

狂犬病ウイルスゲノムの分節化

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

日高 侑也

2018

目次

第1章 序論	1
第2章 分節型 rRABV の作出	7
2.1 はじめに	8
2.2 材料および方法	9
2.2.1 培養細胞	9
2.2.2 プラスミド構築	9
2.2.3 非分節型および分節型 rRABV の作出	10
2.2.4 分節型 rRABV の vRNA 分離	11
2.2.5 PCR および RT-PCR	11
2.3 成績	15
2.3.1 レポーター蛍光タンパク質の検出	15
2.3.2 分節型 rRABV の vRNA の検出	15
2.3.3 分節型 rRABV の作出における L 発現プラスミドの影響	15
2.4 考察	20

2. 5	小括	22
第3章	分節型 rRABV の VP 性状の解析	24
3. 1	はじめに	25
3. 2	材料および方法	26
3. 2. 1	細胞培養	26
3. 2. 2	VP の精製	26
3. 2. 3	電子顕微鏡観察	27
3. 2. 4	非分節型および分節型 rRABV の vRNA 分離	27
3. 2. 5	定量 RT-PCR	28
3. 3	成績	30
3. 3. 1	分節型 rRABV 接種細胞の観察	30
3. 3. 2	VP の観察	30
3. 3. 3	vRNA の相対量解析	30
3. 4	考察	35
3. 5	小括	37
第4章	分節型 rRABV の外来遺伝子発現能および増殖動態の解析	39

4.1	はじめに	40
4.2	材料および方法	41
4.2.1	細胞培養	41
4.2.2	分節型 rRABV の継代培養	41
4.2.3	分節型 rRABV の vRNA 分離	41
4.2.4	RT-PCR	42
4.2.5	免疫組織化学的検索	42
4.2.6	フォーカスアッセイ	43
4.2.7	ウイルス増殖効率	44
4.3	成績	46
4.3.1	外来遺伝子発現の安定性	46
4.3.2	相同組換えの確認	46
4.3.3	ウイルスタンパク質の検出	47
4.3.4	ウイルス増殖効率	47
4.4	考察	54
4.5	小括	57
	第5章 総括	59

謝辞 67

引用文献 68

第 1 章

序論

狂犬病は主に罹患動物による咬傷を介して感染し、発症すると特徴的な神経症状を示して死亡する致死性感染症である。その歴史は古く、紀元前 2300 年頃の法律であるエシュンナ法典に狂犬病に関する記述があり、紀元前 450 年頃には科学的な記録が残されている(Baer, 2007; 高山, 2000)。狂犬病は、日本、英国、スカンジナビア半島の国々など一部の地域を除いて、全世界で発生しており、年間の死亡者数推計は約 60,000 人(アジア地域: 約 36,000 人、アフリカ地域: 約 22,000 人)、年間の暴露後ワクチン接種者推計は約 2,000 万人に上る(Rupprecht et al., 2018; World Health Organization, 2018)。

日本では狂犬病の流行および蔓延防止対策として、1950 年に狂犬病予防法が制定され、それに基づく飼育犬の登録および予防接種の義務化、また野犬や飼い主不明犬の駆除および輸入検疫の厳格化がなされてきた。その結果、1957 年に発生した猫の症例を最後に、国内の飼育犬および家畜における狂犬病発生は報告されていない。しかしながら、近隣諸国には狂犬病が存在し、十分な対策を講じなければ日本国内で狂犬病が再流行する危険性がある。また、人では輸入感染事例が報告されており、1970 年にネパールでの犬による咬傷が 1 例、2006 年にフィリピンでの犬による咬傷が 2 例発生している(Yamamoto et al., 2008; 菅沼他, 2013; 高山, 2000)。このように、狂犬病は未だ公衆衛生上重要な人獣共通感染症である。

狂犬病の病原体である狂犬病ウイルス(RABV)は、モノネガウイルス目、ラブドウイルス科、リッサウイルス属に分類され、非分節型マイナス鎖(NNS)-RNAをゲノムにもつ。約 12,000 ヌクレオチド(nt)からなるウイルスゲノムRNA(vRNA)は、3'リーダー配列から始まり、vRNA の保護に関わる核タンパク質(Nucleoprotein; N)、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RdRp)の小サブユニットであるリン酸化タンパク質(Phosphoprotein; P)、ウイルス粒子(VP)の構造を内側から支えるマトリックスタンパク質(Matrix protein; M)、宿主細胞への吸着、侵入に関わる糖タンパク質(Glycoprotein; G)、および RdRp の大サブユニットであるラージタンパク質(Large protein; L)の 5 つの構造タンパク質遺伝子が、類似した転写開始および終了シグナルと共にコードされ、5'トレーター配列で終わる(Wunner, 2007)。N によって vRNA はカプシド形成され、P および L と共にリボ核タンパク質(RNP)複合体を形成する。RNP 複合体はさらに M および 3 量体 G を含む宿主細胞由来の脂質 2 重膜で構成されるエンベロープに覆われることによって感染性の VP が形成される(Gaudin et al., 1992; Mebatsion et al., 1999; Whitt et al., 1991)。VP サイズは直径 75 nm - 80 nm、長さ約 180 nm の弾丸状の形態をしている(Hummeler et al., 1967)。

遺伝子改変が可能なクローン化ゲノム DNA または cDNA から感染性ウイルスを作出する技術であるリバーシジェネティクス(RG)法が開発され、1994 年に

は Schnell らが NNS-RNA ウイルスとして初めて RABV の RG 法の樹立に成功して以来(Schnell et al., 1994)、様々な NNS-RNA ウイルスの RG 法が開発、改良され(Collins et al., 1995; Garcin et al., 1995; Kato et al., 1996; Lawson et al., 1995; Radecke et al., 1995; Whelan et al., 1995; 加藤, 1997)、ウイルス遺伝子の機能解析を含む基礎研究(Ito et al., 2001; Mebatsion et al., 1999; Okada et al., 2016; Yamaoka et al., 2017)からウイルスベクターを用いた遺伝子治療を含むウイルス療法への応用研究(Biacchesi et al., 2004; Bitzer et al., 2003; Fielding, 2005; Hasan et al., 1997; Nakaya et al., 2001; Russell, 2002; Schnell et al., 1996; Yu et al., 1997; 飯田他, 2003)が行われている。NNS-RNA ウイルスにおける RG 法には一般的に vRNA-cDNA プラスミドと共に vRNA の複製および mRNA の転写に関わる N、P および L 発現プラスミドをヘルパープラスミドとして至適な量比で遺伝子導入する必要がある(Kato et al., 1996; 飯田他, 2003; 加藤, 1997)。vRNA-cDNA プラスミドから発現した vRNA-cRNA はヘルパープラスミドから発現した N、P および L によって vRNA が複製され、複製された vRNA から構造タンパク質が転写、翻訳されることによって子孫 VP が産生される。

国際ウイルス分類委員会(ICTV)において、ラブドウイルス科にはこれまでに未分類を含めて 18 属 131 種が登録されている。ラブドウイルス科のウイルスは一般的に NNS-RNA をゲノムにもつが、例外的に分節型マイナス鎖(SNS)-RNA

をゲノムにもつラン壊疽斑紋ウイルス(OFV)の存在が報告されている(Kondo et al., 2006)。また、水胞性口炎ウイルス(VSV)および RABV において遺伝子欠損ウイルスが互いに不足するウイルスタンパク質を補完し合い増殖が維持されることが報告されている(Klingen et al., 2008; Muik et al., 2012)。さらに、ラブドウイルス科と類似した vRNA 構造をもつパラミクソウイルス科の麻疹ウイルス(MeV)およびニューカッスル病ウイルス(NDV)において vRNA の分節化が可能であることが報告されている(Gao et al., 2008; Takeda et al., 2006)。これらの報告は RABV においても RG 法を用いて vRNA の分節化が可能であることを示唆している。

そこで本研究では、RABV の子孫ウイルス産生メカニズムの解明および新たなウイルスベクター開発への展開のために分節化 vRNA を有した組換え RABV(rRABV)を作出し、vRNA の分節化に伴う RABV 性状の変化を明らかにすることを目的として研究を行った。第 2 章では、分節型 rRABV の vRNA 構造を設計し、RG 法によって分節型 rRABV の作出を試みた。第 3 章では、作出した分節型 rRABV の VP 形成の確認および vRNA の分節化に伴う VP 性状の変化を明らかにするために、電子顕微鏡観察および vRNA の相対定量解析を行った。第 4 章では、分節型 rRABV の外来遺伝子であるレポーター蛍光タンパク質遺伝子の安定性および vRNA の分節化に伴う増殖動態の変化を明らかにするために、

継代培養を行い、フォーカスアッセイを行った。

第2章

分節型 rRABV の作出

2.1 はじめに

RABV は約 12,000 nt からなる NNS-RNA をゲノムにもつ。分節型 rRABV を作出する場合、vRNA の分節化に伴って vRNA の nt 数は減少するため、vRNA の複製速度が上昇し、結果としてウイルス増殖効率が上昇することが期待される。また、作出した rRABV をウイルスベクターとして用いるためには外来遺伝子を搭載し、安定的に発現させる必要があるが、vRNA の nt 数には限界があるため、vRNA を分節化することによって、新たに搭載できる外来遺伝子数および外来遺伝子の nt 数の増加が可能であることが期待される。さらに、RG 法を用いた rRABV の作出には全長の vRNA-cDNA プラスミドを用いるため、vRNA の分節化に伴って cDNA プラスミドの nt 数が減少することによって、クローニングによるプラスミド構築効率およびコンピテントセルである大腸菌への形質転換効率が上昇することが期待できる。以上のように vRNA の分節化によって多くの利点が得られることが期待される。

そこで本章では、NNS-RNA をゲノムにもつ RABV において vRNA の分節化が可能であるかを検討するために、分節型 rRABV の vRNA 構造を設計し、RG 法を用いて分節型 rRABV の作出を試みた。

2.2 材料および方法

2.2.1 培養細胞

培養細胞はシリアンハムスター胎児腎由来細胞株である BHK-21 細胞を用いた。BHK-21 細胞は 10 % Tryptose phosphate broth (TPB; Difco, Detroit, MI)、5 % ウシ胎児血清 (FBS; Japan Bio Serum, Tokyo, Japan) および GlutaMAX™-I (Invitrogen, Carlsbad, CA) 添加 Eagle's MEM (Nissui, Tokyo Japan) を用いて 37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。培養細胞は CELLBANKER® 1 Plus (ZENOAQ, Fukushima Japan) を用いて -80 °C で凍結保存した。

2.2.2 プラスミド構築

分節型 rRABV の vRNA 構造は固定毒 HEP-Flury 株 (Inoue et al., 2003a; Genbank accession no. AB085828) の vRNA 配列を基礎とし、N-P-M-G 遺伝子領域をコードする S1、そして L 遺伝子領域をコードする S2 に分節した。S1 および S2 発現を判別するためのレポーター蛍光タンパク質遺伝子として DsRed 遺伝子を S1 における G 遺伝子領域下流、eGFP 遺伝子を S2 における L 遺伝子領域上流に搭載した。また、新たな転写ユニットを S1 における N-P および G-DsRed、そして S2 における eGFP-L 遺伝子間に搭載した。S1 および S2 は感染細胞内における vRNA

複製および子孫 VP へのパッケージングのために 3'リーダー配列および 5'トリー
ー配列を搭載した(Finke and Conzelmann, 1997)。S1 および S2 cRNA 発現プ
ラスミドをそれぞれ pH-S1 および pH-S2 プラスミドとした。非分節型および分
節型 rRABV の vRNA 構造の模式図を図 2-1 に示す。プラスミドは In-Fusion[®] HD
Cloning Kit (Clontech, Palo Alto, CA)を用いて構築し、*E. coli* HST08 Premium
Competent Cells (Takara Bio, Shiga, Japan)に形質転換し、PureYield[™] Plasmid
Midiprep System (Promega, Madison, WI)を用いて精製した。pH-S1 および pH-S2
プラスミド構築に用いたプライマーを表 2-1 に示す。

2.2.3 非分節型および分節型 rRABV の作出

実験対照とする非分節型 rRABV は既存の方法によって作出した(Inoue et al.,
2003a)。すなわち、非分節型 rRABV の vRNA-cDNA プラスミドである pHEP5.1-
2 プラスミド(2.00 μ g)と共にヘルパープラスミドとして N 発現 pH-N プラスミド
(0.50 μ g)、P 発現 pH-P プラスミド(0.25 μ g)、G 発現 pH-G プラスミド(0.15 μ g)お
よび L 発現 pH-L プラスミド(0.10 μ g)を用いた。分節型 rRABV 作出には S1-cDNA
プラスミドである pH-S1 プラスミド(1.00 μ g)および S2-cDNA プラスミドである
pH-S2 プラスミド(1.00 μ g)と共にヘルパープラスミドとして N 発現 pH-N プラス
ミド(0.50 μ g)、P 発現 pH-P プラスミド(0.25 μ g)および G 発現 pH-G プラスミド

(0.15 µg)を用いた。BHK-21 細胞を 24 well 細胞培養用プレートに 1.0×10^5 個/well で播種し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。播種 2 日後に TransIT-LT1 (Mirus, Madison, WI)および Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium (Gibco, Grand island, NY) を用いて上述のプラスミドの遺伝子導入を行った。遺伝子導入 6 日後に培養上清を回収し、新たに 24 well 細胞培養用プレートに播種した BHK-21 細胞に接種し 37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。接種 6 日後に蛍光顕微鏡 (IX71, Olympus, Tokyo, Japan)を用いて、レポーター蛍光タンパク質の発現を観察した。

2.2.4 分節型 rRABV の vRNA 分離

分節型 rRABV の vRNA は接種 5 日後の BHK-21 細胞の培養上清から QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて分離し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega)を用いて DNase 処理した。

2.2.5 PCR および RT-PCR

分離した分節型 rRABV の vRNA は Blend Taq -Plus- (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて PCR を行い、PrimeScript[™] One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて RT-PCR を行った。PCR および RT-PCR に用いたプライマーを表 2-2 に示す。

表 2-1 pH-S1 および pH-S2 プラスミド構築に用いたプライマー

プライマー名	センス	領域	配列 (5'→3')
S1F FW	+	<i>L</i> 5'UTR & <i>DsRed</i>	<u>GAGACCCATATCAAG</u> ATGGCCTCCTCCGAGGAC
S1F RV	-	<i>L</i> 3'UTR & <i>DsRed</i>	TCATTAATGTCCGGC <u>CTACAGGAACAGGTGGT</u> G
S1V FW	+	<i>L</i> 3'UTR	<u>GCCGGACATTAATGAAAGCCTGTAC</u>
S1V RV	-	<i>L</i> 5'UTR	<u>CTTGATATGGGTCTCGAGATGAGAA</u>
S2F FW	+	<i>N</i> 5'UTR & <i>eGFP</i>	<u>TGTAACACCCCTACA</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAG
S2F RV	-	<i>G</i> 3'UTR & <i>eGFP</i>	AAGGATGACCGGCCT <u>TTACTTATACAGCTCG</u>
S2V FW	+	<i>G</i> 3'UTR	<u>AGGCCGGTCATCCTTT</u> TGACACCTC
S2V RV	-	<i>N</i> 5'UTR	<u>TGTAGGGGTGTTACATTTT</u> TGCTTTG

配列の下線部領域は重複領域を示す。

表 2-2 PCR および RT-PCR に用いたプライマー

プライマー名	センス	位置*	領域	配列(5'→3')
PF	+	1826-1845	<i>P</i> gene	GAATGAGGGAGAGGACCCCA
PR	-	2010-2029	<i>P</i> gene	CGGCCAGTAGTTTGGGTTGA
LF	+	11203-11222	<i>L</i> gene	ATCTACCGCTTTAGGCGACG
LR	-	11326-11345	<i>L</i> gene	TGAACACTGGGGTGTCATCG

* GenBank accession no. AB085828

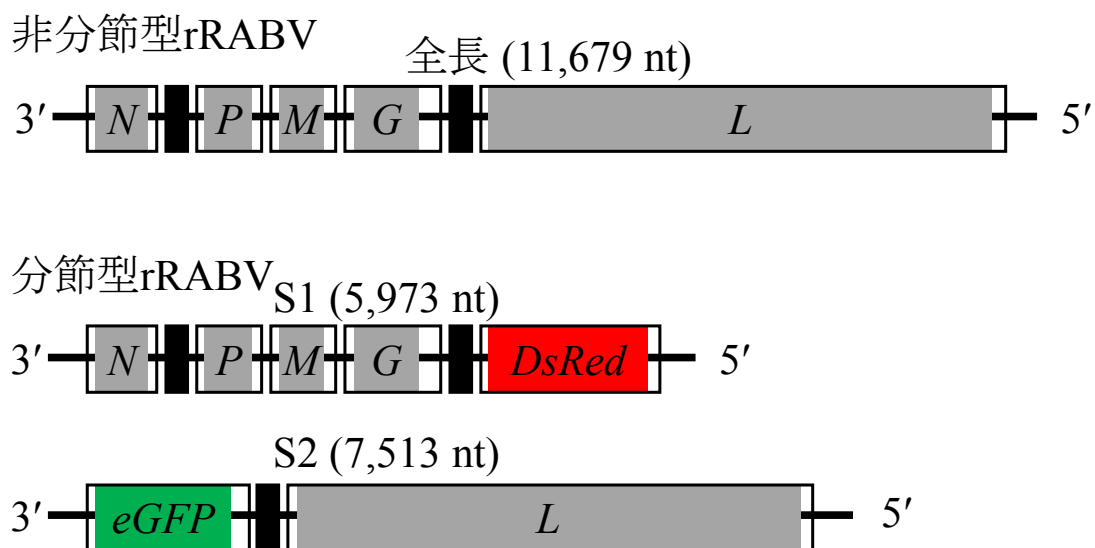


図 2-1 vRNA 構造の模式図

非分節型 rRABV の vRNA は 3'リーダー領域から始まり、N-P-M-G-L 遺伝子をコードし、5'トレーラー領域に終わる。分節型 rRABV の vRNA である S1 は N-P-M-G 遺伝子領域をコードし、S2 は L 遺伝子領域をコードする。レポーター蛍光タンパク質遺伝子として DsRed 遺伝子を S1 における G 遺伝子領域下流、eGFP 遺伝子を S2 における L 遺伝子領域上流に搭載している。また、新たな転写ユニットを S1 における N-P および G-DsRed、S2 における eGFP-L 遺伝子間に搭載し、■で示す。S1 および S2 は感染細胞内における vRNA 複製および子孫 VP へのパッケージングのために 3'リーダー配列および 5'トレーラー配列を搭載している。

2.3 成績

2.3.1 レポーター蛍光タンパク質の検出

分節型 rRABV の作出を確認するために遺伝子導入細胞の培養上清を回収し、新たに播種した BHK-21 細胞に接種した。その結果、接種細胞において S1 に搭載した DsRed および S2 に搭載した eGFP のレポーター蛍光タンパク質発現が観察された(図 2-2)。また、接種細胞には DsRed または eGFP のみ発現している細胞と DsRed および eGFP の両方を発現している細胞が観察された。

2.3.2 分節型 rRABV の vRNA の検出

作出した分節型 rRABV の接種細胞におけるレポーター蛍光タンパク質発現がプラスミド由来ではなく、ウイルス増殖に伴う発現であることを確認するために、vRNA の検出を行った。その結果、DNase 処理の有無に関わらず PCR の増幅産物は確認されなかったが、RT-PCR の増幅産物が確認された(図 2-3)。このことから分節型 rRABV の vRNA はプラスミドの遺伝子導入に伴う発現ではなく、ウイルス増殖に伴う発現であることが確認された。

2.3.3 分節型 rRABV の作出における L 発現プラスミドの影響

分節型 rRABV の作出条件を確認するために、ヘルパープラスミドの有無によるレポーター蛍光タンパク質発現を観察した。その結果、分節型 rRABV は L 発現 pH-L プラスミド無添加の条件下において S2 に搭載した eGFP が発現しており、分節型 rRABV の作出には L 発現 pH-L プラスミドの遺伝子導入を必要としないことが確認された(図 2-4)。

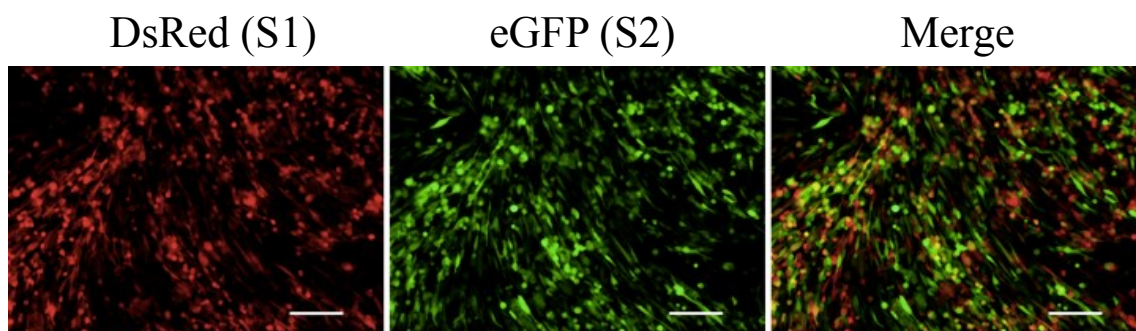


図 2-2 分節型 rRABV 由来レポーター蛍光タンパク質の発現
遺伝子導入細胞の培養上清を接種した BHK-21 細胞(接種 6 日後)。スケールバー
は 200 μ m を示す。

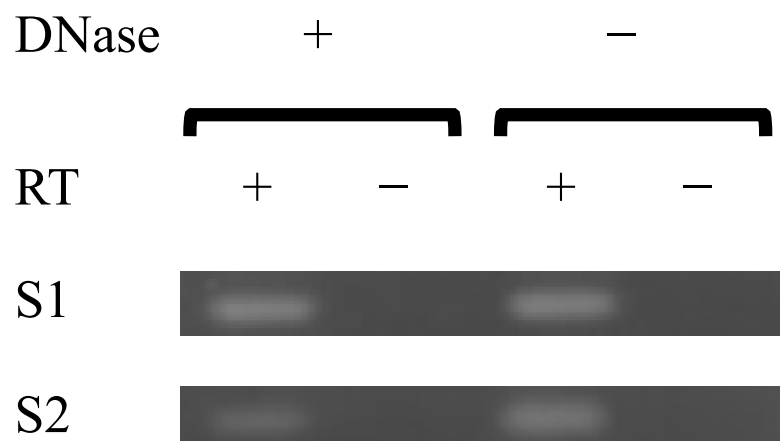


図 2-3 分節型 rRABV の vRNA の検出

作出した分節型 rRABV 接種 BHK-21 細胞の培養上清から vRNA を分離し、DNase 処理後、S1 の P 遺伝子領域および S2 の L 遺伝子領域を標的として PCR および RT-PCR を行った。

pH-L

+

-

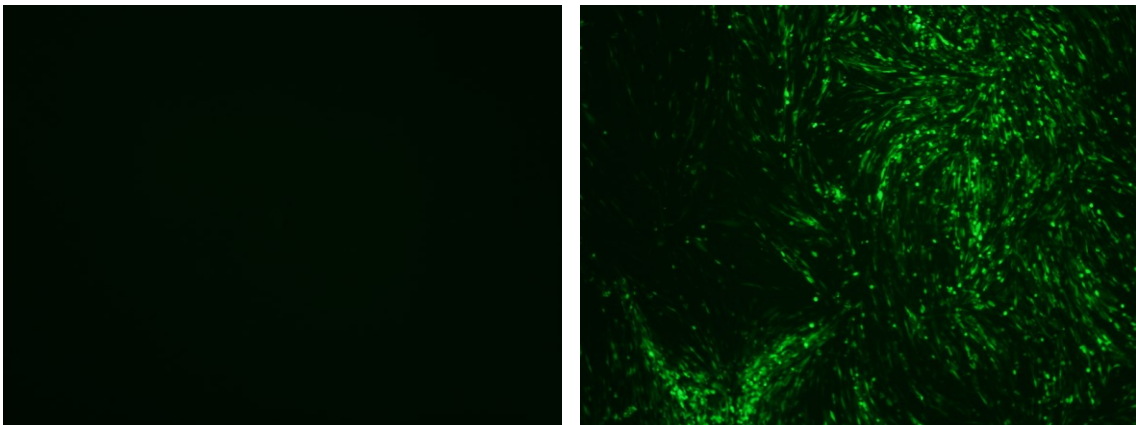


図 2-4 分節型 rRABV の作出における L 発現プラスミドの影響
遺伝子導入細胞の培養上清を接種した BHK-21 細胞(接種 5 日後)。

+ : pH-S1(1.00 μ g)、pH-S2(1.00 μ g)、pH-N(0.50 μ g)、pH-P(0.25 μ g)、pH-G(0.15 μ g)、
pH-L(0.10 μ g)

- : pH-S1(1.00 μ g)、pH-S2(1.00 μ g)、pH-N(0.50 μ g)、pH-P(0.25 μ g)、pH-G(0.15 μ g)

2.4 考察

NNS-RNA ウイルスにおける RG 法を用いた組換えウイルスの作出には一般的に vRNA-cDNA プラスミドと共に vRNA の複製および mRNA の転写に関わるウイルスタンパク質である N、P および L 発現プラスミドの遺伝子導入が必要となる。しかしながら、本研究によって確立した分節型 rRABV の作出には L 発現プラスミドの遺伝子導入を必要としなかった。本研究において vRNA-cDNA プラスミドおよびウイルスタンパク質発現プラスミドにはサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター駆動性プラスミドを使用しており、さらに vRNA の効率的な複製に重要となる正確な末端配列形成のために CMV プロモーターと 3'リーダー配列間に RNA 自己切断活性を有するハンマーヘッド型リボザイム(HmRz)配列を搭載している。しかしながら、HmRz の RNA 自己切断活性は完全ではなく、CMV プロモーターの mRNA 発現活性が高いために、vRNA の分節化に伴って CMV プロモーターと L 遺伝子領域が近接したことで S2-cDNA プラスミドである pH-S2 プラスミドから L が発現し、分節型 rRABV の作出に適した量の L が供給されたと推察される。

本章では、vRNA-cDNA プラスミドと共にヘルパープラスミドを細胞に遺伝子導入することにより分節型 rRABV を作出する RG 法を確立した。また、分節型

rRABV 接種細胞の培養上清から vRNA が検出されたことから、S1 または S2、
もしくは S1 および S2 の両方をパッケージングした VP が放出されていること
が示唆された。

2.5 小括

分節型 rRABV の vRNA 構造を設計し、RG 法を用いて分節型 rRABV の作出を試みた。

分節型 rRABV の vRNA 配列は固定毒株 HEP-Flury 株の vRNA 配列を基礎とし、N-P-M-G 遺伝子領域をコードする S1、そして L 遺伝子領域をコードする S2 に分節した。S1 および S2 発現を判別するためのレポーター遺伝子として DsRed 遺伝子を S1 の G 遺伝子領域下流、eGFP 遺伝子を S2 の L 遺伝子領域上流に挿入した。S1 および S2 は感染細胞内における vRNA の複製および VP へのパッケージングのために 3'リーダー配列および 5'トレーラー配列を搭載した。S1-cDNA プラスミド(pH-S1)および S2-cDNA プラスミド(pH-S2)をヘルパープラスミドである N、P および G 発現プラスミドと共に BHK-21 細胞に遺伝子導入することによって分節型 rRABV の作出を行った。

一般的に RG 法による rRABV の作出には vRNA-cDNA プラスミドと共に vRNA の複製および mRNA の転写に関わる N、P および L 発現プラスミドの遺伝子導入が必要とされているが、分節型 rRABV の作出には L 発現プラスミドの遺伝子導入を必要としなかった。本研究において用いた CMV プロモーターの mRNA 発現活性が高いために、vRNA の分節化に伴って pH-S2 から分節型 rRABV

の作出に適した量の L が供給されたと推測される。

また、作出した分節型 rRABV の接種細胞におけるレポーター蛍光タンパク質の発現が確認され、培養上清において vRNA が検出されたことから、VP が放出されていることが示唆された。

第3章

分節型 rRABV の VP 性状の解析

3.1 はじめに

第2章において、作出した分節型 rRABV の接種細胞の培養上清に VP が放出されていることが示唆された。RABV と同様にラブドウイルス科に分類される VSV では vRNA の nt 数の変化に伴って VP の長さが増加することが報告されており (Schnell et al., 1996)、例外的に SNS-vRNA をゲノムにもつ OFV では弾丸状を呈する小型の VP が存在することが報告されている (Kondo et al., 2006)。そのため、分節型 rRABV の VP サイズは非分節型 rRABV と比較して小型化していることが想定される。しかしながら、ラブドウイルス科と類似した vRNA 構造をもち、実験的に vRNA の分節化が可能であることが報告されているパラミクソウイルス科のウイルスでは複数の vRNA をパッケージングした VP が存在し (Dahlberg and Shimon, 1969; Granoff, 1959; Hosaka et al., 1966; Rager et al., 2002)、パッケージングされた vRNA の量に相関して VP サイズが大型化することが報告されている (Hosaka et al., 1966)。そこで本章では、分節型 rRABV の VP 形成の確認および vRNA の分節化に伴う VP 性状の変化を明らかにするために、電子顕微鏡観察および vRNA の相対定量解析を行った。

3.2 材料および方法

3.2.1 細胞培養

培養細胞はシリアンハムスター胎児腎由来細胞株である BHK-21 細胞を用いた。BHK-21 細胞は 10% TPB (Difco)、5% FBS (Japan Bio Serum) および GlutaMAX™-I (Invitrogen) 添加 Eagle's MEM (Nissui) を用いて 37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。培養細胞は CELLBANKER® 1 Plus (ZENOAQ) を用いて -80 °C で凍結保存した。

3.2.2 VP の精製

3 継代培養後の非分節型および 20 継代培養後の分節型 rRABV 接種細胞の培養上清をそれぞれ接種 5 日後および 9 日後に回収し、1,500 × g で 20 分間遠心を行った。VP 精製には Optiprep™ (Axis-shield, Oslo, Norway) のイオジキサノール溶液を用いて密度勾配遠心分離を行った。超遠心用チューブ Ultra-Clear™ Centrifuge tubes (Beckman Coulter, Brea, CA) に作製した 12 % (w/v, 4ml) および 50 % (w/v, 1ml) のイオジキサノール溶液の不連続勾配溶液に遠心分離を行った培養上清を重層した。SW40Ti Rotor (Beckman Coulter) および Optima™ LE-80K Ultracentrifuge (Beckman Coulter) を用いて 4 °C、120,000 × g の条件下で 2 時間遠心分離を行った

後、ウイルスバンドを回収した。

3.2.3 電子顕微鏡観察

18 継代培養後の分節型 rRABV の接種細胞における微細構造の観察のために 10 % 中性緩衝ホルマリンで固定した接種 9 日後の感染細胞を 1 % 四酸化オスミウムで固定後、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片は酢酸ウラニルとクエン酸鉛を用いて染色後、電子顕微鏡観察を行った。

密度勾配遠心分離によって精製した非分節型および分節型 rRABV は 2 % グルタルアルデヒド(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, WI)を用いて固定後、2 % 酢酸ウラニル(Cerac Incorporated, Milwaukee, WI)を用いてネガティブ染色を施した。VP 観察は花市電子顕微鏡技術研究所(Aichi, Japan)の H-7600 transmission electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan)を用いて行った。

3.2.4 非分節型および分節型 rRABV の vRNA 分離

精製した非分節型および分節型 rRABV を感染多重度(MOI)0.01 で細胞に接種し、37℃、5% CO₂ 条件下で培養した。接種 1 日-8 日後の接種細胞の培養上清から QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を用いて vRNA を分離した。

3.2.5 定量 RT-PCR

分離した vRNA は ReverTra Ace[®] (TOYOBO)を用いて 3'リーダー配列領域から cDNA 合成した。定量 RT-PCR は SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNase H Plus; Takara Bio)および Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II (Takara Bio)を用いて測定した。定量 RT-PCR に用いたプライマーを表 3-1 に示す。

表 3-1 定量 PCR に用いたプライマー

プライマー名	センス	位置*	領域	配列(5'→3')
RT	+	28-50	3' leader	GTATACAGCGTCATTTGCAAAGC
PF	+	1826-1845	<i>P</i> gene	GAATGAGGGAGAGGACCCCA
PR	-	2010-2029	<i>P</i> gene	CGGCCAGTAGTTTGGGTGA
LF	+	11203-11222	<i>L</i> gene	ATCTACCGCTTTAGGCGACG
LR	-	11326-11345	<i>L</i> gene	TGAACACTGGGGTGTTCATCG

* GenBank accession no. AB085828

3.3 成績

3.3.1 分節型 rRABV 接種細胞の観察

分節型 rRABV 接種細胞における微細構造を、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、ウイルス感染に伴う細胞質内封入体の形成および VP 様構造物の存在が確認された(図 3-1)。

3.3.2 VP の観察

分節型 rRABV の VP 形態およびサイズを確認するために、密度勾配遠心分離によって精製した VP をネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、分節型 rRABV の VP 形態は RABV に特徴的な弾丸状の形態をしており、長さは約 130 nm (110 nm - 150 nm)であった。非分節型 rRABV の VP の長さは約 200 nm (190 nm - 210 nm)であるため、vRNA の分節化に伴って VP の長さが短くなることが確認された(図 3-2)。一方で、VP の直径に関しては、非分節型および分節型 rRABV においてほとんど変わらず約 100 nm であった。

3.3.3 vRNA の相対量解析

分節型 rRABV の VP における vRNA のパッケージング様式を確認するため

に、S1 および S2 の相対値の比較を行った。その結果、分節型 rRABV における S2(L)/S1(P)相対値は 0.58 であり、非分節型 rRABV と比較して有意に低いことが確認された(図 3-3)。

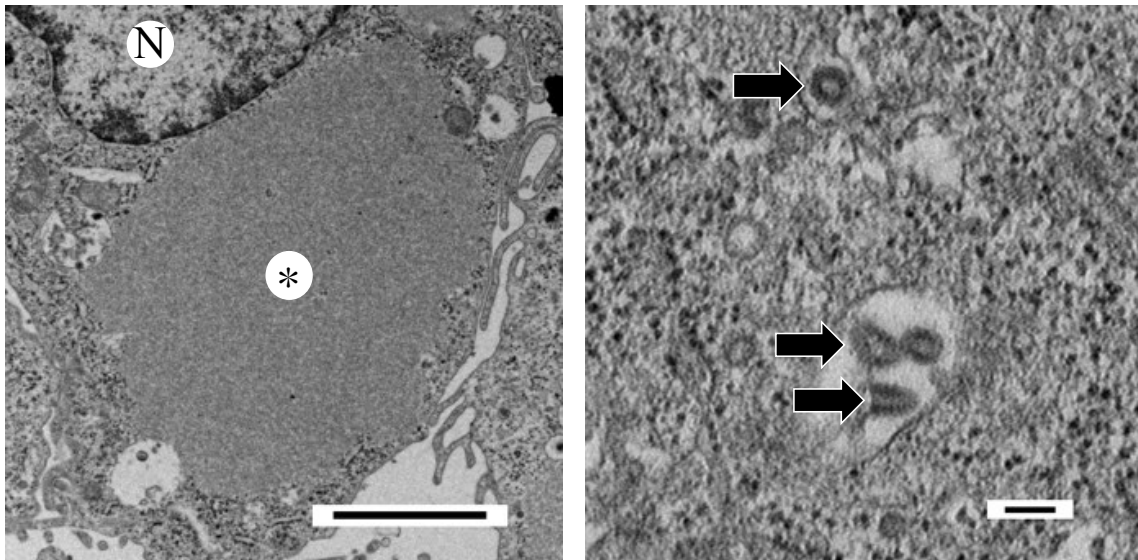
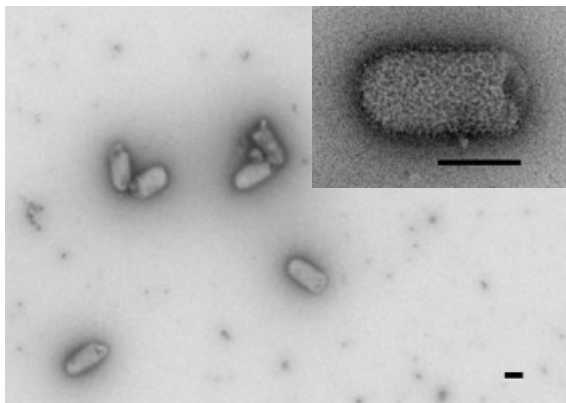


図 3-1 分節型 rRABV の接種細胞における微細構造

18 継代培養後の分節型 rRABV を BHK-21 細胞に接種し、透過型電子顕微鏡を用いて接種 9 日後の感染細胞の微細構造を観察した。ウイルス感染に伴う細胞質内封入体の形成(*)および RABV の VP 様構造物の存在(→)が確認された。N は細胞核を、スケールバーは左図が 2 μm 、右図が 100 nm を示す。

非分節型rRABV



分節型rRABV

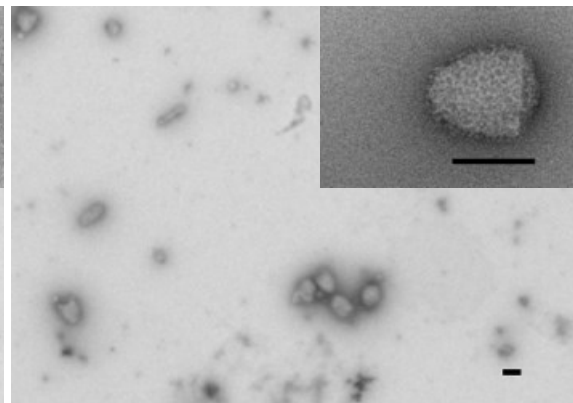


図 3-2 非分節型および分節型 rRABV の VP

密度勾配遠心分離によって精製した rRABV の VP をネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。スケールバーは 100 nm を示す。

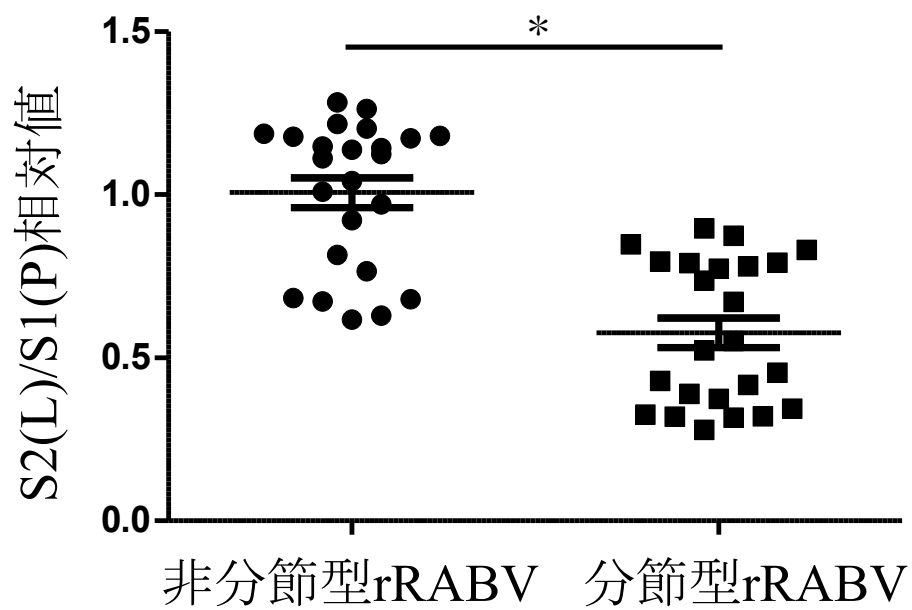


図 3-3 vRNA の相対量解析

分節型 rRABV における S1 および S2 の相対量を比較するために、P および L 遺伝子領域を標的として定量 RT-PCR を行った。非分節型および分節型 rRABV はそれぞれ 24 検体ずつ用いた。全ての測定は 3 well ずつ行い、平均値±標準偏差の測定値を示す。(*)は P 値 < 0.01 の有意差を示す。

3.4 考察

分節型 rRABV の VP は RABV に特徴的な弾丸状の形態をしていることが確認された。一方で、VP サイズに関して非分節型 rRABV と比較すると VP の直径はほとんど変化が認められなかったが、VP の長さはおよそ半分になっていることが確認された。これらの結果は、RABV と同じラブドウイルス科に分類される VSV における vRNA の nt 数と VP サイズに関する研究報告(Schnell et al., 1996) と同様であることを RABV においても実証した。また、ラブドウイルス科と近縁なパラミクソウイルス科のウイルスでは複数の vRNA をパッケージングした VP が存在し(Dahlberg and Simon, 1969; Granoff, 1959; Hosaka et al., 1966; Rager et al., 2002)、パッケージングされた vRNA の量に相関して VP サイズが大型化することが報告されている(Hosaka et al., 1966)。以上のことを考慮すると、本研究で作出した分節型 rRABV の VP は S1 および S2 の両方ではなく、S1 または S2 のどちらか一方をパッケージングしている可能性が高く、ラブドウイルス科のウイルスが複数の vRNA をパッケージングする能力はパラミクソウイルス科のウイルスより低いことが想定される。

そこで、分節型 rRABV における S1 および S2 の vRNA の相対量の比較を行った。もし、分節型 rRABV 接種細胞において S1 および S2 が並行して複製さ

れ、S1 および S2 の両方をパッケージングした子孫 VP が放出されると仮定すると、P および L 遺伝子領域を標的とした定量 RT-PCR における CT 値の割合は非分節型 rRABV と同様に 1.00 に近似するはずである。しかしながら、分節型 rRABV における S2(L)/S1(P)は 0.58 であり、1.00 よりも有意に低くなっていた。この結果は分節型 rRABV 接種細胞の培養上清中に S1 または S2 のどちらか一方をパッケージングした少なくとも 2 種類の子孫 VP(S1VP または S2VP)が放出されていることを示唆する。つまり、S1VP および S2VP は互いにサテライトウイルスであると同時にヘルパーウイルスの関係になっていると考えられる。また、分節型 rRABV の vRNA は S1 が 5,973 nt であり、S2 が 7,513 nt であるため、S2 より S1 の方が短く、より効率的に複製された結果として S1VP が多く産生されていると推定される。分節型 rRABV の S1 および S2 の複製速度が異なるということは、分節型 rRABV の増殖は永久的には継続しないことが想定される。

3.5 小括

作出された分節型 rRABV の VP 形成の確認および vRNA の分節化に伴う VP 性状の変化を明らかにするために、電子顕微鏡観察および vRNA の相対定量解析を行った。

分節型 rRABV の VP は RABV に特徴的な弾丸状の形態をしていることが確認された。VP サイズに関して非分節型 rRABV(約 200 nm)と比較すると長さは半分程度(約 130 nm)であり、vRNA の nt 数は非分節型 rRABV が 11,679nt、分節型 rRABV の S1 が 5,973 nt、S2 が 7,513 nt であることより nt 数と VP 長さに相関関係があることが示された。また、VP 直径はほとんど変化していなかったことから分節型 rRABV の VP は S1 または S2 のどちらか一方をパッケージングしている可能性が高いことが示唆された。

そこで、分節型 rRABV の S1 および S2 の相対量の比較を行った。もし分節型 rRABV 接種細胞において S1 および S2 が並行して複製され、S1 および S2 の両方をパッケージングした VP が放出されると仮定すると、S1 における P 遺伝子領域および S2 における L 遺伝子領域を標的とした RT-PCR の増幅産物の相対量は非分節型 rRABV と同様に 1.00 に近似するはずであるが、分節型 rRABV における S2(L)/S1(P)は 0.58 と低かった。したがって分節型 rRABV 接種細胞の培養

上清中には S1 または S2 をパッケージングした少なくとも 2 種類の VP(S1VP または S2VP)が放出されていることが示された。また、分節型 rRABV の vRNA は S2 よりも S1 の方が短く、複製速度が速い結果として S1VP が多く産生されていると想定される。

以上の結果より、分節型 rRABV には S1 または S2 をパッケージングした VP が存在し、互いにサテライトウイルスであると同時にヘルパーウイルスとして機能していることが示唆された。

第 4 章

分節型 rRABV の外来遺伝子発現能および増殖動態の解析

4.1 はじめに

第2章において、分節型 rRABV は外来遺伝子であるレポーター蛍光タンパク質遺伝子の発現が可能であることが確認された。また、第3章において、分節型 rRABV の増殖には S1VP および S2VP の共感染が必要であることが確認された。

レトロウイルス科以外の RNA ウイルスを用いたウイルスベクターは感染細胞の核内へは入らず、細胞質内で vRNA を複製し、ウイルスタンパク質を転写、翻訳するため、染色体を改変するリスクは原理上なく、従来の DNA ウイルスを用いたウイルスベクターがもつ危険性を根本的に回避できる利点をもつ。しかしながら、免疫原性や安全性、外来遺伝子の安定性などの多くの問題点が残っている (Takayama-Ito et al., 2006)。そこで本章では、外来遺伝子であるレポーター蛍光タンパク質遺伝子発現の安定性の確認および vRNA の分節化に伴う RABV の増殖動態の変化を解析するために継代培養を行い、フォーカスアッセイを行った。

4.2 材料および方法

4.2.1 細胞培養

培養細胞はシリアンハムスター胎児腎由来細胞株である BHK-21 細胞を用いた。BHK-21 細胞は 10% TPB (Difco)、5% FBS (Japan Bio Serum) および GlutaMAX™-I (Invitrogen) 添加 Eagle's MEM (Nissui) を用いて 37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。培養細胞は CELLBANKER® 1 Plus (ZENOAQ) を用いて -80 °C で凍結保存した。

4.2.2 分節型 rRABV の継代培養

BHK-21 細胞を 24 well 細胞培養用プレートに 1.0×10^5 個/well で播種し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。播種 2 日後にウイルス液(100 μ l)を接種し、10 % TPB (Difro)、5 % FBS (Japan Bio Serum) および GlutaMAX™-I (Invitrogen) 添加 Eagle's MEM (Nissui; 900 μ l) を加え、全量 1,000 μ l とし、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。接種 5 日後に培地を全交換し、接種 10 日後に上記の操作を繰り返し、継代培養を行った。

4.2.3 分節型 rRABV の vRNA 分離

16 継代培養した分節型 rRABV の vRNA は接種細胞の培養上清から QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を用いて分離し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega)を用いて DNase 処理した。

4.2.4 RT-PCR

分離した分節型 rRABV の vRNA は PrimeScript[™] One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Takara Bio)を用いて RT-PCR を行った、RT-PCR に用いたプライマーを表 4-1 に示す。

4.2.5 免疫組織化学的検索

18 継代培養した分節型 rRABV の培養上清を BHK-21 細胞に接種した。接種 10 日後、セルスクレーパーを用いて細胞を回収し、200 × g で 10 分間遠心した。細胞ペレットは Mildform[®] 10 NM (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)を用いて固定後、1,500 rpm で 5 分間遠心し、1 % アルギン酸ナトリウムを滴下後、さらに 4,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去し、CaCl₂を滴下し硬化した細胞塊を上昇アルコール系列で脱水、クリアプラスで透徹後、パラフィン包埋した。包埋ブロックは 3 μm の厚さで切片を作製し、免疫組織化学的染色に供した。作製した切片は脱パラフィン後、下行アルコール系列で再水和し、0.25 % トリプシンに

より抗原を賦活化した。内因性ペルオキシターゼは 0.3 % 過酸化水素加メタノールを室温で 60 分間反応させて除去し、非特異的反応を抑制するため、10 % 正常ヤギ血清(Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japna)でブロッキングした。一次抗体はウサギ抗 N 抗体、ウサギ抗 P 抗体、マウス抗 G 抗体(Anti-G mAb #1-46-12)をそれぞれ 1,200 倍希釈し、4 °Cで一晩反応させた(Inoue et al., 2003b; Irie et al., 2002; Irie and Kawai, 2002, 2005; Park et al., 2006)。ウサギ抗 N 抗体およびウサギ抗 P 抗体は国立感染症研究所獣医科学部の井上 智 博士、マウス抗 G 抗体(Anti-G mAb #1-46-12)は生産開発科学研究所分子微生物研究室の河合 明彦 博士に分与していただいた。二次抗体には Histofine[®] Simple Stain MAX-PO (R) (Nichirei Bioscience Inc.)あるいは Histofine[®] Simple Stain MAX-PO (M) (Nichirei Bioscience Inc.)をそれぞれ室温で 30 分間反応させた。反応させた切片は Simple Stain DAB 溶液(Nichirei Bioscience Inc.)により可視化し、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

4.2.6 フォーカスアッセイ

BHK-21 細胞を 24 well 細胞培養用プレートに 1.0×10^5 個/well で播種し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。播種 2 日後に培養上清を除去し、Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)を用いて洗浄した。10 倍階段希釈した非分節型および分節型 rRABV を細胞に接種し、37 °C、5 % CO₂ の条件下で 15 分ごとに振盪しながら 1

時間ウイルス吸着を行った。吸着後、接種したウイルス液を除去し、HBSS で洗浄した。その後、5 % FBS および 0.5 % メチルセルロース添加 Eagle's MEM (Nissui)を 0.5 ml 加え、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。接種 4 日後、接種細胞に 0.5 ml の 4 % Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (Wako Pure Chemicals) を加え、室温で 10 分間固定した。固定後に培養上清を除去し、PBS (pH 8.5)を用いて洗浄した。固定したウイルス接種細胞に 0.5 ml の 80 %アセトン(Wako Pure Chemicals)を加え、室温で 20 分間、後固定した。その後、後固定液を除去し、PBS (pH 8.5)を用いて洗浄した。ウイルス感染に伴うフォーカス形成は FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin (Fujirebio Diagnostics, Malvern, PA)を用いて染色し、ウイルス力価を測定するために蛍光顕微鏡 (Olympus)を用いてフォーカス数を確認した。

4.2.7 ウイルス増殖効率

精製した非分節型および分節型 rRABV を MOI 0.01 または 0.1 の条件下で BHK-21 細胞に接種し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。ウイルス接種細胞の培養上清を接種 1 日-7 日後に回収し、フォーカスアッセイによりウイルス力価を測定した。

表 4-1 RT-PCR に用いたプライマー

プライマー名	センス	位置*	領域	配列(5'→3')
GF	+	3355-3378	<i>G</i> gene	AACATCCCTCAAAAGACTTAGGGA
GR	-	4354-4370	<i>G</i> gene	AACCCGGGGACAAGTTT
G-LF	+	4591-4614	<i>G-L</i> gene	ATAGAGTTATTGGAATCCTCAGTT
G-LR	-	5197-5217	<i>G-L</i> gene	TCTGACTCAACTGGATCAATG
LF	+	11203-11222	<i>L</i> gene	ATCTACCGCTTTAGGCGACG
LR	-	11326-11345	<i>L</i> gene	TGAACACTGGGGTGTTCATCG

* GenBank accession no. AB085828

4.3 成績

4.3.1 外来遺伝子発現の安定性

分節型 rRABV における外来遺伝子であるレポーター蛍光タンパク質遺伝子の安定性を確認するために、分節型 rRABV を 3 継代株に分け(継代株 1-3)、独立して継代培養を行った。その結果、継代株 1 では 16 継代目において S2 に搭載した eGFP の発現低下が確認された。一方で、継代株 2 では 12 継代目において S1 に搭載した DsRed の発現低下が確認された。また、継代株 3 では 10 継代目において S1 に搭載した DsRed および S2 に搭載した eGFP の発現がほとんど観察されなくなった(図 4-1)。

4.3.2 相同組換えの確認

分節型 rRABV の継代株 1-3 における DsRed および eGFP のレポーター蛍光タンパク質の発現低下が S1 および S2 の相同組換えを原因としていないことを確認するために、16 継代培養した分節型 rRABV の継代株 1-3 から vRNA を分離し、G-L 遺伝子領域を標的として RT-PCR を行った。その結果、継代株 1-3 において G および L 遺伝子領域をそれぞれ標的とした RT-PCR の増幅産物が確認されたが、G-L 遺伝子間領域を標的とした RT-PCR の増幅産物は確認されなかった

(図 4-2)。

4.3.3 ウイルスタンパク質の検出

18 継代目の分節型 rRABV 接種細胞において HE 染色および免疫組織化学的染色を行った。その結果、継代株 1-3 において好酸性の細胞質内封入体の形成が確認された。N および P は細胞質内封入体部位に局在していることが確認された。一方で G は細胞膜付近に局在していることが確認された(図 4-3)。

4.3.4 ウイルス増殖効率

非分節型および分節型 rRABV の増殖効率を比較するために FITC 標識抗 N 抗体を用いてフォーカスアッセイを行った。フォーカスサイズに関して非分節型 rRABV と比較すると分節型 rRABV は小さくなっていることが確認された(図 4-4)。また、接種 5 日後におけるウイルス力価は非分節型 rRABV は 7.9 Log FFU/ml であり、分節型 rRABV は 5.6 Log FFU/ml であった(図 4-5)。さらに、分節型 rRABV はウイルス感染に伴う細胞変性効果(CPE)をほとんど示さないことが確認された(図 4-6)。

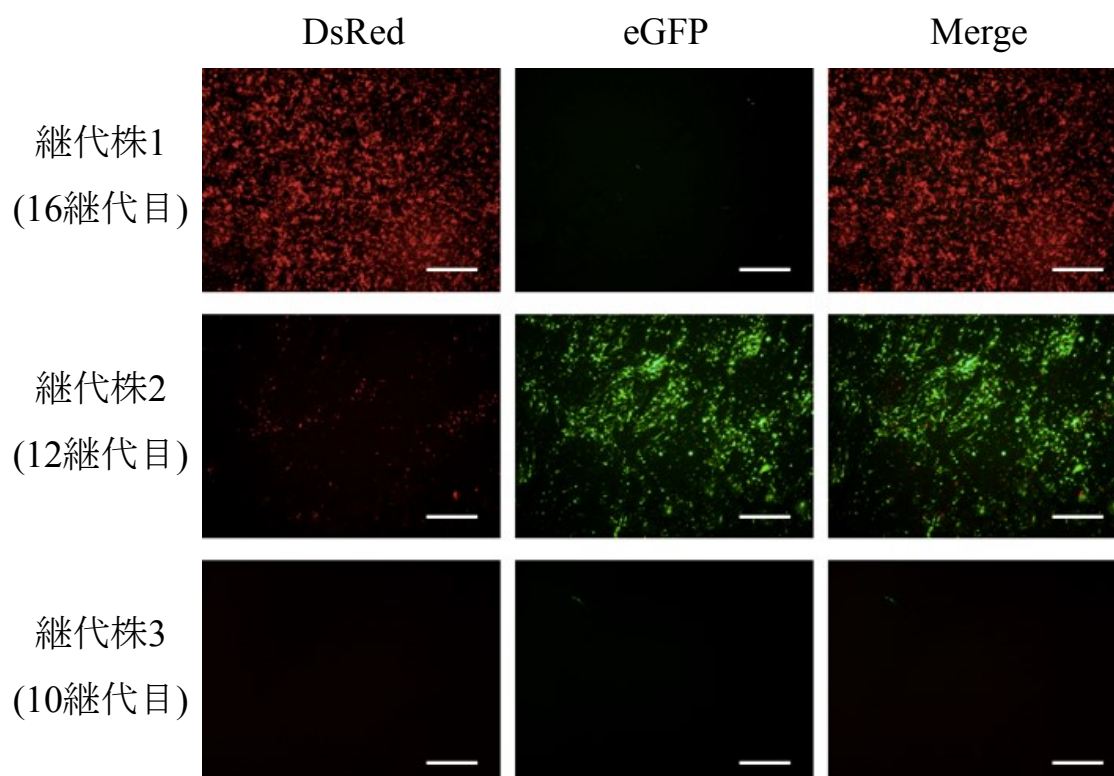


図 4-1 継代培養に伴う分節型 rRABV のレポーター蛍光タンパク質発現の変化
分節型 rRABV を異なる 3 つの継代株に分け、継代培養を行った。継代株 1 は 16 継代目において eGFP 発現が低下した。継代株 2 は 12 継代目において DsRed 発現が低下した。継代株 3 は 10 継代目において DsRed および eGFP 発現が低下した。スケールバーは 600 μ m を示す。

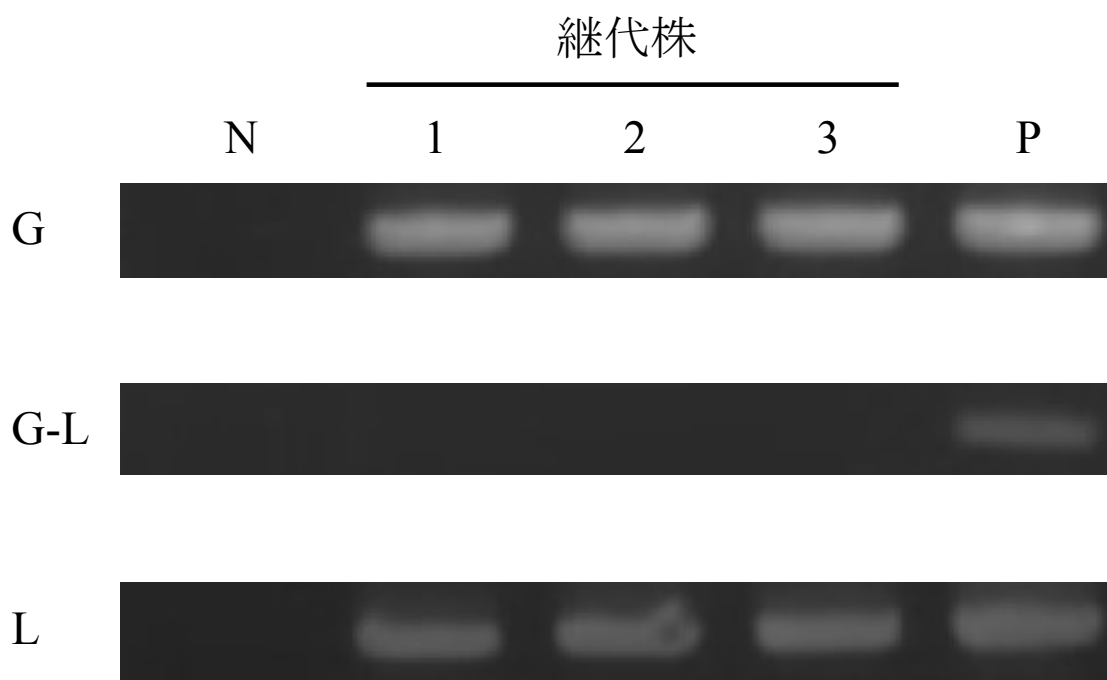


図 4-2 RT-PCR による相同組換えの確認

16 継代培養を行った分節型 rRABV の継代株 1-3 の培養上清から vRNA を分離し、G 遺伝子領域、G-L 遺伝子間領域および L 遺伝子領域を標的として RT-PCR を行った。非分節型 rRABV の vRNA をポジティブコントロール(P)として用いた。

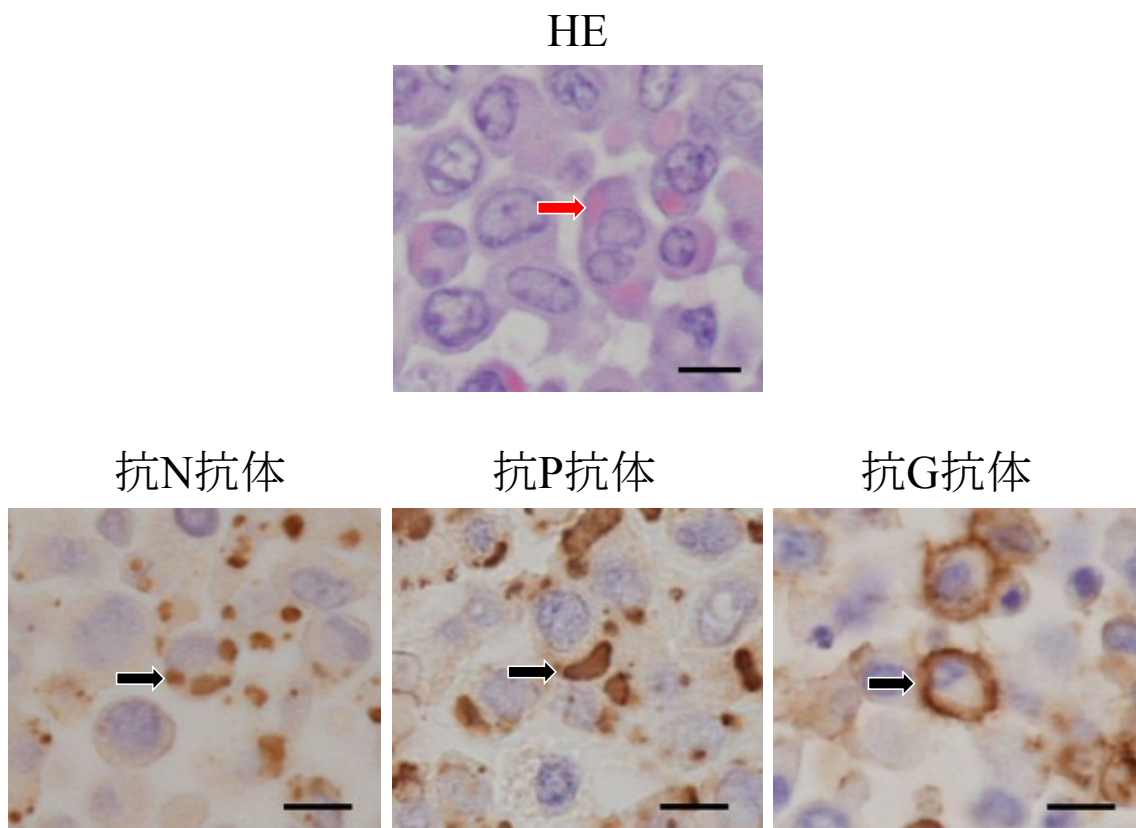
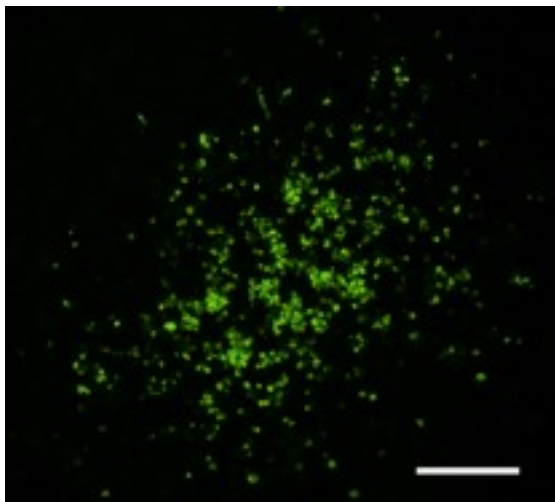


図 4-3 免疫組織化学的検索

18 継代培養後の分節型 rRABV を接種した BHK-21 細胞を用いて免疫組織化学的検索を行った。HE 染色によって好酸性の細胞質内封入体の形成が確認された(赤矢印)。N および P は好酸性の細胞質内封入体部位に局在していることが確認された。一方で、G は細胞膜付近に局在することが確認された(黒矢印)。スケールバーは 10 μm を示す。

非分節型rRABV



分節型rRABV

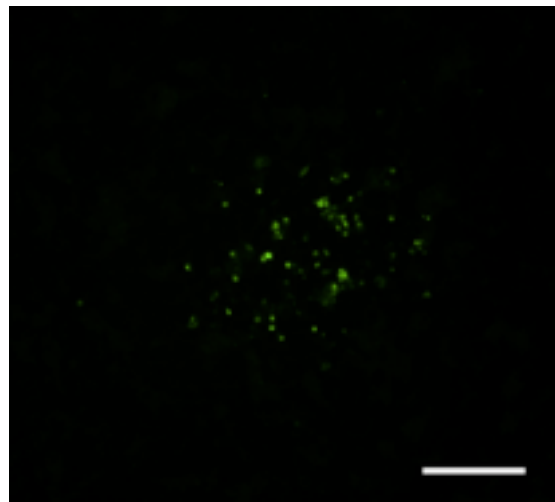


図 4-4 フォーカスサイズ

精製した非分節型および分節型 rRABV を MOI0.1 の条件で BHK-21 細胞に接種し、接種 4 日後に FITC 標識抗 N 抗体を用いて染色を行った。フォーカスサイズは非分節型 rRABV が約 600 μm 、分節型 rRABV が約 200 μm であった。スケールバーは 200 μm を示す。

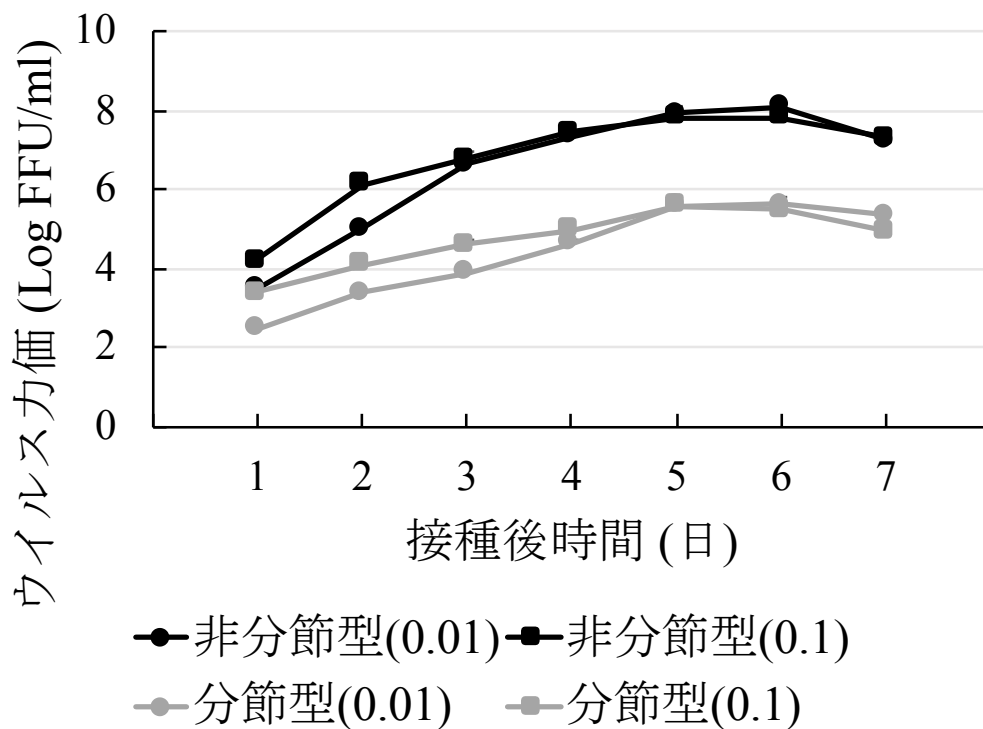


図 4-5 精製 rRABV の増殖曲線

精製した非分節型および分節型 rRABV を MOI0.01 または 0.1 の条件で BHK-21 細胞に接種し、接種 1 日-7 日後におけるウイルス力価をフォーカスアッセイにより測定した。MOI0.01 および 0.1 の条件における非分節型 rRABV の増殖曲線を黒丸および黒四角、分節型 rRABV の増殖曲線を灰丸および灰四角で示す。全ての測定は 3 well ずつ行い、平均値±標準偏差の測定値を示す。

非分節型rRABV

分節型rRABV

Mock

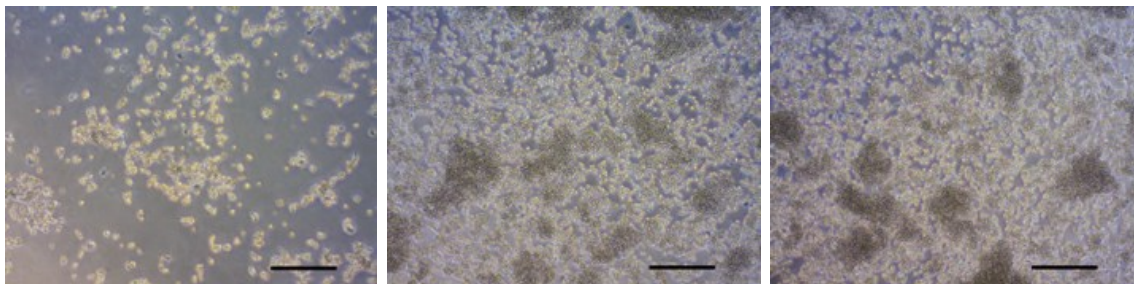


図 4-6 vRNA の分節化に伴う CPE の変化

精製した非分節型および分節型 rRABV を MOI 0.01 の条件で BHK-21 細胞に接種し、接種 7 日後における CPE を観察した。スケールバーは 1,000 μm を示す。

4.4 考察

分節型 rRABV はレポーター蛍光タンパク質遺伝子として DsRed 遺伝子を S1 に、eGFP 遺伝子を S2 に搭載している。分節型 rRABV は継代培養を繰り返すことによってレポーター蛍光タンパク質の発現が低下することが確認された。しかしながら、レポーター蛍光タンパク質の発現が低下した分節型 rRABV の接種細胞の培養上清において vRNA の存在が確認され、接種細胞内においてウイルス感染に伴う好酸性の細胞質内封入体の形成および免疫組織化学的検索によるウイルスタンパク質の存在が確認された。レポーター蛍光タンパク質は子孫 VP の産生に必要なではないため、レポーター蛍光タンパク質の発現が何らかの要因によって低下してもウイルス増殖は維持されていると考えられる。さらに、レポーター蛍光タンパク質の発現低下の動態は継代株 1-3 で異なっていたことより、無作為に生じることが確認された。これらの結果は、分節型 rRABV は継代培養が可能であるが、継代培養を繰り返すことによってレポーター蛍光タンパク質遺伝子、つまり外来遺伝子の発現は不安定になることを示している。NNS-RNA ウイルスは一般的に相同組換えを生じる可能性は低いと考えられているが、街上市毒 RABV において稀に相同組換えを生じることが報告されている(Liu et al., 2011)。そこで、継代培養を行った分節型 rRABV におけるレポーター蛍光タンパ

ク質の発現低下が相同組換えを原因とするか検討するために、S1 および S2 にコードされているウイルスタンパク質遺伝子領域を標的として RT-PCR を行った。その結果、G および L 遺伝子領域を標的とした RT-PCR の増幅産物は検出されたが、G-L 遺伝子領域間を標的とした RT-PCR の増幅産物が検出されなかったことより、継代培養を行った分節型 rRABV は相同組換えを生じていないことが確認された。また、第 3 章における透過型電子顕微鏡を用いた VP の観察によって、非分節型 rRABV と比較して分節型 rRABV の VP の長さが短くなっていたことから、分節型 rRABV が相同組換えを生じていないことが支持される。もし、分節型 rRABV において相同組換えが生じたと仮定すると、VP の長さは非分節型 rRABV と等しくなり、P および L 遺伝子領域を標的とした定量 RT-PCR の $S2(L)/S1(P)$ は 1.00 に近似するはずである。

また、vRNA の分節化に伴って vRNA の nt 数は減少するため、分節型 rRABV の増殖効率は上昇することが期待された。しかしながら、分節型 rRABV の最大ウイルス力価は非分節型 rRABV より低かった。その要因として、分節型 rRABV は子孫 VP 産生に S1VP および S2VP の共感染が必要であり、結果として分節型 rRABV のウイルス力価が低下したことが推察される。また、分節型 rRABV は接種細胞においてウイルスタンパク質を発現しているにも関わらず、顕著な CPE を示さないことが確認された。これらの結果から RABV は vRNA の分節化

に伴って子孫 VP の産生効率が減少することが確認された。

RABV におけるミニ vRNA を用いた外来遺伝子の発現は、vRNA 構造が欠損干渉粒子と似ているにも関わらず、親株であるヘルパーウイルスの増殖効率に影響を与えないことが報告されている (Conzelmann and Schnell, 1994; Finke and Conzelmann, 1999; Schnell and Conzelmann, 1995)。また、RABV と同様にラブドウイルス科に分類される VSV において、異なるウイルスタンパク質遺伝子領域を欠損したウイルスが互いに不足するウイルスタンパク質を補完し合い増殖を維持する組換えウイルスでは、分節型 rRABV と同様にウイルス力価が低下するにも関わらず、腫瘍溶解性ウイルスの能力を維持していることが報告されている (Muik et al., 2012)。したがって、本研究で作出した分節型 rRABV においてもウイルス療法への応用が可能であることが期待される。

4.5 小括

分節型 rRABV のレポーター蛍光タンパク質発現の安定性および vRNA の分節化に伴う増殖動態の変化を明らかにするために、継代培養を行い、フォーカスアッセイを行った。

分節型 rRABV は DsRed 遺伝子を S1 に、eGFP 遺伝子を S2 に搭載しているが、10 継代以上の培養を行うことによってレポーター蛍光タンパク質の発現が低下することが確認された。しかしながら、18 継代培養後の分節型 rRABV 接種細胞の培養上清において vRNA の存在が確認され、接種細胞内においてウイルス感染に伴う好酸性の細胞質内封入体の形成およびウイルスタンパク質の存在が確認された。レポーター蛍光タンパク質は VP 産生に必要でないため、その発現が何らかの要因によって低下してもウイルス増殖は継続していると推察される。また、レポーター蛍光タンパク質の発現低下は別々の継代株において異なっていたことより、無作為に生じることが確認された。さらに、継代培養を行った分節型 rRABV におけるレポーター蛍光タンパク質の発現低下が相同組換えを原因とするか検討するために、S1 および S2 にコードされているウイルスタンパク質遺伝子領域を標的として RT-PCR を行った。その結果、G-L 遺伝子領域間を標的とする RT-PCR の増幅産物が確認されなかったことから、継代培養を行っ

た分節型 rRABV は相同組換えを生じていないことが証明された。

また、vRNA の分節化に伴って vRNA の nt 数は減少するため、分節型 rRABV の増殖効率は上昇することが期待されたが、分節型 rRABV の最大ウイルス力価は非分節型 rRABV より低かった。その要因として、分節型 rRABV の VP 産生には S1VP および S2VP の共感染が必要であり、子孫 VP 産生効率が低下した結果として、分節型 rRABV のウイルス力価が低下したことが推測された。また、分節型 rRABV は接種細胞においてウイルスタンパク質を発現しているにもかかわらず、顕著な CPE を示さないことが確認された。

以上の結果より、分節型 rRABV は継代培養によってレポーター蛍光タンパク質遺伝子、つまり外来遺伝子発現は不安定になることが示された。また、RABV は vRNA の分節化に伴って VP 産生効率が低下することが示された。

第 5 章

総括

狂犬病ウイルス(RABV)はモノネガウイルス目ラブドウイルス科リッサウイルス属に分類され、非分節型マイナス鎖(NNS)-RNA をゲノムとしてもつ。ウイルスゲノム RNA(vRNA)は約 12,000 ヌクレオチド(nt)からなり、3'リーダー配列から始まり、核タンパク質(N)、リン酸化タンパク質(P)、マトリックスタンパク質(M)、糖タンパク質(G)および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの機能として重要なラージタンパク質(L)の 5 つの構造タンパク質遺伝子をコードし、5'トレーラー配列で終わる。N によって vRNA はカプシド形成され、P および L と共にリボ核タンパク質(RNP)複合体を形成する。さらに RNP 複合体は M および 3 量体の G を含む宿主細胞由来の脂質 2 重膜で構成されるエンベロープに覆われ感染性のウイルス粒子(VP)が形成される。VP サイズは直径 75 nm - 80 nm、長さ約 180 nm の弾丸状の形態をしている。

遺伝子改変が可能なクローン化ゲノム DNA または cDNA から感染性ウイルスを作出する技術、いわゆるリバーシジェネティクス(RG)法が開発され、1994 年には Schnell らが NNS-RNA ウイルスとして初めて RABV の RG 法の樹立に成功して以来、様々な NNS-RNA ウイルスの RG 法が開発、改良されてウイルス遺伝子の機能解析を含む基礎研究から遺伝子治療に用いるウイルスベクターを含むウイルス療法への応用研究が行われている。

ラブドウイルス科のウイルスは一般的に NNS-RNA をゲノムとしてもつが、例外的に分節型マイナス鎖 RNA をゲノムとしてもつラン壤痘斑紋ウイルスの存在が報告されている。また、水胞性口炎ウイルスおよび RABV において異なる遺伝子の欠損ウイルスが互いに不足するウイルスタンパク質を補完し合い増殖が維持されることが報告されている。さらに、ラブドウイルス科と類似した vRNA 構造をもつパラミクソウイルス科の麻疹ウイルスおよびニューカッスル病ウイルスにおいて vRNA の分節化が可能であることが報告されている。これらの報告は RABV において vRNA の分節化が可能であることを示唆しており、子孫ウイルス産生メカニズムの解明および新たなウイルスベクター開発への展開が期待される。そこで本研究では、RG 法を利用して分節型組換え RABV(rRABV)を作出し、そのウイルス性状を解析した。

1. 分節型 rRABV の作出

分節型 rRABV の vRNA 構造を設計し、RG 法によって分節型 rRABV の作出を試みた。

分節型 rRABV の vRNA は固定毒株 HEP-Flury 株の vRNA 配列を基礎とし、N-P-M-G 遺伝子領域をコードする S1、そして L 遺伝子領域をコードする S2 に分節した。S1 および S2 発現を判別するためのレポーター遺伝子として DsRed 遺

伝子を S1 の G 遺伝子領域下流、eGFP 遺伝子を S2 の L 遺伝子領域上流に挿入した。S1 および S2 は感染細胞における vRNA の複製および VP へのパッケージングのために 3'リーダー配列および 5'トレーラー配列を搭載した。S1 および S2 発現プラスミド(pH-S1 および pH-S2)をヘルパープラスミドである N、P および G 発現プラスミドと共に BHK-21 細胞に遺伝子導入することによって分節型 rRABV の作出を行った。

一般的に RG 法による rRABV の作出には vRNA-cDNA プラスミドと共に vRNA の複製および mRNA の転写に関わる N、P および L 発現プラスミドの遺伝子導入が必要とされているが、分節型 rRABV の作出には L 発現プラスミドの遺伝子導入を必要としなかった。本研究において vRNA-cDNA プラスミドおよびウイルスタンパク質発現プラスミドにはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター駆動性プラスミドを使用しており、vRNA 末端形成のために CMV プロモーター配列および 3'リーダー配列間に RNA 自己切断活性を有するハンマーヘッド型リボザイム(HmRz)配列を搭載している。しかしながら、HmRz の RNA 自己切断活性は完全ではなく、CMV プロモーターの mRNA 発現活性が高いために、vRNA の分節化に伴って S2 における CMV プロモーターと L 遺伝子領域が近接したことによって pH-S2 から L が発現し、分節型 rRABV の作出に適した量の L が供給されたと推測される。

また、作出した分節型 rRABV の接種細胞におけるレポーター蛍光タンパク質の発現が確認され、培養上清において vRNA が検出されたことから、VP が放出されていることが示唆された。

以上の結果より、RABV の vRNA の分節化が可能であり、分節型 rRABV は継代培養が可能であることが示された。

2. 分節型 rRABV の VP 性状の解析

作出された分節型 rRABV の VP 形成の確認および vRNA の分節化に伴う VP 性状の変化を明らかにするために、電子顕微鏡観察および vRNA の相対定量解析を行った。

分節型 rRABV の VP は RABV に特徴的な弾丸状の形態をしていることが確認された。VP サイズに関して非分節型 rRABV(約 200 nm)と比較すると長さは半分程度(約 130 nm)であり、vRNA の nt 数は非分節型 rRABV が 11,679 nt、分節型 rRABV S1 が 5,973 nt、S2 が 7,513 nt であることより nt 数と VP の長さに相関関係があることが示された。また、VP の直径はほとんど変化していなかったことから分節型 rRABV の VP は S1 または S2 のどちらか一方をパッケージングしている可能性が高いことが示唆された。

そこで、分節型 rRABV において S1 および S2 の相対量の比較を行った。もし

分節型 rRABV 接種細胞において S1 および S2 が並行して複製され、S1 および S2 の両方をパッケージングした VP が放出されると仮定すると、S1 における P 遺伝子領域および S2 における L 遺伝子領域を標的とした RT-PCR の増幅産物の相対量は非分節型 rRABV と同様に 1.00 に近似するはずであるが、分節型 rRABV における S2(L)/S1(P)は 0.58 と低かった。したがって分節型 rRABV 接種細胞の上清中には S1 または S2 をパッケージングした少なくとも 2 種類の VP(S1VP または S2VP)が放出されていることが示された。また、分節型 rRABV の vRNA は S2 よりも S1 の方が短く、複製速度が速い結果として S1 をパッケージングした VP が多く産生されていると想定される。

以上の結果より、分節型 rRABV には S1VP および S2VP が混在し、互いにサテライトウイルスであると同時にヘルパーウイルスとして機能していることが示された。

3. 分節型 rRABV の外来遺伝子発現能および増殖動態の解析

分節型 rRABV のレポーター蛍光タンパク質発現の安定性および vRNA の分節化に伴う増殖動態の変化を明らかにするために、継代培養を行い、フォーカスアッセイを行った。

分節型 rRABV は DsRed 遺伝子を S1 に、eGFP 遺伝子を S2 に搭載している

が、10 継代以上の培養を行うことによってレポーター蛍光タンパク質の発現が低下することが確認された。しかしながら、18 継代培養後の分節型 rRABV 接種細胞の培養上清において vRNA の存在が確認され、接種細胞内においてウイルス感染に伴う好酸性の細胞質内封入体の形成およびウイルスタンパク質の存在が確認された。レポーター蛍光タンパク質は VP 産生に必要でないため、その発現が何らかの要因によって低下してもウイルス増殖は継続していると推察される。また、レポーター蛍光タンパク質の発現低下は別々の継代株において異なっていたことより、無作為に生じることが確認された。さらに、継代培養を行った分節型 rRABV におけるレポーター蛍光タンパク質の発現低下が相同組換えによるものでないことを確認するために、S1 および S2 にコードされているウイルスタンパク質遺伝子領域を標的として RT-PCR を行った。その結果、G-L 遺伝子間を標的とする RT-PCR の増幅産物が確認されなかったことから、継代培養を行った分節型 rRABV は相同組換えを生じていないことが証明された。また、VP 観察によって、非分節型 rRABV と比較して分節型 rRABV の VP の長さが短くなっていたことから、分節型 rRABV が相同組換えを生じていないことは支持される。

また、vRNA の分節化に伴って vRNA の nt 数は減少するため、分節型 rRABV の増殖効率は上昇することが期待された。しかしながら、分節型 rRABV の最大

ウイルス力価は非分節型 rRABV より低かった。その要因として、分節型 rRABV の子孫 VP 産生には S1VP および S2VP の共感染が必要であり、子孫 VP 産生効率が低下した結果として、分節型 rRABV のウイルス力価が低下したことが推測された。また、分節型 rRABV は接種細胞においてウイルスタンパク質を発現しているにも関わらず、顕著な細胞変性効果を示さないことが確認された。

以上の結果より、分節型 rRABV は継代培養によってレポーター遺伝子、つまり外来遺伝子発現は不安定となることが示された。また、RABV は vRNA の分節化に伴って子孫 VP 産生効率が低下することが示された。

本研究によって、NNS-RNA をゲノムにもつ RABV において、分節型 rRABV の作出方法を確立し、RABV において vRNA の分節化が可能であることを実証した。また、本研究はラブドウイルス科のウイルスにおいて vRNA の分節化に成功した初めての報告でもある。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導を賜った日本大学大学院 獣医学研究科の伊藤 琢也 教授に深謝いたします。また、rRABV の作出に関する材料、技術および情報を提供していただいた国立感染症研究所 ウイルス第一部の林 昌宏 博士、伊藤(高山) 睦代 博士、京都大学霊長類研究所の井上 謙一 博士、VP の電子顕微鏡観察および免疫組織化学的検索にご協力していただいた北里大学 獣医病理学研究室の朴 天鎬 准教授、君付 和範 博士、志和 希 氏、抗 RABV タンパク質抗体を分与していただいた国立感染症研究所 獣医科学部の井上 智 博士、生産開発化学研究所 分子微生物研究室の河合 明彦 博士に感謝いたします。さらに、本研究に関してご助言をいただいた岐阜大学 人獣共通感染症学研究室の伊藤 直人 准教授、大分大学 微生物学講座の山田 健太郎 准教授、日本大学大学院 獣医学研究科の鈴木(小林) 由紀 専任講師に感謝いたします。

引用文献

Baer, G. M., 2007. The history of rabies, in: Jackson, A. C., Wunner, W. H. (Eds.), Rabies, second ed., San Diego, pp. 1-22.

Biacchesi, S., Skiadopoulos, M.H., Tran, K.C., Murphy, B.R., Collins, P.L., Buchholz, U.J., 2004. Recovery of human metapneumovirus from cDNA: optimization of growth in vitro and expression of additional genes. *Virology* 321, 247–259.

Bitzer, M., Armeanu, S., Lauer, U.M., Neubert, W.J., 2003. Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J. Gene. Med.* 5, 543–553.

Collins, P. L., Hill, M. G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R. M., Murphy, B. R., 1995. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5'proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 11563-11567.

Conzelmann, K.K., Schnell, M., 1994. Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins. *J. Virol.* 68, 713–719.

Dahlberg, J.E., Simon, E.H., 1969. Physical and genetic studies of Newcastle disease virus: evidence for multiploid particles. *Virology* 38, 666–678.

Fielding, A.K., 2005. Measles as a potential oncolytic virus. *Rev. Med. Virol.* 15, 135–142.

Finke, S., Conzelmann, K. K., 1997. Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions. *J. Virol.* 71, 7281–8.

Finke, S., Conzelmann, K.K., 1999. Virus promoters determine interference by defective RNAs: selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copy-back ambisense rabies virus. *J. Virol.* 73, 3818–3825.

Gao, Q., Park, M., Palese, P., 2008. Expression of transgenes from newcastle disease virus

with a segmented genome. *J. Virol.* 82, 2692–2698.

Garcin, D., Pelet, T., Calain, P., Roux, L., Curran, J., Kolakofsky, D., 1995. A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *EMBO J.* 14, 6087-6094.

Gaudin, Y., Ruigrok, R., Tuffereau, C., Knossow, M., Flamand, A., 1992. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* 187, 627–632.

Granoff, A., 1959. Studies on mixed infection with Newcastle disease virus: II. The occurrence of Newcastle disease virus heterozygotes and study of phenotypic mixing involving serotype and thermal stability. *Virology* 9, 649–670.

Hasan, M. K., Kato, A., Shioda, T., Sakai, Y., Yu, D., Nagai, Y., 1997. Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase gene from the 3'proximal first locus. *J. Gen. Virol.* 78, 2813-2820.

Hosaka, Y., Kitano, H., Ikeguchi, S., 1966. Studies on the pleomorphism of HVJ virions.

Virology 29, 205–221.

Hummeler, K., Koprowski, H., Wiktor, T.J., 1967. Structure and development of rabies virus in tissue culture. *J. Virol.* 1, 152–170.

Inoue, K., Shoji, Y., Kurane, I., Iijima, T., Sakai, T., Morimoto, K., 2003a. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *J. Virol. Methods.* 107, 229–236.

Inoue, S., Sato, Y., Hasegawa, H., Noguchi, A., Yamada, A., Kurata, T., Iwasaki, T., 2003b. Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a mono-specific antirabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues. *Pathol. Int.* 53, 525–533.

Irie, T., Matsuda, Y., Honda, Y., Morimoto, K., Kawai, A., 2002. Studies on the escape mutants of rabies virus which are resistant to neutralization by a highly conserved conformational epitope-specific monoclonal antibody #1-46-12. *Microbiol. Immunol.* 46, 449–461.

Irie, T., Kawai, A., 2002. Studies on the different conditions for rabies virus neutralization by monoclonal antibodies #1-46-12 and #7-1-9. *J. Gen. Virol.* 83, 3045–3053.

Irie, T., Kawai, A., 2005. Further studies on the mechanism of rabies virus neutralization by a viral glycoprotein-specific monoclonal antibody, #1-46-12. *Microbiol. Immunol.* 49, 721–731.

Ito, N., Takayama, M., Yamada, K., Sugiyama, M., Minamoto, N., 2001. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. *J. Virol.* 75, 9121–9128.

Kato, A., Sakai, Y., Shioda, T., Kondo, T., Nakanishi, M., Nagai, Y., 1996. Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells* 1, 569-579.

Klingen, Y., Conzelmann, K., Finke, S., 2008. Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport. *J. Virol.* 82, 237–245.

Kondo, H., Maeda, T., Shirako, Y., Tamada, T., 2006. Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. *J. Gen. Virol.* 87, 2413–2421.

Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A., Rose, J. K., 1995. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4477-4481.

Liu, W., Liu, Y., Liu, J., Zhai, J., Xie, Y., 2011. Evidence for inter-and intra-clade recombinations in rabies virus. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1906-1912.

Mebatsion, T., Weiland, F., Conzelmann, K., 1999. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J. Virol.* 73, 242–250.

Muik, A., Dold, C., Geiß, Y., Volk, A., Werbizki, M., Dietrich, U., Laer, D.L., 2012. Semireplication-competent vesicular stomatitis virus as a novel platform for oncolytic virotherapy. *J. Mol. Med.* 90, 959–970.

Nakaya, T., Cros, J., Park, M., Nakaya, Y., Zheng, H., Sagrera, A., Villar, E., Garcia-sastre,

A., Palese, P., 2001. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J. Virol.* 75, 11868–11873.

Okada, K., Ito, N., Yamaoka, S., Masatani, T., Ebihara, H., Goto, H., Nakagawa, K., Mitake, H., Okadera, K., Sugiyama, M., 2016. Roles of the rabies virus phosphoprotein isoforms in pathogenesis. *J. Virol.* 90, 8226–8237.

Park, C., Kondo, M., Inoue, S., Noguchi, A., Oyamada, T., Yoshikawa, H., Yamada, A., 2006. The histopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 589–595.

Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dötsch, C., Billeter, M., 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J.* 14, 5773–5784.

Rager, M., Vongpunsawad, S., Duprex, W., Cattaneo, R., 2002. Polyploid measles virus with hexameric genome length. *EMBO J.* 21, 2364–2372.

Rupprecht, C. E., Fooks, A. R., Abela-Ridder, B., 2018. Laboratory techniques in rabies, fifth ed. World Health Organization.

Russell, S.J., 2002. RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther.* 9, 961–966.

Schnell, M.J., Buonocore, L., Kretzschmar, E., Johnson, E., Rose, J.K., 1996. Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11359–11365.

Schnell, M.J., Conzelmann, K.K., 1995. Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. *Virology* 214, 522–530.

Schnell, M.J., Mebatsion, T., Conzelmann, K., 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* 13, 4195–4203.

Takayama-Ito, M., Inoue, K., Shoji, Y., Inoue, S., Iijima, T., Sakai, T., Kurane, I., Morimoto, K., 2006. 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.

Takeda, M., Nakatsu, Y., Ohno, S., Seki, F., Tahara, M., Hashiguchi, T., Yanagi, Y., 2006. Generation of measles virus with a segmented RNA genome. *J. Virol.* 80, 4242–4248.

Whelan, S. P., Ball, L. A., Barr, J. N., Wertz, G. T., 1995. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 8388-8392.

Whitt, M.A., Buonocor, L., Prehaud, C., Rose, J.K., 1991. Membrane fusion activity, oligomerization, and assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virology* 185, 681–688.

World Health Organization, 2018. WHO expert consultation on rabies: third report (No. 1012). World Health Organization.

Wunner, W. H., 2007. Rabies virus, in: Jackson, A. C., Wunner, W. H. (Eds.), *Rabies*, second ed., San Diego, pp. 23-68.

Yamamoto, S., Iwasaki, C., Oono, H., Ninomiya, K., Matsumura, T., 2008. The first imported case of rabies into Japan in 36 years: a forgotten life-threatening disease. *J. Travel. Med.* 15, 372-374.

Yamaoka, S., Okada, K., Ito, N., Okadera, K., Mitake, H., Nakagawa, K., Sugiyama, M., 2017. Defect of rabies virus phosphoprotein in its interferon-antagonist activity negatively affects viral replication in muscle cells. *J. Vet. Med. Sci.* 79, 1394–1397.

Yu, D., Shioda, T., Kato, A., Hasan, M. K., Sakai, Y., Nagai, Y., 1997. Sendai virus-based expression of HIV-1 gp120: Reinforcement by the V(-) version. *Genes Cells*, 2, 457–466.

飯田 章博, 加藤 篤, 2003. センダイウイルスベクター. *ウイルス* 53, 171-175.

加藤 篤, 1997. センダイウイルス遺伝子操作系の確立と展開. *ウイルス*, 47, 133-144.

菅沼 明彦, 高山 直秀, 柳澤 如樹, 2013. ヒト狂犬病症例集 2008-2012, in: 山田 章雄. (Eds.), 厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染

症研究事業「ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究」, 東京.

高山 直秀, 2000. ヒトの狂犬病 忘れられた死の病, 時空出版, 東京.