

学 位 論 文 要 旨

氏名 原田 倫子

題 目 : Studies on the factors associated with the cell adaptation of the rabies vaccine strain
HEP-Flury
(狂犬病ウイルス HEP-Flury 株の細胞馴化関連因子に関する研究)

論文要旨 :

狂犬病ウイルスはほぼ全ての哺乳類に感染し、致死性脳炎を主徴とする動物由来感染症を引き起こす。狂犬病ウイルスは大きく分けて、街上毒株と固定毒株があり、固定毒株は街上毒株を動物における脳内継代や培養細胞での継代により樹立された株である。この固定毒株を用いて、現在までに多くのワクチンが作製され、これらのワクチンにより狂犬病の発生が制御されてきた。その中の 1 つとして、鶏胚初代培養細胞で増殖された HEP-Flury 株由来のワクチンがある。この HEP-Flury 株は、街上毒株を鶏卵で 180 回以上継代し、樹立した株であり、ワクチン製造においても鶏初代培養細胞が使用されてきた。本研究では HEP-Flury 株を用いてワクチン製造のためのアフリカミドリザル腎由来培養細胞(Vero 細胞)での継代、あるいは診断に使用されるマウス神経芽腫(MNA)細胞で増殖の際に生じた変異を詳細に解析することにより、馴化に伴う狂犬病ウイルスの性状変化を解析した。

第一章では、従来の鶏胚初代培養細胞での増殖方法では、製造工程が煩雑なため、より効率のよいワクチン生産を目的に、ワクチン株である HEP-Flury 株の Vero 細胞への馴化を試み、その性状を解析した。本研究室保有 HEP-Flury(HEP)株を Vero 細胞に接種し、細胞変性効果(CPE)が認められるまで感染細胞を継代した。CPE が認められた後は上清継代を繰り返し、10 継代株(HEP-10V)、30 継代株(HEP-30V)を作製した。HEP-10V、HEP-30V を用いて、Vero 細胞における増殖性を解析し、継代による塩基配列の変化や抗原性や病原性等を比較した。また、HEP 株と比較して加わったアミノ酸変異による影響を解明するために、組換えウイルス株を合計 18 株作製した。それらを用いて、増殖性や細胞への侵入性や発現等を解析した。Vero 細胞で HEP 株を 10 あるいは 30 回継代した結果、HEP-10V では Vero 細胞において有意に増殖性の向上が認められ、HEP-30V で更なる増殖性の向上が認められた。塩基配列の変化を解析すると、HEP-10V 株では 3 ヶ所のアミノ酸変異が認められ、HEP-30V 株ではさらに 4 ヶ所のアミノ酸変異が加わった。各ウイルスは Vero 細胞での増殖性が向上していたが、病原性や抗原性は親株とほぼ同等であった。本研究は、リバースジェネティクス法にて作製した組換え HEP-Flury(rHEP)株を用いて Vero 細胞への馴化に伴うアミノ酸変異の効果を解析した。Vero 細胞の 10 継代過程で認められた P、G、L 遺伝子の変異を挿入した組換えウイルスではオリジナル株と比較して、G 変異株で軽度 Vero 細胞における増殖性が上昇し、P 変異株では更に上昇した。また、P 及び G 変異を組合せる

(別紙様式第 3 号)

ことで更なる上昇が認められた。そして、30 継代株では 10 継代株に更に G 遺伝子に 3 ヶ所の変異を挿入した株で増殖性の向上が認められた。水疱性口内炎ウイルスを用いた非増殖型シェードタイプウイルスに 10 継代株及び 30 継代株の G 蛋白を外套させ、Vero 細胞における侵入性を比較した結果、30 継代株の G 蛋白外套ウイルスは有意に侵入効率が上昇した。Vero 細胞の馴化に関与する 5 ヶ所の変異を挿入した rHEP-PG4 株を作製し、増殖性・抗原性を比較した結果、HEP-30V と同様であり、Vero 細胞馴化に必要な最少変異を同定した。本研究により、HEP 株の Vero 細胞馴化には P 遺伝子と G 遺伝子の変異が関与していることが明らかとなった。また、30 継代で認められた G 遺伝子の変異が Vero 細胞への侵入に関与していた。以上のことより、Vero 細胞への馴化には P 遺伝子 1 ヶ所、G 遺伝子 4 ヶ所のアミノ酸が関与していることが明らかとなった。Vero 細胞馴化にかかわる 5 ヶ所の変異を有する rHEP-PG4 株の作製により安定したワクチン親株の製造が可能になった。

第二章では、HEP 株の遺伝子配列を基に組換え HEP (rHEP)株を作製し、親株である HEP 株との増殖性を比較した結果、HEP 株は MNA 細胞では rHEP 株より高い増殖性を示したため、HEP 株及び rHEP 株の性状を比較解析した。リバーシジェネティクス法にてオリジナル HEP 株の塩基配列を基に rHEP 株、更に、変異株として rHEP-M(D80N)株を作製し、MNA 細胞ならびに鶏胚細胞(DF-1 細胞)で増殖性を比較した。さらに、乳飲みマウス・成マウスに脳内接種し病原性を比較した。MNA 細胞への接種前の rHEP、HEP 株間の塩基配列を比較した結果、違いは認められなかった。MNA 細胞で増殖した HEP 株の塩基配列を解析した結果、マトリックス(M)蛋白に 1 塩基変異が混在していた。一方で、rHEP 株では変異は認められなかった。この 1 塩基変異により 1 アミノ酸変異 M(D80N)が生じていた。M(D80N)変異は、HEP 株を MNA 細胞で繰り返し継代することで優位になった。限界希釈法により MNA 細胞に接種後培養した HEP 株から、親株のウイルスと同じ塩基配列を持つ cloned HEP (cHEP)株と変異を持つ cHEP-M(D80N)株を樹立し、性状解析を行った。その結果、cHEP-M(D80N)株は有意に MNA 細胞で増殖性が向上していた。リバーシジェネティクス法により M(D80N)を持つ rHEP-M(D80N)株を作製し、性状解析を行った結果、rHEP-M(D80N)株は rHEP 株と比較し、MNA 細胞で有意に増殖性の向上が認められた。一方、DF-1 細胞では株間における増殖性の有意な差は認められなかった。そして、これらの 2 株をそれぞれ乳飲みマウス・成マウスに脳内接種した結果、乳飲みマウスでは病原性に差は認められなかったが、成マウスにおいては rHEP-M(D80N)株で有意に体重減少が誘導され、脳内のウイルス力価を解析した結果、rHEP-M(D80N)株接種群で有意にウイルスの増殖が向上していた。本研究では M 蛋白で認められた M(D80N)変異がマウスにおける神経病原性ならびに馴化に関与していることが明らかとなった。今後、狂犬病の神経細胞での増殖性並びに神経病原性における M 蛋白の機能を明らかとすることが重要である。

本研究は、Vero 細胞や MNA 細胞での継代に伴うアミノ酸変異を明らかにし、また、これらの変異が増殖性や病原性に関わっていることを明らかにした。狂犬病ウイルスを含む多くの病原体で細胞や異種の動物を用いて継代することにより、病原性、増殖性、抗原性などが変化をした馴化ウイルスが作製されている。これらの馴化に関わる機序や細胞側因子を特定することにより、今後新たなワクチンの作製や治療等に応用展開することが期待される。

(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 | 原田 倫子 |
| 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 佐藤 宏 |
| | 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 | Studies on the factors associated with the cell adaptation of the rabies vaccine strain HEP-Flury (狂犬病ウイルス HEP-Flury 株の細胞馴化関連因子に関する研究) |
| <p>審査結果の要旨：</p> <p>本研究では狂犬病ウイルスに対する現行のワクチン株である HEP-Flury 株を用いてワクチン製造のためのアフリカミドリザル腎由来培養(Vero)細胞での継代,あるいは診断のための MNA(マウス神経芽腫)細胞における増殖の際に生じた変異を詳細に解析することにより,狂犬病ウイルスの性状解析を行った。</p> <p>第一章では,従来の鶏胚初代培養細胞での増殖方法では,製造工程が煩雑なため,より効率のよいワクチン生産を目的に,ワクチン株である HEP-Flury 株の Vero 細胞への馴化を試み,その性状を解析した。本研究室保有 HEP-Flury (HEP)株を Vero 細胞に接種し,10 継代株 (HEP-10V)、30 継代株 (HEP-30V)を作製した。HEP-10V では Vero 細胞において有意に増殖性の向上が認められ,HEP-30V で更なる増殖性の向上が認められた。塩基配列の変化を解析すると,HEP-10V 株では 3ヶ所のアミノ酸変異が認められ,HEP-30V 株ではさらに 4ヶ所のアミノ酸変異が加わった。各ウイルスは Vero 細胞での増殖性が向上していたが,病原性や抗原性は親株とほぼ同等であった。Vero 細胞の 10 継代過程で認められた P、G、L 遺伝子の変異を挿入した組換えウイルスではオリジナル株と比較して,G 変異株で軽度に Vero 細胞における増殖性が上昇し,P 変異株では更に上昇した。また,P 及び G 変異を組合せることで更なる上昇が認められた。そして,30 継代株では 10 継代株に更に G 遺伝子に 3ヶ所の変異を挿入した株で増殖性の向上が認められた。水疱性口内炎ウイルスを用いた非増殖型シュードタイプウイルスに 10 継代株及び 30 継代株の G 蛋白を外套させ,Vero 細胞における侵入性を比較した結果,30 継代株の G 蛋白外套ウイルスは有意に侵入効率が上昇した。Vero 細胞の馴化に関与する 5ヶ所の変異を挿入した rHEP-PG4 株を作製し,増殖性・抗原性を比較</p> | |

した結果、HEP-30V と同様であり、Vero 細胞馴化に必要な最少変異を同定した。本研究により、Vero 細胞への馴化には P 遺伝子 1 ヶ所、G 遺伝子 4 ヶ所のアミノ酸が関与していることが明らかとなった。Vero 細胞馴化にかかわる 5 ヶ所の変異を有する rHEP-PG4 株の作製により安定したワクチン親株の製造が可能になった。

第二章では、HEP 株の遺伝子配列を基に組換え HEP (rHEP) 株を作製し、親株である HEP 株との増殖性を比較した結果、HEP 株は MNA 細胞では rHEP 株より高い増殖性を示したため HEP 株及び rHEP 株の性状を比較解析した。リバーシジェネティクス法にてオリジナル HEP 株の塩基配列を基に組換え HEP (rHEP) 株、更に、変異株として rHEP-M (D80N) 株を作製し、MNA 細胞ならびに鶏胚細胞 (DF-1) で増殖性を比較した。さらに、乳飲みマウス・成マウスに脳内接種し病原性を比較した。MNA 細胞への接種前の rHEP、HEP 株間の塩基配列を比較した結果、違いは認められなかった。MNA 細胞で増殖した HEP 株の塩基配列を解析した結果、マトリックス (M) 蛋白に 1 塩基変異が混在していた。一方で、rHEP 株では変異は認められなかった。この 1 塩基変異により 1 アミノ酸変異 M (D80N) が生じていた。M (D80N) 変異は、HEP 株を MNA 細胞で繰り返し継代することで優位になった。限界希釈法により、親株のウイルスと同じ塩基配列を持つ cloned HEP (cHEP) 株と変異を持つ cHEP-M (D80N) 株を樹立し、性状解析を行った。その結果、cHEP-M (D80N) 株は有意に MNA 細胞で増殖性が向上していた。リバーシジェネティクス法により M (D80N) を持つ rHEP-M (D80N) 株を作製し、性状解析を行った結果、rHEP-M (D80N) 株は rHEP 株と比較し、MNA 細胞で有意に増殖性の向上が認められた。また、これらの 2 株をそれぞれ乳飲みマウス・成マウスに脳内接種した結果、乳飲みマウスでは病原性に差はなかったが、成マウスにおいては rHEP-M (D80N) 株で有意に体重減少が誘導され、脳内のウイルス力価を解析した結果、rHEP-M (D80N) 株接種群で有意にウイルスの増殖が向上していた。本研究では M 蛋白で認められた M (D80N) 変異がマウスにおける神経病原性ならびに馴化に関与していることが明らかとなった。今後、狂犬病の神経細胞での増殖性並びに神経病原性における M 蛋白の機能を明らかとすることが重要である。

本研究は、Vero 細胞や MNA 細胞での継代に伴うアミノ酸変異を明らかにし、また、これらの変異が狂犬病ウイルスの増殖性や病原性に関わっていることを明らかにした。狂犬病ウイルスを含む多くの病原体で細胞や異種の動物を用いて継代することにより、病原性、増殖性、抗原性などが変化した馴化ウイルスが作製されている。これらの馴化に関わる機序や細胞側因子を特定することにより、今後新たなワクチンの作製や治療等に応用展開することが期待される。

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。