

氏名（本（国）籍）	Mi Htay Htay Yu（ミャンマー連邦）
主指導教員名	岐阜大学 教授 福士秀人
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博甲第329号
学位授与年月日	平成23年3月14日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 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 the Pathogenicity of Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) and Viral Genes related to the Virulent Factor of EHV-1 (ウマヘルペスウイルス1型の病原性および毒力関連遺伝子に関する研究)
審査委員	主査 岐阜大学 教授 石黒直隆 副査 帯広畜産大学 教授 猪熊 壽 副査 岩手大学 教授 原澤 亮 副査 東京農工大学 教授 本多 英一 副査 岐阜大学 教授 福士秀人

論文の内容の要旨

ウマヘルペスウイルス1型 (EHV-1) は、馬に呼吸器疾患、流産、新生子馬の死亡およびウマヘルペスウイルス脊髄脳症 (Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy, EHM) を引き起こし、馬産業に重要な経済的損失を招く重要な病原体である。EHM の発生件数は、ヨーロッパおよびアメリカ合衆国で 2000 年以降著しく増加している。日本では、流行性呼吸器疾患と関連した EHM が 1989 年に栗東トレーニングセンターで競馬に初めて発生した。また、流行性流産と関連した EHM が 2001 年および 2010 年に北海道で発生した。近年、多くのワクチンが EHV-1 防除のため用いられている。しかし、EHV-1 感染防御に対してワクチンの有効性は十分ではない。有効なワクチンの開発には EHV-1 の病原性解明がひとつであるが、病原性解明は不十分である。さらに、ほとんどの EHV-1 の遺伝子の機能とウイルス病原性におけるそれらの役割はまだ明らかになっていない。

近年、細菌性人工染色体 (BAC) システムを EHV-1 に適用することにより大腸菌を利用した EHV-1 ゲノムの迅速かつ効果的な改変が可能になっている。そこで、本研究では日本で流行している EHV-1 株の病原性をマウスモデルで評価するとともに、BAC システムを基盤として ORF 13 (EUL47)、ORF63 (EICP0) の機能、ORF 63 (A416V) 点突然変異、およびこれらの遺伝子が EHV-1 の病原性発現に果たす役割を研究した。

第一章では、CBA マウスモデルを用いて日本の EHV-1 株の病原性を調べた。CBA マウスは BALB/c より EHV-1 感染に対して感受性が高く、EHV-1 の神経病原性の研究のモデルとして用いられてきた。EHV-1 日本株 8 株 (89c1, 90c16, 90c18, 97c11, 98c12, 00c19, 01c1

and HH-1)およびイギリス株(Ab4p)を CBA マウスに鼻腔内接種した。感染初期に EHV-1 感染マウスの肺から感染性ウィルスが再分離された。89c1 株以外の日本株はマウスに臨床症状を誘導しなかった。しかし、感染マウスで臨床症状を示さなかったいくつかの株 (89c1, 90c18, 97c11, 98c12, 01c1) において、脳炎あるいは髄膜脳炎病変が観察された。一方、間質性肺炎はすべての感染マウスの肺に認められた。これらの結果から、CBA マウスにおける EHV-1 野外株の病原性は株により異なると考えられた。

第二章では、EHV-1 の ORF13 の機能を *in vitro* および *in vivo* で解析した。EHV-1 の ORF13 によりコードされる EUL47 はヒトヘルペスウイルス 1 型 UL47 の相同遺伝子で、ウィルスゲノムの主要な成分を構成する。BAC および Red/ET recombination 技術を用い、EHV-1 Ab4p 株から ORF13 欠損株と復帰変異株 (Ab4pattB Δ 13, Ab4pattB13R) を作製した。培養細胞における ORF13 欠損変異株 Ab4pattB Δ 13 の力価は減少していた。欠損変異株 Ab4pattB Δ 13 のプラークサイズは復帰変異株 Ab4pattB13R および親株 Ab4pattB の 1/2 であった。ORF13 の欠損は、検索した全遺伝子の転写と二次エンベロープ産生過程に影響していた。欠損変異株感染ハムスターでは、臨床症状が 1 日遅れて出現した。これらの結果から、EHV-1 の ORF13 は培養細胞におけるウィルス増殖に必須ではないが、ウィルスの効率的な複製および形態形成に必要であり、ハムスターモデルにおける EHV-1 の病原性因子であることが示された。

第三章では、ORF63 (EICP0) の機能と感染細胞における EICP0 (A416V) の点突然変異、およびこれらの遺伝子が EHV-1 の病原性において果たす役割について調べた。EHV-1 の EICP0 は ICP0 の相同遺伝子で、調節タンパク質である。一方、神経病原性の Ab4p 株と非神経病原性の 00c19 株の EICP0 遺伝子で、異なるアミノ酸が認められた。Ab4p 株の EICP0 はアミノ酸位置 416 がアラニンであるが、00c19 株の EICP0 はバリンだった。そこで、BAC 技術と Red/ET recombination 技術を用い、Ab4p-EICP0 を 00c19-EICP0 で置換することにより Ab4p の EICP0 変異株 (Ab4pattBc1963) を作製した。また、EICP0 欠損 Ab4p 株 (Ab4pattB Δ 63) および EICP0 復帰変異株 (Ab4pattB63R) を BAC 技術と Red/ET recombination 技術を用いて作製した。

EICP0 欠損ウィルスゲノム DNA を細胞にトランスフェクションすることにより、感染性 EICP0 欠損変異株を作製した。EICP0 欠損変異株の力価とプラークサイズは復帰変異株と親株のものよりそれぞれ 10 倍および 2.6 倍減少していた。さらに、この欠損変異株はマウスに臨床症状を誘導しなかったが、感染性ウィルスはマウスの肺から再分離された。これらの結果から、Ab4p 株の EICP0 遺伝子はウィルスの再構成に必須ではないが、ウィルスの複製には必要であり、EHV-1 の神経病原性因子と関係していることが示唆された。

Ab4pattBc1963 株の力価とプラークサイズは復帰変異株および親株のものと有意な差がなかった。接種 2 時間後の Ab4pattBc1963 株の ORF63, 30, 65 の転写は復帰変異株および親株のものより有意に減少しており、00c19 株の転写と同等だった。Ab4pattBc1963 株はマウスに臨床症状を誘導しなかった。一方、ウィルス再分離、PCR および組織病理学的解析の結果から、マウスの感染は確認された。したがって、EICP0 (A416V) の変異は培養細胞内でのウィルスの複製に必要ではないが、感染初期のウィルス遺伝子の mRNA 転写に影響があり、EHV-1 の神経病原性因子と関連があると考えられた。

本研究で得られた知見は、日本で流行している EHV-1 株の病原性についての理解を深めるものである。これらの株の大半は、神経病原性が低い。本研究は、他国、特にアメリカやイギリスと異なり日本では EHM 発生が報告されていないことを支持するものである。さらに、本研究はまた、効果的な生ワクチン開発を考慮するための EHV-1 の遺伝子の機能とそれらが病原性に役割を果たしているかどうかについての知識を支持するものである。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究はウマに呼吸器症状、流産および神経症状を引き起こし、世界の馬産業に重大な被害を及ぼしているウマヘルペスウイルス 1 型(EHV-1)の病原性発現機構および神経病原性に関与する毒力関連遺伝子を解析し、我が国で伝播している EHV-1 の病原性および毒力関連遺伝子の機能を解明したものである。

本論文は 3 章から構成されている。

第一章では、CBA マウスモデルを用いて日本の EHV-1 株の病原性を調べた。CBA マウスは BALB/c より EHV-1 感染に対して感受性が高く、EHV-1 の神経病原性の研究のモデルとして用いられている。EHV-1 日本株 8 株を CBA マウスに鼻腔内接種した。8 株中 1 株がマウスに神経症状を誘導した。しかし、感染マウスで臨床症状を引き起こさなかった株においても脳炎あるいは髄膜脳炎病変が観察された。間質性肺炎はすべての感染マウスの肺に認められた。これらの結果から、CBA マウスにおける EHV-1 野外株の病原性は株により異なると考えられた。

第二章では、EHV-1 の ORF13 の機能を *in vitro* および *in vivo* で解析した。BAC および Red/ET recombination 技術を用い、EHV-1 Ab4p 株から ORF13 欠損株と復帰変異株 (Ab4pattB Δ 13, Ab4pattB13R) を作製した。培養細胞における ORF13 欠損変異株 Ab4pattB Δ 13 の力価は減少していた。欠損変異株 Ab4pattB Δ 13 のプラークサイズは復帰変異株 Ab4pattB13R および親株 Ab4pattB の 1/2 であった。ORF13 の欠損は、ウイルス遺伝子の転写と二次エンベロープ被膜を低下させた。欠損変異株感染ハムスターでは、臨床症状が 1 日遅れて出現した。これらの結果から、EHV-1 の ORF13 は培養細胞におけるウイルス増殖に必須ではないが、ウイルスの効率的な複製および形態形成に必要であり、ハムスターモデルにおける EHV-1 の病原性因子であることが示された。

第三章では、ORF63 (EICP0) の機能と感染細胞における EICP0 (A416V) の点突然変異、およびこれらの遺伝子が EHV-1 の病原性において果たす役割について調べた。EHV-1 の EICP0 は ICP0 の相同遺伝子で、調節タンパク質である。神経病原性の Ab4p 株と非神経病原性の 00c19 株の EICP0 遺伝子ではアミノ酸位置 416 がそれぞれアラニンおよびバリンだった。そこで、Ab4p-EICP0 を 00c19-EICP0 で置換した Ab4p の EICP0 変異株 (Ab4pattBc1963), EICP0 欠損 Ab4p 株 (Ab4pattB Δ 63) および EICP0 復帰変異株 (Ab4pattB63R) を作製した。EICP0 欠損変異株の力価とプラークサイズは復帰変異株と親株のものより減少していた。この欠損変異株はマウスに臨床症状を誘導しなかった。Ab4pattBc1963 株の力価とプラークサイズは復帰変異株および親株と有意差がなかった。接種 2 時間後の Ab4pattBc1963 株の ORF63, 30, 65 の転写は復帰変異株および親株のものより有意に減少していた。Ab4pattBc1963 株はマウスに臨床症状を誘導しなかった。EICP0 (A416V) の変異は培養細胞内でのウイルスの複製に必要なではないが、感染初期のウイルス遺伝子の mRNA 転写に影響があり、EHV-1 の神経病原性因子と関連があると考えられた。

本研究で得られた知見は、日本で流行している EHV-1 株の病原性についての理解を深めるものである。これらの株の大半は、神経病原性が低い。本研究は、他国、特にアメリカやイギリスと異なり日本では EHM 発生が報告されていないことを支持するものである。さらに、本研究はまた、効果的な生ワクチン開発を考慮するための EHV-1 の遺伝子の機能とそれらが病原性に役割を果たしているかどうかについての知識を支持するものである。

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 : Diverse pathogenicity of equine herpesvirus 1 (EHV-1) isolates in CBA mouse model
著 者 名 : Yu, M. H., Kasem, S., Tsujimura, K., Matsumura, T., Yanai, T., Yamaguchi, T., Ohya, K. and Fukushi, H.
学 術 雑 誌 名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 72 (3): 301-306, 2010

既発表学術論文

- 1) 題 目 : The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model
著 者 名 : Kasem, S., Yu, M. H., Yamada, S., Kodaira, A., Matsumura, T., Tsujimura, K., Madbouly, H., Yamaguchi, T., Ohya, K. and Fukushi, H.
学 術 雑 誌 名 : Virology
巻・号・頁・発行年 : 400 (2): 259-270, 2010