

論文審査の結果の要旨

プラユス セックホー

申請者氏名 Prayuth Saekhow

提出されたプラユス セックホー氏の学位論文について、平成26年8月21日、5名の審査委員（池田秀利、田口文広、土田修一、田中良和、青木博史）が集まり最終試験を行った。論文審査の結果は次の通りである。

セックホー氏の大学院博士課程における研究内容は、豚パルボウイルスの疫学的、遺伝学的な調査研究であり、この学位論文はその結果をまとめたものである。

まず、序論では世界におけるパルボウイルス研究の現状とこの研究の目的を述べている。パルボウイルス科のウイルスは多様であり、広い動物種から感染性パルボウイルスが検出されている。さらに、近年、遺伝子解析技術が進み、感染性ウイルスが分離できず、さらに遺伝子情報もないウイルスであっても、ある程度のウイルス核酸量があれば遺伝子配列がわかるようになってきたため、次々に新規のパルボウイルスの存在が明らかにされてきている。そのため、旧分類には当てはまらないウイルスが多くなり、ごく最近になってパルボウイルスの新しい分類や名前が提案された。しかし、この論文では混乱を避けるためウイルス名はすべて旧名で記載されている。

古くから知られている豚パルボウイルス（porcine parvovirus, PPV）は胎児に感染して早産、ミイラ化、死産などを起こすが、新規豚パルボウイルスについては、幾つかの国で感染率などの調査報告がなされている以外に、ウイルス学的な解析はほとんどなされておらず、疾患との関係も明らかでない。パルボウイルス科のウイルスに共通した性質として、消毒剤や熱、pHなどの環境変化に対して比較的抵抗性を示し、ウイルス複製のためにはDNA合成の盛んな細胞を必要とする、ことなどが挙げられてい

る。これはパルボウイルス感染症を清浄化することの難しさや病理発生機構と関係していると考えられる。新規豚パルボウイルスがどの様に蔓延し、どの様な疾病に関与しているかは、今後の様々な解析が必要とされる状況にある。

第一章から三章に分けて書かれているセックホー氏の論文の基本的な研究方法は、日本やタイの養豚の野外材料を用いて、古くから知られている豚パルボウイルスと新規豚パルボウイルスをPCR法(遺伝子増幅法)で特異的に検出して感染率を割り出し、さらに豚一頭ごと感染しているウイルス遺伝子の核酸配列を決定してウイルスの近縁関係を類推するという分子疫学的な解析である。セックホー氏が研究した豚のパルボウイルスは、50年前に発見されたPPVと13年前から発見され始めた10数種の新規豚パルボウイルスのうちの4種(PPV2、PPV3、PPV4、PBo-likeV)である。

第一章では、日本の豚に感染している新規豚パルボウイルス2型(PPV2)に関する研究を述べている。PPV2遺伝子検出率は、食肉検査所で採材した健康豚の扁桃では58%、家畜保健衛生所に持ち込まれた様々な疾病のある豚の扁桃では100%であったが、これは外国に比べて同等かより高い検出率であったという。次に、健康豚からほぼ全長のPPV2遺伝子クローンを分離し、外国で報告されていた6株の核酸配列と比較してその細かい違いを明らかにした。その核酸配列情報をもとに、PPV2遺伝子の中でも比較的多型性に富むORF2の一部を特定し、その領域のDNAを増幅するプライマーを設計し、41個体から得られたPPV2遺伝子の塩基配列を決定して分子系統樹解析を行っている。その結果、多様なPPV2株が日本に存在すること、各養豚場をみると、明らかに異なる複数の株が存在する養豚場が7/10にのぼることなどを明らかにしている。既に犬パルボウイルスの研究で示されているように、遺伝子の少し異なる2つのパルボウイルス株が自然界で遺伝子組換えを起こすことによって、より強毒な株を生じることがあり、この調査でみられた1農場に複数の株が循環している状態は組換え新興ウイルスを生む危険性があると指摘している。

第二章では、タイの養豚における新旧5種の豚パルボウイルスの感染状況調査結果を述べている。今まで、タイについてはPPVの抗体陽性率の報告がある以外に詳しい調査報告がなされていなかったため、この調査は色々な豚パルボウイルスの感染状況を初めて明らかにしたものとなった。タイのチェンマイ地域の食肉検査所で採取した80頭の扁桃サンプルについて、PCR法で5種類のパルボウイルス遺伝子（PPV、PPV2、PPV3、PPV4、PBo-likeV）の検出を試み、すべて陽性であり、遺伝子陽性率は18%から73%で、他国のそれに比べて同等か少し高率であることを示した。個体ごとにみても、各ウイルス遺伝子の検出はランダムではなく、幾つかのパルボウイルスが一個体から共に検出される確率が有意に高いことを認めている。つまり、PPVとPPV3、PPV2とPBo-likeVの2つの組み合わせは、共検出率が統計的に有意に高く、それらのウイルスが生体の中で何らかの影響しあっている可能性を指摘している。

新規パルボウイルスであるPPV2とPPV3については、20サンプルずつ遺伝子配列を決定し分子系統樹解析を行っている。その結果、この地域のPPV2には2つのクレードのウイルス、PPV3には1つのクレードのウイルスしか検出されないことから、両ウイルスとも限定的な感染源から侵入してきたものではないかと推測している。

第三章では、日本の豚での新旧豚パルボウイルスと豚サーコウイルス2型（PCV2）の感染状況の解析を述べている。研究室で行っていた日本の健康豚120頭を対象とした15種類の豚ウイルス遺伝子のスクリーニング結果では、5種類の豚パルボウイルスとPCV2の遺伝子しか検出されなかったが、いずれもかなりの高陽性率（33%～80%）であった。PCV2は、数年前まで世界の養豚産業に大きな損失を与えていた、豚サーコウイルス関連疾患（PCVAD）の主病因であり、PPVはそのPCVAD発症の共因子の一つであろうとも考えられている。この調査でも、健康豚にも関わらず、PCV2はPPVと共に検出される確率が有意に高かったばかりでなく、PCV2/PPV2、PCV2/PPV3の組み合わせでも、さらにPPV/PPV4の組み合わせでも、共検出率が有意に高いことを認めている。推

察として、PCVAD 発症前の無症状豚においても、PCV2 と複数の豚パルボウイルスが協調的に増殖しているか、又は、何らかの免疫抑制が働きウイルスを排除できない状態にあり、それはその後の PCVAD への病的進行と関係があるのではないかとしている。

さらに、PPV3 については 4 養豚場の遺伝子多様性を遺伝子系統樹解析で調べている。PPV3 遺伝子の多様性は大きくないが、2 養豚場は恐らく複数株が混在しているだろうと推測している。

この学位論文全体についての評価は次の通りである。この調査研究は主に食肉検査所で採材した少数の野外材料を対象に行われているが、幾つかの新規性のある情報が得られている。ウイルス遺伝子の解析もオーソドックスな手法であるが、日本とタイのウイルス株の地域的な特徴をとらえていると思われる。新規パルボウイルスと疾患との関連については、まだこの調査結果だけでは明確ではないが、関連性を疑わせるデータが得られていると考えられる。

なお、本論文の第一章にあたる内容は既に科学雑誌に出版され、第二、三章の研究内容は別々に科学雑誌に投稿され現在審査中である。

以上のように、本論文は豚パルボウイルス科のウイルスについて感染状況と遺伝子解析を行い未解明の疾患との関連を迫及した研究内容となっているため、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。