

## げっ歯類パルボウイルス

國田 智

自治医科大学実験医学センター

### 要 約

げっ歯類のパルボウイルス感染症は、動物実験施設において統御が困難なウイルス感染症の1つとされている。成熟個体はもちろんのこと、幼若動物や免疫不全系統でも、感染例の多くは不顕性であるが、リンパ系細胞でウイルス増殖して免疫機能を修飾するなど、感染に伴う実験成績への影響に関しては十分に配慮する必要がある。また、汚染施設内での感染率が一般に低く、sentinel動物による感染検出率も低いと、汚染の早期摘発が容易でないという特徴がある。さらに、ほとんどのパルボウイルスにおいて持続感染が成立し、環境中での抵抗性も強く、垂直感染や配偶子を介した伝播の可能性もあることから、汚染個体や施設の清浄化にも細心の注意が必要となる。

### 1. 病原体

パルボウイルス (Parvovirus) は、パルボウイルス科に属する直鎖の1本鎖DNAを持つウイルスである。ウイルス粒子は、直径約20 nmの正20面体構造で、エンベロープを持たない。ラテン語で「小さい」を意味する“parvus”が命名の由来である。ウイルス粒子は物理化学的に安定であり、アルコールおよび酸やアルカリ、80°Cで2時間の加熱や乾燥などの多くの環境条件に耐性があるが、一般的な滅菌方法により不活化が可能である。パルボウイルスが増殖するには細胞分裂に伴って発現する宿主細胞由来の転写因子等が必要であり、パルボウイルスの増殖は一般に宿主細胞の増殖動態に依存している。このため、体内に侵入したパルボウイルスは、主に細胞増殖が活発な消化管あるいは骨髄などの造血・リンパ系器官で増殖する。

パルボウイルスのゲノムサイズは、約5-kbと非常に小さい。パルボウイルスのゲノムには、大きなタンパク質をコードする読み取り枠 (open reading frame, ORF) が2個存在し、5'側のORFが非構造(NS)タンパク質を、3'側のORFがウイルスの殻 (キャプシド) を構成するタンパク質 (VP) をコードしている。これらのORFは、遺伝子地図上の位置4と38に存在する2つのプロモータ (P4およびP38) によって

転写調節されており、P4が2種類の非構造タンパク質NS1およびNS2をコードするRNAの転写に関与し、P38は2種類のキャプシド蛋白質VP1およびVP2をコードするRNAの転写に関与している。

### 2. ウイルスと宿主

実験用マウスで自然感染がみられるパルボウイルスは、血清学的に識別可能な2種類のウイルスに大別され、マウス微小ウイルス (mouse minute virus, MMV) およびマウスパルボウイルス (mouse parvovirus, MPV-1) と命名されている [1]。1990年代前半にT細胞培養クローンの混入ウイルスとしてMPV-1aが分離され、この発見によりMMVとは血清型が異なるパルボウイルスの存在が明らかとなった [2, 3]。その後、MPV-1aと同様な血清学的性状や遺伝子型のウイルスが実験用マウスコロニーを広く汚染していることが判明し、大きな問題となった。近年では、MPV-1と血清型・遺伝子型が異なるMPV-2およびMPV-3が新規に発見され、4種類の血清型 (MMV, MPV-1, MPV-2, MPV-3) に分類されることが多い [4]。パルボウイルスのキャプシドを構成する主要タンパク質であるVP2のアミノ酸配列は、MMVとMPVの間で73~74%程度の相同性であり、このVP2の抗原性の違いが血清型を決定している。すなわち、

赤血球凝集抑制試験 (HAI) や中和試験によって識別される血清型は VP1 と VP2 の特異性に起因している。一方、NS1 と NS2 をげっ歯類パルボウイルスの間で比較してみるとそのアミノ酸配列が高度に保存されていることが分かる。間接蛍光抗体法 (IFA) や粗精製ウイルス抗原を用いた酵素抗体法 (ELISA) が交差反応性を示すのは、NS1 および NS2 タンパク質がウイルス種を超えて強い共通抗原性を有するためである。

実験用ラットで自然感染がみられるパルボウイルスとして、Kilham ラットウイルス (Kilham rat virus, KRV) および Toolan's H-1 ウイルスがプロトタイプウイルスとして知られていた。1990 年代後半になって、ラットでも 2 種の新規パルボウイルスが自然感染個体から発見され、ラット微小ウイルス (rat minute virus, RMV-1) とラットパルボウイルス (rat parvovirus, RPV-1) と命名された [5, 6]。RPV-1 と RMV-1 は、既知の KRV や H-1 ウイルスとは血清型が異なる。また、VP2 のアミノ酸配列を比較すると、RMV-1 は KRV や H-1 に類似しているものの明確に異なる配列を有し、RPV-1 は RMV-1, KRV, H-1 のいずれとも VP2 配列の類似性が低い。すなわち、RPV-1 は他のげっ歯類パルボウイルスとの類縁性が比較的低いとみられる。

### 3. 感染性および病原性

MMV と MPV は、その抗原性のみならず、感染性にも大きな違いがある。MMV は、幼若マウスが易感染性を示すが、成熟マウスは感受性が低く、実験感染が成立しても不顕性に終始し発症することはない [1]。In vitro でリンパ球に感染し増殖・機能抑制を示す MMV(i) 株を新生マウスに実験感染させた場合、発育不良、造血系や中枢神経系の障害、腎臓や腸管の出血を伴う致死発症が報告されている [7]。免疫不全の SCID マウスは、成体でも MMV(i) を感染させると重篤な白血球減少症を起こし、致死的な経過をたどる [8]。一方、自然感染の場合には、成体はもちろん新生マウスでも、免疫の正常なマウスが MMV 感染によって発症することはない。これに対し、MPV は、成獣でも幼若マウスと同等の感受性を示す [9]。MPV 感染マウスのリンパ系組織には数か月間ウイルスが潜在し、特に免疫不全マウスでは生涯に渡って持続感染が成立する [10,11]。しかしながら、免疫の正常なマウスのみならず免疫不全マウスにおいても、また自然感染、実験感染を問わず、MPV による発症や病変形成の報告例はない。

ラットのパルボウイルス感染症も一般的に不顕性

であるが、KRV および H-1 ウイルスが胎仔に子宮内感染したり新生仔に感染した場合には、胎仔の死亡や吸収、出生仔の発育不良、出血性脳炎、肝炎などの重篤な病原性を示すことがある [1]。RMV や RPV も子宮内感染するが、病原性はないと考えられる。免疫不全ラットにおいても、RMV や RPV 感染による成熟ラットの発症報告はない。

### 4. 感染源および感染経路

糞便中に排出されたウイルスが経口・経鼻感染することで水平伝播する。子宮内感染も認められる [12]。腸管や腸間膜リンパ節では感染が持続し、特に免疫不全動物や新生仔が感染した場合、糞便中へのウイルス排出が長期間続くため、感染源として注意が必要である [9, 11]。また、パルボウイルスは環境中での抵抗性が強く、ウイルス汚染された床敷や飼育器材は長期間感染源となり得る [13]。さらに、パルボウイルスは継代腫瘍細胞や株化細胞を汚染しやすく、これらも感染源として重要である。

### 5. 汚染状況

アメリカやヨーロッパでは、研究施設のマウスが MPV や RMV, RPV に高頻度に感染していることが報告されている。2002 年に報告された感染率調査では、北米の研究施設のマウスで 10% 近くが MPV 抗体陽性であった [14]。一方、日本国内のマウスにおける感染率は極めて低いと考えられる。

### 6. 実験への影響

MPV はマウス個体に感染しても全く無症状であるが、T 細胞性免疫応答の抑制、移植片拒絶反応の亢進など、免疫や移植に関する in vivo ならびに in vitro の研究に障害をもたらすことが知られている。MMV のバリエーションである MMV(i) は、in vitro で T 細胞に感染して細胞死を誘導することで T 細胞機能に抑制的に作用する。KRV や RPV が移植腫瘍細胞や株化細胞に感染し、その形質を変化させることも知られている。感染動物の発癌率を低下させたり、自己免疫性糖尿病モデル (BB) ラットの発症を亢進させるなどの報告もある [1]。

### 7. 検査方法

蛍光マイクロビーズ法 (MFI), ELISA, IFA, HAI による抗体検査が一般的に実施されている。パルボ

ウイルス感染細胞内で合成される非構造タンパク質 NS1, NS2 は、げっ歯類パルボウイルス間で共通抗原性を示し、キャプシドタンパク質 VP1, VP2 はパルボウイルスの血清型に特異的である。このため、NS 抗原に対する抗体を検出可能な方法、すなわち感染細胞を抗原とする IFA や組換え NS1 タンパク質を抗原とする ELISA は、げっ歯類パルボウイルスに対する抗体を広く検出できる [15]。一方、VP 抗原に対する抗体を検出する HAI や組換え VP2 タンパク質を抗原とする ELISA は、パルボウイルスの血清型を特定するのに有効である [14, 16, 17]。精製されたパルボウイルス粒子を抗原として用いる場合、その構成成分は VP タンパク質が主体であり、NS タンパク質はほとんど含まれていないことに注意する必要がある。感染マウス糞便、あるいはケージ内部や排気フィルターに付着したダストから PCR でウイルス核酸を検出する方法も実用化されている [18, 19]。培養細胞のパルボウイルス汚染の検査法としては、従来の mouse antibody production (MAP) test に代わり、現在は PCR が広く利用されている [20]。

げっ歯類パルボウイルスは汚染状況の把握が難しい感染症の 1 つである。たとえば MPV 感染には高力価のウイルスが必要なため、汚染床敷から sentinel マウスの感染が成立するには、sentinel マウスの週齢や添加する床敷量等の条件の最適化が重要とされる [21]。また、我々の MPV 感染実験でも、感染 12 週間後頃まで糞便中へのウイルス排出が PCR で検出されるが、同居感染は感染 8 週間後では成立しないという結果が得られている [17]。このように、sentinel マウスを用いた MPV のモニタリングや検疫では偽陰性のリスクが予想され、MPV 汚染施設において汚染率は低いながらも MPV の根絶が進まない理由の一つと考えられる。感染の疑いがあるマウスを検査するには、当該個体から直接 PCR や血清検査を行うことが最も確実な方法といえる。さらに、MPV 感染に対する感受性、特に抗体産生については、マウス系統ごとに大きな差がみられるとの報告がある。C3H マウスでは MPV 抗体が効率よく誘導されるが、C57BL/6 マウスの MPV 抗体産生は著しく悪く、BALB/c, DBA/2, ICR はその中間的な応答性を示す [18]。このように MPV の抗体検査では、検査動物の系統にも注意を要する。

## 8. 対策

パルボウイルスの清浄化に際しては、いくつかの問題点がある。前述したように MPV は汚染コロニー内の感染率が低く、ケージ内同居でも非感染個体

が散見されるなど、正確な汚染実態の把握が困難である。また、感染力を保持したパルボウイルスが環境中に長期間残存するため、飼育環境のクリーンアップを塩素系消毒薬などで徹底して行うことも必要となる。さらに、パルボウイルスで汚染された培養細胞を介した再汚染への対策も重要である。MPV 感染した雌マウス、特に免疫不全マウスにおいては子宮内感染が起こりやすく、帝王切開による MPV 清浄化は不確実な場合がある。

近年の報告では、感染マウスから採取した配偶子にパルボウイルスが残存している危険性が高いことが示されており、体外受精・胚移植による MPV 除染の効果が問題視されている。たとえば、MPV 汚染コロニー由来のマウスから採取した精子、卵子、受精卵および卵巣サンプルが、PCR で高率に MPV 陽性を示すことが確認されている [22]。一方、MPV-1 感染 SCID マウスの卵管から 1 細胞期胚を回収し、1～2 日の培養後にレシピエントに移植し誕生させた次世代のマウスへは、MPV の伝播は起こらないとの報告もある [23]。これらの報告は、MPV 感染マウスを清浄化する際に、生殖工学技術が実務的には有効であることを示している。しかし、MPV 清浄化過程でウイルス残存のリスクが高いことは明確であり、MPV 除染の確認検査を実施することが本感染症対策において肝要といえるであろう。

## 参考文献

1. Jacoby, R.O., Ball-Goodrich, L.J., Besselsen, D.G., McKisic, M.D., Riley, L.K., and Smith, A.L. 1996. Rodent parvovirus infections. *Lab. Anim. Sci.* 46: 370–380.
2. McKisic, M.D., Lancki, D.W., Otto, G., Padrid, P., Snook, S., Cronin, D.C., Lohmar, P.D., Wong, T., and Fitch, F.W. 1993. Identification and propagation of a putative immunosuppressive orphan parvovirus in cloned T cells. *J. Immunol.* 150: 419–428.
3. Ball-Goodrich, L.J. and Johnson, E. 1994. Molecular characterization of a newly recognized mouse parvovirus. *J. Virol.* 68: 6476–6486.
4. Besselsen, D.G., Romero, M.J., Wagner, A.M., Henderson, K.S., and Livingston, R.S. 2006. Identification of novel murine parvovirus strains by epidemiological analysis of naturally infected mice. *J. Gen. Virol.* 87: 1543–1556.
5. Ball-Goodrich, L.J., Leland, S.E., Johnson, E.A., Paturzo, F.X., and Jacoby, R.O. 1998. Rat parvovirus type 1: the prototype for a new rodent parvovirus se-

- rogrou. *J. Virol.* 72: 3289–3299.
6. Wan, C.H., Soderlund-Venermo, M., Pintel, D.J., and Riley, L.K. 2002. Molecular characterization of three newly recognized rat parvoviruses. *J. Gen. Virol.* 83: 2075–2083.
  7. Brownstein, D.G., Smith, A.L., Jacoby, R.O., Johnson, E.A., Hansen, G. and Tattersall, P. 1991. Pathogenesis of infection with a virulent allotropic variant of minute virus of mice and regulation by host genotype. *Lab. Invest.* 65: 357–364.
  8. Segovia, J. *et al.* 1999. Severe leukopenia and dysregulated erythropoiesis in SCID mice persistently infected with the parvovirus minutes virus of mice. *J. Virol.* 73: 1774–1784.
  9. Smith, A.L., Jacoby, R.O., Johnson, E.A., Paturzo, F. and Bhatt, P.N. 1993. In vivo studies with an “orphan” parvovirus of mice. *Lab. Anim. Sci.* 43: 175–182.
  10. Jacoby, R.O., Johnson, E.A., Ball-Goodrich, L.J., Smith, A.L. and McKisic, M.D. 1995. Characterization of mouse parvovirus infection by in situ hybridization. *J. Virol.* 69: 3915–3919.
  11. Besselsen, D.G., Becker, M.D., Henderson, K.S., Wagner, A.W., Banu, L.A., and Shek, W.R. 2007. Temporal transmission studies of mouse parvovirus 1 in BALB/c and C.B-17/Icr-Prkdc<sup>scid</sup> mice. *Comp. Med.* 57: 66–73.
  12. Kajiwara, N., Ueno, Y., Takahashi, A., Sugiyama, F., Sugiyama, Y., and Yagami, K. 1996. Vertical transmission to embryo and fetus in maternal infection with rat virus (RV). *Exp. Anim.* 45: 239–244.
  13. Yang, F.C., Paturzo, F.X., and Jacoby, R.O. 1995. Environmental stability and transmission of rat virus. *Lab. Anim. Sci.* 45: 140–144.
  14. Livingston, R.S., Besselsen, D.G., Steffen, E.K., Besch-Williford, C.L., Franklin, C.L. and Riley, L.K. 2002. Serodiagnosis of mice minute virus and mouse parvovirus infections in mice by enzymelinked immunosorbent assay with baculovirus-expressed recombinant VP2 proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9: 1025–1031.
  15. Riley, L.K., Knowles, R., Purdy, G., Salome, N., Pintel, D., Hook, Jr. R.R., Franklin, C.L., and Besch-Williford, C.L. 1996. Expression of recombinant parvovirus NS1 protein by a baculovirus and application to serologic testing of rodents. *J. Clin. Microbiol.* 34: 440–444.
  16. Ball-Goodrich, L.J., Hansen, G., Dhawan, R., Paturzo, F.X., and Vivas-Gonzalez, B.E. 2002. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mouse parvovirus infection in laboratory mice. *Comp. Med.* 52: 160–166.
  17. Kunita, S., Chaya, M., Hagiwara, K., Ishida, T., Takakura, A., Sugimoto, T., Iseki, H., Fuke, K., Sugiyama, F., and Yagami, K. 2006. Development of ELISA using recombinant antigens for specific detection of mouse parvovirus infection. *Exp. Anim.* 55: 117–124.
  18. Besselsen, D.G., Wagner, A.M., and Loganbill, J.K. 2000. Effect of mouse strain and age on detection of mouse parvovirus 1 by use of serologic testing and polymerase chain reaction analysis. *Comp. Med.* 50: 498–502.
  19. Macy, J.D., Paturzo, F.X., Ball-Goodrich, L.J., and Compton, S.R. 2009. A PCR-based strategy for detection of mouse parvovirus. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 48: 263–267.
  20. Yagami, K., Goto Y., Ishida, J., Ueno, Y., Kajiwara, N., and Sugiyama, F. 1995. Polymerase chain reaction for detection of rodent parvovirus contamination in cell lines and transplantable tumors. *Lab. Anim. Sci.* 45: 326–328.
  21. Besselsen, D.G., Myers, E.L., Franklin, C.L., Korte, S.W., Wagner, A.M., Henderson, K.S., and Weigler, B.J. 2008. Transmission probabilities of mouse parvovirus 1 to sentinel mice chronically exposed to serial dilutions of contaminated bedding. *Comp. Med.* 58: 140–144.
  22. Agca, Y., Bauer, B.A., Johnson, D.K., Critser, J.K., and Riley, L.K. 2007. Detection of mouse parvovirus in *Mus musculus* gametes, embryos, and ovarian tissues by polymerase chain reaction assay. *Comp. Med.* 57: 51–56.
  23. Besselsen, D.G., Romero-Aleshire, M.J., Munger, S.J., Marcus, E.C., Henderson, K.S., and Wagner, A.W. 2008. Embryo transfer rederivation of C.B-17/Icr-Prkdc<sup>scid</sup> mice experimentally infected with mouse parvovirus 1. *Comp. Med.* 58: 353–359.