

氏名（本籍）	葛谷光隆（愛知県）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博乙第24号
学位授与年月日	平成10年3月13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	Molecular Epidemiological Studies on Group C Rotavirus Infection
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

ロタウイルスは、分節する2本鎖RNAのゲノムを持ち、動物およびヒトに胃腸炎を起こすことが知られている。ロタウイルスは内殻カプシドの抗原性およびウイルスゲノムの電気泳動パターン（ゲノムパターン）の相異により7群（A～G群）に分類されている。そのうちA、BおよびC群ロタウイルスはヒトへの病原性が確認されている。ヒトC群ロタウイルス（human group C rotavirus : CHRV）感染症は、1986年に初めて確認されて以来、世界各地で発生が報告され、ヒトの新興感染症の一つとして注目されている。しかしながら、CHRVは培養が困難なため、免疫電子顕微鏡法あるいは電気泳動で直接ウイルスRNAを検出する方法（RNA-PAGE法）以外にウイルスを検出することができず、CHRV感染症の実態を明らかにする上で障害になっている。また、CHRV野外株の遺伝子レベルにおける比較・解析はほとんど行なわれていない。著者は、我が国におけるCHRV感染症の実態を明らかにする目的で、CHRVの迅速・簡便な検出法の開発およびCHRV野外株の分子レベルにおける比較・解析を行い、以下の結果を得た。

最初に、CHRVの迅速・簡便な検出のため、モノクローナル抗体（MAb）を用いた逆受身血球凝集反応（reverse passive hemagglutination : RPHA）法およびラテックス凝集反応（latex agglutination : Lx-Ag）法を開発した。RPHA法には、ウイルス外殻蛋白を認識するMAb 5A12および内殻蛋白を認識するMAb 13A3の2種類の抗体を、グルタルアルデヒド固定羊赤血球にコートして用いた。46検体のヒト下痢便を用い、RPHA法の有用性を確認したところ、MAb 5A12でコートした血球によるRPHA法は、RNA-PAGE法の結果と46検体中44検体が一致した。一方、MAb 13A3でコートした血球によるRPHA法は、RNA-PAGE法の結果と完全に一致した。さらに、MAb 13A3を用いたLx-Ag法も開発し、

下痢便中のCHRVを2分間以内に検出することが可能になった。今回開発した検査法は、CHRVの検出が極めて迅速・簡便にできるため、本ウイルスの広範な疫学調査に有用であるのみならず、設備が十分に整っていない検査施設におけるCHRV感染症の診断にも有用であると考えられた。

次に、CHRV野外株の分子レベルにおける比較・解析を目的とし、岡山県で検出された異なるゲノムパターン（パターンⅠおよびⅡ型）のそれぞれ代表2株（OK118およびOK450株）について、ウイルス外殻糖蛋白（VP7）をコードする遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、両株の遺伝子は全く同じ長さ（1,063塩基対）であり、332個のアミノ酸をコードする1つの翻訳領域が各々に存在していることが解った。両遺伝子には46カ所で塩基の相異がみられ、そのうち、11カ所はアミノ酸配列の変化を伴っていた。OK118株のVP7アミノ酸配列は、既に報告されているCHRV 4株（1株は日本で検出、3株は外国で検出）の配列と98.4%以上の相同性があったのに対し、OK450株の配列はいずれの株とも約96%の相同性で、かつOK450株には特有のアミノ酸配列置換部位が9カ所に観察された。次に、1988年から1990年に岡山県内で検出されたCHRV 9株（パターンⅠ型5株およびパターンⅡ型4株）のVP7遺伝子について、OK118およびOK450株のVP7遺伝子をプローブとして用いたドットプロットハイブリダイゼーション法により相同性を解析した。その結果、高峻厳条件下において、OK118株プローブはパターンⅠ型の全ての株およびパターンⅡ型の1株の遺伝子と反応したのに対し、OK450株プローブはパターンⅡ型の3株の遺伝子とのみ強く反応した。以上のことから、岡山県内で検出されたCHRVは、ゲノムパターンの変化にほぼ一致したVP7遺伝子の相異が株間に認められた。

次に、我が国におけるCHRV感染症の実態を明らかにする目的で、1992年11月から1993年4月に、国内10県で下痢症患者の糞便を採取した。集めた1,114検体のうち、A群ロタウイルス陰性の784検体について、RPHA法によりCHRVの検出を試みた。その結果、7県で採取した計53検体がCHRV陽性になったことから、本ウイルスが国内に広く浸淫していることが明らかになった。CHRVは主に3月から4月に検出され、またCHRV感染症の好発年齢が3歳から8歳であることが判った。ウイルスの遺伝子レベルにおける比較・解析を目的とし、5県で検出されたCHRV 8株のゲノムパターンを調べたところ、それぞれのパターンは互いに驚くほど類似し、また、現在までに検出されているCHRV株のいずれとも異なっていた。さらに、検出された株のVP7遺伝子について、ドットプロットハイブリダイゼーション法により相同性を解析した結果、各株のVP7遺伝子は互いに高い相同性を示し、また1988年に検出されたOK118株とも高い相同性を示した。以上の成績から、1992年から1993年の冬季に全国的なCHRVの流行があったことが推察された。

著者は、本論文中において、培養が困難なCHRVの迅速・簡便な検出法を開発した。また、本法を用いて全国調査を行い、CHRVが我が国に広く浸淫していることを明らかにした。さらに、検出されたCHRV野外株のゲノムパターンおよびVP7遺伝子を分子レベルで比較・解析し、株間において遺伝子の相異がみられることを示した。これらの知見は、CHRV感染症の実態解明への新展開を導く基礎的資料として極めて重要であると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

ロタウイルスは、分節する2本鎖RNAのゲノムを持ち、動物およびヒトに胃腸炎を起こすことが知られている。ロタウイルスは内殻カプシドの抗原性およびウイルスゲノムの電気泳動パターン（ゲノムパターン）の相異により7群（A～G群）に分類されている。そのうちA、BおよびC群ロタウイルスはヒトへの病原性が確認されている。ヒトC群ロタウイルス（human group C rotavirus：CHRV）感染症は、1986年に初めて確認されて以来、世界各地で発生が報告され、ヒトの新興感染症の一つとして注目されている。しかしながら、CHRVは培養が困難なため、免疫電子顕微鏡法あるいは電気泳動で直接ウイルスRNAを検出する方法（RNA-PAGE法）以外にウイルスを検出することができず、CHRV感染症の実態を明らかにする上で障害になっている。また、CHRV野外株の遺伝子レベルにおける比較・解析はほとんど行なわれていない。申請者は、我が国におけるCHRV感染症の実態を明らかにする目的で、CHRVの迅速・簡便な検出法の開発およびCHRV野外株の分子レベルにおける比較・解析を行い、以下の結果を得た。

最初に、CHRVの迅速・簡便な検出のため、モノクローナル抗体（MAb）を用いた逆受身血球凝集反応（reverse passive hemagglutination：RPHA）法およびラテックス凝集反応（latex agglutination：Lx-Ag）法を開発した。RPHA法には、ウイルス外殻蛋白を認識するMAb 5A12および内殻蛋白を認識するMAb 13A3の2種類の抗体を、グルタルアルデヒド固定羊赤血球にコートして用いた。46検体のヒト下痢便を用い、RPHA法の有用性を確認したところ、MAb 5A12でコートした血球によるRPHA法は、RNA-PAGE法の結果と46検体中44検体が一致した。一方、MAb 13A3でコートした血球によるRPHA法は、RNA-PAGE法の結果と完全に一致した。さらに、MAb 13A3を用いたLx-Ag法も開発し、下痢便中のCHRVを2分間以内に検出することが可能になった。今回開発した検査法は、CHRVの検出が極めて迅速・簡便にできるため、本ウイルスの広範な疫学調査に有用であるのみならず、設備が十分に整っていない検査施設におけるCHRV感染症の診断にも有用であると考えられた。

次に、CHRV野外株の分子レベルにおける比較・解析を目的とし、岡山県で検出された異なるゲノムパターン（パターンⅠおよびⅡ型）のそれぞれ代表2株（OK118およびOK450株）について、ウイルス外殻糖蛋白（VP7）をコードする遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、両株の遺伝子は全く同じ長さ（1,063塩基対）であり、332個のアミノ酸をコードする1つの翻訳領域が各々に存在していることが解った。両遺伝子には46カ所塩基の相異がみられ、そのうち、11カ所はアミノ酸配列の変化を伴っていた。OK118株のVP7アミノ酸配列は、既に報告されているCHRV 4株（1株は日本で検出、3株は外国で検出）の配列と98.4%以上の相同性があったのに対し、OK450株の配列はいずれの株とも約96%の相同性で、かつOK450株には特有のアミノ酸配列置換部位が9カ所に観察された。次に、1988年から1990年に岡山県内で検出されたCHRV 9株（パターンⅠ型5株およびパターンⅡ型4株）のVP7遺伝子について、OK118およびOK450株のVP7遺伝子をプローブとして用いたドットプロットハイブリダイゼーション法により相同性を解析した。その結果、高峻嶮条件下において、OK118株プローブはパターンⅠ型の全ての株およびパターンⅡ型の1株の遺伝子と反応したのに対し、OK450株プローブはパターンⅡ型の3株の遺伝子とのみ強く反応した。以上のことから、岡山県内で検出されたCHRVは、ゲノムパターンの変化にほぼ一致したVP7遺伝子の相異が株間に認められた。

次に、我が国におけるCHRV感染症の実態を明らかにする目的で、1992年11月から1993年4月に、国内10県で下痢症患者の糞便を採取した。集めた1,114検体のうち、A群ロタウイルス陰性の784検体について、RPHA法によりCHRVの検出を試みた。その結果、7県で

採取した計53検体がCHRV陽性になったことから、本ウイルスが国内に広く浸淫していることが明らかになった。CHRVは主に3月から4月に検出され、またCHRV感染症の好発年齢が3歳から8歳であることが判った。ウイルスの遺伝子レベルにおける比較・解析を目的とし、5県で検出されたCHRV 8株のゲノムパターンを調べたところ、それぞれのパターンは互いに驚くほど類似し、また、現在までに検出されているCHRV株のいずれとも異なっていた。さらに、検出された株のVP7遺伝子について、ドットプロットハイブリダイゼーション法により相同性を解析した結果、各株のVP7遺伝子は互いに高い相同性を示し、また1988年に検出されたOK118株とも高い相同性を示した。以上の成績から、1992年から1993年の冬季に全国的なCHRVの流行があったことが推察された。

申請者は、本論文中において、培養が困難なCHRVの迅速・簡便な検出法を開発した。また、本法を用いて全国調査を行い、CHRVが我が国に広く浸淫していることを明らかにした。さらに、検出されたCHRV野外株のゲノムパターンおよびVP7遺伝子を分子レベルで比較・解析し、株間において遺伝子の相異がみられることを示した。これらの知見は、CHRV感染症の実態解明への新展開を導く基礎的資料として極めて重要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あるものと認めた。