岐阜大学機関リポジトリ
Gifu University Institutional Repository

逆遺伝学的手法による新型狂犬病経口ワクチンの開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-03-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 源, 宣之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/653

はしがき

狂犬病は感染発病すると高度医療の発達した現代においてもヒトを含めたあらゆる哺乳動物が100％死亡する、極めて危険な人獣共通感染症である。本病は約4,000年前より既に人類に知られていたが、世界における現在の発生状況は毎年ヒトで33,000件、動物で35,000件がWHOより報告されており、ワクチン接種を熱心に行っている一部の国を除いてここ数十年ほとんど減少していない。現在世界で使われている狂犬病ワクチンは本病の予防に有効であることは十分知られているにもかかわらず、何故このような状況を毎年続けているのであろう。その主な原因としては２つのことがあげられる。１つは、狂犬病の発生が続いている多くの発展途上国では犬が放し飼いにされ、また宗教上からもワクチン注射をしたがらないことである。他の１つは、先進国を含めて多数生息する野生動物に対して予防が出来ないことである。現在、旧西欧各国では野生動物に経口ワクチンを投与し、かなりの成果を上げている。しかし、使用しているのは、遺伝子組換え型あるいは弱毒生ワクチンで、いずれも不活化されておらず、しかも高価で発展途上国では使用出来ない。また、弱毒ワクチンは小型齧歯類に対して病原性を保持している。これらに対応するためには、高力価かつ安全で安価な経口不活化ワクチンの大量生産が不可欠である。経口ワクチンの開発は、単に発展途上国のためだけでなく、毎年ワクチン接種を行っている日本にとっても省力化の点で重要である。

最近、私共は、クローニングした狂犬病ウイルスcDNAから、ウイルス粒子を回収するリバース・ジェネテックス（逆遺伝学）法を確立した。この方法は任意に改変した遺伝子を保持した狂犬病ウイルスを創出させることが出来る。

そこで、本研究では、この逆遺伝学的手法を用いて、新世代の経口ワクチンの開発を試みた。すなわち、我が国の現行の動物用ワクチン株であるRC-HL株遺伝子を用いて、免疫原性を上げるために遺伝子を様々に工作した狂犬病ウイルスを作出し、既存の概念と異なる新世代ワクチンの開発実用化を目指した。

まず、１つ目にワクチンの安全性に重要な、病原制御アミノ酸領域の特定を強毒型の西ヶ原株と弱毒型のRC-HL株との様々なキメラウイルスを用いて行った。２つ目に細胞に感染してウイルス蛋白質を合成するが子孫ウイルスを産生しない「半生」ワクチン創世のための基礎実験を行った。３つ目に「半生」ワクチン株のM遺伝子欠損ウイルスを作成し、それらの免疫原性と動物に対する安全性を検討した。４つ目に本来の遺伝子配置順位の変更、糖(G)遺伝子の二重配置あるいは高い免疫原性を有するウイルス株遺

伝子との交換したキメラウイルスを作出した。得られた結果は以下のように要約された。

1．致死的感染を起こす強毒株と弱毒のRC-HL株との種々のキメラウイルスの病原性の有無から、G蛋白質の242位、255位および268位のアミノ酸が致死的感染に重要な役割を担っていることが明らかになった。**（学術論文1, 2, 7, 8, 10, 12; 口頭発表4, 7-12, 14, 15, 17, 21, 21, 24）**
2．従来のワクチニアウイルスを使わずに組換え狂犬病ウイルスを効率よく回収するT7RNAポリメラーゼ恒常発現細胞系を確立した。**（学術論文５；口頭発表13）**
3．T7RNAポリメラーゼ恒常発現細胞にM蛋白発現プラスミドを導入し、リバースジェネテックス法により、M遺伝子欠損ウイルスを回収した。M遺伝子欠損ウイルスは現行ワクチンのRC-HL株より免疫原性および安全性の高いことが確認された。**（学術論文９；口頭発表1, 18, 19, 22）**
4．免疫原性を向上させるためにG遺伝子を二重に、あるいは3’末端側に配置換えしたウイルスを構築し、G蛋白質発現の増強を確認した。**（口頭発表19, 23）**
5．病原性が強いが免疫原性の高い西ヶ原株とRC-HL株との様々なキメラウイルスを構築し、弱毒で増殖性および免疫原性の高い狂犬病ウイルス株を探索中である。**（学術論文12; 口頭発表11, 14, 20, 21, 24）**

以上の如く、逆遺伝学的手法により遺伝子を増強、組換え、欠損させた様々なウイルスを世界で初めて構築した。現在、それらの新たに創出されたウイルスの培養細胞での増殖性、免疫原性および安全性を調べているが、増殖性は高いが免疫原性が低いあるいはその逆などで、弱毒で増殖性および免疫原性の高い理想的なワクチン製造株は、まだ得られていない。したがって、理想的なワクチン製造株になる狂犬病キメラウイルスの作出とそれらの性状解析の研究を継続することを希望する。これまでに得られた技術を利用することにより、これまで以上に短時間に安価で免疫原性の高い次世代型経口ワクチンの開発が出来るであろう。

そこで、これまでに明らかに出来た新しい知見をもとに作成した論文を本報告書にまとめた。それらを参考にして、引き続き検討すべき課題の解決に当たりたい。なお、本研究の実施中に得られた関連論文も併せて報告書に掲載した。本研究を遂行するに当たり、私共の講座の教官、大学院生および学部学生諸君のご協力を頂いた。心から謝意を表したい。

最後に、科学研究費の補助を受けて本研究が実施され、かつこの研究成果報告書をまとめることが出来たことに対して、文部科学省および日本学術振興会をはじめ関係各位に深く感謝申し上げる。