

氏名（本（国）籍）	安部昌子（愛知県）
主指導教員名	岐阜大学 教授 杉山 誠
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博甲第316号
学位授与年月日	平成22年9月14日
学位授与の要件	学位規則第3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	ウシにおけるA群ロタウイルスの生態に関する研究
審査委員	主査 岐阜大学 教授 恒光 裕 副査 帯広畜産大学 教授 鈴木 宏志 副査 岩手大学 教授 重茂 克彦 副査 東京農工大学 教授 本多 英一 副査 岐阜大学 教授 杉山 誠

## 論文の内容の要旨

A 群ロタウイルス（ARV）は、鳥類及びヒトを含めたほぼ全ての哺乳類に感染し、主として幼若個体に急性胃腸炎を引き起こす。また、ARV は動物種を越えて感染を起こすことも報告されているものの、自然界における生態は不明である。

ARV は 11 本に分節化した 2 本鎖 RNA をゲノムとして保有し、これらは 6 つの構造蛋白（VP1-4, VP6-7）と 6 つの非構造蛋白（NSP1-6）をコードしている。ARV は主にリアソートメント（遺伝子分節の組換え）、リアレンジメント（1 遺伝子分節内での部分的な重複あるいは欠失）及び点突然変異により、遺伝的多様性を獲得している。

自然界において、種間伝播により発生したと考えられる組換え体ウイルスも数多く検出されている。なかでも、ウシはヒトや他の動物における ARV の多様性拡大に大きな影響を与えていることが示されている。一方、ARV は不顕性感染も引き起こすことが知られているものの、ARV の感染環におけるその役割は分かっていない。

以上のような背景から、ARV 感染症を制御するためには、自然界における ARV の生態解明が重要である。そこで本研究では、トレーサビリティが確立されているウシを対象として、分子生物学的及び分子系統学的解析を行うことにより、ウシ正常個体における ARV の感染実態及び野外における ARV 遺伝子動態の解明を試みた。

第一章では、ウシにおける ARV の感染実態を把握するため、岐阜県の 3 地域（郡上、各務原、下呂）を対象に、月 1 回定期的に採取したウシ正常便サンプル 2,452 例から RT-semi-nested PCR により ARV 遺伝子の検出を行った。その結果、郡上地域由来のサンプル 868 例中 40 例、各務

原地域由来のサンプル 1360 例中 8 例，下呂地域由来のサンプル 224 例中 23 例から ARV-VP4 遺伝子が検出され，ウシ正常便中に ARV が排泄されていることを明らかにした。またその排泄は，本感染症の流行期である冬期から春期に集中して認められた。このことから，ARV 株の排泄と下痢流行発生の季節性に関連性があることが示唆された。次に，検出された ARV 株について，外殻蛋白をコードする VP7 及び VP4 遺伝子がそれぞれ規定する G 及び P 遺伝子型の分類を行った。その結果，ウシ正常個体には多様な G/P 遺伝子型 ARV 株が分布していることを示した。また，新型 ARV 株の存在も明らかにした。

第二章では，第一章において検出された新型 ARV 株（AzuK-1 株）の分離を行い，分子生物学的性状を明らかにした。AzuK-1 株の VP7，VP4 及び NSP3 遺伝子分節が新しい遺伝子型に属することを示し，ロタウイルスの専門家らで組織された国際機関 Rotavirus Classification Working Group (RCWG) によりそれぞれ G21，P[29]及び T9 遺伝子型と認定を受けた。AzuK-1 株のその他の分節の遺伝子型はウシ由来 ARV 株に共通して認められるタイプであったものの，分子系統学的解析から，VP6 及び NSP2 遺伝子分節は，ウシ由来 ARV 株よりもサルあるいはイヌ・ネコ由来 ARV 株とより近縁であることがわかった。このことから，AzuK-1 株は，ウシ由来 ARV 株がサル，イヌあるいはネコ由来 ARV 株と複雑に遺伝子分節の組換えを繰り返しながら進化したと考えられた。次に，1997 年から 1998 年に北海道で採取されたウシ糞便サンプルを用いて，レトロスペクティブ的な観点から G21P[29]遺伝子型 ARV 株の感染状況を調査した。その結果，G21P[29]遺伝子型 ARV 株が検出されたことから，この株は 10 年以上前から日本の広い範囲のウシに浸潤していることを明らかにした。

第三章では，第一章において検出された郡上地域由来 ARV 株 6 株について全ゲノムを解析することにより，野外における ARV の遺伝子動態について考察した。6 株（G10P[11]遺伝子型株 2 株，G8P[11]遺伝子型株 2 株，G6P[11]遺伝子型及び G21P[29]遺伝子型株 1 株ずつ）における VP7 及び VP4 遺伝子分節以外の遺伝子型は，I2 (VP6)・R2 (VP1)・C2 (VP2)・M2 (VP3)・A13/A3 (NSP1)・N2 (NSP2)・T6/T9 (NSP3)・E2 (NSP4)・H3 (NSP5) であり，NSP1 及び NSP3 遺伝子分節以外は全て共通したタイプであった。6 株について分子系統学的解析及び相同性解析を行ったところ，株間の近縁度は遺伝子分節によって異なっていた。以上のことから，野外において，ARV の各遺伝子分節はそれぞれに組換えを起こしていると考えられた。さらにこの遺伝子分節の組換えは，外殻蛋白をコードする VP4 及び VP7 遺伝子分節においては遺伝子型間で，他の遺伝子分節においては遺伝子型内で，頻繁に起きていることを明らかにした。また，2 株の NSP5 遺伝子分節でリアレンジメントを確認し，野外における ARV の遺伝的多様性を示した。

以上，本研究では，野外においてウシを例に ARV の各遺伝子分節が活発かつ複雑にリアソートメントを起こしていることを明らかにした。このようなリアソートメントにより，ARV は高い遺伝的多様性を形成していると考えられた。本研究で得られた知見は，ARV の自然界での生態の基盤データとなり，今後，本感染症の制御を考える上で有用な情報となると考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

A群ロタウイルスは幅広い宿主域を持っており、11本の分節2本鎖RNAをゲノムとして  
いることから多様性に富んでいることが知られている。本研究では、ロタウイルス感染症  
を制御するために必要な情報であるウイルスの生態を解明することを目的に、野外のウシ  
正常個体を対象としてロタウイルスの感染実態及び動態について、分子生物学的及び分子  
系統学的解析により解明を試みている。

第一章では、ウシにおけるロタウイルスの感染実態を把握するため、岐阜県の3地域に  
おいて、月1回定期的に採取したウシ正常便サンプル2,452例からRT-semi-nested PCR  
によりウイルス遺伝子の検出を行った。その結果、2,452例中71例から同ウイルスVP4遺  
伝子を検出し、ウシ正常便中に多様なG/P遺伝子型のウイルスが排泄されていることを明  
らかにした。その排泄は、下痢流行発生の季節性に関連性があることを示した。

第二章では、第一章において検出されたウイルスのうち新型と考えられる株の分離を行  
い、分子生物学的性状を明らかにした。この株はVP7, VP4及びNSP3遺伝子分節が新しい  
遺伝子型G21, P[29]及びT9遺伝子型に属し、その他の分節の遺伝子型はウシ由来ロタウ  
イルスに共通して認められるタイプであることを示した。分子系統学的解析から、本株は  
ウシ由来ロタウイルスがサル、イヌあるいはネコ由来ロタウイルスと複雑に遺伝子分節の  
組換えを繰り返しながら進化したと考えられた。

第三章では、第一章において検出されたロタウイルスのうち6株について全ゲノムを解  
析し、ウイルス遺伝子の動態について考察した。VP7, VP4, NSP1及びNSP3遺伝子分節以  
外は全て共通したタイプであった。一方で、分子系統学的解析及び相同性解析を行ったと  
ころ、株間の近縁度は遺伝子分節によって異なっていたことから、各遺伝子分節はそれぞ  
れに複雑に組換えを起こしていると考えられた。

以上、野外においてウシを例にロタウイルス各遺伝子分節が活発に組換えを起こすこと  
により、本ウイルスが高い遺伝的多様性を形成していることを明らかにした。本研究で得  
られた知見は、ロタウイルスの自然界での生態の基盤データとなり、今後、本感染症の制  
御を考える上で有用な情報となると考えられる。

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: Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in  
Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G  
genotypes

著 者 名: Abe, M., Ito, N., Morikawa, S., Takasu, M., Murase, T., Kawashima,  
T., Kawai, Y., Kohara, J. and Sugiyama, M.

学術雑誌名: Virus Research

巻・号・頁・発行年: 144(1-2): 250-257, 2009

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Molecular characterization of rotaviruses in a Japanese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) and a masked palm civet (*Paguma larvata*) in Japan
- 著 者 名 : Abe, M., Yamasaki, A., Ito, N., Mizoguchi, T., Asano, M., Okano, T. and Sugiyama, M.
- 学術雑誌名 : Veterinary Microbiology
- 巻・号・頁・発行年 : In Press