

Title	Genomic Characterization of Human Astrovirus Type 6 Katano Virus and the Establishment of a Rapid and Effective Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Detect All Serotypes of Human Astrovirus
Author(s)	左近, 直美
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44592">https://hdl.handle.net/11094/44592</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;大阪大学の博士論文について&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	左 近 直 美
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 8 1 4 5 号
学位授与年月日	平成 15 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Genomic Characterization of Human Astrovirus Type 6 Katano Virus and the Establishment of a Rapid and Effective Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Detect All Serotypes of Human Astrovirus (ヒトアストロウイルス 6 型交野株の遺伝子解析ならびに全血清型を検出する迅速で効率的な RT-PCR 法の確立)
論文審査委員	(主査) 教授 山西 弘一  (副査) 教授 生田 和良 教授 松浦 善治

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目 的]

1991 年大阪府交野市において 4000 人にのぼる胃腸炎集団発生の原因としてヒトアストロウイルス (HAstV) 6 型交野株を分離同定した。1～8 血清型のうち 6 型の分離例は世界的にも少なく、HAstV によるこのような大規模集団発生はこれまでに報告がない。そこでこのときの代表株である K23 と K24 株についてキャプシド領域の遺伝子解析を試みた。

また、HAstV の検出法が確立されていなかったため、原因ウイルスの特定に時間を要し被害の拡大につながったため、HAstV の疫学的調査に貢献し、迅速な対応を可能にする効率的な検査法を確立することを目的とした。

#### [方法ならびに成績]

HAstV の非構造蛋白 ORF1b からキャプシド領域をコードする (ORF2) 全長を RT-PCR にて増幅し塩基配列を決定した。その結果 K23、K24 株ともに 6 型標準株 Oxf6 と同じ 2337 塩基からなり、1 型に比べ 24 塩基の欠損が認められた。Oxf6 とはアミノ酸レベルで 95% の一致が認められ同一血清内では分離地域、年代に関係なく遺伝子が高率に保存されていたが、5% の相違は C 末端に片寄っていた。またトリプシン存在下 6 代継代株では親株と C 末端領域に 3ヶ所の点変異 (G2250C、C2270T、T2308C ; 2 アミノ酸置換) が認められた。1-8 型と K23 株の末端 385 残基の相同性は 84% と高く、385 残基以降は 22～45% の相同性しか示さなかった。この特徴は各血清型間においても同様で、すなわち血清型に相関した配列が C 末端に存在していた。

そこで、血清型特異的な配列を有する C 末端領域を増幅する方法は遺伝子情報が多いが、検出できない株の出現も考えられたため、N 末端の 1-385 残基のうち血清型間に共通している配列を選択し、検出用 RT-PCR のプライマー AC1/AC230 ならびにプローブ (Acom-probe) を設計した。条件としてすでに一般検査として行われている Norovirus (Norwalkk-Like virus) 検出 RT-PCR を利用したマルチプレックス PCR 法とし、HAstV 検査の導入が容易に行えるようにした。その結果、AC1/AC230 を用いた RT-PCR において HAstV1-7 型が合成され、HAstV の全血清型を検出することが可能であり、Norovirus、HAstV 両ウイルス存在下においては HAstV の遺伝子を特異的に合成した。

また、その他の胃腸炎原因ウイルスとして考えられる Rotavirus、Hepatitis A virus とは反応しなかった。AC17/AC230 の感度は RNA 0.8 pg/ $\mu$ l 相当と算出され、高感度であった。

[総括]

1. 交野株の ORF2 領域は標準株 Oxf6 の ORF2 と 95% の一致率を示し、同一血清型内では分離地域、年代を超えて ORF2 領域が保存されていた。
2. ORF2 領域において 1 型標準株 Oxf1 に対して 24nt の欠損が ORF2 の C 末端領域に認められた。
3. 血清型間においては、その N 末端 385 残基、特に 30~250 残基の相同性が高かった。
4. C 末端は 1) 血清型間での相同性が低く、2) 同一血清型である K23 と Oxf6 においても 5% の変異が集中してみられ、3) 継代後の変異も認められた。すなわち、HAstV における変異が C 末端に集中してみられることがわかった。これらの特徴は Norovirus の報告と類似しており、Norovirus 同様に血清型に共通する N 末端領域は S domain といわれるウイルス粒子殻を構成する蛋白質に相当し、粒子表面は C 末端領域によって構成されることが予測された。
5. 設計された HAstV 検出用 AC17/AC230 プライマーは特異的に HAstV を増幅し、高感度であった。さらに胃腸炎診断に現在広く実施されている Norovirus 検出 RT-PCR とのマルチプレックスが可能であったことより、胃腸炎の診断において迅速で効率的な検査法が確立された。

#### 論文審査の結果の要旨

小児から成人まで幅広い年齢層に胃腸炎症状を引き起すヒトアストロウイルス (HAstV) には 1~8 型までの血清型が存在している。大阪で集団発生の原因となった HAstV6 型の交野株について抗原性を示すキャプシド領域の遺伝子解析を試み以下について明らかにした。

- 1) 交野株と同一血清型標準株の遺伝子配列は年代や地域を超えて高度に保存されていた 2) しかし、同一血清型間また細胞継代後にはその C 末端領域に変異が認められた 3) 血清型間であっても N 末 385 アミノ酸は 84% の相同性を示した 4) 1 型標準株に対し交野株は C 末端に 24 塩基の欠損が認められた。

以上から HAstV の C 末端に変異が生じやすく、その結果、抗原性は C 末端の配列に依存し、ウイルス粒子表面を構成していることを考察した。

これらの結果から、N 末端領域をターゲットにした HAstV の全血清型を検出する迅速かつ効率的な検査法を確立した。

以上の論文を審査のうえ、学位に値すると考える。