

学位論文題名

Development of Diagnostic Methods for Bovine Herpesvirus 1 Infection

(ウシヘルペスウイルス1感染症の診断法の開発)

学位論文内容の要旨

ある特定の疾病を予防制圧するための計画を策定するには、それに先立ってまず多数の動物の集団に発生する疾病の疫学とその制圧対策の問題点を広く調査、検討する必要がある。そこで、ザンビアにおける家畜のウイルス病の分布とその制圧対策の現状ならびに極くわずかながらこれまでに行われた研究について収集できる情報全てをレビューした。調査の結果、次のことが明らかになった。ザンビアでは口蹄疫が現在もなお牛産業に深刻な被害をもたらしており、これまで5血清型のウイルスが分離されている。他の届出伝染病としては、狂犬病、リフトバレー熱、ラムビイスキン病、アフリカ馬疫、ブルータング、アフリカ豚コレラ、ニューカッスル病、マレック病、鶏痘および伝染性フアブリキウス嚢病が発生している。これらの疾病はその正確な発生頻度はわからないが、全国に蔓延している。さらに、今後、ウイルス病の疫学調査をより広範に、正確にそして迅速に実施する必要がある。そのために、簡便、高感度でかつ特異的な診断法を開発することが必須の課題であると結論された。

上述の調査によって、ザンビアではウシヘルペスウイルス1（BHV-1）感染症が最も発生頻度が高く、牛産業に深刻な被害をもたらしていることが判明した。BHV-1は潜伏感染をして、ストレスによって再活性化されることを繰り返して、ウシ集団内に存続するため、根絶することが困難である。以上の観点から、著者はBHV-1抗原と抗BHV-1抗体を非常に高い感度で、特異的に検出する方法、Immuno-PCRを確立した。この試験法は、Sanoら（1992）の方法に基づいており、ELISA系のウイルス抗原に対する単クローン抗体の特異性とPCRの感度を組み合わせたものである。彼

らの方法における ストレプトアビジン-プロテインAキメラのかわりにビオチン標識抗動物種抗体を用い、これにストレプトアビジンを反応させ、ビオチン標識DNAをインジケーターとして抗原を検出する。BHV-1感染培養細胞上清中の抗原検出感度は Immuno-PCR/Ag が MDBK 細胞 を用いたプラーク形成試験の $10^{3.7}$ 倍、ELISA の $10^{7.0}$ 倍そしてPCRの $10^{6.9}$ 倍であった。このImmuno-PCR 変法を抗BHV-1 免疫ウサギ血清の抗体検出に応用した (Immuno-PCR/Ab) ところ、抗体の検出感度は ELISAの $10^{5.0}$ 倍であった。次に BHV-1 に実験感染させたウシの鼻汁中のウイルス抗原をImmuno-PCR/Ag によって検出することを試みた。その結果、鼻汁中の抗原および血清中の抗体は、試験期間を通じて検出された。感染後21日目の鼻汁は、感染価測定では陰性であったが、Immuno-PCR/Ag によれば、 $1:10^4$ 希釈までウイルス抗原陽性であった。この成績は本法が高い感度と特異性を兼ね備えた試験法であることを示すものである。このようにImmuno-PCRは現在用いられているどの抗原または抗体検出法よりも感度が高いので、BHV-1感染症の診断に利用できるものと結論された。

潜伏感染は特にその診断が困難である。BHV-1の自然宿主における潜伏感染に関してさらに情報を得るため、実験感染牛の鼻汁と諸臓器について、ウイルス分離、PCRおよびImmuno-PCR/Ag法を用いてしらべた。鼻汁中のウイルス価が $10^{4.3}$ TCID₅₀ かそれ以上のサンプルでは、PCR によってウイルスDNAが検出された。鼻汁中のウイルス抗原は、Immuno-PCR/Ag によれば、感染後の検査最終日である19日目まで陽性であった。PCR法によって、感染後22日目のすべてのウシの三叉神経節、卵巣、肺、鼻腔と気管の粘膜、脾臓、前肩甲骨と鼠径リンパ節および末梢白血球にBHV-1 DNAが検出された。一方、これらのウシの骨格筋からはウイルスDNA が検出されなかった。どの臓器からも感染性ウイルスは回収されなかった。これらの成績はBHV-1の潜伏感染に白血球が重要な役割を演じている可能性を示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 高 島 郁 夫
副 査 助 教 授 岡 崎 克 則

学位論文題名

Development of Diagnostic Methods for Bovine Herpesvirus 1 Infection

(ウシヘルペスウイルス1感染症の診断法の開発)

ザンビアにおける家畜のウイルス病の分布とその制圧対策の現状について調査した結果、ウシヘルペスウイルス1 (BHV-1) 感染症、口蹄疫、狂犬病、リフトバレー熱、ラムピイスキ病、アフリカ馬疫、ブルータング、アフリカ豚コレラ、ニューカッスル病、マレック病、鶏痘および伝染性フアブリキウス嚢病が全国に蔓延していることが判明した。ウイルス病の疫学調査をより広範に、正確に実施する必要がある、そのために、簡便、高感度でかつ特異的な診断法を開発することが必須の課題であると結論された。

上述の調査によって、ザンビアでは BHV-1 感染症の発生頻度が高く、被害が大きいことが判明した。BHV-1 は潜伏感染と再活性化を繰り返して、ウシ集団内に存続する。したがって、BHV-1の潜伏感染を検出できる診断法を確立する必要がある。申請者は BHV-1 抗原と抗 BHV-1 抗体を高感度で、特異的に検出する方法として、Immuno-PCR 法を確立した。本法による BHV-1 抗原の検出感度は ELISA の $10^{7.0}$ 倍であった。また抗体の検出感度は ELISA の $10^{5.0}$ 倍であった。BHV-1 に実験感染させたウシの鼻汁および血清中の抗体は、Immuno-PCR 法によって試験期間を通じて、高感度に検出された。感染後 21 日目の鼻汁はウイルス分離試験で陰性であったが、Immuno-PCR では $1:10^{4.0}$ 希釈までウイルス抗原陽性であった。以上の成績は本法が高い感度と特異性を兼ね備えた試験法であることを示すものである。

BHV-1の自然宿主における潜伏感染に関してさらに情報を得るため、4頭の実験感染牛の鼻汁と諸臓器について、ウイルス分離と PCR 法を用いてしらべた。PCR 法によって、感染後 22 日目のすべてのウシの三叉神経節、卵巣、肺、鼻腔と気管の粘膜、脾臓、前肩甲骨と鼠径リンパ節および末梢白血球に BHV-1 DNA が検出された。一方、これらのウシの骨格筋からはウイルス DNA が検出されなかった。どの臓器からも感染性ウイルスは回収されなかった。これらの成績は BHV-1の潜伏感染に白血球が重要な役割を演ずる可能性を示唆している。

以上の成果は、ウイルス病の診断および BHV-1 感染症の理解に大きく貢献する。よって、審査員一同は Aaron S. Mweene 氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものとみとめた。