

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小谷 治

サフォードウイルス (Saffold virus、以下 SAFV) は、ピコルナウイルス科 (Picornaviridae) カルジオウイルス属 (Cardiovirus) のウイルスであり、1～11 の遺伝子型が存在する。2007 年に初めて原因不明の熱患児の糞便 (1981 年に採取) から分離されたが、主に乳幼児の下痢症や呼吸器疾患と関連すると考えられており、まれに無菌性髄膜炎や急性弛緩性麻痺患児からも検出される。しかしながら、SAFV の病原性は、不明な点が多い。小谷氏の博士論文は、動物モデルを使用して、SAFV の神経病原性を明らかにすることである。まず第一章では、組織上の病原体の存在を直接明らかにするために、抗 SAFV 抗体を用いたパラフィン包埋組織標本上のウイルス抗原検出法を確立した。第二章では、病理学的手法を中心に、マウスにおける SAFV 臨床分離株の病原性を明らかにし、更に第三章では、マウス脳内継代により得られた小脳親和性を持つ SAFV を用いて、その神経病原性を明らかにした。

第一章 サフォードウイルスの病理学的診断法の確立

本章では、抗 SAFV 抗体を用いて、パラフィン包埋組織標本上のウイルス抗原を免疫組織化学法による検出法を確立することを目的とした。また、無菌性髄膜炎の主な原因となるエンテロウイルス (EV) 属との鑑別が可能かを調べるために、EV 属との交差反応性についても評価した。抗 SAFV 抗体は、SAFV 遺伝子型 3 型の JPN08-404 株を高度免疫して得られたウサギ血清を用いた。一方、抗 EV 抗体は、ドデシル硫酸ナトリウム-熱処理で変性した EV71 あるいはポリオウイルス粒子、ポリオウイルスあるいはコクサッキーウイルス B 群カプシドタンパク (VP) 1 の組換えタンパク質、ポリオウイルス非構造蛋白質 2C のペプチドタンパクをそれぞれ免疫原とした、高度免疫ウサギ血清を用いた。SAFV あるいは A 群、B 群、C 群の主な EV 感染後の培養細胞および感染マウスのホルマリン固定後パラフィン包埋組織標本を用いて免疫組織化学法により特異性と交差反応性を決定した。抗 SAFV 抗体は、SAFV 感染培養細胞中のウ

ウイルス抗原と反応し、EV 感染細胞には反応せず、抗 SAFV 抗体の特異性が明らかとなった。また、ウイルス抗原の局在は、*in situ* hybridization 法により検出した SAFV 遺伝子の局在と一致した。各抗 EV 抗体は EV 属間で多少の交差反応性が認められるものの、SAFV に対して交差反応性は示さなかった。以上の結果から、本研究で用いた抗 SAFV 抗体は特異性が高く、無菌性髄膜炎の主な原因である EV 感染との鑑別が可能であることが判明し、免疫組織化学法によるウイルス抗原の検出法が確立された。これらの抗体は、SAFV 感染症のみならず、ピコルナウイルス感染症の病理学的診断に有用である。

第二章 サフォードウイルス臨床分離株はマウスに神経病原性を有する

SAFVは稀に急性弛緩性麻痺、髄膜炎や小脳炎を発症した患児から検出あるいは分離される。しかし、このウイルスの神経病原性は不明な点が多く、その詳細に関しては全く明らかにされていない。本章では、SAFVの神経病原性に焦点をあて、新生仔ddYマウスと6週齢BALB/cマウスを用いてSAFV3型の二つの臨床分離株の病原性について、病理学的、ウイルス学的、免疫学的に比較解析した。まず、神経毒力と神経親和性を評価する目的で、2008年に無菌性髄膜炎を発症した患児の髄液から分離されたJPN08-404株（AM株）と上気道炎を発症した患児の咽頭拭い液から分離されたGunma/176/2008（UR株）を新生仔ddYマウスに脳内接種したところ、AM株は一過性の運動失調を引き起こし、UR株は体重増加率が低下した。しかしながら、いずれも感染も致死性ではなかった。病理組織学的には、共通して小脳と脳室周囲にウイルス抗原が検出されたが、AM株は主に小脳のバグマングリア細胞、UR株は主に脳室周囲組織の神経上皮細胞、口腔粘膜や歯胚組織の上皮細胞にウイルス抗原陽性細胞が存在した。いずれも接種3-5日をピークとして血中にウイルスゲノムが出現したが、UR株のコピー数が有意に高かった。また、脳内では両株とも感染3日目よりウイルスゲノムコピー数が高くなり、一過性のウイルス増殖とそれに伴う1型インターフェロン（IFN）の誘導を確認した。ただし、3、5日目の大脳・脳幹ではUR株、5日目の小脳ではAM株がウイルスゲノム量の高値を示したが、どの部位においても1型IFNの発現はUR株接種群が高く、炎症所見と一致した。次に、神経侵入性を評価するために、新生仔ddYマウスに腹腔内接種したところ、二株とも接種3日目には脳室周囲と小脳にウイルス抗原

が検出され、21日目にはUR株接種群で脳実質に炎症所見が得られた。6週齢のBALB/cマウスにおける神経病原性を評価したところ、脳内接種後、いずれの株も接種3日以内に一過性の体重減少を引き起こしたが、明らかな神経症状は示さなかった。両株とも脳室周囲にウイルス抗原陽性細胞がみられたが、AM株のみ小脳に親和性を示し、1型IFNの誘導が確認された。さらに、AM株接種8日目には小脳炎所見を認めた。そこで、6週齢のBALB/cマウスに、腹腔内、静脈内、経鼻、あるいは経口感染を試みたが、いずれの経路でも、神経侵入性は確認されず、UR株では経粘膜感染が成立した。以上から、本研究で使用した二つのSAFV3型の臨床分離株は、マウスの神経細胞に親和性を示すものの、比較的弱い神経毒力を有し、新生仔マウスでは神経侵入性を発揮することが判明した。また、二つのSAFV3型株間で、異なる組織親和性と神経病原性が認められ、SAFV3型はマウスに対して神経病原性を有することが明らかとなった。

第三章 サフォードウイルス小脳継代株感染は新生仔マウスの小脳皮質形成に影響する

SAFV3型は新生仔マウスの小脳のバーグマングリア細胞に親和性を示した。このような神経親和性は、他のピコルナウイルスでは報告がない。そこで第三章では、無菌性髄膜炎患者の髄液から分離されたAM株に特に強く認められた小脳親和性に注目し、AM株の新生仔マウス小脳継代株の作出とその性状解析を試みた。AM株を脳内接種した新生仔BALB/cの3日目の小脳を採取し、その乳剤を脳内接種するという継代を五回繰り返し、最後にLLC-MK₂細胞で一代継代したものを小脳継代株（以下、AM-5Cb株）とした。継代を進めるにつれ、VP2領域に2カ所、VP3領域に1カ所のアミノ酸置換が順次、生じたが、立体構造予測の結果、VP2領域のアミノ酸置換部位は、カルジオウイルス属において、レセプター結合に関与する可能性のある領域近傍であることが判明し、VP3アミノ酸置換部位と新たに水素結合が生じることが示唆された。一方で、サル腎細胞由来LLC-MK₂細胞とヒト横紋筋肉腫由来RD細胞でのAM-5Cb株の増殖性は、親株であるAM株より良い傾向がみられたものの、ハムスター腎細胞由来BHK細胞ではAM株の増殖性より有意に低下し、さらに、マウス線維芽細胞由来L929細胞とマウス神経芽細胞腫由来Neuro-2a細胞とマウスアストログリア細胞由来KT-5細胞では、親株、継代株共に増殖性は殆ど無かった。親株及びAM-5Cb株を新生仔ddYマウスに脳内接種したところ、AM-5Cb株では、接種後2-4日の

感染早期に明らかな運動失調を示し、その後、一部の個体で水頭症を発症し、継代の結果、神経毒力が高くなったことが示唆された。病理学的には、大脳皮質、脳幹、小脳、脊髄に高頻度にウイルス抗原陽性細胞が存在し、感染に伴う広範な変性、壊死とミクログリアの強い浸潤が見られた。脳室周囲と小脳における抗原陽性細胞数は、AM株と比較して明らかに多いが、感染細胞の種類に変化は無かった。大脳・脳幹と小脳におけるウイルス量とウイルスRNAコピー数は有意に高かったことから、中枢神経系における増殖性が増加したことが判明した。これらに相関して、1型炎症性サイトカインの高発現と炎症反応の増悪が観察され、総じて神経病原性が高くなったことが明らかとなった。次に、小脳皮質構造への影響について遺伝子検索したところ、バーグマングリア細胞の分化誘導の促進に関連するHes5遺伝子の発現は、接種3日目に対照群と比較して親株が高く、継代株はより高い傾向にあり、接種21日目には、対照群と親株間では差が見られなかったが、継代株接種群ではプルキンエ細胞の成長に関連するDner遺伝子とプルキンエ細胞に関連するCaldinbin遺伝子の発現が高かった。実際に、小脳皮質組織像では、ウイルス接種群は親株、継代株とも、対照群と比較してプルキンエ細胞の神経突起の伸長が旺盛であり小脳皮質形成時のバーグマングリア細胞とプルキンエ細胞の分化・成長の制御異常が示唆された。そこで、AM-5Cb株を高ウイルス量接種したところ、21日目には小脳皮髄の境界は不明瞭となり、皮質の三層構造は破綻した。以上から、継代株は、新生仔マウスの脳室周囲細胞と小脳皮質グリア細胞への強い親和性を獲得し、大脳皮質壊死と小脳皮質形成異常を引き起こす、強い神経病原性を示すようになったと考えられた。したがって、小脳発達時におけるSAFV3型感染は、小脳皮質形成に少なからず影響をおよぼす可能性があり、今回作出した感染動物モデルは、SAFVの小脳における病原性発現機構を解明する上で有用な動物モデルと期待される。

以上のように、本論文は、動物モデルを使用し、SAFV3型の神経病原性をウイルス学的、病理学的、免疫学的に明らかにした。この動物モデルを応用することで、SAFV感染症の重症化機構の解明、抗ウイルス因子の検索に基づく新規薬剤、あるいは、新規ワクチンの開発が可能になると思われる。以上のように、本論文は神経ウイルス感染学において、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。