

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 HASSAN YOUSSEF ABDEL HAMID MAHMOUD

題 目 : Studies on Glycoproteins of Equine Herpesviruses  
馬ヘルペスウイルスの糖蛋白に関する研究

論文要旨 :

Equine herpesvirus (EHV)-1 causes respiratory disorder, neonatal foal disease, abortion and neurological disorders and is one of the most serious pathogens in horses. EHV-4 also causes respiratory diseases in foals. Both viruses are known as the causative agent of equine rhinopneumonitis and induce economic loss in horse industry. In the last 50 years, many attempts have been made to immunize horses against both EHV-1 and EHV-4. However, currently available vaccines can reduce only clinical symptom, but not perfectly protect horses from diseases induced by EHV-1 and EHV-4 infections. In other herpesviruses, glycoproteins on their envelope are known as candidates for vaccine. In my PhD course, glycoproteins of EHV-1 and EHV-4 were expressed in vitro and characterized by our established monoclonal antibodies (MAbs). In addition, the availability of ELISA for detection of antibody to gE was examined using other herpesvirus.

## **Chapter 1. Characterization of glycoproteins in EHV-1**

In this chapter, I attempted to express twelve glycoproteins of EHV-1 in 293T cells, and to characterize these using MAbs and horse sera against EHV-1. Expression of glycoprotein B (gB), gC, gD, gG, gI and gp2 was recognized by immunoblot analysis using horse sera, but that of gE, gH, gK, gL, gM and gN was not. Four MAbs recognized gB, four recognized gC and one recognized gp2. Two MAbs against gB cross-reacted with EHV-4. Interestingly, coexpression of gE and gI and gM and gN enhanced their antigenicity. Furthermore, immunoblot analysis of gp2 showed that different molecular masses of gp2 were recognized by the MAb against gp2 and horse sera against EHV-1. In this study, it was demonstrated that at least six glycoproteins were immunogenic to horses and coexpression of gE and gI and gM and gN was important for enhancement of antigenicity.

## **Chapter 2. Characterization of glycoproteins in EHV-4**

In this chapter, eleven glycoproteins in EHV-4 were expressed in 293T cells and eight MAbs to EHV-4 were developed. One MAb recognized gB4, one did gC4 and the other six did unknown proteins.

(別紙様式第 3 号)

Only three glycoproteins, gB4, gD4 and gG4, expressed in 293T cells reacted with sera from EHV-4-infected foals, indicating that these three glycoproteins were immunogenic to horses. However, the other eight glycoproteins were not recognized by horse sera, suggesting that *in vitro* expression of EHV-4 glycoproteins might be not efficient for recognition by horse sera.

### **Chapter 3. Pseudorabies virus infection in wild boars in Japan**

Pseudorabies virus (PRV) is the next candidate for eradication from Japanese swine industry. To eradicate PRV, the attenuated live vaccine, PRV with a deletion in gE gene, is available and the ELISA to detect antibody to PRV gE is used to serologically differentiate between wild type PRV infection and vaccination. In horses, a live EHV-1 with deletion in gE gene is developed as a vaccine and ELISA for detection of antibody to EHV-1 gE is also established to distinguish between wild EHV-1 infection and vaccine inoculation. In this study, the availability of ELISA to detect antibody to PRV gE was examined by using sera from wild bores (*Sus scrofa leucomystax*).

In Japan, most pig populations are now free from PRV due to the recent success of an extensive eradication program. However, PRV infection persists in Japanese wild boars, representing another potential reservoir for the virus in Japan. In this study, the seroprevalence of PRV in wild boars captured in three different regions was ascertained. The virus-neutralization (VN) test showed that 6 of 173 (3%) were positive for VN antibody; glycoprotein E-ELISA revealed infection with the wild-type, but not the available vaccine strain, PRV. These results indicate that PRV has continued to spread among wild boars in Japan and confirm that ELISA to detect antibody to gE is available in the field.

### **Conclusion**

In these PhD studies, there are some novel findings.

1. EHV-1 gI plays an important role in expression of EHV-1 gE.
2. Immunogenicity of EHV-4 glycoproteins seems to be different from that of EHV-1 glycoproteins.

These novel findings, expression plasmids and MAbs should be available for understanding of pathogenicity and developing of effective vaccine and diagnostic method.

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Hassan Youssef Abdelhamid Mahmoud
審査委員	主 査： 山口大学 教授 前田 健
	副 査： 山口大学 教授 岩田 祐之
	副 査： 鳥取大学 教授 伊藤 壽啓
	副 査： 山口大学 教授 森本 将弘
	副 査： 山口大学 教授 度会 雅久
題 目	Studies on Glycoproteins of Equine Herpesviruses 馬ヘルペスウイルスの糖蛋白に関する研究
審査結果の要旨：  馬ヘルペスウイルス(EHV)は馬に呼吸器症状のみならず脳炎や流産を引き起こす馬の最重要感染症のひとつである。エンベロープ上に存在する EHV の糖蛋白は細胞への感染に重要な役割を担っているばかりではなく、免疫の主要な標的となり、ワクチンの開発や診断法の開発の候補となっている。糖蛋白を詳細に解析することは、EHV の病態解析やワクチンおよび診断法の開発に結びつくと考えられる。本論文の 1 章では、馬ヘルペスウイルス 1 型(EHV-1)の糖蛋白の性状を解析し、2 章では、EHV-4 の糖蛋白の性状を解析し、3 章では、ヘルペスウイルスの糖蛋白 gE を用いた疫学的解析を実施した。その結果、糖蛋白の性状に関する幾つかの新らたな知見を見出すとともに、今後の診断や予防に役立つ成果を出した。  第 1 章では、EHV-1 が発現する 12 種類の糖蛋白をコードする遺伝子をクローニングし、塩基配列を解析した。更に、12 種類の糖蛋白を発現するための発現プラスミドを構築し、細胞培養系での発現解析を行った。また、EHV-1 に対する 14 種類の単クローナル抗体も作製した。その結果、糖蛋白 gp2, gB, gC, gD, gG, gI は単独発現でも EHV-1 感染馬血清から認識される抗原性の強い蛋白であるのに対して、糖蛋白 gE, gH, gK, gL, gM, gN は単独発現では認識されなかった。しかし、単独発現では EHV-1 感染馬血清で認識されない gE や gM が、gE は gI と、gM は gN と共発現することにより、認識されるようになった。gM は gN との共発現により、発現が促進されることはすでに報告されているが、gE が gI との共発現により発現促進され、かつ強い抗原性を持つことは初めての報告である。更に、14 種類の作製した単クローナル抗体のうち、ウイルス中和活性を有するものは 4 種類あり、そ	

のすべてが gC を認識していた。gB を認識する単クローナル抗体は 4 種類存在し、そのうち 2 種類は EHV-4 と交差した。gp2 を認識する単クローナル抗体が 1 種類存在したが、残りの 5 種類の単クローナル抗体の認識している抗原を同定することができなかった。興味深いことに、gp2 を認識する単クローナル抗体が認識する発現 gp2(分子量>250kDa)が、EHV-1 感染馬血清が認識する発現 gp2 の分子量と全く異なっていた。この結果から、gp2 には 2 種類の形態が存在することが判明した。更に、認識する蛋白が同定できなかった単クローナル抗体の 1 つが、gB, gH, gL の三種類の糖蛋白を同時に発現することにより、反応できることを発見した。3 種類の糖蛋白 gB, gH, gL によるエピトープの存在に関しては、ヘルペスウイルスに関して初めての報告であり、今後の展開が期待される。

第 2 章では、EHV-4 が発現する 12 種類の糖蛋白をコードする遺伝子をクローニングし、塩基配列を解析した。更に、糖蛋白 gp2 を除く 11 種類の糖蛋白を発現するための発現プラスミドを構築し、細胞培養系での発現解析を行った。また、EHV-4 に対する 8 種類の単クローナル抗体も作製した。それぞれの単独発現した糖蛋白はほとんど EHV-4 感染馬血清に認識されることがなく、糖蛋白 gG のみが強い反応を示すのみであった。また、糖蛋白 gG は細胞外に分泌されていることが確認された。単クローナル抗体のうち 2 種類がそれぞれ gB と gC を認識していることが確認できた。更に、興味深いことに 1 つの単クローナル抗体が gK, gH, gL の 3 種類の糖蛋白を共発現することにより反応することが確認された。

第 3 章では、EHV-1 の予防用ワクチンとして gE 遺伝子欠損ワクチンが開発され、実用化に向けて国内で進行中である。同様に、gE 遺伝子欠損ワクチンで国内での撲滅に成功しつつあるオーエスキー病ウイルスのスクリーニング法の有用性に関して、イノシシでの検討を行った。まず、豚でオーエスキー病が撲滅された県のイノシシに中和抗体陽性個体が存在していることが判明した。更に gE 検出用 ELISA を用いた検査の結果、すべての抗体陽性イノシシはオーエスキー病の野外株に感染していることが証明された。これらのことは、オーエスキー病が生産動物では制御されていても野生動物では制御されていないことが改めて確認されるとともに、gE 検出用 ELISA の有用性が改めて確認された。

以上の結果は、馬ヘルペスウイルスのみならずヘルペスウイルス全般に対して、幾つかの新たな知見を与えるものであり、特に、3 種類以上の糖蛋白の同時発現の重要性が証明されたことは極めて興味深い。また、本研究成果として、EHV-1 と EHV-4 に対する共通あるいは特異的単クローナル抗体 22 種類、及び EHV-1 と EHV-4 のほぼすべての糖蛋白の発現プラスミド 23 種類は、今後の研究の発展に有用な材料を提供した。また、EHV-1 と EHV-4 の糖蛋白の抗原性が全く異なることを見出した本研究成果は、両ウイルスの病原性の違いを考える上でも、非常に価値が高い。

以上、本論文は、博士(獣医学)の学位論文として十分価値のある内容であることを認める。