

## 牛パラインフルエンザウイルス 3 型を用いたウイルスベクターの開発

松浦 遼介 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 竹内 薫 (筑波大学 医学医療系)

## 【背景・目的】

牛パラインフルエンザウイルス 3 型 (BPIV3) はエンペロペを有するマイナス一本鎖 RNA ウイルスであり、パラミクソウイルス科レスピロウイルス属に属する。BPIV3 はヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (HPIV3) の近縁種であることからヒト用ワクチンのプラットフォームとして注目され、多くのヒト用組換えウイルスの候補株が作製されている。

BPIV3 はウイルスベクターとして望ましい特徴をいくつか有している。一つは宿主ゲノムにインテグレートしないことである。これによって、ベクターとして働いているウイルスが除去された後にウイルスのゲノムが細胞内で発現する危険性や、遺伝子の変異によって、がん化する危険性などを考慮する必要がない。

また、BPIV3 は経鼻的に感染し、効率良く局所に免疫グロブリン A を、全身に免疫グロブリン G を誘導することができる。これによって、注射の必要のない安全で簡単な経鼻ワクチン接種をすることができ、突発的な感染症の発生に対しても予防接種をすることができると考えられる。

本研究では牛の病原体の抗原タンパク質遺伝子を BPIV3 のウイルスゲノムに組み込み、感染細胞で発現させることによって、抗体の産生を誘導し、免疫を与える動物用ワクチンの作製を目的とした。

## 【方法】

## (1) 組換え BPIV3 の完全長 cDNA のプラスミド構築

当研究室の大倉らによって作製された BPIV3 の完全長 cDNA (Ohkura et al, Virology, 2015, in press) の N と P 遺伝子の間に、牛の病原体の抗原タンパク質の遺伝子を PCR で増幅し、制限酵素 *Mlu*I と *Sal*I を用いて組込んだ。その後、プラスミドを大腸菌 (*Stbl2*) にトランスフォーメーションし、大量精製を行った。

## (2) 感染性ウイルスの回収

T7 RNA ポリメラーゼ発現ワクチニアウイルス株 (MVA-T7) を MDBK 細胞に感染させ、その後、T7 プロモーター下流に BPIV3 の N、P、L タンパク質の遺伝子を組込んだプラスミドと (1) で作製したプラスミドを Lipofectamine® 2000 を用いて HeLa 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 3 日後に HeLa 細胞培養液の上清を取り、MDBK 細胞の培養液に加えた。その後、MDBK 細胞の培養液の上清を回収し、感染性組換え BPIV3 を回収した。回収したウイルスは RT-PCR によって、抗原タンパク質の遺伝子を有していることを確認した。また、希釈したウイルス液を MDBK 細胞の培養液に加え、50% の細胞が細胞変性を起こす濃度を調べ (TCID<sub>50</sub> 法)、回収したウイルス液の力価を測定した。

(3) ウェスタンブロッティングによる抗原タンパク質の発現の確認

まず MDBK 細胞に (2) で回収した感染性ウイルスを感染させ、4 日後に細胞を細胞溶解液を用いて溶解した。その後、抗原タンパク質に特異的に結合する抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行い、BPIV3 に組込んだ抗原タンパク質が正常に発現をしているかを確認した。

## (4) ハムスターへの接種実験

5 週令のハムスター 8 頭に回収したウイルスを両方の鼻から 50  $\mu$ l ずつピペットマンを用いて経鼻接種 ( $1.0 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/匹) した。感染後 21 日目に採血を行い、血清を分離した。

## (5) 血清の中和抗体価の測定

100 TCID<sub>50</sub> の BPIV3 にハムスターより回収した血清を 96-well plate に希釈しながら加え、MDBK 細胞に添加し、細胞変性を指標に中和抗体価を測定した。その際に、血清は非働化したものとしていないものを用いた。

## 【結果】

牛の病原体の抗原タンパク質を有する BPIV3 の完全長プラスミドを構築し、感染性ウイルスの回収に成功した。

ウェスタンブロッティングによって、抗原タンパク質が発現していることを確認した。

しかしながら、ハムスターに接種したところ、BPIV3 に対する中和抗体価は上昇したものの、目的の病原体に対する抗体価は上昇しなかった。

## 【考察】

ウェスタンブロッティングの結果から、外来抗原の発現は確認していたので、抗原タンパク質が認識されなかったと考えられる。そこで、抗原タンパク質に BPIV3 の F タンパク質の膜貫通ドメインと細胞質内ドメインを付加し、正しく細胞膜上に発現されるように設計した。これによって、抗原タンパク質がウイルス粒子上にも取り込まれる可能性もあり、免疫原性が高くなることが期待される。

## 【今後の展望】

抗原タンパク質の細胞における発現はウェスタンブロッティングによって確認をすることができたが、そのタンパク質が抗原として働くためには、細胞膜表面に発現していること、あるいは細胞外へと分泌をされていることが必要となってくる。そのため、蛍光抗体法を用いて抗原タンパク質が細胞のどこに存在するかを確認する。また、組込んだ抗原タンパク質が生体内で抗原として働くかを調べる必要がある。そのため、再度、ハムスターへの接種実験を行い、血清を回収し、中和抗体価を測定することが必要となってくる。ハムスターで中和抗体価の上昇が確認できれば、次は動物衛生研究所で牛を用いた接種実験を行う予定である。