライマー#1/#4を用いNADL、NADLE<sup>+</sup>及びNADLE<sup>-</sup>株を増幅した(図2-2)。NADL株では、#1/#4のプライマーの組み合わせからは塩基配列の4833から5440番目の608塩基対(bp)のフラグメントが増幅される。NADL株では予想された大きさのバンドが観察された(図2-2、レーン2)が、NADLE<sup>+</sup>及びNADLE<sup>-</sup>株(図2-2、レーン3、4)ではNADL株に比べ分子量の小さなバンドが観察された。更に、宿主細胞由来mRNAを狭く挟むプライマー(NL1とNL2)とRT-PCR産物を用いnested PCRを行った。特異的な増幅は、NADL株のRT-PCR産物のみで観察された(図2-3、レーン2)。

一方、Osloss、OslossE<sup>+</sup>及びOslossE<sup>-</sup>株をプライマー#05/#06で増幅させたところOsloss株は予想された大きさ(542bp)のバンドが確認された(図2-4、レーン2)が、OslossE<sup>+</sup>及びOslossE<sup>-</sup>株ではOsloss株に比べ分子量の小さなバ



ンドが認められた(図2-4、レーン3及び4)。

BVDウイルスでよく保存されている5' 非翻訳領域のプライマー#7/#8の組み合わせを用いたRT-PCRでは、全ての6株とも同じ大きさのバンドが観察された(図2-5 A, B)。BVDウイルス非接種B T細胞の培養上清から抽出したRNAを用い同様にRT-PCRを行ったが、バンドは全く観察されなかった。

#### (5) 宿主細胞由来mRNAを挟む領域の塩基配列及びアミノ酸残基の比較

ブラック純化したCPウイルス(NADL株、Osloss株)及びCPウイルスと真に親子関係にあるNCPウイルス(NADLE<sup>+</sup>、NADLE<sup>-</sup>、OslossE<sup>+</sup>、OslossE<sup>-</sup>)のウイルスRNAを鋳型としてRT-PCR法により増幅された宿主細胞由来mRNAを挟む領域のcDNAをシークエンスのためにpGEM 3Zプラスミドベクターにサブクローニングした。各クローンの塩基配列を決定し、既に報告されているNADL株(NADL pb)及びOsloss株(Osloss pb)のシークエンスと比較した。

Collettら(13)により報告されているオリジナルのNADL株のシークエンス(NADL pb)とブラック純化したNADL株(NADL cl)、NADLE<sup>+</sup>株、NADLE<sup>-</sup>株の塩基配列の比較を図2-6に示した。ブラック純化NADL株の塩基配列は報告されているものと完全に一致した。しかし、NADLE<sup>+</sup>及びNADLE<sup>-</sup>株の塩基配列には、NADL株にある宿主細胞由来mRNA(270 bp、5' ATGTGC.....CGGATG3')がそのまま完全に脱落していた。NADLE<sup>+</sup>株とNADLE<sup>-</sup>株の塩基配列は全く同じであったが、NADL株との比較では、上記欠損の他宿主細胞由来mRNAのインサクション周辺領域に少数の塩基の違いが認められた。

NADL株のアミノ酸残基を図2-7に示した。NADLE<sup>+</sup>株とNADLE<sup>-</sup>株のアミノ酸残基はNADL株とは2ヶ所で異なり、1534番目がフェニルアラニン(F)からチロシン(Y)に、1651番目がバリン(V)からイソロイシン(I)にそれぞれ置換していた。

Renardら(67,68)により報告されているオリジナルのOsloss株のシークエンス(Osloss pb)とブラック純化Osloss株(Osloss cl)、OslossE<sup>+</sup>株、OslossE<sup>-</sup>株の塩基配列の比較を図2-8に示した。ブラック純化Osloss株の塩基配列は、



オリジナルのOsloss株と1塩基(5314番目がTからAへ)の置換を除き既報のOsloss株と一致していた。OslossE<sup>+</sup>株とOslossE<sup>-</sup>株との塩基配列は全く同じであったが、Osloss株にある宿主細胞由来mRNA(228 bp、5' ATGCAG.....GGTAGT 3')がそのまま完全に脱落していた。また、Osloss株との塩基配列の相違が散見された。

Osloss株のアミノ酸残基を図2-9に示した。ブラック純化Osloss株のアミノ酸残基は、ユビキチンをコードする遺伝子領域でセリン(S)からトレオニン(T)に置換した1ヶ所が既報のOsloss株と異なっていた。OslossE<sup>+</sup>株とOslossE<sup>-</sup>株のアミノ酸残基は同一であったが、Osloss株とはユビキチン遺伝子の脱落の他4ヶ所で置換が認められた。

## 5. 考察

BVDウイルスは、CPウイルスとNCPウイルスの2つのバイオタイプに分けられる。NCPウイルスは、そのウイルス干渉性により更に2つのグループに分けられる。つまり、同種干渉だけを起こすグループと同種及び異種干渉を起こすグループである。END現象の発現の有無からみると、前者はEND現象陽性( $E^+$ )であり、後者はEND現象陰性( $E^-$ )である。Intrinsicな干渉(23)に基づくRPF法の攻撃ウイルスを変えることにより異なるNCPウイルスの検出が可能である。攻撃ウイルスにCPウイルスであるNose株を用いる場合(NCPウイルスに対しては同種ウイルス)リバースブラックは、 $E^+$ 及び $E^-$  NCPウイルスにより形成される。しかし、VSVを攻撃ウイルスとして用いた場合(NCPウイルスに対しては異種ウイルス)リバースブラックは、 $E^-$  NCPウイルスのみにより形成される。

第1章の結果から未純化CPウイルスストック中に性状の異なるNCPウイルスが混在していることが判明し、CPウイルスからNCPウイルスへの変異の可能性が示唆された。これらNCPウイルスの起源を知るために、Nose株及びNADL株を限界希釈法及びブラック法によりクローニングを行い、各ステップ毎のサンプルについてNCPウイルスを検出した。Nose株では3回の限界希釈法の終了時点ではNose-RPF法によりNCPウイルスが検出された。ブラック純化ではCPウイルスによって形成された1個のブラック中にもCPウイルスのみならずNCPウイルスも同時に検出された。NADL株では、限界希釈法によるクローニングを3回行ってもNCPウイルスが検出された。ブラック純化では3回ともNCPウイルスは検出されなかったにもかかわらず、NCPウイルスが検出されなかった純化ウイルスをBT細胞で1回増殖させると再びNose-RPF法及びVSV-RPF法によりNCPウイルスが検出された。これらのことから、ブラック純化CPウイルスからも増殖の過程で微量のNCPウイルスが産生されることが証明された。

各クローニングの段階でCPウイルスは、通常のブラック法で多数を占めるCPウイルスの検出を行い、RPF法により少数のNCPウイルス検出を行っており、もし少数のNCPウイルスの検出と分離法がなかったなら、この現象が真実の現象であることを証明することはできなかった。

一方、今回分離されたNCPウイルスは、第一章の考察で述べたように、B T細胞またはFBSからの汚染ではないものと考えられる。Liessら (48) は、CPウイルスのクローニングを試みたが、限界希釈法ではNCPウイルスを除くことが出来ず、また、ブラック法でも純粋なCPウイルスとは保証できないと述べている。更に、ブラッククローニングしたCPウイルスインディアナ「Gillette」株にも免疫ブラック法によりNCPパイオタイプウイルスが検出されることが報告されている (34)。これらの結果は、NCPウイルスは、CPウイルスの子孫として低率に産生されることを支持する現象と思われる。

また、純化Nose株を無希釈で5代継代することによりCPEが発現しなくなる現象が見られた。経験的にもCPウイルスを培養細胞で継代を重ねるとCPEを示さなくなるという現象がある。これらの現象は、継代する度にCPパイオタイプからNCPパイオタイプへの変異が起こり続け、両者の構成比が次第にNCPパイオタイプが優位になり、CPパイオタイプを干渉するためと考えられた。純化Nose株を培養細胞で無希釈継代を重ねると継代に従いCPウイルスに対するNCPウイルスの占める割合が高くなる傾向が認められたこと及びタイトレーション・パターンにゾーン現象が観察されたことは、この考えを支持するものと思われる。

ここで、なぜNCPウイルスはCPウイルスから産生されるかという疑問がある。この疑問を解くために、NADL株及びOsloss株のウイルスゲノムのp125コード領域に取り込まれている宿主細胞由来mRNAに注目した。6回のクローニングにより純化したNADL株及びOsloss株からNCPウイルスを分離し、真に親子関係にあるCPウイルスとNCPウイルスのペアウイルスを得た。このペアウイルスのp125コード領域をRT-PCR法及び塩基配列の比較により解析した。その結果、NADL株及びOsloss株に認められた宿主細胞由来mRNAのインサージョンは、分離されたNCPウイルス (END現象陽性及び陰性株) から脱落していることが確認された。このことから、NADL株及びOsloss株のCPウイルスは、その増殖に伴いウイルスRNAに取り込まれている宿主細胞由来mRNAが脱落することによってCPパイオタイプからNCPパイオタイプに復帰変異するものと考えられた。

NADL株とOsloss株の全塩基配列は決定され、ウイルスゲノムの大きさは12.5

Kbであることが確認されている(13,67,68)。これら塩基配列を他のバスタウウイルスと比較すると、NADL株とOsloss株にはそれぞれ270と228 bpの宿主細胞由来mRNAのインサクションが確認されている(14,52-54)。両株のインサクションの塩基配列またはアミノ酸残基に類似性はない。NADL株のインサクションの塩基配列は、機能不明の宿主細胞由来mRNAと99%の相同性を示し(14)、Osloss株のインサクションの塩基配列は、ユビキチン様蛋白質に一致する遺伝子であることが同定されている(52)。純化NADL株のアミノ酸残基は、既報と全く同一であったが、純化Osloss株ではユビキチン遺伝子領域で既報とアミノ酸残基が1ヶ所異なっていた。Osloss株に取り込まれているユビキチン遺伝子は動物ユビキチン遺伝子とアミノ酸残基が2ヶ所異なることが報告されている(53)。今回の実験結果では、そのうち1ヶ所は、動物ユビキチンの遺伝子(・・・GRTLS・・・)と比較すると既報(・・・GRSLS・・・)とは異なり純化Osloss株(・・・GRTLS・・・)のアミノ酸残基は動物ユビキチン遺伝子と一致していた。BVDウイルスによる粘膜病は、野外のNCPウイルス持続感染牛(免疫寛容状態)にのみ発生し、CPウイルスはこれらの粘膜病を発症した牛からのみ分離される。また、隔離飼育されていた持続感染牛が自然発生的に粘膜病を発症し、CPウイルスが分離されている(30)。このCPウイルスの起源については、NCPウイルスが宿主細胞由来mRNAをウイルスRNA中に取り込むことによってCPウイルスに変異するという仮説が提唱されている(52-57)。

今回の実験では、CPウイルスの増殖に伴い常に微量のNCPウイルスが産生されることを明らかにし、提唱されている仮説について宿主由来mRNAの動向から逆説的にCPウイルスがNCPウイルスに復帰変異する現象について証明した。しかし、NADL株やOsloss株のようにp125コード領域に外来RNAの存在が明らかとなっている株(66,80)もあるが、すべてのCP BVDウイルスで外来RNAの存在が報告されているわけではない。BVDウイルスゲノム中にインサクションの認められないCPウイルス(16,19,29,66,85)の他、p125コード領域における遺伝子の重複やインサクションと重複(22,56-58,66,70)が見られるウイルスの存在など、この仮説はBVDウイルスの細胞病原性を完璧に説明することはできていない。それ故、このインサクションがバイオタイプを決定する唯一のメカニズムではないと思

われる。このメカニズムを解明するためには、今後、感染性ウイルスcDNAを用いたリバーシジェネティックの手法を用いNCPウイルスのcDNAへ直接宿主由来mRNAを挿入し、細胞病原性との係わりを検討する必要があると思われる。



## 1. 要旨

NCP BVDウイルス感染B T細胞に7種類のオルビウイルスを重感染させたところ、全てのウイルスがC P Eを発現するとともにBVDウイルス非感染B T細胞に比べウイルスの増殖が100倍以上増強された。NCP BVDウイルス10株のうちEND現象陽性の7株はイバラキウイルスのC P Eを発現し、増殖を増強したが、END現象陰性の3株ではイバラキウイルスの増殖は抑制されるとともに、C P Eも観察されなかった。更に、END現象陽性BVDウイルスを感染させたB T細胞では、BVDウイルス非感染B T細胞に比べイバラキウイルスによるインターフェロンの産生が抑制されていた。以上のことから、END現象陽性NCP BVDウイルスはB T細胞においてオルビウイルスの増殖を増強することが明らかとなり、この増殖増強作用は、重感染ウイルスによるインターフェロンの産生をBVDウイルスが抑制することによることが示唆された。



## 2. 序文

BVDウイルスには、培養細胞に対するCPE発現の有無によりCPとNCPの2種類のバイオタイプが存在する。NCP BVDウイルス感染BT細胞にNDVを重感染させると、NDVのみでは認められなかったNDVのCPEが観察されることが報告されている(38,39,65)。この現象は、BVDウイルス感染BT細胞においてNDVの増殖が増強されることにより起こるものと考えられており、豚コレラウイルスの場合と同じようにEND現象またはBEND現象と呼ばれている(38,39)。END現象は、BVDウイルスの生物学的性状の1つとなっており、この現象を指標にNCP BVDウイルスはEND現象陽性(38,39)と陰性(42)の2種類のグループに分けられている。このようなベスチウイルスによる重感染ウイルスの増殖増強作用は、パラミキソウイルス属に分類されるNDV及び牛パラインフルエンザ3型ウイルス(1)以外他のウイルスに関する報告は無い。そこで、著者らが分離したNCP BVDウイルスとオルビウイルスとの培養細胞における相互作用を知る目的で、NCP BVDウイルスを感染させたBT細胞にオルビウイルスを重感染させCPEの発現及び増殖性について検討した。

### 3. 材料と方法

ウイルス： NCP BVDウイルスは、第1章及び第2章に記載した方法で分離した6株 (NoseE<sup>+</sup>、NoseE<sup>-</sup>、KS86(+)<sup>+</sup>END<sup>+</sup>、KS86(+)<sup>-</sup>END<sup>-</sup>、OslossE<sup>+</sup>、OslossE<sup>-</sup>) 及び既知のNo.12-43 (ワクチン株)、関東東山、New York-1、Indiana-46株の計10株を用いた。

オルビウイルスは、アフリカ馬疫ウイルス血清型4 (AHSV-4)、ブルータンダウイルス血清型10 (BTV-10)、流行性出血病ウイルス血清型1・New Jersey株 (EHDV-1)、流行性出血病ウイルス血清型2・Alberta株 (EHDV-2)、カスバウイルス・K-47株 (43,60)、イバラキウイルスNo.2株 (64) 及びカワナベウイルス (59) の合計7種類を用いた。

培養細胞： 培養細胞は、B T、HmLu-1、Vero及びMDBK細胞を用いた。増殖用及び維持用培養液は、第1章と同様の培養液を用いた。

NCP BVDウイルスの定量法： 第1章に記載した干渉法により行った。

オルビウイルスの定量： オルビウイルスの定量は、CPE法により行った。カスバウイルス及びイバラキウイルスにはHmLu-1細胞、他のオルビウイルスにはVero細胞を96ウェルプレートに培養し、維持用培養液で10倍階段希釈したウイルス液の0.05mlずつを各希釈毎に4ウェルずつ接種した。37°Cで1時間吸着後維持培養液を0.1mlずつ加え、37°Cの5%炭酸ガス培養器で7日間培養し、CPEが出現したウェルを陽性としてTCID<sub>50</sub>を算出し、ウイルス価を算出した。

インターフェロンの定量： インターフェロンの定量はVSVを用いた50%ブラック減少法により行った (72)。つまり、直径10cmのシャーレに培養上清4mlを入れ5cmの距離から10分間紫外線照射を行ったものを試料とした。6ウェルプレートに単層を形成したB T細胞に維持用培養液で2倍階段希釈した試料の2mlずつを接種し、37°Cで24時間培養した。試料を除去後、VSVを約50PFU/0.1

mlに調製し、その0.1mlを接種した。ウイルス対照には無処置のB T細胞を用いて同様に接種した。37°Cで1時間吸着後ウイルス液を除去し、3mlの1.2%のメチルセルロースを含む維持用培養液を加えて37°Cの5%炭酸ガス培養器で2日間培養した。培養終了後にメチルアルコールで固定後0.2%クリスタルバイオレット液で染色しVSVのブラック数を算定した。力価は、ウイルス対照に出現したブラックの平均値の50%以下のブラックが出現した試料の最高希釈倍数の逆数で表した。

インターフェロンの定性：超遠心試験は培養上清をベックマンSW27で100,000×g、3時間遠心し、その上清部分の力価を測定した。

透析膜通過性試験は試料を透析膜に入れ、PBS (pH7.2) に対し4°Cで48時間透析し、力価を測定した。

酸処理試験は試料を透析膜に入れ、KC1-HC1液 (pH2.0) に対し4°Cで24時間透析した。その後PBS (pH7.2) に対し4°Cで24時間透析してから、力価を測定した。

トリプシン処理試験は、最終濃度が1mg/mlとなるようにトリプシン液を加え、37°Cで1時間感作した。その後ソイビーン・トリプシンインヒビターを加えてから、力価を測定した。

熱処理試験は試料を56°Cで30分間ウォーターバス中で感作した。その後直ちに氷水中で冷却してから、力価を測定した。

種特異性試験は、B T細胞の他にMDBK及びHmLu-1細胞を用い力価を測定した。

免疫血清：第1章で記載した抗BVDウイルスNose株免疫家兔血清を用いた。

#### 4. 実験結果

##### (1) NCP BVDウイルス感染B T細胞におけるオルビウイルス増殖増強作用

オルビウイルスの増殖とC P Eの発現を調べるために、NCP BVDウイルス感染及び非感染B T細胞に7種類のオルビウイルスを接種した。B T細胞浮遊液にEND現象陽性株であるNCP BVDウイルスNo.12-43株を $10^3$ TCID<sub>50</sub>/mlとなるように接種した。37°Cで3日間培養した後、培養液を除去し、 $10^3$ TCID<sub>50</sub>のオルビウイルスを接種し、37°Cで1時間吸着後接種材料を除去した。維持培地を加え37°Cで7日間培養し、C P Eの出現の有無とそのウイルス価を測定した。なお、オルビウイルスのウイルス価の測定には、C P Eの極期の培養上清に抗BVDウイルス免疫血清を加え、37°Cで1時間中和したものを用いた。NCP BVDウイルスを感染させたB T細胞では、オルビウイルスの増殖の増強が観察された(表3-1)。BVDウイルス感染B T細胞におけるオルビウイルスのウイルス価は、BVDウイルス非感染B T細胞における増殖に比べ100倍以上高い価であった。また、BVDウイルス感染B T細胞にオルビウイルスを重感染させると4日から7日目までに明瞭なC P Eが発現した。一方、BVDウイルス非感染B T細胞にオルビウイルスを感染させた場合は、流行性出血熱ウイルス2型のごく弱いC P Eが観察されたのみであった。

##### (2) 各種NCP BVDウイルスのイバラキウイルス増殖増強作用

上記の結果から、各種NCP BVDウイルスのイバラキウイルスの増殖に与える影響について検討した。B T細胞浮遊液に著者らが分離したNCP BVDウイルス及び既知のNCP BVDウイルスを $10^3$ TCID<sub>50</sub>/mlとなるように接種した。37°Cで4日間培養した後、培養液を除去し、 $10^2$ TCID<sub>50</sub>のイバラキウイルスを接種し、37°Cで1時間吸着後接種材料を除去した。維持用培地を加え37°Cで7日間培養し、C P Eの出現の有無とそのウイルス価を測定した。なお、イバラキウイルスのウイルス価の測定には、C P Eの極期の培養上清に抗BVDウイルスNose株免疫血清を加

え、37°Cで1時間中和したものを用いた。10株のNCP BVDウイルスについて、それぞれウイルス感染B T細胞におけるイバラキウイルスの増殖増強作用を調べた。結果は表3-2に示した。イバラキウイルスのウイルス価は、END現象陽性の6株 (NoseE<sup>+</sup>、KS86(+)+END<sup>+</sup>、OslossE<sup>+</sup>、No.12-43、New York-1及び関東東山) のウイルスを感染させたB T細胞では、BVDウイルス非感染B T細胞における増殖に比べ100倍以上高い価であった。この増殖増強に伴い明瞭なCPEが発現した。一方、Indiana-46株感染B T細胞では、対照細胞に比べウイルス価が10倍高く、弱いCPEが観察された。対照的にEND現象陰性の3株 (NoseE<sup>-</sup>、KS86(+)+END<sup>-</sup>及びOslossE<sup>-</sup>) 感染B T細胞においては、イバラキウイルスの増殖は完全に抑制され、CPEも観察されなかった。

### (3) END現象陽性及び陰性NCP BVDウイルス感染B T細胞におけるイバラキウイルスの増殖曲線

B T細胞浮遊液に $10^3$ TCID<sub>50</sub>/mlとなるようにNoseE<sup>+</sup>、NoseE<sup>-</sup>、OslossE<sup>+</sup>及びOslossE<sup>-</sup>をそれぞれ接種し、37°Cで4日間培養したB T細胞にイバラキウイルスをM.O.I. 0.001で重感染させ経日的にCPEの出現の有無とそのウイルス価を測定した。なお、イバラキウイルスのウイルス価の測定には、培養上清に抗BVDウイルス免疫血清を加え、37°Cで1時間中和したものを用いた。

NoseE<sup>+</sup>及びOslossE<sup>+</sup>のEND現象陽性ウイルスを感染させたB T細胞では、イバラキウイルスを重感染後4日目にそれぞれの増殖は最高になり、そのウイルス価は $10^{5.76}$ 及び $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/0.05mlとなった(図3-1)。CPEは重感染後3日目から発現し、5日目には100%となった。BVDウイルス非感染対照B T細胞におけるイバラキウイルスの増殖は、2日目まではEND陽性株感染B T細胞と同様に推移したが、以後プラトーとなり5日目までCPEは観察されなかった。NoseE<sup>-</sup>及びOslossE<sup>-</sup>のEND現象陰性ウイルスを感染させた細胞では、観察期間中イバラキウイルスは検出されず、CPEも観察されなかった。

#### (4) BVDウイルス感染B T細胞におけるイバラキウイルスによるインターフェロンの誘導

BVDウイルスのイバラキウイルスの増殖増強作用のメカニズムを解明するために、BVDウイルス感染B T細胞におけるイバラキウイルスによるインターフェロンの産生について調べた。イバラキウイルスにより誘導されたインターフェロンの物理化学的性状を表3-3に示した。超遠心、酸(pH 2)及び熱(56°C、30分)処理に対し安定であったが、トリブシン処理により失活した。同じ牛由来細胞であるMDBK細胞よりB T細胞でその活性は高かった。ハムスター肺由来細胞であるHmLu-1細胞では活性を示さなかった。

NCP BVDウイルスOslossE株を $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>/mlとなるように接種したB T細胞では、OslossE株接種後4日目(イバラキウイルス重感染時)には既にインターフェロンが産生され、256単位/2 mlに達していた(表3-4)。一方、OslossE<sup>+</sup>接種細胞及びBVDウイルス非感染対照細胞では、インターフェロンは産生されていなかった。BVDウイルス非感染対照細胞では、イバラキウイルス接種後2日目からインターフェロンの産生が始まり、3日目には最高の512単位/2 mlまで上昇した。OslossE<sup>+</sup>株接種B T細胞では、イバラキウイルス重感染後3日目に初めて32単位/2 ml検出され、その後漸増し5日目になって256単位/2 mlまで上昇した。



## 5. 考察

培養細胞におけるウイルスの相互作用に関しては、多くの報告がある(23,50)。一般的には、異なる2種類のウイルスが同じ感受性細胞に感染した時、①両者が感染する場合、②1種類のウイルスが他のウイルスの増殖を干渉する場合、③1種類のウイルスが他のウイルスの増殖を増強する場合がある。Kumagaiら(45)は、バスタウイルスに属する豚コレラウイルスが感染した豚精巣培養細胞でNDVの増殖が増強されることを初めて報告した。豚コレラウイルスは、風疹ウイルスの増殖も増強することが明らかにされている(78)。また、Inabaら(39)は、NCP BVDウイルスが感染したB T細胞及び牛腎臓培養細胞にNDVを重感染させると、NDVのCPEが明瞭に現れることを報告している。

今回の実験からNCP BVDウイルスを前もって感染させたB T細胞においてオルビウイルスの増殖が増強されることが明らかとなった。BVDウイルス非感染B T細胞では、オルビウイルスのCPEは出現しないか、またはごく弱い、BVDウイルス感染B T細胞では明瞭なCPEが出現した。このオルビウイルスの増殖増強作用とCPEの発現は、BVDウイルスのうちEND現象陽性のウイルスにのみ誘導された。対照的に、END現象陰性のウイルスが感染したB T細胞では、オルビウイルスを重感染させた後でもCPEは観察されず、オルビウイルスの増殖は干渉された。NCP BVDウイルスIndiana-46株を感染させたB T細胞にイバラキウイルスを重感染させた場合、CPEも弱く、その増殖は僅かに増強されるだけであった。BVDウイルスストックには、しばしばEND現象陰性のウイルスが含まれることが報告されていることから、実験に用いたIndiana-46株中にもEND現象陰性のウイルスが存在し、このような現象が現れた可能性が考えられた。BVDウイルスとオルビウイルスの相互作用は、非常に興味深いものである。あるBVDウイルス株はオルビウイルスの増殖を増強する、一方、他の株ではオルビウイルスを干渉した。END現象陽性ウイルスは、CP BVDウイルスのみを干渉するのに対し、END現象陰性ウイルスは、CP BVDウイルスに加えVSVも干渉することが知られている(第一章)。今回更に、END現象陰性ウイルスは、オルビウイルスを完全に干渉し、広くヘテロ干渉を起こすことが明らかになった。



END現象は、NDVによるインターフェロンの誘導を豚コレラウイルスが抑制するメカニズムまたはインターフェロンとは関係ないがアクチノマイシンDに感受性のメカニズムの2種類のメカニズムにより起こることが報告されている(83,84)。Diderholm & Dinter (20) は、牛腎培養細胞にNDVを感染させるとインターフェロンが産生されるが、BVDウイルスを感染させてもインターフェロンは産生されず、更にBVDウイルスとNDVを同時に感染させてもインターフェロンは産生されないことを報告している。B T細胞にイバラキウイルスが感染するとインターフェロンが産生され、その物理化学性状は一般的なインターフェロンの性状とよく一致していた。OslossE<sup>+</sup>株はインターフェロンを誘導するが、OslossE<sup>+</sup>株は誘導しないことを明らかにした。また、B T細胞にイバラキウイルスを感染させると高力価のインターフェロンが誘導されるが、OslossE<sup>+</sup>株に感染しているB T細胞にイバラキウイルスを重感染させるとインターフェロンの産生が抑制された。B T細胞ではイバラキウイルスが感染するとインターフェロンが産生され、そのインターフェロンによりイバラキウイルスの増殖が抑制されるものと思われる。従って、OslossE<sup>+</sup>株は、イバラキウイルスによるインターフェロンの産生を抑制することによりイバラキウイルスの増殖とCPEの発現が亢進したものと思われる。

以上のことから、END現象陽性NCP BVDウイルスはB T細胞においてオルビウイルスの増殖を増強することが明らかとなり、この増殖増強作用は、重感染ウイルスによるインターフェロンの産生をBVDウイルスが抑制することによることが明らかとなった。また、END現象陰性NCP BVDウイルスは、オルビウイルスを干渉することが明らかとなった。

## 総 括

牛ウイルス性下痢ウイルスの細胞病原性(CP)ウイルスから非細胞病原性(NCP)ウイルスへの変異について検討し、以下の成績を得た。

1. 既知の4株のCPウイルスストック中にRPF法によりNCPウイルスの存在を明らかにした。
2. 分離されたNCPウイルスの中には、END現象陽性で同種ウイルスのみを干渉するウイルスとEND現象陰性で同種及び異種ウイルスを干渉するウイルスの2種類の異なるウイルスが存在することを明らかにした。
3. CPウイルスから分離された2種類のNCPウイルスの起源を知るため、CPウイルスのクローニングの過程においてNCPウイルスの検出を行い、純化ウイルスから微量のNCPウイルスが産生されることを証明した。
4. 純化CPウイルスと真に親子関係にある2種類のNCPウイルスペアーを分離し、CPウイルスに取り込まれている宿主細胞由来mRNAの保存の有無を塩基配列を決定して比較した。その結果、CPウイルスでは、宿主細胞由来mRNAが保存されていたが、それから産生されたNCPウイルスでは宿主細胞由来mRNAが欠損していることが解明された。
5. 以上のことから、CPウイルスはその増殖の過程で微量のNCPウイルスを生じ、これはCPウイルスRNA中に取り込まれている宿主細胞由来mRNAの脱落によってCPウイルスからNCPウイルスに復帰変異することが明らかとなった。
6. END現象陽性BVD NCPウイルスは、イバラキウイルスの増殖を増強させたが、END現象陰性BVD NCPウイルスは逆にイバラキウイルスの増殖を抑制した。このイバラキウイルス増殖増強作用は、イバラキウイルスによるインターフェロンの産生をEND現象陽性NCPウイルスが抑制することにより起こることが明らかとなった。

## 謝 辞

本研究の遂行に当たり、多大な御指導及び御助言を賜った農林水産省動物医薬品検査所検査第一部長福所秋雄博士に心から深謝いたします。また、多くの御助言を賜った元農林水産省動物医薬品検査所長小川信雄博士並びに実験の遂行に当たり御協力を賜った同検査所ウイルス製剤第2検査室井上剛光室長に謝意を表します。

本論文の御校閲と有益な御助言を賜った東京大学農学部の高橋英司教授に謝意を表します。

### 参考文献

1. Angulo, A.B. and Savan, M. 1970. Interactions of bovine viral diarrhea virus with other viruses. J. Am. Vet. Med. Assoc. 156:108.
2. Baker, J.C. 1987. Bovine viral diarrhea: a review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 190:1449-1458.
3. Bolin, S.R., Black, J.W., Frey, M.L., Katz, J.B., Ridpath, J.F. and Roblin, R.O. 1994. Detection of a cell line contamination with hog cholera virus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 205:742-745.
4. Bolin, S.R., Littledike, E.T. and Ridpath, F.J. 1991. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhea viruses in a vaccinated herd. Am. J. Vet. Res. 52:1033-1037.
5. Bolin, S.R., McClurkin, A.W., Cutlip, R.C. and Coria, M.F. 1985. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus. Am. J. Vet. Res. 46:573-576.
6. Brownlie, J. 1990. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. Vet. Microbiol. 23:371-382.
7. Brownlie, J. and Clarke, M.C. 1990. Bovine virus diarrhoea virus: speculation and observations on current concepts. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1990. 9:223-230.
8. Brownlie, J., Clarke, M.C. and Howard, C.J. 1984. Experimental pro-

- duction of fatal mucosal disease in cattle. Vet.Rec. 114:535-536.
- 9.Chomczynski,P. and Sacchi,N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal.Biochem. 162:156-159.
- 10.Collett,M.S. 1992. Molecular genetics of pestiviruses. Comp.Immun. Microbiol.Infec.Dis. 15:145-154.
- 11.Collett,M.S., Anderson,D.K. and Retzel,E. 1988. Comparisons of the Pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the Flavi-viridae. J.Gen.Virol. 69:2637-2643.
- 12.Collett,M.S., Larson,R., Belzer,S.K. and Retzel,E. 1988. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a Pestivirus. Virology 165:200-208.
- 13.Collett,M.S., Larson,R., Gold,C., Strick,D., Anderson,D.K. and Purchio,A.F. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. Virology 165:191-199.
- 14.Collett, M.S., Moenning, V. and Horzinek, M.C. 1989. Recent advances in pestivirus research. J.Gen.Virol. 70:253-266.
- 15.Corapi,W.V., Donis,R.O. and Dubovi,E.J. 1988. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections. J.Virol. 62:2823-2827.
- 16.De Moerlooze, L., Desport, M., Renard, A., Lecomte, C., Brownlie, J. and Martial, J.A. 1990. The coding region for the 54-kDa prote-

in of several pestiviruses lacks host insertions but reveals a "Zinc finger-like" domain. Virology 177:812-815.

17. De Moerlooze, L., Lecomte, C., Brown-Shimmer, S., Schmetz, D., Guiot, C., Vandenberg, D., Allaer, D., Rossius, M., Chappuis, G., Dina, D., Renard, A. and Martial, J.A. 1993. Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. J.Gen.Virol. 74:1433-1438.
18. Deng, R. and Brock, K.V. 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence of a Pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. Virology 191:867-879.
19. Desport, M. and Brownlie, J. 1991. Molecular characterization of the coding region for the p 125 from homologous BVDV biotypes. Arch.Virol. (Suppl.) 3:261-265.
20. Diderholm, H. and Dinter, Z. 1966. Interference between strains of bovine virus diarrhoea virus and their capacity to suppress interferon of heterologous virus. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 121:976-980.
21. Donis, R.O. and Dubovi, E.J. 1987. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine diarrhoea-mucosal disease virus. Virology 158: 168-173.
22. Dubovi, E. 1992. Genetic diversity and BVD virus. Comp.Immun.Microbiol.infect.Dis. 15:155-162.



23. Fenner, F., McAuslan, B.R., Mims, C.A., Sambrook, J. and White, D.O. 1974. Interference and interferon. pp.319-337. In: The biology of animal virus. 2nd ed. Academic Press, New York and London.
24. Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. and Brown, F. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Arch.Virol. Suppl(2): 223-233.
25. Fukusho, A., Ogawa, N., Yamamoto, H., Sawada, M. and Sazawa, H. 1976. Reverse plaque formation by hog cholera virus of the GPE<sup>-</sup> strain inducing heterologous interference. Infect.Immun. 14:332-336.
26. Gillespie, J.H., Baker, J.A. and McEntee, K. 1960. A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. Cornell.Vet. 50:73-79.
27. Gillespie, J.H., Madin, S.H. and Darby, N.B. 1962. Cellular resistance in tissue culture, induced by noncytopathogenic strains, to a cytopathogenic strain of virus diarrhea virus of cattle. Proc.Soc. Exp.Biol.Med. 110:248-250.
28. Gratzek, J., Segre, D. and Berman, D.T. 1964. Detection and isolation of a virus contaminating a stock of virus diarrhea virus. Am. J.Vet.Res. 25:374-379.
29. Greiser-Wilke, I., Haas, L., Dittmar, K., Liess, B. and Moenning, V. 1993. RNA insertion and gene duplication in the nonstructural protein p 125 region of pestivirus strains and isolates *in vitro* and *in vivo*. Virology 193:977-980.
30. Gunn, H.M. and Weavers, E.D. 1992. Mucosal disease in cattle housed

- in isolation. Vet.Rec. 131:376.
- 31.Gutekunst,D.E. and Malmquist,W.A. 1963. Separation of a soluble antigen and infectious particles of bovine viral diarrhoea viruses and their relationship to hog cholera. Can.J.Com.Med.Vet.Sci. 27: 121-123.
- 32.Harasawa,R., Hikiji,K., Tanabe,H., Takeda,Y. and Mizusawa,H. 1993. Detection of adventitious pestivirus in cell cultures by polymerase chain reaction using nested-pair primers. Tiss.Cult.Res. Commun. 12:215-220.
- 33.Harasawa,R. and Tomiyama,T. 1994. Evidence of pestivirus RNA in human virus vaccines. J.Clin.Microbiol. 32:1604-1605.
- 34.Hewicker-Trautwein,M., Liess,B., Frey,H.-R. and Trautwein,G. 1994. Virological and pathological findings in sheep fetuses following experimental infection of pregnant ewes with cytopathogenic-bovine-virus-diarrhoea virus. J.Vet.Med.B 41:264-276.
- 35.Horzinek,M.C. 1990. Bovine virus diarrhoea virus: an introduction. Rev.Sci.Tech.Off.Int.Epiz. 9:13-23.
- 36.Hubbert,W.T., Bryner,J.H., Fernelius,A.L., Frank,G.H. and Estes,P. C. 1973. Viral infection of the bovine fetus and environment. Arch. Gesamte Virusforsch. 41:86-98.
- 37.Howard,C.J., Brownlie,J. and Clarke,M.C. 1987. Comparison by the neutralization assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases

- of mucosal disease. Vet.Microbiol. 13:361-369.
38. Inaba, Y., Omori, T. and Kumagai, T. 1963. Detection and measurement of non-cytopathogenic strains of virus diarrhea of cattle by the END method. Arch.Gesamte Virusforsch. 13:425-429.
39. Inaba, Y., Tanaka, Y., Kumagai, T., Omori, T., Ito, H. and Matumoto, M. 1968. Bovine diarrhea virus. II. END phenomenon: exaltation of New castle disease virus in bovine cells infected with bovine diarrhea virus. Jpn.J.Microbiol. 12:35-49.
40. Itoh, O., Sasaki, H. and Hanaki, T. 1983. Reverse plaque formation method for titration of non-cytopathogenic bovine viral diarrhea-mucosal disease virus. Natl.Inst.Anim.Health Q. 23:27-31.
41. Itoh, O., Sasaki, H. and Hanaki, T. 1984. A study of serologic relationships among non-cytopathogenic strains of bovine viral diarrhea-mucosal disease virus by reverse plaque technique. Jpn.J.Vet.Sci. 46:669-675.
42. Itoh, O., Sugiyama, M., Nakamura, S. and Sasaki, H. 1984. Characterization of a non-cytopathogenic agent isolated from cytopathogenic bovine viral diarrhea-mucosal disease virus stock. Microbiol. Immunol. 28:1163-1167.
43. Jusa, E.R., Inaba, Y., Kadoi, K., Kurogi, H., Fonseca, E. and Shope, R. E. 1994. Identification of Kagoshima and Chuzan viruses of Japan as Kasba virus, an Orbivirus of Palyam serogroup. Aust.Vet.J. 71: 57.

44. Kodama, K., Sasaki, N., Fukuyama, S., Izumida, A. and Ishii, F. 1974. Studies on cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus: Recovery, identification, and properties of the isolated virus. Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll. 23:51-59.
45. Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S. and Matumoto, M. 1961. A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. 1. Establishment of standard procedure. J. Immunol. 87:245-256.
46. Kupfermann, H., Thiel, H.-J., Dubovi, E. and Meyers, G. 1996. Bovine viral diarrhoea virus: Characterization of a cytopathogenic defective interfering particle with two internal deletions. J. Virol. 70:8175-8181.
47. Laude, H. 1978. Virus de la peste porcine classique: Interference avec le VSV et titrage par le procede des plages inverses. Arch. Virol. 56:273-277.
48. Liess, B., Reinecke, S., Sanders, G., Greiser-Wilke, I. and Moennig, V. 1993. An immunoplaque assay distinguishing between cytopathogenic and noncytopathogenic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. J. Vet. Med. B 40:89-96.
49. Matthews, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the international committee on taxonomy of viruses. Intervirology. 17:97-101.
50. Matumoto, M. 1968. Enhanced replication of Newcastle disease virus

in cell culture co-infected with certain other viruses. Jpn.J. Microbiol. 12:505-530.

51. McClurkin, A.W., Bolin, S.R. Coria, M.F. 1985. Isolation of cytopathogenic and non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely affected with bovine viral diarrhea. J. Am. Vet. Med. Assoc. 186:568-569.
52. Meyers, G., Rümenapf, T. and Thiel, H.-J. 1989. Ubiquitin in a togavirus. Nature (Lond.) 341:491.
53. Meyers, G., Rümenapf, T. and Thiel, H.-J. 1990. Insertion of ubiquitin-coding sequence identified in the RNA genome of a togavirus. pp.25-29. In: New Aspects of Positive Strand RNA Viruses. (Brinton, M.A. and Heinz, F.X. ed.) American Society for Microbiology, Washington, D.C.
54. Meyers, G., Rümenapf, T., Tautz, N., Dubovi, E.J. and Thiel, H.-J. 1991. Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhea virus. Arch. Virol. (Suppl.)3:133-142.
55. Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J. and Kümmerer, B.M. 1996. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. J. Virol. 70:8606-8613.
56. Meyers, G., Tautz, N., Dubovi, E.J. and Thiel, H.-J. 1991. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. Virology 180:602-616.
57. Meyers, G., Tautz, N., Stark, R., Brownlie, J., Dubovi, E.J., Collett,

- M.S. and Thiel, H.-J. 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. Virology 191:368-386.
58. Meyers, G. and Thiel, H.-J. 1996. Molecular characterization of pestiviruses. pp.53-113. In: Advances in virus research. (Maramorosch, K., Murphy, F.A. and Shatkin, A.J. ed.) Academic press, San Diego.
59. Miura, Y., Miyazato, S., Kubo, M., Goto, Y. and Kono, Y. 1988. Kawana-be virus, an isolate from a calf in Japan: A new virus belonging to the New Jersey serotype of the epizootic hemorrhagic disease serogroup of genus Orbivirus. Jpn.J.Vet.Sci. 50:942-945.
60. Miura, Y., Goto, Y., Kubo, M. and Kono, Y. 1988. Isolation of Chuzan virus, a new member of the Palyam subgroup of the genus Orbivirus, from cattle and *Culicoides oxystoma* in Japan. Am.J.Vet.Res. 49: 2022-2025.
61. Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. and Summers, M.D. (eds.) 1995. Virus taxonomy. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Arch.Virol. (Suppl.)10:415-427.
62. Nuttall, P.A., Luther, P.D. and Stott, E.J. 1977. Viral contamination of bovine foetal serum and cultures. Nature(London) 266:835-837.
63. 小川信雄 1981. 豚コレラウイルス変異株に関する研究 東京大学博士論文
64. Omori, T. 1970. Ibaraki disease: A bovine epizootic disease resem-

- bling bluetongue. Nat.Inst.Anim.Health Q. 10(Suppl.):45-55.
- 65.Omori,T., Inaba,Y., Moromoto,T., Tanaka,Y., Kurogi,H. and Matumoto,M. 1967. Bovine diarrhea virus. 1. Isolation of non-cytopathogenic strains detectable by END method. Jpn.J.Microbiol. 11:133-142.
- 66.Qi,F., Ridpath,J.F., Lewis,T., Bolin,S.R. and Berry,E.S. 1992. Analysis of the bovine viral diarrhea virus genome for possible cellular insertions. Virology 189:285-292.
- 67.Renard,A., Dina,D. and Martial,J. 1987. Vaccines and diagnostics derived from bovine diarrhea virus. European Patent Application number86870095.6. Publication number 0208672.
- 68.Renard,A., Guiot,C., Schmetz,D., Dagenais,L., Pastoret,P.P., Dina,D. and Martial,J.A. 1985. Molecular cloning of bovine viral diarrhea viral sequences. DNA 4:429-438.
- 69.Ridpath,J.F. and Bolin,S.R. 1990. Viral protein production in homogeneous and mixed infections of cytopathic and noncytopathic BVD virus. Arch.Virol. 111:247-256.
- 70.Ridpath,J.F., Qi,F., Bolin,S.R. and Berry,E.S. 1994. Natural recombination in bovine viral diarrhea viruses. Arch.Virol. (Suppl.) 9:239-244.
- 71.Rose,S.D. 1990. RNA PCR: An application kit. Am.Biotech.Lab. 8:31-33.



72. Rosi, C.R., Kiesel, G.K. and Hoff, E.J. 1980. Factors affecting the assay of bovine type I interferon on bovine embryonic lung cells. Am.J.Vet.Res. 41:552-556.
73. Shimizu, M., Murakami, S. and Satou, K. 1989. Serological comparison of cytopathogenic and non-cytopathogenic bovine viral diarrhea-mucosal disease viruses isolated from cattle with mucosal disease. Jpn.J.Vet.Sci. 51:157-162.
74. Shimizu, M., Satou, K., Nishioka, N., Yoshino, T., Momotani, E. and Ishikawa, Y. 1989. Serological characterization of viruses isolated from experimental mucosal disease. Vet.Microbiol. 19:13-21.
75. Shimizu, M., Watanabe, H., Satou, K. and Murakami, S. 1989. Antigenic diversity of bovine viral diarrhea-mucosal disease (BVD-MD) viruses recently isolated from persistently infected cattle and mucosal disease, and serologic survey on bovine sera using antigenically different BVD-MD viruses. Jpn.J.Vet.Sci. 51:1115-1122.
76. Shimizu, Y., Furuuchi, S., Kumagai, T. and Sasahara, J. 1970. A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle cell cultures. Am.J.Vet.Res. 31:1787-1794.
77. Shirai, J., Tanaka, Y. and Horiuchi, T. 1984. Interference patterns between strains of bovine viral diarrhea-mucosal disease (BVD-MD) virus. Jpn.J.Vet.Sci. 46:901-904.
78. Soda, K. and Matumoto, M. 1971. Enhancement of rubella virus replication in swine testicle cells by co-infection with hog cholera virus. Jpn.J.Microbiol. 15:397-406.

79. Sugiyama, M., Itoh, O. and Sasaki, H. 1984. Difference in ability to cause interference of homologous strains of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. Ann. Rep. Natl. Vet. Assay lab. 21:11-17.
80. Tautz, N., Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E. and Thiel, H.-J. 1996. Cytopathogenicity of pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. J. Virol. 70:7851-7858.
81. Tautz, N., Thiel, H.-J., Dubovi, E. J. and Meyers, G. 1994. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. J. Virol. 68:3289-3297.
82. Thiel, H.-J., Stark, R., Meyers, G., Weiland, E. and Rümenapf, T. 1992. Proteins encoded in the 5' region of the pestivirus genome-considerations concerning taxonomy. Vet. Microbiol. 33:213-219.
83. Toba, M. and Matumoto, M. 1969. Role of interferon in enhanced replication of New castle disease virus in swine cells infected with hog cholera virus. Jpn. J. Microbiol. 13:303-305.
84. Toba, M. and Matumoto, M. 1971. Mechanism of enhancement of New-castle disease virus growth in cultured cells by co-infecting hog cholera virus. Arch. Gesamte Virusforsch. 34:310-322.
85. Vilcek, S., Herring, A. J., Herring, J. A., Nettleton, P. F., Lowings, J. P. and Paton, D. J. 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Arch. Virol. 136:309-323.

86. 山下秀之、平井潤思、佐々木實 1993. 市販牛胎仔血清および継代細胞からのウシウイルス性下痢-粘膜病ウイルスの分離 日本獣医師会雑誌 46: 741-745.

# 表 及 び 図

表1-1 ブラック法とRPF法によるBVDウイルスの定量

株 名	ウイルス価 ( PFU/0.2 ml )		
	ブラック法 <sup>1)</sup>	Nose-RPF法 <sup>2)</sup>	VSV-RPF法 <sup>3)</sup>
Nose	$6.3 \times 10^6$	$8.0 \times 10^5$	$7.0 \times 10^4$
NADL	$3.0 \times 10^7$	$2.7 \times 10^6$	$1.9 \times 10^5$
KS86(+)	$2.5 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$
Osloss	$3.0 \times 10^6$	$5.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$

1) CP BVDウイルスにより形成された通常のブラック数からウイルス価を算出

2) Nose株を重感染させた後形成されたリバースブラック数からウイルス価を算出

3) VSVを重感染させた後形成されたリバースブラック数からウイルス価を算出

表 1 - 2 分離ウイルスのウイルス干渉能

株 名	重 感 染 ウ イ ル ス		
	END法	干 渉 法	
	NDV	CP BVDV	VSV
Nose - END <sup>+</sup>	+	-	+
Nose - END <sup>-</sup>	-	-	-
NADL - END <sup>+</sup>	+	-	+
NADL - END <sup>-</sup>	-	-	-
KS86(+)-END <sup>+</sup>	+	-	+
KS86(+)-END <sup>-</sup>	-	-	-
Osloss - END <sup>+</sup>	+	-	+
Osloss - END <sup>-</sup>	-	-	-
無接種対照	-	+	+

+ ; CPE陽性

- ; CPE陰性

表 1 - 3 分離ウイルスの抗原性の比較

株 名	免 疫 血 清	
	抗Nose株	抗NADL株
Nose	4,096*	256
Nose - END <sup>+</sup>	4,096	256
Nose - END <sup>-</sup>	4,096	256
NADL	512	4,096
NADL - END <sup>+</sup>	512	2,048
NADL - END <sup>-</sup>	512	2,048
KS86(+)	512	256
KS86(+ )END <sup>+</sup>	256	256
KS86(+ )END <sup>-</sup>	1,024	256

\*中和抗体価；1 ウエル以上でウイルスの増殖が抑制された血清の最高希釈倍数の逆数で示す。



表2-1 RT-PCRに用いたプライマーリスト

プライマー名	配列	位置
#1	(5') GCTACTGCAGACTGCATAATATGCACTGTATGTG	4833 - 4856 (24mer)
#4	(5') GCTACTGCAGCTTACACACGGCAGGCCCTTAGG	5440 - 5416 (25mer)
NL1	(5') GCTACTGCAGATGTGCAGCCGATGCCAG	4994 - 5011 (18mer)
NL2	(5') GCTACTGCAGCATCCGTGAACCAAATGA	5263 - 5246 (18mer)
#5	(5') GCTACTGCAGGACCCTTCAGGCAGGAACATAGCGG	4991 - 5015 (25mer)
#6	(5') GCTACTGCAGTCCCCTCCTCACTTTTAGCAATGC	5532 - 5508 (25mer)
#7	(5') GCTACTGCAGATCCCTCTCAGCGAAGGCCG	74 - 93 (20mer)
#8	(5') GCTACTGCAGCAGCAGAGATTTTAGTAGCAATAC	375 - 351 (25mer)

下線は制限酵素 *Pst* I の切断部位

表2-2 Nose株のクローニング段階ウイルスのブラック法とRPF法によるウイルス価の比較

サンプル	ウイルス価 (PFU/0.2 ml)		
	ブラック法 <sup>1)</sup>	Nose-RPF法 <sup>2)</sup>	VSV-RPF法 <sup>3)</sup>
限界希釈3回 <sup>4)</sup>	$2.2 \times 10^5$	$2.0 \times 10^3$	検出されず
ブラック1回 <sup>5)</sup>	$3.5 \times 10^3$	$3.5 \times 10$	$0.5 \times 10$
ブラック2回 <sup>5)</sup>	$8.0 \times 10^3$	$4.0 \times 10$	$1.0 \times 10$
ブラック3回 <sup>5)</sup>	$2.9 \times 10^3$	$3.5 \times 10$	検出されず
Nose BT-1 <sup>6)</sup>	$1.2 \times 10^7$	$2.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^4$

1) CP BVDウイルスにより形成された通常のブラック数からウイルス価を算出

2) Nose株を重感染させた後形成されたリバースブラック数からウイルス価を算出

3) VSVを重感染させた後形成されたリバースブラック数からウイルス価を算出

4) 培養試験管を用いた限界希釈法により3回クローニングしたウイルス液

5) 1ブラックから回収されたウイルス液

6) 3回のブラッククローニング後BT細胞で1代増殖させて得たウイルス液

表2-3 NADL株のクローニング段階ウイルスのブラック法とRPF法  
によるウイルス価の比較

サンプル	ウイルス価 (PFU/0.2 ml)		
	ブラック法 <sup>1)</sup>	Nose-RPF法 <sup>2)</sup>	VSV-RPF法 <sup>3)</sup>
限界希釈3回 <sup>4)</sup>	$1.8 \times 10^5$	$1.5 \times 10^3$	$2.0 \times 10^2$
ブラック1回 <sup>5)</sup>	$3.5 \times 10^3$	検出されず	検出されず
ブラック2回 <sup>5)</sup>	$3.2 \times 10^3$	検出されず	検出されず
ブラック3回 <sup>5)</sup>	$3.4 \times 10^3$	検出されず	検出されず
NADL BT-1 <sup>6)</sup>	$1.4 \times 10^7$	$1.5 \times 10^5$	$3.0 \times 10^4$

- 1) CP BVDウイルスにより形成された通常のブラック数からウイルス価を算出
- 2) Nose株を重感染させた後形成されたリバーブラック数からウイルス価を算出
- 3) VSVを重感染させた後形成されたリバーブラック数からウイルス価を算出
- 4) 培養試験管を用いた限界希釈法により3回クローニングしたウイルス液
- 5) 1ブラックから回収されたウイルス液
- 6) 3回のブラッククローニング後BT細胞で1代増殖させて得たウイルス液

表2-4 Nose株の無希釈継代によるCPE発現への影響

継代数	CPE	ウ イ ル ス 価			
		CPE法 <sup>1)</sup> (TCID <sub>50</sub> /0.1ml)	ブラック法 <sup>2)</sup> ( × 10 <sup>4</sup> PFU/0.2ml )	Nose-RPF法 <sup>3)</sup>	VSV-RPF法 <sup>4)</sup>
Nose BT-1	+	10 <sup>6.2</sup>	1200	20 (1.6) <sup>5)</sup>	2.0(0.16) <sup>6)</sup>
1代	+	10 <sup>5.8</sup>	580	31 (5.3)	7.5(1.29)
2代	+	10 <sup>5.3</sup>	550	22 (3.8)	3.0(0.55)
3代	+	10 <sup>5.3</sup>	210	12 (5.7)	1.3(0.62)
4代	+	10 <sup>5.5</sup>	1300	70 (5.4)	7.5(0.57)
5代	-	10 <sup>5.2</sup> * <sup>7)</sup>	1100*	70 (6.4)	2.2(0.20)
6代	-	10 <sup>5.7</sup> *	820*	62 (7.6)	2.6(0.31)

1)CP BVDウイルスのCPEからウイルス価を算出

2)CP BVDウイルスにより形成された通常のブラック数からウイルス価を算出

3)Nose株を重感染させた後形成されたリバースブラック数からウイルス価を算出

4)VSVを重感染させた後形成されたリバースブラック数からウイルス価を算出

5)CPウイルス中のNCPウイルス含有率 (%)

$$\frac{\text{Nose-RPF法によるNCPブラック数} \times 100}{\text{ブラック法によるCPブラック数}}$$

6)CPウイルス中のNCPウイルス含有率 (%)

$$\frac{\text{VSV-RPF法によるNCPブラック数} \times 100}{\text{ブラック法によるCPブラック数}}$$

7)\*印はゾーン現象が見られたもの

表 2 - 5 Nose株のタイトレーションにおけるゾーン現象

サンプル	ウ イ ル ス 希 釈						
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
1代継代	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+----+	-----
6代継代	-----	-----	+----+	+++++	+++++	---+--	-----

+; CPE陽性

-; CPE陰性

表3-1 BVDウイルス感染BT細胞におけるオルビウイルスの増殖

ウイルス	BVDウイルス感染BT細胞		BVDウイルス非感染BT細胞	
	ウイルス価	CPE	ウイルス価	CPE
アフリカ馬疫	3.5 <sup>1)</sup>	++ <sup>2)</sup>	1.25	- <sup>3)</sup>
ブルータンク	4.75	+++	2.25	-
流行性出血熱1型	2.75	++	<0.5	-
流行性出血熱2型	4.75	+++	2.75	+
カスバ	5.5	++	3.5	-
イバラキ	6.0	+++	3.0	-
カワナベ	5.0	+++	<0.5	-

1) log TCID<sub>50</sub>/0.05ml

2) CPE陽性

3) CPE陰性

表 3 - 2 分離BVDウイルス株のイバラキウイルス増殖増強作用

END現象	BT細胞感染 BVDウイルス株	イ バ ラ キ ウ イ ル ス 接 種 後	
		ウイルス価	C P E
陽	NoseE <sup>+</sup>	4.75 <sup>1)</sup>	+++ <sup>2)</sup>
	KS86(+ )END <sup>+</sup>	4.0	+++
	OslossE <sup>+</sup>	5.0	+++
	No.12-43	4.0	+++
性	関東東山	4.5	+++
	New York-1	4.25	+++
	Indiana-46	3.0	+
陰	NoseE <sup>-</sup>	0.5	- <sup>3)</sup>
	KS86(+ )END <sup>-</sup>	<0.5	-
性	OslossE <sup>-</sup>	<0.5	-
	無接種	2.0	-

1) log TCID<sub>50</sub>/0.05ml

2) C P E 陽性

3) C P E 陰性



表 3 - 3 イバラキウイルスにより産生されたインターフェロンの性状

試 験	方 法	単位 / 2 m l
超遠心	100,000 × g, 3 時間	5 1 2
透析膜通過性	P B S, 4° C, 4 8 時間	5 1 2
酸処理	p H 2, 4° C, 2 4 時間	2 5 6
トリブシン処理	1 m g / m l, 3 7° C, 1 時間	< 8
熱処理	5 6° C, 3 0 分間	1 2 8
種特異性	B T 細胞	5 1 2
	M D B K 細胞	6 4
	H m L u - 1 細胞	< 4
対 照		5 1 2

表3-4 イバラキウイルスのBVDウイルス感染BT細胞におけるインターフェロン産生

インターフェロン力価 (単位/2ml)		イバラキウイルス重感染後日数				
ウイルス	重感染時	1	2	3	4	5
OslossE <sup>+</sup>	<4	<4	<4	32	64	256
OslossE <sup>-</sup>	256	32	128	128	128	128
無接種	<4	<4	64	512	256	256

図1-1 BVDウイルスのCP及びNCPウイルスの検出

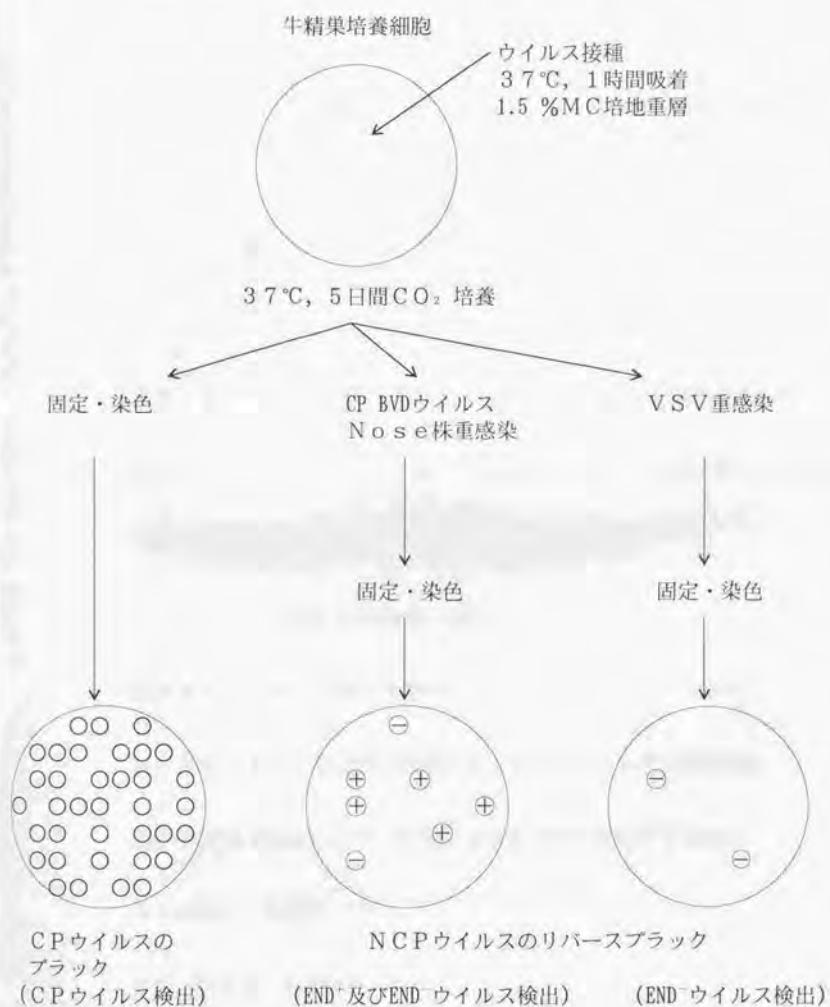
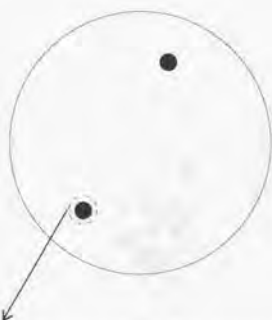


図 1-2 リバースブラックからの NCP BVD ウイルスの分離法



Nose-RPF法又はVSV-RPF法により  
形成されたリバースブラック

リバースブラックの採取 (EDTA・トリプシンによる細胞の消化)

↓

細胞外ウイルス中和 (抗Nose株又は抗VSV家兔免疫血清による中和)

↓

免疫血清除去 (遠心洗浄 5 回)

↓

細胞内ウイルス回収 (凍結融解 3 回)

↓

限界希釈法 (Nose又はVSV干渉法) によるクローニング (1 回目)

↓

限界希釈法 (Nose又はVSV干渉法) によるクローニング (2 回目)

↓

限界希釈法 (Nose又はVSV干渉法) によるクローニング (3 回目)

↓

BT細胞で1代増殖

↓

分離 NCP BVDウイルス

図2-1 CP BVDウイルスのクローニング

震界希釈法

第1回

-1 +++++

-2 ++++-

-3 ---(+)

第2回

-1 +++++

-2 +++++

-3 ---(+)

第3回

-1 +++++

-2 -++++

-3 (+)---

第2回へ

第3回へ

第1回クローニング  
(P-1)

ブラック法

Nose・RPF法

VSV・RPF法

-1

-2

-3

-4

第2回クローニング  
(P-2)

ブラック法

Nose・RPF法

VSV・RPF法

-1

-2

-3

第3回クローニング  
(P-3)

ブラック法

Nose・RPF法

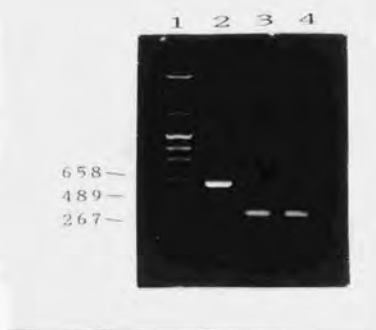
VSV・RPF法

-1

-2

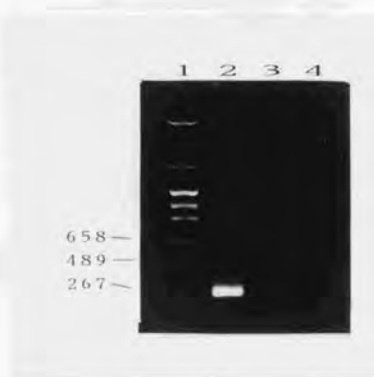
-3

図 2-2 NADL, NADL<sup>+</sup>, NADL<sup>-</sup>株のRT-PCR産物の電気泳動像



レーン 1 : サイズマーカー  
レーン 2 : NADL株  
レーン 3 : NADL<sup>+</sup>株  
レーン 4 : NADL<sup>-</sup>株

図2-3 NADL, NADLE<sup>+</sup>, NADLE<sup>-</sup>株のNested PCR産物の電気泳動像



レーン1 : サイズマーカー

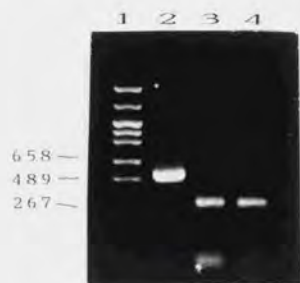
レーン2 : NADL株

レーン3 : NADLE<sup>+</sup>株

レーン4 : NADLE<sup>-</sup>株



図2-4 Osloss, OslossE<sup>+</sup>, OslossE<sup>-</sup>株のRT-PCR産物の電気泳動像



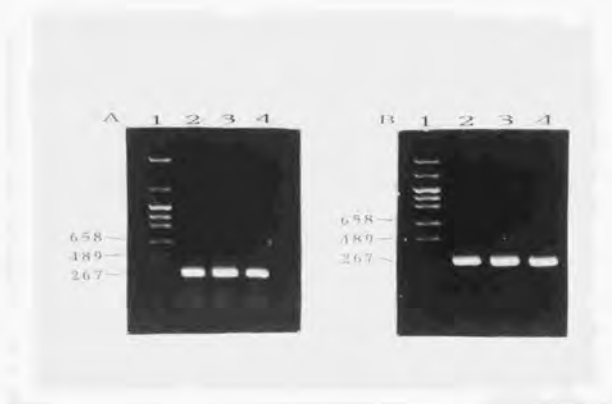
レーン1 : サイズマーカー

レーン2 : Osloss株

レーン3 : OslossE<sup>+</sup>株

レーン4 : OslossE<sup>-</sup>株

図 2-5 各株の 5' 末端の RT-PCR 産物の電気泳動像



A レーン 1 : サイズマーカー  
 レーン 2 : NADL 株  
 レーン 3 : NADLE<sup>+</sup> 株  
 レーン 4 : NADLE<sup>-</sup> 株

B レーン 1 : サイズマーカー  
 レーン 2 : Osloss 株  
 レーン 3 : OslossE<sup>+</sup> 株  
 レーン 4 : OslossE<sup>-</sup> 株

図2-6 NADL, NADLE<sup>+</sup>, NADLE<sup>-</sup>株の塩基配列の比較

4904	
NADL pb	GGGAAGCCGA TAACGTGTGG GATGTCGCTA GCAGATTTTG AAGAAAGACA
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	**A**A**C* *****C* *****AT* *****G*****
NADLE <sup>-</sup>	**A**A**C* *****C* *****AT* *****G*****
4954	
NADL pb	CTATAAAGA ATCTTTATAA GGAAGGCAA CTTGAGGGT ATGTGAGCC
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	T*****G **T***** **AC*****C -----
NADLE <sup>-</sup>	T*****G **T***** **AC*****C -----
5004	
NADL pb	GATGCCAGGG AAAGCATAGG AGGTTTGAAA TGGACCGGGA ACCTAAGAGT
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	-----
NADLE <sup>-</sup>	-----
5054	
NADL pb	GCCAGATACT GTGCTGAGTG TAATAGGCTG CATCTGCTG AGGAAGGTGA
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	-----
NADLE <sup>-</sup>	-----
5104	
NADL pb	CTTTTGSGCA GAGTCGAGCA TGTGGGGCT CAAATCACC TACTTTGCGC
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	-----
NADLE <sup>-</sup>	-----
5154	
NADL pb	TGATGGATGG AAAGGTGTAT GATATCACAG AGTGGGCTGG ATGCCAGCGT
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	-----
NADLE <sup>-</sup>	-----
5204	
NADL pb	GTGGGAATCT CCCAGATAC CCACAGATG CCGTGTGACA TCTCAATTGG
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	-----
NADLE <sup>-</sup>	-----
5254	
NADL pb	TTCACGGATG CCTTCAGGC AGGAATACAA TGGCTTTGTA CAATATACCG
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	----- **T**A* *****T* *****T*****
NADLE <sup>-</sup>	----- **T**A* *****T* *****T*****
5304	
NADL pb	CTAGGGGGCA ACTAFTTCTG AGAACTTGG CCGTACTGGC AACTAAAGTA
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	***** **T**A* *****T**A* *****
NADLE <sup>-</sup>	***** **T**A* *****T**A* *****
5354	
NADL pb	AAATGCTCA TGCTAGGC
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	*****
NADLE <sup>-</sup>	*****

\* : 上段と同じ

--- : 欠損

NADL pb: Collettら(13)により報告された塩基配列

NADL cl: ブラック純化後のNADL株

図2-7 NADL, NADLE<sup>+</sup>, NADLE<sup>-</sup>株のアミノ酸残基の比較

1507	
NADL pb	GKPIITCGMSL ADPEERHYKR IFIREGNFEG MCSRCQCKHR RFEMDREPKS
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	*****Y**
NADLE <sup>-</sup>	*****Y**
1557	
NADL pb	ARYCAECNRL HPAEEGDFWA ESSMLGLKIT YFALMDGKVY DITWAGCQR
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	-----
NADLE <sup>-</sup>	-----
1607	
NADL pb	VGISPDPTRV PCHISFGSRM PFRQYNGFV QYTARGQLFL RNLPLVATKV
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	-----
NADLE <sup>-</sup>	-----
1657	
NADL pb	KMLMVG
NADL cl	*****
NADLE <sup>+</sup>	*****
NADLE <sup>-</sup>	*****

\* : 上段と同じ

--- : 欠損

NADL pb: Collettら(13)により報告されたアミノ酸残基

NADL cl: ブラック純化後のNADL株

図2-8 Osloss, OslossE<sup>+</sup>, OslossE<sup>-</sup>株の塩基配列の比較

5071					
Osloss pb	GCAACCAAG	TAAAAATGCT	TATGGTAGGC	AACCTAGGGG	TAGAAATCGG
Osloss cl	*****	*****	*****	*****	*****
OslossE <sup>+</sup>	*****T*****	*****	C*****G***	*****T*Λ*	Λ*****T**
OslossE <sup>-</sup>	*****T*****	*****	C*****G***	*****T*Λ*	Λ*****T**
5121					
Osloss pb	TGATCTAGAA	CACCTAGGAT	GGATCTTAAA	AATGCAGATC	TTCGTGAAAA
Osloss cl	*****	*****	*****	*****	*****
OslossE <sup>+</sup>	G**C*****	*****C*****	*****C***G	G-----	-----
OslossE <sup>-</sup>	G**C*****	*****C*****	*****C***G	G-----	-----
5171					
Osloss pb	CCCTGACCGG	CAAGACCATC	ACCCTGGAGG	TGGAGCCAG	TGACACCATC
Osloss cl	*****	*****	*****	*****	*****
OslossE <sup>+</sup>	-----	-----	-----	-----	-----
OslossE <sup>-</sup>	-----	-----	-----	-----	-----
5231					
Osloss pb	GAGAACGTGA	AGGCCAAGAT	CCAGGATAAG	GAAGGCATTC	CCCCTGACCA
Osloss cl	*****	*****	*****	*****	*****
OslossE <sup>+</sup>	-----	-----	-----	-----	-----
OslossE <sup>-</sup>	-----	-----	-----	-----	-----
5271					
Osloss pb	GCAGAGGCTC	ATCTTTGCCG	GCAAGCAGCT	GGAAGATGGC	CGCTCTCTTT
Osloss cl	*****	*****	*****	*****	*****
OslossE <sup>+</sup>	-----	-----	-----	-----	*****Λ*****
OslossE <sup>-</sup>	-----	-----	-----	-----	-----
5321					
Osloss pb	CTGATTACAA	CATCCAGAAA	GAGTCGACCC	TGCACCTGGT	CCTCCGTCTG
Osloss cl	*****	*****	*****	*****	*****
OslossE <sup>+</sup>	-----	-----	-----	-----	-----
OslossE <sup>-</sup>	-----	-----	-----	-----	-----
5371					
Osloss pb	AGGGGTAGTG	GGCCTGCCGT	GTGCAAAAAG	ATTACTGAGC	ATGAGAAATG
Osloss cl	*****	*****	*****	*****	*****
OslossE <sup>+</sup>	-----	*****G***	*****Λ***	*****Λ***	*****
OslossE <sup>-</sup>	-----	*****G***	*****Λ***	*****Λ***	*****
5421					
Osloss pb	CCATGTGAAC	ATACTAGACA	AATTGACCGC	ATTTTTCGGG	GTTATGCCAA
Osloss cl	*****	*****	*****	*****	*****
OslossE <sup>+</sup>	***CA*****	*****T*	**C*Λ*T**	**C*****	Λ*****
OslossE <sup>-</sup>	***CA*****	*****T*	**C*Λ*T**	**C*****	Λ*****
5471					
Osloss pb	GAGGTACC				
Osloss cl	*****				
OslossE <sup>+</sup>	*G**G**T				
OslossE <sup>-</sup>	*G**G**T				

\* : 上段と同じ

--- : 欠損

Osloss pb: Renardら(67,68)により報告された塩基配列

Osloss cl: ブラック純化後のOsloss株

図2-9 Osloss, OslossE<sup>+</sup>, OslossE<sup>-</sup>株のアミノ酸残基の比較

Osloss pb	ATKVRMLMVG	NLGVEIGDLE	HLGWILKMQUI	FVKTLTGKTI	TLEVEPSDTI
Osloss cl	*****	*****	*****	*****	*****
OslossE <sup>+</sup>	*****	***E*****	*****R---	-----	-----
OslossE <sup>-</sup>	*****	***E*****	*****R---	-----	-----
Osloss pb	ENVKAKIQDK	EGIPPDQQR	IFAGKQLEDG	RSLSDYNIQK	ESTLHLVRL
Osloss cl	*****	*****	*****	*T*****	*****
OslossE <sup>+</sup>	-----	-----	-----	-----	-----
OslossE <sup>-</sup>	-----	-----	-----	-----	-----
Osloss pb	RGSGPAVCKK	ITEHEKCHVN	ILDKLTAFFG	VMPRGT	
Osloss cl	*****	*****	*****	*****	
OslossE <sup>+</sup>	---*****	*****I*	*****	I*****	
OslossE <sup>-</sup>	---*****	*****I*	*****	I*****	

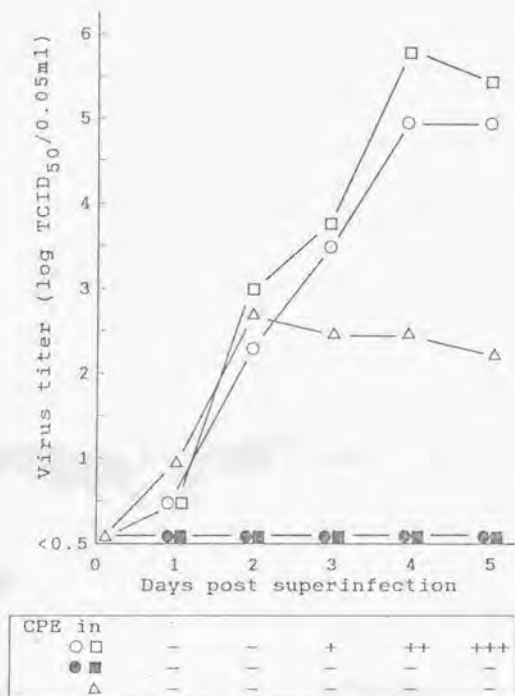
\* : 上段と同じ

--- : 欠損

Osloss pb: Renardら(67,68)により報告されたアミノ酸残基

Osloss cl: ブラック純化後のOsloss株

図3-1 END現象陽性及び陰性BVD NCPウイルス感染B T細胞におけるイバラキウイルスの増殖曲線



○ : 0slossE<sup>+</sup> 感染 B T 細胞  
 ● : 0slossE<sup>-</sup> 感染 B T 細胞  
 □ : NoseE<sup>+</sup> 感染 B T 細胞  
 ■ : NoseE<sup>-</sup> 感染 B T 細胞  
 △ : 無接種対照 B T 細胞



