

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580358

研究課題名（和文） ブタ腸管カリシウイルスの性状解明の進展

研究課題名（英文） Further characterization of porcine enteric caliciviruses

研究代表者

遠矢 幸伸（TOHYA YUKINOBU）

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20180119

研究成果の概要（和文）：

ブタ腸管カリシウイルスの性状を明らかとするため、ブタ糞便サンプルを用いて RT-PCR によるカリシウイルスの検索を行った。サポウイルス（SaV）に加えて St-Valerien-like virus（SVV）が検出され、SaV のうち 8 株は新しい 2 つの genogroups を形成する可能性が示唆された。SVV と 3 株の SaV の VP1 遺伝子をバキュロウイルスで組換え発現させたところ、直径約 40nm のウイルス様粒子が電子顕微鏡で観察された。

研究成果の概要（英文）：

In order to characterize porcine enteric caliciviruses, caliciviruses were surveyed by RT-PCR using porcine fecal samples. In addition to SaV, St-Valerien-like virus (SVV) was detected in this survey. Sequence analysis of SaV VP1 genes suggested that 8 SaV might belong to two new genogroups. The VP1 genes of the SVV strain and three SaV strains were recombinantly expressed in the baculovirus expression system. Ultramicroscopic observation showed production of virus like particles, approximately 40 nm in diameter.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：カリシウイルス、ブタ、サポウイルス、St-Valerien-like virus、下痢

1. 研究開始当初の背景

カリシウイルスは 7～8 キロベースの一本鎖プラスセンス RNA をゲノムとするエンベロプのない直径 30～40 nm の小型球形ウイル

スである。カリシウイルスは培養細胞での分離や増殖が不可能なものが多く、その研究は非常に困難であったが、近年の分子生物学的手法の発達、特に polymerase chain reaction

(PCR) 法を応用したウイルスゲノム RNA の検出法 (RT-PCR 法) の開発と塩基配列決定法の進歩により、その病原体としての実態が解明されてきている。

その中で、ヒトのカリシウイルスの一種であるノロウイルス (NoV) は非細菌性の食中毒の主要な原因であることが近年解明された代表的な腸管病原性カリシウイルスである。加えて、培養不能のヒトのカリシウイルスとしては、主に小児の下痢症の原因であるサポウイルス (SaV) も重要である。

一方、これら公衆衛生上重要なヒトの NoV と SaV に類似の新しいカリシウイルスがウシやブタにも存在することが近年明らかになりつつあり、その家畜衛生ならびに公衆衛生における意義の解明が期待されており、その病原体としての実態を抜本的に解明しようとする本研究計画の成果は、世界レベルでのインパクトを有するものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は近年、世界的にその存在が明らかになりつつあるとともに、人の重要な病原体である SaV や NoV に近縁のブタ腸管カリシウイルスを対象にして、その病原体としての性状解明を進展させることを目的とする。

具体的には以下の項目をブタ腸管カリシウイルスについて追求する。(1) ウイルス学的性状の解析と多様性の解明。(2) 野外における分布と浸潤度の調査。(3) 培養細胞での増殖法の開発。(4) 養豚場における感染サイクルの解明。(5) 実験感染による病原性の解析。

3. 研究の方法

計 142 検体のブタ糞便より RNA を抽出し、カリシウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 遺伝子領域を標的としたプライマーペアを用いた RT-PCR により、ブタカリシウイルスの検出を行った。目的のサイズの DNA が増幅された検体については塩基配列を決定し、系統樹を作成した。SaV については構造タンパク遺伝子である VP1 の塩基配列を、さらに、近年新しく欧米で発見されたブタカリシウイルスである St-Valerien-like virus (SVV) については全ゲノムの塩基配列を決定した。

検出された SaV のうち新しい genogroup と考えられる株を含む 3 株に加えて、SVV は 1 株について、それらの VP1 遺伝子をバキュロウイルスで組換え発現させ、ウイルス様粒子 (VLP) の作出を試みた。

RT-PCR 陽性検体 44 検体については、米国でブタ SaV の増殖に成功したとの報告のあるブタ腎由来株化細胞である LLC-PK1 細胞に胆汁酸塩を添加した系を用いたウイルス増殖試みた。

4. 研究成果

RT-PCR の結果、計 42 検体 (29.3%) にブタ SaV が、2 検体に SVV が検出された。検出されたブタ SaV ゲノムの RdRp 領域の塩基配列をもとに系統樹を作製すると、29 検体が SaV の genogroup III (G III) に属し、14 検体が G III 以外の genogroup に属することが示され (図 1)、1 検体は G III と他の genogroup との共感染が認められた。

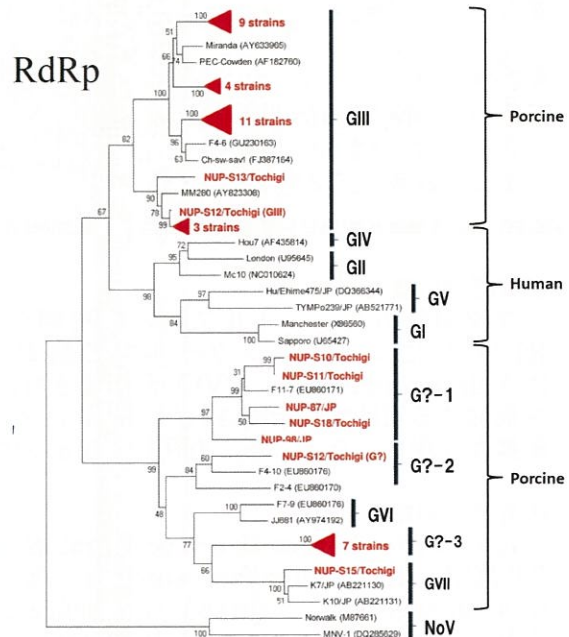


図 1. SaV ゲノムの RdRp 領域の塩基配列に基づく系統樹. 系統樹上の数値はブートストラップ値を示す。赤字及び赤い矢頭によってまとめられた株は本研究で検出された株を示す。

SaV 陽性のうち、20 検体について VP1 遺伝子塩基配列を決定し、アミノ酸配列を用いた系統樹を作製したところ、11 検体は G III に属し、1 検体は G VI に即することが示されたが、残りの 8 検体は既知の SaV の genogroup とは独立した枝を形成した (図 2)。

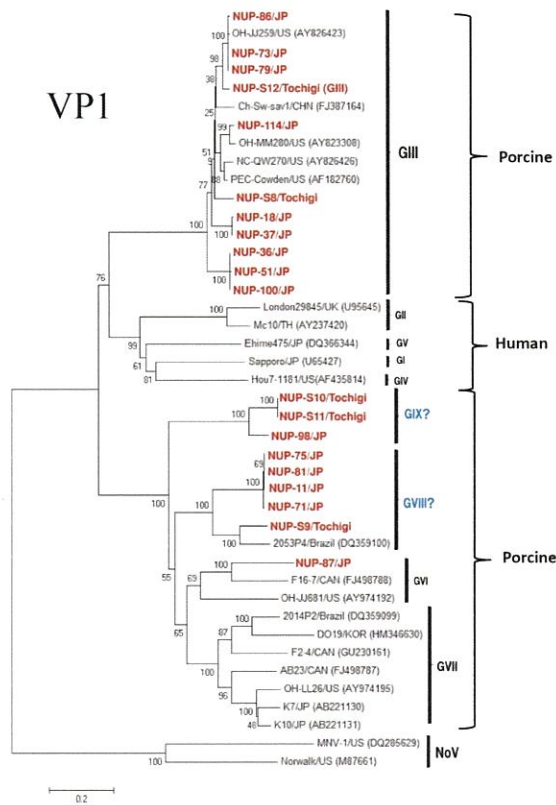


図 2. SaV の VP1 領域の推定アミノ酸配列に基づく系統樹。系統樹上の数値はブートストラップ値を示す。赤字及び赤い矢頭によってまとめられた株は本研究で検出された株を示す。青字は新たに認められた genogroup を示す。

SVV については全ゲノム塩基配列を決定し系統樹を作製したところ、米国の SVV と最も高い相同性を示した (図 3)。

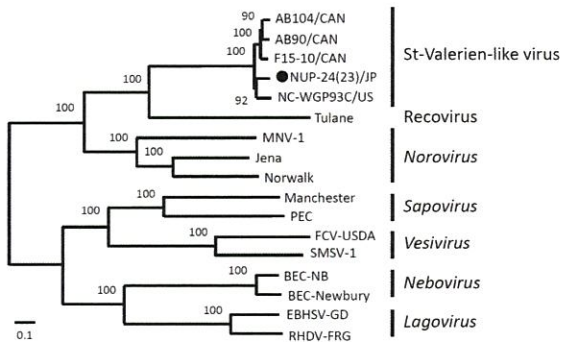


図 3. 全塩基配列を (ポリ A を除く) を用いた SVV 日本株 (NUP24/JP、●印) の系統樹。

組換え発現 VP1 蛋白は SDS-PAGE では約 58kDa (SaV) または約 55kDa (SVV) のバンドとして検出され、電子顕微鏡観察ではすべて約 40nm の中空粒子として VLP が観察され、粒子表面にはカリシウイルスに特有の窪み

が認められた。SVV の VLP を図 4 に示す。

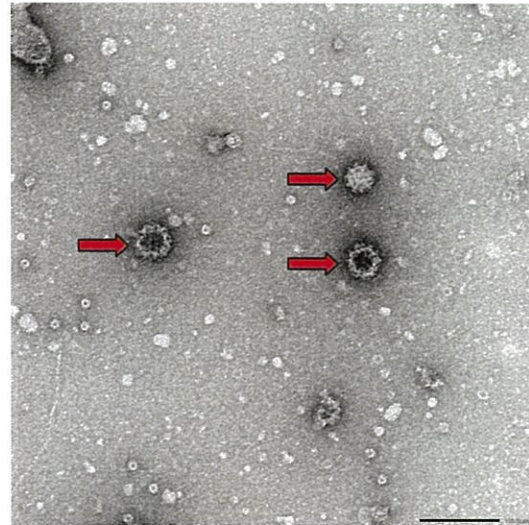


図 4. 日本で初めて検出された SVV の VLP の電子顕微鏡像 (矢印)。

細胞培養での試みでは、明瞭な CPE および RT-PCR でのゲノム RNA の増加は認められず、細胞培養でのブタ腸管カリシウイルスの分離・増殖にはさらなる検討が必要と考えられた。

本研究により、日本のブタにおける SaV や SVV を含む腸管カリシウイルスの遺伝的多様性が示された。また、腸管カリシウイルスは細胞培養での増殖が困難であり、本研究で作製に成功した VLP は血清反応抗原などの今後の研究展開のツールとして有用と期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 木内政宏、佐藤豪、井戸寿之、片山和彦、遠矢幸伸、ブタサポウイルスのゲノム検出とその遺伝子型別、第 155 回日本獣医学会学術集会、2013 年 3 月 29 日、東京大学
- ② 佐藤豪、井戸寿之、木内政宏、片山和彦、遠矢幸伸、日本の豚から初めて検出された St-Valerian-like virus のゲノム性状とウイルス様粒子の作製、第 155 回日本獣医学会学術集会、2013 年 3 月 29 日、東京大学

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/80/0007950/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠矢 幸伸 (TOHYA YUKINOBU)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20180119

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし