

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名： 上間 匡

イヌジステンパーウイルス(CDV)はパラミクソウイルス科モービリウイルス属に属し、麻疹ウイルスや牛痘ウイルス、小反芻獣疫ウイルスと近縁のウイルスであり、CDV 感染症はイヌの重要なウイルス性感染症の一つとして狂犬病とともによく知られる高病原性ウイルス感染症である。これまでワクチンにより、飼い犬個体群の間ではうまくコントロールされてきた CDV 感染症だが、近年ワクチン接種済みのイヌを始め、ミンク・フェレットといった小型肉食獣、ライオン・トラなどの大型ネコ科獣、さらにはアザラシなど海棲哺乳類といった広範な動物種で感染・発症、大量死を引き起こし、世界的な再興ウイルス感染症の一つとして認識されるようになった。唯一の対策はワクチン接種であるが、弱毒生ワクチンとして使用されるワクチン株の中には CDV 感受性野生動物に対して病原性を示すものがあり、さらに将来的なウイルス変異による更なる宿主域の拡大も懸念されるため、これらに対応する安全な新しいワクチンの開発が求められている。弱毒生ワクチンは免疫誘導能と持続性において DNA ワクチンや CDV 蛋白発現組換えウイルスワクチンよりも優れており、また飼い犬における CDV 感染症のコントロールが弱毒生ワクチンの使用でうまくいっていることを考慮すると、感受性動物に広く安全に使用でき、さらには将来のウイルス変異にも対応できる新しい弱毒生ワクチンはワクチン開発において重要な選択肢の一つであるといえる。

本研究第一章で著者は国内での CDV 感染症の流行の原因探索と、流行株の動向を解析する目的で 1982-1998 年にかけて国内で分離された CDV 野外株 23 株の H 遺伝子の一部の塩基配列を決定し、これを基に系統樹解析を行った。その結果、国内のイヌにおける CDV 感染症の流行は主にワクチン株とは異なる 2 種類の遺伝子型のウイルス群の出現によるもので、ワクチン株の病原性復帰の可能性は低いと考えられること、さらに海外で分離されたウイルス群と同系統のウイルスも 1 株存在することが明らかとなり、国際的物流による動物由来ウイルスの国内流入例の可能性も示した。また、この解析結果の臨床的応用として RFLP 法によるワクチン株と国内野外株の簡易識別法の有用性を示した。

第二章では、ホテル由来のルシフェラーゼ遺伝子を発現する組換え CDV を用いて、組換え CDV における外来遺伝子発現の制御機構について解析を行った。本著者は、CDV ゲノム上の各遺伝子間に存在する 6 種類の転写制御配列による外来ルシフェラーゼ遺伝子の発現調節と、ゲノム上への挿入位置の違いによる発現調節について解析し、組み換え CDV では主に、転写制御配列ではなく、ウイルスゲノム上流に近い位置にある遺伝子ほど遺伝子発現が大きくなるという polar attenuation により外

来遺伝子の発現がコントロールされていること、外来遺伝子の挿入が組換えウイルスの増殖に大きな影響を与えないことを明らかにした。また、この外来遺伝子発現調節機構を利用し、組換え CDV ベクターにおいて外来遺伝子の発現量をコントロールすることが可能であり、組換え CDV が遺伝子ベクターとして将来利用できることを示唆するものである。

第三章では、新型 CDV ワクチン候補として、M 遺伝子欠損 CDV の作出を行った。モノネガ ウイルス M 蛋白はウイルス粒子形成・出芽に重要とされ、M 遺伝子に欠損や変異を持つウイルスは感染細胞からの正常なウイルス粒子の放出がないことがセンダイウイルスや麻疹ウイルスで知られている。人為的に M 遺伝子を欠損したウイルスは感染細胞からのウイルスの排出が起こらず、安全性も高いと期待されることから、新しいワクチン候補として有用であると考えられる。著者は CDV 国内分離株を基に、M 遺伝子を欠損させ、かわりに蛍光蛋白 EGFP 遺伝子を挿入した組換え CDV ゲノムを構築し、M 遺伝子欠損組換え CDV の作出を行った。細胞へ遺伝子導入後に蛍光が観察され CDV に特異的な CPE を形成したことから、M 遺伝子欠損 CDV がレスキューされたことを確認した。CPE 拡大は蛍光発現細胞周囲に限局し、CPE から離れた場所には新たな蛍光発現細胞を認めなかったことから、組換え CDV は細胞間を直接伝播していると考えられ、ウイルス放出のない新たな組換え生ワクチンの候補として有用であると考えられた。また、EGFP により可視化されたウイルスは、細胞、動物への感染後の追跡が可能であり、今後の基礎研究に有用なツールとなることが考えられる。

本研究によって得られた知見はリバーシジェネティクスを用いた組換え CDV の遺伝子ベクター、ワクチンとしての応用に大いに役立つと考えられる。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。