

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780265

研究課題名（和文） 牛ウイルス性下痢ウイルスの持続感染に係るウイルス間相互反応と自然免疫制御の解明

研究課題名（英文） Studies on virus-host interaction and innate immunity involved in the persistent infection of bovine viral diarrhea virus

研究代表者

青木 博史（AOKI HIROSHI）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：10440067

研究成果の概要（和文）：牛ウイルス性下痢ウイルスは、自然免疫を誘導するウイルスと抑制するウイルスが混在するウイルス集団である。生物性状が相反するそれらウイルスが同じ培養細胞に感染すると、各ウイルスに特有の生物現象は消失するが、自然免疫は各ウイルスの影響を受けながら様々なレベルで起動していた。自然免疫反応が相反するこれらウイルスの同一宿主への感染は自然免疫に動的変化をもたらし、本病の持続感染性に関与していると推察される。

研究成果の概要（英文）：Noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus could be classified to two biotypes, and each virus had existed together in a viral strain. One biotype could up-regulate the innate immunity of host cells, but the other suppressed it. The specific biological property of each virus was reciprocally interfered in the cells co-inoculated with the viruses, but the innate immunity of these cells was activated at various levels while being influenced from control of each virus. Co-infection of these viruses might involve in the persistent infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：牛ウイルス性下痢ウイルス、自然免疫、干渉現象、持続感染

1. 研究開始当初の背景

(1) 妊娠初期の胎子感染によって生まれる牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛は、粘膜病を発症して死亡するまで終生大量のウイルスを排出するため、本疾病の感染拡大や

慢性的汚染の最も重要な危害要因となっている。

(2) 培養細胞に病原性を示さない牛ウイルス

ス性下痢ウイルス（非細胞病原性ウイルス）が、培養細胞の抗ウイルス活性（自然免疫）に係るアポトーシスや1型インターフェロン産生を抑制することが近年報告され、それらが持続感染に関わると推察されている。一方、例外的なウイルス株も数多く存在するため、非細胞病原性ウイルスの1型インターフェロン産生抑制能と持続感染の間に厳密な関係は見出せないとの指摘も数多くある。

(3) 牛ウイルス性下痢ウイルスや豚コレラウイルスなどのペスチウイルスにおける非細胞病原性ウイルスは、ニューカッスル病ウイルスや水胞性口炎症ウイルスなどの異種ウイルスと重感染させた際の生物反応の相異から少なくとも2種類に分類され、それらが同一株内に共存することが知られる。しかし、本病の病態にどのように係わっているかは不明である。

2. 研究の目的

生物反応の異なるウイルスについて、次の3項目を重点的に解析することにより、牛ウイルス性下痢ウイルスの持続感染のメカニズムを解明することを目的とする。

(1) 同一株内に共存する生物反応の異なるウイルスがそれぞれ単独で宿主細胞に感染した場合の自然免疫反応を分子レベルで解析し、ウイルス株の集団特性を明らかにする。

(2) 同一株内に共存する生物反応の異なるウイルスが混在して宿主細胞に感染した場合の自然免疫反応を分子レベルで解析し、宿主反応の変動パターンを明らかにする。

(3) 同一株内に共存する生物反応の異なるウイルスのそれぞれの遺伝子を明らかにし、自然免疫制御に関与する責任遺伝子領域を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ニューカッスル病ウイルスの増殖増強および水胞性口炎症ウイルスの細胞変性効果阻止を指標としたウイルス分類法を用いて、非細胞病原性牛ウイルス性下痢ウイルスを生物学的に分類するとともに、それぞれを単離する。単離した各ウイルスを培養細胞に感染させ、宿主細胞の自然免疫に関与する蛋白質（インターフェロン調節因子3、インター

フェロンβ、インターフェロン刺激遺伝子群など）の発現を定量的RT-PCRを用いたmRNA定量により解析する。

(2) 単離したそれぞれのウイルスの全塩基配列を決定し、生物反応を相異に関与する責任アミノ酸領域を探索する。また、決定した全塩基配列をもとに、牛ウイルス性下痢ウイルスのリバースジェネティクス系の確立を行う。

(3) 生物反応の異なる各ウイルスを識別する定量的ウイルス遺伝子検出法を確立し、それらウイルスが重感染した際のウイルス複製効率を解析する。

(4) 生物性状の異なる2種類のウイルスを同一の培養細胞に重感染させ、自然免疫に関与する遺伝子の発現の変化を解析する。

4. 研究成果

(1) 単離したウイルスのうち、水胞性口炎症ウイルスの細胞変性効果を阻止するウイルス（END陰性ウイルス）が培養細胞に単独感染すると、インターフェロンβやインターフェロン調節因子3のmRNA量に変動はないものの、インターフェロン刺激遺伝子群（Mx1、OAS-1、bISG15など）のmRNA量が感染6時間後から顕著に増加した（図1）。

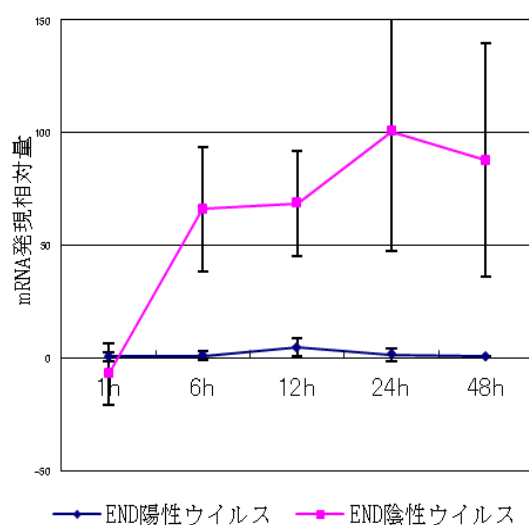


図1 IFN 刺激遺伝子 Mx1 の mRNA 量

また、その感染細胞は少なくとも14日間に亘って水胞性口炎ウイルスの細胞変性効果を強固に阻止した。

単離したウイルスのうち、ニューカッスル病ウイルスの増殖を増強するウイルス（END陽性ウイルス）が培養細胞に単独感染すると、自然免疫に関与するインターフェロン刺激遺伝子群のmRNA量は非感染細胞のそれとほとんど変わらなかった（図1）。

これらのことから、牛ウイルス性下痢ウイルスの株内には、自然免疫を誘導するEND陰性ウイルスと自然免疫を抑制するEND陽性ウイルスという性状が相反するウイルスが混在することが明らかとなった。また、水胞性口炎ウイルスの細胞変性効果を阻止するEND陰性ウイルス感染細胞の持続的かつ強力な抗ウイルス作用には、インターフェロン非依存性の経路が存在する可能性もあると考えられた。

(2) 自然免疫を抑制するEND陽性ウイルスと誘導するEND陰性ウイルスを同一の培養細胞に同時に感染させたときのインターフェロン刺激遺伝子Mx1のmRNAを測定した。その結果、一定量のEND陰性ウイルスが含まれるとMx1のmRNAが検出されるが、END陽性ウイルスがEND陰性ウイルスより100倍以上多く含まれた場合には検出できなくなった（図2）。このことから、それぞれのウイルスがどの程度の割合で混在するかによって培養細胞の自然免疫反応が大きく変動すると考えられた。

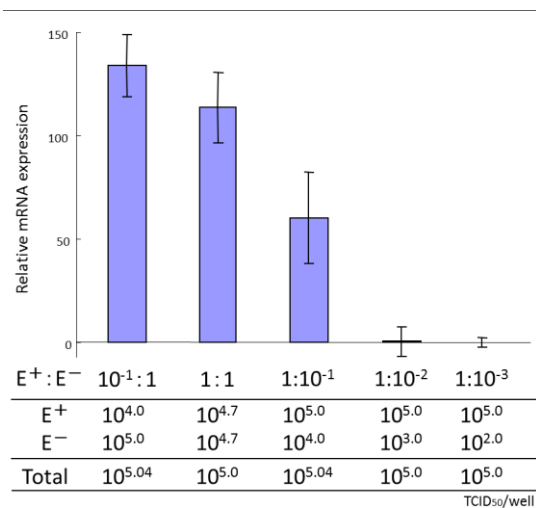


図2 同時感染時のMx1のmRNA量

E⁺: END陽性ウイルス、E⁻: END陰性ウイルス
Total: 細胞に感染させたウイルスの総量

(3) END陽性ウイルスまたはEND陰性ウイルスを感染させた培養細胞に、細胞に病原性を示す牛ウイルス性下痢ウイルス（細胞病原性ウイルス）を重感染させたところ、細胞変性効果が阻止された。しかし、自然免疫が抑制されているEND陽性ウイルス感染細胞では、重感染した細胞病原性ウイルスに対する自然免疫が起動し、一方の自然免疫が起動しているEND陰性ウイルス感染細胞ではMx1のmRNA量がわずかに低下した。すなわち、細胞病原性ウイルスによる細胞変性効果が阻止されていても、そのウイルスによる自然免疫制御能は起動していることが明らかとなった。各ウイルスの混在程度によって宿主細胞の自然免疫に与える影響は様々に変化する可能性が示唆された。

(4) 生物性状の異なる牛ウイルス性下痢ウイルスが同一の培養細胞に感染した際に、それぞれのウイルスRNAの複製状況を把握する定量的RT-PCR法の確立を試みた。具体的には、牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝子型1及び2にそれぞれ特異的な定量的RT-PCR法を確立し、それぞれの遺伝子型のEND陽性ウイルスとEND陰性ウイルスを組み合わせて培養細胞に重感染させ、評価した。その結果、各ウイルスを同時に感染させた培養細胞から、それぞれのウイルスRNA量を特異的に検出および測定することが確認された。

(5) END陽性ウイルスが自然免疫を抑制するにもかかわらず、後から感染させた細胞病原性牛ウイルス性下痢ウイルスの細胞変性効果を阻止することから、ウイルス-宿主相互反応や同種ウイルス同士の干渉（同種ウイルス干渉）に別のメカニズムが存在する可能性が生じた。そこで、本研究で確立したウイルス遺伝子型識別定量的RT-PCR法を併用しながら同種ウイルス干渉における各ウイルスの複製とインターフェロン刺激遺伝子Mx1のmRNA量を解析した。その結果、後から感染するウイルスに特有の生物現象（CPEまたはEND現象など）は阻止されるにもかかわらず、そのウイルスの培養細胞内への侵入とウイルスRNA複製が成立しており、さらに自然免疫制御も抑制的な影響をうけながらも起動していることが明らかとなった（表1及び2）。

(6) 同一ウイルス株に由来するEND陽性ウイルスとEND陰性ウイルスの全塩基配列を決定

し、推定アミノ酸配を比較した。その結果、11種類のウイルス蛋白質のうち4種類のいずれか又はその組み合わせが自然免疫反応の相違に関係している可能性があることが推定された。また、全塩基配列を決定したEND陰性ウイルスの約12,500塩基の相補DNAをmRNA合成可能なプラスミドベクターに挿入し、リバーズジェネティクス系を確立した。

表1 細胞病原性ウイルスが重感染した時のIFN刺激遺伝子Mx1 mRNAとウイルスRNAの変動

初感染 ウイルス	重感染 ウイルス	CPE	mRNA		
			Mx 1	初感染 ウイルス	重感染 ウイルス
NCP		-	-	+	-
	CP	+	+	-	+
NCP	CP	-	↓	→	↓

NCP：細胞病原性のないウイルス、CP：細胞病原性のあるウイルス、CPE：細胞変性効果、+：重感染ウイルスのCPE出現またはRNA検出、-：重感染ウイルスのCPE消失またはRNA不検出、→：RNA量に変化なし、↓：RNA量が低下

表2 END陽性ウイルスとEND陰性のウイルスが重感染した時のMx1 mRNAとウイルスRNAの変動

初感染 ウイルス	重感染 ウイルス	生物 現象	mRNA		
			Mx 1	初感染 ウイルス	重感染 ウイルス
END陰		-	+	+	-
	END陽	+	-	-	+
END陰	END陽	-	↓	→	↓
END陽		-	-	-	+
	END陰	+	+	+	-
END陽	END陰	-	↓	↓	↓

END陽：END陽性ウイルス、END陰：END陰性ウイルス
+：重感染ウイルスの生物現象出現またはRNA検出、
-：重感染ウイルスの生物現象阻止またはRNA不検出、
→：RNA量に変化なし、↓：RNA量が低下

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

Mahmod MUHSEN, Hiroshi AOKI, Hidetoshi IKEDA, Akio Fukusho, Biological properties of bovine viral diarrhoea virus quasispecies detected in RK-13 cell line,

Archives of Virology, 査読有, 158(2), 2013, 753-763.
DOI:10.1007/s00705-012-1538-x

[学会発表] (計9件)

- ① 青木博史、牛ウイルス性下痢ウイルス同種干渉における重感染ウイルスの複製と自然免疫応答、第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月15日、岩手大学
- ② 青木博史、END陰性の牛ウイルス性下痢ウイルス感染及び同種ウイルス干渉時の自然免疫関連 mRNA 解析、第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2011年11月11日、国立感染症研究所
- ③ 青木博史、生物性状の異なる牛ウイルス性下痢ウイルスを用いた自然免疫関連 mRNA の解析、第152回日本獣医学会学術集会、2011年9月20日、大阪府立大学
- ④ 青木博史、牛ウイルス性下痢ウイルスの宿主～牛以外の動物における感染と実態～、第151回日本獣医学会学術集会、2011年3月30日、東京農工大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 博史 (AOKI HIROSHI)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号：10440067

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：