

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580339

研究課題名（和文） パラポックスウイルス感染症の皮膚病変発現に関する細胞生物学的研究

研究課題名（英文） Cell biological study on dermal pathogenesis of parapoxvirus infection

研究代表者

猪島 康雄（INOSHIMA YASUO）

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20355184

研究成果の概要（和文）：

パラポックスウイルス（PPV）感染症は、同じウイルスが感染しても動物種の違いにより皮膚病変の程度が異なり、ウシで軽度、ヒツジ・ヤギで中等度、ニホンカモシカ（カモシカ）で重症となるのは何故か明らかにすることを目的とし、細胞生物学的解析を行った。PPV がコードしている血管内皮増殖因子に対してカモシカの細胞が最も強く反応すること、などが皮膚病変発現の動物種差に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Although parapoxvirus (PPV) infections appear in cattle, sheep and goats, the papular, nodular, pustular and ulcerated skin lesions of Japanese serows (*Capricornis crispus*) are significantly more severe than those of other animals. Our results from cell biological investigations suggest that high responsiveness to viral endothelial growth factor of endothelial cells might be involved in the severe proliferative skin lesions induced by PPV infection in Japanese serows.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：獣医学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：パラポックスウイルス、血管内皮増殖因子、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ニホンカモシカ、感染症、血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

パラポックスウイルス（PPV）感染症は、主にウシ、ヒツジ、ヤギ、ニホンカモシカ（カモシカ）が感染し、口周囲や乳房などに、赤色丘疹、びらん、結節、膿疱、潰瘍などを形成し、ときに重症化するウイルス性の皮膚病である。家畜伝染病予防法の届出伝染病に指

定（牛丘疹性口炎、伝染性膿疱性皮膚炎）されているほか、その症状が口蹄疫や水疱性口炎などと類似することがあり、類症鑑別が重要である。ヒトにも感染し同様の皮膚病変を呈する人獣共通感染症であるが、ヒトの場合、腫瘍や細菌感染と言った誤診を招くことが多い。

近年、一部の PPV ゲノム中に宿主細胞の血

管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) に相同する遺伝子がコードされ、皮膚病変発現に関与していることが示唆された (Savory et al., J. Virol. 74:10699-10706, 2000)。しかし、PPV は、同じウイルスがウシ、ヒツジ、ヤギ、カモシカに感染するにも関わらず、感染後の症状はウシで軽度、ヒツジ、ヤギで中等度、カモシカで重症となることが多い。動物種の違いによる皮膚病変の程度の差は、ウイルス側の VEGF だけで説明することはできず、その原因は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、PPV 感染症において、同じウイルスが感染しても、動物種の違いにより皮膚病変の程度が大きく異なるのは何故か、主に細胞側、宿主側の要因について動物種ごとに比較解析を行い、ウイルス学的な解析と合わせ、PPV 感染症の皮膚病変発現機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) ウシ、ヒツジ、ヤギ、カモシカの血管内皮細胞の純粋培養系を確立する。

それぞれの動物から大動脈を回収し、血管の内面を擦過し内皮細胞を分離し、純粋培養を試みる。内皮細胞の細胞質内マーカーである von Willebrand Factor (vWF) 発現を間接蛍光抗体法により確認する。さらに細胞表面のマーカー抗原である CD31、VEGF レセプター、PLVAP 等に対する抗体と磁気ビーズを用いて内皮細胞を純化する。

2) VEGF 添加による内皮細胞の反応性を動物種ごとに比較する。

1) で得られるそれぞれの動物の高純度内皮細胞に、ウイルス由来組換え VEGF を添加し、VEGF に対する動物種ごとの反応性の差を細胞増殖試験で評価する。測定は MTT 法を改良した WST 法により行う。

3) 現在と過去に国内で流行した PPV 株における VEGF 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性を解析する。

1980 年代後半に流行したカモシカの PPV 感染症が近年再び流行していることから、ウイルス VEGF 遺伝子、インターフェロン抵抗性遺伝子、およびエンベロープ遺伝子の塩基配列を決定し、現在と過去の流行ウイルスの違いを遺伝学的に比較する。

4. 研究成果

ウシ、ヒツジ、ヤギ、カモシカの大動脈か

ら血管内皮細胞を分離・培養することに成功した。平滑筋細胞が混入しているため、内皮細胞の表面抗原マーカーに対する抗体を複数種類用いて、磁気ビーズによる内皮細胞の純化を試みたが、この方法により十分な細胞数を回収することは出来なかった。しかし、血管の擦過時に使用するメス刃の種類を選択し、擦過の強度とスピードを調節することで、どの動物種からも高度に純化した内皮細胞を培養することに成功した。さらに、内皮細胞の細胞質内マーカーである vWF を指標にした、フローサイトメーター解析による内皮細胞の純化を定量する実験系の確立に成功した。

カモシカの大動脈の入手機会の少なさに対応するため、カモシカ内皮細胞に SV40T 遺伝子を導入し株化カモシカ内皮細胞を樹立した。この株化カモシカ内皮細胞は、株化前の細胞と比べ、同程度の増殖能を有し、VEGF 刺激に対する反応性を有し、Ac-LDL の取り込み能も有していた。さらに、株化前には混入していた平滑筋細胞がないことが明らかとなった。

ウシ、ヒツジ、ヤギ、カモシカの細胞に PPV を感染させウイルス VEGF の mRNA 発現を経時的に解析すると、動物種による差は観察されなかった。また、ヒツジとカモシカから分離された PPV に由来し、アミノ酸配列が異なる VEGF 3 種類を組換え蛋白として発現し、その生物活性を比較すると、血管透過性、ヒト血管内皮細胞増殖亢進能に大きな差は観察されなかった。ウシ、ヒツジ、ヤギ、カモシカの内皮細胞に、カモシカから分離された PPV 由来の組換え VEGF を添加し細胞の反応性を比較すると、カモシカの内皮細胞が最もよく VEGF に反応し増殖することが明らかとなった。次にヒツジの内皮細胞が増殖し、ウシの内皮細胞の増殖性が最も低かった。この VEGF に対する反応性の動物種差が、動物種により病変発現の程度に差が生じる原因の一つであることを示唆した。

PPV がコードする VEGF について、現在カモシカで流行している PPV と 1980 年代後半に流行した PPV と遺伝学的に比較し、約 20 年前の PPV と現在の PPV の VEGF 遺伝子の塩基配列、アミノ酸配列は極めて高く保存されていることを明らかにした。VEGF 遺伝子のほか、ウイルスインターフェロン抵抗性遺伝子、ウイルスエンベロープ遺伝子についても高度に保存されていることを明らかにした。このことからカモシカ内皮細胞がよく増殖する VEGF と同じ遺伝学的特徴を持った PPV が、数十年の間カモシカの生態内で継続して馴化・感染していることが、カモシカにおける

皮膚病変の重症度に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表等

(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 19 件)

- 1) Ito, M., Murakami, T., Hayakawa, Y., Shintani, E., Inoshima, Y.: Serological and epidemiological studies of parapoxvirus infection in cattle in Ishikawa Prefecture. *Jpn. Agr. Res. Quart.* 45: 123-127, 2011. (査読有り)
<http://www.jircas.affrc.go.jp/english/publication/jarq/45-1/45-01-17.pdf>
- 2) Inoshima, Y., Ito, M., Ishiguro, N.: Spatial and temporal genetic homogeneity of orf viruses infecting Japanese serows (*Capricornis crispus*). *J. Vet. Med. Sci.* 72: 701-707, 2010. (査読有り)
http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/72/6/701/_pdf/-char/ja/
- 3) Inoshima, Y., Ishiguro, N.: Molecular and biological characterization of vascular endothelial growth factor of parapoxviruses isolated from wild Japanese serows (*Capricornis crispus*). *Vet. Microbiol.* 140: 63-71, 2010. (査読有り)
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD6-4WYDNOJ-3&_user=6281840&_coverDate=01%2F06%2F2010&_alid=1716569816&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_cdi=5190&_sort=r&_st=13&_docanchor=&view=c&_ct=6&_acct=C000009618&_version=1&_urlVersion=0&_userid=6281840&md5=5dc3ac0ca75c15ff16b79dd7623a5ff&searchtype=a
- 4) Inoshima, Y., Ishiguro, N.: Establishment of vascular endothelial cell lines from the aortas of wild Japanese serows (*Capricornis crispus*). *Cell Biol. Int.* 33: 617-620, 2009. (査読有り)
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WCB-4VSB1FD-3&_user=6281840&_coverDate=05%2F31%2F2009&_alid=1716571064&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_cdi=6734&_sort=r&_st=13&_docanchor=&view=c&_ct=36&_acct=C000009618&_version=1&_urlVersion=0&_userid=6281840&md5=af3582dfb5148a4d6ef2092

69ce8e39f&searchtype=a

- 5) Inoshima, Y., Nakane, T., Sentsui, H.: Severe dermatitis on cattle teats caused by bovine papular stomatitis virus. *Vet. Rec.* 164: 311-312, 2009. (査読有り)
<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/164/10/311.3.full?sid=499ab297-8b2e-4cb0-9441-e8b42479141e>
- 6) Ito, M., Hayakawa, Y., Shintani, E., Inoshima, Y.: Molecular characterization of parapoxviruses from infected wild Japanese serows (*Capricornis crispus*) in Ishikawa Prefecture. *Jpn. J. Zoo Wildl. Med.* 14: 103-106, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 19 件)

- 1) 猪島康雄、大野佳、前田健、石黒直隆：ゴマフアザランにおけるパラポックスウイルス感染。第 150 回日本獣医学会。2010 年 9 月 16～18 日、帯広。
- 2) 大野佳、猪島康雄、前田健、石黒直隆：ゴマフアザランにおけるパラポックスウイルス感染。第 16 回日本野生動物医学会。2010 年 9 月 1～4 日、博多。
- 3) 猪島康雄、石黒直隆：最近流行しているパラポックスウイルスのエンベロップ、VEGF、VIR 遺伝子の保存性。第 148 回日本獣医学会。2009 年 9 月 25～27 日、鳥取。
- 4) 伊藤美加、早川裕二、村上俊明、新谷英一、猪島康雄：石川県の牛におけるパラポックスウイルスの浸潤状況。平成 21 年度中部獣医師会連合会大会。2009 年 9 月 6 日、名古屋。
- 5) 猪島康雄、石黒直隆：ニホンカモシカ由来血管内皮細胞株の樹立とバイオアッセイ。第 146 回日本獣医学会。2008 年 9 月 24～26 日、宮崎。
- 6) Inoshima, Y., Ishiguro, N.: Role of viral vascular endothelial growth factor in parapoxvirus infection in Japanese serows (*Capricornis crispus*). 3rd International Meeting on Asian Zoo/Wildlife Medicine and Conservation 2008. 2008 年 8 月 19～22 日、Bogor, Indonesia.
- 7) Yanai, T., Sakai, H., Inoshima, Y., Masegi, T.: A case report; contagious pustular dermatitis (parapox infection) in a Japanese serow. 3rd International Meeting on Asian Zoo/Wildlife Medicine and Conservation 2008. 2008 年 8 月 19

～22日、Bogor, Indonesia.

[図書] (計1件)

- 1) 猪島康雄、学窓社、「ノロウイルスによる食中毒」獣医公衆衛生学実習、獣医公衆衛生学教育研修協議会編、2010、p.59-61.

[その他]

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~naishigu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪島 康雄 (INOSHIMA YASUO)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20355184

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし