

DVO-49

FCVの低温時吸着抑制は可逆的である

○吉岡真里亜、柏木優海、辰野真理子、高橋俊一、藤野 寛、田原口智士(麻布大 獣医・微生物2)

【背景と目的】 猫カリシウイルス (FCV) は低温下で吸着効率の減少が見られることを第156回日本獣医学会学術集会で報告した。今回はその低温におけるCRFK細胞へのFCV吸着の低下が生じるメカニズムを調査した。

【材料と方法】 本試験では、高病原性FCVであるFCV-B株を用いた。FCV-Bを猫腎由来株化細胞 (CRFK細胞) に接種し、吸着時の温度条件を変化させ、常法に従いブラック試験によってその影響を比較した。さらにFCV-Bを接種し温度条件を変えて吸着させたのち、CRFK細胞表面上に吸着しているウイルスを細胞ごと抽出しReal-time PCRを行うことで細胞に結合したウイルスコピー数を定量的に測定した。

【結果と考察】 FCV-Bのブラック数は、4℃で吸着させた場合、37℃で吸着させたブラック数と比較して20%程度にまで減少していた。CRFK細胞に4℃下でFCV-Bを接種し1時間吸着させた後、さらにもう1時間37℃にて吸着を行った場合は吸着効率の減少は見られなかったが、4℃で1時間吸着後、洗浄してから37℃でさらに1時間吸着させた場合には、その値は有意に低下した。このことから、4℃から37℃に移行した際に吸着せずに上清中に浮遊していたウイルスが、温度上昇に伴い吸着が可能になったと考えられ、吸着効率の減少はレセプター依存性の可逆的な変化によって起こる事象だと推測された。さらに37℃で結合したウイルスはその後4℃に温度を下げても遊離されることは無かった。これは一度37℃でウイルスと結合したレセプターは、その後低温下に置かれても、結合したウイルス粒子を放出するほどの立体構造の変化は起こさないか、あるいは単に、37℃で吸着したウイルスが1時間後にはすでに細胞内に侵入している可能性も考えられた。

DVO-51

二枚貝に蓄積するノロウイルス遺伝子型プロファイルに関する調査

○今村彩貴¹、春名美香¹、五島朋子¹、金指大海¹、岡田 宰²、秋元京子¹(¹農林水産省消費・安全局、²北海道システム・サイエンス株式会社)

【背景】 二枚貝に蓄積するノロウイルス遺伝子型プロファイルについては不明点が多い。この原因として、現在の主流であるRT-PCR法では、存在比率の少ない遺伝子型を探知することが困難である等の問題がある。本研究では、次世代シーケンシング (NGS) による2種類の遺伝子解析し、二枚貝に蓄積しているノロウイルスの遺伝子型について調査した。【方法】 二枚貝中腸腺由来cDNAをライブラリー化し、HiSeqで塩基配列情報を取得した。また、当該cDNAからVP1領域を増幅した産物をライブラリー化し、MiSeqで塩基配列情報を取得した。得られた塩基配列を参照配列にマッピングし、遺伝子型の同定並びに存在頻度を算出した。【結果】 cDNAのHiSeqによる直接的なNGS解析では、解析に十分な情報量は得られなかった。一方、VP1増幅産物のMiSeqによるNGS解析では、十分な情報量が得られた。GRについては、カキとムラサキイガイでGI-4、GI-14、GI-2の順に検出率 (当該遺伝子型検出数/当該遺伝子グループ陽性数) と存在比率 (当該遺伝子型にマッピングされたリード数/マッピングされた総リード数) が高かった。また、GI-1、GI-10はカキから検出されず、GI-10、GI-11、GI-13はムラサキイガイからは検出されなかった。GIグループについては、カキでGI-4、GI-13、GI-3の順に検出率と存在比率が高かった。ムラサキイガイでは、GI-4、GI-3、GI-13がすべての検体から検出され、存在比率も高かった。【考察】 近年、ノロウイルス感染症の流行様式とノロウイルスの遺伝子型には相関があるという海外の報告が多い。今後は、国内の流行株の遺伝子型についても情報を収集し、流行様式に応じた効果的なノロウイルス感染症対策を講ずること重要と考えられた。

DVO-50

ノロウイルス様中空粒子免疫鶏由来卵黄抗体の性状

日下部伸治¹、○勢戸祥介¹、梅田浩二²、Shofiqur RAHAMAN²(¹大阪府大 獣医微生物学教室、²株) イーダブルニュートリション・ジャパン 開発部)

【目的】 ノロウイルス (NoV) はカリシウイルス科ノロウイルス属に分類され、幅広い年齢層のヒトに経口感染し急性胃腸炎を引き起こす。ヒトに感染するNoVは遺伝子群 I (GI)、GIIおよびGIVに分類され、GIとGIIはさらに複数の遺伝子型に細分され、それぞれ抗原性が異なると考えられている。NoVは培養方法が確立されていないが、パキエロウイルス発現系を用いて作出したノロウイルス様中空粒子 (NoV-VLP) が種々の研究に用いられている。今回NoV-VLPを採卵鶏に免疫して得られた卵黄抗体の受動免疫の可能性について検討した。

【方法】 パキエロウイルス発現系を用いて作出したNoV GII.4 VLPをフロント不完全アジュバントと共に26週齢の白色レグホン (雌) に免疫し、6週後に追加免疫を行った。免疫鶏の卵を回収し卵黄内の抗体価の推移を測定した。高い抗体価が確認された卵黄より卵黄抗体を抽出し、各種遺伝子型NoV-VLPに対する抗体価を測定した。

【結果】 NoV GII.4 VLPの免疫により卵黄内抗体価は上昇し、追加免疫3週後に抗体価はピークとなり、その後9週間高い抗体価が維持され、卵黄から抗NoV GII.4 VLP卵黄抗体を抽出することができた。卵黄抗体はGII群およびGIV群VLPに対して交差反応を示し、GI群VLPに交差反応を示さなかった。卵黄抗体はNoVの受容体候補である主要組織血液型抗原とNoV GII.4VLPの結合を阻害した。

【総括】 鶏由来卵黄抗体を応用するメリットは、同様の方法で各遺伝子型VLPに対する卵黄抗体の作製と、流行に応じた抗体の組み合わせが簡易であること、高力価な卵黄抗体が持続的かつ実用レベルで大量に粗精製が出来ることである。ノロウイルス様中空粒子免疫鶏由来卵黄抗体は、NoV感染予防法の有効な素材として開発が期待される。

DVO-52

野生動物、狩猟者のE型肝炎ウイルス感染状況調査

○米満研三¹、Dung Nguyen¹、鍛田龍星¹、高野 愛¹、下田 宙¹、武藤正彦²、鈴木和男³、前田 健¹(¹山口大 共同獣医・獣医微生物、²山口大 医、³ふるさと自然公園センター)

【背景と目的】 E型肝炎は、E型肝炎ウイルス (HEV) の感染より引き起こされるウイルス性肝炎である。感染症法では4類感染症に指定されており、日本での報告数は増加傾向にある。先進国においては、動物の肉を生食することにより感染する食品媒介人獣共通感染症である。今回、我々が新規開発したELISAを用いて野生動物、狩猟者におけるHEV感染状況調査を実施した。

【材料と方法】 1) 山口県の狩猟者24人、イノシシ321頭、シカ313頭、イヌ135頭、和歌山県のイノシシ89頭、アライグマ87頭、他地域のイノシシ266頭、イヌ58頭、ネコ19頭、アライグマ173頭、ハクビシン63頭、フェレット47頭、タイのイヌ103頭とネコ47頭、ベトナムのイヌ10頭から血清を回収した。2) HEVのカプシドタンパク質を発現した293T細胞溶解液とHRP標識protein A/Gをそれぞれ抗原および二次抗体としたELISAを行った。

【結果】 1) 日本の狩猟者・イノシシ・シカ・イヌ・ネコ・フェレット、ベトナムのイヌ、タイのイヌ・ネコから抗HEV抗体陽性動物が検出された。2) 日本のイノシシの抗体陽性率には地域差があることが判明した (抗HEV抗体保有率0~29.3%)。山口県のイノシシは他地域のイノシシに比べ陽性率が高かった。3) 山口県のイノシシは4月から9月に捕獲された個体より、10月から3月に捕獲された個体の方が有意に高い陽性率を示した。4) 山口県の狩猟者の抗HEV抗体保有率は38%であった。

【考察】 我々の開発したELISAがヒトを含む多くの動物種からの抗HEV抗体検出に使用可能であることが確認された。山口県はE型肝炎ウイルスの流行地であることが再確認された。また、E型肝炎ウイルス感染には季節性があることが示唆された。