

氏名（本（国）籍）	Kripitch SUTUMMAPORN（タイ王国）		
主指導教員氏名	東京農工大学 准教授 古 谷 哲 也		
学 位 の 種 類	博士（獣医学）		
学 位 記 番 号	獣医博甲第560号		
学位授与年月日	令和2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	東京農工大学		
学 位 論 文 題 目	Studies on the Pathogenesis of Feline Morbillivirus in Kidneys of Infected Cats (ネコモルビリウイルス感染ネコ腎臓における病原性に関する研究)		
審 査 委 員	主査	東京農工大学	教 授 水 谷 哲 也
	副査	帯広畜産大学	教 授 小 川 晴 子
	副査	岩 手 大 学	教 授 村 上 賢 二
	副査	東京農工大学	准教授 古 谷 哲 也
	副査	岐 阜 大 学	教 授 猪 島 康 雄
	副査	岐 阜 大 学	准教授 福 士 秀 悦

### 学位論文の内容の要旨

ネコモルビリウイルス（FeMV）は2012年に発見された比較的新しいウイルスであるが、最初の報告において、FeMV感染と尿細管間質性腎炎との関連が示唆されたため、他の動物に比較して明らかに腎疾患の割合が高いネコにおける腎臓疾患の原因因子として、非常に注目された。また当時、ネコを主たる宿主とするパラミクソウイルス科ウイルスは見つかっていなかった中でのFeMVの発見は注目を集めた。一般にモルビリウイルス属のウイルスは病原性と感染性が高いが、FeMVは生物学上の性質が他のモルビリウイルスと大きく異なり、塩基配列の系統樹解析においても、他のモルビリウイルスからの距離が大きい。FeMVは世界中の多くの場所において検出の報告がされているが、FeMVと腎臓病の関係に関しては、解釈の異なる報告が存在しており、FeMVの病原性についての信頼性の高い報告はなかった。本研究の目的は、組織免疫染色を用いて、ネコ腎臓組織中のFeMV抗原の検出により、ネコの腎臓における病理学的変化とFeMV感染の相関の有意性を調べる事であり、また、同様の組織において、FeMVの病原性機構を探るため、感染細胞でアポトーシスの誘導が見られるかどうかを、TUNELアッセイと抗-FeMV特異抗体の2重染色によって調べる事である。

本研究の第一章では、複数の獣医クリニックから提供いただいた異なった症例ネコ計38匹のホルマリン固定パラフィン包埋腎臓組織を用い、組織病理学的切片の病理学的観察と、2種類の抗-FeMV蛋白質抗体を用いた免疫学的手法によって、FeMV感染の有無を判定し、FeMV感染とネコ腎臓組織の病理学的変化の相関を調べた。ネコ腎臓組織内のFeMV抗原は、FeMVのP蛋白質、およびN蛋白質に対する2種類の抗体による免疫化学染色と蛍光抗体法を行う事により検出した。腎臓組織の病理学的変化は、尿細管、糸球体、間質の部位の違

いにおける形態的变化を、数値化により評価し、観察組織領域の病変を含む割合に基づいて 0～3 点によって評価した。この結果、FeMV 抗原の検出は、尿細管萎縮、管腔拡張、尿円柱などの尿細管病変や、炎症性細胞浸潤および腎線維症などの間質病変と、強い有意な相関を示すことが見つかった。それに対し、糸球体では、FeMV 抗原と強い相関を示したのは、糸球体硬化症だけであった。このことにより、FeMV 抗原の存在は、特に尿細管と間質の病理学的変化に有意に相関していることが示唆され、これは、本研究における、尿細管における FeMV 局在とも合致していた。加えて、本研究で確認された FeMV 抗原と有意の相関があった病理学的変化は、一般的に、慢性腎臓疾患に観察される典型的な病理学的変化である。さらに FeMV 感染が免疫複合体を形成するかを調べるため、蛍光免疫法によってネコ IgG の局在の検出を行ったところ、糸球体房や腎臓組織間質腔での局在 5 例の観察が見られたが、それらの中で FeMV 抗原陽性であったのは 2 例のみであり、FeMV 抗原とネコ IgG の共局在は見られなかった。このことにより、FeMV 感染はいくつかのネコの腎臓組織における病理学的変化と強い相関が見られることが分かったが、免疫複合体の形成に関しての FeMV の直接的な関与は示唆されなかった。

本研究第二章においては、FeMV の病原性機構解明を試みた。第 1 章では、FeMV 抗原の検出がネコ腎臓において、特に尿細管および間質病変に関連していることが分かったが、FeMV 感染がどのようにしてこれらの病変起こすかについての機構は全く明らかでない。そこで、本研究では、ネコ腎臓組織切片において、TUNEL アッセイと抗-FeMV 特異抗体による FeMV 抗原検出のための間接免疫蛍光法を行い、FeMV 感染、非感染グループ間で、アポトーシスが誘導された細胞数を比較した。第 1 章で用いた腎臓検体中の 38 例の検体切片を、TUNEL アッセイと抗-FeMV P 蛋白質抗体による蛍光抗体法により 2 重染色した。また、細胞からのシグナルであることを確認するために、DAPI による細胞核の染色も行った。蛍光顕微鏡による観察の結果、FeMV 陽性組織グループでは、アポトーシス細胞数が有意に高いことが分かった。さらに、同様の組織において、多くの細胞で、アポトーシスシグナルと FeMV 抗原の共局在が観察された。これらの結果は、FeMV 感染が感染猫の腎臓組織細胞においてアポトーシスを誘導することにより病理学的変化を起こしている可能性を示唆しており、FeMV の病原性機構について、世界で初めての報告である。

結論として、本研究の結果は、FeMV 感染が、炎症性細胞浸潤、糸球体硬化症、尿細管萎縮、線維症などの病理学的変化と強い相関を持っていることを示した。また、FeMV と強い相関をもっている病変は、慢性腎炎において観察されるものであり、FeMV 感染の慢性腎疾患における関与を強く示唆するものである。そして、FeMV 感染腎臓組織中におけるアポトーシス細胞の数は非感染組織よりも有意に多く、アポトーシスシグナルと FeMV 抗原の共局在も見られた。これらの結果は、FeMV 感染ネコ腎臓組織における病原性機構の 1 つが、ウイルス感染細胞におけるアポトーシスの誘導であることを示唆している。FeMV の病原性機構については今後の研究が必須であるが、本研究結果は、FeMV の病原性機構についての世界で初めての知見であり、今後、FeMV の予防と治療によるネコの腎臓疾患の改善のために、大きな進歩である。

## 審 査 結 果 の 要 旨

ネコモルビリウイルス (FeMV) は 2012 年に発見された比較的新しいウイルスであるが、初めての検出報告において、FeMV 感染と尿細管間質性腎炎との関連が示唆されたため、注目されている。FeMV は生物学上の性質が他のモルビリウイルスと大きく異なる。FeMV と腎臓病の関係に関しては、解釈の異なる報告が存在しており、FeMV の病原性についての信頼

性の高い報告は少ない。本研究では、免疫組織染色により、ネコ腎臓組織中の FeMV 抗原検出を行い、ネコの腎臓における病理学的変化と FeMV 感染の相関を調べた、また、FeMV の病原性機構解明のため、同様の組織において、アポトーシスの誘導を調べた。

第一章では、計 38 匹のホルマリン固定ネコ腎臓組織を用い、免疫染色により、FeMV 感染とネコ腎臓組織の病理学的変化の相関を調べた。この結果、FeMV 抗原の検出は、尿細管萎縮、管腔拡張、尿円柱などの尿細管病変や、炎症性細胞浸潤および腎線維症などの間質性病変と、強い相関を示すことが明らかになった。また、FeMV 抗原と有意の相関があった病理学的変化は、慢性腎臓疾患に伴う変化と一致していた。FeMV 感染と免疫複合体形成の関係を知るために、ネコ IgG の局在を調べたところ、FeMV 抗原とネコ IgG の明らかな共局在は見られなかった。

第二章では、FeMV の病原性機構解明のため、ネコ腎臓組織切片において、TUNEL アッセイと、抗 FeMV 特異抗体による FeMV 抗原検出のための間接免疫蛍光法を行い、FeMV 感染、非感染グループ間で、アポトーシスが誘導された細胞数を比較した。蛍光顕微鏡による観察の結果、FeMV 陽性組織グループでは、アポトーシス細胞数が有意に高いことが分かった。さらに、同様の組織において、多くの細胞でアポトーシスシグナルと FeMV 抗原の共局在が観察された。これらの結果は、FeMV の病原性機構に関しての、世界で初めての報告である。

結論として、本研究の結果は、FeMV 感染が、炎症性細胞浸潤、糸球体硬化症、尿細管萎縮、線維症などの病理学的変化と強い相関を持っていることを示した。そして、FeMV 感染腎臓組織中におけるアポトーシス細胞の数は非感染組織よりも有意に多く、アポトーシスシグナルと FeMV 抗原の共局在も見られたことから、FeMV 感染ネコ腎臓組織における病原性機構の 1 つが、ウイルス感染細胞におけるアポトーシスの誘導である可能性が示唆された。FeMV の病原性機構解明については今後の研究が必須であるが、本研究結果は、FeMV の病原性機構についての世界で初めての知見であり、今後、FeMV の予防と治療によるネコの腎臓疾患の改善のために、大きな進歩である。

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 : Association of feline morbillivirus infection with defined pathological changes in cat kidney tissues
- 著 者 名 : Sutummaporn, K., Suzuki, K., Machida, N., Mizutani, T., Park, E., Morikawa, S. and Furuya, T.
- 学術雑誌名 : Veterinary Microbiology
- 頁・巻・号・発行年 : 228:12-19, 2019

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Development of an ELISA for serological detection of feline morbillivirus infection
- 著 者 名 : Arikawa, K., Wachi, A., Imura, Y., Sutummaporn, K., Kai, C., Park, E., Morikawa, S., Uematus, Y., Yamaguchi, T. and Furuya, T.
- 学術雑誌名 : Archives of virology

頁・卷・号・発行年：162(8):2421-2425, 2017