

氏名（本（国）籍）	中川 敬介（京都府）
主指導教員名	岐阜大学 教授 杉山 誠
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博甲第384号
学位授与年月日	平成25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	遺伝子操作を用いた新しい狂犬病生ワクチンの開発
審査委員	主査 岐阜大学 教授 福士 秀人 副査 帯広畜産大学 教授 鈴木 宏志 副査 岩手大学 教授 村上 賢二 副査 東京農工大学 教授 水谷 哲也 副査 岐阜大学 教授 杉山 誠

## 論文の内容の要旨

狂犬病の対策には、通常、不活化ワクチンが用いられる。一方で、経口投与が可能であることから、例外的に野生動物対象として生ワクチンが利用されている。本病の流行が深刻な開発途上国で必要な要件である、安価に供給可能な生ワクチンが広く普及しない理由として、含有ウイルスの残存病原性および病原性復帰といった安全面の懸念がある。そこで本研究では、逆遺伝子操作系を用いて安全性を高めた狂犬病生ワクチンの開発に関する研究を行った。

現行の狂犬病生ワクチン株は G 蛋白質 333(G333)位の 1 アミノ酸変異により弱毒化しており、同部位の Glu が Arg もしくは Lys に変異することにより強毒化する。したがって、より安全性の高い生ワクチンを開発するためには、複数の変異により弱毒化された狂犬病ウイルス株を樹立することが望まれる。しかし、G333 位以外の弱毒化変異はほとんど知られていない。一方、狂犬病ウイルス Ni-CE 株は、G333 位に強毒型の Arg を保有しているにもかかわらず、N 蛋白質の 273 および 394(N273/394)位等の変異により弱毒化していることが報告されている。この知見を応用し、複数の変異により弱毒化された狂犬病生ワクチン候補株を 2 株樹立し、これら株の生ワクチン株としての有用性を検討するために残存病原性、弱毒性状の安定性および免疫原性を評価した。

第 1 章では、Ni-CE 株の遺伝子操作系を用いて、複数の変異により弱毒化されたウイルス株の樹立を試みた。すなわち、同株の G333 位を強毒型の Arg から弱毒型の Glu に置換した Ni-CE(G333Glu)株を作出した。10<sup>5</sup> FFU の Ni-CE 株および Ni-CE(G333Glu)株を 6 週齢マウスに脳内接種したところ、両株ともに致死性を示さなかった。一方、Ni-CE 株感染マウスの体重は一過性に減少したのに対し、Ni-CE(G333Glu)株感染マウスの体重には顕著な変化が認められなかった。以上より、Ni-CE(G333Glu)株の残存病原性は高度に減弱していることが示された。

第 2 章では、狂犬病生ワクチン株である ERA 株の遺伝子操作系を用いて、複数の変異により弱毒化したウイルス株の樹立を試みた。同株の N273/394 位のアミノ酸(Phe および Tyr)を Ni-CE 株由来の Leu および His に、G333 位の Arg を Glu に置換することで ERA-N273/394-G333 株を作出した。10<sup>5</sup> FFU の ERA 株および ERA-N273/394-G333 株を 6 週齢マウスに脳内接種した結果、

ERA株感染マウスは全て死亡したのに対し、ERA-N273/394-G333株感染マウスは全て生存した。このとき、ERA-N273/394-G333株感染マウスには体重減少を含む明瞭な発症徴候は認められなかった。以上の成績より、ERA-N273/394-G333株の残存病原性は高度に減弱していることが明らかとなった。

狂犬病ウイルス弱毒固定毒株の多くは、哺乳マウスの脳において連続継代することでマウスに対する致死性を獲得する。このような特徴を利用し、哺乳マウス脳継代株と継代前の株の病原性の比較が、狂犬病ウイルスの弱毒性状の安定性を評価する方法として一般的に用いられてきた。そこで第3章では、Ni-CE(G333Glu)株およびERA-N273/394-G333株の弱毒性状の安定性を、哺乳マウス脳連続継代法により検証した。哺乳マウス脳での10継代した後に得られた両株の継代株の病原性を6週齢マウスに脳内接種( $10^5$  FFU)することで比較した。Ni-CE(G333Glu)継代株は、継代前と同様にマウスに致死感染を引き起こさなかった。また、本継代株のゲノムには、継代前の株の弱毒性状に関与するアミノ酸が全て保存されていた。一方、G333位の1アミノ酸変異により弱毒化されたERA-G333株の継代株が100%のマウスを死亡させたのと対照的に、ERA-N273/394-G333株の継代株は80%のマウスを生存させた。ERA-G333継代株およびERA-N273/394-G333継代株のG333位が弱毒型のGluから強毒型のLysに変異していたのに対し、ERA-N273/394-G333継代株のN273/394位は弱毒型のLeuおよびHisを維持していた。このことより、N273/394位の弱毒化変異には、G333位の変異による病原性復帰の程度を抑制する効果があると考えられた。以上より、Ni-CE(G333Glu)株およびERA-N273/394-G333株が強毒化するリスクは、G333位変異のみにより弱毒化した株よりも減弱していることが示された。

第4章では、Ni-CE(G333Glu)株およびERA-N273/394-G333株の免疫原性を検討した。Ni-CE(G333Glu)株およびERA-N273/394-G333株(それぞれ $10^6$ および $10^5$  FFU)を6週齢マウスに筋肉内接種し、6週間後における血清中和抗体価を測定した。また、これら免疫マウスに強毒のCVS株(25LD50)を脳内接種することで攻撃試験を実施した。その結果、各株免疫マウスの血清中和抗体価は、WHOが推奨する感染防御に必要な血清中和抗体価(0.5国際単位/ml)以上の値を示した。さらに、両株の免疫マウスの全個体はCVS株による攻撃に耐過した。これより、ERA-N273/394-G333株およびNi-CE(G333Glu)株は、免疫マウスに狂犬病ウイルスに対する感染防御能を賦与することが示された。

以上、本研究において複数の弱毒化変異を導入したNi-CE(G333Glu)株およびERA-N273/394-G333株が、G333位変異のみにより弱毒化されたウイルス株よりも高い安全性を有していることが明らかにされた。さらに、両株は免疫マウスに狂犬病ウイルスに対する感染防御能を賦与することも示されている。これらの知見は、複数の弱毒変異を導入した狂犬病ウイルスを用いることにより、本病の流行が続く開発途上国で利用可能な安全性の高い狂犬病生ワクチンを開発できる可能性を示している。

## 審 査 結 果 の 要 旨

現行の狂犬病生ワクチン株はG蛋白質333(G333)位の1アミノ酸変異により弱毒化しており、同部位のGluがArgもしくはLysへの変異により強毒化する。そこで、本研究では、複数の変異により弱毒化した狂犬病生ワクチン候補株を樹立し、生ワクチンとしての有用性を検討するために、安全性および免疫原性を評価した。

第1章では、Ni-CE株の遺伝子操作系を用いて、同株のG333位を強毒型のArgから弱毒型のGluに置換したNi-CE(G333Glu)株を作出した。脳内接種により、Ni-CE株感染マウスの体重は一過性に減少したのに対し、Ni-CE(G333Glu)株感染マウスの体重には顕著な変化が認められなかった。以上より、Ni-CE(G333Glu)株の病原性が高度に減弱していることを示した。

第2章では、狂犬病生ワクチン株であるERA株の遺伝子操作系のN273/394位のアミノ酸(PheおよびTyr)をNi-CE株由来のLeuおよびHisに、G333位のArgをGluに置換することでERA-N273/394-G333株を作出した。脳内接種によりERA株感染マウスは全

て死亡したのに対し、ERA-N273/394-G333 株感染マウスは全て生存した。このとき、ERA-N273/394-G333 株感染マウスには体重減少を含む明瞭な発症徴候も認められなかった。以上より、ERA-N273/394-G333 株の病原性は高度に減弱していることを明らかにした。

第3章では、本研究で作出した2株の弱毒性状の安定性を、哺乳マウス脳連続継代法により検証した。Ni-CE(G333Glu)継代株は、マウスに致死感染を引き起こさなかった。一方、G333位の1アミノ酸変異により弱毒化されたERA-G333株継代株が100%のマウスを死亡させたのに対し、ERA-N273/394-G333株継代株は80%のマウスを生存させた。以上より、両株が強毒化するリスクは、G333位変異のみにより弱毒化した株よりも減弱していることを示した。

第4章では、作出した2株の免疫原性について検討を行った。筋肉内接種による免疫により、各株接種マウスの血清中和抗体価は、感染防御に必要な血清中和抗体価(0.5 国際単位/ml)以上を示し、免疫された全個体は強毒 CVS 株による攻撃に耐過した。これより、両株は免疫マウスに狂犬病ウイルスに対する感染防御能を賦与することを示した。

以上、複数の弱毒化変異を導入したNi-CE(G333Glu)株およびERA-N273/394-G333株が、高い安全性と免疫原性を有していることを示した。これらの知見は、複数の弱毒化変異を導入した狂犬病ウイルスを用いることにより、本病の流行が続く開発途上国で利用可能な安全性の高い狂犬病生ワクチンを開発できる可能性を示している。

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。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Generation of a live rabies vaccine strain attenuated by multiple mutations and evaluation of its safety and efficacy  
著 者 名 : Nakagawa, K., Ito, N., Masatani, T., Abe, M., Yamaoka, S., Ito, Y., Okadera, K. and Sugiyama, M.  
学術雑誌名 : Vaccine  
巻・号・頁・発行年 : 30(24): 3610-3617, 2012

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Amino acid substitutions at positions 242, 255 and 268 in rabies virus glycoprotein affect spread of viral infection  
著 者 名 : Ito, Y., Ito, N., Saito, S., Masatani, T., Nakagawa, K., Atoji, Y. and Sugiyama, M.  
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology  
巻・号・頁・発行年 : 54 (2): 89-97, 2010
- 2) 題 目 : Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response  
著 者 名 : Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Sawaki, Y., Koyama, H. and Sugiyama, M.  
学術雑誌名 : Journal of Virology  
巻・号・頁・発行年 : 84(8): 4002-4012, 2010

- 3) 題 目 : Role of interferon antagonist activity of rabies virus phosphoprotein in viral pathogenicity  
著 者 名 : Ito, N., Moseley, G.W., Blondel, D., Shimizu, K., Rowe, C.L., Ito, Y., Masatani, T., Nakagawa, K., Jans, D.A. and Sugiyama, M.  
学術雑誌名 : Journal of Virology  
卷・号・頁・発行年 : 84(13): 6699-6710, 2010
- 4) 題 目 : Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity  
著 者 名 : Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Abe, M., Yamaoka, S. and Sugiyama, M.  
学術雑誌名 : Virus Research  
卷・号・頁・発行年 : 155(1): 168-174, 2010
- 5) 題 目 : Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission  
著 者 名 : Abe, M., Ito, N., Masatani, T., Nakagawa, K., Yamaoka, S., Kanamaru, Y., Suzuki, H., Shibano, K., Arashi, Y. and Sugiyama, M.  
学術雑誌名 : Journal of General Virology  
卷・号・頁・発行年 : 92(4): 952-960, 2011
- 6) 題 目 : Amino acid substitution at position 95 in rabies virus matrix protein affects viral pathogenicity  
著 者 名 : Ito, N., Mita, T., Shimizu, K., Ito, Y., Masatani, T., Nakagawa, K., Yamaoka, S., Abe, M., Okadera, K., Minamoto, N. and Sugiyama, M.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年 : 73(10): 1363-1366, 2011