

## 学位論文題名

In vivo dynamics of equine infectious anemia viruses  
emerging during febrile episodes: insertions/  
duplications at the principal neutralizing domain

(ウマ発熱期中に出現するウマ伝染性貧血症ウイルス  
の生体内変異：主要中和ドメインの挿入と反復)

## 学位論文内容の要旨

ウマ伝染性貧血症ウイルス (EIAV) は、ウマ伝染性貧血症 (EIA) の病原体で、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) と同じく、レトロウイルス科レンチウイルス亜科に属するウイルスである。EIA研究の歴史は古く、1883年にフランスにおいて伝染性疾患であることが明らかにされ、1904年にはその病原体が濾過性因子であることが証明されている。しかし、その後、本疾病の病原体、発病機序、免疫、診断、予防などに関する研究はほとんど進められていない。1960年代に、小林らによって培養ウマ白血球を用いたEIAVの培養法が行われ、ウイルスの定量が可能となった。その結果、EIAVの理化学的、形態学的性状が解明されるとともに、血清学的診断も可能となり、EIAの発病機序に関する研究や診断法が大きく進展した。

EIAVのゲノムは8200ベースの一本鎖のプラス鎖RNAで、*gag*、*pol*、*env*、S1、S2とS3の6個の読み取り枠 (open reading frame: ORF) を持ち、HIVや他のレンチウイルスに比べ、やや単純な遺伝子構造を持っている。*gag* はウイルスの基本骨格となる蛋白質をコードし、*pol* はウイルス複製に必要な各種酵素、*env* はウイルス粒子表面蛋白質、S1はHIVの*tat* に相当する蛋白質、S3はHIVの*rev* に相当する蛋白質をコードしている。S2産物の機能についてはまだ明らかにされていない。さらに、EIAVの*gag*、*pol* 遺伝子がHIVと高い相同性を有していることが明らかにされている。

EIAの特徴としては、持続的なウイルス血症、慢性期における回帰熱、発熱に伴う貧血等が認められる。感染ウマの病態経過は、感染したウイルス株の病原性、ウイルス量、宿主側の個体差などによって、急性、亜急性、慢性の3つの型に分けられる。急性型は7-20日の潜伏期間後、ウイルス血症、血小板の減少、貧血を伴う41-42℃の高熱が持続する。食欲減退、消沈、粘膜や結膜の出血、黄疸性浮腫などが観察され、起立不能となり、最後に衰弱死する。亜急性型は上記の症状を伴う発熱を示した後に回復が認められるが、その後再発を繰り返し、最後に死亡する。慢性型は、繰り返される症状の度合いがだんだん軽度になるとともに、無熱期が長期にわたるため、健康馬と見分けがつかなくなる場合と、長期の無熱期を経て再度重篤な症状に陥り死亡する場合とがある。また、この慢性型の経過をたどるウマが最も多く認められている。

特に注目されるEIAの特徴は、回帰熱の臨床症状が短期間 (1年ぐらい) で数回繰り返されることである。1973年、回帰熱が抗原変異ウイルスの増殖に起因することが甲野らの試験によって証明された。各々の発熱期に分離されたウイルスは、そのウイルス分離が行われた時やそれ以前に採取された血清中の中和抗体の作用を受けないが、そのウ

ウイルス分離が行われた時より後に採取された血清中にはそのウイルスに対する強い中和抗体の上昇が認められる。この事実は、各時期に分離されたウイルスが異なる抗原性を保有することを示している。また、これらのウイルスは全て共通するウイルス抗原を保有しているため、そのような変異はウイルス粒子の表面にのみ限られていると考えられる。

レンチウイルス予防ワクチン開発の大きな障害は、ウイルスが容易に抗原変異を起こし、エスケープ株を出現させることである。EIAVが、HIVワクチン開発の好適なモデルと考えられている点は、短期間で認められる抗原変異が発熱症状と対応して認められること、また変異ウイルス出現の特定化が容易なことにある。本研究では、EIAV接種ウマの各発熱期ごとに分離されたウイルスについて、その粒子表面蛋白質をコードする *env* 遺伝子の構造変化を探ることにより、生体内で繰り返し出現するEIAVの遺伝子変異機序を検討した。

EIAV粒子表面蛋白質Envのひとつ、gp90中には主要中和ドメイン (PND; principal neutralizing domain) と超可変領域 (HVR; hypervariable region) の2つのドメインが存在し、これら両方のドメインが中和エピトープと深く関わると言われている。そこで、今回、このPNDとHVRを含む領域をPCRにより増幅し、その遺伝子配列について検討を行った。ウイルスは、日本の強毒株であるV70を用い、八頭のウマに接種した。その結果、27回の発熱期が観察された。それぞれの発熱期から採取された27の血しょうサンプルから、ウマの初代マクロファージへの感染により、それぞれの発熱期に存在するウイルスを分離した。これらのウイルス感染細胞からDNAを抽出し、PCR、クローニングを行った。一部の血しょうサンプルについては、血しょう中に存在するウイルス粒子を超遠心で集め、そのウイルスRNAから直接RT-PCR法による解析を行った。得られた計97 cDNAクローンの配列を解析したところ、遺伝子変異がPNDとHVR領域に集中して認められた。さらに、PND領域の変異は顕著で、主としては挿入/反復に依っていた。一方、HVR領域の変異は塩基置換であった。このPND領域の変異配列は、挿入の見られた領域の近傍に存在する領域に由来するものであった。すなわち、近傍配列は5個のsmall unit (SU) (9個のヌクレオチドから成るSU1、6個のヌクレオチドから成るSU2、12個のヌクレオチドから成るSU3、12個のヌクレオチドから成るSU4、15個のヌクレオチドから成るSU5) に分けられるが、全ての変異ウイルスのPND配列は、これらの各SUを異なる様式で挿入/反復することにより構成されていた。さらに、この27回の発熱期中に出現するウイルスのPNDの構成は、そのSUの配列から大きく4型に分けることができた。I型は、PND配列がSU1-SU2-SU2-SU3-SU4-SU5と、最も単純な配列で、親株として用いたV70がこの型に含まれる。II型はSU1-SU2-SU2-SU3-SU1-(SU2)-SU2-SU3-SU4-SU5、III型はSU1-SU2-SU2-SU3-SU4-(SU2)-SU2-SU3-SU4-SU5、IV型はSU1-SU2-SU2-SU3-SU4-SU5-(SU2)-SU2-SU3-SU4-SU5である。下線の部分が挿入部分で、それぞれ異なるSUが繰り返し挿入していた。また、括弧内の配列が存在するものと存在しないものが認められたが、これらは同じ型に型別した。さらに、同じSU中でも、各時期のウイルスによって塩基置換あるいは欠失も認められた。すなわち、SU1は5個、SU2は15個、SU3は14個、SU4は16個、SU5は9個の変異型が存在した。このように、同じSU組成のウイルスであっても、大きな挿入変異に加えて、置換変異によってさらに多様なウイルス集団が出現することが明らかになった。

次に、各4型のウイルスがそれぞれのウマの各発熱期で出現してくる規則性について検討した。I型に属するウイルスによる発熱期の次に見られる発熱期から出現してくるウイルスは、II、III型で、IV型は認められなかった。II型の次にはI、II、III型のみ、III型の次にはIII、IV型のみ、IV型の次にはIII、IV型のみであった。このように、今回解析を行った限りでは一旦IIIとIV型に変異すると、IやII型への変異は認められなかった。このように、レンチウイルスにおいても、その変異性には限界があることが示唆された。

以上の結果から、EIAVは、PND領域のSUの挿入／反復変異に加えて、SU中の塩基置換と塩基欠失によって、多様なエスケープ変異株を出現させ、その結果生体に発熱を引き起こしていると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柿 沼 光 明

副 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 生 田 和 良

学 位 論 文 題 名

## In vivo dynamics of equine infectious anemia viruses emerging during febrile episodes: insertions/ duplications at the principal neutralizing domain

(ウマ発熱期中に出現するウマ伝染性貧血症ウイルス  
の生体内変異：主要中和ドメインの挿入と反復)

ウマ伝染性貧血症ウイルス (EIAV) は、ウマ伝染性貧血症 (EIA) の病原体で、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) と同じく、レトロウイルス科レンチウイルス亜科に属するウイルスである。EIAの特徴は、持続的なウイルス血症、慢性期における回帰熱、発熱に伴う貧血等が認められることである。1973年、この回帰熱は抗原変異ウイルスの増殖に起因していることが甲野らの実験によって証明された。レンチウイルス予防ワクチン開発の大きな障害は、ウイルスが容易に抗原変異を起こし、エスケープ株を出現させることである。EIAVが、HIVワクチン開発の好適なモデルと考えられている点は、短期間で認められる抗原変異が発熱症状と対応して認められること、また変異ウイルス出現の特定化が容易なことにある。本研究では、EIAV接種ウマの各発熱期ごとに分離されたウイルスについて、その粒子表面蛋白質をコードする *env* 遺伝子の構造変化を探ることにより、生体内で繰り返し出現するEIAVの遺伝子変異機序を検討した。

EIAV粒子表面蛋白質Envのひとつ、gp90中には主要中和ドメイン (PND; principal neutralizing domain) と超可変領域 (HVR; hypervariable region) の2つのドメインが存在し、これら両方のドメインが中和エピトープと深く関わると言われている。そこで、今回、このPNDとHVRを含む領域をPCRにより増幅し、その遺伝子配列について検討を行った。ウイルスは、日本の強毒株であるV70を用い、八頭のウマに接種した。その結果、27回の発熱期が観察された。それぞれの発熱期から採取された27の血しょうサンプルから、ウマの初代マクロファージへの感染により、それぞれの発熱期に存在するウイルスを分離した。これらのウイルス感染細胞からDNAを抽出し、PCR、クローニングを行った。一部の血しょうサンプルについては、血しょう中に存在するウイルス粒子を超遠心で集め、そのウイルスRNAから直接RT-PCR法による解析を行った。

得られた計97 cDNAクローンの配列を解析したところ、遺伝子変異がPNDとHVR領域に集中して認められた。さらに、PND領域の変異は顕著で、主として挿入/反復に依っていた。一方、HVR領域の変異は塩基置換であった。このPND領域の変異配列は、挿入の見られた領域の近傍に存在する領域に由来するものであった。すなわち、近傍配列は5個のsmall unit (SU) (9個のヌクレオチドから成るSU1、6個のヌクレオチドから成るSU2、12個のヌクレオチドから成るSU3、12個のヌクレオチドから成るSU4、15個のヌクレオチドから成るSU5) に分けられるが、全ての変異ウイルスのPND配列は、これらの各SUを異なる様式で挿入/反復することにより構成さ

れていた。さらに、この27回の発熱期中に出現するウイルスのPNDの構成は、そのSUの配列から大きく4型に分けることができた。I型は、PND配列がSU1-SU2-SU2-SU3-SU4-SU5と、最も単純な配列で、親株として用いたV70がこの型に含まれる。II型はSU1-SU2-SU2-SU3-SU1-(SU2)-SU2-SU3-SU4-SU5、III型はSU1-SU2-SU2-SU3-SU4-(SU2)-SU2-SU3-SU4-SU5、IV型はSU1-SU2-SU2-SU3-SU4-SU5-(SU2)-SU2-SU3-SU4-SU5である。下線の部分が挿入部分で、それぞれ異なるSUが繰り返し挿入されていた。また、括弧内の配列が存在するものと存在しないものが認められたが、これらは同じ型に型別した。さらに、同じSU中でも、各時期のウイルスによって塩基置換あるいは欠失も認められた。すなわち、SU1は5個、SU2は15個、SU3は14個、SU4は16個、SU5は9個の変異型が存在した。このように、同じSU組成のウイルスであっても、大きな挿入変異に加えて、置換変異によってさらに多様なウイルス集団が出現することが明らかになった。次に、各4型のウイルスがそれぞれのウマの各発熱期で出現してくる規則性について検討した。I型に属するウイルスによる発熱期の次に見られる発熱期から出現してくるウイルスはI、II、III型で、IV型は認められなかった。II型の次にはI、II、III型のみ、III型の次にはIII、IV型のみ、IV型の次にはIII、IV型のみであった。このように、今回解析を行った限りでは一旦IIIとIV型に変異すると、IやII型への変異は認められなかった。このように、レンチウイルスにおいても、その変異性には限界があることが示唆された。

以上の結果から、EIAVは、PND領域のSUの挿入/反復変異に加えて、SU中の塩基置換と塩基欠失によって、多様なエスケープ変異株を出現させ、その結果生体に発熱を引き起こしていると考えられた。

公開発表にあたり、主査の柿沼教授からEIAV感染馬が貧血を引き起こす理由、II、III、IV型ウイルスからI型ウイルスへのback mutationがあるのか、副査の皆川教授より、EIAV感染馬発熱期でのサイトカインの動き、ウイルスviremiaと中和抗体価との関連性、弱毒株が持続感染するのか、強毒株とのrecombinationを引き起こす可能性、レンチウイルスのウイルス進化の限界に関する考え方、免疫科学研究所細菌感染部門の岸助教授から今回遺伝子解析した97cDNA clone中DNA PCRとRT-PCR由来の割合、back mutationメカニズムについての考え方、PCR中のartifactの可能性、副査の生田教授から中国で使われているEIAV弱毒ワクチンの情况及びこのような弱毒ワクチンをHIVへ応用できる可能性、などについて質問がなされたが発表者はおおむね妥当な回答を行った。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。