

機関番号 : 32701

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20580359

研究課題名 (和文) イヌ・ネコにおける原因不明の中樞神経疾患からの未知のウイルス検出

研究課題名 (英文) Detection of unknown viruses in dogs and cats with central nervous system diseases of unknown etiology.

研究代表者

齋藤 弥代子 (SAITO MIYOKO)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号 : 80367242

研究成果の概要 (和文) :

脳炎罹患犬の脳脊髄液から、日本の野外株以外の犬ジステンパーウイルス (CDV) の遺伝子型が検出された。詳細な解析により特定のワクチンと同一配列であることが確認され、ワクチン株の病原性を再検討する必要性が示唆された。野生動物での CDV 流行地にて捕獲された二匹のタヌキより CDV の捕獲に成功した。ワクチン株との相同性は 86%まで低下しており、今後野生動物からイヌへの感染を注視する必要がある。また同地域のネコの CDV 抗体価を調べたところ、約 12%の陽性率を示した。国内で野生動物から大型ネコ科動物への感染も報告されており、ネコへの CDV 感染とその症状は今後注意が必要であることが示された。

研究成果の概要 (英文) :

Canine distemper virus (CDV) was detected in the cerebrospinal fluid of dogs with encephalitis. Sequence analysis revealed that the detected CDV was identical to the CDV vaccine. Therefore, it was suggested that re-evaluation of the pathogenicity of CDV vaccines may be needed. CDV was successfully isolated from two raccoon dogs captured in the area where CDV was epidemic among wild animals. DNA homology between the raccoon dogs CDV and the vaccine strain decreased to 86%, which implies careful monitoring of CDV transmission from wild animals to dogs. Seroprevalence of CDV in cats in the other CDV epidemic area revealed 12% of cats were positive for CDV antibody. Considering the fact that cases of CDV infection from wild animals to large felids are also reported, close attention to the transmission and clinical signs of CDV in cats would be required. Genotype which differs from the field strain of canine distemper virus (CDV) was detected in the cerebrospinal fluid of dogs with encephalitis. Detailed analysis revealed that its DNA sequence was identical to that of certain CDV vaccine. Therefore, it was suggested that re-evaluation of the pathogenicity of CDV vaccines may be needed. CDV was successfully isolated from two raccoon dogs captured in the CDV-epidemic area of wild animals. DNA homology of the raccoon dogs' CDV and the vaccine strain was decreased to 86%, which implies careful monitoring of CDV infection from wild animals to dogs. Measurement of antibody titer against CDV in cats from the same area revealed 12% seroprevalence. Considering the fact that cases of CDV infection from wild animals to large felids are also reported, close attention to the transmission and clinical signs of CDV in cats would be required.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,070	450,000	1,950,070
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,600,070	1,080,000	4,680,070

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：診断、未知のウイルス、脳炎

### 1. 研究開始当初の背景

近年新興・再興感染症が多発する傾向にあり、対策の重要性が強調されている。新興感染症の実に75%が人獣共通感染症であり、動物の感染症の実態を解明することは、流行予測、伝播防止の面から非常に重要である。イヌやネコには炎症性中枢疾患が多数存在するが、海外の報告によるとそのうちの60~70%以上は原因が分かっていない。例えば、イヌでウイルス性髄膜脳炎を引き起こす可能性がある」と判明しているウイルスは8種類のみであり、そのうち検査法が確立し疑わしい症例にてルーチンに検査を行うことが可能であるのはイヌジステンパーウイルス(CDV)1種のみである。ヒトの炎症性中枢疾患の原因ウイルスが30種以上であることを考えると圧倒的に少ない。すなわち、イヌ・ネコの炎症性中枢疾患には未同定・未確認のウイルスが関与していると考えられる。

### 2. 研究の目的

獣医療の発展に寄与するために、イヌ、ネコの中枢疾患の原因となる未同定・未確認のウイルスを判明し、検査方法を確立することが本研究の目的である。近年イヌ、ネコは家族の一員として、その飼育形態はヒトとより密接なものとなっている。従って、ヒトと同じ生活環境下にて飼育されているイヌ、ネコにおける感染症のサーベイランスは、ヒトの感染症に対するsentinelとしても、有用性が高いものとする。同様に野生動物についてもウイルス感染の実態を調査し、イヌ・ネコにおけるウイルス感染との関連性を明らかにする。さらに、中枢神経病原性ウイルスの分離感度向上を目的として、イヌの中枢神経細胞由来の株化細胞樹立を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1)病院症例におけるデータと検体の収集と

**解析**：麻布大学附属動物病院に来院し、各種検査から中枢神経疾患と診断したイヌ・ネコのうち、血液と脳脊髄液(CSF)を採取し、それらが十分量残ったものを本研究に供することとし、各種臨床データを収集・解析した。採取した検体の一部は、ウイルス活性の低下を避けるため直ちに冷蔵状態にて郵送しウイルス分離のための培養を行った。一部は-80℃にて凍結保存ののち、(3)に供した。

#### (2)野生動物のCDV流行地におけるデータと

**検体の収集と解析**：野生動物から飼育犬へのCDV感染が疑われる地域において、CDVの発症が疑われる野生動物や動物病院に来院したネコから血液などの検体を採取し、(3)に供した。さらに、ネコにおいてはCDVウイルス抗体価測定を行った。

#### (3)ウイルスの分離とPCR法を用いたウイルス

**核酸の検出**：①ウイルス分離のための細胞は、犬の腫瘍由来培養細胞で、イヌアデノウイルス・イヌパルボウイルス・イヌコロナウイルスおよびイヌパラインフルエンザに感受性のA-72細胞(ATCC No.CRL-1542)、A-72細胞にイヌジステンパーウイルスのレセプターであるSLAM(CD150)を恒常的に発現するA-72/cSLAM細胞、多くのウイルス分離培養に用いられるVero9013細胞(ヒューマンサイエンス研究資源バンク JCRB9013)、アルボウイルスの分離に適した蚊(Aedes albopictus)由来C6/36細胞(ヒューマンサイエンス研究資源バンク IFO50010)、イヌ腎臓由来のMDCK(Madin-Darby canine kidney)細胞の5種類の細胞を用いた。それぞれの細胞培養については、A-72細胞・

A-72/cSLAM 細胞および C6/36 細胞の 3 種類の細胞では Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM:GIBCO)に 100U/ml のペニシリンと 100  $\mu$ g/ml のストレプトマイシン (GIBCO) を加えたものに、10%ウシ胎児血清(FCS)を加えたものを用いた。Vero 細胞、MDCK 細胞は Eagle's minimal essential medium (EMEM: GIBCO)に 5%FCS を加えたものを用いた。培養条件は A-72 細胞・A-72 細胞/csLAM 細胞および Vero9013 細胞では 37°C・5%CO<sub>2</sub>、C6/36 細胞では 28°C・5% CO<sub>2</sub> で行った。ウイルス分離を開始する前日に 96well プレート (SUMILON) に約 50%の細胞密度で各種細胞を準備した。ウイルス感染直前に血清を含まない DMEM で細胞を洗浄後、15,000 回転 30 秒間遠心した上清を 10~20  $\mu$ l 接種した。一時間の吸着後、それぞれの well に 100  $\mu$ l の培養液を加え、毎日細胞変性効果 (CPE) の有無を観察した。CPE が検出されず、細胞が well 全体に増殖した場合は、翌日細胞を 0.2%のトリプシン (DIFICO) と 0.02%の EDTA (WAKO) を含むリン酸緩衝液 (PBS) で処理し、24well プレート (SUMILON) に細胞を接種した。さらに CPE を観察し続け、細胞が全体に増殖したら 6well プレート (SUMILON) に接種しなおし、CPE を指標に観察し、その後は 5 倍希釈で 3 回の培養を行った。計 6 回の盲継代で CPE が観察されないものをウイルス分離陰性とし、CPE が観察されたものを陽性とした。②PCR を用いた核酸抽出は DNA について MonoFas<sup>®</sup> mini DNA 全血精製 Kit II (ジーエルサイエンス株式会社) のプロトコールに従い、RNA については Agilent Total RNA Isolation mini キット (Agilent Technologies) のプロトコールに従いそれぞれ抽出を行った。核酸抽出を行った検体は -80°Cにて冷凍保存後、PCR 法によるウイル

ス検出を行った。検体より抽出を行った DNA は PCR 試薬の AmpliTaq Gold<sup>®</sup>(Applied Biosystems, Applied Biosystems, Monza, Italy) と DNA ウイルスである CPV、CAV1 および CHV に対するそれぞれのプライマーを用いコンベンショナル PCR 法を実施した。反応液組成は PCR buffer 1 (KC 150mM、Tris-HCl10mM、PH8.3)、MgCl<sub>2</sub> 2mM、デオキシリボ核酸 (d ATP、d CTP、d GTP、d TTP) をそれぞれ 200mM、それぞれのウイルスに対するプライマー 1 m M、AmpliTaq Gold 2 単位、DNA を 10ml 含む総量 100ml で、反応は AmpliTaq Gold polymerase<sup>®</sup> の活性化を 94°Cで 10 分間行い、94°C・30 秒の熱変性、50°C・1 分間のアニーリングおよび 72°C・1 分間の伸長反応を 40 サイクル行い、最終伸長反応に関しては 72°Cで 10 分間実施した。検体より抽出を行った RNA は MuLV 逆転写酵素 (Applied Biosystems)を用い 42°C・30 分の逆転写反応を実施した。MuLV 逆転写酵素を不活化した後に、RNA ウイルスである CDV、CPIV、日本脳炎ウイルスに対するプライマーをそれぞれ 1 M 添加し、GeneAmp<sup>®</sup> RNA PCR キット(Applied Biosystems, Applied Biosystems, Monza, Italy)を用い PCR を実施した。反応は 94°C・10 分間の熱変性を行い、その後 94°C・10 分間の熱変性、59.5°C・2 分間のアニーリング、72°C・1 分間の伸長反応を 45 サイクル行い、最終伸長反応に関しては 72°C・10 分間実施した。プライマーは CDV に対して p1a/p2a、CPIV に対しては PNP1/PNP2、PNP3/PNP4、CPV 2 型に対しては Hfor/Hrev、VP2-F/VP2-R、VP1-F/VP1-R、PV2-F/PV2-R、CAV 1 に対しては CAV-F1/CAV-R1、CAV-VP1/CAV-VP2、Adeno-polF/Adeno-polR、Adeno-hexF/Adeno-hexR、CHV に対しては CHV1/

CHV2、また日本脳炎ウイルスに対しては JE8K inner-S/JEER inner-C 法を用いた。検体より増幅された PCR および RT-PCR 産物に対しエチジウムブロマイドで染色した後、2%アガロースゲルを用い電気泳動を実施し、ウイルス核酸の検出を行った。

**(4)サンガー法による塩基配列の決定：**(3)にてウイルスが増殖、もしくはウイルス核酸が検出された検体にて、PCR 産物をサンガー法でシーケンスすることにより塩基配列を決定した。

**(5)イヌの脳神経細胞由来の株化細胞樹立：**イヌの脳神経細胞を用いて neurosphere 法による神経幹細胞培養を行った。様々な神経細胞培養液や遺伝子導入方法を用い、最も適切な条件を検討した。株化細胞の樹立後は、その細胞を使用し(3)のウイルス培養によるウイルス分離を試みることにした。

**(6)未知のウイルスの検索：**既知・未知のウイルスの塩基配列を網羅的にかつ迅速に決定できる水谷博士が確立した新しいウイルス検出システム、RDV 法 (Mizutani T, Endoh D, et.al. Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. Emerging Infectious Diseases. 13. 2007.) を用い、(3)にてウイルスが増殖、もしくはウイルス核酸が検出された検体にて、未知のウイルスの検出を試みることにした。未知のウイルスを検出した場合、遺伝子配列全長を決定し、未知あるいはイヌ・ネコの中核疾患として重視されていないウイルスを検出した場合、疫学的調査を実施することとした。

#### 4. 研究成果

**(1)病院症例におけるデータと検体の収集と解析：**本研究に供した症例は 74 頭 (イヌ 73 頭、ネコ 1 頭) であった。これらのうち炎症性中枢神経疾患と診断したのは 32 頭で、臨床診断名の内訳は、肉芽腫性髄膜脳脊髄炎 9

頭、壊死性髄膜脳炎 3 頭、CDV 性脳脊髄炎 5 頭、MUE (meningoencephalitis of unknown etiology) 2 頭、全身性振戦症候群 2 頭、原因不明の髄膜炎 7 頭、ステロイド反応性髄膜動脈炎 1 頭、細菌性脊髄炎 3 頭 (うちネコ 1 頭) であった。CDV 性脳脊髄炎の 1 頭は内耳炎を併発していた。ヒトで CDV に近縁の麻疹ウイルスによる内耳炎は知られるが、CDV 性内耳炎は過去に報告がない。MUE の 1 頭では、ミオキミア/ニューロミオトニアという非常に珍しい臨床徴候を呈していた。32 頭の炎症性中枢神経疾患のうち原因が明らかでない特発性脳炎が 24 頭 (75%) と多数を占め、これは過去の報告 (Schwab S. J.Comp.Path. 2007) と同様の結果であった。また、臨床的にウイルス性中枢疾患と診断できたのは、CDV 性脳脊髄炎のみであった。以上より、検査法が確立しルーチンに検査を行うことが可能である生前診断法のみでは、炎症性中枢疾患の大部分のイヌで原因の特定が不可能であるという問題点が、本邦においても存在することが示唆された。

**(2)野生動物の CDV 流行地におけるデータと検体の収集と解析：**様々な理由で動物病院に来院したネコ 51 頭において血中 CDV 抗体価を測定したところ、6 頭に CDV 抗体陽性を認めた。国内で野生動物から大型ネコ科動物への感染も報告されており、ネコへの CDV 感染とその症状は今後注意が必要であることが示された。

**(3)(4)ウイルスの分離と PCR 法を用いたウイルス核酸の検出およびサンガー法によるウイルス塩基配列の決定：**①(1)における全 74 頭についてウイルス培養によるウイルス分離を試みた。10 症例においては冷蔵保存をして 3 日以内に培養を開始し、残りの 64 頭では -80°C で冷凍保存後に培養を開始した。血液、CSF いずれにおいても、6 代の盲継代により

CPE が観察されウイルス増殖を確認できたものは存在しなかった。この理由として、疾患の原因ウイルスが今回用いた培養細胞に非感受性であった可能性がある。イヌにおける中枢神経病原性ウイルスの分離感度を向上させるため、イヌの脳神経細胞由来の株化細胞樹立が必要である。

②(1)で炎症性中枢神経疾患と診断した 33 頭うち、ウイルス検出に十分量の CSF が採取できた 18 頭の CSF を用いてウイルス核酸の検出を行った。CDV 性脳炎と臨床診断した 2 頭のイヌの CSF から、これまで日本の野外に存在していないと思われていた CDV の遺伝子型が検出された。PCR 産物をサンガー法でシーケンスして塩基配列を解析したところ、特定のワクチンと同一の配列であることが確認され、ワクチンによる脳炎の発症の可能性が示唆された。今回の結果は複数の機関が関与しているので慎重な解釈を必要とするが、今後ワクチン株の病原性を再検討する必要性が示唆された。その他の検体からウイルス核酸は検出されなかった。(2)の調査において、ハクビシンから飼育犬への CDV 感染が強く疑われた地域で二匹のタヌキより CDVV ウイルスの捕獲に成功した。変異が激しいといわれている H 遺伝子の配列を決定した結果、典型的なアジアで流行しているウイルスであったが、ワクチン株との相同性は 86%まで低下していた。今後野生動物からイヌへの感染を注視する必要がある。

#### (5)イヌの脳神経細胞由来の株化細胞樹立：

ビーグル成犬の脳を用いて、N2 サプリメント、EGF,FGF2 を含んだ無血清培地で培養したところ、ラットで報告されているように neurosphere の形成が確認されたが、細胞増殖能が低い傾向にあり、発育はげっし類で報告されているほど良好ではなかった。次に活発な細胞分裂能を有すると期待できる 1 日齢

のビーグル仔犬を用いて細胞培養を試みたところ、多数の neurosphere の形成が確認された。これに SV40 T 抗原をコードするプラスミドを遺伝子導入し、テロメラーゼ活性の誘導による細胞の不死化を試みたが、遺伝子陽性細胞株 (G418 耐性株) の細胞は得られなかった。イヌの neurosphere は報告されているラットの neurosphere より寿命が短く培養条件の検討も必要と考えられた。そこで、ラットの大脳組織を用いて、神経細胞の細胞株の樹立のためにもっとも有効な細胞培養液、遺伝子導入条件を検討した。無血清培地に N2 サプリメント、EGF,FGF2、さらに BPE (脳下垂体抽出物) を加えることにより、neurosphere 法による神経幹細胞の培養を試みたところ、neurosphere の形成が改善された。次に、この neurosphere に対し、リポフェクション法により遺伝子導入を試みたが遺伝子陽性細胞株 (G418 耐性株) の細胞は得られなかった。さらにトリプシン処理により neurosphere を分散させ、プレートに一層に定着した細胞に対して、リポフェクションを試みたが、耐性株は得られなかった。Neurosphere のような浮遊細胞群にはエレクトロポレーション法によるトランスフェクションの検討が必要かもしれない。

(6)未知のウイルスの検索：ヒトのウイルス性脳炎に類似する臨床経過を呈したが既知のウイルスは検出されなかった 4 検体について RDV 法を実施したが、既知のウイルスに相同性のある遺伝子や未知のウイルスと考えられる遺伝子を見つけることができなかった。

#### 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 3 件)

①宇津木真一、齋藤弥代子、久末正晴、ミオ

キミア/ニューロミオトニアのヨークシャー  
テリアの 1 例、日獣会誌、査読有、64 巻、  
2011、56-60

②長村徹、齋藤弥代子、落合秀治、中/内耳疾  
患を疑う犬における聴性脳幹誘発反応の有  
用性の検討、日獣会誌、査読有、63 巻、2010、  
531-537

③Saito M, Ono S, Kayanuma H, 以下 3 名  
(6 名中の 1 番目)、Evaluation of the  
susceptibility artifacts and tissue injury  
caused by implanted microchips in dogs on  
1.5T magnetic resonance imaging、J Vet  
Med Sci、査読有、72 巻、2010、575-581

〔学会発表〕(計 11 件)

①齋藤弥代子、脳脊髄液検査のガイドライン、  
第 7 回日本獣医内科学アカデミー学術集会、  
2011 年 3 月 12 日、横浜

②檀華子、他、イヌの脳炎・髄膜炎における  
バイオマーカーとしての pNF-H の有用性の  
検討、第 7 回日本獣医内科学アカデミー学術  
集会、2011 年 3 月 12 日、横浜

③長尾裕美子、他、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]、2010  
年 10 月 11 日、岡山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 弥代子 (SAITO MIYOKO)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：80367242

### (2) 研究分担者

落合 秀治 (OCHIAI HIDEHARU)

麻布大学・生物科学総合研究所・講師

研究者番号：20247303

水谷 哲也 (MIZUTANI TETSUYA)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・

主任研究官

研究者番号：70281681

前田 健 (MAEDA KEN)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：90284273

(H20：研究協力者)

### (3) 連携研究者

なし