

13 県内で検出された大きな欠損があるマレック病ウイルス

meq 遺伝子

中央家畜保健衛生所

○曾田 泰史

I はじめに

マレック病 (MD) はヘルペスウイルス科に属するマレック病ウイルス (MDV) によるウイルス性疾病であり、鶏の悪性リンパ腫を主徴とし、家畜伝染病予防法で届出伝染病に指定されている¹⁾。MD はワクチン接種によりコントロール可能な疾病であるが、近年、野外株の病原性が増強し、ワクチンブレイクした事例が報告されている²⁾。MDV の病原性には、癌遺伝子である MDV-*EcoRI*-Q (meq) 遺伝子及びそれがコードする癌蛋白質である Meq 蛋白質が関与することが知られている^{3, 4, 5, 6, 7)}。また、MDV はウイルス株の病原性に応じて meq 遺伝子の多型が存在し、遺伝子型に応じて病態形成が変化する^{2, 8)}。その中で、meq 遺伝子の一部が欠損すると S-meq MDV と呼ばれ、実験室内で継代されている MDV 株から検出されている⁹⁾。これまで MD 野外発症事例からの検出報告はなかったが、2010 年代に入り、国外では中東の野鶏、国内では香川県のシャモの MD 野外発症事例で S-meq MDV が検出されている^{10, 11)}。今回、県内で MD を発症したシャモ 1 羽から meq 遺伝子に一部欠損がある MDV が初めて検出されたので、その概要を報告する。

II 症例概要

愛玩用にシャモ 50 羽を飼養する養鶏家で、平成 28 年 8 月に約 150 日齢のシャモ 1 羽が起立不能と開口呼吸を呈して死亡したため、病性鑑定を実施した。当該農家では MD を含め、ワクチンを接種していなかった。

剖検時、肝臓及び脾臓が著しく腫大し、これら臓器と肺、腎臓に白斑が認められた。病理組織学的検査では、主要臓器において、T 細胞由来のリンパ球様腫瘍細胞の重度浸潤がみられたため、MD と診断した。その他、重度のコクシジウム寄生を伴う盲腸炎が認められ、鶏コクシジウム病と診断した。

III 材料と方法

1 材料

上記 1 羽の肝臓、脾臓及び腎臓を抗生物質添加済みイーグル培地 (日水製薬) に懸濁、10%臓器乳剤とした。これらを 4000 rpm で 5 分間遠心した上清から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出、遺伝子検査に供した。また、上記乳剤をセルス

トレーナー (100 μ m メッシュ) でろ過し、ウイルス分離に供した。

2 方法

(1) ウイルス遺伝子検査

上記遺伝子検査材料について MDV¹²⁾、鶏白血病ウイルス (ALV)¹³⁾ 及び細網内皮症ウイルス (REV)¹⁴⁾ の遺伝子検査を実施した。

(2) 遺伝子解析・推定アミノ酸配列分析

MDV meq 遺伝子の ORF 領域について、Machida らの方法¹⁵⁾ で塩基配列を特定し、コードする Meq 蛋白質のアミノ酸配列とともに既報^{8、10、11)} の MDV と比較した。

(3) ウイルス分離

真瀬の方法¹⁶⁾ に従い、初代鶏腎細胞を培養し、単層シートした細胞に上記ウイルス分離材料を接種した。接種後は 37°C に設定した 5%CO₂ インキュベーター内で 10 日間静置培養した後、培養上清及びトリプシン-EDTA 液で剥離した培養細胞を各々新たな初代鶏腎細胞に接種し、3 代盲継代した。

IV 成績

1 ウイルス遺伝子検査

meq 遺伝子を標的とした MDV 遺伝子検査において、一般的な meq 遺伝子では 583 bp の増幅産物が得られる¹²⁾ が、本例では全ての検体から約 400 bp の増幅産物が得られた (図 1)。その他、全検体から ALV 特異遺伝子が検出され、REV 特異遺伝子は検出されなかった。

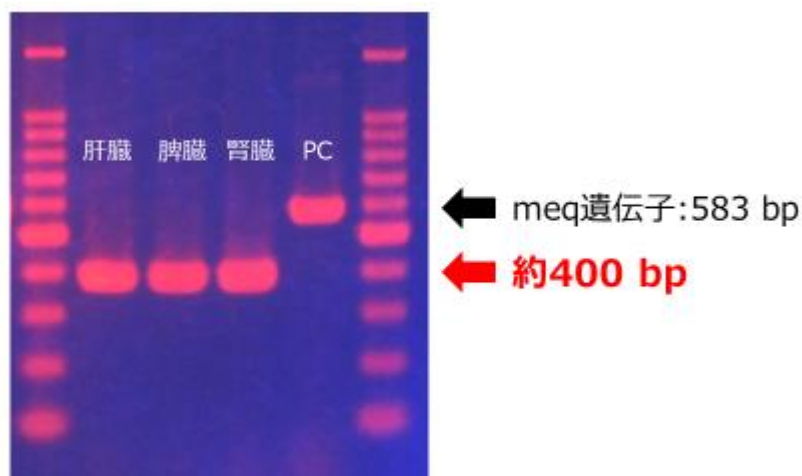


図 1 MDV meq 遺伝子検査

2 遺伝子解析

遺伝子解析の結果、増幅産物が meq 遺伝子であることを確認した。しかし、通常の meq 遺伝子の 508~700 番目まで 192 mer が欠損していた。また、508~631 番目が欠損している中東や香川県の MD 野外症例から検出された S-meq^{10、11)} と比較すると、さらに 69 mer 多く欠

損していた (図 2)。

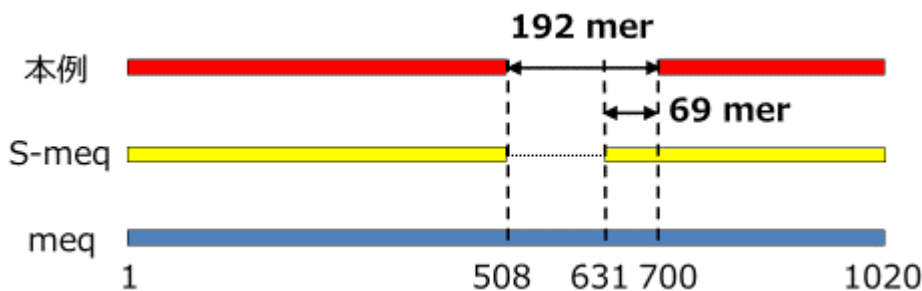


図 2 本例で検出された MDV meq 遺伝子の欠損範囲

3 推定アミノ酸配列分析

図 3 に一般的な Meq 蛋白質 (MDV RB1B 株) の 339 個のアミノ酸配列全長¹⁴⁾を示し、S-meq^{10, 11)}及び本例で検出された meq 遺伝子のアミノ酸配列全長と比較した。S-meq は Meq 蛋白質の 170~210 番目のアミノ酸が欠損しているが、本例ではさらに 233 番目まで欠損していた。図 3 で点線で示した転写活性調節領域には、プロリンリッチリピート (PRR) と呼ばれるプロリン (P) が 4 つ連続する配列 (P 配列) が多くある⁵⁾。本例では、PRR に大きな欠損が認められた。また、Meq 蛋白質の核局在シグナルである Basic 領域及び ZIP 領域¹⁷⁾に点変異が認められた。

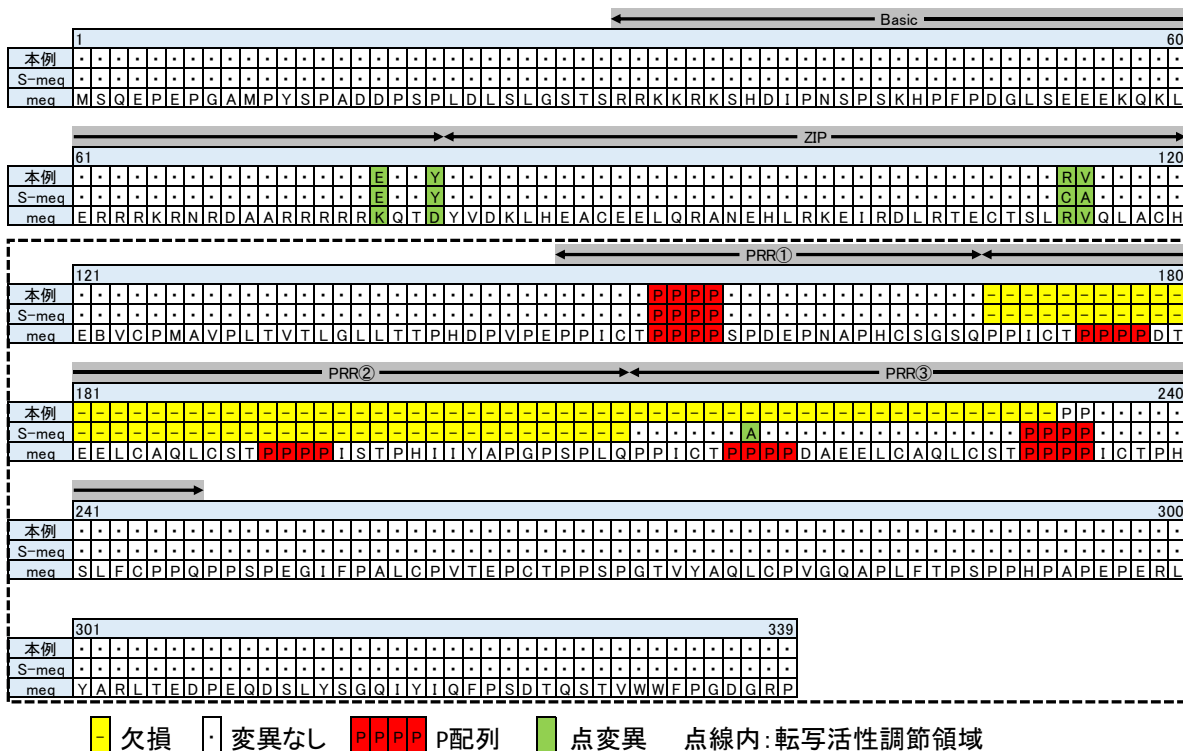


図 3 Meq 蛋白質のアミノ酸配列の比較

4 ウイルス分離

細胞変性効果は認められず、3代盲継代後の細胞培養上清及び培養細胞を検体として実施したMDV遺伝子検査¹²⁾は陰性であり、ウイルスは分離されなかった。

V まとめと考察

本例で認められたMeq蛋白質の多型について、既報のMDVと比較した(表1)。表1には、既報で多型が多く報告されているアミノ酸配列のみ示している。香川、Iraq3A及びIraq6FはMD野外発症事例から検出されたS-meq MDV株であり、^{10、11)}、この3株については病原性が不明である。N、648A、Md5、RB1B、GA、567及び617A株が過去にワクチンブレイクしたMDV株であり、VV+ (Very Virulent +)、VV (Very Virulent)、V (Virulent)の順で病原性が高い^{2、8)}。CVI988は現行ワクチン株で、N及び648A株がワクチンブレイクした株である⁸⁾。Meq蛋白質の機能は完全に解明されていないが、MD発症の過程で細胞の腫瘍化に関与することが知られている^{3、4、5、6、7)}。Meq蛋白質の転写活性調節領域の中でも、PRRは転写活性に特に大きく関与すると考えられている⁵⁾。本例では、この領域に大きな欠損が認められたため、既報のいずれのMDV株よりもPRRの長さが短くなっていた(表1)。また、PRRの中のP配列の数が減ると病原性が高くなると報告されている¹¹⁾。本例ではPRRに大きな欠損があったため、その数が1か所のみで、N株及び648A株よりも少なかった。

アミノ酸の点変異については、Meq蛋白質の77番目のアミノ酸がリジン(K)になっていると、転写活性や形質転換能が高くなり、病原性が強くなることが知られている²⁰⁾。本例では、この部分はグルタミン酸(E)で、S-meq株、567株、617A株及びCVI988株と一致していた。また、転写活性調節領域内の153番目のPがグルタミン(Q)、176番目のP、180番目のトレオニン(T)及び217番目のPがアラニン(A)に変異していると病原性が高くなると報告されている¹⁹⁾が、本例では153番目もPであり、176、180、217番目は欠損していた。

表1 既報のMDVとのMeq蛋白質アミノ酸多型の比較

株名	病原性	PRR コピー数	PRRs アミノ酸	PPPP 配列数	アミノ酸の位置							
					77	80	115	119	153	176	180	217
本例	不明	1	37	1	E	E	V	C	P	欠失	欠失	欠失
香川	不明	1.5	60	2	E	E	A	C	P	欠失	欠失	A
Iraq3A	不明	1.5	60	2	E	Y	V	R	P	欠失	欠失	A
Iraq6F	不明	1.5	60	2	E	E	A	C	P	欠失	欠失	A
N/648A	VV+	2.5	101	2	K	D	V	R	Q	A	A	A
Md5	VV	2.5	101	4	K	D	V	C	P	P	T	A
RB1B	VV	2.5	101	5	K	D	V	C	P	P	T	P
GA	V	2.5	101	5	K	Y	V	C	P	P	T	P
567/617A	V	2.5	101	4	E	Y	V	R	P	P	T	A
CVI988	なし	2.5	101	4	E	D	V	C	P	P	T	P

以上から、本例で検出された MDV 株には何らかの病原性の変異があったと考えられたが、今回実施した検査では病原性の強弱に関する明確な所見は得られなかった。今後、S-meq MDV の病原性を検討する必要がある。現在、MD は病理組織学的検査及び免疫組織化学的検査によって診断される¹⁾が、meq 遺伝子に関する情報を増やすために、今後は遺伝子検査も同時に実施していくことが求められる。また、MDV の病原性を評価するためにはワクチン接種鶏を用いた感染実験でワクチンブレイクを評価しなければならず、ウイルスを分離する必要があるが、本例ではウイルス分離が陰性であり、過去に MD 野外発症事例から S-meq MDV が分離された報告もない。そのため、S-meq MDV の病原性の検討はされていない。MDV は cell-to-cell 感染で広がる²⁾ため、ウイルスを分離するには生きた感染細胞が必要である。そのため、検体を凍結せずに一時保存する、あるいは発症個体の腎臓から鶏腎細胞を作製することも有用である。また、凍結する場合であってもグリセリンなどの保護剤を添加する必要がある。本例では採取した臓器を凍結しており、保護剤も添加していなかった。さらに、MDV の cell-free ウイルスは羽包上皮で形成される²⁾ため、羽軸を検体とする方法¹²⁾も有用である。今後、本例のウイルス分離を検討するとともに、S-meq MDV 株を含めた MDV の病原性を解明していきたい。

本例に認められた meq 遺伝子の欠損は過去に報告がなく、国内では 2 例目の MDV meq 遺伝子一部欠損株による MD 発症事例である。本例が発症した要因は、まず発症鶏がシャモであったことが考えられる。MDV への抗病性を高めるように育種されたコマーシャル鶏に比べ、シャモは MDV への抗病性が低い²²⁾。しかし、S-meq MDV のコマーシャル鶏への病原性を否定することはできないため、愛玩鶏の中にも病原性 MDV が浸潤していることを養鶏農家に周知する必要がある。MDV 以外にも、ALV 特異遺伝子が検出された。ALV の本例の病変形成への関与は病理学的に否定されたものの、今後、注意が必要である。また、過去の S-meq MDV による MD 野外発症事例は、いずれも MD ワクチンが接種されていなかった^{10, 11)}。本例でも、ワクチンが未接種であったことも発症した要因のひとつと考えられる。愛玩鶏を飼養している場合でも、飼養衛生管理基準の遵守やワクチン接種の励行を指導する必要がある。

VI 謝辞

meq 遺伝子の遺伝子解析を実施していただいた北海道大学大学院 獣医学研究科 村田史郎 助教、ウイルス分離に関してご助言くださいました農研機構 動物衛生研究部門 高木道浩 上級研究員に深謝します。

引用文献

- 1) 農林水産省消費・安全局：病性鑑定指針，216-217 (2015)
- 2) Witter：Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. Avian Dis. 41,149-163. (1997)
- 3) Jones et al.：Marek's disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid

- tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89,4042-4046. (1992)
- 4) Peng et al. : Isolation and characterization of Marek's disease virus (MDV) cDNAs mapping to the BamHI-I2, BamHI-Q2, and BamHI-L fragments of the MDV genome from lymphoblastoid cells transformed and persistently infected with MDV. Virology 213,590-599. (1995)
 - 5) Qian et al. : Transactivation activity of Meq, a Marek's disease herpesvirus bZIP protein persistently expressed in latently infected transformed T cells. J. Virol. 69, 4037-4044. (1995)
 - 6) Lee et al. : Recombinant Marek's disease virus (MDV) lacking the Meq oncogene confers protection against challenge with a very virulent plus strain of MDV. Vaccine. 26,1887-1892. (2008)
 - 7) Lupiani et al. : Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 11815-11820. (2004)
 - 8) Shamblin et al. : Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. Vet. Microbiol. 102, 147-167. (2004)
 - 9) Chang et al. : Suppression of transcription activity of the Meq protein of oncogenic Marek's disease virus serotype 1 (MDV1) by L-Meq of non-oncogenic MDV1. J. Vet. Med. Sci. 64, 1091-1095. (2002)
 - 1 0) Wajid et al. : Prevalence of Marek's disease virus in different chicken populations in Iraq and indicative virulence based on sequence variation in the EcoRI-Q (meq) gene. Avian Dis. 57:562-568. (2013)
 - 1 1) 村田ら : マレック病ウイルス meq 遺伝子に認められた欠損配列, 第 158 回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 354 (2015)
 - 1 2) Murata et al. : Development of a nested polymerase chain reaction method to detect oncogenic Marek's disease virus from feather tips. J. Vet. Diagn. Invest. 19: 471-478. (2007)
 - 1 3) Silva et al. : Development of a Polymerase Chain Reaction to Differentiate Avian Leukosis Virus (ALV) Subgroups: Detection of an ALV Contaminant in Commercial Marek's Disease Vaccines. Avian Dis. 51:663-667, (2007)
 - 1 4) Singh et al. : Reticuloendotheliosis Virus Sequences within the Genomes of Field Strains of Fowlpox Virus Display Variability. J. Virol. May:5855-5862 (2003)
 - 1 5) Machida et al. : Isolation and purification of Gallid herpesvirus 2 strains

- currently distributed in Japan. J. Vet. Med. Sci. 79(1):115-122. (2017)
- 1 6) 真瀬 : 初代鶏腎細胞培養法. 鶏病研究会報. 48 卷. 305-305. (2012)
- 1 7) Spatz et al. : Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispens) strains of Marek' s disease virus. J. Gen. Virol. 88: 1080-1096. (2007)
- 1 8) Liu et al. : Nucleolar and nuclear localozation properties of a herpesvirus bZIP oncoprotein, MEQ. J. Virol. 71. 3188-3196. (1997)
- 1 9) Renz et al. : Pathotyping of Australian isolates of Marek' s disease virus and association of pathogenicity with meq gene polymorphism. Avian Pathol. 41: 161-176. (2012)
- 2 0) Murata et al. : Characterization of Meq proteins from field isolates of Marek' s disease virus in Japan. Infect. Genet. Evol. 16: 137-143. (2013)
- 2 1) Schat et al. : Marek' s disease. InSaif, Disease of Poultry. 12th edition. 452-514. Blackwell publishing Ltd. (2008)
- 2 2) Cole et al. : Citation Classic : Studies on genetic resistance to Marek' s disease. Ag. Biol. Env. Sci. N1:9-28. (1985)