

学 位 論 文 題 名

Genetic and Antigenic Analyses of Porcine Enteroviruses

（豚エンテロウイルスの遺伝学的および抗原学的解析）

学位論文内容の要旨

豚エンテロウイルス(PEV)は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属の+鎖 RNA ウイルスである。本ウイルスはこれまで中和試験により、国際的に PEV-1～-11 までの 11 血清型に区分されてきたが、日本国内では独自に PEV-J1～-J10 までの 10 血清型に分類され、これらのうち大半は PEV-1～-11 と重複することが示されてきた。また PEV は、感染豚腎細胞で観察される細胞変性効果(CPE)の形態によっても type I～III に型別され、この CPE 型別はウイルスの理化学的性状や細胞指向性の差異と関連していることが報告されてきた。

PEV は国内外の広範囲の農場で分離され、その感染の大半は無症状で終わる一方で、脳脊髄炎、繁殖障害、下痢、肺炎等、多様な臨床症状に關与するという報告も多い。殊に PEV の関与する脳脊髄炎は 1940～50 年代のヨーロッパを中心に広く流行し、「テッシェン病」「タルファン病」と呼称された。これらの疾病は PEV-1 の一部強毒株が病原と考えられたが、近年では様々な血清型株が脳脊髄炎を呈する豚の脳神経材料より分離されることから、現在では「エンテロウイルス性脳脊髄炎」と呼称され、国際獣疫事務局 (OIE)の List B 疾病に指定されている。また病原としては、脳神経病変より分離されたウイルスをテッシェン/タルファンウイルス(Teschen Talfan virus; TTV)と総称する考え方が一般的になりつつある。しかし、中和試験で交差反応を示し、血清型を同定できない株が近年多く分離されること、TTV とその他の PEV を識別するマーカーが知られていないことなどから、血清型別に代わる遺伝学的な型別が強く求められてきた。

本研究においては、PEV-1 Talfan 株ゲノムの 5'非翻訳領域 (5' NTR)を除く大部分の領域について塩基配列を決定し、遺伝学的解析を行った。塩基配列および推定アミノ酸配列を他のピコルナウイルスと比較したところ、Talfan 株のゲノムは以下の 3 点において特徴的な構造を有していた。(1) ポリプロテインコード領域の 5'末端にリーダー蛋白がコードされていること。(2) 口蹄疫ウイルスと相同性の高い 2A プロテアーゼをコードしていること。(3) 5' NTR に poly (C) 領域を含むことが推定されること。また、ピコルナウイルスの蛋白で最もよく保存されている RNA 依存性 RNA ポリメ

ラーゼ (RdRp) について、推定アミノ酸配列を解析したところ、ピコルナウイルスに特徴的なモチーフは同様に保存されており、同モチーフを用いた系統解析において、Talfan 株は既存のピコルナウイルスからは独立したクラスターに位置づけられることが明らかになった。これらに基づき、PEV-1 Talfan 株はピコルナウイルス科の中で、新たなウイルス属として再分類する必要があることが示唆され、1999 年国際ウイルス分類委員会において、ピコルナウイルス科テシオウイルス属、豚テシオウイルス(PTV)として再分類されることが承認された。

続いて、Talfan 株における中和抗原決定基の解析を行うため、同株に対するモノクローナル抗体を作製し、中和能を有する抗体を 11 クローン得た。これらを、Talfan 株キャプシド領域のアミノ酸配列に基づく合成ペプチドと反応させ、中和抗原決定基を同定した。ポリオウイルス 1 型のキャプシドをモデルとし、アミノ酸のアラインメントを行ったところ、全てのクローンは VP2 EF ループ (通称「パフ」) のペプチドに反応していることが明らかになった。またそのうちの 1 クローンは VP1 GH ループと、別の 1 クローンは VP1 の C 末端とも反応していた。立体構造モデルを作製し、抗原決定基の局在を解析したところ、上記 3 つの抗原決定基はいずれもウイルス粒子表面に露出し、「パフ」を中心に互いに近傍に位置していると推定された。これらより、VP2「パフ」が Talfan 株の最も有力な中和抗原決定基であると推測された。

最後に、他の血清型株を含めた PEV の遺伝学的多様性および、それらと PTV との遺伝学的関係を解析した。PTV および PEV 各血清型の標準株について、ゲノム上の 3 つの領域 (ポリメラーゼコード領域、キャプシド VP2 N 末端コード領域、3'NTR) について、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応法(RT-PCR)および 3' cDNA 末端迅速増幅法 (3'RACE)産物から塩基配列を決定した。ポリメラーゼ、キャプシド VP2 の推定アミノ酸配列を用いて系統解析を行ったところ、PEV は遺伝学的に PTV Talfan 株グループ、PEV-9 UKG/410/73 株グループ、PEV-8 V13 株グループの少なくとも 3 群に分けられることが明らかになった。また、この 3 群は 3'NTR の推定 2 次構造解析においても確認された。興味深いことに、この再分類は CPE type ならびにウイルスの理化学的性状や細胞指向性の違いと一致していた。これらのうち、特に Talfan 株グループについては、既存のピコルナウイルスとは遺伝学的に大きく異なることから、PTV として再分類することが確認された。また、PEV-9 UKG/410/73 株グループと PEV-8 V13 株グループについても、グループ間の遺伝学的差異が無視できないことから、これらを PEV-A、PEV-B として区別する必要性が示唆された。さらに、PTV に分類されるべきウイルスについて、有力な中和抗原決定基と推測される VP2「パフ」相当領域の推定アミノ酸配列を用いて系統解析を行ったところ、同領域における遺伝学的型別は血清型別と完全に一致することが明らかになり、血清型別に代わる新たな型別法の方が示された。

以上のように本研究では、豚エンテロウイルス 1 型 (PEV-1)標準株である Talfan 株の遺伝学的解析を行い、既存のピコルナウイルスとは著しく相同性が低く、また独自の遺伝子構造を有することを明らかにした。この結果 PEV-1 は、新たに豚テシオウイルス(PTV)として再分類されることが承認された。また同株の中和抗原決定基を解析し、PEV の血清型別に代わる遺伝学的型別に関する基礎的知見を得るとともに、他の血清型株の遺伝学的解析から、PEV が PTV、PEV-A、PEV-B の 3 つの遺伝学的グループに再分類されることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高島郁夫
副査	教授	喜田宏
副査	教授	小沼操
副査	助教授	荻和宏明

学位論文題名

Genetic and Antigenic Analyses of Porcine Enteroviruses

(豚エンテロウイルスの遺伝学および抗原学的解析)

豚エンテロウイルス(PEV)は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属のウイルスで、これまで中和試験により、国際的にPEV-1〜11までの11血清型に区分されてきた。PEVは国内外の広範囲の農場で分離され、その感染の大半は無症状で終わる一方、脳脊髄炎、繁殖障害、下痢、肺炎等、多様な臨床症状に関与する。殊にPEVの関与する脳脊髄炎は1940〜50年代のヨーロッパを中心に広く流行し、「テッシェン病」、「タルファン病」と呼称された。これらの疾病はPEV-1の一部強毒株によると考えられたが、近年では様々な血清型株が脳脊髄炎を呈する豚の脳神経材料より分離され、さらに血清型別不能株も分離されることから、血清型別に代わる遺伝子型別が強く求められてきた。

本研究においては、PEV-1 Talfan株遺伝子の5' 非翻訳領域を除く大部分の領域について塩基配列を決定し、遺伝子解析を行った。その結果PEV-1 Talfan株はピコルナウイルス科の中で、新たなウイルス属として再分類する必要があることを提唱し、テシオウイルス属、豚テシオウイルス(PTV)として再分類されることが国際的に承認された。

Talfan株に対して中和能を持つモノクローナル抗体を作製し、これらをTalfan株キャプシド領域のアミノ酸配列に基づく合成ペプチドと反応させ、中和抗原決定基を同定した。抗原決定基の局在を解析したところ、抗原決定基はいずれもウイルス粒子表面に露出し、「puff」を中心に互いに近傍に位置していると推定された。

他の血清型株を含めたPEVの遺伝学的多様性、およびそれらとPTVとの遺伝学的関係を解析した。PTVおよびPEV各血清型の標準株についてポリメラーゼコード領域、キャプシドVP2N末端コード領域について、塩基配列を決定した。これらの推定アミノ酸配列を用いて系統解析を行ったところ、PEVは遺伝学的にPTV Talfan株グループ、PEV-Aグループ、およびPEV-Bグループの少なくとも3群に分けられることが明らかになった。

以上のように本研究では、豚エンテロウイルス1型(PEV-1)標準株であるTalfan株の遺伝子解析を行い、PEV-1は、新たに豚テシオウイルス(PTV)として再分類されることが承認された。また同株の中和抗原決定基を解析するとともに、他の血清型株の遺伝子解析から、従来PEVとされていたウイルスがPTV、PEV-A、PEV-Bの3つの遺伝学的グループに再分類されることを明らかにした。上記の成績は今後の豚ピコルナウイルス感染症の診断と疫学調査を実施する上で有益

な知見を提供するものである。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者加来義浩氏が博士（獣医学）の学位を授与されるのに十分な資格を有するものと認めた。