OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Full-Length Sequences of One Genotype 4 and Three Genotype 3 Hepatitis E Viruses in Fecal Samples from Domestic Swine in Japan
Author(s)	浦山, 健
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59051
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	浦山 健（うらやま たける）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 24830 号
学位授与年月日	平成23年5月26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	Full-Length Sequences of One Genotype 4 and Three Genotype 3 Hepatitis E Viruses in Fecal Samples from Domestic Swine in Japan （日本国内のブタ糞便サンプルから得たE型肝炎ウイルスGenotype4の1株、Genotype3の3株の全長塩基配列）
論文審査委員	（主査） 教授 生田 和良 （副査） 教授 松浦 善治　教授 塩田 達雄

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

E型肝炎ウイルス(HEV)は人獣共通感染症であり、日本国内では主にシカ、イノシシ及びブタの生肉食によって感染する事が知られている。我々は国内32箇所の養豚施設で320頭のブタ糞便を調査し、高頻度にHEVが蔓延している事を報告した（HEV RNA陽性率；49.7%）。また、陽性サンプルのGenotypingの結果、異なるclusterに属する4種類のHEV株、すなわちGenotype(G)3の3株（$G3_{JP}$、$G3_{SP}$、$G3_{US}$）及びG4の1株（$G4_{JP}$）を分離した。国内のHEV株の性状を明らかにするため、これら4種類のHEV株の全長塩基配列を決定してその違いを解析した。

〔 方法ならびに成績 〕

ブタ糞便中から分離した$G3_{JP}$、$G3_{SP}$、$G3_{US}$及び$G4_{JP}$のHEV株から代表的な1株ずつを選び、5’及び3’両端付近にprimerを設計した。RT-PCRによりcDNAを増幅、primer walkingによるDirect sequencingを行って全長塩基配列を決定した。これら4株の塩基配列及び、3つのORFのアミノ酸配列を相互に比較したところ、何れもORF2で高い相同性を示した。特に、$G3_{JP}$と$G3_{US}$間は$G3_{SP}$に比べて相同性が高い傾向であった。次に全長ゲノムの中で保存性の高い領域と低い領域を明らかにするため、配列比較の可視化プログラムであるDifferenceBlotを用いて解析を行い、コードされた機能性蛋白のDomain mapと照合した。同一cluster内ではORF1 V (prolin-rich hinge domain)で保存性が低い傾向が認められたが、Genotype 3同士、Genotype 4同士で比較すると、ORF1 Vでの低い保存性はさらに顕著であった。一方、ORF2/3重複部位はよく保存されていた。$G3_{JP}$、$G3_{SP}$、$G3_{US}$間の比較も同様の結果であったが、$G3_{JP}$と$G3_{US}$間は$G3_{SP}$に比べて全体的に保存性が高い傾向であった。さらに、これら3つのG3株（$G3_{JP}$、$G3_{SP}$、$G3_{US}$）と異なるgenotypeの$G4_{JP}$を比較したところ、ORF1 Vだけでなく ORF1 P (papain-like protease region)の保存性も極めて低く、ORF2/3重複部位は他の領域と比べて保存性が高い傾向を示した。しかし、この保存性の高い領域は、$G3_{JP}$、$G3_{SP}$、$G3_{US}$間の比較と比べて範囲が非常に狭かった。一般にHEV RNA検出に用いられるprimerとprobeは、ORF2/3重複部位をターゲットとしている例が多い。Jothikumarらの報告もその一つであるが、彼らは異なるgenotype間で保存性が高かったこの狭い領域をターゲットにprimerとprobeを設計している。彼らの検出系のprimer、probeの配列は、動物由来のHEV72株、ヒト由来の107株とそれぞれ88.9～97.2%、94.4～96.3%が一致していた。

〔　総　　括　〕

国内においては$G3_{JP}$、$G3_{SP}$、$G3_{US}$及び$G4_{JP}$の4種類のHEV株が主に報告されているが、我々の疫学調査でも実際にこれらの株が多く分離された。国内のHEV株の性状を明らかにするため、これら4種類のHEV株の全長塩基配列を決定して株間の違いを比較した。同一cluster間での保存性は高いが、異なるcluster間では保存性の低い領域がORF1 Vに偏在していた。但し、今回我々が解析した4株の中で、$G3_{SP}$に比べて$G3_{JP}$と$G3_{US}$は相同性が高かった。分子系統樹を見ると$G3_{JP}$と$G3_{US}$は$G3_{SP}$の後に分岐しており、$G3_{JP}$と$G3_{US}$の先祖株が日本と米国で独自に進化したものと推測される。また、$G3_{JP}$のclusterに属する株は日本株のみであるのに対し、$G3_{US}$のclusterに属する株は日本株と米国株が存在するため、日本の$G3_{US}$株は米国で進化した株が比較的最近、国内へ侵入したのではないかと考えられる。一方、日本の$G3_{SP}$株は、100年以上前に英国から輸入されたHEV感染ブタの株が国内で独自に進化したと考えられている。次に異なるgenotype間で比較したところ、ORF1 Vに加えて5' 側のORF1 Pまでを含む幅広い部位に低い相同性領域が認められた。しかし、ORF1 Pの2箇所の活性中心の内、1箇所は欠損していたため、ORF1 Pがプロテアーゼ活性を保持していない可能性が考えられる。一方、ORF2/3重複部位の狭い範囲に保存性の高い領域が存在していた。元々2つの蛋白コード領域が重複しているため変異が生じにくいと推測されるが、特に保存性の高い箇所はORF3のCytoskelton and MKP binding、hemopexin binding domainに集中しており、genotypeに関わらず重要な役割を持った領域ではないかと考えられる。この領域をターゲットとしたHEV RNA検出系により、国内のHEV株の網羅的な検出が可能であると思われる。

論文審査の結果の要旨

E型肝炎ウイルス(HEV)は人獣共通感染症であり、日本国内では主にブタ等の生食によって感染する事が知られている。国内養豚施設の網羅的調査によって、Genotype 3の3種及び、Genotype 4の1種のHEV株を分離した。本研究では、国内のHEVの性状を明らかにする事を目的として、これら4種のHEV株の全長塩基配列を決定してその解析を試みた。その結果、4種のHEV株のゲノム上に保存性の高い領域が存在し、これがHEVのライフサイクルに重要な機能を持った蛋白をコードしている可能性を見出した。また、この領域をターゲットとしたHEVゲノム検出系を設計することにより、国内のHEV株の網羅的な検出が可能である事を明らかにした。4種類のHEV株は現在、ゲノム検出系とともに国内標準パネルの候補として、厚生労働科学研究班で評価が行われている。本研究は畜産、食品及び医療分野における公衆安全衛生の向上に寄与するものであり、学位に値するものと認める。