

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 勢籬 剛

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) と犬パラインフルエンザウイルス (CPiV)、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、申請者は、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章で構成されている。

第1章ではCPV ワクチン株(9985-46株)の弱毒化を担う最小決定因子の同定について述べた。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の弱毒化の遺伝子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。申請者は、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。その結果、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ている。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。本章の結果により、CPV9985-46株の弱毒化を担保する遺伝的な最小決定因子が同定され、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すことが示された。さらに古典的なブラインド継代法に代わる次世代のCPV弱毒生ワクチンの合理的な作出方法に有益な情報を提供することができた。

第2章では、CDVの実験感染系におけるリアルタイムRT-PCR法の利用について述べた。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。直腸およ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。本章の結果より、ジステンパーの実験感染系でウイルス動態を評価する時、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判定するのに役立つといえる。

第 3 章では、国内における CIRDC の病原学的調査について述べた。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 と CPIV、CDV、犬ヘルペスウイルス (CHV)、犬呼吸器コロナウイルス (CRCoV) および *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ある。ワクチン接種犬からの CAV-2 と CPIV、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。本章の成果により、CIRDC の発生には、Bb と CPIV、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 と CPIV、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、ワクチンの有効性を示すことができた。

以上のように、本論文の成果は、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学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。

