

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 アザブ・ワリド・アブドラ・フィクリィ・アブドラ・モハマド

馬ヘルペスウイルス 4 型 (EHV-4) は、世界中で馬の呼吸器病の主要な原因となっており、発病期間中トレーニングが出来ないため競走馬産業に大きな被害を与えている。EHV-4 感染は、臨床的に馬ヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) 感染による呼吸器病と区別が付かず問題視される。

EHV-1 と EHV-4 は感受性培養細胞域が異なり、EHV-1 が馬、牛、ウサギ、ハムスター、マウス、サル、豚、猫など、多種類の動物由来細胞で増殖するのに対し、EHV-4 は主に馬の細胞でのみ増殖する。EHV-4 の分離、増殖には、初代馬胎子腎 (FHK) 細胞が使用されてきた。しかし、初代培養細胞の作製には時間もかかり、困難な点が多い。さらに、EHV-1 がハムスターに感染するのに対し、EHV-4 には小動物の実験感染モデルが存在しない。これらの点から、ウイルス蛋白の機能解析や病原性発現メカニズムの解析のためには、変異ウイルスの作製が大きな役割を果たす。

ヘルペスウイルスのゲノムは大きいため、その取扱は容易でない。近年、いくつかのヘルペスウイルスゲノムが BAC (bacterial artificial chromosome) 組換え系を用いてクローニングされた。この方法はヘルペスウイルスゲノムを大腸菌に保持させることによって、容易に維持、改変を行うことが可能である。

第 1 章では、EHV-4 TH20p 株のゲノムを、BAC を保有するプラスミドにクローニングすることに成功した。組込み部位は、ウイルス遺伝子 58 と 59 の中間領域である。大腸菌にトランスフェクトされた EHV-4 BAC は大腸菌内で安定的に維持された。EHV-4 BAC DNA を導入された FHK 細胞において、ウイルス粒子の産生が確認された。また、Cre 蛋白を発現する組換えアデノウイルスと共感染させることで、BAC を除去した組換えウイルスが得られた。これらの組換えウイルスは、親株と同様の増殖性を示した。従って、EHV-4 のゲノムを世界で初めて BAC 化することによって、容易に変異ウイルスを得ることが可能となった。

第 2 章では、第 1 章で作製した BAC 化 EHV-4 ゲノムのチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子

を欠損させた変異ウイルスを作出した。この変異ウイルスと親株を用いて、抗ヘルペスウイルス剤として使用されているアシクロビル (ACV) とガンシクロビル (GCV) のウイルスに対する影響を見た。EHV-1 は両薬剤に対し感受性であることが報告されているが、EHV-4 は GCV には感受性を示したのに対し、ACV には抵抗性であった。しかし、EHV-1 の TK を発現した細胞中では ACV はリン酸化され、EHV-4 に対しても効果を示した。従って、EHV-4 の TK は ACV をリン酸化出来ないため、ACV に耐性を示すことが明らかとなった。

第 3 章では、糖蛋白 C (gC) を欠損させた EHV-4 変異体を作製し、EHV-4 感染における gC の役割を検討した。gC 欠損 EHV-4 は親株と比較して、ウイルス増殖の程度は変わらないが、プラックサイズが約 12%減少した。また、他のヘルペスウイルスで gC が結合することが知られているヘパラン硫酸の 1 種であるヘパリン処理細胞では、変異株および親株とも結合が低下した。さらに、細胞をヘパリン分解酵素で処理したり、グリコサミノグリカン合成阻害剤を投与した場合でも、ウイルス吸着の低下とプラック数の減少が認められた。これらの結果は、他のヘルペスウイルスと同様、EHV-4 gC もヘパラン硫酸と結合することを示している。また、ウイルスの感染には gC のヘパラン硫酸への結合のみでなく、他のウイルス因子のヘパラン硫酸に対する結合が関与していることを示唆している。

以上本論文は、今までウイルス増殖を可能とする培養細胞が限られており、実験動物の系も無い EHV-4 の研究を進展させる目的で、ウイルスゲノムの BAC 化を行い、チミジンキナーゼ遺伝子やウイルス糖蛋白 C を欠損させることにより、ウイルス性状の検討を行ったもので、馬ヘルペスウイルス感染症の制御に大きく貢献するものである。よって、審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) 論文として価値あるものと認めた。