

氏名 (本 (国) 籍)	EL-HABASHI, Nagwan Mahmoud Mohamed (エジプト・アラブ共和国)
主 指 導 教 員 名	岐阜大学 教授 柳 井 徳 磨
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 3 1 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 2 年 9 月 1 4 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	Studies on Pathogenicity and Infectivity of Equine Herpesvirus 9 (EHV-9) in Rodents (げっ歯類におけるウマヘルペスウイルス 9 型 (EHV-9) の病原性および感染性に関する研究)
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 福 士 秀 人 副査 帯 広 畜 産 大 学 教 授 松 井 高 峯 副査 岩 手 大 学 教 授 重 茂 克 彦 副査 東 京 農 工 大 学 教 授 三 森 国 敏 副査 岐 阜 大 学 教 授 柳 井 徳 磨 副査 岐 阜 大 学 教 授 鈴 木 正 嗣

論 文 の 内 容 の 要 旨

ウマヘルペスウイルス 9 型 (EHV-9) は、集団脳炎により斃死したトムソンガゼルより分離された新型のウマヘルペスウイルスである。このウイルスは患動物に神経の壊死、神経細胞核内封入体形成およびグリア集族を引き起こし、血清学的にはウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) に近縁であるが、DNA 指紋解析では EHV-1 および他のウマヘルペスウイルスとは異なる。EHV-9 のアミノ酸配列は EHV-1 とは 93%、EHV8 とは 92% 相同とされた。EHV-9 の感染性は多くの動物で認められており、致死性の急性脳炎がマウス、ラット、ハムスター、山羊、豚、猫、犬およびマーモセットでの経鼻接種でみられた。しかし、EHV-9 がどのような経路で鼻腔から中枢神経系 (CNS) に到達するのか、時間はどれくらい要するのか、あるいは妊娠動物における感染の影響などは不明のままである。本研究では、EHV-9 のげっ歯類における感染性を、侵入門戸および感染経路の点から検討し、病原発現の差異を明らかにし、その病理発生を明らかにした。

第一章では、EHV-9 のハムスター (成獣および乳呑み仔) における経鼻接種における鼻炎および急性脳病変の病理発生を調べ、次いで 2% 硫酸亜鉛 (zinc sulphate) の前処置による脳炎の防御効果を検討した。ハムスター成獣に 10^6 PFU/mL を $50 \mu\text{L}$ 経鼻投与したところ、接種 12-24 h 後にはウイルスは鼻腔粘膜に接着し神経細胞での増殖が認められた。接種 48 h では鼻腔粘膜に重度で

広範囲なびらんが形成され、嗅球には脳炎が認められた。2% 硫酸亜鉛で鼻腔に前処置した動物では鼻炎と脳炎の発生はみられなかった。乳呑みハムスターに EHV-9 を経鼻接種したところ、鼻腔から櫛骨、脳に至る頭部全体のパノラマ像が得られ、EHV-9 抗原が鼻腔の嗅覚受容細胞には接種 12 h 後に発現し、48 h 後には同神経のほとんど、さらに嗅球への伸展が確認された。頭部矢状断でのウイルス抗原の経時的分布から、嗅神経がウイルスの侵入門戸である可能性が示唆された。

第二章では、EHV-9 のハムスターにおける種々の接種経路における感染性および病理発生について検討した。ハムスターに経鼻、点眼、経口、腹腔内および静脈内接種を行ったところ、経鼻接種例の全例、経口および腹腔内接種例の 25% が接種 3, 6 あるいは 9 日に神経症状を示した。経鼻、点眼、経口および腹腔内接種例では神経細胞の壊死、囲管性細胞浸潤、グリア集簇、封入体形成、髄膜におけるリンパ球浸潤を特徴とする脳炎が認められ、ウイルス抗原が変性神経細胞にみられた。脳病変と EHV-9 抗原の分布様式は接種経路により異なり、経鼻接種例では、海馬などよりも嗅球で抗原陽性細胞が多く認められたが、経口および腹腔内接種例では逆の傾向が認められた。点眼により感染した動物では嗅脳に軽度で限局性の病変が認められたことから、ウイルスが視神経を通過して CNS に到達したと考えられた。この研究から EHV-9 は静脈内以外の他の種々の接種経路からも感染が成立することが明らかになった。

第三章では、感染の影響を妊娠動物（マウスおよびハムスター）で調べた。妊娠マウスおよびハムスターの妊娠前期あるいは後期に EHV-9 をそれぞれ経鼻投与したところ、接種動物は軽度から重度の神経症状を示し、斃死あるいはサイズが小さい胎児を出産した。妊娠第 1 期に EHV-9 を接種したマウス 3 例およびハムスター 4 例の全てで、著明な母体側血管洞の拡張、栄養膜細胞の萎縮、および栄養芽層の中間層の壊死からなる種々の程度の胎盤異常、これに加えて、第 3 妊娠期に接種されたマウスおよびハムスターでは、子宮内膜の血管にうっ血および胎児側毛細血管の壊死と組織破壊が種々の程度に認められた。ウイルス抗原は第 1 妊娠期に接種された母体の脳および胎児の肺、さらに胎盤の栄養芽層の中間帯に認められた。胎盤病変はハムスターよりもマウスの方がより軽度であった。最終妊娠期間に接種されたマウスおよびハムスターはいずれも第 1 妊娠期間に接種された動物よりも重度の病変を示した。妊娠動物において EHV-1 および EHV-9 により引き起こされた組織変化はよく類似していた。胎児の斃死は必ずしも胎児への EHV-9 感染のみに起因するのではなく、胎盤の血管への侵襲による致死的障害などが複合的に加わった結果引き起こされたと推測された。

以上のことから、EHV-9 は経鼻感染では急性の脳炎が短時間に引き起こされ、経鼻感染以外の経路の種々の感染経路からも CNS に到達すること、さらに妊娠動物が感染した場合、流産が発生する可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、ウマヘルペスウイルス 9 型 (EHV-9) のげっ歯類における感染性を、侵入門戸、感染経路の点から検討し、それぞれの病理発生を明らかにした。

第一章では、EHV-9 のハムスター（成獣および乳呑み仔）の経鼻接種における鼻炎および急性脳病変の病理発生を調べ、2% 硫酸亜鉛の前処置による脳炎防御効果を検討した。成獣に 10^6 PFU/mL を 50 μ L 経鼻投与したところ、接種 12-24 h 後にウイルスは鼻腔粘膜に接着し神経細胞でウイルス増殖が認められた。接種 48 h では鼻腔粘膜に重度広範囲なびらん形成され、嗅球に脳炎が認められた。2% 硫酸亜鉛で鼻腔に前処置した動物では鼻炎と脳炎の発生はなかった。乳呑み仔に接種したところ、鼻腔から櫛骨、脳に至る頭部全体のパノラマ像で、EHV-9 抗原が接種後 12 h に鼻腔の嗅覚受容細胞に発現し、48 h 後には同神経のほとんど、さらに嗅球への伸展が確認された。頭部矢状断でのウイルス抗原の経

時的分布から、嗅神経がウイルスの侵入門戸である可能性が示唆された。

第二章では、EHV-9のハムスターにおける種々の接種経路における感染性および病理発生について検討した。ハムスターに経鼻、点眼、経口、腹腔内および静脈内接種を行ったところ、経鼻接種例の全例、経口および腹腔内接種例の25%が接種3、6および9日に神経症状を示した。経鼻、点眼、経口および腹腔内接種例で神経細胞の壊死、囲管性細胞浸潤、グリア集族、封入体形成、髄膜におけるリンパ球浸潤を特徴とする脳炎が認められ、ウイルス抗原が変性神経細胞にみられた。抗原の分布様式は接種経路により異なり、経鼻接種例では、海馬などよりも嗅球で抗原陽性細胞が多く認められたが、経口および腹腔内接種例では逆の傾向が認められた。点眼により感染した動物では嗅脳に軽度で限局性の病変が認められたことから、ウイルスが視神経を通過してCNSに到達したと考えられた。これらのことから、EHV-9は静脈内以外の他の種々の接種経路からも感染が成立することが明らかになった。

第三章では、EHV-9感染の影響を妊娠動物（ハムスターおよびマウス）で調べた。妊娠マウスおよびハムスターの妊娠前期あるいは後期にEHV-9をそれぞれ経鼻接種したところ、接種動物は軽度から重度の神経症状を示し、斃死あるいはサイズが小型の胎児を出産した。妊娠第1期にEHV-9を接種したマウス3例およびハムスター4例の全てで、著明な母体側の血管洞の拡張、栄養膜細胞の萎縮および栄養芽層の中間層の壊死からなる種々の程度の胎盤異常、これに加えて、第3妊娠期に接種されたマウスおよびハムスターでは、子宮内膜の血管にうっ血および胎児側毛細血管の壊死と組織破壊が種々の程度に認められた。ウイルス抗原は第1妊娠期に接種された母体の脳および胎児の肺、さらに胎盤の栄養芽層の中間帯に認められた。胎盤病変はハムスターよりもマウスの方がより軽度であった。最終妊娠期間に接種されたマウスおよびハムスターはいずれも第1妊娠期間に接種された動物よりも重度の病変を示した。妊娠動物においてEHV-1およびEHV-9により引き起こされた組織変化はよく類似していた。胎児の斃死は必ずしも胎児へのEHV-9感染のみに起因するのではなく、胎盤の血管への侵襲による致死性の障害などが複合的に加わった結果引き起こされたと推測された。

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に値すると判断した。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Experimental intranasal infection of equine herpesvirus 9 (EHV-9) in suckling hamsters: kinetics of viral transmission and inflammation in the nasal cavity and brain
著 者 名 : El-Habashi, N., EL-Nahass, E., Fukushi, H., Hibi, D., Sakai, H., Sasseville, V. and Yanai, T.
学術雑誌名 : Journal of NeuroVirology
巻・号・頁・発行年 : 16 (3) : 242-248; 2010
- 2) 題 目 : Study on the infectivity of equine herpesvirus 9 (EHV-9) by different routes of inoculation in hamsters
著 者 名 : El-Habashi, N., Mirakami, M., EL-Nahass, E., Hibi, D., H., Sakai, Fukushi, H., Sasseville, V. and Yanai, T.
学術雑誌名 : Veterinary Pathology
巻・号・頁・発行年 : 47 (5) : 1-7, 2010
- 3) 題 目 : Effect of equine herpesvirus 9 (EHV-9) infection in pregnant mice and hamsters

著者名 El-Habashi, N., EL-Nahass, E., Fukushi, H., Hibi, D., Sakai, H. and Yanai, T.

学術雑誌名: Journal of Comparative Pathology

巻・号・頁・発行年: 2010 in press

既発表学術論文

1) 題 目: Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) may not become infected with equine herpesvirus (EHV-9)

著者名: Kodama, A., Yanai, T., Kubo, K., El Habashi, N., Kasem, S., Sakai, S., Masegi, T., Fukushi, H., Kuraishi, T., Yoneda, M., Hattori, S. and Kai, C.

学術雑誌名: Journal of Medical Primatology

巻・号・頁・発行年: 2010 in press