農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

低病原性ウイルスによる口蹄疫に対する新たな診断技術の確立に関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2019-03-22
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 森岡, 一樹
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002242

研究紹介

学位取得者の論文要旨

低病原性ウイルスによる口蹄疫に対する新たな診断技術の確立に関する研究

森岡一樹

Studies on Development of New Diagnosis Methods for Foot-and-Mouth Disease Caused by Low Pathogenic Virus

Kazuki MORIOKA

口蹄疫は，牛，豚，緬山羊など偶蹄類動物の口腔，鼻部および蹄部に水疱を形成し，歩行障害および摂食障害を生じる伝染病である。本病の致死率は幼若動物を除き高くないが，その伝染力の強さから，経済的被害は莫大であり，世界的に最も警戒すべき家畜の伝染病である。

2000年に我が国で92年ぶりとなる口蹄疫の発生が黒毛和種牛飼養農家で起きたが，発生農場における症状の特徴は，水疱などの症状を示さないもの，または認められても口腔内における僅かな潰瘍など，従来の口蹄疫の症状と比較して明らかに病原性の低いものであった。したがって，症状摘発から病原診断を行う通常の病性鑑定法とは異なり，全国規模の抗体サーベイランスによる口蹄疫の摘発と清浄性の確認が同時並行に5万頭以上の牛に対し行われた。その結果，4戸の農家に口蹄疫が確認され，3戸目の黒毛和種牛のプロバング材料からO/JPN/2000株が分離された。本株を用いた動物感染実験の結果，豚では典型的な水疱形成などが認められたが，その程度は低く，黒毛和種牛では野外例と同様の口腔内粘膜に小さな潰瘍を呈したのみで，水疱形成などを示さなかった。一方，ホルスタイン種，山羊および緬羊はほとんど感受性を示さなかった。このような低病原性を示す口蹄疫ウイルスは，2001年の英国の口蹄疫でも報告されており，その摘発法の開発が国際的な重要課題となっている。

まず，O/JPN/2000株の持つ低病原性について解析を行った。プラック法を用いてウイルスのクローニングを行ったところ，分離直後から小型と大型の表現形に4：6の割合で分かれ，大型のプラックを示すウイルス（LPV），小型のプラックを示すウイルス（SPV）をそれぞれクローニングした。これら2つのウイルスと典型的な病原性を示す英国野外株（O_1 BFS 1860株）を乳飲みマウスおよび豚に接種し，病原性の比較を行った。その結果，SPVおよびLPVともにO_1 BFS 1860株に比べて病原性が弱く，特にSPVでは乳飲みマウスおよび豚に対して著しく病原性が弱いことが明白となった。これらのウイルスのアミノ酸配列を比較した結果，SPVはVP3の56番目においてアルギニンを，SPVおよびLPVはVP3の60番目においてアスパラギン酸をコードしており，これらのアミノ酸は培養細胞に馴化した口蹄疫ウイルスで報告されているものと同一であった。また，豚の血液および唾液を用いて，ウイルス血症およびウイルス排泄の程度を調べた結果，SPVおよびLPV接種豚とも著しく低いことを確認し，極期でも，ウイルス量が現在用いられている間接サンドイッチELISA（IS-ELISA）の検出限界量に達しないことが判明した。したがって，このような低病原性の口蹄疫が発生した際には，ウイルスを多量に含む水疱液および水疱上皮の採材が困難であることが予想されるため，高特異性および高感度に口蹄疫ウイルスを検出するIS-ELISAに代わる方法が必要であることなどの課題が浮き彫りとなった。

IS-ELISAの問題点を解決すべく，水疱液および水疱上皮だけでなく低病原性の口蹄疫にも対応するために血液および唾液等の検査材料にも応用可能で，特異性および感度の優れた抗原検出ELISA法の開発を試みた。まず，アジア地域で流行の続いている血清型O，A，Asia1に対応するために，それらの血清型に対するモノクローナ

ル抗体（MAb）を作製し，ELISA 法に応用することでモノクローナル抗体サンドイッチ ELISA（MSD-ELISA）を開発した。口蹄疫ウイルスの場合，同一血清型間でも抗原性のバリエーションが広く，ワクチン選定および抗原抗体反応を利用した診断において，株間の適合性が問題となる。そこで，複数の血清型に反応する MAb を使用した MSD-ELISA（MSD-ELISA/MS）で血清型 O，A，C，Asia1 に含まれるすべてのウイルス抗原の検出を可能とし，株間の抗原性の問題を解決する一方，上記各血清型に特異的な MAb を用いることにより，特異性および感度に優れた MSD-ELISA/SS を開発した。MSD-ELISA は IS-ELISA と比較して，検出感度，特異性および迅速性に優れているだけでなく，血液や唾液からも検出可能であることから，水疱の出現以前の発熱等の前駆症状の段階から診断が可能となり，早期防疫に資するものと考えられた。

次に抗体検出法の開発を行った。口蹄疫が発生すると当該国内の畜産業および対外国貿易に多大な影響を引き起こすことから，一刻も早い清浄国への復帰が強く求められる。そのため，発生規模によっては全国規模の血清サーベイランスによる清浄性の確認も必要となる。さらに，2000 年の我が国おける口蹄疫のように，低病原性株が原因で臨床症状に乏しい場合などは，症状確認後の病原診断といった通常の病性鑑定に代わり，抗体検出による診断法に頼らざるを得ないが，現行の液相競合 ELISA（LPBE）では非特異反応が高頻度に生じるため，血清サーベイランスおよび診断に支障をきたす場合がある。このような現状を踏まえ，アジアで最も頻繁に流行し，抗原性が多様な血清型 O に対する MAb サンドイッチ液相競合 ELISA（M-LPBE）を開発した。作製した MAb の中から，血清型 O のウイルスに対して，広くウイルス中和活性を有し，最も相互の競合を示さない 2 つの中和 MAb をウイルス捕捉抗体およびウイルス検出用のペルオキシダーゼ標識抗体として用いた。M-LPBE は日本国内における牛および豚の野外陰性血清に対して，極めて高い特異性を示し，LPBE において強い非特異反応を示した検体においても完全に非特異反応を抑えた。また，O/JPN/2000 株に対する牛および豚の感染経過血清から中和試験と相関して抗体を検出でき，ワクチン接種個体血清および異なるトポタイプの感染経過血清からも同様に抗体を検出することが可能であった。したがって，M-LPBE は，LPBE およびウイルス中和試験の欠点を補うものであり，抗体サーベイランスや低病原性口蹄疫などの診断に極めて有効であると考えられた。

口蹄疫ウイルスの伝染力は非常に高いものであり，極めて迅速かつ正確な診断が求められている。本論文では，近年特に診断で問題となる低病原性の口蹄疫ウイルスの新しい知見を加えるとともに，今まで困難とされた低病原性口蹄疫ウイルス抗原の高感度検出法の開発および特異性の高い抗体検出法の開発を行った。これにより，口蹄疫の診断およびサーベイランスを迅速かつ正確に行うことが可能となり，本病の防疫，発生後の清浄化の早期実現とともに，検疫強化による侵入および蔓延の防止に貢献できるものと思われる。

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
博士（獣医学）
平成 22 年 3 月 11 日授与