HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the molecular basis of the pathogenicity of foot-and-mouth disease virus [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	西, 達也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第7106号
Issue Date	2020-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/79711
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tatsuya_Nishi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：西　達也
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on the molecular basis of the pathogenicity of foot-and-mouth disease virus
（口蹄疫ウイルスの病原性の分子基盤に関する研究）

口蹄疫はピコルナウイルス科アフトウイルス属に分類される口蹄疫ウイルスの感染による急性熱性伝染病である。ウイルスのゲノムは全長約 8,400 塩基のプラス極性一本鎖 RNA であり、5'末端より L^{pro}、VP1-4、2A、2B、2C、3A、3B、3C および 3D タンパクをコードしている。本ウイルスは互いにワクチンの効かない 7 つの血清型があるなど抗原性が多様である。本疾病は牛、水牛、豚、緬羊、山羊等、偶蹄類の家畜および野生動物に感染し、その伝染力は著しく強い。発病動物は鼻鏡を含む口周辺、蹄及び乳頭周辺部の皮膚や粘膜に水疱が形成され、摂食と歩行が困難となり、発育障害または泌乳障害により経済的価値を失う。水疱の中には大量のウイルスが含まれ、これが破れて周囲を汚染するほか、唾液、鼻汁、糞便、乳汁等からも排出され、エアロゾルによる空気伝播も起こる。一度発生すると、家畜及び畜産物の輸出入が厳しく制限されるため、社会経済的な被害は甚大となる。我が国では口蹄疫発生時には家畜伝染病予防法に基づき殺処分等の防疫措置がとられる。口蹄疫ウイルスの病原性や宿主域は株によって異なり、その性状の違いは畜産業にもたらす被害規模を大きく左右する。口蹄疫の病態についてはよく知られているが、ウイルスの流行時におけるゲノムの変異動態や病原性の分子基盤は未だ不明である。そこで本研究では、国内の畜産史上最も甚大な被害を及ぼした 2010 年の口蹄疫の発生について、原因ウイルスのゲノム変異動態と病原性発現に関与する遺伝子を特定することにより、口蹄疫ウイルスの病原性の分子基盤の解明を試みた。

口蹄疫のような伝染力の強い疾病は、迅速かつ確実な診断に基づき、早期に防疫措置を講じることが重要である。RNA を増幅する Reverse transcription-PCR（RT-PCR）は、病原体を迅速に検出する方法の一つとして有用である。そこで、第 I 章では、口蹄疫ウイルスの株間で保存性の高いポリメラーゼ遺伝子を標的として設計されプライマー（FM8/9）について、その感度と特異度を国際獣疫事務局の推奨する 5'非翻訳領域を標的とするプライマー（1F/R）を用いた RT-PCR と比較した。全ての血清型を網羅する計 24 株の口蹄疫ウイルス RNA を各 RT-PCR に供して感度を検証

した結果、FM8/9 を用いた RT-PCR は 1F/R を用いた場合と比較し、計 21 株で 4 から 6,300 倍高い感度を示した。また、口蹄疫ウイルスを実験的に感染させた豚、牛から経日的に採取した血清と唾液サンプルから RNA を抽出し、各 RT-PCR に供した結果、FM8/9 を用いた RT-PCR は顕著に高い検出率を示した。以上から、FM8/9 を用いた RT-PCR は病性鑑定において高感度にウイルス遺伝子を検出可能であることが明らかとなった。実際に、2010 年の国内発生においては、同等の感度であることが明らかとなったリアルタイム RT-PCR 法と併せて、迅速な診断法として重要な役割を果たした。

口蹄疫ウイルスはゲノム複製時における変異率が高く、その遺伝子は多様である。蔓延地域においては抗原変異株や豚でのみ症状を呈するなどの宿主特異性を持った変異株も確認されている。流行の時間枠中におけるウイルスの変異の動態を解明することは、適切な診断と防疫対策を講じる一助となる。第Ⅱ章では、2010 年宮崎県において口蹄疫の発生した 292 戸の材料から、104 株の塩基配列を決定し、比較解析した。海外のウイルスのゲノム全長配列と共に作成した分子系統樹において、104 株は一つのグループに分類されたことから、単一のウイルスが侵入、蔓延したことがわかった。104 株のゲノム全体の相同性は 99.56%～99.98%であり、完全に一致する配列はなかった。牛から分離されたウイルスと豚から分離されたウイルスに関してアミノ酸全長を比較解析したところ、宿主特異的置換は確認されなかった。各ウイルス株の塩基配列と採材日から算出した塩基置換率は 2.88×10^{-5}/塩基/日であり、既報の自然変異によるものと同等であった。迅速な防疫対応により発生規模を限局できたことで、性状の大きく異なるウイルスによる発生を防ぐことが出来たものと考えられる。各アミノ酸の変異割合の解析結果、ウイルスの外殻タンパク質を構成する VP1 と VP2 は変異が集中して遺伝的に多様であり、外殻タンパク質を架橋する VP4 および非構造タンパク質である 2C には変異が少なく遺伝的に安定していることが明らかとなった。

国内では 2000 年と 2010 年の二度にわたり口蹄疫が発生したが、2010 年とは対照的に 2000 年の発生は 4 戸に抑えられた。現場での患畜の臨床症状から、原因ウイルスの宿主における病原性の差が、発生規模の差に関与したと考えられているがその詳細な分子基盤は明らかとなっていない。第Ⅲ章では、2010 年日本分離株のゲノムをもとに感染性 cDNA を構築した。構築した感染性 cDNA クローンは、2010 年発生時の材料から得られた O/JPN/2010 株（親ウイルス）のゲノム RNA 全長の cDNA をプラスミドベクターに組み込んだものである。これを哺乳類動物細胞に導入することにより、感染性を有するウイルスを得ることが可能である。親ウイルスとの比較解析の結果、cDNA 由来ウイルスは、親ウイルスと同様の細胞内増殖性および豚での病原性を示すことが確認された。これを用いて第 IV 章では、2000 年および 2010 年に分離された 2 株を用いて遺伝子組換えウイルスを作出し、病原性に関与する遺伝子領域を探索した。2 株間で遺伝子を網羅的に組換え、計 8 株のウイルスを回収した。親株 O/JPN/2010 および O/JPN/2000 を乳飲みマウスに接種した場合、致死率はそれぞれ 100%、0%であった。これを基準として組換えウイルスの性状を解析したところ、O/JPN/2010 の VP1 および 3D をそれぞれに O/JPN/2000 のものに組換えたウイルスを接種した群の致死率は 0%だったが、その他の遺伝子領域を組換えたウイルスを接種した群の致死率は 100%であった。ウイルス粒子の最外殻に位置し

て宿主内の主要レセプターとの結合および免疫物質に作用する VP1、ならびに RNA の複製を担う 3D ポリメラーゼ遺伝子それぞれが、O/JPN/2010 の乳飲みマウスおよび自然宿主への病原性に大きく関わることが示唆された。VP1 の立体構造予測により、親株間でのアミノ酸の相違が主に細胞のレセプターとの結合部に位置することが分かった。一方で、2 つの親株についてウイルス複製時に起きる塩基置換率を解析したところ、O/JPN/2010 が O/JPN/2000 よりも 1.5 倍以上高かった。以上から、最外殻タンパクである VP1 のレセプター選択性、およびポリメラーゼによる RNA 複製の正確性が、口蹄疫ウイルスの宿主における病原性に重要な因子であることが分かった。

本研究は、口蹄疫ウイルスの遺伝子変異性と病原性発現機序の一端を分子レベルで解明したものである。これにより、口蹄疫ウイルスの病原性発現に寄与する遺伝子が明らかになり、安全で効果的なワクチンやそれらの遺伝子の機能を標的とする抗ウイルス剤の開発が可能となる。