

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)

学位論文の内容の要約

勢籟 剛

(指導教授：田中 良和)

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、犬ジステンパーがある。また発生頻度が高く集団飼育施設内で伝播しやすい感染症として、犬呼吸器感染症（canine infectious respiratory disease, CIRDC）がある。これらの感染症は病態の重篤さと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すでに開発され広く使用されているが、より効果的で安全なワクチンを開発するためには次に掲げる課題がある。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 弱毒生ワクチン株の病原性復帰を示す報告はなく、弱毒化は非常に安定的であることが証明されているものの、ワクチンを接種した犬が下痢症を示すとワクチン株の病原性復帰がしばしば懸念される。この懸念を払拭するためには、強毒株と弱毒ワクチン株を明確に区別できることが重要である。そのために、CPV の弱毒化を表す遺伝子マーカーの同定は、ワクチンの安全性を担保する品質管理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）動態の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。CDV の検出には様々な方法が用いられている。リアルタイム RT-PCR 法は、臨床検体からウイルス RNA を迅速かつ簡便に定量することができる。しかし、リアルタイム RT-PCR 法により検出されるウイルス 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、実験感染系における有用性が評価されていないことが課題である。CIRDC 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国内での疫学情報が少ないといった課題がある。国内の CIRDC について個々の病原体に関する調査報告は散見されるが、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。さらに、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 CDV についてはワクチンが広く普及しているものの、ワクチン接種犬と未接種犬で各病原体の検出率を比較した報告はない。

以上の背景より、本研究では、CPV 感染症ワクチンの安全性の品質管理を担う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 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。本論文はそれらの研究成果をまとめて 3 章で構成した。

第 1 章 CPV 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 の弱毒化の遺伝学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。そこで、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。これらの変異により CPV は犬由来の A72 細胞への感染性の低下を示した。感染性分子クローンをを用いて、9985-46 株の親株である強毒の 9985 株に 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の表現型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は十分に生じえないことを示した。従って、CPV9985-46 株の弱毒化には少なくとも G300V と T389N の 2 つの VP2 領域のアミノ酸置換が必要であることが示された。

第 2 章 CDV 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最も重要な犬の病原体のうちのひとつである。CDV の野外分離株を実験感染させた犬では、しばしば多様な臨床症状と程度を示し、

非常に軽度の場合や不顕性感染を示すことがある。そのため株間での病原性の差やワクチンに対する感染防御効果の評価は、臨床症状だけでは難しく、体内でのウイルス増幅が病態評価に重要な指標となる。ウイルスの動態を調査するには、感度が高く、定量性のある方法でウイルス血症や局所からのウイルス排泄量を評価す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。直腸及び鼻腔サンプルにおいては、ウイルス RNA の動態のピークとウイルス分離のピークは一致した。また、実験感染犬は軽度から重度まで、呼吸器病、消化器症状又は皮膚の湿疹といった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 の動態は比較的類似していた。症状を示した犬においては、ウイルス RNA のピークは、症状の発現時期と一致した。これらの結果から、CDV の実験感染においてリアルタイム RT-PCR 法が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が示され、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が示された。

第 3 章 国内における CIRDC の病原学的調査

国内で発生した CIRDC 罹患犬 119 頭の口腔、鼻腔及び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 が 13 頭、CPIV が 9 頭、CDV が 6 頭、CAV-2 が 2 頭、CHV が 2 頭から検出された。複数の病原体遺伝子が検出された 16 頭についても、Bb が 13 頭、CPIV が 9 頭、CRCoV が 6 頭と検出率が高かった。これらの結果から Bb と 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、CIRDC の主要な原因となっていることが推定された。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 CDV 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決めるのに役立つ。
- ③ CIRDC 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が示唆され、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す。

これらの成果は犬の健康が脅かされる重要な感染症を予防するための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。