

氏名(本(国)籍)	増田 恒 幸(鳥取県)				
推薦教員氏名	東京農工大学 准教授 長 井 誠				
学位の種類	博士(獣医)				
学位記番号	獣医博乙第142号				
学位授与年月日	平成28年3月14日				
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当				
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻				
研究指導を受けた大学	東京農工大学				
学位論文題目	家畜の下痢症関連ウイルスの遺伝的多様性と迅速診断に関する研究				
審査委員	主査	東京農工大学	准教授	長 井 誠	
	副査	帯広畜産大学	教授	小 川 晴 子	
	副査	岩手大学	教授	古 市 達 哉	
	副査	東京農工大学	教授	水 谷 哲 也	
	副査	岐阜大学	教授	浅 井 鉄 夫	
	副査	岐阜大学	教授	筒 井 俊 之	

学位論文の内容の要旨

当該論文は、畜産経営に大きな影響を与える家畜の下痢症に焦点を当て、中でも原因として大きな割合を占めるウイルス性の下痢を題材とし、臨床症状が通常と異なる症例から分離された病原ウイルスの分子生物学的研究を行い、さらに複数の下痢症ウイルスを同時に検出する診断系の開発について述べたものであり、3章から構成されている。

第一章では、病原性とウイルス遺伝子欠損の関係を考察している。ワクチン接種を行っていない初発農場での豚流行性下痢(PED)の発生では、通常哺乳豚に高い死亡率が認められるが、初発のワクチン未接種農家であるにもかかわらず、死亡率の極めて低いPED症例に遭遇した。分離されたウイルスを分子生物学的に解析したところ、S遺伝子領域のN末端側に194アミノ酸の大きな欠損があることが確認された。このような大きな欠損を保有するPEDウイルス野外株はこれまで報告がなく、本例が最初の報告となった。同じコロナウイルス属の伝染性下痢(TGE)ウイルスはPED同様の激しい症状を豚に引き起こすが、S遺伝子領域にある大きな欠損以外にTGEウイルスと同じ遺伝子を持つ呼吸器コロナウイルスは豚にほとんど症状を示さない。今回のPEDウイルスS遺伝子欠損株も症状が穏やかであることから、このS遺伝子の大きな欠損は病原性の発現に関係する可能性が考えられる。

第二章では、新しい遺伝子型のウイルスが発症の年齢要因に影響を与える可能性を示唆している。通常、A群ロタウイルスは幼弱動物の下痢を引き起こすが、成獣ではA群ロタウイルスによる下痢は希である。成牛が集団下痢を起こした症例からA群ロタウイルスが有意に分離された。病性鑑定を詳細に実施したが、通常成牛の下痢症の原因となる病原体は全て否定された。分離されたA群ロタウイルスの遺伝子型を調べたところ、VP7遺伝子が我が国では初めてとなるG15型であり、VP4遺伝子型も報告例の多くないP[14]型であった。このG15P[14]遺伝子型の組み合わせはこれまで例がなく、今回が初めての報告である。

これまで成牛の下痢症から分離されている遺伝子型は G8P[1]型や G21P[29]型といった通常子牛の下痢症で流行している株とは異なる，検出される頻度が非常に低い株であることから，今回の G15P[14]型も含め，希少な遺伝子型の A 群ロタウイルス株は成牛の下痢の原因になりうる可能性が示された。

第三章では，第一章および第二章で述べた臨床症状が通常でないウイルス性下痢の発生があることを受け，原因を正確にかつ迅速に診断する必要性が示されたことから，下痢症を迅速に診断する系を開発した。豚の下痢症の診断にはゲルベースの RT-PCR やリアルタイム RT-PCR がウイルスごとに行われており，今般我が国で流行している PED ウイルス，TGE ウイルス，デルタコロナウイルスおよび A 群ロタウイルスを同時に診断する方法は実用化されていなかった。そこでこれら 4 種のウイルスを迅速に検出する系の開発を行った。方法は，感度が高く，正確性の高いリアルタイム RT-PCR を採用し，さらにコンタミネーションを防止するためワンステップ法による方法を検討した。その結果，4 種類を同一な条件で検出できる条件が得られ，同時に同じ設定でのリアルタイム PCR の実施が可能となり，診断に要する時間は約 75 分と大幅に短縮された。感度においても，従来の方法よりも 1～1000 倍の向上が認められた。

ウイルスの遺伝子変異や遺伝子型と病勢との関係は明らかにされていない部分が多く，本研究はその基礎となる貴重なデータを示している。さらに正確かつ迅速な診断系の開発は疾病の防疫に有用であり，今回開発した豚下痢症における 4 ウイルスの迅速診断系は，我が国の畜産経営の安定化に寄与する，貴重な研究であると思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

当該論文について，審査委員は論文の新規性および独自性を精査し，学位論文としての価値があるかを審査した。当該論文の第一章では，従来の豚流行性下痢 (PED) よりも病勢が穏やかで，子豚の死亡率の少ない PED 症例に遭遇し，分子生物学的手法を用いて病原ウイルスの解析を行った結果，S 遺伝子領域の N 末端側に 194 アミノ酸の大きな欠損のあることを発見した。この変異は野外の PED ウイルスではこれまで報告のない遺伝子変異であり，同属の呼吸器コロナウイルスと伝染性下痢 (TGE) ウイルスとの関係に類似していることから，S 遺伝子領域の大きな欠損が病原性の減弱に関係する可能性を述べている。第二章では，稀有な A 群ロタウイルスの成牛の集団下痢の症例から，これまでに報告のない遺伝子型の組み合わせである G15P[14] 遺伝子型 A 群ロタウイルスを分離した。このウイルスの VP7 および VP4 以外の遺伝子分節は通常のウシ A 群ロタウイルスと類似しており，ウシに馴化したウイルスである可能性が示唆された。詳細な病性鑑定により他の病原体の関与を否定し，この新しい遺伝子型の株が成牛の下痢症の発生に関与する可能性を論述している。第三章においては，第一章および第二章で臨床症状による診断のできない症例に遭遇したことから，下痢症の診断には正確かつ迅速な診断を実施する必要性が強く示されたことを受け，豚の下痢症の診断において，PED ウイルス，TGE ウイルス，デルタコロナウイルスおよび A 群ロタウイルスの 4 種類を同時に迅速診断する系は未だ実用化されていないことから，この 4 種を対象とした診断系の開発を企画した。検出感度や特異性が高く，迅速に診断が実施可能で，しかもコンタミネーションのリスクを軽減するため，ワンステップ法によるリアルタイム RT-PCR を採用し，診断系を検討したところ，同じ条件で一度に 4 種類のウイルスを同時に検出できる系の作出に成功した。さらに野外材料について本診断法を応用したところ，検出感度および特異性は高く，良好な成績を得たことを述べている。

第一章および第二章に書かれた内容はいずれも新規性が高く，世界初というインパクト

の高い知見が示されている。さらに、第一章および第二章が背景となって第三章における診断系の開発につながる流れは一貫性があり、第三章の内容も十分な実験データが示されており、有用な診断系が開発できたという論旨は明確である。

以上のことから、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 : Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer
著 者 名 : Masuda, T., Nagai, M., Yamasato, H., Tsuchiaka, S., Okazaki, S., Katayama, Y., Oba, M., Nishiura, N., Sassa, Y., Omatsu, T., Furuya, T., Koyama, S., Shirai, J., Taniguchi, K., Fujii, Y., Todaka, R., Katayama, K. and Mizutani, T.
学術雑誌名 : Veterinary Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 171 (1-2): 66-73
- 2) 題 目 : New porcine epidemic diarrhoea virus variant with a large deletion in the spike gene identified in domestic pigs
著 者 名 : Masuda, T., Murakami, S., Takahashi, O., Miyazaki, A., Ohashi, S., Yamasato, H. and Suzuki, T.
学術雑誌名 : Archives of Virology
巻・号・頁・発行年 : 160 (10): 2565-2568
- 3) 題 目 : Development of one-step real-time reverse transcriptase-PCR-based assays for the rapid and simultaneous detection of four viruses causing porcine diarrhea
著 者 名 : Masuda, T., Tsuchiaka, S., Ashiba, T., Yamasato, H., Fukunari, K., Omatsu, T., Furuya, T., Shirai, J., Mizutani, T. And Nagai, M.
学術雑誌名 : The Japanese Journal of Veterinary Research
巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Possibility of Neospora caninum infection by venereal transmission in CB-17 scid mice
著 者 名 : Masuda, T., Kobayashi, Y., Maeda, R. and Omata, Y.
学術雑誌名 : Veterinary Parasitology
巻・号・頁・発行年 : 149 (1-2) : 130-133, 2007
- 2) 題 目 : Full genome analysis of bovine astrovirus from fecal samples of cattle in Japan: identification of possible interspecies transmission of bovine astrovirus
著 者 名 : Nagai, M., Omatsu, T., Aoki, H., Otomaru, K., Uto, T., Koizumi, M., Minami-Fukuda, F., Takai, H., Murakami, T., Masuda, T., Yamasato, H., Shiokawa, M., Tsuchiaka, S., Naoi, Y., Sano, K., Okazaki, S., Katayama, Y., Oba, M., Furuya, T., Shirai, J. and Mizutani, T.
学術雑誌名 : Archives of Virology
巻・号・頁・発行年 : 160 (10): 2491-2501, 2015

3) 題 目 : Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses
isolated in Japan from 2013 to 2014
著 者 名 : Suzuki, T., Murakami, S., Takahashi, O., Kodera, A., Masuda, T.,
Itoh, S., Miyazaki, A., Ohashi, S. and Tsutsui, T.
学術雑誌名 : Infection, Genetics and Evolution
卷・号・頁・発行年 : 36: 363-368, 2015