

が、1088-N30 株（致死率約 18%）と比較した場合には高かった。また、1088-N4#14 株の 10^4 FFU 接種では発症個体は全て耐過したが、それより低用量である 10^3 FFU 接種では 6 匹発症したうち 2 匹死亡し、 10^2 FFU 接種では 1088 株感染では 1 匹も発症しなかったにもかかわらず、4 匹発症しうち 3 匹が死亡した。以上のように、1088-N4#14 株 i.m. 接種における致死率について用量依存性が認められなかった。また、死亡、発症もしくは VNA 陽性を指標に感染率を調べたところ、 10^2 FFU 接種において顕著な差が認められ、1088 株接種では感染率 10%であったが、1088-N4#14 株接種では感染率 80%であった。また、1088-N4#14 株で観察された臨床症状は、1088 株と同様の神経症状を示した個体もあったが、多くの個体で麻痺が認められた。その麻痺の程度は 1088-N30 株接種の場合よりも強く、接種部位である右後肢の完全な麻痺や両後肢もしくは四肢の完全な麻痺が認められ、耐過した約 83%のマウス (19/23) で発症中に観察された麻痺が後肢症として残った。

考察

狂犬病の治療法確立のためには本来の狂犬病を再現させた動物モデルが必須である。CVS 株は最も頻繁に用いられている固定毒の一つであり、末梢感染も成立する強毒株であるが、本研究の結果でも示したように、感染マウスにおいて潜伏期間および発症から死亡までの期間も短く、さらに臨床症状も全身の麻痺を呈する等、本来の狂犬病を再現しているとは言い難い側面がある。特に経過が早いため、試みた治療法の効果を過小評価してしまう恐れがある。そこで、本研究では街上毒 1088 株

をマウスに感染させて、狂犬病モデルとしての評価を行った。結果にも示したように、末梢接種において 1088 株は CVS 株よりも低用量でマウスに致死感染を引き起こし、潜伏期間および発症から死亡までの期間も長く、神経症状の進行も緩徐で、さらに低用量の接種では潜伏期間の延長とバラツキが認められ、個体によっては攻撃行動も観察されたことから、1088 株感染マウスは本来の狂犬病を再現しているのではないかと考えられた。したがって、1088 株感染マウスは治療法確立のための狂犬病モデルマウスとして非常に有用であると考えられた。

最近、抗 RNA ウイルス薬として T-705（富山化学工業）等の RNA アナログが開発され、T-705 に関しては抗インフルエンザウイルス薬として既に臨床試験（フェーズ III）が始まっている。この T-705 は脳炎を引き起こすウエストナイルウイルスに対してもマウスでの試験で有効性が示されていることから、同じ RNA ウイルスである狂犬病ウイルスによる脳炎に対しても有効性が期待される。今回示した 1088 株感染マウスは、このような抗ウイルス薬の狂犬病に対する有効性を検証するのに非常に適した狂犬病モデルであると考えられる。

一方、狂犬病の治療法を確立する上で、狂犬病ウイルスによる病原性発現機構の解明も非常に重要である。狂犬病ウイルス、特に街上毒がどのようにして病原性を発揮しているのかについて現在のところほとんど分かっていない。そこで、固定毒作出法に倣い、街上毒 1088 株から連続継代により弱毒株を作出し、その弱毒化機構を解明することで街上毒の病原性発現機構を解明することを試みた。

1088 株を NA 細胞で計 30 代継代して得られた 1088-N30 株は、NA 細胞に馴化し、末梢からの接種において高度に弱毒化していた。1088-N30 株 G タンパク質には R196S 変異による N 型糖鎖の追加が認められ、この G タンパク質における N 型糖鎖の追加は固定毒に認められる共通の現象であることから、この変異が 1088-N30 株の弱毒性状に大きく関与していることが考えられた。そこで、この G タンパク質に R196S 変異のみを有する 1088-N4#14 株をクローニングし、その病原性について検討したところ、末梢接種において 1088 株と比べれば弱毒化していたが、1088-N30 株ほどは弱毒化していなかった。

この理由について、2 つの可能性が考えられた。1 つめは準種 (quasispecies) による可能性で、1088 株および 1088-N30 株は、1088-N4#14 株とは異なり、クローニングの過程を経ていないため、それらのストックウイルスは mix populations である可能性がある。実際、1088-N30 株については、Table 3 に示すようにゲノムの 17、28 および 1187 番目の塩基で 2 つのピークが認められ、mix populations であることが確認できている。これまでに狂犬病ウイルスにおいて異なる病原性を有するウイルスが準種としてストックウイルス内に含まれていることが報告されており、ポリオウイルスではストックウイルス中の多様性の差で病原性に違いの認められることが報告されている。実際、今回データには示していないが、1088 株継代 6 代目は G タンパク質 R196S の変異しか認められず、かつ変異していないウイルス (強毒株) も混在しているストックであるにもかかわらず、このストックウイルスを

同様にマウスに i.m. 接種した場合、1088-N4#14 株ではなく 1088-N30 株と同程度の弱毒性状を示す結果が得られており、この結果は N 型糖鎖追加の変異による弱毒性状は優性な形質であることと mix populations であることが病原性に影響を与えていることを示すものである。

2 つめの可能性として、N 型糖鎖追加の変異以外の変異も弱毒性状に関与していることが挙げられる。1088-N30 株では計 7 つの変異が認められており、なかでも G タンパク質の 144 番目のアミノ酸の変異 (P144L) や N タンパク質の変異の弱毒性状への関与が考えられる。G タンパク質については古くから狂犬病ウイルスの病原性に関与することがよく知られており、N タンパク質と病原性の関連については、最近、岐阜大学の Masatani らによって、固定毒である西ヶ原株とその弱毒株である NiCE 株の病原性の違いに、N タンパク質によるウイルス RNA 細胞質内センサーである RIG-I からの逃避能力の違いが関与していることが示されている。また、P タンパク質はインターフェロンによるシグナル伝達系を阻害することが知られており、1088-N4#14 株の P タンパク質に認められた変異 (G61E) はいくつかの街上毒で認められている変異ではあるが、この変異が 1088 株の病原性を高めている可能性も考えられる。以上の 2 つの可能性を検証するためには、1088 株のリバースジェネティクス系を確立する必要があり、今後の課題である。

結論として、今回示した街上毒 1088 株感染マウスは狂犬病の病態をよく反映しており、治療法の検証に非常に有用であることが示された。また今回、1088 株の NA 細胞での連続継代により弱毒株を作

出することに成功した。今後、弱毒株感染で認められる発症耐過および後遺症出現のメカニズムを丁寧に解明していくことで、戦略的かつ効率的に狂犬病治療法を確立していくことが可能になるであろう。

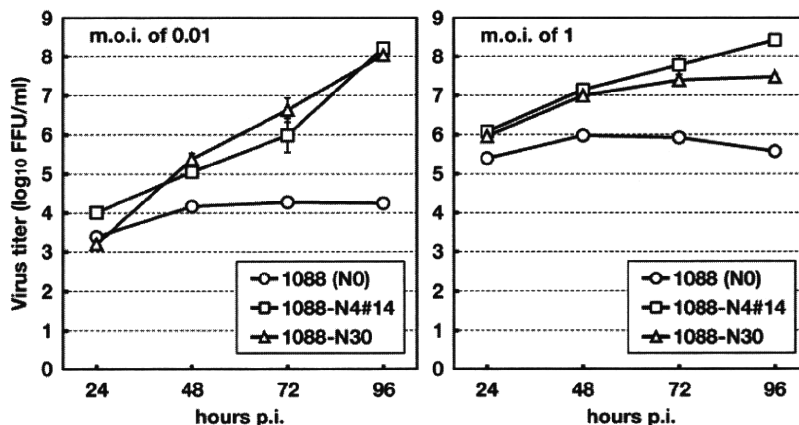


Fig. 1. Virus growth in NA cells. Each virus (as indicated) was inoculated at an m.o.i. of 0.01 or 1 and samples were collected at 24, 48, 72 and 96 hours post-inoculation (p.i.). Virus titers were determined by the focus assay in NA cells. Virus titers represent the mean and standard deviation for three wells.

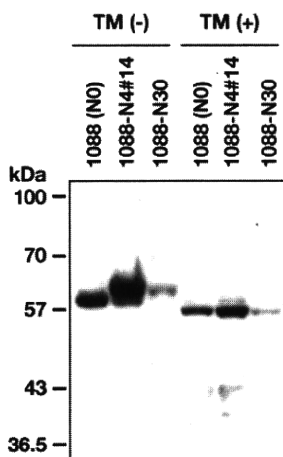


Fig. 2. N-glycosylation of the virus G protein. Each virus (as indicated) was inoculated to NA cells at an m.o.i. of 1, and then the inoculated cells were incubated for 28 hours in the absence (-) or presence (+) of tunicamycin (TM, 1 μ g/ml). The G proteins in the cells were detected by Western Blotting.

Table 1. Primer sequences used in this study

Primer name	sense	sequence (5'-3')	Notes
RBV15f	+	ACGCTTAACAACAAA	for DNA amplification
RBV77f	+	CAAAAATGTAACCCCTACAATGGATG	for DNA amplification and sequencing
RBV2208r	-	CTCTTAACTATGTCATCAAGGTTCAT	for DNA amplification and sequencing
RBV1870f	+	GGAGAAAAGATTCCCAAGATATGGTC	for DNA amplification and sequencing
RBV3542r	-	ACAACACCTGTGCAAGTGAACCGTT	for DNA amplification and sequencing
RBV3229f	+	ATGGTGCCATTAACCGCTGCATTT	for DNA amplification and sequencing
RBV5577r	-	GTCATCCGGTAAGGTCATTCCCTGT	for DNA amplification and sequencing
RBV5443f	+	GATCCAGGAGAGGTTTATGATGACCC	for DNA amplification and sequencing
RBV7758r	-	TAGATGAGAAAAGTCATAACTACACAT	for DNA amplification and sequencing
RBV7570f	+	ATAGACAGAGAATCTCAAACAGGAACAC	for DNA amplification and sequencing
RBV9819r	-	TCCTCTAAGAGATGGTTCTCTGAGCAT	for DNA amplification and sequencing
RBV9636f	+	ATGATGGAACCATCTTCCCTGTCAACA	for DNA amplification and sequencing
RBV11730r	-	TGATATCCCTGAGGGTGATCCACCTGTT	for DNA amplification and sequencing
RBV11903r	-	ACGCTTAACAAAAAACAATAAAG	for DNA amplification
RBV254r	-	CATCGTCAGGATCAAGTTTGGCGGC	for RACE (leader sequence)
RBV424r	-	ATGCCCTCTGTGAGAGCCCAATTC	for RACE (leader sequence)
RBV1638r	-	AGATTGTCCACTTCTATGGGTTT	for RACE (leader sequence)
RBV11402f	+	TTATTCTATCCACCGTCTGATCCC	for RACE (Trailer sequence)
RBV11493f	+	GACGTCCTTAGCTTCGCAAGACTTCACG	for RACE (Trailer sequence)
RBV11605f	+	ACACCTCAGTGTCAAGAGGGTAGCCTG	for RACE (Trailer sequence)
RBV641f	+	GAACACCATACTCTAATGACAACTC	for DNA sequencing
RBV2118f	+	ATCTATCAGTAGAGGCTGAGATCG	for DNA sequencing
RBV2409f	+	TTGAATCGCTATACATCCTGCTAAC	for DNA sequencing
RBV3097r	-	CGGGATATAATCTGATTATCTAG	for DNA sequencing
RBV3266f	+	AATTGCCCTTACATCTTGAGCC	for DNA sequencing
RBV3725f	+	TCTCTACACAATCCATACCCTG	for DNA sequencing
RBV3923f	+	CCATCTGGATGCCGGAGAATCCGAG	for DNA sequencing
RBV5000r	-	AATGAAAATCTTATGACTCTTGAATC	for DNA sequencing
RBV6074f	+	TCAAAGATCAAATATGGGGACTG	for DNA sequencing
RBV7082r	-	AATAAATCTCAGATTCATGAC	for DNA sequencing
RBV8190f	+	CTGAAGGGITGCTCTCTGGAGAG	for DNA sequencing
RBV9166r	-	GTTCTGGGCAACAGAAAGAAIACC	for DNA sequencing
RBV10249f	+	GATCAAGAGGTTCCCATGCAGC	for DNA sequencing
RBV11189r	-	TCTCATTGTAAGGATTGATATG	for DNA sequencing

Table 2. Pathogenicity of 1088, 1088-N4#14, 1088-N30 and CVS in adult mice after i.m. inoculation

Virus strain	Infectious dose (FFU)	No. infected ^a /No. tested	No. dead /No. sick ^b	Case-fatality rate (%)	Onset date of sick mice ^c	Survival date of dead mice ^d	No. VNA positive ^e /No. survived	No. sequelae ^f /No. resistance ^g
1088 (N0)	10 ⁶	10/10	10/10	100.0	7.0 ± 0.5	13.4 ± 2.0	–	0/0
	10 ⁵	10/10	7/10	70.0	9.2 ± 1.5	14.0 ± 2.6	3/3	3/3
	10 ⁴	8/10	8/8	100.0	12.5 ± 4.3	16.0 ± 5.1	0/2	0/0
	10 ³	8/10	5/5	100.0	18.6 ± 9.2	22.6 ± 10.0	3/5	0/0
	10 ²	1/10	0/0	–	–	–	1/10	0/0
1088-N4#14	10 ⁶	10/10	5/10	50.0	6.5 ± 0.7	15.0 ± 2.3	5/5	5/5
	10 ⁵	10/10	5/10	50.0	7.9 ± 1.5	14.8 ± 1.3	5/5	4/5
	10 ⁴	9/10	0/8	0.0	10.9 ± 2.4	–	9/10	6/8
	10 ³	10/10	2/6	33.3	14.3 ± 2.7	17, 24	8/8	3/4
	10 ²	8/10	3/4	75.0	14, 18, 18, 32	17, 22, 37	5/7	1/1
1088-N30	10 ⁶	10/10	0/10	0.0	6.6 ± 1.0	–	10/10	9/10
	10 ⁵	10/10	1/9	11.1	9.9 ± 3.1	11	9/9	5/8
	10 ⁴	10/10	3/7	42.9	9.3 ± 1.6	13, 15, 17	7/7	3/4
	10 ³	8/10	1/1	100.0	10	15	7/9	0/0
	10 ²	4/10	1/1	100.0	17	22	3/9	0/0
CVS	10 ⁶	10/10	10/10	100.0	4.7 ± 0.7	7.8 ± 1.3	–	0/0
	10 ⁵	10/10	9/9	100.0	5.8 ± 1.1	9.4 ± 2.9	1/1	0/0
	10 ⁴	10/10	4/4	100.0	5, 5, 6, 6	7, 8, 9, 9	6/6	0/0
	10 ³	6/10	0/0	0.0	–	–	6/10	0/0
	10 ²	4/10	0/0	0.0	–	–	4/10	0/0

^a total No. of dead, sick or VNA-positive mice

^b No. of mice showed neurological symptoms or body weight loss

^c ≥5 sick mice; data are represented as mean onset date ± S.D.

^d ≥5 dead mice; data are represented as mean survival date ± S.D.

^e ≥0.3 I.U./ml by RFFIT

^f No. of mice survived with paralysis or palsy

^g No. of mice survived the sickness

Table 3. Sequence differences between 1088 (N0), 1088-N4#14 and 1088-N30

Nucleotide position	Region	Amino acid position	Nucleotide (Amino acid)		
			1088 (N0)	1088-N4#14	1088-N30
17	Leader		T	T	T/C
28	Leader		G	G	G/A
1187	N gene	373	G (Glu)	G (Glu)	G/A (Glu/Lys)
1695	P gene	61	G (Gly)	A (Glu)	G (Gly)
2513	M gene	6	A (Lys)	A (Lys)	G (Lys)
3803	G gene	144	C (Pro)	C (Pro)	T (Leu)
3960	G gene	196	A (Arg)	T (Ser)	T (Ser)
11870	Trailer		A	A	G

Table 4. Potential N-glycosylation sites on the G protein of street and fixed rabies viruses

Strain	Origine	Location	Year	N-glycosylation sites (potential ^a)	GenBank Accession no.
Street viruses					
1088	Woodchuck	USA	1970s	37, 319	
BR-Pfx1	Fox	Brazil	2002	37, 319	AB362483
HN10	Human	China	2006	37, 319	EU643590
NNV-RAB-H	Human	India		37, 319	EF437215
8743THA*	Human	Thailand	1983	37, 319	EU293121
8764THA	Human	Thailand	1983	37, 319	EU293111
9147FRA	Fox	France	1990	37, 319	EU293113
9704ARG	Bat	Argentina	1997	319	EU293116
RRV ON-99-2	Raccoon	USA	1999	319	EU311738
SHBRV-18	Bat	USA		237, 319	AY705373
Fixed viruses					
CVS-11				37, 204, 319	EU352767
Pitman Moore	Vaccine			37, 204, 319	AJ871962
ERA	Vaccine			37, 247, 319	EF206707
SAD B19	Vaccine			37, 247, 319	M31046
RV-97	Vaccine			37, 247, 319	EF542830
Nishigahara	Vaccine			37, 247, 319	AB044824
RC-HL	Vaccine			37, 247, 319	AB009663
PV	Vaccine			37, 158, 247, 319	M13215
HEP-Flury	Vaccine			37, 158, 319	M32751

*passed 22 times in BSR cells

^bsequons on ectodomain

F. 健康危険情報

なし

病ワクチン皮内接種法による曝露前免疫の有効性の検討. 感染症学雑誌, 84(1), 9-13, 2010

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takashi Matsumoto, Kentaro Yamada, Kazuko Noguchi, Kantou Nakajima, Kenzo Takada, Pakamatz Khawplod, Akira Nishizono. Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus. **Microbiol Immunol.** 2010 54 (11): 673-683

2) Moazzem Hossain, Tania Bulbul, Kamruddin Ahmed, Ziauddin Ahmed, Mohammad Salimuzzaman, Mohammad Shahidul Haque, Ajmat Ali, Shohrab Hossain, Kentaro Yamada, Kazuhiko Moji, Akira Nishizono. Five year (January 2004 – December 2008) surveillance on animal bite and rabies vaccine utilization in the Infectious Disease Hospital, Dhaka, Bangladesh. **Vaccine.** (in press)

3) Takashi Matsumoto, Kamruddin Ahmed, Omala Wimalaratne, Kentaro Yamada, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, Dushantha Karunanayake, Akira Nishizono. Whole genome analysis of a human rabies virus from Sri Lanka **Arch Virol.** (in press)

4) 塩田 星児, Kamruddin Ahmed, 三舟 求真人, 西園 晃. 日本製狂犬

2. 総説

なし

3. 著書

なし

4. 学会発表

1) 2010. 9. 3 宮崎市 第47回日本ウイルス学会九州支部総会 松本昂, Kamruddin Ahmed, Narapati Dahal, Karma Rinzin, 西園晃 「ブータンにおける狂犬病の分子疫学的解析」

2) 2010. 9. 3 宮崎市 第47回日本ウイルス学会九州支部総会 山田健太郎, 野口賀津子, 松本昂, 三井孝広, アハメド・カルムディン, 西園晃 「狂犬病ウイルス街上毒のMNA細胞での連続継代による末梢感染症減弱変異」

3) 2010. 9. 9-10 Hanoi, Vietnam Emerging and Re-emerging Vector-borne and Zoonotic Viral Infectious Diseases in Southeast Asia meeting Akira Nishizono 「Development of rapid diagnosis for rabies based on the principle of immunochromatography and its utility in rabies-endemic countries」

4) 2010. 11. 8 徳島市 第58回日本ウイルス学会学術集会 山田 健太郎, 野口 賀津子, 松本 昂, 三井 孝広, アハメド カムルディン, 西園 晃 「狂犬病ウイルス街上

毒のMNA細胞での連続継代による末梢
感染性減弱変異株の樹立」

6) 2010. 11. 9 徳島市 第58回日本ウイルス学会学術集会 松本 昂, Kamuruddin Ahmed, Omala Wimalaratne, 山田 健太郎, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, 西園 晃 「スリランカにおける狂犬病ウイルスの全ゲノム配列の決定とそれに基づく分子疫学的解析」

7) 2010.12.3 仙台市 第51回日本熱帯医学会大会 松本 昂, Dushantha Karunanayake, 小林 祐司, Omala Wimalaratne, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, Kamruddin Ahmed, 西園 晃 「1999年から2009年までのスリランカにおける狂犬病の調査」

8) 2010.12.12 東京都 第14回日本ワクチン学会総会 渡辺一平、西園晃 「狂犬病ウイルス中和抗体価迅速検査キットの有用性」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許

特願2010-092461 抗ウイルス剤および抗体酵素 平成22年4月13日

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

.....

狂犬病の診断法確立に関する研究

研究分担者： 井上 智 国立感染症研究所獣医科学部 室長

研究協力者： 佐藤 豪 国立感染症研究所獣医科学部 協力研究員

研究要旨：

狂犬病ウイルス(RABV)は、ヒトを含む全ての哺乳類に感染しうる人獣共通感染症の病原体であり、主としてイヌ、キツネ、オオカミ、コヨーテ、スカンク、アライグマ等の食肉目や、食虫・食果・吸血コウモリを含む多種の翼種類(コウモリ)によって流行が維持されている。RABV は上記のような多種多様の哺乳類によって媒介され、その生存する生態系や宿主の免疫システムの相違に関わらず幅広い哺乳類に感染する事が出来る。この「種の壁」を超えたウイルス伝播や新しい宿主への順化過程でみられるウイルスゲノムの変異機序等を理解することは、新しい動物種等で見つかる系統の異なる新規ウイルス株等に対する遺伝子診断プライマーの設計や流行地域における野生動物等の宿主間でのウイルス伝播や宿主順化を考慮した分子疫学系統解析を行うために重要な科学的知見となりえる。今回、ブラジルで分離された RABV の野生株（街上毒 6 株）を分離された宿主と異なる種（CH3 マウス）に継代・順化を行って、RABV のゲノム上に誘導された遺伝子変異等について解析を行った。結果、マウスへの馴化過程の早い時期で RABV ゲノム上に塩基置換が誘導されており、特に P-M TTS ポリ A 配列上に集中して塩基置換の起こることを見出した。

A. 研究目的

狂犬病ウイルス(RABV)は、ヒトを含む全ての哺乳類に感染しうる人獣共通感染症の病原体であり、主としてイヌ、キツネ、オオカミ、

コヨーテ、スカンク、アライグマ等の食肉目や、食虫・食果・吸血コウモリを含む多種の翼種類(コウモリ)によって流行が維持されている (図 1)。本研究では RABV が新しい宿主への順化

過程でみられるウイルスゲノムの変異機序等を理解するために、ブラジルで分離されたRABVの野生株（街上毒6株）を分離された宿主と異なる種（CH3マウス）に継代・順化を行うことによって誘導されるRABVのゲノム上の遺伝子変異等について解析を行った。

B. 研究方法

ウイルスおよびマウス： ブラジルにおいて分離された食虫コウモリ株3株(MPV, MPVI, MP19)および家畜株3株(P17, P18, P19)を用いた(図2)。食虫コウモリ分離株は、マウス脳内接種を一度経過してRABVの検査が陽性となったマウス脳を冷凍保存して使用した。また、家畜分離株は感染した宿主の脳組織を冷凍保存したものを本実験に使用した。検体は10倍量のPBSで懸濁液とし、14000rpm、10分の遠心後に上清を接種用のウイルス液とした。マウスは3週齢のCH3マウスを用いた。

接種および継代方法： 脳内接種(I.C.)による継続をRABV 6株について4~11代行った。なお、MPV株およびP18株については、I.C.で継代を1回行って、筋内接種(I.M.)による継代を1~2代行った。I.C.による継代では、 $10^{^{-1.5}}$ to $10^{^{-2.1}}$ mouse intracerebral 50% lethal doses (MICLD50)/30 μ lのウイルス液を1群3匹に接種し、3週間の経過観察を行った。観察期間中に死亡したマウスの脳は、直接蛍光抗体（FITC labeled Anti-Rabies Monoclonal Globulin, FUJIREBIO）で狂犬病ウイルス抗原の陽性を確認した後に、次の継代に使用するウイルス液作製に使用した。一方、I.M.では100 μ lのウイル

ス液を後肢左側大腿部に接種して1カ月間観察を行った(図3)。

今回行ったRABV野外株の接種経路と継代数は以下のとおりである。MPV株(I.C.×10)、MPVI株(I.C.×9)、MP19株 (I.C.×11 およびI.C.×1+I.M.×2)、P17株(I.C.×10)、P18株(I.C.×5およびI.C.×1+I.M.×1)、P19株 (I.C.×4)。

マウスの取り扱いと動物実験はサンパウロ大学獣医科学部実験動物管理区域内において定められた規定に準拠して行われた。

ウイルスRNA抽出： 各継代のRABVは、ウイルス液を核酸保存用の濾紙(FTA Classic Card, Whatman)に吸収して保存を行い、必要時にQIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いてウイルスRNAの抽出を行った。

塩基配列の決定： 継代後に保存したRABV株について、ウイルスのゲノム遺伝子をRT-PCRで増幅後にダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定した。今回、*Taq* DNAポリメラーゼの増幅エラーによる塩基置換を最小にするため、SuperScriptIII One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* High Fidelity kit (Invitrogen)を用いた。

塩基置換部位の決定： RABVの野生株（街上毒6株）とこれの継代株についてゲノム配列を比較して継代によって誘導された塩基置換部位を決定した。

C. 研究結果

今回、RABVの野生株（街上毒6株）をマウ

スの脳内(I.C.)および筋肉内(I.M.)に接種して、8系統の継代株 (MPV株(I.C.)、MPVI株(I.C.)、MP19株 (I.C.)、MP19株 (I.C.+I.M.)、P17株 (I.C.)、P18株(I.C.)、P18株(I.C.+I.M.)、P19株 (I.C.)を得た。

上記、8系統の継代株について各継代におけるウイルスゲノムの塩基配列をダイレクトシーケンスによって決定したところ、ゲノム上に14か所の塩基置換が見られた(図4)。ただし、P18(I.C.)株についてはゲノム上に塩基置換が見られなかった。

ウイルスゲノム上に見られた14か所の塩基置換のうち、8か所は構造遺伝子上にあり6か所がノンコーディング領域上に見られた。また、6か所の塩基置換について各継代株で比較したところ「Electropherogram」で塩基置換前後の2塩基が「Mix population」として確認された(図5)。このことは、誘導された塩基置換は、置換した2塩基を持つゲノムの比率が継代で推移したものと考えられた。また、構造遺伝子上の塩基置換の63%が継代3代以内で見られ、ノンコーディング領域上の塩基置換は50%が1回目の継代で確認された。

構造遺伝子上の塩基置換は、P遺伝子上では見られずG遺伝子上に1か所のみが確認された。一方、ノンコーディング領域では全ての塩基置換がP遺伝子とG遺伝子のコード領域間(P-M)で見られ、うち5か所がP-M間の転写停止シグナル領域(TTS; transcriptional termination signal)のポリA配列上であった(図6)。

D. 考察

今回、ブラジルで分離されたRABVの野生株(街上毒6株)を分離された宿主と異なる種(CH3マウス)に継代・順化を行って、RABVのゲノム上に誘導される塩基置換を調べたところ、マウス継代による馴化過程の早い時期でRABVゲノム上に塩基置換が誘導され、特にノンコーディング領域であるP-M TTSポリA配列上に集中して塩基置換の起こることが明らかになった。

RABVの構造遺伝子上に8か所の塩基置換が見られたが、G遺伝子上の塩基置換を除いて遺伝子の機能に影響すると考えられる置換はなかった。しかしながら、P19株(I.C.)のG遺伝子上に見られた塩基置換(C3805T)は非同義置換であり(Pro163Leu)、低pH条件下でのウイルスの膜融合に関わる領域(第120-179残基間)(Gaudin et al., 1995)に位置している。

一方、ノンコーディング領域上に見られた6か所の塩基置換は全てP-M間に存在しており、その5/6がP-M TTSのポリA配列上に位置していた。RABVと同じ科に属する牛水疱性口炎ウイルス(VSV)のP-M TTSポリA配列上の塩基置換がM蛋白の発現に影響を与えるという報告がなされており大変興味深い(Barr et al., 1997)。

これまでに、RABVのM蛋白が細胞のアポトーシスを誘導するという報告(Kassis et al. 2004)がなされており、P-M TTSポリA配列上の塩基置換がM蛋白発現の抑制を誘導可能であれば「種の壁」を超えたウイルス伝播や新しい宿主への順化過程でみられるRABVの宿主体内動態を明らかにする実験モデルとして有益と考えられた。

E. 結論

本報告では、ブラジルで採取された 6 株の RABV を CH3 マウスに繰り返し接種して馴化し、その過程で半数の馴化株のゲノム上において、P-M TTS のポリ A 配列上に塩基置換が集中して起きていることを明らかにした。また、馴化の過程において、RABV ゲノム上の塩基置換は比較的早い時期に起こっていることが示唆された。

F. 参考文献

Barr JN, Whelan SP, Wertz GW. 1997. cis-Acting signals involved in termination of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis include the conserved AUAC and the U7 signal for polyadenylation. *J Virol.* 71(11): 8718-25.

Gaudin Y, Ruigrok RW, Brunner J. 1995. Low-pH induced conformational changes in viral fusion proteins: implications for the fusion mechanism. *J Gen Virol.* 76 (Pt 7):1541-56

Kassis R, Larrous F, Estaquier J, Bourhy H. 2004. Lyssavirus matrix protein induces apoptosis by a TRAIL-dependent mechanism involving caspase-8 activation. *J Virol.* 78(12):6543-55.

健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Go Sato, Satoshi Inoue, Fumio H. Ito, Maria L.C.R. Silva, Akio Yamada, Takuya Itou, Takeo Sakai. The rabies viral RNA genomes selectively increased from quasispecies population after serial passages of street virus in mouse. 44th Joint Working Conference on Viral Diseases, 2010、6月、札幌市、北海道

佐藤 豪, 井上 智, Fumio H. Ito, Maria LCR Silva, 伊藤 琢也, 酒井 健夫, 山田 章雄。マウスを用いた継代で見られたブラジル狂犬病ウイルスゲノムの選択。第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、11月、徳島市、徳島県

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1

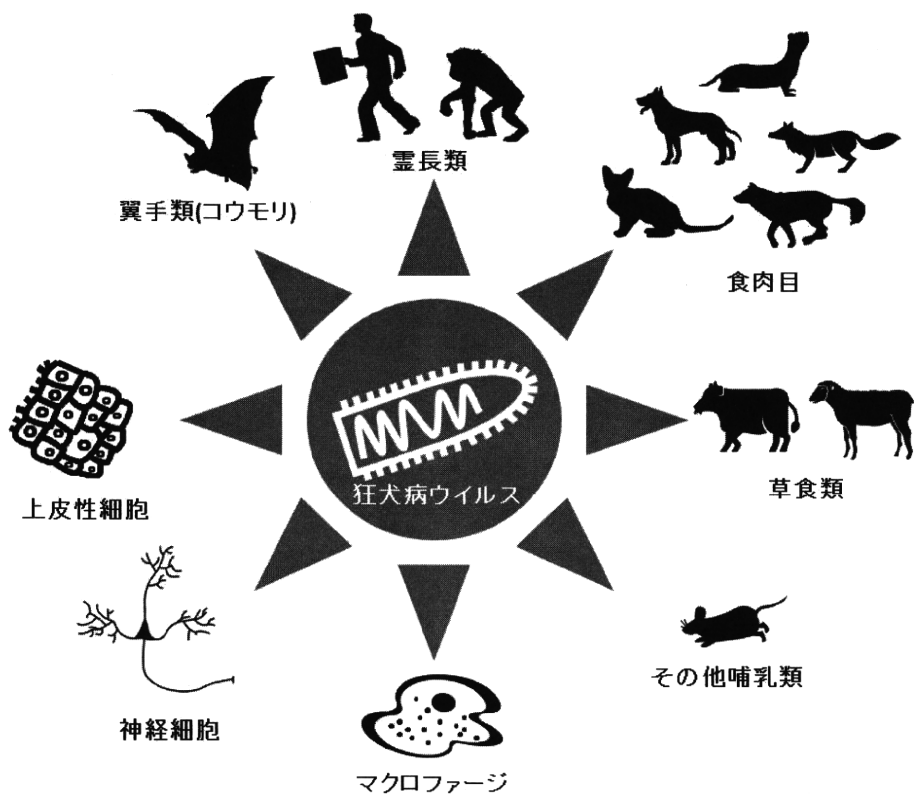


図2

材料

株名	分離宿主	分離地域
MP19	食虫コウモリ	ブラジル
MPV	食虫コウモリ	ブラジル
MPVI	食虫コウモリ	ブラジル
P17	ウシ(吸血コウモリ媒介)	ブラジル
P18	ヒツジ(吸血コウモリ媒介)	ブラジル
P19	ウシ(吸血コウモリ媒介)	ブラジル

図3

方法: マウスを用いたRABVの継代

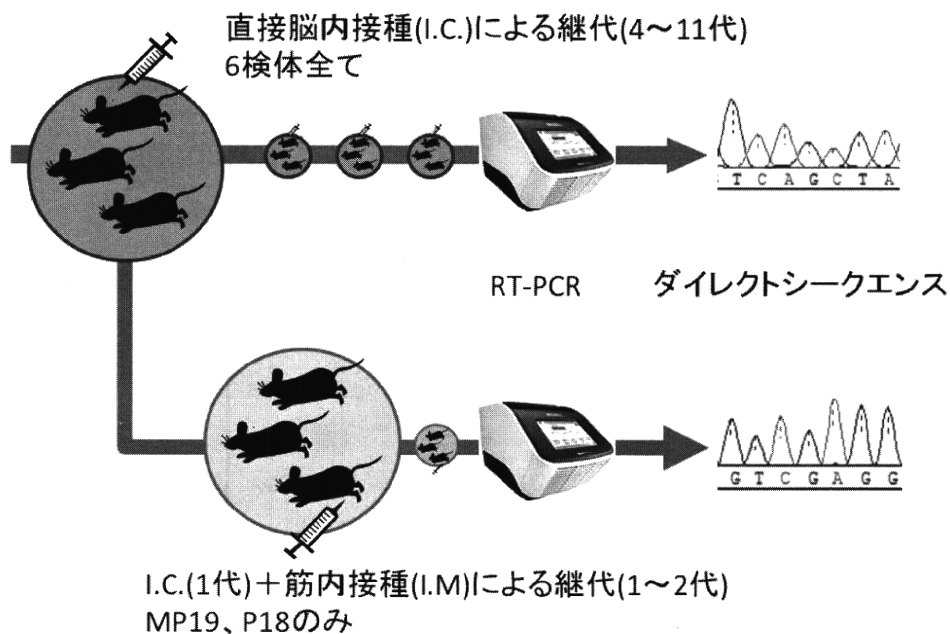


図4

継代株のゲノム上に見られた塩基配列の置換

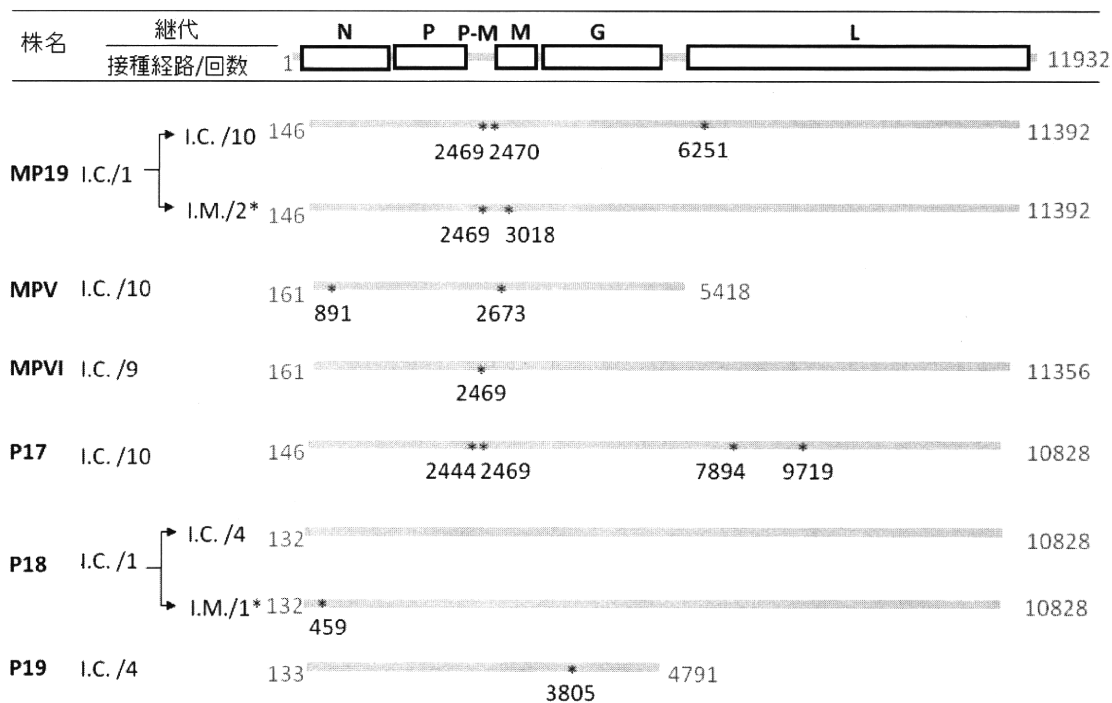
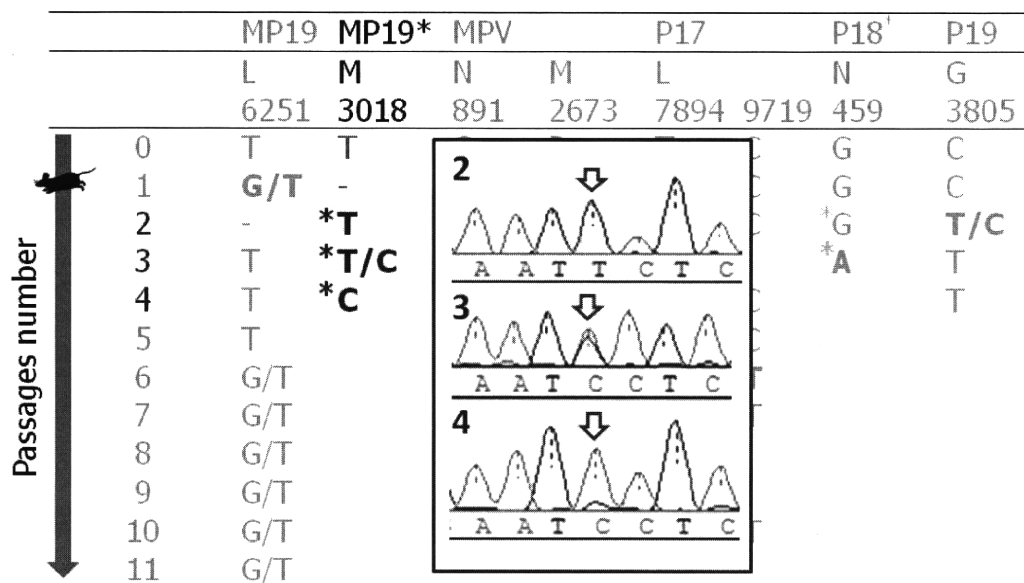


図5 Trace substitution during serial passages
MP19* M 3018 2nd-4th



--: No data

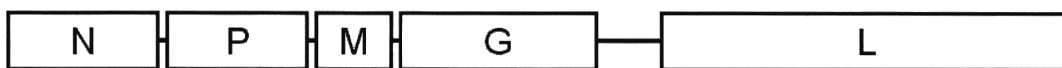
*: Passage with I.M. route.

↓: Position 3018

5

図6

P-M transcriptional termination signal (TTS)上に見られた塩基配列の置換



P-M non-coding region (2408-2495)

ccgaacctctccactcagtcctctagacaataaagtccgagatgtcctaagtcaaca **tgaaaaaaaa** caggcaacaccactgataaa
P-M TTS (2467-75)

MP19(11 I.C. passages):	TGRRAAAAA
MP19(1 I.C. + 2 I.M. passages):	TGGAAAAAA
MPVI (9 I.C. passages):	TGRAAAAAA
P17 (10 I.C. passages):	TGGAAAAAA
R: A/G	

分担者報告書

【狂犬病の疫学と神経病原性に関する研究】

狂犬病ウイルスの I 型インターフェロン抵抗性および病原性における P 蛋白質の核外輸送シグナルの重要性

研究分担者: 伊藤直人 岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究要旨: 狂犬病ウイルス P 蛋白質は、インターフェロン(IFN)・シグナル伝達経路の転写因子である STAT1 に結合し、その核内移行を阻害する。最近、本分担研究者のグループは、強毒型固定毒の西ヶ原株の P 蛋白質の STAT1 阻害能が、弱毒型の Ni-CE 株 P 蛋白質よりも強いことを報告した。一方、西ヶ原株 P 蛋白質に存在する核外輸送シグナル(NES)は、Ni-CE 株 P 蛋白質には存在しない。Ni-CE 株 P 蛋白質に NES を導入したところ、その STAT1 阻害能が復帰したことから、NES 活性により P 蛋白質-STAT1 複合体が細胞質に保持されることが示された。しかし、狂犬病ウイルスの IFN 抵抗性及び病原性における NES の重要性は不明である。そこで本研究では、NES を導入した Ni-CE 変異株、Ni-CE(NES+)株を作出し、その IFN 抵抗性及び病原性を Ni-CE 株と比較した。IFN 存在下の神経系培養細胞におけるウイルス増殖性を比較した結果、Ni-CE(NES+)株は Ni-CE 株よりも効率よく増殖することが分かった。また、Ni-CE 株が脳内接種によりマウスの全個体に非致死感染を起こしたのに対し、Ni-CE(NES+)株は 40%のマウスに致死感染を引き起こした。以上より、狂犬病ウイルス P 蛋白質上の NES は、本ウイルスの IFN 抵抗性及び病原性に関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

狂犬病ウイルス P 蛋白質は、I 型インターフェロンのシグナル伝達に関連する転写因子 ISGF3 の構成成分のひとつ、STAT1 に結合し、その核内移行を阻害する。その結果、IFN 存在下でも感染細胞は抗ウイルス状態になることができないため、効率のよいウイルス複製が起こると考えられている。

最近、本分担研究者のグループは、強毒の狂犬病ウイルス固定毒である西ヶ原株とその継代株で弱毒の Ni-CE 株について、両者の P 蛋白質

の STAT1 阻害能の比較を行った。その結果、西ヶ原株の P 蛋白質が Ni-CE 株の P 蛋白質よりも STAT1 の核内移行を効率的に阻害することを明らかにした(Ito et al., J. Virol., 2010)。

狂犬病ウイルス P 蛋白質の N 末端領域(49-58 位のアミノ酸領域)には CRM1 依存的核外輸送シグナル(NES)が存在することが知られている(Pasdeloup et al., Virology, 2005)。西ヶ原株および Ni-CE 株 P 蛋白質のアミノ酸配列の比較により、西ヶ原株 P 蛋白質にはこの NES が保存されているのに対し、Ni-CE 株 P 蛋白質では 2 つのアミノ酸変異により NES が消失していることが示された。

この事実と両株の STAT1 阻害能の違いから、P 蛋白質の NES が P 蛋白質-STAT1 複合体を細胞質に保持する役割を担っている可能性が考えられた。上記の仮説を検証する目的で、Ni-CE 株の組換え P 蛋白質へ NES を導入したところ、同蛋白質の STAT1 阻害能が復帰することが明らかとなった (Ito et al., J. Virol., 2010)。すなわち、P 蛋白質の NES が STAT1 阻害能に重要な役割を果たすことが示された。しかし、P 蛋白質上の NES がウイルスの IFN 抵抗性ならびに病原性にどのように関与しているのかについては、これまで検証されていない。そこで本研究では、NES を導入された Ni-CE 株、Ni-CE(NES+)株を遺伝子操作により作出し、その IFN 抵抗性ならびに病原性を検証した。

B. 研究方法

Ni-CE 株の遺伝子操作系 (Shimizu et al., Virus Res., 2007) を用いて、P 蛋白質上に NES を保有する Ni-CE(NES+)株を作出した。

ヒト神経芽細胞腫由来 SK-N-SH 細胞に Ni-CE 株あるいは Ni-CE(NES+)株を接種した後に、IFN- α 処理 (4000 U/ml, 30 分間) を行った。細胞を固定後、抗 STAT1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) による蛍光免疫染色を実施し、STAT1 の細胞内局在を検討した。

SK-N-SH 細胞に Ni-CE 株または Ni-CE(NES+)株を接種した後 (感染多重度=0.01)、IFN- α (500 U/ml) の存在下あるいは非存在下で細胞を培養した。接種 3 日目の培養上清中のウイルス感染価をフォーカス・アッセイにより検討した。

ddY マウス (4 週齢、メス、1 群 5 匹) に Ni-CE 株あるいは Ni-CE(NES+)株を 10^6 フォーカス形成単

位 (FFU) の用量で脳内接種した。各株感染マウスの症状ならびに生存数の推移を 14 日間観察した。

C. 研究結果

IFN- α 処理された Ni-CE 株感染細胞では明瞭な STAT1 核内移行が確認されたのに対し、Ni-CE(NES+)株では確認されなかった (図 1)。このことから、P 蛋白質への NES 導入により、STAT1 阻害能が復帰することが感染細胞レベルでも確認された。

IFN- α 非存在下の SK-N-SH 細胞において、Ni-CE 株および Ni-CE(NES+)株が同程度、増殖した (図 2)。一方、IFN- α 存在下では、Ni-CE(NES+)株の増殖性のほうが Ni-CE 株よりも約 200 倍高いことが示された。以上より、Ni-CE(NES+)株の IFN 抵抗性は Ni-CE 株よりも高いことが明らかとなった。

Ni-CE 株を脳内接種されたマウスでは、全個体が体重減少を示した後に回復した (図 3)。それに対し、Ni-CE(NES+)株を接種されたマウス 5 匹のうち、2 匹が神経症状を発症し、死亡した (致死率 40%)。このことより、Ni-CE(NES+)株の病原性が Ni-CE 株よりも高いことが示された。

D. 考察

上記の実験により、Ni-CE(NES+)株の IFN 抵抗性および病原性が Ni-CE 株よりも高いことが明らかとなった。このことは P 蛋白質上の NES が狂犬病ウイルスの IFN 抵抗性ならびに病原性に関連していることを示している。

西ヶ原株および Ni-CE 株 P 蛋白質間には、計 5 つのアミノ酸変異 (56、58、66、81 および 226 位)

が存在する。そのうち、56 および 58 位のアミノ酸を西ヶ原株由来のものに置換した Ni-CE(NES+) 株の IFN 抵抗性および病原性は、5 つのアミノ酸すべての西ヶ原株由来に置換した CE(NiP)株よりも低い(データ未掲載)。このことから、66、81 および 226 位のアミノ酸もこれらの生物性状に重要な役割を果たしていることが示唆された。

狂犬病ウイルスの P 蛋白質には NES の他に、核局在シグナル(NLS)(211-214 位および 260 位のアミノ酸領域)も存在することが知られている(Pasdeloup et al., *Virology*, 2005)。今後、西ヶ原株および Ni-CE 株 P 蛋白質間の 5 つのアミノ酸変異が P 蛋白質の核-細胞質間輸送にどのように影響を及ぼすのかについて詳細に検討し、病原性との関連性を検証する必要がある。

E. 結論

狂犬病ウイルス P 蛋白質上の NES は、同ウイルスの IFN 抵抗性および病原性に関与している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Masatani, T, Ito, N, Shimizu, K, Ito, Y, Nakagawa, K, Sawaki, Y, Koyama, H, Sugiyama, M. Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J Virol* 2010;84(8):4002-12.

2) Ito, N, Moseley, GW, Blondel, D, Shimizu, K, Rowe, CL, Ito, Y, Masatani, T, Nakagawa, K, Jans,

DA, Sugiyama, M. Role of interferon antagonist activity of rabies virus phosphoprotein in viral pathogenicity. *J. Virol.* 2010;84(13):6699-6710.

3) Masatani, T, Ito, N, Shimizu, K, Ito, Y, Nakagawa, K, Abe, M, Yamaoka, S, Sugiyama, M. Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity., *Virus Res.* 2010 (in press).

2. 学会発表

1) 伊藤直人、正谷達膳、中川敬介、山岡理子、杉山誠: 狂犬病ウイルスのインターフェロン抵抗性及び病原性における P 蛋白質核外輸送シグナルの重要性: 第 150 回日本獣医学会、帯広(2010, 9)

2) 伊藤直人、正谷達膳、中川敬介、山岡理子、安部昌子、杉山誠: 狂犬病ウイルス P 蛋白質の核外輸送シグナルはインターフェロン抵抗性及び病原性に重要である: 第 58 回日本ウイルス学会、徳島(2010, 10)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

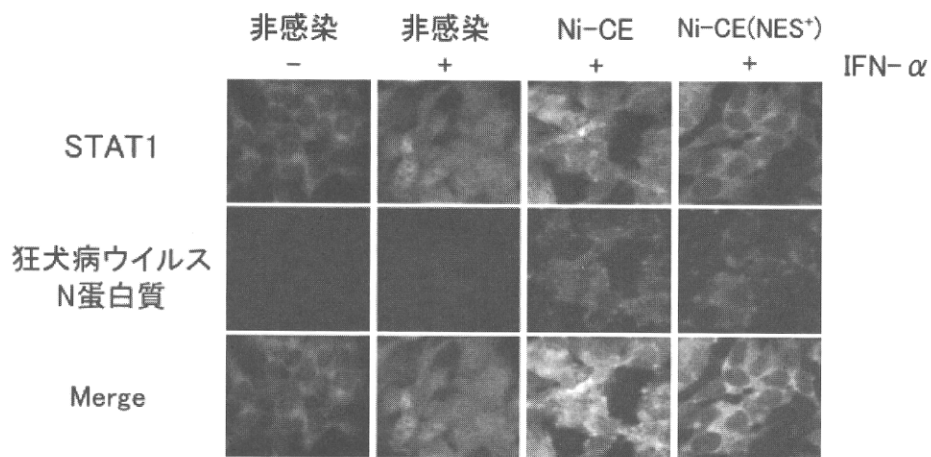


図1. Ni-CE(NES⁺)株感染細胞におけるSTAT1の細胞内局在

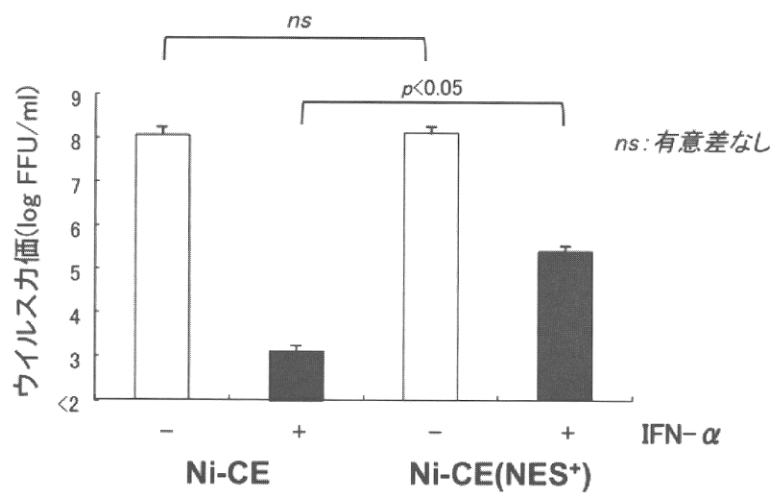


図2. IFN- α 存在下におけるウイルス増殖性の比較

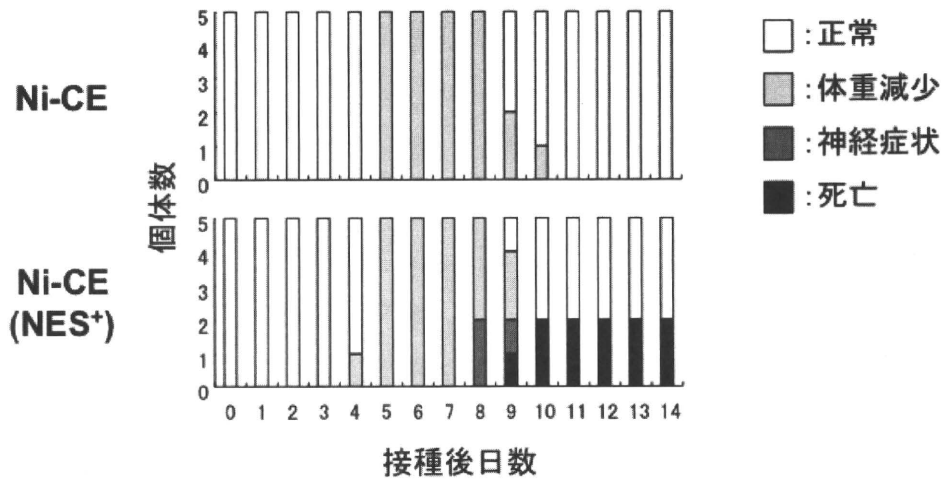


図3. 各株感染マウスの症状の推移

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表