

氏 名 (本籍)	山 下 照 夫 (愛 知 県)		
学 位 の 種 類	博 士 (獣 医 学)		
学 位 記 番 号	獣 医 博 乙 第 3 3 号		
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 1 年 9 月 2 1 日		
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当		
学 位 論 文 題 目	Epidemiological Study and Molecular and Biological Characteristics of Aichi Virus, a New Member of the <i>Picornaviridae</i> Associated with Acute Gastroenteritis in Humans		
審 査 委 員	主 査	岐 阜 大 学 教 授	平 井 克 哉
	副 査	帯 広 畜 産 大 学 教 授	品 川 森 一
	副 査	岩 手 大 学 教 授	品 川 邦 汎
	副 査	東 京 農 工 大 学 教 授	本 多 英 一
	副 査	岐 阜 大 学 教 授	源 宣 之

論 文 の 内 容 の 要 旨

ウイルス性胃腸炎は集団発生および散发例としてよく知られている。胃腸炎を起こす主なウイルスとしては、ロタウイルス、アデノウイルス、ノーウォークウイルスおよびアストロウイルスが知られている。著者が 1989 年にはじめて分離したアイチウイルスはカキの生食に起因するウイルスである。著者は、本ウイルスの分類を目的として、物理化学的および分子生物学的性状を解析すると共に、その病原性や流行状況を知るために疫学調査を行った。

アイチウイルスは BS-C-1 細胞に変性効果を起こすが、既知のエンテロウイルスと中和反応がみられなかった。また、エンテロウイルスおよびノーウォーク様ウイルスを検出する PCR 法に反応しなかった。さらに、電子顕微鏡による観察ではアストロウイルスに類似しているが、それを検出する ELISA には反応しなかった。したがって、本ウイルスは既知のウイルスと異なる新しいウイルスの可能性が考えられた。

アイチウイルスの抗原を検出する新しい ELISA を開発した。この方法は糞便中のアイチウイルス抗原に特異的に反応し、アデノ、エンテロ、ロタ、ノーウォーク、カリシおよ

びアストロウイルスの腸管ウイルスとは反応しなかった。本方法により、カキが原因の胃腸炎の集団発生 9 事例中 5 事例の成人由来糞便 47 件中 13 件 (27.8%) から、小児の散発例 397 例中 1 例からアイチウイルス抗原が検出された。患者血清による中和反応では、9 事例中 5 事例の患者由来ペア血清 43 例中 20 例 (46.5%) がアイチウイルスに対し有為な抗体上昇を示した。アイチウイルスに対する抗体保有率を年齢階層別に調べたところ、生後 7 ヶ月から 4 歳の乳幼児では 7.2%であったが、年齢と共に上昇し、35 歳では 80%に達していた。したがって、アイチウイルスは既知ウイルスとは異なる型のウイルスであり、主に 15 歳から 34 歳の年齢層に下痢症を引き起こすことが考えられた。

下痢の症状を示したパキスタンの小児 222 名中 5 名 (2.3%) からアイチウイルスが分離された。しかし、健康者 91 名からは分離されなかった。また、東南アジア旅行からの帰国時に名古屋国際空港検疫所で胃腸炎症状を訴えた日本人 722 名中 5 名 (0.7%) から分離された。この 5 名中 3 名はインドネシアから、2 名はタイおよびマレーシアからの帰国者であった。これらの結果から、アイチウイルスは東南アジアにも存在し、各地の小児やそこを訪れる日本人観光客の胃腸炎の原因になっていることが示唆された。

アイチウイルスの全塩基配列 (accession no. AB010145) を決定したところ、ウイルス遺伝子は 8,251 塩基から構成されていた。5'および 3'非翻訳領域が各々 712 および 240 塩基から成り、3'末端にポリ A 鎖が存在した。翻訳領域は 7,302 塩基一本のみで形成され、2,433 個のアミノ酸をコードしていた。塩基配列から推定されたポリペプチドはピコルナウイルスの典型である VP0、VP3、VP1、2A、2B、2C、3A、3B、3C および 3D から成ると予想された。さらに、構造ポリペプチドの上流には 145 アミノ酸から成る L タンパクが存在すると考えられた。3D 領域の分子系統樹による解析ではピコルナウイルス科のエンテロ、ライノ、カルジオ、アフソ、ヘパトおよびエコーウイルス 22 型の既知 6 属とは遺伝子的に異なることが示唆された。以上の性状および物理化学的性状から、アイチウイルスはピコルナウイルス科の新たな属に分類されると考えられた。

以上のように、著者はアイチウイルスをはじめて胃腸炎患者から分離し、ピコルナウイルス科の新しい属のウイルスであることを提案した。また、本ウイルスは我が国以外にアジア各国に存在することを明らかにした。さらに、ヒトの糞便中のアイチウイルス抗原を

検出する ELISA を開発し、カキが原因と推定された胃腸炎の集団発生 5 事例から採取された糞便 47 検体中 13 検体 (28%) に同ウイルス抗原を証明した。したがって、本研究は、ウイルス学およびウイルス性胃腸炎の新しい情報を提供した。

審 査 結 果 の 要 旨

ウイルス性胃腸炎は集団発生および散発例としてよく知られている。胃腸炎を起こす主なウイルスとしては、ロタウイルス、アデノウイルス、ノーウォークウイルスおよびアストロウイルスが知られている。著者が 1989 年にはじめて分離したアイチウイルスはカキの生食に起因するウイルスである。著者は、本ウイルスの分類を目的として、物理化学的および分子生物学的性状を解析すると共に、その病原性や流行状況を知るために疫学調査を行った。

アイチウイルス BS-C-1 細胞に変性効果を起こすが、既知のエンテロウイルスと中和反応がみられなかった。また、エンテロウイルスおよびノーウォーク様ウイルスを検出する PCR 法に反応しなかった。さらに、電子顕微鏡による観察ではアストロウイルスに類似しているが、それを検出する ELISA には反応しなかった。したがって、本ウイルスは既知のウイルスと異なる新しいウイルスの可能性が考えられた。

アイチウイルスの抗原を検出する新しい ELISA を開発した。この方法は糞便中のアイチウイルス抗原に特異的に反応し、アデノ、エンテロ、ロタ、ノーウォーク、カリシおよびアストロウイルスの腸管ウイルスとは反応しなかった。本方法により、カキが原因の胃腸炎の集団発生 9 事例中 5 事例の成人由来糞便 47 件中 13 件 (27.8%) から、小児の散発例 397 例中 1 例からアイチウイルス抗原が検出された。患者血清による中和反応では、9 事例中 5 事例の患者由来ペア血清 43 例中 20 例 (46.5%) がアイチウイルスに対し有為な抗体上昇を示した。アイチウイルスに対する抗体保有率を年齢階層別に調べたところ、生後 7 ヶ月から 4 歳の乳幼児では 7.2% であったが、年齢と共に上昇し、35 歳では 80% に達していた。したがって、アイチウイルスは既知ウイルスとは異なる型のウイルスであり、主に 15 歳から 34 歳の年齢層に下痢症を引き起こすことが考えられた。

下痢の症状を示したパキスタンの小児 222 名中 5 名 (2.3%) からアイチウイルスが分離された。しかし、健康者 91 名からは分離されなかった。また、東南アジア旅行からの帰国時に名古屋国際空港検疫所で胃腸炎症状を訴えた日本人 722 名中 5 名 (0.7%) から分離された。この 5 名中 3 名はインドネシアから、2 名はタイおよびマレーシアからの帰国者であった。これらの結果から、アイチウイルスは東南アジアにも存在し、各地の小児やそこを訪れる日本人観光客の胃腸炎の原因になっていることが示唆された。

アイチウイルスの全塩基配列 (accession no. AB010145) を決定したところ、ウイルス遺伝子は 8,251 塩基から構成されていた。5' および 3' 非翻訳領域が各々 712 および 240 塩基から成り、3' 末端にポリ A 鎖が存在した。翻訳領域は

7,302塩基一本のみで形成され、2,433個のアミノ酸をコードしていた。塩基配列から推定されたポリペプチドはピコルナウイルスの典型であるVP0、VP3、VP1、2A、2B、2C、3A、3B、3Cおよび3Dから成ると予想された。さらに、構造ポリペプチドの上流には145アミノ酸から成るLタンパクが存在すると考えられた。3D領域の分子系統樹による解析ではピコルナウイルス科のエンテロ、ライノ、カルジオ、アフソ、ヘパトおよびエコーウイルス22型の既知6属とは遺伝子的に異なることが示唆された。以上の性状および物理化学的性状から、アイチウイルスはピコルナウイルス科の新たな属に分類されると考えられた。

以上のように、著者はアイチウイルスをはじめ胃腸炎患者から分離し、ピコルナウイルス科の新しい属のウイルスであることを提案した。また、本ウイルスは我が国以外にアジア各国に存在することを明らかにした。さらに、ヒトの糞便中のアイチウイルス抗原を検出するELISAを開発し、カキが原因と推定された胃腸炎の集団発生5事例から採取された糞便47検体中13検体(28%)に同ウイルス抗原を証明した。したがって、本研究は、ウイルス学およびウイルス性胃腸炎の新しい情報を提供した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた

基礎となる学術論文

1. Yamashita T, Kobayashi S, Sakae K, Nakata S, Chiba S, Ishihara Y, Isomura S (1991) Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *Journal of Infectious Disease* 164: 954-957
2. Yamashita T, Sakae K, Ishihara Y, Isomura S, Utagawa E (1993) Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 2938-2943
3. Yamashita T, Sakae K, Kobayashi S, Ishihara Y, Miyake T, Agboatwalla M, Isomura S (1995) Isolation of cytopathic small round virus (Aichi virus) from Pakistani children and Japanese travelers from Southeast Asia. *Microbiology and Immunology* 39: 433-435
4. Yamashita T, Sakae K, Tsuzuki H, Suzuki Y, Ishikawa N, Takeda N, Miyamura T, S. Yamazaki (1998) Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the *Picornaviridae* associated with acute gastroenteritis in humans. *Journal of Virology* 72: 8408-8412

既発表学術論文

1. Hirai K, Yamashita T, Sawa H, Takahahi M, Shimakura S, Masegi T, Inoue M (1980) Isolation of Newcastle disease virus from imported parrots (*Katakoë sulphurea*). Japanese Journal of Veterinary Science 42: 381-385
2. Hirai K, Sawa H, Yamashita T, Shimakura S, Hashimoto A (1980) Giardia infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Japanese Journal of Veterinary Science 42: 615-617
3. Shimakura S, Sawa H, Yamashita T, Hirai K (1981) An outbreak of ocular disease caused by staphylococcal infection in Amazon parrot (*Amazona aestiva*) imported into Japan. Japanese Journal of Veterinary Science 43: 273-275
4. Hirai K, Yamashita T, Sawa H, Shimakura S, Masegi T, Inoue M (1981) An occurrence of Newcastle disease in other psittacine birds exposed to imported Cokatoos (*Kakatoe sulphurea*). Japanese Journal of Veterinary Science 43: 557-559
5. Yamashita T, Hirai K (1981) Isolation of *Chlamidia psittaci* from imported psittacine birds in Japan. Japanese Journal of Veterinary Science 43: 561-563
6. Yamashita T, Hirai K, Shimakura S, Itoh K, Hirata A, Hashimoto A (1981) Recent occurrence of chlamydiosis and giardiasis in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in Japan. Japanese Journal of Veterinary Science 43: 963-965
7. Hirai K, Itoh K, Yamashita T, Fukushi H, Hayashi Y, Kuzuya M, Shimakura S, Hashimoto A, Akiyama K (1983) Prevalence of *Chlamydia psittaci* in pet birds maintained in public places or in close human contact. Japanese Journal of Veterinary Science 45: 843-845
8. Yamashita T, Kasuya S, Noda S, Nagano I, Ohtsuka S, Ohtomo H (1988) Newly isolated strains of *Rickettsia tsutsugamushi* in Japan identified by using monoclonal antibodies to Karp, Gilliam and Kato strains. Journal of Clinical Microbiology 26: 1859-1860
9. Yamashita T, Sakae K, Ishihara Y, Isomura S, Inoue H (1988) Virucidal effect of chlorinated water containing cyanuric acid. Epidemiology and Infection 101: 631-639
10. Kobayashi S., Morishita T, Yamashita T, Sakae K, Nishio O, Miyake T, Ishihara Y, Isomura S (1991) A large outbreak of gastroenteritis associated with a small round structured virus among school children and teachers in Japan. Epidemiology and Infection 107: 81-86

11. Yamashita T, Sakae K, Ishihara Y, Isomura S (1992) A 2-year survey of the prevalence of enteric viral infection in children compared with contamination in locally-harvested oysters. *Epidemiology and Infection* 108: 155-163
12. Isomura S, Mubina A, Dure-Samin A, Ishihara Y, Sakae K, Yamashita T, Nishio O, Ahmed A (1993) Virological and serological studies on poliomyelitis in Karachi, Pakistan. 1. Outbreaks in 1990-91. *Acta Paediatrica Japonica* 35: 382-386
13. Yamashita T, Kasuya S, Noda N, Nagano I, Kang J.S.(1994) Transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* strains among humans, wild rodents, and trombiculid in an area of Japan in which tsutsugamushi disease is newly endemic. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 2780-2785
14. Isomura S, Agboatwalla M, Dure-samin A, Ishihara Y, Sakae K, Yamashita T, Nishio O, Ahmed A (1996) Epidemiology of poliomyelitis in Karachi, Pakistan: Prospective studies during 1990-93. *Acta Paediatrica Japonica* 38: 667-671
15. Nagano I, Kasuya S, Noda N, Yamashita T (1996) Virulence in mice of *Orientia tsutsugamushi* isolated from patients in a new endemic area in Japan. *Microbiology and Immunology* 40: 743-747
16. Ito A, Ma L, Itoh M, Cho S.Y, Kong Y, Kang S.Y, Horii T, Pang X.L, Okamoto M, Yamashita T, Lightowlers M.W, Wang X.G, Liu Y.H.(1997) Immunodiagnosis of alveolar Echinococcosis by enzyme-linked immunosorbent assay using a partially purified Em18/16 enriched fraction. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 4: 57-59
17. Honma S., Nakata S, Numata K, Kogawa K, Yamashita T, Oseto M, Jiang X, Chiba S,(1998) Epidemiological study of prevalence of genogroup II human calicivirus (Mexico virus) infections in Japan and Southeast Asia as determined by enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2481-2484
18. Sato K, Yamashita T, Sakae K, Suzuki Y, Ishikawa N, Nishimura Y.(1998) A new-born baby outbreak of echovirus type 33 infection. *Journal of Infection* 37: 123-126
19. 山下照夫、榮 賢司、石原佑式、井上 裕正、磯村思无(1988) 塩素のウイルス不活化に及ぼすシアヌル酸の影響と実際のプール水における比較. *感染症学雑誌* 62: 200-205
20. 山下照夫、榮 賢司、石原佑式、磯村思无 (1989) 結合塩素のウイルス不活化に及ぼすシアヌル酸の影響. *日本公衆衛生雑誌* 36: 353-356
21. 山下照夫、榮 賢司、石原佑式、磯村思无、竹内一仁 (1990) 屋内温水プール水の微生物ならびに理化学検査と塩素によるウイルス不活化効果. *日本公衆衛生雑誌* 37: 962-966

22. 粕谷志郎、古賀香理、長野 功、山下照夫、日置敦巳、大友弘士、岩佐光啓、野田伸司 (1991) 岐阜県における恙虫病の研究 第4報 恵那および高山市の調査結果ならびに総合的考察. 感染症学雑誌 65: 151-156
23. 山下照夫、栄 賢司、石原佑弍、磯村思无、戸塚敦子、森次保雄 (1992) A型肝炎ウイルスの家族内感染—1990年に愛知県内で発生した患者とその家族について—. 感染症学雑誌 66: 781~785
24. 山下照夫、粕谷志郎、長野 功、大友弘士 (1992) 岐阜県における恙虫病の研究 第5報 標準株に対するモノクロナール抗体の性状と分離株の分類への応用. 感染症学雑誌 66: 1262~1269
25. 小林慎一、森下高行、山下照夫、栄 賢司、三宅恭司、石原佑弍 (1994) 海外旅行下痢症の原因ウイルス調査成績. 感染症学雑誌 68: 196-200
26. 栄 賢司、山下 照夫、石原 佑弍、磯村 思无 (1994) パキスタン・カラチ地区におけるポリオのウイルス学的研究. 臨床とウイルス 22: 314-319