

学 位 論 文 題 名

In Vivo and in Vitro Analysis of Neuropathogenicity of Equine Herpesvirus-1

（ウマヘルペスウイルス 1 型神経病原性の in vivo, in vitro 解析）

学位論文内容の要旨

ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) は世界中に広く分布し、馬に鼻肺炎、流産、脳脊髄炎を惹き起こす。近年、EHV-1 感染症のモデル動物として用いられている BALB/c 成マウスでは、経鼻接種によりウイルス血症、鼻肺炎、異常産など馬に類似の病態が発生するが、本モデルで中枢神経系 (CNS) 病変は報告されていない。過去に乳飲みマウスに EHV-1 を脳内接種することにより脳炎が惹き起こされることが報告されていたものの、末梢から接種した場合の EHV-1 神経病原性は不明であった。第 1 章では EHV-1 HH1 株ならびに HH1 株より作出した乳飲みマウス神経馴化株を脳内、経鼻、腹腔内接種し、その神経病原性を組織学的に解析した。その結果、脳内、経鼻接種では、いずれのウイルス株によっても非化膿性脳炎が惹き起こされた。腹腔内接種では神経馴化株により非化膿性脳脊髄炎が惹き起こされたが、HH1 株接種マウスでは中枢神経系病変は認められなかった。第 2 章では、乳飲みマウスに HH1 株および神経馴化株を腹腔内接種し、末梢血、CNS、全身諸臓器を組織学的、分子生物学的に検索した。その結果、HH1 株接種マウスでは CNS 病変は認められなかったが、神経馴化株接種マウスにおいて、ウイルスは細胞随伴性ウイルス血症に続発して血行性に CNS に伝播し、非化膿性脳脊髄炎を惹き起こした。これらマウスの脳炎、脳脊髄炎において、ウイルスは神経細胞およびグリア細胞で増殖し、感染細胞の変性、壊死が惹き起こされた。また、馬の EHV-1 脳脊髄炎の発生に重要である血管内皮細胞へのウイルス感染はほとんど認められなかった。以上の結果から、EHV-1 感受性細胞は乳飲みマウス CNS と馬 CNS では大きく異なることが示された。

第 3 章では、馬およびマウス CNS 血管内皮細胞のウイルス感受性の差異を細胞レベルで解析するために、馬大脳皮質より分離した初代培養馬脳微小血管内皮細胞 (EBMECs) と初代培養マウス脳微小血管内皮細胞 (MBMECs) の EHV-1 感受性を比較

した。プラークアッセイにより EBMECs では EHV-1 高感受性であるウサギ腎由来細胞 (RK13 細胞) と同程度のウイルス力価上昇がみられた。従って、EBMECs は EHV-1 高感受性であり、EHV-1 神経病原性の解明に有用なモデルとなり得ることが示唆された。一方、MBMECs ではウイルス力価の上昇は認められなかった。また、抗 EHV-1 抗体を用いた間接蛍光抗体法により、MBMECs ではウイルス抗原が検出されなかった。RT-PCR 法でウイルス遺伝子の発現を検索したところ、MBMECs では前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子すべてが発現していなかった。また、EBMECs と MBMECs において EHV-1 が細胞へ侵入する段階を超微形態学的に観察した。EBMECs では細胞質小胞内に取り込まれたウイルス粒子が観察されが、MBMECs では観察されなかった。以上の結果から、MBMECs は EHV-1 非感受性であり、EBMECs と MBMECs の EHV-1 感受性の差異はウイルス侵入段階に起因することが示唆された。

EHV-1 の細胞内侵入機構には不明な点が多い。第 3 章の超微形態学的解析により、EHV-1 は EBMECs にエンドサイトーシスを介して侵入することが示された。EHV-1 高感受性である RK13 細胞、馬真皮由来線維芽細胞 (E. Derm) で同様の検索を行ったところ、EHV-1 は RK13 細胞、E. Derm に対してもエンドサイトーシスにより侵入することが明らかとなった。そこで、第 4 章では EHV-1 のエンドサイトーシスに関与する宿主因子の検索を行った。EHV-1 感染細胞におけるウイルス抗原とエンドサイトーシスマーカーの局在を共焦点顕微鏡で検索した結果、EBMECs、RK13 細胞においてウイルス抗原はカベオリンと共存していたが、クラスリンとの共存は認められなかった。一方、E. Derm では、一部でウイルス抗原とクラスリンの共存が観察されたが、大部分はクラスリンおよびカベオリンとは共存していなかった。以上の結果から、EHV-1 の主な侵入経路は EBMECs、RK13 細胞ではカベオリン介在性エンドサイトーシス、E. Derm ではクラスリン非依存性カベオリン非依存性エンドサイトーシスであることが示唆された。また、チロシンキナーゼ阻害剤 (genistein) と Lysosomotropic agents (bafilomycin A, NH_4Cl) が EHV-1 感染に及ぼす影響を検討した。Genistein 処理により、EBMECs、RK13 細胞における EHV-1 感染は有意に減少した。また、bafilomycin A 処理により E. Derm への感染、 NH_4Cl 処理により EBMECs、E. Derm への感染が有意に減少した。従って、EBMECs と RK13 細胞への EHV-1 感染にはチロシンキナーゼ活性が重要であり、EBMECs と E. Derm への感染はエンドソーム内の pH に依存すると考えられた。以上より EHV-1 の宿主細胞への侵入には複数の経路が存在することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	梅村孝司
副査	教授	高島郁夫
副査	助教授	大橋和彦
副査	助教授	木村享史

学位論文題名

In Vivo and in Vitro Analysis of Neuropathogenicity of Equine Herpesvirus-1

(ウマヘルペスウイルス 1 型神経病原性の in vivo, in vitro 解析)

ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) は馬に鼻肺炎、流産、脳脊髄炎を惹き起こす。馬での感染実験は経済的、設備的な制約を伴い、困難であるが、EHV-1 脳脊髄炎の小動物モデルは確立されていない。また、EHV-1 脳脊髄炎の発生機序には不明な点が多い。本研究において申請者はマウスおよび培養細胞系を用いて EHV-1 の神経病原性の解析を行った。

初めに、EHV-1 を乳飲みマウスに接種し、組織学的に解析した。その結果惹き起こされた脳脊髄炎は、馬の病態とは異なり、血管内皮細胞へのウイルス感染と血管病変は認められなかった。次に、馬とマウスの中樞神経系 (CNS) における EHV-1 の血管内皮向性の差異を細胞レベルで解析するために、馬脳微小血管内皮細胞 (EBMECs) 培養系を樹立し、その EHV-1 感受性をマウス脳微小血管内皮細胞 (MBMECs) と比較した。EBMECs は EHV-1 高感受性であるのに対し、MBMECs は非感受性であり、それはウイルスの細胞内侵入段階に起因することが示された。最後に、EBMECs と他の EHV-1 感受性細胞を用いて EHV-1 の細胞内侵入機構を解析した。その結果、EHV-1 の侵入経路は細胞により異なることが示された。

本研究の成果から、馬とマウスに対する EHV-1 の神経病原性は異なり、それは CNS 血管内皮細胞のウイルス感受性の差異によることが示された。また、EHV-1 神経病原性の解析に有用な in vitro モデルを確立し、それを用いた解析により EHV-1 の細胞内侵入機構が明らかとなった。

以上のように申請者は EHV-1 神経病原性の in vivo、in vitro モデルを用いた研究により EHV-1 感染症研究の発展に貢献した。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者長谷部理絵の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。