

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

ハン チィ トゥ フン

申請者氏名 HANG THI THU PHUNG

フォーミー ウイルスはレトロウイルスの一種で、サル、ネコ、ウシなどから分離されている。ネコフォーミー ウイルス (FeFV) が感染したネコは持続感染状態となるが、特定の病気との関連は証明されていない。今日、FeFV は遺伝子治療用のベクターとして注目されているが、未解明の性状が多く残されている。本研究では、FeFV の遺伝学性状および抗原性に着目し、研究を行った。

### 第一章 異なる地域のイエネコおよび野生ネコ類から分離されたネコフォーミー ウイルスの遺伝学的解析

FeFV は、*env* 遺伝子により 2 つの genotype (F17-type と FUV-type) に分けられるが、アジアおよびアルゼンチンのイエネコと日本とベトナムのヤマネコから分離された FeFV の遺伝学的解析はなされていない。そこで、FeFV の遺伝学的多様性と系統発生的関連を解明するために、イエネコ由来 13 株、ヤマネコ由来 4 株の FeFV の LTR、*gag*、*env* 遺伝子の部分領域の塩基配列を決定した。LTR および *gag* 領域の系統発生的解析では概ね由来地域でグループを形成するのに対し、*env* 領域の比較では 2 つの genotypes に分かれることが確認された。genotype 間での塩基配列の相同性が約 75% であるのに対し、genotype 内での相同性は 95% 以上であったが、地域性との関連は見出されなかった。以上のことから、イエネコの祖先は世界中に広がる前に 2 つの genotypes の FeFV を有していた可能性が推定された。また、ヤマネコ由来 FeFV もイエネコ由来のものから独立したグループを形成する傾向は認められなかった。

### 第二章 ネコフォーミー ウイルスの定量のための GFP を利用したウイルス検出用細胞株の開発

FeFV は培養細胞で細胞変性効果 (CPE) を指標とした感染価の測定が可能であるが、日数と労力が必要であることに加え、CPE を示さずに持続感染状態になることもあるため、CPE を指標とした感染価測定には限界がある。そこで、FeFV の感染を迅速かつ簡便に検出するため、感染時に緑色蛍光色素 (GFP) を発現するネコ由来細胞の樹立を試みた。GFP 遺伝子の upstream に FeFV 感染時に活性化される LTR を組み込んだプラスミド作製し、CRFK 細胞に導入して樹立した細胞は FeFV

感染下で GFP が発現することが認められた。この細胞を FFG 細胞と名付け、その FeFV 感染の検出における有用性を検討したところ、CPE の有無にかかわらず感染細胞に GFP の強い発現が認められ、感染価の測定に応用した場合には 3 または 4 日で測定を終了することが可能となった。感染価は従来法と比較して 3-10 倍高く、感度も高いことが示された。本法の応用として各種培養細胞に FeFV を感染させた時の培養上清中のウイルス産生量を定量したところ、従来知られていた細胞に加え、新たにニワトリ及びコウモリ由来の細胞でも増殖が可能であることが示された。

### 第三章 感染ネコ血清とモノクローナル抗体を用いたネコフォーミー ウイルスの中和抗原性の解析

FeFV には中和試験で区別される 2 つの血清型が知られているが、2 つの genotypes の中和抗原性については不明の点が多い。そこで、FFG 細胞を応用した中和試験により、FeFV の中和抗原の解析を行った。FeFV が分離されたネコの血清を用いた交差中和試験では、2 種の血清は用いた全てのウイルスを中和したのに対して、実験感染ネコ血清は同一の genotype (F17-type) のウイルスのみを特異的に中和した。一方、3 つの血清サンプルにおいては中和活性が認められなかった。野外ネコ血清では、陽性例は全てどちらかの genotype のみを中和した。さらに、中和試験に補体の添加を試みたところ、genotype に特異的な中和活性の著しい上昇が認められた。従来、genotype 間では重複感染はないものと考えられていたが、両 genotype の FeFV を中和する血清が見つかったことから、重複感染の可能性が示された。また、中和モノクローナル抗体(mAb)の作出も試みたところ、FUV-type に特異的な中和活性を有する抗 Env タンパク mAb が得られ、今後の抗原解析に有用と考えられた。

本研究により、FeFV は由来ネコの種類にかかわらず、env 遺伝子塩基配列をもとに 2 つの genotypes に大別されることが明らかとなった。また、serotype は genotype に一致することが示されるとともに、genotype 間の重複感染の可能性も示唆された。加えて、本研究により開発された GFP 細胞により、FeFV 感染価の測定を数日以内に行うことが可能となった。以上の成果は今後、FeFV の持続感染に対するネコの免疫応答の解明並びに FeFV のウイルスベクターとしての開発研究に貢献するものと考えられる。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）論文として価値あるものと認めた。