

学 位 論 文 要 旨

氏名 日高 千晴

題 目 : Study on the mechanism of increased virulence of Newcastle disease virus in ducks
(ニューカッスル病ウイルスのアヒルにおける病原性増強機序に関する研究)

論文要旨 :

一般的に、強毒型ニューカッスル病ウイルス(NDV)はニワトリに重篤な感染を引き起こす一方で、アヒルやガチョウなどの水禽に対しては明らかな病原性を示さない。しかし、1990年代から中国のアヒルおよびガチョウ農場において致死的な ND が散発的に発生しており、水禽に病原性を示す NDV が出現している。本研究では、NDV が水禽であるアヒルへの病原性を増強させる機序の解明を目的とした。先行研究において、弱毒型 NDV をニワトリで連続継代すると、F 蛋白の開裂部位が多塩基性開裂部位へと変化し、病原性が強毒型へと変異したウイルス(9a5b 株)が得られている。

本研究の第一章では、強毒型 NDV 9a5b 株をアヒルで連続継代することで生じる病原性およびウイルス性状の変化を調べた。9a5b 株をアヒルの気嚢および脳で継代して得られた d5a20b 株は、アヒル雛における脳内病原性指数(ICPI)が 1.10 から 1.88 へと上昇し、1 週齢アヒルでは鼻腔接種時の致死率が 30%から 100%へと上昇した。d5a20b 株は 9a5b 株と比較してアヒルの全身臓器で効率的な複製を示した。ニワトリにおける病原性および増殖性は 9a5b 株および d5a20b 株間ではほとんど差が認められず、アヒル継代を経た後も維持されていた。従って、ニワトリ由来の強毒型 NDV が水禽集団内で感染を繰り返すことにより、ニワトリおよびアヒルの両者に対して高い病原性を示すウイルスが出現する可能性が示唆された。アヒル培養細胞において、d5a20b 株は 9a5b 株よりも増殖速度が高く、その感染によって誘導された IFN- β 遺伝子発現量は 9a5b 株と比較して低いレベルであった。従って、d5a20b 株は宿主免疫を抑制または回避することでアヒルに高い病原性を示した可能性が示唆された。全長ゲノム配列の解析により、d5a20b 株には 9a5b 株に対して P、V、M、F、HN、および L 蛋白に計 11 箇所のアミノ酸置換が生じていることが明らかと

(別紙様式第 3 号)

なった。

第二章では、NDV のアヒルへの病原性増強に関与する因子の同定を行なった。d5a20b 株に認められたアミノ酸置換を様々な組み合わせで有する組換え(r) NDV を作出し、その性状を解析した。その結果、F 蛋白 I142M 置換および M 蛋白 Q44R 置換はそれぞれ単独でアヒルへの病原性を増強することが明らかとなった。F 蛋白 I142M を有する rF142 株は r9a5b 株と比較して 5 倍高い cell-cell fusion 活性を示した。rF142 株はアヒル培養細胞において r9a5b 株と同様の増殖動態を示しており、F 蛋白 I142M 置換によるウイルス増殖への直接的な影響は認められなかった。F 蛋白 I142M 置換による病原性増強機序を明らかにするためには、さらなる調査が必要である。M 蛋白 Q44R を有する rM44 株は、アヒル培養細胞において感染初期の複製速度が高い傾向を示した。また、病原性の増強は認められなかったものの、M 蛋白 N123D 置換を有する rM123 株も同様にアヒル培養細胞において高い複製効率を示した。従って、これらの M 蛋白のアミノ酸置換による増殖性の高まりが、d5a20b 株のアヒルにおける効率的な複製につながった可能性が考えられた。rF142 株および rM44 株のアヒルへの病原性は r9a5b と比較して増強していたものの、rd5a20b の病原性には及ばなかった。一方で、d5a20b 株と M、F、および HN 蛋白のアミノ酸配列が同一である rM+F+HN 株は、ICPI が 1.88、1 週齢アヒルの致死率 100%と、rd5a20b に匹敵する高い病原性を示した。従って、NDV のアヒルへの病原性には M 蛋白およびエンベロープ蛋白の複数のアミノ酸が相乗的に関与していることが明らかとなった。GenBank に登録されている NDV のゲノム配列を解析したところ、F 蛋白 I142M 置換を持つ株は認められなかった一方で、M 蛋白 Q44R 置換を有する 8 つの野外分離株が認められた。興味深いことに、このうちの 1 株である HN1007 株は、飼育アヒルにおける致死的な ND 事例に関連した分離株であった。

以上の成績から、本研究では、単一のアミノ酸置換によって NDV のアヒルにおける病原性の増強が明らかとなり、水鳥に対して病原性を示す強毒型 NDV が感染時に偶発的に出現する可能性が示された。従って、アヒルや合鴨などの水生家禽における ND の発生を防ぐためには、農場におけるバイオセキュリティの向上と、野生水禽類の ND に対するサーベイランスの重要性が改めて示された。

(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	日 高 千 晴
審 査 委 員	主 査： 鳥取大学 教授 伊 藤 壽 啓
	副 査： 鹿児島大学 教授 小 原 恭 子
	副 査： 鳥取大学 教授 山 口 剛 士
	副 査： 鳥取大学 准教授 寸 田 祐 嗣
	副 査： 鳥取大学 准教授 伊 藤 啓 史
題 目	Study on the mechanism of increased virulence of Newcastle disease virus in ducks (ニューカッスル病ウイルスのアヒルにおける病原性増強機序に関する研究)
審査結果の要旨： 一般的に、強毒型ニューカッスル病ウイルス (NDV) はニワトリに重篤な感染を引き起こす一方で、アヒルやガチョウなどの水禽に対しては明らかな病原性を示さない。しかし、1990 年代から中国のアヒルおよびガチョウ農場において致死的な ND が散発的に発生しており、水禽に病原性を示す NDV が出現している。本研究では、NDV が水禽であるアヒルへの病原性を増強させる機序の解明を目的とした。先行研究において、弱毒型 NDV をニワトリで連続継代すると、F 蛋白の開裂部位が多塩基性開裂部位へと変化し、病原性が強毒型へと変異したウイルス (9a5b 株) が得られている。 本研究の第一章では、強毒型 NDV 9a5b 株をアヒルで連続継代することで生じる病原性およびウイルス性状の変化を調べた。9a5b 株をアヒルの気嚢および脳で継代して得られた d5a20b 株は、アヒル雛における脳内病原性指数 (ICPI) が 1.10 から 1.88 へと上昇し、1 週齢アヒルでは鼻腔接種時の致死率が 30%から 100%へと上昇した。d5a20b 株は 9a5b 株と比較してアヒルの全身臓器で効率的な複製を示した。ニワトリにおける病原性および増殖性は 9a5b 株および d5a20b 株間でほとんど差が認められず、アヒル継代を経た後も維持されていた。従って、ニワトリ由来の強毒型 NDV が水禽集団内で感染を繰り返すことにより、ニワトリおよびアヒルの両	

者に対して高い病原性を示すウイルスが出現する可能性が示唆された。アヒル培養細胞において、d5a20b 株は 9a5b 株よりも増殖速度が高く、その感染によって誘導された IFN- β 遺伝子発現量は 9a5b 株と比較して低いレベルであった。従って、d5a20b 株は宿主免疫を抑制または回避することでアヒルに高い病原性を示した可能性が示唆された。全長ゲノム配列の解析により、d5a20b 株には 9a5b 株に対して P、V、M、F、HN、および L 蛋白に計 11 箇所のアミノ酸置換が生じていることが明らかとなった。

第二章では、NDV のアヒルへの病原性増強に関与する因子の同定を行なった。d5a20b 株に認められたアミノ酸置換を様々な組み合わせで有する組換え (r) NDV を作出し、その性状を解析した。その結果、F 蛋白 I142M 置換および M 蛋白 Q44R 置換はそれぞれ単独でアヒルへの病原性を増強することが明らかとなった。F 蛋白 I142M を有する rF142 株は r9a5b 株と比較して 5 倍高い cell-cell fusion 活性を示した。rF142 株はアヒル培養細胞において r9a5b 株と同様の増殖動態を示しており、F 蛋白 I142M 置換によるウイルス増殖への直接的な影響は認められなかった。F 蛋白 I142M 置換による病原性増強機序を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。M 蛋白 Q44R を有する rM44 株は、アヒル培養細胞において感染初期の複製速度が高い傾向を示した。また、病原性の増強は認められなかったものの、M 蛋白 N123D 置換を有する rM123 株も同様にアヒル培養細胞において高い複製効率を示した。従って、これらの M 蛋白のアミノ酸置換による増殖性の高まりが、d5a20b 株のアヒルにおける効率的な複製につながった可能性が考えられた。rF142 株および rM44 株のアヒルへの病原性は r9a5b と比較して増強していたものの、rd5a20b の病原性には及ばなかった。一方で、d5a20b 株と M、F、および HN 蛋白のアミノ酸配列が同一である rM+F+HN 株は、ICPI が 1.88、1 週齢アヒルの致死率 100%と、rd5a20b に匹敵する高い病原性を示した。従って、NDV のアヒルへの病原性には M 蛋白およびエンベロープ蛋白の複数のアミノ酸が相乗的に関与していることが明らかとなった。GenBank に登録されている NDV のゲノム配列を解析したところ、F 蛋白 I142M 置換を持つ株は認められなかった一方で、M 蛋白 Q44R 置換を有する 8 つの野外分離株が認められた。興味深いことに、このうちの 1 株である HN1007 株は、飼育アヒルにおける致死的な ND 事例に関連した分離株であった。

本研究では、単一のアミノ酸置換によって NDV のアヒルにおける病原性が増強されることが明らかになり、水鳥に対して病原性を示す強毒型 NDV が感染時に偶発的に出現する可能性が示唆された。従って、水鳥における ND の発生を防ぐため、農場におけるバイオセキュリティの向上と、野鳥の ND に対するサーベイランスの重要性が改めて示された。

本研究によって得られたこれらの成績はニューカッスル病ウイルスの病原性を理解し、今後、本病の予防防遏策を考えていく上で、極めて重要な情報を提供するものと考えられた。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位を受けるにふさわしいものと判断された。