

学 位 論 文 要 旨

氏名 石嶋 慧多

題 目 : Isolation and analysis of herpesviruses from wild animals
(野生動物由来ヘルペスウイルスの分離及び解析)

論文要旨 :

ヘルペスウイルスはヘルペスウイルス目に分類されるウイルスの総称である。その宿主域は哺乳類から軟体動物まで多岐に渡る。特に哺乳類を宿主とするヘルペスウイルスはヘルペスウイルス科に属し、アルファ、ベータ、ガンマヘルペスウイルスの3亜科に分類される。生体内において潜伏感染する箇所、あるいは病原性・増殖性などは特に亜科ごとで大きく異なる。また、ヒト、伴侶動物、生産動物において多くの疾病が報告されているアルファヘルペスウイルスは比較的病原性について明らかになっている部分もあるが、ガンマヘルペスウイルスについては、その病原性について不明な部分が多い。動物園動物を含む、野生動物由来のヘルペスウイルスについては分離の報告も少ない。未だ、各種動物が保有するヘルペスウイルスに関して不明な点が多いのが現状である。

本研究において、新規に分離された野生動物由来の2種のヘルペスウイルスの同定並びに解析を行った。

【第1章】 カマイルカから分離された新規のヘルペスウイルス

本章では、国内の死亡したカマイルカの腎臓から分離されたヘルペスウイルスについて、その解析を行った。

国内の水族館で死亡したカマイルカの腎臓から培養細胞の作出を試みた結果、合胞体を主体とする細胞変性効果 (CPE) が確認された。ヘルペスウイルスコンセンサスプライマーによるPCR、および塩基配列を決定した結果、分離ウイルスはアルファヘルペスウイルス亜科に属する新規のヘルペスウイルスであることが明らかになった (Lagenorhynchus herpesvirus 1)。決定した DNA ポリメラーゼ領域で系統解析を行った結果、他の鯨類由来アルファヘルペスウイルスと同じクレードを形成した。鯨類由来アルファヘルペスウイルスの系統学的位置をより詳細に明らかにするため、新規に設計したプライマーとインバース PCR によって、エンベロープ糖蛋白 gB 遺伝子の全長 (2,757 bp) の決定に成功した。系統解析の結果、本ウイルスはバリセロウイルス属に属し、反芻類由来のヘルペスウイルスと近縁であることが明らかになった。

鯨類由来のアルファヘルペスウイルスの分離については、本報告が初めてである。反芻類由来のアルファヘルペスウイルスと本ウイルスが近縁だったことは、ヘルペスウイルスと宿主が共進化しているという仮説と一致していた。

【第2章】 キクガシラコウモリガンマヘルペスウイルスの分離及び全塩基配列の決定

本章では、国内のキクガシラコウモリから分離されたガンマヘルペスウイルスについて、その性状解析と全塩基配列の決定を行った。

国内で捕獲したキクガシラコウモリの脾臓から培養細胞の作出を試みた結果、継代の途中で CPE が認められた。上清を同一のキクガシラコウモリから作出した腎由来培養細胞株である Bat kidney T (BKT)-1 細胞に接種、継代したところ、CPE が認められた。Rapid determination of viral RNA sequence 法によって、新規のガンマヘルペスウイルスであることが明らかになった (Rhinolophus gammaherpesvirus 1; RGHV-1)。RGHV-1 の増殖性について、10 種類の細胞を用いて評価した。5 種類の翼手目由来の細胞 (BKT1、FBKT1、YubFKT1、YubFKT2、DemKT1) 及び 5 種類の翼手目以外の哺乳類由来の細胞 (Vero、BHK、CRFK、fcwf-4、MDCK) において RGHV-1 の増殖性を比較した結果、Vero 細胞と CRFK 細胞では他の細胞に比較してよく増殖した。

RGHV-1 感染 Vero 細胞から抽出した DNA から全塩基配列の決定を試み、PCR、ダイレクトシーケンス、並びに次世代シーケンス法でその全塩基配列 (147,790 bp) を決定した。4,721 bp の末端反復配列が両端に存在するゲノム構造をとり、そのゲノム上には 84 個の蛋白をコードしている open reading frame (ORF) が推定された。12 個の ORF は、既知のヘルペスウイルス由来の蛋白と相同性のない配列であったが、そのうち 2 個の ORF については機能が推測された。一つはアポトーシス抑制因子であるヒト bcl-x1 と相同性のある蛋白で、もう一つは構造的にヒトヘルペスウイルス 8 型の modulator of immune recognition (MIR) に類似していた。糖蛋白 gB 遺伝子の全長による系統解析の結果、ペルカウイルス属に属することが確認された。また、過去に報告のある、ホオヒゲコウモリの糞便から検出されたガンマヘルペスウイルスと 97.6 % の相同性が認められ、同一の種と考えられた。いずれのコウモリ種が RGHV-1 の自然宿主かについてはより詳細な検討が必要である。

本章では、新規に分離されたキクガシラコウモリ由来のヘルペスウイルスについて、その全塩基配列を決定した。ゲノム構造の決定ならびに遺伝子解析によって、既知のガンマヘルペスウイルスとは異なる特徴を有するヘルペスウイルスであることが明らかになった。

本研究において、野生動物由来のヘルペスウイルスとして、鯨類由来のアルファヘルペスウイルスと翼手目由来のガンマヘルペスウイルスの分離に成功した。いずれも過去に分離報告がないヘルペスウイルスであり、宿主の臓器由来の初代培養細胞、並びに宿主に由来する培養細胞株がウイルス分離で有用であることが改めて示された。また、分離に成功したことで、カマイルカヘルペスウイルスでは糖蛋白 gB の全長が、キクガシラコウモリ由来ヘルペスウイルスでは塩基配列の全長が決定された。

鯨類由来のヘルペスウイルスについては、皮膚病変や、あるいは全身症状との関連が疑われるにも関わらず、分離に成功した例は本報告を除けば現時点では 1 例のみである。第一章で分離されたウイルスについて、今後、培養細胞による増殖系の確立を含めてより詳細な研究をすることは、動物園における鯨類の予防・治療につながると考えられる。

第 2 章において分離されたウイルスのゲノム中には、既知のヘルペスウイルスとは大きく異なる蛋白を含めて、免疫回避に関与する蛋白が複数同定されている。これらの蛋白の解析を進めることは、複数の人獣共通感染症の宿主として知られているコウモリの免疫系を知る手がかりになると考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	石嶋 慧多
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 前田 健
	副 査：山口大学 教授 岩田 祐之
	副 査：鳥取大学 教授 山口 剛士
	副 査：山口大学 教授 西垣 一男
	副 査：JRA 馬事部防疫課長 山中 隆史
題 目	Isolation and analysis of herpesviruses from wild animals (野生動物由来ヘルペスウイルスの分離及び解析)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>ヘルペスウイルスはヘルペスウイルス目に分類されるウイルスの総称である。その宿主域は哺乳類から軟体動物まで多岐に渡る。特に哺乳類を宿主とするヘルペスウイルスはヘルペスウイルス科に属し、アルファ、ベータ、ガンマヘルペスウイルスの3亜科に分類される。生体内において潜伏感染する箇所、あるいは病原性・増殖性などは特に亜科ごとで大きく異なる。また、ヒト、伴侶動物、生産動物において多くの疾病が報告されているアルファヘルペスウイルスは比較的病原性について明らかになっている部分もあるが、ガンマヘルペスウイルスについては、その病原性について不明な部分が多い。動物園動物を含む、野生動物由来のヘルペスウイルスについては分離の報告も少ない。未だ、各種動物が保有するヘルペスウイルスに関して不明な点が多いのが現状である。</p> <p>本研究は新規に分離されたヘルペスウイルスの同定並びに解析を目的とし、全2章から構成される。</p> <p>【第1章】 カマイルカから分離された新規のヘルペスウイルス</p> <p>本章では、国内の死亡したカマイルカの腎臓から分離されたヘルペスウイルスについて、その解析を行った。</p> <p>国内の水族館で死亡したカマイルカの腎臓から培養細胞の作出を試みた結果、合胞体を主体とする細胞変性効果（CPE）が確認された。ヘルペスウイルスコンセンサスプライマーによるPCR、および塩基配列を決定した結果、分離ウイルスはアルファヘルペスウイルス亜科に属する新規のヘルペスウイルスであることが明らかになった（Lagenorhynchus herpesvirus 1）。決定したDNAポリメラーゼ領域で系統解析を行った結果、他の鯨類由来アルファヘルペスウイルスと同じクレードを形成した。鯨類由来アルファヘルペスウイルスの系統学的位置をより詳</p>	

細に明らかにするため、新規に設計したプライマーとインバース PCR によって、エンベロープ糖蛋白 gB 遺伝子の全長 (2,757 bp) の決定に成功した。系統解析の結果、本ウイルスはバリセロウイルス属に属し、反芻類由来のヘルペスウイルスと近縁であることが明らかになった。

鯨類由来のアルファヘルペスウイルスの分離については、本報告が初めてである。反芻類由来のアルファヘルペスウイルスと本ウイルスが近縁だったことは、ヘルペスウイルスと宿主が共進化しているという仮説と一致していた。

【第 2 章】キクガシラコウモリガンマヘルペスウイルスの分離及び全塩基配列の決定

本章では、国内のキクガシラコウモリから分離されたガンマヘルペスウイルスについて、その性状解析と全塩基配列の決定を行った。

国内で捕獲したキクガシラコウモリの脾臓から培養細胞の作出を試みた結果、継代の途中で CPE が認められた。上清を同一のキクガシラコウモリから作出した腎由来培養細胞株である Bat kidney T (BKT)-1 細胞に接種、継代したところ、CPE が認められた。Rapid determination of viral RNA sequence 法によって、新規のガンマヘルペスウイルスであることが明らかになった (Rhinolophus gammaherpesvirus 1; RGHV-1)。RGHV-1 の増殖性について、10 種類の細胞を用いて評価した。5 種類の翼手目由来の細胞 (BKT1、FBKT1、YubFKT1、YubFKT2、DemKT1) 及び 5 種類の翼手目以外の哺乳類由来の細胞 (Vero、BHK、CRFK、fcwf-4、MDCK) において RGHV-1 の増殖性を比較した結果、Vero 細胞と CRFK 細胞では他の細胞に比較してよく増殖した。

RGHV-1 感染 Vero 細胞から抽出した DNA から全塩基配列の決定を試み、PCR、ダイレクトシーケンス、並びに次世代シーケンス法でその全塩基配列 (147,790 bp) を決定した。4,721 bp の末端反復配列が両端に存在するゲノム構造をとり、そのゲノム上には 84 個の蛋白をコードしている open reading frame (ORF) が推定された。12 個の ORF は、既知のヘルペスウイルス由来の蛋白と相同性のない配列であったが、そのうち 2 個の ORF については機能が推測された。一つはアポトーシス抑制因子であるヒト bcl-x1 と相同性のある蛋白で、もう一つは構造的にヒトヘルペスウイルス 8 型の modulator of immune recognition (MIR) に類似していた。糖蛋白 gB 遺伝子の全長による系統解析の結果、ペルカウイルス属に属することが確認された。また、過去に報告のある、ホオヒゲコウモリの糞便から検出されたガンマヘルペスウイルスと 97.6 % の相同性が認められ、同一の種と考えられた。

本章では、新規に分離されたキクガシラコウモリ由来のヘルペスウイルスについて、その全塩基配列を決定した。ゲノム構造の決定ならびに遺伝子解析によって、既知のガンマヘルペスウイルスとは異なる特徴を有するヘルペスウイルスであることが明らかになった。

以上の「カマイルカから分離された新規のヘルペスウイルス」、「キクガシラコウモリガンマヘルペスウイルスの分離及び全塩基配列の決定」により、野生動物におけるヘルペスウイルスについて新規の知見が明らかとなった。第一章で分離されたウイルスについて、今後、培養細胞による増殖系の確立を含めてより詳細な研究をすることは、動物園における鯨類の診断・予防・治療につながると考えられる。第二章において分離されたウイルスのゲノム中には、既知のヘルペスウイルスとは大きく異なる蛋白を含めて、免疫回避に関与する蛋白が複数同定されている。これらの蛋白の解析を進めることは、複数の人獣共通感染症の宿主として知られているコウモリの免疫系を知る手がかりになると考えられる。

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。