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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：小佐々　隆志

審査委員	主査　教授	大橋　和彦
	副査　教授	苅和　宏明
	副査　教授	迫田　義博
	副査　准教授	今内　覚

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）

ワクチンの品質、有効性および安全性の低下は、感染症の制御に悪影響を与え、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。我が国では、ワクチンを含む動物用医薬品は、関連する法律に基づき、その品質、有効性および安全性の確保が行われている。そして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）を引き起こし、さらに牛胎子血清（FBS）等の動物由来成分を介したワクチンへの迷入因子として重要である。そこで本研究では、動物用ワクチンの品質管理の観点から、BVDV に着目して詳細な検討を行った。

動物用ワクチンの品質検査では、ウイルス含有量や中和抗体価を測定する有効性試験や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 など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。そこで第 I 章では、動物用ワクチンの品質検査に用いる市販 FBS の品質について検討した。国内で流通した 49 検体のうち、28 検体からペスチウイルスの遺伝子を検出し、48 検体からは BVDV に対する中和抗体を検出した。一方で、1 検体を除き、ウシの細胞に細胞変性効果を引き起こすウイルスや他のウイルス種に対する抗体は検出されなかった。以上より、市販 FBS のロットチェックでは、まずペスチウイルスの検出を行い、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て、陰性のものを選択する。さらに他のウイルスに対する抗体を測定し、未知のウイルスによる汚染を避けるため、ガンマ線照射を行った FBS を使用することが適していると示唆された。

国内で用いられているペスチウイルス検出法のひとつに Exaltation of Newcastle disease（END）法がある。国内での BVD-MD ワクチンの含有量試験の

BVDV 検出法には干渉法や 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 による 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 株（GBK 株）から単離された END 現象陽性株（GBK_E^{+}株）と陰性株（GBK_E^{-}株）を用いて、リバースジェネティクス法により、GBK 株における END 現象に関わる BVDV タンパクを同定した。これら 2 株の間には 4 ヶ所のアミノ酸の違いのみが存在し、その中で非構造タンパク質である N^{pro}の亜鉛結合性 TRASH モチーフにあるアミノ酸の違いが END 現象やインターフェロン調節因子 3 の分解を介した I 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。遺伝子データベース上の各遺伝子亜型の株を選択して、同領域を比較した結果、1 株を除いて、GBK_E^{+}株と同様のアミノ酸構成であることが確認され、野外では END 現象陽性株が主流であることが示された。

BVD-MD は 1946 年に現在の 1 型（BVDV-1）が病原として同定され、1980 年代後半から 1990 年代に血小板減少症等を引き起こす 2 型（BVDV-2）が流行し、各国で両ウイルス型に対する対策が行われてきた。そして 2004 年にブラジル産の FBS から新たに分離された HoBi-like ウイルス（BVDV-3）は、南米産の FBS やウシから分離され、ワクチンへの新たな迷入因子として着目された。そこで第 III 章では、国内での飼育牛における 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ウシにおける交差反応の有無を検討した。2012 年～2017 年に採取したウシの血液から HoBi-like ウイルスは検出されず、国内侵入の形跡は確認されなかったが、血液試料では高い中和抗体価が検出された。これらのことより、継続的に BVDV-1 や 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で 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 ウイルス対策にも効果的であることが示された。

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重要な成果を提供している。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者小佐々隆志氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。