

論文の内容の要旨

論文題目: **Epidemiological Analysis of Bovine Torovirus**
(牛トロウイルスに関する疫学的研究)

氏名 伊藤 寿浩

コロナウイルス科はエンベロープを有する一本鎖 (+) RNA ウィルスで、コロナウイルス属とトロウイルス属から構成される。コロナウイルス属に含まれるウィルスの多くは消化器官や呼吸器官に感染性を有するが、一部のウィルスは肝臓や腎臓、神経系など多様な指向性を示すことが知られている。一方、トロウイルス属は多型性のエンベロープを有する直径 120~140nm のウィルスで、コロナウイルス属と同様、ウィルス粒子の表面に棒状のスパイク蛋白が放射状に分散する。しかし、ヌクレオカプシドがらせん対称のドーナツ様構造を呈することから、コロナウイルス属と形態学的に区別される。トロウイルス属は宿主別にヒト、牛、豚及び馬トロウイルスに分類され、ヒトと牛、馬のトロウイルスは腸炎との関わりが報告されている。しかし、**Bernevirus** として他のトロウイルスとは区別される馬トロウイルスを除き、トロウイルス属のウィルスは分離が困難であることから、トロウイルス属に関する研究はコロナウイルス属に比べて遅れている。

牛トロウイルス (**Bovine torovirus**、以下 **BToV**) は 1982 年にアメリカで発生した子牛の集団下痢の糞便より初めて検出され、後に本件における集団下痢の原因ウィルスとして同定された。また、感染便を用いた実験感染により、牛の空回腸、結腸や盲腸の絨毛・陰窩細胞に感染し萎縮や壊死を起こすこと、その結果下痢を起こすことが確認された。しかし、**BToV** は牛のウィルス性下痢に関わる牛コロナウイルス (**BCV**) や牛ロタウイルスと異なり、培養細胞を用いたウ

ウイルス分離が極めて困難であることから、糞便の電子顕微鏡観察や ELISA 法、RT-PCR 法によるウイルス検出により浸潤調査が進められてきた。その結果、これまでに欧米を中心に BToV の検出が報告されている (1991: オランダ、1992: ドイツ、1998: カナダ、2002・2003: アメリカ、2006: オーストリア)。なかでも RT-PCR 法は、得られた遺伝子断片の配列解析により他のウイルスとの比較が可能となることから、遺伝子情報の蓄積・解析が進んでいる。Draker らは BToV 感染糞便より BToV ウイルスゲノムの全長を解読し、BToV は約 24.5kb のゲノムサイズを有し、RNA polymerase、spike (S)、membrane、hemagglutinin-esterase (HE) 及び nucleocapsid (N) 遺伝子より構成されることを示した。Smits らは S 及び HE 蛋白の相同性を指標に、野外株間での多様性について報告しており、コロナウイルス属において S 蛋白が抗原性状と深く関わっていることが知られていることから、BToV の抗原性状にも多様性の存在する可能性が考えられる。しかし、これまでに BToV の抗原性状の比較は行われていない。一方、日本を含むアジア地域では BToV の広域な浸潤調査は行われておらず、その感染実態や欧米で検出された BToV との異同については不明である。そこで、著者は国内で採取した牛由来材料を用いて BToV の浸潤状況調査を行うとともに、既報の BToV との遺伝子学的比較解析を行った。また、その過程で 4 株の細胞増殖性 BToV の分離に成功したため、それらの基礎的ウイルス性状及び抗原性状の解析を行うとともに、分離株を用いた野外での抗体調査を行った。

本研究は以下の 5 章より構成される。

第 1 章: 糞便を用いた BToV の疫学調査

2004 年から 2005 年にかけて 1 道 11 県より採取した牛の糞便 231 検体 (下痢便 167 検体、正常便 64 検体) を用い、RT-PCR 法により BToV の N 遺伝子の検出により国内における BToV の検出状況と疾病との関連性を調べた。また、得られた BToV 陽性検体よりさらに S 遺伝子の塩基配列解析を行い、BToV の遺伝学的多様性について検討した。

糞便 231 検体のうち、1 道 3 県より得た 15 検体 (6.5%) から BToV が検出され、国内で広範囲に BToV が浸潤していることが確認された。このうち、正常便由来のものが 1 検体 (1/64、[1.6%]) であったのに対し、下痢便では 14 検体 (14/167、[8.4%]) と明らかに高い検出率を示した。さらに下痢便由来の 14 検体のうち 7 検体からは BCV が同時に検出されたが、それ以外では BCV や RV、病原性大腸菌等の下痢に関する病原体は検出されず、BToV 感染と下痢との疫学的関連が示唆された。S 遺伝子の塩基配列解析を実施した結果、検体間で 91.6%~99.8% の相同性を有していたが、同じ地域で得られた検体の間では特に相同性が高かった。また、系統樹解析の結果、国内に分布する BToV は少なくとも 3 種類のクラスターに分類されることが明らかとなった。以上の結果から、国内において BToV は常在し、牛の下痢の一因として関与している可能性が考

えられた。また、地域毎に独自の進化が進んでいる可能性が示唆された。

第2章: 鼻汁を用いた BToV の疫学調査

BToV と同じく牛の下痢を引き起こす BCV は、消化器系と呼吸器系の双方の感染因子となることが知られている。Hoet らはオハイオ州の一農場において牛の鼻汁からの BToV の検出を報告しており、BToV においても呼吸器に対する侵襲性が予想される。しかし、BToV と呼吸器疾病との疫学的関連性については検討が行われていない。また、鼻汁より検出された BToV (rBToV) と糞便由来 BToV (eBToV) との間での遺伝学的関連性の有無についても報告が無い。以上のことから、著者は 2006 年から 2008 年にかけて 1 道 15 県より採取した牛の鼻汁 311 検体 (呼吸器症状陽性牛 205 検体、健常牛 106 検体) より BToV-N 遺伝子の検出を試み、rBToV の検出状況と疾病との疫学的関連性を調べた。また、rBToV と eBToV の遺伝子解析を行い BToV の多様性について検討を行った。

鼻汁 311 検体のうち 7 検体 (2.3%) から BToV が検出された。これら 7 検体は 5 県 6 農場に由来したが、いずれも呼吸器症状を示した若齢子牛より採取した検体であった。次いで、S 及び HE 遺伝子の配列解析を実施した結果、rBToV 間では S で 91.1%~100%、HE で 90.8%~100% の相同性を有し、既報の eBToV との間では S で 89.6%~99.0%、HE で 70.6%~99.0% の相同性を示した。系統樹解析の結果、3 検体は eBToV のクラスター 2、また 1 検体はクラスター 1 の近縁に位置づけられた。また他の検体はクラスター 1 とクラスター 3 の中間に位置づけられた。以上の結果から、BToV は BCV と同様に牛の消化器だけでなく呼吸器系組織にも感染性を有し、牛の呼吸器疾病との疫学的な因果関係が示唆された。一方、rBToV と eBToV との間には遺伝学的に本質的な差異は認められなかった。

第3章: 新規に分離した BToV 4 株のウイルス性状及び抗原性状と遺伝子性状との相関

BToV 遺伝子が検出された糞便をヒト直腸癌由来細胞 (HRT-18 細胞) に接種・継代することにより 4 株の細胞増殖性 BToV の分離に成功した。分離ウイルスは、いずれの株もマウス赤血球に対して HA 活性を有していたが、鶏赤血球に対しては HA 活性を示さなかった。BToV 4 株の S 遺伝子について、既報の BToV と比較した結果、分離ウイルスは Gifu-2007TI/E を除いてクラスター 1 とその近縁に位置づけられた。一方、Gifu-2007TI/E はクラスター 2 の近縁に位置づけられた。次に、これらの分離ウイルスについて交差中和試験及び交差 HI 試験を行い、抗原関連値 (R%) を指標に株間の抗原性状の相違を調べた。その結果、中和試験では R% : 19.8~100%、HI 試験では R% : 14.0~89.4% を示したが、Gifu-2007TI/E を除いた場合には前者で R% : 56.6~100%、後者で R% : 44.2~89.4% と高い交差性を有していた。このことから、Gifu-2007TI/E を除いた 3 株は互いに極めて強い交差性を有し、Gifu-2007TI/E 株はこれらとは抗原性が多少異なっ

たものの、血清型の違いとして定義づけるほどの相違はないことが考えられた。以上の結果から、中和及び HI 試験により識別される、少なくとも 2 種類の BToV 血清亜型が存在し、また、それは S 蛋白の相同性と関わっている可能性が示された。

第 4 章: BToV 分離ウイルスを用いた感染試験

BToV の感染試験に関する報告は少なく、呼吸器経路に対する感染性も実験感染では確かめられていない。そこで、細胞で増殖が可能な BToV 分離株を用いた感染実験を行い、消化器経路と呼吸器経路におけるウイルスの動態と抗体応答の推移を調べた。

HRT-18 細胞培養 Hokkaido-2008TI/E 株を 5 か月齢の牛に接種し、臨床観察をおこなうとともに糞便と鼻汁より排泄されるウイルスの定量を行った。その結果、実験感染牛に体温や元気、食欲に異常は認められなかったものの、攻撃後 4 日から 10 日にかけて軟便を呈した。消化器症状が観察され始めたのとほぼ同時期から、糞便より BToV の排出が観察され、特に攻撃後 4 日から 7 日には顕著なウイルス排出が確認された。同期間中、糞便に比べ少量ではあったが鼻汁からもウイルス排出が確認された。攻撃開始後 7 日より血清抗体の上昇が確認され、抗体価の推移は HI および中和試験で良く相関していた。これらの結果から、BToV は牛の消化器経路と呼吸器経路の双方に感染性を有し、また、HI 及び中和抗体を指標に感染の確認が可能であることが示された。

第 5 章: BToV の野外牛における血清疫学調査

BToV の抗体検出には、これまで感染牛の糞便材料が用いられており、実験手技が困難であったため、広範囲での血清疫学調査はおこなわれていなかった。そこで、分離ウイルスを用いて 2005 年から 2010 年にかけて 1 道 16 県より採取した健康牛群 12 群、臨床症状（消化器症状、呼吸器症状、発熱）を呈した牛群 36 群のペア血清について BToV に対する HI 抗体価の測定を行った。その結果、多くの個体は初回採血の時点で BToV に対する HI 抗体を保有していたが、健康牛群の多くは月齢を経るに従って抗体価の低下が見られたのに対し、疾病牛群の一部では臨床症状観察後に抗体の上昇が確認された。特に、呼吸器症状が見られた牛群でその程度は顕著であった。以上の結果から、BToV は牛の疾病に関わる一因子として広く浸潤している可能性が、血清学的にも示された。

BToV が初めて分離報告されたのは 2007 年で、牛の下痢症に関わる病原体として認識されたのはごく最近であり、本ウイルスの感染と病原性等については検討すべき課題が多く残されている。本研究は、今後重要性を増すであろう BToV の疫学研究と防除対策確立の一助となると考えられる。