

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 14 年博士課程入学

氏 名 尹 益哲

指導教官氏名 明石 博臣

論文題目 Molecular Biological Studies on Swine Enteric Caliciviruses
(ブタ腸管カリシウイルスに関する分子生物学的研究)

カリシウイルスは一本鎖ポジティブセンス RNA をゲノムとし、エンベロープを欠く小型球形ウイルスであり、さまざまな動物種ならびにヒトに対して全身性あるいは局所性の感染症を引き起こす。分類上カリシウイルス科には近年新たにベシウイルス属、ラゴウイルス属、ノロウイルス属、サポウイルス属の 4 属が確立された。カリシウイルスには大きく分けて 2 種類の遺伝子構造が知られている。ノロウイルスとベシウイルスは 3 つの Open Reading frames (ORF) を有しており、ORF1 は非構造蛋白、ORF2 は主要構造蛋白である VP1、ORF3 はマイナーな構造蛋白である VP2 をそれぞれコードしている。サポウイルスとラゴウイルスは 2 つの ORF を有し、VP1 遺伝子が ORF1 に含まれている。ベシウイルスは細胞培養が可能であるが、他のカリシウイルスは細胞培養での増殖は困難である。ノロウイルスとサポウイルスに分類されたヒトカリシウイルスは疫学的に異なる。ノロウイルスはウイルス性食中毒の原因であり、すべての年齢のヒトに対して急性胃腸炎を引き起こすが、サポウイルスは主に幼児の胃腸炎の原因である。一方、ヒトのカリシウイルスに近縁のウイルスが哺乳類の中でしばしば発見されている。その中でウシとブタでの発見は特に注目さ

れている。ウシでの分離株はすでにノロウイルス属の genogroup III (GIII) にまとまることが報告されている。ブタに関しては、日本で発見された SW918 株がブタ腸管由来のノロウイルスの最初のものであり、他のノロウイルスと同じく細胞培養はまだできていない。サポウイルスに分類されるブタ腸管由来のウイルスとしては Porcine Enteric Calicivirus (PEC) Cowden 株が 1980 年にアメリカで分離されている。本ウイルスを培養細胞で増やすため研究が重ねられ、最終的にブタの腎臓細胞で増殖することが確認されたが、その培養にはノトバイオートのブタの腸管内容物または胆汁酸塩を必要としている。

現在、ブタの腸管由来カリシウイルスについては、その分布及びヒト由来ウイルスとの関係など不明な点が多い。そこで、日本におけるブタ腸管由来カリシウイルスについて、遺伝子検索とその性状を解析すると共に血清調査を行うこととした。

本研究は以下の三章より構成されている。

第一章 ブタ腸管内容物におけるウイルスゲノムの検索、塩基配列の決定及び系統樹解析

ブタでは 2 種類の腸管由来カリシウイルスが発見され、それぞれノロウイルスとサポウイルスに分類されると考えられている。遺伝子解析によりノロウイルスは 5 つの genogroups に分けられ、SW918 株はそのうちの GII に分類されている。サポウイルスも今まで計 5 つの genogroups に分類されており、PEC Cowden 株は GIII とされている。しかし、ブタ腸管由来の両ウイルスは今まで分離された株が少なく、遺伝学的多様性と系統発生的関連はほとんど解明されていない。本章においてはブタ腸管由来のカリシウイルスの遺伝子検索を行い、得られた分離株の遺伝子性状を解析した。

ふたつの県の家畜保健所で採取されたブタの腸管由来サンプル 26 検体(下痢症 17 検体、その他 9 検体)より RNA を抽出し、カリシウイルスの RNA ポリメラーゼ領域をユニバーサルに増幅可能なプライマーペア P290/289 を用いた RT-PCR により、11 検体から当該遺伝子が増幅された。その中で K7/JP については 5' 及び 3' RACE 法により全ゲノムのクローニングを行い、その塩基配列を決定した。他の陽性サンプルの中で S20/JP については VP1 領域の塩基配列を、K5/JP、K8/JP と K10/JP については VP1 領域から 3' 末端までの塩基配列を

決定した。その結果、K7/JP は 7144 塩基の長さであり、2 つの ORF を有していることが明らかとなった。また、5'側に存在する ORF1 の推定アミノ酸配列中にカリシウイルスの非構造蛋白に高度に保存されているアミノ酸モチーフが検出された。解析した 5 つのウイルスの VP1 のアミノ酸配列について他のカリシウイルスと比較解析を行ったところ、K7/JP、K8/JP、K10/JP と S20/JP は PEC Cowden 株と相同性が高く、サポウイルスに近縁であり、K5/JP はノロウイルスの GII に属していることが判明した。また、K7/JP、K8/JP、K10/JP は PEC Cowden 株とは異なる新しいブタのサポウイルスの genogroup を形成することが示唆された。

第二章 新しいサポウイルスの VP1 の発現と粒子形成

腸管由来カリシウイルスは PEC Cowden 株を除いて細胞培養での増殖ができないため、その診断及び予防法の開発が遅れている。一方、ヒト由来カリシウイルスは主にウイルス様粒子(VLP)を利用して抗体の検出、抗原性の比較や形態学的研究が行われている。主にバキュロウイルスと昆虫細胞を用いて蛋白の発現及び VLP の形成が行われているが、対象となるカリシウイルスの種類もしくは用いる昆虫細胞の株により発現量も異なっている。本章では第一章で検出されたブタサポウイルスの性状解明を進めるため、その VP1 の発現と VLP の形成を試みた。

まず、VP1 遺伝子の発現確認に用いる抗体を作成するために、K7/JP の VP1 遺伝子を 3 つの断片に分けて大腸菌で glutathione *S*-transferase との融合蛋白として発現させた。発現した各融合蛋白を glutathion sepharose 4B を用いて精製後マウスに投与し、抗 K7/JP VP1 血清を作成した。その結果、VP1 の N-末端及び中央領域に対する免疫血清が得られた。次に、第一章で塩基配列を決定した新しいサポウイルスゲノムの ORF1 の 3'側に存在する VP1 遺伝子の発現をバキュロウイルスで試みたところ、K7/JP についてはマウスにより作成した VP1 の部分領域に対する抗体を使用したイムノプロットで、昆虫細胞内とその培養上清に 58 kDa の VP1 の発現が確認できた。他のウイルス株も SDS-PAGE により VP1 の発現が示され、各株の発現量には違いは認められなかった。電子顕微鏡観察により K7/JP と K10/JP は VLP の形成が確認されたが、K8/JP と S20/JP の 2 株においては VLP が認められず、VP1 は

発現しているものの集合して粒子を形成するには至らなかったものと考えられた。

第三章 VLP を用いたブタサポウウイルスの血清調査

近年の研究により、VLP は動物の体内で増殖したウイルスとほぼ同等の抗原性を有していることが報告されている。ウイルスの抗原性の比較や抗体の検出などには Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)が広く使われている。VLP を抗原とした ELISA により、サポウイルスの GI は GII と GV に対して抗原性が区別されることが知られている。また、ブタとヒトのノロウイルスの VLP を利用して抗原性を ELISA で検討したところ、ブタ由来の SW918 はヒトの GII と交差するが GI とは交差しなかったという報告もある。PEC Cowden 株でも VLP を作成し ELISA が確立されているが、まだ詳しい血清調査までには至っていない。

本章では第 2 章で作成した VLP を用いた各種血清反応により、野外ブタ血清サンプル中の抗体検出を試みた。まずイムノプロットにより抗原性の確認と用いる血清について検討した。K7/JP の VLP をマウスに免疫して作成した抗 VP1 血清を用いたイムノプロットにより各株の VP1 の抗原性を調べたところ、K7/JP と遺伝学的に近い K10/JP は反応したが、K8/JP と S20/JP は反応性を示さなかった。更に、イムノプロットでブタの野外血清をスクリーニングしたところ、陽性の血清サンプルが得られ、VLP を抗原とする ELISA を構築する際の陽性対照血清として用いることができた。構築した ELISA による血清調査では、血清サンプルを 100 倍まで希釈したところ 28%の陽性率であり、1,000 倍希釈においても 18%の陽性率が示された。以上のことから、ブタサポウウイルスが日本のブタの中で流行している可能性が強く示唆された。

培養細胞で増殖できないカリシウイルスはウイルスの特徴を把握することが困難である。本研究により、従来知られていないブタ腸管カリシウイルスが発見され、その分子生物学的性状解析が進められた。本研究の成果はブタの腸管感染症および人獣共通感染症の原因としての疫学的検討、ひいてはその診断・予防法を開発するなどの今後の研究展開の基礎になることが期待される。