

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 柿 澤 淳 子

本研究は風疹生ワクチンの弱毒化の解明の第一段階として、TO-336 風疹ワクチン株ウイルスの弱毒化に伴う塩基の変異を決定し、5' 領域にある 5 変異と弱毒化との関係を明らかにするため 5 変異がウイルスの性状（弱毒化に関係するとされている）に及ぼす影響をプラークアッセイにて調べたものであり、下記の結果を得ている。

1. TO-336 ワクチン株ウイルスの 5' 及び 3' 端と TO-336 野生株ウイルス（TO-336 ワクチン株の親株）の約 7400 塩基の配列を、PCR 法で増幅した DNA 断片またはその DNA 断片をクローニングして作成したプラスミドを用いて DNA シーケンサーにより決定した。既に得られていた配列を加えて TO-336 ワクチン株と TO-336 野生株ウイルスの全塩基配列を決定した。GC 含有率の高い塩基番号 2100-2500 の領域の PCR による増幅を、領域の約 700 塩基下流に設定した reverse primer を用い、“30 cycles of heat denaturing at 98°C for 20 sec, annealing at 50°C for 5 sec, and extension at 70°C for 10 min” という PCR の条件下で行うことにより可能にした。
2. TO-336 ワクチン株と TO-336 野生株ウイルスの配列を比較することによりワクチン株で起こった変異を同定し、2 ウイルス間では 21 塩基が異なっていることが示された。21 塩基のうち、13 塩基が NSP（非構造蛋白翻訳領域）に、5 塩基が SP（構造蛋白翻訳領域）に、3 塩基が UTR（非翻訳領域）（3 箇所にある非翻訳領域に 1 塩基ずつ）に存在しており、予測アミノ酸の変異を伴うものは 10 個であることが示された。10 個のアミノ酸変

異のうち 4 個は機能不明領域に、2 個がプロテアーゼ領域に、2 個がヘリケース領域に、2 個が E1 遺伝子の中に存在していることが示された。ワクチンの 3 株 (TO-336 株、RA27/3 株と Cendehill 株) 間では 21 塩基のうち 8 塩基が共通して認められた。

3. 風疹ウイルス野生株である Therien 株の感染性 cDNA クローンの 5' 領域を TO-336 ワクチン株または TO-336 野生株の 5' 領域に組み換えて作成した 2 種のウイルスを用い、ワクチン株の 5' 領域がウイルスの性状に及ぼす影響を調べたところ、プラークの大きさへの影響は認められず、感染初期においてウイルスの増殖を抑制していることが認められた。ワクチンウイルスの増殖の抑制には、5' 領域以外にある変異も関係していることが考えられた。
4. TO-336 ワクチン株または TO-336 野生株と Therien 株間ではプラークの大きさとウイルスの増殖において 5' 領域の活性の差異が認められた。

以上、本論文は風疹ウイルスにおいてワクチン株とその親株との比較により弱毒化関連の変異を明らかにした最初の報告であり、5' 領域のみが異なる 2 種の組み換えウイルスの解析から TO-336 ワクチン株ウイルスの 5' 領域が弱毒化に関与している可能性を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、風疹ウイルスの弱毒化のメカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。