

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月10日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580374

研究課題名（和文） ウイルスの異種間伝播による感染拡大要因の解明とその制御

研究課題名（英文） Studies on transmission of canine distemper virus among many animal species

研究代表者

前田 健 (MAEDA KEN)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：90284273

研究成果の概要（和文）：

イヌジステンパーウイルス(CDV)は野生動物を中心として蔓延しており、我々の調査によって国内のアライグマ、タヌキ、イタチ、テン、キツネ、アナグマ、トラ、ライオン、シカ、イノシシ、クマへの感染が確認された。さらに、これまでにない新規のウイルスの存在も確認された。また、これまで困難であったイヌを用いたCDV感染実験系の確立にも成功し、CDVの病態解析が可能となった。

研究成果の概要（英文）：

Canine distemper virus (CDV) has been spreading among Japanese wild mammals. Our results indicated that raccoon, raccoon dog, badger, masked palm civet, martens, fox, tiger, lion, sika deer, wild boar and bear had been infected with CDV in Japan. Furthermore, a novel genotype of CDV was isolated from domestic wild mammals. In addition, we succeeded in establishment of experimental model using dogs and this challenge model seems to be useful for analysis of pathogenesis of CDV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：獣医微生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：イヌジステンパーウイルス、野生動物、動物園動物、サル、遺伝子型

1. 研究開始当初の背景

イヌでのイヌジステンパーウイルス(CDV)発生は大きな問題となっていないが、野生動物ではかなりの変異を伴い進化し続けている。和歌山や高知県での野生動物への馴化は、ヒトへの感染も危惧される「新興感染症」と

なる要素を含んでいるため注視し続ける必要がある。更に、イノシシやシカへの感染は、生産動物である「ブタやウシへの感染」の可能性が危惧される。また、今回のCDVの感染源としては外来移入種であるアライグマである可能性が強く示唆されている。アライグ

マは北米では狂犬病と CDV の感染源として危惧されており、CDV の異種間伝播の機序を詳細に解析することにより、「狂犬病などの侵入時の対策」となることも期待される。CDV の野生動物間での拡がりにはイヌのみならず動物園動物へも脅威となっている。しかし、動物園動物へのイヌ用のジステンパーワクチンは時として発症するため、ワクチン接種ができない。「動物園動物用のワクチン開発」も重要な課題となっている。

2. 研究の目的

- (1) 国内の野生動物間で流行している CDV を解析する。
- (2) 流行地での感染パターンを解析する。
- (3) CDV の実験感染モデルを作出する。
- (4) CDV の病態発現機序を解明する。

上記、4 項目を目的として以下の研究を行った。

3. 研究の方法

- (1) 各種 CDV 感染野生動物からのウイルス分離

和歌山県、高知県、滋賀県、山口県における CDV 感染が疑われる野生動物（タヌキ、ハクビシン、アナグマ）の各種臓器の乳剤およびぬぐい液より、A72/cSLAM 細胞を用いてウイルス分離を行った。

- (2) Hemagglutinin(H)および Nucleocapsid(N) 遺伝子の遺伝子検出

分離ウイルスおよび分離不可能な場合は臓器よりウイルス遺伝子の検出を試みた。CDV の診断および検出には、CDV を高感度に検出できる N 遺伝子をターゲットとした One-Step RT-PCR を行った。また、系統樹作成のために H 遺伝子を含む断片をプライマー HF と HR を用いて TaKaRa RNA LA PCR™ kit (AMV) Ver 1.1 にて RT-PCR を実施した。

- (3) 塩基配列の決定

塩基配列は各種プライマーを用いて BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit によりダイレクトシーケンス法にて決定した。全塩基を決定する際には、5' 末端および 3' 末端を増幅するために Invitrogen 社の 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 あるいは 3' -end, 5' -Full RACE Core Set を用いた。

- (4) ウイルス中和抗体価の測定

野生動物およびイヌ由来血清は 56°C30 分間で補体を非働化した後、ウイルス中和試験に用いた。5 倍より二倍階段希釈した血清と 100PFU の KDK-1 を含むウイルス液を等量混合し、37°C1 時間反応後、CRFK/cSLAM 細胞へ接

種した。1 時間 37°C で吸着後、0.8% アガロスを重層した。ブランクが観察されるのを確認した後、ホルマリン緩衝液で固定し、クリスタルバイオレットで染色した。ブランクを数え、コントロールに比べて 75% 以上ブランク数が減少している血清の最大希釈倍率を抗体価とした。

(5) CDV 感染実験

サル由来 CDV #7 株と高知県ハクビシン由来 Kochi01A 株をビーグル犬 (CDV 陰性確認、3 カ月齢、雌) 6 頭 (各群 3 頭) に点眼、経鼻、経口にて 10ml のウイルス液 (CDV#7 株 1×10^7 PFU、Kochi01A 株 1×10^6 PFU) を接種し、イヌにおける発症の有無を検討した。さらに CDV#7 株は高用量および低用量接種し、その病態を比較した。

4. 研究成果

- (1) 和歌山県・滋賀県・高知県における CDV 抗体陽性率の推移

和歌山県のアライグマにおける CDV 抗体陽性率は 2007 年、2008 年、2009 年、2010 年、2011 年でそれぞれ 60.3%、27.6%、13.9%、8.6%、15.2%、タヌキにおいては 2008 年、2009 年、2010 年、2011 年でそれぞれ 33.3%、23.5%、18.2%、18.5% であった。その他、イノシシで 12 頭、シカ、テンで 2 頭、アナグマ、チョウセンイタチで 1 頭の CDV 陽性個体が見られた。(図 1) 和歌山県では 2010 年にキツネから、2011 年にタヌキから新たに CDV 遺伝子が検出され、それらは 2007、2008 年の和歌山県分離株と同一性が高かった (図 2 紫色)。滋賀県においては 2 株の CDV がタヌキから分離され、これらは和歌山県分離株と同一性が高かった (図 2 紫色)。高知県では 2009-2010 年に小規模の再流行が起こり、ハクビシン、アナグマ、タヌキから新たに 4 株の CDV が分離され、それらは系統樹上では以前高知県で分離された CDV 分離株と同じクラスターに属していた (図 2 青色)。

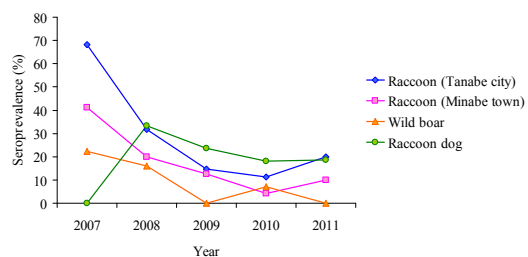


図1 和歌山県田辺市周辺の野生動物におけるCDV感染率の推移

これらの結果は、各地域で独自に進化している CDV が存在するとともに、和歌山県から滋賀県にわたる広域に感染している CDV の存

在も示された。また、高知県では小規模な再流行が観察された。和歌山ではCDV抗体保有動物の割合が減少していることから、再流行に注意を要することが示された。

(2) 山口県での野生動物から動物園動物への感染

2009年11月末よりサファリ式展示施設内及びその周囲でタヌキの衰弱死が多発した。翌年1月より施設内のトラ12頭が下痢、嘔吐、腹痛、発咳などを呈したが、多くは回復した。その後、3月に1頭が神経症状を示し呼吸不全に陥り死亡した。タヌキ4頭とトラ1頭からCDVが分離された。H遺伝子配列は、タヌキ由来株間では完全に一致し、トラ由来株との相同性は99.7%であった(図2緑色)。すべての分離株は現在国内の野生動物間で流行しているAsia-1型に属していた。7頭のトラ全ての下痢便からCDV遺伝子が検出された。ライオン1頭で1:320、野生クマ1頭で1:40のCDV抗体価が検出された。トラの組織所見では間質性肺炎が観察され、各種臓器でCDV抗原が検出された。さらに、動物園動物の過去に回収された血清を調べた結果、以前よりCDV感染が起きていることが示された。

以上のことから、国内に流行しているCDVは大型ネコ科動物にも感染して、致死性となることが示された。我々の研究結果は、クマ、イノシシ、シカ、ライオン、トラ、サルへの感染を証明しており、国内のほぼすべての哺乳類がCDV感染する可能性を示唆しており、CDVの蔓延には今後も注目する必要がある。

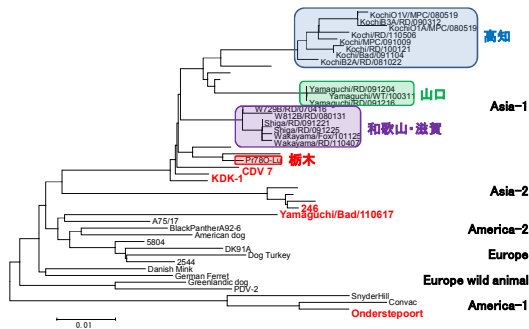


図2 Hemagglutinin蛋白のアミノ酸配列に基づいた系統樹の作製

(3) 在来野生動物から新規遺伝子型CDVの分離

2011年6月、衰弱したアナグマ(成獣、雄)が保護した後、死亡した。アナグマの肺と脳からCDVが分離された。肺、脳、脾臓、リンパ節における好酸性の細胞質内封入体およびCDV抗原が確認された。H遺伝子(1824bp)

の塩基配列を決定した結果、アミノ酸レベルで遺伝子型 America-2 に属する A75/17 株との相同性が 94.9%で最も高く、Asia-1 型とは 90.3-93.2%、Asia-2 型とは 90.5-93.0%、America-1 型とは 88.7-89.4%であった(図3赤文字)。全塩基配列(15690塩基)を決定した結果、コードされる8種類の蛋白(N, P, H, F, M, L, C, V)は全て遺伝子型 America-2 に相同性が最も高かった。

以上の結果より、国内には3番目の遺伝子型のCDVが存在することが証明された。

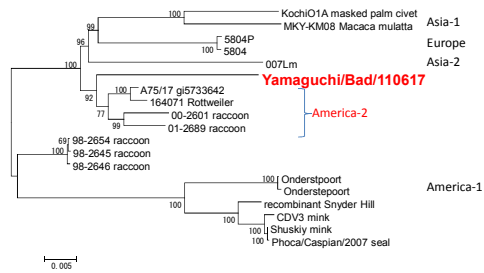


図3 Yamaguchi/Bad/110617の全塩基配列の決定

(4) 最近分離株のイヌへの病原性の検討

CDV#7 および Kochi01A 接種群において、接種後3-6日目と9-10日目をピークとする二峰性の発熱が認められた(図4)。CDV#7 接種群においては顕著な体重減少が認められたが、接種後9-11日目に体重が回復し始めた(図4)。Kochi01A 接種群では接種後6日目まで体重増加が認められなかったが、7日目で降体重増加が観察された。両群ともに接種後3-9日目に顕著なリンパ球の減少が観察された(図4)。両群ともに元気消失、食欲不振、下痢、嘔吐、腹部の発疹、発赤、肌荒れ、パッドの発赤などが見られた(図4)。CDV#7 接種群は Kochi01A 接種群と比較して臨床症状が顕著であり、ハードパッドも認められた。犬の炎症マーカーであるCRP(C-reactive protein)はCDV#7 接種群において3日目、Kochi01A 接種群では6日目をピークとして上昇した(図5)。

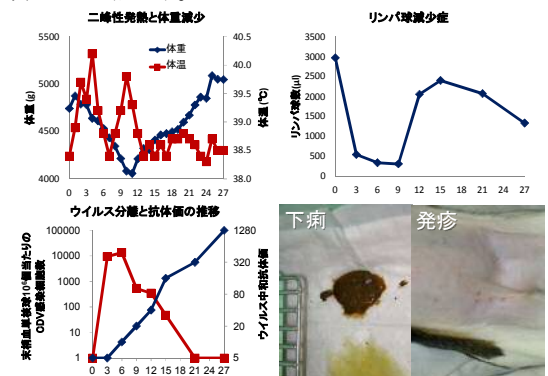


図4 サル由来CDV#7株感染実験犬における臨床症状

今回、野外分離株を用いた犬での実験的 CD 発症に成功した。これまで、犬で CD 発症試験の報告はほとんどなく、本実験系を用いることにより CD の複雑な病態の解析とワクチンの有効性試験が可能になった。

CDV#7 株を高用量および低用量で接種して病原性を比較したところ、低用量では感染が成立しなかった。高用量接種と低用量接種におけるサイトカインの推移を比較した結果、サイトカインを網羅的に検討した。その結果、IL-2, GM-CSF, IL-17, IL-15 の有意な上昇が確認されたのに対して IL-6 の発現が減少していた(図 5)。

これらサイトカインは CDV の複雑な病態に関与していることを示している。

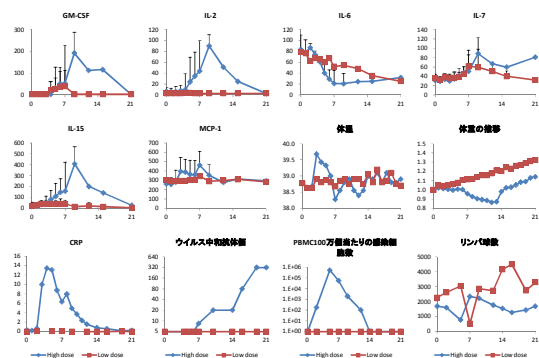


図5 CDV#7株実験感染犬におけるサイトカインおよび臨床症状の推移

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Nagao Y, Nishio Y, Shimoda H, Tamaru S, Shimojima M, Goto M, Une Y, Sato A, Ikebe Y, Maeda K*. An outbreak of canine distemper virus in tigers (*Panthera tigris*): Possible transmission from wild animals to zoo animals. *Journal of Veterinary Medical Science* (In press). 査読有
- ② Shimoda H, Nagao Y, Shimojima M, Maeda K*. Viral infectious diseases in wild animals in Japan. [Review] *Journal of Disaster Research* 2012. 7(3): 289-296. 査読有
- ③ Kameo Y †, Nagao Y †, Nishio T, Shimoda H, Nakano H, Suzuki K, Une Y, Sato H, Shimojima M, Maeda K*. Epizootic canine distemper virus infection among wild mammals. *Veterinary Microbiology* 2012. 154(3-4): 222-229. († Equally contributed) 査読有

- ④ Nakano H, Kameo Y, Andoh K, Ohno Y, Mochizuki M, Maeda K*. Establishment of canine and feline cells expressing canine signaling lymphocyte activation molecule for canine distemper virus study. *Veterinary Microbiology* 2009. 133: 179-183. 査読有
- ⑤ Nakano H, Kameo Y, Sato H, Mochizuki M, Yokoyama M, Uni S, Shibasaki T, Maeda K*. Detection of antibody to canine distemper virus in wild raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 2009. 71: 1661-1663. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 長尾裕美子、西尾陽平、秋山今日子、吉田翔太、中島朋美、久保正仁、森本将弘、林俊春、佐藤 宏、下島昌幸、前田 健「在来野生動物から新規遺伝子型イヌジステンパーウイルスの分離」第 153 回日本獣医学会学術集会 (大宮) 2012 年 3 月 27-29 日 (大宮ソニックシティ)
- ② 西尾陽平、長尾裕美子、塩崎雄登、高杉真綾、松井信貴、渡部 孝、鈴木和男、光田昌史、下島昌幸、前田 健「イヌジステンパーウイルス流行地 (和歌山、高知) のその後」第 152 回日本獣医学会学術集会 (大阪) 2011 年 9 月 19-21 日 (大阪府立大学)
- ③ 下島昌幸、長尾裕美子、西尾陽平、下田 宙、田丸精治、佐藤 梓、池辺祐介、宇根有美、前田 健「イヌジステンパーウイルスの野生動物から大型ネコ科動物への伝播」第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (徳島) 2010 年 11 月 7-9 日 (あわぎんホール)
- ④ 田丸精治、馬場健司、西尾陽平、下田 宙、長尾裕美子、酒井宏治、森川 茂、下島昌幸、前田 健「犬ジステンパーウイルスの最近の分離株を用いた犬での発症試験」平成 22 年度日本小動物獣医学会 [中国] (岡山) 2010 年 10 月 10 日 (岡山コンベンションセンター)
- ⑤ 長尾裕美子、西尾陽平、下田 宙、田丸精治、佐藤 梓、池辺祐介、宇根有美、下島昌幸、前田 健「野生タヌキから大型猫科動物へのイヌジステンパーウイルスの伝播」平成 22 年度日本小動物獣医学会 [中国] (岡山) 2010 年 10 月 10 日 (岡山コンベンションセンター)
- ⑥ 長尾裕美子、西尾陽平、下田 宙、田丸精治、佐藤 梓、池辺祐介、宇根有美、下島昌幸、前田 健「イヌジステンパーウイルスの野生タヌキから大型猫科動物への伝

播」第150回日本獣医学会学術集会(帯広)
2010年9月16-18日(帯広畜産大学)

- ⑦ 亀尾由紀、寺田 豊、下田 宙、田丸精治、鈴木和男、渡部 孝、宇根有美、谷内安規子、望月雅美、**前田 健**「野生動物由来イヌジステンパーウイルスの遺伝子解析と抗原性の比較」第148回日本獣医学会学術集会(鳥取)2009年9月25-27日(とりぎん文化会館)
- ⑧ 亀尾由紀、鈴木和男、渡部 孝、宇根有美、佐藤 宏、**前田 健**「野生動物に蔓延するイヌジステンパーウイルス-宿主域の拡大か?」第24回中国四国ウイルス研究会(岡山)2009年7月4,5日(ピュアリティまきび)

[図書](計3件)

- ① **前田 健**「イヌジステンパーウイルスの感染状況」田辺鳥獣害調査研究報告書Ⅱ(田辺市鳥獣害対策協議会)2009. p18-29.
- ② **前田 健**「イヌジステンパーウイルスおよび日本脳炎の抗体保有状況と課題」兵庫県におけるアライグマの現状(兵庫県森林動物研究センター研究部編集)2009. 第6章 p55-65.
- ③ **前田 健**: 野生動物のイヌジステンパーウイルス感染。 *Small Animal Clinic* 2009. 158:12-19.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 健 (MAEDA KEN)
山口大学・農学部・教授
研究者番号: 90284273