

学 位 論 文 題 名

Differences in Infectivities and Genomic Structures between Oncogenic and Non-oncogenic Marek's Disease Viruses

（腫瘍原性および弱毒マレック病ウイルスの遺伝子構造と
感染性の相違に関する研究）

学位論文内容の要旨

マレック病（MD）は、マレック病ウイルス（MDV）の感染によって起こる鶏の悪性リンパ腫症で、伝播性が極めて強く、末梢神経の腫大や各種臓器におけるリンパ腫形成を特徴とする。MDVは、その病原性や抗原性の違いからMDV1、MDV2、及びMDV3の3血清型に分けられている。弱毒MDV1ならびにMDV2や七面鳥ヘルペスウイルス（MDV3）はMDワクチンとして用いられているが、その防御機構については不明な点が多い。本研究では、腫瘍化の分子機構ならびにワクチンの機序を知る目的で、MDVのT細胞サブセットに対する感染性の相違を解析し、腫瘍原性MDV1に対するMDワクチンの影響を検討した。さらにMDV各株間でみられた感染性の相違を解析するため、他のヘルペスウイルスなどの受容体として知られているヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）をMDVが利用している可能性についてヘパリンを用いて検討した。また、弱毒及び腫瘍原性MDV1株間で生じている感染性や腫瘍原性の違いについて、MDVゲノム中で腫瘍化に重要と考えられている*meq*遺伝子領域における両株間の相違を検討した。

T細胞サブセットにおけるMDV1腫瘍原性株Md5の増殖に対して、ワクチン株であるCVI988（MDV1）やSB-1（MDV2）の接種による影響と、CVI988、SB-1及びMd5株間のT細胞サブセットへの指向性の相違を検討した。Md5株の接種群ではCD8⁺よりCD4⁺T細胞サブセットから高力価のウイルスが分離された。しかし、CVI988株あるいはSB-1株をワクチン接種後、腫瘍原性MDVで攻撃した鶏ではいずれのT細胞サブセットからもワクチン非接種鶏に比べて分離ウイルス量は有意に低下していた。このことは血清型に関係なくワクチン接種により腫瘍原性MDVの感染がCD4⁺、CD8⁺いずれのT細胞サブセットにおいても抑制されていることを示している。また、CVI988、SB-1及びMd5株接種鶏のT細胞サブセットからのウイルス分離を検討した結果、Md5株接種群ではCD4⁺T細胞から高力価のウイルスが、CVI988株接種群ではCD4⁺、CD8⁺T細胞いずれからも同程度の力価のウイルスが分離された。しかし、SB-1株接種群ではいずれのT細胞サブセットからもウイルスは分離されなかった。CVI988株とSB-1株間での細胞指向性の相違はこれらのワクチンがそれぞれ異なった機構で作用する可能性を示している。

Md5 株、CVI988 株および SB-1 株間での T 細胞サブセットへの感染性が異なることが判明したが、MDV は細胞随伴性が強く未だに MDV の細胞受容体は同定されていない。そこで感染細胞から超音波処理により作製した細胞遊離型 MDV を用いて、細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンと類似構造を有するヘパリンによる感染抑制能を検討した。ヘパリン存在下では、細胞遊離型 MDV によるプラーク形成が濃度依存的に抑制された。また、予め細胞をヘパリナーゼ処理した時にも、部分的なプラーク形成の抑制が認められた。これらの結果は、他のヘルペスウイルスと同様に、細胞遊離型 MDV は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンを受容体として利用していることを示している。

Md5 株及び CVI988 株はともに腫瘍化の標的細胞である CD4⁺ T 細胞へ感染力があり、また細胞遊離型では同じ受容体を利用していたが、両株間における腫瘍原性の相違がどのような因子によって決定されるかは解明されていない。そこで、MDV1 特異的タンパクをコードし、腫瘍化に重要と考えられている *meq* 遺伝子の構造について、両株間で比較検討した。その結果、Md5 株では既に報告されている *meq* 遺伝子のみが検出されたが、弱毒の CVI988 株では、*meq* 遺伝子と共に、178 bp の塩基が挿入された新しい *meq* 遺伝子が検出された。また、この新しい *meq* 遺伝子では塩基挿入によってフレームシフトが起こっていることが示された。このような *meq* 遺伝子の変化が CVI988 株の弱毒化と腫瘍原性の消失に関係していることが示唆された。

本研究の成績から、MDV1 株間あるいは血清型間で T 細胞に対する感染性に違いがあり、ワクチン接種によって腫瘍原性株の T 細胞サブセットへの感染が抑制されることが判った。さらにこのような腫瘍原性株と弱毒株との相違に、*meq* 遺伝子構造の変化が関わっている可能性が示唆された。また細胞遊離型 MDV では細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンを受容体として利用していると考えられたが、生体内でのウイルス受容体に関しては不明である。本研究において明らかにされた細胞指向性の相違、受容体ならびに発癌遺伝子の相違は MDV による腫瘍化ならびにワクチン機序の解明に重要な知見を提供している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 助 教 授 杉 本 千 尋
副 査 助 教 授 岡 崎 克 則

学 位 論 文 題 名

Differences in Infectivities and Genomic Structures between Oncogenic and Non-oncogenic Marek's Disease Viruses

(腫瘍原性および弱毒マレック病ウイルスの遺伝子構造と
感染性の相違に関する研究)

マレック病 (MD) は、マレック病ウイルス (MDV) の感染によって起こる鶏の悪性リンパ腫症である。MDV は、その病原性や抗原性の違いから MDV1~3 の 3 血清型に分けられている。弱毒 MDV1 ならびに MDV2 や 3 は MD ワクチンとして用いられている。本研究では、腫瘍化の分子機構ならびにワクチンの機序を知る目的で、MDV の T 細胞サブセットに対する感染性の相違、ウイルス受容体の相違ならびに MDV ゲノム中で腫瘍化に重要と考えられている *meq* 遺伝子領域の相違を検討した。

まず MDV1 腫瘍原性株 Md5 の増殖に対して、ワクチン株である CVI988 (MDV1) や SB-1 (MDV2) の接種による影響と、CVI988、SB-1 及び Md5 株間の T 細胞サブセットへの指向性の相違を検討した。ワクチン接種後、Md5 で攻撃した鶏ではいずれの T 細胞サブセットでもワクチン非接種鶏に比べて分離ウイルス量は有意に低下していた。このことはワクチン接種により Md5 の感染が CD4⁺、CD8⁺いずれの T 細胞サブセットにおいても抑制されることを示している。ウイルスを単独感染させた場合、Md5 株接種群では CD4⁺T 細胞から高力価のウイルスが、CVI988 株接種群では CD4⁺、CD8⁺T 細胞いずれからも同程度の力価のウイルスが分離されたが、SB-1 株接種群ではいずれの T 細胞サブセットからもウイルスは分離されなかった。

MDV は細胞随伴性が強く未だに MDV の細胞受容体は同定されていない。そこで細胞遊離型 MDV を用いて、細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンと類似構造を有するヘパリンの感染抑制能を検討した。ヘパリン存在下では、細胞遊離型 MDV によるプラーク形成が濃度依存的に抑制された。ヘパリナーゼ処理した時にも、部分的なプラーク形成の抑制が認められた。これらの結果は、細胞遊離型 MDV は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンを細胞受容体として利用していることを示唆している。

最後に MDV1 特異的タンパクをコードし、腫瘍化に重要と考えられている *meq* 遺伝子の構造について比較検討した。その結果、Md5 株では *meq* 遺伝子のみが検出されたが、弱毒の CVI988 株では、*meq* 遺伝子と共に、178 bp の塩基が挿入された新しい *meq* 遺伝子が検出された。このような *meq* 遺伝子の変

化が CVI988 株の弱毒化と腫瘍原性の消失に関係していることが示唆された。

本研究の成績から、MDV1 株間あるいは血清型間で T 細胞に対する感染性に違いがあり、ワクチン接種によって腫瘍原性株の T 細胞サブセットへの感染が抑制されることならびに腫瘍原性株と弱毒株間での *meq* 遺伝子構造の変化が明らかとなった。本研究は MDV による腫瘍化ならびにワクチン機序の解明に重要な知見を提供している。よって、審査員一同は李成一氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格が十分であると認めた。