

学 位 論 文 題 名

Establishment of murine model of latent infection with pseudorabies virus

(マウスにおけるオーエスキー病ウイルス潜伏感染モデルの確立)

学位論文内容の要旨

オーエスキー病ウイルス (PrV) はブタを宿主とするヘルペスウイルスで三叉神経節に潜伏感染し、宿主がストレスを受けると活性化する。活性化したウイルスは体外に排泄され、新たな感染源となる。潜伏感染している個体を完全に排除することは難しく、オーエスキー病を完全に清浄化することは困難で、養豚業に与える影響は非常に大きい。従って PrV の潜伏感染と活性化の機構を調べることは大変重要である。しかし、ブタのストレスの研究は進んではおらず、潜伏感染したウイルスの活性化には寒冷暴露や副腎皮質ホルモンの過剰投与が行われているに過ぎない。しかも潜伏ウイルスの活性化に対して安定した結果が得られていないため、より効率的にウイルスを活性化する因子を探索する必要がある。加えて PrV は宿主域は広いが、ブタ以外の動物では自然界で潜伏感染が成立することはない。このため、PrV の潜伏感染のメカニズムを研究するためにはブタを使用する以外にない。唯一、Osorio らが 1992 年にワクチン株を利用したマウス PrV 潜伏感染モデルを報告したが、野外株や強毒株での試験例は報告されていない。これらをふまえ、筆者は次のような研究を行った。

1. 神経伝達物質であるアセチルコリン (Ach) により潜伏 PrV の活性化を試みた。PrV 野外株、YS-81 で 5 週齢ブタを攻撃し、PrV 潜伏感染ブタを作出した。この一群に Ach $10^3\text{M} \times 1\text{ ml}$ を耳根部筋肉内に 4 日間、連続投与した。他の群にはそれぞれデキサメサゾン (Dex)、陰性対照としてそれぞれの溶媒を 1 ml ずつ投与した。臨床観察と鼻腔スワブからのウイルス分離を試みた。また、これとは別の一群から神経臓器を採取し、一方に Ach を加えて cloned porcine kidney (CPK) 細胞と共に 37°C で培養、細胞変性効果の有無を判定した。Ach を投与したブタは投与直後に副作用による症状を示したが、症状はすぐに消失した。Dex 投与群のブタは投与を続けるにつれて副作用による症状を示し、うち数頭は死亡した。ウイルスの鼻汁への排泄は Ach 群でのみ確認された。Ach 存在下で三叉神経節乳剤と培養した細胞のみ細胞変性効果を示した。これらの結果により、Ach は潜伏しているウイルスを活性化する可能性が示唆され、潜伏ウイルスの活性化という点では Dex よりも優れていた。

2. Osorio らの報告を元に日本の野外分離株である YS-81 株を用いて同様の試験を行い、マウスモデルへの応用の可能性を検討した。6 週齢 BALB/c マウスの腹腔内に生理食塩水 (PBS) で 1:128 に希釈したブタ抗 PrV 血清を投与し、その 30 分後に 10、

10²、10³ LD₅₀ 相当の YS-81 で腹腔内攻撃した。攻撃から 89 日および 126 日後、生残したマウスから三叉神経節を採取し、潜伏ウイルス活性化試験に供した。前処置したマウスは 10³ LD₅₀ 相当の YS-81 に対しても大半が生残し、三叉神経節内に PrV が存在していることが確認された。以上のことから、本法によって野外株である YS-81 株によるマウス潜伏感染モデルを確立することが可能であった。

3. 作製したマウス PrV 潜伏感染モデルの解析を進め、マウスからのウイルス回収について検討を加えた。6 週齢 BALB/c マウスの腹腔内に PBS で 1:128 に希釈したブタ抗 PrV 血清を前投与し、その 30 分後に 2 x 10² LD₅₀ 相当の YS-81 で腹腔内攻撃した。攻撃から 2 カ月以上生残したマウスを潜伏感染マウスとして使用した。Ach または Dex を腹腔内投与し、鼻腔スワブを採取して排泄されるウイルスの検出試験に供した。薬剤投与から 2 週間後に血清を採取し、血中抗体の検出を行った。いずれの薬剤でもウイルス活性化の誘発が確認された。ウイルス排泄の時期は両薬剤間で異なり、PrV 活性化メカニズムの違いが予想された。

4. PrV マウス潜伏感染モデルにおける潜伏ウイルスの活性化が実際のストレス環境下でも認められることを確認するために各種ストレスを潜伏感染マウスに与え、PrV の活性化やそれに伴う一連の変化について検討した。潜伏感染マウスに拘束ストレス、移動ストレス、寒冷暴露のいずれかを 1 日 2 時間、3 日間連続して与え、実験開始から 6 日間、鼻腔スワブ中の排泄 PrV を検出した。試験終了後、全てのマウスから三叉神経節と血清を採取し、ウイルス検出と中和試験に供した。いずれのストレスを与えた潜伏感染マウスからもウイルスの活性化が確認された。すなわち、これまで各種試薬で再現された PrV 活性化は実際のストレス環境下でも再現された。

5. ウイルスの活性化と免疫系との関係を明らかにするために、ストレスに関わっている免疫系サイトカイン、IL-1 β 、IL-6、TNF- α の動態について解析を行った。潜伏感染マウスに Ach 腹腔内接種を 3 日間行い、初回投与時から 1 群ずつ殺処分して血清、脳乳剤中のサイトカイン量を酵素抗体法により測定した。鼻腔スワブは PrV 検出に供した。これとは別の潜伏感染マウスから三叉神経節を採取し、IL-6 または IL-1 β 存在下で CPK 細胞とともに混合培養して PrV の活性化の有無を確認した。血清、脳乳剤中のサイトカイン量を測定したところ、IL-6、IL-1 β がウイルス排泄に先立って上昇した。潜伏感染マウスの三叉神経節を IL-6 または IL-1 存在下で CPK 細胞とともに混合培養しても PrV の活性化は認められなかった。以上のことから Ach によってストレス状態が惹起されていることが確認されたが、IL-1 β 、IL-6 を介しているものではないと推察された。

このように本マウスモデルは PrV 潜伏感染と活性化の研究やストレスの研究を行う上で非常に有益なものであり、本モデルの活用によって PrV をはじめとするヘルペスウイルスの潜伏感染-活性化の機序をより詳細に検討することが可能となった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安居院 高 志
副 査 名誉教授 小 沼 操
副 査 准教授 大 橋 和 彦
副 査 准教授 佐々木 宣 哉

学 位 論 文 題 名

Establishment of murine model of latent infection with pseudorabies virus

(マウスにおけるオーエスキー病ウイルス潜伏感染モデルの確立)

オーエスキー病ウイルス (PrV) はブタを宿主とするヘルペスウイルスで三叉神経節に潜伏感染し、宿主がストレスを受けると活性化する。活性化したウイルスは体外に排泄され、新たな感染源となる。PrV は宿主域は広いが、ブタ以外の動物では自然界で潜伏感染が成立することはないため、これまでげっ歯類を用いた PrV の潜伏感染モデルは確立されなかった。申請者は PrV 潜伏感染モデルの確立を目指し研究を行い、以下のことを明らかにした。

1. まずブタに PrV を接種し、潜伏感染状態にしたものに、アセチルコリン (Ach) を投与することで、ウイルスが排泄されることを示した。
2. BALB/c マウスにブタ抗 PrV 血清を前投与することで PrV 潜伏感染モデルを作製することに成功した。このマウスから三叉神経節を摘出し、*in vitro* で Ach 処理することでウイルスが排泄されることを確認した。
3. 上記のマウス PrV 潜伏感染モデルに Ach またはデキサメサゾンを腹腔内投与することでウイルスが排泄されることを *in vivo* でも確認した。
4. 上記のマウス PrV 潜伏感染モデルを拘束ストレス、移動ストレス、寒冷ストレスといった自然状態のストレスに暴露したところ、いずれのストレスでもウイルスの再活性化が起こることを確認した。
5. ウイルスの活性化と免疫系サイトカインとの関係を明らかにするために、ストレスに関わっている免疫系サイトカイン、インターロイキン-1 (IL-1) β 、IL-6、腫瘍壊死因子- α の動態について解析を行った。上記マウス潜伏感染モデルに Ach を腹腔内投与し、血清及び脳乳剤中のサイトカイン量を測定したところ、IL-6、IL-1 β がウイルス排泄に先立って上昇した。しかし潜伏感染マウスの三叉神経節を IL-6 または IL-1 存在下で培養しても PrV の活性化は認められなかった。以上のことから Ach によって IL-1 β 、IL-6 の産生は亢進するものの、ウイルスの活性化はこれらのサイトカインだけでは説明できないことが判明した。

以上のように申請者は、これまで不可能であったマウスの PrV の潜伏感染モデルを確立し、PrV の潜伏感染に関する研究に多大な貢献をした。一連の研究成果は獣医学の分野において一定の水準を超えたものと判断された。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者、田中聖一氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。