

令和 4 年 5 月 8 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06002

研究課題名(和文)馬媾疹の迅速診断法と貼るワクチンによる新規予防法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a rapid diagnosis method for equine coital exanthema and a new preventive method using a paste vaccine

研究代表者

桐澤 力雄 (Rikio, Kirisawa)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：70153252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：馬媾疹は馬ヘルペスウイルス3型(EHV3)に起因し、主に交配で伝播する。本病を発症すると外部生殖器に丘疹や水疱が生じ、痛みを伴うため交配が2～3週間不可能となり、交配料の高い種牡馬では数億円の損害に達する。本研究で、EHV3のエンベロープ糖タンパクのgBに特異的なモノクローナル抗体を13種類作出し、最も高感度な抗体の組み合わせを用いて馬媾疹迅速診断キットを完成させた。次に感染防御抗原を28頭の抗EHV3抗体陽性馬の血清を用いて検索した結果、gB、gD、gGとgIがmRNAワクチンの候補として確定され、培養細胞でのウイルス蛋白の発現を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

馬媾疹ウイルスを迅速に検出するキットの完成により、馬の交配現場での迅速な馬媾疹の確定診断法を確立することが出来た。このキットの使用により、発症馬の迅速な摘発と早期治療が容易となり、未然の感染防止ならびに治療期間の短縮が見込める。これにより、大幅な交配計画の変更を防ぐとともに、種牡馬においては交配停止等による経済損失を大きく引き下げることが出来る。ワクチン候補となるウイルス蛋白の絞り込みが出来たことから、特に種牡馬でのmRNAワクチンによる感染防御効果が期待される。本研究の成果は、軽種馬産業の発展に寄与できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Equine coital exanthema (ECE) is caused by equid herpesvirus type 3 (EHV3) and is mainly transmitted by mating. When this disease develops, papules and blisters occur on the external reproductive organs. It is so painful that mating is impossible for 2 to 3 weeks. The cost of the mating stallion is hundreds of millions of yen. In this study, we created 13 types of specific monoclonal antibodies for the envelope glycoprotein B (gB) of EHV3. We completed a rapid diagnostic kit for ECE using the most sensitive antibody combination. As a result of searching using the sera of 28 anti-EHV3 antibody-positive horses, gB, gD, gG, and gI were confirmed as candidates for the mRNA vaccine. In addition, the expression of viral protein in cultured cells was confirmed.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：馬媾疹 馬ヘルペスウイルス3 貼るワクチン 迅速診断法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

馬媾疹は、馬ヘルペスウイルス 3 型 (EHV3) に起因し、主に交配で伝播する。外部生殖器に丘疹や水疱が生じ痛みを伴うため交配が約 2 週間不可能となり、交配料の高い種牡馬では数億円の損害に達する疾患である。我が国の臨床現場では、本病を疑う症状は散発的に認められるものの、EHV3 が分離された事例は極めて少なく、2015 年まででは 2002 年の岩手県鞍用馬 1 例と 2015 年に当教室で分離した軽種の種牡馬 2 例であったが、その後、2017 年に当教室でさらに軽種の種牡馬 2 例から EHV3 を分離したことから、本病の対策の必要性が高まったが、我が国では本病に関する研究はほとんどなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、本病を現場で迅速に診断できる EHV3 検出キットの開発と生殖器への感染防御を目的として感染防御抗原をコードする mRNA を微小針に封入した貼るワクチンによる経皮ワクチンを開発する。本研究の成果は科学的根拠に基づいた新興感染症に対する新しいワクチンモデルを提供する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 馬ヘルペスウイルス 3 型

当教室で分離した EHV3 SS-1 株を使用した。ウイルス精製はショ糖不連続密度勾配超遠心法で行った

#### 2) モノクローナル抗体の作製

精製ウイルスをアジュバント (TiterMax Gold adjuvant) とともに BALB/c マウスの背部皮下に接種し、4 週間間隔で 3 回免疫した。免疫マウスの脾細胞とマウスミエローム細胞を定法に従ってポリエチレングリコール法で融合した。抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、EHV3 感染細胞を用いた間接蛍光抗体法 (IFA) で行った。高力価のモノクローナル抗体は腹水化して得た。モノクローナル抗体のアイソタイプは、the Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit を用いて調べた。モノクローナル抗体の精製は、the HiTrap protein G HP で行った。

#### 3) 抗体の標識

精製したモノクローナル抗体への蛍光色素 (FITC) ならびにペルオキシダーゼの標識は、それぞれ、Ab-10 Rapid Fluorescein Labeling kit と the Peroxidase Labeling kit-SH を用いて行った。

#### 4) 酵素抗体法 (ELISA)

間接 ELISA の抗原ならびにサンドイッチ ELISA の捕捉抗体のマイクロプレートへの吸着は 0.05M 炭酸重炭酸緩衝液 (pH9.4) で行った。ブロッキングは、0.5%ブロッキング試薬 (ロシュ) を用いて行った。希釈液ならびに洗浄液は 0.05% Tween20 加 PBS を持ちいた。基質には ABTS を用い、OD<sub>405</sub> を測定した。

#### 5) 迅速診断用キット

EHV3 迅速検出キットはホクドー株式会社に依頼して試作品を作成した。

#### 6) ウイルス蛋白発現ベクターの構築

EHV3 の 14 種類のウイルス蛋白 (エンベロープ糖タンパク : gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gJ、gK、gL、gM と gN ; 遺伝子発現調節蛋白 : ICP4 と ICP22) をコードする

領域を PCR で増幅し、動物細胞発現用プラスミド pCAGGS にクローニングした。HEK293 細胞に Lipofectamine 3000 を用いて各種プラスミドをトランスフェクトし、ウイルス蛋白を発現させた。

#### 7) EHV3 抗体陽性馬の血清

当研究室で実施した EHV3 抗体調査において中和試験で抗体陽性を示した 28 頭の血清を用いた。

#### 8) ウイルス蛋白をコードする mRNA の合成

ウイルス蛋白をコードする遺伝子の upstream に T7 プロモーターの配列を付加し、pCAGGS にクローニングした。mRNA 合成は HiScribe T7 ARCA mRNA Kit (with tailing) を用いて行った。RNA 媒介性の自然免疫を抑制するために d5mCTP と Pseudo-UTP を用いた。このキットでは、mRNA の 5' 端にキャップ構造、3' 端にポリ A が付加される。

mRNA は TransIT-mRNA Transfection Kit を用いて HEK293 細胞に導入して、ウイルス蛋白を発現させた。

### 4. 研究成果

#### 1) EHV3 検出キット開発

EHV3 に対するモノクローナル抗体を 30 種類得た。そのうち、抗体のサブタイプが IgG のもの 16 種類 (IgG1:15 種類、IgG2a: 1 種類) について、解析を進めた (表 1)。EHV3 感染細胞を抗原とする間接蛍光抗体法で腹水の IFA 価を求めたところ、25600 以上が 10 種類、6400 倍が 4 種類、そして 1600 倍と 400 倍が各 1 種類であった。精製ウイルスを抗原とする ELISA では、高い反応性を示すものが 9 種類、中程度が 2 種類、低いものが 5 種類であった。これらのモノクローナル抗体が認識するウイルス蛋白を、各ウイルス蛋白を発現させた培養細胞を用いて間接蛍光抗体法で調べた。その結果、13 種類がエンベロープ糖タンパク gB、2 種類が gJ、そして 1 種類が gC であった。この結果から、EHV3 検出キットは gB を検出対象とすることとした。

競合 IFA でモノクローナル抗体の大まかな分類を行ったところ、4 種類に分類された。これらのうち、最も競合しない E7H1A11 と E4C9 をペルオキシダーゼで標識してすべてのモノクローナル抗体を対象に可溶性 EHV3 を抗原とする競合 ELISA を実施した。その結果、E7H1A11 と競合しないモノクローナル抗体として E4C9、E3C7 と C6E11 が、E4C9 と競合しないものとして E7H1A11、C6E11 と E3C7 が確認された。これら 4 種類のモノクローナル抗体のペルオキシダーゼ標識抗体と未標識抗体を用いて可溶性 EHV3 を抗原とするサンドイッチ ELISA を実施した。その結果、捕捉抗体として E4C9、検出用抗体として E7H1A11 を用いた場合に、最も検出感度が高かった。この組み合わせで、イムノクロマトグラフィーを原理とする検出系に応用して迅速診断キットを構築したところ、検出感度は  $10^{3.9}$  TCID<sub>50</sub> であった。これにより、EHV3 迅速検出キットを作成することができた。

今回作出した抗 gB モノクローナル抗体が認識する gB (全長 993 アミノ酸残基、aa) の部位を推定するために、約 250aa がオーバーラップして gB 全長をカバーする 3 種類の gB 分割発現プラスミド (pgB1、pgB2、pgB3) を構築して、gB モノクローナル抗体との反応性を調べた (表 2)。その結果、A 領域 (1-237aa) と反応するものはなく、B 領域 (238 - 469aa) は 2 種類、C 領域 (470-471aa) は 5 種類、そして D 領域 (722-993aa) 2 種類であった。いずれにも分類されないものが 4 種類あった。検出キット作成に使用した E4C9 は C 領域、E7H1A11 は D 領域であったことが、検出効率を高めた構造的要因であることが

示された。

## 2) ワクチン開発

感染防御抗原を検索するため、ウイルス蛋白 14 種類(エンベロープ糖タンパク:gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gJ、gK、gL、gM と gN ; 遺伝子発現調節蛋白:ICP4 と ICP22) を動物細胞で発現する組換えプラスミドを構築し、培養細胞で発現させた。これらウイルス蛋白発現細胞と EHV3 抗体陽性馬 28 頭の血清との反応性を間接蛍光抗体法で調べた(表 3)。その結果、28 頭全頭から抗 gB 抗体が検出された。次いで、抗 gG が 24 頭(陽性率 85.7%)、抗 gD が 20 頭(71.4%)、抗 gI が 19 頭(67.9%)、抗 gC が 18 頭(64.3%)で高い値を示した。gH、gK、gL と ICP22 に対する抗体を保有する馬は見られなかった。gC が感染防御に有効とする報告はヘルペスウイルスで報告されていないことから、gB、gD、gG と gI が感染防御に有効と考え、これらの蛋白を発現する mRNA をワクチン候補とした。

T7 ポリメラーゼの作用で mRNA を合成するキットを使用してこれら 4 種類の mRNA を合成した。これらを HEK293 細胞にトランスフェクトし、蛍光抗体で蛋白発現を確認した。

現在、マウスの系でこれらの mRNA ワクチンの抗体誘導活性の検討を進めている。

表 1. モノクローナル抗体のアイソタイプ、間接蛍光抗体 (IFA) 価、ELISA 反応性と認識するウイルス蛋白

モノクローナル抗体	アイソタイプ	IFA 価	間接 ELISA での反応性	認識するウイルス蛋白
E7H1A11	IgG1	25600	高	gB
C1E5E5	IgG1	6400	低	gJ
C7C2E1	IgG1	1600	中間	gB
E3C7	IgG1	6400	中間	gB
F2B5	IgG1	25600	高	gB
C6G11	IgG1	25600	高	gB
D6D3	IgG1	25600	高	gB
F8E11	IgG1	25600	低	gB
C6E11	IgG1	25600	高	gB
C1C3	IgG1	25600	高	gB
F7B9	IgG1	400	低	gC
E1A7	IgG1	25600	高	gB
A8D5	IgG2a	6400	低	gB
E6C11	IgG1	6400	低	gJ
C7B5	IgG1	25600	高	gB
E4C9	IgG1	25600	高	gB

表 2 . 抗 gB モノクローナル抗体が認識する gB 領域 ( gB 全長 : 993aa )

A 領域 ( 1-237aa )	B 領域 ( 238-469aa )	C 領域 ( 470-721aa )	D 領域 ( 722-993aa )	反応なし
なし	E3C7 A8D5	C7C2E1 D6D3 C1C3 C7B5 E4C9	E7H1A11 E1A7	F2B5 C6G11 F8E11 C6E11

表 3 . 間接蛍光抗体法 ( IFA ) による EHV3 中和抗体陽性馬が認識するウイルス蛋白の検索

馬 No.	中和 抗体価	IFA 価									
		gB	gC	gD	gE	gG	gI	gJ	gM	gN	ICP4
1	32	1280	80	80	<20	80	80	80	<20	<20	<20
2	32	320	80	320	<20	320	80	<20	<20	<20	<20
3	32	320	80	320	<20	320	320	80	<20	1280	<20
4	32	80	80	80	<20	80	80	80	<20	<20	<20
5	32	80	80	1280	<20	320	1280	80	20	320	<20
6	16	1280	320	80	20	320	80	80	<20	<20	<20
7	16	320	80	80	<20	80	80	<20	<20	<20	<20
8	16	320	20	80	<20	80	80	<20	<20	<20	<20
9	16	1280	<20	1280	20	1280	320	1280	20	320	<20
10	8	1280	1280	1280	<20	80	320	1280	<20	<20	20
11	8	1280	<20	80	<20	80	320	320	<20	<20	<20
12	8	1280	20	80	<20	1280	1280	320	<20	320	<20
13	8	1280	80	80	<20	80	1280	1280	<20	<20	20
14	8	1280	80	80	<20	80	320	80	<20	<20	<20
15	8	1280	320	80	<20	80	320	80	<20	<20	<20
16	8	320	80	<20	<20	80	<20	<20	<20	<20	<20
17	8	320	80	<20	<20	80	<20	<20	<20	<20	<20
18	8	80	80	<20	<20	20	<20	<20	<20	<20	<20
19	8	320	<20	<20	<20	80	<20	<20	<20	<20	<20
20	4	320	80	80	<20	80	80	<20	<20	<20	<20
21	4	1280	<20	<20	<20	80	<20	<20	<20	<20	<20
22	4	1280	80	80	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
23	4	1280	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
24	4	1280	<20	80	<20	<20	80	80	<20	<20	<20
25	4	1280	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
26	4	1280	<20	<20	<20	80	<20	<20	<20	<20	<20
27	2	1280	<20	1280	<20	1280	320	80	<20	<20	<20
28	2	1280	<20	1280	<20	1280	320	1280	<20	<20	<20
IFA 陽性頭数		28	18	20	2	24	19	15	2	4	2
陽性率 (%)		100.0	64.3	71.4	7.1	85.7	67.9	53.6	7.1	14.3	7.1

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kirisawa Rikio, Kato Rika, Furusaki Koichi, Onodera Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Universal Virucidal Activity of Calcium Bicarbonate Mesoscopic Crystals That Provides an Effective and Biosafe Disinfectant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 262 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10020262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama Takashi, Nishimura Tomoyasu, Uwamino Yoshifumi, Kosaki Kenjiro, Furusaki Koichi, Onishi Rumiko, Onodera Takashi, Haritani Makoto, Sugiura Katsuaki, Kirisawa Rikio, Hasegawa Naoki	4. 巻 9
2. 論文標題 Virucidal Effect of the Mesoscopic Structure of CAC-717 on Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2096 ~ 2096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9102096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 TOISHI Yuko, TSUNODA Nobuo, KIRISAWA Rikio	4. 巻 82
2. 論文標題 Period of excretion of equine herpesvirus 3 (EHV-3) from a stallion before showing clinical signs of equine coital exanthema and the effect of acyclovir treatment on the duration of EHV-3 excretion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1299 ~ 1305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 ISHINO Takeshi, KURITA Hirofumi, KIRISAWA Rikio, SHIMAMOTO Yoshinori, NUMANO Rika, KITAMURA Hiroshi	4. 巻 82
2. 論文標題 Introduction of a plasmid and a protein into bovine and swine cells by water-in-oil droplet electroporation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 14 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asakawa Mitsuhiro, Kakogawa Masayoshi, Onuma Manabu, Kirisawa Rikio	4. 巻 7
2. 論文標題 Countermeasures for avian influenza outbreaks among captive avian collections at zoological gardens and aquariums in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Microbiology & Experimentation	6. 最初と最後の頁 167 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15406/jmen.2019.07.00256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamiguchi Kohei, Kojima Seiji, Sakumoto Kana, Kirisawa Rikio	4. 巻 55
2. 論文標題 Isolation and molecular characterization of a variant of Chinese gC-genotype II pseudorabies virus from a hunting dog infected by biting a wild boar in Japan and its pathogenicity in a mouse model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virus genes	6. 最初と最後の頁 322 ~ 331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11262-019-01659-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kirisawa Rikio, Toishi Yuko, Hashimoto Hiromitsu, Tsunoda Nobuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Isolation of an Equine Foamy Virus and Sero-Epidemiology of the Viral Infection in Horses in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 613 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v11070613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田中 良子, 登石 裕子, 角田 修男, 桐澤 力雄
2. 発表標題 マウスモノクローナル抗体を用いたイムノクロマト法による馬媾疹迅速診断キットの開発
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横山 愛, 日台 海, 登石 裕子, 角田 修男, 田中 良子, 桐澤 力雄
2. 発表標題 北海道の一種牡馬牧場の馬から分離されたウマフォーミーウイルスの分子系統解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 滝沢 逸志, 桐澤 力雄
2. 発表標題 野生のカラスから分離された新規レオウイルスの抗腫瘍療法の腫瘍溶解性ウイルスとしての検討
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中良子, 村田亮, 内田郁夫, 古崎孝一, 小野寺節, 太西るみ子, 桐澤力雄
2. 発表標題 植物ミネラル機能水(テラヘルツ水)加工セラミック処理水(殺菌消毒水)の抗菌・抗ウイルス効果
3. 学会等名 令和元年度産業動物獣医学会(北海道)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 登石裕子, 角田修男, 田中良子, 桐澤力雄
2. 発表標題 繁殖牝馬におけるウマヘルペスウイルス 3 型のスクリーニング検査
3. 学会等名 日本ウマ科学会 第 32 回学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 加藤 里佳、古崎 孝一、小野寺 節、太西 るみ子、桐澤 力雄
2. 発表標題 植物ミネラル機能水（テラヘルツ水）加工セラミックの抗ウイルス効果
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口 敦規、加藤 里佳、三好 舞、登石 裕子、角田 修男、前田 健、桐澤 力雄
2. 発表標題 北海道の種牡馬牧場における馬ヘルペスウイルス3型の血清疫学調査
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三好 舞、岡本 実、松田 一哉、登石 裕子、角田 修男、桐澤 力雄
2. 発表標題 2シーズン連続でウマヘルペスウイルス1型（EHV-1）による流産を起こした繁殖牝馬の流産胎子から分離したEHV-1の性状比較
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桐澤 力雄、古崎 孝一、太西 るみ子、Hoang Vu Dang、小野寺 節
2. 発表標題 Inactivation effects of calcium hydrogen carbonate mesoscopic crystals on enveloped or non-enveloped animal DNA and RNA viruses.
3. 学会等名 31st International Conference on Antiviral Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------