

## 論文の内容の要旨

獣医学 専攻  
平成 14 年度博士課程 入学  
氏名：大屋 智香  
指導教員名：吉川 泰弘

### 論文題目

Molecular Epidemiological Studies on Herpes B Virus (*Cercopithecine herpesvirus 1*)  
Infection in Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*)

(カニクイザルにおける B ウイルス感染に関する分子疫学的研究)

B ウイルス (*Cercopithecine herpesvirus 1*) は、マカカ属サルを自然宿主とする  $\gamma$ -ヘルペスウイルスである。ウイルスは初感染後、三叉神経節 (TG) を含む脊髄知覚神経節において潜伏感染を起こし、宿主動物生涯にわたり持続感染する。潜伏ウイルスが様々な刺激により再活性化されると、宿主はウイルス潜伏知覚神経節支配領域の粘膜分泌液中に感染性ウイルスを排出することが知られている。マカカ属サルにおける B ウイルス感染は、通常不顕性感染、あるいは口腔領域の水疱、潰瘍形成といった軽症に終わる。一方、ヒトでは早期治療がなされなければ、上向性の脳脊髄炎によりその約 80% が死に至る。B ウイルスにおいて最も重要な点は、ヒトに致死的な感染を引き起こす点である。

しかし、B ウイルスが近縁ヘルペスウイルス (ヒト単純ヘルペスウイルス 1 型、2 型: HSV-1、-2) と免疫学的および遺伝子学的に高い類似性を持つこと、またウイルスの分離培養はヒトに対し感染の危険性を伴い、P3 以上の生物学的封じ込め施設が必要であることから B ウイルス感染の診断は困難であった。TG にウイルスを保有するマカカ属サルはウイルスの再活性化により唾液中に感染性ウイルスを排出する潜在的危険性を持ち、ウイルスに汚染された唾液はヒトへの重要な感染源である。さらに、カニクイザルは生物医学研究において広く用いられているマカカ属サルである。これらのことに鑑み、本研究では B ウイルスに特異的な分子生物学的診断法の確立および自然宿主であるカニクイザルにおける B ウイルス感染について調べることを目的とした。

本論文は以下の 3 章からなる。第 1 章では B ウイルス特異的な DNA 診断法の確立およ

びその有用性の検討を行い、第2章ではカニクイザル TG における B ウイルス感染状況を検索した。さらに第3章では、カニクイザル由来 B ウイルス検体について遺伝子解析にもとづく系統的解析を行った。

## 第1章 PCR-microplate hybridization法によるBウイルスゲノムの特異的検出および同定

B ウイルスゲノム US 領域内にプライマーを設計し、A から F の6領域について B ウイルス、HSV-1、HSV-2、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) およびサルサイトメガロウイルス (SCMV) 株 DNA を PCR により増幅した。6領域中 A、C および E 領域の3領域において、HSV-1、HSV-2、HCMV および SCMV と交差することなく B ウイルス DNA のみが特異的に増幅された。次に、B ウイルス分離株間で高い遺伝的多型性を示す領域の増幅産物を、PCR により作製されたプローブを用いた microplate hybridization 法により同定した。B ウイルス SMHV 株と E2490 株、および B ウイルス抗体陽性カニクイザル TG 抽出 DNA 由来の PCR 増幅産物が、B ウイルス DNA であると同定された。以上から本章において、B ウイルスの遺伝的多型領域遺伝子の検出および同定に対し、PCR-microplate hybridization 法が有用であることが示された。

## 第2章 カニクイザルTGにおけるBウイルス感染

B ウイルスに感染したサルの唾液を介したヒトへの B ウイルス伝播の危険性の観点から、抗体陽性カニクイザルの TG に着目し、TG における B ウイルスの保有状況およびその動態について検索した。

### 第1節 カニクイザル左右TGにおけるBウイルスゲノムの不均等な分布

第1章で有用性が示された PCR-microplate hybridization 法を用いて、臨床症状を示していない B ウイルス抗体陽性カニクイザルの左右 TG における B ウイルスの保有状況を調べた。B ウイルスゲノムは 30 頭中 12 頭 (40%) のカニクイザルの片側および両側 TG から検出された。12 頭中 5 頭においてはその両側 TG から、また残りの 7 頭では片側 TG のみから B ウイルスゲノムが検出された。本実験の結果から、B ウイルス抗体陽性カニクイザルがその TG に B ウイルスを保有する潜在的リスクは最大で 40% であること、およびウイルスはカニクイザルの片側あるいは両側 TG に不均等に分布することが示唆された。

### 第2節 カニクイザルTGにおける潜伏感染Bウイルスゲノムコピー数の定量

B ウイルス抗体陽性カニクイザルにおける B ウイルスの再活性化の有無を調べるために、抗体陽性カニクイザルの末梢血単核球 (PBMC) について B ウイルスゲノムの検出を試みた。さらに、定量 PCR-microplate hybridization 法によりカニクイザル左右 TG 中の B ウイルスゲノムコピー数を定量した。抗体陽性の 20 頭のカニクイザル全てにおいて、その PBMC が

らBウイルスゲノムは検出されなかった。また、各TGにおけるBウイルスゲノムコピー数は、TGあたり  $10^{4.8}$  から  $10^{6.6}$  コピーであった。また、本法の検出限界はTGあたり  $10^{3.6}$  コピー以下であった。これらの結果から、20頭の抗体陽性カニクイザルにおいてBウイルスの再活性化は起こり得ていないことが示唆された。さらに、Bウイルスが、カニクイザルTGにおいてTGあたり  $10^{4.8}$  から  $10^{6.6}$  コピーの範囲で潜伏感染していることが示唆された。片側あるいは両側TGでウイルスゲノム陽性の場合および性差について、そのTGにおけるウイルスゲノムコピー数に統計学的有意差は見られなかった。

### 第3章 カニクイザルTG由来Bウイルス検体の塩基配列解析

これまでに Smith らによって、Bウイルス分離株には宿主マカカ属サル種に関連した3つの遺伝子型が存在することが報告されている。さらに、Ohsawa らによっても日本国内のニホンザルが保有するBウイルスには、固有の遺伝子型が存在することが報告されている。

本章ではカニクイザルの片側あるいは両側TG由来の13検体のBウイルスについて、遺伝的多型を示すUS5の大部分とその3'側非翻訳遺伝子間領域の塩基配列の解析を行った。13検体の塩基配列の比較により、同一個体の左および右側TG由来Bウイルス検体の塩基配列はそれぞれ同一であること、および13検体が互いに近縁であることが示された。さらに、本章で決定されたカニクイザルTG由来検体の塩基配列とこれまでに報告されている4種のマカカ属サル由来Bウイルス分離株のそれを比較し、系統樹を作製した。カニクイザルTG由来検体は、カニクイザル由来E90-136およびSMHV株と同じ遺伝子型(Genotype 2)に分類された。また、カニクイザル由来Bウイルス間においても、本章で調べられた13検体と先に報告された2株の間にはわずかな遺伝的距離があることが示された。したがって、Bウイルス遺伝子に見られたウイルス由来マカカ属サル種に関連した遺伝的差異は、Smithらによる先の報告を支持する結果であった。さらに本研究によって、カニクイザル由来分離株間にカニクイザル個体群の地理的分離に起因する遺伝的差異が存在する可能性が示唆された。

上記の結果より、PCR-microplate hybridization法が臨床検体におけるBウイルス感染の診断に有用であることが示された。さらに、これらの研究結果はBウイルス抗体陽性カニクイザルからヒトへのウイルス伝播リスクの解析、SPFマカカ属サル群の確立および自然宿主におけるBウイルス感染のさらなる研究に寄与することが期待される。