

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 土器 美穂

論文題目

Basic studies for canine contagious viruses
(イヌの病原性ウイルスに関する基礎的研究)

イヌジステンパー、イヌパルボウイルス感染症、狂犬病はイヌのウイルス性感染症の中で最も重篤なものに含まれる。本研究では、これらの原因であるイヌジステンパーウイルス(CDV)、イヌパルボウイルス(CPV)、狂犬病ウイルス(RaV)に着目し、CDVリバーシジェネティクス法を用いることによりCDV持続感染機構の解析と組換え多価ワクチン開発を主題に基礎的研究を行った。

第1章では、著者らの研究グループがCDVリバーシジェネティクス法により作出した蛍光蛋白EGFP発現組換えCDV(CDV-EGFP)を用いて、リンパ球系細胞における新たなCDV持続感染株(CDV-EGFP-BP2)の樹立と持続感染機構の解析を行った。CDVは持続感染能を有するが、その機序は明らかでない。樹立したCDV-EGFP-BP2は元株と同様のウイルス増殖と細胞外へのウイルス粒子放出を示したが、感染細胞に細胞融合性巨細胞を形成せず、非感染細胞と同等の細胞生存率を示した。細胞侵入の役割を担う膜蛋白HとFの感染細胞における発現様式を比較したところ、mRNA量、蛋白量、細胞表面での局在において元株と相違なかったが、膜蛋白の塩基配列を決定し元株と比較したところ、HとMに各一ヶ所ずつアミノ酸変異があった。また、リンパ球でのレセプターであるSLAMを導入した細胞への感染では細胞融合能の減弱が見られた。細胞融合には膜蛋白HとFの相互作用が必要であることから、Hのアミノ酸置換がFとの相互作用の減弱をもたらし、持続感染を起こしている可能性が示唆された。

第2章 1では、近年日本で分離されたCPVの系統樹解析を行った。1999年と2000年の国内CPV感染7症例よりCPVを分離し、カプシドの大半を占め宿主域決定や中和抗体誘導に関連するVP2蛋白をコードする遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、3株がタイプ2a、4株がタイプ2bの遺伝子型を持ち、日本や台湾の近年野外株に近縁の株であることが示唆された。いずれも初期流行株の抗原型を元にした現在のCPVワクチン株とは異なるクラスターを形成しており、将来のワクチン開発に有用な知見を与えた。

第2章 - 2ではCDVをベクターとした多価ワクチン開発の基礎研究として、CDVリバーサージェネティクス法によりCPVの抗原遺伝子VP2を組込んだ組換えCDVの作出と解析を行った。得られたウイルスCDV-CPV-VP2は、元株と比べウイルス増殖速度と細胞融合性巨細胞の形状に顕著な差異はなかったが、感染細胞における外来蛋白VP2の発現は見られなかった。そこでmRNA発現を調べたところ、N-VP2間でリードスルーが高頻度で起こりVP2を翻訳しないmRNAが殆どを占めることがわかった。原因としてVP2遺伝子内にリードスルー誘発配列が存在するか、VP2蛋白が発現しない組換えCDVが選択的に得られた可能性が考えられたため、VP2遺伝子をEGFP遺伝子の下流において転写調節領域から離れた遺伝子や、VP2蛋白が核内に集積しないように膜局在シグナルを付加した遺伝子を構築し、細胞に導入して目的蛋白質の発現を確認した上でこれらを用いて組換えCDV作出を試みたが、いずれも組換えCDVは得られなかった。以上の結果から、VP2の発現がウイルスの増殖や宿主細胞に影響するためにVP2発現組換えCDVが作出できない可能性が示された。

第2章 - 3では、CDVリバーサージェネティクス法によりRaVの抗原遺伝子Gを組込んだ組換えCDV(CDV-RaV-G)の作出と解析を行った。得られたCDV-RaV-Gは元株と比較して増殖の遅れと小型の細胞融合が見られた。感染細胞中に外来蛋白Gの発現が見られ、RaV感受性であるBHK-21細胞に対して感染能を獲得したことがわかった。本章では、多価ワクチンとして有望なCDV-RaV-Gを得ることができた。前章の結果も含めこれらの成果は今後の組換えCDVの作出に寄与する重要な知見と考えられた。

本研究は、CDVの持続感染機構の基礎的研究およびCDVベクターを用いた組換えワクチンの開発における有用な知見を与えることができたと考える。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。