

氏 名 (本籍)	森 嘉 生 (岐阜県)		
学 位 の 種 類	博士 (獣医)		
学 位 記 番 号	獣医博甲第 1 1 9 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 4 年 3 月 1 3 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 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	岐阜大学		
学 位 論 文 題 目	Studies on interspecies Infections of avian rotaviruses in a suckling mouse model (トリロタウイルスの哺乳マウスモデルにおける異種間 感染に関する研究)		
審 査 委 員	主査	岐阜大学	教授 源 宣 之
	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 平 井 克 哉

論 文 の 内 容 の 要 旨

ロタウイルスは幼若個体の下痢症における最も主要な原因ウイルスであり、多くの哺乳類および鳥類から分離されている。ロタウイルスはそれぞれに特定の宿主をもつが、異種間感染も起こすことから、人獣共通感染症の病原体としての可能性が示唆されている。鳥類を宿主とするトリロタウイルスは、哺乳類ロタウイルスと遺伝子および抗原性状が大きく異なるにも関わらず、疫学的にヒトおよびウジに浸潤していることが示唆されている。しかし、トリロタウイルスが哺乳類に感染し病原性を示す直接的な証拠は現在のところ全く報告されていない。そこで本研究では、哺乳マウスを用いてトリロタウイルスの感染実験を行い、その感染性および病原発現機構を明らかにすることを試みた。

最初に、ハト由来P0-13株およびシチメンチョウ由来Ty-3株をddY系哺乳マウスに経口接種することで病原性を検討した。その結果、P0-13株ではその接種量および哺乳マウスの日齢に依存して黄色水様下痢を引き起したが、Ty-3株では発症しなかった。P0-13株の病理組織学的検索において、P0-13株の感染は少数の回腸吸収上皮細胞にのみ認められた。しかし、病変は十二指腸から回腸における吸収上皮細胞の風船様膨化として数多く認められ、ウイルス感染細胞と一致しなかった。病変の観察される期間は発症期間とよく一致することから、この病変が下痢発症の直接の原因であることが示唆された。近年、哺乳類ロタウイルスの非

構造蛋白質NSP4がエンテロトキシンとして働くことが報告されているが、P0-13株感染細胞と変性細胞の不一致は、ウイルスの増殖に伴って感染細胞から放出されたNSP4が周囲の細胞に作用して起きたのではないかと考えられた。

次に、P0-13株NSP4をGST融合蛋白質として大腸菌で発現精製し、それを腹腔内接種することで病原性を検討した。P0-13株NSP4を接種された哺乳マウスはウイルス接種時と同様の黄色水様下痢を発現したことから、P0-13株による発症にNSP4の関与していることが示唆された。また、各種の欠損NSP4の接種実験から、P0-13株NSP4のエンテロトキシン活性部位はアミノ酸109-135位に存在することが分かった。これはSA11株NSP4で報告されている部位にほぼ一致した。さらに、このエンテロトキシン活性がトリロタウイルスで保存されているかを検討するため、シチメンチョウ由来Ty-3株およびTy-1株、およびニワトリ由来Ch-1株のNSP4遺伝子配列を決定比較した。その結果、トリロタウイルスのNSP4は、Ch-1株を除いて、哺乳類ロタウイルスのそれと比較してよく保存されていた。特にアミノ酸109-135位の領域はCh-1株における一カ所の同類アミノ酸置換を除いて、トリロタウイルス株間で100%一致した。このことから、他のトリロタウイルスのNSP4も同様のエンテロトキシン活性を持ち、哺乳マウスに病原性を示し得ることが示唆された。

そこで、哺乳マウスに非病原性のTy-3株NSP4を哺乳マウスに接種したところ、明瞭な下痢を発現した。したがって、Ty-3株では腸管でNSP4を産生できないために病原性を示さないことが推測された。Ty-3株は哺乳マウスに経口接種後4時間以内で腸管から回収できなくなることから、哺乳マウスの胃腸内で何らかの不活性化を受けることが考えられた。

次いで、どのウイルス構造蛋白質が胃腸内での不活性化および病原性の違いに関係しているかを明らかにするため、P0-13株とTy-3株の外殻蛋白質VP4およびVP7を入れ替えたリアソータント株を作製し、哺乳マウスに接種した。その結果、Ty-3株を基盤にP0-13株のVP4とVP7の両方を持つ株のみが病原性を示したことから、VP4とVP7がP0-13株とTy-3株の病原性の違いに関与していることが明らかとなった。さらに、Ty-3株のVP7を持つ株はすべてTy-3株と同様に接種4時間以内で腸管からウイルスを回収できなくなったことから、Ty-3株のVP7は不活性化に関与することが分かった。この不活性化は哺乳マウスに非病原性のTy-1株およびCh-1株においても認められたことから、トリロタウイルスの病原性と宿主域を制限する重要な要因の一つであることが示唆された。また、Ty-3株のVP4を持つ株もウイルスが増殖できないことから、VP4も不活性化とは異なる機構で病原性に関与することが示唆された。

以上のように、トリロタウイルスP0-13株が宿主の壁を越え哺乳マウスに感染し、病原性を示すことを初めて明らかにした。一方、今回用いたその他のトリロタウイルス3株は、哺乳マウスに病原性を示さなかった。P0-13株の場合、回腸吸収上皮細胞に感染しエンテロトキシンであるNSP4を産生することで下痢を引き起こす病原メカニズムが推測された。他のトリロタウイルスのNSP4もエンテロトキシン活性を持つことが示唆されたことから、トリロタウイルス株間の哺乳マウスにおける病原性の違いにNSP4は直接関係ないことが考えられた。この病原性の違いは、胃腸管におけるウイルス不活性化の差にあることが分かった。本研究のデータは、ロタウイルスの異種動物への感染性および病原発現機構を解明する上で有益であると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者、森 嘉生君の学位論文は、ロタウイルスの異種間感染を証明するために、哺乳類ロタウイルスと遺伝子および抗原性状が大きく異なるにも関わらず、疫学的にヒトおよびウシに浸潤していることが示唆されているトリロタウイルスを用いて、哺乳マウスで感染実験を行い、その感染性および病原発現機構を明らかにしたものである。

氏は、まず哺乳マウスに対して、ハト由来P0-13株が下痢を起こし、シチメンチョウ由来Ty-3株が下痢を起こさないことを見つけた。次いで、両株の下痢原性に関与していると考えられている非構造蛋白質、NSP4を大腸菌にそれぞれ発現させ、それらが共に哺乳マウスに下痢を起こすことを示した。さらに、両株における病原性の違いに、ウイルスの外殻蛋白質、VP4とVP7が、特にVP7 の関与が重要であることを、P0-13株とTy-3株とのリアソータント株を用いて明らかにした。以上の得られた成績は、次の3つに大別される。

第一に、ハト由来P0-13株およびシチメンチョウ由来Ty-3株をddY系哺乳マウスに経口接種することで病原性を検討した。その結果、P0-13株はその接種量および哺乳マウスの日齢に依存して黄色水様下痢を引き起した。一方、Ty-3株は最高濃度のウイルス液を接種しても発症することはなかった。P0-13株の病理組織学的検索を行ったところ、P0-13株の感染は少数の回腸吸収上皮細胞にのみ認められた。しかし、病変は十二指腸から回腸における吸収上皮細胞の風船様膨化として数多く認められ、ウイルス感染細胞は変性細胞と一致しないことが確認された。一方、病変の観察される期間は発症期間とよく一致することから、この病変が下痢発症の直接の原因であることが示唆された。近年、哺乳類ロタウイルスの非構造蛋白質NSP4がエンテロトキシンとして働くことが報告されているが、P0-13株感染細胞と変性細胞の不一致は、ウイルスの増殖に伴って感染細胞から放出されたNSP4が周囲の細胞に作用して起きたのではないかと考えられた。

そこで第二に、P0-13株NSP4をGST融合蛋白質として大腸菌で発現、精製し、それを腹腔内接種することで病原性を検討した。その結果、P0-13株NSP4を接種された哺乳マウスはウイルス接種時と同様の黄色水様下痢を発症したことから、P0-13株による発症にNSP4が関与していることが示唆された。また、各種の欠損NSP4の接種実験から、P0-13株NSP4のエンテロトキシン活性部位はアミノ酸109-135位に存在することが分かった。これはSA11株NSP4で報告されている部位にほぼ一致した。次に、このエンテロトキシン活性がトリロタウイルスで保存されているかを検討するため、シチメンチョウ由来Ty-3株およびTy-1株、およびニワトリ由来Ch-1株について、それらのNSP4遺伝子配列を決定し比較した。その結果、トリロタウイルスのNSP4は、Ch-1株を除いて、哺乳類ロタウイルスのそれと比較してよく保存されていた。特にアミノ酸109-135位の領域はCh-1株における一カ所の同類アミノ酸置換を除いて、トリロタウイルス株間で100%一致した。このことから、他のトリロタウイルスのNSP4も同様のエンテロトキシン活性を持ち、哺乳マウスに病原性を示し得ることが示唆された。

そこで、哺乳マウスに非病原性のTy-3株のNSP4を哺乳マウスに接種したところ、明瞭な下痢を発現した。したがって、Ty-3株ではNSP4を産生できないために病原性を示さないことが推測された。その原因として、Ty-3株は哺乳マウスに経口接種後4時間以内で腸管から回収できなくなることから、哺乳マウスの胃腸内で何らかの不活性化を受けることが考えられた。

第三に、どのウイルス構造蛋白質が胃腸内での不活性化および病原性の違いに関係しているかを明らかにするため、P0-13株とTy-3株のリアソータント株を作製し哺乳マウスに接種した。特に最も外界からの作用を受けやすいと考えられる外殻蛋白質VP4およびVP7を入れ替えたリアソータント株を実験に用いた。その結果、Ty-3株を基盤にP0-13株のVP4とVP7の両方を持つ株のみが病原性を示したことから、VP4とVP7がP0-13株とTy-3株の病原性の違いに関与していることが明らかとなった。さらに、Ty-3株のVP7を持つ株はすべてTy-3株と同様に接種4時間以内で腸管からウイルスを回収できなくなったことから、Ty-3株のVP7は不活性化に関与することが分かった。この不活性化は哺乳マウスに非病原性のTy-1株およびCh-1株においても認められたことから、トリロタウイルスの病原性と宿主域を制限する重要な要因の一つであることが示唆された。また、Ty-3株のVP4を持つ株もウイルスが増殖できないことから、VP4も不活性化とは異なる機構で病原性に関与することが示唆された。

以上のように、トリロタウイルス株間の哺乳マウスにおける病原性の違いにNSP4は直接関与しないことが考えられ、この病原性の違いは胃腸管におけるウイルス不活性化の差にあることが明らかとなった。

以上のように、本研究のデータは、ロタウイルスの異種動物への感染性および病原発現機構を解明する上で有益なデータを提供するものと考えられる。

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： Avian-to mammal transmission of an avian rotavirus: analysis of its pathogenicity in a heterologous mouse model
著 者 名： Mori Yoshio, Sugiyama Makoto, Takayama Mutsuyo, Atoji Yasurou, Masegi Toshiaki and Minamoto Nobuyuki
学術雑誌名： Virology 288(1): 63~70, 2001

既発表学術論文：

- 1) 題 目： Molecular epidemiology of rabies in Thailand
著 者 名： Ito Naoto, Sugiyama Makoto, Oraveeraku Kanisak, Piyaviriyakul Prapruddee, Lumlertdacha Boonlert , Arai Takashima Youko, Tamura Yutaka, Mori Yoshio and Minamoto Nobuyuki
学術雑誌名： Microbiology and Immunology 43(6): 551~559, 1999
- 2) 題 目： Complete nucleotide sequence of group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses
著 者 名： Ito Hiroshi, Sugiyama Makoto, Masubuchi Katsuo, Mori Yoshio and Minamoto Nobuyuki
学術雑誌名： Virus Research 75(2): 123~138, 2001