

学位論文要旨

氏名 寺田 豊

題目 : Studies on mechanisms of evolution of coronaviruses
(コロナウイルスの進化メカニズムの解析)

論文要旨 :

コロナウイルス (CoV) はニドウイルス目コロナウイルス科に属するウイルスであり、近年では重症急性呼吸器症候群 (SARS) CoV 等の動物由来の新興 CoV 感染症が大きな問題となっている。

CoV は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の不正確性等の性状から遺伝子変異や組換えが起きやすいウイルスである。これらの現象は CoV の連続的あるいは非連続的進化を促進し、その結果として宿主域や病原性の劇的な変化を引き起こす。

CoV の進化と宿主域・病原性との関連を厳密に調べるには、自然宿主を用いて解析する必要があるが、多くの研究は自然宿主とは異なる動物種を用いて実施されている。本研究では、猫コロナウイルス (FCoV) 及びフェレットコロナウイルス (FRCoV) を自然宿主である猫及びフェレットを用いて解析し、CoV の進化と宿主域・病原性との関連を調査した。更に、その進化メカニズムを解明し、新興 CoV の出現機序の解明に向けた基礎データの蓄積を目的とする。本研究は以下の3章より構成される。

第1章 I型 FCoV C3663株が有するS遺伝子の巨大な欠損とその病原性の解析

FCoV は猫に対する病原性により、弱毒である猫腸コロナウイルス (FECV) と、致死性疾患である猫伝染性腹膜炎 (FIP) を引き起こす FIP ウイルス (FIPV) に分類される。更に FCoV はスパイク (S) 遺伝子により I 型と II 型に分類される。野外では I 型 FCoV が優勢であるが、多くの研究は実験が容易な II 型 FCoV を用いている。本章では、I 型 FCoV を用いた FIP 研究の動物モデル構築を目的として、I 型 FCoV C3663 株の遺伝子解析と共に猫に対する病原性を検討した。

I 型 FCoV C3663 株と Yayoi 株の S 遺伝子の塩基配列を決定した結果、C3663 株 S 遺伝子の 5' 末端領域に 735 塩基の巨大な欠損が認められた。次に SPF 猫 4 頭に C3663 株を経口投与した結果、4 頭中 2 頭が FIP で死亡し、他の 1 頭が感染後 91 日目の剖検時に FIP 病変が認められ (発症率 75%)、C3663 株の高病原性が確認された。

本研究により、I 型 FCoV による FIP 感染実験系の確立に成功し、さらに S 遺伝子のダイナミックな変異と病原性の関連性が示された。

第2章 II型猫コロナウイルスの出現機序の解明

II 型 FCoV は、I 型 FCoV と II 型犬コロナウイルス (CCoV) との組換えによって出現すると考えられているが、その詳細は十分解明されていない。本章では II 型 FCoV 出現メカニズムの解明を目的に、国内分離株である II 型 FCoV 3 株と II 型 CCoV 1 株の RdRp 遺伝子の一部と S 遺伝子以降の塩基配列を決定した。さらに、II 型 CCoV 9 株の RdRp 遺伝子及び S 遺伝子の一部、ヌクレオカプシド (N) 遺伝子全長を決定し、I 型 FCoV C3663 株及び Yayoi 株とともに比較解析を実施した。

(別紙様式第3号)

RdRp 遺伝子を基に作成した系統樹により、II 型 FCoV はウイルス株によって I 型 FCoV または II 型 CCoV に由来しており、各 II 型 FCoV の組換えは RdRp 遺伝子前後の異なる部位で生じていた。S 及び N 遺伝子を基にした系統樹により、各 II 型 FCoV はそれぞれ異なる I 型 FCoV 及び II 型 CCoV に由来することが判明した。II 型 FCoV 3 株の内、2 株は膜タンパク遺伝子の異なる部位で、1 株は S 遺伝子の 3' 末端で組換えを起こしていた。この組換え部位は CoV 間で高度に保存されており、高度保存領域が相同組換えによる II 型 FCoV の出現に関与していると考えられた。また、中和試験の結果、I 型 FCoV 感染猫血清には II 型 CCoV に対する中和活性がないことが示された。

以上の結果から、I 型 FCoV が持続感染している猫に II 型 CCoV が重感染し、猫体内で相同組換えにより II 型 FCoV は出現するというメカニズムが強く示唆された。

第3章 フェレットコロナウイルスの国内における蔓延状況

FRCoV は 2000 年に初めて報告された新興 CoV である。FRCoV にはフェレットにカタル性腸炎を引き起こす弱毒型 (FRECV) と、FIP 様の症状を引き起こす強毒型 (FRSCV) が存在する。また、欧米で蔓延している FRCoV は S 遺伝子の違いから I 型及び II 型に分類される。本章では、FRCoV の遺伝子検出系を確立し、これまで不明であった国内飼育フェレットの FRCoV 感染状況を調査した。

糞便 79 検体及び口腔スワブ 14 検体 (5 都県、10 動物病院) を用いて遺伝子検出を実施した。CoV コンセンサスプライマー (RdRp) を用いた結果、41.8% (33/79) の糞便から CoV 遺伝子が検出された。得られた塩基配列を基に新規 FRCoV 検出プライマーを設計した結果、陽性率は 55.7% (44/79) と高率であった。更に、国内のフェレットからも I 型 (30/79:38.0%) 及び II 型 FRCoV (17/79:21.5%) が検出された。8 頭 (10.1%) には両型の FRCoV が同時感染しており、2 種類の FRCoV がすでに国内に広く蔓延していることが判明した。今回の結果からだけでは FRCoV の型と臨床症状との関連性は認められなかった。口腔スワブでは陽性率 35.7% (5/14) となり、口腔を介した水平伝播の可能性も示唆された。

本研究では、S 遺伝子の巨大な欠損を有する高病原性 I 型 FCoV の存在が確認された。同様の欠損は豚の CoV である PRCoV にも認められており、組織特異性や病原性への関与が示唆されている。このような変異は CoV では比較的起きやすいと考えられ、今後同様の変異を起こす CoV の出現も危惧される。II 型 FCoV と多くの CCoV との塩基配列を比較した研究により、II 型 FCoV が相同組換えによって猫の体内でそれぞれ独立に出現するというメカニズムが強く示された。更に、この出現の頻度が予想以上に高いことが示された。2 種類の FRCoV がすでに国内に広く蔓延していることが判明した。国内の動物に様々な CoV が数種類感染しており、相同性組換えや欠損などにより新興 CoV が出現する可能性が危惧された。本研究の成果は新興 CoV の出現予測に大いに役立つと考えている。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	寺田 豊
審査委員	主査：山口大学 教授 前田 健
	副査：鹿児島大学 教授 桃井 康行
	副査：鹿児島大学 教授 望月 雅美
	副査：山口大学 教授 奥田 優
	副査：山口大学 准教授 渡邊 理恵
題目	Studies on mechanisms of evolution of coronaviruses コロナウイルスの進化メカニズムの解析

審査結果の要旨：

コロナウイルス (CoV) はニドウイルス目コロナウイルス科に属するウイルスであり、近年では動物由来新興 CoV 感染症が大きな問題となっている。CoV は遺伝子変異や組換えが非常に起きやすいウイルスであり、これらの現象は宿主域や病原性の変化を引き起こす。

本研究は CoV の進化のメカニズムを猫コロナウイルス (FCoV) 及びフェレットコロナウイルス (FRCoV) をモデルとして、自然宿主である猫及びフェレットを用いて解析し、新興 CoV の出現機序の解明に向けた基礎データの蓄積を目的としている。本研究は以下の 3 章より構成される。

【第 1 章】 I 型 FCoV C3663 株が有する S 遺伝子の巨大な欠損とその病原性の解析

FCoV は猫に対する病原性により、弱毒である猫腸コロナウイルス (FECV) と、致死性疾患である猫伝染性腹膜炎 (FIP) を引き起こす FIP ウイルス (FIPV) に分類される。更に FCoV はスパイク (S) 遺伝子により I 型と II 型に分類される。野外では I 型 FCoV が優勢であるが、多くの研究で実験が容易な II 型 FCoV を用いている。本章では、I 型 FCoV を用いた FIP 研究の動物モデル構築を目的として、I 型 FCoV C3663 株の遺伝子解析を行うと共に猫に対する病原性を検討した。

I 型 FCoV C3663 株の S 遺伝子以降 (8, 170b) 及び Yayoi 株の S 遺伝子 (4, 404b) の塩基配列を決定した結果、C3663 株 S 遺伝子の 5' 末端領域に 735 塩基の巨大な欠損が認められた。更に SPF 猫を用いた C3663 株の感染実験を実施した結果、FIP 発症率は 75% (3/4) にも上り、C3663 株が高病原性であることが確認された。

本研究において、I 型 FCoV による FIP 感染実験系の確立に成功し、更に S 遺伝子のダイナ

ミックな変異と病原性の関連性が示された。

【第 2 章】II 型猫コロナウイルスの出現機序の解明

II 型 FCoV は、I 型 FCoV と II 型犬コロナウイルス (CCoV) との組換えによって出現すると考えられているが、その詳細は十分解明されてはいない。本章では II 型 FCoV 出現メカニズムの解明を目的に、国内分離株である II 型 FCoV 3 株と II 型 CCoV 10 株の塩基配列を決定し、I 型 FCoV C3663 株及び Yayoi 株とともに比較解析を実施した。

系統解析の結果、各 II 型 FCoV はそれぞれ異なる組換え部位を有し、それぞれ異なる I 型 FCoV 及び II 型 CCoV に由来することが判明した。また、各組換え部位は CoV 間で高度に保存されており、高度保存領域が相同組換えによる II 型 FCoV の出現に関与していると考えられた。中和試験の結果から、I 型 FCoV 感染猫血清には II 型 CCoV に対する中和活性が無いことが示された。以上の結果から、II 型 FCoV は I 型 FCoV が持続感染している猫に II 型 CCoV が重感染し、猫体内で相同組換えにより出現するというメカニズムが強く示唆された。

【第 3 章】フェレットコロナウイルスの国内における蔓延状況

FRCoV は 2000 年に初めて報告された新興 CoV である。FRCoV は病原性の違いからカタル性腸炎を引き起こす弱毒型 (FRECV) と、FIP 様の症状を引き起こす強毒型 (FRSCV) が存在する。また、欧米で蔓延している FRCoV は S 遺伝子の違いから I 型及び II 型に分類される。本章では、これまで未知であった国内飼育フェレットの FRCoV 感染状況の解明を目的に、FRCoV の遺伝子検出系を確立し、調査を実施した。

本研究ではフェレットの糞便 79 検体及び口腔スワブ 14 検体 (5 都県、10 動物病院) からの CoV 遺伝子検出を試み、さらに新規 FRCoV 遺伝子検出系を確立した。その結果、糞便における陽性率は 56% (44/79) にも上った。更に、国内のフェレットからも I 型 (30/79:38%) 及び II 型 FRCoV (17/79:22%) が検出され、8 頭 (10%) には両型の FRCoV が同時感染しており、2 種類の FRCoV がすでに国内に広く蔓延していることが判明した。FRCoV の型と臨床症状との関連性は認められなかった。口腔スワブでは陽性率 35.7% (5/14) となり、口腔を介した水平伝播の可能性も示唆された。

本研究において、S 遺伝子の巨大な欠損を有する高病原性 I 型 FCoV の存在が確認された。同様の欠損は豚の CoV である豚呼吸器コロナウイルスにも認められており、CoV では比較的起きやすいと考えられる。今後同様の変異を起こす CoV 出現の可能性も考えられた。II 型 FCoV と多くの II 型 CCoV との塩基配列を比較した研究により、II 型 FCoV が相同組換えによって猫の体内でそれぞれ独立に出現するというメカニズムが強く示された。また、2 種類の FRCoV がすでに国内に広く蔓延していることが判明した。

これら一連の研究は、CoV における欠損と組換えという進化メカニズムについて、重要な知見をもたらした。また、2 種類の FRCoV がすでに国内に広く蔓延していることを解明し、今まで未知であった CoV が相同組換えや欠損などにより新興 CoV として出現する可能性を示した。本研究の成果は新興 CoV の出現予測に大いに役立つと期待される。以上により、本論文は博士 (獣医学) の論文として、妥当なものであると判断された。