

学 位 論 文 題 名

ウシC群ロタウイルスの分離および
C群ロタウイルスの抗原性と疫学に関する研究

学位論文内容の要旨

北海道で下痢を呈した成牛の糞便から電子顕微鏡観察により形態学的にロタウイルスと類似したウイルス粒子が認められた。本ウイルスの核酸はRNAで、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって11本の分節から成ることが確認され、その泳動パターンはC群ロタウイルスのそれと類似し、免疫電子顕微鏡法によりブタC群ロタウイルス Cowden 株に対する抗血清と反応した。これらの所見から本ウイルスをC群ロタウイルスと同定し、Shintoku 株と命名した。本ウイルスは100 μ g/ml のトリプシンで処理し、培養液に1 μ g/ml のトリプシンを加えて回転培養を行うと、MA104細胞で増殖して継代も可能となった。Shintoku 株は世界で初めて検出されたウシC群ロタウイルスである。

次に、C群ロタウイルスの抗原性を検討した。これまで、A群とC群ロタウイルスの間には共通抗原は無いとされてきたが、MA104細胞で増殖した両群ロタウイルスとそれらの高度免疫血清を用いて間接蛍光抗体法（IFA）で交差試験を行ったところ弱い交差反応が認められ、両群間に共通抗原が存在する可能性が示された。この共通抗原の存在を確認する目的で、抗ブタC群ロタウイルス単クローン性抗体を作出し、IFAで両群ロタウイルスに対する反応性を調べた結果、5種類の単クローン性抗体が両群に反応し、それらはA群ロタウイルス3株とC群ロタウイルス2株に対するIFAでの反応性から2群に大別された。これらの単クローン性抗体はELISAによってもC群ロタウイルス Cowden 株ならびにA群ロタウイルス NCDV 株と反応した。また、1例の単クローン性抗体はELISAで、ヒト、ブタおよびウシ由来のA群とC群のロタウイルスをそれぞれ含む糞便材料と反応した。これらの単クローン性抗体は、ウェスタンブロット法でA群ロタウイルスのVP6とそれと相同なC群ロタウイルスの41kDの蛋白質を認識することが明らかとなった。また、4種類の単クローン性抗体を用いた競合ELISAにより、これらの単クローン性抗体はC群ロタウイルスの同一抗原領域内に存在するエピトープを認識すると考えられた。以上の結果から、A群とC群ロタウイルスの間に共通抗原の存在することが明らかと

なった。

中和試験による抗原解析では、C群ロタウイルス Cowden 株と Shintoku 株の血清型が異なり、複数の血清型のC群ロタウイルスが存在することが明らかとなった。また、培養細胞で増殖困難なC群ロタウイルス4株(ヒト由来1株、ブタ由来3株)を用いて作成した抗血清は Cowden 株と Shintoku 株に対する中和能により2群に分けられた。すなわち、ブタ由来2株とヒト由来1株に対する抗血清は Cowden 株に対して高い中和抗体価を示したのに反し、Shintoku 株に対しては反応しなかった。一方、ブタ由来1株に対する抗血清は、IFA では両株に対して反応したが、中和試験では反応しなかった。これらの成績から、ブタ由来2株とヒト由来1株は Cowden 株と同じ血清型であるが、ブタ由来1株は Cowden 株と Shintoku 株で代表される2つの血清型以外である可能性が示唆された。

C群ロタウイルス感染症の簡易診断法の確立をを目的として、ブタC群ロタウイルスに対する免疫血清を用いてC群ロタウイルス抗原検出のためELISAを開発し、ブタC群ロタウイルスのみならずヒトとウシのC群ロタウイルスを検出することが可能となった。ブタとウシのC群ロタウイルスの実験感染例から、採材した下痢便はすべて本ELISAで陽性を示した。これらの成績から、本ELISAはヒトと動物の糞便材料からのC群ロタウイルスの検出に有効であると考えられた。次に、C群ロタウイルス抗原検出用ELISAのブロッキング法でC群ロタウイルス抗体検出用のELISAを開発した。日米両国のブタとウシの血清についてブロッキングELISAによりC群ロタウイルスに対する抗体を検査したところ、ブタの93~97%、ウシの47~56%から抗体が検出され、本ウイルスは日米両国のブタとウシに広く浸淫していることが示唆された。一方、米国のウマの血清からは本ウイルスに対する抗体は検出されなかった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	清水	悠紀臣
副査	教授	浦沢	正三
副査	教授	橋本	信夫
副査	助教授	小沼	操

ロタウイルスは人や動物の下痢の原因として重視されており、現在A~Gの7群に分類されて

いる。申請者はC群ロタウイルスについて研究を行い、ウシからはじめてC群ロタウイルスを分離するとともに、C群ロタウイルスの抗原性状を明らかにした。これらの知見に基づき、C群ロタウイルス感染症の実験室内診断法を確立した。本論文は65ページから成り、参考論文15編を付している。

ロタウイルスは培養細胞で増殖し難いことがその研究を大きく阻んできたが、ウイルスをトリプシンで処理し、MA-104細胞を用い、維持培養液にトリプシンを加えて回転培養すると培養が可能なが我が国の研究者によって明らかにされた。申請者はこの方法を改良し、はじめてウシC群ロタウイルスの分離培養に成功した。これによってC群ロタウイルスの研究が容易となり、A群ロタウイルスとの間に共通抗原が存在し、共通抗原性に41kD 蛋白質エピトープが関与していることを明らかにした。一方で、中和試験によってC群ロタウイルスには複数の血清型があることを明らかにした。これらの知見に基づいてC群ロタウイルス感染症の実験室内診断法を確立するため、ELISA を用い、ウイルスと抗体の検出法について検討し、特異性の高い方法を確立した。この方法を用い、日米両国のブタとウシの血清について抗体検査を行った結果、ブタの93～97%，ウシの47～56%が陽性で、両国のブタとウシの間に本ウイルスが広く浸淫していることが示唆された。

このように申請者は、C群ロタウイルスとその感染症について数々の新しい知見を得た。これらは本感染症の防圧に大きく貢献すると考えられる。

よって審査員一同は恒光 裕氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると認めた。