

氏名（本（国）籍）	DONG, Van Hieu（ベトナム社会主義共和国）		
主指導教員氏名	帯広畜産大学 教授 小川 晴子		
学位の種類	博士（獣医学）		
学位記番号	獣医博甲第568号		
学位授与年月日	令和2年9月18日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学		
学位論文題目	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)		
審査委員	主査	帯広畜産大学 教授	横山 直明
	副査	帯広畜産大学 教授	小川 晴子
	副査	岩手大学 教授	村上 賢二
	副査	東京農工大学 教授	水谷 哲也
	副査	岐阜大学 教授	福士 秀人

学位論文の内容の要旨

鶏貧血ウイルス（CAV）は、感染した鶏に免疫抑制を引き起こす病原体である。世界各地に存在することが知られるが、感染伝播については不明な点が多い。ウイルスが感染鶏に持続感染する可能性やウイルスゲノムに進化が生じている可能性について報告されているが、十分な研究は行われていない。本研究は、CAVの持続感染および東南アジア諸国における分離ウイルスのゲノムの特徴について明らかにすることを目的に行われた。

第1章では、CAVに感受性のMDCC-MSB1細胞（以下、MSB1細胞）を用いてCAV持続感染の *in vitro*モデルを構築した。CAVを感染させたMSB1細胞を、感染鶏と同様に中和抗体が存在する条件下で培養し続け、生存性を確認した。その後、感染細胞の継代を繰り返し、引き続き中和抗体存在下で培養した。その結果、継代を続けても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。それらのCAV感染細胞において、蛍光抗体法によりCAV抗原、またリアルタイムPCR法によりCAVゲノムの存在を確認した。14代継代した細胞から回収した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が、遺伝子変異は確認されなかった。すなわち、CAVのMSB1細胞における持続感染には遺伝子変異は関与しないことが

明らかにされた。今後は、本研究で作製された *in vitro* モデルを用いて、CAV持続感染の機序が明らかにされることが期待される。

第2章では、ベトナム北部におけるCAV感染を初めて確認し、検出された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。生産性低下などの報告があった2~28週齢の家禽の組織330検体について、リアルタイムPCR法によりCAVゲノムの検出が試みられた。その結果、いずれの週齢の鶏（肉用鶏、種鶏）においてもCAVゲノムが検出され、全体としての陽性率は47.58%であった。なかでも2~3週齢の若鶏で最も陽性率が高く61.43%であった。系統学的解析により、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株の存在が確認され、中国、米国および台湾の分離株に近縁であることが明らかにされた。重要な結果として、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を明らかにした。本研究では、ベトナム北部の鶏にCAV感染が高率に発生し、2つのgenotypeのCAVに生じた組換えによって新たなgenotypeが出現したこと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を示した。ベトナムにおいてCAV感染を制御する上で役立つ情報を提供したものと考えられる。

第3章では、フィリピンにおける初めてCAV感染を確認し、検出したウイルス遺伝子の特徴について明らかにした。フィリピンの中部ルソン地方の肉用鶏農場においてニューカッスル病（ND）の臨床症状を示した鶏由来の肺3検体が実験に用いられた。それぞれの検体の一部については、別研究によってNDウイルス（NDV）の存在が確認されている。本研究において、リアルタイムPCRでCAVゲノムの検出を試みた結果、1検体においてCAVゲノムが検出された。すなわち、当該鶏ではNDVとCAVの混合感染が起きていた可能性が示された。検出したCAV株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結果、ポーランドや中国で分離されたCAV株に近縁であることも明らかにした。本研究に用いられた検体が採取された農場では、CAV感染による影響は認識されていなかったが、CAV感染による免疫抑制がND発症に影響した可能性が考えられた。本研究の結果から、フィリピンにおいてCAVが感染伝播し、他の病原体との混合感染により鶏産業に影響を与えている可能性が示された。提供された情報は、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* モデルの構築に初めて成功した。感染個体と同様に中和抗体が存在する条件下においてCAVはMSB1細胞に感染し続けることが確認された。一方、この *in vitro* モデルで持続感染したCAVのタンパク質翻訳領域の遺伝子に変異は確認されないことが示され、今後の機序解明に向けて貴重な情報を提供した。また、CAV感染についての情報が少ないベトナムとフィリピンにおいてCAVの感染を確認し、分布するCAVに関する遺伝学的特徴を明らかにしたことにより、それらの国々における疾病制御に役立つ情報を提供した。

審査結果の要旨

鶏貧血ウイルス（CAV）は、鶏に免疫抑制を引き起こし養鶏産業に経済的損失を与える。

CAV の持続感染の可能性や進化について報告されてきたが、未だ不明な部分が多い。本研究は、CAV の持続感染およびゲノムの特徴に関する知識の蓄積を目的とした。

第1章では、MDCC-MSB1 細胞（以下 MSB1 細胞）を用いて、CAV 持続感染の *in vitro* モデルの構築を目指した。CAV を感染させた MSB1 細胞を中和抗体存在下で培養し、さらに中和抗体の存在下で培養しつつ継代を行なった。その結果、継代を繰り返しても、CAV 感染細胞は中和抗体の存在下で生存し続けることを明らかにした。それら継代細胞には、蛍光抗体法およびリアルタイム PCR 法により、CAV の抗原およびゲノムの両者が確認された。14 代継代した細胞から抽出した CAV の遺伝子配列を解析したが、ウイルスタンパク質翻訳領域に変異は確認されなかった。すなわち、本モデルにおける CAV 持続感染には、ウイルスの遺伝子変異は関与しないことが明らかとなった。本研究では、CAV 持続感染の *in vitro* モデルの構築に初めて成功し、今後、中和抗体存在下で CAV が持続感染する機序の解明に役立てられることが期待される。

第2章では、ベトナム北部で初めて検出された CAV の遺伝子について、詳細な解析が行われた。生産性の低下が認められた 2~28 週齢の鶏由来の 330 組織検体が実験に供された。リアルタイム PCR 法により CAV ゲノムの検出を行なったところ、いずれの週齢の鶏でも陽性が確認されたが、2~3 週齢で 61.43% と最も高かった。それら CAV 遺伝子は、複数の genotype (II, III, V) および sub-genotype (IIIa~IIIc) に分類され、genotype II および III のウイルスの組換えにより新たな genotype V のウイルスが生まれたことも明らかにした。本研究により、ベトナム北部の鶏に高率に CAV が感染し、組換えウイルスが生まれていることが示され、CAV の進化の一端が明らかとなった。

第3章では、フィリピンにおける CAV 感染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でニューカッスル病ウイルス感染が確認された 3 羽の鶏の肺検体が実験に用いられた。それらのうちの 1 検体において、リアルタイム PCR 法で CAV ゲノムが検出された。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、検出されたフィリピンの 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になった。

本研究では、中和抗体存在下における CAV 持続感染の *in vitro* モデルの構築に初めて成功し、同モデルでは持続感染にウイルス遺伝子の変異は関与しないことを示した。CAV の持続感染の機序を解明する上で貴重な手法を提供した。また、ベトナムとフィリピンに分布する CAV に関する遺伝学的特徴を明らかにし、組換えウイルスの存在も示した。これらの結果は、疫学的情報としての価値とともに、CAV の感染制御に役立つことが期待される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Chicken anemia virus in northern Vietnam: molecular characterization reveals multiple genotypes and evidence of recombination

著者名 : Dong, V. H., Tran, T. H. G., Nguyen, V. G., Dao, D. T., Bui, N. V.,
Huynh, T. M. L., Takeda, Y., Ogawa, H. and Imai, K.

学術雑誌名 : Virus Genes

巻・号・頁・発行年 : 55 (5) : 643-653, 2019

既発表学術論文

1) 題 目 : Molecular characterization of a virulent strain of Newcastle
disease virus isolated from a diseased chicken in Kyrgyzstan in
2016

著者名 : Huong, T. T. G., Van, D. H., Duy, D. T., Iskender, S., Mairambek,
I., Omatsu, T., Katayama, Y., Mizutani, T., Ozeki, Y., Takeda, Y.,
Ogawa, H. and Imai, K.

学術雑誌名 : The Japanese Journal of Veterinary Research

巻・号・頁・発行年 : 67 (4) : 263-273, 2019

2) 題 目 : Pathological and virological analysis of concurrent disease of
chicken anemia virus infection and infectious bronchitis in
Japanese native chicks

著者名 : Hosokawa, K., Imai, K., Dong, V. H., Ogawa, H., Suzutou, M., Linn,
H. S., Kurokawa, A. and Yamamoto, Y.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 82 (4) : 422-430, 2020