

氏 名 (本籍)	武 藤 淳 二 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第200号
学 位 授 与 年 月 日	平成18年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	遺伝子操作した次世代型狂犬病ワクチン製造株の開発に関する研究
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 源 宣 之 副査 帯広畜産大学 教 授 牧 野 壮 一 副査 岩 手 大 学 教 授 品 川 邦 汎 副査 東京農工大学 教 授 本 多 英 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 福 士 秀 人

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

狂犬病は、人を含むすべての哺乳動物が感染し、発病するとほぼ100%死亡する極めて危険な人獣共通感染症である。本病は今なお世界中で発生し、毎年約5万人が死亡していると推定されている。狂犬病予防対策として、ヨーロッパでは経口弱毒生ワクチンを空中散布して野生動物を免疫しているが、病原性の復帰など安全面に問題がある。人での狂犬病発生の大半を占めるアジアやアフリカなどでは犬への予防注射が行われているが、大部分の犬が放し飼いされており、また現行の組織培養由来の不活化ワクチンが高価なことなどから、予防注射が徹底されていない。

そこで著者は、これまでのワクチン開発とはまったく異なる手法を用いて従来よりさらに安全・安価で免疫原性の高い次世代型の狂犬病ワクチン株を確立するため、免疫原性に関与するG蛋白質を過剰に含む狂犬病ウイルスの作出を考えた。狂犬病ウイルスなどのモノネガウイルスではRNAポリメラーゼのプロモーターがゲノムの3'末端にあり、転写が必ず3'末端から行われるため、3'末端に近い遺伝子ほどmRNAの合成量が多く、それらの蛋白質の発現量も増大する。そこで本研究では、日本の動物用不活化ワクチン製造株で、高度に弱毒化されたRC-HL株を用いて、リバーシ・ジェネテックス (逆遺伝学) 法によりG遺伝子を3'末端側に配置換えまたはウイルスゲノムにG遺伝子をさらに追加した狂犬病ウイルスの作出を試みた。

### 1. 遺伝子操作した狂犬病ウイルスの作出

ウイルスゲノムにG遺伝子を配置換えまたは追加した5種類のゲノムプラスミドを構築し、N、PおよびL蛋白質発現ヘルパープラスミドとともにT7RNAポリメラーゼ発現BHK細胞にトランスフェクションした。培養後、BHK細胞に狂犬病ウイルスG蛋白質の発現を確認し、培養上清中のウイルスを回収した。回収したウイルスは、GおよびL遺伝子の間にG遺伝子を追加したR(NPMGGL)株、G遺伝子をN遺伝子の上流に配置したR(GNPML)株およびR(GNPMGL)株、G遺伝子をNおよびP遺伝子の間に配置したR(NGPML)株およびR(NGPMGL)株である。これらのウイルスはRT-PCRおよびダイレクトシーケンシングにより目的のゲノム構造を持っていることを確認した。回収後のウイルス力価は、親株のRC-HL株(NPMGL)に比べて、G遺伝子をN遺伝子の上流に配置したR(GNPML)株やR(GNPMGL)株で低値であったが、R(NPMGGL)株、R(NGPML)株およびR(NGPMGL)株は比較的高いウイルス力価を示した。

### 2. 遺伝子操作した狂犬病ウイルスの性状解析

回収したウイルスのうち、比較的ウイルス力価の高かったR(NPMGGL)株、R(NGPML)株およびR(NGPMGL)株の生物学的性状を調べ、親株であるRC-HL株ゲノムプラスミドから同様に作出されたりコンビナントRC-HL (rRC-HL) 株のそれらと比較した。3株の培養細胞への馴化を調べたところ、R(NPMGGL)株がNA細胞に馴化する傾向が見られた。そこで、R(NPMGGL)株の遺伝的安定性の確認と培養細胞への馴化を目的にNA細胞で11代継代した。継代したウイルスにおいてG遺伝子の脱落は認められなかった。また継代ウイルス感染細胞においてG蛋白質発現量の増大が維持されていたことから、R(NPMGGL)株が遺伝的に安定していることが示された。NA細胞への馴化の結果、ウイルス力価が $2.2 \times 10^8$ FFU/mlに達し、高力価のウイルスを得ることができた。

ウイルス感染細胞におけるG蛋白質の発現量は、R(NGPML)株、R(NGPMGL)株およびR(NPMGGL)株ともにrRC-HL株より増大していた。さらに、R(NGPML)株およびR(NPMGGL)株のウイルス粒子中に取り込まれたG蛋白質量および粒子の形態を調べたところ、rRC-HL株に比べてG蛋白質量が増大し、粒子の長くなっているのが確認された。このことから、感染細胞で過剰発現したG蛋白質が狂犬病ウイルス粒子に取り込まれ、粒子自体が長くなることが示唆された。

### 3. G遺伝子を二重に配置した狂犬病ウイルス、R(NPMGGL)株のマウスにおける病原性と免疫原性の解析

培養細胞での増殖性が最も高く、ウイルス粒子中のG蛋白質量の増大が確認されたR(NPMGGL)株について、マウスを用いて病原性および免疫原性を調べた。

R(NPMGGL)株を成熟マウスに脳内接種しても致死的な感染を起こさなかったことから、R(NPMGGL)株は親株であるrRC-HL株と同様に弱毒株であることが確認された。紫外線で不活化したウイルスを用いてマウスを免疫し、血清中和抗体価を経日的に測定した。免疫3週間後、R(NPMGGL)株免疫群では5匹中4匹のマウスで血清中

和抗体価が上昇していたのに対し、rRC-HL株免疫群では1匹のマウスしか抗体価の上昇が認められなかった。従って、R(NPMGGL)株の免疫原性がrRC-HL株より高いことが示唆された。

以上の結果から、本研究で作出した5株のうち、G遺伝子を二重に配置したR(NPMGGL)株は次世代型の狂犬病ワクチン製造株として有用であることが示唆された。また、これらのデータは狂犬病ウイルス粒子の構造解析を行う上でも有益であると考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

申請者、武藤 淳二氏の学位論文は、これまでのワクチン開発とはまったく異なる手法を用いて、従来よりさらに安全で免疫原性の高い次世代型の狂犬病ワクチン製造株を確立することを目的としている。すなわち、狂犬病ウイルスでは転写が必ずゲノムの3'末端から行われるため、3'末端に近い遺伝子ほどmRNAの合成量が多く、それらの蛋白質の発現量も増大する点に着目し、リバーズ・ジェネテックス（逆遺伝学）法を用いて同じウイルスゲノム内でG遺伝子を配置換えあるいは追加し、免疫原性に関与するG蛋白質を過剰に発現させた狂犬病ウイルスの作出を試みたものである。

氏は、まず日本の動物用不活化ワクチン製造株で、高度に弱毒化されたRC-HL株を用いて、G遺伝子をウイルスゲノムの3'末端側に配置換えまたはG遺伝子をさらに追加した狂犬病ウイルス5株を作出した。次に作出したウイルス株の生物および遺伝学的性状並びに免疫原性を親株のRC-HL株のそれらと比較し、そのうちG遺伝子を二重に配置したR(NPMGGL)株が次世代型の狂犬病ワクチン製造株として有用であることを示唆した。

したがって、得られた成績は次の3つに大別することが出来る。

第一に、ウイルスゲノムに同じウイルスのG遺伝子を配置換えまたは追加した各種のゲノムプラスミドを構築し、N、PおよびL蛋白質発現ヘルパープラスミドと共にT7RNAポリメラーゼ発現BHK細胞にトランスフェクションした。7～8日間培養後、BHK細胞に狂犬病ウイルスG蛋白質の発現を確認し、培養上清中のウイルスを回収した。回収したウイルスは、GおよびL遺伝子の間にG遺伝子を追加したR(NPMGGL)株、G遺伝子をN遺伝子上流に配置換えあるいは追加したR(GNPML)株およびR(GNPMGL)株、G遺伝子をNおよびP遺伝子の間に配置換えあるいは追加したR(NGPML)株およびR(NGPMGL)株である。回収後のウイルス力価は、親株であるRC-HL株のゲノムプラスミドから同様に作出されたりコンビナントRC-HL (rRC-HL) 株(ゲノムの配置：NPMGL)に比べて、R(GNPML)株やR(GNPMGL)株で低値であったが、R(NPMGGL)株、R(NGPML)株およびR(NGPMGL)株は比較的高いウイルス力価を示した。

第二に、回収したウイルス株のうち、比較的高いウイルス力価の高かったR(NPMGGL)株、R(NGPML)株およびR(NGPMGL)株の生物および遺伝学的性状を調べ、親株のrRC-HL株のそれらと比較した。3株中、R(NPMGGL)株がNA細胞に最も良く馴化する傾向があり、継代11代目のウイルス力価は $2.2 \times 10^8$ FFU/mlに達した。11代細胞継代した

R(NPMGGL)株のG遺伝子の脱落・変異は認められず、また継代ウイルス感染細胞においてG蛋白質発現量の増大が維持されていたことから、R(NPMGGL)株が遺伝的に安定していることが示された。さらに、R(NGPML)株およびR(NPMGGL)株のウイルス粒子中に取り込まれたG蛋白質量は、rRC-HL株に比べて増加し、粒子の長さも伸張しているのが確認された。

第三に、培養細胞での増殖性が最も高く、ウイルス粒子中のG蛋白質量の増加が確認されたR(NPMGGL)株のマウスにおける病原性および免疫原性を調べた。

R(NPMGGL)株を成熟マウスに脳内接種しても致死的な感染を起こさなかったことから、R(NPMGGL)株は親株のrRC-HL株と同様に弱毒株であることが確認された。紫外線で不活化したウイルスをマウスに接種し、血清中和抗体価を経日的に測定したところ、R(NPMGGL)株免疫群では3週間後に5匹中4匹のマウスで血清中和抗体が上昇したのに対し、rRC-HL株免疫群では1匹のマウスでしか中和抗体の上昇が認められなかった。したがって、R(NPMGGL)株の免疫原性がrRC-HL株より高いことが示唆された。

以上の結果から、本研究で作出した5株のうち、G遺伝子を二重に配置したR(NPMGGL)株は次世代型の狂犬病ワクチン製造株として有用であることが示唆された。また、これらのデータは狂犬病ウイルス粒子の構造解析を行う上でも有益である。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Characterization of recombinant rabies virus carrying double glycoprotein genes

著 者 名 : Hosokawa-Muto, J., Ito, N., Yamada, K., Shimizu, K., Sugiyama, M. and Minamoto, N.

学術雑誌名 : Microbiology and Immunology

巻・号・頁・発行年 : 50(3) In Press

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system

著 者 名 : Ito, N., Takayama-Ito, M., Yamada, K., Hosokawa, J., Sugiyama, M. and Minamoto, N.

学術雑誌名 : Microbiology and Immunology

巻・号・頁・発行年 : 47(8) 613-617, 2003

2) 題 目 : Characterization of M gene-deficient rabies virus with advantages of effective immunization and safety as a vaccine strain

著 者 名 : Ito, N., Sugiyama, M. Yamada, K., Shimizu, K., Takayama-Ito, M.,  
Hosokawa, J. and Minamoto, N.

学術雑誌名 : Microbiology and Immunology

巻・号・頁・発行年 : 49(11) 971-979, 2005