



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular Basis of Pathogenicity of a Rabies Virus Street Strain
Author(s)	川口, 虹穂
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第16955号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16955
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99800
Type	doctoral thesis
File Information	Nijiho_Kawaguchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：川口 虹穂

Name: Nijiho Kawaguchi

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Molecular Basis of Pathogenicity of a Rabies Virus Street Strain

（狂犬病ウイルス街上毒の病原性の分子基盤に関する研究）

狂犬病は、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属する狂犬病ウイルス（Rabies virus: RABV）によって引き起こされ、致死的な神経症状を主徴とする人獣共通感染症である。狂犬病は、古くから知られる感染症の一つであるにも関わらず、RABV の病原性発現機序は未だ十分には解明されていない。本感染症はワクチンによって発症を予防できる一方、発症後の有効な治療法は確立されておらず、発症した人及び動物の致死率はほぼ 100%に至る。現在でも一部の清浄国・地域を除き世界中に分布しており、特にアジア・アフリカ地域の発展途上国を中心に、年間約 5 万 9,000 人が狂犬病によって死亡していると推定されている。このように、狂犬病の流行は依然として国際社会において公衆衛生上極めて重要な問題であり、本感染症を効果的に制御するためには、新規治療法及びより効果的な予防法の確立が不可欠である。

RABV の病原性は、ウイルスが末梢の咬傷部位から中枢神経系へ到達する「神経侵襲性（neuroinvasiveness）」と、中枢神経系内で拡散し神経症状を引き起こす「神経病原性（neurovirulence）」という二つの能力によって規定される。これまでに、RABV の病原性に関する研究の多くは主に神経病原性に焦点が当てられてきた一方で、神経侵襲性、すなわち末梢感染の成立から中枢神経系への移行機序に関しては、未だ知見が乏しい。その主たる要因として、従来の RABV 研究の多くが固定毒を用いて実施されてきたことが挙げられる。RABV は、野外で流行している街上毒と、ワクチン株や実験室株などの固定毒に大別される。固定毒は細胞や動物組織での継代を経ることで、街上毒と比較して潜伏期間の短縮や病態の均一化が認められる反面、神経侵襲性が著しく減弱しているなど、街上毒とは異なる性状を示す。したがって、固定毒を用いた研究で得られた知見が、必ずしも街上毒の病原性を反映しているとは限らない。このことから、自然感染における狂犬病の病態形成、特に末梢から中枢神経系への侵入機構を解明するためには、実際に野外で流行している RABV を用いた研究が極めて重要となる。本研究では、この課題に取り組むべく、RABV 街上毒

の病原性発現機序、特に筋細胞への感染性（筋指向性：myotropism）及び神経侵襲性を規定する分子基盤の解明を目的とした。

第一章では、フィリピンで犬による咬傷後に日本で狂犬病を発症した輸入症例から 2020 年に分離された街上毒である Toyohashi 株のウイルス学的性状を解析するために、本株のリバースジェネティクス（RG）システムの確立を試み、ウイルスゲノム由来の全長 complementary DNA から感染性ウイルスの作出に成功した。ウイルス回収過程における培養細胞での増殖に伴い、細胞適応変異による性状変化が生じる可能性が懸念されたが、再構成された組換え Toyohashi 株（rToyo）は、培養細胞において親株と同程度の増殖性を示した。さらに、マウスを用いた感染実験においても、rToyo は、固定毒である Challenge virus standard（CVS）株と比較して高い神経侵襲性並びに約 7 日間長く不定な潜伏期を示し、街上毒特有の性状を保持していた。次に、RABV の転写及び複製の場として機能するネグリ小体様構造（Negri-body like structures）の細胞内動態を解析するため、Toyohashi 株の *phosphoprotein*（*P*）遺伝子に蛍光蛋白質 mCherry 遺伝子を融合させた組換えウイルス（rToyo-P-mCherry）を作製した。タイムラプス顕微鏡を用いた生細胞イメージングを実施した結果、組換えウイルス感染細胞の細胞質内に mCherry 陽性のネグリ小体様構造が形成され、経時的に蓄積していく動態を可視化することに成功した。以上より、本研究で確立した RG システムが、RABV 街上毒の複製及び病原性の分子基盤を解明するための有用なツールであることが示された。

第二章では、第一章で確立した RG システムを活用し、Toyohashi 株の筋指向性及び神経侵襲性を規定するウイルス因子の同定とメカニズムの解析を実施した。まず、街上毒 Toyohashi 株と固定毒 CVS 株間で筋指向性及び神経侵襲性を比較した。筋芽細胞株並びにマウス後肢筋組織を用いたウイルス増殖能の評価と、後肢筋肉内接種したマウスの生存率解析の結果、Toyohashi 株は CVS 株と比較して、筋芽細胞内でのより効率的な複製、マウス後肢筋組織における高い感染性、及び筋肉内接種後のマウスにおける高い致死率を示した。以上の結果より、街上毒である Toyohashi 株が固定毒である CVS 株よりも高い筋指向性及び神経侵襲性を有していることを確認した。続いて、この表現型に寄与する RABV 遺伝子を特定するため、RG システムを用いて、Toyohashi 株と CVS 株間で各構成遺伝子（*N*, *P*, *M*, *G*, 及び *L*）を一つずつ入れ替えた組換えキメラ RABV を作製した。*in vitro* 及び *in vivo* での評価の結果、Toyohashi 株に CVS 株由来の *G* または *L* 遺伝子を導入した組換え RABV では、筋指向性が低下し、末梢感染後の病原性も著しく減弱した。対照的に、CVS 株に Toyohashi 株由来の *G* 及び *L* 遺伝子を導入した組換え RABV は筋指向性が増強し、末梢感染後の致死率も上昇した。このことから、*G* 及び *L* 遺伝子が Toyohashi 株の筋指向性及び神経侵襲性を規定する重要な因子であることが特定された。さらに、シュードタイプウイルスやミニゲノムアッセイを用いて Toyohashi 株の *G* 及び *L* 蛋白質の筋感染における機能を解析した。その結果、Toyohashi 株の *G* 蛋白質は、CVS 株の *G* 蛋白質より筋細胞へのウイルス侵入を促進する機能を有していた。また、Toyohashi 株の *L* 蛋白質は、CVS 株の *L* 蛋白質より感染筋細胞内におけるウイルスゲノム複製及び転写効率を高める機能を有していた。以上の結果から、*G* 蛋白質による筋細胞への効率的な侵入と、*L* 蛋白質による感染筋細胞内での複製・転写促進

が協調的に作用することで、Toyohashi 株は筋細胞で効率よく増殖し、その結果として高い神経侵襲性を発揮していることが示唆された。

本研究では、臨床分離された街上毒である Toyohashi 株の詳細なウイルス学的解析を可能にする RG システムを確立し、これまで未解明であった街上毒の筋指向性及び神経侵襲性の分子基盤に新たな知見を提供した。本研究成果は、野外感染下での RABV 感染過程をより正確に理解するために街上毒を用いることの重要性を強く示唆しており、RABV 街上毒に共通する分子機構の解明や、ウイルス侵入・複製過程を標的とした新規治療法及び予防法の開発へと繋がることが期待される。