

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 Nguyen Van Dung

題 目 : Characterization of canine enteric viruses in Vietnam  
(ベトナムの犬における腸管ウイルスの性状解析)

---

### 論文要旨 :

Enteric viruses cause enteritis in dogs and some of them cause severe diarrhetic disease with high mortality and morbidity such as canine distemper virus (CDV) and canine parvovirus (CPV). There were a few reports on CDV and CPV infections in Vietnam, but not on the other enteric viruses such as canine coronavirus (CCoV), canine kobuvirus (CKoV) and mammalian orthoreovirus (MRV). To understand Vietnamese enteric viruses in dogs, we carried out genetic analysis and virus isolation.

In CHAPTER 1, Vietnamese CDVs were characterized. CDV H genes were detected in five domestic Vietnamese dogs with diarrhea and two CDVs were successfully isolated from dogs positive for H genes. The complete genome of one isolate, CDV/dog/HCM/33/140816, was determined. Phylogenetic analysis showed that all Vietnamese CDVs belonged to the Asia-1 genotype. In addition, the H proteins of Vietnamese CDV strains were the most homologous to those of Chinese CDVs (98.4% to 99.3% identity). These results indicated that the Asia-1 genotype of CDV was the predominant genotype circulating among the domestic dog population in Vietnam and that transboundary transmission of CDV has occurred between Vietnam and China.

In CHAPTER 2, Vietnamese CCoVs were characterized. To examine the prevalence of CCoV infection among Vietnamese dogs, 201 serum samples were analyzed by virus-neutralization (VN) test. The results showed that antibodies against CCoV-II were present in 87 dogs (43.3%). To detect genes of CCoV, fecal samples collected from 30 diarrhetic and 50 healthy dogs were examined by RT-PCR, confirming that 2 diarrhetic dogs and 5 healthy dogs were positive for CCoV. Nucleotide sequences of *N*-terminal region of S gene indicated that CCoV strains were divided into two subgenotypes, CCoV-IIa and -IIb, respectively. Furthermore, we succeeded in isolation of CCoV/dog/HCM47/2015, the isolate was plaque-purified three times, and 3'-terminal one-third of the genome was analyzed. Interestingly, the plaque-purified virus had a large deletion in ORF3abc and E genes (1,165 nt), and a short deletion in ORF7b gene (60 nt), suggesting that these regions are not necessary for *in vitro* replication of CCoV. Next, the antigenicity between the isolated CCoV-IIb and the other CCoV-IIa was compared by VN test, revealing that antigenicity of the isolated CCoV is equal or higher than that of the other CCoV. In summary, two subgenotypes of CCoV-II are spreading among Vietnamese dogs. The isolated virus with a large deletion after *in vitro* passage may be useful for the development of vaccine, owing to its antigenicity and efficient viral growth *in vitro*.

(別紙様式第 3 号)

In CHAPTER 3, Vietnamese CPVs were characterized. To examine the prevalence of antibody against CPV-2 among Vietnamese dogs, 108 serum samples from unvaccinated dogs were analyzed by VN test. The results showed 101 dogs (93.5%) were positive for anti-CPV antibody. To detect genes of CPV, fecal samples collected from 30 diarrheic and 50 healthy dogs were examined by PCR. The prevalence of anti-CPV antibody in diarrheic dogs (43.3%, 13/30) was significantly higher than that in healthy dogs (4%, 2/50), indicating that CPV was a major pathogen causing diarrhea in domestic dogs. Genotyping of 15 CPV strains showed that CPV-2a (1/15) and CPV-2c (14/15) were circulating in Vietnam. Virus isolation was performed from fecal samples using A72/cSLAM cells, and nine CPV strains were successfully isolated. Phylogenetic analysis based on VP2 gene (1,755 nt) and whole coding region (4,269 nt) indicated that Vietnamese CPV strains were similar to Chinese strains. In conclusion, dominant genotype spreading among Vietnamese dogs changed from CPV2b to CPV-2c.

In CHAPTER 4, Vietnamese MRVs and CKoVs were characterized. The prevalence of MRV in diarrheic dogs (50%, 15/30) was significantly higher than that in healthy dogs (4%, 2/50). Mix-infection with MRV and the other enteric viruses (CDV, CPV, CKoV) was commonly observed in diarrheic dogs. Four MRVs were isolated from feces, and genetic analysis of MRV S1 genes showed that three Vietnamese MRVs belonged to serotype 3 and one did to serotype 2. Vietnamese serotype 3 and 2 showed the highest identities with Chinese porcine MRV-3 (95.2%-96.1%) and Chinese human MRV-2 (94.6%), respectively. CKoV was detected from three diarrheic (10%) and two healthy dogs (4%). Nucleotide sequence of CKoV showed that Vietnamese CKoV was similar to those in Korea. This is the first report on MRV and CKoV infections in Vietnamese dogs.

In conclusion, we performed comprehensive surveillance of canine enteric viruses in Vietnamese dogs. Interestingly, all Vietnamese viruses were the most similar to those in China, indicating transboundary transmission between Vietnam and China. We succeeded in isolation of two CDVs, one CCoV, nine CPVs and four MRVs. These viruses should be available for development of diagnostic method and vaccine in Vietnam.

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	NGUYEN VAN DUNG
審査委員	主査：山口大学 教授 前田 健
	副査：山口大学 教授 岩田 祐之
	副査： 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 海外病研究調整監 山川 睦
	副査：山口大学 准教授 西垣 一男
	副査：山口大学 准教授 高野 愛
題目	Characterization of canine enteric viruses in Vietnam (ベトナムの犬における腸管ウイルスの性状解析)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>ベトナムの犬におけるウイルス感染症に関する情報は少ない。また、下痢症の原因ウイルスに関する詳細な情報が少ないにも関わらずワクチン接種が行われているのが現状である。</p> <p>本学位論文では犬における主要な下痢の原因ウイルスと考えられる犬ジステンパーウイルス(CDV)、犬コロナウイルス(CCoV)、犬パルボウイルス(CPV)と下痢症との関連が疑われている哺乳類オルトレオウイルス(MRV)と犬コブウイルス(CKoV)についてベトナムの検体を用いて疫学調査を実施するとともに、その原因ウイルスを分離し、分子疫学を実施した。ベトナムで蔓延している下痢を引き起こすウイルスを明らかにすること、および蔓延するウイルスを分離することにより、ベトナムにおけるウイルス性下痢症の予防対策への一助となることを目的とする。</p> <p>本学位論文における研究は、以下の4章より構成される。</p> <p>【第1章】ベトナムの飼育犬からの犬ジステンパーウイルス(CDV)の分離とその系統解析</p> <p>CDVは飼育犬を含む多くの食肉目に感染する最も重篤な感染症を引き起こす病原体の一つである。5株が下痢を呈した犬から検出され、2株の分離に成功した。そのうちCDV/dog/HCM/33/140816株1株の全塩基配列の決定に成功した。現在検出された5株のCDVは遺伝子型Asia-1型であることが判明した。また、ベトナムのCDVは中国のCDVに近縁であることが判明した。</p> <p>これまでワクチン株と同じAmerica-1型の報告がベトナムの犬より報告されていたが、Asiaで蔓延しているAsia-1型の報告は初めてである。また、中国からの越境性感染も示唆された。更に、分離株が得られたことはベトナムの飼育犬のCDV予防に最も適したワクチン開発の基礎となることが期待される。</p>	

### 【第 2 章】ベトナムの飼育犬の間で拡がる犬コロナウイルスの疫学調査

犬コロナウイルス (CCoV) は犬に腸炎を引き起こす重要な病原体であるにも関わらず、ベトナムにおける CCoV に関する情報はない。ベトナムの 201 頭の飼育犬を調べた結果 87 頭 (43.3%) が CCoV に対する中和抗体を保有していた。30 頭の下痢を呈した犬と 50 頭の健康な犬の糞便から遺伝子検出を試みた結果、それぞれ 2 頭と 5 頭の犬から CCoV 遺伝子が検出され、ベトナムの CCoV は IIa と IIb の二つに分類された。更に、一株の CCoV/dog/HCM/47/2015 株の分離に成功した。しかし、性状解析のためにプラーク純化したウイルスには 3abc の 1165 塩基の欠損と 60 塩基の欠損が認められた。

CCoV-IIa と IIb の 2 種類がベトナムの飼育犬で蔓延していることが判明した。分離されたウイルスは高い抗原性を保持しているとともに、*in vitro* での増殖が良いことからワクチン作製のための候補となることが期待される。

### 【第 3 章】ベトナムの飼育犬に蔓延する犬パルボウイルス (CPV) の疫学調査

犬パルボウイルス (CPV) は飼育犬に腸炎を引き起こす最も重要な病原体の一つである。ベトナムの飼育犬におけるパルボウイルス感染の報告はあるが、最近の感染状況に関する情報は少ない。108 頭の血清を調査した結果、93.5% の飼育犬が抗体を保有していた。下痢を引き起こした犬の 43.3% から CPV が検出されたのに対して、健康な犬からは 4% しか検出されなかった。15 株の遺伝子解析の結果、14 株が遺伝子型 2c であり、1 株が 2a であった。

CPV が依然としてベトナムの飼育犬に蔓延していること、主要な遺伝子型が 2b から 2c に推移したこと、ベトナムの CPV には特有の変異が多いことが判明した。今後も、既存のワクチンの有効性の検証が必要であることが示された。

### 【第 4 章】ベトナムの犬における腸ウイルスの分子疫学調査

下痢症との関連が示唆されている哺乳類レオウイルス (MRV) と犬コブウイルス (CKoV) を加えた調査を行った結果、MRV は下痢症の犬から 50%、健康な犬から 4% の割合で検出されるとともに、MRV は下痢症ウイルスである CDV、CPV、CCoV、CKoV と共感染していることが判明した。また MRV4 株は血清型 2 と 3 であることが判明した。CKoV は 10% の下痢症の犬、4% の健康な犬の糞便から検出され、韓国の CKoV と遺伝的に近縁であることが判明した。

MRV は犬の下痢症と関連していることが判明したが、CKoV の下痢症との関連は見いだせなかった。MRV の対策の必要性が示唆された。

本研究において、ベトナムに蔓延するウイルス性下痢症が網羅的に解明された。CDV の新規遺伝子型、CCoV 感染の検出、CPV の遺伝子型の推移、MRV の下痢症との関連を報告するとともに、ベトナムのウイルスの多くが中国由来株と近縁であることを証明した。

これら一連の研究はベトナムにおけるウイルス性下痢症対策に多く貢献するものである。また、得られた CDV 2 株、CCoV 1 株、CPV 9 株、MRV 4 株はベトナムにおけるワクチン開発、診断法の開発に応用されると期待される。更に、中国との越境感染の可能性が強く示唆され、越境感染対策の重要性が明らかとなった。本研究の成果は今後のベトナムにおけるウイルス性下痢症の対策に大いに役立つと期待される。以上により、本論文は博士 (獣医学) の論文として、妥当なものであると判断された。