

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850185

研究課題名(和文)ネコノロウイルスによる感染性胃腸炎の研究 - ノロウイルス感染症動物モデルの樹立 -

研究課題名(英文) Study of norovirus gastroenteritis in cats: attempt to establish animal model for pathogenesis of norovirus infection

研究代表者

高野 友美 (Takano, Tomomi)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：20525018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ノロウイルス(NoV)はGIからGVIの6つのgenogroupに分類される。今回、我々は、新規のネコNoV(FNoV)であるM49-1株を同定した。このFNoV M49-1 strainはGIV.2 FNoVとgenogroup GVI.1 CNoVの間でrecombinationによって生じたウイルスである可能性も示唆された。また、FNoV M49-1 strainを接種したSPF catsでは、gastroenteritis-likeの臨床症状を呈するとともに、糞便および血液中にウイルス遺伝子が検出された。今回の結果は、人および動物のNoVを研究する上で、有用なデータになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Norovirus (NoV) has been classified into 6 genogroups, GI-GVI. In the present study, we newly identified novel feline NoV (FNoV) M49-1 strain. Based on the results of the Simplot analysis, the FCoV M49-1 strain may have been produced by recombination between GIV.2 FNoV and GVI.1 CNoV. In addition, specific pathogen-free cats inoculated with the FNoV M49-1 strain developed gastroenteritis-like clinical symptoms, and the viral gene was detected in their feces and blood. Our results may be useful for studies on human and animal NoV.

研究分野：獣医感染症学、獣医ウイルス学

キーワード：ノロウイルス 動物モデル 感染性胃腸炎 猫

1. 研究開始当初の背景

人の感染性胃腸炎は毎年冬期に全国各地で流行が認められている。中でも、ノロウイルス(ヒトノロウイルス)による感染性胃腸炎は年齢を問わず爆発的な流行が報告されている。現在、米国を中心に、ヒトノロウイルスに対する予防薬および治療薬の開発が実施されているが、実用化するに至っていないのが現状である。ヒトノロウイルスに対する予防薬および治療薬を効率良く開発するためには、ヒトノロウイルスによる感染性胃腸炎を再現できる動物モデルシステムを構築する必要がある。

現在、ヒトノロウイルス感染症の動物モデルとして主にマウスおよびブタが使用されている。しかし、マウスノロウイルスおよびブタノロウイルスは、宿主に感染しても病原性をほとんど示すことが無いため、ヒトノロウイルスによる感染性胃腸炎を再現できる動物モデルシステムとは言い難い。

2012年、米国において胃腸炎を発症したネコの糞便からノロウイルスの遺伝子が高率に検出された(Pinto *et al*, 2012 *PLoS ONE* e32739)。即ち、ネコに感染性胃腸炎を発症させるノロウイルスの存在が示唆された。この報告を踏まえ、我々は消化器症状を伴うネコの直腸スワブを日本各地の動物病院で採取して、ネコノロウイルス遺伝子の検出を試みた。その結果、1頭のネコの直腸スワブからネコノロウイルス遺伝子を検出することに成功した(図1)。次に、ネコノロウイルス

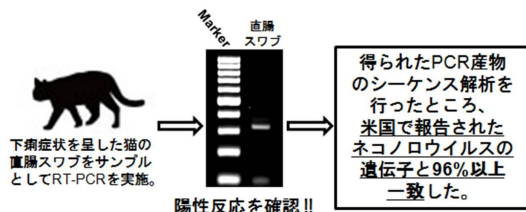


図1: ネコの直腸スワブを用いた猫ノロウイルス遺伝子の検出および同定。

遺伝子が検出された直腸スワブ乳剤を SPFネコに経口投与したところ、40 前後の発熱と糞便中へのウイルスの排出が繰り返

し確認された(図2)。このように、

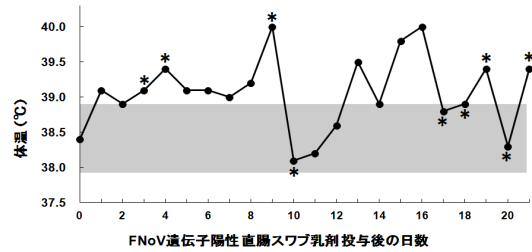


図2: ネコノロウイルス遺伝子陽性直腸スワブ乳剤投与後のネコにおける体温推移およびウイルス遺伝子の検出。*: 糞便からネコノロウイルス遺伝子が検出された日。灰色の網掛けはネコの平均体温域を示す。

ネコにノロウイルスを接種して臨床症状を観察した報告は国内・国外いずれにおいても存在しない。

2. 研究の目的

- (1) ネコノロウイルスの病原性 現在、我々は、ネコノロウイルス遺伝子陽性の直腸スワブおよび糞便を保管している状態にある。本研究では、これらの乳剤を使用して SPFネコ(3-4ヶ月齢)を用いた感染実験を、規模を拡大して再度実施する。具体的には、糞便からのウイルス遺伝子の検出、臨床的所見の観察および安楽死後の病理学的所見の観察を行う。
- (2) ネコノロウイルスの遺伝子学的性状 ネコノロウイルスの全ゲノム解析は報告されているが、わずか1例のみである。本研究では、我々が猫の直腸スワブもしくは糞便から検出したネコノロウイルス遺伝子の全ゲノム解析を実施する。
- (3) 日本国内におけるネコノロウイルスの分布 国内・国外においてネコノロウイルスに関する疫学調査は行われていない。既に、我々は全国の動物病院および猫飼育施設から多数の直腸スワブを得ている。これらをサンプルとして、ネコノロウイルス遺伝子の検出を行い、全国各地におけるネコノロウイルスの存在状況および系統樹解析を実施する。

3. 研究の方法

SPF ネコにネコノロウイルス遺伝子陽性の糞便乳剤を投与してネコにおける感染性胃腸炎の臨床所見を確認した。また、日本国内におけるネコノロウイルスの疫学調査を実施するとともに、ネコノロウイルスの遺伝子解析を行った。

- (1) SPF ネコを用いたネコノロウイルスの病原性の確認 SPF ネコ4頭 (3-4ヶ月齢) にネコノロウイルス遺伝子陽性の糞便乳剤(20% w/v)を 1ml 経口投与した。投与後、体温・体重の測定、臨床症状の確認および糞便の回収を行った。回収した糞便については、ネコノロウイルス遺伝子の有無をRT-PCR法によって解析した。
- (2) ネコノロウイルスの遺伝子解析 以前、我々はネコノロウイルスを SPF ネコ(2ヶ月齢)に実験的に感染させた。その際に回収した糞便からネコノロウイルスRNAを抽出して、RT-PCRを行った。このネコノロウイルス(M49-1株)のゲノムについて、ORF1の3'末端側約4,000bpおよびORF2の全領域をシーケンスによって解析した。シーケンスによって得られた塩基配列を基に推定アミノ酸配列を決定し、これを基に系統樹解析を実施した。また、M49-1株の遺伝子的特徴をSimplot法により解析した。
- (3) ネコノロウイルスの疫学調査 全国から収集した消化器症状を伴うネコの直腸スワブまたは糞便からネコノロウイルス遺伝子を抽出して、シーケンス解析を行った。

4. 研究成果

- (1) ネコノロウイルスの病原性 SPF ネコ(3-4ヶ月齢)にネコノロウイルス遺伝子陽性の糞便乳剤を経口投与したところ、全てのネコにおいて下痢が認められるとともに、回収した糞便から持続的にネコノロウイルス遺伝子が検出された。また、4頭中1頭において嘔吐が認められ、嘔吐物からはネコノロウイルス遺伝子が検出された。以上を踏まえると、ネコ

ノロウイルスは猫に対して病原性を示すことが確認された。即ち、本実験系はノロウイルスの動物モデルとして適当であることが示唆された。

(2) ネコノロウイルスの遺伝子学的性状

我々は、ネコノロウイルス M49-1 株の遺伝子群を特定するため、本ウイルスの遺伝子配列をシーケンス解析した。まず、ORF1 遺伝子の3'末端側の塩基配列を同定するとともにこの配列情報から得られた推定アミノ酸配列から系統樹解析を行った。その結果、M49-1 株は米国で発見されたネコノロウイルスやライオンノロウイルスと同じクラスターに分類された。次に、ORF2 遺伝子すなわちVP1 遺伝子の全領域についても塩基配列および推定アミノ酸配列を決定するとともに系統樹解析を実施したところ、M49-1 株は遺伝子型 GVI イヌノロウイルスと同じクラスターに分類された。以上の結果を踏まえると、M49-1 株は ORF1 が GIV ネコノロウイルス、ORF2 が GVI イヌノロウイルスというキメラウイルスである可能性が示唆された。

(3) 日本国内におけるネコノロウイルスの分布

国内・国外においてネコノロウイルスに関する疫学調査はほとんど行われていない。我々は全国の動物病院および猫飼育施設から送付された直腸スワブからネコノロウイルス遺伝子の検出を行い、全国各地におけるネコノロウイルスの存在状況を確認した。その結果、東京、神奈川および三重のネコから得られた直腸スワブからネコノロウイルス遺伝子(ORF1)が検出された。7つの陽性サンプルのうち3つのサンプルについては、これまでのネコノロウイルスとは異なるクラスターに分類された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Takano T, Yamashita S, Murata-Ohkubo M, Satoh K, Doki T, Hohdatsu T. 2016. Prevalence of canine coronavirus (CCoV) in dog in Japan: detection of CCoV RNA and retrospective serological analysis. J Vet Med Sci. 78:341-345. doi: 10.1292/jvms.15-0347. (査読有)

Takano T, Kusahara H, Kuroishi A, Takashina M, Doki T, Nishinaka T, Hohdatsu T. 2015. Molecular characterization and pathogenicity of a genogroup GVI feline norovirus. Vet Microbiol. 2015. 178:201-207. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.05.018. (査読有)

Takano T, Takashina M, Doki T, Hohdatsu T. 2015. Detection of canine astrovirus in dogs with diarrhea in Japan. Arch Virol. 2015 160:1549-53. doi: 10.1007/s00705-015-2405-2403. (査読有)

[学会発表](計3件)

高野 友美, 楠原 一, 福嶋 俊文, 土岐 朋義, 西中 隆道, 宝達 勉. 2015. 新規ネコノロウイルス M49-1 株の性状: 遺伝子および抗原性の解析. 第18回北里微生物アカデミー研究集会 北里大学(神奈川県 相模原市). 2015年8月6日. 講演要旨集 p103.

高野 友美, 山下 沙弥, 土岐 朋義, 宝達 勉. 2015. 下痢症状を示した犬または猫におけるアルファコロナウイルスの感染について. 第11回日本獣医内科学アカデミー学術集会

パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市). 2015年2月21日. 講演要旨集 p241.

高野 友美, 黒石 陽, 高階 碧, 土岐 朋義, 楠原 一, 西中 隆道, 宝達 勉. 2014. ネコノロウイルスのSPFネコに対する感染性および病原性に関する検討. 第157回日本獣医学会学術集会 北海道大学(北海道 札幌市). 2014年9月9日. 講演要旨集 p398.

[その他]

朝日新聞(三重:地方版)2016年1月29日付
「ノロウイルス対策、産学官6機関連携」
(<http://www.asahi.com/articles/ASJ1V555YJ1VONFB00S.html>). 他3紙.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高野 友美 (TAKANO, Tomomi)
北里大学・獣医学部・准教授
研究者番号: 20525018