

氏名（本（国）籍）	高 橋 龍 樹（岐阜県）
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 伊 藤 直 人
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博甲第578号
学位授与年月日	令和3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	狂犬病ウイルス小松川株の遺伝学的および生物学的性 状に関する研究
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 伊 藤 直 人

学位論文の内容の要旨

狂犬病は、重篤な神経症状、ほぼ 100%の致死率を特徴とするウイルス性人獣共通感染症である。発展途上国を中心として毎年 5.9 万人が狂犬病の犠牲になっていることから、本病の治療法の確立が急務となっている。しかし、現在も有効な治療法は確立されていない。その理由のひとつとして、狂犬病ウイルス野外株（街上毒）の病原性発現機序に関する情報が十分に蓄積されていないことが挙げられる。狂犬病の全症例に有効な治療法を確立するためには、遺伝学的に異なる複数の街上毒株の比較解析を実施し、いずれの株の病原性にも寄与する普遍的な事象を特定する必要がある。しかしながら、以前に解析された街上 毒株には、系統学的な偏りが存在する。具体的には、既知の狂犬病ウイルスの系統分類に基づく 8 つの系統群のうち、3 つの系統群に属する株のみが、これまでの病原性解析に使用されてきた。したがって、残り 5 つの系統群（Arctic-Related 他 4 つ）の株についても同様に病原性解析を実施することで、狂犬病ウイルスの病原性発現機序の本質を理解することができると考えられた。

このような背景の中、1940 年代の東京においてイヌから分離された小松川株に注目した。部分的塩基配列に基づく系統学的解析により、本株は、これまで詳細な病原性解析が行われていない Arctic-Related 群に属するウイルスであることが判明している。したがって、本

株が狂犬病ウイルスの病原性発現機序の解明に有用なツールとなることが期待される。しかしながら、本株の全ゲノム配列が決定されていないため、その系統学的起源の詳細や遺伝学的特徴は不明であった。また、病原性を含む生物学的性状についても、体系的な検討は実施されていなかった。一方、小松川株は、モルモットおよびマウスでの連続継代により維持されてきたため、街上毒株としての性状を失っている可能性が懸念されていた。そこで本研究では、小松川株の系統学的起源に関する詳細な知見を得ること、ならびに病原性解析における本株の有用性を評価することを目的として、本株の遺伝学的および生物学的性状の解析を行った。

第1章では、小松川株の全ゲノム配列を次世代シーケンス解析等により決定した上で、本株の起源を詳細に推定し、さらに本株が街上毒株としての性状を保持しているか否かについても遺伝学的な側面から検証した。全ゲノム配列の決定により、小松川株のゲノム RNA が 11,927 塩基によって構成されることが判明した。また、同配列に基づく系統学的解析では、本株が Arctic-Related 群に属し、1989 年にロシア沿海地域のタヌキから分離された街上毒 RV303 株と非常に近縁であることが明らかにされた。この成績より、本ウイルス株の祖先が大陸極東地域から日本に持ち込まれたことが推定された。小松川株と RV303 株の全ゲノム配列の相同率は 98.2%，各蛋白質のアミノ酸配列の相同率も 98.0～99.8% といずれも非常に高く、両株の各蛋白質に認められたアミノ酸残基の相違の総数はわずか 17 個であった。上記の遺伝学的解析の成績より、小松川株の生物学的性状が街上毒株と類似している可能性が高いと考えられた。

第2章では、小松川株が街上毒株と類似した生物学的性状を実際に保持しているか否かを検証する目的で、小松川株と、代表的な街上毒2株および実験室株（固定毒）3株の神経親和性および病原性の比較解析を実施した。神経系培養細胞における各株の増殖能および cell-to-cell 感染能を比較検討した結果、小松川株の増殖能および cell-to-cell 感染能は、いずれも街上毒各株と類似して低いことが示された。さらに、病原性を比較するために、マウスへの筋肉内接種により各株の LD₅₀ を算出した結果、小松川株の LD₅₀ (3.2×10^2 FFU) は、街上毒各株の LD₅₀ ($2.4 \times 10^3 \sim 3.3 \times 10^3$ FFU) と同等であった一方で、固定毒各株の LD₅₀ ($>1.5 \times 10^5$ FFU) よりも顕著に低いことが判明した。これらの成績より、小松川株が街上毒株に類似した神経親和性および病原性を有していることが明らかにされた。

以上のように、小松川株が街上毒株に類似した生物学的性状を保有していたため、本株は、病原性発現機序を解明する上で有用なツールとなると期待される。第3章では、小松川株の病原性発現の分子機序の解明のための技術的基盤を確立するため、ウイルスゲノム cDNA から感染性ウイルスを回収する技術、いわゆるリバーシジェネティクス法を本株において確立することを試みた。小松川株の完全長ゲノム cDNA を有するプラスミドを構築し、培養細胞に導入した結果、感染性ウイルス (rKoma 株) の回収に成功した。神経系培養細胞における rKoma 株の増殖能および cell-to-cell 感染能は、親株の小松川株 (wtKoma 株) と同程度であった。また、マウス筋肉内接種によって算出された rKoma 株の LD₅₀ (4.8×10^2 FFU) は wtKoma 株 (6.8×10^2 FFU) と同等であったため、rKoma 株の病原性は wtKoma 株と類似していることが確認された。これらの成績に基づき、小松川株のリバーシジェネティクス法が確立された。

と結論づけられた。

以上の検討により、小松川株が、狂犬病ウイルスの病原性発現機序の解明に有用なツールとなることが明らかにされた。本研究によって得られた小松川株の遺伝学的および生物学的性状に関する知見、ならびにリバーシジェネティクス法は、今後、病原性発現機序の解明、さらには、狂犬病の治療法等の開発に多大に貢献することが期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

狂犬病は、ほぼ 100%の致死率を特徴とする人獣共通感染症である。現在も治療法は存在しない。本病の治療法を確立するためには、遺伝学的に多様な狂犬病ウイルス野外株の解析により、病原性に寄与する普遍的な事象を分子レベルで特定する必要がある。しかし、系統群 Arctic-Related に属するウイルスの詳細な解析は、これまで実施されていない。1940 年代にイヌから分離された小松川株は、以前、部分的配列に基づき Arctic-Related 群に分類されており、狂犬病ウイルスの病原性解析に有用である可能性がある。一方、全ゲノム配列が未決定であるため、本株の遺伝学的特徴は不明であるとともに、病原性を含む生物学的性状についても不明な点が多い。本研究では、病原性解析における小松川株の有用性を評価する目的で、本株の遺伝学的および生物学的性状の解析を行った。本学位論文は 3 章からなり、以下のようにまとめられる。

第 1 章では、小松川株の全ゲノム配列を決定後、その遺伝学的特徴について検討した。全ゲノム配列の解析の結果、本株が Arctic-Related 群に属し、ロシア由来野外株の RV303 株と近縁であることが示された。また、両株の各蛋白質に認められたアミノ酸相違の総数はわずか 17 個であった。以上より、小松川株の遺伝学的性状が RV303 株に類似していることを示した。

第 2 章では、小松川株の神経親和性および病原性を代表的な野外株および実験室株と比較した。その結果、小松川株の神経親和性が野外株と同様に、実験室株よりも低いこと、さらに、マウスにおける小松川株の病原性は、実験室株よりも高く、野外株と同等であることを示した。以上より、小松川株の生物学的性状が野外株に類似していることが判明した。

第 3 章では、小松川株の病原性を分子レベルで解析するための技術基盤を得るため、本株のリバーシジェネティクス法の確立を試みた。完全長ゲノム cDNA を構築し、培養細胞に導入した結果、感染性ウイルスの回収に成功し、さらに、本ウイルスの神経親和性および病原性が、親株と同等であることを確認した。以上より、小松川株のリバーシジェネティクス法が確立されたと結論づけられた。

本研究で得られた知見および技術基盤は、今後、狂犬病ウイルスの病原性発現機序の解明、治療法等の開発に多大に貢献することが期待できる。

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 : Genetic and phenotypic characterization of a rabies virus strain isolated from a dog in Tokyo, Japan in the 1940s
著 者 名 : Takahashi, T., Inukai, M., Sasaki, M., Potratz, M., Jarusombuti, S., Fujii, Y., Nishiyama, S., Finke, S., Yamada, K., Sakai, H., Sawa, H., Nishizono, A., Sugiyama, M. and Ito, N.
学術雑誌名 : Viruses
巻・号・頁・発行年 : 12 (9) : 914, 2020

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Molecular function analysis of rabies virus RNA polymerase L protein by using an L gene-deficient virus
著 者 名 : Nakagawa, K., Kobayashi, Y., Ito, N., Suzuki, Y., Okada, K., Makino, M., Goto, H., Takahashi, T. and Sugiyama, M.
学術雑誌名 : Journal of Virology
巻・号・頁・発行年 : 91 (20) : e00826-17, 2017