

氏名 (本 (国) 籍)	杉 浦 尚 子 (東京都)		
主 指 導 教 員 名	岐阜大学 教授 山 田 章 雄		
学 位 の 種 類	博士 (獣医)		
学 位 記 番 号	獣医博甲第 3 5 4 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 4 年 3 月 1 3 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	狂犬病ウイルスの発症病理に関わる宿主遺伝子応答に関する研究		
審 査 委 員	主査	岐阜大学 教授	杉 山 誠
	副査	帯広畜産大学 教授	猪 熊 壽
	副査	岩手大学 教授	重 茂 克 彦
	副査	東京農工大学 教授	白 井 淳 資
	副査	岐阜大学 教授	山 田 章 雄
	副査	岐阜大学 教授	石 黒 直 隆

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

狂犬病ウイルス固定毒 CVS-11 株は末梢感染性を有し、街上毒の場合と同様の四肢麻痺症状をマウスに引き起こし、死に至らしめる。CVS-11 株を末梢接種したマウスでは、感染後 4 日目から四肢の麻痺症状が出現し、脊髄にネクロシス像が認められるのに対し、脳内接種では麻痺の誘導が認められず、海馬のアポトーシスが認められるものの、脊髄には著変がないことが報告されており、脊髄における病理組織学的変化が麻痺症状に関わっている可能性が示唆されている。本研究では、狂犬病の病態に関わる宿主遺伝子群の解明を目的として、CVS-11 株末梢接種ならびに脳内接種後のマウス中枢神経系 (CNS) における遺伝子発現を比較解析した。

第一章では、CVS-11 株を末梢接種した C57BL/6J マウスの CNS における遺伝子発現を、マイクロアレイを用い網羅的に解析した。マウスで麻痺症状が認められた感染 7 日後の脳と脊髄では、C-C と C-X-C ファミリーを含む炎症性ケモカイン、炎症性サイトカイン、インターフェロン (IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) 等、自然免疫に関連する遺伝子の発現が有意に上昇しており、インターフェロン刺激伝達系、抗原提示ならびに補体系が脳および脊髄で活性化していることが明らかとなった。また、グランザイムおよびパーホルンの遺伝子発現の上昇が認められたが、これらは細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導するアポトーシスに関連する因子であり、CVS-11 株感染マウスの CNS における CTL の活性化を示唆している。これらの成績は過去の報告と若干異なっており、本研究で用いたウイルス株の弱毒化がやや進んでいる可能性が示唆された。過去の報告と

の違いは継代歴の差による可能性が高く、CVS-11 株の使用にあたっては、継代歴に十分な注意を払う必要があると考えられた。しかし、街上毒で認められる特徴の多くは CVS-11 株感染においても認められることから、本ウイルス株を街上毒のモデルとすることは妥当であると考えられた。また、脊髄特異的に変化していた遺伝子の中には神経細胞の機能維持に関わる遺伝子が含まれていた。

第二章では、麻痺症状に関与する遺伝子群が存在するかを知るために、末梢接種ならびに脳内接種したマウスの CNS をマイクロアレイ解析ならびに病理組織学的解析に供した。脳内接種群と末梢接種群のいずれの脳と脊髄において、炎症性ケモカイン、炎症性サイトカイン、インターフェロン等の自然免疫に関連する遺伝子の発現が有意に上昇していたが、特に、CD3, CD8, パーホリン, グランザイムをコードする遺伝子の発現が末梢接種群の脊髄において上昇しており、CTL の活性化を示唆するものと考えられた。また、末梢接種群の脊髄の病理組織学的解析では、活性化したミクログリアやアストログリアの集簇がみられ、ウイルス抗原と TUNEL 陽性細胞も多く観察された。一方、脳内接種群の脊髄では、病理学的変化はほとんど確認されなかった。これらのことから、脊髄の病変が麻痺症状の有無に関与している可能性が示唆された。

第三章では、第一章で確認された脊髄における神経細胞の機能維持に関わる遺伝子の発現の変化が、狂犬病の病態にどう関わるかを検討した。脳内接種群と末梢接種群の脊髄を比較すると、後者では、知覚、認知、刺激伝達等に関わる遺伝子の発現が有意に低下していた。また、G タンパク質結合受容体に関連する一連の遺伝子群、細胞間のシグナル伝達系や細胞を構成する遺伝子の発現の低下も認められたことから、CNS におけるシグナル伝達が阻害され、神経症状を引き起こしている可能性が考えられた。本章で検出された個々の遺伝子が狂犬病の病態とどのように関連しているかは、今後の重要な課題であると考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

申請者は、狂犬病ウイルス野外株の病態を理解するため、固定毒ではあるものの末梢感染によりマウスに対して致死性を示す CVS-11 株をモデルに用い、野外株の病理発生の更なる理解を試みた。その際、四肢麻痺を示す末梢接種と麻痺を生じさせない脳内接種を比較することとした。

まず申請者は末梢から CVS-11 株をマウスに投与し、感染後の脊髄ならびに脳における遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果麻痺症状がみられた感染後 7 日目の脳と脊髄では、自然免疫に関連する、炎症性ケモカイン、炎症性サイトカイン、インターフェロン (IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) 等の遺伝子発現が有意に上昇しており、インターフェロン刺激伝達系、抗原提示ならびに補体系が脳および脊髄で活性化していることを明らかにした。更に、脳および脊髄においては、グランザイムおよびパーホリンの遺伝子発現の上昇が認められることを見出した。グランザイムおよびパーホリンは細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導するアポトーシスに関連する因子であることから、CVS-11 株感染マウスの CNS において、CTL が活性化している可能性を示した。これらの成績はこれまでの報告と若干異なっており、本研究で用いたウイルス株の弱毒化がやや進んでいることによると推察している。しかし、街上毒で認められる特徴は、CVS-11 株感染においても認められることから、本ウイルス株を街上毒モデルとすることは妥当であるものの、ウイルス株の継代歴には留意する必要があるとしている。

次に申請者は麻痺症状のみられる末梢接種と、麻痺症状のみられない脳内接種後の中枢神経系 (CNS) についてマイクロアレイ解析ならびに病理組織学的解析を実施した。いずれの接種経路でも脳と脊髄における炎症性ケモカイン、炎症性サイトカイン、インターフェ

ロン等の自然免疫に関連する遺伝子発現の有意な上昇を明らかにした。末梢接種群の脊髄において、特に、CD3, CD8, パーホリン, グランザイムをコードする遺伝子の発現上昇が顕著であることから、CTL の活性化を示唆した。また、末梢接種群の脊髄では活性化したミクログリアやアストログリアの集簇、ウイルス抗原細胞ならびに TUNEL 陽性細胞も多数観察されるのに対し、脳内接種群では、病理学的変化はほとんど確認されないことから、脊髄における病態が、麻痺症状の有無に関与している可能性に言及している。

更に脳内接種群の脊髄と比較して、末梢接種群の脊髄では、知覚、認知、刺激伝達等に関わる遺伝子の発現が特異的に低下していること、G タンパク質結合受容体に関連する一連の遺伝子群、細胞間のシグナル伝達系や細胞を構成する遺伝子の発現の低下が認められることを示し、CNS におけるシグナル伝達系が阻害され、神経症状を引き起こしている可能性を示唆した。

本研究の成果は複雑な狂犬病の病理発生機構を理解するための新たな知見を提供するものであると考えられた。

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価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Gene expression analysis of host innate immune responses in the central nervous system following lethal CVS-11 infection in mice  
著 者 名 : Sugiura, N., Uda, A., Inoue, S., Kojima, D., Hamamoto, N., Kaku, Y., Okutani, A., Noguchi, A., Park, C. H. and Yamada, A.  
学術雑誌名 : Japanese Journal of Infectious Diseases  
巻・号・頁・発行年 : 64(6):463-472, 2011

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification  
著 者 名 : Boldbaatar, B., Inoue, S., Sugiura, N., Noguchi, A., Orbina, J. R. C., Demetria, C., Miranda, M. E. and Yamada, A.  
学術雑誌名 : Japanese Journal of Infectious Diseases  
巻・号・頁・発行年 : 62(3):187-191, 2009
- 2) 題 目 : Molecular epidemiology of rabies virus in Mongolia, 2005-2008  
著 者 名 : Boldbaatar, B., Inoue, S., Tuya, N., Dulam, P., Batchuluun, D., Sugiura, N., Okutani, A., Kaku, Y., Noguchi, A., Kotaki, A. and Yamada, A.  
学術雑誌名 : Japanese Journal of Infectious Diseases  
巻・号・頁・発行年 : 63(5):358-363, 2010