

学位論文要旨

氏名 南 昌平

題 目 : Epidemiological studies on infectious diseases among carnivores
(食肉目動物感染症の疫学解析)

論文要旨 :

伴侶動物、動物園動物、野生動物における感染症は動物の生態や経済などに深刻な被害を及ぼすことがある。フェレットコロナウイルス (FRCoV) は近年発見されたフェレットに感染する新興感染症であり、猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) と似た病態を示し、致死的であるにも関わらず、不明な点が多い。オーエスキー病ウイルス (PRV) の自然宿主はブタであるが、ブタ以外の動物に対して狂犬病に似た致死性の脳炎、オーエスキー病 (別名 ; 仮性狂犬病) を引き起こす。新生ブタに対しても高い病原性を示すため、養豚業界において経済的に問題となる感染症であり、国内の養豚場ではワクチンプログラムによって管理され、現在撲滅計画が推進されている。

本研究は食肉目動物に感染症を引き起こす上記 2 種のウイルスを解析し、病原性や発生機序を解明することを目的とし、全 3 章より構成される。

第 1 章 抗 FRCoV 抗体検出法の確立

FRCoV は国内のフェレットに蔓延していることが、遺伝子解析により判明している。しかし、全世界において血清学的調査は行われておらず、その検査法も確立されていない。本章では、抗 FRCoV 抗体検出法の確立を行い、血清学的調査を国内フェレットに対して実施した。

抗体検出法として ELISA を選択した。抗原にはヌクレオカプシド (N) 蛋白を GST 融合蛋白として N 末端側と C 末端側の 2 つに分けて発現、精製したものを使用した。

作製した蛋白の抗原性評価のため、国内フェレット計 22 個体の血清または血漿を用い、ELISA を実施した。多くの個体が両蛋白に対する抗体を保有していた一方で、一部の個体は N 末端側蛋白にのみに対する抗体を保有していた。N 末端側蛋白を抗原に用いた ELISA を国内フェレット計 35 個体の血清または血漿に対して実施した結果、31 個体 (89%) が抗 FRCoV 抗体陽性となり、血清学的にも国内の飼育フェレットに FRCoV が蔓延していることが示された。また、確立した検出法の有用性が証明された。

第 2 章 新規 FRCoV の検出と遺伝子組み換えによる FRCoV 出現機序

国内フェレットにおける蔓延状況を把握するため、FRCoV の RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 遺伝子を標的とした RT-PCR を国内フェレット 201 個体に対して実施し、国内での蔓延状況把握および系統解析による新規 FRCoV の発見とその比較解析を行った。

126 個体 (62.7%) が遺伝子陽性となり、高い陽性率が示された。得られた遺伝子配列を用

いて系統解析を実施した結果、2株（Saitama-1株、Aichi-1株）の遺伝子が他の株と大きく異なっていた。このSaitama-1株のスパイク（S）遺伝子より下流の遺伝子配列（8,271塩基）を決定し、既報のMSU-1株とMSU-2株と比較解析した。SimPlot解析により、MSU-2株はS遺伝子を含む上流3分の1がMSU-1株に、下流3分の2がSaitama-1株に対して高い相同性を示した。このことからMSU-2株はMSU-1株とSaitama-1株との遺伝子組み換えにより出現したことが示唆された。

以上から新規FRCoV株と遺伝子組み換えによるFRCoVの出現機序が明らかとなり、不明な点が多いFRCoVの病原性解明に貢献する結果が得られた。

第3章 野生動物におけるPRVの種間伝播

アライグマは多くのウイルス感染症を媒介するが、国内ではウイルス感染症によるアライグマの死亡例は我々の知る限り存在しなかった。2016年に2頭のアライグマが西日本でPRV感染により死亡した。死亡した2頭のアライグマからPRVが分離されたため、PRV感染により死亡したことが示唆された。アライグマのPRV自然感染による死亡例は世界初である。分離株の全塩基配列（141,757塩基）を決定した結果、国内のワクチン株ではgE遺伝子が欠損しているのに対して、RC1株はgE遺伝子を保有していた。そのため、RC1株は病原性を保有した野生株であることが示された。また系統解析から、旧来の日本株よりも近年の中国株に近縁であった。

同県のイノシシ111個体、アライグマ61個体の血清を用いてウイルス中和試験を実施した。その結果、13頭（11.7%）のイノシシが抗PRV抗体陽性となったが、アライグマは全て抗体陰性であった。

PRV清浄県においても野生動物であるイノシシがPRVを維持していることが再確認された。PRVは狂犬病との鑑別疾患でも重要であり、野生動物におけるPRV調査の重要性を再確認する結果となった。

本研究ではFRCoVとPRVといった食肉目動物へ深刻な感染症を引き起こすウイルスを調査し、国内の蔓延状況や病原性解明に貢献した。それぞれ伴侶動物、畜産動物、野生動物において種間伝播や遺伝子組み換え、遺伝子変異により強毒化するおそれがある。FRCoV遺伝子組み換え機序の解明はコロナウイルスの病原性解明にも役立つことが期待される。PRVは野生のイノシシでも維持されており、養豚で清浄化されている地域でも定期的な調査が必要であることが示された。これらの結果は野生動物・伴侶動物におけるウイルス感染症をモニタリングする必要性を改めて示した。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	南 昌平
審 査 委 員	主 査：国立感染症研究所獣医科学部 獣医科学部長 前田 健
	副 査：山口大学 教 授 岩田 祐之
	副 査：鹿児島大学 教 授 遠藤 泰之
	副 査：山口大学 教 授 水野 拓也
	副 査：山口大学 准教授 下田 宙
題 目	Epidemiological studies on infectious diseases among carnivores (食肉目動物感染症の疫学解析)
審査結果の要旨： 本論文では、国内の伴侶動物並びに野生食肉目における感染症について疫学調査を実施し、得られた病原性ウイルスの遺伝子解析および病原性解析を行った。 第 1 章ではフェレットコロナウイルス (FRCoV) の抗体検出法を確立し、血清疫学調査を実施した。FRCoV に感染したフェレットは重篤な症状を呈し、致死性感染症であるにも関わらず、基礎研究があまり進んでいない。本章では、コロナウイルス科でよく保存されている FRCoV のヌクレオカプシド (N) 蛋白を大腸菌発現し、精製した後、ELISA の抗原とすることで世界初となる FRCoV の抗体検出法の確立に成功した。今後、FRCoV の疫学調査において有用なツールとなることが期待される。また、FRCoV の N 蛋白の抗原性を詳細に解析した結果、FRCoV N 蛋白において N 末端側と C 末端側の抗原性に違いがあることが明らかとなった。N 末端側がより FRCoV 間で保存されていることが明らかとなった。国内フェレットにおける FRCoV 感染状況を把握するために、ELISA を用いて血清疫学調査を実施した。その結果、35 検体中 31 検体が陽性となり、非常に高い抗体陽性率であることが明らかとなった。これらの結果は、不明な点が多い FRCoV の動態や蔓延状況の把握に大きく貢献している。 第 2 章では、RT-PCR による FRCoV 遺伝子検出を行い、国内フェレットを対象とした疫学調査を実施した。FRCoV 遺伝子検出にはウイルス間で保存されている RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 遺伝子内にプライマーを設計した。RT-PCR の結果、201 検体中 126 検体が陽性となり、国内の多くのフェレットが FRCoV に感染しており、持続感染している可能性が示唆された。第 1 章の結果と共に、国内での FRCoV 蔓延状況を明らかにし	

た。FRCoV には 2 つの遺伝子型と病型が報告されているが、2 つの病型は劇的に異なっており、遺伝子型との相関も明らかになっていない。しかし、今回の結果から、下痢を示したフェレット及び若齢の個体から有意に FRCoV 遺伝子が検出されており、FRCoV が若齢動物で感染が広がること、また、下痢と相関していることが明らかとなった。また、得られた FRCoV RdRp 遺伝子の系統樹解析の結果、2 株 (Saitama-1 株、Aichi-1 株) が他の FRCoV と遺伝学的に異なっていることが判明した。そこで、Saitama-1 株のスパイク (S) 遺伝子から 3'末端までの遺伝子配列を決定し、既報の FRCoV と比較解析を行った。系統樹解析から S 蛋白は上流 3 分の 1 を境として近縁な株が異なっており、RdRp 遺伝子及び N 蛋白では他の FRCoV と大きく異なっていた。SimPlot 解析により、MSU-2 株に対して MSU-1 株と Saitama-1 株は部分的に相同性が高くなっていることがわかり、遺伝子組み換えによる FRCoV の発生を明らかにした。コロナウイルスの組み換えによる強毒株発生機序の解明は猫伝染性腹膜炎、SARS や MARS のような危険なコロナウイルス感染症の予防に繋がる非常に価値のある研究である。また、新興感染症である FRCoV は早急な対策が必要であり、本章で疫学調査及び病原性解析から得られたデータの重要性は非常に高く、今後の研究発展に期待できる。

第 3 章では、アライグマの死亡原因を探求し、得られた病原性因子の遺伝学的解析を行っている。アライグマは環境適応能力が高く、媒介する感染症も多い外来種動物であることがよく知られている。しかし、アライグマを死に至らしめる病原体は数少なく、致死性のもは狂犬病ウイルスや犬ジステンパーウイルスなど、どれも高病原性で重要度の高い感染症である。本章では、PCR およびウイルス分離の結果から 2016 年の関西地方におけるアライグマの死因はオーエスキー病ウイルスであることを診断した。また、分離株 (RC1 株) の全長ゲノム配列を次世代シーケンスにより決定し、全長及び gC 遺伝子を用いた系統樹解析から、国内の過去のウイルスとは異なり、近年中国で報告されているウイルスと近縁であることを示した。この分離株はワクチン株では欠損されている gE 遺伝子を保持しており、ワクチン株ではなく野生株であることが明らかとなった。オーエスキー病によるアライグマの自然感染は世界でも報告例がなく、新たな知見である。また、この地域はブタでのオーエスキー病が清浄化されており、血清疫学調査の結果から野生動物のイノシシから伝播が強く示唆された。これらの結果から、アライグマの死因として、犬ジステンパーや狂犬病だけでなくオーエスキー病も重要であること、また異なる動物種間での感染症の拡大が示された。

以上「FRCoV の疫学調査及び病原性解析」から、コロナウイルスの病態解明に大きく貢献し、「オーエスキー病ウイルスの野生動物での蔓延」から、野生動物種間でのウイルスの伝播を明らかにした。これら、各種動物でのウイルス感染の把握は、小動物臨床や大動物診療のみならず、人獣共通感染症対策にも貢献できると期待された。

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。