

豚エンテロウイルスの遺伝学的および抗原学的解析

加 来 義 浩

The genetic and antigenic analyses of porcine enteroviruses

Yoshihiro KAKU

豚エンテロウイルス (PEV) は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属の+鎖RNAウイルスである。本ウイルスはこれまで中和試験により、国際的にPEV-1~11までの11血清型に区分されてきたが、日本国内では独自にPEV-J1~J10までの10血清型に分類され、これらのうち大半はPEV-1~11と重複することが示されてきた。またPEVは、感染豚腎細胞で観察される細胞変性効果 (CPE) の形態によってもtype 1~ に型別され、このCPE型別はウイルスの理化学的性状や細胞指向性の差異と関連していることが報告されてきた。

PEVは国内外の広範囲の農場で分離され、その感染の大半は無症状で終わる一方で、脳脊髄炎、繁殖障害、下痢、肺炎等、多様な臨床症状に関与するという報告も多い。殊にPEVの関与する脳脊髄炎は1940~50年代のヨーロッパを中心に広く流行し、「テッセン病」「タルファン病」と呼称された。これらの疾病はPEV-1の一部強毒株が病原と考えられたが、近年では様々な血清型株が脳脊髄炎を呈する豚の脳神経材料より分離されることから、現在では「エンテロウイルス性脳脊髄炎」と呼称され、国際獣疫事務局 (OIE) のList B疾病に指定されている。また病原としては、脳神経病変より分離されたウイルスをテッセン/タルファンウイルス (Teschén Talfan virus; TTV) と総称する考え方も提案されているが、TTVと既存の血清型分類との関係は明らかにされておらず、分子生物学的な解析が求められてきた。

その一方で、中和試験には参照株として全ての血清型の代表株を用意しなければならないうえに、中和試験で交差反応を示し、血清型を同定できない株が近年多く分離されること、TTVとその他のPEVを識別するマーカーが知られていないことなどから、現在では血清型別に

代わる遺伝情報に基づく型別の確立が待たれている。さらに迅速な診断法として、これら遺伝情報に基づいた分子生物学的手法の確立も強く期待されている。

1. PEV-1 Talfan株の塩基配列の決定および遺伝学的解析

PEV-1 Talfan株ゲノムの5' 非翻訳領域 (5' NTR) を除く大部分の領域について塩基配列を決定し、遺伝学的解析を行った。塩基配列および推定アミノ酸配列を他のピコルナウイルスと比較したところ、Talfan株のゲノムは以下の3点において特徴的な構造を有していた。(1) ポリプロテインコード領域の5' 末端にリーダー蛋白がコードされていること。(2) 口蹄疫ウイルスと相同性の高い2Aプロテアーゼをコードしていること。(3) 5' NTRにpoly (C) 領域を含むことが推定されること。また、ピコルナウイルスの蛋白で最もよく保存されているRNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRp) について、推定アミノ酸配列を解析したところ、ピコルナウイルスに特徴的なモチーフは同様に保存されており、同モチーフを用いた系統解析において、Talfan株は既存のピコルナウイルスからは独立したクラスターに位置づけられることが明らかになった。これらに基づき、PEV-1 Talfan株はピコルナウイルス科の中で、新たなウイルス属として再分類する必要があることが示唆され、1999年国際ウイルス分類委員会において、ピコルナウイルス科テシオウイルス属、豚テシオウイルス (PTV) として再分類されることが承認された。

2. PTV-Talfan株の抗原学的解析

Talfan株における中和抗原決定基の解析を行うため、

Talfan株に対するモノクローナル抗体を作製し、中和能を有する抗体を11クローン得た。これらを、Talfan株キャプシド領域のアミノ酸配列に基づく合成ペプチドと反応させ、中和抗原決定基を同定した。ポリオウイルス1型のキャプシドをモデルとし、アミノ酸のアラインメントを行ったところ、全てのクローンはVP2 EF ループ(通称「パフ」)のペプチドに反応していることが明らかになった。またそのうちの1クローンはVP1 GH ループと、別の1クローンはVP1のC末端とも反応していた。立体構造モデルを作製し、抗原決定基の局在を解析したところ、上記3つの抗原決定基はいずれもウイルス粒子表面に露出し、「パフ」を中心に互いに近傍に位置していると推定された。これらより、VP2「パフ」がTalfan株の最も有力な中和抗原決定基であると推測された。

3. PEVの遺伝学的再分類および迅速診断法開発への展望

他の血清型株を含めたPEVの遺伝学的多様性および、それらとPTVとの遺伝学的関係を解析した。PTVおよびPEV各血清型の標準株について、ゲノム上の3つの領域(ポリメラーゼコード領域、キャプシド VP2 N末端コード領域、3' NTR)について、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応法(RT-PCR)および3' cDNA末端迅速増幅法(3' RACE)産物から塩基配列を決定した。ポリメラーゼ、キャプシド VP2の推定アミノ酸配列を用いて系統解析を行ったところ、PEVは遺伝学的にPTV Talfan株グループ、PEV-9 UKG/410/73株グループ、PEV-8 V13株グループの少なくとも3群に分けられることが明らかになった。また、この3群は3' NTRの推定2次構造解析においても確認された。興味深いことに、この再分類はCPE typeならびにウイルスの理化学的性状や細胞指向性の違いと一致していた。これらのうち、特にTalfan株グループについては、既存のピコルナウイル

スとは遺伝学的に大きく異なることから、PTVとして再分類されることが確認された。また、PEV-9 UKG/410/73株グループとPEV-8 V13株グループについても、グループ間の遺伝学的差異が無視できないことから、これらをPEV-A、PEV-Bとして区別する必要性が示唆された。

さらに、PTVに分類されるべきウイルスについて、有力な中和抗原決定基と推測されるVP2「パフ」相当領域の推定アミノ酸配列を用いて系統解析を行ったところ、同領域における遺伝学的型別は血清型別と完全に一致することが明らかになり、血清型別に代わる新たな型別法の方向が示された。また、「パフ」領域を増幅するRT-PCR法と、その産物の推定アミノ酸配列に基づく系統解析を組み合わせることにより、迅速診断法として、分子生物学的な手法を用いた血清型別が応用できる可能性が示唆された。

以上のように本研究では、豚エンテロウイルス1型(PEV-1)標準株である Talfan株の遺伝学的解析を行い、既存のピコルナウイルスとは著しく相同性が低く、また独自の遺伝子構造を有することを明らかにした。この結果PEV-1は、新たに豚テシオウイルス(PTV)として再分類されることが承認された。また同株の中和抗原決定基を解析し、PEVの血清型別に代わる遺伝学的型別に関する基礎的知見を得るとともに、他の血清型株の遺伝学的解析から、PEVがPTV、PEV-A、PEV-Bの3つの遺伝学的グループに再分類されることを明らかにした。これらの成果により、分子生物学的な手法に基づくPEVおよびPTV感染症に迅速診断法の開発が期待される。

動物衛生研究所 海外病研究部 診断研究室
(現所属)

厚生労働省 国立感染症研究所 獣医科学部第二室)