

|            |   |
|------------|---|
| 氏名(国籍)     | PAGAMJAV, Ochir (モンゴル国)   |
| 学位の種類      | 博士(獣医)  |
| 学位記番号      | 獣医博甲第181号   |
| 学位授与年月日    | 平成17年3月14日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当  |
| 研究科及び専攻    | 連合獣医学研究科<br>獣医学専攻   |
| 研究指導を受けた大学 | 岐阜大学  |
| 学位論文題目     | Studies on Molecular Biological Characteristics<br>and Pathogenicity of Equine Herpesvirus 1<br>Isolated from Horse, Cattle and Wild Animals<br>(ウマ、ウシおよび野生動物由来ウマヘルペスウイルス<br>1型の分子生物学的特性および病原性に関する研究) |
| 審査委員       | 主査 岐阜大学 教授 福士 秀人<br>副査 帯広畜産大学 教授 五十嵐 郁男<br>副査 岩手大学 教授 品川 邦汎<br>副査 東京農工大学 教授 本多 英一<br>副査 岐阜大学 教授 源 宣之  |

### 論文の内容の要旨

ウマヘルペスウイルス1型および4型(EHV-1およびEHV-4)は、ヘルペスウイルス科、アルファヘルペスウイルス亜科のウイルスである。EHV-1およびEHV-4はそれぞれ馬における流産並びに呼吸器病の主な病原体である。EHV-1は時として神経疾患を引き起こす。EHV-1は150kbpの直鎖状2本鎖DNAを有し、長いユニーク領域(UL)および倒置反復配列(IR/TR)で挟まれた短いユニーク領域(US)からなる。EHV-1は80の遺伝子を有する。EHV-4もEHV-1と同様に145kbpの直鎖状2本鎖DNAからなる。EHV-4は79の遺伝子を有する。

ヘルペスウイルス粒子はコア、カプシド、テグメントおよびエンベロープという4構造からなり、テグメントタンパク質はカプシドとエンベロープの間に存在する。オープンリーディングフレーム(ORF)13および14はEHV-1の主要なテグメントタンパク質をコードしている。

EHV-1の分子疫学に制限酵素DNAフィンガープリンティングが用いられてきた。EHV-1は16の電気泳動型が知られているが、EHV-1 PおよびEHV-1 Bが最近の主な型である。EHV-1 PはIRおよびTR領域にそれぞれ2つのBamHI部位を持ち、EHV-1 Bは1つの部位を持っている。この他にはウイルス学的及び病原学的な相違は知られていない。ヘルペスウイルスの多くは宿主特異的である。しかしながら、時折、馬以外の動物からもEHV-1が分離され、

EHV-1は馬産業に多大な経済的な被害をもたらす。したがって、馬、牛および野生動物から分離されるEHV-1の分子生物学的な特性や病原性を解明することは重要である。

そこで、本研究では、以下の目的で研究を行った。

- 1) EHV-1のテグメントタンパク質ORF13およびORF14の解析
- 2) EHV-1 PおよびB型間の分子生物学的相違に関する解析
- 3) 牛から分離されたEHV-1の分子生物学的解析
- 4) 南アフリカの野生動物におけるヘルペスウイルスDNAポリメラーゼ遺伝子の検出

第一章においてはテグメントタンパク質の病原性発現における役割を明らかにするためORF13またはORF14内に緑色蛍光タンパク質遺伝子 (GFP) 発現カセットを挿入し、組換え体をそれぞれ構築した。一段階増殖実験において、ORF13組換え体ウイルス増殖能は、野生株および復帰株よりも低かった。ORF13組換え体およびORF14組換え体ウイルスのプラークサイズは、野生株および復帰株よりも著しく小さかった。また、ORF13組換え体ウイルスのハムスターにおける病原性は、野生株および復帰株よりも弱かった。これらの成果から、ORF13およびORF14産物が、in vivoおよびin vitroにおけるウイルスの増殖に関与している可能性が示された。

第二章においてEHV-1 PおよびB株の分子生物学的な違いを明らかにするため、LA-PCR-RFLP解析を行った。制限酵素部位の相違が、infected cell protein 4 (ICP4) をコードするORF64とその下流に認められた。塩基配列解析からEHV-1 BのICP4遺伝子の下流と3'末は、EHV-4の相同な領域と置き換わっていることが分かった。EHV-1 P 11分離株を接種したハムスターは、神経病原性を示した。他のEHV-1 P 4分離株およびEHV-1 B 全9分離株を接種したハムスターは、どんな異常も示さなかった。この結果から、EHV-1 Bは、EHV-1 PとEHV-4の間で自然に起こった組換え体であることが示唆された。これは、自然界でのアルファヘルペスウイルスの種間組換えの最初の証拠である。

第三章では牛から分離された5株のEHV-1、BH1247、3M20-3、G118、G1753および9BSV4の病原性と分子生物学的特徴をLA-PCR-RFLP法により解析した。牛分離株は、株間で長さ制限酵素部位の変異が認められた。変異部位は、ORF2、ORF24、ORF36、ORF57、ORF62とORF63の間の遺伝子をコードしていない領域、ORF64、およびORF70に認められた。G118と3M20-3の二つの分離株は、遺伝子型がEHV-1 Pと同定された。G1753の変異は、ICP4をコードしているORF64とその下流で、遺伝子型EHV-1 Bと同定された。BH1247と9BSV4分離株は、EHV-1の他の遺伝子型と考えられた。BH1247、3M20-3、G118および9BSV4分離株を接種したハムスターは、神経症状が認められた。G1753分離株を接種したハムスターは、まったく神経症状を示さなかった。EHV-1は牛に感染する能力を持ち、検索したEHV-1は馬から牛へ自然に伝播したと考えられた。

第四章ではヘルペスウイルスDNAのDNAポリメラーゼ領域の増幅によりヘルペスウイルスを検出した。インパラ22検体とスプリングボック2検体からヘルペスウイルスDNAポリメラーゼ領域が検出された。インパラから検出されたDNA塩基配列はすべて同一だった。2つのスプリングボック検体からのDNA塩基配列は異なっていた。この3つのタイプの塩基配列は、ガンマヘルペスウイルスの相当する遺伝子と親密な関係を示した。今回の調査は、インパラおよびスプリングボックが彼ら自身のガンマヘルペスウイルスを持っているかもしれないことを示唆した。

これらの知見は以下のようにまとめられる。

1. ORF13 遺伝子は、ハムスターにおける病原性と培養細胞でのウイルス複製において、何らかの役割を担っている。
2. EHV-1 B は、EHV-1 P と EHV-4 の間で自然に生じた組換え体である。
3. 馬 EHV-1 は、牛に感染する能力を持っている。
4. インパラやスプリングボックから新しいヘルペスウイルスの遺伝子が検出された。

本研究では、EHV-1 が馬だけでなく、馬以外の動物にも感染することを示した。また、自然界での種間組換え体が、優勢ウイルス種の一つとして馬群の間に広がることができたことを明らかにした。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文はウマヘルペスウイルスの病原性ならびに野生動物におけるヘルペスウイルスの感染状況について分子生物学的に研究した成果を取りまとめたものである。

第一章において、ウマヘルペスウイルス 1 型のテグメントタンパク質が病原性発現において担っている役割を明らかにしようとした。ウマヘルペスウイルス 1 型遺伝子 ORF13 または ORF14 組換え体をそれぞれ構築した。一段階増殖実験において、ORF13 組換え体ウイルス増殖能は、野生株および復帰株よりも低かった。ORF13 組換え体および ORF14 組換え体ウイルスのプラークサイズは、野生株および復帰株よりも著しく小さかった。また、ORF13 組換え体ウイルスのハムスターにおける病原性は、野生株および復帰株よりも弱かった。これらの成果から、ORF13 および ORF14 産物が、in vivo および in vitro におけるウイルスの増殖に関与している可能性が示された。

第二章において EHV-1 P および B 株の分子生物学的な違いを明らかにするため、LA-PCR-RFLP 解析を行った。制限酵素部位の相違が、infected cell protein 4 (ICP4) をコードする ORF64 とその下流に認められた。塩基配列解析から EHV-1 B の ICP4 遺伝子下流と 3'末は、EHV-4 の相同な領域と置き換わっていることが分かった。この結果から、EHV-1 B は、EHV-1 P と EHV-4 の間で自然に起こった組換え体であることが示唆された。これは、自然界でのアルファヘルペスウイルスの種間組換えの最初の証拠である。

第三章では牛から分離された 5 株の EHV-1 の病原性と分子生物学的特徴を解析した。牛分離株間の変異部位は 6 ORFs および 1 遺伝子間領域に認められた。2 分離株は遺伝子型 EHV-1 P と同定された。1 分離株は遺伝子型 EHV-1 B と同定された。ほかの 2 分離株は EHV-1 の他の遺伝子型と考えられた。5 分離株中 4 株にハムスターに対する神経病原性が認められた。1 B 型と同定された分離株はまったく病原性がみられなかった。検索した EHV-1 は馬から牛へ自然に伝播したと考えられた。

第四章では野生動物の全血 DNA からヘルペスウイルスを検出した。インパラ 22 検体とスプリングボック 2 検体からヘルペスウイルス DNA ポリメラーゼ領域が検出された。インパラから検出された DNA 塩基配列はすべて同一だった。2つのスプリングボック検体からの DNA 塩基配列は異なっていた。この3つのタイプの塩基配列は、ガンマヘルペスウイルスの相当する遺伝子と親密な関係を示した。今回の調査は、インパラおよびスプリングボックが彼ら自身のガンマヘルペスウイルスを保有している可能性を示唆した。

本研究結果から、EHV-1 が馬だけでなく、馬以外の動物にも感染することを示した。また、自然界での種間組換え体が、優勢ウイルス種の一つとして馬群の間に広がることのできたことを明らかにした。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目： Natural recombinant between equine herpesviruses 1 and 4 in the ICP4 gene  
著 者 名： Pagamjav, O., Sakata, T., Matsumura, T., Yamaguchi, T., and Fukushi, H.  
学術雑誌名： Microbiology and Immunology  
巻・号・頁・発行年：印刷中, 2005

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目： Cross reaction of recombinant equine infectious anemia virus antigen to heterologous strains and application for serological survey among horses in the field  
著 者 名： Sentsui, H., Inoshima, Y., Murakami, K., Akashi, H., Purevtseren, B., Pagmajav, O. and Sugiura, T.  
学術雑誌名： Microbiology and Immunology  
巻・号・頁・発行年： 45(1): 45-50, 2001
- 2) 題 目： Growth and virulence alterations of equine herpesvirus 1 by insertion of a green fluorescent protein gene in the intergenic region between ORFs 62 and 63  
著 者 名： Ibrahim, E-S.M., Pagmajav, O., Yamaguchi, T., Matsumura, T. and Fukushi, H.  
学術雑誌名： Microbiology and Immunology  
巻・号・頁・発行年： 48(11): 831-842, 2004