

学 位 論 文 要 約

氏 名 三竹 博道

題 目 ウシにおけるロタウイルス A の存続様式に関する研究

ロタウイルス A (RVA) は、ヒトを含む様々な哺乳類および鳥類に感染し、主として幼若個体に下痢や嘔吐を主徴とする急性胃腸炎を引き起こす。RVA のゲノムは分節化した 2 本鎖 RNA で構成され、6 つの構造蛋白(VP1-4, 6, 7)と 6 つの非構造蛋白(NSP1-6)をコードしている。また、ウイルスゲノムが分節化しているため、異なる株が一つの細胞に同時感染することにより RVA 遺伝子分節の交雑 (リアソートメント) が起きる。

RVA 感染症は世界中で発生しており、我が国のような温帯気候の地域ではヒトにおいて毎年繰り返して冬期から春期にその発生が集中する。そのため、RVA は下痢非流行期においても自然界に存続していると考えられる。また、家畜においては、同一農場で繰り返し RVA 感染症が発生するという疫学的特徴を示すため、RVA が農場内に常在化していると考えられている。しかし、これまで、農場内における RVA の常在化を検証した報告はほとんどない。そのため、RVA が農場内に常在化する疫学的要因については、多くの不明な点が残されている。

以上のような背景から、RVA 感染症の防疫対策を講じるためには、RVA の常在化に関与する要因を明らかにすることが重要である。そこで本研究では、ウシにおける RVA の存続様式を解明することを目的として、1 つの肉牛肥育農場を中心に分子疫学調査を行った。

第一章では、農場内の RVA の常在化を検証するために、福井県内の 1 つの肉牛肥育農場を対象として、2011 年 4 月から 2012 年 8 月までの期間に月一回定期的に採取したウシ正常便サンプルから RT-semi-nested PCR により RVA の P 遺伝子型を規定する VP4 遺伝子の検出を試みた。その結果、3 ヶ月齢未満の子牛から VP4 遺伝子が高率に検出され、このような若齢の子牛を中心に RVA が排泄されていることが明らかとなった。また、その排泄は下痢流行期だけでなく、下痢非流行期である夏期にも起こることが示された。VP4 遺伝子が検出された RVA 株については、G 遺伝子型を規定する VP7 遺伝子についても検出を試み、検出された RVA 株間の関連性を分子系統学的手法により解析した。その結果、農場内に常在している RVA は分子系統学的に複数の系統群に分けられ、遺伝的に多様であることが示された。一方、VP7 遺伝子が遺伝子学的に同一な RVA 株であっても、VP4 遺伝子が遺伝学的に異なる RVA 株が認められた。これらの RVA 株については、リアソートメントにより出現したリアソータント株と考えられた。また、リアソータント株が検出されるより以前に、それらの起源と考えられる RVA 株が検出されていた。このことから、

農場内の常在化 RVA 株間でリアソートメントが起きていたことが推察された。これらのリアソータント株は、基本的に一時的な検出であったものの、複数の月に渡って検出され、感染を拡大しているリアソータント株もみられた。以上より、リアソートメントを繰り返しながら、ウシに適応した RVA 株が不顕性感染を繰り返すことで農場内に蔓延し、常在化に至っていると考えられた。

第二章では、第一章における調査期間中に、同一の農場で発生した下痢症の症例から RVA を検出し、常在化 RVA と分子疫学的手法により比較解析した。2011 年 12 月および 2012 年 2 月にそれぞれ 1 頭および 3 頭が下痢症を発症し、RVA 感染症と診断された。VP7 および VP4 遺伝子を用いた分子疫学的解析の結果、これらの子牛の下痢便から検出された全 4 株の RVA 株は、正常便由来 RVA 株で形成される 3 つの異なる系統群に分けられた。このことから、複数の常在化 RVA 株の下痢症への関与が明らかとなった。また、複数の RVA 株がそれぞれ異なる時期に下痢症へ関与することで、RVA 感染症が繰り返されていると考えられた。なお、下痢症を発症した 4 頭中 1 頭の子牛については、下痢治癒後も遺伝学的にはほぼ同一と考えられる RVA が持続的に検出され、慢性的な感染源となっていたことが示唆された。

第三章では、第二章で下痢発症からの持続感染が疑われた子牛の腸間膜リンパ節から RVA 遺伝子が検出され、RVA が腸間膜リンパ節で持続して存在している可能性が疑われた。そこで、腸間膜リンパ節における RVA 感染の持続性を検証するために、下痢以外の病因で死亡した非健常子牛および健常成牛の腸間膜リンパ節から RVA 遺伝子の検出を試みた。その結果、非健常子牛の腸間膜リンパ節から RVA 遺伝子が高率に検出され、RVA が高率に腸間膜リンパ節に存在していることが明らかとなった。また、RVA 遺伝子は、腸管内容物より腸間膜リンパ節において高率に検出された。このことから、RVA 感染は腸間膜リンパ節において持続している可能性が示された。また、上述の現象は少数の健常成牛においても確認され、RVA はウシの腸間膜リンパ節で持続的に存続していることを明らかにした。そのため、このような RVA に持続感染しているウシが RVA の慢性的な感染源となる可能性が考えられた。

以上、本研究では、これまで不明な点が多かった RVA の農場内における常在化について、実態とその疫学的要因を明らかにした。また、養牛農場において常在化 RVA の下痢症への関与を直接的に示したのは本研究が初めてである。また、RVA の不顕性感染の意義と持続感染といった新たな RVA の存続様式を明らかにし、RVA 感染症が繰り返し発生する疫学的機序の解明に貢献できた。以上の知見は、RVA 感染症の防疫対策を講じる上で、重要な情報となると考えられる。

学 位 論 文 要 約

氏 名 MITAKE, Hiromichi

題 目 Studies on the Modes of Maintenance of Rotavirus A in Cattle
(ウシにおけるロタウイルス A の存続様式に関する研究)

Rotavirus A (RVA) infects humans and a wide range of animals including birds and causes acute gastroenteritis in infants. The RVA genome consists of 11 segments of double-stranded RNA encoding six structural proteins (VP1-4, VP6 and VP7) and nonstructural proteins (NSP1-6). The virus has the capacity to reassort its genome segments when two or more distinct strains infect a cell concomitantly.

RVA infection in human occurs worldwide and displays a marked seasonal pattern with epidemic peaks in cooler months of each year in temperate countries including Japan. This recurring pattern of RVA infection indicates that RVAs persist in nature over the non-epidemic season. Since recurrence of RVA-induced diarrhea in domestic animals is frequently observed in the same farms, it is thought that RVAs are normally present in the farms. However, there is little information on the modes of maintenance of RVAs within farms, and the epidemiological factors that contribute to the persistence of RVAs in farms have not been clarified.

For controlling RVA infection, it is crucial to evaluate the factors that are responsible for persistence of RVA in farms. In this study, in order to investigate the modes of maintenance of RVAs in cattle, the author conducted molecular epidemiological surveillance of RVA mainly in a beef cattle farm.

In order to investigate the persistency of RVA in farms, normal stools from calves were examined for RVA VP4 genes defining P genotypes by using RT-semi-nested PCR, and the results are presented in chapter 1. Specimens were collected monthly in a beef cattle farm from April 2011 to August 2012. Since RVA VP4 genes were detected at high rates in calves under the age of 3 months, it was thought that these young calves frequently excrete RVAs. Excretion of RVAs in normal stools was also observed not only in the epidemic season but also in the non-epidemic summer season. The author also sought to detect the VP7 gene defining G genotypes of the RVA strains, and performed phylogenetic analyses to elucidate the genetic relationships among those strains. The RVA strains were phylogenetically divided into several groups, indicating the genetic diversity of RVAs persisted within the farm. Some of the RVA strains that had identical VP7 genes harbored genetically distinct VP4 genes, strongly suggesting

reassortment among RVA strains. Since RVAs that were thought to be the parents of the reassortant strains had been detected before the first detection of reassortant strains, it was thought that gene reassortment occurred among the RVA strains persisting in the farm. While most of the reassortant strains were transiently detected, some of the strains were detected over a period of a few months, indicating that they had spread and persisted in the farm. Taken together, the results suggested that the repeated reassortment events and asymptomatic infections of RVA in cattle contributed to the spread and persistency of RVA in the farm.

In chapter 2, the results of a comparison of RVAs from diarrheal stools with the viruses persisting in the farm by using a molecular epidemiological technique are presented. During the period of investigation for which results are presented in chapter 1, diarrhea occurred in one calf and three calves in December 2011 and February 2012, respectively. All of these calves were diagnosed as having RVA infection. Phylogenetic analyses based on partial nucleotide sequences of the VP4 and VP7 genes revealed that these four RVA strains from diarrhea could be divided into three different phylogenetic groups consisting of RVA strains from normal stools, which had been detected during the investigation for which results are presented in chapter 1. Thus, some of the RVA strains persisting in the farm were probably associated with diarrhea. The results also suggested that reoccurrence of RVA-induced diarrhea may have been caused by different RVA strains. On the other hand, since one of the four diarrheal calves persistently excreted the genetically identical RVA strain even after recovering from diarrhea, the calf may have played a role as a source of infection for a prolonged period.

In chapter 3, the author detected RVA genes from mesenteric lymph nodes of the calf with extended excretion of the virus, raising a possibility that RVAs can persist in that site. In order to investigate the persistence of RVA infection in mesenteric lymph nodes, the author examined mesenteric lymph nodes from diseased calves without diarrhea and healthy adult cattle for RVA genes by using RT-semi-nested PCR. RVA genes were detected at a high rate from mesenteric lymph nodes of diseased calves, indicating that RVAs are frequently present in that site. Furthermore, since the detection rates of RVA genes were higher in mesenteric lymph nodes than in contents of the digestive tract, it is likely that RVA infection persists in mesenteric lymph nodes of calves. The persistence of RVA genes in mesenteric lymph nodes was also observed in some healthy adult cattle. Considering these findings, there is a possibility that cattle with persistence of RVAs in mesenteric lymph nodes play a role as a source of infection.

In this study, the author clarified the epidemiological factors that are responsible for the persistence of RVA in farms. This is the first report describing direct association of RVAs persisting within farms with occurrence of diarrhea. The author also highlighted

the significance of asymptomatic infection in viral maintenance and a novel mode of maintenance of RVA, such as persistent infection. The findings may contribute a better understanding of the mechanism underlying reoccurrence of RVA-induced diarrhea in farms. In conclusion, this study provides useful information for the control of RVA infection.