

日生研おより

2012年(平成24年)9月号 第58巻第5号(通巻576号)

挨拶・巻頭言

昨年の出来事：「限界に挑む」
……………笹川千尋（2）

獣医病理学研修会

- 第51回 No. 1027 ウシの空腸
……………動衛研つくば・広島県西部家保（3）
- 第51回 No. 1040 イヌの内股部腫瘤
……………東京農工大学（4）
- 第51回 No.1045 イヌの卵巣部腫瘤
……………摂南大学（5）

論文紹介

豚流行性下痢ウイルスの培養細胞における
馴化および弱毒化に伴うスパイク遺伝子
の変異……………佐藤哲朗（6）

学会参加記

22nd International Pig Veterinary
Society Congress (IPVS 2012 in
Korea)
場所：大韓民国・濟州島
期間：2012年6月10日～14日…………(11)



NIBS

一般財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

<http://nibs.lin.gr.jp/>



昨年の出来事：「限界に挑む」

笹川千尋

4月から日生研で勤務させていただいている。無我夢中で半年があっという間に過ぎたが、毎日新たな経験があり充実した時間を過ごしている。今回本稿を書く機会に今迄のことを色々と思い巡らしてみたい。やはり昨年の事を思い出す。震災にも遭遇して、また大学教員として最後の年でもあり、多忙を極める一年だった。3月11日の東日本大震災により東北を中心に日本は甚大な被害を被ったが、一方で人々のあいだに強い絆が芽生え、また家族、友人、社会に対して新たな価値観も生まれ、復興の支えになった。さて私のことで恐縮だが、震災に加えて幾つかの出来事があった。震災直前の2月は、文科省の大型研究費のヒアリングの準備に追われていたが、震災で4月中旬に延期された。大型研究費（五カ年）では限られた採択枠に新規申請者が入ることは、まさに「限界に挑む」ことであり、厳しい審査結果を覚悟していた。5月中旬に採択通知を受け取った時は、定年後の計画も進行中であり、晴天の霹靂であった。6月から研究はスタートしたが、医科研では定年後も研究を継続させた前例はなく、清野所長と教授会はその取り扱いに苦慮した。10月まで議論を重ね、私の研究事業の受け皿とし、11月に入って「社会連携講座：細菌感染生物学」の設置案が提案された。東大の規則では社会連携の設立条件として、研究パートナーとして民間研究財団や企業との連携を求めている。4月の設立までには残された時間も僅かであり、研究を断念することも覚悟した。しかし清野所長の熱意に押され、また上田理事長、田中ヤクルト中央研究所元所長からも社会連携の主旨にご理解をいただき、日生研とヤクルトへ連携講座をお願いすることにした。年の瀬も押し迫った12月のことで、まさに「限界に挑む」心境であった。このように多くの方々に助けられ、4月1日から、何とか社会連携講座をスタートすることができた。また同時に、日生研と医科研そしてヤクルトとの間に太いパイプが築かれた。ここに今あらためて、お世話になった上田進理事長および田中隆一郎ヤクルト中央研究所元所長には心より謝意を表したい。

ところで昨年は、ヒアリング直前のある忘れられない出来事がある。2年ほど前から家族に誘われ近くのスポーツジムに通い始めた。最初にスタジオレッスンに参加したが、若い頃の瞬発力はすっかり失われていた。そこで週一度ジムでベンチプレス 시작했다。開始後10ヶ月してやっと37.5 kgが挙がり喜んだ。しかし早速40 kgの壁が現れた。因みに現在は60 kgの直前までできている。一般にベンチプレスでは、40 kgを連続10回挙げられる筋力があれば50 kgを一回挙げるができる。即ち、我々は最大負荷筋力の約20%減の力しか通常では発揮していないことになる。実はこの20%増が「限界の壁」と感じる。これはスポーツにかぎらず仕事にも言えることかもしれない。さて私が40 kgのバーベルで苦しんでいるのを前に、ある女性のインストラクター（80 kg以上を挙げられる怪力の持ち主）が言い放った。「限界を意識して失敗を恐れたら、笹川さん絶対に挙りませんから！」。久しぶりに体育系の厳しい一言に打ちのめされた。あの研究費のヒアリング直前の出来事である。翌週は心をいれかえそのインストラクターのかけ声で40 kgのバーベルに挑戦した。不思議なことに挙げる時に何故か、「もしここで40 kgが挙げれば、来週のヒアリングも突破できる」と自問した。次の瞬間、これまで不可能であった40 kgのバーベルがついに挙がった。インストラクターも周囲の仲間も思わず拍手してくれた。とても嬉しかった。ジムの帰り路にヒアリングに僅かな希望を感じた。

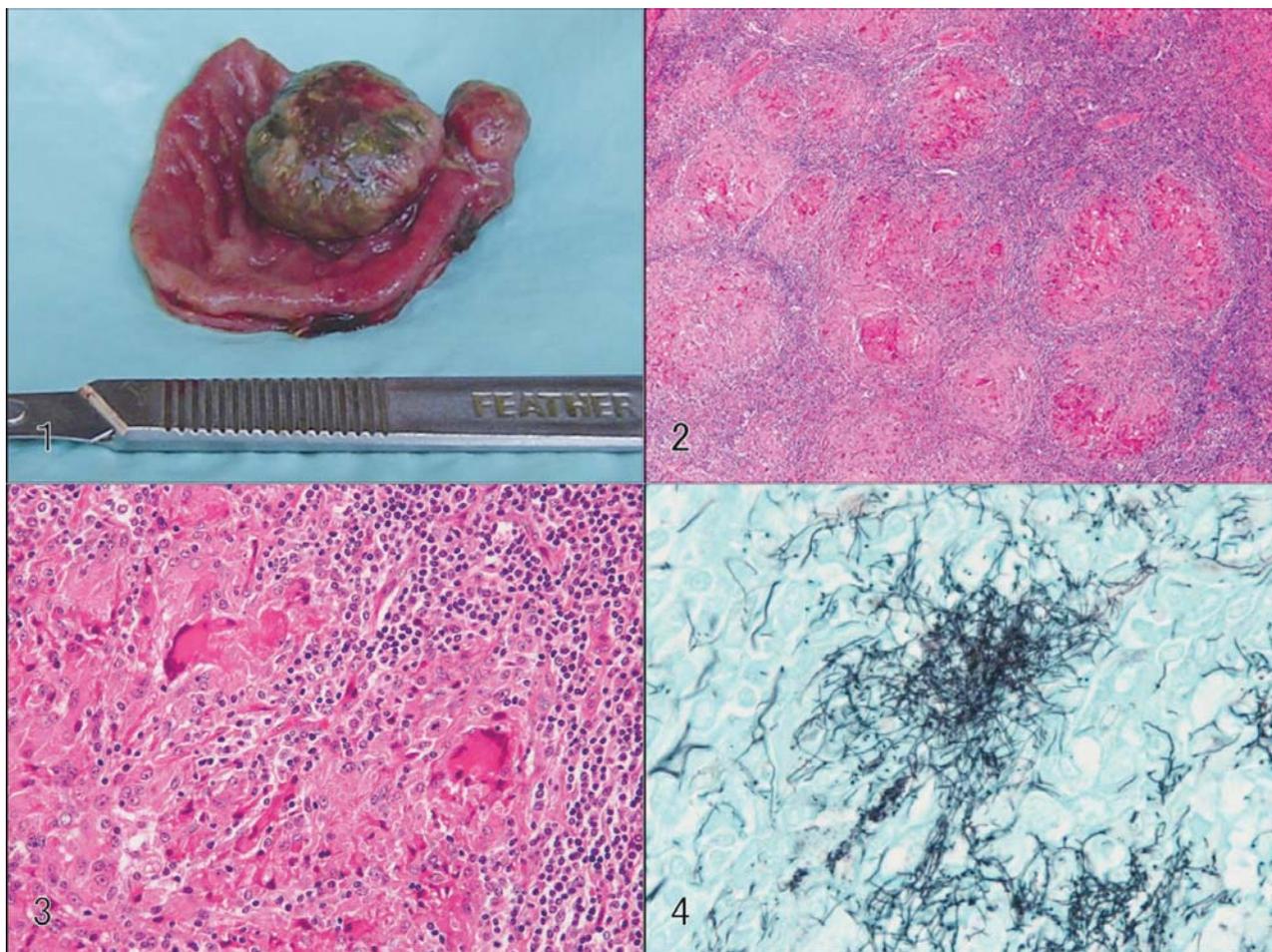
さて私の大学在職中の研究でも「限界に挑む」ことを何度か経験した。研究成果を最終的に論文にしているいろいろな国際誌へ投稿するが、特に「三大誌」と言われる国際誌に掲載されるまでの道のりは長く、まさに「限界に挑む」ことであった。私の研究の軌跡を、論文が掲載されるジャーナルのインパクトファクター（IF）で、論文業績リストを俯瞰すると、興味深いことに、IF4-6、10-15、20-30の三つの段階（壁）を経て研究が進展してきたことがわかる。最初はIF4-6あたりの微生物学専門誌にコンスタントに発表する時期があり、それを過ぎてやっとIF10-15程度の一般生物・医学雑誌へ発表できる段階が到来した。次に毎回苦労の連続だったが、IF10-15程度の雑誌に論文がコンスタントに出せるようになり、やっとIF20-30の三大誌に挑戦できるようになった。このことは上述のベンチプレスの経験則と一脈通ずるところがあるように思える。もちろん「beginner's luck」の番狂わせもあったが、若い時は周到に準備した論文でもその時々壁に行き詰まり苦悩した。今思うと、一つ一つ壁を克服できたのは、研究室の若いメンバーと一丸となり、「限界重量のバーベルに挑む」時のような心境で、勇気とパワーを瞬間的に爆発させたからではないだろうか。

「限界に挑む」と題して、私の拙い経験を披露させていただいた。誰にでも「限界に挑む」必要に迫られた経験は一度や二度はあるに違いない。そしてまたこれからも幾度となくあるだろう。限界への挑み方は壁（課題）に応じて様々であって良いと思う。しかし最初から挑戦を諦めたら、いかなるブレイクスルーも生まれえない。昨年はこのことをあらためて実感させられた。私自身、仕事であれ、日常生活であれ、「限界に挑む」ことをこれからも経験できればこのうえない幸せである。

(理事)

ウシの空腸

動衛研つくば・広島県西部家保 第51回獣医病理学研修会 No. 1027



動物：ウシ，ホルスタイン，雌，8歳。

臨床事項：妊娠3ヶ月時に，突然，食欲不振，皮膚温度の低下，第一胃運動の停止，沈鬱，重度の脱水，腹部膨満が認められた。

肉眼所見：右臍部切開開腹手術時に，長さ約50cmの空腸重積が認められた。重積起始部粘膜には，腫瘤（直径25および10mm）（図1）が認められた。腫瘤と腸重積部分は外科的に摘出された。この病変は境界明瞭で，その断面には，さらに小さい腫瘤（直径8mm）とともに，多発性の白黄色病巣が確認された。

組織所見：空腸の粘膜固有層に多発性の肉芽腫（図2）がみられ，類上皮細胞，多核巨細胞（図3），マクロファージ，リンパ球，好中球の著しい浸潤と細胞崩壊産物が認められた。この病変には，多数の好銀性フィラメント状細菌（図4：グロコットメセナミン銀染色）が認められ，グラム陽性，PAS陽性，非抗酸性，長さ2～28 μm ，直径0.2～0.35 μm でまれに分岐し，分節を有していた。このフィラメント状細菌（accession number AB539875）と既知の細菌との塩基配列の相同性は非常に低かった（640bp比較，高いものでも89.2%）。

診断：ホルスタイン種雌牛における好銀性グラム陽性分節性フィラメント状細菌が関連した多病巣性肉芽腫性空腸炎

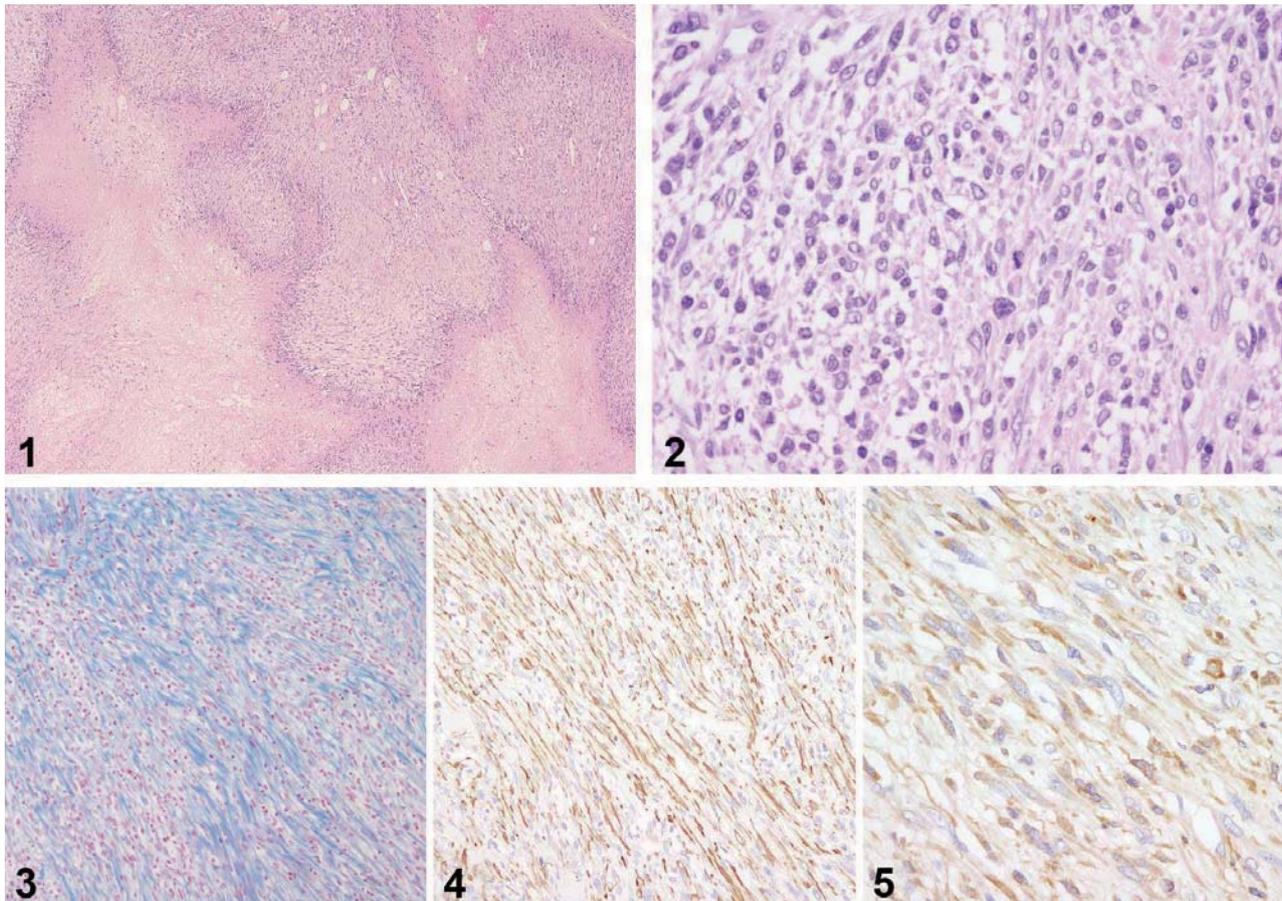
考察：この好銀性グラム陽性分節性フィラメント状細菌がこの牛の多病巣性肉芽腫性空腸炎を引き起こしたと考えられた。さらにこの肉芽腫性腫瘤より二次的に腸重積が誘発されたと推察された。（芝原友幸）

参考文献：

1. Ibaraki, Y., Shibahara, T., Kobayashi, H., Ito, N., Shinozuka, Y., Kasuya, K., Murakoshi, N., Chikuba, T. and Kubo, M. 2011. Multifocal granulomatous jejunitis associated with an argyrophilic gram-positive segmented filamentous bacterium in a Holstein cow. *J. Comp. Pathol.* **145**: 118-121.
2. Ogawa, K., Shibahara, T., Kobayashi, H., Kanazaki, M., Morishita, M., Kamikawa, M. and Kubo, M. 2010. Jejunal granuloma associated with an argyrophilic gram-negative non-segmented filamentous bacterium in a Holstein cow. *J. Comp. Pathol.* **143**: 52-56.

イヌの内股部腫瘍

東京農工大学 第 51 回獣医病理学研修会 No. 1040



動物：イヌ，ブラッドハウンド，雌，11歳。

臨床事項：2009年3月上旬に左内股部皮下腫瘍に気づく。その3日後に食欲低下，若干の元気消失の主訴で某動物病院に来院。来院5日後に腫瘍を摘出し，退院。その後良好に経過するも，術後2ヶ月目に急死。飼い主の希望により剖検は行わなかった。摘出した腫瘍がホルマリン固定後，当研究室に送付された。

肉眼所見：腫瘍は6×8×1cmと4×3×1cmの2つの腫瘍から構成され，腫瘍を被う皮膚の一部は浅く潰瘍化していた(4cm径)。6×8×1cmの腫瘍は剖面で灰白色の結合組織様弾性組織に淡褐色巣が不規則に混在しており，4×3×1cmの腫瘍は一様に灰白色の結合組織様弾性組織で構成されていた。

組織所見：皮下組織において，大小不同，紡錘形～多角形の細胞が束状あるいは不整な花筵状に増殖している(図1)。増殖細胞の核は淡明，核小体明瞭で異型性は高く，分裂像も多い(22個/10HPF；図2)。トリクロム染色で青染する膠原線維の産生も豊富である(図3)。周囲組織との境界は不明瞭で，広範囲に壊死巣がみられ(図1)，その周囲にはリンパ球，マクロファージが

浸潤している。免疫染色では腫瘍細胞はvimentin， α -smooth muscle actin(図4)およびcalponin(図5)に陽性を示した。

診断：高グレード筋線維芽細胞肉腫(High-grade myofibroblastic sarcoma)

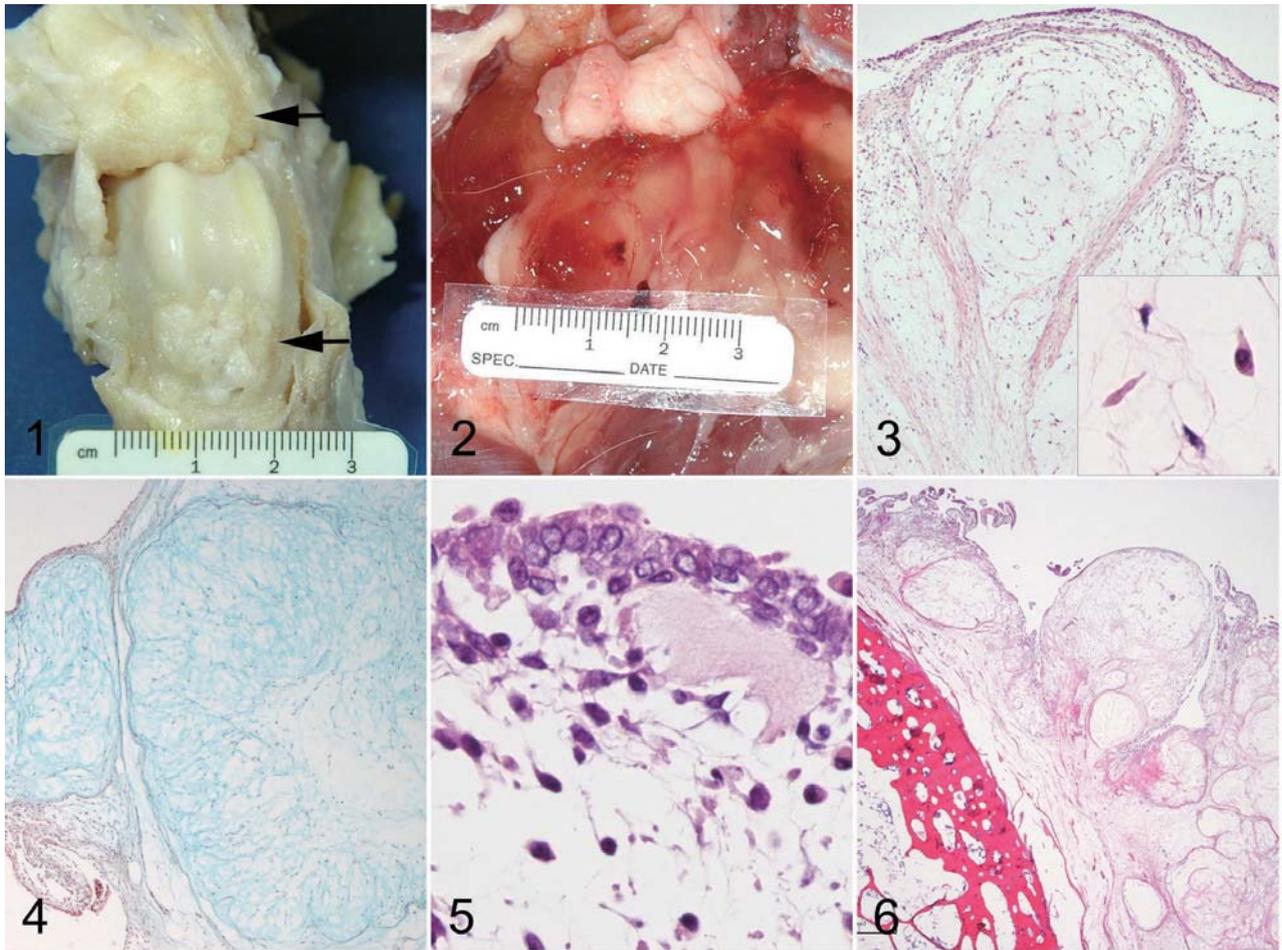
考察：ヒトでは筋線維芽細胞腫瘍は4つのサブタイプに区分され，その1つである高グレード筋線維芽細胞肉腫は豊富な膠原線維産生を伴う細長い紡錘形腫瘍細胞の花筵状増殖ならびに多数の分裂像と壊死巣形成を特徴とする。これらの組織学的特徴は本症例のものと合致する所見であり，免疫染色結果もヒトの筋線維芽細胞肉腫の場合とほぼ合致していた。これらのことから，現在の動物の腫瘍分類では筋線維芽細胞腫瘍はないが，ヒトでの診断区分に基づいて本症例の診断を高グレード筋線維芽細胞肉腫とした。(北条友理・鈴木和彦)

参考文献：

1. Mentzel, T. 2001. Myofibroblastic sarcomas: a brief review of sarcomas showing a myofibroblastic line of differentiation and discussion of the differential diagnosis. *Curr. Diag. Pathol.* 7: 17-24.

イヌの卵巣部腫瘍

摂南大学 第51回獣医病理学研修会 No.1045



動物：イヌ，雑種，雄，17歳。

臨床事項：腎不全の治療のため本学を来院。その際、右後肢の浮腫が認められた。初診から7ヶ月後、元気消失および起立不能となり、超音波検査にて左腎に腫瘤が認められた。状態悪化のため、安楽殺が施され、当教室にて剖検が行われた。

剖検所見：右膝関節の大腿脛関節および大腿膝蓋関節の関節面に、直径7 mmに至る多結節性灰白色軟性腫瘤が認められた(図1)。腫瘤は大腿脛関節から連続して、近位下腿部の筋間まで伸展していた。同様の腫瘤が大腿部筋間にも認められた。筋間腫瘤の一部は嚢胞状を呈し、その内部に透明なゼリー状物質が貯留していた(図2)。

参考所見：左腎に3×3×4 cmの白色硬性腫瘤がみられ、病理組織学的に腎細胞癌と診断されたが、他臓器への転移は認められなかった。

組織所見：筋間腫瘤は、少数の紡錘形ないし星状の間葉系細胞(図3；挿入図)と粘液基質(図4；アルシアン青染色)からなる多結節性病変であり、嚢胞内腔面ではA型滑膜細胞様細胞の内張りが認められた(図5)。同様の病変が、膝関節の関節包および大腿骨・脛骨の関節面で見られたが、骨浸潤は認められなかった(図6)。免疫染色では、結節内の間葉系細胞および嚢胞の内張り細胞はビメンチンに強陽性で、その一部はマクロファージマーカー(MSR-A)とPCNAに陽性を示した。サイ

トケラチンとS-100には陰性を示した。

診断：滑膜粘液腫 Synovial myxoma

考察：上記の病理学的所見は、既報のイヌの滑膜粘液腫と一致しており、膝関節原発の滑膜粘液腫と診断した。本症例では、大腿部および下腿部の筋間に広く浸潤がみられたものの、明らかな臨床症状(運動障害)を示さず、骨浸潤も認められないことから良性腫瘍と考えた。滑膜粘液腫の由来細胞については未だ不明であるが、本症例では膝関節から離れた下腿部筋間においても、間葉系細胞(B型滑膜細胞様)に加えて、嚢胞を内張りする細胞(A型滑膜細胞様)の増殖が認められ、滑膜粘液腫の病理組織学的特徴の一つと考えられた。

(井澤 武史)

参考文献：

1. Craig, L. E., Krimer, P. M. and Cooley, A. J. 2010. Canine synovial myxoma: 39 cases. *Vet. Pathol.* 47: 931-6.
2. Craig, L.E., Julian, M.E. and Ferracone, J.D. 2002. The diagnosis and prognosis of synovial tumors in dogs: 35 cases. *Vet. Pathol.* 39: 66-73.
3. Pool, R. R. and Thompson, K. G. 2002. Tumors of joints. pp. 199-243. *In*: Tumors in Domestic Animals, 4th ed. (Meuten, D. J. ed.), Iowa State Press, Ames, Iowa.

論文紹介

豚流行性下痢ウイルスの培養細胞における馴化および弱毒化に伴うスパイク遺伝子の変異

佐藤 哲朗

背景

豚流行性下痢ウイルス (PEDV) は、下痢および脱水症状を主徴とし、幼齢豚において致死率の高いコロナウイルス属のウイルスである [1, 2]。PEDV は一本のプラス鎖 RNA ゲノム全長 28 kb に、それぞれ 4 つの構造蛋白質 (スパイク [S], エンベロップ, メンブレン [M] およびヌクレオカプシド [N]) および非構造蛋白質 (1a, 1b, 3a および 3b) をコードした遺伝子を有している。このうちの S 蛋白質は、ウイルスの宿主レセプターへの結合や細胞膜との融合の役割を果たすだけでなく、ウイルスの中和反応や病原性とも深く関わっている [7-10]。M 蛋白質は、最も豊富なウイルス蛋白質で、ウイルス粒子の会合に関与している [14-19]。N 蛋白質は、ウイルスゲノムを内包する役割を果たしている [20, 21]。

現在、野外で利用されている豚流行性下痢のワクチンは、培養細胞を用いて連続継代された弱毒生ワクチンである [22, 23]。これまでもコロナウイルスでは、培養細胞における連続継代によって、本来の宿主に対する病原性が減弱することは報告されているが、ウイルスの培養細胞への馴化と弱毒化のメカニズムに関する分子生物学的知見は乏しい。以前、我々は PEDV 83P-5 株を子豚の小腸から Vero 細胞を用いて分離した [24]。分離した 83P-5 株は、始めは Vero 細胞のみで増殖したが、22 継代目以降のウイルスは、MA104 細胞、MPK 細胞および CPK 細胞においても増殖が確認された。このように Vero 細胞において連続継代した 83P-5 株は、次第に様々な培養細胞に馴化した。そこで今回、PEDV の培養細胞への馴化とウイルス弱毒化のメカニズムの一端を明らかにするため、83P-5 株を Vero 細胞にて 100 代まで連続継代し、構造蛋白質である S, M および N 遺伝子の変異を解析した。さらに、34, 61 および 100 継代目の 83P-5 株を豚に感染させ、その病原性を確認した。

材料および方法

子豚の小腸から分離した PEDV 83P-5 株の親株、34 継代株、61 継代株および 100 継代株の培養上清から、ウイルス RNA を抽出した。各継代株の cDNA を合成した後、PCR によって全長の S, M および N 遺伝子をそれぞれ増幅した。各 PCR 産物は、pCR[®]4-TOPO ベクター (インビトロジェン) にクローニングした後、塩基配列を解析した。

継代した 83P-5 株の病原性を確認するため、PEDV 抗体陰性の 3 ヶ月齢豚に、各継代株を経口投与し、各個体の臨床症状を観察した。また、糞便中のウイルス排泄を RT-PCR を用いて確認した。

成績および考察

83P-5 各継代株の S 遺伝子をシークエンスした結果、親株、34 継代株および 61 継代株の S 遺伝子は、4,152 塩基で 1,383 アミノ酸をコードしていた。一方、100 継代株は 455 から 457 番目の 3 塩基が欠損していた。この欠損によって、Tyr₁₅₂ が欠損した。各継代株の S 遺伝子を比較したところ、親株に比べ、34 継代株で 6、61 継代株で 10 および 100 継代株で 18 塩基の変異が認められた。これらの変異は、34 継代株で 5、61 継代株で 9 および 100 継代株で 13 のアミノ酸置換を伴っていた。非同義置換と同義置換の比を求めたところ、34 継代で 5.00、61 継代で 9.00 および 100 継代で 5.00 といずれも高く、83P-5 株の S 遺伝子が、Vero 細胞における連続継代を通じて、選択圧を受けていたことが示された。

検出した変異の S 蛋白質における局在を確認したところ、S 遺伝子の変異は、S 蛋白質のシグナル配列および S1・S2 外部ドメインに存在し、膜貫通領域および細胞質領域には存在していなかった (図 1)。このことは、Vero 細胞における継代によって、S 蛋白質の外部ドメインに優先的に選択圧が働いたことを示している。また、34 継代株と 61 継代株で発

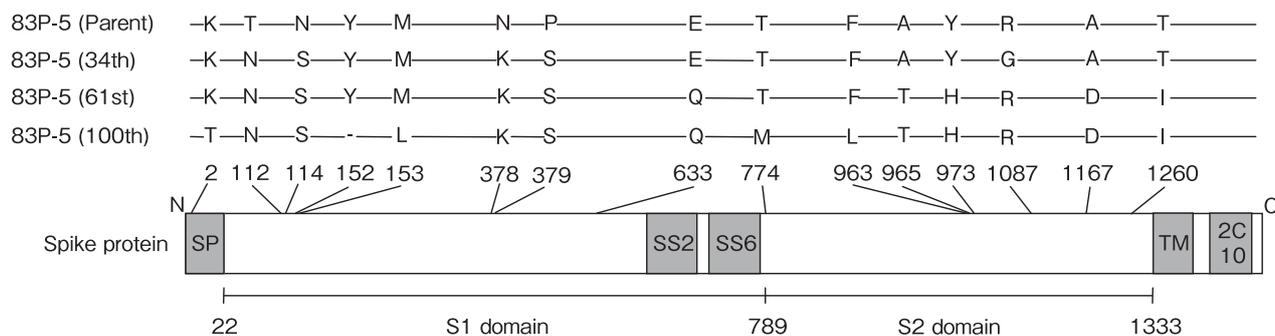


図1 各継代株のS蛋白質のアミノ酸置換の位置

シグナルペプチド (SP), 膜貫通領域 (TM), 中和エピトープ (SS2, SS6, 2C10) を灰色で示した。アミノ酸番号は 83P-5 親株を基準にした。ダッシュは欠損を示す。

生じたアミノ酸置換は, $\text{Arg}_{1087}\text{Gly}$ のアミノ酸置換を除き, 100 継代株へと引き継がれており, 100 代に及ぶ連続継代によって, S 遺伝子に変異が蓄積されていったことが明らかとなった。S1 ドメインの Asn_{112} と Ser_{114} , Tyr_{152} の欠損と Leu_{153} , Lys_{378} と Ser_{379} および S2 ドメインの Leu_{963} , Thr_{965} と His_{973} は, 互いに隣接して存在しており, 他の散在するアミノ酸置換に比べ, S 蛋白質の構造や機能に影響している可能性が推測された。一方, S 蛋白質には中和エピトープとして SS2, SS6 および 2C10 が報告されているが [7, 10], これらの中和エピトープ内には変異はみられなかった。

S 蛋白質は高度にグリコシル化された糖蛋白質で, 83P-5 親株では 30 箇所 of N-型糖鎖結合部位が予測されている。各継代株の N-型糖鎖結合部位を NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) を用いて予測したところ, 100 番目の Asn が 112 番目に変化した以外の箇所は, 高度に保存されていた。このような近接した N-型糖鎖結合部位の変化およびその他の結合部位の保存は, N-結合型のグリコシル化が, S 蛋白質の構造の保持とその機能にとって, 重要であることを示唆している [25, 26]。

以前, Park らは Vero 細胞における連続継代によって弱毒化した PEDV DR13 株の S 遺伝子の塩基配列を報告した [27]。この DR13 弱毒株と今回解析した 83P-5 各継代株の S 遺伝子と比較したところ, 83P-5 の 100 継代株と最も高い相同性を示した。83P-5 親株と 100 継代株の間では, 14 箇所のアミノ酸置換が存在するが, このうち 13 箇所が DR13 弱毒株にも存在した。両者の親株間では, 47 個のアミノ酸に相違が認められた。このように, DR13 弱毒株の S 蛋白質は, その親株に比べ, 83P-5 の 100 継代株に類似しているようであった。

83P-5 および DR13 両弱毒株の遺伝的類縁関係を解明するため, PEDV 野外株の S 遺伝子配列を GenBank より引用し, 分子系統樹を作成した (図 2)。分子系統樹解析の結果, PEDV の S 遺伝子は 5 つのグループに分類された。83P-5 親株はグループ III に属したが, DR13 親株はグループ IV であった。また, 83P-5 株は親株から順に 34 代, 61 代, 100 代と継代回数の順番にグループ III 内に配置した。一方, DR13 弱毒株は, グループ III に属し, 83P-5 の 100 継代株と最も近縁であった。

83P-5 各継代株の M および N 遺伝子配列も S 遺伝子と同様に解析したところ, M 遺伝子では, 61 および 100 継代株において, A_{499}G の非同義置換による $\text{Asn}_{167}\text{Asp}$ のアミノ酸置換がみられた。N 遺伝子では, 100 継代株においてのみ, T_{102}C の同義置換が認められた。これら両遺伝子は S 遺伝子に比べ, 非常に少ない変異数であり, ウイルスの表現型に与える影響はわずかなものと推測された。

83P-5 各継代株を 3 ヶ月齢豚に経口投与した。34 および 61 継代株を経口投与したすべての豚で, 投与 5 日後までに水様性の下痢または軟便を観察した (表 1)。一方, 100 継代株を投与した豚は, いずれも下痢症状を示さなかったことから, 83P-5 株は 61 継代から 100 継代の間で弱毒化したことが明らかとなった。また, 直腸スワブから RT-PCR によって, ウイルスの排泄を確認したところ, 100 継代を投与した 1 頭のみでウイルス排泄を確認できなかったことを除き, すべての豚で一過性のウイルス排泄を確認した。

まとめ

PEDV 83P-5 株を Vero 細胞において連続継代したところ, ウイルスの細胞への馴化および豚に対す

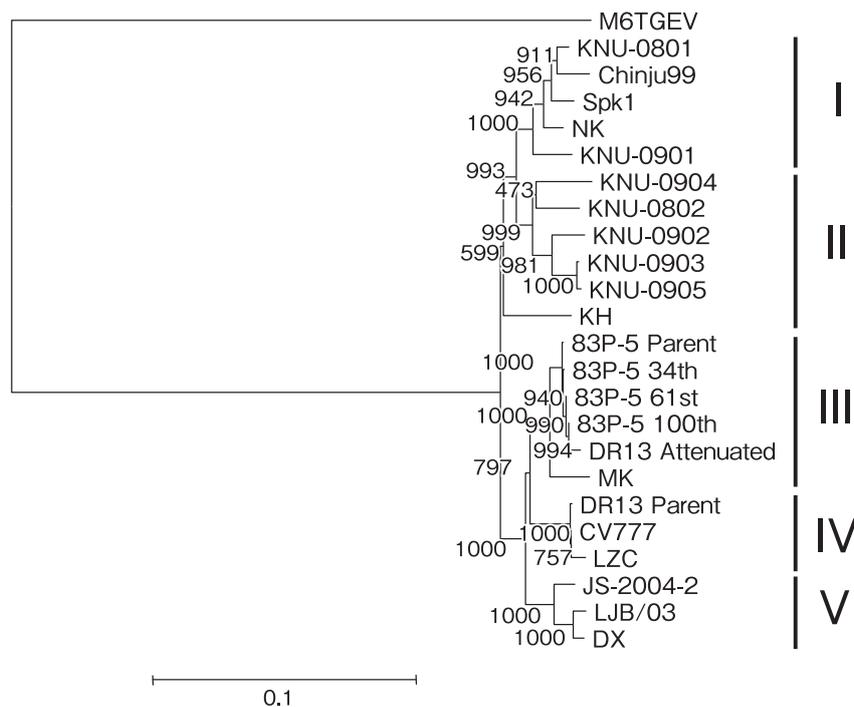


図2 S遺伝子の分子系統樹

分子系統樹の作成には、ClustalX v1.83 プログラムによる近隣接合法を用い、1,000回のブートストラップ検定を行った。アウトグループには TGEV Miller M6 株 (GenBank アクセス番号 DQ811785) を使用した。

る弱毒化を確認した。83P-5 株の中間継代で発生した S 遺伝子の変異が、100 継代株に存在したことは、Vero 細胞内において、一方向性の選択圧が S 遺伝子に働き、変異が蓄積されたことを示している。S 蛋白質は PEDV の細胞への侵入および病原性に関与しているとの報告から、連続継代によって S 遺伝子に発生した変異の蓄積は、PEDV の表現型に影響を与えたことが推測された。

83P-5 の 100 継代株と DR13 弱毒株の S 遺伝子は、非常に類似していたことは、コロナウイルスの弱毒化と遺伝子変異に関するこれまでの報告とは、異なるものである。

鶏伝染性気管支炎ウイルス (IBV) [28-31] や豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) [32] 弱毒株のゲノム配列が解析されているが、弱毒株共通のアミノ酸置換の報告は僅かである。83P-5 の 100 継代株と DR13 弱毒株が非常に近縁であることは、Vero 細胞という同じ環境からの強い選択圧を受けていることが原因の可能性も示唆される。しかし、マウス肝炎ウイルス [33, 37]、SARS コロナウイルス [34]、IBV [35]、猫伝染性腹膜炎ウイルス [36] および TGEV [38] では、非構造蛋白質やアクセサリ蛋白質が、コロナウイルスの弱毒化に関与しているとの報告もあるため、コロナウイルスを弱毒化へと導く過程は、S 遺伝子の変異以外にも複数存在すると考

えられる。

本研究において、コロナウイルスの弱毒化にとって、S 蛋白質がその中心的役割を果たしている可能性が示唆された。しかし、S 遺伝子上のどの変異が、ウイルスの弱毒化に関与しているかは不明である。今後、コロナウイルスの弱毒化のメカニズムを理解するためには、今回検出したどの遺伝子変異が、ウイルスの表現型を決定する要素となっているかを明らかにする必要がある (本稿は *Virus Genes* (2011) 139(3-4), 347-350. に掲載された論文を訳し、一部を省略・改変したものです)。

引用文献

1. Ammayappan, A., Upadhyay, C., Gelb, J. Jr., Vakharia, V.N. 2009. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of avian infectious bronchitis virus strain Arkansas DPI. *Arch. Virol.* **154**: 495-499.
2. Armesto, M., Cavanagh, D., Britton, P. 2009. The replicase gene of avian coronavirus infectious bronchitis virus is a determinant of pathogenicity. *PLoS One* **4**: e7384.
3. Cruz, D.J., Kim, C.J., Shin, H.J. 2008. The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal

表1 83P-5 各継代株を経口投与した豚の下痢症状およびウイルスの排泄

群	豚番号		経口投与後日数														
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
グループ1 (34 継代株)	11	下痢症状 ^a	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ウイルス排泄 ^b	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31	下痢症状 ^a	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ウイルス排泄 ^b	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	34	下痢症状 ^a	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ウイルス排泄 ^b	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グループ2 (61 継代株)	9	下痢症状 ^a	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
		ウイルス排泄 ^b	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	10	下痢症状 ^a	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ウイルス排泄 ^b	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	30	下痢症状 ^a	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ウイルス排泄 ^b	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
グループ3 (100 継代株)	22	下痢症状 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ウイルス排泄 ^b	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	23	下痢症状 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ウイルス排泄 ^b	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	下痢症状 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ウイルス排泄 ^b	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	下痢症状 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ウイルス排泄 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

10^{8.2} TCID の各継代株を経口投与した。

^a 糞便の状態を正常便(-), 軟便(+), 下痢便(++)で示した。

^b 直腸スワブから S 遺伝子を RT-PCR で増幅した結果, 陽性を+, 陰性を-で示した。

of the spike protein induces antibodies that neutralize porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res.* **132** : 192-196.

- Debouck, P., Pensaert, M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Am. J. Vet. Res.* **41** : 219-223.
- de Haan, C.A., Vennema, H., Rottier, P.J. 2000. Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *J. Virol.* **74** : 4967-4978.
- de Haan, C.A., Masters, P.S., Shen, X., Weiss, S., Rottier, P.J. 2002. The group - specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology* **296** : 177-189.
- de Haan, C.A., Smeets, M., Vernooij, F., Vennema, H., Rottier, P.J. 1999. Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein. *J. Virol.* **73** : 7441-7452.
- Ducatelle, R., Coussement, W., Charlier, G., Debouck, P., Hoorens, J. 1981. Three-dimensional sequential study of the intestinal surface in experimental porcine CV 777 coronavirus enteritis. *Zentralbl. Veterinarmed B.* **28** : 483-493.
- Haijema, B.J., Volders, H., Rottier, P.J. 2004. Live,

attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J. Virol.* **78** : 3863-3871.

- Han, D.P., Lohani, M., Cho, M.W. 2007. Specific asparagine - linked glycosylation sites are critical for DC-SIGN-and L-SIGN-mediated severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *J. Virol.* **81** : 12029-12039.
- Huang, Y.P., Wang, C.H. 2007. Sequence changes of infectious bronchitis virus isolates in the 3' 7.3 kb of the genome after attenuating passage in embryonated eggs. *Avian Pathol.* **36** : 59-67.
- Klumperman, J., Locker, J.K., Meijer, A., Horzinek, M.C., Geuze, H.J., Rottier, P.J. 1994. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J. Virol.* **68** : 6523-6534.
- Kusanagi, K., Kuwahara, H., Katoh, T., Nunoya, T., Ishikawa, Y., Samejima, T., Tajima, M. 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J. Vet. Med. Sci.* **54** : 313-318.
- Kweon, C.H., Kwon, B.J., Lee, J.G., Kwon, G.O.,

- Kang, Y.B. 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine* **17** : 2546–2553.
15. Li, B.X., Ge, J.W., Li, Y.J. 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology* **365** : 166–172.
 16. Liu, S., Han, Z., Chen, J., Liu, X., Shao, Y., Kong, X., Tong, G., Rong, J. 2007. S1 gene sequence heterogeneity of a pathogenic infectious bronchitis virus strain and its embryo-passaged, attenuated derivatives. *Avian Pathol.* **36**:231–234.
 17. Liu, S., Zhang, X., Gong, L., Yan, B., Li, C., Han, Z., Shao, Y., Li, H., Kong, X. 2009. Altered pathogenicity, immunogenicity, tissue tropism and 3'-7kb region sequence of an avian infectious bronchitis coronavirus strain after serial passage in embryos. *Vaccine* **27** : 4630–4640.
 18. Nam, E., Lee, C. 2010. Contribution of the porcine aminopeptidase N (CD13) receptor density to porcine epidemic diarrhea virus infection. *Vet. Microbiol.* **144** : 41–50.
 19. Nguyen, V.P., Hogue, B.G. 1997. Protein interactions during coronavirus assembly. *J Virol.* **71** : 9278–9284.
 20. Opstelten, D.J., Raamsman, M.J., Wolfs, K., Horzinek, M.C., Rottier, P.J. 1995. Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J. Cell. Biol.* **131** : 339–349.
 21. Park, S.J., Song, D.S., Ha, G.W., Park, B.K. 2007. Cloning and further sequence analysis of the spike gene of attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13. *Virus Genes* **35** : 55–64.
 22. Ritchie, G., Harvey, D.J., Feldmann, F., Stroehrer, U., Feldmann, H., Royle, L., Dwek, R.A., Rudd, P.M. 2010. Identification of N-linked carbohydrates from severe acute respiratory syndrome (SARS) spike glycoprotein. *Virology* **399** : 257–269.
 23. Song, D.S., Yang, J.S., Oh, J.S., Han, J.H., Park, B.K. 2003. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3. *Vaccine* **21** : 1833–1842.
 24. Spaan, W., Delius, H., Skinner, M., Armstrong, J., Rottier, P., Smeekens, S., van der Zeijst, B.A., Sidel, S.G. 1983. Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. *EMBO J.* **2** : 1839–1844.
 25. Sturman, L.S., Holmes, K.V., Behnke, J. 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* **33** : 449–462.
 26. Sun, D., Feng, L., Shi, H., Chen, J., Cui, X., Chen, H., Liu, S., Tong, Y., Wang, Y., Tong, G. 2008. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Vet. Microbiol.* **131** : 73–81.
 27. Vennema, H., Godeke, G.J., Rossen, J.W., Voorhout, W.F., Horzinek, M.C., Opstelten, D.J., Rottier, P.J. 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J.* **15** : 2020–2028.
 28. Wathelet, M.G., Orr, M., Frieman, M.B., Baric, R.S. 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J Virol.* **81** : 11620–11633.
 29. Zhang, X., Hasoksuz, M., Spiro, D., Halpin, R., Wang, S., Stollar, S., Janies, D., Hadya, N., Tang, Y., Ghedin, E., Saif, L. 2007. Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Virology* **358** : 424–435.
 30. Züst, R., Cervantes-Barragán, L., Kuri, T., Blakqori, G., Weber, F., Ludewig, B., Thiel, V. 2007. Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. *PLoS Pathog.* **3** : e109.

学会参加記

22nd International Pig Veterinary Society Congress (IPVS 2012 in Korea)

場所：大韓民国・済州島

期間：2012年6月10日～14日

佐藤哲朗, 李 知恩

6月10日から14日まで、第22回国際養豚獣医学学会 (International Pig Veterinary Society Congress; IPVS) が、韓国の済州島で開催され、参加の機会を得ましたので、その概要を報告いたします。学会開場は済州国際空港から車で約1時間の国際コンベンションセンター (ICC JEJU, 西帰浦市, 写真1) です。コンベンションセンターの裏手には漢拏山、前には東シナ海が見渡せる自然豊かなロケーションの中、世界60ヶ国、3,093名の養豚獣医師、大学等の研究者および豚用医薬品メーカー関係者が集まり、活発な議論が交わされました。本学会はその性格上、豚用の医薬品メーカーからの参加者が多く、各メーカーの臨床データを発表する場として、豚用医薬品の見本市といった側面も兼ねています。次いで、現場の臨床獣医師および大学などの公的研究機関の研究者が、実際の野外データを討論する場として参加しており、各国の養豚事情を知る上でおおいに役立つものです。弊所からは李知恩研究員が、*Actinobacillus pleuropneumoniae* 15型菌のELISAを確立し、ポスター発表を行いました (写真2)。

学会のセクションは、ウイルス性感染症 (359題)、細菌性感染症 (239題)、生産・栄養 (128題)、臨床 (81題)、新興感染症 (73題)、繁殖 (57題)、動物愛護・環境 (44題) および公衆衛生 (38題) の8分野 (演題数合計1,019題) にわかれていまし

た。実際には、臨床や繁殖などの分野でも感染症に起因した問題が多く、印象としては感染症に関する演題が8割を占めていました。当然のことですが、養豚現場での最大の関心事は、感染症のコントロールにあるといえます。

口頭およびポスター発表の演題数を病原体別にまとめました (図1)。豚サーコウイルス (PCV) が156題、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) が153題と圧倒的に多く、全体の46%を占めています。前回大会 (IPVS 2010 in Vancouver, 2010年7月) では、PCVが約200題、PRRSVが約120題であったことを考えると、今大会では、PCVの演題数が減少し、PRRSVが増加したことがわかりました。日本でも2008年からPCVのワクチンが使用され、効果を発揮していますが、国際的な養豚現場の関心は、サーコウイルス関連疾病から少し離



写真1 済州コンベンションセンターの外観

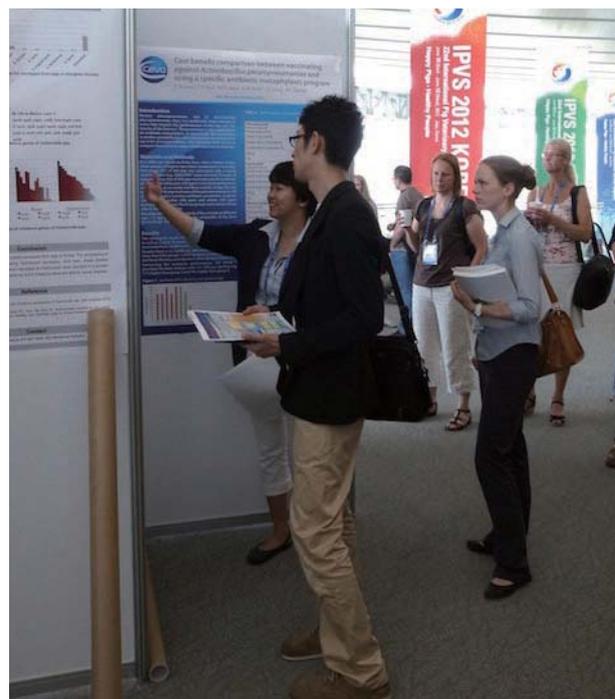


写真2 ポスターセッションにて自身の研究を発表する李研究員 (左から1人目)

れてきたのかもしれませんが。しかし、依然として PRRSV による被害は、各国の養豚現場を悩ませているようです。PRRS のワクチンは、従来からの生または不活化ワクチンが主流であり、残念ながら今大会においても、有効な新規ワクチンの発表はありませんでした。今後も当面の間、PRRS 対策の基本は、農場のバイオセキュリティレベルの強化になると思われます。

以下、簡単ですが興味深いトピックを紹介します。米国アイオワ州立大の Opriessnig らは、米国の PCV2 ワクチン使用農場における PCV2 ジェノタイプ (PCV2a または 2b) の分布状況を報告しました。ワクチン接種農場では、PCV2b タイプのウイルスが循環しているとのことでした。現在、市販 PCV2 ワクチンのジェノタイプは、すべて PCV2a です。PCV2 のワクチンは、有効性の高いものですが、PCV2b タイプのウイルスには、完全な感染防御を示していないことが報告されました。また、PCV2a タイプのウイルスが、ワクチン接種農場から一切分離されていなかったことが印象的でした。

新生豚に散発する先天性振戦病 (Congenital tremor; CT) には、遺伝的な原因のものと感染症が原因で引き起こされるものがあります。これまでに CT のタイプ AII は、ウイルスが原因と考えられながら、その原因ウイルスは特定されていませんでした。スペインの Segales らは、CT タイプ AII と診断された豚から、牛ウイルス性下痢ウイルス 1 (BVDV-1) を検出したことを報告していました。BVDV-1 が CT タイプ AII の原因ウイルスであるのかどうか、今後の研究の進展が待たれます。

豚の唾液を用いた抗体検査および PCR 検査について、口頭およびポスター発表を合わせて十数題の発表がありました。唾液をサンプルとした検査方法は、以前から米国アイオワ州立大の Zimmerman らが盛んに提唱している方法ですが、今大会では、オランダ、デンマークおよびポーランドからの発表も

病原体	演題数
PCV2	156
PRRSV	153
M. hyopneumoniae	60
CSFV	50
SIV	43
Lowsonia	31
PEDV	25
APP	25
E. coli	24
Salmonella spp.	22
H. parasuis	13
FMDV	12
C. difficile	10
Brachyspira spp.	9
S. suis	9
その他	23

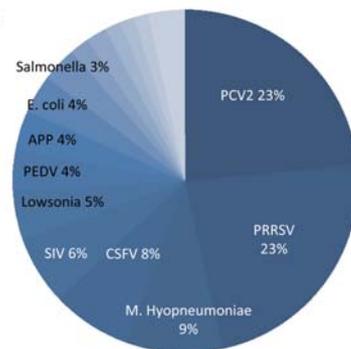
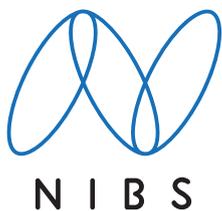


図1 病原体別に分類した演題数とその割合 (筆者により集計)

ありました。唾液を用いた診断は、医学分野では90年代から利用されています。豚の唾液の採取方法は、豚房にコットンロープを垂らして行います。豚はロープを噛むので、唾液がロープに染みこみます。これをジップロック等のビニール袋の中で絞ったものを検査材料とします。PRRSV, PCV2, 豚インフルエンザウイルスおよび豚丹毒菌のPCR・抗体検査の報告がありました。唾液サンプルの利用は、採血の手間を省くことができ、豚群としての管理を考えた場合に有用です。実際に利用する場合は、個々の検査法ごとに最適化の必要があると思われますが、今後、各研究・検査機関で普及するかもしれません。

このようにIPVSは2年に一度、養豚に関わる世界中の臨床家と研究者が集合し、各国の最新情報を得る絶好の機会です。IPVSは一般的な学会とはその様相を異にし、臨床現場寄りの内容が多いため、臨床獣医師にとっても得るものが多い学会です。今回のIPVSは、2014年6月にメキシコのカンクンで開催されます。2年間で世界の養豚現場において、どのようなイノベーションが起こるのか、非常に注目されます。私も自身の研究成果を携え、参加したいと思います。



—— テーマは「生命の連鎖」——
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)
 (通巻576号) 平成24年8月25日印刷 平成24年9月1日発行(第58巻第5号)
 発行所 一般財団法人 日本生物科学研究所
 〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1
 TEL: 0428(33)1056(企画学術部) FAX: 0428(33)1036
 発行人 林志鋒
 編集室 委員/堤 信幸(委員長), 大嶋 篤, 山下 龍
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)