

学 位 論 文 要 旨

氏名 井上 雄介

題 目 : Establishment of the novel method for detection of antibodies against all lyssaviruses and comparison of cross-reactivities among lyssaviruses
(全リッサウイルスに対する抗体検出法の確立と交差反応性の比較)

論文要旨 :

リッサウイルスはラブドウイルス科リッサウイルス属に属するウイルスである。リッサウイルス属の中でも特に狂犬病ウイルス (Rabies lyssavirus: RABV) は、ヒトを含む全ての哺乳動物に感染し、致死的な神経症状を引き起こす。狂犬病に対する対策が世界中で進められているにもかかわらず、現在でも年間約5万人の死亡者が報告されている。RABV に対してはワクチンもありウイルスに対する様々な研究が進んでいるが、その他のリッサウイルスに関しては殆ど研究が進んでいない。リッサウイルス属には現在までに RABV を含め 18 種のウイルスが見つかっており、RABV が含まれるフィログループ I、フィログループ II 及び未分類種の 3 つに分類されている。RABV 以外では少なくとも 6 種類のリッサウイルスで人への感染例が報告されており、致死感染を引き起こす。

本研究は、第 1 章でリッサウイルスに対する日本の RABV ワクチンの防御能の評価を行い、第 2 章で全リッサウイルス 18 種に対する抗体検出系の確立と交差反応性の比較を行った。

第 1 章 RABV ワクチンのリッサウイルスに対する有効性の評価とリッサウイルス 18 種の抗 G 蛋白血清の交差反応性の検討

本章は現在日本で使用されているヒト用・動物用の RABV ワクチンがリッサウイルスに対してどの程度交差反応を示すか評価した。また全リッサウイルス 18 種の G 蛋白に対する抗血清を製し、交差反応性の評価を行った。

リッサウイルスはフィログループ I の RABV (CVS 株)、ヨーロッパコウモリリッサウイルス 1 (EBLV-1)、ドーベンハーゲリッサウイルス (DUVV)、フィログループ II のモコラリッサウイルス (MOKV)、ラゴスコウモリリッサウイルス (LBV) の 5 種類を使用し、WHO により指定されている中和試験法を実施した。抗ワクチン血清は国内で市販されているヒト用ならびに犬用 RABV ワクチンをウサギ (各群 2 羽) に 6 回接種した後に回収した。G 蛋白に対する抗血清は各リッサウイルスの G 蛋白の発現プラスミドをウサギに 6 回接種した後に回収した。

中和試験の結果、ヒト用 RABV ワクチンを接種したウサギの抗血清は RABV に対する中和抗体価が最も高く、EBLV-1、DUVV に対する中和抗体価は RABV の中和抗体価と比較して、22.7% と 68.3% の値であった。一方でフィログループ II に属する MOKV と LBV に対する中和抗体価は、RABV に対する中和抗体価と比較して 100 倍以下、あるいは検出限界以下となった。動物用の RABV ワクチンも同様な結果となった。

(別紙様式第 3 号)

各リッサウイルスの抗 G 蛋白血清を評価した結果、フィログループ I に属するリッサウイルスの抗血清は、同じフィログループ I の RABV、EBLV-1、DUVV に対して高い中和抗体価を示したが、フィログループ II の MOKV と LBV に対しては低い中和抗体価を示した。フィログループ II に属するリッサウイルスの抗血清は、同じフィログループ II の MOKV と LBV に対して高い中和抗体価を示したが、フィログループ I のリッサウイルスに対する中和抗体価は低かった。また未分類種のリッサウイルスの抗血清は、5 種のリッサウイルスに対して検出限界以下となった。興味深いことにフィログループ I の EBLV-1 の G 蛋白と EBLV-2 の G 蛋白に対する抗血清はフィログループ II である MOKV、LBV に対しても比較的高い中和抗体価を示した。

以上のことから、日本で使用されている RABV ワクチンは、RABV と同じフィログループ I に属するリッサウイルスに対して防御効果はあるが、フィログループ II のリッサウイルスに対しては防御効果が低い可能性が示唆された。狂犬病以外のリッサウイルスに対するワクチン開発の必要性が改めて示された。また、EBLV-1 と EBLV-2 の G 蛋白は比較的多くのリッサウイルスに対して有効な抗体を誘導する可能性が示された。

第 2 章 シュードタイプウイルスを用いた 18 種類のリッサウイルスに対する抗体検出系の確立と交差反応性の比較

本章は狂犬病を含む 18 種類すべてのリッサウイルスに対する抗体検査系を確立し、リッサウイルス間の交差反応性を比較した。第 1 章で 5 種類のリッサウイルスを用いた中和試験を行ったが、それ以外の 13 種類のウイルスに関しては評価することができなかった。そこで水疱性口内炎ウイルスを用いたシュードタイプウイルス (VSVp) の系を確立し、全リッサウイルス 18 種で中和試験を可能にした。

第 1 章で用いた RABV ワクチンに対する抗血清を 18 種の VSVp で評価したところ、RABV と同じフィログループ I に属する 12 種の VSVp に対しては高い中和抗体価を示した。一方でフィログループ II に属する 3 種類のリッサウイルスの VSVp に対する中和抗体価は殆どが検出限界以下であった。また未分類の 3 種類のリッサウイルスの VSVp に対する中和抗体価は検出限界以下となった。

次に第 1 章で作製した各リッサウイルス G 蛋白に対する抗血清 18 種と VSVp18 種を用いて網羅的な中和試験を行った。その結果、フィログループ I に対する抗血清はフィログループ I の VSVp と、フィログループ II の抗血清はフィログループ II の VSVp と交差反応を示した。一方で未分類種のイコモリリッサウイルスとリレイダコウモリリッサウイルスに対する抗血清は殆どの VSVp と交差反応しなかった。そのなかでフィログループ I の EBLV-1 の G 蛋白と未分類種のウエストコーカサスコウモリリッサウイルスの G 蛋白に対する抗血清は比較的多くのリッサウイルスの VSVp に対して中和活性を示した。

以上のことから、全リッサウイルス 18 種類に対する抗体検査系を確立したことで、全リッサウイルスに対する中和試験や抗体の検出が可能になった

本研究により、全リッサウイルスに対する抗体検出系の確立と全 G 蛋白に対する抗血清の作製に成功した。これまで研究が進んでいない RABV 以外のリッサウイルスの研究のための基礎を確立することができた。この系を応用することで新たなワクチン開発や疫学調査が期待される。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	井上 雄介
審査委員	主 査：国立感染症研究所獣医科学部 獣医科学部長 前田 健
	副 査：鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副 査：山口大学 教授 岩田 祐之
	副 査：山口大学 教授 早坂 大輔
	副 査：山口大学 准教授 下田 宙
題 目	Establishment of the novel method for detection of antibodies against all lyssaviruses and comparison of cross-reactivities among lyssaviruses (全リッサウイルスに対する抗体検出法の確立と交差反応性の比較)
審査結果の要旨： 本論文では、狂犬病ウイルス以外はあまり検討が進んでいないリッサウイルスに対する解析を行った。第一章でリッサウイルスに対する日本の RABV ワクチンの防御能の評価を行い、第二章で全リッサウイルス 18 種に対する抗体検出系の確立と交差反応性の比較を行った。 第一章では現在日本で使用されているヒト用・動物用の RABV ワクチンがリッサウイルスに対してどの程度交差反応を示すか評価した。また全リッサウイルス 18 種の G 蛋白に対する抗血清を作製し、交差反応性の評価を行った。 リッサウイルスはフィログループ I の RABV (CVS 株)、ヨーロッパコウモリリッサウイルス 1 (EBLV-1)、ドーベンハーゲリッサウイルス (DUVV)、フィログループ II のモコラリッサウイルス (MOKV)、ラゴスコウモリリッサウイルス (LBV) の 5 種類を使用し、WHO により指定されている中和試験法を実施した。抗ワクチン血清は国内で市販されているヒト用ならびに犬用 RABV ワクチンをウサギ (各郡 2 羽) に 6 回接種した後に血清を回収した。G 蛋白に対する抗血清は各リッサウイルスの G 蛋白の発現プラスミドをウサギに 6 回接種した後に血清を回収した。 中和試験の結果、ヒト用 RABV ワクチンを接種したウサギの抗血清は RABV に対する中和抗体価が最も高く、EBLV-1、DUVV に対する中和抗体価は RABV の中和抗体価と比較して、22.7%と 68.3%の値であった。一方でフィログループ II に属する MOKV と LBV に対する中和抗体価は、RABV に対する中和抗体価と比較して 100 倍以下、あるいは検出限界以下となった。動物用の RABV ワクチンも同様な結果となった。	

各リッサウイルスの抗 G 蛋白血清を評価した結果、フィログループ I に属するリッサウイルスの抗血清は、同じフィログループ I の RABV、EBLV-1、DUVV に対して高い中和抗体価を示したが、フィログループ II の MOKV と LBV に対しては低い中和抗体価を示した。フィログループ II に属するリッサウイルスの抗血清は、同じフィログループ II の MOKV と LBV に対して高い中和抗体価を示したが、フィログループ I のリッサウイルスに対する中和抗体価は低かった。また未分類種のリッサウイルスの抗血清は、5 種のリッサウイルスに対して検出限界以下となった。興味深いことにフィログループ I の EBLV-1 の G 蛋白と EBLV-2 の G 蛋白に対する抗血清はフィログループ II である MOKV、LBV に対しても比較的高い中和抗体価を示した。

以上のことから、日本で使用されている RABV ワクチンは、RABV と同じフィログループ I に属するリッサウイルスに対して防御効果はあるが、フィログループ II のリッサウイルスに対しては防御効果が低い可能性が示唆された。狂犬病以外のリッサウイルスに対するワクチン開発の必要性が改めて示された。また、EBLV-1 と EBLV-2 の G 蛋白は比較的多くのリッサウイルスに対して有効な抗体を誘導する可能性が示された。

第 2 章では狂犬病を含む 18 種類すべてのリッサウイルスに対する抗体検査系を確立し、リッサウイルス間の交差反応性を比較した。まず水疱性口内炎ウイルスを用いたシェードタイプウイルス (VSVp) の系を確立し、全リッサウイルス 18 種で中和試験を可能にした。

RABV ワクチンに対する抗血清を 18 種の VSVp で評価したところ、RABV と同じフィログループ I に属する 12 種の VSVp に対しては高い中和抗体価を示した。一方でフィログループ II に属する 3 種類のリッサウイルスの VSVp に対する中和抗体価は殆どが検出限界以下であった。また未分類の 3 種類のリッサウイルスの VSVp に対する中和抗体価は検出限界以下となった。

次に各リッサウイルス G 蛋白に対する抗血清 18 種と VSVp18 種を用いて網羅的な中和試験を行った。その結果、フィログループ I に対する抗血清はフィログループ I の VSVp と、フィログループ II の抗血清はフィログループ II の VSVp と交差反応を示した。一方で未分類種のイコモマリッサウイルスとレイダコウモリリッサウイルスに対する抗血清は殆どの VSVp と交差反応しなかった。そのなかでフィログループ I の EBLV-1 の G 蛋白と未分類種のウエストコーカサスコウモリリッサウイルスの G 蛋白に対する抗血清は比較的多くのリッサウイルスの VSVp に対して中和活性を示した。

以上のことから、全リッサウイルス 18 種類に対する抗体検査系を確立したことで、全リッサウイルスに対する中和試験や抗体の検出が可能になった

一連の研究により、全リッサウイルスに対する抗体検出系の確立と全 G 蛋白に対する抗血清を作製に成功し、これまで研究が進んでいない RABV 以外のリッサウイルスの研究のための基礎を確立することができた。この系を応用することで新たなワクチン開発や疫学調査が今後期待される。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の論文として、妥当なものであると判断された。