

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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010-2012

課題番号：22700459

研究課題名（和文） サルで致死性的流行したイヌジステンパーウイルスの性状解析およびコントロール法の確立

研究課題名（英文） Characterization of the Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys

研究代表者

酒井 宏治 (Sakai Kouji)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・研究員

研究者番号：70515535

研究成果の概要(和文):サルで致死性的流行したイヌジステンパーウイルスの性状解析を行った。具体的には、肺炎、消化器症状等を主徴とする感染ザルのウイルス学的・血清学的・病理学的解析から CDV による全身感染症であることを明らかにした。イヌ SLAM 発現 Vero 細胞を用いて分離した CYN07-dV 株の全塩基配列を決定し (DDBJ / GenBank accession number AB687720)、既知の CDV で高度に保存されている領域において、複数のアミノ酸変異の存在を明らかにした (細胞侵入に関わる H 蛋白質では 4 箇所、F 蛋白質では 8 箇所、ウイルス増殖に関わる M や L 蛋白質等にも複数存在)。動物感染実験では、イヌで神経症状を伴う致死性的感染、カニクイザルでは中枢神経を含めた全身感染が認められ、その強い病原性を明らかにした。レセプター指向性の解析では、CYN07-dV 株はサルのレセプター (SLAM ならびに nectin4) をイヌのそれらと同等もしくはそれ以上に効率良く使えるウイルスであることを明らかにした。以上より、CYN07-dV 株はサルの免疫系細胞及び上皮系細胞に、in vitro 及び in vivo の両方で効率よく感染・増殖し、流行したと考えられた。

研究成果の概要 (英文) : In 2008 in Japan, a Canine distemper virus (CDV) outbreak also occurred in cynomolgus monkeys imported from China. In that outbreak, forty-six monkeys died from severe pneumonia during a quarantine period. A CDV strain (CYN07-dV) was isolated in Vero cells expressing dog signaling lymphocyte activation molecule (SLAM). Phylogenetic analysis showed that CYN07-dV was closely related to the recent CDV outbreaks in China, suggesting continuing chains of CDV transmission in monkeys. In vitro, CYN07-dV uses macaca SLAM and macaca nectin4 as receptors as efficiently as dog SLAM and dog nectin4, respectively. CYN07-dV showed high virulence in experimentally infected cynomolgus monkeys and excreted progeny viruses in oral fluid and feces. These data revealed that some of the CDV strains, like CYN07-dV, have the potential to cause severe disease in monkeys and spread among them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	900,000	0	900,000
2012 年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	0	2,800,000

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ウイルス、感染症、実験動物学、獣医学、

1. 研究開始当初の背景

2008年、国内の検疫施設で、中国から輸入された動物実験用カニクイザルのコロニーにおいて致死性の流行が認められ、イヌジステンパーウイルス(CDV)遺伝子が検出された。これまでに、CDVがサルに自然感染し発症した事例はニホンザルについて1例(Vet Microbiol. 20: 193-205. 1989)ある。また、本事例と同時期に中国のアカゲザルで致死性の流行が最近報告されており(Vet Microbiol. 141:374-378. 2009.)、おそらく同様のウイルスがカニクイザルに感染し、日本に輸入され、検疫中に発症したものと考えられる。

2. 研究の目的

発症中のサルについてウイルス学的、血清学的及び病理学的解析を行い、サルはCDVに感染し、肺炎、脳炎および全身感染等を呈していたことが確認された。カニクイザルから分離されたCDVについて、その性状解析を実施すると共に、このような大規模な致死性の流行に至った原因を解明し、実験動物用サルにおける輸入感染症としてのCDVコントロール法の確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) カニクイザル分離株の全塩基配列の決定
中国のアカゲザルでのCDV発生の報告ではNタンパク質の一部の配列について既に報告されている。これまで、CDVの病原性に関わるいくつかの遺伝子の報告はあるが、未だ不明なことが多い。したがって、本研究では、これまでに分離されたカニクイザル分離株について全塩基配列を決定し、既知のCDV、MeV遺伝子配列と比較し、病原因子を検索した。

(2) 動物感染実験

CDVサル分離株による動物への感染実験の報告はない。致死性感染はこれまでに本事例のカニクイザルとアカゲザルの発生報告のみである。本分離株のサルへの感染・発症機序は不明であり、感染実験による病原性、感染源及び感染経路、MeV抗体でのCDV防御についても不明である。これらを明らかにするために、サルでの感染実験を行った。

(3) レセプター指向性の解析

マカク属内のカニクイザル、アカゲザル、ブタオザルのSLAM発現Vero細胞を作製し、マカク属、ヒト及びイヌの各SLAMとCDVサル

分離株とのウイルス親和性を解析した。本解析により、CDVサル分離株が、サルSLAMをレセプターとして感染・発症に関与したのか明らかになる。

4. 研究成果

(1) カニクイザル分離株の全塩基配列の決定
カニクイザル感染臓器乳剤からイヌSLAM発現Vero細胞で分離されたCYN07-dV株、それをヒトSLAM発現Vero細胞に馴化させたCYN07-hV株の全配列決定を行った。馴化により、Hタンパク質に1アミノ酸変異が認められた(P541S)。Hタンパク質の系統解析では、アジア1型に分類され、同時期に中国のアカゲザルから分離されたCDVと近縁であった。Hタンパク質及びFタンパク質でCDV株間で高度に保存されているに領域でそれぞれ4及び8箇所のアミノ酸変異が認められた。流行初期・後期の感染サル臓器のCDVのH遺伝子配列もCYN07-dV型であり、イヌSLAM発現Vero細胞で効率よくウイルス分離できたことと一致した。

(2) 動物感染実験

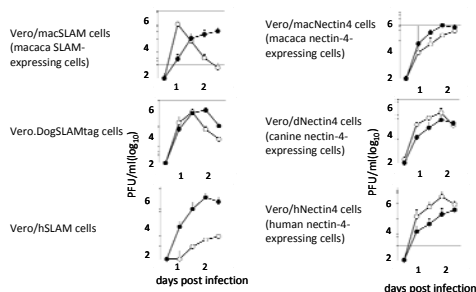
CDVカニクイザル分離株のサルへの経鼻接種を行った。全ての実験感染サルは、15日間の観察期間中生存したが、CYN07-dV感染サルの4/5、CDV/human-Vero感染サルの1/4で、PBMC・呼吸器・消化器等の多くの組織・臓器からCDVが分離され、全身性CDV感染症が再現できた。CYN07-dV感染サルでのみ感染性ウイルスの排泄が認められた。CYN07-dVは、CYN07-hVと比べ、PBMCへの感染では差は認められないが、サルの上皮系を含む組織では親和性が高いことがわかった。また、CYN07-dV株については、静脈内接種も実施した。上述の経鼻接種より顕著に発疹やコプリック班が認められた。しかし、抗体陽転が認められ、実験期間中に致死は認められなかった。実際のアウトブレイク(輸入カニクイザル)では致死が認められたが、SPFカニクイザルへの本実験プログラム(CDV単独実験感染)では致死が認められないことから、輸送ストレスによる増悪やSRVなどの混合感染、CDVのquasispeciesなどの複合的要因が考えられるが、現時点では明らかに出来ていない。

(3) レセプター指向性の解析

カニクイザル、アカゲザル、ブタオザルのSLAMアミノ酸配列はマカク属で同一であった。また、これまでに報告されている免疫細

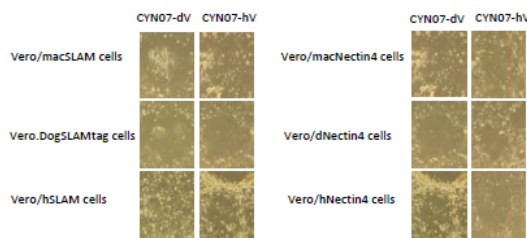
胞系受容体の SLAM に加え、最近報告された上皮系受容体 Nectin4 の発現細胞を各種動物（ヒト、サル、イヌ）ごとに作製した。CYN07-dV 及び CYN07-hV の H 及び F を有する VSV シュードタイプウイルスならびに CYN07-dV 及び CYN07-hV の H 及び F の各発現プラスミドを作製した。各動物種、各受容体発現細胞における、①生ウイルスを用いてウイルス増殖曲線、②VSV シュードタイプウイルスを用いての Entry assay、③発現プラスミドを用いての Fusion assay を実施した。それら結果から、SLAM については、1) CYN07-dV はヒト型を利用できないこと、2) CYN07-dV 及び CYN07-hV は共にサル型を利用できること、Nectin4 については、サル型 > ヒト・イヌ型で利用できることが明らかとなった。

CYN07-dV 株と CYN07-hV 株の各種細胞でのウイルス増殖



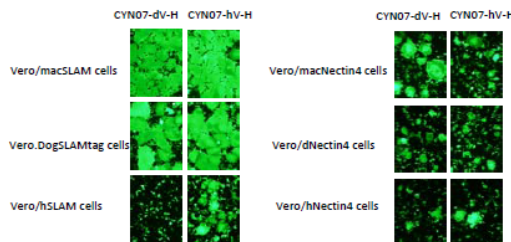
Vero/macSLAM, Vero/DogSLAMtag, Vero/hSLAM, Vero/macNectin4, Vero/dNectin4, and Vero/hNectin4 cells were infected with CYN07-dV (open circles) and CYN07-hV (filled circles) at an MOI of 0.001, and the titers were determined at indicated time points.

CYN07-dV 株と CYN07-hV 株の各種細胞での細胞変性効果



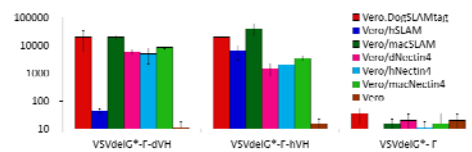
Vero/macSLAM, Vero/DogSLAMtag, Vero/hSLAM, Vero/macNectin4, Vero/dNectin4, and Vero/hNectin4 cells were infected with CYN07-dV and CYN07-hV at an MOI of 0.001, and observed under a phase-contrast microscopy (data at 24h p.i. for SLAM-expressing cells and at 36h p.i. for nectin-4-expressing cells).

CYN07-dV 株と CYN07-hV 株の各種細胞での細胞融合能



Vero/macSLAM, Vero/DogSLAMtag, Vero/hSLAM, Vero/macNectin4, Vero/dNectin4, and Vero/hNectin4 cells were transfected with a mixture of plasmids encoding EGFP, CDV-F, and CDV-H (CYN07-dV-H or CYN07-hV-H) proteins, cultured, and observed using a fluorescence microscope (data at 36 h posttransfection for SLAM-expressing cells and at 72 h posttransfection for nectin-4-expressing cells).

CYN07-dV 株と CYN07-hV 株の各種細胞での細胞侵入能



Vero/macSLAM, Vero/DogSLAMtag, Vero/hSLAM, Vero/macNectin4, Vero/dNectin4, Vero/hNectin4, and parental Vero cells were infected with EGFP-expressing VSVs pseudotyped with the H and F proteins of CYN07-hV and CYN07-dV (VSV Δ G⁺-F-hVH and VSV Δ G⁺-F-dVH, respectively) and with the F protein alone (VSV Δ G⁺-F). The numbers of cells expressing EGFP were counted at 24 h p.i., and the infectivity titers of each pseudotype in the cells were calculated.

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 1 件)

Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushima S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *Journal of Virology*, 87, 1105-1114. 2013

[学会発表] (計 10 件)

① 酒井宏治・永田典代、網康至、岩田奈織、鈴木忠樹、水谷哲也、福士秀悦、須崎百合子、緒方もも子、西條政幸、長谷川秀樹、山田靖子、倉根一郎、森川茂「カニクイザルで致死感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスの性状と実験感染サルでの病原性の解析」、第 150 回日本獣医学会学術集会、DV-48、帯広、2010 年 9 月

② 酒井宏治、田丸精治、前田健、永田典代、網康至、岩田奈織子、鈴木忠樹、水谷哲也、福士秀悦、須崎百合子、緒方もも子、長谷川秀樹、西條政幸、山田靖子、倉根一郎、森川茂「カニクイザルで致死感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスのサル及びイヌでの病原性の解析」、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、P2-013、徳島、2010 年 11 月

③ Kouji Sakai, Noriyo Nagata, Yasushi Ami, Katsuhiko Komase, Makoto Takeda, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Virulence of canine distemper virus isolated from cynomolgus monkeys during 2008 epizootic in Japan. 2011 MEASLES VIRUS MINI-SYMPOSIUM, 39, July 15, 2011, Rochester, MN, USA.

④ Kouji Sakai, Noriyo Nagata, Yasushi Ami, Katsuhiko Komase, Makoto Takeda, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Virological and pathological analyses of canine distemper virus

isolated from cynomolgus monkeys during 2008 epizootic in Japan. American Society for Virology 30th Annual Meeting, W8-12, July 16 - 20, 2011, Minnesota, MN, USA.

⑤ Kouji Sakai, Yohei Nishio, Noriyo Nagata, Yasushi Ami, Katsuhiko Komase, Masayuki Shimojima, Ken Maeda, Makoto Takeda, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Characterization of canine distemper virus isolated from cynomolgus monkeys during 2008 epizootic in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, VI-PO22-6, July 11 - 16, 2011, Sapporo, Japan.

⑥ 酒井宏治、關文緒、田原舞乃、大槻紀之、山口良二、伊藤由梨、福原秀雄、前仲勝実、駒瀬勝啓、西條政幸、森川茂、竹田誠「カニクイザルで致死感染症を起こしたイヌジステンパーウイルス (CDV) のレセプター指向性の解析：CDV はヒトへの脅威となり得るのか?」、1st Negative Strand Virus-Japan Symposium、長崎、2012年1月

⑦ 酒井宏治、關文緒、網康至、福士秀悦、西條政幸、森川茂、山口良二、駒瀬勝啓、竹田誠「カニクイザルで致死感染症を起こしたジステンパーウイルスのサル SLAM ならびに Nectin4 の効率的な利用」、第 154 回日本獣医学会学術集会、DV-13、盛岡、2012年9月

⑧ 酒井宏治、關文緒、網康至、田原舞乃、中津祐一郎、大槻紀之、福原秀雄、福士秀悦、吉河智城、西條政幸、森川茂、前仲勝実、山口良二、駒瀬勝啓、竹田誠「カニクイザルで致死感染症を起こしたジステンパーウイルスのサルレセプターの効率的な利用：ジステンパーウイルスはヒトへの脅威となり得るのか?」、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、O3-C-11、大阪、2012年11月

⑨ 酒井宏治「犬ジステンパーウイルスの霊長類レセプターの利用について」、2nd Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2013年1月

⑩ Kouji Sakai, Fumio Seki, Maino Tahara, Noriyuki Otsuki, Yasushi Ami, Masayuki Saijo, Ryoji Yamaguchi, Katsuhiko Komase, Makoto Takeda and Shigeru Morikawa. Canine distemper virus intrinsically uses monkey receptors and readily adapts to use human receptors as well. 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Singapore, march, 2013.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

<http://idsc.nih.gov/iasr/29/345/kj3451.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 宏治 (Sakai Kouji)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・研究員

研究者番号 : 70515535

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :