

氏名（本（国）籍）	江 川 和 孝（東京都）
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 西 條 政 幸
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博甲第502号
学位授与年月日	平成30年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4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	Development of Pteropine Orthoreovirus Infection Mouse Model and its Application for Evaluation of Therapeutics and Preventive Measures (プテロパインオルソレオウイルス感染マウスモデルの 開発とその治療・予防法の評価への応用)
審 査 委 員	主査 岩 手 大 学 教 授 村 上 賢 一 副査 帯広畜産大学 教 授 猪 熊 壽 副査 岩 手 大 学 准教授 彦 野 弘 一 副査 東京農工大学 教 授 水 谷 哲 也 副査 岐 阜 大 学 教 授 浅 井 鉄 夫 副査 岐 阜 大 学 教 授 西 條 政 幸 副査 岐 阜 大 学 准教授 福 士 秀 悦

学位論文の内容の要旨

プテロパインオルソレオウイルス (Pteropine orthoreovirus, PRV) は、レオウイルス科オルソレオウイルス属に分類されるコウモリ由来のウイルスである。2006 年以降、マレーシアおよびインドネシアで呼吸器症状を示した患者から PRV が分離されている。日本においても、2007 年にインドネシアから帰国後に呼吸器感染症を発症した患者からも分離されている。PRV はこれまで呼吸器症状を示した患者からのみ分離されていることから、呼吸器感染症の原因ウイルスであると考えられている。しかし、PRV の詳細な病原性は明らかにされていない。一方、PRV はコウモリからも分離されている。これらがヒトから分離された PRV と同様の病原性を示すのかは不明である。マレーシアでは呼吸器感染症状を呈した患者から PRV 遺伝子が検出され、ベトナムの住民では PRV 抗体が検出されていることから、PRV 感染症は東南アジアで広く蔓延している可能性がある。PRV 感染症に対する効果的な治療や予防法は、これまで報告されていない。

本研究では、BALB/c マウスを用いて PRV 感染動物モデルを開発するとともに、PRV の病原性、PRV 感染における宿主免疫応答、および抗 PRV 血清による PRV 感染症治療効果を解析、評価した。また、PRV 感染症治療薬となり得る化合物を探索するために、化合物ライブラリーを用いたスクリーニング法を新たに構築した。

第1章では、ヒトから分離された PRV 株 (PRV-MB) を BALB/c マウスに経鼻接種経路で感染させた時の病原性を、ウイルス学的、病理学的手法により解析した。致死性の有無、

半数致死量 (LD₅₀) の算出, 各臓器中のウイルス量の定量, および病理組織学的変化について評価した。PRV-MB は BALB/c マウスに致死性を示し, LD₅₀ は 6.8×10^3 PFU/head であった。ウイルス RNA および感染性ウイルス粒子は, 鼻腔, 咽頭, 肺で検出され, 特に肺において顕著なウイルス増殖が認められた。肺におけるウイルス RNA 量, およびウイルス力価は, 各々 6.9×10^8 copies/0.1g, および 6.4×10^4 PFU/0.1g であった。また, 肺では急性肺炎の病理所見が認められ, 細気管支から肺胞においてウイルス抗原が検出された。

第 2 章では, コウモリから分離された PRV 株 (PRV-Samal-24) を経鼻接種経路で感染させた時の BALB/c マウスにおける病原性を第 1 章と同様の手法により解析し, PRV-MB の病原性と比較した。また, 非致死量の PRV を感染させた BALB/c マウス (非致死量 PRV 感染マウス) を用いて, PRV 感染により誘導される宿主免疫応答について評価した。血清中の中和抗体価の測定, および致死量の PRV を感染させた時の生死について観察した。致死量の PRV を感染させた BALB/c マウス (致死量 PRV 感染マウス) に抗 PRV 血清 (中和抗体価; 10, 240) を腹腔内投与し, その治療効果についても評価した。PRV-Samal-24 は, BALB/c マウスに対して, PRV-MB と同程度のウイルス量で同様の呼吸器感染症を引き起こした。LD₅₀ は 4.2×10^3 PFU/head であった。肺におけるウイルス RNA 量, およびウイルス力価は, 各々 3.7×10^8 copies/0.1g, 9.5×10^3 PFU/0.1g であった。病理組織学的解析では, 肺でのみ炎症反応や壊死, ウイルス抗原が検出された。非致死量 PRV 感染マウスでは, PRV に対する中和抗体価が上昇 (640-2560 倍) し, それに引き続いて致死量の PRV を感染させても死亡することはなかった。また, 致死量 PRV 感染マウスに抗 PRV 血清を投与することにより致死率が低下した。

第 3 章では, 化合物ライブラリーを用いたスクリーニング法を確立し, PRV 増殖抑制活性のある化合物を探索した。PRV 増殖阻害効果を見出された化合物の 90%増殖抑制濃度 (IC₉₀) を算出し, 細胞毒性および PRV 感染マウスにおける治療効果についても評価した。化合物 (100 μM) と PRV (multiplicity of infection, 1.0×10^{-2}) を含んだ培養液を用いて Huh7 細胞を 48 時間培養し, 細胞変性効果の出現により抗 PRV 活性を評価した。細胞毒性は細胞増殖試薬 (WST-1) により生存細胞率を算出することで評価した。Ribavirin と Gemcitabine hydrochloride が PRV の増殖抑制効果を発揮した。Ribavirin の PRV に対する 90%増殖抑制濃度 (IC₉₀) は, Huh7 細胞および Vero 細胞において, それぞれ 100 μM と 369 μM であった。致死量 PRV 感染マウスに ribavirin を腹腔内投与しても, 致死率の改善は認められなかった。一方, Gemcitabine hydrochloride の PRV に対する IC₉₀ は, Huh7 細胞および Vero 細胞において, それぞれ 0.8 μM と 0.3 μM であった。Gemcitabine hydrochloride は, 0.1 μM の濃度で Vero 細胞に対し著しい細胞毒性を示したことから, PRV 感染症治療候補化合物とはならないと判断された。

本研究により, ヒト由来 PRV は BALB/c マウスに呼吸器感染症を引き起こすことを明らかにされた。PRV に関する研究に有用な PRV 感染 BALB/c マウスモデルが確立された。コウモリ由来 PRV のマウスにおける病原性は, ヒト由来 PRV のそれと同等であった。本研究で開発された PRV 感染 BALB/c マウスモデルは, 治療薬やワクチンの有効性評価に有用である。また, 化合物ライブラリーを用いた PRV 増殖阻害化合物のスクリーニング法が構築された。PRV 感染 BALB/c マウスモデルおよび PRV 感染症治療候補薬の探索法の開発により, PRV 感染症の病原性や病態生理の解明, および治療薬やワクチンの効果の評価が可能となった。

審 査 結 果 の 要 旨

プテロパインオルソレオウイルス (Pteropine orthoreovirus, PRV) は、レオウイルス科オルソレオウイルス属に分類されるコウモリ由来のウイルスである。2006 年以降、マレーシアおよびインドネシアで呼吸器症状を示した患者から PRV が分離されている。日本においても、2007 年にインドネシアから帰国後に呼吸器感染症を発症した患者から分離された。PRV が引き起こす疾患や病態は明らかにされていない。マレーシアでは呼吸器感染症状を呈した患者から PRV 遺伝子が検出され、ベトナムの住民では PRV 抗体が検出されていることから、PRV 感染症は東南アジアで広く蔓延している可能性がある。PRV 感染症に対する効果的な治療や予防法はない。

本研究の目的は、病態解明、治療・予防法の開発研究に必須の PRV 感染症の動物モデル開発である。BALB/c マウスを用いて PRV 感染動物モデルを開発するとともに、PRV の病原性、PRV 感染における宿主免疫応答、および抗 PRV 血清による PRV 感染症治療効果を解析、評価した。また、PRV 感染症治療薬となり得る化合物を探索するために、化合物ライブラリーを用いたスクリーニング法を新たに構築した。

第 1 章では、ヒトから分離された PRV 株 (PRV-MB) をそれぞれ BALB/c マウスに経鼻接種経路で感染させた時の病原性を、ウイルス学的、病理学的手法により解析した。PRV-MB の半数致死量 (LD_{50}) は、 6.8×10^3 PFU/head であった。感染性ウイルス粒子は、鼻腔、咽頭、肺で検出され、特に肺において顕著なウイルス増殖が認められた。肺では急性肺炎の病理所見が認められ、細気管支から肺胞においてウイルス抗原が検出された。

第 2 章では、コウモリから分離された PRV 株 (PRV-Samal-24) を経鼻接種経路で感染させた時の BALB/c マウスにおける病原性を第 1 章と同様の手法により解析し、PRV-MB の病原性と比較した。 LD_{50} は 4.2×10^3 PFU/head であった。肺におけるウイルス RNA 量、およびウイルス力価は、各々 3.7×10^8 copies/0.1g、 9.5×10^3 PFU/0.1g であった。病理組織学的解析では、肺でのみ炎症反応や壊死、ウイルス抗原が検出され、PRV-MB の場合と同様であった。今回開発されたモデルは、ワクチン開発や治療法開発の評価に有用であることも証明した。

第 3 章では、化合物ライブラリーを用いたスクリーニング法を確立し、PRV 増殖抑制活性のある化合物を探索した。Ribavirin と Gemcitabine hydrochloride が PRV の増殖抑制効果を発揮した。しかし、致死量 PRV 感染マウスに Ribavirin を腹腔内投与しても、致死率の改善は認められなかったことから、Ribavirin には効果がないとの結論が得られた。一方、Gemcitabine hydrochloride の PRV に対する増殖抑制効果が認められたものの、細胞毒性も強く、PRV 感染症治療候補化合物とはならないと判断された。

本研究により、世界で先駆けて PRV に関する研究に有用な PRV 感染マウスモデルが、確立された。本研究で開発された感染動物モデルは、治療薬やワクチンの有効性評価に有用である。PRV 感染症の病原性や病態生理の解明、および治療薬やワクチンの効果の評価が可能となった。

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: Virulence, pathology, and pathogenesis of Pteropine orthoreovirus (PRV) in BALB/c mice: Development of an animal infection model for PRV

著 者 名: Egawa, K., Shimojima, M., Taniguchi, S., Nagata, N., Tani, H., Yoshikawa, T., Kurosu, T., Watanabe, S., Fulishi, S. and Saijo,

M.

学術雑誌名 : PLoS Neglected Tropical Diseases

巻・号・頁・発行年 : 11 (12) : e0006076, 2017

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus antigen detection using monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein

著 者 名 : Fukuma, A., Fukushi, S., Yoshikawa, T., Tani, H., Taniguchi, S., Kurosu, T., Egawa, K., Suda, Y., Singh, H., Nomachi, T., Gokuden, M., Ando, K., Kida, K., Kan, M., Kato, N., Yoshikawa, A., Kitamoto, H., Sato, Y., Suzuki, T., Hasegawa, H., Morikawa, S., Shimojima, M. and Saijo, M.

学術雑誌名 : PLoS Neglected Tropical Diseases

巻・号・頁・発行年 : 10 (4) : e0004595, 2016

- 2) 題 目 : First isolation and characterization of Pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines

著 者 名 : Taniguchi, S., Maeda, K., Horimoto, T., Masangkay, J. S., Puentes-pina, R. Jr., Alvarez, J., Eres, E., Cosico, E., Nagata, N., Egawa, K., Singh, H., Fukuma, A., Yoshikawa, T., Tani, H., Fukushi, S., Tsuchiaka, S., Omatsu, T., Mizutani, T., Une, Y., Yoshikawa, Y., Shimojima, M., Saijo, M. and Kyuwa, S.

学術雑誌名 : Archives of Virology

巻・号・頁・発行年 : 162 (6) : 1529-1539, 2017