

学 位 論 文 題 名

# Experimental studies for attracting antibody-secreting cells into the CNS to control neurotropic viral infections

(抗体産生細胞の脳内誘導による神経向性ウイルス感染症制圧のための実験的研究)

## 学位論文内容の要旨

The induction of an effective immune response, especially antibodies (Abs) production within the central nervous system (CNS) is regarded to be critical to prevent the transneural spread of viruses. Previous studies have been shown that antigen-specific Abs could be induced in cerebrospinal fluid by experimental intrathecal (e.g., intracerebral or subarachnoid) immunization. However, the mechanism of Abs induction has not been well understood. Therefore, CNS humoral immune response, especially antibody secreting cells (ASCs) known as plasma cells were focused in this study.

In the first experiment, the immune responses in both the CNS and lymphoid organs were investigated following intracerebral (IC) immunization against pseudorabies virus (PRV) in mice. IC immunized mice had significantly higher PRV-specific serum Abs and neutralizing Abs titers than subcutaneously (SC) immunized mice. The spleen and cervical lymph nodes of IC immunized mice produced significantly more PRV-specific Abs than that of SC immunized mice. The mRNAs of some chemokines and cytokines were predominantly detected in the brain of IC immunized mice. Further, ASCs were infiltrated in intrathecal region of IC immunized mice, and these mice (86%) survived more than SC immunized mice (33%) by suppression of virus propagation, when PRV was inoculated directly into the brain.

In the second experiment, IC chemokine injection was tried to investigate the utility of the chemokine as an inducer of peripheral ASCs into the CNS. CXCL12 and cocktail chemokine (mixture of CXCL9, 10, 12 and 13) attracted antigen-specific ASCs most strongly, compared to CXCL9, 10 and 13 in *in vitro* chemotaxis assay and *in vivo* IC chemokines injection experiment. CXCL12 and cocktail chemokine injections after intraperitoneal immunization increased the survival rate against IC rabies virus challenge.

In summary, IC immunization induced more effective immune responses against a neurotropic viral infection by attracting ASCs into the CNS that is partly undertaken by chemokine expression, suggesting the potentials of IC immunization and chemokine treatment as preventive or therapeutic tools against the diseases caused by transneural infection of neurotropic viruses.

# 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	澤洋文
副査	教授	堀内基広

## 学位論文題名

### Experimental studies for attracting antibody-secreting cells into the CNS to control neurotropic viral infections

(抗体産生細胞の脳内誘導による神経向性ウイルス感染症制圧のための実験的研究)

神経向性ウイルス感染症の制圧のためには、中枢神経系内の効果的な免疫反応、特に抗体の誘導が重要である。以前の研究により、実験的な鞘内免疫（脳内またはクモ膜下腔への抗原の投与）によって脳脊髄液中に抗原特異抗体が誘導されることが明らかにされた。しかし、その詳細なメカニズムは不明である。そこで、本研究はマウスを用いて鞘内免疫後の中枢神経系の液性免疫反応、特に抗体産生細胞の反応を解析すること、また神経向性ウイルス感染に対する効果を調べることを目的とした。

初めに、不活化 pseudorabies virus (PRV) を脳内免疫した後の中枢神経系およびリンパ系器官の反応を調べた。脳内免疫群で皮下免疫群に比べて有意に高い抗原特異的な血清抗体およびウイルス中和抗体が検出され、また脾臓と頸部リンパ節で高い抗原特異的な抗体産生が認められた。脳内免疫群マウスの脳ではケモカイン(CXCL9, 10, 12, 13)とサイトカイン(BAFF)の遺伝子発現が高く、抗体産生細胞の脳内浸潤が観察された。さらに、致死量の PRV を脳内接種した結果、脳内免疫群マウスは皮下免疫群マウスに比べ有意に高い生存率を示した。次に、末梢組織の抗体産生細胞を中枢神経系内へ誘導するため、脳内への各種ケモカイン投与による効果を検討した。腹腔内に免疫したマウスの脾臓から分離した細胞を用いて、*in vitro* のケモカイン走化性試験、さらにケモカインを免疫マウス脳内へ投与する *in vivo* 実験を行なったところ、CXCL12 とカクテル・ケモカイン (CXCL9, 10, 12, 13) に対して強い走化性が認められ、これらの細胞は抗原特異的な抗体産生を示した。また、免疫したマウスに CXCL12 またはカクテル・ケモカインを脳内投与した後に、致死量の狂犬病ウイルスを脳内接種したところ、対照群に比べて有意に高い生存率を示した。本研究は、鞘内免疫によって抗原特異的抗体産生細胞を脳内に誘導できること、神経向性ウイルスの脳内増殖を抑制できること、また抗体産生細胞の脳内浸潤にはケモカインが重要な役割をすることを実験的に証明した。

これらの成績は、鞘内免疫やケモカインの投与による抗体産生細胞の脳内誘導によって、神経向性ウイルス感染症に対する新しい予防および治療への応用が可能であることを示唆している。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者 李 賢敬氏の博士論文は、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。