

氏 名 (本籍)	伊 藤 睦 代 (岐阜県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第154号
学 位 授 与 年 月 日	平成16年3月15日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4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	Studies on Identification of the Amino Acids Related to the Pathogenicity of Rabies Virus Glycoprotein (狂犬病ウイルス糖蛋白質の病原性関連アミノ酸の特定に 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 白 幡 敏 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

狂犬病は最も危険なウイルス性人獣共通感染症の一つである。狂犬病の病原体は古くから研究されてきたにも関わらず、その病原性についての分子生物学的基盤はほとんど明らかにされていない。狂犬病ウイルスのゲノムはマイナス鎖RNAであり、5つの構造蛋白質をコードしている。これまでに、ウイルス粒子表面のスパイクを形成する糖(G)蛋白質の333位のアミノ酸、アルギニンあるいはリジンが成熟マウスに対する致死病原性に深く関与していることが明らかになっている。ところが、日本の動物用ワクチン製造株であるRC-HL株はマウスに体重減少のみを起こす弱毒型であるにも関わらず、333位はその親株でマウスに致死感染を起こす強毒型の西ヶ原株と同じである。したがって、両株の病原性の違いには新規の病原関連アミノ酸が関与していると考えられた。これまでに、我々の研究室では西ヶ原株のG蛋白質が致死病原性を決定する主な因子であることを明らかにしてきた。そこで、本研究では、強毒型の西ヶ原株とその株から派生した弱毒型のRC-HL株とのG遺伝子間のキメラウイルスをリバーズ・ジェネテックスにより多数創出し、それらのキメラウイルスのマウスに対する病原性の有無から、成熟マウスに対する病原性に関与するG蛋白質のアミノ酸を直接特定することを目的とした。また、病原発現機構を解析するため

に、強毒型のキメラウイルスの生物学および免疫学的性状を弱毒株のそれと比較した。

### 1. 狂犬病ウイルスG蛋白質164位～303位の病原性への関与

弱毒のRC-HL株を基盤として、両株のG蛋白質間においてアミノ酸変異が蓄積していた164位～303位のみ西ヶ原株の同じ領域と取り替えたキメラウイルスR(G 164-303)株を作出した。R(G 164-303)株は成熟マウスに致死感染を起こし、そのLD<sub>50</sub>は7.7 フォーカス形成単位(ffu)でG蛋白質全てを西ヶ原株由来にしたキメラウイルスR(G)株の1.0 ffuとほぼ同じであった。マウスの脳におけるR(G 164-303)株の増殖は、強毒のR(G)および西ヶ原株と同様に感染初期より良く増殖し、ウイルス抗原も強毒株と同様に脳全体に分布した。これらの所見は脳でのウイルス増殖が限局されるRC-HL株とは明らかに異なっていた。しかし、R(G 164-303)株の培養細胞での増殖および細胞融合活性は弱毒のRC-HL株のそれとほぼ一致した。このことから、宿主における免疫反応が強毒株と弱毒株との病原性の違いに関与していることが示唆された。

### 2. 成熟マウスに対する致死の病原性に関与するG蛋白質アミノ酸の特定

G蛋白質164位～303位の領域には強毒型の西ヶ原株と弱毒型のRC-HL株の間で9つのアミノ酸変異が存在する。そこで、RC-HL株を基盤として164位～210位あるいは242位～303位の領域のみをそれぞれ西ヶ原株の同じ領域と取り替えたキメラウイルスR(G 164-210)株およびR(G 242-303)株を作出した。4つのアミノ酸変異を含むR(G 242-303)株の病原性は強毒型のR(G)株とほぼ同じであった。このうち242位、255位および268位の3つのアミノ酸のみを西ヶ原株由来にしたR(G 242/255/268)株は、マウスに致死感染を起こした。また、そのLD<sub>50</sub>は3.7 ffuであり、R(G)株と同様の病原性を復帰していた。これらのアミノ酸を単独あるいは組み合わせて西ヶ原株由来にした6つの変異株を作出した。242位および255位の両アミノ酸あるいはそれぞれ単独を西ヶ原株由来にした変異株は致死性を復帰していなかった。一方、268位と242位あるいは255位の2つのアミノ酸あるいは268位のアミノ酸単独を西ヶ原株由来にした変異株は一部致死性を示したが、感染マウスのほとんどは回復し、その致死率は低値であった。

### 3. 宿主免疫系の致死感染への関与

病原性に関与する宿主側の因子を明らかにするため、強毒のR(G)株および西ヶ原株の感染マウスにおける免疫反応を弱毒のRC-HL株のそれらと比較した。感染マウスの脳組織切片のHE染色において強毒株では囲管性細胞浸潤がほとんど認められないのに対して、弱毒株では強く認められた。BおよびT細胞欠損SCIDマウスに3株をそれぞれ接種したところ、強毒株では正常マウスとSCIDマウスとの間に、症状および致死率に違いは認められなかった。一方、弱毒株の接種では正常マウスが一過性の体重減少のみを示したのに対し、SCIDマウスは全例死亡した。さらに、ウイルス感染初期に働く自然免疫系の一員であるサイトカインについて検討したところ、強毒株ではI型インターフェロンの発現量が弱毒株のそれと比較して低かった。このこと

から、感染初期のマウス脳でのI型インターフェロンの発現量の差が致死感染性の有無に関与することが示唆された。

以上のことより、G蛋白質の242位のアラニン、255位のアスパラギン酸および268位のイソロイシンは、それぞれ単独ではなく3つのアミノ酸が揃うことにより、西ヶ原株の病原性の発現にきわめて重要であることが明らかとなった。このことは、狂犬病ウイルスの街上市毒から固定毒への病原変化の解析あるいはより安全な弱毒生ワクチンの開発にとって有益な情報となると思われる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

申請者、伊藤 睦代君の学位論文は、狂犬病ウイルスの致死病原性に関する分子基盤を確立するために、マウスに対し致死感染を起こす強毒株とその株から派生した致死感染を起こさない弱毒株とのG遺伝子間のキメラウイルスをリバーシ・ジェネテックスにより多数創出し、それらのキメラウイルスのマウスに対する病原性の有無から、致死感染に関与するアミノ酸を直接特定したものである。

氏は、まず弱毒のRC-HL株を基盤として、両株のG蛋白質間においてアミノ酸変異が蓄積していた164位～303位のみ強毒の西ヶ原株の同じ領域と取り替えたキメラウイルスR(G 164-303)株を作出した。R(G 164-303)株は成熟マウスに対する致死な病原性を復帰しており、そのLD<sub>50</sub>はG蛋白質全てを西ヶ原株由来にしたR(G)株の1.0 フォーカス形成単位(ffu)とほぼ同じであった。マウスの脳におけるR(G 164-303)株のウイルス抗原は強毒のR(G)および西ヶ原株と同様に脳全体に分布した。これらの所見は脳でのウイルス増殖が限局されるRC-HL株とは明らかに異なっていた。しかし、R(G 164-303)株の培養細胞での増殖および細胞融合活性は弱毒のRC-HL株のそれとほぼ一致した。このことから、宿主における免疫応答が強毒株と弱毒株との病原性の違いに関与していることが示唆された。

そこで、G蛋白質164位～303位領域における致死感染に関わるアミノ酸の特定を同様な実験手段で試みた。この領域には西ヶ原株とRC-HL株の間で9つのアミノ酸変異が存在した。そこで、RC-HL株を基盤として164位～210位あるいは242位～303位のみを西ヶ原株の同じ領域と取り替えたキメラウイルスR(G 164-210)株およびR(G 242-303)株を作出した。4つのアミノ酸変異を含むR(G 242-303)株の病原性はR(G)株とほぼ同じであった。さらに、このうち242位、255位および268位の3つのアミノ酸のみを西ヶ原株由来にしたR(G 242/255/268)株は、マウスに致死感染を起こし、そのLD<sub>50</sub>は3.7 ffuであり、R(G)株同様の病原性を復帰していた。

つぎに、病原性に関与する宿主側の因子を明らかにするため、強毒のR(G)株および西ヶ原株の感染マウスにおける免疫反応を弱毒のRC-HL株のそれらと比較した。感染マウスの脳組織切片のHE染色において強毒株では血管性細胞浸潤がほとんど認められなかったのに対し、弱毒株では強く認められた。BおよびT細胞欠損SCIDマウスに各株を接種したところ、強毒株では正常マウスとSCIDマウスを共に死亡させた。一方、弱毒株では正常マウスが一過性の体重減少のみを示したのに対し、SCIDマウスは死亡した。さらに、強

毒株では感染初期に出現する I 型インターフェロンの発現量が弱毒株のそれと比較して低かった。このことから、感染初期のマウス脳における I 型インターフェロンの発現量の差が病原性の有無に関与することが示唆された。

以上のことより、G 蛋白質の 242 位のアラニン、255 位のアスパラギン酸および 268 位のイソロイシンの 3 つのアミノ酸が、西ヶ原株の病原性の発現にきわめて重要であることが明らかとなった。このことは、より安全な弱毒生ワクチンの開発にとっても有益な情報となると思われる。

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 : Region at amino acids 164 to 303 of the rabies virus glycoprotein plays an important role in pathogenicity for adult mice.

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

学術雑誌名 : Journal of Neurovirology

巻・号・頁・発行年 : In Press

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Avian-to-mammal transmission of an avian rotavirus: analysis of its pathogenicity in a heterologous mouse model.

著 者 名 : Mori, Y., Sugiyama, M., Takayama, M., Atoji, Y., Masegi, T. and Minamoto, N.

学術雑誌名 : Virology

巻・号・頁・発行年 : 288(1):63-70, 2001

- 2) 題 目 : Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice.

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

学術雑誌名 : Journal of Virology

巻・号・頁・発行年 : 75(19): 9121-9128, 2001

- 3) 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

4) 題 目 : Roles of outer capsid proteins as determinants of pathogenicity and host range restriction of avian rotaviruses in a suckling mouse model.

著 者 名 : Mori, Y., Borgan, M.A., Takayama, M., Ito, N., Sugiyama, M. and Minamoto, N.

学術雑誌名 : Virology

巻・号・頁・発行年 : 316(1) 126-134, 2003