

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 石田 大歩

D 型インフルエンザウイルス (D 型ウイルス) は、2011 年に米国で呼吸器症状を呈するブタから発見された新しいインフルエンザウイルスである。その後の疫学調査によって D 型ウイルスの本来の宿主はウシであり、畜産業界における経済損失が最も大きい牛呼吸器病症候群 (BRDC) の要因ウイルスであることがわかってきた。現在、BRDC の対策として他の呼吸器病ウイルスに対するワクチンがあるが制御されていない。D 型インフルエンザワクチンの導入により BRDC を制御できる可能性から、米国で不活化ワクチンが試作されたが感染防御効果は低かった。したがって、呼吸器感染症に対する高い効果が期待される弱毒生ワクチンの開発が望まれる。しかし、D 型ウイルスを弱毒化する遺伝子変異はわかっていない。ウイルスの分子解析や組換えワクチンの作出において、人工的に任意の変異株が作出できるリバーシジェネティクス法は強力なツールとなる。本研究では、D 型ウイルスのリバーシジェネティクス法を開発し、それをウイルスの性状解析やワクチンウイルス候補株の構築に応用した。

第 1 章では、D 型ウイルスのリバーシジェネティクス法を開発を目的とした。まず、野外分離株の詳細なゲノム配列を再検証したところ、7 分節のゲノム RNA の 3' 末端の塩基が、これまでの報告とは異なりウラシルであることがわかった。この解析に基づいて構築したゲノム RNA を合成する 7 種類のプラスミドと RNA ポリメラーゼを含むウイルスタンパク質を発現する 4 種類のプラスミドを同時に HRT-18G 細胞に導入することで、組換え D 型ウイルスの作出に成功した。しかし、その増殖性は野生型ウイルスと比べ著しく低下していた。そこで、組換えウイルス粒子の各ゲノム RNA 分節の割合を調べたところ、PB2、P3、NP 分節の割合が低下していた。そこで、各 RNA 合成プラスミドの割合を調整して細胞に導入したところ、野生型ウイルスと同等の増殖性を示す組換えウイルスの作出に成功した。これにより、D 型ウイルスのリバーシジェネティクス法が確立され、ウイルスの基礎解析や応用研究に必要な任意の変異ウイルスを人工的に作出することが可能になった。

第 2 章では、確立したリバーシジェネティクス法により、NS1 と NS2 遺伝子を別の分節 (人工 NS1 と NS2 分節) にもつ 8 分節の組換えウイルスを作出し、その性状を評価した。

その結果、レスキューした 8 分節の D 型ウイルスの増殖性は、7 分節の野生型ウイルスよりも著しく低下していた。さらに、8 分節システムを NS1 あるいは NS2 タンパク質の部分欠損変異体の作出に応用したところ、両タンパク質の N 末端側にある共通領域（1-63 番目のアミノ酸）が NS1 タンパク質にとっては増殖に必須であるが、NS2 タンパク質にとっては必須でないことがわかった。これらの成績は、D 型ウイルス粒子には人為的に 8 分節の RNA 分節を搭載できること、この方法によりこれまで不可能であった NS1 と NS2 タンパク質の独立した機能解析ができること、さらにウイルスの弱毒化に応用できることが示された。

第 3 章では、A 型インフルエンザウイルスの高温感受性変異を導入した D 型ウイルスの温度感受性とワクチン効果を検証した。リバーシジェネティクス法を用い、A 型ウイルスの高温感受性変異を D 型ウイルスの PB2 および PB1 タンパク質にそれぞれ導入した変異体（rD/OK-AL）を作出したところ、33℃で増殖するが 37℃では増殖せず、さらにマウスの下部気道で増殖しない高温感受性を獲得していることがわかった。さらに、rD/OK-AL はマウスに病原性がないこと、さらに感染マウスを野生型ウイルスで攻撃したところ、攻撃後にウイルスは一切検出されず完全な防御応答を示すことがわかった。これらの成績は、rD/OK-AL が D 型インフルエンザに対する安全な弱毒生ワクチンの候補株になりうることを示している。

本研究によって、独自の D 型インフルエンザウイルスのリバーシジェネティクス法が確立された。この方法は、ゲノムに任意の変異を導入した組換え変異ウイルスの作出を可能にし、ウイルスの増殖性や病原性の分子機構の解明等の基礎研究、さらに BRDC 制御のブレイクスルーになりうる D 型インフルエンザワクチン開発等の応用研究に大きく貢献することが期待できる。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。