

NIBS LETTER 2011 JULY  
No. 569

# 日生研おより

2011年(平成23年)7月号 第57巻第4号(通巻569号)

## 挨拶・巻頭言

「政治主導」とは？

.....永村武美(2)

## 獣医病理学研修会

第50回 NO. 1014 イヌの小脳

.....日本大学獣医病理学研究室(3)

## レビュー

未利用園芸食資源の抗インフルエンザ  
ウイルス作用および抗アレルギー作用

.....保井久子(4)

伝染性気管支炎ウイルス由来の病原性に  
関わるタンパク質

.....稲吉勇仁(8)

## お知らせ

研修者・見学者受け入れ状況.....(13)

お知らせ.....(14)

編集室からのお知らせ.....(14)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

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

## 「政治主導」とは？

永村 武美

熊本県議会農政委員会で、社会党のある議員が「チェルノブイリの事故が熊本県の畜産にいかなる影響を与えるのか？」という質問をしたのは、25年前の1986年4月のことである。国会の農政委員会では畜産局長が答弁するが、県の委員会では担当課長である。畜産課長に赴任したばかりの私にとっては初体験でもあり、県会議員の面々も新米課長をへこませんと手ぐすね引いているから、それなりの緊張感があった。「シカゴの先物市場におけるトウモロコシの価格は殆ど上昇していないから、当面悪影響はない。」と答えたら、第2弾の質問はなかった。それから約1年4ヶ月の間、細川知事の下で県の畜産行政を預かり、実に充実した日々を送らせてもらった。その後の役人人生にとって有意義この上ない体験であった。中でも、短期間ではあったが深く緊密な人間関係を育めたことが最大の収穫といえる。

それから14年後の2000年3月、92年ぶりに口蹄疫が宮崎で発生した。4月に畜産局審議官を拝命したので、技官として陣頭指揮を執ることになった。畜産といささかなりとも関係がある人ならば、口蹄疫の恐ろしさを認識しているので、政、官ともに一致協力して対処するものと思いきやさにあらず。早朝から永田町の自民党本部で開かれる対策会議では、連日喧々譁々の議論が続いた。蔓延防止と経営再建対策が議論の対象だが、時には脱線もある。宮崎県選出の某ヴェテラン議員は、地元の農家を意識するあまり、口蹄疫ではなく別のウイルス性の感染症ではないかなどと言い張る始末である。懇切丁寧に説明し、議員の顔を潰さぬように納得してもらうのは、役人の仕事である。当時は役人が主体となって行政が運営されていたかのごとき誤解が今日あるようだが、政権与党自民党が納得しない限り、いかなる対策も予算も執行出来なかったのだから、十分に「政治主導」というべきであろう。昨今の政治主導との大きな相違は、政治家と役人との激しいやり取りの場があるかないかではなからうか。また、当時の「農林族」と称される議員の多くは専門的な勉強も良くしており、手強い人が多かったように思う。現与党の中には、「松下政経塾卒」が売りの優秀な議員が多いが、首から上で仕事をしているようで頼り甲斐がなさそうである。

当時の農水大臣は、玉沢徳一郎氏である。対策本部を作って間もなく、大臣が現地入りをしたと言われるので、お供して熊本、宮崎の二県を訪れ、生産者との集会に出た。大臣は、不安に駆られた生産者の質問や陳情、苦情に対して誠意を持って回答されたので、両県とも大きな混乱はなく、現地視察は終わった。ウイルスの伝播力の弱さ、機敏な初動措置もさることながら、蔓延防止対策などの関連対策が功を奏したのか、5月10日には清浄化宣言が出され、二月足らずで終息したのである。宮崎県の発生農家は3戸、処分頭数は35頭であった。

それから10年後の昨年3月、再び宮崎県で口蹄疫が発生した。その被害たるや甚大で、牛豚合わせて29万頭が殺処分された。この惨事における唯一の救いは、隣県に伝播しなかったことである。仮にそのような事態になっていたら、間違いなく流血の惨事さえ起こりかねなかったと思う。宮崎県の対応が少なからず杜撰なものであったが故である。終結後に設置された「口蹄疫対策検証委員会」の報告書にも、多くの指摘がある。そのいくつかを拝借すると、中でも(1)国と県、市町村の役割分担が不明確で、しかも連携不足、(2)初動の遅れ、及び異常畜の発見見逃しや通報の遅れ、(3)対策本部の乱立と指揮命令系統の混乱、(4)県有種雄牛に対する特例措置の容認、が重要であると思う。これと併せて、私見を述べたい。10年前と今回との違いについてである。(1)国が主導権を取れなかったのではないか。特に技術の専門家が中心となって臨機応変に対策を打ち出せなかったのではないか、(2)国と県との間の信頼関係が希薄化したのではないか。国と県との人事交流のあり方に問題はないか、(3)アマチュアの政治家が責任ある立場についていた。政治主導のはき違えと、判断力、実行力、真摯などが欠如していなかったか、をあえて指摘しておきたい。特に、今後隣接する複数県に発生した場合、全県で適正かつ公平な対策を講ずるには、国の強靱な指導力が不可欠となることは必定である。法的な裏付けも必要であろう。

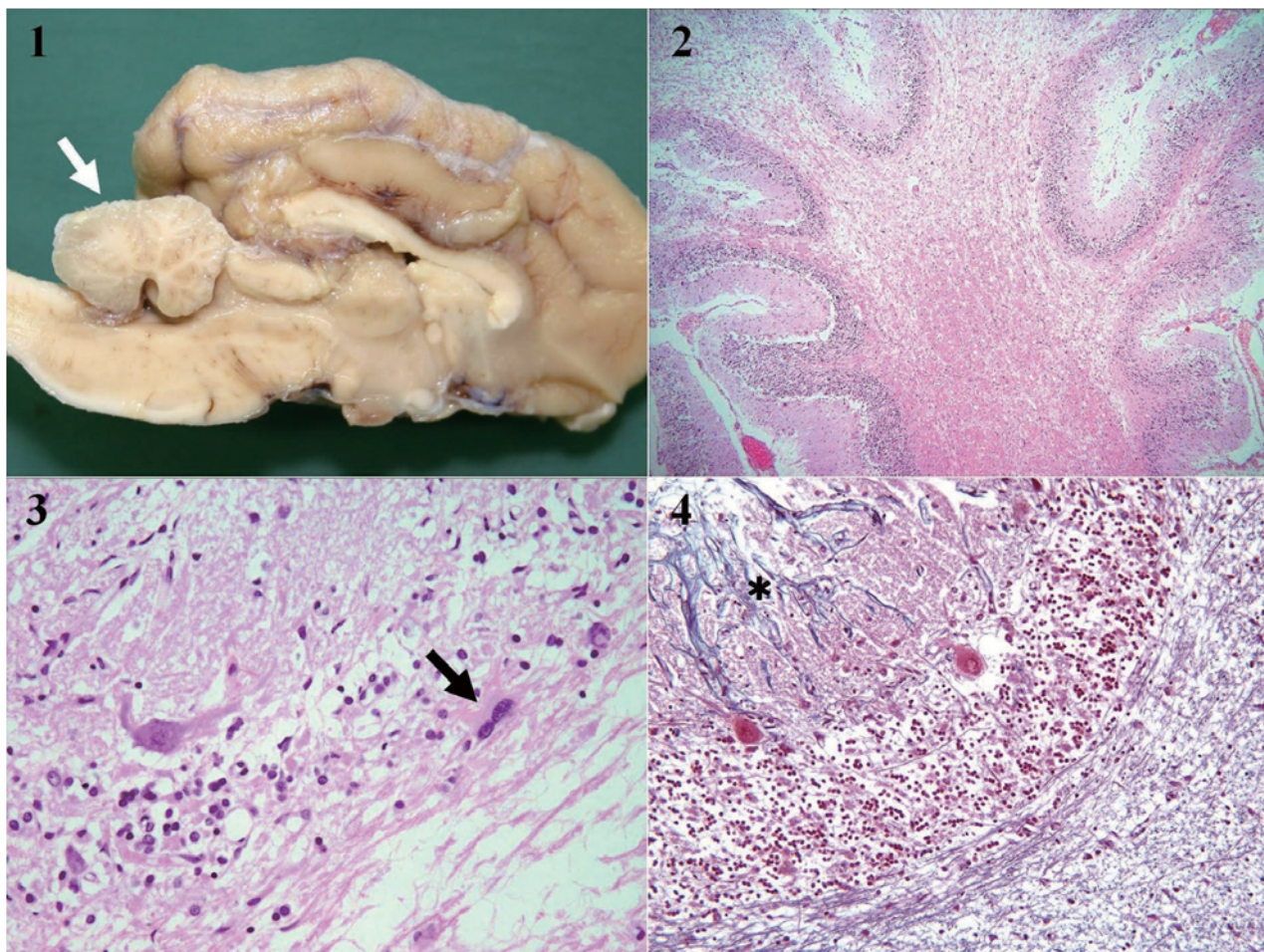
大震災の混乱は未だ収拾の兆しすら見えない。特に、原発事故への対応や被災地の復旧対策の展望が開けないようだ。宮崎の口蹄疫をめぐる混乱とあまりに酷似する点が多いのは、決して偶然ではないのである。

(理事)



## イヌの小脳

日本大学獣医病理学研究室 第50回獣医病理学研修会標本 NO.1014



動物：イヌ，柴犬，雄，9歳，体重18kg

臨床事項：2005年8月に歩様異常を主訴に本学動物病院に来院。神経学的検査では前肢の測定過大および運動失調，後肢の姿勢反応の低下，威嚇瞬き反射の消失が認められた。MRI検査で小脳皮質の脳溝の拡大がみられたため，臨床的に小脳変性症による小脳皮質萎縮と診断された。その後，臨床症状（ふらつき，測定過大など）の悪化が見られたため，年に1,2回のMRI検査を行うが，画像上の小脳萎縮の進行は緩慢であった。血液，脳脊髄液検査で著変はなかった。2009年2月に消化器症状を呈した後，突然死亡した。部分的採材の病理検査では盲腸にGISTが認められ，穿孔による腹膜炎が疑われた。

剖検所見：小脳は顕著に萎縮（図1，矢印）していたが，大脳に著変は認められなかった。

組織所見：小脳灰白質の分子層は萎縮し，顆粒細胞は顕著に減少（図2）またプルキンエ細胞の減少やかご細胞の脱落も伴っていた（図3，4（Bodian染色））。分子層には軟膜から連続して線維増生（図4\*）が認められた。抗GFAP抗体陽性の異型あるいは多核細胞（図3，矢印）が散在していた。白質では脱髄が認められ，辺縁部で顕

著であった。

診断：犬の遅発性小脳変性（Late-onset cerebellar degeneration），原因不明。

考察：成犬で発症し，進行が緩慢な神経障害で，顕著な小脳萎縮が認められた症例であった。組織学的に小脳の反応性変化や炎症反応が乏しく，顕著な白質の脱髄と分子層や顆粒層の萎縮，プルキンエ細胞の減少，かご細胞の脱落により特徴付けられた。大脳皮質（未提出）では散在性に膠性癍痕が存在し，また限局性に囲管性細胞浸潤が認められた。抗犬ジステンパー抗体で神経細胞およびグリア細胞の細胞質が非特異的に反応し，感染の有無は未確定であったが病変の組織学的特徴や病変部位の局在より否定した。Abiotrophyの可能性が示唆されたが確定には至らなかった。

（渋谷 久）

参考文献：

1. Speciale, J. et al. 2003. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **39**: 459-62.
2. Steinberg, H.S. et al. 2000. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **217**: 1162-5.

## 未利用園芸食資源の抗インフルエンザウイルス作用 および抗アレルギー作用

保井久子（信州大学大学院農学研究科機能性食料開発学専攻）

### 1. はじめに

野菜・果物の茎、葉、果皮や種子および搾汁後の搾り滓などの未利用園芸食資源を有効利用して、食品産業廃棄物を削減する動きが社会的に活発化している [10]。

一方、インフルエンザウイルス (Flu) は抗原変異が多くしばしば新型 Flu が出現するため、インフルエンザは毎年冬季に流行するばかりかパンデミックを引き起こす。予防にはワクチン接種法があるが、ワクチン株と流行株の不一致時の効果やワクチンによる副作用などの問題が残る。また、治療薬の開発も行われているが、耐性ウイルスの出現で問題がある。そこで、我々は、未利用園芸食資源から抗 Flu 作用を有する物質を見出し、これを有効利用することを検討した。43 種類の未利用園芸食資源サンプルの赤血球凝集 (HA) 阻止試験を試み、活性を示した巨峰の種子および果皮を多く含む巨峰搾り滓およびソバ殻熱水抽出物の抗 Flu 作用を解析した。

また、近年、アトピー性皮膚炎、喘息、花粉症および食物アレルギーなどの I 型アレルギー疾患は増加の一途をたどり、社会問題になっている。そこで、未利用園芸食資源の一つであるブドウ（甲州ブドウ）搾り滓を乳酸菌で発酵させた発酵ブドウ絞り滓を作製し、これの抗アレルギー作用を好塩基球細胞を用いた脱顆粒阻害試験により検討した。

### 2. 未利用園芸食資源の抗インフルエンザウイルス作用

21 種類の野菜・果物の茎、果皮、種子、殻などの廃棄物食資源を熱水またはエタノールで抽出した 43 種類サンプルの Flu による赤血球凝集 (HA) 阻害作用を測定した。ポジティブコントロールとして標準品のエピカテキンを用いた。各熱水抽出サンプル (HW) は各廃棄物食資源の凍結乾燥サンプルに 4 倍量の蒸留水 (DW) を入れ、100℃、1 時間抽出し、ろ過後、ろ液を凍結乾燥し作製した。また、各エタノール抽出サンプル (EtOH) は各廃棄物食資源の凍結乾燥サンプルに 4 倍量の 80% エタノールを入れ、1 週間静置抽出し、抽出物を凍結乾燥し作製した。これらのサンプルまたはエピカテキン 2 mg/ml

またはリン酸緩衝液 (コントロール) を Flu (A/Puerto Rico/8/34 (PR8);  $10^{7.2}$  TCID<sub>50</sub>/ml) と反応させ、HA 価を測定し、各サンプルの HA 阻害を測定した (Fig. 1)。その結果、ソバ殻、巨峰種子および果皮の熱水抽出物に有意に高い HA 阻害活性が認められた。

#### (a) 巨峰搾り滓の抗インフルエンザウイルス作用

ブドウは世界中で最も生産されている果物の一つであり、その量は年間 6 千万トン以上にもなる [10]。ブドウの加工工程では種子および果皮を含むブドウ搾り滓が大量に生じ、これらは食品産業廃棄物となっている。ブドウの搾り滓はポリフェノールを豊富に含んでいることから多くの機能が期待される。茶類や果実類のポリフェノールの抗 Flu 作用はすでに報告されている [3, 5, 7, 8, 11]。そこで、Flu の鶏赤血球への吸着を阻害した巨峰の種子および果皮 (Fig. 1) を多量に含む巨峰搾り滓の熱水抽出物 (GpHW) の抗 Flu 作用をイヌ腎臓尿細管上皮 (MDCK) 細胞を用いて詳細に検討した (Fig. 2)。

GpHW の Flu 感染全ステージに及ぼす影響を解析するために、Flu と GpHW の反応液を MDCK 細胞に吸着させ、3 日間培養後、培養上清中の Flu 量を HA 法により測定し解析した。さらに、GpHW の Flu 感染阻害ステージを明らかにするために、Flu を MDCK 細胞に吸着 0 (吸着時)、1 (侵入時)、9 (増殖時)、17 時間 (出芽時) 後に、GpHW を添加し、それぞれ 1.5 時間後に洗浄し、3 日間培養後の MDCK 細胞の細胞変性効果 (CPE) および上清中の Flu 量を測定した。Flu 感染全ステージおよび感染各ステージにおける GpHW の阻害活性は 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) で表示した。その結果、GpHW には強い感染阻止作用が認められ、とくに吸着及び侵入ステージを阻害することが明らかになった。次に、Sep-pakC18 を用いた合成吸着樹脂法により、GpHW を 3 画分に分画し、MDCK 細胞を用いて阻害成分を解析した (Fig. 3)。蒸留水抽出画分 (F1) は 87.3% の収量があったが、活性は認められなかった。酢酸エチル抽出画分 (F2) は 5.34% の収量であり、未画分 (F0) と同程度の活性が認められた。メタノール (MeOH) 抽出画分 (F3) は 5.38% の



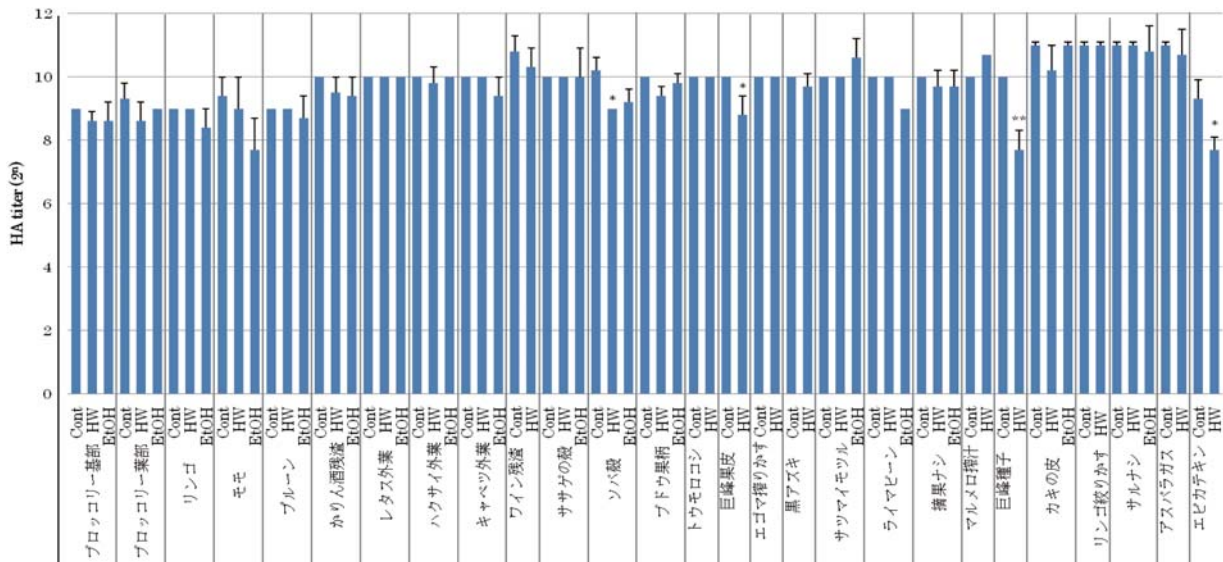


Fig. 1 各種未利用園芸食資源によるインフルエンザウイルスの赤血球凝集阻害作用 \*\* P < 0.01 \* P < 0.05

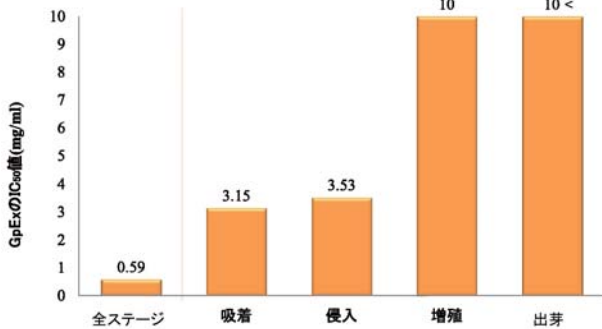


Fig.2 巨峰搾り滓熱水抽出物のFlu感染阻害ステージ衛生情報より

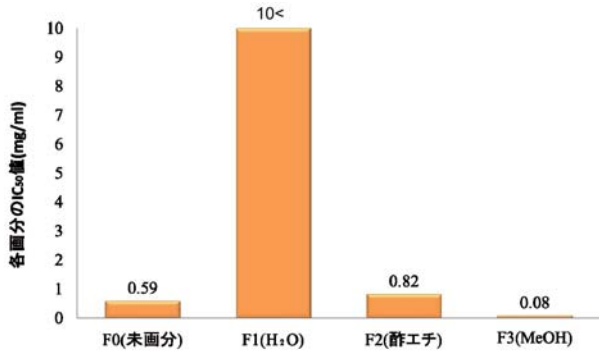


Fig.3 各画分のFlu感染阻害作用(全ステージ)

収量であり、非常に強い活性が認められた。さらに、各画分の抗Flu作用をマウスを用いた生体系で解析した (Fig. 4)。Fluを1 mg/mlの未画分または各画分サンプルと37℃、3分間反応させ、これらをマウスの両鼻腔に感染させ、累積発症率と生存率を測定した。その結果、F1処理群はリン酸緩衝液処理(コントロール)群と同様に累積発症率100%、生存率0%を示し、F3処理群は累積発症率0%、生存率100%を示した。F2処理群の累積発症率は中間値を示した。以上のように、細胞系および生体系で

の結果から主にF3画分に活性成分が存在することが分かった。次に、各画分の総ポリフェノール量をフォーリンチオカルト法(フェノール硫酸法)で、プロアントシアニジン量をブタノール硫酸法で測定した (Fig. 5)。その結果、F3は多量の総ポリフェノール含み、これは重合度の高いプロアントシアニジンであることが分かった。さらに高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により各画分の分析を行った (Fig. 6)。その結果、F3成分はアントシアニン類を含むプロアントシアニジンであり、F2成分は比較的分子量の小さい各種ポリフェノールであった。F1はポリフェノールをほとんど含まなかった。

以上の結果、巨峰絞り滓熱水抽出物には抗Flu作用があり、主にFluの細胞への吸着および侵入を阻害し、この活性成分はアントシアニン類を含む重合度の高い高分子プロアントシアニジンであることが分かった。

(b) ソバ殻熱水抽出物の抗インフルエンザウイルス作用

次に、ソバ殻熱水抽出物(BwHW)にもFluのHA阻害作用があった (Fig. 1) ことから、BwHWの抗Flu作用について、マウスを用いた生体系試験で解析した。FluをBwHW(2 mg/ml)またはリン酸緩衝液(コントロール)と37℃、3分間反応させ、マウスの両鼻腔に接種して、累積発症率と生存率を測定した。その結果、コントロール群は累積発症率100%、生存率0%であったが、BwHW処理群は、累積発症率0%、生存率100%になり、生体系でもBwHWの抗Flu活性は確認された。

さらに、BwHWの阻害ステージを解析するためにMDCK細胞を用いて、巨峰搾り滓と同様に

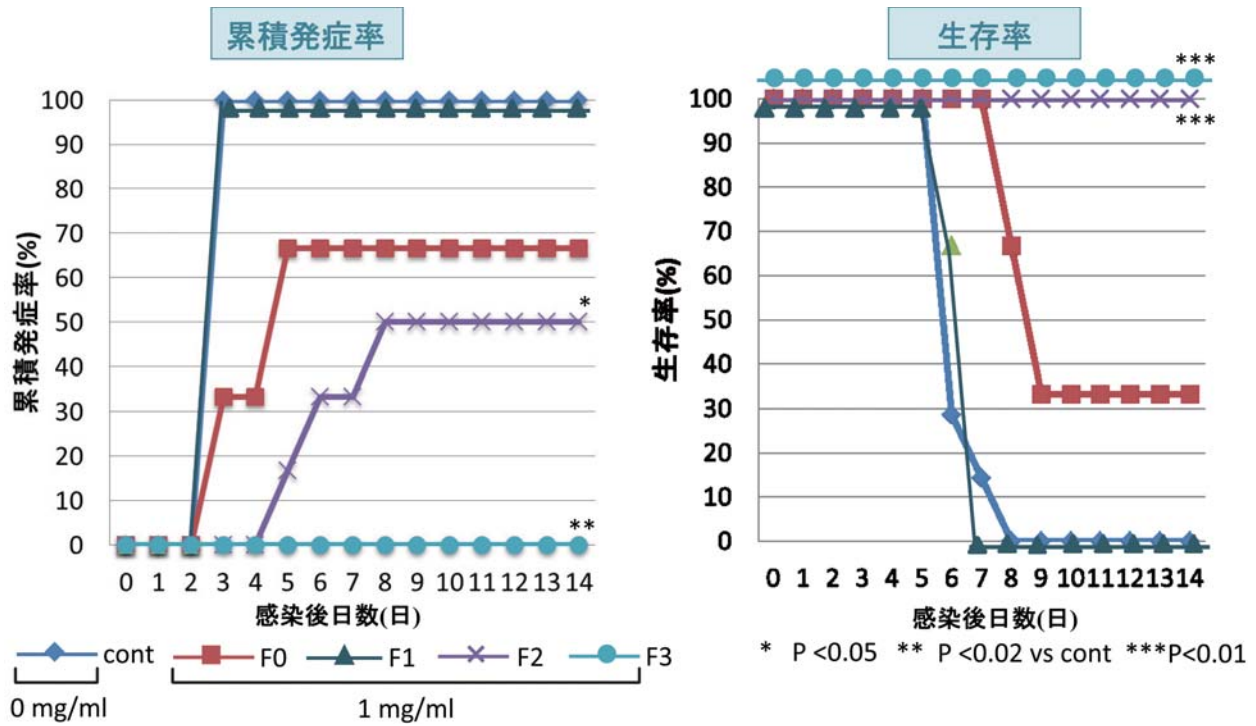


Fig. 4 インフルエンザ発症率および生存率に及ぼす各画分の影響

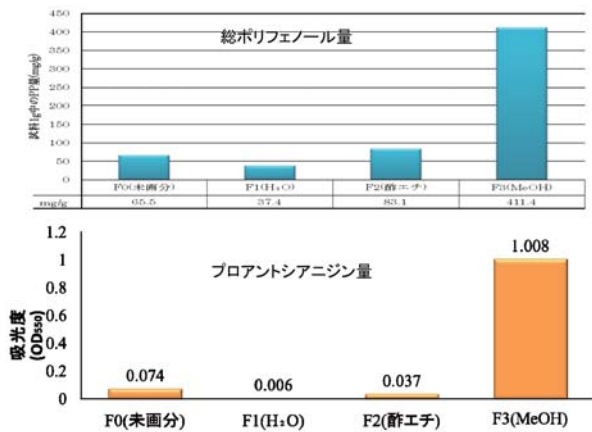


Fig. 5 各画分の総ポリフェノール量およびプロアントシアニジン量

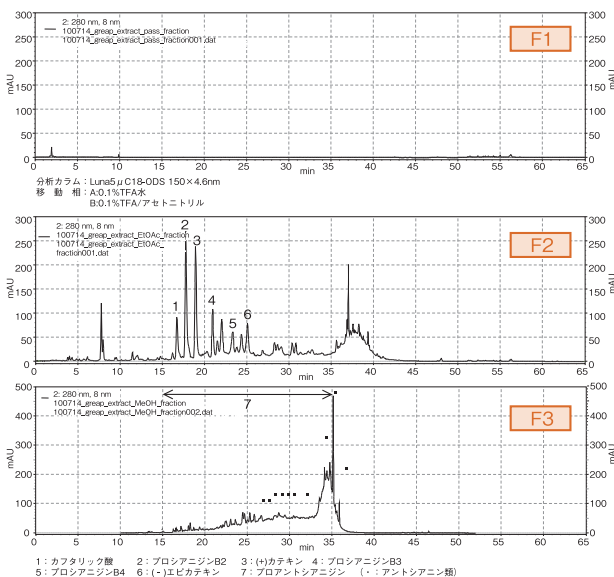


Fig. 6 HPLCによる各画分のポリフェノール成分分析

BwHWのIC<sub>50</sub>を求めた (Fig. 7)。その結果, Fluの吸着, 侵入および増殖ステージに阻害活性を示した。これらのことから, BwHWは, GpHWとは異なり増殖ステージにも効果を示す成分を含んでいることが明らかになった。

次に, 吸着時に活性を示す物質を解析することとし, 合成吸着樹脂 HP-20を用いて, BwHWを分画し, HA阻害活性を測定した。蒸留水抽出画分 (F1), 15%エタノール抽出画分 (F2), 30%エタノール抽出画分 (F3), 100%エタノール抽出画分 (F4)のHA阻害作用を測定した結果, アントシアニン高含有で高分子タンニン類と推定されるF2に高いFlu吸着阻害活性が認められた。さらに, この画分をH<sup>1</sup>-NMR分析により解析した結果, この高分子タンニンには芳香環と糖が付いていることが分かった。以上の結果から, ソバ殻熱水抽出物中のFlu吸着阻害成分はアントシアニン含有高分子タンニンで, 糖をもつことが推定された。現在, 侵入ステージおよび増殖ステージを阻害する成分を解析中である。

### 3. 発酵ブドウ搾り滓の抗アレルギー作用

ブドウはポリフェノールを豊富に含む果物として古くから知られており, 抗アレルギー作用や抗炎症作用についても多数報告されている [4]。ブドウポリフェノールはカテキン, エピカテキン, 没食子酸およびプロアントシアニジンなどが主成分であり, これらブドウポリフェノールの約5~7割は種子に, 2.5~5割は果皮に, 残りは果汁およびパルプ部に

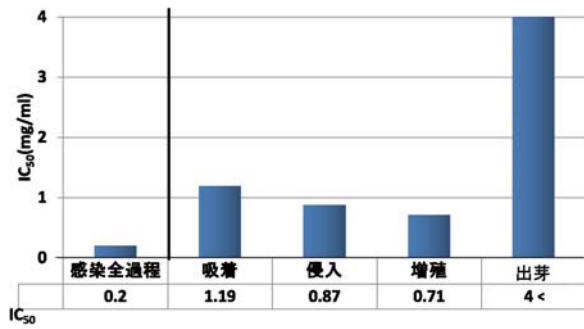


Fig. 7 ソバ殻熱水抽出物のFlu 感染阻害ステージ

約 0.5 割含まれている。ブドウは生産量の約 8 割がワインなどの加工品に用いられており、その加工工程では大量の搾り滓が食品産業廃棄物として生じている [9]。ブドウ搾り滓は種子および果皮が主成分であるため、豊富なポリフェノールが含まれており、抗アレルギー作用を持つ機能性食品素材として有効利用出来る可能性は高い。茶葉や各種果実のポリフェノールに脱顆粒抑制作用がある事がすでに報告されている [1, 2, 12]。

そこで、甲州ブドウ搾り滓またはこれを乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* NB 株) で発酵させた発酵ブドウ搾り滓の抗アレルギー作用をラット好塩基球細胞 (RBL-2H3) を用いて検討した [6]。脱顆粒の指標として、 $\beta$ -hexosaminidase 量を測定した。その結果、甲州ブドウ搾り滓には阻害活性が認められなかったが、発酵ブドウ搾り滓に脱顆粒阻害作用が確認された。次に、この作用成分を巨峰搾り滓の抗Flu 作用と同様に、Sep-PakC18 を用いて分画した。各画分 (1 mg/ml) 添加による  $\beta$ -hexosaminidase 量および 50% 阻害濃度を求めて阻害活性成分を解析した (Fig. 8A, B)。その結果、蒸留水抽出画分 (F1) は 68.2% の収量があり、阻害活性は認められなかった。酢酸エチル抽出画分 (F2) は 6.6% の収量であり、未画分 (F0) の約 3 倍の阻害活性が認められた。MeOH 抽出画分 (F3) は 5.9% の収量であり、F0 の約 8 倍の強い阻害活性が認められた。

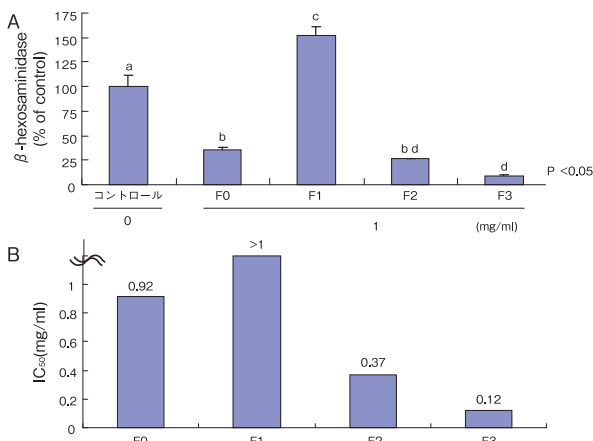


Fig. 8 各画分の脱顆粒抑制作用 (A) 及び IC<sub>50</sub> 値 (B)

この強い阻害活性はフォーリンチオカルト法 (フェノール硫酸法) およびブタノール塩酸法を用いた試験により、巨峰搾り滓の抗Flu 作用と同様に、プロアントシアニジンが関与していることが分かった。さらに HPLC による解析により、F2 は低分子の各種ポリフェノールが含まれており、強い阻害活性をもつ F3 成分は主に重合したプロアントシアニジンであることが示唆された (Fig. 9)。

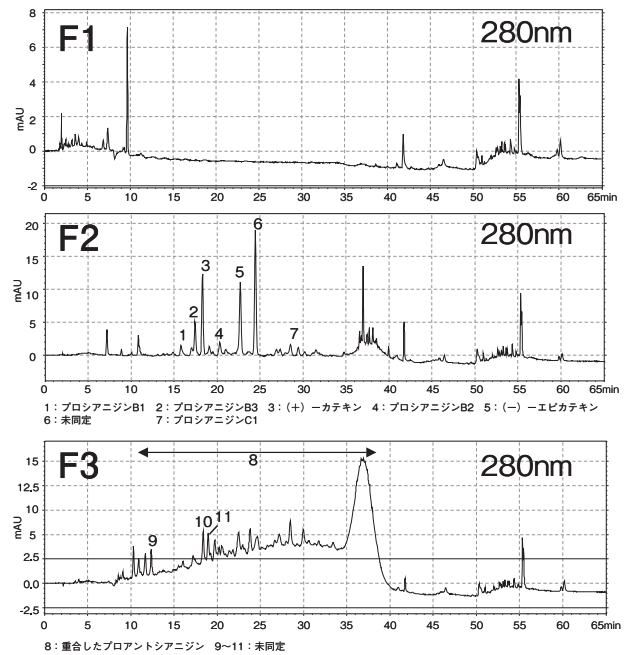


Fig. 9 HPLC による各画分のポリフェノール成分分析

#### 4. おわりに

食品加工過程で大量の廃棄物が生じ、これが悪臭や腐敗などの環境汚染にもつながっている。これらの廃棄物の有効利用は、環境改善、食糧不足解消および健康維持食品開発などの観点から非常に重要なことである。

そこで、我々は、種々の未利用園芸食資源が機能性食品および機能性飼料になり得るかをFlu 感染予防作用および抗アレルギー作用の観点から解析した。その結果、ブドウ (巨峰) 搾り滓およびソバ殻熱水抽出物はインフルエンザ感染予防作用を示すことが明らかになった。また、この作用成分は、これらに多量に含有する高分子プロアントシアニジンであることが明らかになった。

また、ブドウ (甲州) 搾り滓を乳酸菌で発酵させた発酵ブドウ搾り滓は、近年増加の一途をたどる花粉症などの I 型アレルギーを予防する可能性があることが分かった。この活性成分も主に高分子プロアントシアニジンであることがわかった。

今後、ヒトや家畜への投与試験により、これらが



抗Flu作用や抗アレルギー作用をもつ機能性食品や機能性飼料になり得るかが明らかになろう。また、他の食品廃棄物の中にもこれらの機能および他の機能を持つものがあるかも知れない。このような食品廃棄物が、機能性食品や機能性飼料の開発素材になれば、人々の健康維持ばかりでなく、世界的な食料不足や環境汚染を改善することになるであろう。

## 5. 参考文献

1. Fujimura, Y., Umeda, D., Yano, S., Maeda-Yamamoto, M., Yamada, K. and Tachibana, H. 2007. The 67kDa laminin receptor as a primary determinant of anti-allergic effects of O-methylated EGCG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**: 79–85.
2. Itoh, T., Ninomiya, M., Yasuda, M., Koshikawa, K., Deyashiki, Y., Nozawa, Y., Akao, Y. and Koketsu, M. 2009. Inhibitory effects of flavonoids isolated from *Fragaria ananassa* Duch on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 5374–5379.
3. Jae-Min, S., Kwang-Hee, L. and Baik - Lin, S. 2005. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res.* **68**: 66–74.
4. Kim, S. H., Kwon, K. and Shin, T. Y. 2008. Antiallergic effects of *Vitis amurensis* on mast cell-mediated allergy model. *Exp. Biol. Med.* **230**: 192–199.
5. Kiyoshima, J., Hori, T. and Yasui, H. 2001. The inhibitory effects of Guava leaf extract (GvEx) against influenza virus infection in mice. *Jpn. J. Food Chem.* **8**: 11–16.
6. Kondo, K., Nakamura, K., Hamauzu, Y., Kawahara, T., Sansawa, H., Suzuki, M. and Yasui, H. 2011. Inhibitory effect of fermented grape pomace on degranulation in RBL-2H3 cells and an analysis of its active ingredients. *Food Sci. Technol. Res. In press.*
7. Nakayama, M., Suzuki, K., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y. and Shimamura, T. 1993. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res.* **21**: 289–299.
8. Noguchi, A., Hamauzu, Y., and Yasui, H. 2008. Inhibitory effects of Guishi tea against influenza virus infection. *Food Sci. Technol. Res.* **14**: 277–284.
9. Scalbert, A. and Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **130**: 2073–2085.
10. Schieber, A., Stintzing, F. C. and Carle, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends. Food Sci. Tech.* **12**: 401–413.
11. Sundararajan, A., Ganapathy, R., Huan, L., Dunlap, J. R., Webby, R. J., Kotwal, G. J., Sangster, M. Y. 2010. Influenza virus variation in susceptibility to inactivation by pomegranate polyphenols is determined by envelope glycoproteins. *Antiviral Res.* **88**: 1–9.
12. Tokura, T., Nakano, N., Ito, T., Matsuda, H., Nagasako-Akazome, Y., Kanda, T., Ikeda, M., Okumura, K., Ogawa, H. and Nishiyama, C. 2005. Inhibitory effect of polyphenol-enriched apple extracts on mast cell degranulation in vitro targeting the binding between IgE and Fc $\epsilon$ RI. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 1974–1977.

## レビュー

# 伝染性気管支炎ウイルス由来の病原性に関わるタンパク質

稲吉 勇仁

## まえがき

伝染性気管支炎ウイルス (IBV) はコロナウイルス科に属するプラス一本鎖 RNA ウイルスである。伝播力が強く、ニワトリに感染すると主に呼吸器障

害、腎臓障害や産卵低下を引き起こし、養鶏産業に大きな経済損失を与える。IBV の抗原性や病原性は株によってさまざまである。IBV は高頻度で遺伝子変異をおこすため非常に多くの血清型が存在し、その数は数百とも言われている。さらに、血清学的性



状が異なれば互いの中和交差性が乏しいことから、単一のワクチン株で完全に感染を予防すること困難な場合が多い。このような感染症をより効果的にコントロールするためには、既存の弱毒化ワクチンだけでなく、新規のワクチン開発が期待される。そのためには、IBVの病原性並びに感染免疫に関する分子メカニズムの解明が不可欠であろう。IBVは宿主域が狭く、増殖可能な細胞に制限があることやウイルスゲノムが長いことから、解析は容易ではない。2001年に Britton らのグループが IBV の cDNA を *in vitro* でつなぎ合わせ、ウイルス RNA を合成し、それを哺乳動物培養細胞に導入することで感染性 IBV クローンの作製に成功したことから [1]、組み換え IBV を用いて、ウイルス由来のタンパク質機能を解析することが可能になった。その後、欠損株やキメラ株を用いてウイルスタンパク質の解析がなされるようになり、徐々にそれらの機能が明らかになりつつある。今回は最近の報告から、IBV 由来のタンパク質機能に関して興味深い知見を紹介したいと思う。

## IBV の感染

IBV が経気道感染すると気管粘膜上皮で増殖し、ウイルス量は感染から 3 日以内に最大となり、その後 5 日間あるいはそれ以降も、その状態が続く [2]。IBV は気管粘膜上皮だけでなく、腎臓、輸卵管、精巢、ファブリキウス嚢や消化器官にも感染する。しかし、IBV の増殖性とトロピズムは株によってさまざまであり、さらに、その増殖性も病原性と必ずしも相関するわけではない。一般的には、腎臓に親和性が高く、腎炎を引き起こしやすいウイルスが強毒株とされる傾向があるが、気道感染後の細菌等の二次感染によって病態が増悪するケースが多いようである。

## IBV のゲノム構造

コロナウイルスのゲノムは 26 - 32 kb であり、RNA ウイルスの中では最も長い。IBV に関しては約 27.6 kb である。コロナウイルスの RNA ゲノムは少なくとも 6 つの Open reading frame (ORF) を含む [3]。ORF 1 a/b は N 末端側 2/3 を占め、この領域には Nonstructural protein (Nsp 1-16) がコードされている (Fig. 1)。これらのタンパク質は RNA の複製、転写に関わるポリペプチドとして発現し、ウイルス由来のプロテアーゼ (3C-like protease, Papain-like protease) により分解される [4, 5]。IBV はコロナウイルス科の中でもグループ 3 に属するが、このグループには Nsp 1 が発現しない。

残りの 1/3 には Structural protein が Spike (S) - Envelope (E) - Membrane (M) - Nucleocapsid (N) の順に構成されており、S と E タンパク質の間と M と N タンパク質の間には Accessory protein (または Nonstructural protein) と呼ばれるタンパク質がコードされている。IBV の S - E 間には ORF 3a 及び 3b が、M - N 間には ORF 5a 及び 5b がそれぞれコードされている (Fig. 1) [2]。

## Structural protein

構造タンパク質はウイルス粒子を形成するのに必要な構成因子である。コロナウイルスが細胞内に侵入する際、S タンパク質は、細胞表面の特異的レセプターに結合することが知られており、細胞表面への接着、融合に寄与している [2]。しかし、現在のところ、IBV の S タンパク質に対するレセプターは同定されていない。また、S タンパク質は IBV 感染のトロピズムを決定していると考えられている [6]。Beaudette 株の S 遺伝子 (Ectodomain 領域) を M41 株の S 遺伝子と入れ換えた場合 (Fig. 2)、組

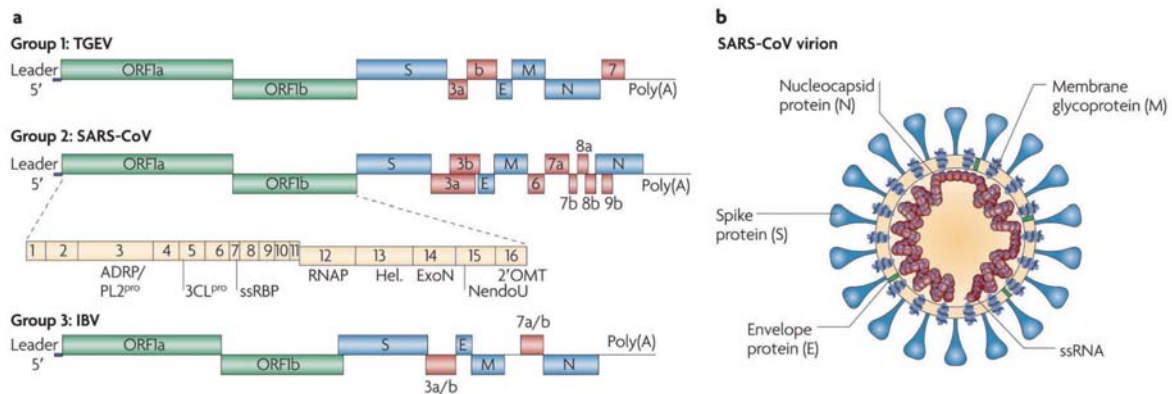


Fig. 1 コロナウイルスのゲノム構造 (a) とウイルス粒子の構造 (b)  
Perlman, S. and Netland, J. 2009. Nat. Rev. Microbiol. 7: 439-450.

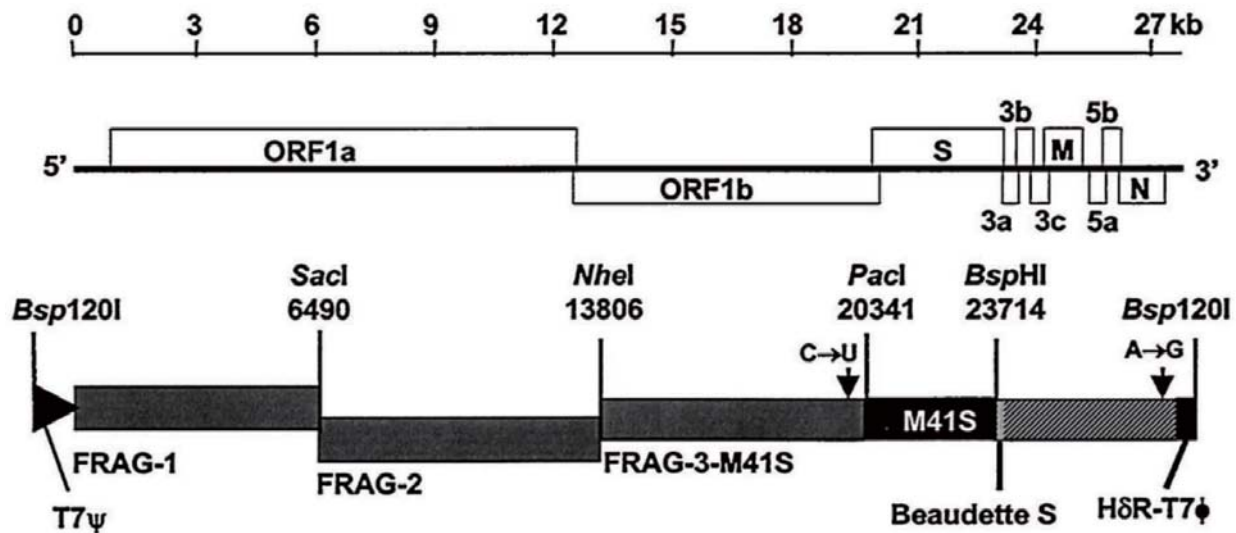


Fig. 2 組み換え IBV (Beaudette-M41 (S)) のゲノム構造  
 Perlman, S. and Netland, J. 2009. Nat. Rev. Microbiol. 7: 439-450.

み換え IBV (Beaudette-M41(S)) の増殖が M41 株と似たトロピズムに変化したと報告されている。しかし、培養細胞を用いて検討を行っていることから *in vitro* におけるトロピズムに限定される。さらに、Beaudette-M41(S) は、強毒株である M41 株の S 遺伝子に組み換えたのにもかかわらず病原性を示さなかった [7]。このことは、Beaudette 株に対して S タンパク質の Ectodomain だけでは、M41 株由来の病原性を与えられないことを示唆している。しかしながら、逆の組み換え IBV、つまり、M41 株の S 遺伝子を Beaudette 株の S 遺伝子に入れ換えた IBV において、病原性が維持されるかの検討がなされていないので、実際に S 遺伝子が病原性に関わっていないのかは断言できない。グループ 1 のコロナウイルスである豚伝染性胃腸炎ウイルスにおいては S 遺伝子が病原性に関与することを示唆する報告がなされていることから [8]、IBV の他の株を含めた検証も必要であろう。一方で、この Beaudette-M41(S) は Beaudette 株より高い免疫誘導を示した [7]。このことは、IBV の免疫原性は主に S タンパク質によって決定されることを示唆している。

コロナウイルスの E タンパクはウイルス粒子を構成する因子のひとつであり、主に Assembly と Budding に寄与している。E タンパクを細胞中に強制発現させると、Golgi 体に局在することが知られている [9]。これは E タンパクの Cytoplasmic tail に Golgi targeting signal が存在しているからである。さらに、M タンパクにおいても Golgi targeting signal が Transmembrane (TM) 中に同定されている [10]。TM の近傍には Conserved domain が存在し、ウイルス粒子の形成に重要な役割を果たし、N タンパクはその安定性に寄与しているようである

[11]。さらに、M タンパクは S 及び N タンパクに相互作用することが報告されている [12, 13]。コロナウイルスの Budding は cis-Golgi ネットワークで行われると考えられているので [9]、ウイルス構成因子が Golgi 体を経てどのように集約されるのか興味深い。しかし、現在のところ、そのメカニズムは明らかにされていない。N タンパクは、この他にも Type I interferon (IFN) のアンタゴニストとして報告されており、病原性に関わっている可能性が考えられる [14]。

### Nonstructural protein (Nsp)

コロナウイルスの Nsp は 16 個存在する。これらのタンパク質を Table 1 に示した [3]。この Replicase gene 領域はウイルス RNA の複製及び転写に関与するタンパク質群であるが、どのようなメカニズムで複製、転写に関わっているのかよくわかってはいない。ましてや全く機能が未知な因子さえ存在する。IBV については病原性まで検討された報告は少ない。

Britton らのグループは、Replicase gene を組み換えた IBV クローンを作製し (Fig. 3) ウイルスの病原性を検討したところ、弱毒株である Beaudette 株

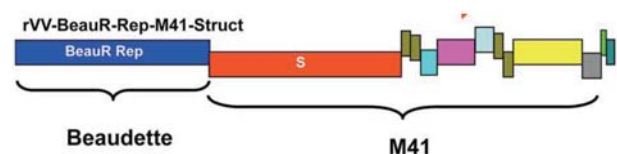


Fig. 3 Beaudette の Replicase gene に組み換えた M41 株のゲノム構造  
 Armesto, M., Cavanagh, D. and Britton, P. 2009. PLoS One. 4: e7384.

の N 末端 (Replicase gene) と、強毒株である M41 株の C 末端 (Structural gene 並びに Accessory gene) のゲノムを持つ組換え IBV は、病原性がないことを報告している [15]。このことは IBV の Replicase gene 領域が IBV の病原性を決定している可能性を示唆している。

さらに、興味深い論文が昨年発表された。それは、ウイルス RNA が自身の修飾酵素によって、宿主の mRNA のようにカムフラージュされるという報告である。細胞質中で複製するウイルスは、宿主細胞の核内でおこる RNA のプロセッシングを利用することができない。そのため、自身のゲノムに 5' - Cap 付加酵素がコードされている。5' - Cap においては Cap 0 と呼ばれる N - 7 位のメチル化がよく知られており (Fig. 4), N - 7 位のメチル化は RNA の安定化や翻訳に寄与することがわかっている。一方、Cap 1, Cap 2 と呼ばれる 2' - O 位のメチル化もかなり前から知られていたが、その生物学的意義はよくわかっていなかった。Diamond らのグループはウエストナイルウイルスで 2' - O Methyltransferase (MTase) を変異させたウイルスを作製し、マウスに感染させたところ、野生型に比べ弱毒化したことを明らかにした [16]。2' - O MTase はコロナウイルスにも存在しており、Nsp 16 に位置している (Table 1)。この酵素を変異させ不活化すると、ウイルスの増殖が激減し、弱毒化されることが報告されている [17]。この変異型コロナウイルスが感染すると Type I IFN が誘導されるようである。このことは、mRNA の 2' - O 位のメチル化が宿主細胞中の RNA を自己か非自己か区別する標識となっており、非自己の RNA を排除するメカニズムが存在することを示唆している。逆に言えば、ウイルスはこのような防御システムから巧みに逃れている。RNA レベルで、このような細胞の防御システムが存在することは非常に興味深く、新薬あるいは新たなワクチンの開発へと繋がること

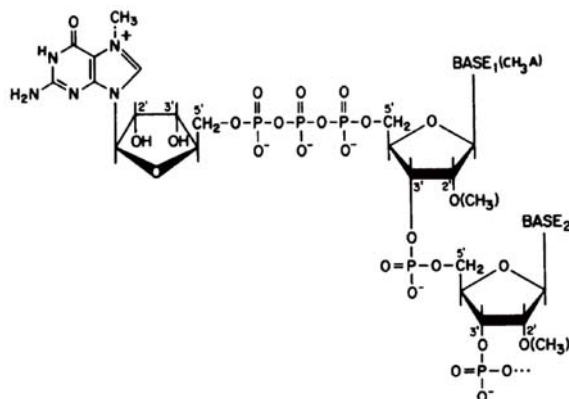


Fig. 4 mRNA の 5' -CAP 構造  
Banerjee, A. K. 1980. Microbiol Rev. 44: 175-205.

期待される。

IBV において、この他の Nsp が抗ウイルス作用を抑制するような報告はなされていないが、重症急性呼吸器症候群ウイルス (SARS - CoV) においては Nsp 3 が Type I IFN の誘導を抑制することが報告されている [18]。さらに Nsp 15 においても、ウイルス感染の刺激によって引き起こされるアポトーシスを阻害することが報告されている [19]。これは IBV の Nsp においても細胞の抗ウイルス作用を抑制する機能が存在する可能性を示唆している。

ORF 3 及び 5 に関してはまだ機能がわかっていないが *in vitro* における IBV の複製に必須な因子ではないようである [20, 21]。しかしながら、マウス肝炎ウイルス (MHV) の ORF 5a が Type I IFN のアンタゴニストとしての可能性を示唆する報告 [22] や、SARS - CoV の 3b タンパク質 (ORF 4) が G0/G1 細胞周期停止やアポトーシスを誘導するという報告 [23] があることから、IBV の Accessory protein の場合も病原性に関与している可能性は否定できない。上記にある IBV の ORF 3 及び 5 の解析についても、Beaudette 株をベースとした組み換え IBV を用いて *in vitro* における増殖性を検討しているので病原性への関与が不明であり、更

Table1 コロナウイルスの Nsp とその機能

Protein	Functions
Nsp1	Host mRNA degradation Translation inhibition Cell cycle arrest Inhibition of IFN signaling
Nsp2	Unknown
Nsp3	Papain-like proteases (PL1 <sup>pro</sup> , PL2 <sup>pro</sup> ) (Polyprotein processing) Poly(ADP-ribose) binding DMV formation? IFN antagonist Nucleic acid binding Deubiquitinating activity
Nsp4	DMV formation?
Nsp5	Main protease (M <sup>pro</sup> , 3CL <sup>pro</sup> ) (Polyprotein processing)
Nsp6	DMV formation?
Nsp7	ssRNA binding
Nsp8	Primase
Nsp9	Part of replicase complex
Nsp10	Part of replicase complex
Nsp11	Unknown
Nsp12	RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)
Nsp13	Helicase Nucleoside triphosphatase activity RNA 5'-triphosphatase activity
Nsp14	3'-to-5' exoribonuclease (ExoN) RNA cap formation (guanine-N7)-methyltransferase
Nsp15	Endonuclease (NendoU)
Nsp16	RNA cap formation (2'O-methyltransferase)



なる検証が必要である。

#### あとがき

リバーズジェネティクスにより感染性IBVクローン作製技術が構築されて10年が経った。この感染性IBVクローンの成功により、さまざまな変異株や交雑株の作製が可能になり、直接ウイルスタンパクの効果を検討することができるようになった。しかしながら、IBVのゲノムの長さや宿主域の狭さを考慮すると、依然解析は容易ではない。更なる簡便な実験系の構築が必要かもしれない。これまでの多くの論文では、Beaudette株を用いて、IBVの培養細胞での増殖性、あるいは病原性が検討されている。Beaudette株は継代を繰り返し、馴化させることで鶏腎初代培養細胞だけでなく哺乳動物培養細胞(BHK, Vero)などにおいても増殖可能であり、IBVの解析においては有用な株といえる。しかし、今後は他の分離株やその組み換えIBVを用いた解析も必要であろう。そのデータの蓄積がIBVの増殖メカニズムと病原性の解明の基盤となるのではないかと考えている。

現在でも、IBV感染症に対するワクチンの開発では、野外流行株をスクリーニングし、有望な候補株を継代によって弱毒化することが主である。しかし、継代を重ねることにより病原性は減弱していくが、免疫原性も低下してしまう。そのような問題を解決するためには、新たなアプローチが必要であろう。

#### 参考文献

1. Casais, R., Thiel, V., Siddell, S. G., Cavanagh, D. and Britton, P. 2001. Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J. Virol.* **75**: 12359–12369.
2. Cavanagh, D. 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* **38**: 281–297.
3. Perlman, S. and Netland, J. 2009. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 439–450.
4. Tibbles, K.W., Brierley, I., Cavanagh, D. and Brown, T.D. 1996. Characterization in vitro of an autocatalytic processing activity associated with the predicted 3C-like proteinase domain of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Virol.* **70**: 1923–1930.
5. Lim, K. P., Ng, L. F. and Liu, D. X. 2000. Identification of a novel cleavage activity of the first papain-like proteinase domain encoded by open reading frame 1a of the coronavirus Avian infectious bronchitis virus and characterization of the cleavage products. *J. Virol.* **74**: 1674–1685.
6. Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D. and Britton, P. 2003. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J. Virol.* **77**: 9084–9089.
7. Hodgson, T., Casais, R., Dove, B., Britton, P. and Cavanagh, D. 2004. Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity. *J. Virol.* **78**: 13804–13811.
8. Sánchez, C. M., Izeta, A., Sánchez-Morgado, J. M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Durán, J. and Enjuanes, L. 1999. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J. Virol.* **73**: 7607–7618.
9. Corse, E. and Machamer, C. E. 2002. The cytoplasmic tail of infectious bronchitis virus E protein directs Golgi targeting. *J. Virol.* **76**: 1273–1284.
10. Swift, A. M. and Machamer, C. E. 1991. A Golgi retention signal in a membrane-spanning domain of coronavirus E1 protein. *J. Cell Biol.* **115**: 19–30.
11. Arndt, A. L., Larson, B. J. and Hogue, B. G. 2010. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly. *J. Virol.* **84**: 11418–11428.
12. McBride, C. E. and Machamer, C. E. 2010. A single tyrosine in the severe acute respiratory syndrome coronavirus membrane protein cytoplasmic tail is important for efficient interaction with spike protein. *J. Virol.* **84**: 1891–1901.
13. Hurst, K. R., Koetzner, C. A. and Masters, P. S. 2009. Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. *J. Virol.* **83**: 7221–7234.
14. Ye, Y., Hauns, K., Langland, J. O., Jacobs, B. L. and Hogue, B. G. 2007. Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. *J. Virol.* **81**: 2554–2563.
15. Armesto, M., Cavanagh, D. and Britton, P. 2009. The replicase gene of avian coronavirus infectious

- bronchitis virus is a determinant of pathogenicity. *PLoS One*. 4: e7384.
16. Daffis, S., Szretter, K. J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T. Y., Schnell, S., Züst, R., Dong, H., Thiel, V., Sen, G. C., Fensterl, V., Klimstra, W. B., Pierson, T. C., Buller, R. M., Gale, M. Jr, Shi, P. Y. and Diamond, M. S. 2010. 2'-O-methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*. 468: 452-456.
17. Züst, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B. W., Ziebuhr, J., Szretter, K. J., Baker, S. C., Barchet, W., Diamond, M. S., Siddell, S. G., Ludewig, B. and Thiel, V. 2011. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* 12: 137-143.
18. Devaraj, S. G., Wang, N., Chen, Z., Chen, Z., Tseng, M., Barretto, N., Lin, R., Peters, C. J., Tseng, C. T., Baker, S. C. and Li, K. 2007. Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Biol Chem.* 282: 32208-32221.
19. Lei, Y., Moore, C. B., Liesman, R. M., O'Connor, B. P., Bergstralh, D. T., Chen, Z. J., Pickles, R. J. and Ting, J. P. 2009. MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. *PLoS One*. 4: e5466.
20. Hodgson, T., Britton, P. and Cavanagh, D. 2006. Neither the RNA nor the proteins of open reading frames 3a and 3b of the coronavirus infectious bronchitis virus are essential for replication. *J. Virol.* 80: 296-305.
21. Casais, R., Davies, M., Cavanagh, D. and Britton, P. 2005. Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. *J. Virol.* 79: 8065-8078.
22. Koetzner, C. A., Kuo, L., Goebel, S. J., Dean, A. B., Parker, M. M. and Masters, P. S. 2010. Accessory protein 5a is a major antagonist of the antiviral action of interferon against murine coronavirus. *J. Virol.* 84: 8262-8274.
23. Yuan, X., Shan, Y., Zhao, Z., Chen, J. and Cong, Y. 2005. G0/G1 arrest and apoptosis induced by SARS-CoV 3b protein in transfected cells. *Virol. J.* 2: 66

### 研修者・見学者受け入れ状況（平成22年4月から平成23年3月）

来所日・期間		所属機関・人数		研修・見学内容
平成22年	4月6日	日本大学生物資源科学部	2名	施設見学
	4月27日～4月28日	株式会社ナルク	1名	実験動物取扱手技習得
	6月21日～7月9日	東京都家畜保健衛生所	1名	細菌検査技術習得
	7月12日～8月31日	東京都家畜保健衛生所	1名	ウイルス検査技術習得
	7月15日～9月15日	昭和大学医学部内科学講座	1名	病理標本作製技術習得
	8月16日～8月20日	帯広畜産大学畜産学部獣医学課程	1名	学外実習
	8月23日～8月27日	日本獣医生命科学大学	1名	学外実習
	9月8日	東京大学獣医病理学教室	1名	施設見学
平成23年	2月4日	東京農工大学獣医病理学教室	1名	施設見学
	3月7日～3月11日	日本獣医生命科学大学	1名	学外実習

