

学 位 論 文 題 名

ウマヘルペスウイルス 1 型感染症の遺伝子診断と
ウイルス DNA の解析に関する研究

学位論文内容の要旨

ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) は、アルファヘルペスウイルス亜科に属し、妊娠馬の死流産や子ウマの鼻肺炎、また、ときには神経疾患を引き起こす。同じ亜科に属するウマヘルペスウイルス 4 型 (EHV-4) は主として子ウマに呼吸器疾患、また、まれに妊娠馬に死流産を起こすウイルスで EHV-1 と抗原的に近縁である。EHV-1 による流産は毎年発生し、軽種馬生産業界に多大の経済損失を与えていることから、ウマのウイルス性疾病の中で最も重要視されている。流産防止用に不活化ワクチンが応用されているが、その効果が不十分であるため、有効なワクチンの開発が切望されている。

本研究では、EHV-1 による流産の防止対策の一環として、EHV-1 感染症の迅速な確定診断法の確立、日本で分離された EHV-1 の DNA 解析ならびに遺伝子組み換えによるワクチン開発に必要な基礎的検討を行い、以下の成績を得た。

1. EHV-1 と EHV-4 感染症を迅速に診断する目的でポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の応用を試みた。プライマーは両ウイルスのエンベロップ糖タンパク gB 遺伝子の塩基配列をもとに設定し、それぞれのウイルスに特異的なプライマーを混合して PCR を行うことによって、容易に両ウイルスを型別することが可能となった。野外のウマ流産例に本法を応用したところ、PCR の成績はウイルス分離の成績と完全に一致した。このことから、本 PCR 法は両ウイルス感染症の優れた迅速確定診断法であることが示唆された。

2. 日本で分離された 9 株の EHV-1 のウイルス DNA を制限酵素 *Bam* HI で切断して電気泳動プロファイルを比較したところ、EHV-1 不活化ワクチンの実用化前に分離された 3 株と実用化後に分離された 6 株との間に大きな変化はなかったが、9 株の間ではいくつかの断片で分子量の違いが認められた。そこで、これらの断片をサザ

ンハイブリダイゼーションで調べたところ、*Bam* HI 消化で得られるA～Tの20断片のうち、A、D、E、N、P、QR、SとTの8断片に変化を認めた。特に、A断片の分子量の変化はこれまでに報告がなく、今回の研究で初めて明らかになった。

3. 日本で初めて分離されたEHV-1の強毒HH1株とこれをウシ腎臓 (BK) 細胞で77代 (BK77株)、161代 (BK161株)、271代 (BK271株) と343代 (BK343株) 連続継代して作出された株のウイルスDNAを *Bam* HI で切断して電気泳動プロファイルと比較したところ、BK77株とBK161株は親株のHH1株と同一のプロファイルを示したが、BK271株とBK343株では明らかに親株と異なっていた。この変化を認めた株の継代数はウマに対する病原性低下を示した株の継代数と一致していた。BK343株で変化を認めた断片は、*Bam* HI A、B、D、E、N、P、QR、SおよびT断片と同定された。各断片の変化領域を特定したところ、T断片上の1番遺伝子、A断片上の24番遺伝子とD断片上の71番遺伝子に変化を認めた。他の6断片には非コード領域あるいは繰り返し配列部位に変化を認めた。変化を認めた3遺伝子の塩基配列を決定したところ、1) 1番遺伝子内には299塩基を単位とする繰り返し配列の挿入、2) 24番遺伝子には繰り返し配列のコピー数の変化、3) 71番遺伝子では繰り返し配列のコピー数の変化とアミノ酸置換を伴う2箇所の塩基置換が認められた。以上の成績より、BK細胞による長期間の連続継代で変化したウイルスゲノム領域のうち、これら3種類の遺伝子が病原性に関与している可能性が推察された。

4. BK343株でみられた71番遺伝子の変異と病原性との関連を調べるために、相同組み換えにより、親株であるHH1株の71番遺伝子内に β -ガラクトシダーゼ遺伝子を挿入したもの (β -71株)、 β -71株の71番・ β -ガラクトシダーゼ結合遺伝子をBK343株の71番遺伝子あるいはHH1株の71番遺伝子に置き換えたもの (それぞれ、3F-71株、Res-71株) を作出した。これらのウイルスの生物性状を培養細胞を用いて検討したところ、ウイルス複製に大きな差はみられなかったが、 β -71株の細胞外へのウイルス放出量が他の株に比べて減少する傾向にあった。これらのウイルスをマウスに経鼻接種してマウス肺でのウイルス感染価を調べたところ、 β -71株とBK343株の感染価はHH1株の約1/100であったが、3F-71株とRes-71株ではHH1株と同様であった。以上の成績より、71番遺伝子産物は病原性に関与することが示唆された。しかし、BK343株の71番遺伝子で置き換えられた3F-71株の増殖性は低下しなかったことから、BK343株の病原性低下が71番遺伝子の変異だけによるものではないことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 橋 本 信 夫
副 査 教 授 喜 田 宏
副 査 助 教 岡 崎 克 則

学 位 論 文 題 名

ウマヘルペスウイルス 1 型感染症の遺伝子診断と ウイルス DNA の解析に関する研究

ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) は、妊娠馬に死流産を、また EHV-1 と抗原的に近縁である EHV-4 型 (EHV-4) は子ウマに呼吸器疾患をおこす。EHV-1 による流産は毎年発生し、軽種馬生産業界に多大な経済損失を与えており、有効なワクチンの開発が切望されている。本研究では、EHV-1 感染症の迅速な確定診断法の確立、日本で分離された EHV-1 の DNA 解析ならびに遺伝子組み換えによるワクチン開発に必要な基礎的検討を行った。

まず EHV-1 と EHV-4 感染症を迅速に診断する目的で両ウイルスのエンベロープ糖タンパク gB 遺伝子の塩基配列をもとにプライマーを設定し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の応用を試みた。野外のウマ流産例に本法を応用したところ、PCR の成績はウイルス分離の成績と完全に一致したことから、本 PCR 法は両ウイルス感染症の優れた迅速確定診断法であることが示唆された。

次に日本で分離された 9 株の EHV-1 のウイルス DNA を制限酵素 *Bam* HI で切断して電気泳動プロファイルと比較したところ、いくつかの断片で分子量の違いが認められた。そこで、これらの断片をサザンハイブリダイゼーションで調べたところ、*Bam* HI 消化で得られる A~T の 20 断片のうち、A、D、E、N、P、QR、S および T の 8 断片に変化を認めた。

また、日本で初めて分離された EHV-1 の強毒 HH1 株とこれをウシ腎臓 (BK) 細胞で連続継代して作出された株のウイルス DNA を *Bam* HI で切断して電気泳動プロファイルと比較したところ、271 代と 343 代 (BK343) 継代株では明らかに親株と異なっていた。この変化を認めた株はウマに対する病原性も低下していた。BK343 株で変化を認めた断片は、T 断片上の 1 番遺伝子、A 断片上の 24 番遺伝子と D 断片上の 71 番遺伝子であり、これら 3 種類の遺伝子が病原性に関与している可能性が推察された。

最後に BK343 株でみられた 71 番遺伝子の変異と病原性との関連を調べるために、相同組み換えにより、親株である HH1 株の 71 番遺伝子内に β -ガラクトシダーゼ遺伝子を挿入したもの (β -71 株)、 β -71 株の 71 番・ β -ガラクトシダーゼ結合遺伝子を BK343 株の 71 番遺伝子あるいは HH1 株の 71 番遺伝子に置き換えたもの (それぞれ、3F-71 株、Res-71 株) を作出した。これらのウイルスをマウスに経鼻接種して肺での増殖能を調べたところ、 β -71 株と BK343 株の感染価は HH1 株の約 1/100 であったが、3F-71 株と Res-71 株では HH1 株と同様であった。以上の成績より、71 番遺伝子産物は病原性に関与することが示唆された。

本研究により EHV-1 の病原性に関与する遺伝子が推定され、遺伝子組み換えワクチンの開発および本病の制圧にとり重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は桐沢力雄氏が博士(獣医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。