

総説

ペスチウイルスの基礎

迫 田 義 博^{1,2)}

(¹)北海道大学 大学院獣医学研究院 微生物学教室、²)国際獣疫事務局 (OIE) 高病原性
鳥インフルエンザ レファレンスラボラトリー)

Sakoda, Y. (2020). The basic research evidences of *Pestivirus*.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 76, 1-7.

キーワード：ペスチウイルス、フラビウイルス科、豚熱ウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ボーダー病ウイルス

1. はじめに：感染症は忘れた頃にやってくる

本会報2001年8月号「英国の豚コレラから学ぶこと」²⁰⁾以来、約20年ぶりの投稿となった。理由は2018年から再燃した豚熱 (CSF、これまでの呼び名は“豚コレラ”) の国内における発生である。2001年当時、日本はCSFのワクチンを中止し摘発淘汰を基本とする防疫対策に転換し、清浄国の仲間入りの準備を進めていた。幸いワクチンを完全中止しても発生はなく、2007年に国際獣疫事務局から清浄国と正式に認められた。

1969年の現行のGPE⁻ワクチンが現場投入される前、またその後も1980年代の比較的大規模な発生が報告された時期まではCSFウイルスを中心とする、フラビウイルス科ペスチウイルス属のウイルスに対する研究は家畜衛生試験場 (現在の農研機構動物衛生研究部門) のみならず、様々な研究機関で実施されていた。しかし、1992年の20世紀最後の国内発生以降、ペスチウイルス属の研究は長い冬の時代に入った。生き残った国内の研究者 (当時は若手だったが現在は皆50代以上) はウイルス性下痢 (BVD) ウイルスの研究にシフトしながら“ペスチの研究”を細々と続けてきた。著者の場合は、研究者としての基礎を家畜衛生試験場で鍛えていただいた後、2001年から母校で恩師の喜田宏先生のインフルエンザウイルスの研究を支援しながら、“ペスチの研究”を続けてきた。“研究の継続”とは言葉ほど簡単ではなく、組織 (上司) の理解と本人の強い意志が必要である。

2018年から国内で再燃したCSFの原因ウイルスの病原性が中程度であるため現場も行政も混乱した。し

かし、上記「英国の豚コレラから学ぶこと」で報告²⁰⁾したとおり、英語で言うところの「moderate」の病原性のウイルスは20年前から周知の事実であった。我々が怠っていたのは、自分も含め研究者による啓蒙、また現場と行政における当時の情報の継承である。これらを払拭すべく、改めて皆さんとペスチウイルスを勉強したい。

2. ペスチウイルス属のウイルスの分類と国内でのウイルス分離状況

フラビウイルス科ペスチウイルス属は、CSFウイルス、BVDウイルス、羊のボーダー病ウイルスが野外での分離の中心を占める。CSFウイルスは現在でもブタとイノシシにおける感染の報告に限られる。一方BVDウイルスやボーダー病ウイルスは、ウシ、ブタ、ヒツジなどの家畜やシカなどの野生動物からも分離され、宿主域が広い。これらに加え、近年様々な動物種から新しいペスチウイルスが発見されており、その分類法が見直された²⁵⁾。最新の分類では、ペスチウイルス属はペスチウイルスAからペスチウイルスKまでの11種に分類されている (表1)。なお、ペスチウイルスはこれまで陸生動物からのみ分離されてきたが、水生動物からも新たなウイルス種が同定され、宿主域の多様性に関心が高まっている。

国内ではペスチウイルスA及びBに分類されるBVDウイルス遺伝子型1及び遺伝子型2がウシから分離されている。ペスチウイルスCに分類されるCSFウイルスは、20世紀には1986年に沖縄県でウイルスが分離されたのが最後で1992年の熊本県での最終発生以降、国内でワクチン株以外のウイルスはブタから分離されていない²²⁾。ちなみに1992年の熊本県での発生ではCSFウイルスは分離されておらず、組織中のウイルス抗原の検出のみで診断された。しかし後述の通り、

表1 フラビウイルス科ペスチウイルス属の新しい分類 (Smithら、2017²⁵⁾を一部改変)

ウイルス種名	ウイルス名	宿主動物	疾病
<i>Pestivirus A</i>	牛ウイルス性下痢ウイルス 1型	ウシ、ヒツジ、その他反芻動物、ブタ	牛ウイルス性下痢 ^a 、致死的な粘膜病
<i>Pestivirus B</i>	牛ウイルス性下痢ウイルス 2型	ウシ、ヒツジ、その他反芻動物、ブタ	牛ウイルス性下痢、致死的な粘膜病
<i>Pestivirus C</i>	豚熱ウイルス	ブタ、イノシシ	豚熱
<i>Pestivirus D</i>	ボーダー病ウイルス	ヒツジ、トナカイ、シャモア、その他反芻動物、ブタ	ボーダー病
<i>Pestivirus E</i>	Pronghornペスチウイルス	アンテロープ	不明
<i>Pestivirus F</i>	ボンゴワナウイルス	ブタ	豚心筋炎症候群
<i>Pestivirus G</i>	Giraffeペスチウイルス	キリン、ウシ	致死的な粘膜病 (キリン)、不明 (ウシ)
<i>Pestivirus H</i>	Hobi-likeペスチウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス 3型	ウシ、バフファロー	牛ウイルス性下痢、致死的な粘膜病
<i>Pestivirus I</i>	Aydin-likeペスチウイルス	ヒツジ、ヤギ	流産、先天性奇形
<i>Pestivirus J</i>	ラットペスチウイルス	ラット	不明
<i>Pestivirus K</i>	非定型豚ペスチウイルス	ブタ	先天性痙攣症 (ダンス病)

^a 我が国の家畜の伝染性疾病名の最新版の通り。

2018年に26年ぶりにCSFの発生が報告されて以来、ブタとイノシシから多数のウイルスが分離されている¹⁶⁾。CSFウイルスは遺伝子型で1～3型に細分されるが、今回の国内分離株は遺伝子型2.1である。ペスチウイルスDに分類されるボーダー病ウイルスは、日本では過去にブタから分離されたことがある。ブタから分離されたFNK2012-1株は、本来の宿主であるヒツジに対する病原性がより高いことがわかっているが、ヒツジにおける流行状況は不明である。日本ではその他のペスチウイルスの分離報告はないが、近年世界各国で先

天性痙攣症 (ダンス病) の原因ウイルスとして非定型豚ペスチウイルスが同定されており^{14,15)}、国内でもウイルスの分離及びその性状解析が待たれる。

3. ペスチウイルスの基本性状と感染サイクル

CSFウイルスを含むペスチウイルスは、直径40～60nmでエンベロープを有する。ウイルスゲノムは約12,300塩基のプラス1本鎖RNAである。Internal ribosomal entry siteを含む約380塩基の5'非翻訳領域と180から270塩基の3'非翻訳領域の間に約4,000のアミ

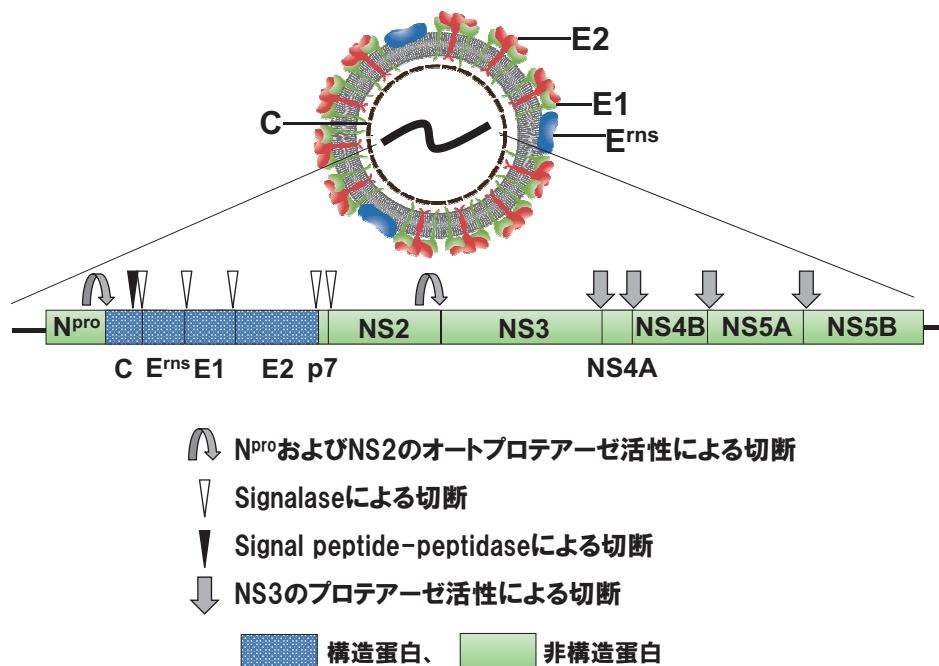


図1 ペスチウイルスのゲノム構造

ノ酸がコードされている²⁷⁾。ウイルス RNA は1本のポリプロテインとして翻訳された後、プロテアーゼ活性を有するウイルス蛋白 (N^{pro}、NS2、NS3) や宿主の Signalase、Signal peptide-peptidase などによりプロセッシングを受ける²⁷⁾。開始コドンの直後は非構造蛋白 N^{pro}、その後構造蛋白 (C、E^{gns}、E1、E2) をはさんで p7、NS2-3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B の順にコードされている (図1)。非構造蛋白 N^{pro} と構造蛋白 E^{gns} はペスチウイルスに特有のウイルス蛋白であり²⁷⁾、詳細は後述する。

CSF ウイルスは、ウイルス糖蛋白 E^{gns} がグリコサミノグリカンを含むヘパラン硫酸やラミニンに結合することにより細胞表面への吸着が開始される^{3,7)}。さらにエンベロープ蛋白 E1や E2が膜融合や細胞内への侵入に関与している。BVD ウイルスの解析結果から、ペスチウイルスはクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、脱核すると考えられる⁵⁾。またウイルスゲノムの複製は、NS3以降 NS5B までの非構造蛋白により行われる²⁷⁾。ウイルス蛋白の翻訳は、キャップ非依存的に IRES を用いてリボゾーム上で行われる。翻訳されたポリプロテインは上述の通りプロセッシングを受け、個々のウイルス蛋白に分かれる²⁷⁾。陽性の電荷を持ったコア蛋白はウイルス RNA と非特異的に結合し、ウイルスの粒子形成の最初のステップが始まる。このコア蛋白と RNA の複合体 (ヌクレオプロテイン) は、E^{gns}、E1、E2を含む小胞体の脂質二

重膜で覆われ、最終的にゴルジ体を通してエキソサイトーシスにより細胞外に放出される¹³⁾。

4. CSF ウイルスのブタに対する病原性

CSF ウイルスは口、鼻から体内に侵入し、最初に扁桃で増殖する。その後、リンパ流を介してリンパ組織、骨髄、血管内皮細胞で増殖後、ウイルス血症を起こし、全身臓器で増殖する。ウイルスの病原性の強さやブタの品種・週齢により病型は大きく、急性型、慢性型、不顕性型に分けられる (図2)。近年野外で流行している CSF ウイルスは中程度の病原性の株が多く、病型としては「急性型」と「慢性型」の中間程度と考えて良い^{4,8)}。すなわち、今回国内で流行しているウイルスもブタに対する病原性は中程度で、感染後発症するまでの期間 (潜伏期) が長く、感染後死亡までに要する日数も長い。このことが農家での本病発見の遅れの原因であり、かつイノシシでの感染が止まらない要因でもある。

BVD ウイルスでは胎盤をウイルスが通過し、持続感染牛として出生することにより牛群の汚染源になることがよく知られている (図3)。一方、CSF ウイルスも妊娠豚に感染すると稀に胎盤感染後に持続感染豚が産出されることが考えられてきた。しかし、近年流行している中程度の病原性を持つ CSF ウイルスは胎盤感染を必要とせず、出生直後の子ブタへの感染により持続感染が高率に成立することが明らかにされた^{2,12)}。よっ

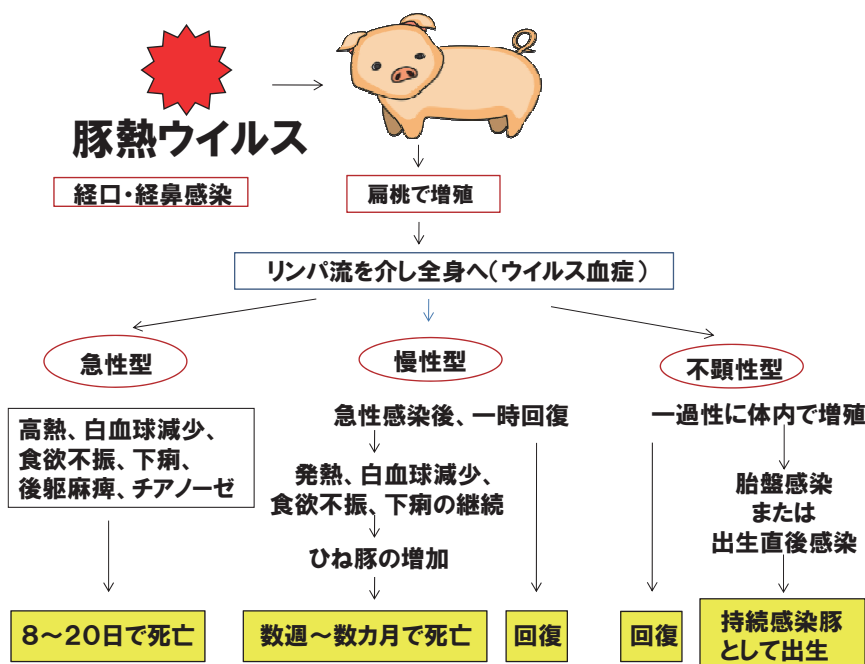


図2 CFSウイルスの発病機序

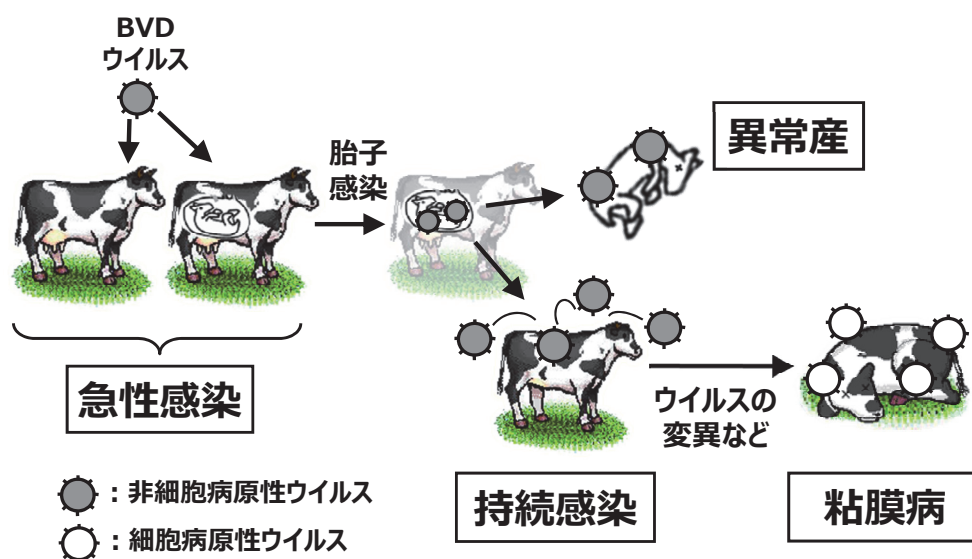


図3 牛ウイルス性下痢ウイルスの感染様式と病態

て、野外でもブタやイノシシで持続感染が発生している可能性がある。

5. ペスチウイルスの病原性の分子基盤

フラビウイルス科の他の属のウイルスと比べ、 N^{pro} と E^{rns} がペスチウイルスに特有な蛋白である。これらはペスチウイルスの病原性においても大きな役割を果たすことがわかってきた。

N^{pro} はポリプロテインのN末端にコードされている20kdの蛋白である。 N^{pro} を欠損させたウイルスも培養細胞で増殖するのでウイルスの複製には必須ではないが、 N^{pro} の欠損により感染細胞でのI型インターフェロン(IFN)産生が増強される。この報告以降、 N^{pro} が自然免疫調節因子として機能するメカニズムに関する研究が進み、 N^{pro} の持つプロテアーゼ活性とは独立してIFN調節因子3をプロテアソーム系により分解し、I型IFNの産生を抑制することが明らかになった。さらに、 N^{pro} はIFN調節因子7を介する形質細胞様樹状細胞を中心とした自然免疫の抑制にも関与していることが明らかになった。以上を含め、ペスチウイルスの非構造蛋白 N^{pro} は、宿主の自然免疫を抑制することによりウイルスが増殖しやすい環境を作ることが明らかになった^{19,26)}。

E^{rns} は44~48kdの糖蛋白で、ホモ二量体を形成しウイルス粒子表面に存在する。また E^{rns} はRNase活性を保持したまま細胞外に分泌されるので、2本鎖RNA

による細胞外からのI型IFN誘導を抑制する。このように E^{rns} は、 N^{pro} とは異なる作用機序によりI型IFNの誘導を抑制する。このRNase活性やホモ二量体の形成に重要なアミノ酸を置換した変異体は宿主に対する病原性が低下した^{10,29)}。また、形質細胞様樹状細胞がウイルス感染細胞を効率的に検出する生体防御機能を E^{rns} が阻害することによりウイルスの持続感染が成立すると考えられる¹⁷⁾。以上より、ペスチウイルスの構造蛋白 E^{rns} も宿主の自然免疫を抑制し、宿主でウイルスが増殖しやすい環境を作ることがわかった。

他にもE2やNS4Bがペスチウイルスの病原性に関与することを我々も報告しているが、ペスチウイルスの病原性分子基盤の全容解明にはさらなる研究が必要である。

6. ペスチウイルスの診断：昔ながらの検査体制の刷新を

これまでの日本の家畜衛生における強みは、47の都道府県の家畜保健衛生所における古典的診断法に基づくウイルス感染症の診断であった。しかし、今回の新型コロナ騒動でも明るみになったとおり、機械化を進めた多検体の迅速検査の観点で日本は他国に劣っている。将来に望まれるペスチウイルス感染症の診断法について、CSFを例に説明したい。

CSFの診断では、体温測定、血液検査の後、扁桃などの臓器や血液を材料としたウイルス抗原の検出が重

要である。これまでは扁桃を用いた凍結切片法が迅速診断の基本だったが、時代の流れの中で遺伝子検査が急速にその重要性を高めている。実際にヨーロッパや韓国でも凍結切片法を現場に求める時代は終わったと判断し、その診断マニュアルから姿を消している。遺伝子検査についても、PCR産物を電気泳動で確認する“コンベンショナル RT-PCR”を診断の中心に据えている国は減り、“リアルタイム RT-PCR”の現場での活用が進んでいる⁹⁾。英国では2000年のCSFの発生時にすでにリアルタイム RT-PCRが診断の中心であり²⁰⁾、そのことから日本が世界のトレンドに乗り遅れていることがわかる。野生イノシシの検査も今後10年は相当数対応する必要があるので、速やかな戦略の転換が必要である。

抗体検査はウイルス感染後2週以降に陽性になるので緊急診断には適さないが、過去の感染の有無やワクチンによる免疫状況を把握するために有用である。国内ではスクリーニングとしてのELISAと確定検査としての中和試験が普及している^{21,23)}。国内で使用されているELISAキットは諸外国で使用されているものと感度に差はない。またペスチウイルスの感染が過去にないブタの血清に対する非特異反応も低く、その観点での特異性に問題はない。ただし、BVDウイルスなどCSFウイルス以外のペスチウイルスがブタに感染し、耐過しても本ELISAはその抗体を検出してしまう。諸外国はその問題を解決するために、モノクローナル抗体を用いた競合ELISA法に移行し、その問題を解決している。またペスチウイルスの抗体検査のゴールドスタンダードは中和試験であるが、生ウイルスを使用すること、またCSFウイルスを含めペスチウイルスの大半が細胞病原性(CPE)を示さないウイルスであるため、判定には時間と熟練を要する。これらの問題を解決するために、“光る”CSFウイルスを用いて3日で多検体処理が可能な中和試験法を当研究室で確立したので今後活用されることを期待する²⁸⁾。

7. CSFに対する予防：従来型ワクチンの上手な活用と10年先を見据えた新型ワクチンの開発

日本でのCSF撲滅の鍵は、ウイルスの元栓であるイノシシにおけるウイルスの感染を抑えることである。国と都道府県はイノシシ対策として以下を進めている。①イノシシの個体数を減らすための積極的な捕獲(罟猟または銃猟)、②野外で発見された死亡イノシシ(次の感染源)の適切な処分、③ヨーロッパで実績のある

イノシシに対する経口餌ワクチン(弱毒生ワクチンC株を含む)の散布がその柱である。これらの対策は過去にヨーロッパでの経験^{11,18)}を基に立案され、実行されている。相手が野生動物でありまた日本特有の地理的要因もあり、ワクチンの効果が見えるまでには時間を要する。対策の継続にあたっては、費用対効果を検証し、適宜軌道修正することが必要である。またCSFのイノシシに用いることができる経口餌ワクチンは現在使用されている海外製品しか存在しない。自然環境中で安定し、かつ、若齢イノシシにも免疫を付与することができる改良型ワクチンの開発が望まれる。

国は2018年に国内の養豚場で発生が報告された後も、清浄国へ早期に復帰するためにブタへのワクチン接種を認めていなかった。しかし2019年10月、イノシシにおけるCSFウイルスの封じ込めに相当な時間を要すると判断し、ブタへのワクチン接種を開始した。イノシシ対策が難航しており、現状ではブタを守るために本州ではワクチン接種が必要である。しかし、野生イノシシでのウイルス汚染のない沖縄県で、ワクチンの接種継続を認めている国の姿勢は一貫性を欠く判断で、早急に改善すべきである。

ワクチン株は1969年から国内で使用されてきたGPE⁻ワクチンである²⁴⁾。有効性と安全性に優れたワクチンであるが、ワクチン接種による抗体と野外感染による抗体を識別する技術は持ち合わせていない。また生ワクチンであることから移行抗体を考慮した計画ワクチン接種が必要である。接種豚では、群で見るとその中央値が中和抗体価で128倍程度となる。母豚の中にはこの平均値より異常に低い、または異常に高い抗体を持つものが含まれる。これらの母豚から生まれた子豚が移行抗体を保有する期間は他の大多数とは大きく異なるので、ウイルス感染のリスクがそれぞれ存在する。とくに母豚の移行抗体が高い場合は、現在国がワクチン接種を推奨している30~40日齢では容易にワクチンブレイクが起こる。

過去にワクチンを接種していた時の母豚は、自分が子豚の時代に移行抗体を保有しながら初回免疫を受けていた。これに対し、2019年10月以降に一斉に接種された母豚は、CSFに対する抗体を全く持たない状態で初回ワクチンを受けている。後者の場合も、母豚の抗体価の中央値が過去と同様に128倍程度であれば良いのだが、初回免疫時にワクチン免疫を阻害する要因がない方が抗体価が高くなることは十分に考えられる。仮説通りだと前段落で書いたワクチンブレイクを起こ

すブタが多数存在することになるので、群として野外感染に無防備な状態になる。ワクチンの使用説明書には、「子豚では母豚からの移行抗体を考慮して1～2カ月齢に初回接種する」とある。国は抗体保有状況に応じた“きめ細やかな”ワクチンプログラムの必要性を検証すべきである。その上で、効果的な集団免疫の獲得に必要なワクチン接種プロトコルの変更が必要かもしれない。母豚及びワクチン接種時の子豚の中和抗体価の把握が急務である。

我が国がワクチン接種を中止し清浄国に復帰する最終段階には、諸外国で利用が始まっているマーカーワクチン^{1,9)}の実用化が望まれる。野外感染による抗体とワクチン抗体を識別可能で、ワクチン中止を見極めるのに有効である。ただし、マーカーワクチンとそれを識別するELISAを両方組み合わせてCSFの撲滅を飼養豚で成功させた例は世界的にない。エビデンスの積み重ねによる有効性と精度の高いマーカーワクチン戦略を、海外研究機関と協力しながら検討する必要がある。

8. おわりに：次世代の育成が急務

国内で発生しているCSFやBVDを制御するためには、科学的エビデンスに基づいた政策への提言とその実行、時代に合わせた診断法やワクチンの改良とその普及が不可欠である。CSFの発生がなかった26年間、日本におけるペスチウイラスの研究が弱体化したのは明白である。イノシシからのCSFウイルスの駆逐には相当の年月を要すると考えられ、多方面にわたる研究及び診断に携わる人材の育成が急務である。

謝辞

本稿を準備するにあたり、CSFの研究を25年間続けることを支えてくださった、北海道大学名誉教授の清水悠紀臣先生、喜田宏先生、元日本獣医生命科学大学教授の故 福所秋雄先生に深く御礼申し上げます。

利益相反開示について

本稿に関し、開示すべき利益相反関係にある企業等はありません。

引用文献

- 1) Blome S, et al. (2017) A decade of research into classical swine fever marker vaccine CP7_E2alf (Suvaxyn[®]) CSF Marker): a review of vaccine properties. *Vet Res*, 48: 51.
- 2) Cabezon O, et al. (2017) Post-natal persistent infection with classical swine fever virus in wild boar: A strategy for viral maintenance? *Trans-bound Emerg Dis*, 64: 651-655.
- 3) Chen J, et al. (2015) The laminin receptor is a cellular attachment receptor for classical swine fever virus. *J Virol*, 89: 4894-4906.
- 4) Enkhbold B, et al. (2017) Genetic and virulence characterization of classical swine fever viruses isolated in Mongolia from 2007 to 2015. *Virus Genes*, 53: 418-425.
- 5) Grummer B, et al. (2004) Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 51: 427-432.
- 6) Hoffmann B, et al. (2005) Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods*, 130: 36-44.
- 7) Hulst MM, et al. (2001) Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence. *J Virol*, 75: 9585-9595.
- 8) Kameyama KI, et al. (2019) Experimental infection of pigs with a classical swine fever virus isolated in Japan for the first time in 26 years. *J Vet Med Sci*, 81: 1277-1284.
- 9) Lim SI, et al. (2019) Assessment of the efficacy of an attenuated live marker classical swine fever vaccine (Flc-LOM-BE^{rms}) in pregnant sows. *Vaccine*, 37: 3598-3604.
- 10) Meyers G, et al. (2007) Bovine viral diarrhea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and N^{pro} protease. *J Virol*, 81: 3327-3338.
- 11) Moennig V. (2015) The control of classical swine fever in wild boar. *Front Microbiol*, 6: 1211.
- 12) Munoz-Gonzalez S, et al. (2015) Postnatal persistent infection with classical swine fever virus and its immunological implications. *PLoS One*, 10: e0125692.
- 13) Murray CL, et al. (2008) Architects of assembly: roles of *Flaviviridae* non-structural proteins in vi-

- rion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 6: 699-708.
- 14) Postel A, et al. (2016) Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Sci Rep*, 6: 27735.
- 15) Postel A, et al. (2017) High abundance and genetic variability of atypical porcine pestivirus in pigs from Europe and Asia. *Emerg Infect Dis*, 23: 2104-2107.
- 16) Postel A, et al. (2019) Reemergence of classical swine fever, Japan, 2018. *Emerg Infect Dis*, 25: 1228-1231.
- 17) Python S, et al. (2013) Efficient sensing of infected cells in absence of virus particles by plasmacytoid dendritic cells is blocked by the viral ribonuclease E^{rns}. *PLoS Pathog*, 9: e1003412.
- 18) Rossi S, et al. (2010) Preventive vaccination contributes to control classical swine fever in wild boar (*Sus scrofa* sp.). *Vet Microbiol*, 142: 99-107.
- 19) Ruggli N, et al. (2009) Classical swine fever virus can remain virulent after specific elimination of the interferon regulatory factor 3-degrading function of N^{pro}. *J Virol*, 83: 817-829.
- 20) 迫田義博. (2001) 英国の豚コレラ発生から学ぶこと. *日本豚病学会報*, 38: 14-17.
- 21) Sakoda Y, et al. (1998) Establishment of a serum-free culture cell line, CPK-NS, which is useful for assays of classical swine fever virus. *J Virol Methods*, 75: 59-68.
- 22) Sakoda Y, et al. (1999) Genetic heterogeneity of porcine and ruminant pestiviruses mainly isolated in Japan. *Vet Microbiol*, 65: 75-86.
- 23) Sakoda Y, et al. (2012) Development and evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for a screening test to detect antibodies against classical swine fever virus. *Jpn J Vet Res*, 60: 85-94.
- 24) Shimizu Y, et al. (1970) A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle cell cultures. *Am J Vet Res*, 31: 1787-1794.
- 25) Smith DB, et al. (2017) Proposed revision to the taxonomy of the genus *Pestivirus*, family *Flaviviridae*. *J Gen Virol*, 98: 2106-2112.
- 26) Tamura T, et al. (2014) N^{pro} of classical swine fever virus contributes to pathogenicity in pigs by preventing type I interferon induction at local replication sites. *Vet Res*, 45: 47.
- 27) Tautz N, et al. (2015) The molecular biology of pestiviruses. *Adv Virus Res*, 93: 47-160.
- 28) Tetsuo M, et al. (2020) Development of a high-throughput serum neutralization test using recombinant pestiviruses possessing a small reporter tag. *Pathogens*, 9: 188.
- 29) Tews BA, et al. (2009) Mutation of cysteine 171 of pestivirus E^{rns} RNase prevents homodimer formation and leads to attenuation of classical swine fever virus. *J Virol*, 83: 4823-4834.