HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on bovine viral diarrhea virus in quality control of veterinary vaccines [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	小佐々, 隆志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第7070号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74792
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_KOZASA_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：小佐々　隆志

学位論文題名

Studies on Bovine Viral Diarrhea Virus in Quality Control of Veterinary Vaccines
(動物用ワクチンの品質管理における牛ウイルス性下痢ウイルスに関する研究)

ワクチンは、感染症の制御のために重要なツールである。ワクチンの品質、有効性および安全性の低下は、対象とする感染症の制御に悪影響を与え、さらに、ワクチン中の迷入ウイルスは新たな感染症の発生を引き起こすことになる。我が国において、ワクチンを含む動物用医薬品は、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律に基づき、その品質、有効性および安全性の確保が行われている。製造ロットごとの管理は、製造工程中の試験や最終製品の試験といった品質検査によって行われている。

フラビウイルス科ペスチウイルス属の牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）は、ウシに感染して、経済的に重要な牛ウイルス性下痢・粘膜病（BVD-MD）を引き起こすことに加え、牛胎子血清（FBS）等の動物由来成分を介したワクチンの迷入因子として重要である。そこで本研究では、BVDV に着目して、動物用ワクチンの品質管理の観点から詳細な検討を行った。

動物用ワクチンの品質検査において、ウイルス含有量や中和抗体価を測定する有効性試験、生ワクチン中の迷入ウイルスの有無を確認する試験等に細胞培養技術が使用される。細胞培養には、FBS をはじめとする動物由来成分が必要であり、試験結果は動物由来成分の品質に影響を受けることが考えられる。そこで、第 I 章では、動物用ワクチンの品質検査（特に生ワクチンの製造用 FBS やウシ用生ワクチンの迷入ウイルス否定試験および BVD-MD ワクチンの検査）に用いる市販 FBS の品質について検討した。その結果、国内で流通していた 49 検体のうち、28 検体（57.1%）からペスチウイルスの遺伝子を検出し、48 検体（97.6%）からは BVDV に対する中和抗体を検出した。一方で、アカバネウイルスに対する抗体が検出された 1 検体を除き、ウシの細胞に CPE を引き起こすウイルスや他のウシのウイルス種に対する抗体は検出されなかった。そこで、市販 FBS における BVDV や BVDV 抗体の汚染率の高さから、BVDV を中心にした FBS の選択方法を提案した。すなわち、市販 FBS のロットチェックにおいては、まずペスチウイルスの検出を行い、感染性ウイルスを含まないものについて、BVDV に対する中和抗体価を測定し、陰性のものを選択

する。念のために他の主要なウイルスに対する抗体を測定するとともに、未知のウイルスによる汚染をさけるため、ガンマ線照射を行ってから FBS を使用することである。

国内で古くから用いられているペスチウイルス検出法の 1 つに END（Exaltation of Newcastle Disease virus）法がある。END 法はペスチウイルスの機能である感染培養細胞におけるニューカッスル病ウイルスの増強作用を利用したものであり、感染培養細胞における 1 型インターフェロンの抑制がその分子機構であるとされる。国内において BVD-MD ワクチンの含有量試験における BVDV 検出法として干渉法または END 法が規定されており、規制当局として、試験法の妥当性を説明するためにもその原理を明らかにしておくことが必要である。そこで、第 II 章では、BVDV における END 現象の分子基盤を解明するため、培養細胞に迷入していた 1 つの BVDV ストック（GBK 株）から単離された END 現象陽性株（GBK_E^{+}株）および同現象陰性株（GBK_E^{-}株）を活用し、リバースジェネティクス法により、GBK 株における END 現象に関わっている BVDV のタンパクを同定した。GBK_E^{+}株および GBK_E^{-}株の間には 4 箇所（D136G、I2623V、D3148G および D3502Y）のアミノ酸の違いのみが存在し、このうち、ウイルスの非構造タンパク質である N^{pro} の 136 番目のアミノ酸（アスパラギン酸）が END 現象、細胞の IRF-3 の分解を介した 1 型インターフェロンの産生抑制に必要であることを発見した。同部位を含む Cys112-Cys134-Asp136-Cys138 は N^{pro} において亜鉛結合性 TRASH モチーフを形成している。そこで、遺伝子データベースに登録されている各遺伝子亜型から代表的な株を選択し、同領域の遺伝子情報を解析した結果、1 株を除き、GBK_E^{+}株と同様のアミノ酸構成であることを確認したことから、野外において END 現象陽性株が主流であると考えられた。

BVD-MD は 1946 年に米国で初めて報告され、現在の 1 型（BVDV-1）が病原ウイルスとして同定された。その後、1980 年代後半から 1990 年代にかけて北米で血小板減少症等を引き起こす 2 型（BVDV-2）が流行し、日本を始め各国で両ウイルス型に対する対策が行われてきた。2004 年にブラジル産の FBS から新たに HoBi-like ウイルス（BVDV-3）が報告された。HoBi-like ウイルスは南米産の FBS や南米、南アジア、ヨーロッパのウシ（一部に水牛を含む。）から分離され、ワクチンへの新たな迷入因子として着目された。また、既存 BVD-MD ワクチンの有効性への懸念が示された。そこで第 III 章では、国内で飼育されているウシにおける HoBi-like ウイルスの感染状況と、既存 BVD-MD ワクチンを接種した牛における交差反応の有無を検討した。2012 年から 2017 年にかけて採取された国内のウシの血液から HoBi-like ウイルスは検出されず、国内に HoBi-like ウイルスが侵入した形跡は確認されなかった。一方で、ウシ血液中の中和抗体価は<2 倍から 4,096 倍であった。BVDV-1 および BVDV-2 の両成分を含むワクチンを接種したウシにおいて強い交差反応が認められたことから、この高い抗体価は BVDV-1 および BVDV-2 感染による交差が考えられた。これらのことから、継続的に BVDV-1 および BVDV-2 を含むワクチンを接種することは HoBi-like ウイルスの防御にも効果的であると考えられた。また、HoBi-like ウイルスは感染した培養細胞において CPE を起こす BVDV を干渉

することから、現在のワクチンの品質検査が HoBi-like ウイルス対策に効果的に機能していることが確認された。

以上の研究成果は、今後の動物用ワクチンの品質検査に活用できるものであり、さらに、既存の試験方法の妥当性を説明するものであるため、動物用ワクチンの品質、有効性および安全性の確保に貢献するものと思われる。現在、動物用医薬品の承認申請等に必要な技術的要件の世界的な調和が行われており、動物用ワクチンの迷入ウイルス否定試験等、生物学的製剤の検査法もその焦点の 1 つである。昨今、グローバル化が進み、多国籍メーカーが各国に同じワクチンを流通させる事例が増えており、品質管理上の問題点は世界共通となっている。ワクチン中の迷入 BVDV による動物への被害を防ぐため、国際協調での BVDV 対策が求められる。