

審査の結果の要旨

氏名 上間 亜希子

ブニヤウイルス科オルトブニヤウイルス属のアカバネウイルス (AKAV) が原因のアカバネ病は、ウシ、ヒツジ、ヤギ等の反芻動物が罹患する疾患であり、その流行は畜産業界に多大な経済的損失をもたらす。AKAV に感染した妊娠動物に臨床症状はないが、子宮感染した胎子は、流産、早産、死産、もしくは関節拘縮症および水頭性無脳症といった先天性異常を伴う。ワクチンの使用によりアカバネ病は減少したが、現在も日本や韓国で散発的に発生がみられている。最近、AKAV の抗原性および病原性変異体が分離されており、それらは初期に分離された株と防御抗体の交差反応性が低く、これらに対応できる新しいワクチンの開発が期待されている。そこで本論文では、効果的な組換え AKAV 作出法の確立、および作出した組換えウイルスの安全性とワクチン効果の検証、さらに確立した組換え AKAV 作出技術を別の病原体の抗原を発現する二価ワクチン開発に繋げるべく、外来遺伝子挿入 AKAV の構築法の確立を目的とした。

現在の AKAV 弱毒生ワクチンはアカバネ病の減少をもたらしたものの、抗原性および病原性変異体の制御は困難である。こういった変異株の出現に迅速に対応するには、より効率的にワクチンウイルスが作出できるリバーシジェネティクス技術が必要である。そこで、第1章では、新しいワクチンの開発に応用できる組換え AKAV 作出技術の確立を目指し、T7 RNA polymerase に基づくリバーシジェネティクス法を AKAV に初めて応用した。その結果、組換えワクチン株 TS-C2 ウイルス (rTTT) と、非構造タンパク質 NSs を欠損させた変異体ウイルス (rTTTΔNSs) の作出に成功した。この方法は、RNA polymerase I に基づく従来の方法に比べて、効率良く組換え AKAV を作出できることが示された。

第2章では、第1章で作出した rTTT と rTTTΔNSs について、妊娠ヤギを用いて、安全性とワクチン効果を評価した。どちらの組換えウイルスも妊娠ヤギに臨床症状を起こさなかったが、rTTT 接種で胎子脳からごく少量の AKAV RNA が検出された。rTTTΔNSs 接種ではウイルス RNA は検出されなかった。対照的に、野生型 Iriki 株の接種は妊娠ヤギにウイルス血症を引き起こし、胎子の水頭性無脳症や大脳半球の低形成を引き起こした。免疫効果では、rTTT や rTTTΔNSs を投与した全てのヤギで、現行ワクチンと同レベルの中和抗体価が検出された。これらの結果によ

り、妊娠ヤギ感染モデルで、NSs 欠損株は元株より弱毒化されており、強い免疫反応を誘導することが示された。

第3章では、二価ワクチン開発への応用性を念頭に蛍光タンパク質発現組換え AKAV の作出法の確立を目指した。ブニヤウイルス科フレボウイルス属のリフトバレー熱ウイルス (RVFV) の S ゲノムの遺伝子間領域を利用して、マイナス鎖に N/NSs とプラス鎖に緑色蛍光タンパク質 (eGFP) をコードしたアンビセンス AKAV S ゲノムの構築という方法を用いることで、eGFP 発現組換え AKAV (eGFP-AKAV) の作出に成功した。組換えウイルスは、eGFP 遺伝子を安定して保持することが示された。また、構築した AKAV のアンビセンス S 分節における、RVFV と異なる遺伝子転写終結メカニズムも明かにした。eGFP-AKAV を乳のみマウスに腹腔内投与したところ、親株 AKAV 接種時と同等の神経症状や致死率がみられ、感染マウス脳組織で eGFP 蛍光を検出した。

第4章では、二価ワクチンの実用性を目指し、第3章で作出した eGFP-AKAV の蛍光強度の向上法を検討した。eGFP-AKAV では感染細胞での蛍光発現の遅延が観察されたが、eGFP-AKAV のアンビセンス S 分節の 5' UTR の 3'側領域を部分欠損させた変異ウイルスでは、蛍光発現が著しく増強した。また、5' UTR を 38 nt まで短くした eGFP-AKAV/38 においても、元株の eGFP-AKAV と同等の増殖性を保持していた。これらの変異体では、S 分節 5' UTR の欠損により複製プロモーター活性が上昇することで、感染細胞での蛍光発現が増強することが示唆された。

本論文において、筆者は、T7 RNA polymerase を用いた新しい AKAV リバースジェネティクス法を確立し、それを用いて NSs 欠損組換えウイルスの作出に成功した。そのワクチン適用は、野外で感染した個体とワクチン接種個体の識別ができる可能性があり、今後のワクチン候補として最有力である。さらに、革新的な方法により、外来遺伝子を安定に発現する組換え AKAV の作出にも成功した。今後の多価ワクチン作製に応用できる矚目すべき成果であり、家畜の感染症の制御に大いに貢献することが期待される。また、著者が作出した蛍光発現 AKAV ウイルスは、いまだ同定されていない宿主のウイルスレセプターや、動物体内での感染動態の詳細な解明のための強力なツールになると期待される。以上のように、本論文で得られた研究成果は、アカバネ病の理解と制御に貢献するものであり、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。