

博士論文（要約）

遺伝子組換え技術を用いた  
アカバネウイルスの作出およびその応用

上間 亜希子

目次.....	2
要旨.....	4
略語.....	8
<b>序章</b>	
アカバネウイルスの分離と流行.....	10
アカバネウイルスの分類.....	11
アカバネウイルスの構造.....	13
アカバネウイルスの侵入と増殖環.....	14
アカバネウイルスの伝播様式.....	15
アカバネウイルスの病態.....	17
アカバネウイルスの感染防御.....	20
目的.....	23
図.....	24
<b>第1章 新しい遺伝子組換え技術を用いたアカバネウイルスの作出.....</b>	<b>27</b>
要旨.....	28
背景と目的.....	29
材料と方法.....	30
結果.....	33
考察.....	36
表、図.....	38

第2章 ヤギを用いた新規アカバネウイルスワクチン候補株の検討.....	43
要旨.....	44
背景と目的.....	45
材料と方法.....	46
結果.....	49
考察.....	51
表、図.....	53
第3章 蛍光タンパク発現アカバネウイルスの作出と解析.....	58
要旨.....	59
背景と目的.....	60
材料と方法.....	62
結果.....	68
考察.....	72
表、図.....	76
第4章 蛍光タンパク発現アカバネウイルスの改変による蛍光発現の上昇.....	85
総合考察.....	87
引用論文.....	91
謝辞.....	105

## 論文の内容の要旨

論文題目 遺伝子組換え技術を用いたアカバネウイルスの作出およびその応用

獣医学 専攻  
氏 名 上間 亜希子

アカバネウイルス (AKAV) が原因となるアカバネ病は、ウシ、ヒツジ、ヤギ等の反芻動物が罹患するウイルス性疾患であり、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は臨床症状を示さないが、子宮感染によりウイルスに暴露された胎子は、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 (AH syndrome) を伴う。ワクチン接種によりアカバネ病の発生は減少したが、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、このような変異体は、初期に分離された株と防御抗体の交差反応性が低いことが分かっている。分子生物学的研究は、ワクチン開発に重要な役割を果たしており、アカバネ病をコントロールするための戦略開発を担う。組換え AKAV を効率的に作出することができれば、従来のワクチンより安全で効果的な組換えワクチン株の迅速な開発が可能となる。そこで本研究では、既存の AKAV 作出法よりも効果的な組換え AKAV 作出法の確立を試みた。さらに、その作出法により作出した組換えワクチンウイルスの、宿主動物であるヤギへの接種試験を行った。また組換え AKAV 作出技術を、別の病原体の抗原領域を発現する二価ワクチン開発に繋げるために、外来遺伝子挿入 AKAV の構築法および、効果的な外来遺伝子発現をもたらす改変操作について報告する。

## 第1章 新しい遺伝子組換え技術を用いたアカバネウイルスの作出

AKAV 弱毒生ワクチンの発達は、アカバネ病の発生を減らして来たが、近年報告されているような抗原性および病原性の変異体の出現に迅速に対応するためには、より効率的な方法で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システムが必要である。本研究では、AKAV では初めてとなる T7 RNA polymerase に基づくリバーシジェネティクス法を利用して、組換えワクチン株 TS-C2 ウイルス (rTTT) と、非構造タンパク NSs を欠損させた変異体ウイルス (rTTTΔNSs) を作出した。この方法により、これまでに確立されていた RNA polymerase I に基づくリバーシジェネティクス法に比べて、効率良く組換え AKAV を回収することが可能となった。

## 第2章 ヤギを用いた新規アカバネウイルスワクチン候補株の検討

第1章で作出した rTTT と rTTTΔNSs について、妊娠ヤギにおける、安全性とワクチンとしての有用性を評価した。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、wt 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、市販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、強い免疫反応を引き出すことが証明された。rTTTΔNSs のような NSs 欠損組換えウイルスのワクチン適用は、野外で感染した個体とワクチン接種個体の識別 (DIVA) ができる可能性があり、アカバネ病の流行をコントロールするのに有用である。

### 第3章 蛍光タンパク発現アカバネウイルスの作出と解析

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とプラス鎖に高感度緑色蛍光タンパク質 (eGFP) をコードした、アンビセンスAKAV Sゲノムを人工的に構築し、eGFP発現組換えAKAV (eGFP-AKAV) を作出した。作出した組換えウイルスは、アンビセンスRNAでコードしたeGFP遺伝子を安定して保持していた。RVFVのアンビセンスS分節では、NとNSsの転写終結サイトはある特定のシグナル配列によって決定されているが、人工的に構築したAKAVのアンビセンスS分節では、RVFVの場合と異なったメカニズムで転写終結していた。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蛍光が検出できた。

### 第4章 蛍光タンパク発現アカバネウイルスの改変による蛍光発現の上昇

第3章で作出した eGFP-AKAV は、感染細胞で、CPE が起きた後に蛍光が検出されるが、eGFP-AKAV のアンビセンス S 分節における 5' UTR の 3'側領域を段階的に削って作出した mutant ウイルスは、感染細胞で CPE が起こる前に蛍光発現した。5' UTR を 38 nt まで短くした eGFP-AKAV/38 は、元株の eGFP-AKAV や 5' UTR を 42 nt まで短くした eGFP-AKAV/42 よりも、感染細胞で十分大きなプラックを形成し、その大きさは wt 株と同等であった。また eGFP-AKAV/38 のウイルス増殖能は、感染 48 時間までの間、eGFP-AKAV や eGFP-AKAV/42 に比べてわずかに高かった。感染細胞で蛍光発現が早まった原因が、eGFP 転写活性の上昇によるものかは確認できなかったが、S 分節 5' UTR の欠損により、複製プロモーター活性の上昇によるアンチゲノムからゲノムへの RNA 合成効率の上昇が確認された。

以上のように、本研究では、T7 RNA polymerase を用いたリバースジェネティクスによる AKAV 作出法と、それに基づいた外来遺伝子挿入 AKAV 作出法を確立した。これらは、宿主のウイルスレセプターや感染動態の詳細な解明および、多価ワクチン作製による感染症の制御に貢献することが期待される。

## 略語

aa	amino acid
AH syndrome	arthrogryposis-hydranencephaly syndrome
AKAV	Akabane virus
bp	base pair
BUNV	Bunyamwera virus
CNS	central nervous system
CPE	cytopathic effect
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DIVA	differentiating infected from vaccinated animals
eGFP	enhanced green fluorescence protein
FCS	fetal calf serum
HE	hematoxylin–eosin
IGR	intergenic region
LACV	La Crosse virus
MAb	monoclonal antibody
MOI	multiplicity of infection
nt	nucleotide
ORF	open reading frame
PFU	plaque forming unit
RACE	rapid amplification of cDNA ends



RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RNP	ribonucleoprotein
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction assay
RVFV	Rift Valley Fever virus
SBV	Schmallenberg virus
TINV	Tinaroo virus
ts	temperature sensitive
UTR	untranslated region
wt	wild-type

## 序章

### アカバネウイルスの分離と流行

アカバネウイルス (*Akabane virus*: AKAV) が原因となるアカバネ病は、ウシ、ヒツジ、ヤギ等の反芻動物が罹患するウイルス性疾患であり、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は臨床症状を示さないが、子宮感染によりウイルスに暴露された胎子は、流産、早産、死産、もしくは関節拘縮症および水頭性無脳症 (AH) syndrome といった先天性異常を伴う (Inaba et al., 1975)。

アカバネ病に似た節足動物媒介疾患は、1951～1955 年にオーストラリアで最初に報告された (Blood, 1956) が、その症例ではウイルス分離は行われなかった。ヤブカ属が媒介するアルボウイルスを対象とした調査により、1959 年に日本の群馬県赤羽村で、AKAV の JaGar39 株が蚊 (ヤブカ、コガタアカイエカ) から初めて分離された (Matsuyama et al, 1960; Oya et al., 1961)。アカバネ病の発生は、1974 年にオーストラリア、1972～1975 年に日本、1969～1970 年にイスラエルで初めて報告され (Inaba et al., 1975; Hartley et al., 1975; Shimshony, 1980)、その後、日本、イスラエル、トルコ、オーストラリアで大流行が起こっている (Shimshony, 1980; Inaba, 1979; Yonguç et al., 1982)。日本では、1972 年から 1975 年の間に、42,000 件以上の奇形胎子や異常産がウシで発生した (Inaba et al., 1975)。さらに AKAV は、多くの熱帯や亜熱帯地域でも検出されており (Bryant et al., 2005; Chang et al., 1998; Liao et al., 1996; Al-Busaidy et al., 1987; Taylor and Mellor, 1994)、現在オーストラリア、東南アジア、東アジア、中東、アフリカに広く分布している。オーストラリアでは、北半分の地域で AKAV が地方病として常在しているが、時折、南オーストラリアでも大流行が起きている。

AKAV は地方病であり、その地理的分布は、北から南までの 2 つの大きな帯で示される。1 つは、日本から東南アジアを経由してオーストラリアまで伸びる帯で、もう 1 つは、中東から南アフリカまでの地域である。AKAV が地方病として常在する地域では、ほとんどの動物は性成熟前に感染し、最初の妊娠より前に免疫ができているため、通常、出生子で臨床症状は出ない。このような地方病となっている地域でも、AKAV に感作されていない動物が導入された場合、流行が起こる可能性がある。感染昆虫が風で長距離を移動し、常在地域から離れた地域で大流行が起こる可能性もある。アカバネ病の流行は季節性であり、4-6 年間隔で見られる傾向にある。これは恐らく、以前に獲得した AKAV に対する免疫が衰退した時である。

ワクチン接種によりアカバネ病の発生は減少したが、現在も日本や韓国で散発的に発生がみられる (Inaba and Matsumoto, 1990; Kim et al., 2011)。最近、AKAV の、抗原性や病原性における変異体が分離されている (Akashi and Inaba, 1997; Yamakawa et al., 2006; Kamata et al., 2009; Ogawa et al., 2007a)。1984 年に日本南部で、非化膿性脳炎や神経症状を起こした子ウシから Iriki 株が分離され、この株は、子宮内感染だけでなく生後感染でも病態を引き起こすことが証明された (Miyazato et al., 1989)。このような AKAV 変異体による子ウシへの脳脊髄炎症例は、韓国や台湾でも報告されている (Lee et al., 2002; Liao et al., 1996)。

Iriki 株のような変異体は、初期に分離された株と抗体の交差反応性が低いことが分かっており (Akashi and Inaba, 1997)、このことが、ワクチン接種された地域でアカバネ病が継続的に発生する理由かもしれない。そのため、AKAV の病原性因子を解明するためには、疫学的研究と病原学的研究の両方向からのアプローチが必要である。さらに分子生物学的研究は、アカバネ病をコントロールするための戦略開発の点から重要である。

アカバネウイルスの分類

ブニヤウイルス (*Bunyaviridae*) は、オルソブニヤウイルス属 (*Orthobunyavirus*)、ハンタウイルス属 (*Hantavirus*)、ナイロウイルス属 (*Nairovirus*)、フレボウイルス属 (*Phlebovirus*) およびトスポウイルス属 (*Tospovirus*) に分類されるが、ハンタウイルス属を除いていずれも節足動物をベクターとするアルボウイルスである。トスポウイルス属 (植物感染) 以外のウイルスは、動物に重篤な疾患を引き起こす。病原性が明らかになっているウイルスの数はまだ少ないが、ヒトの熱性疾患や脳炎の原因となる他、同科にはリフトバレー熱、クリミア・コンゴ出血熱、ハンタウイルス感染症など重要な人獣共通感染症病原体も含まれる。また、獣医学領域で重要なウイルスが幾つか知られており、中でも AKAV や AKAV に遺伝的に近いシュマーレンベルグウイルス (*Schmallenberg virus*: SBV) は、反芻家畜に感染し、畜産農家に大きな経済的被害を与える。

オルソブニヤウイルス属には 180 ものウイルスが分類されている。AKAV はオルソブニヤウイルス属に属し、血清学的に、25 のウイルスからなる Simbu 血清群に入る。この血清群に属するウイルスは、ヌカカや蚊によって媒介され、ヒトや反芻動物に病態を引き起こす (Calisher, 1996)。Simbu 血清群はこれまで、ヨーロッパ以外の世界中の国々から分離されてきた (Calisher, 1996) が、2011 年、サシュペリウイルス (*Sathuperi virus*) とシャモンダウイルス (*Shamonda virus*) の遺伝子再集合 (リアソータント) ウイルスもしくはシャモンダウイルスの祖先だと考えられる SBV (Yanase et al., 2012; Goller et al., 2012) が、ヨーロッパの広大な地域で発見された (Hoffmann et al., 2012; Kupferschmidt, 2012; Garigliany et al., 2012; Bilk et al., 2012)。AKAV と同様に、SBV はヨーロッパの国々で、ウシ、ヒツジ、ヤギに流産や胎子の先天性異常を引き起こす。

現在 AKAV は、N 遺伝子の翻訳領域 (ORF) の塩基配列に基づいて、4 つのクラスターに分類されており (Akashi et al., 1997; Ogawa et al., 2007a)、これは、地理的起源を反映してい

る（図1）。4つのうち2つのクラスター（cluster I、II）は、日本、台湾、イスラエルの分離株で構成されており、アジアの株は共通の遺伝子集団の中で進化して来たと考えられる。オーストラリアの分離株はcluster III、ケニアの分離株はcluster IVに分類される。系統発生的解析により、日本の野外株は主要な2つのクラスター（cluster I、II）に分類され、cluster II はさらに2つの枝（IIa、IIb）に細分されている。この分類データから、AKAVは複数の分化系列で進化して来たと考えられる。地理的分岐は、様々な新奇遺伝子型が持続的に導入されている可能性を示唆しており、これにより、AKAVの変異体が生み出されると考えられる（Yamakawa et al., 2006; Akashi et al., 1997）。一方、AKAVの変異株とされている *Tinaroo virus*（TINV）は、アジアやオーストラリアの株に近いS、L分節と、それらから最も遠いアフリカのMP496株に近いM分節を持つ、リアソータントウイルスである（Kobayashi et al., 2007）。

ウイルスゲノムの変異がどの程度抗原性に反映されるのか、OBE-1株のモノクローナル抗体（MAb）を使った血清学的試験が行われた（Akashi and Inaba, 1997; Yoshida and Tsuda, 1998）。その結果、系統発生的解析とGcタンパクのMAb反応にはっきりとした相関性は無く、AKAVには遺伝的多様性に加えて抗原多様性が存在するといえる。

#### アカバネウイルスの構造（図2）

AKAVは、エンベロープを持つ、マイナスイオン鎖RNAウイルスである。ウイルス粒子は直径70-130 nm（典型的サイズは90-100 nm）の球状もしくは多形性のもも存在する。ウイルス表面は、スパイク様突起を持つエンベロープからなる（Ito et al., 1979）。エンベロープは宿主由来の脂質層であり、スパイクはウイルスの糖タンパク、GnとGcタンパクからなる。AKAVを含むオルソブニヤウイルスは、large（L）、medium（M）、small（S）の3つのマイナスイオン鎖ゲノム

分節を持つ (Schmaljohn and Hooper, 2001)。各ゲノムは、ヌクレオカプシド (N) タンパクと RNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRp) で包まれてらせん状の立体構造をとっており、リボヌクレオタンパク (RNP) 複合体と呼ばれる。L分節はlarge (L) タンパクをコードし、これはRdRpとして働く。M分節はNH<sub>2</sub>-Gn-NSm- Gc-COOHを含む前駆体ポリタンパク質をコードしており、このポリタンパク質は、後に2つの糖タンパク (Gn、Gc) と非構造タンパクNSmに開裂する。Gn、Gcタンパクは、ウイルスの中和や細胞レセプターへの吸着に関与する (Ludwig et al., 1991)。AKAVのMAbを用いた抗原性解析により、Gcが赤血球凝集 (HA) 活性を持つことが分かっている (Akashi and Inaba, 1997)。NSmの詳細な機能はまだ不明であるが、アポトーシスのシグナル伝達 (Acrani et al., 2010) や、ウイルスのアセンブリーに関与する (Shi et al., 2006; Fontana et al., 2008) 可能性が示唆されている。S分節は、ORFにおいてオーバーラップする形で、Nタンパクと非構造タンパクNSsをコードしている (図1-1)。NタンパクはRNPを形成する。またNは抗原性決定因子であり、他のオルソブニヤウイルスと抗原性を共有している。NSsタンパクはI型インターフェロンのアンタゴニストとして作用し、宿主タンパク合成の制御に関与する (Bouloy et al., 2001; 37, Weber et al., 2002)。さらに、各分節の非翻訳領域 (UTR) は、RNA調節やゲノム合成に重要な役割を果たす (Lowen and Elliott, 2005)。

### アカバネウイルスの侵入と増殖環 (図3)

AKAVを始めとするオルソブニヤウイルスは、まず細胞表面レセプターに接着し、エンドサイトーシス経路により細胞に侵入する (Hollidge et al., 2012)。多くのブニヤウイルスは、クラスリン依存性エンドサイトーシスを利用する (Hollidge et al., 2012; Jin et al., 2002; Santos et al., 2008; Simon et al., 2009)。一方、幾つかのブニヤウイルスは別の経路で細胞に侵入する。例えば、

リフトバレー熱ウイルス (*Rift Valley Fever virus: RVFV* / フレボウイルス属) はカベオラ依存性エンドサイトーシスで哺乳類細胞に侵入し (Harmon et al., 2012)、ウークニエミウイルス (*Uukuniemi virus* / フレボウイルス属) やアンデスウイルス (*Andes virus* / ハンタウイルス属) は、クラスリン非依存性のエンドサイトーシスで細胞に侵入する (Lozach et al., 2010; Ramanathan and Jonsson, 2008)。AKAV の細胞侵入は、非ウシ由来細胞株の場合クラスリン依存性エンドサイトーシスを利用するが、ウシ由来細胞株へはクラスリン依存性でもカベオラ依存性でもなく、ダイナミン依存性経路で侵入することが最近分かって来た (Bangphoomi et al., 2014)。細胞質ゾルへ取り込まれた後、ウイルスを包括したエンドソームは初期エンドソームから後期エンドソームとなり、最適 pH 環境下でウイルス粒子がエンドソーム膜と融合して、ウイルスゲノムが細胞質内に放出される。続いて、最初の転写およびウイルスタンパクの翻訳が開始される。新しく作られたウイルスゲノムは RNP を形成し、ゴルジ体に蓄積した Gn-Gc 糖タンパクのヘテロダイマーと集合する。ウイルス粒子はゴルジ体領域内に出芽した後、細胞からエキソサイトーシスにより放出される (Schmaljohn and Hooper, 2001; Fontana et al., 2008; Elliott, 1997)。

#### アカバネウイルスの伝播様式

AKAVはアルボウイルスであるため、その出現は季節性のもので、昆虫が活動する期間に限定される。さらにその昆虫が生息する地理的分布によっても制限される。アカバネ病の大流行の発生は、夏から秋の媒介昆虫による伝播が大きく関連する (Inaba et al., 1975; Blood, 1956)。AKAVに感染した昆虫は冬の期間生存することが出来ないため、その流行は次第におさまっていく (Murray, 1987; Bishop et al., 2000; Bishop et al., 2004)。

AKAVは、主にサシバエ属のヌカカによって媒介される。オーストラリアでの主要なベクターは、オーストラリアヌカカ (*Culicoides brevitarsis*) であり、これは家畜反芻動物の一般的な刺咬性害虫である (St George et al., 1978)。オーストラリアの安定した環境条件のおかげで、オーストラリアヌカカは一年を通じて、ニューサウスウェールズ州の北中部や、北部から南部の沿岸平野に広く生息しており、AKAVはこれらの地域で地方病となっている (Murray, 1991; Jagoe et al., 1993; Cybinsk et al., 1978)。ウマ、ラクダといった他の動物からもAKAVの中和抗体が検出されているが、これらの動物は、流行地域においてオーストラリアヌカカの一般的な宿主ではないため、偶発的な宿主となったか、もしくは別のベクターによってAKAVが伝播されていると考えられる (Cybinsk et al., 1978)。日本の南部では、ウシヌカカ (*C. oxystoma*) がAKAVの主要なベクターである (Kurogi et al., 1987; Yanase et al., 2005)。AKAVや他のオルソブニヤウイルスを含むアルボウイルスの流行が懸念される地域で、オーストラリアヌカカの生息も発見されている (Yanase et al., 2011)。アフリカでは、ヌカカの *C. wadei*, *C. milnei*, *C. imicola* がAKAVを媒介する。オマーンでは、*C. imicola* がベクターとして報告されている (Al-Busaidy and Mellor, 1991)。イスラエルでのベクターはまだ正確に分かっていない。アメリカとヨーロッパの現地調査でAKAVが分離されたという報告はまだ無いが、それぞれに広く生息するヌカカの *C. variipennis* と *C. nubeculosus* で、実験的にウイルス増殖することが分かっている (Jennings and Mellor, 1989)。

AKAVはヌカカ以外にも、日本でキンイロヤブカ (*Aedes vexans*) やコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) (Matsuyama et al., 1960)、ケニアでハマダラカの一種の *Anopheles funestus* (Metselaar and Robin, 1976) といった蚊からも分離されている。しかしながら、これらイエカ属 (*Culex*) やヤブカ属 (*Aedes*) の蚊を介した実験的な感染試験はこれまで成功していない。近年ベトナム北部で、吸血していないコガタアカイエカやニセシロハシイエカ (*Culex vishnui*)、



ハマダラカ的一种である*Anopheles vagus*、セスジヤブカ亜属 (*Ochlerotatus*) の蚊からAKAVが分離された (Bryant et al., 2005)。さらにAKAVは、ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) の培養細胞で、増殖し持続感染した (Han, 1981)。以上のことから、AKAVは蚊によっても媒介される可能性がある。

#### アカバネウイルスの病態

胎子の先天性異常など、症候性のAKAV感染は、ウシ、ヒツジ、ヤギで報告されて来た (Inaba et al., 1975; Della-Porta et al., 1976; Kurogi et al., 1976; Parsonson et al., 1975)。2000年に台湾で、痙攣や下痢症状を示したブタからも新たにAKAVが分離された (Huang et al., 2003)。近年日本でも、ブタでAKAVによる神経症状および異常産が発生しており (本田ら, 2013; 和田ら, 2015; 丸田ら, 2015)、これらの分離株は全てIriki株と同じclusterに属していた。さらに、病態変化は報告されていないが、野生の反芻動物でのAKAV感染事例もある。ウマ、ロバ、ラクダ、その他の野生動物からAKAV抗体が検出されている (Al-Busaidy et al., 1987; Yang et al., 2008)。

AKAV感染に対する宿主の免疫機構には、液性免疫と細胞性免疫とがあり、血中や感染組織からウイルスを排除する。そのため、免疫機構が成熟した動物は、AKAV感染に抵抗力を持つ (Parsonson et al., 1977; Della-Porta et al., 1977)。一方、免疫機構が十分成熟していない動物、特に胎子では感染しやすく、病態が現れることになる (McClure et al., 1988)。

成体へのAKAV感染は無症状であるが、通常感染1-9日後にウイルス血症が起こり、ウイルスは、血行性に脳、脊髄、骨格筋、胎盤、子宮のほか、角膜、ブドウ膜、水晶体繊維にも広がる (Parsonson et al., 1981; Ushigusa et al., 2000)。AKAVは子宮を通じて胎子に感染する (Kirkland et al., 1988)。胎子感染は、実際に胎子が娩出されるまで明らかにならない。妊娠ウ

シ、ヒツジ、ヤギが感染した場合、難産、流産、早産、死産に至る。妊娠ヤギでは分娩遅延が観察されることもある (Hashiguchi et al., 1979)。よく知られる重篤な兆候は先天性異常子の晩出であり、関節拘縮症と脳の形成異常で特徴付けられる、AH syndromeと呼ばれるものである。感染胎子は一般的に、分娩までに死に至る。生きて産まれて来た個体は、起立不能、失明、吸入反射の欠如、眼振といった神経障害を示し、摂食不能のために3日以内に死亡する (Haughey et al., 1988; Coverdale et al., 1978)。これら出生時の合併症は、特に胎子が関節拘縮症による奇形を呈する場合、母体に損傷を与え、不妊や死をもたらす可能性がある。

AKAVは、株によって病原性が異なる。新生子や成体のAKAV感染は一般的に、一過性のウイルス血症になるが、臨床症状はみられない (Parsonson et al., 1977; Kurogi, et al., 1977a)。一方、Iriki株に代表される幾つかのAKAV変異体の感染では、子ウシや成体で非化膿性脳炎や脳脊髄炎が引き起こされる (Liao et al., 1996; Yamakawa, et al., 2006; Miyazato et al., 1989)。こういった動物では、食欲不振、乳量の低下、脚の伸展、跛行、麻痺、振戦、眼振、後弓反張、運動失調を含む様々な臨床症状が観察される。一般的に治療法は無く、症状を示す動物は予後不良のため、安楽死させることになる。

AH syndromeの肉眼所見は主に、中枢神経系 (CNS) と筋肉系の組織障害として現れる。CNS障害には、水頭性無脳症 (大脳皮質の菲薄化や構造崩壊)、小頭症、孔脳症 (大脳半球内の嚢胞性欠損) などの大脳両側性の低形成があり、脳組織は脳脊髄液に置き換わっている。さらに、小脳の空洞形成を含む、中脳、小脳、延髄、脊髄の低形成 (Parsonson et al., 1977; Kurogi et al., 1977a) および、嚢胞腔や皮質下嚢胞が観察される (Narita et al., 1979)。小型反芻動物では、肺、胸腺、脊髄の低形成が起こることもある。

AKAVによる神経系への直接的な損傷は、ニューロンへのウイルス感染である。CNSでの病理組織学的病変は神経細胞の変性であり、細胞溶解などを引き起こす (Kitani et al., 2000)。

間接的には、細胞障害性サイトカイン反応を引き起こし、炎症反応による血管損傷をもたらす (Konno et al., 1982a)。血管周囲層では、血管周囲カフ (形質細胞を含む細胞、組織球、リンパ球の血管周囲への浸潤) が顕著である (Konno et al., 1982)。脊髄の前角では、運動ニューロンの消失、神経膠症、血管周囲カフが見られる (Hartley et al., 1977)。AKAVは、大脳、小脳、脳幹、脊髄といった全てのCNSに炎症を起こし、これらの炎症性病変は重篤な壊死性脳炎に移行する。骨格奇形は、脊柱側弯症、脊柱後弯症、斜頸、下顎短小として現れる (Parsonson et al., 1977; Konno et al., 1982)。関節拘縮症は、筋線維を制御する前角ニューロンの減少によってもたらされる。主に脚で骨格筋の異常がみられ、萎縮し浮腫状になる。関節は屈曲した状態で固定される (Konno et al., 1982)。筋肉は線維化し灰色を呈する。骨格筋で起こる多発性筋炎では、炎症細胞の浸潤が見られる (Konno and Nakagawa, 1982)。筋小管や筋線維は変性し、崩壊、断片化する。断片化した筋線維の幾つかでは、黄紋が消失する。新生子や大人で起きる脳炎では、肉眼所見は認められない。非化膿性脳脊髄炎の組織病変は、中脳、小脳橋、延髄での血管周囲カフや神経細胞変性であり、まれに大脳や小脳でも見られる (Kono et al., 2008)。

感染胎子の病理学的変化は、胎齢に密接に関係する。これは特に、小型反芻動物よりも妊娠期間の長いウシで顕著である。AKAVの病態形成は、非化膿性脳脊髄炎phase、多発性筋炎phase、そしてAH phaseの3つの段階に分けられる。非化膿性脳脊髄炎phaseは、AKAV感染ステージの最初の病理学的変化である。妊娠中期以降にウイルスに暴露された胎子のみが、この病理変化を起こす (Parsonson et al., 1977; Lee et al., 2002; Narita et al., 1979; Uchida et al., 2000)。さらにこの期間中には、壊死性脳炎を除く多発性脳炎が起こる。妊娠後期に感染した子ウシは、生後感染した子ウシや大人のウシと同様、顕著な肉眼所見は無いが、リンパ組織球増多性脳脊髄炎を示す。病変は一般的に、橋、延髄、脊髄の全角灰白質で好発する。多発性筋炎phaseは、妊娠初期から中期の、筋肉における筋小管と筋線維の発達期間に感染することで引き起こされ

る。AKAV感染はこれらに直接的および間接的に影響し、筋小管の変性や炎症が起こる。そのため、妊娠初期段階で感染した子ウシは通常、関節拘縮症を持って生まれてくる。AH phaseは、病態発生の最終段階である。これは、非化膿性脳脊髄炎と多発性筋炎に続いて起こる病態変化である (Konno et al., 1982)。妊娠初期から中期にAKAVに暴露された胎子で引き起こされ (Kurogi et al., 1977a; 1977b; Parsonson et al., 1977; Narita et al., 1979)、脳の病変は、小さな空洞形成から重篤な水頭性無脳症に及ぶ。これらの動物は通常、行動異常を示す。多くは、失明、抑うつや鈍重、難聴、無関心、徘徊などであり、吸入反射の消失がみられることもある。妊娠期間はしばしば延長する。ほとんどの子ウシはCNS障害もしくは関節拘縮症のどちらかを示すが、ヒツジやヤギでは2つの症候群が同時に起こることが多々ある。

#### アカバネウイルスの感染防御

AKAVは新生子に先天異常をもたらすため、AKAV感染に対する実際的な処置は無い。節足動物の媒介以外では動物間で伝播されないため、地方病でない地域にAKAVが入り込んだ場合、ベクターによる感染を防ぐ対策をとる必要がある。これには、殺虫剤による節足動物（ヌカカや蚊）の幼虫・成虫の除去や、動物舎を網で遮蔽し節足動物の接触を防ぐ方法が含まれる (Carpenter et al., 2008)。しかし、殺虫剤は一時的な効果でしかなく、その大量使用は環境に悪影響を与えるため、野外での適用は難しい。ブニヤウイルスのようなエンベロープを持つウイルスには、次亜塩素酸塩、界面活性剤、クロルヘキシジン、アルコール、フェノールといった、一般的なウイルス消毒薬も有効である。

アカバネ病が地方病となっている地域や流行地域での動物へのワクチン接種は、最も実用的な感染防御戦略である。アカバネ病対策に使用するワクチン開発は、日本、韓国、オー

オーストラリアで行われてきた。不活化ワクチンは、日本、韓国、オーストラリアで使われている (Kim et al., 2011; Kurogi et al., 1978; Charles, 1994) のに対して、弱毒生ワクチンは、日本と韓国のみで使用されている (Kim et al., 2011; Kurogi et al., 1979a)。ホルマリン処理等による不活化ワクチンの開発は、日本で発達してきた。妊娠ウシやヤギに対する安全性と有効性が確認されており (Kurogi et al., 1978)、4週間の間隔を空けて2回筋肉内投与することで、有効性を発揮する。中和抗体はワクチン接種から1ヶ月後に出現し、12ヶ月後に検出不能になるため、毎年の追加免疫が推奨される。オーストラリアでも、交配前の若い雌ウシや乳牛に、4週間の間隔を空けて2回筋肉内投与している (Charles, 1994)。近年、三種混合ホルマリン不活化ワクチン (対象：アイノウイルス、アカバネウイルス、チューザンウイルス) が日本や韓国で開発されており、マウス、モルモット、妊娠ウシに対する安全性と免疫原性が証明されている (Kim et al., 2011)。

日本では、弱毒ウイルスを使った生ワクチンの開発も行われてきた。市販の弱毒AKAV株として、TS-C2株が樹立されている。これは、30°Cの低温条件で、OBE-1株を培養細胞で20回継代することで弱毒化している。妊娠ウシに接種した場合、接種4週間以内に抗体を産生し、発熱、白血球減少、ウイルス血症等の病原性は現れない。妊娠ヒツジでも接種後の免疫原性が確認されているが、ウイルス血症が起こるため、妊娠ヒツジへの使用は安全性の面で疑問視される (Kurogi et al., 1979a; Kurogi et al., 1979b; Hashiguchi et al., 1981)。

ワクチンのおかげで、特にオーストラリアでアカバネ病の発生は減ったが、日本や韓国では今でも散発性の症例が存在する (Inaba and Matsumoto, 1990)。近年、OBE-1株などの古典的なAKAV株とは抗原性や病原性が異なっている変異体が、幾つか分離されている (Ogawa et al., 2007a)。ワクチン接種地域でのアカバネ病の発生は、これらの広範な遺伝的変異体が原因かもしれない、そのため、より効果的なワクチンが必要とされる。さらに、Iriki株など生後感染で病

態を引き起こす株の流行地域では、子ウシのAKAVワクチン接種計画を再検討する必要があるかもしれない。

現在、分子生物学的手法は、ワクチン開発に重要な役割を果たしている。本研究室のOgawaらは、クローニングしたcDNAから組換えウイルスを作出するリバーシジェネティクス法を利用して、組換えAKAVを作出し、その分子学的解析を行った (Ogawa et al., 2007b; 2007c)。NSsタンパクは、インターフェロン $\alpha/\beta$ 産生を抑制するため、ウイルスの病原性因子として作用することが分かっている (Weber et al., 2002)。NSs欠損組換えAKAVは、マウスに対する病原性が低下するため (Ogawa et al., 2007c)、NSs欠損株は新たな弱毒生ワクチン候補株として期待される。さらに、この株で免疫された動物はNSs抗体を産生しないため、ワクチン接種個体と感染個体を区別する (DIVA) 分子マーカーとして機能するかもしれない。DIVAの活用についてはこれまでにRVFVで報告があり (McElroy et al., 2009; Fernandez et al., 2012)、AKAVでも同様に活用できれば、アカバネ病をコントロールする新しいツールとなる。

## 目的

本研究ではまず、既存のAKAV作出法よりも効果的な組換えAKAV作出法の確立を試みた。組換えAKAVを効率的に作出することができれば、従来のワクチンより安全で効果的な組換えワクチン株の迅速な開発が可能となる。第1章では、ワクチン株をもとに組換えワクチンウイルスを作出し、これらの培養細胞での特性について、元株と比較解析した。第2章では、これらを用いて、宿主動物であるヤギに対する安全性と免疫賦与効果を検討した。第3章では、他の病原体の抗原領域を併せ持つ多価ワクチン開発を将来的な目標として、第1章で確立した組換えAKAV作出法を用いて、外来遺伝子を導入したAKAV作出を試みた。第4章ではこれをさらに発展させ、外来遺伝子をより高度発現するAKAVの作出を試みた。これらの研究成果を元に、アカバネ病を制御するワクチン開発の展望および、宿主動物への侵入機構解明の可能性を考察したい。

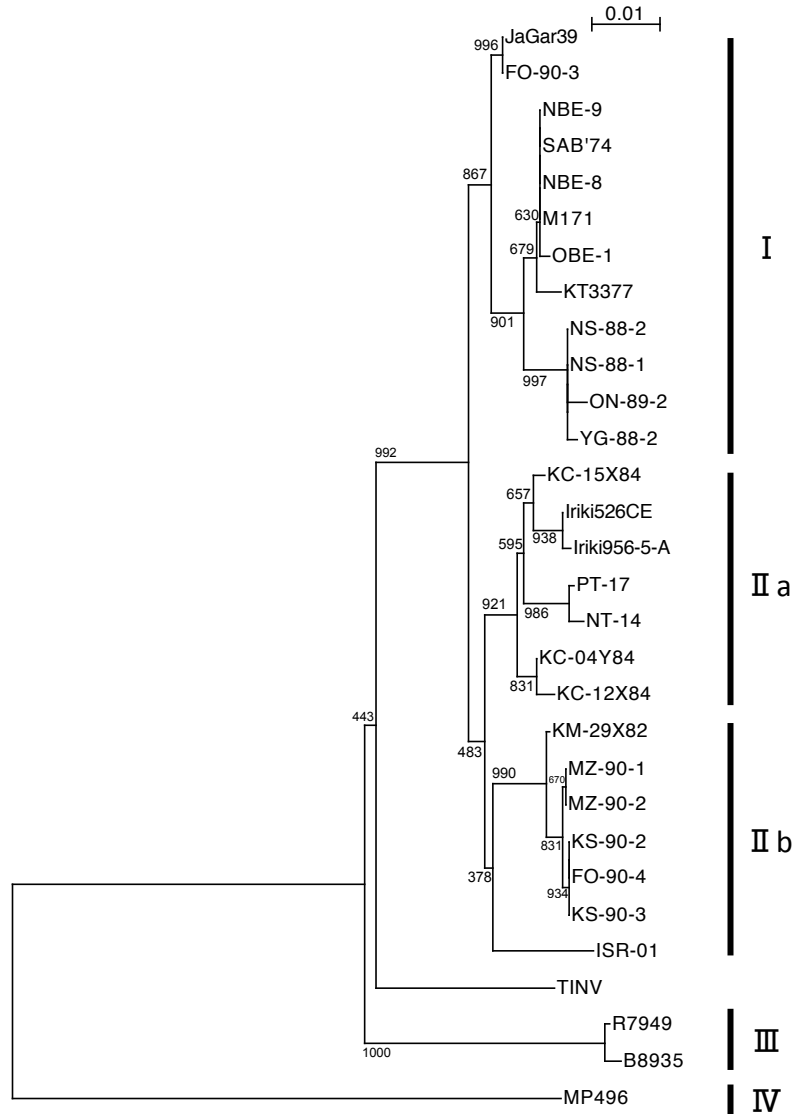


図1 AKAV野外分離株のN ORF塩基配列に基づいた系統分類

N ORF (34 -735 ntの702塩基) の系統発生解析により、4つのcluster (I~IV) の存在が示される。数字は、計算1000回からのブートストラップ確率を示す。スケールバーは、座位あたり0.01%の置換を表す。N ORFの配列は、以下のGenBank受入番号から取得した。JaGar39, AB000852; FO-90-3, AB000870; NBE-8, AB232174; NBE-9, AB000855; SAB'74, AB000856; M171, AB000858; OBE-1, AB000851; KT3377, AB000857; NS-88-1, AB000864; NS-88-2, AB000865; ON-89-2, AB000867; YG-88-2, AB232196; KC-15X84, AB000861; Iriki526CE, AB000863; Iriki956-5-A, AB232175; PT-17, AF034940; NT-14, AF529883; KC-04Y84, AB000862; KC-12X84, AB000860; KM-29X82, AB000859; MZ-90-1, AB000868; MZ-90-2, AB000869; KS-90-2, AB000872; KS-90-3, AB000873; FO-90-4, AB000871; ISR-01, AY378155, TINV, AB000819; R7949, AB000854; B8935, AB000853; MP496, AB232320.



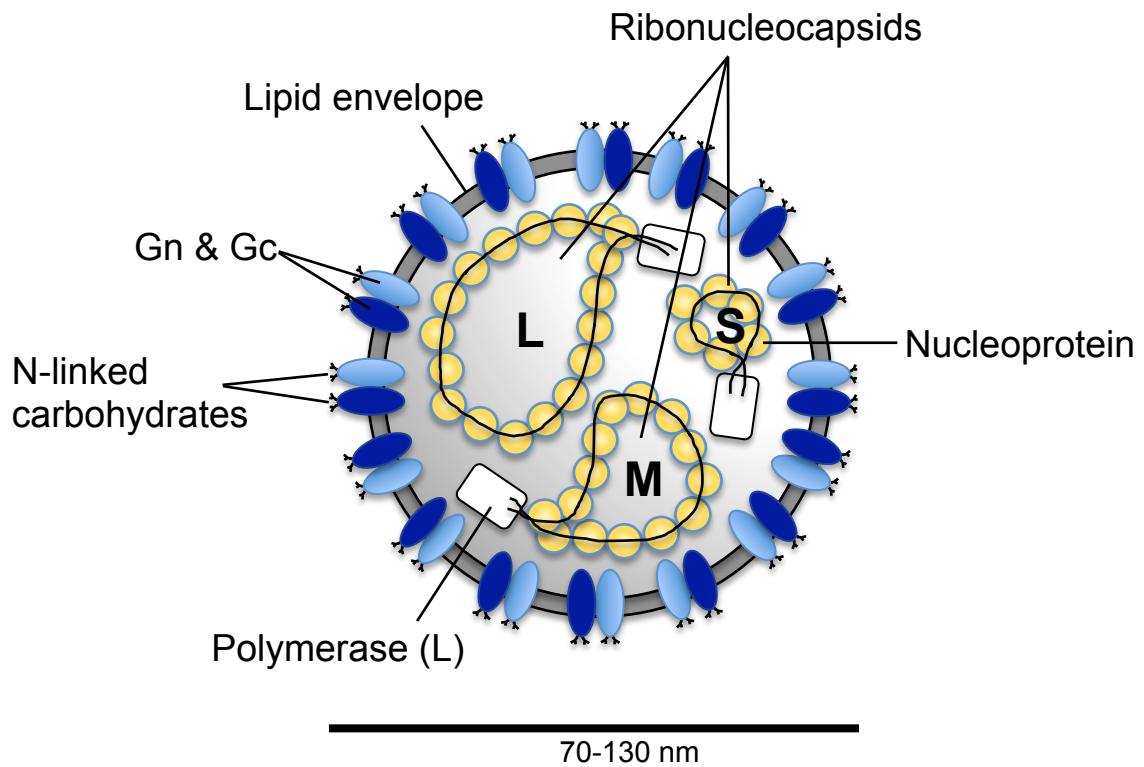


図2 AKAV粒子構造

AKAVはマイナス鎖の3分節RNAを持つ。S分節からはN (Nucleoprotein: 核タンパク) とNSs (非構造タンパク)、M分節からはGn、Gc (ともにエンベロープ糖タンパク) とNSm (非構造タンパク)、L分節からはL (Polymerase: RNA依存性RNAポリメラーゼ) のタンパクが作られる。

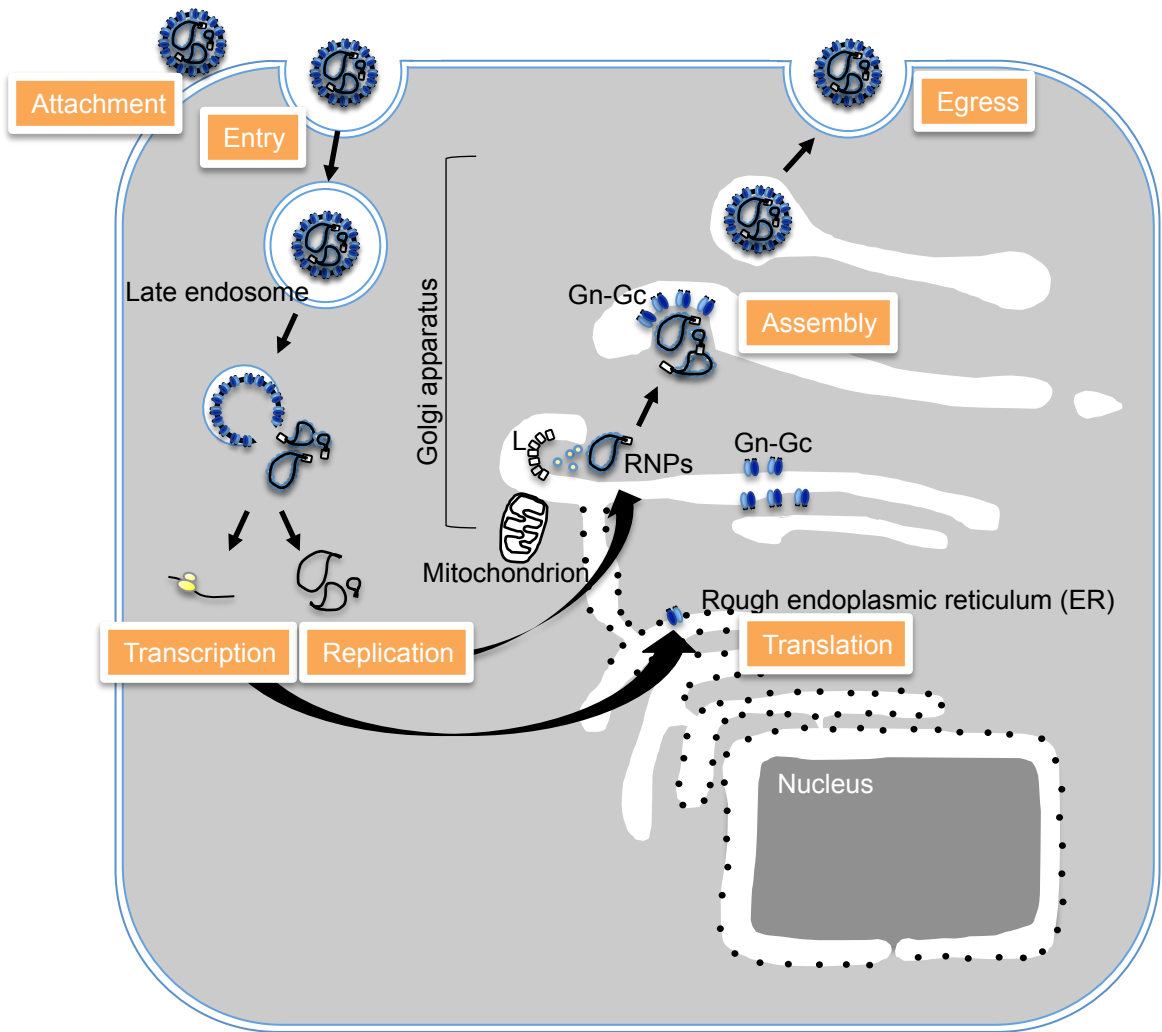


図3 ブニヤウイルスの侵入から放出までの模式図

ウイルスは、GnとGcの片方もしくは両方によって、宿主レセプターに接着し【Attachment】、エンドサイトーシスで細胞に侵入する【Entry】。エンドソームの酸性化により、ウイルス膜とエンドソーム膜が融合し、ウイルスの脱外被が起こる。ウイルス由来のRdRpは、ウイルスmRNAの最初の転写を触媒する【Transcription】。ウイルスmRNAの翻訳【Translation】に続いて、糖タンパクGn、GcがERで二量体化し、Gnの膜貫通領域に存在するシグナルによって、ゴルジ装置に蓄積される。3つのマイナス鎖ウイルスゲノムは複製され【Replication】、Viral tubeで形成されたRNPは、GnとGcの挿入によって修飾されたゴルジ装置膜に輸送され、Gn-Gc糖タンパクヘテロダイマーと集合する【Assembly】。ウイルス粒子はゴルジ膜由来の小胞に出芽し、ウイルス粒子を含んだゴルジ小胞は細胞表面に輸送される。ゴルジ小胞膜と細胞膜が融合して、感染性のウイルス粒子が放出される【Egress】。

## 第 1 章

# 新しい遺伝子組換え技術を用いた アカバネウイルスの作出

## 要旨

AKAV によるアカバネ病は、家畜に繁殖障害を引き起こし、日本を含む各国で著しい経済的損失をもたらす。弱毒株である TS-C2 株の生ワクチンとしての利用はアカバネ病の流行を減らして来たが、近年報告されているような抗原性および病原性の変異体が出現した場合、迅速に対応するためには、より効率的な方法でワクチンウイルスが作出できるリバースジェネティクスシステムが必要である。本研究では、組換え TS-C2 ウイルス (rTTT) と、非構造タンパク NSs を欠損させた変異体ウイルス (rTTTΔNSs) を、AKAV では初めてとなる T7 RNA polymerase に基づくリバースジェネティクス法を利用することで作出した。この方法により、これまでに確立されていた RNA polymerase I に基づくリバースジェネティクス法に比べて、効率良く組換え AKAV を回収することが可能となった。NSs は病原性を決定する因子だと考えられるため、rTTTΔNSs は野生型 TS-C2 株よりも弱毒化していることが予想され、より良いワクチン候補株となることが期待される。

## 背景と目的

ワクチン接種によってアカバネ病の流行は減っているが、日本や韓国では依然として、アカバネ病による症例が頻発している (Inaba and Matumoto, 1990; Kim et al., 2011)。これまでに、抗原性や病原性における変異体が分離されており (Akashi and Inaba, 1997; Kamata et al., 2009; Lee et al., 2002; Liao et al., 1996; Miyazato et al., 1989; Ogawa et al., 2007a; Yamakawa et al., 2006)、日本では Iriki 株が脳炎を起こした子ウシから分離されている (Miyazato et al., 1989)。これらの変異株は現在のワクチン株に対して抗体の交差反応性が低いため、ワクチン接種が行われている地域でも、こういった AKAV の変異体による感染が起こっている可能性が示唆される。したがって、新しい株の出現に迅速に対応し、アカバネ病の発生を効果的にコントロールするために、より効果的な AKAV 作出技術を確立することは、ワクチン戦略上重要な課題である。

リバーシジェネティクス法によるブニヤウイルスの作出は、オルソブニヤウイルス属の BUNV で最初に確立され (Bridgen and Elliott, 1996)、その方法に基づいて発展して来た。バクテリオファージの T7 RNA polymerase を用いたレスキュー方法は、BUNV、LACV、RVFV で報告されており (Bridgen and Elliott, 1996; Blakqori and Weber, 2005; Ikegami et al., 2006)、AKAV では当研究室で Ogawa らにより、RNA polymerase I 転写系を用いたレスキュー法が確立されている (Ogawa et al., 2007c)。

RNA polymerase I による AKAV のレスキュー効率は、他のリバーシジェネティクスの報告に比べて高くなかった。そこで本研究では、他のオルソブニヤウイルスで効果的なウイルスレスキューが報告されている、T7 RNA polymerase を用いたリバーシジェネティクス系を、AKAV で確立することを目指した。

## 材料と方法

### 細胞とウイルス

T7 RNA polymeraseを発現しているハムスター腎臓由来細胞 (BHK/T7-9) (Ito et al., 2003) は、岐阜大学の伊藤直人先生から寄与された。これを、5%ウシ胎児血清(FCS)、10% tryptose phosphate broth (TPB) 加Eagle's minimum essential medium (MEM) 培地を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養、継代した。ハムスター肺由来細胞 (HmLu-1) は、5% FCS加Dulbecco's modified MEM (DMEM) 培地で同様に培養した。AKAVワクチン株であるTS-C2株は、動物医薬品検査所から購入した。全てのウイルスは、無血清培地でHmLu-1細胞を用いて継代した。

### TS-C2 株における L、M、S 分節のクローニングとシーケンス配列決定

野生型 (wt) TS-C2 株のウイルス RNA は、感染細胞の上清から、Viral RNA mini kit (Qiagen) を用いて抽出した。シーケンス配列の両末端を決定するために、抽出した RNA を SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) で、OBE-1 株の特異的プライマー (Ogawa et al., 2007b) を用いて逆転写し (RT-PCR)、5' RACE system (Invitrogen) を用いて、得られた cDNA に poly C tail を付加した。Poly C tail 付加 cDNA は、anchor プライマー (AP) と特異的プライマー (表 1-1、First PCR) を用いて、PCR 反応 (GoTaq Green Master Mix [Promega]) で増幅した。得られた PCR 産物をテンプレートとし、AP のアダプター領域と相同性を持つ abridged universal amplification プライマー (AUAP) と、OBE-1 株特異的プライマー (表 1-1、Nested PCR) を用いて nested PCR を行った。得られた全ての DNA 断片は pCR2.1-TOPO (TA Cloning kit: Invitrogen) にクローニングし、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシーケンス解析を行った。

得られた両末端の塩基配列をもとに作製した、TS-C2 株特異的プライマー（表 1-1、T7riboSM2-MR2/TSC）もしくは TS-C2 株・OBE-1 株共通プライマー（表 1-1、Full-length cloning）を用いて PCR を行い (LA *Taq* polymerase [Takara])、cDNA 全長を合成した。PCR 産物は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit（Takara）で精製し、TA クローニングし、シーケンス配列を決定した。得られた TS-C2 株の L、M、S 遺伝子の塩基配列は、GenBank に登録した。

#### リバーシジェネティクス系による組換えウイルスの作製

自己複製型の組換え AKAV 変異株の作製と使用は、「遺伝子組換え等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等の拡散防止措置に関する大臣確認後（確認番号：23 受文科振第 2073 号および 28 受文科振第 419 号）に関連法令を遵守し、実施した。

T7 RNA polymerase を用いたリバーシジェネティクス法による組換えウイルス作製のために、TS-C2 株の L、M、S 遺伝子全長を、pT7riboSM2 ベクター（Habjan et al., 2008）に *Esp3I* 制限酵素サイトで挿入し、各プラスミド pT7riboSM2/TL、pT7riboSM2/TM、pT7riboSM2/TS を得た。N のアミノ酸配列を変えることなく NSs の発現を欠損させるために、PfuUltra DNA polymerase（QuickChange II mutagenesis kit: Agilent Technologies）を用いて、S 分節の ATG 開始コドン（59-61 nt）を ACG に変えた、プラスミド pT7riboSM2/TSΔNSs を作製した。

6 well プレートにコンフルエント手前の BHK/T7-9 細胞を蒔き、1.2 μg の pT7riboSM2/TL、0.6 μg の pT7riboSM2/TM、1.2 μg の pT7riboSM2/TS もしくは pT7riboSM2/TSΔNSs を 200 μL の Opti-MEM（GIBCO）に加えた混合物を、9 μL の TransIT-LT1 reagent（Mirus）を用いてトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞は 37°C で培養した。6 日後、新たに BHK/T7-9 細胞を重層した後、さらに 2 日間培養した（図 1-1）。トランスフェクション 8 日後

に培養上清を回収し、HmLu-1 細胞で継代して CPE を観察することで、ウイルスの有無を確認した。作出したウイルスは 3 回ブラック純化し、以降の実験に用いた。導入した遺伝子変異が反映されていることを確認するために、Ogawa らの方法と同様、感染細胞からウイルス RNA を抽出し、SF プライマー (5'-AGT AGT GAA CTC CAC TAT TAA CTA CGC-3') と NSs\_C\_XhoI プライマー (5'-GGG GCT CGA GCT AAG TAG CCC GA-3') を用いて、S 分節 (全長 858 base pair [bp]) のうち 334 bp (1-334 nt) を PCR で増幅後、*Hpy*CH4IV 制限酵素処理し遺伝子断片を確認した (Ogawa et al., 2007c)。

#### 増殖曲線とブラックサイズの比較

コンフルエントの HmLu-1 細胞に、wt TS-C2 株と作出した組換えウイルスを MOI = 0.01、37°C で吸着させ、1 時間後に細胞を PBS で洗浄した後、無血清培地で培養した。12、24、36、48、60 時間後に上清を回収し、plaque-forming unit (PFU) を HmLu-1 細胞を用いて決定した。増殖曲線を描くための力価測定試験は、wt TS-C2 株は既報の通り 34°C で (Kurogi et al., 1979a)、作出したウイルスは 37°C で、全て triplicate で行った。各ウイルスのブラック形態を調べるために、HmLu-1 細胞にそれぞれ 1 時間感染させ、0.8%アガロースを混ぜた 2% FCS 加 DMEM を重層し、4 日後にニュートラルレッドで染色後、ブラックサイズを計測した。各ウイルスについて 50 個のブラックを無作為に選択し、サイズを画像解析ソフト (ImageJ: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) で計測した。



## 結果

### TS-C2 株のシーケンス解析

クローニングした TS-C2 株の L、M、S 遺伝子の塩基配列を決定し、GenBank に登録した。受入番号はそれぞれ、AB968525、AB968526、AB968527 である。これらと、元株である OBE-1 株の塩基配列 (GenBank 受入番号: AB190458.1 [L]、AB100604.1 [M]、AB000851.1 [S]) との比較を、表 1-2 に示す。TS-C2 株では、S の ORF 内で 1 塩基 (nt) が変異、UTR 内で 1 nt 欠損していたが、アミノ酸 (aa) レベルでは変異が無かった。M では ORF 内で 17 nt、5' UTR 内で 1 nt が変異しており、アミノ酸レベルでは Gn で 2 aa、NSm で 6 aa、Gc で 6 aa の変異が存在した。L では、ORF 内で 11 nt、6 aa が変異していた。ORF 内の相同性は、塩基レベルで S: 99.9%、M: 99.6%、L: 99.8%、アミノ酸レベルで S: 100%、M: 99.0% (Gn: 99.4%、NSm: 96.2%、Gc: 99.4%)、L: 99.7%であった。

### 組換えウイルスの作製

T7 RNA polymerase 系のリバーシジェネティクス法で TS-C2 株ウイルスを作出するために、pT7riboSM2 ベクターに、L、M、S の各遺伝子を組み込んだ。プラスミド pT7riboSM2/TL、pT7riboSM2/TM、pT7riboSM2/TS をトランスフェクションしてから、ウイルスが回収できるまでに細胞が死滅してしまうため、6 日後に新鮮な BHK/T7-9 細胞を重層した。重層して 2 日後、CPE が観察され、感染性ウイルス (rTTT) を回収することができた。回収時の rTTT ウイルス力価は、 $8.6 \times 10^3$  PFU/mL であった。以前私たちが報告した RNA polymerase I 系のリバーシジェネティクス法では、ウイルス粒子形成にウイルスタンパクを発現するサポータープラスミドを必要とする (Ogawa et al., 2007c) が、本研究で用いた T7 系でのリバーシジェネティクス法ではこれ

らが必要としないことが確認された。これは、他のブニヤウイルスでの T7 系リバーシジェネテイクス法でも証明されている (Blakqori and Weber, 2005; Ikegami et al., 2006; Lowen et al., 2004)。

また、AKAV の病原性を決める因子であり、ウイルス増殖に必須ではないことが分かっている NSs タンパク (Ogawa et al., 2007c) を欠損させたウイルス (rTTTΔNSs) の作出を試みた。NSs の開始コドン内に変異を加えた cDNA を組み入れた pT7riboSM2/TSΔNSs を、pT7riboSM2/TM、pT7riboSM2/TS とともにトランスフェクションし、rTTT を作出した場合と同様に培養した結果、ウイルス力価  $1.4 \times 10^4$  PFU/mL の rTTTΔNSs を回収できた。

回収した rTTTΔNSs について、NSs を発現しない塩基配列を維持しているかを確認した。TS-C2 株の S 分節は本来 HpyCH4IV 酵素サイトを持たないが、rTTTΔNSs の場合、NSs 開始コドンに入れた変異によって、この制限酵素サイトを持つようになる (図 1-2A)。ウイルスの RNA から RT-PCR を行い、PCR 産物を HpyCH4IV 制限酵素処理したところ、rTTTΔNSs の S 分節は 2 断片になっており、この制限酵素の認識配列を維持していることが示された (図 1-2B)。さらに S 分節全長のダイレクトシーケンスにより、rTTTΔNSs の S 分節は、その他の変異が入っていないことが確認された。

#### 組換えウイルスの *in vitro* での性状解析

次にこれらの組換えウイルスについて、培養細胞での性状解析を行った。wt TS-C2 は、rTTT や rTTTΔNSs に比べて様々な大きさのプラックを形成した。これは、wt TS-C2 が、混合ウイルス液となっているためと考えられる。これに対し、組換えウイルスはプラック純化されているため、プラックの大きさはわずかなバラつきに留まった。rTTTΔNSs のプラックは、rTTT に比べて小さかった (図 1-3A)。各ウイルスの HmLu-1 細胞における増殖解析では、rTTTΔNSs が rTTT や wt TS-C2 に比べて増殖速度が遅く、これはプラックサイズの結果と一致していた。

この結果は rTTTΔNSs のウイルス複製効率が低いことを示すが、rTTTΔNSs の最高力価は、感染 60 時間後に  $1.0 \times 10^7$  PFU/mL に達しており、wt TS-C2（感染 60 時間後： $9.2 \times 10^6$  PFU/mL）と同等であった（図 1-3B）。rTTT の最高力価は、感染 48 時間後の  $2.5 \times 10^6$  PFU/mL であった。

## 考察

本研究では、T7 RNA polymerase 系のリバーシジェネティクス法を用いた AKAV の作出に、初めて成功した。これまでに、BUNV (Bridgen and Elliott, 1996; Lowen et al., 2004)、LACV (Blakqori and Weber, 2005)、RVFV (Ikegami et al., 2006) といった他のブニヤウイルスでは、この方法を用いたウイルス作出が報告されており、AKAV でもこれを用いて組換えウイルスが作出できることが証明された。以前に私たちが報告した RNA polymerase I を用いたリバーシジェネティクス法 (Ogawa et al, 2007c) では、トランスフェクション時に 2 つのサポータープラスミドを含む 5 つのプラスミドが必要であるのに対して、本研究で示した T7 RNA polymerase 系は、S、M、L の各遺伝子を組み入れた 3 つのプラスミドで済むという点で簡便であり、トランスフェクション効率も上昇すると考えられる。また、RNA polymerase I 系で TS-C2 の元株である OBE-1 株をレスキューした場合、何度かのトライアルでウイルスが得られたが、その力価は 1 PFU/mL 以下であったのに対して、T7 RNA polymerase 系では高確率でウイルスが回収でき、その力価は  $10^3$  PFU/mL 以上であった。このことから、AKAV ではウイルスのレスキュー効率においても、T7 polymerase 系は polymerase I 系よりも優れていることが分かった。

T7 RNA polymerase 系リバーシジェネティクス法は、AKAV のワクチン開発といった実用的研究に役立つことが想定される。本研究では、OBE-1 株と温度感受性 (ts) 株である TS-C2 株との遺伝的差異が、アミノ酸レベルで M 分節と L 分節に確認された。BUNV、*Batai virus*、*Maguari virus* といった、他のオルソブニヤウイルスの研究では、ts 株の弱毒化の要因は M 分節における変異であり (Iroegbu et al., 1981; Pringle et al., 1984)、恐らく Gc のアミノ末端に存在する変異が重要であるという報告がある (Pollitt et al., 2006)。リバーシジェネティクスによる組

換えウイルスを用いた研究は、ピンポイントで遺伝子を組換えたウイルスの作出が可能のため、AKAV の ts 株における弱毒化要因を解析する上でも、有力な手段となる。

NSs は、AKAV の病原性の決定因子として作用することが分かっている (Ogawa et al, 2007c) ため、TS-C2 株の NSs 遺伝子を欠損させることで、より弱毒化したウイルス株が得られると予想した。実際に生ワクチンとして使用されている幾つかのウイルスは、病原性の復帰を防ぐために、複数の遺伝子変異が導入されている。本研究で作出した NSs 欠損株である rTTTΔNSs は、より安全なワクチン株として、TS-C2 株よりも優れていると想定される。さらに、実際のワクチン接種の現場において、rTTTΔNSs のような NSs 欠損組換えウイルスのワクチン適用は、NSs 抗体がワクチン接種個体で検出されず、野生型ウイルスに感染した個体で確実に検出できた場合、野外で感染した個体とワクチン接種個体の識別 (DIVA) が可能になる。RVFV の場合、NSs 欠損ワクチンを DIVA として使用する可能性が報告されている (McElroy et al., 2009) が、NSs 抗体の産生が必ずしも一致しないために、この識別方法は、多くの個体が存在する群れでの利用に限定される (Fernandez et al., 2012)。今後、AKAV の NSs 欠損ワクチン株を使用した DIVA の実用化への試みは、アカバネ病発生のコントロールを見据えた重要な課題である。

表1-1 TS-C2株のRNAクローニングに使用したプライマー

	RNA segment	Primer	Amplification reaction	Sequence (5'-3')	Nucleotides (OBE-1)
3'-or 5'-end amplification	L	L-10R	RT	CAATGGCTTTAAATGCGTCC	1063-1044
		L-4R	First PCR	TCTCATAATCCAGGCCCAAT	400-381
		L-60F	RT, first PCR	GCCTACAAGTAGCTGTTAGC	5981-6000
		L3'NCR-R1	Nested PCR	GTTGTATGTTGTATTTA	30-14
		L5'RACE	Nested PCR	CCCTGGATATCGATAATGAA	6643-6662
	M	M-5R	RT, first PCR	GTTATCCAGATCTATAGAGA	514-495
		M-35F	RT, first PCR	CTACTATTCTGCGCTAC	3535-3552
		M303-284	Nested PCR	TCTTGAAGTGGATTGCACTC	303-284
		M4059-4080	Nested PCR	AACCATTATGGAATGAGTTAAG	4059-4080
	S	S-8R	RT, first PCR	ATAGACATGGTGCCTTAGG	791-772
		S-0F	RT, first PCR	CATTTCAACGATGTTCCAC	48-67
		S400-381	Nested PCR	CAATTGTGGCAGCTGCCTCT	400-381
		S459-478	Nested PCR	GGGATTTGCCCTGGTGCTG	459-478
full length cloning	L	T7riobSM2-LF	RT, PCR	<u>aatcgtctcctatag</u> AGTAGTGACCCTAAATACAACATACA	1-28
		T7riboSM2-LR	PCR	<u>aatcgtctc</u> acceAGTAGTGCCCCCTAAATGCAATAATAT	6868-6841
	M	T7riboSM2-MF2	RT, PCR	<u>aatcgtctc</u> tatagAGTAGTGAACACCACAACAAAATGATTATTACAA	1-35
		T7riboSM2-MR2/TSC	PCR	<u>aatcgtctc</u> acceAGTAGTGCTACCACAACAAATAATTATTATATCAGCA	4309-4271
	S	T7riboSM2-SF	RT, PCR	<u>aatcgtctc</u> tatagAGTAGTGAACCT	1-27
		T7riboSM2-SR2	PCR	<u>aatcgtctc</u> acceAGTAGTGTCT	858-832
	AP	First PCR	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT		
	AUAP	Nested PCR	GGCCACGCGTCGACTAGTAC		

下線部は、制限酵素サイトを表す。

表1-2 TS-C2株とOBE-1株のシーケンス配列比較

Segment	OBE-1/nt position/TS-C2	OBE-1/aa position/TS-C2	Gene
S	T432C	-	N
	-	-	NSs
	T754 del	-	5' UTR
M	C78A	P19H	Gn
	A549G	K176R	
	C1155T	T378I	NSm
	G1163C	V381P	
	T1164C	-	
	G1191A	R390Q	
	G1225A	M401I	
	T1325C	C435R	
	G1384T	L454F	
	A1433G	K471E	Gc
	A1893G	E624G	
	G2556A	G845D	
	C3271T	-	
	G3641A	V1207I	
	C3658T	-	
	G3690T	W1313L	
	A4013G	T1331A	
A4301G	-	5' UTR	
L	T2088A	-	RdRp
	A2673G	-	
	G4232A	G1401E	
	C4599T	-	
	T4700C	I1557T	
	A4878C	Q1616H	
	A5648G	N1873S	
	C5697T	-	
	G5736A	-	
	T6244C	S2072P	
	G6600A	M2190I	

OBE-1株のシーケンス配列は、GenBank（受入番号：AB190458.1, AB100604.1, and AB000851.1）より得た。

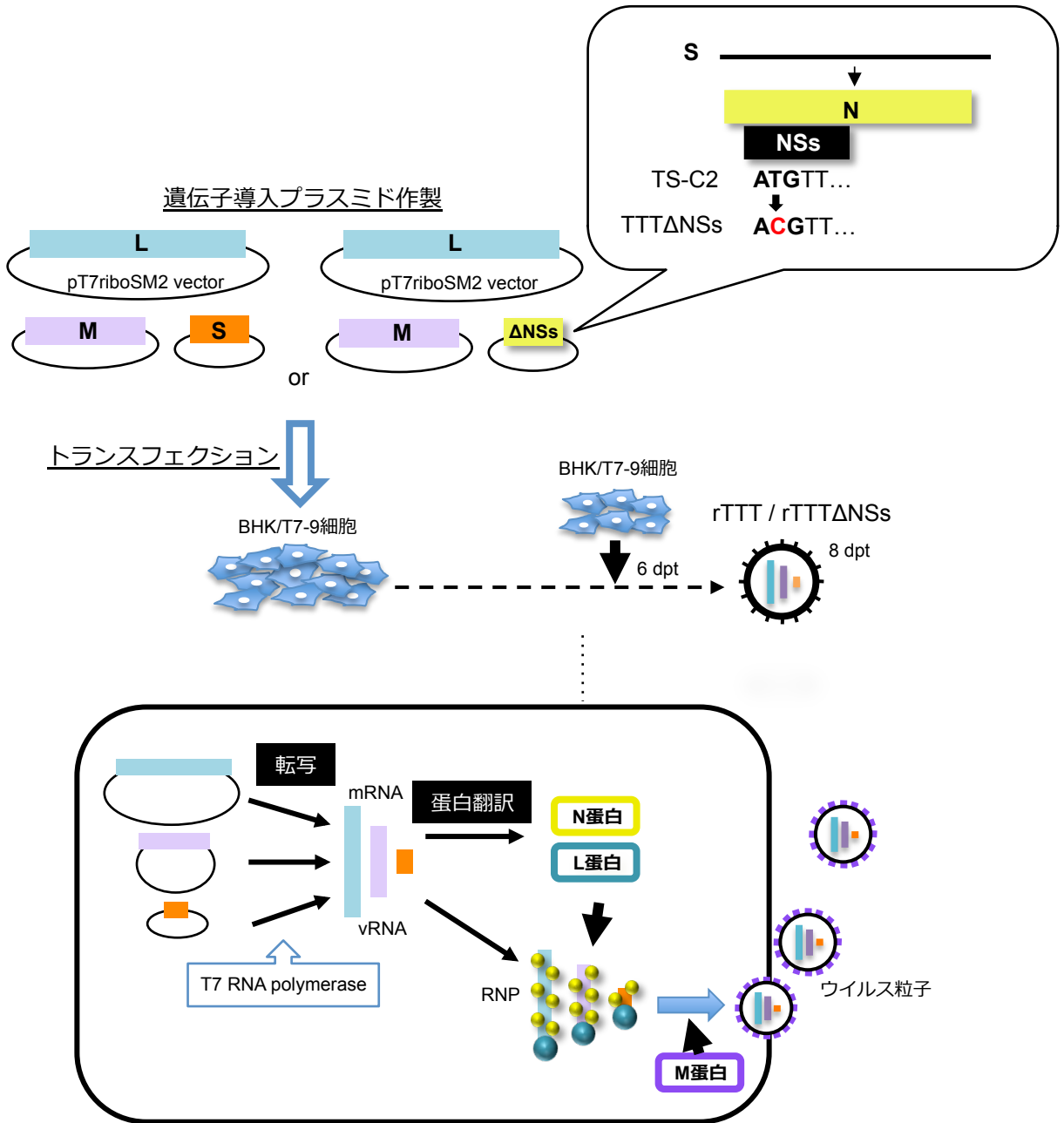


図1-1 リバーシジェネティクスによるAKAVの作出模式図



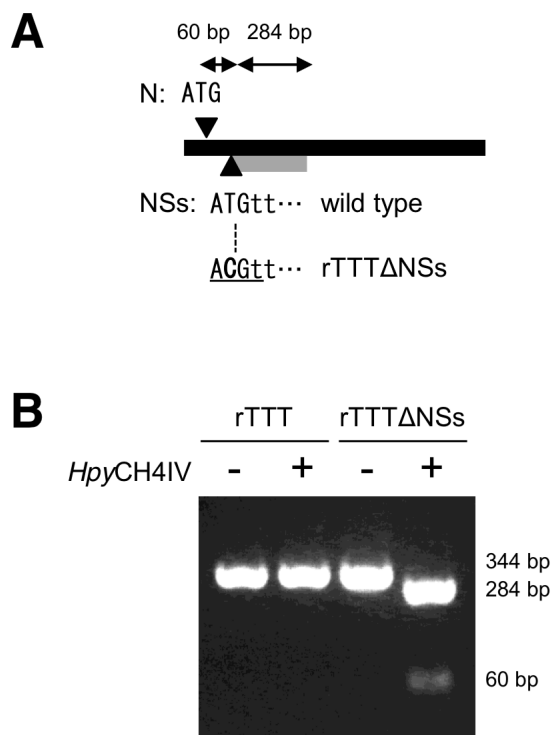


図1-2 組換えAKAVの構築

(A) S RNA分節における非構造タンパクNSsの翻訳開始サイトの模式図。NSsの開始コドンには、Nタンパクのアミノ酸配列を変えることなくNSs翻訳を阻止するよう変異を入れている。(B) NSs欠損組換えAKAVの遺伝子識別。(A)の下線部に示されるように、rTTTΔNSsには*Hpy*CH4IV制限酵素サイトが入っている。感染細胞から抽出したRNAをRT-PCRし、得られたNSs ORFのうちの344 bpのDNA断片を*Hpy*CH4IV酵素処理した。rTTTΔNSsのRT-PCR産物を*Hpy*CH4IV酵素処理したものでは、60 bpと284 bpの2つのDNA断片が確認された。RT反応を行っていないコントロールサンプルでは、バンドが検出されなかった。

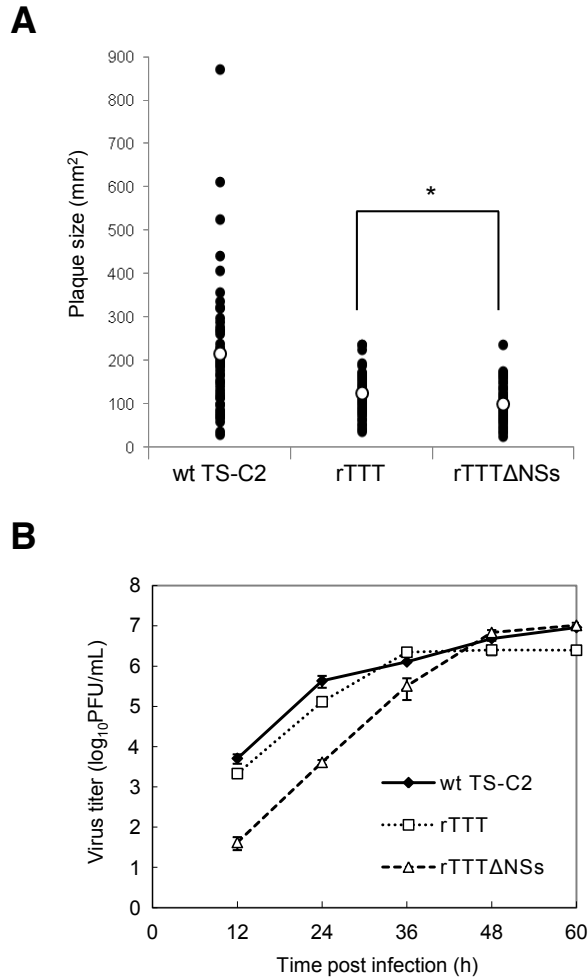


図1-3 組換えAKAVの*in vitro*での特性

(A) 組換えウイルスのプラックサイズ比較。各ウイルスについて、50個のプラックを無作為に選択し大きさをImageJソフトウェアで計測した。平均は図の白丸 (○) で示される (\*,  $P < 0.05$ ; two-tailed Student's *t*-test)。(B) 組換えウイルスの増殖曲線。HmLu-1細胞に各ウイルスをMOI = 0.01で感染させ、上清を継続的に回収し、各ウイルス力価を決定した。3回の実験結果を、平均値 ± SDで示す。

## 第2章

### ヤギを用いた

### 新規アカバネウイルスワクチン候補株の検討

## 要旨

AKAV 弱毒生ワクチンの発達は、アカバネ病の発生を減らして来たが、近年報告されているような抗原性および病原性の変異体の出現に対応するためにも、より効果的なワクチン開発が必要となる。第 1 章では、T7 RNA polymerase 系 AKAV リバーシジェネティクス法により、組換え TS-C2 株ウイルス (rTTT) とその変異体ウイルス (rTTTΔNSs) を作出した。rTTTΔNSs は、病原性因子となる非構造タンパク NSs を欠損させたものである。第 2 章では、妊娠ヤギ感染モデルを用いて、これら組換えウイルスの安全性とワクチンとしての可能性を評価した。妊娠ヤギへの接種試験では、どちらの組換えウイルスも臨床症状を起こさなかった。母親の白血球もしくは胎子の脳からウイルス RNA の検出を試みたところ、rTTT 接種で胎子脳からごく少量の RNA が検出されたのに対して、rTTTΔNSs 接種では全く検出されなかった。対照的に、wt 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、市販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、*in vitro* で NSs 欠損株は元株より弱毒化されており、強い免疫反応を引き出すことが証明された。作出した組換えウイルスは、アカバネ病の流行をコントロールできる生ワクチンウイルスの候補となる可能性がある。

## 背景と目的

AKAV の宿主にあたる、ウシ、ヒツジ、ヤギ等の妊娠動物を用いた感染実験は、動物の扱いづらさから制限があり、報告はかなり古いものが多数である。なかでもヤギの感染実験は、これまで野生型 OBE-1 株を用いたもののみである (Kurogi et al., 1977b; Konno et al., 1982)。現在生ワクチン株として用いられている TS-C2 株は、子ウシと妊娠ウシでその効果と安全性が確認されている (Kurogi et al., 1979a) が、妊娠ヒツジでは安全性が十分ではなく (Hashiguchi et al., 1981)、妊娠ヤギではその効果、安全性はともに報告されていない。

AKAV の非構造タンパク NSs は、I 型インターフェロンのアンタゴニストとして作用し、宿主のタンパク合成を制御する (Weber et al., 2002)。第 1 章では、組換え TS-C2 ウイルス (rTTT) と、その NSs 欠損変異体ウイルス (rTTTΔNSs) について、*in vitro* での特性を解析した。rTTTΔNSs は、最終的な最高力価は rTTT と同等であったが、rTTT に比べて培養細胞で複製効率が低く、弱毒化していることが想定される。

第 2 章では、これら組換えウイルスを用いた妊娠ヤギの感染実験を行い、感染親ヤギの免疫反応やその胎子に対する安全性を調査することで、新しいワクチン候補としての有用性を評価した。また、以前の報告 (Kurogi et al., 1977b; Konno and Nakagawa, 1982) と合わせて、ウシ等に比べて比較的扱いやすい小型反芻動物であるヤギの妊娠動物感染モデルが、AKAV の研究に有用であることを示す。

## 材料と方法

### ウイルス

リコンビナントの TS-C2 ウイルス (rTTT) とその NSs 欠損変異体ウイルス (rTTTΔNSs) については、第 1 章で述べた通り、T7 RNA polymerase 系リバーシジェネティクス法によって得られた。rTTTΔNSs は、細胞培養において rTTT よりもウイルス増殖が遅かったが、感染 48 時間後では rTTT と同等な感染力価を示すことが確認されている。神経強毒株である wt Iriki 株と、これらの組換えウイルスを HmLu-1 細胞で継代培養後、力価測定し、以降の感染実験および血清学的診断に用いた。

### 動物実験

9 ヶ月齢から 2 歳齢の雌シバヤギ 7 頭を、東京大学大学院農学生命科学研究科、高等動物教育研究センター、附属牧場から購入した。妊娠 37 日から 49 日間の各 2 頭に、3 mL の wt Iriki 株 ( $4.6 \times 10^7$  PFU)、もしくは組換えウイルス (rTTT:  $4.6 \times 10^7$  PFU, rTTTΔNSs:  $2.3 \times 10^7$  PFU) を頸静脈内接種した。コントロールとして、1 頭のヤギに 3 mL の PBS を投与した。投与から実験終了日まで、1 日 1 回、直腸温の計測と一般的な臨床所見の観察を行った。また投与日と解剖日に、体重を計測した。感染 0、3、14、21 日後に採取した血液サンプルはヘパリン処理し、バフィーコートから白血球を回収した。得られた白血球は  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。感染 0、1、2、3 週間後に血清サンプルを採取し、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。感染 3 週間後に安楽殺し、子宮から胎子を取り出して各臓器を採取した。これらの臓器は、病理解析用にホルマリン固定し保存するとともに、RNA 解析用に  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

これらの動物接種実験は、(財)生物科学安全研究所の動物実験委員会での審査後(承認番号:倫 120208-1)、当研究所内 BSL2 対応動物試験室にて「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、当研究所員の協力の元、当該研究所動物実験規則および動物実験実施マニュアルに沿って実施した。

#### 病理学的解析

解剖時、胎子的大脑、小脳、脳幹、脊髄、その他臓器、胎盤を採取した。サンプルは、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。各組織の連続切片を作製し、hematoxylin-eosin (HE) 染色による病理組織学的検査と免疫染色による AKAV 抗原検出を行った。免疫染色は、第一抗体としてウサギ抗 OBE-1 株血清 (200 ×) (Tsuda et al., 2004) を用い、EnVision 検出システム (Dako) で反応させた後、3,3'-diaminobenzidine (DAB) で発色させた。

#### 定量 RT-PCR

親ヤギの白血球もしくは胎子組織から、TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いてウイルス RNA を抽出した。抽出した RNA のうち 2 μL を、cDNA 合成に使用した (PrimeScript RT Reagent Kit [Takara])。AKAV の cDNA を増幅するために、ak151f プライマー (5'-GCT AGA GTC TTC TTC CTC AAC CAG AA-3') と ak231r プライマー (5'-AAA AGT AAG ATC GAC ACT TGG TTG TG-3') (Stram et al., 2004) を使用した。内在性コントロールとして、18S リボゾーム RNA を増幅する、18S-qF (5'-AAT TCC CAG TAA GTG CGG GTCA-3') と 18S-qR (5'-GAT CCG AGG GCC TCA CTA AAC C-3') を使用した。定量 PCR は、RT 反応産物 2 μL、Power SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μL (Applied Biosystems)、プライマー各 10 μM、水を加え、25 μL の反応系で行った。反応は、

95°C : 10 分の後、 95°C : 15 秒、 60°C : 30 秒を 45 サイクルの条件で行い、 Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (Takara) で解析した。

#### 血清学的検査

AKAV 中和抗体は、HmLu-1 細胞を用いた TCID<sub>50</sub>-format アッセイ (Ogawa et al., 2007a) で検出した。ウイルス接種したヤギの血清を段階希釈し、各接種ウイルス 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/0.05 mL を 1 時間反応させた後、HmLu-1 細胞を重層して、7 日間 CPE の有無を観察した。各血清における中和抗体価は、ウイルスが 50%の細胞に CPE を起こした最も高い血清希釈率の逆数で表した。



## 結果

### ヤギの感染実験

購入後、飼育環境に3日間馴化させた後、妊娠ヤギに wt Iriki 株、rTTT、rTTTΔNSs を感染させた。実験期間中、全てのヤギにおいて、発熱や臨床症状の変化は無かった (図 2-1A、B)。感染3週間後、解剖し胎子を取り出したところ、wt Iriki 株接種個体からの胎子は、肉眼的変化を示した。親ヤギ #2 から取り出した胎子のうち1頭 (#2-1) は、顕著な水頭性無脳症であった (図 2-2A、D)。もう1頭の同腹胎子には異常が見られなかった。胎子#3-1 では大脳半球が透けており (図 2-2B 左図)、横切断面から、大脳半球の菲薄化と側脳室の拡大 (図 2-2C 左図、矢頭) が観察された。rTTT や rTTTΔNS 接種個体およびコントロール (PBS 接種個体) からの胎子は、肉眼的異常は見られなかった (図 2-2B、C 右図)。

病理組織学的解析では、胎子#2-1 で大脳皮質の菲薄化と側脳室の拡大がみられた (図 2-2D、矢頭) が、明らかなウイルス性脳炎は見られなかった。一方、AKAV 抗原は、wt Iriki 接種個体からの胎子の大脳や脳幹で検出され (表 2-1)、特に#2-1 で顕著であった (図 2-2E)。AKAV 抗原は、大脳半球、中脳、間脳のニューロンで広く検出された。脳以外の組織で、抗原は検出されなかった (表 2-1)。組換えウイルス接種個体からの胎子では、全ての組織で AKAV 抗原は検出されなかった。

ウイルス RNA を検出するために、母ヤギの白血球および胎子の脳組織を用いて、定量 RT-PCR を行った。感染3日後の wt Iriki 接種個体#2 の白血球から、高レベルのウイルス RNA が検出された (図 2-3A) が、他の親ヤギの白血球からは検出されなかった。胎子#2-1 の脳は、他の胎子 (#3-2、#4-2、#5-2) の脳に比べて、十分にウイルス RNA レベルが高かった (図 2-3B)。低いレベルであるが、rTTT 接種個体の胎子からも、ウイルス RNA が検出された。rTTTΔNSs 接

種個体からの胎子は、コントロールからの胎子とウイルス RNA が同レベルであったことから、rTTTΔNSs 接種個体にはウイルスが存在しないといえる。

#### 抗体産生

AKAV 中和抗体価を調べるために、ウイルス接種前および接種後 3 週間まで毎週、妊娠ヤギから血清を採取した。6 頭中 5 頭は、接種前に AKAV 抗体を持っていなかったが、1 頭 (#3) は、予め抗体価 8 を持っていたことが分かった (表 2-2)。この原因は不明であるが、この個体は、ウイルス接種 2 週間後に最も高い抗体価 (181) を示しており、これは結果的に、ブースト効果が起きたと考えられる。

全ての接種個体で、接種 1 週間後にウイルス中和抗体価が検出され、その抗体価レベルは、接種 2 から 3 週間後にピークに達した。個体#3 を除いて、rTTTΔNSs 接種個体 (#7) の血清が、最も高い抗体価 (接種 2 週間後: 54) を示した。コントロールでは中和抗体価は検出されなかった。

比較対照として、TS-C2 株ベースの市販ワクチン (Nisseiken, Oume, Japan) を非妊娠ヤギ (1 歳 2 ヶ月齢~2 歳 6 ヶ月齢) に同様の方法で接種し、中和抗体価を測定した。中和抗体価は接種 1 週間後では検出できなかった。ワクチン接種した 5 頭中 4 頭で、接種 2 週間後に最も高い抗体価 ( $15.0 \pm 6.9$ ) を示し、残り 1 頭は接種 3 週間後に最も高い抗体価 (4.8) を示した (表 2-2)。これにより、rTTTΔNSs の免疫反応を引き起こす能力は、現行ワクチンと同等であることが示された。

## 考察

Ogawa らおよびその他の報告により、NSs はオルソブニヤウイルスの病原性に関与しており、ウイルスの毒性因子であることが示されている (Ogawa et al., 2007c; Bridgen et al., 2001)。そこで、OBE-1 株を弱毒化した TS-C2 株の NSs を欠損させることにより、より弱毒化されると予想した。実際、rTTT 接種ヤギでは、少量のウイルス RNA が胎子の脳から検出されたのに対して、rTTTΔNSs 接種では、母ヤギの白血球およびその胎子の脳からウイルス RNA は検出されなかった。これは、現在使用されている生ワクチンウイルス株よりも、rTTTΔNSs が十分に弱毒化されていることを示している。

ワクチン候補としてこの組換えウイルスを評価するために、本研究では妊娠ヤギの感染モデルを用いた。TS-C2 株は、ヒツジに対して免疫賦与効果がある一方、安全性が不十分なことが分かっている (Hashiguchi et al., 1981)。ヤギではその安全性と免疫原性はまだ報告されていない。本研究における妊娠ヤギの感染モデルでは、Iriki 株の接種が感染親ヤギにウイルス血症を起こした。これらのヤギから取り出した胎子は、水頭性無脳症や大脳半球の低形成といった肉眼的異常を示し、その脳から豊富なウイルス RNA 量が検出された。これは、妊娠ウシの AKAV 自然感染における病態と一致している。またこの結果により、Iriki 株が神経病原性だけでなく催奇形性を持つことが確認された。以上のことから、これまでの実験感染報告 (Kurogi et al., 1977b; Konno and Nakagawa, 1982) と合わせて、妊娠ヤギの感染モデルは、AKAV 研究に役立つと考えられる。一方、Iriki 株感染ヤギの病理所見で明らかな病変が見られなかったのに対して、ウシの Iriki 株感染実験では、自然感染の場合と同様、重篤な神経症状の他に、リンパ球の血管周囲浸潤、グリア結節といった病理組織学的変化を示した (Miyazato et al., 1989)。これは、Iriki 株のヤギとウシに対する病原性が異なる可能性を示唆する。このように、宿主動物の

なかでも種によって AKAV 感受性が異なることから、各宿主動物の感染モデルがワクチン開発における評価基準として必要かもしれない。また、小型反芻動物であるヤギは扱いが簡易であり、TS-C2 株接種個体の胎子でウイルス RNA が検出されたことから、ウシに比べて AKAV 感受性が強いことが予想されるため、より厳しいワクチン候補の評価モデルとして有用である。

本章では、rTTTΔNSsがヤギにおいて十分に液性免疫反応を引き起こすことを示した。rTTTΔNSsの投与は、rTTTや市販ワクチンと同等もしくは、より高いレベルの中和抗体産生をもたらした。これは、rTTTΔNSsが生ワクチンとして十分な免疫賦与効果を持つことを意味する。rTTTΔNSsが実際に有用なワクチンとなることを証明するためには、rTTTΔNSs免疫後にチャレンジ実験を行う必要があり、これは今後の研究課題である。このようなウイルスの遺伝的操作は、蔓延しているAKAV株の抗原に適合するワクチンウイルス開発に有用である。例えば、TS-C2株のS、Lと、抗原性変異株のMを持つリアソータントのようなウイルスが、ワクチン候補として作出できる。リバーシジェネティクス法を用いることで、2つのウイルスを共感染させてリアソータントを作製する従来の手法より、組換えウイルスが確実に効率良く構築することができる。さらに、rTTTΔNSsといったNSs欠損組換えウイルスに基づくワクチンは、ワクチン接種個体と感染個体を区別するDIVAとして利用できるかもしれない。しかし、自然感染動物におけるAKAVのNSs抗体誘導の普遍性はまだ確認されておらず、NSs抗体検出系も樹立されていない。自然感染個体でNSs抗体が必ずしも検出されないというRVFVの例からも、NSs欠損ワクチン株を用いたAKAV 感染におけるDIVAの実用化は、まだ克服すべき点が多い。

表2-1 胎子組織におけるAKAV抗原の検出

Virus	Fetus No.	Days of pregnancy when removed	Cerebrum	Cerebellum	Brain stem	Spinal cord	Visceral organs	Placenta
Mock (PBS)	#1-2	70	-	-	-	-	-	-
wt Iriki	#2-1	68	+	NT	+	-	-	-
	#3-2	58	+	NT	+	-	-	-
rTTT	#4-2	62	-	-	-	-	-	-
	#5-2	65	-	-	-	-	-	-
rTTTΔNSs	#6-2	59	-	-	-	-	-	-
	#7-2	68	-	-	-	-	-	-

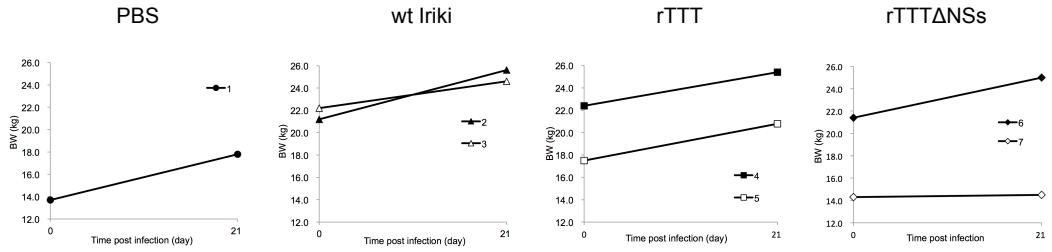
NT (Not tested): 未試験

表2-2 妊娠ヤギにおけるウイルスの中和抗体価

Virus	Pregnant goat	Weeks post infection			
		0	1	2	3
Mock	#1	<2	<2	<2	<2
wt Iriki	#2	<2	7	45	45
	#3	8	23	181	108
rTTT	#4	<2	2	27	14
	#5	<2	7	27	19
rTTTΔNSs	#6	<2	7	16	23
	#7	<2	16	54	32
vaccine TS-C2	5 non-pregnant goats	<2	<2	4 - 23	5 - 16

比較対照として、市販ワクチン（TS-C2株）を、製品の説明書通りに非妊娠ヤギに投与した。

A



B

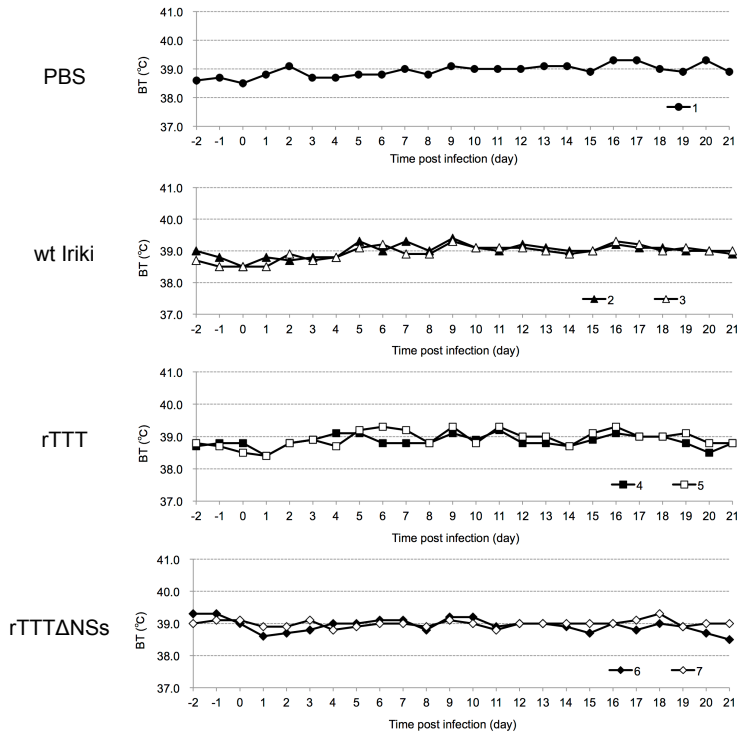


図2-1 感染ヤギにおける臨床症状

PBS (#1)、wt Iriki株 (#2、#3)、rTTT (#4、#5)、rTTTΔNSs (#6、#7) を、妊娠37日から49日のヤギに頸静脈接種し、臨床症状を観察した。(A) 体重変化。接種前と解剖時に測定。(B) 体温変化。接種2日前から解剖時まで毎日測定。

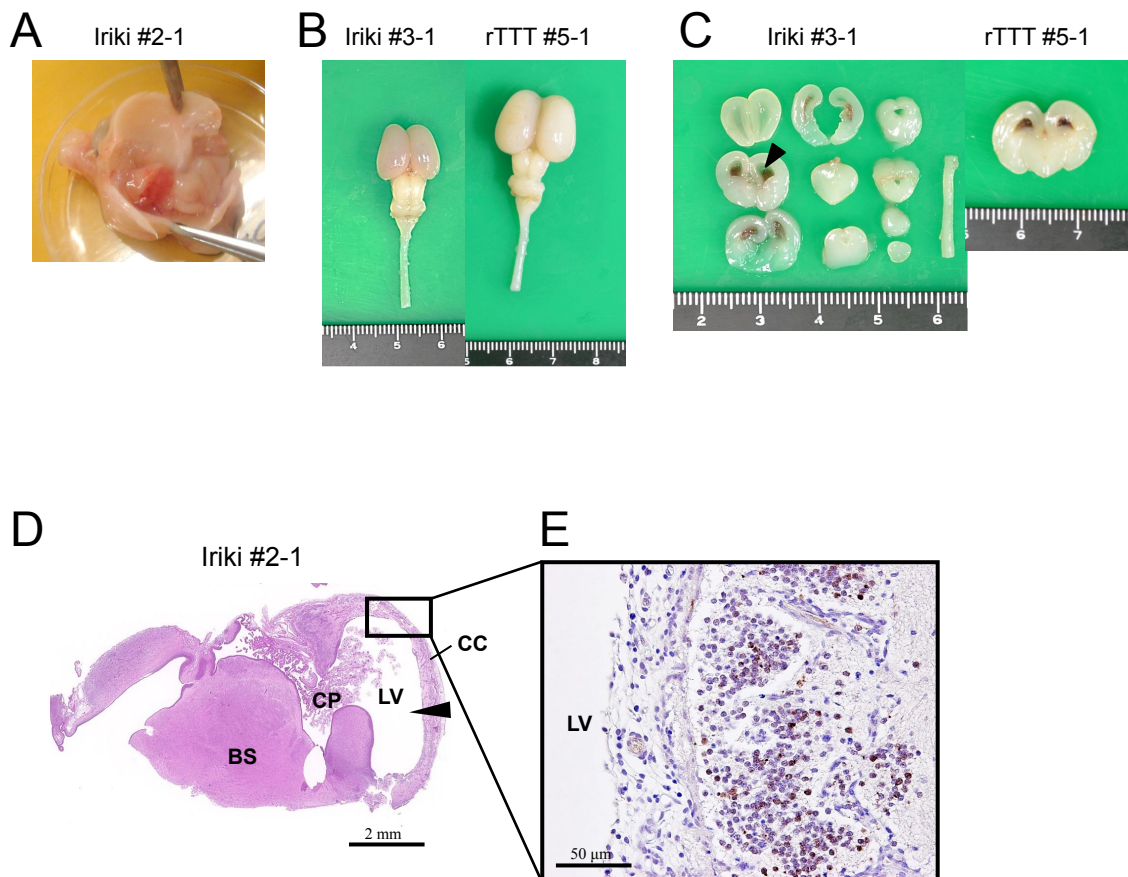


図2-2 感染ヤギから取り出した胎子の、肉眼的所見および組織学的所見

(A) wt Iriki株接種個体からの胎子 (#2-1) 脳の解剖所見。水頭性無脳症の様相を示す。(B) wt Iriki株接種個体からの胎子 (#3-1) の脳 (左写真)。rTTT接種個体からの胎子 (#5-1) (右写真) が正常であるのに対して、大脳が透き通っている。(C) (B) の脳の連続冠状断面。#3-1の脳では側脳室の拡張が見られる (矢頭)。(D) #2-1脳の冠状断面のHE染色像。側脳室で著名な脳室拡張が見られる (矢頭)。(E) #2-1脳のAKAV抗原による免疫染色。(D) の四角で囲まれた部分の高倍率写真。ウイルス抗原は、大脳実質、大脳半球で大量に検出された。LV (lateral ventricle) : 側脳室、CC (cerebrum cortex) : 大脳皮質、CP (choroid plexus) : 脈絡叢、BS (brainstem) : 脳幹。



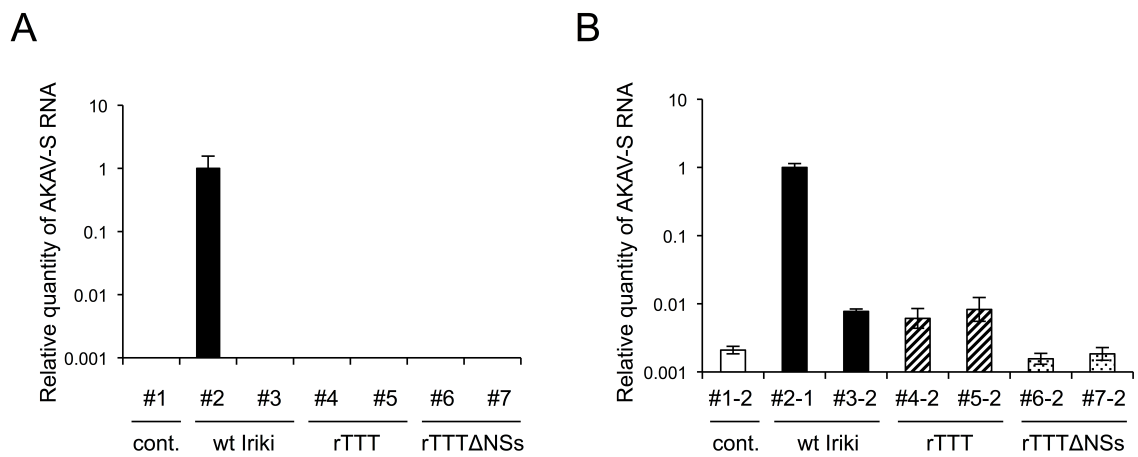


図2-3 定量PCRによるAKAV RNAの検出

(A) wt Iriki株もしくは組換えウイルスを妊娠ヤギに接種し、3日後の白血球におけるAKAV RNAを相対定量したもの。

(B) 感染3週間後に妊娠ヤギから取り出した、胎子脳におけるウイルスRNAの相対定量値。#1-2、#2-1、#3-2、#4-2、#5-2、#6-2、#7-2はそれぞれ、(A)における妊娠ヤギ、#1、#2、#3、#4、#5、#6、#7からの胎子を示す。各試験はduplicateで2回行なった。

## 第3章

# 蛍光タンパク発現アカバネウイルス の作出と解析

## 要旨

本研究では、第1章で確立したリバーシジェネティクス法を用いて、アカバネ多価ワクチンの作出を将来的な目標とし、外来遺伝子挿入AKAVの構築法を確立した。挿入遺伝子の発現を容易に検出できるよう、高感度緑色蛍光タンパク質 (eGFP) を発現した組換えAKAV (eGFP-AKAV) を作出した。このウイルス作出のために、RVFVのSゲノムの遺伝子間領域 (IGR) を利用して、マイナス鎖にN/NSsとプラス鎖にeGFPをコードした、アンビセンスAKAV Sゲノムを人工的に構築した。作出した組換えウイルスは、継代後もeGFP蛍光を発現し、培養細胞にCPEを起こした。この結果は、アンビセンスRNAでコードしたeGFP遺伝子が、安定して保持されていることを示している。eGFP-AKAVにおけるN/NSsとeGFP mRNAの転写は、IGR内で終結していた。RVFVでは、NとNSsの転写終結サイトはある特定のシグナル配列によって決定されているが、人工的に構築したAKAVでは、RVFVの場合と異なったメカニズムで転写終結しているようである。この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た。eGFP-AKAV感染マウスから取り出した脳の凍結切片では、小脳、橋、延髄でeGFP蛍光が検出できた。本研究で確立したアンビセンスゲノムを使って蛍光ウイルスを作出する手法は、ウイルス遺伝子そのままを保持し、かつ安易に可視化できる蛍光ブニヤウイルスを作出することができる。また蛍光遺伝子を別の病原体の遺伝子に置き換えることで、アカバネ多価ワクチンの作出に繋がると想定される。

## 背景と目的

オルソブニヤウイルスを始めとするブニヤウイルスの多くは、マイナス鎖の S 分節を持ち、N と NSs タンパクが単一の mRNA 上で ORF に重複してコードされている (Akashi et al., 1997; Elliott, 1989; Fuller et al., 1983; Fuller and Bishop, 1982)。一方、RVFV といったフレボウイルス属やトスポウイルス属のウイルスは、N と NSs を発現するアンビセンス鎖の S 分節を持ち、N の ORF はマイナス鎖であるが、NSs の ORF はプラス鎖になっている (Giorgi et al., 1991)。N と NSs の ORF は、シトシンに富んだ遺伝子間領域 (intergenic region: IGR) で繋がれている (図 3-2A)。

大動物を扱った AKAV 感染実験を行う場合、バイオセーフティレベル 2 の生物学的封じ込め施設が必要となるため、宿主である反芻動物への病原性に関する研究は制限される。代わりに、*in vivo* 研究のモデル動物としてマウスが使われてきた。マウスへの病原性はしばしば、皮下接種や腹腔内接種で評価される (Ogawa et al., 2007a; Kurogi et al., 1978b)。さらに、経胎盤感染のモデルとして妊娠ハムスターが (Andersen and Campbell, 1978)、催奇形性のモデルとしてニワトリの発育鶏卵が使用されている (McPhee et al., 1984)。

蛍光ウイルスは、*in vivo* で容易にウイルス粒子の動向が追跡できるため、病原性の研究に役立つ。以前には、同じオルソブニヤウイルスである BUNV で、培養細胞でのウイルス複製に必須ではないことが分かっている領域 (Shi et al., 2009) を削った Gc タンパクに、高感度緑色蛍光タンパク (eGFP) を融合させた組換えウイルスが作出された (Shi et al., 2010)。しかし、このウイルスを細胞培養で何度か継代すると、挿入された eGFP 遺伝子はウイルスの構成遺伝子とともに欠落し、これらを安定して維持することができなかった。

本研究では、eGFP で標識した AKAV を作出するために、RVFV のアンビセンス方式を使って、AKAV S ゲノムの N/NSs 遺伝子の下流に、IGR と eGFP の遺伝子配列を挿入した。回収できたウイルス (eGFP-AKAV) は、培養細胞で十分に複製し、eGFP は安定して発現していた。マウスの感染実験では、eGFP-AKAV は親株ウイルスと同等の神経病原性を示した。さらに、蛍光検出によって、マウスの脳におけるウイルス感染領域を容易に同定することができた。

## 材料と方法

### 細胞とウイルス

第1章で記したように、BHK/T7-9細胞 (Ito et al., 2003) は37°Cで、5% FCS、10% TPB加EMEMで培養した。HmLu-1細胞は、37°Cで、5% FCS加DMEMで培養した。本研究では、組換えウイルスを作出するために、神経病原性AKAVであるIriki株 (Miyazato et al., 1989) を用いた。ウイルスは、無血清培地でHmLu-1細胞を用いて継代した。

### プラスミド構築

組換えウイルス作出のため、第1章で確立した、AKAVのT7 RNA polymeraseによるリバースジェネティクス法を用いた。Iriki株のL、M、S分節のcDNAがそれぞれクローニングされた、ウイルスRNAを発現する3つのプラスミド、pT7riboSM2/IL、pT7riboSM2/IM、pT7riboSM2/ISを構築した。プラスミドpT7riboSM2/ISから、eGFP遺伝子をN遺伝子と逆方向に挿入したpT7riboSM2/S-eGFPを構築した。以下、挿入の手順を示す (図3-1)。eGFPのORFは、pEGFP-N1 (Clontech) からクローニングした。eGFP ORFの上流に、S分節5' UTRのうち30 bpの配列を付加した。これに使用したプライマーは、IrikiS-3' NCR+GFP-F (5'-GAA GCA AGG AAA CTG GAG AAT CAG CAA AGA ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG-3') と MluI+GFP-R (5'-AAA ACG CGT TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT-3') である。S分節5' UTRの全長は、IrikiS-3' NCR-F (5'-TCT TTG CTG ATT CTC CAG TT-3') とT7riboSM2-SR2 (表1-1) のプライマーペアを使って合成した。これら配列が重なり合った2つのDNA断片 (eGFPにS分節5' UTRの一部を付加したものと、S分節の5' UTR全長) が、PCRの鋳型として使われた。この時用いたプライマーは、T7riboSM2-SR2とMluI+GFP-Rである。結果として、eGFPのORFとS分節5' UTR全長を含んだDNA断片が得られ

た。次に、このDNA断片の下流に、RVFV ZH548株（GenBank受入番号：DQ380151）のIGRの5'側末端55 bpの配列が、段階的に付け加えられた。プライマーペアは、T7riboSM2-SR2とGFP+IGR-R1（5'-GGG GGG TGG GGG GTG GGG CAG CCT TAA CCT TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT-3'）、T7riboSM2-SR2とGFP+IGR-R2（5'-GGG AGT TGG GGT TAC GGT CGG GAT TGG GGG GTG GGG GGT GGG GCA G-3'）を用いた。プライマーT7riboSM2-SF（表1-1）とIrikiS+IGR-R（5'-CCC CCA ATC CCG ACC GTA ACC CCA ACT CCC CTT CCC CCC AAC CCC CTG GGC AGC CAC TTA GAT CTG AAT ACC AAA TTG AG-3'）を用いて、IGRの3'側末端（57 bp）を延ばし、N/NSs ORFの下流に加えた。2つのDNA断片（IGRの3'側末端付加N/NSs ORFと、IGRの5'側末端付加eGFP ORF）をテンプレートとして用い、プライマーT7riboSM2-SFとT7riboSM2-SR2を使ってPCRを行った。最終的に、N/NSs遺伝子とIGR配列、そしてeGFP遺伝子を含むアンビセンス構造のS分節（S-eGFP）が作出された。このS-eGFPをEsp3I制限酵素サイトでpT7riboSM2ベクター（Habjan et al., 2008）に挿入し、pT7riboSM2/S-eGFPを構築した。

#### 組換えウイルスの作製

自己複製型の組換え AKAV 変異株の作製と使用は、「遺伝子組換え等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等の拡散防止措置に関する大臣確認後（確認番号：23 受文科振第 2073 号および 28 受文科振第 419 号）に関連法令を遵守し、実施した。

pT7riboSM2/IL、pT7riboSM2/IM、pT7riboSM2/ISを用いて、T7系リバーシジェネティクス法により、wt Iriki株AKAV（AKAV-RG）を作出した。AKAV-RGはコントロールウイルスとして使用した。eGFP-AKAVを作出するために、6 wellプレートにコンフルエント手前のBHK/T7-9細胞を蒔き、1.2 μgのpT7riboSM2/IL、pT7riboSM2/S-eGFPと、0.6 μgのpT7riboSM2/IM

を200  $\mu$ LのOpti-MEM (GIBCO) に加えた混合物を、9  $\mu$ LのTransIT-LT1 (Mirus) でトランスフェクトした。トランスフェクション3日後に培養上清を回収し、HmLu-1細胞で継代した。得られたウイルスはHmLu-1細胞で3回ブラック純化し、以降の実験に使用するまで-80°Cで保存した。組換えウイルスは、感染細胞におけるCPEの有無と、蛍光顕微鏡 (Eclipse TS100, Nikon, Japan) でeGFP発現を観察して確認した。組換えウイルスの力価は、以前の報告 (Ogawa et al., 2007c) の通り、ブラックアッセイで決定した。

#### RT-PCR解析

ウイルスRNAは、感染細胞の上清から、QIAamp viral RNA Mini kit (Qiagen) を使って回収した。S、M、L分節の3'側末端配列にアニーリングさせるプライマーT7riboSM2-SF、T7riboSM2-MF (5'-AAT CGT CTC CTA TAG AGT AGT GAA CTA CCA CAA CAA AAT G-3')、T7riboSM2-LF (表1-1) を使って、SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) でcDNAを合成した。各3分節は、cDNAからLA Taq polymerase (TaKaRa Bio) でPCR合成した。T7riboSM2-SFとT7riboSM2-SR2、T7riboSM2-MFとT7riboSM2-MR (5'-AAT CGT CTC CAC CCA GTA GTG TTC TAC CAC AAC AAA TAA TTA T-3')、T7riboSM2-LFとT7riboSM2-LR (表1-1) のプライマーペアを、S、M、L RNA分節の合成にそれぞれ使用した。得られた増幅産物はアガロースゲル電気泳動法でバンドの大きさを確認し、PCR cleanup kit (TaKaRa Bio) で精製した。精製したDNA産物は、各分節に適切な制限酵素 (S: *Bst*XI, M: *Eco*RI, L: *Kpn*I) で処理し、長さを確認した。さらにS-eGFPは、標準プロトコールにより、3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems) で全長のシーケンス配列を確認した。

#### *in vitro*での増殖動態とブラック形態



コンフルエント手前のHmLu-1細胞に、eGFP-AKAVもしくはAKAV-RGをMOI = 0.01で感染させた。37°Cで1時間培養した後、細胞に吸着していないウイルスをPBSで洗浄して取り除き、無血清培地を加えて培養した。感染後、異なった時点で上清を回収し、HmLu-1細胞を用いたブラックアッセイで力価測定した。この実験はtriplicateで行った。eGFP-AKAVとAKV-RGのブラック形態の違いを調べるために、6 wellプレートに蒔いたHmLu-1細胞に各ウイルスを感染させ、37°Cで1時間インキュベートした。その後、ウイルス液を取り除き、細胞に0.8% (wt/vol) アガロースと2%FCS加DMEMを混ぜて重層した。感染4日後に、細胞をニュートラルレッドで染色した。

#### GFP発現ブラック数

作出したeGFP-AKAVをブラック純化後、HmLu-細胞で10回継代した。HmLu-1細胞を4 wellチャンバースライド (Lab-Tek chamber slides, Thermo) に蒔き、各継代数のeGFP-AKAVウイルス希釈液を37°Cで1時間感染させた。吸着しなかったウイルス液を取り除き、0.8%メチルセルロースと2%FCS加DMEMを混ぜて重層した。感染3日後にメチルセルロースを含んだ培地を取り除き、細胞をPBSで3回洗浄後、生細胞をZeiss LSM 510共焦点顕微鏡で観察した。全ブラック数と、蛍光が見られるブラックの数をカウントし、異なった継代数のウイルスでその割合を比較した。結果は、各継代サンプルにつき、少なくとも4 well分のデータを集計した。

#### 免疫蛍光アッセイ

eGFP-AKAVの蛍光イメージングのために、HmLu-1細胞を4 wellチャンバースライドにコンフルエント手前の状態に蒔き、eGFP-AKAVをMOI = 0.01で37°C、1時間感染させた。吸着

しなかったウイルス液を取り除き、細胞に0.8%メチルセルロースと2% FCS加DMEMを混ぜて重層した。感染2日後にメチルセルロースを含む培地を取り除き、細胞をPBSで洗浄した。細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS希釈0.3% Triton X-100で5分間、透過処理を施した。PBSで洗浄し30分間のブロッキング後、抗ウサギAKAV血清 (Tsuda et al., 2004) で1時間インキュベートした。二次抗体として、Alexa 546結合抗ウサギIgGsで1時間インキュベートした。PBSで細胞を洗浄し、風乾した。サンプルは蛍光染色用マウンティングメディウム (Dako) で封入し、カバーガラスで覆った。スライドは暗所で4°C保存し、解析に用いた。蛍光画像の取得には、Zeiss LSM 510共焦点顕微鏡を使用した。

### 3' RACE法による転写終結配列の同定

ウイルスRNAを感染HmLu-1細胞から抽出し、A-Plus Poly(A) polymerase tailing kit (Epicenter Biotechnologies) を用いて、製品プロトコール通りに*in vitro*でポリA付加した。その後サンプルは、QIAamp viral RNA Mini kitで精製した。約1 µgのポリA付加したRNAをテンプレートとして、oligo(dT)-containing primer (3' RACE- AP; Invitrogen) を用いて逆転写を行った。得られたcDNAから、3' RACE- APのアダプター領域に相同性のあるプライマーAUAP (Invitrogrm) と、AKAV Sの特異的プライマーS-0F (5'-CAT TTT CAA CGA TGT TCC AC-3') もしくはeGFPの特異的プライマー、GFP-F1 (5'-ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA-3') を用いて、LA Taq polymeraseでPCR反応を行った。増幅したPCR産物は、semi-nested PCRのテンプレートとして使用した。AKAV S (約360 bp) もしくはeGFP (約430 bp) の遺伝子配列を合成するためのプライマーは、AUAPとS459-478 (5'-GGG ATT TGC CCC TGG TGC TG-3') もしくはGFP-363F (5'-GAA CCG CAT CGA GCT GAA GG-3') を使用した。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動で解

析し、正しい大きさのDNAバンドを回収、精製した。精製したDNA産物は、pCR2.1-TOPO

(Invitrogen) にクローニングし、シーケンス解析を行った。

#### 動物感染実験と感染マウス脳の解析

3日齢のBALB/cCrSlcマウス(日本エスエルシー)に、AKV-RGもしくはeGFP-AKAVを、 $5 \times 10^4$  PFUと $5 \times 10^5$  PFU/0.1 mLの力価で腹腔内投与した。感染21日目まで、生死および臨床症状の観察を行った。観察期間中に瀕死状態になったマウスは安楽殺し、脳を採材した。蛍光イメージングのために、採材した脳をすぐに凍結組織切片作製用包埋剤ティッシュ・テック O.C.T コンパウンド(サクラファインテックジャパン)で包埋し、液体窒素で凍結後、使用まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。CM3050 Sクライオスタット(Leica)で、冠状断で $12 \mu\text{m}$ の連続凍結切片を作製し、シランコートのスライドガラスに載せた。切片の上から、蛍光染色用封入剤のVectashield mounting medium with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories)を載せ、カバーガラスで覆った。サンプルは遮光して、観察まで $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。蛍光像は、Leica DMT 300B顕微鏡で観察した。AKAVの抗原検出のために、脳を4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液で固定し、パラフィン包埋した。作製した連続切片をスライドガラスに載せ、Envision polymer method (Dako)を用いて免疫染色を行い、DABで発色させた。第一抗体には、OBE-1株の抗ウサギ血清( $\times 200$ 希釈)を使用した(Tsuda et al., 2004)。 $5 \times 10^5$  PFU/0.1 mLを脳内接種したマウスが瀕死状態になった時、脳および肝臓、脾臓、腎臓、肺を採取し、無血清培地で20%ホモジネートを作製後、ウイルス力価をHmLu-1細胞を用いたブラックアッセイで決定した。

遺伝子組換え体の動物実験は、東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会の承認の元（承認番号：P14-891）、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、「東京大学動物実験規則」および「東京大学動物実験実施マニュアル」病原体取扱いの規則に沿って行った。

## 結果

### eGFP-AKAV の作出

RVFV といったフレボウイルスでは、N mRNA と NSs mRNA の転写終結は、N ORF と NSs ORF の間の IGR 内で起こる (図 3-2A)。AKAV を含むオルソブニヤウイルスは、N や NSs タンパクの発現にアンビセンス方式を使わないが、BUNV の S RNA は潜在的にアンビセンスでの転写プロモーターを持つことが分かっている (Barr et al., 2005)。そこで本研究では、AKAV の N/NSs ORF と eGFP 遺伝子配列の 3'側に隣接して、RVFV の IGR を導入した S-eGFP (図 3-2B) を作出し、AKAV の S RNA がアンビセンスとして働くかどうかを試した。eGFP-AKAV を作出するために、S-eGFP、L、M の RNA 発現プラスミドを BHK/T7-9 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション3日後に細胞上清を回収し、新しく HmLu-1 細胞に重層したところ、2日後に eGFP 蛍光と CPE を観察することができた (図 3-3A)。eGFP-AKAV が S-eGFP RNA の全長を維持しているかを調べるために、RT-PCR で確認したところ、S-eGFP の全長である 1.7 kb の RT-PCR 産物が確認できた (図 3-3B)。また、各分節に適切な制限酵素 (S: *Bst*XI、M: *Eco*RI、L: *Kpn*I) で処理したところ、S 分節では AKAV-RG が 590 bp、279 bp の 2 断片、eGFP-AKAV では 910 bp、590 bp、170 bp の 3 断片が得られた。また両方のウイルスで、M 分節では 2.3 kbp、1.6 kbp、490 bp の 3 断片、L 分節では 5.7 kbp、1.2 kbp の 2 断片が得られ、これらはそれぞれ正しい大きさであった。さらに eGFP-AKAV の S RNA においては、シーケンス解析で塩基配列に変異や欠損が無いことを確認した。

### *in vitro*でのeGFP-AKAVの性状解析

培養細胞でのウイルス増殖において、S RNAにIGRとeGFPを挿入した影響を調べるために、HmLu-1細胞におけるプラックの形態と増殖曲線を調べた。eGFP-AKAVは、コントロールである親株AKAV-RGに対して著しく小さいプラックを形成した（図3-4A）。プラックサイズと一致して、eGFP-AKAVのウイルス力価はAKAV-RGよりも5倍ほど低かった（図3-4B）。AKAV-RGとeGFP-AKAVの最高力価はそれぞれ、感染48時間後の、 $3.6 \times 10^6$  PFU/mLおよび $7.2 \times 10^5$  PFU/mLであった。

eGFP-AKAV感染細胞が実際にeGFPを発現していることを確認するために、感染2日目に、細胞をAKAV抗体でインキュベートした。AKAV-RG感染細胞ではeGFPシグナルは見られなかったが、eGFP-AKAV感染細胞でeGFP蛍光が観察された（図3-5A）。eGFPタンパクは核内でも発現するが、AKAVタンパクは細胞質内で産生されるため、緑の蛍光は赤の蛍光と完全にマージしていない。eGFP-AKAV感染細胞では、AKAVタンパクはeGFP蛍光の無い細胞でも検出されたが、eGFP蛍光は感染細胞でのみ観察された（図3-5A）。これは、感染細胞でeGFPの発現が低いことを示唆する。注目すべきことに、蛍光はCPEが出現した後に観察されており、感染細胞において、eGFPが遅れて発現することを示している。つまり、eGFP-AKAV感染細胞においては、eGFPシグナルよりも、AKAVタンパクのシグナルの方が強いことが分かる。

遺伝子が安定して保持されているかを評価するために、eGFP-AKAVをHmLu-1細胞で10回継代した。各継代数において、ウイルス感染で出来たプラック総数とeGFP蛍光を発現したプラック数を決定し、蛍光プラックの割合を計算した。その結果、継代後も蛍光プラックの割合は減少していなかった（図3-5B）。興味深いことに、カウント時にeGFP蛍光が見られなかったプラックにおいても、プラックが大きくなった時点で蛍光が観察されており、これはeGFPシグナルの発現が遅れているためと推測される。以上の結果から、遺伝的に安定したeGFP発現アンピセンスAKAVの作出に成功したことが証明された。

## eGFP-AKAVにおけるN/NSs mRNAとeGFP mRNAの転写終結箇所の同定

RVFV S分節のmRNAの転写終結は、IGR内の終結シグナル (5'-CGUCG-3') によって起こることが分かっている (Albariño et al., 2007; Ikegami et al., 2007)。しかし、本研究で構築したeGFP-AKAVのS-eGFPでも、このシグナルが転写終結因子として機能しているかどうかは不明である。S-eGFPの転写終結サイトを決定するために、3' RACE法を用いた (図3-6A)。semi-nested PCRによって、N/NSs mRNAとeGFP mRNAの3'末端の増幅産物 (N/NSs: 約360 bp、eGFP: 約430 bp) を獲得し (図3-6B)、これらについてシーケンス解析を行った。eGFP-AKAVのN/NSs mRNAおよびeGFP mRNAには幾つかの転写終結サイトが存在しており、その殆どは、RVFVのNおよびNSs mRNAの転写終結サイトよりも上流に位置していた (図3-6C)。eGFP-AKAVのN/NSs mRNAの終末は、15クローンのうち14クローンで、IGR内の14-33 ntに位置しており、うち1クローンは63 ntに位置していた。またeGFP mRNAの終末は、IGR内の23 nt (3クローン) もしくは27 nt (2クローン) に位置していた (図3-6C)。RVFVの場合、N mRNAの終末はIGR内の65 ntに、NSs mRNAの終末は70 ntに位置する。これらの結果は、S-eGFPにおけるN/NSs mRNAおよびeGFPのmRNAは、RVFVのSにおける転写終結メカニズムとは異なることを示している。

## *in vivo*でのeGFP-AKAVの性状解析

eGFP-AKAVもしくはAKAV-RGの動物に対する病原性を調べるために、マウスを用いた感染実験を行った。マウスには各ウイルスを $5 \times 10^4$  PFUの力価で感染させた。eGFP-AKAVやAKAV-RGを感染させたマウスのほとんどは、感染4~13日目に臨床症状を示した。症状の進行において、2群間に明瞭な差はみられなかった。eGFP-AKAVおよびAKAV-RG感染マウスの約半

数が、後肢麻痺といった神経症状を現し、死に至った。2群の死亡率は40から50%であった（図3-7A）。生き残ったマウスも、被毛粗豪、下痢、後肢の痙攣、結膜炎様の炎症性反応等の症状を示した。

さらに、各ウイルスを $5 \times 10^5$  PFUの力価でマウスに感染させ、脳および内臓でのウイルス力価を調べた。2群間（各3匹）で、ウイルス力価に有意な差は無かった（表3-1）。eGFP-AKAV感染マウスの脳では、 $8.0 \times 10^7$ 、 $6.5 \times 10^7$ 、 $4.3 \times 10^6$  PFU/gであり、AKAV-RG感染マウスの脳は、 $2.8 \times 10^8$ 、 $9.5 \times 10^5$ 、 $2.5 \times 10^5$  PFU/gであった。また、AKAV-RG感染マウスでは、内臓で $1.1 \times 10^5$  PFU/gのウイルス力価が検出された。以上より、eGFP-AKAVは、マウスでAKAV-RGと同様のウイルス複製能と病原性を持つことが示された。

eGFP-AKAV感染マウスの病変部でのeGFPシグナルを可視化するために、瀕死状態になった時点でマウスを安楽殺し、脳を採材した。蛍光顕微鏡観察により、小脳および橋や延髄といった脳幹で、eGFP発現領域が観察された（図3-7C）。免疫染色でも、eGFP-AKAV感染マウスの小脳、橋、延髄でAKAV抗原の存在が明らかになり、これはAKAV-RG感染マウスと同様の結果であった（図3-7D）。



## 考察

本研究では、eGFPを安定的に発現する組換えAKAVである、eGFP-AKAVの作出に成功した。eGFP-AKAVは培養細胞で弱毒化がみられたが、マウスに対しては元株とほぼ同程度の病原性を示し、脳組織でeGFPを発現した。

私は、アンビセンス方式をオルソブニヤウイルスに応用し、N/NSs遺伝子が位置するマイナス鎖と反対のプラス鎖でeGFP遺伝子をコードするよう挿入した、改変型S分節を人工的に構築した。Barrらは、BUNVで、マイナス鎖のS遺伝子とプラス鎖のGFP遺伝子から、それぞれのmRNAを転写するアンビセンスS分節を設計したが、このS分節からなる感染性ウイルスの作出には至っていない（Barr et al., 2005）。彼らの報告では、トランスフェクトした細胞でGFPが発現しており、この構築で人工的にS分節に組み込まれたGFP遺伝子は転写・翻訳されたが、ウイルス粒子へのパッケージングはされなかったと考えられる。本論文の準備中に、van Knippenberg and Elliottが、アンビセンス構造のS RNA分節を持った組換えBUNVの作出に成功した（van Knippenberg and Elliott, 2015）。彼らは、5'および3'末端塩基配列に変異を加えることで、このアンビセンスS分節のプロモーター活性を変えており、作製されたNSs欠損組換えBUNVは、感染細胞でGFPを発現した。しかし検出されたGFP発現は、継代するにつれて減少していた。一方、私が作出したeGFP-AKAVは、10代継代してもeGFP発現は安定して維持されていた。ここでは、RVFVのアンビセンスS分節のIGRをコードする配列を、N/NSs遺伝子とeGFP遺伝子の間に挿入し、もとの遺伝子配列に変異を加えない、新しい構築方法を用いた。この人工的なS分節は、ウイルス粒子にパッケージングされ、挿入したeGFP遺伝子は継代後も安定的に保持されたため、eGFP-AKAVは、アンビセンス方式で作出された機能的な蛍光オルソブニヤウイルスであるといえる。挿入した外来遺伝子の安定性は、このAKAVのアンビセンス方式が技術上、優れているこ

とを示しており、他のタンパクを発現する組換えAKAVの作出も可能となる。例えば、TS-C2ワクチン株 (Kurogi et al., 1979a) を基に、他の病原体で保存されている抗原を発現するAKAVの二価ワクチンをこのアンビセンス方式を用いて構築することができる。ブニヤウイルスの各分節由来のUTRは、RdRpによる2種類のRNA合成、つまり、ゲノムの転写と複製を活性化させる。オルソブニヤウイルスのS分節では、マイナス鎖RNAが、転写および複製第一段階のテンプレートとして働く。一方、複製過程で作られた相補的なアンチセンスRNAは、複製第二段階のテンプレートとしてのみの役割を果たすと言われて来た (Barr et al., 2005; Jin and Elliott, 1993)。オルソブニヤウイルス属とは異なり、フレボウイルス属やトスポウイルス属のブニヤウイルスは、ゲノムとアンチゲノムがともに転写活性を持つアンビセンス転写方式を使っている。ブニヤウイルスのゲノム分節の両末端に位置するUTRは、部分的にパンハンドル構造を持つ相補的な配列となっており、この両末端によって形成される二本鎖領域は、転写プロモーターとして機能する可能性をもつ。本研究において、eGFP-AKAV感染細胞の細胞質で検出されたeGFPシグナルは、CPEが起きた後に観察された。これは、AKAVのS分節RNAにおいて、アンチゲノムの持つ転写プロモーター活性が弱いためであると考えられる。van Knippenberg and Elliott (2015) が作出した組換えBUNVのアンビセンスS分節で、3' UTRと5' UTRに導入した変異は、転写プロモーター活性を増強するのに有効であるかもしれない。以前の報告によると、これらの変異は、BUNV S分節において転写プロモーター活性を強くすることが分かっている (Barr et al., 2005; Barr and Wertz, 2005)。

最近、mRNAの転写終結シグナルが、幾つかのブニヤウイルスのゲノムで分かって来た。BUNVのS分節は、5' UTRの中に5塩基 (3'-UGUCG-5') を持つ2つの転写終結シグナルを持っており (Barr et al., 2006)、細胞でのウイルス感染においては、そのうちの上流のシグナルが転写終結に重要であることが分かっている (Blakqori et al., 2012)。この5塩基のモチーフは、カ

リフォルニア血清群 (*Lumboo virus*) やブニヤンウェラ血清群 (*Maguari virus*, *Northway virus*, *Batai virus*, *Cache Valley virus*) の、幾つかのオルソブニヤウイルスでも保存されている (Barr et al., 2006)。*Inkoo virus*、LACV、*Germiston virus*、*Snowshoe hare virus*といったオルソブニヤウイルスの場合、上記モチーフとは異なった塩基配列 (3'-CGUCG-5') が保存されており、これが転写終結シグナルである可能性がある。AKAVの転写終結シグナルはまだ同定されていないが、AKAV S分節もまた、この3'-CGUCG-5'の5塩基配列モチーフを5' UTR内に持っている。RVFVのS分節の場合、転写終結は、IGRに存在する3'-CGUCG-5'モチーフによって起こる (Albariño et al., 2007; Ikegami et al., 2007; Lara et al., 2011)。RVFVのN mRNAは、IGRゲノムテンプレートの9-13 ntに位置にする3'-CGUCG-5'配列の、4 nt上流で終結する。RVFVのNSs mRNAもまた、IGRアンチゲノムテンプレートの3'-CGUCG-5'配列の4 nt上流である、70 ntの位置で終結する。本研究におけるアンピセンス構造のAKAV Sゲノムの場合、N/NSs mRNAやeGFP mRNAの転写終結は、RVFVのN mRNAやNSs mRNAとは異なった位置で起こっていた。オリジナルと人工的なアンピセンス構造の分節では、同じIGR配列を持っていても、転写終結メカニズムで異なるといえる。この転写終結における不安定さが、eGFP遺伝子の発現レベルを減らし、そのため、eGFP-AKAV感染細胞では細胞質で蛍光出現が遅れるのかもしれない。

作出したeGFP-AKAVは、マウスに対して病原性を保っていた。感染によって惹き起こされる臨床症状や致死率は、親株であるAKAV-RGで観察されたものと同程度であった。培養細胞で、eGFP-AKAVはAKAV-RGより小さいプラックを形成し、ウイルスの最高力価はAKAV-RGよりも5倍ほど低かったが、外来遺伝子の挿入は、ウイルスの表現型に劇的に影響を与えることは無かった。本研究で利用したアンピセンス構造では、ウイルスタンパクが親株と同レベルで発現しているかは不明だが、この手法により、ウイルス遺伝子そのまま保持された組換えウイルスの回収が可能となった。一方、ルシフェラーゼ遺伝子 (Billecocq et al., 2008;

Ikegami et al., 2006) やeGFP遺伝子 (Billecocq et al., 2008; Bird et al., 2008) といった、外来遺伝子を発現した組換えRVFVでは、恐らくNSsを欠損しているために、ラット感染モデルにおいてウイルスの病原性が著しく落ちていた (Bird et al., 2008)。本研究で作出した蛍光AKAVはマウスに対する病原性を保っている点で、マウス感染モデルとして有用であるといえる。

eGFP蛍光は、eGFP-AKAV感染マウスの脳スライスで検出された。蛍光箇所は、免疫染色で同定されたウイルス増殖箇所と一致していた。eGFPシグナルは、主に感染マウスの小脳や脳幹で検出されており、これは、AKAV-RGの標的領域と一致する。AKAV抗原の分布は、wt Iriki株をマウスに腹腔内投与した実験結果とも類似しており、その報告でウイルス抗原は、大脳、小脳、脳幹で検出されている (Murata et al., 2015)。

結論として、病原性を維持したeGFP-AKAVは、動物での感染組織の可視化とそのウイルス動態の追跡を可能にし、神経病原性、ウイルス粒子の伝播、中枢神経系への侵入の観点から、AKAVのライフサイクル解明のために、さらなる研究を推進すると考えられる。またこの手法は、他の病原体の抗原領域を併せ持つ多価ワクチンの作出に利用できるため、当初の目的である、アカバネ病のコントロールに役立つ。

表3-1 感染マウスの臓器におけるウイルスカ価

Virus	Mouse	Brain (PFU/g)	Visceral pool (PFU/g)	Moribund date
AKAV-RG	#1	$2.8 \times 10^8$	$1.1 \times 10^5$	7 dpi
	#4	$9.5 \times 10^5$	ND	8 dpi
	#5	$2.5 \times 10^5$	ND	10 dpi
eGFP-AKAV	#3	$4.3 \times 10^6$	ND	11 dpi
	#4	$8.0 \times 10^7$	ND	9 dpi
	#5	$6.5 \times 10^7$	ND	9 dpi

ND: Not detected

Visceral pool: Mixture of liver, spleen, kidney, and lung

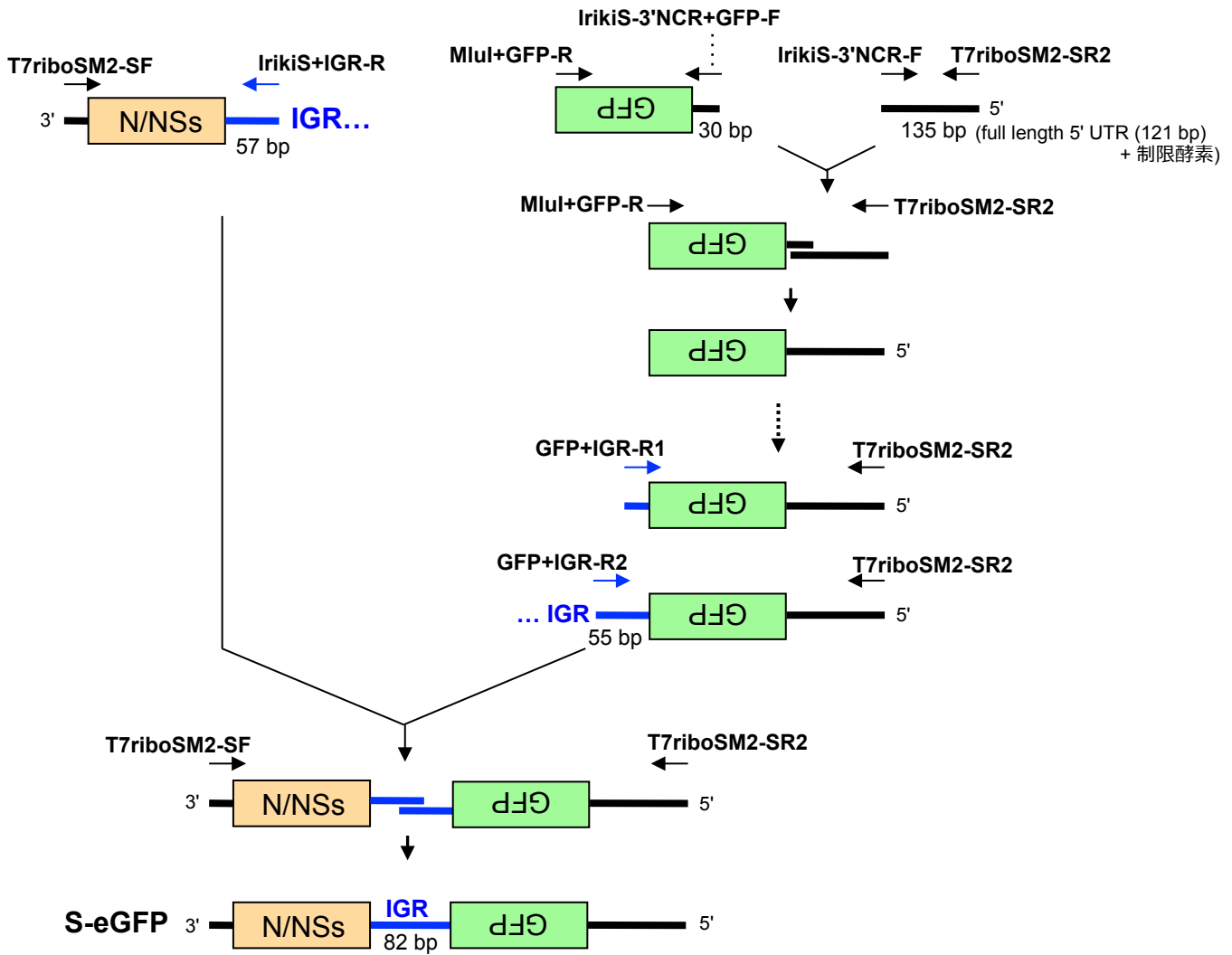


図3-1 アンビセンス鎖S分節の構築過程

矢印 (→←、→) 傍の表記はプライマー名を示す。PCRで段階的にDNAを合成し、S-eGFPを構築した。

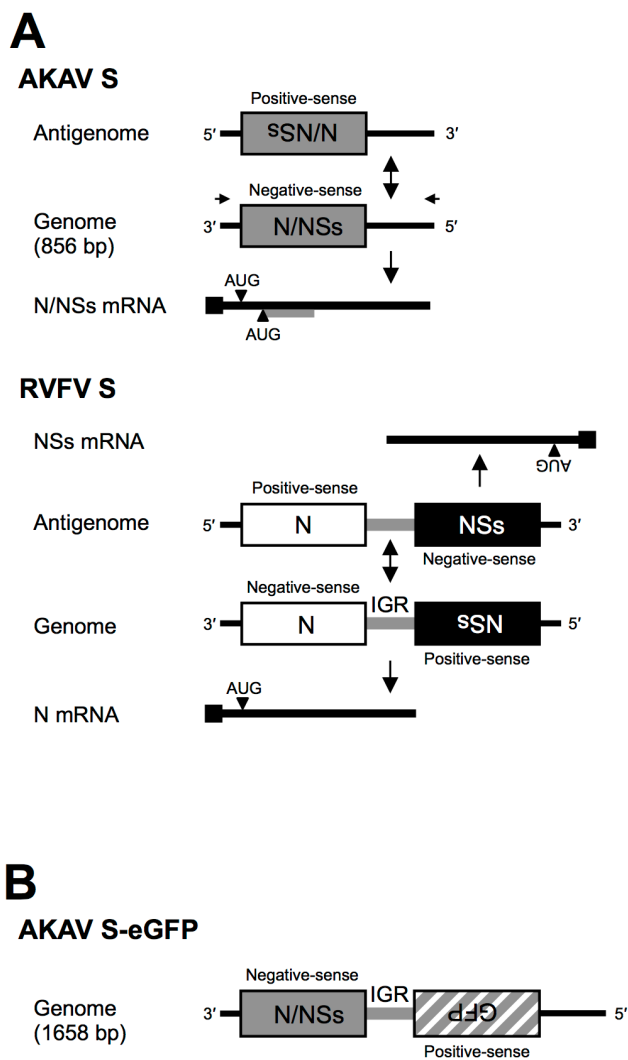


図3-2 アンビセンス鎖S分節 (S-eGFP) の構築図

(A) ブニヤウイルスのS RNAにおける遺伝子発現模式図。マイナス鎖 (AKAV) とアンビセンス鎖 (RVFV)。AKAVは、全ての分節がマイナス鎖RNAで遺伝子をコードしている。S RNA分節は、ゲノムの3' UTRから始まる唯一の転写方式を持ち、ゲノムの複製過程で生じたプラス鎖のアンチゲノムは転写されないと考えられてきた。この転写ユニットは、別の開始コドンを利用して、重なり合うもう1つのORF (NSs) を構成している。N/NSs mRNAの灰色線 (—) は、NSsのORF領域を示す。RVFVは、アンビセンス構造を使って、ゲノムとアンチゲノムのS RNAからそれぞれmRNAを転写することができる。これらのmRNAは、IGRの中心部付近に転写終結シグナルを持っている。黒四角 (■) は、mRNAの5' cap構造を示す。(B) S-eGFPプラスミド。RVFVのアンビセンス方式を使って人工的に構築した。

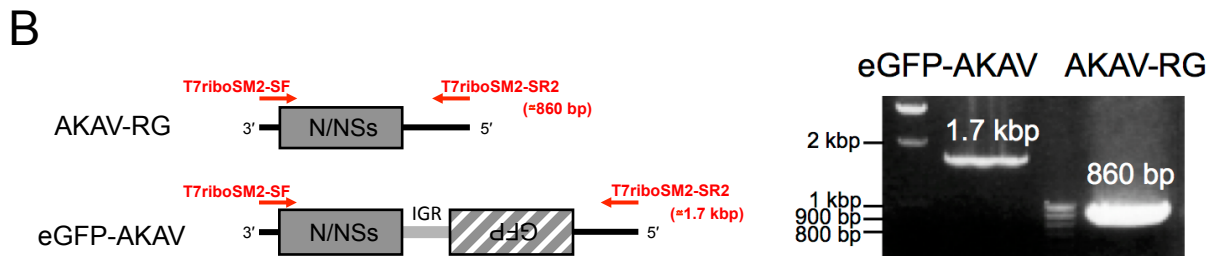
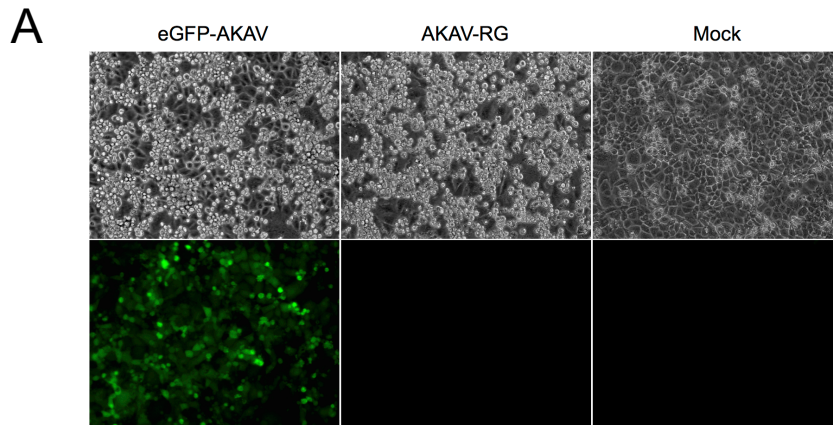


図3-3 eGFP-AKAV感染細胞での蛍光発現

(A) 感染HmLu-1細胞における、CPEと蛍光発現。明視野（上写真）と、蛍光画像（下写真）を示す。

(B) 左：使用したプライマーペア（T7riboSM2-SFとT7riboSM2-SR2）の結合位置。右：eGFP-AKAVもしくは親株のAKAV-RGを感染させたHmLu-1細胞からS RNAを抽出し、RT-PCR産物を電気泳動で確認した。



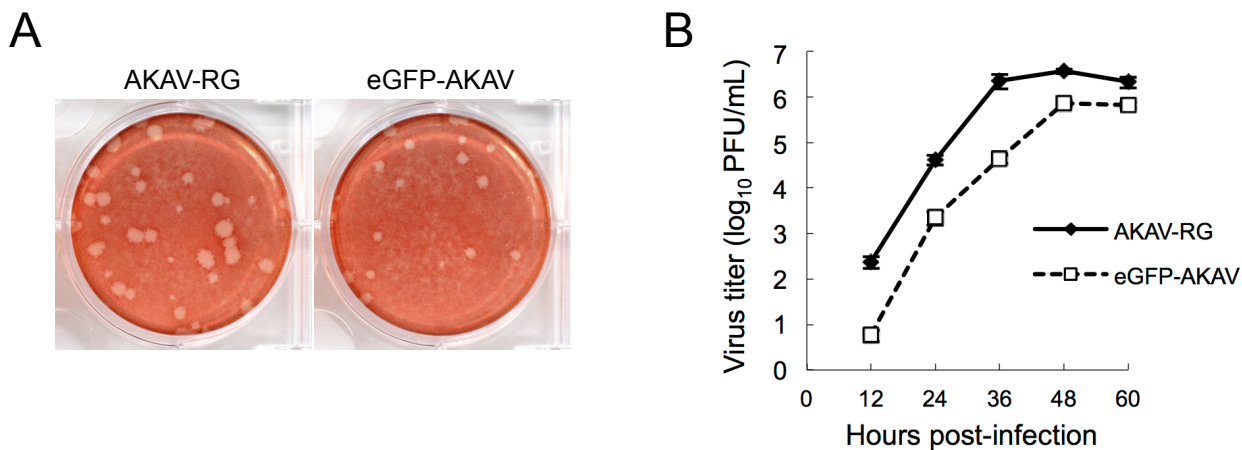


図3-4 組換えウイルスのプラック形態と増殖解析

(A) プラックサイズの比較。HmLu-1細胞にAKAV-RGもしくはeGFP-AKAVを感染させた後、アガロースを含んだ血清培地を重層し、3日後にニュートラルレッドで染色した。(B) AKAV-RGとeGFP-AKAVの増殖曲線。各ウイルスをMOI = 0.01でHmLu-1細胞に感染させ、12時間毎のウイルス力価を測定した。3回の実験結果を平均値±SDで示す。

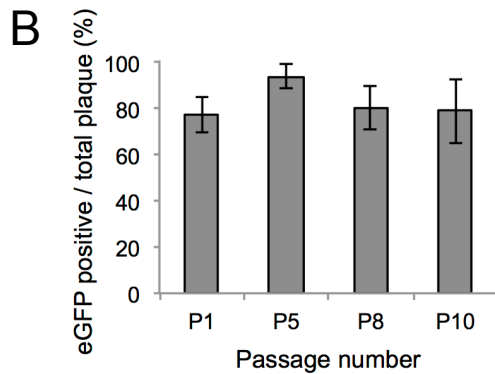
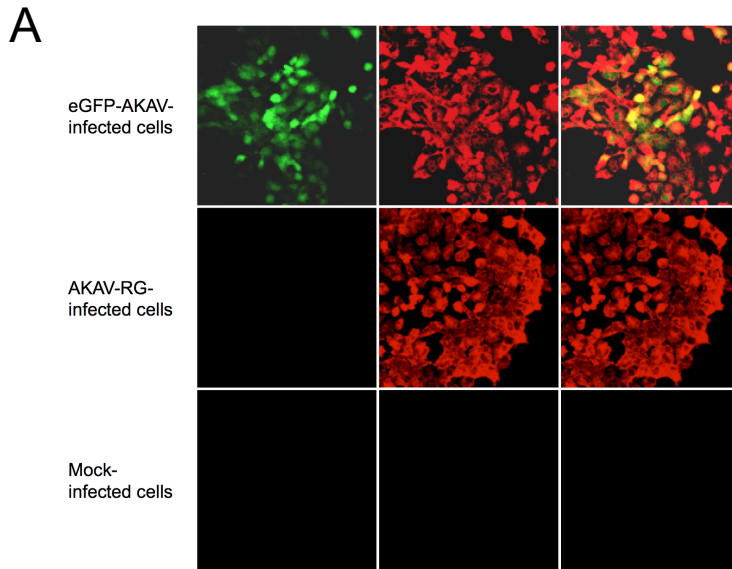
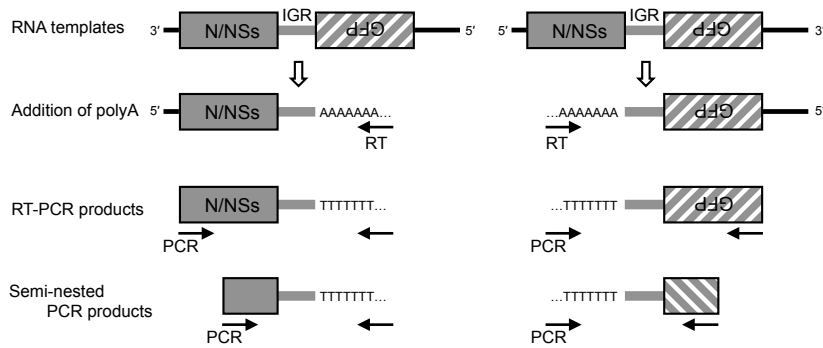


図3-5 eGFP-AKAVの*in vitro*での性状解析

(A) eGFP-AKAV感染細胞の蛍光顕微鏡写真。HmLu-1細胞にeGFP-AKAVもしくはAKAV-RGをMOI = 0.01で感染させた。左写真：感染細胞のeGFP蛍光像。真ん中写真：感染細胞を抗AKAV血清で免疫蛍光染色した。右写真：AKAV抗原（赤）とeGFP蛍光（緑）の共局在（黄色）。(B) eGFP-AKAVの遺伝的安定性の解析。HmLu-1細胞に、各継代数（P1、P5、P8、P10）のeGFP-AKAVを感染させ、感染3日後に蛍光が観察されたブラックを共焦点顕微鏡下でカウントし、ブラック全体数に対する割合を算出した。結果は、4もしくは5 well分の平均値±SDを示す。

**A**



**B**



**C**

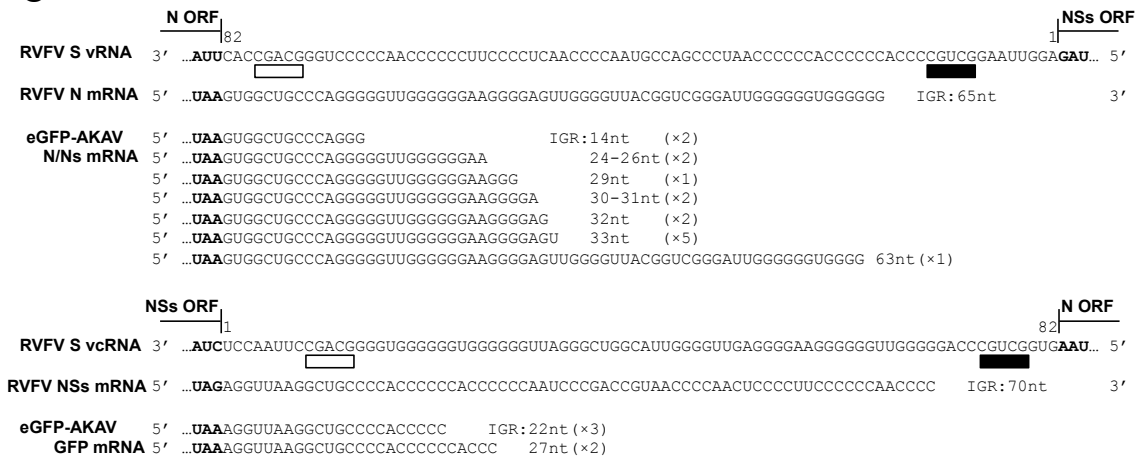


図3-6 S-eGFPでの転写されたmRNA解析

(A) S RNAの、センス鎖およびアンチセンス鎖からN/NSs mRNAおよびeGFPのmRNAを検出する3' RACE戦略。(B) 3' RACEによるeGFP-AKAVのN/NSs mRNAとeGFP mRNAからのPCR産物。(C) eGFP-AKAVのN/NSs mRNAとeGFP mRNAの3'末端。RVFVのRNA (vRNA) とcomplementary RNA (vcRNA) テンプレート、RVFV N mRNAとNSs mRNA配列、および、eGFP-AKAVのN/NSs mRNAとeGFP mRNAの塩基配列を対応させている。太字は、RVFVのNとNSs、eGFP-AKAVのN/NSsとeGFPの停止コドンを示す。RVFVのAH548株のIGRは、図の1-82の位置にあたる。RVFVの転写終結シグナル (3'-CGUCG-5') は、黒下線棒 (■) の位置にある。RVFV N mRNAとNSs mRNAはともに、3'-CGUCG-5'モチーフの4 nt上流で終了する。白下線棒 (□) の位置に存在する3'-CGACG-5'モチーフは、アンチセンスで対応するもう一方のORF転写終結シグナルを表す。eGFP-AKAVの3'末端は、クローニングした3' RACE産物のシーケンス解析によって決定した。括弧内の数字は、そのシーケンス配列が同定された回数を示す。

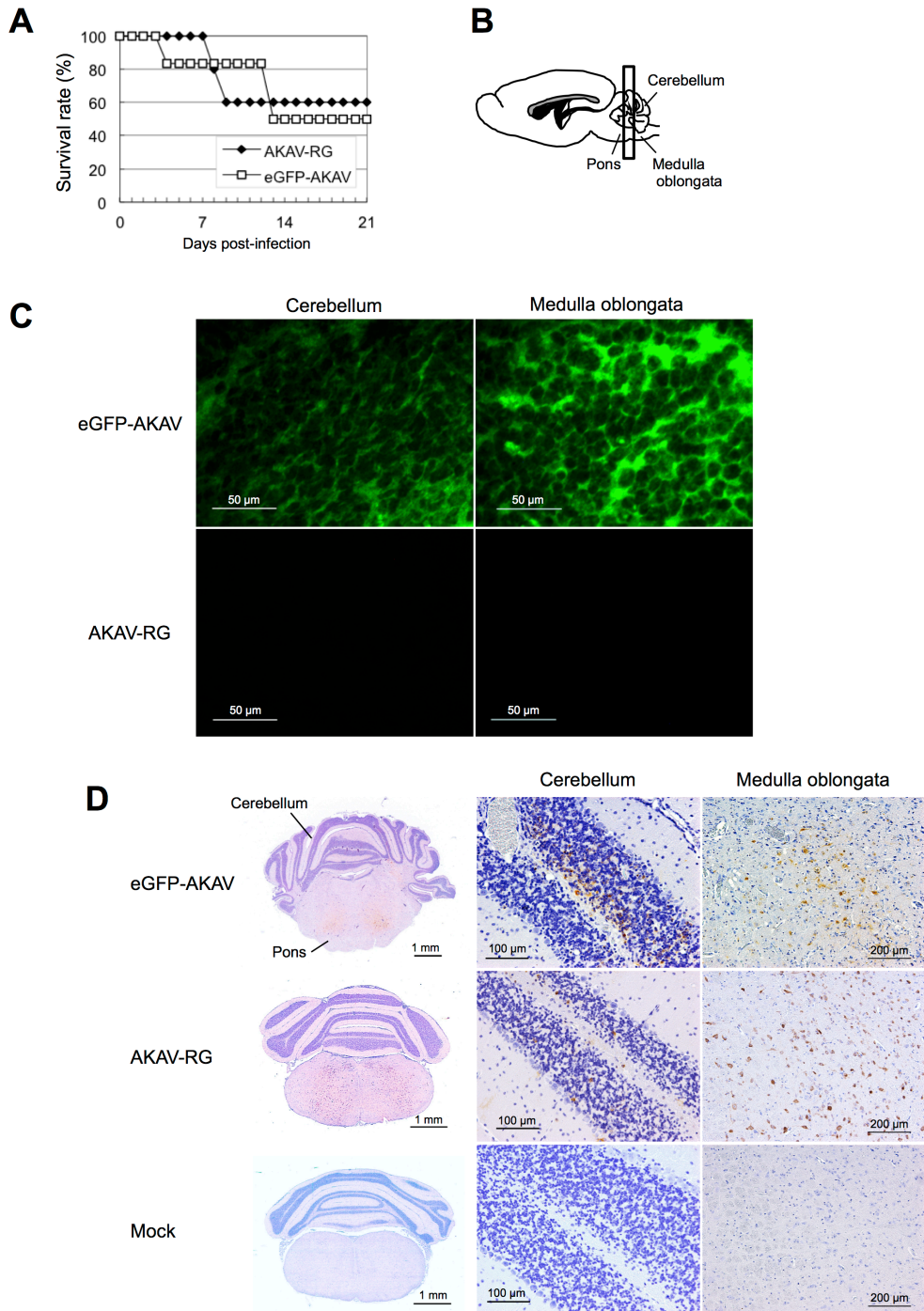


図3-7 組換えAKAVのマウス感染実験

1週齢マウスに、 $5 \times 10^4$  PFUのeGFP-AKAVもしくはAKAV-RGを腹腔内接種し、21日間観察した。(A) 接種後のマウスの生存曲線。

(B) ウイルス局在が観察された冠状断の位置。(C) 脳の凍結切片でのeGFP蛍光分布。(D) eGFP-AKAV、AKAV-RGおよびmock感染マウスの脳組織の免疫染色像。図(C)で示した箇所とほぼ同じ位置のもの。低倍率(左写真)および高倍率(右写真)像を示す。ウイルス抗原はAKAV抗体によって検出した。

## 第 4 章

# 蛍光タンパク発現アカバネウイルス の改変による蛍光発現の上昇

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。  
5年以内に出版予定。

## 総合考察

AKAV は、反芻動物に流早死産や AH syndrome を引き起こし、畜産業界に多くの経済的損失をもたらす。この発生予防にはワクチン接種が有効であるが、抗原性や病原性において変異した AKAV 分離株は、古くから存在する株と抗原交差性が低く (Akashi and Inaba, 1997)、ワクチン接種地域でもこれら AKAV 変異体によるアカバネ病の流行が起こっている可能性がある。そのため、アカバネ病の発生を効果的にコントロールするには、これまでのワクチン戦略を見直す必要がある。これまでに確立された AKAV のリバーシジェネティクス法によるウイルス作出技術は、RNA polymerase I 転写系を用いたものであった (Ogawa et al., 2007c) が、その感染性ウイルスの回収効率はあまり高くなかった。第 1 章で、BUNV、LACV、RVFV で報告されている T7 RNA polymerase を用いたレスキュー方法 (Bridgen and Elliott, 1996; Blakqori and Weber, 2005; Ikegami et al., 2006) を AKAV で試みたところ、より効率的にウイルスが作出できることが分かった。本研究では、T7 RNA polymerase を恒常発現している細胞を使用した。T7 系でのウイルスレスキューには、T7 RNA polymerase 発現するワクシニアウイルスを予め細胞に感染させておき、そこにプラスミドをトランスフェクションする方法もある。この場合、ウイルスゲノムを発現する 3 つのプラスミド以外にも、ヘルパープラスミドとしてウイルスタンパクを発現する 3 つのプラスミドがさらに必要となる (Fuerst et al., 1986)。T7 RNA polymerase 発現ワクシニアウイルスを用いた場合、レスキューされたウイルスと競合するため、T7 RNA polymerase の発現が制限されるという仮説があり、そのために、サポートタンパク発現プラスミドの存在が必要なのかもしれない。T7 系を用いた 3 つのプラスミドのみでのウイルスレスキューは、BUNV で初めて行われた。他のマイナス鎖 RNA ウイルスと異なり、少なくとも BUNV (Lowen et al.,

2004)、LACV (Blakqori and Weber, 2005)、RVFV (Ikegami et al., 2006)、AKAV では、L、M、S を発現する 3 つのプラスミドのみで、合成されたプラス鎖のゲノムから少量のサポートタンパクが出来るようである。本研究で用いた AKAV ウイルスレスキュー法は、最小限のプラスミドで効率よくウイルス回収できるという点で、新規ワクチンの作出に有効な手法といえる。

このリバーシジェネティクス法で作出した組換えウイルスについては、第 2 章でヤギを用いた感染実験を行っている。AKAV の宿主にあたる、ウシ、ヒツジ、ヤギ等の妊娠動物を用いた感染実験の報告は古く、妊娠ヤギの感染実験は、野生型 OBE-1 株を用いたもののみである (Kurogi et al., 1977b; Konno et al., 1982)。第 2 章では、弱毒生ワクチン TS-C2 株の組換えウイルスを用いて、妊娠ヤギへの免疫賦与効果と安全性を調べた。結果として、組換え TS-C2 接種ヤギでは、少量のウイルス RNA が胎子の脳から検出されたのに対して、非構造タンパク NSs 欠損組換えウイルスは十分に弱毒化されており、安全なワクチン候補株となることが確認された。また、同時に接種した神経病原性株の Iriki 株は、ヤギ胎子に催奇形性を示し、妊娠ヤギ AKAV 感染モデルの陽性コントロールとなることが分かった。TS-C2 株の接種は、子ウシと妊娠ウシでその効果と安全性が確認されている (Kurogi et al., 1979a) が、妊娠ヒツジでは安全性が十分ではなく (Hashiguchi et al., 1981)、また本研究で、妊娠ヤギに対しても安全性が不十分である可能性が示唆された。同じ反芻動物のなかでも感受性が異なるため、ワクチン製造過程で各動物を対象とした接種試験を行う必要があるが、小型で感受性の高いヤギやヒツジを代替動物として用いることは可能かもしれない。

地球温暖化に伴いウイルス媒介節足動物の分布域は急速に変化しており、節足動物媒介によるウイルス性新興・再興感染症の流行が危惧されている。2011 年にヨーロッパで大流行した SBV は新奇のウイルスである (Yanase et al., 2012; Goller et al., 2012) が、深刻な被害をもたらした対応の遅れは、オルソブニヤウイルスについての情報不足が原因のひとつである



(Hoffmann et al., 2012)。SBV のような新奇オルソブニヤウイルスの大流行が日本でも懸念されるなか、原因ウイルスの感染機構の解明は、学術的のみならず感染制御の面から非常に重要である。SBV に極めて近い AKAV では、野外分離株における病原性の変化 (福富ら, 2004) や神経強毒株の出現 (Miyazato et al., 1989) が報告されており、抗原性、病原性変異株の流行が懸念されるが、他のオルソブニヤウイルスと同様、宿主のウイルスレセプターや詳しい感染動態などは未だ分かっていない。これらの解明が進めば、ワクチン改良等によりアカバネ病やその他のブニヤウイルスによる感染症の発生がコントロールできるようになると考えられる。

ブニヤウイルス科のうちオルソブニヤウイルスでは、外来遺伝子を安定して発現できる組換えウイルスはこれまで作出できていなかったが、第 3 章で述べた通り、本研究では、外来遺伝子を安定して発現する組換えオルソブニヤウイルスの作出に初めて成功した。このウイルスは、AKAV Iriki 株のアンピセンス S 分節を人工的に構築して、eGFP 遺伝子を組み込んだものであり、マウス感染モデルで、脳組織の感染領域における蛍光検出に成功した。また第 4 章では、このアンピセンス S 分節を改変することで、ウイルスに組み込んだ eGFP の転写翻訳能が、ウイルスタンパクのそれに比べて弱いという性質を改善することができた。AKAV の妊娠動物への感染は、AH syndrome のほか、子牛の生後感染でも脳炎などの病変を起こす報告があり (Miyazato et al., 1989)、AKAV は中枢神経系への親和性が高いことが分かっている。しかし、媒介節足動物を介した宿主体内への侵入後、AKAV が中枢神経系へ移行する機序は未だ分かっておらず、これをマウスのような小動物感染モデルで再現できれば、自然感染下で起きているウイルスの宿主体内移行を再現できるため、感染機構の解明は飛躍的に進む。本研究で作出した安定的かつより高度に蛍光タンパクを発現するウイルスは、AKAV の宿主体内での感染動態の解析に極めて有効である。また、未知であるレセプターの解明には、主な感染の標的細胞を特定することが重要である。高度に蛍光発現する AKAV は、宿主細胞のレセプターを解

明する上でも重要なツールとなる。

蛍光タンパク質を発現する AKAV 作出法の確立は、他のブニヤウイルスの転写様式が、属を超えて有効に応用できるという点で、新しい方法論を提供するものである。ブニヤウイルス科には SBV といった新しいウイルスを初めとする重要な動物病原ウイルスの他に、人獣共通感染症病原体も含まれている。改変型蛍光タンパク発現 AKAV の作出に成功した本研究の手法は、他のブニヤウイルスにも応用でき、これらブニヤウイルス全般の感染機構の解明にも貢献する。

リバーシジェネティクスの技術で遺伝的に操作したウイルスは、次世代のワクチン戦略として有用である。本研究で行った、外来遺伝子を効果的に発現する組換え AKAV の開発は、AKAV を標的としたワクチン研究に役立ち、また効力の高いアカバネ多価ワクチンの作出に繋がる。これは、アカバネ病だけでなく、その他の新興・再興感染症の制御も視野に入れての対策が可能となることを意味する。

## 引用論文

- Akashi H, Inaba Y.** 1997. Antigenic diversity of Akabane virus detected by monoclonal antibodies. *Virus Res* 47:187-196.
- Akashi H, Kaku Y, Kong XG, Pang H.** 1997. Sequence determination and phylogenetic analysis of the Akabane bunyavirus S RNA genome segment. *J Gen Virol* 78:2847-2851.
- Al-Busaidy SM, Mellor PS.** 1991. Isolation and identification of arboviruses from the Sultanate of Oman. *Epidemiol Infect* 106:403-413.
- Al-Busaidy S, Hamblin C, Taylor WP.** 1987. Neutralising antibodies to Akabane virus in free-living wild animals in Africa. *Trop Anim Health Prod* 19:197-202.
- Albariño CG, Bird BH, Nichol ST.** 2007. A shared transcription termination signal on negative and ambisense RNA genome segments of Rift Valley fever, sandfly fever Sicilian, and Toscana viruses. *J Virol* 81:5246-5256.
- Andersen AA, Campbell CH.** 1978. Experimental placental transfer of Akabane virus in the hamster. *Am J Vet Res* 39:301-304.
- Bangphoomi N, Takenaka-Uema A, Sugi T, Kato K, Akashi H, Horimoto T.** 2014. Akabane virus utilizes alternative endocytic pathways to entry into mammalian cell lines. *J Vet Med Sci* 76:1471-1478.
- Barr JN, Rodgers JW, Wertz GW.** 2005. The Bunyamwera virus mRNA transcription signal resides within both the 3' and the 5' terminal regions and allows ambisense transcription from a model RNA segment. *J Virol* 79:12602-12607.
- Barr JN, Rodgers JW, Wertz GW.** 2006. Identification of the Bunyamwera bunyavirus transcription termination signal. *J Gen Virol* 87:189-198.
- Barr JN, Wertz GW.** 2005. Role of the conserved nucleotide mismatch within 3'- and 5'-terminal regions of Bunyamwera virus in signaling transcription. *J Virol* 79:3586-3594.

- Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B.** 2012. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Vet Microbiol* 159:236-238.
- Billecocq A, Gaudiard N, Le May N, Elliott RM, Flick R, Bouloy M.** 2008. RNA polymerase I-mediated expression of viral RNA for the rescue of infectious virulent and avirulent Rift Valley fever viruses. *Virology* 378:377-384.
- Bird BH, Albariño CG, Hartman AL, Erickson BR, Ksiazek TG, Nichol ST.** 2008. Rift valley fever virus lacking the NSs and NSm genes is highly attenuated, confers protective immunity from virulent virus challenge, and allows for differential identification of infected and vaccinated animals. *J Virol* 82:2681-2691.
- Bishop AL, Barchia IM, Spohr LJ.** 2000. Models for the dispersal in Australia of the arbovirus vector, *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae). *Prev Vet Med* 47:243-254.
- Bishop AL, Spohr LJ, Barchia IM.** 2004. Factors affecting the spread of *Culicoides brevitarsis* at the southern limit of distribution in eastern Australia. *Vet Ital* 40:316-319.
- Blakqori G, Lowen AC, Elliott RM.** 2012. The small genome segment of Bunyamwera orthobunyavirus harbours a single transcription-termination signal. *J Gen Virol* 93:1449-1455.
- Blakqori G, Weber F.** 2005. Efficient cDNA-based rescue of La Crosse bunyaviruses expressing or lacking the nonstructural protein NSs. *J Virol* 79:10420-10428.
- Blood DC.** 1956. Arthrogryposis and hydraencephaly in newborn calves. *Aust Vet J* 32:125-131.
- Bouloy M, Janzen C, Vialat P, Khun H, Pavlovic J, Huerre M, Haller O.** 2001. Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of rift valley fever virus nonstructural protein NSs. *J Virol* 75:1371-1377.
- Bridgen A, Elliott RM.** 1996. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15400-15404.
- Bridgen A, Weber F, Fazakerley JK, Elliott RM.** 2001. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:664-669.

**Bryant JE, Crabtree MB, Nam VS, Yen NT, Duc HM, Miller BR.** 2005. Isolation of arboviruses from mosquitoes collected in northern Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 73:470-473.

**Calisher CE.** 1996. History, classification, and taxonomy of viruses in the family Bunyaviridae. In *The Bunyaviridae* (ed. Elliott RM.), pp.1-17, Plenum Press, New York.

**Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ.** 2008. Control techniques for Culicoides biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. *Med Vet Entomol* 22:175-187.

**Chang CW, Liao YK, Su V, Farh L, Shiuan D.** 1998. Nucleotide sequencing of S-RNA segment and sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of the newly isolated Akabane virus PT-17 strain. *Biochem Mol Biol Int* 45:979-987.

**Charles JA.** 1994. Akabane virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 10:525-546.

**Coverdale OR, Cybinski DH, St George TD.** 1978. Congenital abnormalities in calves associated with Akabane virus and Aino virus. *Aust Vet J* 54:151-152.

**Cybinski DH, St George TD, Paull NI.** 1978. Antibodies to Akabane virus in Australia. *Aust Vet J* 54:1-3.

**Della-Porta AJ, Murray MD, Cybinski DH.** 1976. Congenital bovine epizootic arthrogryposis and hydranencephaly in Australia. Distribution of antibodies to Akabane virus in Australian Cattle after the 1974 epizootic. *Aust Vet J* 52:496-501.

**Della-Porta AJ, O'Halloran ML, Parsonson IM, Snowdon WA, Murray MD, Hartley WJ, Haughey KJ.** 1977. Akabane disease: isolation of the virus from naturally infected ovine foetuses. *Aust Vet J* 53:51-52.

**Elliott RM.** 1989. Nucleotide sequence analysis of the small (S) RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *J Gen Virol* 70:1281-1285.

**Elliott RM.** 1997. Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol Med* 3:572-577.

- Fernandez JC, Billecocq A, Durand JP, Cêtre-Sossah C, Cardinale E, Marianneau P, Pépin M, Tordo N, Bouloy M.** 2012. The nonstructural protein NSs induces a variable antibody response in domestic ruminants naturally infected with Rift Valley fever virus. *Clin Vaccine Immunol* 19:5-10.
- Fontana J, López-Montero N, Elliott RM, Fernández JJ, Risco C.** 2008. The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol* 10:2012-2028.
- Fuller F, Bhowan AS, Bishop DH.** 1983. Bunyavirus nucleoprotein, N, and a non-structural protein, NSS, are coded by overlapping reading frames in the S RNA. *J Gen Virol* 64:1705-1714.
- Fuller F, Bishop DH.** 1982. Identification of virus-coded nonstructural polypeptides in bunyavirus-infected cells. *J Virol* 41:643-648.
- Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, Moss B.** 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8122-8126.
- Garigliany MM, Hoffmann B, Dive M, Sartelet A, Bayrou C, Cassart D, Beer M, Desmecht D.** 2012. Schmallenberg virus in calf born at term with porencephaly, Belgium. *Emerg Infect Dis* 18:1005-1006.
- Giorgi C, Accardi L, Nicoletti L, Gro MC, Takehara K, Hilditch C, Morikawa S, Bishop DH.** 1991. Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virology* 180:738-753.
- Goller KV, Höper D, Schirrneier H, Mettenleiter TC, Beer M.** 2012. Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerg Infect Dis* 18:1644-1646.
- Habjan M, Penski N, Spiegel M, Weber F.** 2008. T7 RNA polymerase-dependent and -independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus. *J Gen Virol* 89:2157-2166.
- Han HD.** 1981. Propagation and persistent infection of Akabane virus in cultured mosquito cells. *J Vet Med Sci* 43:689-697.

**Harmon B, Schudel BR, Maar D, Kozina C, Ikegami T, Tseng CT, Negrete OA.** 2012. Rift Valley fever virus strain MP-12 enters mammalian host cells via caveola-mediated endocytosis. *J Virol* 86:12954-12970.

**Hartley WJ, De Saram WG, Della-Porta AJ, Snowdon WA, Shepherd NC.** 1977. Pathology of congenital bovine epizootic arthrogryposis and hydranencephaly and its relationship to Akabane virus. *Aust Vet J* 53:319-325.

**Hartley WJ, Wanner RA, Della-Porta AJ, Snowdon WA.** 1975. Serological evidence for the association of Akabane virus with epizootic bovine congenital arthrogryposis and hydranencephaly syndromes in New South Wales. *Aust Vet J* 51:103-104.

**Hashiguchi Y, Murakami Y, Nanba K.** 1981. Responses of pregnant ewes inoculated with Akabane disease live virus vaccine. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 21:113-120.

**Hashiguchi Y, Nanba K, Kumagai T.** 1979. Congenital abnormalities in newborn lambs following Akabane virus infection in pregnant ewes. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 19:1-11.

**Haughey KG, Hartley WJ, Della-Porta AJ, Murray MD.** 1988. Akabane disease in sheep. *Aust Vet J* 65:136-140.

**Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeier H, Eschbaumer M, Goller KV, Wernike K, Fischer M, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Beer M.** 2012. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis* 18:469-472.

**Hollidge BS, Nedelsky NB, Salzano MV, Fraser JW, González-Scarano F, Soldan SS.** 2012. Orthobunyavirus entry into neurons and other mammalian cells occurs via clathrin-mediated endocytosis and requires trafficking into early endosomes. *J Virol* 86:7988-8001.

**Huang CC, Huang TS, Deng MC, Jong MH, Lin SY.** 2003. Natural infections of pigs with akabane virus. *Vet Microbiol* 94:1-11.

**Ikegami T, Won S, Peters CJ, Makino S.** 2006. Rescue of infectious rift valley fever virus entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. *J Virol* 80:2933-2940.

- Ikegami T, Won S, Peters CJ, Makino S.** 2007. Characterization of Rift Valley fever virus transcriptional terminations. *J Virol* 81:8421-8438.
- Inaba Y.** 1979. Akabane Disease: an epizootic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle, sheep and goats, caused by Akabane virus. *Jpn Agric Res Q* 13:123-133.
- Inaba Y, Kurogi H, Omori T.** 1975. Letter: Akabane disease: epizootic abortion, premature birth, stillbirth and congenital arthrogryposis-hydranencephaly in cattle, sheep and goats caused by Akabane virus. *Aust Vet J* 51:584-585.
- Inaba Y, Matumoto M.** 1990. Akabane virus. In *Virus Infections of Ruminants*, Vol. 3 (eds. Dinter Z, Morein B.), pp.467-480 (Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands).
- Iroegbu CU, Pringle CR.** 1981. Genetic interactions among viruses of the Bunyamwera complex. *J Virol* 37:383-394.
- Ito N, Takayama-Ito M, Yamada K, Hosokawa J, Sugiyama M, Minamoto N.** 2003. Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system. *Microbiol Immunol* 47:613-617.
- Ito Y, Kurogi H, Takahshi H, Goto Y, Inaba Y, Omori T.** 1979. Electron microscopy of Akabane virus. *Acta Virol* 23:198-202.
- Jagoe S, Kirkland PD, Harper PA.** 1993. An outbreak of Akabane virus-induced abnormalities in calves after agistment in an endemic region. *Aust Vet J* 70:56-58.
- Jennings M, Mellor PS.** 1989. Culicoides: biological vectors of Akabane virus. *Vet Microbiol* 21:125-131.
- Jin H, Elliott RM.** 1993. Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. *J Virol* 67:1396-1404.
- Kamata H, Inai K, Maeda K, Nishimura T, Arita S, Tsuda T, Sato M.** 2009. Encephalomyelitis of cattle caused by Akabane virus in southern Japan in 2006. *J Comp Pathol* 140:187-193.



- Kim YH, Kweon CH, Tark DS, Lim SI, Yang DK, Hyun BH, Song JY, Hur W, Park SC.** 2011. Development of inactivated trivalent vaccine for the teratogenic Aino, Akabane and Chuzan viruses. *Biologicals* 39:152-157.
- Kirkland PD, Barry RD, Harper PA, Zelski RZ.** 1988. The development of Akabane virus-induced congenital abnormalities in cattle. *Vet Rec* 122:582-586.
- Kitani H, Yamakawa M, Ikeda H.** 2000. Preferential infection of neuronal and astroglia cells by Akabane virus in primary cultures of fetal bovine brain. *Vet Microbiol* 73:269-279.
- Kobayashi T, Yanase T, Yamakawa M, Kato T, Yoshida K, Tsuda T.** 2007. Genetic diversity and reassortments among Akabane virus field isolates. *Virus Res* 130:162-171.
- Kohl A, Dunn EF, Lowen AC, Elliott RM.** 2004. Complementarity, sequence and structural elements within the 3' and 5' non-coding regions of the Bunyamwera orthobunyavirus S segment determine promoter strength. *J Gen Virol* 85:3269-3278.
- Kohl A, Lowen AC, Léonard VH, Elliott RM.** 2006. Genetic elements regulating packaging of the Bunyamwera orthobunyavirus genome. *J Gen Virol* 87:177-187.
- Konno S, Moriwaki M, Nakagawa M.** 1982. Akabane disease in cattle: congenital abnormalities caused by viral infection. Spontaneous disease. *Vet Pathol* 19:246-266.
- Konno S, Nakagawa M.** 1982. Akabane disease in cattle: congenital abnormalities caused by viral infection. Experimental disease. *Vet Pathol* 19:267-279.
- Kono R, Hirata M, Kaji M, Goto Y, Ikeda S, Yanase T, Kato T, Tanaka S, Tsutsui T, Imada T, Yamakawa M.** 2008. Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan. *BMC Vet Res* 4:20.
- Kupferschmidt K.** 2012. Infectious disease. Scientists rush to find clues on new animal virus. *Science* 335:1028-1029.
- Kurogi H, Akiba K, Inaba Y, Matumoto M.** 1987. Isolation of Akabane virus from the biting midge *Culicoides oxystoma* in Japan. *Vet Microbiol* 15:243-248.

**Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Akashi H, Satoda K, Omori T.** 1979a. An attenuated strain of Akabane virus: a candidate for live virus vaccine. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 19:12-22.

**Kurogi H, Inaba Y, Akashi H, Takahashi E, Sato K, Satoda K, Sugimoto C, Hatekeyama H, Omori T.** 1979b. Immune response of various animals to Akabane disease live virus vaccine. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 19:23-31.

**Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Goto Y, Satoda K, Omori T, Hatakeyama H.** 1978a. Development of inactivated vaccine for Akabane disease. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 18:97-108.

**Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Akashi H, Satoda K, Omori T.** 1978b. Pathogenicity of different strains of Akabane virus for mice. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 18:1-7.

**Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Satoda K.** 1977a. Congenital abnormalities in newborn calves after inoculation of pregnant cows with Akabane virus. *Infect Immun* 17:338-343.

**Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Goto Y.** 1977b. Experimental infection of pregnant goats with Akabane virus. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 17:1-9.

**Kurogi H, Inaba Y, Takahashi E, Sato K, Omori T, Miura Y, Goto Y, Fujiwara Y, Hatano Y, Kodama K, Fukuyama S, Sasaki N, Matumoto M.** 1976. Epizootic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle: isolation of Akabane virus from affected fetuses. *Arch Virol* 51:67-74.

**Lara E, Billecocq A, Leger P, Bouloy M.** 2011. Characterization of wild-type and alternate transcription termination signals in the Rift Valley fever virus genome. *J Virol* 85:12134-12145.

**Lee JK, Park JS, Choi JH, Park BK, Lee BC, Hwang WS, Kim JH, Jean YH, Haritani M, Yoo HS, Kim DY.** 2002. Encephalomyelitis associated with akabane virus infection in adult cows. *Vet Pathol* 39:269-273.

**Liao YK, Lu YS, Goto Y, Inaba Y.** 1996. The isolation of Akabane virus (Iriki strain) from calves in Taiwan. *J Basic Microbiol* 36:33-39.

- Lowen AC, Elliott RM.** 2005. Mutational analyses of the nonconserved sequences in the Bunyamwera Orthobunyavirus S segment untranslated regions. *J Virol* 79:12861-12870.
- Lowen AC, Noonan C, McLees A, Elliott RM.** 2004. Efficient bunyavirus rescue from cloned cDNA. *Virology* 330:493-500.
- Lozach PY, Mancini R, Bitto D, Meier R, Oestereich L, Overby AK, Pettersson RF, Helenius A.** 2010. Entry of bunyaviruses into mammalian cells. *Cell Host Microbe* 7:488-499.
- Ludwig GV, Israel BA, Christensen BM, Yuill TM, Schultz KT.** 1991. Role of La Crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells. *Virology* 181:564-571.
- Matsuyama T, Oya A, Ogata T, Kobayashi I, Nakamura T, Takahashi M, Kitaoka M.** 1960. Isolation of arbor viruses from mosquitoes collected at live-stock pens in Gumma Prefecture in 1959. *Jpn J Med Sci Biol* 13:191-198.
- Mazel-Sanchez B, Elliott RM.** 2015. Evolution of the Bunyamwera virus polymerase to accommodate deletions within genomic untranslated region sequences. *J Virol* 89:3957-3964.
- McClure S, McCullagh P, Parsonson IM, McPhee DA, Della-Porta AJ, Orsini A.** 1988. Maturation of immunological reactivity in the fetal lamb infected with Akabane virus. *J Comp Pathol* 99:133-143.
- McElroy AK, Albariño CG, Nichol ST.** 2009. Development of a RVFV ELISA that can distinguish infected from vaccinated animals. *Virol J* 6:125.
- McPhee DA, Parsonson IM, Della-Porta AJ, Jarrett RG.** 1984. Teratogenicity of Australian Simbu serogroup and some other Bunyaviridae viruses: the embryonated chicken egg as a model. *Infect Immun* 43:413-420.
- Metselaar D, Robin Y.** 1976. Akabane virus isolated in Kenya. *Vet Rec* 99:86.
- Miyazato S, Miura Y, Hase M, Kubo M, Goto Y, Kono Y.** 1989. Encephalitis of cattle caused by Iriki isolate, a new strain belonging to Akabane virus. *Jpn J Vet Sci* 51:128-136.

- Murata Y, Uchida K, Shioda C, Uema A, Bangphoomi N, Chambers JK, Akashi H, Nakayama H.** 2015. Histopathological studies on the neuropathogenicity of the Iriki and OBE-1 strains of Akabane virus in BALB/cAJcl mice. *J Comp Pathol* 153:140-149.
- Murray MD.** 1987. Akabane epizootics in New South Wales: evidence for long-distance dispersal of the biting midge *Culicoides brevitarsis*. *Aust Vet J* 64:305-308.
- Murray MD.** 1991. The seasonal abundance of female biting-midges, *Culicoides-Brevitarsis* Kieffer (Diptera, Ceratopogonidae), in coastal south-eastern Australia. *Aust J Zool*:333-342.
- Narita M, Inui S, Hashiguchi Y.** 1979. The pathogenesis of congenital encephalopathies in sheep experimentally induced by Akabane virus. *J Comp Pathol* 89:229-240.
- Obijeski JF, Bishop DH, Palmer EL, Murphy FA.** 1976. Segmented genome and nucleocapsid of La Crosse virus. *J Virol* 20:664-675.
- Ogawa Y, Fukutomi T, Sugiura K, Kato K, Tohya Y, Akashi H.** 2007a. Comparison of Akabane virus isolated from sentinel cattle in Japan. *Vet Microbiol* 124:16-24.
- Ogawa Y, Kato K, Tohya Y, Akashi H.** 2007b. Sequence determination and functional analysis of the Akabane virus (family Bunyaviridae) L RNA segment. *Arch Virol* 152:971-979.
- Ogawa Y, Sugiura K, Kato K, Tohya Y, Akashi H.** 2007c. Rescue of Akabane virus (family Bunyaviridae) entirely from cloned cDNAs by using RNA polymerase I. *J Gen Virol* 88:3385-3390.
- Osborne JC, Elliott RM.** 2000. RNA binding properties of bunyamwera virus nucleocapsid protein and selective binding to an element in the 5' terminus of the negative-sense S segment. *J Virol* 74:9946-9952.
- Oya A, Okuno T, Ogata T, Kobayashi I, Matsuyama T.** 1961. Akabane, a new arbor virus isolated in Japan. *Jpn J Med Sci Biol* 14:101-108.
- Parsonson IM, Della-Porta AB, Snowdon WA, Murray MD.** 1975. Letter: Congenital abnormalities in foetal lambs after inoculation of pregnant ewes with Akabane virus. *Aust Vet J* 51:585-586.

- Parsonson IM, Della-Porta AJ, Snowdon WA.** 1977. Congenital abnormalities in newborn lambs after infection of pregnant sheep with Akabane virus. *Infect Immun* 15:254-262.
- Parsonson IM, Della-Porta AJ, Snowdon WA, O'Halloran ML.** 1981. The consequences of infection of cattle with Akabane virus at the time of insemination. *J Comp Pathol* 91:611-619.
- Pettersson RF, von Bonsdorff CH.** 1975. Ribonucleoproteins of Uukuniemi virus are circular. *J Virol* 15:386-392.
- Pollitt E, Zhao J, Muscat P, Elliott RM.** 2006. Characterization of Maguari orthobunyavirus mutants suggests the nonstructural protein NSm is not essential for growth in tissue culture. *Virology* 348:224-232.
- Pringle CR, Lees JF, Clark W, Elliott RM.** 1984. Genome subunit reassortment among Bunyaviruses analysed by dot hybridization using molecularly cloned complementary DNA probes. *Virology* 135:244-256.
- Raju R, Kolakofsky D.** 1989. The ends of La Crosse virus genome and antigenome RNAs within nucleocapsids are base paired. *J Virol* 63:122-128.
- Ramanathan HN, Jonsson CB.** 2008. New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. *Virology* 374:138-150.
- Samso A, Bouloy M, Hannoun C.** 1975. [Circular ribonucleoproteins in the virus Lumbo (Bunyavirus)]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 280:779-782.
- Santos RI, Rodrigues AH, Silva ML, Mortara RA, Rossi MA, Jamur MC, Oliver C, Arruda E.** 2008. Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. *Virus Res* 138:139-143.
- Schmaljohn CS, Hooper JW.** 2001. Bunyaviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*, vol. 2 (eds. Knipe DM, Howley JW.), pp.1581-1602 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA).
- Shi X, Goli J, Clark G, Brauburger K, Elliott RM.** 2009. Functional analysis of the Bunyamwera orthobunyavirus Gc glycoprotein. *J Gen Virol* 90:2483-2492.

- Shi X, Kohl A, Léonard VH, Li P, McLees A, Elliott RM.** 2006. Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *J Virol* 80:8089-8099.
- Shi X, van Mierlo JT, French A, Elliott RM.** 2010. Visualizing the replication cycle of bunyamwera orthobunyavirus expressing fluorescent protein-tagged Gc glycoprotein. *J Virol* 84:8460-8469.
- Shimshony S.** 1980. An epizootic of Akabane disease in bovines, ovines and caprines in Israel, 1969-70: epidemiological assessment. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 28:197-199.
- Simon M, Johansson C, Mirazimi A.** 2009. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin-, pH- and cholesterol-dependent. *J Gen Virol* 90:210-215.
- St George TD, Standfast HA, Cybinski DH.** 1978. Isolations of akabane virus from sentinel cattle and *Culicoides brevitarsis*. *Aust Vet J* 54:558-561.
- Stram Y, Kuznetzova L, Guini M, Rogel A, Meïrom R, Chai D, Yadin H, Brenner J.** 2004. Detection and quantitation of akabane and aino viruses by multiplex real-time reverse-transcriptase PCR. *J Virol Methods* 116:147-154.
- Taylor WP, Mellor PS.** 1994. The distribution of Akabane virus in the Middle East. *Epidemiol Infect* 113:175-185.
- Tsuda T, Yoshida K, Yanase T, Ohashi S, Yamakawa M.** 2004. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the antibodies specific to akabane virus. *J Vet Diagn Invest* 16:571-576.
- Uchida K, Murakami T, Sueyoshi M, Tsuda T, Inai K, Acorda JA, Yamaguchi R, Tateyama S.** 2000. Detection of Akabane viral antigens in spontaneous lymphohistiocytic encephalomyelitis in cattle. *J Vet Diagn Invest* 12:518-524.
- Ushigusa T, Uchida K, Murakami T, Yamaguchi R, Tateyama S.** 2000. A pathologic study on ocular disorders in calves in southern Kyushu, Japan. *J Vet Med Sci* 62:147-152.
- van Knippenberg I, Elliott RM.** 2015. Flexibility of bunyavirus genomes: creation of an orthobunyavirus with an ambisense s segment. *J Virol* 89:5525-5535.

**Weber F, Bridgen A, Fazakerley JK, Streitenfeld H, Kessler N, Randall RE, Elliott RM.** 2002. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs counteracts the induction of alpha/beta interferon. *J Virol* 76:7949-7955.

**Yamakawa M, Yanase T, Kato T, Tsuda T.** 2006. Chronological and geographical variations in the small RNA segment of the teratogenic Akabane virus. *Virus Res* 121:84-92.

**Yanase T, Hirata M, Matsumori Y, Matsumura M, Kato T, Shirafuji H, Yamakawa M, Hayama Y, Tsutsui T.** 2011. Detection of *Culicoides brevitarsis* activity in Kyushu. *J Vet Med Sci* 73:1649-1652.

**Yanase T, Kato T, Aizawa M, Shuto Y, Shirafuji H, Yamakawa M, Tsuda T.** 2012. Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus. *Arch Virol* 157:1611-1616.

**Yanase T, Kato T, Kubo T, Yoshida K, Ohashi S, Yamakawa M, Miura Y, Tsuda T.** 2005. Isolation of bovine arboviruses from *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in southern Japan: 1985--2002. *J Med Entomol* 42:63-67.

**Yang DK, Kim BH, Kweon CH, Nah JJ, Kim HJ, Lee KW, Yang YJ, Mun KW.** 2008. Serosurveillance for Japanese encephalitis, Akabane, and Aino viruses for Thoroughbred horses in Korea. *J Vet Sci* 9:381-385.

**Yonguç AD, Taylor WP, Csontos L, Worrall E.** 1982. Bluetongue in western Turkey. *Vet Rec* 111:144-146.

**Yoshida K, Tsuda T.** 1998. Rapid detection of antigenic diversity of Akabane virus isolates by dot immunobinding assay using neutralizing monoclonal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 5:192-198.

**丸太哲也, 堀内早苗.** 2015. アカバネウイルスの関与が疑われた豚異常産の一例. 平成26年度全国家畜保健衛生業績抄録 406:81.

**和田彬美, 元村泰彦.** 2015. 管内で発生したアカバネウイルスの関与を疑う異常産. 平成26年度全国家畜保健衛生業績抄録 395:79.

**本田俊次, 秋山昌紀, 清水和, 藤田敦子, 伊藤直美, 久保田康德.** 2013. 豚におけるアカバネウイルス感染症の発症例. 広島県獣医師会雑誌 No.28:47-52.

福富豊子, 長井誠, 奥田宏健, 明石博臣, 秦守男, 萱原佳美, 秦野好博. 2004. 岡山県で分離されたアカバネウイルスの抗原性と遺伝子解析. 日本獣医師会雑誌 57:101-105.



## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、多くの方のご協力を賜りました。特に、獣医微生物学研究室の堀本泰介教授には、アカバネウイルスの実験を行える環境を与えて下さり、博士論文をまとめるよう導いてくださったことに、心から感謝いたします。同研究室の明石博臣名誉教授には、本博士論文の研究テーマとなった、アカバネウイルスの仕事を与えていただき、論文博士の指針をくださいましたお陰でこの状況に至りましたことに、深く感謝申し上げます。

また、感染制御学の芳賀猛准教授には、深い理解の上、研究できる環境を与えてくださったことを深く感謝申し上げます。獣医病理学研究室の内田和幸准教授をはじめとした獣医病理学研究室の皆様には、研究指導ならびに実験にご協力いただきまして、大変ありがとうございました。

獣医微生物学研究室の村上晋助教、帯広畜産大学の加藤健太郎准教授には、研究のご指導を賜りましたことに、感謝申し上げます。感染制御学研究室の皆様、獣医微生物学研究室の皆様には、日々の研究生生活を支えてくださり深く感謝申し上げます。

また、一般財団法人、生物科学安全研究所の西村昌晃主任研究員には、感染実験で大変お世話になり、論文掲載に至りましたことを、感謝申し上げます。

最後に、研究生生活をあらゆる面から支えてくれた夫と家族に、心から感謝します。