

犬の重篤感染症におけるワクチンの弱毒化関連遺伝子マーカーの同定とウイルス検出法の評価及び疫学調査
(Identification of the genetic attenuation-marker of canine parvovirus vaccine and methodological and epidemiological studies in canine serious infectious diseases)

勢簗 剛

犬の重篤感染症におけるワクチンの弱毒化関連遺伝子マーカーの同定とウイルス検出法の評価及び疫学調査
(Identification of the genetic attenuation-marker of canine parvovirus vaccine and methodological and epidemiological studies in canine serious infectious diseases)

勢籟 剛

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授：田中 良和)

2019年3月

目次

序論.....	5
1 犬の重篤感染症を予防するワクチン開発における課題.....	5
2 犬パルボウイルスについて	6
3 犬パルボウイルス感染症ワクチンの弱毒マーカー	7
4 ジステンパーウイルスの病態評価	7
5 犬呼吸器感染症の病原体.....	8
6 本研究の目的.....	8
第 1 章 犬パルボウイルスワクチン株 (9985-46 株) の弱毒化を担う最小決定因子	10
1 緒言	11
2 材料と方法	11
2-1 細胞	11
2-2 弱毒ワクチン株の作出と感染防御効果.....	11
2-3 弱毒ワクチン株の遺伝子変異箇所の探索	12
2-4 CPV 完全長 DNA クローンの構築.....	12
2-5 CPV 完全長 DNA クローンの VP2 遺伝子領域への点変異導入	13
2-6 CPV 完全長 DNA クローンからの組換え CPV のレスキュー	14
2-7 組換えウイルスの CRFK 細胞と A72 細胞に対する感染価の測定	15
2-8 犬での病原性確認	15
2-9 供試動物からの排泄ウイルス量の評価.....	16
2-10 供試動物の血清学的評価	16
2-11 供試動物の腸病変の病理組織学的検査.....	17
2-12 統計解析	17
3 結果	17
3-1 9985-46 ワクチン株の感染防御効果.....	17
3-2 9985-46 ワクチン株と親株の病原性の比較.....	17
3-3 9985-46 ワクチン株の遺伝子変異の同定	18
3-4 CPV の完全長 DNA クローンの構築と組換えウイルスのレスキュー	18

3-5	培養細胞への親和性	19
3-6	犬での病原性.....	20
3-7	病理組織学的検査	21
3-8	ウイルス排泄量	21
3-9	血清学的検査.....	22
3-10	組換えウイルスの遺伝的安定性	22
4	考察	22
5	小括	25
	図及び表.....	26
第 2 章	ジステンパーウイルスの実験感染系におけるリアルタイム RT-PCR の利用	34
1	緒言	35
2	材料と方法	35
2-1	細胞とウイルス	35
2-2	実験感染	35
2-3	リアルタイム RT-PCR 法.....	36
2-4	ウイルスタイトレーション	37
2-5	血清中和試験.....	37
2-6	統計解析	37
3	結果	38
3-1	実験感染犬の病態発現.....	38
3-2	実験感染犬のウイルス血症及びウイルス排泄.....	38
3-3	血清学的検査.....	39
4	考察	39
5	小括	41
	図及び表.....	42
第 3 章	国内における犬呼吸器感染症の病原学的調査	44
1	緒言	45

2	材料および方法	45
2-1	検査材料	45
2-2	DNA と RNA の抽出	45
2-3	PCR と RT-PCR	46
2-4	PCR と RT-PCR の特異性	46
3	結果	46
4	考察	47
5	小括	49
	図及び表	50
	動物実験について	54
	総括	55
	謝辞	58
	引用文献	59
	Summary	67

序論

1 犬の重篤感染症を予防するワクチン開発における課題

犬に致死的で重篤な病態を示す感染症として、犬パルボウイルス (canine parvovirus, CPV) 感染症及び犬ジステンパーがある。また集団飼育施設内で伝播しやすく発生頻度が高い感染症として、犬呼吸器感染症 (canine infectious respiratory disease, CIR) がある。これらの感染症は病態の重篤さ及び発生頻度の高さから、犬の健康被害を予防するためにワクチン接種が重要である。これらの感染症に対するワクチンは広く使用されているが、さらに安全で有効なワクチンを開発するにあたり、次に掲げる課題が残っている。

CPV 感染症ワクチンについては、ワクチン株の弱毒化を担保する遺伝子マーカーが未同定である。CPV の弱毒生ワクチンは世界中で使用されており (Bass EP, 1982; Churchill AE, 1987)、安全性が証明され、弱毒ワクチン株の病原性復帰を示す報告はないものの (Bass EP, 1982)、ワクチンを接種した後、犬が CPV 感染症を示すと病原性復帰が懸念されることがある (Decaro N, 2007)。この懸念を払拭するためには、強毒株と弱毒株を明確に区別することが重要である。そのために、CPV の弱毒化を担う遺伝的決定因子の同定は、ワクチンの安全性を担保するのに重要な要素である。

犬ジステンパーについては、実験感染系でのジステンパーウイルス (canine distemper virus, CDV) の動態検出にリアルタイム reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いたときの病態発現との関連性が不明である。リアルタイム RT-PCR 法は、ウイルス RNA を迅速かつ簡便に定量することができる (Elia G, 2006; Scagliarini A, 2007)。CDV の実験感染において、ウイルス血症及びウイルス排泄の評価は様々な方法で行われているが、リアルタイム RT-PCR 法によるウイルス RNA の経時的な変化と病態発現との関連を調査した報告はなく、ワクチンの有効性評価に重要な実験感染系での有用性が評価されていないことが課題である。

CIRD については、原因となる複数の病原体の関与が知られているものの (Azetaka M, 1988; Buonavoglia C, 2007; Takamura K, 1982; Wright NG, 1973)、ワクチンに含まれない病原体の野外浸潤状況及びワクチンに含まれる病原体の検出状況を調査した報告は少なく、さらなる有用なワクチン開発のためにも、国内での疫学調査による CIRD の病因学的研究が必要である。

2 犬パルボウイルスについて

CPV は重篤で致死率の高い犬の主要病原体の一つであり、特に子犬に激しい下痢、白血球減少症を引き起こす。CPV は口腔及び鼻腔から犬に感染し、感染した犬は 4～6 日間の潜伏期間を経て、食欲不振、嘔吐、発熱、下痢（粘膜便、水溶性下痢、血便）、白血球数の減少を兆候とした急性腸炎に至る (McCaw DL, 2006)。CPV はパルボウイルス科プロトパルボウイルス属に属し、直鎖上の 1 本鎖マイナス鎖の約 5kb の DNA ゲノムを有する (Cotmore SF, 2014)。ヘルパーウイルスを必要としない自律増殖型のパルボウイルスであり、エンベロープは持たない。ウイルスゲノムの 3'末端側と 5'末端側はそれぞれ非翻訳領域のヘアピン構造をとる回文配列であり、それらの間に非構造蛋白 (NS: NS1, NS2) と構造蛋白であるカプシド蛋白 (VP: VP1, VP2, VP3) をコードする主要な 2 つの ORF を含んでいる (Reed AP, 1988)。NS1 と NS2 のアミノ末端は同一の配列からなる。カルボキシ末端は両者の領域が重複しているが、NS2 の mRNA のスプライシングにより、両者の読み枠は異なっている。VP2 のシーケンスは VP1 のシーケンスの中に完全に含まれ、VP1 は mRNA のスプライシングにより、アミノ末端に VP2 に加えて追加の配列を有する (Jongeneel CV, 1986)。VP3 は VP2 のアミノ末端から 15 から 20 のアミノ酸が切断されたものから成る (Parrish CR, 2010; Weichert WS, 1998)。VP2 はパルボウイルスのカプシドを構成する主要な構造タンパクであり、VP2 領域のアミノ酸置換は、CPV の抗原性状、宿主細胞に対する親和性及び宿主に対する病原性の変化を起こすことが知られている (Allison AB, 2014; Hueffer K, 2003; Kailasan S, 2015; Parrish CR, 2010; Stevenson MA, 2001)。

CPV は 1978 年に突如発生し、抗原変異と宿主親和性の変化を伴って進化してきたウイルスである。初期の抗原型は 2 型であったが、その後 40 年の間に新しい抗原型に進化した。CPV は猫パルボウイルス (FPV) に近縁であることから、FPV が犬への感染性及び病原性を獲得した新しいウイルスであると考えられている。1980 年代には初期の 2 型は完全に 2a 型と 2b 型の新しい抗原型に置き換わった。2000 年には 2c 型の出現がイタリアで報告された (Decaro N, 2012; Zhou P, 2017)。これらの抗原変異は、ウイルスカプシド蛋白の表面に位置する VP2 領域の 3 か所のアミノ酸変異 (K93N、D323N、G299E または A300D) によって起こり、ウイルスの宿主域の変化をもたらしていることが報告されている (Kailasan S, 2015)。

3 犬パルボウイルス感染症ワクチンの弱毒化関連遺伝子マーカー

CPV 感染症の予防には弱毒生ワクチンが広く使用されている。CPV の弱毒生ワクチンは 30 年もの間、多くの国で使われており (Bass EP, 1982; Churchill AE, 1987)、新しい抗原型に対応するため 2b 型のワクチンも近年開発されている (Wilson S, 2013)。弱毒生ワクチン株の作出には、野外株の組織培養での連続継代法が最も広く用いられているが (Badgett MR, 2002; Churchill AE, 1987)、盲継代した株から、弱毒株を選別するには、経験則により株を選択し動物実験にて病原性を確認するしかなく、多大な時間と労力を要する。このような状況のため、弱毒株の早期作出及び弱毒化を保証することによるワクチンの品質管理のためにも、CPV の弱毒化の分子メカニズムは解明されるべきである。

これまでに CPV 弱毒生ワクチンが野外で病原性復帰したという報告はなく、ワクチンの弱毒化は安定であると考えられる (Bass EP, 1982)。しかし、ワクチンを接種した後に、犬が消化器症状を発症したとき、ワクチンの病原性復帰が原因であるかもしれないという懸念が残る (Decaro N, 2007)。この懸念を払拭するためにも、ワクチン株が弱毒の性状を保持していることを担保するための遺伝学的に検出可能な弱毒マーカーを特定することが必要である。

4 ジステンパーウイルスの病態評価

CDV は犬の最も重要な病原体の一つであり、重篤でしばしば致死的な犬ジステンパーを引き起こす。CDV はパラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属し、非分節型の 1 本鎖マイナス鎖の RNA ゲノムを含むエンベロープを有するウイルスである。CDV 感染における病態は一様ではなく、様々な臨床経過を辿る。CDV は体内に侵入すると気道のリンパ組織で増幅した後、感染後 3~7 日に一時的な発熱とリンパ球減少を引き起こし、ウイルス血症となり体内に拡がる。その後、CDV は全身のリンパ組織へ移行し、全身症状が発現する。急性感染期には、CDV は全身からのあらゆる分泌物及び排泄物に含まれる。この時期は、皮膚の湿疹、鼻汁や涎、結膜炎、消化器症状や呼吸器症状といった局所症状を伴う (Appel MJ, 1969, 1982, 1987; Beineke A, 2009; Krakowka S, 1975, 1977, 1980a,b; Lan NT, 2005; Pearce-Kelling S, 1990; Tan B, 2011)。一方で、犬ジステンパーの病態再現のために、CDV 野外分離株を犬に実験感染させても、個体によって多種多様な臨床症状や軽度な症状または不顕性感染を示し、1 頭ずつで病態

が異なることがある (Kimoto T, 1986; Krakowka S, 1975, 1977; Lan NT, 2005; Metzler AE, 1980; Pearce-Kelling S, 1990; Tan B, 2011)。このような場合、実験感染による株間の病原性の差の調査や、野外分離株に対するワクチンの防御効果の評価が困難となる。多様な病態発現のため、CDV の病態評価には、臨床症状の観察に合わせて、排泄ウイルスの定量や経時的変化も特徴的な要素として用いられている (Kimoto T, 1986; Lan NT, 2005; Metzler AE, 1980; Nguyen DT, 2012; Pardo MC, 1997; Pearce-Kelling S, 1990; Tan B, 2011)。そのためウイルス血症とウイルス排泄量の調査に、感度が高く定量性のある方法が CDV の病態評価に重要である。

5 犬呼吸器感染症の病原体

CIRD は、主要病原体として、犬アデノウイルス 2 型 (CAV-2)、犬パラインフルエンザウイルス (CPIV) 及び *Bordetella bronchiseptica* (Bb) が知られている (Azetaka M, 1988; Buonavoglia C, 2007; Takamura K, 1982; Wright NG, 1973)。その他に、犬ヘルペスウイルス (CHV)、レオウイルス、ストレプトコッカス、パスツレラ、シュードモナス属菌及びマイコプラズマなどが上部呼吸器から検出される (Angus JC, 1997; Binn LN, 1977; Buonavoglia C, 2007; Chalker VJ, 2003, 2004; Erles K, 2004)。また、CDV が重篤な呼吸器症状を示した犬の上部呼吸器から分離されることもある (Appel MJ, 1970)。最近では下痢を惹起する犬腸炎コロナウイルスとは異なる犬呼吸器コロナウイルス (CRCoV) や犬インフルエンザウイルスなど、新興病原体の関与も報告されるようになってきた (Crawford PC, 2005; Erles K, 2003; Soma T, 2008; Yachi A, 2006)。このように CIRD は、多種の病原体の混合感染により、症状が発現し増悪化に至る。これらの病原体のうち、CAV-2、CPIV 及び CDV に対するワクチンは広く使用されているものの、犬の繁殖場など集団飼育している施設では、CIRD はいまだ発生している。CIRD の発生を抑えるためには、原因病原体を把握することが第一であり、ワクチンにより病原体の浸潤が低下しているのか、またはワクチンに含まれていない病原体が広く浸潤しているのか調査すべきである。国内での CIRD の病原体の野外浸潤状況を調査した報告は少なく、さらなる疫学調査が必要である。

6 本研究の目的

本研究の目的は、CPV 感染症、犬ジステンパー及び CIRD に対するさらに安全で有

用なワクチンの開発における課題を解決することである。第一章では、CPV の弱毒生ワクチンの弱毒化を担保する遺伝学的な最小決定因子を同定する。第二章では、CDV の実験感染系において、ウイルス動態を評価するために、感度が高く定量性のあるリアルタイム RT-PCR 法の有用性を検証する。第三章では、呼吸器症状を示した犬から CIRDC の病原体である CAV-2、CPIV、CDV、CHV、CRCoV および Bb を検出し、国内における野外浸潤状況の調査及び現行ワクチンの有効性の評価を行う。これらの研究は、犬の健康を脅かす重要な感染症に対するワクチンの改良及び新しいワクチンの開発に有益な知見をもたらすものである。

なお、本論文は以下に示す誌上発表論文の内容をまとめたものである。

1. Sehata G, Sato H, Yamanaka M, Takahashi T, Kainuma R, Igarashi T, Oshima S, Noro T and Oishi E, 2017: Substitutions at residues 300 and 389 of the VP2 capsid protein serve as the minimal determinant of attenuation for canine parvovirus vaccine strain 9985-46. *Journal of General Virology*, 98, 2759-2770, doi:10.1099/jgv.0.000936
2. Sehata G, Sato H, Ito T, Imaizumi Y, Noro T and Oishi E, 2015: Use of quantitative real-time RT-PCR to investigate the correlation between viremia and viral shedding of canine distemper virus, and infection outcomes in experimentally infected dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77, 851-855, doi:10.1292/jvms.14-0066
3. 勢籟 剛, 若月 章, 増渕勝夫, 高橋拓男, 国分輝秋, 2010: 国内における犬呼吸器感染症の病原学的調査, *日本獣医師会雑誌*, 63, 538-542.

第 1 章

犬パルボウイルスワクチン株（9985-46 株）の 弱毒化を担う最小決定因子

本章は下記に示す論文の出版者のオープンアクセスポリシーに準拠してアーカイブされたグリーンオープンアクセスバージョンである。出版者版（Version of Record）は次の場所で入手可能である。

[http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000936#
ab2](http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000936#tab2)

Sehata G, Sato H, Yamanaka M, Takahashi T, Kainuma R, Igarashi T, Oshima S, Noro T and Oishi E, 2017: Substitutions at residues 300 and 389 of the VP2 capsid protein serve as the minimal determinant of attenuation for canine parvovirus vaccine strain 9985-46. *Journal of General Virology*, 98, 2759-2770, doi:10.1099/jgv.0.000936

1 緒言

2015年にCPVの弱毒生ワクチン株9985-46株が作出された。この株は野外分離株を猫由来の株化細胞であるCRFK細胞で連続継代することにより弱毒した株であり、ワクチンとしての感染防御効果をチャレンジ試験により確認した(Table 1-1)。このワクチンを臨床適用した際の有効性と安全性は、国内のGood Clinical Practice (GCP)ガイドラインに基づいた臨床試験により証明された。本研究では、9985-46株の弱毒化を担う遺伝学的な決定因子を同定するために、感染性分子クローンの技術を用いて、9985-46株に認められた数か所のアミノ酸変異のうち、1か所または2か所の変異を強毒型の感染性クローンに導入した。得られた変異ウイルスの病原性を調査することにより、どのアミノ酸変異が弱毒化をもたらしているか探索し、弱毒化を担う最小決定因子を同定した。

2 材料と方法

2-1 細胞

猫の腎臓由来細胞であるCRFK細胞と犬の大腿部腫瘍由来細胞であるA72細胞はAmerican Type Culture Collection (ATCC)から購入した。CRFK細胞は5%の牛胎仔血清(FBS)を含む最小必須培地(MEM)で培養し、A72細胞は5%FBSを含むLeibovitzのL15培地で培養した後、徐々に5%FBSを含むMEMに馴化させ、最終的に完全に置き換えて培養した。

2-2 弱毒ワクチン株の作出と感染防御効果

弱毒CPV9985-46株の親株であるCPV9985株は2b型のCPVであり、CPVの感染により死亡した犬の扁桃組織からCRFK細胞を用いて37°Cで培養し、限界希釈法により5代継代して分離した。弱毒化のために、32°Cの培養でCRFK細胞にて連続的に盲継代した。各代の継代時の培養ウイルスの感染価は約 1×10^8 TCID₅₀/mlであり、100倍希釈したものを次代に継代した。41代の時にCRFK細胞でプラーククローニングを3回繰り返して行い、さらに2代継代して増幅させたウイルス培養液を9985-46株と名付け保存した。

9985-46株のワクチンとしての防御効果を評価するために、強毒CPVによるチャレンジ試験を行った。株式会社微生物化学研究所の繁殖施設から入手したCPV抗体陰性

のビーグル犬3頭（1か月齢1頭、2か月齢2頭）のうち、1か月齢の犬1頭（Table 1-1, No. 1）にチャレンジの50日前に9985-46株 $10^{7.0}$ TCID₅₀を皮下注射して免疫し、2か月齢の犬2頭（Table 1-1, No. 2 及び 3）にチャレンジの15日前に9985-46株 $10^{5.5}$ TCID₅₀を皮下注射して免疫した。3頭の免疫群と2か月齢の2頭の無免疫対照群、合わせて5頭すべてに、 $10^{5.0}$ TCID₅₀の強毒CPV9690株（2b型）を5 mL 経口投与してチャレンジした。チャレンジ後、供試犬の臨床症状の観察、体温及び体重測定を毎日実施し、週に2回、末梢血中の白血球数を測定した。直腸からのウイルス排泄を評価するために、直腸スワブをチャレンジ直前とチャレンジ後2、4、6、8、10、12日目に採取した。ウイルス排泄量はウイルス感染価測定により評価した。

2-3 弱毒ワクチン株の遺伝子変異箇所の探索

ワクチン株の遺伝子変異箇所を探索するためにワクチン株と親株のシーケンス解析を行った。ウイルスDNAを9985-46株と9985株のウイルスストックから、QIAamp DNA Mini Kit（キアゲン）を用いて抽出した。CPVのゲノムを二つに区切り、境界部分の配列が一部重なり合うようにして（nt 241-3174 と nt 2744-4585）プライマーを設計し、KOD DNA ポリメラーゼ（KOD-Plus-Neo、東洋紡）を用いたPCRにより、ウイルスDNAを増幅した。400～500塩基ごとにプライマーを設計してPCR産物からダイレクトシーケンスを行った。得られたシーケンスはBioEditソフトウェア（バージョン7.0.9）でアライメントし、ワクチン株と親株で異なる塩基とアミノ酸置換箇所を調べた。本研究ではタンパク翻訳領域の変異をターゲットとし、3'および5'末端の非翻訳領域の変異箇所は調査対象としなかった。

2-4 CPV 完全長 DNA クローンの構築

CPVの感染性分子クローンを作成するために、CPVの完全長ゲノムを1つのプラスミドにクローニングし、完全長DNAクローンを構築した。CPVゲノムの5'及び3'末端のDNA鎖は、既知の塩基配列（pCPV Y1, GenBank accession no. D26079, nt 1-400 及び nt 4607-5075; Horiuchi M, 1993）を基に合成した。これらの合成DNAは5'及び3'末端領域のDNAをつなげてpBMH（pBluescript II SK (+)のマルチクローニングサイトを改変したもの、バイオマテック）にクローニングした。連なった5'及び3'末端領域のDNAを、中間で分断して5'及び3'末端領域の各々がDNA断片の末

端に位置するようにプライマーペア (5'-ATT GTA CTT GTA TTT GAT ATA GGA TTT-3'、5'-TTG GAC GTT GTC ACA TTT A-3') を設計し、KOD DNA ポリメラーゼ (KOD-Plus-Neo、東洋紡) を用いたインバース PCR により、5'又は3'末端領域がそれぞれの末端に位置する直鎖上の DNA 断片を調製した。CPV ゲノムの中央部分の NS1、NS2、VP1、VP2 遺伝子領域は、In-Fusion cloning (クロンテック) のためにデザインしたプライマーペア (5'-TGT GAC AAC GTC CAA CTA AAT GGA AAG GAT GTT CGC TGG AA-3'及び5'-AAA TAC AAG TAC AAT ATT TCT ATG CTG TAA TTT AAT TAA TCT TAA AAT-3') と KOD DNA ポリメラーゼを用いて、9985 株及び 9985-46 株から抽出したウイルス DNA から PCR により増幅した。CPV ゲノムの完全長を構築するようにして、増幅産物を直鎖上にした 5'及び3'末端領域を有する DNA 断片に In-Fusion HD Cloning Kit (クロンテック) を用いてライゲートした。構築したプラスミドを大腸菌 DH5 α コンピテントセル (タカラバイオ) に導入して形質転換させ、50 μ g/ml アンピシリン存在下で 37 °C で一夜培養し、クローニングした。構築した完全長 DNA クローンを p9985 と p9985-46 (DDBJ accession nos. LC270891 と LC270892) と名付けた (Fig. 1-1)。

p9985 のバックボーンに p9985-46 の NS または VP 領域全体の DNA を入れ替えることによって p9985-NS と p9985-VP を構築した (Fig. 1-1)。p9985 の VP2 領域を欠いた断片を、KOD DNA ポリメラーゼとプライマーペア (5'-GTA TAT GAA AAA TCT CAA CTA GCA CCT A-3'及び5'-GTG CAA GAT TGT CTC TTT TTA CTT-3') を用いたインバース PCR により調製した。p9985-46 の VP2 領域を、プライマーペア (5'-AAG TAA AAA GAG ACA ATC TTG CAC-3'及び5'-TAG GTG CTA GTT GAG ATT TTT CAT ATA C-3') を用いて PCR で増幅した。これらの断片を In-Fusion cloning によってライゲート及びクローニングして、p9985-VP を構築した。p9985-NS は同様の方法で p9985-46 のバックボーンに、p9985 の VP2 領域全体を置き換えるようにして構築した。これらのクローニング手技には、標準的な分子生物学的手法を用いた (Sambrook J, 2001)。得られたプラスミドは CPV ゲノム部分のシーケンス解析を行い、予想通りに構築されたことを確認した。

2-5 CPV 完全長クローンの VP2 遺伝子領域への点変異導入

PCR を用いて p9985 の VP2 遺伝子領域に 9985-46 株に認められた変異を導入する

ために、部位特異的変異導入法 (Site-directed mutagenesis) を用いた。プライマーペア AA93S/AA93AS、AA300S/AA300AS、AA389S/AA389AS 及び AA562S/AA562AS (Table 1-2) はそれぞれ C3062A、G3682T、C3949A 及び G4467C の塩基の置換を導入するようにデザインした。これらの塩基の置換は VP2 領域のそれぞれ N93K、G300V、T389N 及び V562L のアミノ酸置換をもたらす。PCR 条件は、DNA 変性に 98 °C で 10 秒、アニーリングに AA93S/AA93AS、AA300S/AA300AS 及び AA562S/AA562AS のプライマーペアで 55 °C で 15 秒、AA389S/AA389AS のプライマーペアで 60 °C で 15 秒、伸長反応に 72 °C で 40 秒行い、一連のサイクルを 30 回繰り返した。PCR には、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ) を使用した。得られた PCR 産物を大腸菌コンピテントセルにトランスフォームしてクローニングした。得られたプラスミドはそれぞれ p9985-N93K、p9985-G300V、p9985-T389N 及び p9985-V562L と名付けた。さらにもう 1 か所の点変異を導入するために、上記の方法で、p9985-N93K、p9985-G300V、p9985-T389N 及び p9985-V562L にさらに 1 か所の点変異を導入し、2 か所の点変異を導入した完全長 DNA クローンを構築した。プラスミドの構築には、標準的な分子生物学的手法を用いた (Sambrook J, 2001)。シーケンス解析により、変異が適切に導入されていることと、CPV ゲノム部分に PCR エラーによるミス塩基が導入されていないことを確認した。

2-6 CPV 完全長 DNA クローンからの組換え CPV のレスキュー

組換え CPV を得るために、各完全長 DNA クローンの p9985、p9985-46、p9985-NS、p9985-VP、p9985-N93K、p9985-G300V、p9985-T389N、p9985-V562L、p9985-N93K/G300V、p9985-N93K/T389N、p9985-N93K/V562L、p9985-G300V/T389N、p9985-G300V/V562L 及び p9985-T389N/V562L を CRFK 細胞にトランスフェクションした。すなわち、トランスフェクションの前日に、CRFK 細胞をトランスフェクション時におよそ 50%コンフルエントになるように 25-cm² フラスコに播種した。FuGENE6 Transfection Reagent (プロメガ) 7.5 µl と 242.5 µl の無血清培地 (Opti-MEM I reduced-serum medium, ライフテクノロジーズ) を混合して 5 分間室温で静置させた後、2.5 µg の プラスミド DNA を加えて、15 分間静置させた。これらの混合物を、CRFK 細胞の培養液中に添加し 37°C で培養した。トランスフェクション後 7 日目に、培養上清を回収し、ウイルス感染価を測定した。ウイルスストックを調製す

るために、75-cm² フラスコに単層形成した CRFK 細胞にトランスフェクション後の培養上清を接種して継代した。継代後の培養上清を-80 °C で保存し、ウイルスストックとして、v9985、v9985-46、v9985-NS、v9985-VP、v9985-N93K、v9985-G300V、v9985-T389N、v9985-V562L、v9985-N93K/G300V、v9985-N93K/T389N、v9985-N93K/V562L、v9985-G300V/T389N、v9985-G300V/V562L 及び v9985-T389N/V562L と名付けた。導入した変異部位が維持されているかをシーケンス解析により確認した。

2-7 組換えウイルスの CRFK 細胞と A72 細胞に対する感染価の測定

組換えウイルスストックの感染価を CRFK 細胞と A72 細胞でのローラーチューブ法によるタイトレーションで測定した。すなわち、試験管 1 本あたり、5% FBS を含む MEM 1ml に浮遊させた細胞と 10 倍階段希釈したウイルス希釈液 0.1 ml を混合して培養した。37 °C で 24 時間静置培養して細胞を接着させた後、培養液を 2% FBS を含む新しい MEM 1ml に交換し、37 °C で 6 日間ローラードラム上で回転培養した。ウイルス増幅は、培養上清の豚赤血球の血球凝集能 (HA) により確認した。HA を認められた培養上清を CPV 感染陽性とみなし、ウイルス感染価 (TCID₅₀/ml) を Reed-Muench 法 (Burlison FG, 1992) により算出した。

2-8 犬での病原性確認

CPV に対する抗体陰性の 5~11 週齢の 49 頭のビーグル犬を株式会社微生物化学研究所の繁殖施設から入手し、A~N までの 14 グループに分けた。頭数の配分はグループ A~N でそれぞれ 4、4、3、2、4、3、4、3、3、3、3、7、3 及び 3 とした。各グループを別々に隔てた部屋で飼育し、2 または 3 頭ずつ別ケージで飼育した。全てのグループ (A~N) の動物にそれぞれ 5 ml のストックウイルス液 (9985 株、9985-46 株、v9985、v9985-46、v9985-NS、v9985-VP、v9985-G300V、v9985-T389N、v9985-V562L、v9985-N93K/G300V、v9985-N93K/V562L、v9985-G300V/T389N、v9985-G300V/V562L 又は v9985-T389N/V562L) を経口投与した。グループ A と B の動物には、親株とワクチン株の最大限の病原性状を評価するために、調製できる最大量のウイルス感染価 (9985 株は $1 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/ml、9985-46 株は $1 \times 10^{7.5}$ TCID₅₀/ml。いずれも CRFK 細胞での感染価を表す) を投与した。グループ C と D の動物にも、

組換えウイルスの最大限の病原性状を評価するために、得られた最大量のウイルス感染価（v9985-NS は $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml、v9985-VP は $1 \times 10^{8.0}$ TCID₅₀/ml。いずれも CRFK 細胞での感染価を表す）を投与した。グループ E~N には、各グループ間の病原性を比較するために、一律に $1 \times 10^{6.5}$ TCID₅₀/ml（いずれも CRFK 細胞での感染価を表す）に調整したウイルスを投与した。ただし、v9985-N93K/V562L は最大で $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml のウイルス濃度しか得られなかった（Fig. 1-2）ので、この感染価で投与した。供試動物の臨床症状を 14 日間毎日観察し、Nakamura ら（Nakamura K, 2001）が示すようにスコア化した。末梢血、直腸スワブは 1 日おきに採取し、白血球数の測定と含まれるウイルス感染価を測定した。血清は投与直前、投与後 7 及び 14 日目に採取し、血清中の中和抗体価を測定した。ウイルス感染価測定に供する検体は使用するまで -80°C で保存した。CPV の感染に耐過した動物は、Table 1-3 に示したように投与後 7、11 又は 14 日目に安楽死させて剖検し、腸病変の病理組織学的検査のために空腸、回腸及び結腸を採取した。剖検した動物の臨床観察及び採材は安楽死までの期間行った。

2-9 供試動物からの排泄ウイルス量の評価

各ウイルスを投与した動物のウイルス排泄量は直腸スワブのウイルス感染価測定により評価した。ウイルス感染価は前述したように CRFK 細胞を用いたローラーチューブ法で行った。ただし、MEM には 3,000 U/ml ペニシリン、300 µg/ml ストレプトマイシン、30 µg/ml カナマイシン、0.6 µg/ml アンホテリシン B を含み、静置培養して細胞を接着させた後に、MEM で培養細胞を一度洗浄する工程を加えた。培養後、HA を認めた培養上清を CPV 感染陽性とみなし、ウイルス感染価（TCID₅₀/ml）を Reed-Muench 法（Burlison FG, 1992）により算出した。

2-10 供試動物の血清学的評価

供試動物の CPV 感染における血清学的反応を血清中和試験（SN）により評価した。すなわち培養液で希釈した血清 0.1 ml と 0.1 ml あたり 200 TCID₅₀ の CPV9985 株を混合し、 37°C で 1 時間反応させた。混合液 0.1 ml をローラーチューブ内に添加した CRFK 細胞浮遊液 1 ml 中に接種した。 37°C で 24 時間静置し細胞を接着させた後、ローラードラム上で 6 日間回転培養させた。ウイルス増幅は培養上清の豚赤血球の血球

凝集能（HA）により判定し、HA を認めなかった試験管を SN 抗体陽性と判定した。SN 抗体価は Reed-Müench 法（Burleson FG, 1992）により算出した。

2-11 供試動物の腸病変の病理組織学的検査

病理組織学的検査に供した材料を、重篤な CPV 感染症に陥り人道的エンドポイントに到達した時又は投与後 7 日間の観察期間が終了した時に供試動物を安楽死させ回収した。空腸、回腸及び結腸をホルマリン固定し、パラフィン包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。組織切片は鏡検により病理組織学的に評価し、病変の程度によりスコア化し、著変なし=0、軽度=1、中等度=2、重度=3 とした。評価項目は次の 3 点とし、①空腸、回腸、結腸の腸管上皮の壊死、②空腸、回腸、結腸の腸陰窩の変性、③結腸のリンパ濾胞の壊死の程度をスコア化した（Fig. 1-3 に典型的な病変を示す）。①～③のスコアを総合して、それぞれの個体における病理組織学的スコアとした。

2-12 統計解析

母数が異なる 2 つのグループの平均値の差を評価するために、対応のない 2 標本 *t* 検定を実施した。R ソフトウェア version 3.1.2（R Development Core Team, 2014）を使用して算出し、*P* 値が < 0.05 の時、有意差ありとした。

3 結果

3-1 9985-46 ワクチン株の感染防御効果

9985-46 ワクチン株の防御効果を調べるために、9985-46 株を犬に免疫した後、強毒の CPV 2b 型でチャレンジした。Table 1-1 に示すように、無免疫対照群は CPV 感染症の典型的な症状を示したのに対し、免疫群はいずれの犬も CPV 感染症の症状を示さなかった。さらにチャレンジ時の中和抗体価が 640 倍以上の個体はウイルス排泄も認めなかった。これらの成績から、9985-46 株の感染防御効果が示された。

3-2 9985-46 ワクチン株と親株の病原性の比較

ワクチン株の 9985-46 株と親株の 9985 株の病原性を調べるために、それぞれ 4 頭の犬に自然感染経路（経口投与）にて投与した。9985 株は 4 頭の犬に下痢、発熱、食欲不振、沈鬱、脱水、白血球減少の CPV 感染症の典型的な症状を引き起こした。さら

に1頭の犬は接種後8日目に重篤化した。一方、9985-46株を接種した犬はいずれも症状を示さなかった (Table 1-3、グループ A 及び B)。これらの成績から、9985-46株は、猫由来細胞での連続継代によって、強毒の親株から明らかに弱毒していることが確認された。

3-3 9985-46 ワクチン株の遺伝子変異の同定

9985-46株と9985株のゲノム(5'及び3'末端の非翻訳領域を除く)のシーケンス解析を行った。9985-46株には、9985株から7か所の塩基の置換が確認された。それら7か所のうち、1か所はアミノ酸置換を伴わない塩基の置換であったが、6か所はNS1領域に2つのアミノ酸置換(I574M及びD665G)、VP2領域に4つのアミノ酸置換(N93K、G300V、T389N及びV562L)をもたらした (Table 1-4)。これらのVP2領域のアミノ酸置換は、いずれもウイルスカプシドの内部ではなく表面に位置しているものであった (Hafenstein S, 2007)。CPV粒子は正二十面体構造であり、その三回対称軸のスパイク部分には、トランスフェリンレセプター (TfR) への結合に関与しているアミノ酸残基が存在しており、CPVの宿主親和性を決定する中心的な領域であることが知られている (Strasheim ML, 1994)。VP2領域の300位のアミノ酸残基は、カプシドの三回対称軸のスパイク部分のショルダー部位に位置しており、TfRへの結合を担う宿主特異性の決定因子である (Allison AB, 2016)。VP2の389位のアミノ酸残基は、カプシド表面において300位の近傍に位置している (Parker JS, 1997)。また、93位と562位のアミノ酸残基は、CPVが他の哺乳動物種由来の培養細胞に適応するのに重要な残基であることが示唆されている (Allison AB, 2014)。

3-4 CPVの完全長DNAクローンの構築と組換えウイルスのレスキュー

シーケンス解析により、9985-46株のアミノ酸変異はNS及びVP領域に生じていることが明らかとなった。9985株と9985-46株の完全長DNAクローンを構築するために、それぞれの株由来のNS及びVP遺伝子領域を含むDNA断片と既知の配列を基に合成した5'及び3'末端の非翻訳領域のDNA断片をつなぎ合わせて、CPVの完全長ゲノムを含む分子クローンを作製した。それらのウイルスゲノムの非翻訳領域にも遺伝子変異が生じている可能性も考えられるが、9985-46株の弱毒化において重要な役割を有してはいないと考えている。なぜなら、分子生物学的手法で構築したウイルス

は、*in vitro* 及び *in vivo* においてそれぞれのオリジナルのウイルスと類似の生物学的性状を有していたからである。従って、9985-46 株の弱毒化は、5'及び3'末端の非翻訳領域ではなく、翻訳領域の変異がもたらしているものと考えた。

翻訳領域のうち NS と VP のどちらが主に弱毒化に寄与しているか調べるために、強毒の 9985 株の分子クローンに、弱毒の 9985-46 株の分子クローンの NS もしくは VP 遺伝子領域全体を組み換えたクローンを構築し、細胞培養によって組換えウイルスをレスキューし、犬での病原性を評価した。弱毒クローンの VP 領域を導入したウイルス (v9985-VP) は、犬に臨床症状を引き起こさなかったが、NS 領域を導入したウイルス (v9985-NS) は、発熱、食欲不振、体重減少を引き起こした。これらの結果から、9985-46 株の弱毒化には、VP に生じたアミノ酸置換が主に重要な役割を担っていると仮説を立て、弱毒化を担う VP 遺伝子領域の最小決定因子の同定に取り組むことにした。

病原性の損失を担う変異を同定するために、VP2 領域の N93K、G300V、T389N、V562L のアミノ酸置換のうち 1 か所または 2 か所の変異を、強毒の 9985 株に由来する感染性分子クローンに導入し、それらの感染性クローンを CRFK 細胞にトランスフェクションすることによって組換えウイルスを得た。レスキューされたウイルスは v9985、v9985-N93K、v9985-G300V、v9985-T389N、v9985-V562L、v9985-N93K/G300V、v9985-N93K/V562L、v9985-G300V/T389N、v9985-G300V/V562L、v9985-T389N/V562L 及び v9985-46 と命名した。p9985-N93K/T389N を導入した細胞からは、感染性ウイルスの産生が確認されなかった。

Fig. 1-2 に示すように、これらのレスキューウイルスは $10^{6.50}$ から $10^{8.19}$ TCID₅₀/ml の CRFK 細胞に対する感染価を示した。一方で、v9985-N93K は $10^{2.88}$ TCID₅₀/ml、v9985-N93K/V562L は $10^{5.00}$ TCID₅₀/ml と低い感染価しか得られなかった。シーケンズ解析によりレスキューウイルスの NS と VP の塩基配列が、トランスフェクションした分子クローンと同一であることを確認した。

3-5 培養細胞への親和性

9985 株と 9985-46 株の宿主親和性を調べるために、猫由来細胞として CRFK 細胞、犬由来細胞として A72 細胞への感染価を調べたところ、両株間で明らかな違いを認められた。9985 株の感染価は CRFK で $10^{6.50}$ TCID₅₀/ml、A72 で $10^{5.00}$ TCID₅₀/ml であった

が、9985-46 株は CRFK で $10^{8.19}$ TCID₅₀/ml、A72 で $10^{3.50}$ TCID₅₀/ml であった。これらの結果は、9985-46 株が猫由来細胞での連続継代により、猫由来細胞ではよく増幅するようになったものの、犬由来細胞ではあまり増幅しなくなったことを示しており、ウイルスの宿主親和性が変化したと考えられる。

組換えウイルスの宿主親和性の変化と弱毒化の関係を調べるために、CRFK 細胞と A72 細胞での感染価を比較した。Fig. 1-2 に示すように、組換え CPV の CRFK 細胞と A72 細胞での感染価の差は、A72 細胞への感染価の低下の程度により 3 グループに分けられた。すなわちグループ 1 は、A72 細胞での感染価が CRFK 細胞での感染価と比べて 10^4 以上低いグループ：v9985-46、v9985-VP、v9985-N93K/G300V、v9985-G300V/T389N、v9985-G300V/V562L で、9985-46 ワクチン株もこのグループに含まれる。グループ 2 は、A72 細胞での感染価のほうが $10^2 \sim 10^4$ の範囲で低いグループ：v9985-G300V、v9985-N93K/V562L、v9985-T389N/V562L。グループ 3 は、A72 細胞での感染価と CRFK 細胞での感染価の差が 10^2 未満のグループ：v9985、v9985-NS、v9985-T389N、v9985-V562L で、強毒株の 9985 株もこのグループに属する。これらことから、G300V は CPV の犬由来細胞への感染力の低下をもたらす十分条件であることが示された。

3-6 犬での病原性

9985-46 株の弱毒化に寄与する VP2 領域の最小決定因子を同定するために、犬での感染実験を行った。9985 株及び 9985-46 株と各組換えウイルス（v9985、v9985-46、v9985-G300V、v9985-T389N、v9985-V562L、v9985-N93K/G300V、v9985-N93K/V562L、v9985-G300V/T389N、v9985-G300V/V562L 及び v9985-T389N/V562L）は、接種した犬にウイルス排泄、ウイルス血症及び抗 CPV 中和抗体の誘導（v9985、v9985-46 及び v9985-G300V/T389N を除く各組換えウイルスの中和抗体価のデータは省略する）を認め、犬への感染が成立した。Table 1-3 に実験感染犬に認められた臨床症状をまとめた。臨床症状の程度により、組換えウイルスを接種した犬は 4 つのグループに分けられた。すなわちグループ 1 は、血便を伴う下痢、重篤な白血球減少症、回復の見込みのない重篤な状態を示したグループ：v9985、v9985-V562L。グループ 2 は、水溶性下痢を示したが回復したグループ：v9985-N93K/V562L、v9985-G300V/V562L。グループ 3 は、粘液便のような軽度な症状を示したグループ：v9985-

G300V、v9985-T389N、v9985-N93K/G300V、v9985-T389N/V562L。グループ 4 は、臨床症状を示さなかったグループ：v9985-46、v9985-G300V/T389N。

Fig. 1-4 (a) に臨床スコアを示した。臨床スコアは全ての犬が生存していた接種後 6 日目までのスコアを基に計算した。v9985-46、v9985-G300V、v9985-T389N、v9985-N93K/V562L、v9985-G300V/T389N 及び v9985-T389N/V562L を接種したグループの臨床スコアは、v9985 を接種したグループよりも有意に低かった ($P<0.05$)。1 か所または 2 か所の変異を導入した組換えウイルスの中では、v9985-G300V/T389N だけが犬に臨床症状を認めなかった。

3-7 病理組織学的検査

腸病変の程度をさらに調査するために、組換えウイルスを接種した犬の腸管の病理組織学的検査を行った。Fig. 1-4 (b) に病理組織学的スコアを示した。v9985-46、v9985-G300V、v9985-T389N、v9985-N93K/G300V、v9985-N93K/V562L、v9985-G300V/T389N 及び v9985-T389N/V562L を接種した犬のスコアは、v9985、v9985-V562L、v9985-G300V を接種した犬のスコアよりも明らかに低かった。重度の空腸・回腸の上皮細胞の壊死、腸陰窩の変性、結腸のリンパ濾胞の壊死（典型例を Fig. 1-3 に示す）は、v9985 を接種して重篤化した犬 2 頭と、v9985-V562L を接種して重篤化した犬 3 頭に認められた。中程度の空腸・回腸の上皮細胞の壊死、腸陰窩の変性、結腸のリンパ濾胞の壊死は、v9985-G300V/V562L を接種後 7 日目に安楽死させた犬 1 頭に認めた。v9985-46、v9985-G300V、v9985-T389N、v9985-N93K/G300V、v9985-N93K/V562L、v9985-G300V/T389N 及び v9985-T389N/V562L を接種した犬は軽度な病変しか認められなかった。これらの病理組織学的検査の結果は、腸病変の程度が臨床症状の程度と相関することを示している。

3-8 ウイルス排泄量

実験感染犬におけるウイルス増幅を評価するために、直腸からのウイルス排泄量を調べた。Fig. 1-5 は直腸スワブ中の組換え CPV の感染価の比較を示している。ウイルス排泄は組換えウイルスを接種した全ての犬に認められ、接種後 4 または 6 日目に排泄量のピークを示した。v9985-46 を接種した犬のピーク時のウイルス排泄量（接種後 6 日目： $10^{5.83}$ TCID₅₀/ml）は、v9985 を接種した犬のウイルス排泄量（接種後 4 日目：

10^{8.75} TCID₅₀/ml) より有意に低かった ($P < 0.05$)。犬に軽度もしくは全く臨床症状を示さず、軽度な腸病変だけを認めた v9985-T389N、v9985-G300V/T389N の接種犬のピーク時のウイルス排泄量 (それぞれ接種後 4 日目: 10^{6.67} TCID₅₀/ml、接種後 6 日目: 10^{6.07} TCID₅₀/ml) も、v9985 を接種した犬のウイルス排泄量よりも有意に低かった ($P < 0.05$)。これらの結果は、ウイルス排泄量の少なさとウイルスの弱毒化が一致することを示している。

3-9 血清学的検査

v9985-G300V/T389N の免疫原性を v9985 及び v9985-46 と比較するために、実験感染犬から得た血清中の強毒 9985 株に対する中和抗体価を測定した。接種後 14 日目を以降、v9985-G300V/T389N を接種した犬の中和抗体価は、弱毒の v9985-46 を接種した犬の中和抗体価と同等であった。それらの中和抗体価は強毒の v9985 を接種した犬の中和抗体価と比べて約 4 倍低かった (Fig. 1-6)。

3-10 組換えウイルスの遺伝的安定性

実験感染犬の直腸スワブ中の組換えウイルスの遺伝的な安定性を調べるために、PCR ダイレクトシーケンシングを行った。シーケンス解析により組換えウイルスは、犬体内で保存性が高く複製され、親株に逆戻りするような変異は生じていないことが確認された。

4 考察

弱毒ワクチン株の CPV9985-46 株は安全性が確かめられているものの、弱毒化を担う遺伝的な決定因子は明らかとなっていない。本研究は 9985-46 株に弱毒化をもたらしている遺伝的な最小決定因子を解明することを目的とした。

本研究では VP2 領域の G300V の置換だけでは十分ではないものの CPV の病原性を弱めることを示した。アミノ酸 300 位の置換は、CPV のレセプターへの結合性と、種々の哺乳動物への感染性に影響を与えることが知られている (Allison AB, 2016)。このことから、300 位のアミノ酸は、CPV の宿主細胞への親和性に重要な役割があるだけでなく、病原性においても重要であるということが示される。さらに、VP2 領域の T389N の置換も弱毒化を担っていることが確認された。これまでに 389 位の変異

が CPV にどのような生物学的性状の変化をもたらすかという報告はなかった。389 位のアミノ酸置換を CPV の感染性クローンに導入してウイルスのレスキューを試みても、複製能力のあるウイルスが産生されなかったことを示す報告はある (Parker JS, 1997) もの、本研究がアミノ酸 389 位の変異によって CPV の病原性の変化がもたらされることを示す初めての報告となった。

VP2 領域の G300V と T389N を同時に置換させると、さらに CPV を弱毒化させ、直腸からのウイルス排泄量も低下した。CPV の複製は初期に扁桃のリンパ組織で起こり、その後、血中を介して全身に広がる (Meunier PC, 1985)。CPV は幅広い組織に親和性を有するが (Nho WG, 1997)、増殖期の細胞を好むため、小腸陰窩の増殖期の細胞で複製される。それゆえ、腸での増殖性として直腸からのウイルス排泄量を調べることは、犬体内での増殖性を示す指標として捉えることができる。さらに、腸病変の重篤さは、全身の臨床兆候の重篤さと相関する (Meunier PC, 1985)。これらの理由から、G300V と T389N の同時置換は、CPV の増幅能力を低下させた結果、腸管への組織傷害を減少させ、弱毒化をもたらしたことが示唆される。

G300V と T389N は CPV の病原性だけでなく、宿主親和性にも変化を与えた。CPV カプシドは主に 8 つのコア β バリヤー・モチーフ鎖からなっている。このコア鎖は、いくつかの β 鎖とループを形成してカプシドの表面構造を構築している (Simpson AA, 2000; Tsao J, 1991)。さらに VP2 分子は 3 つが合わさることによって、ウイルス粒子における 3 回対称軸のスパイク部分のショルダー部位を構築している。ショルダー部位は宿主の TfR へ結合する部位である。VP2 の 300 位のアミノ酸残基はショルダー部位を構成する VP2 のモノマーの表面に露出しているループに位置する (Hueffer K, 2003; Hafenstein S, 2007; Allison AB, 2016; Parker JS, 1997; Govindasamy L, 2003)。一方、389 位のアミノ酸残基はショルダー部位の 300 位が位置する他のモノマーのループに位置している。しかし、T389 は 300 位が位置するループの E298 と水素結合を形成していることが報告されており (Parker, 1997; Govindasamy L, 2003)、389 位のアミノ酸置換による構造変化は 300 位のループの構造の変化にも影響する可能性が考えられる。従って、G300V と T389N が合わさることにより、それぞれが単独でもたらす構造変化よりも、さらにショルダー部位の構造変化をもたらした結果、CPV の宿主親和性の変化を増強させたと考えられる。

しかしながら、宿主細胞への親和性の低下だけでは、ウイルスの弱毒化の十分な説

明とはならないことを本研究は示している。G300V/V562L の変異ウイルスは、犬由来細胞への親和性が低下しているにも関わらず、犬での病原性は維持されたままであった。VP2 領域の 562 位のアミノ酸は、宿主親和性に重要な 564 位と 568 位のアミノ酸とカプシド表面上で近接しているため、CPV の猫由来細胞での増幅効率に影響を及ぼすことが示唆されている (Allison AB, 2014; Govindasamy L, 2003; Truyen U, 1996)。しかし今回の結果は、オリジナルの宿主の Tfr への結合性と病原性は区別されなければならないことを示唆する。Badgett ら (Badgett MR, 2002) は、CPV のオリジナルの宿主である犬の細胞で CPV を連続継代することによって弱毒株を作出し、遺伝子解析をした。80 代継代した弱毒株の VP2 遺伝子領域には、宿主親和性の変化をもたらす重要なアミノ酸残基として知られている 300 位及びその近傍のアミノ酸のいずれの置換も含んでいなかった。本研究と Badgett らの報告 (Badgett MR, 2002) から考察すると、CPV の弱毒化は、オリジナルの宿主とは異なる宿主への親和性の獲得ではなく、他のメカニズムによっても起こり得ることを示唆している。ここでは異なるウイルスの例を挙げて、他のメカニズムの可能性について論じる。CPV と同様にエンベロープを持たない正二十面体のウイルス粒子である伝染性ファブリキウス囊病ウイルス (IBDV) でも、ウイルスの主要カプシド蛋白のアミノ酸変異は、細胞への親和性と複製効率に影響をもたらしたが、ウイルスの弱毒化には必須ではなかったという例がある (Ben Abdeljelil N, 2014)。その他に CPV の弱毒化は、カプシドと Tfr よりも、その他のタンパク質との相互作用による可能性も考えられる。IBDV においては、ウイルス構造蛋白は、細胞のゴルジ体に存在するリボソームタンパク質や膜転写タンパク質と相互作用があることが知られている (Chen Y, 2016; Zhang L, 2015)。また、CPV の VP2 領域のアミノ酸変異がレセプター結合よりもウイルスゲノムの核への局在化に影響をもたらす可能性もある。例えば、マウスの微小ウイルスは、カプシド内に機能的な核移行シグナルを有している (Tu M, 2015)。これらの解釈は、ウイルスの弱毒化が単にレセプターへの親和性の変化によるもの以外のメカニズムが存在していることを示唆するものである。

当初、CPV9985-46 株の弱毒化は受容体への親和性の変化によるものと推論されたが、G300V/T389N と G300V/V562L が共に犬由来細胞への感染性の低下をもたらしたものの、*in vivo*での病原性は両者で明らかに異なった。ここで重要な点は、CPV の宿主親和性を決定付ける 300 位のアミノ酸変異だけでは、ウイルスの弱毒化には十分

ではないことである。本研究は、CPV9985-46 ワクチン株の弱毒化が 300 位のアミノ酸と相互に作用するさらなるアミノ酸置換によって生じることを明らかにした。すなわち G300V/T389N のアミノ酸置換は、宿主親和性の変化をもたらすことの他に、弱毒化を示す遺伝的な決定因子であることを示す。全ての弱毒 CPV ワクチン株が 300 位と 389 位のアミノ酸置換を有しているわけではないが (Badgett MR, 2002)、本研究は、9985-46 株が弱毒化したように、少なくとも 300 位と 389 位のアミノ酸置換が CPV に弱毒化をもたらすことを証明するものである。他の CPV 株にとっても、これらのアミノ酸置換が弱毒化の重要なアミノ酸残基となるかは今後の研究に期待される。

今回の研究では、変異ウイルスの病原性を調べるために自然感染経路での実験感染を行ったので、ワクチンとしての効果を確認するチャレンジ試験は実施しなかった。血清学的解析は G300V/T389N の両方の変異ウイルスが、弱毒ワクチン株の 9985-46 株と同等の中和抗体価の誘導をもたらしたことを示しているので、G300V/T389N の変異ウイルスは、ワクチンとして十分な免疫原性を有していることが確認された。今後、防御効果を評価するのにチャレンジ試験は必要だと考える。

5 小括

CPV9985-46 株は VP2 カプシド領域の 300 位と 389 位の 2 つのアミノ酸変異によって弱毒化されていることが証明された。このことは 9985-46 株のワクチン株を安定的に製造するための品質管理にとって重要な弱毒化関連遺伝子マーカーを提供する。また、古典的な盲継代法に代わる合理的な手法による次世代の CPV 弱毒生ワクチン株の作出法に有益な情報となるだろう。

Table 1-1 犬へのチャレンジ試験による CPV ワクチン 9985-46 株の感染防御効果

Immunization	Dog no.	Serum neutralizing antibody titer at day of challenge	Clinical signs after inoculation with virulent CPV*				
			Diarrhea	Leukopenia	Presence of other clinical signs†	Mortality	Viral shedding from rectum
9985-46 vaccine strain	1	1:3620	-	-	-	-	-
	2	1:640	-	-	-	-	-
	3	1:80	-	-	-	-	+
None	4	<1:10	+	-	+	-	+
	5	<1:10	+	+	+	+	+

* 強毒 CPV-2b 型 9690 株

† 発熱, 食欲不振, 沈鬱, 脱水

Table 1-2 CPV の部位特異的変異導入に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

Primer	Sequence (5' to 3')*	Position†	Orientation
AA93S	CAGTTAAaGGAAACATGGCTTTAGAT	3058-3083	Sense
AA93AS	TGTTTCcTTAACTGCAGTCTTATCC	3072-3047	Antisense
AA300S	GAAGGAGtTACTAACTTTGGTTATAT	3678-3704	Sense
AA300AS	GTTAGTAaCTCCTTCAGCTTGAGGCA	3692-3667	Antisense
AA389S	AAAACtAaCACAACAGGAGAAACACC	3945-3970	Sense
AA389AS	TGTTGTGtTAGTTTTTTGACCATGTT	3959-3934	Antisense
AA562S	TAACTATcTACCAAGTAATATTGGAG	4463-4488	Sense
AA562AS	CTTGGTAgATAGTTAAATTGGTTATC	4477-4452	Antisense

* 導入した変異を小文字で表す

† CPV-d (GenBank Accession no. M38245) ゲノムの位置に基づく

Table 1-3 各 CPV を接種した犬の臨床観察

Group	Virus	Inoculum*	Diarrhea	Leukopenia	Presence of signs†	Mortality	Days post-infection euthanasia/necropsy
A	9985 parental strain	10 ^{5.5}	4/4	2/4	4/4	1/4	8, 14, 14, 14
B	9985-46 vaccine strain	10 ^{7.5}	0/4	0/4	0/4	0/4	14, 14, 14, 14
C	v9985-NS	10 ^{5.0}	0/3	0/3	2/3	0/3	14, 14, 14
D	v9985-VP	10 ^{8.0}	0/2	0/2	0/2	0/2	14, 14
E	v9985	10 ^{6.5}	4/4	4/4	4/4	2/4	7, 7, 14, 14
F	v9985-46	10 ^{6.5}	0/3	0/3	0/3	0/3	7, 11, 14
G	v9985-G300V	10 ^{6.5}	1/4	0/4	1/4	0/4	7, 11, 14, 14
H	v9985-T389N	10 ^{6.5}	0/3	0/3	2/3	0/3	7, 14, 14
I	v9985-V562L	10 ^{6.5}	3/3	3/3	3/3	3/3	6, 6, 6
J	v9985-N93K/G300V	10 ^{6.5}	1/3	0/3	3/3	0/3	7, 14, 14
K	v9985-N93K/V562L	10 ^{5.0}	3/3	1/3	3/3	0/3	7, 14, 14
L	v9985-G300V/T389N	10 ^{6.5}	0/7	0/7	0/7	0/7	7, 14, 14, 14, 14, 14, 14
M	v9985-G300V/V562L	10 ^{6.5}	3/3	2/3	3/3	0/3	7, 14, 14
N	v9985-T389N/V562L	10 ^{6.5}	0/3	0/3	3/3	0/3	7, 14, 14

* 接種量：TCID₅₀/ml × 5 ml

† 発熱，食欲不振，沈鬱，脱水

Table 1-4 9985-46 株に認められた 9985 株から変異した VP2 領域の塩基とアミノ酸

Nucleotide position*	Nucleotide difference		Amino acid position	Amino acid substitution	
	9985	9985-46		9985	9985-46
3062	C	A	93	Asn	Lys
3682	G	T	300	Gly	Val
3949	C	A	389	Thr	Asn
4467	G	C	562	Val	Leu

* pCPVY 1 ゲノム (GenBank accession no. D26079) に基づく位置

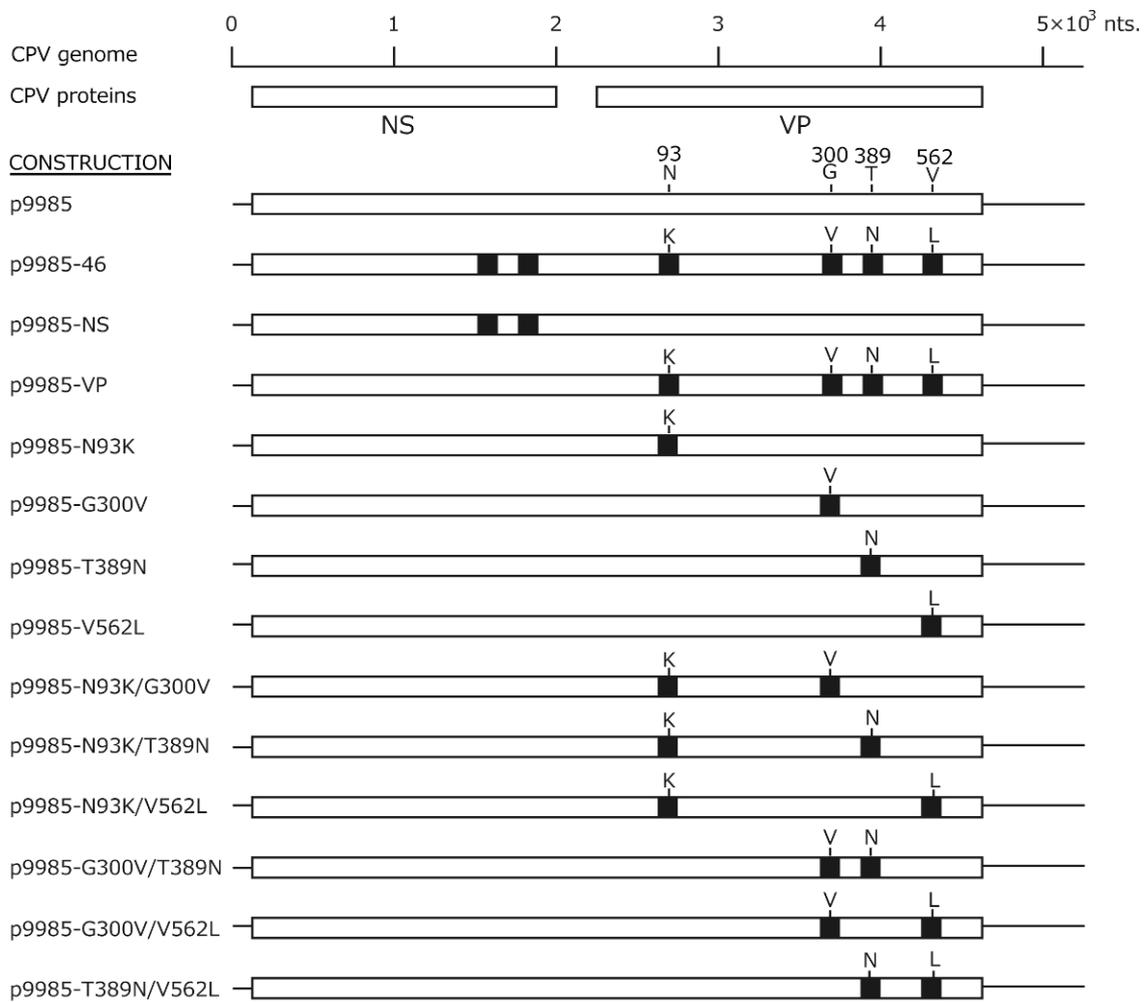


Fig. 1-1 組換え CPV の感染性分子クローンの構築図

非構造蛋白 (NS) とカプシド蛋白 (VP) の ORF を図示している。白抜き部分は 9985 株に由来する塩基配列を示す。黒塗部分は 9985 株と異なる 9985-46 株のアミノ酸置換を示し、アルファベットは置換したアミノ酸を一文字表記で表している。

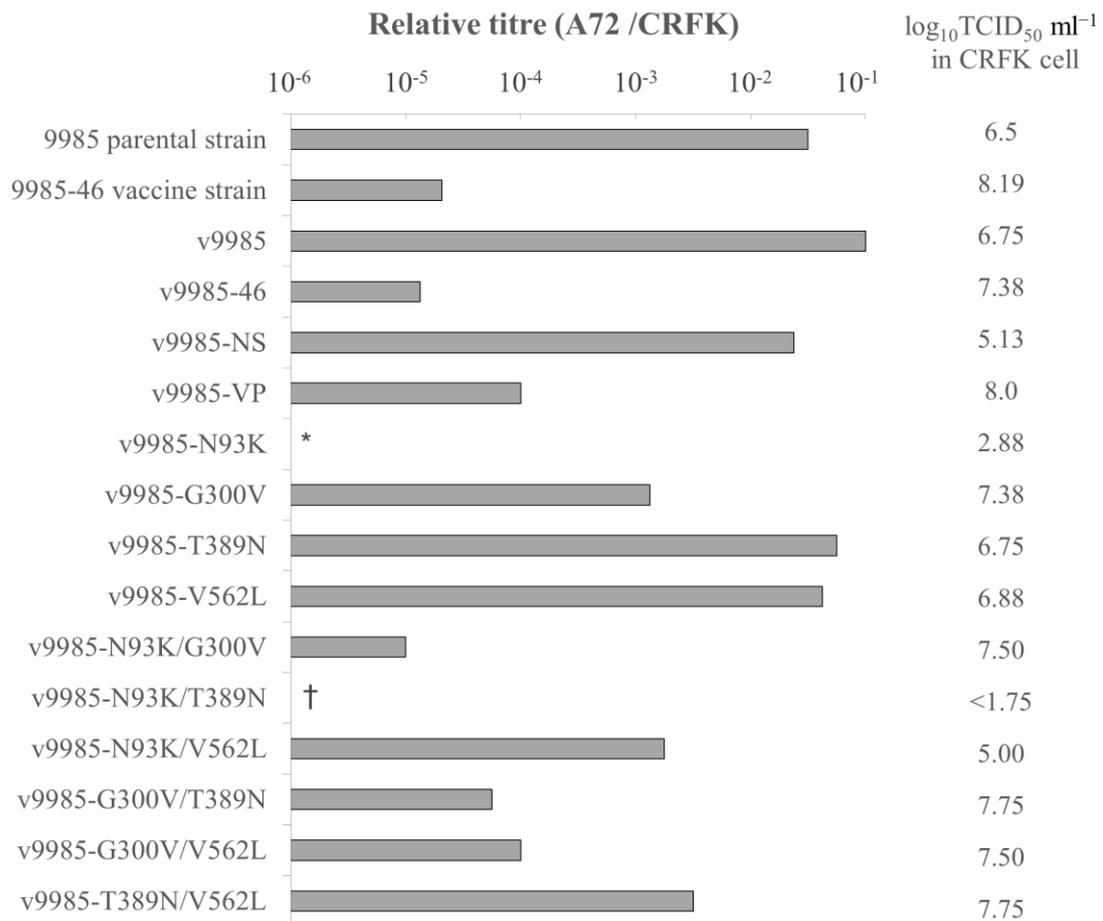


Fig. 1-2 猫由来の CRFK 細胞と犬由来の A72 細胞に対する各 CPV の感染価の比較
in vitro における宿主域を CRFK 細胞と A72 細胞の感染価 (TCID₅₀) により評価し
 た。各ウイルスについて A72 細胞と CRFK 細胞に対する感染価の比を示している。
 * : A72 細胞での感染価が得られなかった。 † : 感染性ウイルスが得られなかった。

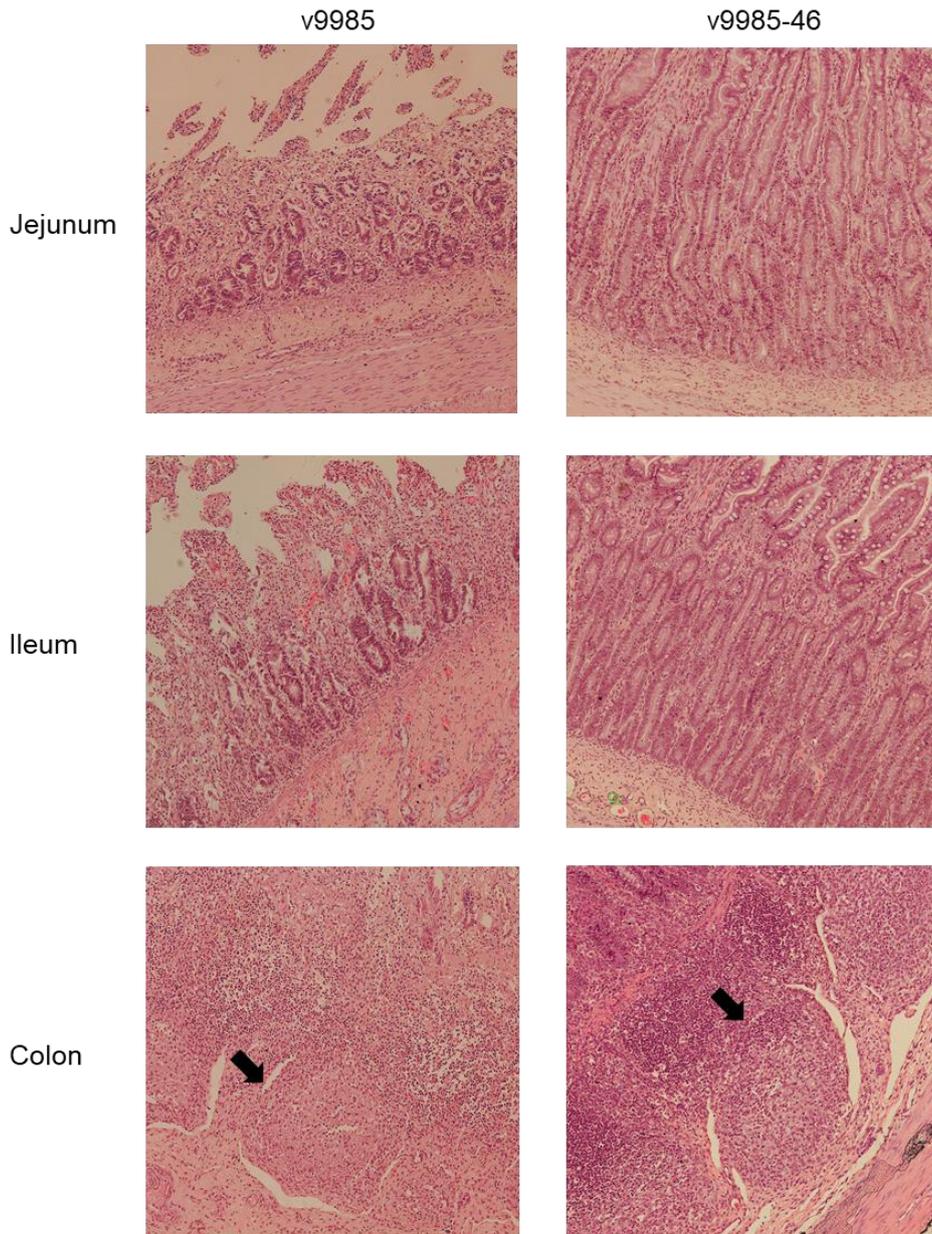


Fig. 1-3 組換え CPV を実験感染させた犬の腸管の病理組織像

左図：v9985 の接種後 7 日目に重篤化した犬に認められた空腸及び回腸の上皮細胞の壊死、腸陰窩の変性、結腸のリンパ濾胞の壊死（図中矢印）を示す重度な病変の病理組織像。

右図：v9985-46 の接種後 7 日目に安楽死させた犬の空腸及び回腸の正常な上皮細胞及び腸陰窩、結腸の軽度なリンパ濾胞の壊死（図中矢印）を示す病理組織像。

上記の病理組織像を重度な例または正常及び軽度な例として、病理組織学的スコアの評価の指標とした。

写真：ヘマトキシリン・エオジン染色、倍率 100 倍

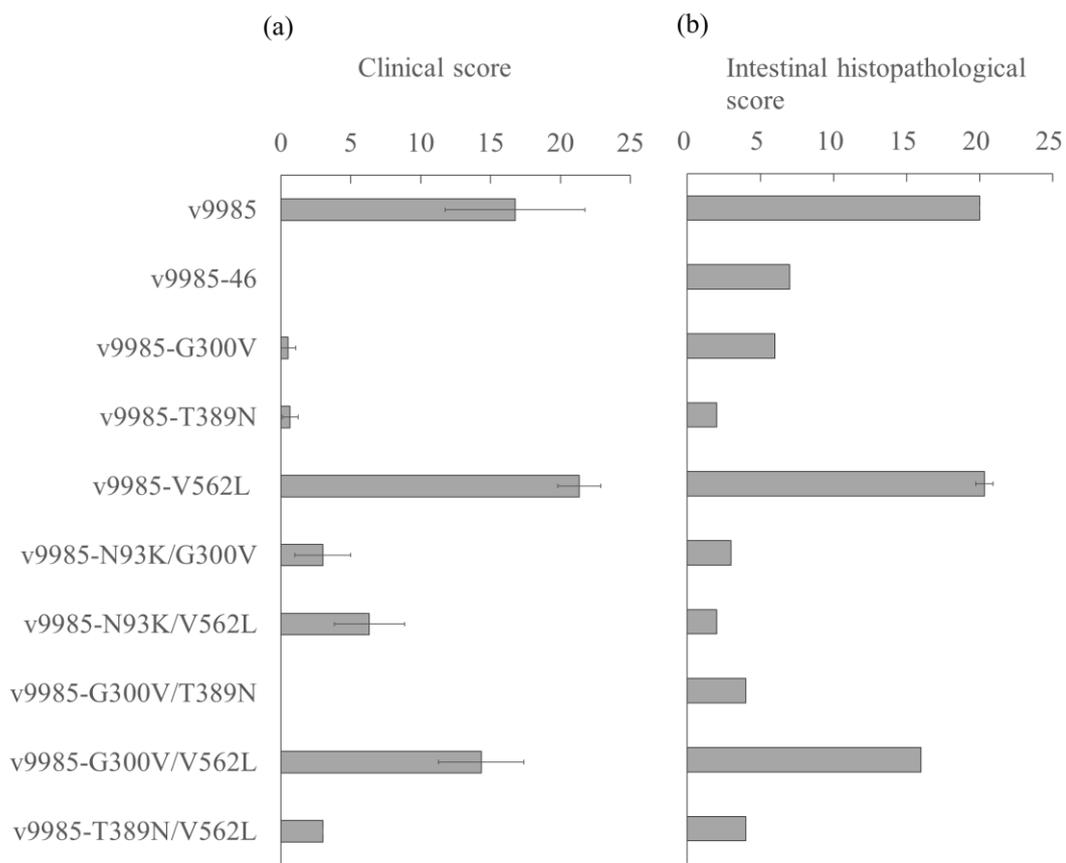


Fig. 1-4

(a) 各群における組換え CPV を接種した犬の感染後 0~6 日目までの臨床スコアの合計値の平均値。

(b) 組換え CPV を接種した犬の腸管の病理組織学的スコア。v9985 接種群は接種後 7 日目に重篤化した犬 2 頭の平均スコアを示す。v9985-V562L 接種群は接種後 6 日目に重篤化した犬 3 頭の平均スコアを示す。その他の群は接種後 7 日目に安楽死させたそれぞれ 1 頭のスコアを示す。図中のエラーバーは標準誤差を表す。

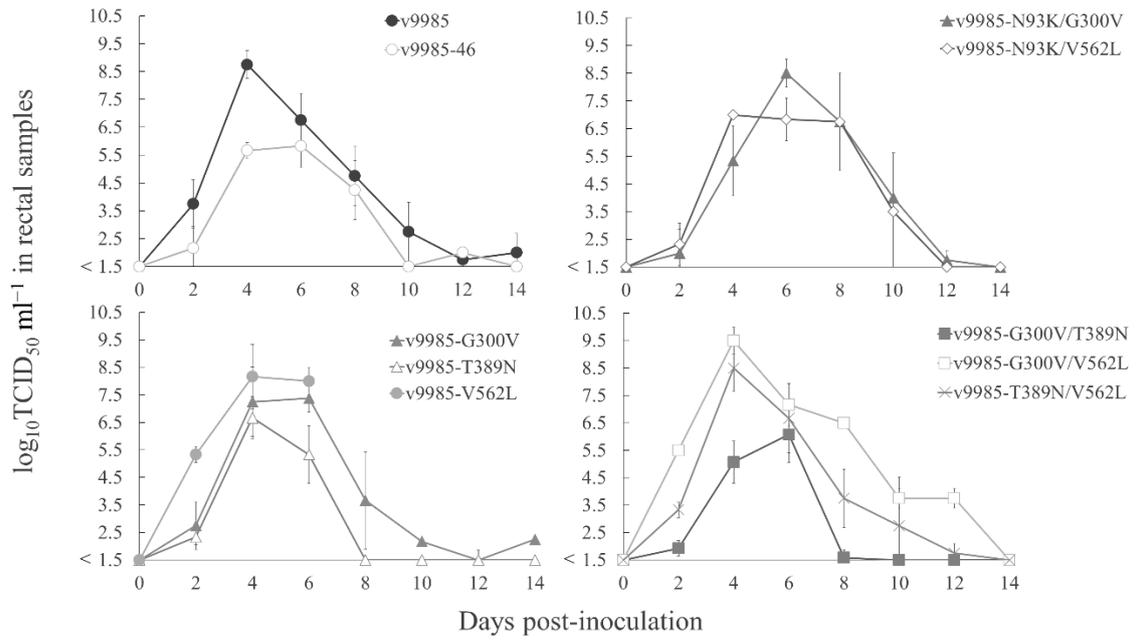


Fig. 1-5 組換え CPV を接種した犬の直腸からのウイルス排泄量の経時的な変化
 各群のウイルス感染価 (TCID₅₀) の幾何平均値と標準誤差 (エラーバー) を示す。
 接種後 6 日目までは全ての犬から直腸サンプルを集めている。6 日目以降は、病理組織学的検査のために安楽死させたため、Table 1-3 に示すようにサンプル数が減少している。

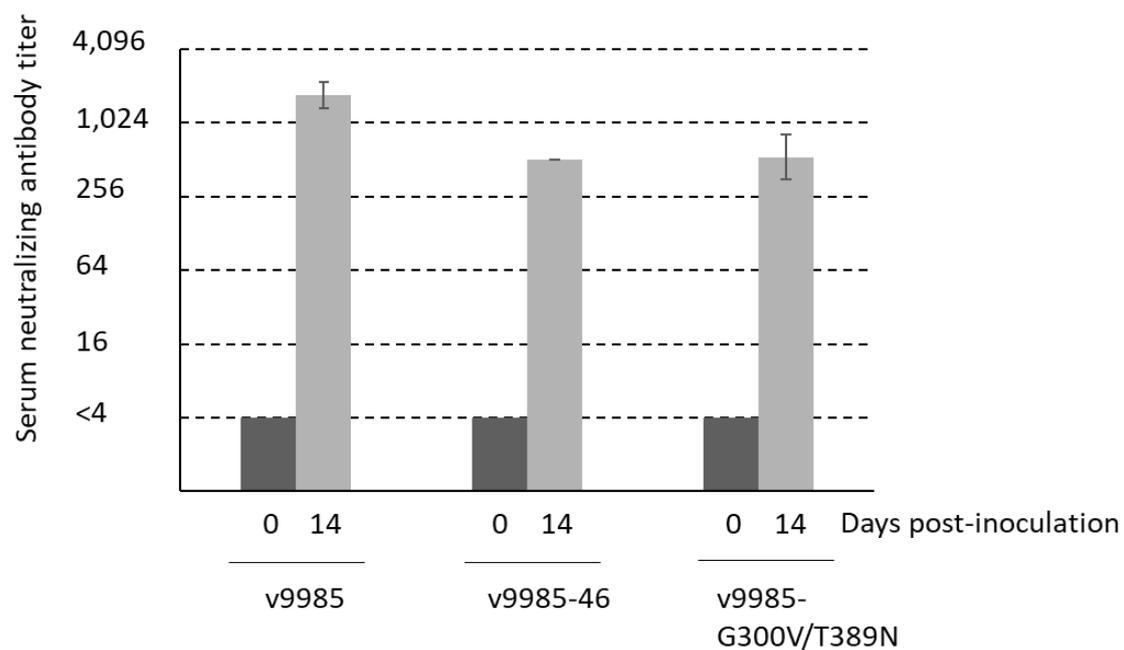


Fig. 1-6 v9985 接種群、v9985-46 接種群及び v9985-G300V/T389N 接種群の血清中和抗体価の平均値

エラーバーは標準誤差を表す。v9985 接種群、v9985-46 接種群及び v9985-G300V/T389N 接種群の接種後 0 及び 14 日目の抗体価はそれぞれ 2、1、6 頭の犬について測定している。

第 2 章

ジステンパーウイルスの実験感染系における リアルタイム RT-PCR 法の利用

本章は下記の出版済み論文から構成される。

Sehata G, Sato H, Ito T, Imaizumi Y, Noro T and Oishi E, 2015: Use of quantitative real-time RT-PCR to investigate the correlation between viremia and viral shedding of canine distemper virus, and infection outcomes in experimentally infected dogs.

Journal of Veterinary Medical Science, 77, 851-855, doi:10.1292/jvms.14-0066

1 緒言

CDV の実験感染系においてウイルス動態を調査するために、様々なウイルス検出法が用いられている。例えば、モルビリウイルスのレセプターが発現しており CDV に高感受性の Vero-dogSLAMtag (Vero-DST) 細胞を用いたウイルス分離 (Seki, 2003) や、蛍光抗体法、RT-PCR 法 (Kim D, 2006; Kimoto T, 1986; Lan NT, 2005; Metzler AE, 1980) などがある。しかし、これらの方法には不利な点はいくつかあり、ウイルス分離は手技に労力と時間を要し、蛍光抗体法は検出感度が優れず、従来の RT-PCR 法は定量性に欠く。CDV を検出するリアルタイム RT-PCR 法が確立され、*in vitro* で培養ウイルスや野外の臨床サンプルにおいて、感度が高い定量的手法であることが示されている (Elia G, 2006; Scagliarini A, 2007)。その一方で、CDV の実験感染においてリアルタイム RT-PCR 法を用いたウイルス動態を調査した報告はなく、検出されるウイルス RNA が、CDV の感染後体内でどのような推移を示し、どのように病態発現と関係しているかということが不明である。本研究は CDV 野外分離株を実験感染させた犬の末梢血中と鼻腔及び直腸から排泄される CDV RNA 量を定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いて測定し、感染経過における CDV RNA 量の増減と臨床症状の発現時期との相関性を調査した。

2 材料と方法

2-1 細胞とウイルス

CDV866 株は、1997 年に京都市で神経症状を伴いジステンパーを発症した犬の末梢血単核球から Vero 細胞を用いて分離された (Hatano M, 2001)。本株は H 遺伝子領域の分子系統樹解析により、AsiaH1 型に属した。試験に供した株は、野外材料の 1 代目のウイルス分離から数えて Vero 細胞で 5 代継代された。Vero-DST 細胞とオリジナルの Vero 細胞は、各試料のウイルスタイトレーションと血清中和 (SN) 試験に用いた。Vero-DST 細胞は、九州大学医学部ウイルス学教室の柳 雄介教授から分与された。

2-2 実験感染

2 か月齢の CDV 抗体陰性のビーグル犬 12 頭を株式会社微生物化学研究所の繁殖場から入手し、 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml の CDV 866 株のウイルス培養液を 1 ml ずつ経口及び経鼻投与した。臨床症状の観察、直腸温、体重を毎日記録し、白血球数の測定、リアルタ

タイム RT-PCR 法及びウイルスタイトレーションに供するために全血、直腸及び鼻腔スワブを 1 日おきに、血清中和試験に供するために血清を 7 日おきに採取した。リアルタイム RT-PCR 法とウイルスタイトレーションに用いたサンプルは、使用直前まで -80°C に保存した。

2-3 リアルタイム RT-PCR 法

定量的リアルタイム RT-PCR 法は、既報 (Scagliarini A, 2007) に従い、高度に保存された領域である P 遺伝子領域を増幅するプライマーと同領域のプローブを用いた。これらのプライマーとプローブを用いたリアルタイム PCR が CDV 株間で差異なく検出できることは既報によって確かめられている (Scagliarini A, 2007)。テンプレート RNA は QIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン) を用いて使用説明書に従い、 $140\ \mu\text{l}$ の全血、直腸及び鼻腔スワブ液から抽出した。リアルタイム RT-PCR 法の反応試薬には、PrimeScript One-Step RT-PCR Kit (タカラバイオ) を用い、サーマルサイクラーには Mx3005P Real-Time QPCR System (ストラタジーン) を用いた。リアルタイム RT-PCR 反応液は、PrimeScript One-Step RT-PCR Kit の反応試薬に、 $600\ \text{nM}$ のプライマーペア (qCDVF4 and qCDVR3)、 $400\ \text{nM}$ の TaqMan Probe 3CDV (Scagliarini A, 2007) 及び $1\ \mu\text{l}$ の抽出したテンプレート RNA を加え、 $25\ \mu\text{l}$ の混合液とした。反応条件は、 42°C 5 分の逆転写反応、 95°C 10 分の熱処理に続き、 95°C 5 秒、 56°C 30 秒のサイクルを 45 回繰り返した。蛍光波長の読取は、アニーリングステップ中に行った。標準曲線を作成するために、スタンダード RNA を調製した。P 遺伝子領域を増幅するプライマーペア (5' -GAG TTC TCC TGT CTA TAA TGA TAG-3' 及び 5' -TAG TTG ACC TTT TGA GCC CA-3') を用いた RT-PCR により、CDV866 株の P 遺伝子を増幅した。増幅した DNA 断片を、T7 プロモーターを有する pTA2 ベクター (東洋紡) に TA クローニングし、*in vitro* Transcription T7 Kit (タカラバイオ) を用いて P 遺伝子領域の DNA から RNA を転写した。得られた反応液を DNase (RNase-Free DNase Set; キアゲン) 処理することにより、プラスミド DNA を分解し、RNeasy Mini Kit (キアゲン) により RNA を精製した。分光光度計 (GeneQuant II RNA/DNA Calculator; GE ヘルスケア) により溶液の吸光度を測定し、RNA 濃度を測定した。得られたスタンダード RNA は、希釈用バッファー (EASY Dilution; タカラバイオ) を用いて 10 倍階段希釈し、 $10\ \mu\text{l}$ ずつ小分けして使用直前まで -80°C に保

存した。スタンダード RNA を 10 倍階段希釈してリアルタイム RT-PCR 法を実施し、直線性のある濃度を調べたところ、 $10^{2\sim 9}$ までの範囲で直線性の高い検量線が作成された。このときの、PCR の増幅効率 は 100.7% であり、検量線の相関係数 (R^2) は 0.999 であった。

2-4 ウイルスタイトレーション

ウイルスタイトレーションは Vero-DST 細胞を用いて行った。ローラーチューブ内に単層を形成した Vero-DST 細胞に、直腸及び鼻腔スワブをイーグル最小必須培地 (EMEM, 3,000 U/ml ペニシリン、300 μ g/ml ストレプトマイシン、30 μ g/ml カナマイシン及び 0.6 μ g/ml アンホテリシン B を含む) で 10 倍階段希釈した各希釈液 0.1 ml ずつを接種し、37 °C で 60 分間吸着させた。吸着後、接種液を除き、EMEM で一度培養細胞を洗浄した後、2% FBS を含む新しい EMEM を 0.5 ml ずつ加えた。37 °C で回転培養させ、細胞変性効果 (CPE) を観察した。CPE を認めた細胞を CDV 感染陽性とみなし、それぞれのサンプル中のウイルス感染価 ($TCID_{50}/ml$) を Reed-Muench 法 (Burlison FG, 1992) を用いて算出した。

2-5 血清中和試験

血清中和 (SN) 試験は Vero 細胞と、CDV866 株を Vero 細胞で継代して馴化させた CDV 株を中和用ウイルスとして用い、マイクロプレート法により実施した。すなわち、56 °C で 30 分間処理し非働化した被検血清を 4 倍階段希釈し、希釈血清と 200 $TCID_{50}/0.05ml$ の中和用ウイルスを等量混合し 22 °C で 60 分間感作させた。血清 1 希釈当たり 4 ウェルの Vero 細胞に 0.05 ml ずつ接種し、37 °C、5% CO_2 下で 7 日間培養した。CPE を認めなかったウェルを中和抗体陽性とみなし、Reed-Muench 法 (Burlison FG, 1992) により SN 抗体価を算出した。

2-6 統計解析

実験感染犬におけるウイルス RNA の経時的変化の統計解析には、一元配置分散分析とチューキー法による多重比較検定を行った。実験感染犬におけるリアルタイム RT-PCR 法により定量されるウイルス RNA 量とウイルスタイトレーションにより定量されるウイルス感染価の相間を評価するために、ピアソン相関係数 (r) を求め、 r の

統計学的有意差を算出した。P値が0.05未満のとき有意差ありとした。

3 結果

3-1 実験感染犬の病態発現

CDV866株を実験感染させた12頭の犬はジステンパーの臨床兆候である食欲不振、元気消失、体重減少、発熱、リンパ球減少症、下痢、目やに又は皮膚の湿疹といった種々の症状を示した（Table 2-1）。12頭のうち1頭（No.2）は、接種後16日目に病態が重篤化したため安楽死させた。No.7の犬は、軽度な皮膚の湿疹の症状を示しただけであった。12頭の犬の臨床症状の発現ステージは前半と後半に大きく二つに分けられた。前半の接種後3から10日の間には、食欲不振、発熱、白血球減少症の全身症状が認められていた。接種後9日目以降は下痢や目やに、顎・股間・肛門周囲の皮膚の湿疹といった局所症状が発現した。元気消失や一過性の体重減少は前述した症状に付随して認められ、前半または後半のどちらかに偏って認められることはなかった。今回、実験感染させた犬に発咳及びくしゃみといった呼吸器症状やチック、けいれんといった神経症状は観察期間中認められなかった。

3-2 実験感染犬のウイルス血症及びウイルス排泄

実験感染犬の末梢血と鼻腔及び直腸スワブ液中のリアルタイムRT-PCR法とウイルスタイトレーションによるCDVの定量をFig. 2-1に示した。

リアルタイムRT-PCR法は、ウイルスタイトレーションが陽性であった直腸及び鼻腔スワブの検体全てに対し陽性を示し、ウイルス感染価を認めた検体は必ずリアルタイムRT-PCR法で検出された。両者によってCDVが検出された頭数および時期を比較すると、ウイルスタイトレーションは、12頭中12頭の直腸、8頭の鼻腔から排泄ウイルスを検出した。直腸からのウイルス排泄は接種後4から14日の間に認め、1頭当たりの平均検出期間は2.2日であった。鼻腔スワブからは、接種後6から16日の間に認め、1頭当たりの平均検出期間は1.3日であった。一方、リアルタイムRT-PCR法は直腸、鼻腔共に12頭すべての犬から検出し、1頭当たりの平均検出期間はそれぞれ7.9日と7.5日であった。検出期間は直腸が接種後4から20日の間、鼻腔が接種後2から20日の間に検出された。

リアルタイムRT-PCR法によるウイルスRNA量の推移を統計学的に評価するため

に、接種後の各日で12頭のウイルスRNA量の平均値を算出して評価した。全血サンプルからのウイルスRNAの検出は、12頭の犬に認められ、12頭を平均すると接種後2日目から検出され、6日目にウイルスRNA量のピークを認めた。ピーク時のウイルスRNA量は、接種後12日目までに明らかな減少を認めた（6日目と12日目の比較： $P<0.05$ ）。12日目以降は減少を認めず、ウイルスRNA量の持続を認めた（10日目と20日目の比較： $P>0.05$ ）。直腸と鼻腔サンプルのウイルスRNA量は、いずれも接種後2日目から上昇し、それぞれ10日目、10及び12日目にピークに達した。その後、直腸と鼻腔サンプルのウイルスRNA量は、それぞれ16日目、18日目まで明らかな減少は認めず持続した（直腸：10日目と16日目の比較、鼻腔：10日目と18日目の比較：いずれも $P>0.05$ ）。

次にウイルスRNAと感染性ウイルスの相間性を調べた。12頭の犬の直腸及び鼻腔サンプルを用いたCDVの検出において、20日間の試験期間に得た全てのサンプルについて、ウイルスRNA量とウイルス感染価の相関係数を求めると、直腸サンプルで $r=0.58$ 、鼻腔サンプルで $r=0.48$ と非常に低い相関を示した。これは多くのサンプルで、感染性ウイルスが検出されないがウイルスRNAが検出されたためと考えられる。ウイルスRNAのピーク付近に得られたサンプルにはウイルス感染価を認めるサンプルが多かったため、ウイルスRNA量がピーク時のサンプルだけに絞って、ウイルスRNA量とウイルス感染価の相関係数を求めると、直腸サンプルで $r=0.78$ 、鼻腔サンプルで $r=0.80$ であり高い相関を示した。さらにピーク時の前後2日間のサンプルまで対象を広げると、両者の相関係数は、直腸で $r=0.82$ であり、20日間の試験期間全体を対象にした場合（前述： $r=0.58$ ）と比べると、有意に高かった（ $P<0.05$ ）。このことは、感染性ウイルスが検出された範囲にある時期のサンプルに限って、ウイルスRNA量とウイルス感染価は有意に相関することを示している。

3-3 血清学的検査

血清学的検査において、12頭すべてに接種後64～512倍のCDVに対するSN抗体価の上昇を認めた（データ示さず）。

4 考察

CDVの実験感染系において、リアルタイムRT-PCR法はウイルス感染価の検出よ

りも多くの時点でウイルスを検出した。*in vitro* のウイルス培養液をサンプルとした場合、リアルタイム RT-PCR 法と Vero-DST 細胞を用いたウイルスタイトレーションは同等の感度で CDV を検出した（データ示さず）が、本研究の実験感染犬においては、ウイルスタイトレーションで陰性であったサンプルも、リアルタイム RT-PCR 法ではウイルス RNA を検出した。従って、*in vivo* における CDV の検出には、リアルタイム RT-PCR 法のほうが感度が高いことが示された。*in vivo* においてリアルタイム RT-PCR 法の感度が高かった理由としては、ウイルス粒子の中にパッケージされていない RNA や感染細胞中に存在しているウイルス RNA も検出している可能性が考えられる。Scagliarini らも（Scagliarini A, 2007）、リアルタイム RT-PCR 法は組織培養細胞中の非感染性のウイルスに由来する CDV RNA を検出することを報告している。さらに、血液サンプルからのウイルス RNA の検出は、血清中の中和抗体が存在しているにも関わらず、実験期間の終了まで認められた。ジステンパーのウイルス血症はセルフリーのウイルスおよびリンパ球に感染したウイルスにより生じるとされており、中和抗体はセルフリーのウイルスの排除には有効である（Beineke A, 2009; Krakowka S, 1980b）。このことから本成績を考察すると、SN 抗体の出現以降の血液サンプル中のウイルス RNA は、細胞介在性のウイルス血症に由来していると考えられる。既報によると、末梢血のセルフリーのウイルスが中和抗体によって排除されても、CDV が感染したリンパ球及びマクロファージは消化管や気管などの局所組織の表面上皮細胞に移行し、感染ウイルスを運ぶことが示されている（Beineke A, 2009; Krakowka S, 1975）。本研究で認められた直腸や鼻腔スワブからのウイルス RNA の持続的な検出も、局所組織の上皮細胞内での持続的な感染によるものであるかもしれない。

末梢血中及び局所から排泄されるウイルス RNA 量のピークは臨床症状の発現時期を良く反映した。CDV866 株を感染させた 12 頭の犬は、各々で様々な臨床症状及び経過を示したが、症状を認めた犬においては、血中のウイルス RNA 量のピークが、食欲不振、発熱、白血球減少といった全身性症状の発現時期と一致し、直腸や鼻腔の局所から検出されたウイルス RNA 量のピークが、下痢、目ヤニ、皮膚の湿疹といった局所症状の発現時期と一致した。さらに直腸及び鼻腔スワブ中のピーク時のウイルス RNA 量は、組織培養におけるウイルス感染価と良く相関した。これらの結果から、ウイルス RNA には非感染性ウイルスに由来する RNA も含まれるものの、ピーク時において定量されるウイルス RNA のコピー数は、体内で増殖する感染性ウイルス量とよく一

致することが明らかになった。

一方で、末梢血中及び局所排泄のウイルス RNA のピーク時においても臨床症状を示さなかった犬も認められた。また、1 頭 (No. 2) は全身性の症状を認め重篤化に至った一方で 1 頭 (No. 7) は軽度な皮膚の湿疹を認めただけに留まり、個体間で様々な程度と種類の臨床経過を辿った。しかし、末梢血中及び局所から検出される CDV RNA の量と経時的变化は 12 頭で大きく異なることはなく、いずれの個体でも同様に推移した。このことは、リアルタイム RT-PCR 法が重篤または軽度な症状を示した犬においても、同様に CDV の動態を検出及び定量できることを示している。同時に末梢血及び局所組織でのウイルス増幅と臨床症状の発現程度は相間しないことを示唆する。他のパラミクソウイルスでは、臨床症状が認められなくてもウイルス RNA の排泄が認められている報告がある (de Oliveira Torres Carrasco A, 2008)。パラミクソウイルスの分子生物学的な病原性メカニズムの解析によると、病態発現はウイルス側と宿主側の双方の因子が協同して生じており、ウイルスの膜融合タンパク (fusion protein) の解離や感染細胞同士の細胞融合に寄与する宿主側のプロテアーゼの存在が密接に関連している (de Leeuw OS, 2005; Weidmann A, 2000)。この宿主側の要因が、局所組織でウイルスが複製しているにも関わらず、病態を起こさないことの説明になるかもしれない。これらの関係を説明するには、その他の CDV 株での実験感染や自然感染例でのさらなる調査が必要である。

5 小括

リアルタイム RT-PCR 法は、CDV の実験感染犬において組織培養を用いたウイルスタイトレーションよりも明らかに感度良く CDV を検出及び定量したため、実験感染犬の臨床症状の発現程度に関わらず CDV を検出することができた。またウイルス RNA 量のピーク時においてウイルス感染価と相関することを示し、ウイルス RNA 量のピークが病態発現時期と一致することを示した。このことはウイルス RNA をモニターすることにより末梢血や局所排泄中のアクティブな CDV 動態を調査できることを示している。リアルタイム RT-PCR 法を用いた CDV RNA の定量は、CDV の病原性解析やチャレンジ試験によるワクチンの防御効果を評価するのに有用なものである。

Table 2-1 CDV866 株を実験感染させた犬の臨床症状

Dog	Clinical signs (days post-infection)							
	Anorexia	Weakness	Weight loss ^{a)}	Hyperthermia ^{b)}	Lymphopenia ^{c)}	Diarrhea	Eye discharge	Skin rash
1	5-15	- ^{d)}	9, 10	5	8	10-14	16	-
2 ^{e)}	5-16	5, 13-16	5, 13-16	3-5, 9	-	10-14	14-16	-
3	5-15	-	9-11, 14	-	8	10-14	15, 16	-
4	6, 7, 11	-	11	6, 7, 10	8	10-12	10-13	11-13
5	6, 7, 11	-	-	4, 5, 10	-	10-12	-	12-19
6	-	10	-	9, 10	-	9-11	10, 13, 14, 20	-
7	-	-	-	-	-	-	-	10-20
8	-	-	-	-	10	-	-	19, 20
9	-	4,5	-	4	6	19, 20	-	-
10	-	-	4	4,5	6, 10	19, 20	-	9-20
11	-	-	-	-	6	-	-	11,12
12	-	-	-	6	8	-	-	9-20

a) 体重減少：前日比 5%以上減

b) 発熱：39.5 °C以上

c) 白血球減少症：6,000/ μ l 未満

d) -：臨床症状を認めない

e) 個体番号 2 の犬は感染後 16 日に重篤な症状を示したため、設定した人道的エンドポイントにより安楽死させた。

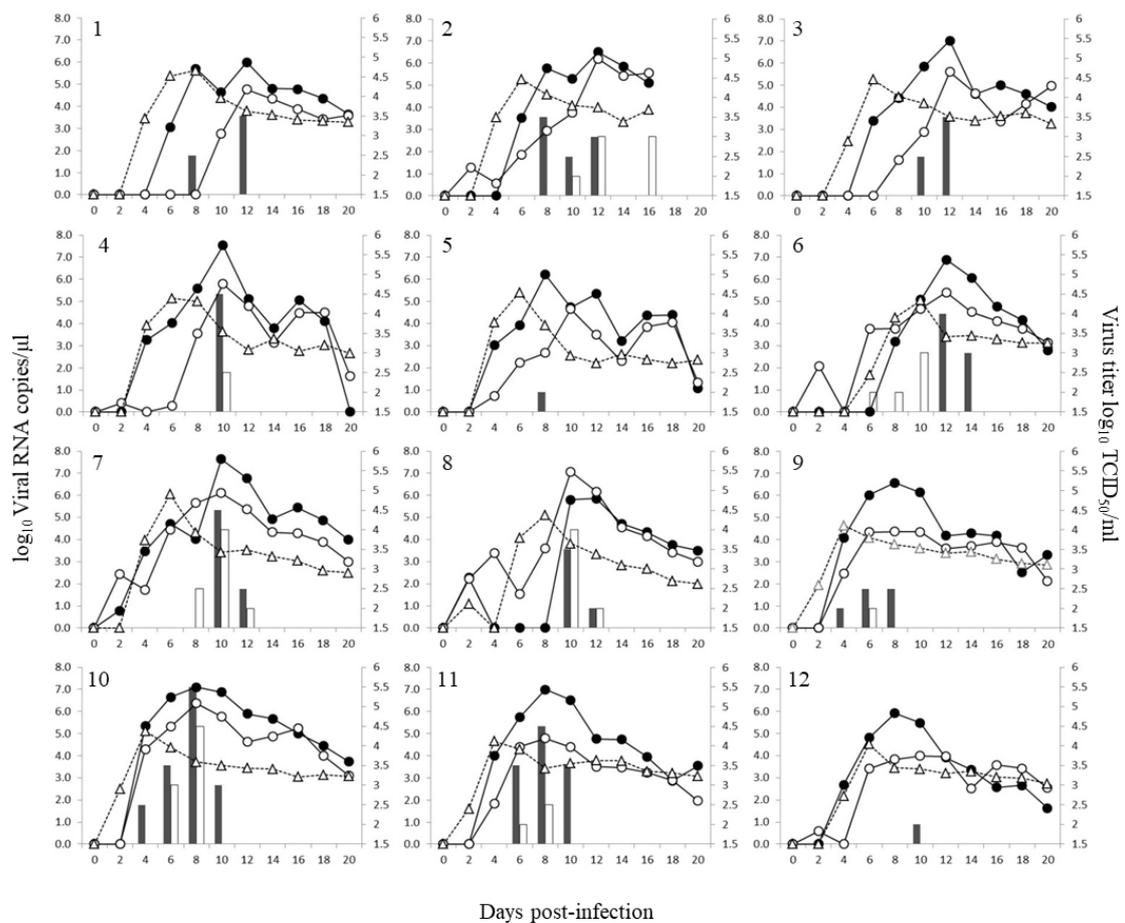


Fig. 2-1 12頭の実験感染犬の全血、直腸及び鼻腔サンプルからリアルタイム RT-PCR法を用いて定量した CDV RNA と直腸及び鼻腔サンプルからウイルスタイトレーションにより検出した CDV 感染価

折れ線グラフはウイルス RNA 量 (copies/ μ l)、棒グラフは感染性ウイルス量 (TCID₅₀/ml) を表す。黒塗り丸印と黒塗り棒グラフは直腸サンプルを、白抜き丸印と白抜き棒グラフは鼻腔サンプルを、白抜き三角印は全血サンプルを表す。リアルタイム RT-PCR 法の定量性の下限は 2.0 log₁₀ copies/ μ l であった。

第3章

国内における犬呼吸器感染症の病原学的調査

本章は下記の出版済み論文から構成される。

勢籟 剛, 若月 章, 増渕勝夫, 高橋拓男, 国分輝秋, 2010: 国内における犬呼吸器感染症の病原学的調査, *日本獣医師会雑誌*, 63, 538-542.

1 緒言

国内の CIRDC について個々の病原体に関する調査報告が散見されるが (Azetaka M, 1988; Takamura K, 1982)、最近の野外状況に関する報告、特に新興病原体を含めた複数の病原体の関与を総合的に調査した報告は少ない。また、CAV-2、CPIV 及び CDV についてはワクチンが広く普及しているが、ワクチン接種犬と未接種犬で各病原体の検出を比較した報告もない。本報告では国内で発生した CIRDC 罹患犬の臨床材料を検査材料とし、CAV-2、CPIV、CDV、CHV、CRCoV 及び Bb の野外浸潤状況を PCR 法で調査した。

2 材料および方法

2-1 検査材料

2004 年 8 月～2007 年 2 月の間に、北海道、埼玉、千葉、東京、長野、岐阜、静岡、愛知、滋賀、京都、大阪、兵庫、和歌山、岡山、山口、香川、鹿児島の開業獣医師から診断検査の依頼のあった 119 頭の臨床材料を用いた。検査犬はいずれも発咳、くしゃみ、鼻汁の漏出などの呼吸器症状を示し、口腔、鼻腔及び眼瞼から採取したスワブ 100、82 及び 37 検体を検査に供した。119 頭のうち、口腔、鼻腔及び眼瞼スワブ全て採取した犬が 19 頭、口腔及び鼻腔スワブ、口腔及び眼瞼スワブ、鼻腔及び眼瞼スワブ、口腔又は鼻腔スワブいずれかのみ採取した犬がそれぞれ 44、8、10、29、9 頭であった。採取したスワブは 2 ml のイーグル基礎培地を加え、検査の実施まで -80 °C に保存した。調査犬の年齢は 3 ヶ月齢未満が 78 頭、3～12 ヶ月齢が 16 頭、12 ヶ月齢以上が 17 頭で、残りの 8 頭の年齢は不明であった。また、34 頭は CAV-2、CPIV 及び CDV を含む混合生ワクチンを接種されたことがあり、53 頭は未接種犬であった。残りの 32 頭のワクチン接種歴は不明であった。ワクチンを接種された全ての犬はスワブの採取時に少なくともワクチン接種後 3 週間以上経過していた。

2-2 DNA 及び RNA の抽出

検査材料からの DNA 及び RNA の抽出は、それぞれ QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) と QIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン) を用い、それぞれの使用書に従って行った。

2-3 PCR 及び RT-PCR

CAV-2、Bb 及び CHV 遺伝子を検出する PCR には Go Taq Green Master Mix (プロメガ) を使用し、プライマー 0.4 pmols、抽出したサンプル DNA を 1 µl とし総量 25 µl で行った。CAV-2、Bb 及び CHV のプライマーと反応条件はそれぞれ Hu ら (Hu RL, 2001)、Hozbor ら (Hozbor D, 1999) 及び Erles ら (Erles K, 2003) の方法に従った。CPIV、CDV 及び CRCoV 遺伝子の RT-PCR には One Step RNA PCR Kit (タカラバイオ) を使用し、プライマー 0.4 pmols、抽出したサンプル RNA を 1 µl とし総量 50 µl で行った。CRCoV については、RT-PCR 後に Go Taq Green Master Mix を用い、プライマー 0.4 pmols、一次 PCR 産物 1 µl、総量 25 µl とし nested PCR を行った。反応条件は Yachi ら (Yachi A, 2006) の方法に準じた。CPIV 及び CDV 遺伝子の検出条件は、42 °C 30 分の逆転写の後に 95 °C 5 分を 1 回、94 °C 30 秒、58 °C 30 秒、72 °C 90 秒を 30 回繰り返す、最後は 72 °C 5 分とした。サーマルサイクラーには Thermal Cycler Dice MP (タカラバイオ) を用いた。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分析し、想定される塩基数のバンドが検出された試料を当該遺伝子陽性とした。PCR 及び RT-PCR のプライマーの配列、増幅したバンドの大きさは、Table 3-1 に示したとおりである。

2-4 PCR 及び RT-PCR の特異性

PCR 及び RT-PCR の特異性は、既知のウイルス株 (CAV-2 OD-N/SL 株、CPIV DS-L 株、CDV DFE-HC 株、CHV F205 株、CRCoV は近縁な牛コロナウイルス No. 66 株) と Bb (Z-6 株) を用いて検討した。反応の特異性は当該病原体とのみ PCR 産物が認められることによって確認した。

CPIV 及び CDV 遺伝子を検出する RT-PCR のプライマーは、GenBank に登録されている既知の塩基配列を基にして保存性の高い領域を選択して作製した。上記の方法に加えて、それぞれ複数の CPIV 株及び CDV 株を検出することによっても特異性を確認した。

3 結果

呼吸器病罹患犬からの病原体遺伝子検出状況を Fig. 3-1 及び Table 3-2 に示した。口腔、鼻腔あるいは眼瞼スワブのうち少なくとも 1 試料からいずれかの病原体遺伝子

が検出された個体は、供試犬 119 頭のうち 63 頭 (52.9%) であった。そのうち 47 頭からは 1 種類の病原体遺伝子が、16 頭からは 2 種又は 3 種の病原体遺伝子が検出された (Fig. 3-1)。1 種類の病原体遺伝子が検出された 47 頭のうち、最も検出頻度が高かったのは Bb で 15 頭、次いで CRCoV が 13 頭、CPIV が 9 頭であった。複数の病原体遺伝子が検出された症例も同様の傾向を示し、Bb が 13 頭と最も多く、次いで CPIV が 9 頭、CRCoV が 6 頭から検出された (Table 3-2)。2 種検出された症例のうち、最も多かった組合せは Bb と CPIV で 4 頭、次に Bb と CRCoV の 3 頭が多かった。また、3 種検出された症例は、CPIV、CRCoV 及び CDV と、Bb、CPIV 及び CRCoV と、Bb、CRCoV 及び CHV の組合せであった。

検査材料別の病原体遺伝子の検出状況を Table 3-3 に示した。Bb、CAV-2 及び CRCoV は口腔および鼻腔スワブから同じような頻度で検出されたが、眼瞼スワブから検出された例はなかった。一方、CPIV と CDV はいずれの試料からも検出されたが、CPIV は鼻腔スワブからの検出頻度が最も高かった。

CAV-2 及び CPIV、CDV を含む多種混合生ワクチン接種犬と未接種犬からの各病原体遺伝子の検出状況を比較し、結果を Fig. 3-2 に示した。CPIV 及び CDV とも未接種犬に比べ、ワクチン接種犬からの検出率が低い傾向にあった。しかしながら、統計学的有意差は認められなかった。一方、CAV-2 は未接種犬の 3 頭から検出されたが、接種犬から CAV-2 が検出された例はなかった。

国内でワクチンが使用されていない Bb、CHV 及び CRCoV の 3 ヶ月齢を境にした検出率を Fig. 3-3 に示した。CHV 及び CRCoV の検出率は月齢に関係なくほぼ同一であった。Bb は 3 ヶ月齢以上の犬よりも 3 ヶ月齢未満の犬で検出率が高い傾向にあったが、統計学的有意差は認められなかった。

4 考察

CIRD 罹患犬 119 頭を検査したところ、Bb が検出された犬が 28 頭と最も多く、次いで CRCoV、CPIV の順であった。今回の調査では口腔、鼻腔、眼瞼スワブを検査材料としたが、CDV 以外の病原体の検出率は検査材料によって異なり、特に CPIV は鼻腔から顕著に検出された (Table 3-3)。全ての部位からの検体を収集することが出来れば CPIV の検出率はさらに増加するものと考えられる。従ってこれらの成績は、CIRD の診断には複数の検査材料を用いることが望ましいことを示している。

既報の血清学および病原学的調査で報告されたように (Horigome S, 1995, Mochizuki M, 2008)、今回の調査でも Bb 及び CPIV が多く検出され、これらの病原体が国内の犬の間に広く浸潤し、CIRD の主要な原因となっていることが推定される。特に Bb は重複感染例の 80%以上を占めており、他の病原体の感染を誘発する可能性が示唆される。しかし、Bb が単独に検出された 15 頭と重複感染犬 13 頭の間で大差がなかったことから (Table 3-2)、複合感染における Bb の果たす役割については明らかにすることができず、今後検討する必要がある。

今回の調査では、近年 CIRD との関係が注目されるようになった CRCoV (Erles K, 2003; Soma T, 2008; Yachi A, 2006) も 19 頭から検出された。Soma らは国内飼育犬の血清学的調査で CIRD 罹患犬の 47.8%から CRCoV 抗体が検出されたことを報告している (Soma T, 2008)。今回の調査結果はそれらの結果を支持し、CRCoV も国内に広く分布し、CIRD の一因となっていることを示すものであった。

ワクチン接種犬からの CAV-2、CPIV 及び CDV の検出率は未接種犬に比べ低い傾向にあり、ワクチンの効果が推定される。特にワクチン接種犬から CAV-2 が検出された例はなかった。一方、ワクチン未接種犬に比べ検出率は低いものの、CPIV 及び CDV はワクチン接種犬からも検出された。Erles らもワクチン接種犬の 19.4%の気管、10.4%の肺から CPIV が検出されたことを報告している (Erles K, 2004)。今回の調査対象犬のワクチン接種から CIRD 発病までの明確な期間、臨床症状の程度、発病時の血清抗体価などは不明であるが、CPIV 及び CDV が検出された犬では、これらウイルスに対する免疫効果が低下していた可能性も考えられる。

一般に CIRD は幼若犬で重篤化することが知られている (Buonavoglia C, 2007)。今回の調査でも、Bb の検出率は 3 ヶ月齢未満の犬で高かった。幼若犬は Bb に対し高い感受性を示し、同菌の感染により CIRD の重篤化する危険性が危惧される。

複数の病原体の重複感染は、CIRD の病態に複雑化と重篤化を招くことが知られている (Azetaka M, 1988; Buonavoglia C, 2007)。今回の調査でも 16 頭に重複感染が認められた。今回の調査で口腔、鼻腔、眼瞼スワブのすべてを検査した犬は 19 頭に過ぎなかったことから、実際の重複感染犬はさらに多いものと思われる。しかし、今回の調査では臨床症状の内容と程度、検出された病原体の種類との関係を明らかにすることができず、病態と病原体の種類および重複感染については今後の検討課題として残された。一方、CIRD 罹患犬 119 頭のうち 56 頭からは検査したいずれの病原体も検出

されなかった。CIRD の予防と治療法を改善するためには、今回は検査対象としなかったレオウイルス、犬インフルエンザウイルス、ストレプトコッカスやパスツレラ、シュードモナス属菌、マイコプラズマなどを含め、CIRD の発生に関与する病原体の実態を明らかにすることが重要である。

5 小括

Bb、CPIV 及び CRCoV が単独または複合して犬呼吸器感染症の発生に関与することが示唆される。現行ワクチンに含まれる CAV-2、CPIV 及び CDV の病原体の検出率は、ワクチン未接種犬に比べ接種犬で低い傾向にあり、ワクチンの効果が示唆された。

Table 3-1 今回の調査で使用した PCR 及び RT-PCR のプライマー

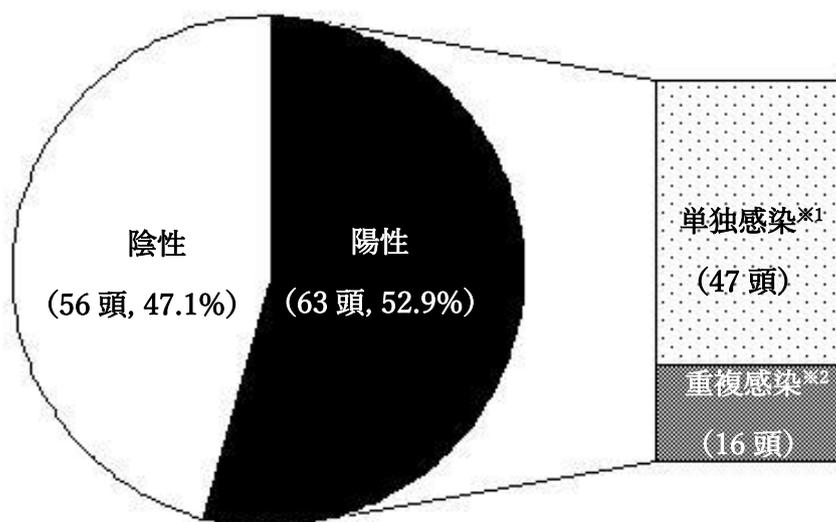
病原体		塩基配列 (5'-3')	増幅産物サイズ (bp)	標的遺伝子部位	引用文献
CAV-2	F	CGCGCTGAACATTACTACCTTGTC	1,030	E3	Hu RL, 2001
	R	CCTAGAGCACTTCGTGTCCGCTT			
CPIV	F	GAGTTCATCCCCTGTAAGTGTGTC	232	F	
	R	AAGGTATGTGTCACTTTGTGCT			
Bb	F	TGGCGCCTGCCCTATC	237	flaA	Hozbor D, 1999
	R	AGGCTCCCAAGAGAGAAAGGCTT			
CDV	F	ATGCTCCCCTACCAAGACAAG	185	H	
	R	TGGTGAAATCGAACTCCAG			
CHV	F	TAATTCATATGTCCCCTTTTT	1,287	gB	Erles K, 2004
	R	GTCCTGTATCTTCTAACTCTGCT			
CRCoV 1st	F	TATCGCAGCCTTACTTTTGT	497	HE	Yachi A, 2006
	R	ACCGCCGTCATGTTATCAG			
nested	F	GCACAATCTACAGCTCTTTG	365		
	R	AGACAGATTGCTTTCGTAGGA			

Table 3-2 単独感染または重複感染犬における各病原体遺伝子の検出

	頭数	病原体検出頭数					
		Bb	CRCoV	CPIV	CDV	CAV-2	CHV
単独感染	47	15	13	9	6	2	2
重複感染	16	13	6	9	5	2	1

Table 3-3 検査材料別の病原体遺伝子の検出状況

採材部位	検体数	病原体検出数 (%)					
		CAV-2	CPIV	Bb	CDV	CHV	CRCoV
口腔	100	3 (3.0)	5 (5.0)	18 (18.0)	6 (6.0)	2 (2.0)	14 (14.0)
鼻腔	82	2 (2.4)	14 (17.1)	19 (23.2)	7 (8.5)	1 (1.2)	12 (14.6)
眼	37	0	2 (5.4)	0	3 (8.1)	3 (8.1)	0



計 (119 頭, 100%)

Fig. 3-1 呼吸器症状を呈した犬からの6種類の病原体遺伝子の検出

※1: 1頭から1種類の病原体遺伝子が検出された

※2: 1頭から2または3種類の病原体遺伝子が検出された

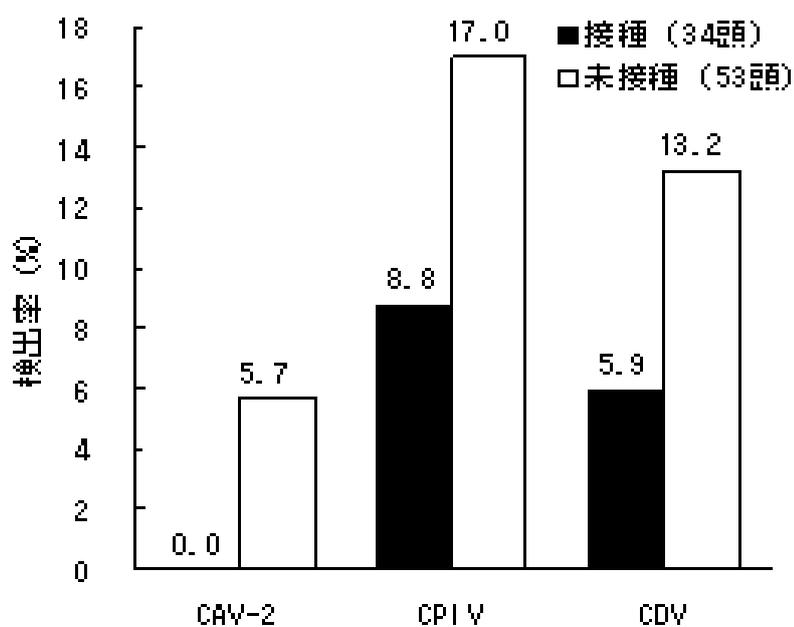


Fig. 3-2 ワクチン接種犬及び未接種犬からのCAV-2、CPIV及びCDVの検出率

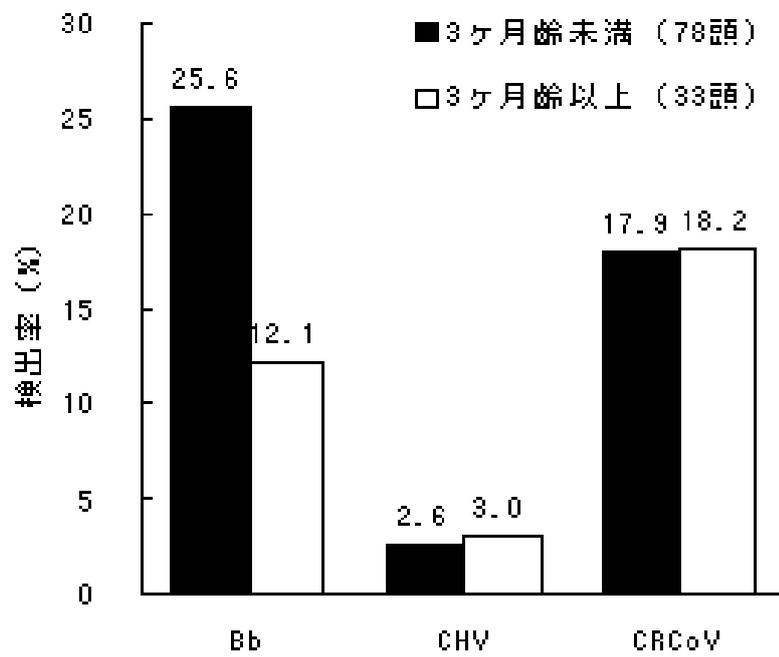


Fig. 3-3 月齢別の Bb、CHV 及び CRCoV の検出率

動物実験について

動物に関する実験手順は全て、2006年6月1日に日本学術会議が策定した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」及び2006年6月1日に定められた「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に則って定められた株式会社微生物化学研究所の動物倫理に関する規定とガイドラインに従い実施された。全ての動物実験は、上記のガイドラインに従って設立・運営された株式会社微生物化学研究所の動物実験委員会からの事前の承認を得たものである。

総括

本研究では、CPV 感染症ワクチンの品質管理を担う弱毒化関連遺伝子マーカーの同定、犬ジステンパーワクチンの開発に重要な実験感染系におけるウイルス動態の検出方法の評価及び CIRDC の病原体の浸潤状況の調査を実施するために、CPV 感染症ワクチンの弱毒化を担う遺伝的な最小決定因子の同定（第 1 章）、リアルタイム RT-PCR 法の CDV 実験感染系での有用性の検証（第 2 章）、国内における CIRDC の病原学的調査（第 3 章）を行った。

第 1 章 犬パルボウイルスワクチン株（9985-46 株）の弱毒化を担う最小決定因子

CPV はパルボウイルス科プロトパルボウイルス属に含まれる DNA ウイルスであり、犬に致死的で重篤な下痢症を引き起こす重要な病原体である。CPV に対する弱毒生ワクチンは広く使われており、その予防効果は認められている。しかし、いずれのワクチンにおいても弱毒化を担う遺伝子マーカーは特定されておらず、CPV の弱毒化の遺伝的決定因子の同定は、ワクチンの安全性を証明及び担保するのに重要な要素である。本研究は、猫腎株化細胞（CRFK 細胞）での連続継代により弱毒化されたワクチン株である CPV9985-46 株の変異遺伝子を同定し、それらのうちのどの遺伝子変異が弱毒化をもたらしているかを探索した。CPV9985-46 株のゲノムの VP2 遺伝子領域に、4 つのアミノ酸変異（N93K、G300V、T389N、V562L）を認めた。これらの変異を人工的に導入したウイルスを作出するために、親株の 9985 株の感染性分子クローンを用いてリバーシジェネティクスの基盤を確立した。この感染性分子クローンからレスキューされた v9985 ウイルスは犬に強毒の病態を示した。この強毒ウイルスに 4 つのアミノ酸変異のうち 1 か所または 2 か所の変異を導入するように、感染性分子クローンに点突然変異を導入し、組換え CPV を作出した。G300V または T389N のいずれか 1 か所を導入した組換え CPV の病原性は低下した。G300V と T389N を同時に導入したウイルスの病原性はさらに低下し、犬に臨床症状を引き起こすことなく、ワクチン株である 9985-46 株と同程度の弱毒化を認めた。さらに、同ウイルスは犬由来細胞への感染性の低下も認めた。一方、G300V と V562L の 2 か所を同時に導入したウイルスは、犬由来細胞への感染性は低下したものの、犬への病原性は低下せず強毒を維持したままであった。この結果は、CPV の宿主親和性に重要

な役割を担っている VP2 領域の 300 位のアミノ酸置換だけでは弱毒化に十分ではないことが示された。CPV9985-46 株の弱毒化には少なくとも G300V と T389N の 2 つが必要であることが本研究によって示された。

第 2 章 ジステンパーウイルスの実験感染系におけるリアルタイム RT-PCR 法の利用

CDV はパラミクソウイルス科モルビリウイルス属に含まれる RNA ウイルスであり、犬に致死的で重篤な病態を引き起こす重要な病原体である。CDV の病態解明やワクチンの有効性判定のために犬に実験感染をする際、ウイルスの体内動態は重要な指標となる。体内動態を調査するには、感度が高く、定量性のある検出方法を用いることが重要である。本研究では、リアルタイム RT-PCR 法を用いて、CDV の実験感染犬におけるウイルス動態を検出した。CDV を実験感染させた 12 頭の犬の末梢血、直腸及び鼻腔スワブ中のウイルス動態をリアルタイム RT-PCR 法で、直腸及び鼻腔スワブ中の感染性ウイルスを組織培養法によるウイルス分離を用いて調査したところ、リアルタイム RT-PCR 法はウイルス分離よりも高い感度を示した。直腸および鼻腔サンプルにおいては、ウイルス RNA のピークとウイルス分離のピークは一致した。また、実験感染の犬は軽度から重度まで、また呼吸器病、消化器症状又は皮膚の湿疹の多種多様な症状を示したが、どの犬においても体内のウイルス RNA の動態は似通っていた。症状を示した犬におけるウイルス RNA のピークは、症状の発現時期と一致した。これらの結果は、リアルタイム RT-PCR 法が発現する症状の種類及び程度に関わらず CDV の増殖性をモニターできるほど十分感度が高いことを示し、病態発現に関連した CDV の体内動態を調査するのに有用であることを示した。

第 3 章 国内における犬呼吸器感染症の病原学的調査

国内で発生した CIRDC 罹患犬 119 頭の口腔および鼻腔、眼瞼から採取したスワブを検査材料とし、CAV-2、CPIV、CDV、犬ヘルペスウイルス (CHV)、犬呼吸器コロナウイルス (CRCoV) 及び *Bordetella bronchiseptica* (Bb) の野外浸潤状況を PCR 法で調査した。1 種類の病原体遺伝子が検出された 47 頭のうち、Bb が 15 頭と最も多く、次いで CRCoV、CPIV の順に検出された。複数の病原体遺伝子が検出された 16 頭についても、Bb、CPIV 及び CRCoV の検出率が高かった。Bb 及び CPIV が多く検出さ

れ、これらの病原体が国内の犬の間に広く浸潤し、CIRD の主要な原因となっていることが推定される。特に Bb は重複感染例の 80%以上を占めており、他の病原体の感染を誘発する可能性が示唆される。近年 CIRD との関係が注目されるようになった CRCoV も国内に広く分布し、CIRD の一因となっていることを示すものである。ワクチン接種犬からの CAV-2、CPIV 及び CDV の検出率は未接種犬に比べ低い傾向にあり、ワクチンの効果が推定された。特にワクチン接種犬から CAV-2 が検出された例はなかった。

以上、本研究は次の成果を提供する。

- ① CPV9985-46 株の弱毒化を担保する遺伝的な最小決定因子を同定し、CPV ワクチンの安全性を担保する品質管理に重要な役割をもたらし、さらには古典的な盲継代法に代わる次世代の CPV 弱毒生ワクチンの合理的作出方法に有益な情報を提供する。
- ② ジステンパーの実験感染系においてウイルス動態を評価するのにリアルタイム RT-PCR 法が有用であることを示し、本法を用いた CDV の定量は、病原性解析やチャレンジ試験によるワクチンの防御効果を評価することに役立つ。
- ③ CIRD の発生には、Bb、CPIV 及び CRCoV が単独または複合して関与することを示唆し、現行ワクチンに含まれる CAV-2、CPIV 及び CDV の病原体の検出率は、ワクチン未接種犬に比べ接種犬で低い傾向にあり、ワクチンの効果を示唆する。

これらの成果は犬が脅かされる重要な感染症に対するワクチンの品質管理、改良及び新規開発に有益な知見をもたらすものである。

謝辞

本研究を行うに当たり、懇切なご指導とご高配を賜りました日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科獣医衛生学研究室、田中良和教授に深く御礼申し上げます。第1章の研究をまとめるにあたり、ご指導を賜りました株式会社微生物化学研究所、五十嵐樹彦氏に深甚なる感謝の意を表します。第2章においては、ご指導、ご助言頂きました株式会社微生物化学研究所、野呂太一氏、伊藤寿浩氏に心より感謝申し上げます。第3章においては、ご多忙の中、論文をお目通しご指導頂きました元株式会社微生物化学研究所、清水実嗣氏に深謝申し上げます。並びに研究のあらゆる段階において有益なご示唆を頂戴した元株式会社微生物化学研究所、山中盛正氏、大石英司氏、今泉好能氏、株式会社微生物化学研究所、国分輝秋氏、高橋拓男氏、増渕勝夫氏、東北大学大学院医学研究科抗体創薬共同研究講座、山田慎二助教に心より御礼申し上げます。

また、実験データの取得にあたり、ご協力頂きました元株式会社微生物化学研究所、若月章氏、株式会社微生物化学研究所、佐藤博昭氏、河股舞さん、樫本千尋さんに心から感謝申し上げます。

最後に本研究に関わる各種実験及びその解析を実施させて頂いた株式会社微生物化学研究所並びに職員の皆様に深く感謝致します。

引用文献

- Allison, A.B., Kohler, D.J., Ortega, A., Hoover, E.A., Grove, D.M., Holmes, E.C., Parrish, C.R., 2014. Host-specific parvovirus evolution in nature is recapitulated by in vitro adaptation to different carnivore species. *PLoS. Pathog.* 10, e1004475.
- Allison, A.B., Organtini, L.J., Zhang, S., Hafenstein, S.L., Holmes, E.C., Parrish, C.R., 2016. Single Mutations in the VP2 300 Loop Region of the Three-Fold Spike of the Carnivore Parvovirus Capsid Can Determine Host Range. *J. Virol.* 90, 753–767.
- Angus, J.C., Jang, S.S., Hirsh, D.C., 1997. Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210, 55–58.
- Appel, M.J., 1969. Pathogenesis of canine distemper. *Am. J. Vet. Res.* 30, 1167–1182.
- Appel, M.J., 1970. Distemper pathogenesis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156, 1681–1684.
- Appel, M.J., 1987. Canine distemper virus, in: Appel, M.J. (Ed.) , *Virus Infections of Carnivores: Virus Infections of Vertebrates.* vol. 1, Elsevier, Amsterdam, pp. 133–159.
- Appel, M.J., Shek, W.R., Summers, B.A., 1982. Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. *Infect. Immun.* 37, 592–600.
- Azetaka, M., Konishi, S., 1988. Kennel Cough Complex: Confirmation and Analysis of the Outbreak in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 50, 851–858.
- Badgett, M.R., Auer, A., Carmichael, L.E., Parrish, C.R., Bull, J.J., 2002. Evolutionary Dynamics of Viral Attenuation. *J. Virol.* 76, 10524–10529.
- Bass, E.P., Gill, M.A., Beckenhauer, W.H., 1982. Development of a modified live, canine origin parvovirus vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181, 909–913.
- Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F., Baumgärtner, W., 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127, 1–18.
- Ben Abdeljelil, N., Khabouchi, N., Kassar, S., Miled, K., Boubaker, S., Ghram, A.,

- Mardassi, H., 2014. Simultaneous alteration of residues 279 and 284 of the VP2 major capsid protein of a very virulent Infectious Bursal Disease Virus (vvIBDV) strain did not lead to attenuation in chickens. *Viol. J.* 11, 199.
- Binn, L.N., Marchwicki, R.H., Keenan, K.P., Strano, A.J., Engler, W.R., 1977. Recovery of reovirus type 2 from an immature dog with respiratory tract disease. *Am. J. Vet. Res.* 38, 927–929.
- Buonavoglia, C., Martella, V., 2007. Canine respiratory viruses. *Vet. Res.* 38, 355–373.
- Burleson, F.G., Chambers, T.M., Wiedbrauk, D.L., 1992. Virus quantification, in: *Virology: A laboratory Manual*. Academic Press, San Diego, pp. 53–97.
- Chalker, V.J., Brooks, H.W., Brownlie, J., 2003. The association of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* with canine infectious respiratory disease. *Vet. Microbiol.* 95, 149–156.
- Chalker, V.J., Owen, W.M., Paterson, C., Barker, E., Brooks, H., Rycroft, A.N., Brownlie, J., 2004. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology.* 150, 3491–3497.
- Chen, Y., Lu, Z., Zhang, L., Gao, L., Wang, N., Gao, X., Wang, Y., Li, K., Gao, Y., Cui, H., Gao, H., Liu, C., Zhang, Y., Qi, X., Wang, X., 2016. Ribosomal protein L4 interacts with viral protein VP3 and regulates the replication of infectious bursal disease virus. *Virus. Res.* 211, 73–78.
- Churchill, A.E., 1987. Preliminary development of a live attenuated canine parvovirus vaccine from an isolate of British origin. *Vet. Rec.* 120, 334–339.
- Cotmore, S.F., Agbandje-Mckenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A.J., 2014. The family Parvoviridae. *Arch. Virol.* 159, 1239–1247.
- Crawford, P.C., Dubovi, E.J., Castleman, W.L., Stephenson, I., Gibbs, E.P.J., Chen, L., Smith, C., Hill, R.C., Ferro, P., Pompey, J., Bright, R.A., Media, M-J., Johnson, C.M., Olsen, C.W., Cox, N.J., Klimov, A.I., Katz, J.M., Donis, R.O., 2005. Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science.* 310, 482–485.
- Decaro, N., Buonavoglia, C., 2012. Canine parvovirus—a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 155, 1–12.

- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Campolo, M., Lorusso, A., Mari, V., Martella, V., Buonavoglia, C., 2007. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*. 25, 1161–1166.
- de Leeuw, O.S., Koch, G., Hartog, L., Ravenshorst, N., Peeters, B.P., 2005. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J. Gen. Virol.* 86, 1759–1769.
- de Oliveira Torres Carrasco, A., Seki, M.C., de Freitas Raso, T., Paulillo, A.C., Pinto, A.A., 2008. Experimental infection of Newcastle disease virus in pigeons (*Columba livia*) : Humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding. *Vet. Microbiol.* 129, 89–96.
- Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Cirone, F., Lucente, M.S., Lorusso, E., Di Trani, L., Buonavoglia, C., 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods*. 136, 171–176.
- Erles, K., Dubovi, E.J., Brooks, H.W., Brownlie, J., 2004. Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4524–4529.
- Erles, K., Toomey, C., Brooks, H.W., Brownlie, J., 2003. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology*. 310, 216–223.
- Govindasamy, L., Hueffer, K., Parrish, C.R., Agbandje-Mckenna, M., 2003. Structures of host range-controlling regions of the capsids of canine and feline parvoviruses and mutants. *J. Virol.* 77, 12211–12221.
- Hafenstein, S., Palermo, L.M., Kostyuchenko, V.A., Xiao, C., Morais, M.C., Nelson, C.D., Bowman, V.D., Battisti, A.J., Chipman, P.R., Parrish, C.R., Rossmann, M.G., 2007. Asymmetric binding of transferrin receptor to parvovirus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104, 6585–6589.
- Hatano, M., Taharaguchi, S., Iwamoto, K., Masubuchi, K., Kokubu, T., Sasaki, O., Yamanaka, M., 2001. Biological and serological properties of canine distemper

- viruses recently isolated from dogs in Japan. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 54, 109–114.
(in Japanese with English abstract).
- Horigome, S., Fukuyasu, T., Ogata, M., Ashida, K., 1995. Serological Survey of *Bordetella bronchiseptica* antibody in Dogs. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 48, 113–115.
(in Japanese with English abstract).
- Horiuchi, M., Shinagawa, M., 1993. Construction of an infectious DNA clone of the Y1 strain of canine parvovirus and characterization of the virus derived from the clone. Arch. Virol. 130, 227–236.
- Hozbor, D., Fouque, F., Guiso, N., 1999. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. Res. Microbiol. 150, 333–341.
- Hu, R.L., Huang, G., Qiu, W., Zhong, Z.H., Xia, X.Z., Yin, Z., 2001. Detection and Differentiation of CAV-1 and CAV-2 by Polymerase Chain Reaction. Vet. Res. Commun. 25, 77–84.
- Hueffer, K., Govindasamy, L., Agbandje-Mckenna, M., Parrish, C.R., 2003. Combinations of two capsid regions controlling canine host range determine canine transferrin receptor binding by canine and feline parvoviruses. J. Virol. 77, 10099–10105.
- Jongeneel, C.V., Sahli, R., McMaster, G.K., Hirt, B., 1986. A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. J. Virol. 59, 564–573.
- Kailasan, S., Agbandje-Mckenna, M., Parrish, C.R., 2015. Parvovirus Family Conundrum: What Makes a Killer? Annu. Rev. Virol. 2, 425–450.
- Kim, D., Jeoung, S.Y., Ahn, S.J., Lee, J.H., Pak, S.I., Kwon, H.M., 2006. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. J. Vet. Med. Sci. 68, 877–879.
- Kimoto, T., 1986. *In vitro* and *in vivo* properties of the virus causing natural canine distemper encephalitis. J. Gen. Virol. 67, 487–503.
- Krakowka, S., Cockerell, G., Koestner, A., 1975. Effects of canine distemper virus infection on lymphoid function *in vitro* and *in vivo*. Infect. Immun. 11, 1069–1078.
- Krakowka, S., Higgins, R.J., Koestner, A., 1980a. Canine distemper virus: review of

- structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.* 41, 284–292.
- Krakowka, S., Higgins, R. J., Metzler, A.E., 1980b. Plasma phase viremia in canine distemper virus infection. *Am. J. Vet. Res.* 41, 144–146.
- Krakowka, S., Hoover, E.A., Koestner, A., Ketring, K., 1977. Experimental and naturally occurring transplacental transmission of canine distemper virus. *Am. J. Vet. Res.* 38, 919–922.
- Lan, N.T., Yamaguchi, R., Furuya, Y., Inomata, A., Ngamkala, S., Naganobu, K., Kai, K., Mochizuki, M., Kobayashi, Y., Uchida, K., Tateyama, S., 2005. Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. *Vet. Microbiol.* 110, 197–207.
- McCaw, D.L., Hoskins, J.D., 2006. Canine Viral Enteritis. in: Greene, C.E. (Ed.) , *Infectious Disease of the Dog and Cat*. 3rd ed., Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 63–73.
- Meunier, P.C., Cooper, B.J., Appel, M.J., Slauson, D.O., 1985. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Vet. Pathol.* 22, 60–71.
- Metzler, A.E., Higgins, R.J., Krakowka, S., Koestner, A., 1980. Virulence of tissue culture-propagated canine distemper virus. *Infect. Immun.* 29, 940–944.
- Mochizuki, M., Yachi, A., Ohshima, T., Ohuchi, A., Ishida, T., 2008. Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs, *J. Vet. Med. Sci.* 70, 563–569.
- Nakamura, K., Sakamoto, M., Ikeda, Y., Sato, E., Kawakami, K., Miyazawa, T., Tohya, Y., Takahashi, E., Mikami, T., Mochizuki, M., 2001. Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8, 663–668.
- Nguyen, D.T., Ludlow, M., van Amerongen, G., de Vries, R.D., Yüksel, S., Verburgh, R.J., Osterhaus, A.D., Duprex, W.P., de Swart, R.L., 2012. Evaluation of synthetic infection-enhancing lipopeptides as adjuvants for a live-attenuated canine distemper virus vaccine administered intra-nasally to ferrets. *Vaccine.* 30, 5073–5080.
- Nho, W.G., Sur, J.H., Doster, A.R., Kim, S.B., 1997. Detection of canine parvovirus in

- naturally infected dogs with enteritis and myocarditis by in situ hybridization. J. Vet. Diagn. Invest. 9, 255–260.
- Pardo, M.C., Bauman, J.E., Mackowiak, M., 1997. Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. Am. J. Vet. Res. 58, 833–836.
- Parker, J.S., Parrish, C.R., 1997. Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. J. Virol. 71, 9214–9222.
- Parrish, C.R., 2010. Structures and functions of parvovirus capsids and the process of cell infection. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 343, 149–176.
- Pearce-Kelling, S., Mitchell, W.J., Summers, B.A., Appel, M.J., 1990. Growth of canine distemper virus in cultured astrocytes: relationship to *in vivo* persistence and disease. Microb. Pathog. 8, 71–82.
- Reed, A.P., Jones, E.V., Miller, T.J., 1988. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. J. Virol. 62, 266–276.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. in: Molecular Cloning, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 1.31–1.162.
- Scagliarini, A., Dal Pozzo, F., Gallina, L., Vaccari, F., Morganti, L., 2007. TaqMan based real time PCR for the quantification of canine distemper virus. Vet. Res. Commun. 31, 261–263.
- Seki, F., Ono, N., Yamaguchi, R., Yanagi, Y. 2003. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. J. Virol. 77, 9943–9950.
- Simpson, A.A., Chandrasekar, V., Hébert, B., Sullivan, G.M., Rossmann, M.G., Parrish, C.R., 2000. Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses. J. Mol. Biol. 300, 597–610.
- Soma, T., Ishii, H., Miyata, K., Hara, M., 2008. Prevalence of antibodies to canine respiratory coronavirus in some dog populations in Japan. Vet. Rec. 163, 368–369.
- Stevenson, M.A., Fox, J.M., Wolfenbarger, J.B., Bloom, M.E., 2001. Effect of a valine residue at codon 352 of the VP2 capsid protein on *in vivo* replication and

- pathogenesis of Aleutian disease parvovirus in mink. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1658–1663.
- Strassheim, M.L., Gruenberg, A., Veijalainen, P., Sgro, J.Y., Parrish, C.R., 1994. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology*. 198, 175–184.
- Takamura, K., Ajiki, M., Hiramatsu, K., Takemitsu, S., Nakai, M., Sasaki, N., 1982. Isolation and properties of adenovirus from canine respiratory tract. *Jpn. J. Vet. Sci.* 42, 265–270.
- Tan, B., Wen, Y.J., Wang, F.X., Zhang, S.Q., Wang, X.D., Hu, J.X., Shi, X.C., Yang, B.C., Chen, L.Z., Cheng, S.P., Wu, H., 2011. Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain ZJ7 isolate from domestic dogs in China. *Viol. J.* 8, 520.
- Truyen, U., Evermann, J.F., Vieler, E., Parrish, C.R., 1996. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology*. 215, 186–189.
- Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., Compans, R.W., et al., 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science*. 251, 1456–1464.
- Tu, M., Liu, F., Chen, S., Wang, M., Cheng, A., 2015. Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Viol. J.* 12, 114.
- Weichert, W.S., Parker, J.S., Wahid, A.T., Chang, S.F., Meier, E., Parrish, C.R., 1998. Assaying for Structural Variation in the Parvovirus Capsid and Its Role in Infection. *Virology*. 250, 106–117.
- Weidmann, A., Maisner, A., Garten, W., Seufert, M., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, S., 2000. Proteolytic cleavage of the fusion protein but not membrane fusion is required for measles virus-induced immunosuppression in vitro. *J. Virol.* 74, 1985–1993.
- Wilson, S., Stirling, C., Borowski, S., Thomas, A., King, V., Salt, J., 2013. Vaccination of dogs with Duramune DAPPi+LC protects against pathogenic canine parvovirus type 2c challenge. *Vet. Rec.* 172, 662.

- Wright, N.G., Thompson, H., Taylor, D., Cornwell, H.J.C., 1973. *Bordetella bronchiseptica*: a re-assessment of its role in canine respiratory disease. *Vet. Rec.* 93, 486–487.
- Yachi, A., Mochizuki, M., 2006. Survey of dogs in Japan for group 2 canine coronavirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2615–2618.
- Zhang, L., Ren, X., Chen, Y., Gao, Y., Wang, N., Lu, Z., Gao, L., Qin, L., Wang, Y., Gao, H., Li, K., Jiang, L., Cui, H., Liu, C., Zhang, Y., Qi, X., Wang, X., 2015. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-2 contributes to the replication of infectious bursal disease virus via interaction with the capsid protein VP2. *Viruses.* 7, 1474–1491.
- Zhou, P., Zeng, W., Zhang, X., Li, S., 2017. The genetic evolution of canine parvovirus —A new perspective. *Plos. One.* 12, 3.

Summary

Here, we describe basic studies for development and improvement of vaccines to prevent serious and fatal infectious diseases such as canine parvovirus (CPV) infection, canine distemper, as well as the highly incident canine infectious respiratory disease (CIRD) in owners of multiple dogs. Vaccines for these diseases have been developed and are widely used. However, many challenges remain in the development of more effective and safe vaccines. Regarding live attenuated vaccines for CPV infections, the genetic markers that define the attenuated phenotype have not yet been identified. Although reversion of virulence in a live attenuated CPV vaccine has never been demonstrated and the attenuation of virulence has been proven to be highly stable, concerns have arisen that enteric illnesses observed in animals following administration of a CPV vaccine may have resulted from vaccine reversion to a virulent form. It is important to clearly discriminate attenuated vaccine strains from wild-type strains to resolve this concern. Therefore, it is necessary for quality control of vaccines to determine the genetic markers that define the attenuated phenotype. Regarding canine distemper, evaluation of canine distemper virus (CDV) dynamics using quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction (qRT-PCR) did not reveal any relationship to infection outcomes in experimentally infected dogs. Various methods have been applied to examine the CDV dynamics. CDV qRT-PCR is a rapid and handy method for the quantitative detection of CDV RNA in clinical specimens. However, there has been no report on changes in the CDV RNA load with time in infected dogs or the relationship between these changes and infectious outcomes. Further, the usefulness of this method under experimental infectious conditions has yet to be properly evaluated. Regarding CIRD, in Japan, studies on the surveillance of CIRD-causing pathogens have been limited. Although some research reports on individual CIRD pathogens were found in Japan, there are few reports on the recent field situation, particularly a comprehensive investigation of involvement of multiple pathogens, including emerging pathogens. Additionally, vaccines are widely used for canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza virus (CPIV), and CDV, but there are no reports comparing detection of each pathogen

in vaccinated and unvaccinated dogs.

Based on the above background, in this study, we investigated genetic markers responsible for quality control of the CPV vaccine, evaluated the detection method of viral kinetics in experimentally infected dogs, which is important for development and improvement of canine distemper vaccine, and conducted an etiological investigation of CIRDC in Japan. To this end, we identified genetic minimal determinants responsible for attenuation of CPV infection vaccine (Chapter 1), verified the usefulness of qRT-PCR in CDV experimental infection (Chapter 2), and conducted a pathogenetic investigation of CIRDC in Japan (Chapter 3). In this paper, the results of these studies are summarized in three chapters.

Chapter 1

Identification of the minimal determinant for attenuation of the CPV vaccine strain 9985-46

CPV, which belongs to the genus *Protoparvovirus* in the family *Parvoviridae*, is an important canine pathogen that causes a severe, highly contagious gastroenteric disease in pups. CPV live attenuated vaccines have been widely used, and their usefulness has been confirmed. Identifying molecular determinants of virulence attenuation in the CPV vaccines is important to ensure their safety. To this end, we identified mutations in the attenuated CPV 9985-46 vaccine strain that arose during serial passage in Crandell-Reese feline kidney cells compared to their wild-type counterpart, as well as minimal determinants of virulence loss. Four amino acid substitutions (N93K, G300V, T389N, and V562L) in VP2 of strain 9985-46 significantly restricted infection in canine A72 cells. Using an infectious molecular clone system, we constructed isogenic CPVs of the parental virulent 9985 strain carrying single or double mutations. We observed that only a single amino acid substitution in VP2, G300V or T389N, attenuated the virulent parental virus. Combinations of these mutations further attenuated CPV to a level comparable to that of 9985-46. Strains with G300V/T389N substitutions did not induce clinical symptoms in experimentally infected pups, and their ability to infect canine cells was highly restricted. We found that another G300V/V562L double mutation decreased

affinity of the virus for canine cells, although its pathogenicity in dogs was maintained. These results indicate that mutation of residue 300, which plays a critical role in host tropism, is not sufficient for viral attenuation *in vivo*, and that attenuation of the 9985-46 strain is defined by at least two mutations in residues 300 and 389 of the VP2 capsid protein.

Chapter 2

Use of quantitative real-time RT-PCR to investigate CDV dynamics in experimentally infected dogs

CDV, which belongs to the genus *Morbillivirus* in the family *Paramyxoviridae*, is an essential canine pathogen, which causes a serious and often fatal disease. Dogs infected experimentally with field isolates of CDV commonly show diverse clinical symptoms and mild clinical features or subclinical infections. Thus, it is difficult to resolve and evaluate pathogenic differences among strains or to examine the protective efficacy of vaccines against field isolates. Although differences in the clinical responses of CDV-infected dogs have not been characterized, the degree of viral multiplication and spread throughout the body of infected dogs is considered a significant factor in CDV pathogenesis. Therefore, a sensitive and quantitative investigation of viremia and viral shedding in infected dogs is vital to understand CDV pathogenesis. We used qRT-PCR and virus titration to examine CDV kinetics in the peripheral blood and rectal and nasal secretions of 12 experimentally infected dogs. qRT-PCR proved extremely sensitive, and the correlation between the two methods for rectal and nasal samples on the peak day of viral RNA was good. Although dogs showed diverse symptoms, the viral RNA kinetics were similar; specifically, the peak of viral RNA in the symptomatic dogs was consistent with the onset of symptoms. These results indicate that qRT-PCR is sufficiently sensitive to monitor CDV replication in experimentally infected dogs regardless of the degree of clinical manifestation. Further, it suggests that the peak of viral RNA reflects active CDV replication.

Chapter 3

Etiological investigation on CIRDC in Japan

The oral, nasal, and ocular swabs collected from 119 dogs suffering from CIRDC were tested for CAV-2, CPIV, CDV, canine herpes virus (CHV), canine respiratory coronavirus (CRCoV), and *Bordetella bronchiseptica* (Bb) genes by a polymerase chain reaction method. The most prominent pathogen detected in 47 dogs positive for a single pathogen was Bb followed by CRCoV, CPIV, CDV, CAV-2, and CHV, and they were found in 15, 13, 9, 6, 2, and 2 dogs, respectively. Similarly, Bb, CPIV, and CRCoV were more prominent in 16 dogs positive for plural pathogens, and they were detected in 13, 9, and 6 dogs, respectively. These appear to suggest that Bb, CPIV, and CRCoV are major pathogens to cause CIRDC, and concomitant infection of Bb with other pathogens may exacerbate the disease. In addition, CPIV, CAV-2, and CDV were apt to be detected less frequently in dogs administered previously with the multivalent live vaccine, including those viruses than those unvaccinated, suggesting that the vaccine works effectively to prevent infection in dogs.

Overall,

1. The first study led to the identification of the minimal determinant of attenuation as the genetic marker of the CPV vaccine strain 9985-46. This finding is relevant for quality control of the vaccine and provides insight into the rational design of second-generation live attenuated vaccine candidates.
2. The second study underlined the usefulness of qRT-PCR for investigating CDV dynamics in experimental infections. This method will be useful for comparing the multiplication and dissemination among different CDV strains and for determining the protective efficacy of vaccines.
3. The third study provided the occurrence of CIRDC, which suggested that Bb, CPIV, and CRCoV are involved single or multiple infections. Further, the detection rates of CAV-2, CPIV, and CDV included in the current vaccine tended to be lower in vaccinated dogs as compared with unvaccinated dogs, indicating vaccine efficacy.

These findings obtained in this study provide useful and insightful information regarding the development of improved vaccines against important infectious canine diseases.