

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 米田 篤史

---

世界的に重要な人獣共通感染症である狂犬病は、イヌ科動物間およびイヌ科動物からの感染によりヒト、家畜に感染する。本研究では、現行の注射による狂犬病ワクチンに代わる、より安全な粘膜免疫法を確立する目的で、感染性のない不活化狂犬病ウイルス(RV)の経鼻投与による狂犬病ウイルス感染防御免疫の誘導を試みた。

RVは、感染動物の咬傷等、末梢から感染し、末梢神経細胞に感染、上行し、脳に至る。脳内では血液脳関門のため、抗体や補体成分(C4等)が、末梢に比べ低濃度でしか存在していないことから、末梢と脳内では機能する免疫機構が異なると考え、第1章において、脳内と末梢における抗体の感染防御機構を解析した。抗RV抗血清を腹腔に移入した後、RVをマウスに末梢および脳内感染させたところ、50%生残させるために要した抗RV抗体量は、脳内に抗血清を移入し、脳内にウイルス感染させた場合に比べて、腹腔に抗血清を移入し、末梢感染させた方が4.4倍多かったが、末梢では抗体が血液循環へ希釈されること、および末梢感染させるウイルス量が、脳内感染の2,000倍であることを考慮すると、抗RV抗体は、末梢のウイルスに対して、脳内よりも低濃度で効率的にウイルスを排除していると思われた。次に、RVの外被膜蛋白(G蛋白)を認識するモノクローナル抗体(mAb)で、RV CVS株をオプソニン化した後末梢または脳内に接種した実験により、末梢におけるIgG<sub>1</sub>を介した補体によるウイルス排除の有効性が示唆された。一方、オプソニン化RVの脳内感染実験では、脳内感染RVに対しては、補体によるウイルス排除はほとんど行われず、感染防御には中和活性が有効で有効であること、さらに、中和抗体による感染防御においても、補体が相乗的に機能することが示唆された。また、貪食細胞による抗体によるオプソニン化されたウイルスの捕捉は、それほど効率的に機能していないと考えられた。

第2章では、第1章の結果を踏まえ、経鼻投与による脳内接種RVに対する感染防御効果を検討した。CRV 30  $\mu$ lをコレラトキシン(CT) 5  $\mu$ gと共に(CRV/CT)、ddyマウスに5回経鼻投与し、最終免疫一週間後に採血し、抗体価を測定した後、致死量(25 LD<sub>50</sub>)のRV CVS株を脳内感染させ、CRV 30  $\mu$ lの2回腹腔免疫群と比較した。CRV/CT経鼻免疫群と腹腔免疫群は、血中抗RV-IgG抗体価は同程度の抗体価を示したが、中和抗体価は、腹腔免疫群の方が若干高かった。IgGサブクラスでは、高レベルのIgG<sub>2a</sub>抗体が双方の免疫群で検出され、Th1型の免疫が誘導されていることが示唆された。一方で、IgG<sub>1</sub>抗体は、腹腔免疫群よりも、CRV/CT経鼻免疫群で高値を示すマウスが多かった。RVの脳内感染に対するマウス生残率は、CRV/CT経鼻免疫群および腹腔免疫群では、それぞれ67%および100%であった。RVの脳内接種で生残したマウスと死亡したマウスの血清抗体価の比較では、生残マウスの中和抗体価とIgG<sub>2a</sub>抗体価が高く、脳内感染RVに対しては、Th1型の免疫応答と中和抗体による免疫応答が有効であることが示唆された。以上より、不活化RVの経鼻投与により、RVに対する発症防御免疫を誘導することが可能であること、およびCT等のアジュバントが必須であることが示された。また、経鼻投与によりIgG<sub>2a</sub>のみならずIgG<sub>1</sub>も高

値を示すマウスが多数見られたことから、Th1 型およびTh2 型の双方の免疫反応を誘導することが示唆された。

第3章では、CRV/CT経鼻投与の末梢感染RVに対する感染防御効果を検討した。CRV/CT経鼻免疫マウス群をそれぞれ2分し、RVを脳内感染または末梢感染させたところ、マウス生存率は、脳内感染群より、末梢感染群の方が高かった。経鼻免疫マウス血清中のIgG<sub>1</sub>抗体の末梢感染RV感染防御における寄与について、さらに検討するため、経鼻免疫または腹腔免疫マウス血清をそれぞれマウス腹腔に移入した後、RV末梢感染実験を行った。結果として、50%のマウスを生存させるために要した抗血清中に含まれる中和抗体量の比は1:2.6、IgG<sub>1</sub>抗体量比は、逆に3:1であったことから、末梢感染RVに対する抗体の作用として、経鼻免疫群では、IgG<sub>1</sub>抗体を介して補体によるウイルス排除が行われるため、中和抗体価が低くても腹腔免疫と同等か、それ以上の感染防御効果を示したと考えられた。

このように本論文は、経鼻免疫による狂犬病の発症防御免疫の誘導が可能であり、その効果は、末梢感染において特に有効であることを証明し、現行のワクチンに代わる新しいワクチン投与方法になり得る可能性を示したもので、医学・生物学上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。