

厚生科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

狂犬病ウイルスに対する骨髄系樹状細胞の反応

分担研究者 西園晃（大分大学医学部感染分子病態制御講座 教授）

研究要旨

狂犬病ウイルス街上市毒株の感染は最終的に致死病的病態を誘導するが、その際の中  
枢神経系における病理学的所見には形態的特徴、特に炎症反応などはほとんど認められ  
ず、中枢神経系においては免疫応答の抑制または不応答が引き起こされていると考えら  
れている。それに対し、致死病的病原性の減衰した弱毒株は、末梢において免疫を賦活し、  
それが故に致死病的病態から免れていると考えられている。本研究では狂犬病ウイルス  
(RV)に対する樹状細胞の応答を検討することで、中枢神経系における病原性発現の端緒  
を末梢の免疫系細胞が担っている可能性について検討した。マウス樹状細胞由来 JAWSII  
細胞は Challenge Virus Standard (CVS) または Evelyn Rotkitniki Abelseth strain  
(ERA) 接種により培養上清中に子孫ウイルスの産生は観察されなかった。CVS または  
ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中の TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  を解析した結果、  
CVS と比較して ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中には顕著に TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  およ  
び IFN- $\beta$  が検出され、樹状細胞が末梢において暴露した RV の株の違いにより免疫応答  
が左右されている可能性が推測された。

A. 研究目的

狂犬病ウイルスは (RV) はラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される一本鎖 RNA ウイルスである。RV は神経細胞に指向性が強く、ひとたび上向性に侵入し免疫特権領域である脳内に感染が拡大すれば、もはや獲得免疫応答をはじめ、いかなる手段をしても排除不可能であり、

宿主は死に至る。よって脳神経まで感染が及ぶか否かは、最初に暴露を受けた末梢組織での自然免疫応答に深く左右されており、暴露後ワクチン接種の根拠もそこにあると考えられている。致死病的病原性の減衰した弱毒株の末梢における応答性と致死病的病態を誘導する街上市毒株とは、末梢における免疫応答、特に自然免

疫応答と獲得免疫応答を繋ぐ樹状細胞の応答に根本的な違いがあるのではないかと予測される。

これまで、末梢局所を実験的に接種されたRV粒子の多くはマクロファージ等の食食系の細胞内に存在することが報告されており、またマクロファージ由来のRAW264を用いた*in vitro*の実験において、RVはRAW264細胞に対して非感染性であり子孫ウイルスは産生しないが、ERK1/2シグナル経路を介してCXCL10の発現を誘導する事により、免疫系を活性化する事が報告されている。

これらの報告を元に本研究では、末梢における自然免疫と獲得免疫を仲介するキーパーソンである樹状細胞を用いて、狂犬病ウイルス固定毒株と弱毒株をそれぞれ接種した場合の反応性の違いの解析を行った。

## B. 研究方法

### 1) 細胞

C57BL/6 マウス(H-2b)の骨髄より樹立された骨髄系樹状細胞株 JAWSII (ATCC CRL-11904)、およびマウス神経芽細胞腫由来細胞株 MNA を用いた。JAWSII 細胞の表面マーカーを FACSscan にて解析したところ、CD11c、CD11b とともに強陽性で CD8 $\alpha$  は陰性であり、骨髄系樹状細胞に典型的な phenotype であった(図 1)。

### 2) ウイルス

RV 固定毒株 Challenge Virus

Standard-11 (CVS)、および弱毒株 Evelyn Rotkitniki Abelseth (ERA) strain を用いた。ウイルスストックの調整および感染力価測定には MNA 細胞を用いた。

### 3) 樹状細胞への RV 接種

#### イ) JAWSII 細胞の形態的観察とウイルス特異抗原の観察

24 穴培養プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を  $2.5 \times 10^5$  個播種した後に CVS または ERA を MOI 10、MOI 5、MOI 1 で接種した。6, 12, 24, 48, 72 時間後に細胞を顕微鏡下で観察を行った。さらに、これらの細胞をビベッティングにて回収し、PBS で洗浄した後スライドグラスに固着させ、アセトンで固定を行った。固定終了後、FITC 標識抗 RV-N 抗体 (Centocor 社) により 40 分、37°C インキュベーター内で反応させ、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

#### ロ) FACSscan による RV N と G 蛋白の樹状細胞内での確認

96 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を  $6.0 \times 10^4$  個播種した後に CVS または ERA を MOI 5 で接種した。48 時間後に細胞をビベッティングにて回収し、PBS で洗浄した後、イ) と同様に FITC 標識抗 RV-N 抗体 (Centocor 社) と RV-G モノクローナル抗体 (#4-12) を 40 分、37°C 反応させた後、FACSscan により蛍光強度の測定を行った。

ハ) JAWSII 培養上清中の子孫ウイルス産生量の測定

24 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を  $2.5 \times 10^5$  個播種した後に CVS または ERA を MOI 5 で接種した。6, 12, 24, 48, 72 時間後に培養上清液を回収し感染性子孫ウイルス量を MNA 細胞を用いたフォーカス形成試験により測定した。

4) ウイルス接種による JAWSII 細胞表面での抗原提示関連分子の発現の観察

CVS, ERA いずれも  $moi=5$  で JAWSII 細胞に接種し、72 時間後に細胞を回収・固定し、FACScan により細胞表面分子の解析を行った。用いた抗体は、MHC class I, class II, CD40, CCR7 である。

5) 樹状細胞培養上清中の TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  産生

24 穴プレート 1 穴あたりに JAWSII 細胞を  $2.5 \times 10^5$  個播種した後に CVS または ERA を MOI 10, MOI 5, MOI 1 で接種した。24, 72 時間後に培養上清液を回収し TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  を ELISA (e-BioScience 社) にて解析した。

## C. 研究結果

1) 樹状細胞への RV 接種

イ) JAWSII 細胞の形態的観察とウイルス特異抗原の観察

CVS, ERA いずれを感染させた

JAWSII 細胞も 6, 12, 24, 48 間後では形態学的な変化、特に CPE は観察されなかったが、ERA を接種した JAWSII 細胞は、72 時間後から細胞の樹状化が目立つようになり、120 時間後では対照と比べその差は明瞭となった。

蛍光抗体染色法による観察では、CVS および ERA を接種した JAWSII 細胞では、RV N を発現した細胞はほとんど観察されなかった。

ロ) FACScan による RV N 蛋白の確認

図 2 は抗 RV N モノクローナル抗体を用いて染色された JAWSII 細胞の蛍光強度である。CVS を接種した JAWSII 細胞では蛍光強度の移動は観察されないが、ERA 感染 JAWSII 細胞では弱くはあるが N 蛋白の細胞内での発現が確認された。

ハ) JAWSII 培養上清中の子孫ウイルス産生量の測定

CVS および ERA を接種した JAWSII 細胞の培養上清中における感染性粒子量は、コントロール (JAWSII 細胞を含まずウイルスだけをインキュベートした場合) と比較して速やかに減衰した (図 3)、さらに培養上清中には子孫ウイルスの産生は見られなかった。

2) ウイルス接種による JAWSII 細胞表面での抗原提示関連分子の発現の観察

図4に示すごとく MHC class I 分子は、ウイルス接種により発現の増強が認められた。ERA 接種での発現増強は CVS のそれより明らかに強かった。ERA 接種では MHC class II 分子の発現も増強していたが、CVS ではほとんど変化は無かった。CD40 と CCR7 はいずれのウイルスの接種においても JAWSII での発現の増強は認められなかった。

3) 樹状細胞培養上清中の TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  産生

ERA を接種した JAWSII 細胞では、24 時間、72 時間後のいずれでも非常に高い TNF- $\alpha$  産生が培養上清中で認められ、これは moi 依存性であった。一方、CVS 接種の場合は対照と比べると TNF- $\alpha$  の産生は確認されたが、その程度は ERA に比べ低かった(図5)。

さらに同様にして、培養上清中の I 型インターフェロンの産生量を測定した。図6はいずれも 24 時間後の培養上清中の IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  の産生量であるが、TNF- $\alpha$  の産生の場合と同様に、ERA 接種のほうが CVS 接種に比べより強くインターフェロンの産生を促し、それは moi 依存性であった。

D. 考察

RV の強毒株と弱毒株における免疫反応の違いは、以前よりマウスまたは神経細胞を使った実験で報告がなされているが、ウイルスに暴露され感染が成立した直後、初期に応答すると考えられている樹状細胞に対する反応性に関してはほとんど報告されたことはない。近年 HIV やデングウイルスが樹状細胞の DC SIGN などの表面分子を介して感染し、DC の中で複製・増殖が起こることが報告されており、HIV に関しては、一度樹状細胞に感染する事により、細胞指向性がより強く決定され CD4+T 細胞に感染しやすくなるという報告もある。これらのことから、ウイルス感染に際して樹状細胞の反応性の検討を行うことはその後の感染の広がりや宿主免疫応答を決定づける上で重要であると考えられる。よって今回我々は RV が体内に侵入した際、早期にどのような免疫反応が誘導されているのかを予測するのを目的に、マウス樹状細胞を用い *in vitro* でその反応性の検討を行った。

今回の検討で RV 接種 72 時間後、ERA を接種した細胞と CVS を接種した細胞には、明らかな樹状化の違いが認められた。間接蛍光抗体法と FACSscan を用いて細胞を染色して観察すると、両者ともに RV N 蛋白はごくわずかに ERA 接種の場合にのみ検出され、RV G 蛋白は確認されなかった。さらに培養上清中には感染性を有するウイルス粒子の産生は全く認められなかった。一方、細胞培養液の上清中の TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  を測定したと

ころ、ERA を接種した細胞の上清中には TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$  が顕著に高く検出されたが、CVS を接種した細胞の上清中では低かった。

一方、ウイルスを接種した後の JAWSII 細胞表面分子の観察では、上記の結果を裏付けるように、ERA 株は JAWSII 細胞を強力に刺激し、これにより MHC class I 分子の発現増強と、MHC class II 分子の発現が若干ながらも増強されたことは、ERA 株が骨髄系樹状細胞をより効果的に賦活し、以後の獲得免疫応答への橋渡しをしていることが推察された。

これらの結果より、ERA 及び CVS は樹状細胞に接種しても「感染」はほとんどせず、貪食経路によって侵入（処理）されている可能性が示唆された。また、ウイルス粒子が JAWSII 細胞に貪食されることにより、おそらくは TLR などを介したサイトカイン産生の経路が活性化されるものと考えられる。しかしながらその応答性はウイルスの株によって異なっており ERA の方が樹状細胞をより強力に賦活化していると考えられた。これらのウイルス側からのメカニズムを今後解析していく予定である。

#### E. 結論

ERA と CVS の樹状細胞に対する反応性は大きく異なる事が判明した。樹状細胞はウイルスの末梢感染において重要な役割を持っている事が推測できることより、この反応性の違いは、致死的病態を誘導

する強毒株と、致死的病原性の減衰した弱毒株の病態形成機序を解明するヒントに成り得ると考えている。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Otsu S., K. Gotoh, T. Yamashiro, J. Yamagata, K. Shin, T. Fujioka, A. Nishizono : Transfer of Antigen-Pulsed Dendritic Cells Induces Specific T-Cell Proliferation and a Therapeutic Effect against Long-Term *Helicobacter pylori* Infection in Mice. *Infection and Immunity*: 74(2), 984-993, 2006
- 2) Minoura-Etoh J., K. Gotoh, R. Sato, M. Ogata, N. Kaku, T. Fujioka, A. Nishizono: *Helicobacter pylori* associated oxidant monochloramine induces reactivation of Epstein-Barr virus(EBV) in gastric epithelial cells latently infected with EBV. *Journal of Medical Microbiology*: 55, 905-911, 2006
- 3) Pakamatz K., Y. Shoji, S. Ubol, C. Mitmoonpitak, H. Wilde, A. Nishizono, I. Kurane, K. Morimoto : Genetic

analysis of dog rabies viruses  
circulating in Bangkok. *Infection  
Genetics and Evolution*. 6. 235-240.  
2006

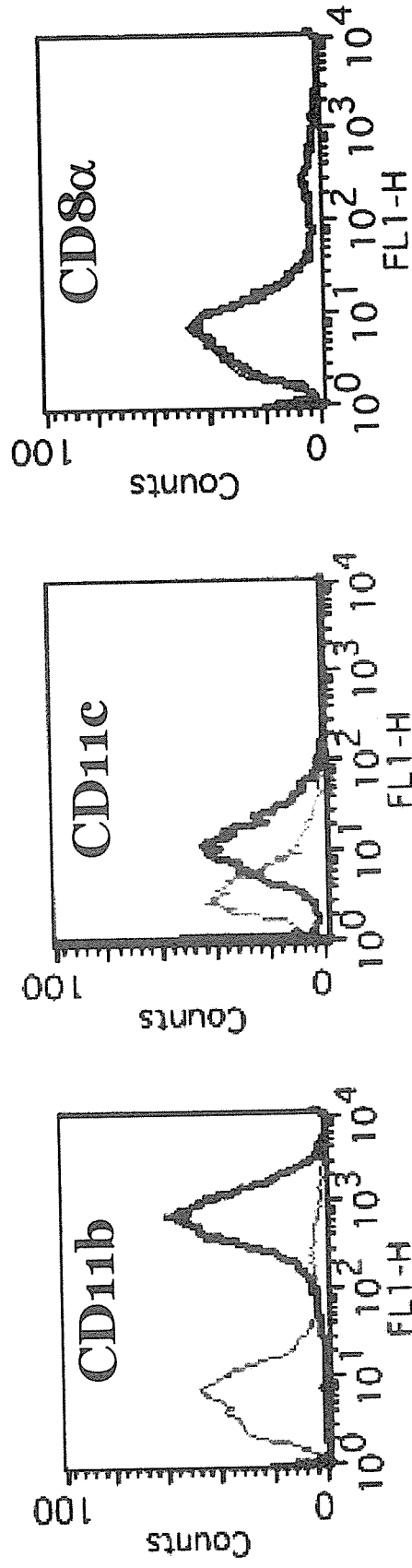
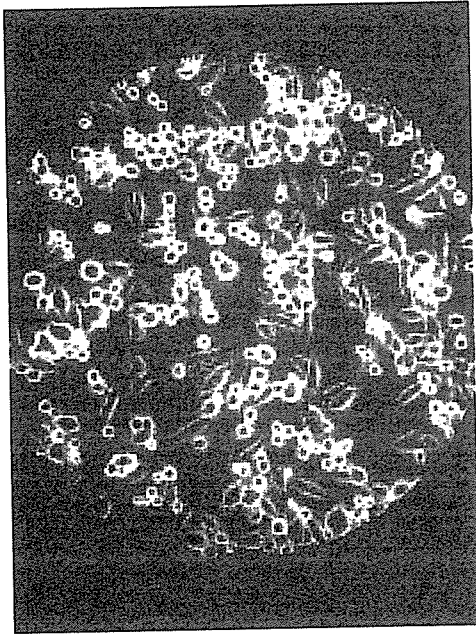
- 4) Yamagata J, Ahmed K, Pakamat K, Y.  
Mannen K, Xuyen D, K, Loi H, H.  
Dung N, V, A, Nishizono, : Molecular  
epidemiology of rabies in Vietnam.  
Microbiology and Immunology (in  
submission)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



**図1 JAWSIIの形態(400x)と細胞表面マーカー**

一部はプラスチック底面に固着しpolygonalな形態を呈し、一部は浮遊している。細胞表面に表出されるマーカーはCD11b, CD11c陽性、CD8a陰性を示す。

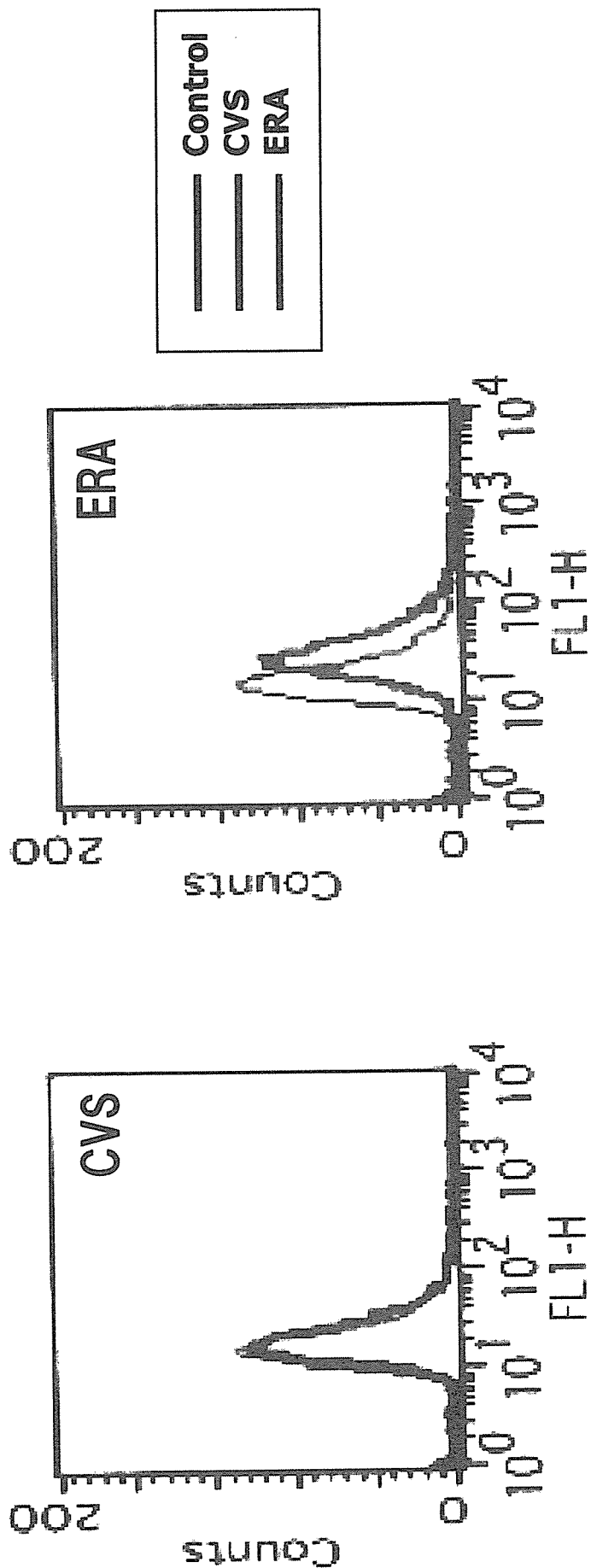


図2 CVS, ERA接種後のJAWSII細胞内N蛋白の発現

RVをmoi=5でJAWSIIに感染、72時間後細胞を固定、浸透処理後に抗Nモノクローナル抗体にて染色、FACScanにて計測。



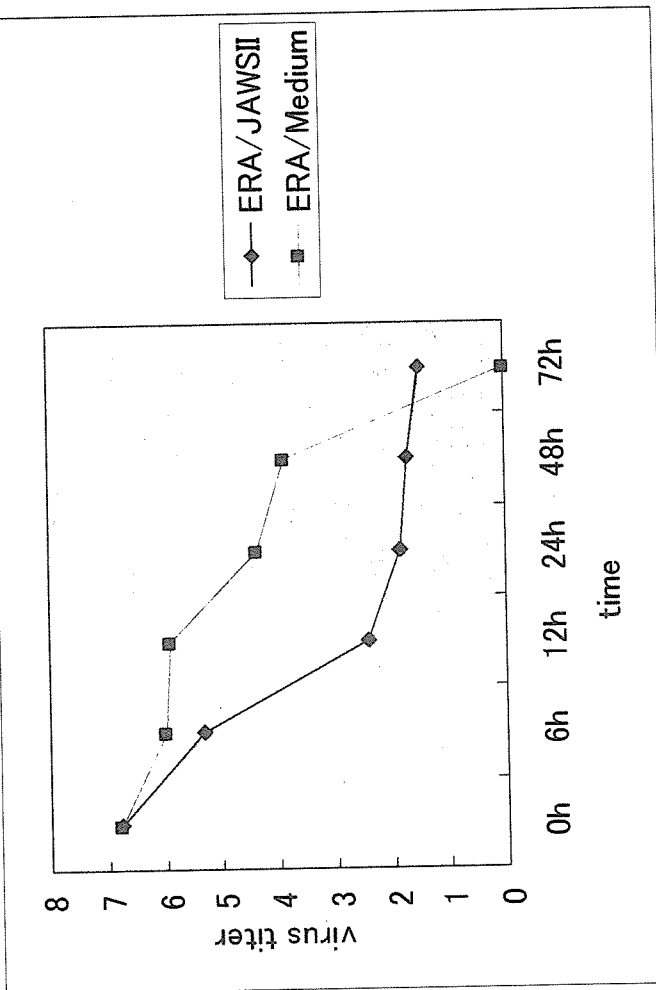
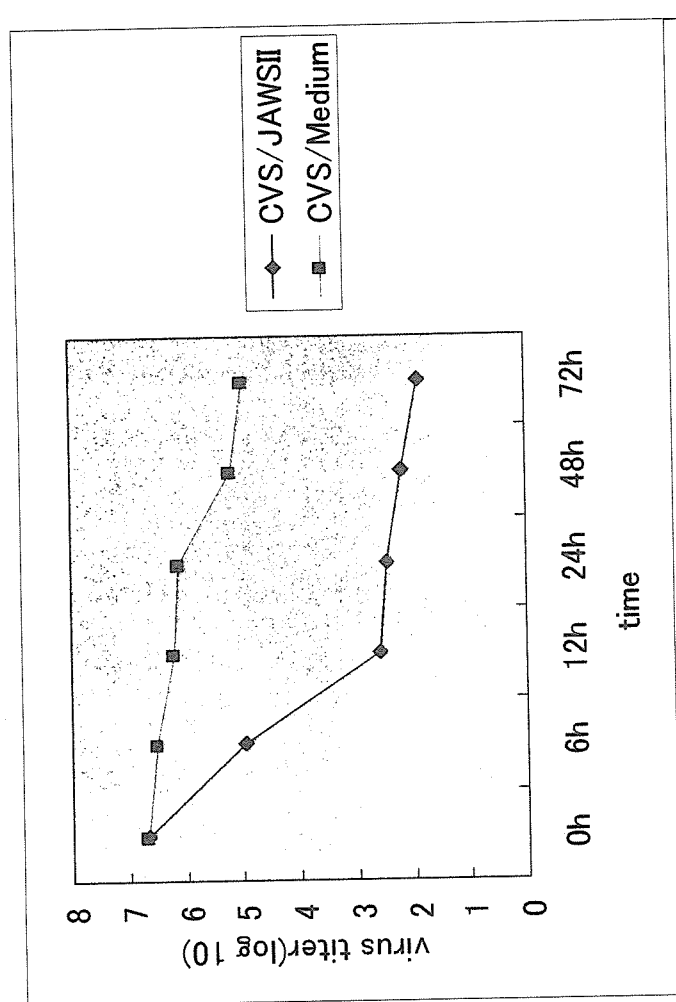


図3 CVS, ERA 接種後のJAWSII培養上清中のウイルス量の経時的推移

RVをmoi=5でJAWSIIに感染後、経時的に培養上清を採取しMNA細胞を用いて感染価を定量

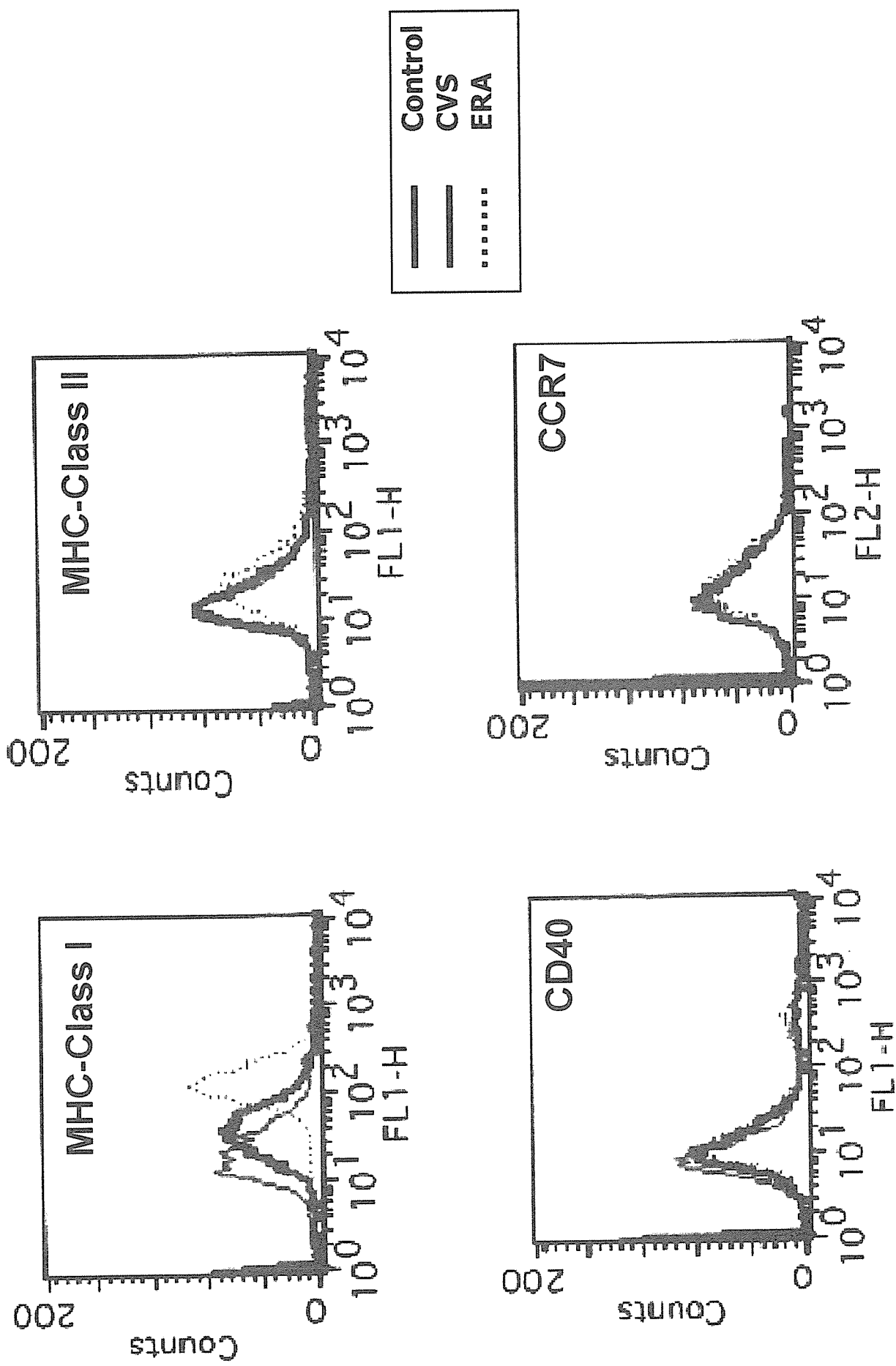
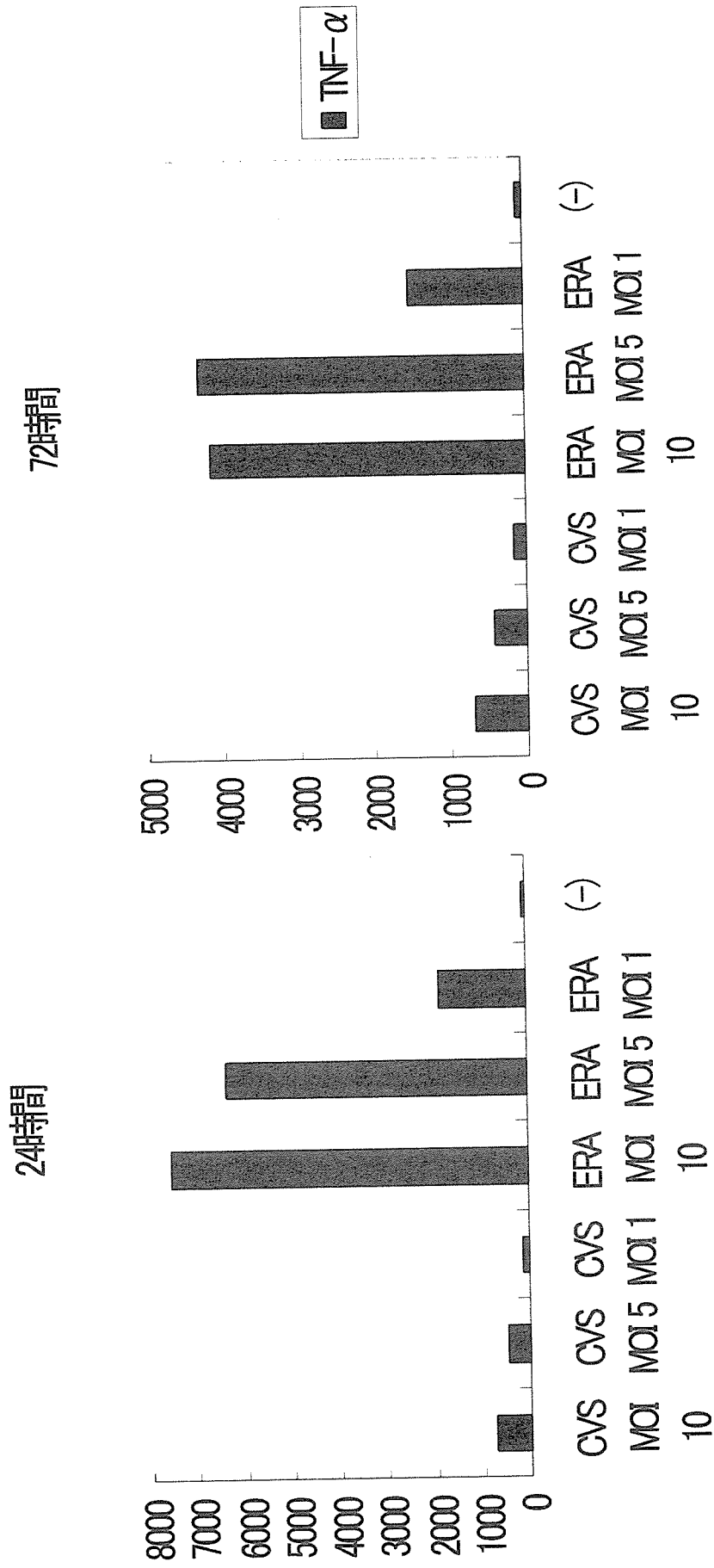


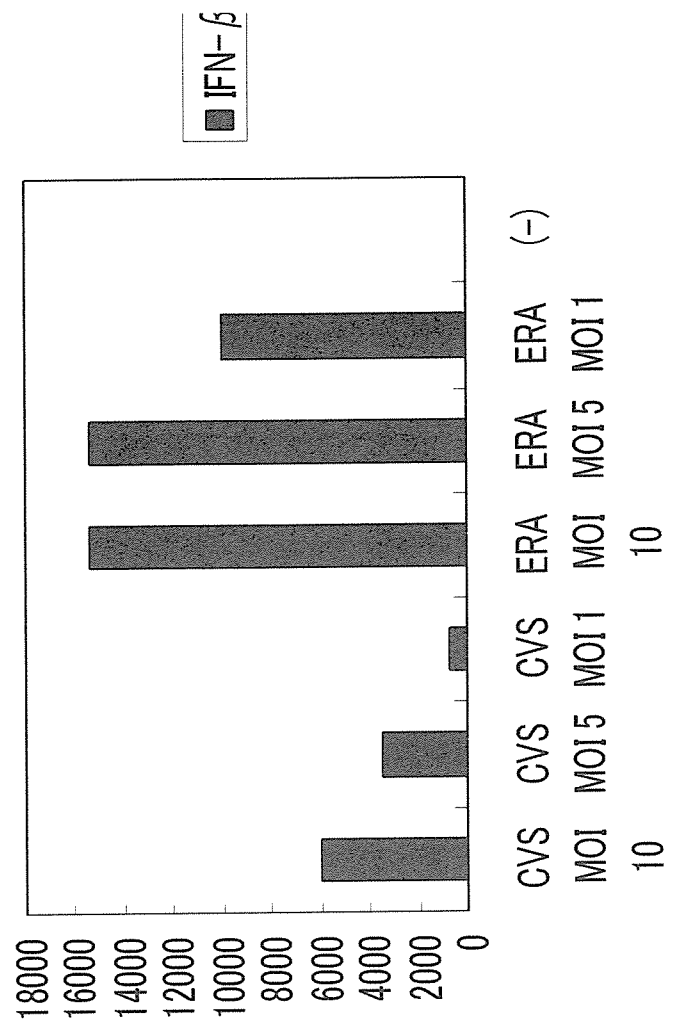
図4 CVS, ERA 接種後のJAWSII細胞表面分子の検出

RVをmoi=5でJAWSIIに感染、72時間後細胞を固定しMHC-class I, class II, CD40, CCR7で染色、FACScanにて計測。



**図5 CVS, ERA 接種後のJAWSII培養上清中のTNF-α産生量 (pg/ml)**  
 RVをmoi=10, 5, 1でJAWSIIに感染、24, 72時間後培養上清中のTNF-α量をELISAにて測定

24時間



24時間

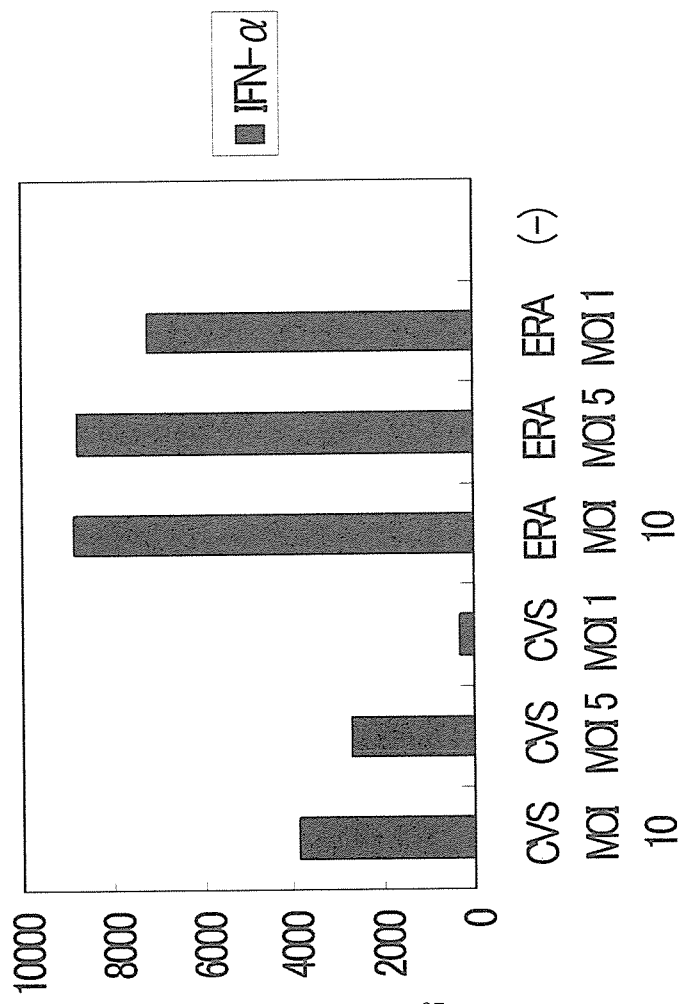


図6 CVS, ERA 接種後のJAWSII培養上清中のIFN-α, IFN-β産生量 (pg/ml)

RVをmoi=10, 5, 1でJAWSIIに接種、24時間後培養上清中のIFN-α, IFN-β量をELISAにて測定

厚生労働科学研究費補助金 （国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

タイ国バンコク市で流行しているイヌ狂犬病ウイルスの遺伝子解析と  
そのウイルスの他宿主動物あるいは BHK-21 細胞への馴化機構の解析

[分担研究者] 森本金次郎 （国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：タイ国バンコク市で流行しているイヌ狂犬病ウイルスの表面蛋白質である G 遺伝子の塩基配列を決定し、その特長を解析した。その結果、ウイルスの表面蛋白質の外側に出ている領域は塩基置換の頻度が少なく、ウイルス粒子内の領域は塩基置換の頻度が多いことが分かった。このことはバンコク市内で流行しているイヌ間でウイルス表面蛋白質の構造に遺伝的拘束があることを示唆するものである。ウイルスの表面 G 蛋白質は宿主細胞、宿主動物への侵入に関与することから、イヌ間での伝播に有利な構造を維持して流行株は伝播していると考えられる。

#### A. 研究目的

狂犬病ウイルスの表面蛋白質である G 蛋白質は宿主細胞への吸着・侵入に関与していること、中和抗体に対するウイルス側の唯一の抗原であることから、狂犬病ウイルスの病原性に深く関与している蛋白質である。我々はタイ国バンコク市で採取した狂犬病イヌ脳から得た狂犬病ウイルスを分離し、その G 蛋白質の遺伝子解析を行い、バンコク市で流行しているイヌ狂犬病ウイルスの G 遺伝子の特長を解析した。また、イヌ間での解析だけでなく、一匹のイヌより得られた狂犬病ウイルスの G 遺伝子のクローン解析も行い、一つの動物宿主内に存在するウイルス G 遺伝子の違いを解析した。

さらに、イヌ狂犬病ウイルスをハムスターに接種するとその病原性は思ったより低いものであった。その原因を探るべ

く、イヌ狂犬病ウイルスを乳のみマウスあるいは培養細胞である BHK-21 細胞に感染させ、その継代を繰り返すことで、ハムスターに適応したウイルス株の分離を試みた。最終的にはそのような分離ウイルスの遺伝子の変化を解析し、狂犬病ウイルスにおける異なる宿主動物への伝播機構とその際の病原性の変化を解明することを目指している。

#### B. 方法

1) タイ国バンコク市の狂犬病イヌ脳より狂犬病ウイルスの採取。タイ国バンコク市にある赤十字 Queen Saovabha Memorial Institute において、2002 年から 2003 年の間に蛍光抗体法において狂犬病と診断されたイヌ脳を -80℃ に保管した。今回その中から 10 検体を遺伝子解析の標品に供した。

2) 狂犬病ウイルスからの RNA 抽出と G 遺伝子解析のための RT-PCR 及びそれらの塩基配列の決定。 イヌ脳から得た RNA の抽出はマウス脳や培養細胞での増幅を行わずに、イヌ脳から直接 RNeasy Maxi kit (Qiagen) のプロトコールに従い行った。10 サンプルの RNA はプライマー G5a: 5' -CCATCATGACCACCAAGTC-3' (position 923 から 941) と G3-stop:

5' -TTACAGCTTGGTCTCACC-3' (position 1558 から 1575) を用いて、one step RT-PCR (Qiagen) により G-3 fragment (653 base-length) を増幅した。(図 2 に示したように G 遺伝子は position 1 から 1575 である)。50°C 30 分の逆転写反応後、95°C 15 分後、94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 1 分の PCR を 30 サイクル行い、最後に 72°C 10 分処理した。PCR 産物は Qiagen MiniElute PCR purification Kit (Qiagen) により精製し、DNA のシークエンス反応に供された。完全長 G 遺伝子の構築のために、もうひとつのプライマーセット G5-start:

5' -AGGAAAGATG (A/G) TTCC (G/T) CA-3' (position -7 から 11) と G3a: 5' -GATTT (A/G) TAGTGAGCATCAGC-3' (position 1030 から 1049) を用いて G-5 fragment (1056 base-length) を増幅した。

3) 一匹のイヌ脳からの狂犬病ウイルスの G 遺伝子クローン解析。一匹のイヌ脳からのウイルスのクローンの遺伝子解析には DG476 株を使用した。DG476 株より得られた G 遺伝子 PCR 産物をプラスミド pCRII-TOPO に TOPO TA cloning Kit

(Invitrogen Co., CA) を用いてクローニングし、得られた大腸菌クローン 12 個を遺伝子解析した。プラスミド DNA は Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出、各々のプラスミドは G-5 fragment の 685 塩基 (G 遺伝子の positions 81 から 765) と G-3 fragment の 621 塩基 (G 遺伝子の positions 955 から 1575) の領域の塩基配列を決定した。(図 3)。

4) 狂犬病イヌ脳より採取した狂犬病ウイルス株のハムスターでの病原性と乳のみマウスあるいは BHK-21 細胞に適応したウイルス株の分離。狂犬病イヌ脳より採取した狂犬病ウイルス株 QS-05 の 30% 脳懸濁液を作製した。ハムスターでの病原性は筋中接種によるハムスターの生死により決定した。乳のみマウスでの継代は QS-05 株を乳のみマウスの脳内に接種し、30% 脳懸濁液を作製した。QS-05 株の BHK-21 細胞への馴化継代は最初に BHK-21 細胞に感染、その感染細胞は僅かしか観察されなかったが、感染細胞を継代続けることにより 10 代まで継代し、その培養上清をウイルス液として実験に使用した。

### C. 結果

1) タイ国バンコク市のイヌ間で伝播している狂犬病ウイルスの性状を遺伝子解析により調べた。特にウイルスの表面蛋白質をコードしている G 遺伝子に注目して解析した。その結果、G 遺伝子領域内において、外側に出ている領域と内側の領域においては遺伝子の塩基置換の割合が異なることが分かった。G 蛋白質の外側は

外部に突出していて、宿主細胞への吸着・侵入に関与するとともに、中和抗体に対する抗原部位となる。図1に示したようにウイルスの外側の領域(Ecto domain)の塩基置換率と内側の領域(ウイルスの脂質二重膜とその内側; TM + Endo domain)の塩基置換率が有意に異なっていることが示された。Ecto domainが0.043に対し、TM + Endo domainでは0.113と2.6倍塩基置換の割合が多いことが分かった。さらにその置換がアミノ酸置換を引き起こすもの(nonsynonymous mutation)かそうでないものかを調べてみると、外側に面した領域の塩基置換は全てアミノ酸置換を引き起こさないもの(synonymous mutation)であった。一方、内側の部分は16ヶ所の塩基置換部位のうち10ヶ所でアミノ酸置換が起こる(nonsynonymous mutation)変異であった(図2)。

2) 一匹のイヌ脳より得られた狂犬病ウイルス株 DG476 株の G 遺伝子 PCR 産物をプラスミド DNA に挿入し個々のクローン遺伝子の解析を行った。得られたクローンのなから、12 個取り出し、その塩基配列を解析した。その結果、一匹の宿主動物内から得たウイルスにおいても、その遺伝子の中には塩基置換が見られる(quasispecies である)ことが分かった(図3)。塩基置換によるアミノ酸置換の場所は各クローンにより異なり、散在して見られた。いくつかのクローンにおいて興味深い現象が観察された。例えば、クローン#11 であるが、塩基置換は高頻度に見られるが、アミノ酸置換にはなっていないもの、synonymous mutation が蓄

積しているクローン。また、クローン#12 のように Ecto domain の 13 ヶ所の塩基置換の内 6 ヶ所がアミノ酸置換 nonsynonymous mutation を起こすようなクローンも存在することが示された。クローン#11 はウイルスの表現型としては変化がないので、宿主動物内では他の塩基置換の少ないクローンと同様の性状を示し、宿主動物内で生き延びていくであろうが、クローン#12 は突然変異ウイルスとして宿主細胞内で少数派として存在し、生き延びていけるかどうかは分からない。しかしながら、そのような少数派の突然変異ウイルスを包含していることが、別な環境下におかれた場合、例えば、宿主動物が代わった際に、他のウイルスより有利な増殖能をもつようであれば、その少数派のウイルスがいち早く新しい環境(別な宿主動物)に適応し、多数派になりうる可能性を持つと考える。

3) 狂犬病イヌ脳より採取したウイルス株 QS-05 をハムスターに筋注接種した場合、予想以上に低い病原性しか示さなかった。QS-05 株の 30% 脳懸濁液を 50 $\mu$ l 接種しても 40% の死亡率しか示さなかった。乳のみマウス一継代後においても、死亡率は 50% を超えることはなかったが、二回継代することにより、50% 以上の致死率を示すようになり、IMLD<sub>50</sub> として数値を計算できるようになった。一方、QS-05 株を BHK-21 細胞において継代をしたものは最初は BHK-21 細胞での感染率が非常に悪く、感染が成立した細胞は稀であったが、継代を続けていくと、徐々に感染効率が増し、10 代継代において、およそ 2x10<sup>4</sup> FFU/ml の感染価をもつようになり、

IMLD<sub>50</sub> = 10<sup>-2.5</sup>を示すようになった(表1)。

#### D. 考察

タイ国バンコク市の狂犬病イヌより採取したイヌ狂犬病ウイルスの表面蛋白質Gの遺伝子解析を行った。G蛋白質はウイルス粒子の表面に突き出ている蛋白質であることから、宿主細胞への吸着・侵入に関与しており、さらに、宿主動物側からみると、中和抗体の唯一の抗原であることから、ウイルスの感染成立と病原性にもっとも重要な蛋白質である。本研究において、バンコク市内の狂犬病イヌより採取した脳標品より狂犬病ウイルスRNAを抽出、RT-PCRによりG遺伝子領域のcDNAを作製し、塩基配列を決定した。

その結果、ウイルス表面G蛋白質の外側に突き出ている領域と内側の粒子内に埋もれている領域では塩基置換の割合が異なることが分かった。外側に突き出ている領域は遺伝子置換の率が低く、調べた10個のウイルス間において、アミノ酸置換もなく、保存されていることが分かった。イヌ-イヌ間での感染伝播に必須で、遺伝的拘束がある結果と考えている。一方、粒子内に埋もれている領域ではイヌ株間において、アミノ酸置換も見られたことから、あまり遺伝的拘束に縛られていないと考えられる。

一匹のイヌより得られたDG476株のG遺伝子のクローン解析を試みた。12クローンを解析した結果、従来の知見と同様、DG476株はquasispeciesとして構成されており、その中には大多数のウイルスクローンに比べ、塩基置換の非常に多く見られるウイルスクローンが存在すること

が示された。このように一匹の宿主動物内に数は少ないが塩基置換の非常に多く見られるウイルスが存在することは、環境が変化した場合にいち早く対応できるウイルスを潜在的に保持しながら、宿主動物内でウイルスが増殖していることを示しており、RNAウイルスの適応進化に重要な要因となっていると考える。

イヌ脳より得た狂犬病ウイルス株QS-05をハムスターに末梢接種した場合、イヌ街上毒株として病原性の強い株として分離されると予測されたが、そうではなかった。その理由として、宿主動物が変化した場合、イヌ宿主内では大多数を占めていたウイルスはハムスターでは増殖に有利ではないのが原因ではないかと想定した。したがって、イヌ脳以外の環境下で継代させることにより、元のウイルス株のquasispeciesが環境変化により、quasispecies内の構成分布が変動し、ハムスターでの病原性に変化が現れる可能性を考えた。実際、乳のみマウス脳やBHK-21細胞で継代をすることにより、ハムスターでの病原性に変化が現れた。今後は乳のみマウスで継代した株とBHK-21細胞で継代した株のG遺伝子の変動に注目して、解析を進めていきたい。

#### E. 結語

タイ国バンコク市で流行しているイヌ狂犬病ウイルスのG遺伝子の解析より、イヌ間で伝播しているウイルスはその表面G蛋白質の外側の領域はその内側の膜に埋もれている領域より、遺伝的な拘束を受けていることが分かった。またイヌから他の動物への伝播にはイヌ間の伝播



より感染効率の悪い伝播であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito-Takayama, M., Inoue, K., Shoji, Y., Inoue, S., Iijima, T., Sakai, T., Kurane, I., Morimoto, K. A highly attenuated rabies virus HEP-Flury strain reverts to virulent by single amino acid substitution to arginine at position 333 in glycoprotein. *Virus Res.* 119, 208-215 (2006).

2) Khawplod, P., Shoji, Y., Ubol, S., Wilde, H., Mitmoonpitak, C., Nishizono, A., Kurane, I., Morimoto, K. Genetic analysis of dog

rabies viruses circulating in Bangkok.

*Infection, Genetics and Evolution* 6, 235-240 (2006).

2. 学会発表

1) K. Morimoto Rabies situations in the world – the virus structure, pathogenesis, diagnosis and control. 中国狂犬病防疫研討会 南京市 中国 2006年5月

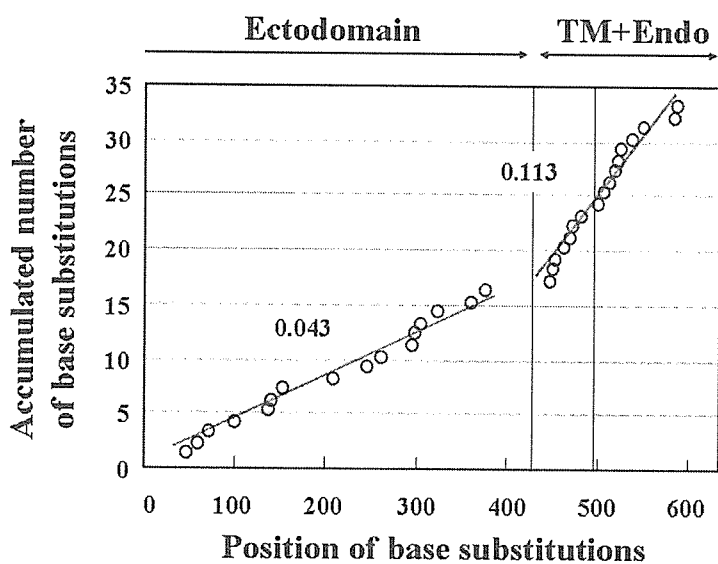
2) K. Morimoto Rabies detection Academic conference on Rabies in 2006, Beijing, October 26, 2006.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

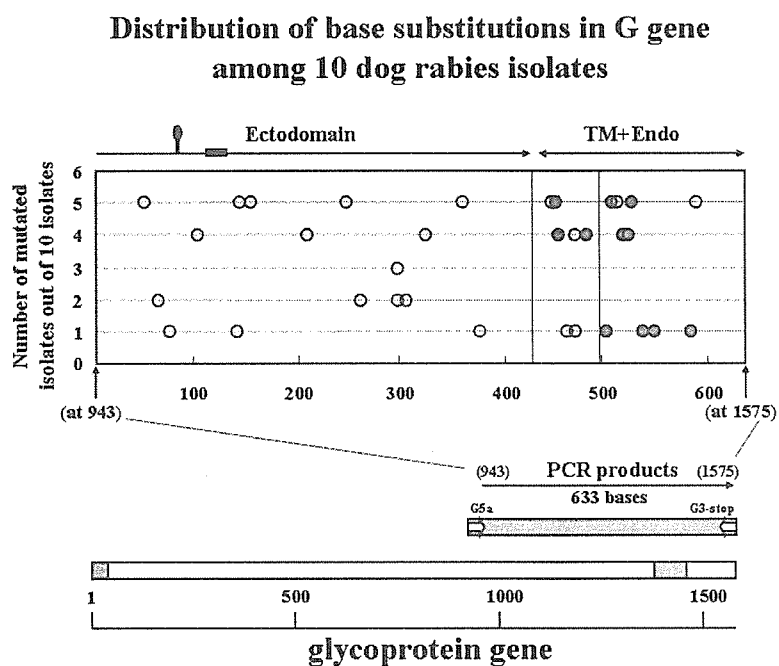
図 1

### Analysis of mutation rate among dog rabies isolates



バンコク市のイヌ脳より採取した狂犬病ウイルス 10 株の G 遺伝子の塩基置換部位の位置（横軸）とその蓄積数（縦軸）を表示し、塩基置換率を G 蛋白質の Ecto domain と TM + Endo domain に分けて比較した。

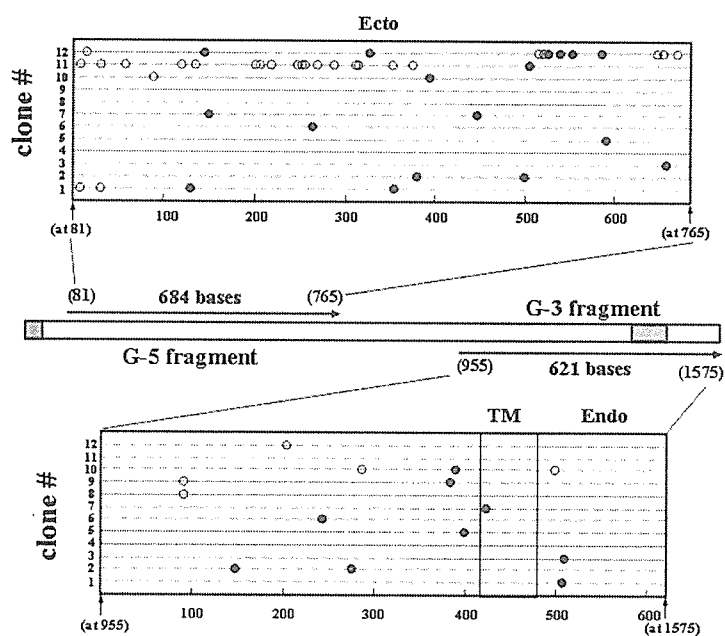
図 2



バンコク市のイヌ脳より採取した狂犬病ウイルス 10 株の G 遺伝子の塩基置換部位の位置を表示し、アミノ酸置換をとともなうものは (●)、アミノ酸置換をとともなわないものは (○) で表示した。G 蛋白質の Ecto domain と TM + Endo domain に分けて比較した。縦軸は 10 株のうち同じ部位に置換をもつ株の数を示している。

図 3

### Mutation positions of 12 clones obtained from strain DG476



バンコク市のイヌ狂犬病ウイルス DG476 株より得られた 12 個のウイルスのクローン解析 (クローン #1-#12)。塩基置換部位の位置を表示し、アミノ酸置換をとまなうものは (●)、アミノ酸置換をとまなわないものは (○) で表示した。