

京都大学	博士（人間・環境学）	氏名	吉川 禄助
論文題目	Risk analysis of iatrogenic endogenous retrovirus infection by vaccination (ワクチン接種による内在性レトロウイルス医原性感染の危険性解析)		
(論文内容の要旨)			
レトロウイルスは一本鎖プラス鎖RNAをゲノムとして保持しているが、複製の過程で自身の逆転写酵素によりウイルスゲノムRNAをDNAに変換し、宿主ゲノム内に組み込む事が知られている。レトロウイルスはその伝播様式及び標的細胞の違いから外来性及び内在性レトロウイルス(ERV)に二分される。前者は体細胞に感染しウイルス粒子を介して個体間で水平伝播するが、後者は生殖細胞に感染し宿主ゲノムの一部として親から子へ垂直伝播する。多くの哺乳類は自身のゲノム内にERVゲノムを保持しており、ヒトにおいては全ゲノムの約8%がERV由来とされている。ERVは太古の昔に宿主ゲノムに組み込まれた外来性レトロウイルスとされており、長い年月を経て多くはゲノム内に変異が入り不活性化されているとされるが、稀に感染性を有し、ウイルス粒子を形成して新たな宿主に感染し病原性を発現するものがある。ギボンザルに白血病を引き起こすギボン白血病ウイルスはその一例であり、元来はげっ歯類のERVであったとされている。 全てのネコ属は感染性ERVであるRD-114ウイルス（以下RD-114）を保有している。RD-114はネコ体内では不活性であると考えられているが、培養細胞では時に活性化し、感染性のウイルス粒子を産生する。2010年に、申請者はネコ腎臓由来株化細胞(CRFK細胞)を用いて製造された抗イヌウイルス疾患弱毒生ワクチンに、RD-114と受容体干渉する感染性のレトロウイルス(RD-114様ウイルス)が迷入している事を報告した(Miyazawa and Yoshikawa <i>et al.</i>, J. Virol)。 本論文において、申請者はRD-114様ウイルスの性状解析やワクチンへの迷入ルートの解明、更には、イヌへの感染性を細胞及び個体レベルで解析する事を目的とし、以下の研究を行った。 1章では、CRFK細胞及び抗イヌウイルス疾患弱毒生ワクチン由来のRD-114様ウイルスの全塩基配列及び感染性クローンの作製を行うために、CRFK細胞培養上清又は抗イヌウイルス疾患弱毒生ワクチンをヒト横紋筋肉種由来株化細胞に接種し、ウイルス分離を行った。更に、感染細胞よりゲノムDNAを抽出し、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)によりRD-114様ウイルスのプロウイルスを増幅し、全塩基配列を決定、CRFK細胞由来RD-114様ウイルスから感染性分子クローンを作製した。その結果、RD-114様ウイルスはこれまで知られていたRD-114と同一である事が明らかとなった。 2章および3章では、多くの抗イヌウイルス疾患弱毒生ワクチン中に含まれる免疫原であるイヌパルボウイルス(CPV)がCRFK細胞を用いて分離・弱毒化されていることから、ワク			

チン製造過程でネコ由来細胞を使用しないにも関わらず、製品中にRD-114が迷入する可能性を検討した。その結果、これら種ウイルス及びワクチンへの、感染性RD-114の迷入を明らかにした。

4章では、RD-114のイヌ細胞における複製能を明らかにするため、イヌ腎臓由来初代培養細胞に本ウイルスを接種したところ、高効率に複製する事が明らかとなった。また、RD-114が感染の際に用いる標的細胞の受容体が中性アミノ酸トランスポーターであるASC T1及びASCT2である事を明らかにした。

5章ではRD-114のイヌ個体への感染性を検証するためにイヌ接種試験を行った。全身検索により、血液、精巣、脾臓及び腸間膜リンパ節からウイルスが検出され、抗ウイルス抗体産生も認められた。しかし、末梢血単核球(PBMC)からウイルスは再分離されず、ウイルス血症も見られなかった。PBMCにおいてAPOBEC3Hやtetherin/BST2といった宿主由来レトロウイルス増殖抑制因子が発現し、本ウイルス複製を抑制する可能性を検討した所、これら抑制因子が本ウイルス複製を阻害する事が明らかとなった。

以上から、イヌはRD-114の複製を液性免疫や抗レトロウイルス因子により制御すると考えられた。しかし、全てのイヌがRD-114複製を効果的に制御するか不明であり、かつ、宿主の複製抑制機構を回避する変異体ウイルス出現の可能性も否定出来ない。そのため、RD-114不含のワクチンを製造する事は急務である事が明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

多くの哺乳類は自身のゲノム内にレトロウイルス由来のゲノムを保有しており、これらは内在性レトロウイルス (ERV) と呼ばれている。ERVは太古の昔に宿主の生殖細胞に感染した外来性レトロウイルスであり、多くは長い年月を経て不活性化されている。しかし、感染性を有したERVも未だ存在し、そのようなERVは稀にウイルス粒子を形成して新たな宿主に感染し、病原性を発現する危険性があることが知られている。

すべてのネコ属は感染性ERVであるRD-114ウイルス (以下RD-114) を保有している。RD-114は個体内では不活性化していると考えられるが、ネコ腎臓由来株化細胞 (CRFK細胞) を含むいくつかの培養細胞では活性化し、感染性のRD-114様ウイルスを培養上清中に放出することが知られている。

近年、様々なウイルス性疾病を予防するために多様なワクチンが開発されてきた。それらのワクチンは異種動物由来の細胞を用いて製造されている。抗イヌウイルス疾患弱毒生ワクチンも例外ではなく、ネコ由来CRFK細胞がワクチン抗原調製に用いられている。そのため、これらのワクチンに感染性のRD-114様ウイルスが迷入する危険性がある。2010年、申請者はCRFK細胞を用いて製造された抗イヌウイルス疾患弱毒生ワクチン中に感染性のRD-114様ウイルスが迷入していることを報告した (Miyazawa and Yoshikawa *et al.*, J. Virol)。しかし、RD-114様ウイルスの性状やイヌへの感染性及び迷入経路に関し未だ不明な点が多い。そのため、申請者はこれらを解明するため本博士論文にまとめられた以下の研究を行った。

申請者は初めに、CRFK細胞及び上記の抗イヌウイルス疾患弱毒生ワクチン由来RD-114様ウイルスの塩基配列の決定および感染性分子クローンの作製を目的とし、培養上清又はワクチンをヒト横紋筋肉種由来株化細胞に接種し、ウイルス分離を行った。その後、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) を用いて、分離したRD-114様ウイルスのプロウイルスDNAを増幅し、全塩基配列を決定した。その結果、RD-114様ウイルスはこれまでに報告されているRD-114と塩基配列がほぼ完全に一致していたことから、CRFK細胞及びワクチンに含まれているRD-114様ウイルスはRD-114そのものであることを明らかにした。また、CRFK細胞由来のRD-114の感染性分子クローンの作製に成功した。このクローンは今後、RD-114のウイルス学的解析において大変有用なツールになると考えられる。

続いて、ワクチンへのRD-114の新たな迷入ルートに関して検討した。抗イヌウイルス疾患弱毒生ワクチンに免疫原として含まれているイヌパルボウイルス2型 (CPV-2) の多くは分離・弱毒化にあたり異種細胞であるCRFK細胞を用いていることから、申請者はCPV-2に着目した。CRFK細胞を用いて分離・弱毒化されたCPV-2種ウイルスおよび製造にネコ由来細胞を使用していないCPV-2含有抗イヌウイルス疾患弱毒生ワクチンへの感染性RD-114の迷入を、PCR及びLacZマーカーレスキューアッセイにより検索した。その結果、CPV-2の種ウイルスおよび生ワクチンへの感染性RD-114迷入が判明した。ERVの迷入ルートを新たに解明したことは今後の安全なワクチン製造戦略の観点から非常に意義深いと考えられる。

更に申請者は、イヌへのRD-114の感染性を細胞及び個体レベルで検討した。まず初めにイヌ腎臓由来初代培養細胞及びイヌ胸腺由来株化細胞におけるRD-114の複製能をLacZマーカーレスキューアッセイにより検討した。その結果、RD-114は両細胞で効率よく複製することを明らかにした。RD-114はヒト細胞への感染に際し、中性アミノ酸トランスポーターの一種であるASCT1及びASCT2を受容体として用いることが知られている。そこで、申請者はイヌASCT1及びASCT2がRD-114の受容体として機能するか検討した。その結果、RD-114はヒトでの場合と同様、イヌASCT1及びASCT2を利用する事が

明らかとなった。次にイヌ個体におけるRD-114の複製能を検証するために、申請者は2頭の雄イヌの腹腔及び精巣、2頭の雌イヌの腹腔に本ウイルスを接種した。その結果、4頭中3頭で血液における本ウイルス感染が確立された。また、腸間膜リンパ節、脾臓及び精巣にウイルス感染した個体も見られた。更に、全個体において抗RD-114抗体が誘導された。しかし、血液で確立された感染は一過性であり、末梢血単核球(PBMC)や骨髓よりウイルスが再回収されなかった事から、RD-114は血球系の細胞で複製能が低い可能性が示唆された。そこで、PBMCにおけるRD-114の複製能を検討したところ、感染するが、複製能が極めて低い事が明らかとなった。更に、この原因の一つとしてAPO BEC3HおよびBST2と言った宿主抗レトロウイルス因子が本ウイルスを制御する可能性を提示した。このことから、イヌはRD-114に感染しうるが、宿主抗レトロウイルス因子等の自然免疫や液性免疫等の獲得免疫により複製制御していると考えられた。

以上、申請者は本学位論文において、抗イヌウイルス疾患弱毒生ワクチンへのRD-114の迷入ルートを解明し、当該ウイルスのイヌ個体への感染性を明らかにした。更に、イヌ個体においては自然免疫並びに獲得免疫によりRD-114の複製が阻害されることを示した。しかし、これらの結果はワクチン中にRD-114が迷入していても問題ないということを示唆してはいない。レトロウイルスは非常に変異しやすく、一端イヌで高効率に複製する変異を獲得すれば多くのイヌに感染が拡大する可能性がある事から、申請者はワクチン中に感染性のERVが迷入することは出来る限り避けるべきであると結論した。

本研究において、申請者は異種動物細胞で調製したワクチンの接種により未知のERVが種間感染する可能性を示唆した。このことはヒトを含むイヌ以外の動物種を対象とした抗ウイルス疾患ワクチンにおいても問題となる可能性があり、今後、より安全なワクチン製造戦略を策定する上で非常に重要な研究である。また、申請者はRD-114のイヌ細胞における受容体及び本ウイルス複製を阻害する因子(APOBEC3HやBST2)を世界で初めて同定したが、これらの結果は今後、万が一イヌにワクチン接種等によりRD-114が種間感染し、病原性を発揮した際の治療方法の確立につながる非常に有意義な研究である。

申請者は本論文の一部の内容を、すでに国際学術誌(Journal of Clinical Microbiology, Biologicals, Journal of Veterinary Medical Science, Journal of General Virology)において公表しており、その価値は当該分野の研究者にも高く評価されている。このように、本学位論文は、自然と人間との自立的な関わりの限界特性を明らかにし、自然環境動態の将来予測を行うための方法論と実際に教育研究することを目指して設立された相関環境学専攻自然環境動態論講座にふさわしい内容を備えたものと言える。

よって本論文は博士(人間・環境学)の学位論文として価値有るものと認める。また平成25年1月28日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降