

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 DONG, Van Hieu

題 目 Studies on Persistent Infection of Chicken Anemia Virus and Genetic Characterization of the Virus in Southeast Asian Countries  
(鶏貧血ウイルスの持続感染および東南アジア諸国におけるウイルスの遺伝的特徴に関する研究)

鶏貧血ウイルス (CAV) は、鶏に致死率の増加や免疫抑制を引き起こす結果、養鶏残業に経済的損失を与える。いくつかの研究により、CAV株のウイルスゲノムに進化が起き続けていることが報告されている。また、CAVが持続感染する可能性についても報告がなされているが、直接的な証拠はいまだ示されていない。CAVに関する知識を蓄積するために、CAVの感染およびウイルスゲノムの特徴についてさらなる研究が行われる必要がある。

Chapter 1 では、マレック病リンパ腫由来樹立細胞株であるMDCC-MSB1細胞（以下、MSB1細胞）を用いて、中和抗体存在条件下におけるCAV持続感染の *in vitro*モデルを構築した。その実験では、CAVを感染させたMSB1細胞を中和抗体存在下で培養し、その後の生存性を観察した。その後、感染細胞を繰り返し継代し、引き続き中和抗体の存在下で培養した。そのような継代実験において、繰り返し継代を行っても、CAV感染細胞は中和抗体の存在下で生存し続けることが明らかとなった。中和抗体存在下で培養されたCAV感染細胞において、蛍光抗体法およびリアルタイムPCRにより、CAVの抗原およびゲノムの両者が確認された。この *in vitro*モデルを用いて、14代継代した細胞からCAVを回収し、CAVゲノムのタンパク質翻訳領域の遺伝子配列を解析した。その結果、MSB1細胞におけるCAVの持続感染には、CAVの遺伝子変異は関与しないことが明らかとなった。中和抗体の存在下でCAVが持続感染する機序について明らかにするためには、本研究で作出した *in vitro*モデルを用いたさらなる研究が求められる。

Chapter 2 では、分子学的手法を用いてベトナム北部におけるCAV感染を初めて検出した。この研究により、ベトナム北部に由来するCAVのタンパク質翻訳領域の遺伝子の特徴が明らかにされた。生産者から生産性の低下や虚弱な鶏の存在が報告された家禽農場を研究対象とした。それらの農場から得られた合計330の組織検体が用いられたが、

そのうち328検体は肉用鶏，その他2検体は種鶏から採取された。それら検体について，リアルタイムPCRによりCAVゲノムの検出を行なった。その結果，肉用鶏および種鶏のいずれの週齢群においてもCAVゲノムが検出され，陽性率は47.58%であった。なかでも，もっとも陽性率が高かったのは2~3週齢の若鶏であり，陽性率は61.43%であった。CAVゲノム陽性率は，4~11週齢の鶏では44.83%，12~28週齢の鶏では35.27%であり，2~3週齢の陽性率より有意に低い結果であった。これらの結果から，ベトナムにおいてCAVが継続的に感染を繰り返し，養鶏産業に影響を与えている可能性が示唆された。遺伝学的および系統学的解析により，ベトナム北部では，複数のgenotype (II, III, および V) および sub-genotype (IIIa, IIIb, および IIIc) に属するCAV株が循環していることが明らかとなった。それらベトナムのCAV株は，中国，米国および台湾で分離されたCAV株に近縁であった。genotype II および III のウイルスの組換えの結果，新たなgenotype V のウイルスが生じたことが本研究で初めて明らかになった。以上，本研究では，ベトナム北部において，鶏に高率にCAV感染が起きていることを明らかにした。2つのgenotypeのウイルス間で生じた組換えを明らかにしたことにより，同国においてCAVが進化している可能性が示された。これらの結果は，ベトナムにおけるCAV感染を制御するための戦略を立てる上で役立つものと考えられる。

Chapter 3では，フィリピンにおけるCAV感染及びウイルスの遺伝学的特徴について初めて明らかにした。フィリピンの中部ルソン地方の肉用鶏農場において採取された3羽の鶏由来の肺検体を実験に用いた。それらの鶏は，ニューカッスル病 (ND) の臨床症状を示しており，得られた検体の一部は，別実験においてNDウイルス (NDV) の診断に用いられた。本研究では，NDVとCAVの混合感染の可能性について調べる目的で，残りの検体についてCAVゲノムの検出を試みた。その結果，3検体のうちの1検体において，リアルタイムPCRでCAVゲノムを検出した。検体が採取された農場において，CAV感染による臨床症状の報告はなされていなかったため，フィリピンの鶏において無症状のままCAVが感染伝播している可能性が示唆された。得られたCAVのタンパク質翻訳領域の遺伝子解析を行ない系統学的に解析したところ，フィリピンのCAV株は，ポーランドや中国で分離されたCAV株に近縁であることが明らかとなった。これらの結果は，疫学的情報として価値があるとともに，フィリピンにおけるCAV感染の制御に役立つことが期待される。

本研究では，CAV持続感染の *in vitro*モデルを初めて構築した。中和抗体存在下でCAVが持続感染する機序を明らかにするには至らなかったが，得られた結果では，MSB1細胞におけるCAVの持続感染には遺伝子変異は関与しないことが示された。また，

ベトナムとフィリピンに循環するCAVに関する遺伝学的特徴を明らかにしたことにより、それらの国におけるCAV感染や疾病制御に役立つことが期待される。

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 DONG, Van Hieu

題 目 Studies on Persistent Infection of Chicken Anemia Virus and Genetic Characterization of the Virus in Southeast Asian Countries  
(鶏貧血ウイルスの持続感染および東南アジア諸国におけるウイルスの遺伝的特徴に関する研究)

Chicken anemia virus (CAV) infection has an impact on the chicken production industry, leading to an economic loss because of increased mortality or immunosuppression in chickens. In some reports, the evolution in the viral genome is continuing among CAV strains. Other reports show a possibility of persistent infection of CAV; however, there are no direct evidences. There should be a continuous supplementary study on CAV infection and characterization of the viral genome to gather knowledge on this virus.

In Chapter 1, an *in vitro* model of CAV persistent infection with a neutralizing antibody (NA) was set in Marek's disease chicken cell line (MDCC-MSB1 (MSB1) cells. In the study, MSB1 cells were infected with CAV and cultured with NA, and then the cells viability was observed. The infected cell was then passaged repeatedly and kept cultured with NA. Results in the passage studies showed that the CAV-infected cells were unceasingly alive during the repeated passages with NA. The CAV antigens and genome were found in the CAV-infected cells cultured with NA by using fluorescent antibody test and real-time PCR, respectively. With the use of this *in vitro* model, the CAV was recovered from the cells passaged 14 times and sequenced for the protein-coding region of the CAV genome. The results have shown that the persistent infection of CAV in MSB1 cells is not related to the viral gene mutation. The exact mechanism of CAV persistent infection with NA would be explained with the use of this *in vitro* model in succeeding studies.

In Chapter 2, the molecular-based method identified the CAV infection in Northern Vietnam for the first time. This study has shown the genetic characterization of the CAV genome from Northern Vietnam based on the protein-coding region sequence. Chicken farms manifesting poor performance and weakness as reported by the owners were part of this study. A total of 330 tissue samples including 328 broiler and 2 breeder chickens were chosen to be part of the sample. The CAV genome was studied for those samples with the use of the real-time PCR method. The CAV genome was found in both broiler and breeder chickens

in all age groups at a positive rate of 47.58%. Among them, the highest rate (61.43%) was seen in young chickens at 2-3 weeks of age. The positive rate was 44.83% and 35.72% in older chickens at 4-11 weeks and 12-28 weeks of age, respectively, which were significantly lower than that of chickens at 2-3 weeks of age. The results proposed that CAV may be constantly circulating and also affecting the chicken production industry in Vietnam. Genetic and phylogenetic analyses have shown that multiple genotypes (II, III, and V) and sub-genotypes (IIIa, IIIb, and IIIc) of CAV strains are circulating in Northern Vietnam. The Vietnamese CAV strains were closely associated with the CAV isolates from China, the United States, and Taiwan. The recombination event happened between the viruses of genotypes II and III to create a novel genotype (genotype V), which was first and foremost reported in this study. Altogether, this study has shown that CAV infection has a high rate in chickens in Northern Vietnam. The findings on the recombination events of the 2 genotypes of viruses proposed the possible evolution of CAV in the country. These findings may help in the development of strategies to control CAV infection in Vietnam.

In Chapter 3, CAV infection and genetic characterization in the Philippines were firstly reported. Three chicken lung samples acquired from 3 broiler chicken farms, which are found in Central Luzon, Philippines, were used. These chickens have shown extreme clinical signs of Newcastle disease (ND), and one part of the sample was sent to a different study for the detection of ND virus (NDV). Another part of the sample was forwarded to CAV genome detection to check for a possible co-infection between NDV and CAV. The results have shown that one out of 3 samples was positive for CAV genome using real-time PCR. There were no clinical signs of CAV infection in the chicken farms involved in this study, proposing that CAV may have been circulating and the Filipino chickens have signs of subclinical infection. The protein-coding region of the CAV genome was then sequenced and characterized. Genetic and phylogenetic analyses have shown that the Filipino strain was closely associated with the CAV isolates from Poland and China. These findings may have value as epidemiological data and also for control of the CAV infection in the Philippines.

In closing, an *in vitro* model of CAV persistent infection was set first and foremost in this study. Even though the exact mechanism by which CAV persists with NA was not successfully explained, the acquired results have shown that the persistent infection of CAV in MSB1 cells is not associated with viral mutation. Additionally, detection and genetic characterization of CAV reported in Vietnam and the Philippines described in this study may be of value for CAV infection and disease preventative strategies in these countries.