

日本における家畜の下痢原因コロナウイルス に関する研究

(Studies on coronaviruses causing enteric infections in domestic
animals in Japan)

学位論文の内容の要約

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
獣医学専攻博士課程平成25年入学

Md. Taimur Islam

(指導教授：高橋公正)

要約

コロナウイルス (CoV) は、家畜に様々な病気を引き起こし、その幾つかは家畜産業の脅威となり、また経済にも大きな影響を及ぼす。経済に大きな影響を及ぼす CoV としては、豚流行性下痢ウイルス (PEDV)、豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV)、牛トロウイルス (BToV) と牛コロナウイルス (BCoV) があり、これらは腸管感染性で、若齢動物では下痢を引き起こす。2013 年には、日本ではそれまで 7 年間発生しなかった豚流行性下痢 (PED) の大発生があり、幼豚が高い罹患率と致死率を示した。一方、BToV は子牛の軽度の下痢を誘発する。病牛の糞便からは常に血球凝集素-エステラーゼ (HE) 蛋白を持つウイルスが分離されるが、培養細胞での数代の継代により、HE 遺伝子内の変異により、ウイルスからは HE 蛋白が消失する。このことから、HE 蛋白は動物体内での増殖や病原性に重要であるが、培養細胞での増殖には必須ではないことが示唆されている。本研究では、本邦で新たに分離した PEDV について、遺伝子の系統樹的解析と抗原性の解析を行った。また、BToV の HE 蛋白の生物学的活性については、特に抗インターフェロン (IFN) 活性に焦点をあて、研究を行った。

1. 新たに分離した PEDV の系統樹及び抗原解析

PEDV は下痢とそれに伴う脱水症状を引き起こすため、特に幼豚では高い致死率を示す。本邦では殆どの農場ではワクチン接種が行われているが、それにも拘わらず、大規

模な PED が再発生した。第一章では、本邦での再発生から新鮮ウイルスを分離し、現在世界規模で流行している株との比較系統樹解析を行った。更に、新鮮分離株と日本で使用されているワクチン株の抗原性を比較を行った。ワクチン接種が全国規模で行われている本邦で大きな PED 再発生のメカニズムを知るために、2 株の PEDV を病幼豚の小腸から分離した。それらの株は、日本のワクチン株（グループ 1）株より近年米国で分離された株（グループ 2）に属していることが判明した。PED が起こった幾つかの異なる養豚場から採取した豚血清を用いて、日本のワクチン株との抗原性を中和試験で検討した結果、日本のワクチン株との大きな抗原的差異は認められなかった。これまで、多くの豚の感染血清を用いて、グループ 1 と 2 の間における相同性を示した報告はなく、本研究が最初である。これらの結果から、日本における PED の大流行は、ワクチンが功を奏さなかったというより、流行した新しい PEDV の極めて高い病原性に依ることが示唆された。不完全なバイオセキュリティも世界的な PED アウトブレイクの重要な原因であることが、文献的には示されている。

2. BToV の HE 蛋白の生物学的活性の解析

子牛の下痢原因ウイルスである BToV は、病牛からの分離時にはウイルスエンベロープに HE 蛋白を有するが、培養細胞での継代により HE 蛋白は消失する。このことは、HE 蛋白は動物内での増殖や病原性には必須であるが、培養細胞での増殖には不必要であることを示している。第二章では、HE 蛋白の生物活性について検討した。HRT-18 細胞を用いて、下痢便材料から BToV Nig-3 を分離し、更に、HE を持つ (HE+) Nig-3-3

を培養細胞で 3 代継代時に、また、HE が消失した (HE-) Nig-3-8 を 8 代継代時に得た。Nig-3-8 の HE 遺伝子にはアミノ酸 109 番目が終始コドンになり、欠損 HE 蛋白をもつウイルスであった。この 2 株について、培養細胞 HRT-18 における増殖を比較したところ、HE-の Nig-3-8 株の方が HE+の Nig-3-3 株と比べ、優位に高かった。このことは、HE 蛋白は BToV の増殖抑制作用がある可能性を示唆している。HE 蛋白を発現している HEK 293T 細胞はシンドビスウイルスの増殖を抑制することも明らかとなった。これらのことは、HE 蛋白は BToV に限らず他のウイルスの増殖にも障害になっていることを示唆している。

3. BToV HE 蛋白の抗 IFN 活性に関する解析

前章では、HE 蛋白は培養細胞でのウイルスの増殖に必須ではなく、むしろ障害となることが示された。HE 蛋白は培養細胞でのウイルス増殖には負に働くが、検体から分離される BToV は常に HE 蛋白を持っていることから、動物体内での増殖、病原性には必須であろうと推測される。第三章では、HE+ウイルスおよび HE-ウイルスの HE 蛋白の抗 IFN 活性について、IFN- α 及び IFN- β を用いて、検討した。IFN- α は HE-ウイルスの増殖を抑制したが、HE+ウイルスの増殖に対しては抑制作用を示さなかった。また、IFN- β はいずれのウイルスについても増殖抑制作用はなかった。このことから、HE 蛋白は抗 IFN- α 活性を持つことが示唆された。そこで、293T 細胞に発現した HE 蛋白が抗 IFN- α 活性を持つか否かについて、シンドビスウイルスを用いて検討した。HE 発現 293T 細胞では IFN- α によるシンドビスウイルスの増殖は抑制されなかったが、Nig-3-8 が持つ欠損

HE 蛋白を発現した 293T 細胞では IFN- α によりシンドビスウイルス増殖が抑制された。

このことは、HE 蛋白が抗 IFN 活性があることを明確に示している。これらの結果を総合的に解釈すると、BToV の HE 蛋白は、抗 IFN 活性という自然免疫に対する抑制力により、感染病態に大きく関与していることが判明した。

本研究では、グループ 2 PEDV によるワクチンと適正なバイオセキュリティにより PED の大発生を阻止することは可能であることを示唆している。一方、BToV の HE 蛋白は培養細胞内でのウイルスの増殖を抑え、また抗 IFN 活性を持つことが示された。HE 蛋白は抗 IFN 活性を持つことは、BToV の動物への病原性に大きく関与していることを示唆している。本論文で示された腸管感染を引き起こす 2 つの異なる CoV 研究は、CoV の抗ウイルス戦略を考える上で、また病態発生機構を明らかにする上での貢献度は大きいと思われる。