

論文の内容の要旨

論文題目 **Study on Molecular Evolution of Orbiviruses** (オルビウイルス流行株の変異に関する分子遺伝学的研究)

氏 名 大橋 誠一

レオウイルス科オルビウイルス属に属するウイルスにはブルータングウイルス (BTV) やアフリカ馬疫ウイルス (AHSV) などの国際的に最重要家畜伝染病に指定されている疾病の病原ウイルスから、流行性出血熱ウイルス (EHDV) やパリアムウイルス (PALV) などの家畜の病原ウイルスが含まれている。これらのウイルスでは補体結合反応やゲル内沈降反応においても交差反応は認められず、全く異なる抗原性を有する。各ウイルスには中和試験で異なる抗原性を示す複数のウイルスが知られており、これらはウイルス血清群として分類されている。BTV 血清群には 24 血清型、AHSV 血清群には 9 血清型、EHDV 血清群には 8 血清型、PALV 血清群には 11 血清型が存在し、多様な抗原性が認められる。オルビウイルスのゲノムは 10 分節から成る 2 本鎖 RNA で構成され、それぞれの RNA 分節は第 10 分節を除き、単一のウイルスタンパクをコードしている。10 本のウイルスゲノムは内外 2 層から成るキャプシッドに覆われ、内殻は血清群特異抗原である VP3 および VP7、外殻は血清型特異抗原である VP2 と VP5 で構成される。VP2 は中和抗原でもあり、これをコードする第 2 分節は最も変異しやすい RNA 分節である。オルビウイルスの RNA 分節は同一血清群内のウイルスが同時に感染すると分節の交換が起こることがある。この現象を遺伝子再集合といい、哺乳動物細胞内だけでなくベクターとなる吸血昆虫の細胞内でも起こる。遺伝子再集合はウイルスの性状に大きな変化を誘導し、オルビウイルスの遺伝子および抗原性の多様性を作り出している。BTV や AHSV では遺伝子解析が進み、RNA 分節と病原性の関係が一部明らかにな

りつつある。また、これらのウイルスでは蓄積された多くの遺伝子データを用いた分子疫学的解析がなされ、血清群内あるいは血清群間のウイルス相互の遺伝学的関連性が明らかになり、オルビウイルスの分子進化機構に関する知見が得られている。

上記の現状を踏まえ、これまでに、わが国では多くの新興・再興アルボウイルス感染症の流行があり、畜産上大きな被害を引き起こしている。近年、これまで日本で確認されていなかったアルボウイルスや性状が変化したと考えられるウイルスの流行が報告されている。しかし、わが国ではオルビウイルスの遺伝学的、病原学的研究はほとんど行われてこなかった。現在わが国で流行しているオルビウイルスの遺伝学的多様性を解析することは、よりの確な疾病の防疫にも重要であると考えられる。本研究ではイバラキウイルス (IBAV) と PALV 血清群の国内流行株について、その抗原性の変異と病原性の変化について分子遺伝学的解析を行った。

第1章 IBAV および EHDV 分離株の制限酵素切断パターン(RFLP)による識別

1997年に九州を中心としてイバラキ病が流行した。さらに、同時期、同地域で牛の死流産が多発した。ウイルス分離を実施したところ、感染牛や不顕性感染牛の血液およびベクターとされるヌカカから IBAV が分離された。さらに、妊娠牛の血液や流産胎子の臓器からも IBAV が分離されたことから、早急にこれら分離株の性状解明が求められた。最初に 1997 年分離株とそれ以前の IBAV 分離株の抗原性が同一か否かを検討するため交差中和試験を実施した。1959 年に国内で最初に分離された Ibaraki-2 株と 1987 年分離株は抗原的に同一であった。しかし、1997 年分離株ではこれらの分離株と抗原的に差が認められた。さらに、遺伝子の変異頻度が小さい第 3 分節をターゲットとした PCR-RFLP 解析を行った。PCR 産物を制限酵素 *Hae* III で消化した場合、全ての IBAV 国内分離株は同様のパターンを示したが、IBAV と血清学的に近縁であることが報告されている EHDV 血清型 2 型 (EHDV-2) オーストラリア分離株は切断されなかった。さらに、PCR 産物を *Sau* 3AI で消化すると、1997 年分離株のパターンは過去に分離された IBAV や EHDV のそれとは異なっていた。1997 年に九州、中国および近畿地方で分離された IBAV 114 株は全て同一のパターンを示した。このことから、1997 年に流行した IBAV は遺伝的に単一の IBAV であるが、従来の分離株とは遺伝子レベルおよび抗原性状が異なる変異株であること示唆された。

第2章 IBAV および EHDV 分離株の構造タンパク質遺伝子による分子系統樹解析

第1章で得られた結果より、IBAV 変異株と考えられる 1997 年分離株についてより詳細に解析するために構造タンパクをコードする遺伝子の塩基配列を決定し、EHDV 血清群内の遺伝学的関係を解析するために、IBAV 分離株、EHDV 北米およびオーストラリア分離株について分子系統学的関連性を明らかにした。

過去の IBAV 分離株と 1997 年分離株の塩基配列の相同性を比較すると、内殻タンパクをコードする第

3 および第7分節はともに5%の相違が認められた。アミノ酸配列においては相同性が98%以上であった。またこれらの配列に基づく分子系統樹解析ではVP3領域では1997年分離株はEHDV-2の中で、オーストラリア分離株に近縁であるが、VP7領域ではIBAVおよびEHDVは北米、オーストラリアおよび日本のそれぞれの分離地域ごとに3グループに分けられ、オーストラリアと日本で流行しているウイルスは遺伝的に近縁であると考えられた。一方、外殻タンパクであるVP2およびVP5をコードしている第2および第6分節について同様に解析したところ、第6分節では第3、第7分節同様、塩基配列の相同性は従来の分離株とは7%の相違が認められたが、アミノ酸配列の相同性は97%以上であった。しかし、第2分節では1997年分離株は従来のIBAV分離株だけでなくEHDV-2 オーストラリア分離株とも相同性が70%以下であった。Ibaraki-2株とおおよそ30年後に分離された1987年分離株の間でもわずか3%未満しか変異が認められなかった。これらのことから1997年分離株は短期間に急激に変異したと考えられ、遺伝子再集合に起因するものと考えられた。第2分節の分子系統樹解析でも1997年分離株は独立したグループを形成し、このウイルスが新型のIBAVであることが明らかとなった。この1997年分離株は嚥下障害や飲水困難を主徴とするイバラキ病発症牛だけでなく、流産胎子やその母牛からもこのウイルスが分離されていることから、この遺伝子再集合により抗原性だけでなく病原性の変化があった可能性が示唆された。

第3章 チュウザンウイルス (CHUV) および PALV 血清群の構造タンパク質遺伝子による分子系統樹解析

2001年から翌年春にかけて九州で16年ぶりにチュウザン病が発生した。しかし、感染牛のCHUVに対する中和抗体価はこれまでの感染時の抗体価よりも低かった。そのため、この2001年分離株の遺伝学的特性および抗原性の解明を試みた。さらに1985年以降、日本国内で分離されたPALV血清群ウイルス9株と台湾、オーストラリアおよびアフリカ分離株の相互の遺伝学的関係について明らかにするため、血清群特異抗原をコードし、ウイルスの地域性を反映する第7分節および血清型特異抗原をコードする第2分節の分子系統学的解析を行った。第7分節の塩基配列は日本分離株間で95.1-100%、日本分離株と台湾分離株間で96-100%、日本分離株とオーストラリア・アフリカ分離株間で84.2-92%であった。これらのウイルスを分子系統樹解析すると、地域特異性が認められ、日本および台湾、オーストラリアおよびアフリカの3つのグループに分かれた。一方、血清型特異的抗原であるVP2をコードする第2分節の塩基配列を比較したところ、日本分離株は塩基配列の相同性によりCHUVグループとディアグラウイルス(DAGV)やニアピラウイルス(NYAV)と同じグループの2つに分かれた。さらに、分子系統樹解析でも、CHUVを含むグループとDAGVやNYAVを含む2つのグループに分けられた。異なるグループに分かれた日本分離株間の抗原性状を比較するため、DAGVを含むグループからDAGVおよび2001年分離株、CHUVを含むグループからCHUV 31株を用いて交差中和試験を行った。2001年分離株は抗

DAGV 血清で DAGV と同等の 512 倍で中和されただけでなく、抗 CHUV 血清でも 64 倍と低い値ながら中和された。以上のことより、2001 年分離株は CHUV と DAGV との間で第 2 分節の遺伝子再集合が起こり、遺伝学的、抗原的にユニークな性状を示したと考えられた。

以上の研究により、オルビウイルスにとって、遺伝子再集合は遺伝学的および抗原的多様性を生む重要な機構であることが示された。また、遺伝子再集合が野外で起きていることが示されるとともに、その結果、ウイルスの病原性の変化にも寄与することが示唆された。日本および近隣の東アジア地域を循環しているオルビウイルスの遺伝学的・抗原的バリエーションを解析することは、オルビウイルスを原因とするアルボウイルス感染症の分子生物学的診断やより効果的なワクチン開発に貢献するものと考えられる。