

平成26年3月18日

平成25年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業
研究実績報告書

課題番号：2406

代替動物を用いたワクチンの有効性確認試験プロトコルの開発

研究期間：平成24年度～平成25年度（2年間）

研究総括者名：明石 博臣

試験研究機関名：東京大学

I. 全体計画

1. 研究目的

牛の流産・胎子死・奇形等の原因としてウイルスは大きな割合を占める。なかでも、節足動物によって媒介されるアルボウイルス感染は、広範な地域で多数の妊娠牛が胎子の異常を示すところから、その経済的な損失は莫大なものとなる。現在、流行性牛異常産の原因として、アカバネウイルス、アイノウイルス、チュウザンウイルス、イバラキウイルスなどが知られているが、これらのウイルス感染症に対するワクチンは既に開発されており、野外で使用されている。しかし、これらのウイルスは変異しやすく、抗原性や病原性の変化が報告されている。従って、現在のワクチンで防御不可能な変異ウイルス出現の危険性がある。また、近年新しいアルボウイルスの分離が報告されており、新種ウイルスによる牛異常産の流行が起こることも十分考えられる。

もし、変異ウイルスや新しいアルボウイルスの流行が起こると、現行のワクチンでは対処できないため、迅速なワクチン開発が必要となる。しかし、ワクチンの認可には、有効性、即ち十分な抗体付与能と感染または発症防御能が必要であることはもちろん、対象動物に対する安全性も必要とされる。対象動物に対する有効性、安全性の最終的な評価は野外における臨床試験で確認されることとなるが、野外における検証の前に実験室内レベルで有効性、安全性を確認することが求められる。牛異常産の場合、対象動物は当然牛であって、しかも有効性、安全性を確認するためには妊娠牛を用いた試験が要求される。しかし、妊娠牛を一定以上の頭数使用した動物試験は、試験を行う施設や手間、必要とされる価格の面で、ワクチン開発を行おうとする者に多大な負担となる。

本研究では、牛異常産の原因として古くから知られ、既に不活化および生ワクチンが開発および使用されている実績を持つアカバネ病と起因ウイルスであるアカバネウイルスについて、妊娠牛の代わりに代替動物を用いてブリッジングが可能かどうかを科学的に検証し、宿主動物における有効性、安全性の評価を行うことの妥当性を探るものである。

2. 研究内容

(1) 中課題1：代替動物を用いた感染試験系モデルの確立

妊娠代替候補動物をワクチン親株によって攻撃することで、宿主動物である牛の代替動物を絞り込む。

1) 小課題1：妊娠代替候補動物を用いた感染試験

ワクチンの有効性を確認するためには、妊娠牛にワクチン親株を接種し、胎子に対する影響を見ることが必要となる。しかし、ウイルスの病原性は継代を繰り返すことにより変化することが知られている。このため、攻撃試験に使用するウイルス株として、動物医薬品検査所が配布しているワクチン親株であるアカバネウイルス OBE-1 株の病原性についてマウスおよび代替動物の候補であるシバヤギを用いて確認する。このため、初年度はまず、哺乳および成マウスを用いて脳内接種および腹腔内接種による動物医薬品検査所配布アカバネウイルス (VB1201) の病原性を、当教室保存アカバネウイルス分離株と比較検討する。また、代替動

物の候補として実験動物としても確立している妊娠シバヤギを用い、ワクチン親株の胎盤通過能と胎子に対する影響を比較検討する。同時に、ウイルスの高感度検出法として、**real-time PCR** の手法確立を行う。

実験場所である一般財団法人生物科学安全研究所は、わが国では数少ない動物用医薬品等の開発、承認申請に係わる各種受託試験を行う機関であり、ワクチン等の安全性や有効性に関する試験に深い経験を有する。また、試験施設や試験手順も **GMP**、**GLP**、**GCP** の各種基準に適合している。さらに、職員は感染性微生物の取扱にも習熟している所から、実験場所として最適であると考えられる。

(2) 中課題 2：代替動物を用いたワクチンの有効性確認試験プロトコルの確立

代替動物を用いてアカバネ病ワクチンの有効性、安全性が評価できるかどうかについて検証し、評価が可能な場合、代替動物を用いたワクチン有効性確認試験プロトコルを確立する。

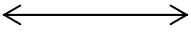
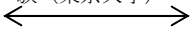
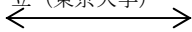
1) 小課題 1：代替動物を用いた既存ワクチン有効性確認試験

中課題 1 の小課題 1 において検討したシバヤギをワクチンで免疫し、妊娠させた後、攻撃試験を行う。対照としてワクチン非接種群を置く。胎子感染を同様に既に確立したウイルス検査法に従って検査し、攻撃ウイルスの胎子移行の有無について検討する。

2) 小課題 2：代替動物を用いたワクチン有効性確認試験プロトコルの確立

中課題 2 の小課題 1 で得られた結果から、牛で定められているワクチンの有効性評価法が代替動物においても同等に機能することを確認するとともに、代替動物の成績が牛における有効性確認に外挿できることを立証することによって「代替動物を用いたワクチン有効性確認試験プロトコル」を確立する。

3. 年次計画

項目	平成24年度	平成25年度
1. 代替動物を用いた感染試験系モデルの確立 (1) 妊娠代替候補動物を用いた感染試験 2. 代替動物を用いたワクチンの有効性確認試験プロトコルの確立 (1) 代替動物を用いた既存ワクチン有効性確認試験 (2) 代替動物を用いたワクチン有効性確認試験プロトコルの確立	代替候補動物を用いた感染試験 (東京大学) 	代替動物を用いた既存ワクチンの有効性確認試験 (東京大学)  代替動物を用いた有効性確認プロトコルの確立 (東京大学) 
所要経費 (合計)	15,000 千円	13,300 千円

4. 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者		エフォート (%)
研究総括者	東京大学	明石博臣		4 5
1. 代替動物を用いた感染試験系モデルの確立	同上	○	明石博臣	前出
(1) 妊娠代替候補動物を用いた感染試験	同上	△	明石博臣	前出
2. 代替動物を用いたワクチンの有効性確認試験プロトコルの確立	同上	○	明石博臣	前出
(1) 代替動物を用いた既存ワクチン有効性確認試験	同上	△	内田和幸	1 5
(2) 代替動物を用いたワクチン有効性確認試験プロトコルの確立	同上	△	明石博臣	前出

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

Ⅱ. 研究実績報告

1. 中課題1：代替動物を用いた感染試験系モデルの確立

(1) 成果の概要

工程表	進捗状況・成果
動物医薬品検査所が配布しているワクチン親株であるアカバネウイルス OBE-1 株の病原性についてマウスを用いて確認する（小課題1 関連）。	動物医薬品検査所からウイルスを購入し、接種試験用ウイルスを準備した。このウイルスを用いて、マウスの感染試験を行った。当該ウイルスはマウスに強い神経病原性を示すことが示された（図1～4）。 <u>（平成24年度）※1</u>
↓	
動物医薬品検査所配布ウイルスのマウスにおける病原性を再確認する。	平成24年度に行った配布標準ウイルスのマウスにおける病原性を再確認するため、平成25年度において同様の試験を行った。 <u>（平成25年度）※2</u>
↓	
同時にウイルス遺伝子検出法の検討を行い、簡便かつ高感度な胎子感染検出法を確立する（小課題1 関連）。（平成25年度）	【追】平成25年度に行う計画であったが、平成24年度に予備的に real-time PCR による遺伝子検出を検討した。平成25年度はウイルス接種動物および胎子材料を用いて、最適な検出法を検討した。 <u>（平成24, 25年度）※3</u>
↓	
動物医薬品検査所配布 OBE-1 株の病原性が確認された後、まず妊娠シバヤギを用い接種試験をする。（平成24年度）	【追】当初計画にはなかったが、動物医薬品検査所から購入した OBE-1 株と実験室で継代された同株および Iriki 株の表面糖蛋白質 Gc 遺伝子の塩基配列を比較し、動物医薬品検査所配布ウイルスの遺伝学的、免疫学的性状を確認した（表1）。 <u>（平成25年度）※3</u>
↓	
	性周期を確認したシバヤギ5頭に種付けを行い、試験用ウイルスを接種し、13日後に解剖した。その結果、妊娠が確認できたのは1頭のみであった。非妊娠、妊娠シバヤギおよび胎子には病変およびウイルス遺伝子は検出されなかった。 <u>（平成24年度）※4</u>

配布標準ウイルスの妊娠シバヤギ接種試験を再度行う。この際、ウイルスの調整方法および力価について改善する。また、性周期の同期化を行わず、自然発情を待ち種付けを行う。(平成 25 年度)	性周期を確認し、種付けしたシバヤギ 5 頭にウイルスを接種し、21 日後に解剖した。5 頭全てが妊娠し、胎子数は 1～3 頭であった。親シバヤギおよび胎子の材料からウイルス遺伝子は検出できなかったが、病理学的検査ではウイルス抗原が検出された(表 2、図 5 および 6)。(平成 25 年度) ※ 5
成果目標：動物医薬品検査所配布 OBE-1 株の病原性を確認し、ワクチンの有効性評価における攻撃ウイルスとして使用可能かどうか検証する。代替候補動物をワクチン親株によって攻撃することで、代替動物によるワクチンの有効性評価が可能か検証する。	

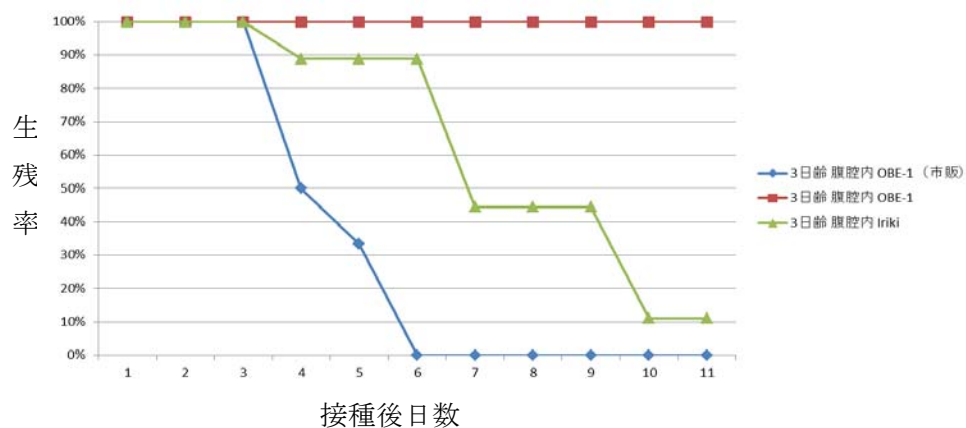
＜成果の概要の補足＞

※ 1：動物接種用攻撃ウイルス（アカバネウイルス OBE-1 株：動物医薬品検査所配布標準製剤 VB1201）を購入後、ハムスター肺継代培養細胞（HmLu-1 細胞）を用いて増殖させたところ、力価は 4.1×10^6 PFU/ml および 5.65×10^6 PFU/ml であった。このため、超遠心で濃縮し 3.75×10^7 PFU/ml の力価を得た。この濃縮ウイルスをシバヤギの接種材料とした。マウスの接種には、初回増殖ウイルスを当てた。高力価のウイルスを得るために、ウイルス液の調整を繰り返し行ったところ、 8.0×10^7 PFU/ml のウイルスストックが得られたため、平成 25 年度の接種試験には濃縮せず接種した。

マウスを用いた攻撃用ウイルス病原性確認試験

動物医薬品検査所配布標準製剤 VB1201 の病原性を確認するため、マウスを用いて東京大学でクローニングを行ったアカバネウイルス OBE-1 株および強い神経病原性を示す Iriki 株との比較を行った。用いたマウスは 3 日齢および 8 週齢の BALB/c 雄で、腹腔内接種 (ip) と脳内接種 (ic) を行った。3 日齢マウスには ip および ic、8 週齢マウスには ic のみを用いた。ウイルス量は ip の場合 5×10^4 PFU/匹、ic では 2.5×10^3 PFU/匹であった。

図 1：3 日齢マウスの腹腔内接種試験成績



注：動物医薬品検査所配布標準ウイルスは市販と記載し、記載のないものは研究室でクローニング済みのウイルス（以下同様）

図 2：3 日齢マウスの大脳皮質内接種試験成績

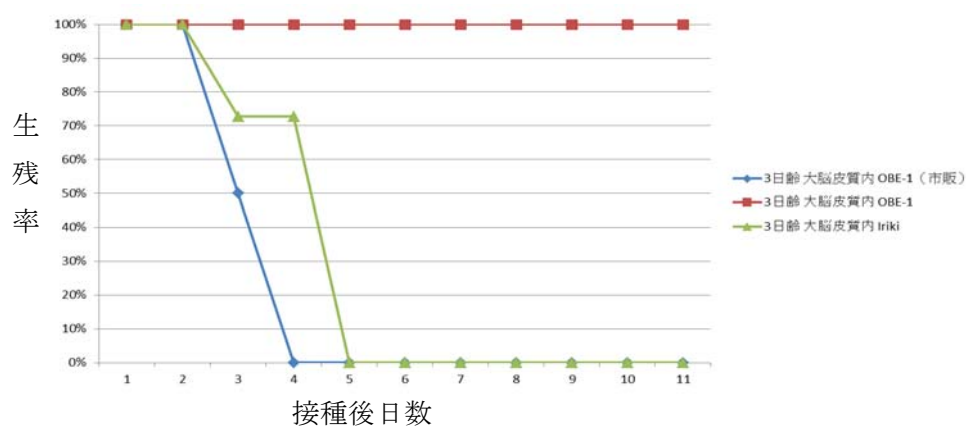


図 3：8 週齢マウスの大脳皮質内接種試験成績

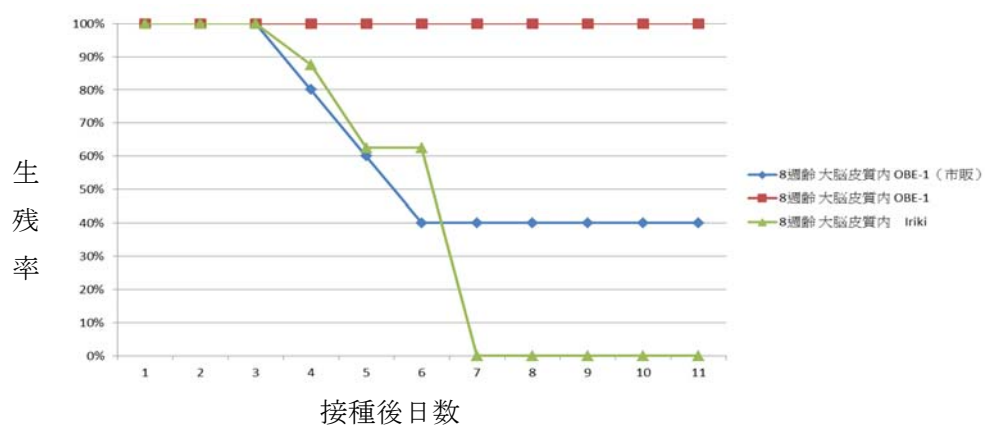
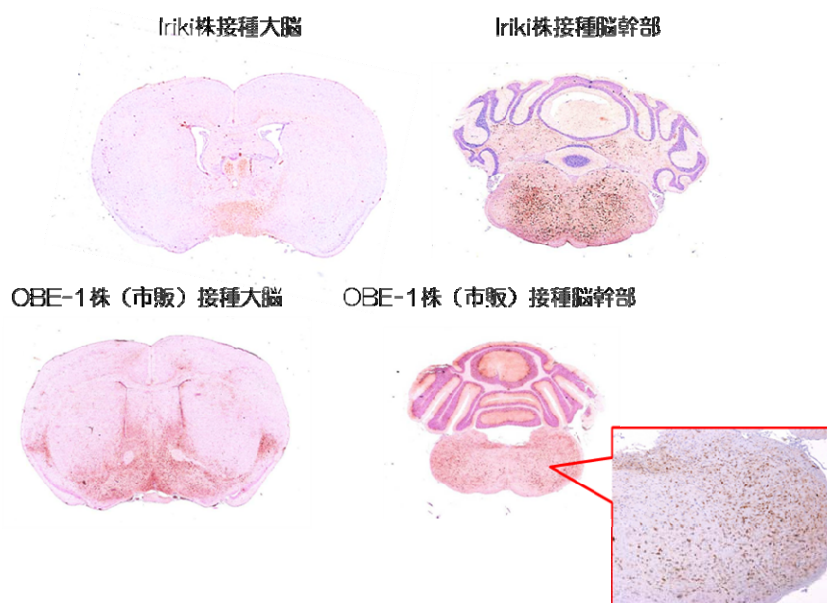


図 4：ウイルス接種マウス中枢神経の病理学的解析



注：褐色部分はウイルス抗原の存在を示す。

動物医薬品検査所配布標準ウイルスをマウスの腹腔内および大脳皮質内に接種したところ、マウスに強い病原性を示した。中枢神経領域におけるウイルス抗原の分布および抗原量は、牛に強い神経病原性を示すことが報告されている Iriki 株のそれとほぼ同等であった。今回使用した研究室保存の OBE-1 株および Iriki 株はクローニングを行ったため継代を繰り返しており、病原性が減弱していると考えられるところから、動物医薬品検査所配布標準ウイルスは、分離当初の病原性を保持していると考えられ、動物攻撃用ウイルスとして使用可能であることが示された。

※ 2： マウスにおける攻撃用ウイルス病原性再確認試験

平成 24 年度に動物医薬品検査所配布標準ウイルスのマウスにおける病原性確認試験を行ったが、配布標準ウイルスはマウスに強い病原性を示し、Iriki 株の神経病原性とほぼ同等であり、当教室継代の OBE-1 株よりはるかに強い病原性を示した。この成績を確認するため、平成 24 年度と同様の試験を行い、病原性について再確認した。平成 25 年度の試験においても、配布標準ウイルスは当教室継代の OBE-1 株より強い病原性を示し、その程度は Iriki 株のそれとほぼ同等であった。このことから、配布標準ウイルスはマウスに対し強い神経病原性を持つことが再確認された。

※ 3： 動物医薬品検査所配布標準ウイルス遺伝子検出法の検討およびウイルス表面糖蛋白質遺伝子配列の確認

動物医薬品検査所配布標準ウイルスの高感度遺伝子検出法として、real-time PCR

の手法を検討したところ、nested PCR とほぼ同等の感度が得られた。このため、シバヤギ材料からの遺伝子検出には real-time PCR を用いることとした。しかし、後述のごとく、母シバヤギおよび胎子材料からアカバネウイルス遺伝子を検出することは出来なかった。real-time PCR は既報の OBE-1 株塩基配列をもとに開発されているため、配布標準ウイルスの Gc 遺伝子全塩基配列を決定し、当教室保存 OBE-1 (OBE-1a) および Iriki 株のそれと比較した。また対照として、データベースに登録されている OBE-1 株および JaGAR39 株の配列とも比較した。表 1 に示すとおり、配布標準ウイルスと教室保存 OBE-1 株の Gc 塩基配列および推定されるアミノ酸配列の相同率は、それぞれ 96% および 97% であった。これに対し、配布標準ウイルスとアカバネウイルス代表株の JaGAR39 株との相同率は、塩基配列およびアミノ酸配列とも 99% の相同性を示した。このことは、ウイルスの継代が塩基配列の変異に及ぼす影響の強さを示している。

表 1: 標準配布 OBE-1 株 Gc 遺伝子配列と教室保存株配列の比較

ウイルス株	OBE-1 データベース	OBE-1a 教室保存	VB1201 市販標準	JaGAR39 データベース	Iriki 教室保存
アミノ酸配列一致率 (Gc:936 アミノ酸)					
OBE-1		99%	97%	97%	94%
		935/936*	913/936	914/936	890/936
OBE-1a	99%		97%	97%	95%
	2810/2811		914/936	915/936	891/936
VB1201	95%	96%		99%	95%
	2698/2811	2699/2811		935/936	893/936
JaGAR39	95%	96%	99%		95%
	2698/2811	2699/2811	2808/2811		894/936
Iriki	89%	89%	90%	90%	
	2521/2811	2522/2811	2532/2811	2532/2811	
塩基配列一致率 (Gc 遺伝子:2811 塩基)					

※935/936 は 936 アミノ酸残基の内 935 アミノ酸残基が一致したことを示す。塩基配列も同様

※4: 妊娠シバヤギにおける接種試験

性周期の同期化を行ったシバヤギ 5 頭に種付けをし、種付け後 24~26 日目に 3.75×10^7 PFU のウイルスを接種した。接種時の体重は 15.2~23.2 kg であった。ほとんどのシバヤギは解剖時まで緩やかな体重増加を示した。体温は、概ね 38℃~39℃

の間に上下を繰り返したが、1 頭のみ接種時と接種後 2 日目に 39.4℃を示した。胎子への移行ルートを探るため、接種後 13 日目に解剖した。ウイルス接種前に妊娠確認が出来なかったため、解剖時に検査したところ、1 頭のみが妊娠していた。非妊娠シバヤギと妊娠シバヤギおよびその胎子材料のウイルス抗原局在部位の探索、遺伝子検査、病理組織学的検査を行ったところ、ウイルス抗原および遺伝子は検出されず、病理学的変化も確認されなかった。中和試験によって、接種後 7 日、13 日（解剖時）の抗体価を測定したところ、7 日目に 2～4.8、13 日目に 23～53.8 と抗体価の上昇が見られ、ウイルス感染が確認された。

※5：妊娠シバヤギにおける接種再試験

平成 24 年度はウイルス力価が低かったため、超遠心で濃縮したウイルスを使用したが、胎子へのウイルス感染が確認できなかった。このため、平成 25 年度は動物医薬品検査所から入手した後、1 回継代し、高力価が得られたウイルス液を濃縮せず使用した。シバヤギ 5 頭の性周期を確認し、種付け後、23 日～40 日目に 8.0×10^7 PFU のウイルスを接種した。ウイルス接種後、21 日目に全頭解剖を行った。全てのシバヤギが妊娠し、1 頭あたり 1～2 頭の胎子が確認された。母シバヤギおよび胎子の材料を採取し、一部はウイルス検出に供し、残りを病理組織学検査に用いた。real-time PCR によって、母獣の胎盤および白血球と胎子の脳、腹腔諸臓器（区別できた場合、区別の不可能な材料では胎子材料として検査）、胎盤（母胎盤と区別可能な場合）から遺伝子の検出を試みたが、検出されなかった。病理組織学的検査では 1 頭の母獣および胎子材料からウイルス抗原が検出されなかったが、他の 4 頭の胎子から抗原が検出された（表 2）。病理組織学的には、胎盤や胎子の脳組織のいずれにも実質細胞の壊死や炎症反応は認められなかった。アカバネウイルス抗体による免疫染色では、ほぼ正常な構造を維持した胎盤の栄養膜細胞、脳の脈絡膜上皮を中心にウイルス抗原が少量分布していた（図 5 および図 6）。これらの抗原の分布パターンには、ワクチン接種の有無による相違は認められなかった。これに対し、real-time PCR では病理学的検査で陽性を示した材料から遺伝子が検出されなかった理由として、胎子材料では採材の際病理組織の採取を優先し、残りを遺伝子検査に当てたためと、ウイルス攻撃後 21 日経過しており、ウイルス量自体が減少していた可能性が考えられる。

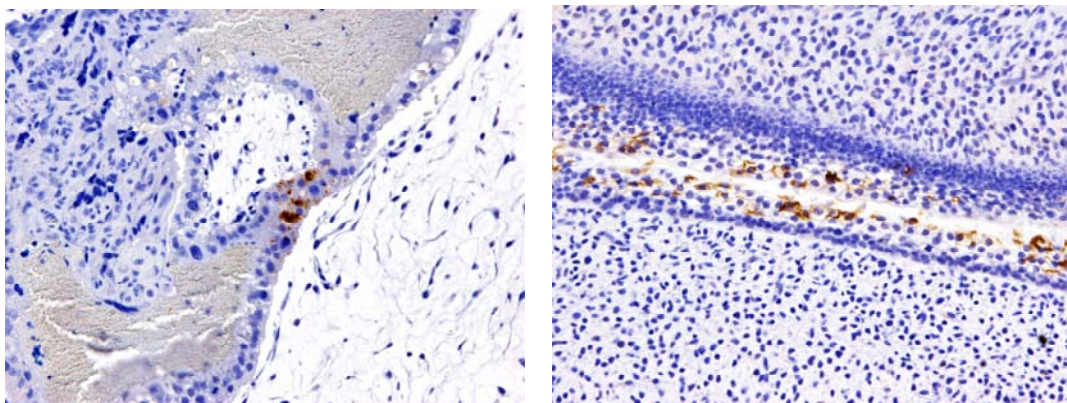


図 5. ワクチン未接種の個体（Y79）の胎盤組織（左）と胎子脳組織（右）におけるウイルス抗原の分布。それぞれ少量のウイルス抗原が胎盤と脳組織に分布する。

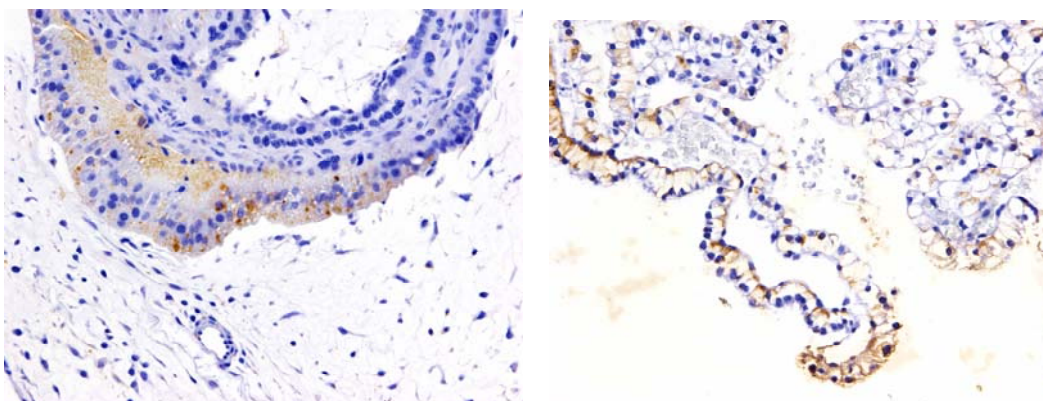


図 6. ワクチン接種個体（Y99）の胎盤組織（左）と胎子脳脈絡膜（右）におけるウイルス抗原の分布。それぞれ少量のウイルス抗原が胎盤と脳組織に分布する。

表 2：妊娠シバヤギ攻撃試験の結果

ワクチン 接種	個体番号	種付け時 年齢	ウイルス接 種時胎齢	剖検時 胎齢	胎子数	ウイルス抗原陽性部位	
						母獣	胎子
無	Y79	3歳2ヶ月	23	44	1	—	胎盤、脳、内臓
	Y173	1歳1ヶ月	40	61	1	—	内臓
	Y178	10ヶ月	25	46	1	—	—
	Y180	10ヶ月	39	60	2	—	胎盤、脳、内臓
	Y181	10ヶ月	33	54	2	延髄	胎盤、脳、内臓
有	Y99	2歳6ヶ月	35	56	1	延髄	胎盤、脳、内臓
	Y109	2歳3ヶ月	35	56	3	—	胎盤、脳、内臓
	Y149	1歳6ヶ月	26	47	1	—	胎盤、内臓
	Y153	1歳5ヶ月	34	55	2	—	胎盤、脳、内臓
	Y172	1歳2ヶ月	27	48	2	—	胎盤、脳、内臓

2. 中課題2：代替動物を用いたワクチンの有効性確認試験プロトコルの確立

(1) 成果の概要

工程表	進捗状況・成果
シバヤギをワクチンで免疫し、妊娠させた後、攻撃試験を行う。攻撃ウイルスの胎子移行について検討する（小課題1関連）（平成25年度）	シバヤギ5頭に牛用ワクチン1ドーズを接種し、種付けを行った。種付け後26～35日後に 8.0×10^7 PFUのウイルスを接種した。21日後に解剖したところ全頭妊娠しており、各シバヤギの胎子数は1～3頭であった。母シバヤギ、胎子からウイルス抗原が確認されたが、ウイルスゲノムは検出されなかった（表2、図5および6）。（平成25年度）※1
↓	
代替動物を用いた最終的なワクチン有効性確認試験のプロトコルを確立するため、市販ワクチンの抗体誘導能を、既に得られている牛の成績と比較検討する（小課題2関連）。	中和試験によって抗体を確認したところ、ワクチン接種シバヤギは、ワクチン接種後2週目で十分な抗体価の上昇が認められ、ウイルス接種時まで中和抗体が維持されていた（表3）。（平成25年度）※2
↓	
以上の成績から、代替動物を用いたワクチン有効性確認試験プロトコルを確立する（小課題2関連）。	ワクチン接種シバヤギの攻撃試験結果と非接種シバヤギのそれを比較したところ、胎子へのウイルス感染に差はなく、シバヤギでは抗体の保有による胎子へのウイルス感染阻止が起こらないことが明らかとなった。（平成25年度）※3
成果目標：代替動物を用いてアカバネ病ワクチンの有効性、安全性が評価できるかどうかについて検証し、評価が可能な場合、代替動物を用いたワクチン有効性確認試験プロトコルを立案する。	

※1：牛用ワクチン免疫妊娠シバヤギの攻撃試験結果

シバヤギ1頭あたり、牛用ワクチン1ドーズを接種した。その後、性周期を確認し種付けを行った。種付け後、26日～35日後にワクチン非接種シバヤギと同様 8.0×10^7 PFUのウイルスを接種した。ウイルス接種後、21日目に全頭解剖を行った。全てのシバヤギが妊娠し、1頭あたり1～3頭の胎子が確認された。母シバヤギおよび胎子の材料を採取し、一部はウイルス検出に供し、残りを病理組織学検査に用いた。real-time PCRによって、胎子的大脑、腹腔諸臓器（区別できた場合、区別の不

可能な材料では胎子材料として検査)、胎盤（母胎盤と区別可能な場合）から遺伝子の検出を試みたが、検出されなかった。妊娠シバヤギにおける接種再試験の項で述べたごとく、材料の採取部位および採取時期のためウイルスゲノム量が検出感度以下であったためと考えられた。しかし、胎子からウイルス抗原が検出されているところから、ウイルス血症は起こっていると考えられ、白血球からの遺伝子検出が期待されたが、母獣の胎盤および白血球からの遺伝子検出も陰性であった（中課題 1 の表 2 参照）。real-time PCR によって陽性対照であるウイルス含有組織材料は陽性結果を示しているため、白血球からの検出が陰性であった理由については不明である。

病理組織学的検査では、ウイルス抗原は胎盤組織および胎子脳の脈絡膜上皮を中心に分布していたものの、これらの組織に細胞の壊死や炎症反応は認められなかった。このため十分な細胞傷害性を惹起するウイルス感染には至っていないものと推測された。

※ 2 : ワクチン接種シバヤギにおける中和抗体価の推移

牛用ワクチンをシバヤギに接種した場合の抗体価の推移を表 3 に示す。ワクチン接種後、全てのシバヤギで抗体上昇が認められ、接種後 14 日目では 4 倍～22.6 倍の抗体価を示した。ウイルス攻撃後は急速に抗体価が上昇し、攻撃後 7 日目には 1 頭を除いて全てのシバヤギが 1,000 倍を越す高い抗体価を示し、最高値は 3444.3 倍であった。これに対し、ワクチン非接種シバヤギでは動物医薬品検査所配布標準ウイルスの攻撃により中和抗体価 100 倍程度の上昇を示したのみであった。この結果は、牛への生ワクチン接種とワクチン親株の攻撃試験成績の結果とよく一致していた。しかし、牛ではワクチン接種群で胎子へのウイルス感染が認められないのに対し、シバヤギではワクチンによる免疫を有するにもかかわらず、攻撃ウイルスの胎子感染を防げないことが示された。

表 3 : シバヤギにおける中和抗体価の推移

	個体番号	ワクチン接種後日数				攻撃後日数			
		0	7日	14日	21日	0	7日	14日	21日
非接種群	Y79	< 2	////	< 2	////	< 2	< 2	16	26.9
	Y173	< 2	////	< 2	////	< 2	16	90.5	90.5
	Y178	< 2	////	< 2	////	< 2	16	26.9	13.5
	Y180	< 2	////	< 2	////	< 2	13.5	152.2	90.5
	Y181	< 2	////	< 2	////	< 2	5.7	64	38.1
接種群	Y99	< 2	< 2	16	16	8	1217.7	1722.2	1217.7
	Y109	< 2	< 2	16	5.7	9.5	1722.2	1024	608.9
	Y149	< 2	< 2	4	4.8	2.8	861.1	430.5	181
	Y153	< 2	< 2	5.7	5.7	6.7	3444.3	861.1	430.5
	Y172	< 2	< 2	22.6	8	8	1722.2	861.1	430.5

※3：代替動物を用いたワクチン有効性確認試験プロトコールの確立

ワクチンの有効性を検証するには、宿主動物を用いて十分な抗体付与能と感染または発症防御能を証明する必要がある。感染または発症防御能の証明には、ワクチン免疫群と非免疫群の宿主動物を強毒ウイルスで攻撃し、非免疫群ではウイルスの感染ないしは発症に至るのに対し、免疫群では感染ないし発症しないことを示さねばならない。この場合、用いる強毒ウイルスの病原性が重要となる。アカバネウイルスの属する RNA ウイルスは、継代により病原性が減弱することはよく知られている。従って、攻撃用ウイルスの保存が問題となる。本課題では動物医薬品検査所が配布している標準製剤アカバネウイルス OBE-1 株 (VB1201) が攻撃用ウイルスとして使用可能かどうかマウスで検証した。この結果、配布標準ウイルスはマウスに強い病原性を有していることが明らかとなった。また、牛の代替動物として選定したシバヤギを当該ウイルスで攻撃したところ、胎子移行を示したところから攻撃用ウイルスとして適していることが明らかとなった。

これに対し、シバヤギを代替動物として用いた場合、胎子にウイルス抗原は検出されるものの、その程度は低く、かつ抗原が観察された組織に炎症反応などは認められず、妊娠牛に対する攻撃試験で得られている反応より軽度であった。また、牛用生ワクチンによる免疫群と非免疫群の間に、胎子に対するウイルス移行について差がなく、残念ながら牛の代替動物としてシバヤギをワクチンの有効性確認に用いることが出来なかった。

Ⅲ. 主要な成果

1. 成果の内容

1) 動物医薬品検査所配布アカバネウイルスの病原性確認とワクチン有効性確認のための攻撃ウイルスとしての使用の可否

動物医薬品検査所配布アカバネウイルスの病原性をマウスおよびシバヤギを用いて検討し、その病原性を確認した。また、ワクチン有効性確認のための攻撃ウイルスとして使用に適していることを明らかとした (p9 および p11)。

2) 牛の代替動物としてのシバヤギにおけるワクチン有効性試験

牛の代替動物としてシバヤギを用いてワクチン有効性試験を行ったが、シバヤギではワクチンによる免疫を付与されたにもかかわらず、攻撃ウイルスの胎子移行を防御できず、牛の代替動物として使用することは出来なかった (p13 および p14)。

Ⅳ. 論文、特許等の実績等

別紙のとおり

論文、特許等の実績等

学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名
Bangphoomi, N., Uema, A., and Akashi, H. Akabane virus. MANUAL OF SECURITY SENSITIVE MICROBES AND TOXINS, Taylor and Francis CRC Press In press.	東京大学
Akashi, H. The 2010 Foot-and-mouth disease outbreak in Miyazaki Prefecture. J. Disaster Res., 7, 252-257, 2012	東京大学
Ito T, Uchida K, Nakayama H. NOS expression level is not involved in the different susceptibility to nigro-striatal dopaminergic neurotoxicity induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) between C57BL/6 and BALB/c mice. Exp Toxicol Pathol. 65: 121-125, 2013	東京大学
Harada T, Ogawa Y, Eguchi M, Shi F, Sato M, Uchida K, Nakayama H, Shimoji Y. Erysipelothrix rhusiopathiae exploits cytokeratin 18-positive epithelial cells of porcine tonsillar crypts as an invasion gateway. Vet Immunol Immunopathol. 153. (In Press)	東京大学
Sai T, Uchida K, Nakayama H. Changes of MAO-A and MAO-B. Expressions in the Placenta of MPTP or MPP(+) Treated Mice. J Toxicol Pathol. 26(1):73-77. 2013	東京大学
Rodríguez S, Uchida K, Nakayama H. Striatal TH-immunopositive fibers recover after an intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in golden hamsters treated with prednisolone: Roles of tumor necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase in neurodegeneration. Neurosci Res.76: 83-92. 2013	東京大学
Kandiel, M., Watanabe, G., Abou-El-Roos, M., Abdel-Ghaffar, A., Sosa, G., Abd El-Salam I. El-Azab, Nagaoka, K., Li, J., Manabe, N. Taya, K. Follicular turnover and hormonal association in postpartum goats during early and late lactation. J. Reprod. Dev., 58: 61-68, 2012.	東京大学

口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
村田洋介、上間亜希子、内田和幸、チェンバーズジェームズ、明石博臣、中山裕之 アカバネウイルス Iriki株のマウス中枢神経内伝播に関する研究 第155回日本獣医学会 2013年3月	東京大学
玄文宏 アカバネ病のワクチン開発に関する基礎研究 第1回感染コンピテンシー若手研究会 2013年9月	東京大学

出版図書

区分:①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名
①	牛病学第3版 明石博臣 代表編集委員 近代出版、2014年10月	東京大学

国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名
該当なし							

国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名
該当なし							