

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008 年度

課題番号：19880003

研究課題名（和文） 狂犬病ウイルス感染による宿主免疫反応の解析

研究課題名（英文） Analysis of host immune responses against rabies virus infection

研究代表者

寸田 祐嗣（SUNDEN YUJI）

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：20451403

研究成果の概要：本研究では致死的な人獣共通感染症である狂犬病の予防・治療へ応用可能な基礎的知見を得ることを目的として、主にマウスを使った動物実験を行った。脳内または脳脊髄液中へ抗原となる物質を投与する免疫方法によって、脳内に感染した狂犬病ウイルスの増殖を阻止する効果が誘導され、高率に狂犬病発症を阻止できることが判明した。その機構として、脳内に抗体産生細胞が誘導され、脳脊髄組織中に多量のウイルス中和抗体が供給されることが示唆され、本免疫方法による狂犬病の予防、さらには治療への応用が期待される成果を得た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,070,000	0	1,070,000
2008 年度	1,040,000	312,000	1,352,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,110,000	312,000	2,422,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：①狂犬病、②ウイルス、③鞘内免疫、④中和抗体

1. 研究開始当初の背景

狂犬病はヒトを含めた全ての哺乳動物において発生する。その原因はラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される狂犬病ウイルスの感染であり、発症した場合には悲惨な神経症状を伴いほぼ 100%死亡する人獣共通感染症である。現在もなお世界中で毎年 10

万例以上の発生があると推測されている。しかし、狂犬病に対する特異的な予防法・治療法は見つかっておらず、特に神経症状を発症した患者に対する治療法の確立が早急に求められている。

狂犬病ウイルスの病原性に関しては、不明な点が多いが、狂犬病罹患脳の病理組織像を

観察すると、炎症性細胞浸潤は非常に乏しく病変は軽度であり、なぜ狂犬病ウイルスに対する免疫反応が起こらないのかは不明な点が多い。また弱毒株（マウスを殺さないウイルス株）と強毒株（マウスを殺すウイルス株）を接種したマウスを解析すると、宿主免疫反応に有意な差があることが報告されているため、狂犬病ウイルスは宿主の免疫応答を制御することによって、その病原性を発揮していることが予想される。

研究代表者が所属する研究室では、これまでに鞘内免疫法（抗原となる物質を脳内または脳脊髄液中に直接投与する免疫方法）に注目し、神経向性ウイルスに対する予防・治療に関する研究を行ってきた。その結果、皮下あるいは筋肉内に免疫した場合よりも、鞘内免疫の方が有意に高い発症阻止(予防)効果が得られることが判明した（*Microbiol Immunol*,50:823-830,2006）。

2. 研究の目的

狂犬病ウイルスが示す宿主免疫回避機構を解明すること、および鞘内免疫による発症阻止機構を解明することに取り組み、治療への応用に必要な基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスを使った感染実験により、鞘内免疫による効果がどこで発揮されるのか、脳内でウイルス増殖を阻害することが可能なのかについて、病理組織学的ならびに分子生物学的手法により検討した。

(2) マウスを使った実験により、鞘内免疫によってどのような免疫反応が活性化するのかについて、分子生物学的ならびに免疫学的解析を行った。

(3) 狂犬病ウイルスが発揮する病原性を解析するために、ウイルス遺伝子のクローニングと遺伝子発現系の構築を試みた。

4. 研究成果

(1) 鞘内免疫はマウスの脳内において RV の増殖を阻害する効果を誘導し、発症を阻止できることを証明した。

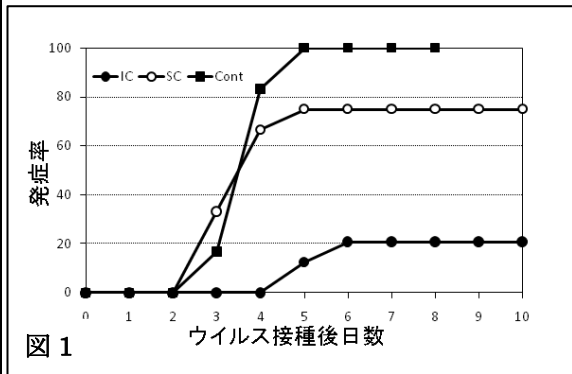
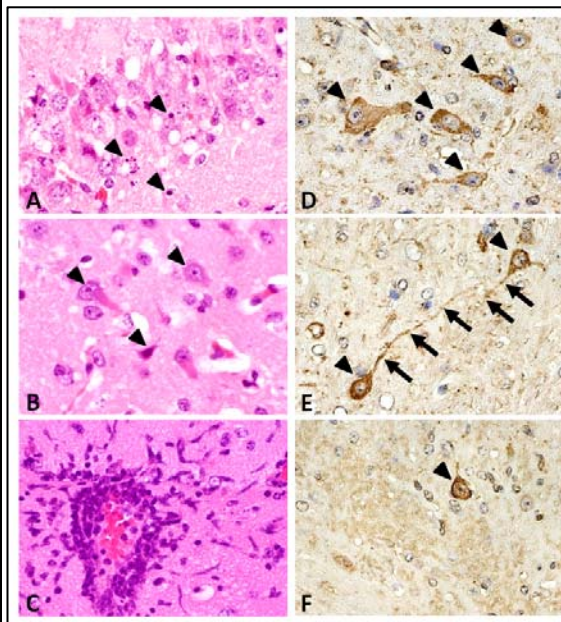


図1は鞘内免疫（IC）、皮下免疫（SC）、コントロール（Cont）の各マウスにウイルスを脳内接種した後の発症率を示したグラフである。致死量のウイルスを脳内接種したにも関わらず、鞘内免疫マウスの狂犬病発症率はわずか20%であった。



写真A~Fは組織学的解析結果を示したものである。皮下免疫およびコントロールマウスではA~Cに示すように顕著な神経細胞死を伴う非化膿性脳炎が認められた。また、D、Eに示すように多数のウイルス抗原が観察さ

れた。一方、鞘内免疫マウスの脳病変はほとんど観察されず、極めて少量のウイルス抗原 (F) が散見されるのみであった。神経細胞内にウイルスが感染していたにも関わらず、鞘内免疫したマウスの多くが狂犬病を発症しなかったことは、鞘内免疫により誘導された宿主免疫反応によって脳神経細胞内のウイルスが排除されたことを示唆しており、狂犬病の治療への応用が期待される重要な知見であった。

(2) 鞘内免疫マウスの脳脊髄組織中には多量の免疫グロブリンが誘導されており、それらは RV の中和活性を有していた。すなわち、鞘内免疫によって血液中のみならず、脳脊髄液・脳脊髄組織中にもウイルス中和抗体が誘導されることを確認することができた。さらに鞘内免疫によって、①頸部リンパ節群、脾臓のリンパ球が増加すること、②IL-4, IL-10, IFN- γ の産生が亢進すること、③脳内に抗体産生細胞が誘導されていることが判明した。

(3) 狂犬病ウイルス感染マウスの脳から RNA を抽出し、NP, P, M 遺伝子の増幅を行ったところ、各遺伝子に特異的なバンドが検出されたため、シーケンス解析と各遺伝子発現ベクターの作製を行った。N, P 遺伝子を発現ベクターに組み込み、いくつかの哺乳細胞内で各蛋白質を発現させることに成功した。しかし、それらの発現が微弱であり、検出時に非特異的な反応が強く現れたため、条件の検討が必要であると思われた。

(4) RV の神経系細胞への感染様式を解析するために、マウス脊髄背根神経節由来細胞を用いて RV 接種実験を行った結果、その他の神経向性ウイルスに比較してウイルス増殖が遅いこと、非神経細胞 (シュワン細胞) にも感染する可能性があることが判明した。

(5) 鞘内免疫による狂犬病治療への応用を期待される成果が得られたことは重要な知見であり、論文として海外学術誌へ投稿準備を進めている。RV による宿主免疫回避機構についての解析は上記した理由により、研究期間内に十分な成果を挙げることができなかったが、今後も継続して取り組んでいく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ①Hara Y, Hasebe R, Sunden Y, et al.
Propagation of swine hemagglutinating encephalomyelitis virus and pseudorabiesvirus in dorsal root ganglia cells. *J Vet Med Sci*, in press. (査読有)
- ②Hara Y, Sunden Y, Ochiai K Umemura T.
In vitro propagation of rabies virus in mouse dorsal root ganglia cells. *Jpn J Vet Res*, 56(4): 181-188, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ①寸田 祐嗣他、第 8 回狂犬病研究会、東京都新宿区、国立感染症研究所、平成 21 年 3 月 6 日、「鞘内免疫法による狂犬病の予防・治療に関する基礎的研究」
- ②寸田 祐嗣他、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山県岡山市、岡山コンベンションセンター、平成 20 年 10 月 26 日～28 日、「鞘内免疫法による狂犬病治療効果の基礎検討」
- ③寸田 祐嗣他、第 146 回日本獣医学術集会、宮崎県宮崎市、宮崎市フェニックス・シーガイア・リゾート、ワールドコンベンションセンター・サミット、平成 20 年 9 月 24

日～26日、「H5N1型インフルエンザウイルスに感染した野生オオハクチョウの病理学的検索」

- ④寸田 祐嗣他、第145回日本獣医学術集会、神奈川県相模原市、麻生大学、平成20年3月28日～30日、「鞘内免疫法による狂犬病治療効果の基礎検討」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寸田 祐嗣 (SUNDEN YUJI)
北海道大学・大学院獣医学研究科・助教
研究者番号：20451403

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者