

氏名（本（国）籍）	伊 藤 由 紀（愛知県）
主 指 導 教 員 名	岐阜大学 教授 杉 山 誠
学 位 の 種 類	博士（獣医）
学 位 記 番 号	獣医博甲第307号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月15日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	狂犬病ウイルス糖蛋白質が関与する病原性発現機構の 解明に関する研究
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 山 田 章 雄 副査 帯広畜産大学 教 授 鈴 木 宏 志 副査 岩 手 大 学 教 授 重 茂 克 彦 副査 東京農工大学 教 授 本 多 英 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 杉 山 誠

論 文 の 内 容 の 要 旨

狂犬病は致死的な神経症状を起こすウイルス性人獣共通感染症である。治療法は未だに確立されておらず、発症した人や動物は100%死亡する。したがって、本症の制御のために、治療法の開発が世界的に望まれている。しかし、治療法を確立するために必要な狂犬病ウイルスの病原性発現機構については未だ不明な点が多い。以上を背景に、申請者は、狂犬病の制御を念頭に本ウイルスの病原性発現機構について研究を行った。

狂犬病ウイルス固定毒の西ヶ原株は、脳内接種によりマウスに致死感染を引き起こす強毒株である。一方、西ヶ原株を鶏胚及び種々の培養細胞で計285代継代することにより作出されたRC-HL株は、マウスに非致死感染を引き起こす弱毒株である。本ウイルス糖(G)蛋白質の242, 255及び268位のアミノ酸を西ヶ原株と同一のアミノ酸に置換したRC-HL株変異ウイルス、R(G 242/255/268)株は、西ヶ原株と同様、強毒性状を示すことが明らかになっている。したがって、西ヶ原株及びRC-HL株の病原性の違いにはG蛋白質の上記3アミノ酸が関与することが明らかとなっている。しかし、これらのアミノ酸変異が病原性発現にどのように影響しているかは不明である。そこで本研究では、RC-HL株及びR(G 242/255/268)株の生物性状、ならびに両株の感染に対する宿主の免疫応答を比較・解析することによって、狂犬病ウイルスのG蛋白質が関与する病原性発現機構の解明を試みた。

第一章では、RC-HL株及びR(G 242/255/268)株感染マウスの脳の組織学的な比較解析を行った。まず、狂犬病ウイルスN蛋白質に対する免疫染色を実施した結果、感染マウスの脳

では RC-HL 株の感染細胞のほとんどが海馬領域に分布するのに対し, R(G 242/255/268)株感染細胞は海馬だけでなく, 大脳皮質及び視床でも認められた。このことから, マウスの脳内において, 強毒の R(G 242/255/268)株の感染が弱毒の RC-HL 株の感染よりも広範囲に拡がること示された。次に, 両株感染における炎症反応を比較するため, HE 染色により感染マウスの脳における組織学的変化を観察した。感染 3 日目では, 両株感染マウスの脳内において, 顕著な組織学的変化は認められなかった。一方, 感染 5 日目の RC-HL 株感染マウスの脳内では血管周囲への強い細胞浸潤が認められた。これに対し, R(G 242/255/268)株感染マウスの脳内における炎症細胞の浸潤程度は, RC-HL 株感染マウスの脳に比べて軽度であった。以上より, RC-HL 株感染が R(G 242/255/268)株感染よりも強く炎症を誘導したことから, 感染マウスの脳内における両株の拡がりの違いに炎症誘導能が関与することが示唆された。

第二章では, 病原性に関与することが知られている cell-to-cell 感染効率, アポトーシス誘導能, 侵入効率などのウイルスの生物性状について両株で比較し, マウスの脳内における両株感染の拡がりの違いに関与する要因を検討した。両株の cell-to-cell 感染効率を比較するため, 感染 72 時間後のフォーカス面積を測定した。その結果, R(G 242/255/268)株のフォーカス面積 (平均 0.09 mm^2) は RC-HL 株のフォーカス面積 (平均 0.04 mm^2) よりも有意に広がった ($p < 0.001$)。一方, 両株のアポトーシス誘導能及び *in vitro* における増殖能と侵入効率に差は認められなかった。これらの結果から, cell-to-cell 感染効率がマウスの脳内における両株の感染の拡がりに関与している可能性が考えられた。

第三章では, 両株の感染が宿主の免疫関連遺伝子の発現にどのような変化をもたらすのかを検討した。まず, 明瞭な炎症反応が出現する前の感染 3 日目のマウスの脳について, マイクロアレイ解析を行い, 脳内の両株の感染による宿主の遺伝子発現の変化について網羅的に比較した。自然免疫に重要なインターフェロン (IFN) 及び多くのケモカインの遺伝子発現量は, R(G 242/255/268)株感染マウスの脳よりも RC-HL 株感染マウスの脳内において 2 倍以上高かった。次に, 各種細胞マーカーに対する免疫染色を行ったところ, RC-HL 株及び R(G 242/255/268)株のほとんどが神経細胞に感染していることが示された。そこで, 両株に感染した神経系 NT2-N 細胞における免疫関連遺伝子の発現量を比較した結果, RC-HL 株感染細胞における *IFN- β* , *CXCL10*, *CCL5* 及び *CXCL1* の遺伝子発現量は, R(G 242/255/268)株感染細胞よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。これらの成績は, RC-HL 株の感染における *IFN- β* 及びケモカイン遺伝子の発現誘導能が R(G 242/255/268)株の感染に比べて高いことを示している。また, 両株感染マウスの脳における *IFN- β* 及びケモカイン遺伝子の発現量の差は, 感染神経細胞における免疫応答の違いに起因することが強く示唆された。

以上の成績から, 狂犬病ウイルス G 蛋白質の 242, 255 及び 268 位のアミノ酸は同ウイルスの cell-to-cell 感染効率, ならびに宿主の免疫応答に影響を及ぼすことが明らかとなった。その結果として, 上記の 3 アミノ酸はマウスの脳内における感染拡大効率に影響を及ぼし, 結果的に病原性を決定していると考えられた。これらの知見は, 狂犬病ウイルスの病原性発現機構の解明だけでなく, 狂犬病の治療法確立のための有用な基礎情報と考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、マウスに対する病原性が異なる狂犬病ウイルス固定毒株の生物性状及び両株の感染に対する宿主の免疫応答を比較・解析することによって、狂犬病ウイルスの G 蛋白質が関与する病原性発現機構の解明を試みた。

第一章では、弱毒性の RC-HL 株及び RC-HL 株 G 蛋白質の 242, 255 及び 268 位のアミノ酸を変異させた強毒性の R(G 242/255/268)株感染マウスの脳の組織学的な比較解析を行った結果、R(G 242/255/268)株の感染が RC-HL 株の感染よりも広範囲に脳内に拡がることが示された。次に、両株の感染における脳の炎症反応を比較し、RC-HL 株感染が R(G 242/255/268)株よりも強く炎症を誘導することを明らかにした。以上より、感染マウスの脳内における両株の拡がりの違いに炎症誘導能が関与することが示唆された。

第二章では、cell-to-cell 感染効率、アポトーシス誘導能などの両株の生物性状について比較し、マウスの脳内における両株感染の拡がりの違いに関与する要因を検討した。その結果、cell-to-cell 感染効率がマウスの脳内における両株の感染の拡がりに関与している可能性を示した。

第三章では、両株の感染が宿主の免疫関連遺伝子の発現にどのような変化をもたらすかを検討した。マイクロアレイ解析により、自然免疫に重要なインターフェロン (IFN) 及び多くのケモカインの遺伝子発現量は、R(G 242/255/268)株感染マウスの脳よりも RC-HL 株感染マウスにおいて高いことが示された。次に、両株のほとんどが神経細胞に感染していることが明らかになったことから、両株に感染した神経系培養細胞における免疫関連遺伝子の発現量を比較した。その結果、RC-HL 株の感染における *IFN* β 及びケモカイン遺伝子の発現誘導能が R(G 242/255/268)株の感染に比べて高いことが示された。したがって、両株感染マウスの脳における *IFN* β 及びケモカイン遺伝子の発現量の差は、感染神経細胞における免疫応答の違いに起因することが強く示唆された。

以上の成績から、狂犬病ウイルス G 蛋白質の 242, 255 及び 268 位のアミノ酸は同ウイルスの cell-to-cell 感染効率、ならびに宿主の免疫応答に影響を及ぼすことが明らかとなった。その結果として、上記の 3 アミノ酸はマウスの脳内における感染拡大効率に影響を及ぼし、結果的に病原性を決定していると考えられた。これらの知見は、狂犬病ウイルスの病原性発現機構の解明だけでなく、狂犬病の治療法確立のための有用な基礎情報と考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Amino acid substitutions at positions 242, 255 and 268 in rabies virus glycoprotein affect spread of viral infection
著 者 名 : Ito, Y., Ito, N., Saito, S., Masatani, T., Nakagawa, K., Atoji, Y. and Sugiyama, M.

学術雑誌名 : Microbiology and Immunology

巻・号・頁・発行年 : 印刷中

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Amino acid at position 95 of the matrix protein is a
cytopathic determinant of rabies virus

著 者 名 : Mita, T., Shimizu, K., Ito, N., Yamada, K., Ito, Y., Sugiyama,
M. and Minamoto, N.

学術雑誌名 : Virus Research

巻・号・頁・発行年 : 137 (1) : 33-39, 2008