

学 位 論 文 題 名

イヌヘルペスウイルスの潜伏感染ならびに
前初期および初期蛋白質遺伝子に関する研究

学位論文内容の要旨

イヌヘルペスウイルス（canine herpesvirus : CHV）はアルファヘルペスウイルス亜科、ワリセロウイルス属の2本鎖DNAウイルスである。CHVは3週齢以下の子犬に致死的な全身感染を起こす。一方、3週齢以上の子犬および成犬には、気管支炎を伴う上気道感染および持続性の生殖器感染を起こすが、殆どが軽症である。急性感染期を過ぎるとCHVは宿主の神経節およびリンパ節に遺伝子の形で潜伏し、ストレスや免疫機能の低下等に伴って再活性化する。再活性化したウイルスは胎盤あるいは産道を介して胎子および新生子犬に感染する。成犬には、接触、飛沫および交尾によって感染する。したがって、潜伏感染犬がウイルスに汚染されていない飼育場に導入されると、再活性化したCHVが蔓延する危険があるため、繁殖施設における被害は大きい。したがって、CHVの潜伏と再活性化の機構を解明することは、CHV感染症の制圧に極めて重要である。

CHVの潜伏と再活性化はウイルスと宿主との相互作用の結果である。本研究では、その機構の解明を目的として、最初に実験感染犬で潜伏感染細胞の同定を行った。続いて、ウイルスの増殖に必須な前初期（IE）蛋白質遺伝子およびウイルス遺伝子の転写制御に重要な役割を果たす単純ヘルペスウイルス1（HSV-1）のICP0に相同なCICP0の遺伝子構造を決定し、その予測アミノ酸配列から機能を推定した。さらに、潜伏の維持および再活性化に深く関与すると考えられる潜伏関連転写物（LAT）を実験感染犬の潜伏感染組織中に検出し、その転写領域の決定を試みた。

まず、CHVをイヌに実験感染させ、潜伏感染細胞を同定した成績を第一章に述べる。鼻腔内、鼻腔と静脈内、ならびに膣粘膜にCHVを接種した成犬8頭は、いずれも接種後4～6日間鼻汁中にウイルスを排泄した。CHVを膣粘膜に接種したイヌは膣粘液からもウイルスが回収された。これらの実験感染犬は、接種後4～8週で中和抗体価が最高値を示し、以降漸減した。感染2カ月以上を経た後、全身諸臓器から抽出したDNAを鋳型として、nestedPCRによってCHVゲノムを検索した。その結果、全8頭の三叉神経節および7頭の咽頭後リンパ節にCHVゲノムが検出された。これらの組織中に感染性ウイルスおよびウイルス抗原は検出されなかった。また、CHVゲノムDNAを標的にした*in situ*ハイブリダイゼーションによって、三叉神経節の神経細胞および咽頭後リンパ節のリンパ球の核にウイルスゲノムが検出された。以上の成績から、CHVは接種経路に関わらず、実験感染犬の三叉神経節の神経細胞ならびに咽頭後リンパ節のリンパ球に潜伏感染することが判明した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	橋本	晃
副査	教授	喜田	宏
副査	教授	平井	克哉
副査	助教授	岡崎	克則

学位論文題名

イヌヘルペスウイルスの潜伏感染ならびに 前初期および初期蛋白質遺伝子に関する研究

イヌヘルペスウイルス(CHV)は、新生子犬に全身性の出血と壊死を特徴とする致死的感染を起こす。成犬は、軽症で耐過するが、ウイルスは体内に潜伏する。潜伏したウイルスは宿主の免疫機能の低下やストレスなどによって再活性化し、新たな感染源となる。本研究では、CHVの潜伏と再活性化の機構の解明を目的として、分子生物学的検索を行い以下の成果を得た。

最初に、実験感染犬で潜伏感染細胞の同定を行った。CHVに潜伏感染した成犬の全身諸臓器において、感染性ウイルスは検出されなかったが、三叉神経節や咽頭後リンパ節などにウイルス遺伝子が検出された。これらの臓器で*in situ*ハイブリダイゼーションを行い、神経細胞およびリンパ球の核がCHVの潜伏部位であることを明らかにした。

次に、ウイルスの増殖に必須な前初期蛋白質の遺伝子構造を決定した。CHV前初期遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)は4,152塩基からなり、CHV前初期蛋白質は1,383アミノ酸残基で構成されると予測された。そのアミノ酸配列は他のアルファヘルペスウイルス前初期蛋白質との比較から、酸性トランス活性化領域、DNA結合領域、核移行シグナルおよびトランス活性化領域が認められ、転写因子として機能すると考えられた。

さらに、ヒト単純ヘルペスウイルス1の感染細胞内蛋白質0(ICP0)に相同なCICP0の遺伝子構造を決定した。CICP0遺伝子は初期に転写され、そのORFは1,002塩基からなり、CICP0は333アミノ酸残基で構成されると予測された。そのアミノ酸配列にはリングフィンガー、酸性トランス活性化および高セリン領域が認められたことから、CICP0は転写調節にあずかると考えられた。

最後に、潜伏の維持と再活性化に関与すると考えられるCHVの潜伏関連転写物を潜伏感染組織から検出し、その転写領域を決定した。CHV潜伏関連転写物はCICP0および前初期遺伝子mRNAに相補的なRNAであることを明らかにした。

以上のように、申請者はCHVの潜伏と再活性化の機構の解明に必要と思われるいくつ

かの新しい知見を明らかにした。これらの成績はヘルペスウイルス感染症研究の進展に大きく貢献する。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者三好正浩の博士論文を、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。