

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 馬 渡 隆 寛

ロタウイルス (RV) はレオウイルス科のロタウイルス属に分類され、ヒト、ウシ、ブタを始めとする多くの哺乳類や鳥類に感染して下痢や嘔吐等の胃腸炎を引き起こす主要な病原微生物である。ゲノムは 6 つのウイルスタンパク (VP1-VP4、VP6 および VP7) および 5 または 6 つの非構造タンパク (NSP1-NSP5/6) をコードする 11 本の 2 本鎖 RNA 分節から成っている。また、ゲノムが分節化していることから、異なる株の混合感染により RNA 分節の組み換え (リアソートメント) が時に起きる。RV は、VP6 の抗原性および遺伝学的相違に基づいて RVA、RVB、RVC から RVJ の 10 種に区分されている。RVA は従来の定型的な RV であり、ヒトや動物において最も検出頻度が高く臨床的に重要である。RVC は、哺乳子豚における下痢症の原因ウイルスとして 1980 年に米国で最初に報告され、その後、ヒト、ウシ、ブタ、イヌ、フェレットで集団発生や散発発生例が報告されている。国内外で、ウシから最初に検出された RVC は、1991 年に北海道において成牛の下痢便から分離された Shintoku 株である。しかしながら、それ以降、検出報告がないために、ウイルスの分類学上、一般的にウシは RVC の自然宿主に含まれない状況にあった。そのために、野外におけるウシ RVC による下痢症の発生実態および本ウイルスの遺伝学的性状は、ほとんど明らかにされていない。

以上のような背景から、申請者は、野外におけるウシ RVC による下痢症の発生実態および本ウイルスの遺伝学的性状を明らかにすることを目的に、山形県内で発生したウシの下痢症例からウシ RVC の検出および遺伝子解析等を行った。

第一章において、2002 年 4 月、山形県の一乳肉複合経営農場で集団発生した乳用成牛の下痢症が発生し、病性鑑定の結果、下痢便から RVC のみが検出され、その他の主要な下痢に関与する病原体は検出されなかった。さらに、電子顕微鏡観察により RV 様粒子が観察された一方で、その他のウイルス粒子は観察されなかった。また、RVC の検出された下痢便からポリアクリルアミドゲ

ルを用いた RNA 電気泳動 (RNA-PAGE) により典型的な RVC の RNA 電気泳動パターンである 4-3-2-2 パターンを確認し、RVC Shintoku 株のそれと非常に類似していた。これらの結果から、糞便中に確認された RV は RVC であることが明らかとなり Yamagata 株と命名した。本症例と Shintoku 株を比較してみると、発生状況および臨床症状が類似していた。また、VP6 および VP7 遺伝子の相同性解析の結果、Yamagata 株はブタ由来株およびヒト由来株よりも Shintoku 株との相同性が非常に高かった。さらに、VP6 遺伝子の分子系統学的解析の結果、Yamagata 株と Shintoku 株は同じクラスターに属し、ヒトやブタの株が形成するクラスターと明確に区別された。以上の結果からウシが RVC の自然宿主の 1 つであることが裏付けられた。従って、RVC は成牛の下痢症に関与しウシ RVC と呼ぶことを提唱した。

ウシが RVC の自然宿主の 1 つであることが裏付けられて以降、ウシ RVC が広く認知され、加えてウシ RVC を含む主要な下痢関与ウイルス検出用のマルチプレックス RT-PCR が開発されたことも相まって、症例報告が相次いだ。そして、ウシ RVC が乳用成牛の下痢症に関与している実態が徐々に明らかになってきたが、品種や月齢との関連性等不明な点が多く残されていた。そこで、第二章では、野外におけるウシ RVC による下痢症の発生実態を明らかにすることを目的に、2002 年から 2011 年の 10 年間に山形県内の農場で発生した下痢症例から、主要な下痢に関与する病原体を検出し、また、発生状況や臨床症状などの得られた情報について整理した。その結果、ウシ RVC は、肉用成牛、乳用および肉用子牛からは検出されず、乳用成牛からのみ 7 症例 (5.7%) 検出された。また、ウシ RVC 病の発生状況および臨床症状を整理すると、①集団発生である点、②秋から春先に発生する点、③下痢便はいずれも茶褐色の水様性を呈した点、④産乳量の低下がみられた点、以上 4 点の共通の特徴がみられた。従って、ウシ RVC は、上記 4 点の特徴を持ち乳用成牛の下痢症に関与していることが示唆された。また、注目点として、乳用成牛の下痢症においてウシ RVA、ウシ RVB そしてウシ RVC を含めたウシ RV の検出頻度は 25 症例 (20.3%) を占め、ウシコロナウイルス (BCoV) の 73 症例 (59.3%) に次ぐ大きな割合を占めた点が挙げられる。そして、ウシ RV 病の発生状況および臨

床症状に関しても上記 4 点の特徴がみられた。このことから、ウシ RV も上記 4 点の特徴を持ち、これまで考えられていたよりも大きな割合を占めて、乳用成牛の下痢症に関与している可能性が示唆された。冬期赤痢と称される BCoV 病においても同様に上記 4 点の特徴を持つ一方で、必発ではないが血便の排出および鼻汁漏出がみられる場合もあり、若干の違いが見られている。また、ウシ RVC の検出された 7 症例の内、1 農場で 2 年間に乳用成牛の下痢症がくり返し 3 回集団発生し、それぞれ異なる病原体（ウシ RVB、BCoV およびウシ RVC）が検出された。この 3 回の下痢症の共通点としては、上記 4 点の特徴がみられている。一方、BCoV の検出された時に相違点もみられ、①血便がみられた点、②鼻水漏出がみられた点、それから、ウシ RVB およびウシ RVC の検出された時に比べて③乳量減少の割合が大きかった点、④下痢の最盛期間が長かった点、⑤下痢の発症期間が長かった点が挙げられる。これらの相違点は、ウシ RVB 病およびウシ RVC 病と BCoV 病を臨床的に鑑別する一助となる可能性がある。しかしながら、共通点が多いことから、下痢症の発生時には、実験室検査で原因病原体を鑑別する必要がある。

近年、野外におけるウシ RVC 病の発生実態は徐々に明らかになってきている。しかしながら、遺伝子情報が極端に少ないために遺伝子性状はほとんど明らかにされていない。そこで第三章では、第二章で検出した症例のうち 6 症例から症例ごとに下痢便を 1 検体ずつ抽出し、全 11 遺伝子分節を解析し、野外におけるウシ RVC の遺伝的多様性、遺伝子動態そして生態等について考察を行った。相同性解析、分子系統学的解析そして遺伝子型分類を行った結果、RVC6 株はウシ RVC であることが明らかになったと同時に、いずれの遺伝子分節においても他の動物種由来株とリアソータントを起こしていないことも明らかになった。そして、その RVC6 株は Y/03、Y/1/04、Y/2/04、Y/3/04、Y/08 そして Y/10 と命名した。RCWG により提唱された分類法に準拠すると、既報株も含めてウシ RVC 株の遺伝子型は全て VP7-BP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 に対応して、G2-P[3]-I3-R3-C3-M4-A3-N3-T3-E3-H3 に分類された。このことから、ウシ RVC は、基本的にウシの中で感染環を形成していることが示唆された。注目点

として、VP4 遺伝子において、遺伝子型として分けることはできなかったが、2 系統に分岐した点が挙げられる。この 2 系統は塩基配列レベルで 83.7-84.8% とアミノ酸レベル 88.9-89.9% と低い相同性を示し、一方の系統に属する Y/1/04 株と Y/2/04 株は、残りの系統に属する 6 株に存在しないアミノ酸 1 個の欠損と 3 個の挿入を有することが明らかになった。このことから、この 2 系統を暫定的に系統 I および II と分けることとした。以上のようにウシ RVC において VP4 遺伝子に挿入や欠損がみられ、多様性のあることが初めて確認された。また、ウシ RVC 株の各文節は、検出された地域または年に従って同じ傾向を示して株ごとに分かれることはなく、独立して複数の系統にランダムに分かれているようである。このことから、ウシ RVC 株は、同じ遺伝子型内で文節ごとに独立して複雑にリアソータントを繰り返し、遺伝的多様性を獲得していることが示唆された。故に、異なった遺伝的背景をもつ複数のウシ RVC 株が国内に広く分布し、ウシの下痢症に関与していることが明らかになった。第二章においてウシ RVC の検出された 6 症例について、発生状況や臨床症状などの情報は整理している。その中で注目すべきことは、疫学的に関連のある近隣農場で続発した症例と 4 年の時を経て同一農場で再発生した症例が初めて確認された点が挙げられる。これらの症例から遺伝子レベルでも同じ株が下痢症発生農場から持ち込まれたこと、そして、新たな株が農場内に持ち込まれたことが確認され、ウシ RVC の生態の一端が確認された。

以上の研究において、ウシは RVC の自然宿主の 1 つであることが裏付けられ、RVC は成牛の下痢症に関与しウシ RVC と呼ぶことを提唱した。また、過去 10 年間に山形県内農場で発生した下痢症例の解析結果から、ウシ RVC による下痢症の発生実態を報告した。さらに、検出されたウシ RVC 6 株の全 11 遺伝子分節の全塩基配列を決定し、野外におけるウシ RVC の遺伝的多様性、遺伝子動態そして生態等について考察を行った。

以上の知見は、ウシ RVC 病の防疫対策を講じる上で、重要な情報を与えると考えられ、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）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。