

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 尹 益哲

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 属が確立されたが、ベシウイルスを除き、カリシウイルスの細胞培養での増殖は困難である。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。本論文は、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ったもので、以下の三章より構成されている。

第一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を用いた Reverse transcription-polymerase chain reaction 法により、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 については主要構造蛋白 (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 つの翻訳可能領域 (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、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 の発現とウイルス様粒子 (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発現させ、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 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。

第三章では第二章で作成した VLP を用いた血清反応により、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。

以上、本論文は従来知られていないブタ腸管カリシウイルスを発見し、その分子生物学的性状の解析を進め、得られた知見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学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。