

博士（獣医学） 松 田 一 哉

学 位 論 文 題 名

Demonstration of Neural Transmission of
Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus

（高病原性A型トリインフルエンザウイルスの経神経伝播の証明）

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

A型インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属し、表面糖タンパクであるヘマグルチニンとノイラミニダーゼ、ならびにそれらをコードするゲノムから、血清学的および遺伝学的に亜型に分類される。これまでに15亜型のヘマグルチニンならびに9亜型のノイラミニダーゼが同定されており、いずれの亜型も自然宿主である水禽から分離されている。

ヒトでのA型インフルエンザウイルス感染症は通常、上部気道を侵す疾患であるが、脳を含む全身諸臓器への感染も報告されている。中枢神経感染は幼児や小児あるいは妊娠女性で特に重篤な病態を招き、A型インフルエンザウイルスやウイルスゲノムが脳脊髄液から、ウイルス蛋白が脳組織から分離されている。また、小児の急性壊死性脳症（小児のインフルエンザ脳症）、hemorrhagic shock and encephalopathy、ライ症候群、嗜眠性脳炎（Economo脳炎）および脳炎後パーキンソン病とインフルエンザウイルス感染との関連も示唆されている。

20世紀に人類が体験してきたA型インフルエンザによる多くの地方病性および世界的流行はH1N1、H2N1およびH3N2亜型のウイルスを原因としたが、1997年以降、アジア諸国においてH5N1亜型のウイルスによる感染が発生し、高い致死率を示している。

マウスにH5亜型の高病原性インフルエンザウイルスを経鼻接種すると呼吸器感染の後に脳幹部迷走神経中枢に主座した脳炎が発生し、病巣内にウイルス蛋白とウイルスゲノムが検出されること、ならびに、マウスに静脈内接種しても病変を形成しないことから、末梢神経、とくに迷走神経を介した中枢神経系へのウイルス伝播が示唆してきた。しかしながら、インフルエンザウイルスの経神経伝播の直接的証明はなされておらず、その伝達メカニズムも不明である。

第一部では、H5高病原性トリインフルエンザウイルスが迷走神経を介して中枢神経系へ侵入するのであれば、迷走神経を切除することによって中枢神経感染を抑えられるのではないかという仮説に基づき、あらかじめ一側の迷走神経を頸部で切除したマウスを作製し、ウイルスを経鼻接種した後のウイルス抗原、ウイルスゲノムおよび病変の広がりを経時的に検索した。迷走神経切除マウスの切除側の迷走神経節では非切除側に比べて2日遅れてウイルス抗原が検出された。この結果は、迷走神経が切断されていることによりウイルスが神経節へ到達できなかつたためであり、ウイルスが呼吸器から迷走神経節へ迷走神経を介して伝播さ

れることを示していた。

第二部では、マウスの脊髄背根神経節から得た末梢神経細胞の初代培養系を用いて H5 高病原性トリインフルエンザウイルスの経神経伝播についての検索を行った。第一章では区画培養した神経細胞、すなわち細胞体と軸索を区画化した培養系を利用して高病原性インフルエンザウイルスの軸索輸送を検索した。陽性対照として *in vivo* および *in vitro* で軸索輸送することが示されているオーエスキ一病ウイルスを、陰性対照として *in vivo* では神経向性を示さない低病原性インフルエンザウイルスを使用した。いずれのウイルスも、軸索区画に接種した 12 時間後から神経細胞体でウイルス抗原が検出された。このことから、インフルエンザウイルスが軸索輸送されることが *in vitro* で初めて証明された。高病原性インフルエンザウイルスとオーエスキ一病ウイルスでは神経細胞における感染の拡がり方に違いが認められ、両ウイルスの伝播機構が異なる可能性が示唆された。また、*in vitro* で軸索に直接的に接種した場合には、低病原性インフルエンザウイルスも軸索輸送されることが示されたが、神経細胞培養系での伝達性および感染性は低く、効率的な神経細胞間伝播にはヘマグルチニン開裂部位における連続的塩基性アミノ酸配列が関与することが示唆された。

第二章では、高病原性トリインフルエンザウイルスの経神経伝播メカニズムを解明することを目的に、細胞骨格(微小管、アクチンおよび中間径フィラメント)を選択的に阻害することによる経神経伝播への影響を調べた。陽性対照として、微小管依存性に輸送されることが示されているオーエスキ一病ウイルスを用いた。微小管、アクチンおよび中間径フィラメントの阻害薬として、それぞれ、ノコダゾール、サイトカラシン D およびアクリルアミドを使用した。オーエスキ一病ウイルスの神経細胞感染が微小管と中間径フィラメントの阻害によって有意に抑制されたのに対して、高病原性インフルエンザウイルスの感染は微小管阻害には影響されなかつた。このことから、高病原性インフルエンザウイルスがこれまでの経神経伝播ウイルスで知られている微小管依存性軸索輸送機構とは異なるメカニズムで輸送されることが示された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 梅村 孝司
副査 教授 喜田 宏
副査 教授 高島 郁夫
副査 助教授 落合 謙爾

学位論文題名

Demonstration of Neural Transmission of Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus

(高病原性A型トリインフルエンザウイルスの経神経伝播の証明)

マウスに H5 亜型の高病原性インフルエンザウイルス (HPAIV) を経鼻接種すると呼吸器感染の後に脳幹部迷走神経中枢に主座した脳炎が発生し、病巣内にウイルス蛋白とゲノムが検出され、静脈内接種では病変を形成しないことから、末梢神経、特に迷走神経を介した中枢神経系へのウイルス伝播が示唆されてきた。しかしながら、インフルエンザウイルスの経神経伝播の直接的証明はなされておらず、その伝達メカニズムも不明である。

第一部では、予め一側の迷走神経を頸部で切除したマウスに HPAIV を経鼻接種した後のウイルス抗原、ウイルスゲノム及び病変の広がりを経時的に検索した。切除側の迷走神経節では非切除側に比べて 2 日遅れてウイルス抗原が検出された。この結果は、迷走神経の切断によりウイルスが神経節へ到達できなかつたためであり、ウイルスが呼吸器から迷走神経節へ迷走神経を介して伝播されることを示していた。

第二部では、初代培養神経細胞を用いて HPAIV の経神経伝播について検索した。第一章では神経細胞の細胞体と軸索を区画化した培養系を利用して HPAIV の軸索輸送を検索した。陽性対照に微小管依存性に軸索輸送されるオーエスキー病ウイルス (PRV) を、陰性対照にマウスで神経向性を示さない低病原性インフルエンザウイルス (LPAIV) を使用した。いずれのウイルスも軸索区画に接種した後に神経細胞体でウイルス抗原が検出され、HPAIV の軸索輸送が *in vitro* で初めて証明された。神経細胞での感染拡大様式の違いから、HPAIV と PRV では伝播機構が異なる可能性が示唆された。また、軸索に直接的に接種すると LPAIV も軸索輸送されたが、その伝達性及び感染性は HPAIV に比べて低かった。

第二章では、細胞骨格の選択的阻害による経神経伝播への影響を調べた。陽性対照として PRV を用いた。PRV の神経細胞感染が微小管と中間径フィラメントの阻害によって有意に抑制されたのに対して、HPAIV 感染は微小管阻害には影響されなかった。このことから、HPAIV がこれまでの経神経伝播ウイル

スで知られている微小管依存性軸索輸送機構とは異なる機構で輸送されることが示された。

高病原性インフルエンザウイルスの経神経伝播が *in vivo* 及び *in vitro* で証明され、従来の微小管依存性輸送と異なる機構で軸索輸送されることが明らかにされた。よって審査員一同は、松田一哉氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。