

氏名(本(国)籍)	根本 学(福島県)
推薦教員	岐阜大学 教授 恒 光 裕
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博乙第116号
学位授与年月日	平成24年9月18日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題目	ウマロタウイルス病の簡易迅速診断および分子疫学に関する研究
審査委員	主査 岩手大学 教授 恒 光 裕 副査 帯広畜産大学 教授 宮 原 和 郎 副査 岩手大学 教授 原 澤 亮 副査 東京農工大学 教授 水 谷 哲 也 副査 岐阜大学 教授 杉 山 誠 副査 藤田保健衛生大学 教授 谷 口 孝 喜

論 文 の 内 容 の 要 旨

ウマロタウイルス病は4ヵ月齢までの子ウマに主に認められ、特に生後1ヵ月から3ヵ月齢の子ウマに多発し、水様性下痢、元気消失、食欲不振等を主徴とする。ウマロタウイルス病の診断法として、ウイルス分離、電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察、血清診断法、および分子生物学的手法を用いた方法が主に実施されている。しかし、これらの診断法は、検査手技が複雑であること、結果が得られるまでに時間がかかること、さらに専用の機械を必要とすることから、一般的な臨床検査室や臨床現場ではあまり実施されていない現状にある。このことから、臨床現場で容易にかつ迅速に実施可能な診断法は、ウマロタウイルス病のまん延阻止に非常に有効と考えられる。

日本最大の馬産地である北海道日高地方において、1990年代前半までは遺伝子型G3BP[12]のウイルスが優勢に流行していたことから、この疫学調査結果を基にワクチン開発が行われ、RVA/Horse-tc/JPN/HO-5/1982/G3BP[12]をワクチン株とする不活化ワクチンが開発された。1990年代後半になり、G3BP[12]に加えてG14P[12]のウイルスが流行していることが明らかとなったが、それ以降のウマロタウイルスの疫学調査に関する報告はなく、近年の流行状況は不明である。また、G14P[12]のウマロタウイルスに対して、現在のワクチンが有効か否は不明である。ワクチンの効果および将来的なワクチン株の変更を検討する上で、現在の流行状況の把握および流行株に対するワクチン接種馬の抗体応答の有無を明らかにすることは必須である。

以上のことから本研究では、ウマロタウイルス病に対する簡易迅速診断法を開発するとともに、北海道日高地方における近年の流行株の遺伝子型およびワクチン接種馬での流行株に対する抗体応答の有無を明らかにする目的で、以下の課題について取り組んだ。

第1章では、RT-LAMP法のウマロタウイルス病への応用を検討した。本法はRT-PCR法と比較し、操作が簡易で、反応時間が60分程度と短く、また専用の機器を要しない利点を

有する。これまでに報告されたウマロタウイルスの主要な遺伝子型は G3BP[12]および G14P[12]であることから、VP4 遺伝子の P[12]型を標的として RT-LAMP 法を構築した。その結果、P[12]型のウマロタウイルスに対して特異的かつ高感度にウマロタウイルスを検出可能な RT-LAMP 法を開発することができた。

第 2 章では、ヒト用ロタウイルス検査キットのウマロタウイルス病への応用を試みた。ヒト用ロタウイルス迅速検査キットは、新たな試薬や装置が必要なく、15 分程度で結果を判定することができる利点がある。その結果、イムノクロマト法を原理としたディップスティック「栄研」ロタ（栄研化学，東京）がウマロタウイルス病の診断に有用であることが明らかとなった。

第 3 章では、日高地方において 2003 年から 2008 年に採材された子ウマの下痢便を用いて、ウマロタウイルス病の分子疫学調査を実施した。Semi-nested RT-PCR 法により G/P 遺伝子型別を行った結果、G3P[12]および G14P[12]のウイルスがともに広く流行していることが明らかとなった。次に、VP7 および VP4 遺伝子の塩基配列を決定して分子系統樹解析を行ったところ、VP4 遺伝子の P[12]型は G 型に関係なく、1980 年代から流行している P[12]型と同系統に分類された。また、VP7 遺伝子の G3 型についても 1980 年代から流行している G3B 亜型と同系統に分類され、長期間に渡り同一の G3B 亜型のウマロタウイルスが伝播していることが示された。一方、G14 型は全て 1990 年代後半に確認された G14 型とは別系統に分類され、ヨーロッパおよびオーストラリアの分離株、また 1987 年に日本で分離された G14 型ウイルスの 1 株と近縁であったことから、近年の G14 型ウイルスは 1980 年代に日本に存在していたウイルスの再出現、もしくは海外から 2000 年ごろに日本へ侵入したものと考えられた。

第 4 章では近年の流行株である遺伝子型 G3BP[12]および G14P[12]のウイルスに対する市販ワクチンの免疫応答を調査した。市販ウマロタウイルス不活化ワクチンは、RVA/Horse-tc/JPN/HO-5/1982/G3BP[12]株のみが含まれている。妊娠馬へのワクチン接種により、ワクチン株と同じ遺伝子型である G3BP[12]のウイルスだけでなく G14P[12]のウイルスに対しても中和抗体価の上昇が確認された。しかし、G14P[12]ウイルスに対する中和抗体価の幾何平均値は、G3BP[12]ウイルスのそれに比べて 1/2～1/3 程度低値であった。

本研究において、ウマロタウイルス病の簡易迅速診断法を開発するとともにヒト用ロタウイルス検査キットのウマロタウイルス病に対する有効性を明らかにし、検出感度を優先する場合は RT-LAMP 法を、簡便さを優先する場合はヒト用ロタウイルス検査キットを用いる等、状況に応じて検査方法を使い分けることが可能になった。臨床現場で応用可能なこれらの検査法は、本病の拡大阻止に寄与すると思われる。また、近年の流行ウイルスの分子疫学解析により、G14 型の VP7 遺伝子は 1990 年代後半の流行株における当該遺伝子と系統学的に区別されることが明らかになった。さらに、市販されている G3BP[12]ウイルスの単味ワクチンは、近年流行している G3BP[12]だけでなく、程度は低いものの G14P[12]のウイルスに対しても中和抗体を誘導することが明らかとなった。以上、本研究で得られた知見は、ウマロタウイルス病の早期診断およびワクチンによる制御において極めて有用な情報であると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

ウマロタウイルス病は生後 3 ヶ月齢までの子ウマに多発し、水様性下痢を主徴とする急性感染病である。臨床現場で容易かつ迅速に実施可能な診断法の開発は、ウマロタウイルス病の感染拡大阻止に極めて有効と考えられる。一方、北海道日高地方において、1990 年代前半まで

は遺伝子型 G3BP[12]のウイルスが優勢に流行していたことから、この疫学調査結果を基に G3BP[12]の不活化ワクチンが開発された。1990年代後半から G3BP[12]に加えて G14P[12]のウイルスが流行していることが明らかとなったが、それ以降のウマロタウイルスの疫学調査に関する報告はなく、近年の流行状況は不明である。また、G14P[12]のウマロタウイルスに対する現在のワクチンの有効性は明らかでない。以上のことから本研究では、ウマロタウイルス病に対する簡易迅速診断法の開発、北海道日高地方における近年流行株の遺伝子型別およびワクチン接種馬での流行株に対する抗体応答を明らかにする目的で、以下の課題について取り組んでいる。

第1章では、RT-PCR法と比較して操作が簡易かつ反応時間が短い RT-LAMP法に注目し、ウマロタウイルス病への応用を検討した。ウマロタウイルスの主要な遺伝子型が G3BP[12]および G14P[12]であることから、VP4 遺伝子の P[12]型を標的とした RT-LAMP法の開発を試みた。その結果、P[12]型のウマロタウイルスに対して特異的かつ高感度にウマロタウイルスを検出可能な RT-LAMP法を開発した。

第2章では、ヒト用ロタウイルス検査キットのウマロタウイルス病への応用を試みた。ヒト用ロタウイルス検査キットは、新たな試薬や装置が必要なく、臨床現場において極めて短時間に結果を得られる。その結果、イムノクロマト法を原理としたディップスティック‘栄研’ロタ（栄研化学、東京）がウマロタウイルス病の診断に有用であることが明らかとなった。

第3章では、日高地方において2003年から2008年に採材した子ウマの下痢便を用いてウマロタウイルス病の分子疫学調査を実施した。Semi-nested RT-PCR法による G/P 型別により、G3P[12]および G14P[12]がともに広く流行していることが明らかとなった。次に、VP7および VP4 遺伝子塩基配列の系統樹解析を行った結果、VP4 遺伝子の P[12]型は、1980年代から流行している P[12]型と同系統に分類された。VP7 遺伝子の G3型についても1980年代から流行している G3B 亜型と同系統に分類され、長期間に渡り本亜型のウマロタウイルスが存続していることが示された。一方、G14型は全て1990年代後半に確認された G14型とは別系統に分類され、ヨーロッパおよびオーストラリア、また1987年に日本で分離された G14型の1株と近縁であったことから、1980年代に日本に存在していたウイルスの再出現、あるいは海外から2000年ごろに日本へ侵入したものと推測された。

第4章では、近年の流行株である遺伝子型 G3BP[12]および G14P[12]のウイルスに対するワクチンの免疫応答を調査した。市販ウマロタウイルス不活化ワクチンは、RVA/Horse-tc/JPN/HO-5/1982/G3BP[12]株のみが含まれている。妊娠馬へのワクチン接種により、ワクチン株と同じ遺伝子型である G3BP[12]のウイルスだけでなく G14P[12]のウイルスに対しても中和抗体価の上昇が確認された。しかしながら、G14P[12]ウイルスに対する中和抗体価の幾何平均値は、G3BP[12]のウイルスに比べて1/2～1/3低値であった。

本研究により、RT-LAMP法およびヒト用ロタウイルス迅速検査キットは、ともに臨床現場で検査可能な方法であることから、検出感度を優先する場合は RT-LAMP法を、簡便さを優先する場合は迅速検査キットを用いる等、状況に応じて検査法を使い分けることが可能になった。臨床現場で応用可能なこれらの方法は、本病の早期診断を可能にすることから、本病の拡大阻止に寄与すると考えられる。また、現在市販されている G3BP[12]ウイルスの単味ワクチンは、近年流行している G3BP[12]のみならず、G14P[12]のウイルスに対しても中和抗体を誘導することが明らかとなった。これらのことから、本研究で得られた知見は、ウマロタウイルス病の早期診断およびワクチンによる制御において極めて有用な情報であると考えられる。

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があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Detection of equine rotavirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)
著 者 名 : Nemoto, M., Imagawa, H., Tsujimura, K., Yamanaka, T., Kondo, T. and Matsumura, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 72(6): 823-826, 2010
- 2) 題 目 : Evaluation of rapid antigen detection kits for diagnosis of equine rotavirus infection
著 者 名 : Nemoto, M., Hata, H., Higuchi, T., Imagawa, H., Yamanaka, T., Niwa, H., Bannai, H., Tsujimura, K., Kondo, T. and Matsumura, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 72(9): 1247-1250, 2010
- 3) 題 目 : Molecular characterization and analysis of equine rotavirus circulating in Japan from 2003 to 2008
著 者 名 : Nemoto, M., Tsunemitsu, H., Imagawa, H., Hata, H., Higuchi, T., Sato, S., Orita, Y., Sugita, S., Bannai, H., Tsujimura, K., Yamanaka, T., Kondo, T. and Matsumura, T.
学術雑誌名 : Veterinary Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 152(1-2): 67-73, 2011

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Equine herpesvirus type 1 mutant defective in glycoprotein E gene as candidate vaccine strain
著 者 名 : Tsujimura, K., Shiose, T., Yamanaka, T., Nemoto, M., Kondo, T. and Matsumura, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 71(11): 1439-1448, 2009
- 2) 題 目 : Interspecies transmission of equine influenza virus (H3N8) to dogs by close contact with experimentally infected horses
著 者 名 : Yamanaka, T., Nemoto, M., Tsujimura, K., Kondo, T. and Matsumura, T.
学術雑誌名 : Veterinary Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 139(3-4): 351-355, 2009
- 3) 題 目 : Loop-mediated isothermal amplification assays for detection of *Equid herpesvirus 1* and 4 and differentiating a gene-deleted candidate vaccine strain from wild-type *Equid herpesvirus 1* strains
著 者 名 : Nemoto, M., Tsujimura, K., Yamanaka, T., Kondo, T. and Matsumura, T.
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
巻・号・頁・発行年 : 22(1): 30-36, 2010
- 4) 題 目 : Pharmacokinetics of penciclovir after oral administration of its prodrug famciclovir to horses
著 者 名 : Tsujimura, K., Yamada, M., Nagata, S., Yamanaka, T., Nemoto, M., Kondo, T., Kurosawa, M. and Matsumura, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 72(3): 357-361, 2010
- 5) 題 目 : Antibody responses induced by Japanese whole inactivated vaccines against equine influenza virus (H3N8) belonging to Florida sublineage clade2
著 者 名 : Yamanaka, T., Bannai, H., Nemoto, M., Tsujimura, K., Kondo, T. and Matsumura, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 73(4): 483-485, 2011

- 6) 題 目 : Induction of a Th-1-biased IgG subclass response against equine herpesvirus type 1 in horses previously infected with type 4 virus
 著 者 名 : Bannai, H., Tsujimura, K., Kondo, T., Nemoto, M., Yamanaka, T., Sugiura, T., Maeda, K. and Matsumura, T.
 学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
 卷・号・頁・発行年 : 73(4): 535-539, 2011
- 7) 題 目 : Direct detection of equine herpesvirus type 1 DNA in nasal swabs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)
 著 者 名 : Nemoto, M., Ohta, M., Tsujimura, K., Bannai, H., Yamanaka, T., Kondo, T. and Matsumura, T.
 学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
 卷・号・頁・発行年 : 73(9): 1225-1227, 2011
- 8) 題 目 : Evaluation of the usefulness of a PCR assay performed at a clinical laboratory for the diagnosis of respiratory disease induced by equine herpesvirus type 1 in the field
 著 者 名 : Ohta, M., Nemoto, M., Tsujimura, K., Kondo, T. and Matsumura, T.
 学術雑誌名 : Journal of Equine Science
 卷・号・頁・発行年 : 22(3): 53-56, 2011
- 9) 題 目 : Prevalence of equine herpesvirus type 1 strains of neuropathogenic genotype in a major breeding area of Japan
 著 者 名 : Tsujimura, K., Oyama, T., Katayama, Y., Muranaka, M., Bannai, H., Nemoto, M., Yamanaka, T., Kondo, T., Kato, M. and Matsumura, T.
 学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
 卷・号・頁・発行年 : 73(12): 1663-1667, 2011
- 10) 題 目 : Development and evaluation of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for H3N8 equine influenza virus
 著 者 名 : Nemoto, M., Yamanaka, T., Bannai, H., Tsujimura, K., Kondo, T. and Matsumura, T.
 学術雑誌名 : Journal of Virological Methods
 卷・号・頁・発行年 : 178(1-2): 239-242, 2011
- 11) 題 目 : Loop-mediated isothermal amplification 法を用いた馬鼻肺炎による流産の診断法の検討
 著 者 名 : 小山 毅, 羽生英樹, 山口雅紀, 加藤昌克, 根本 学
 学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌
 卷・号・頁・発行年 : 64(12): 950-953, 2011