

## 論文審査結果の要旨

氏名	柏崎 広美
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 116 号
学位記の授与日	平成 26 年 3 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 創価大学大学院学則第 31 条第 2 項該当 創価大学学位規則第 3 条の 3 第 1 項該当
論文題目	Analysis of the mechanism of spongiform degeneration induced by neuropathogenic mouse hepatitis virus
論文審査機関	工学研究科委員会
論文審査委員	主査委員 医学博士 渡辺 里仁 委員 医学博士 木暮 信一 委員 獣医学博士 高瀬 明

### <論文の内容の要旨>

本論文は神経病原性マウス肝炎ウイルス c1-2 および srr7 を用いて感染後 48 時間以内における病変およびウイルス抗原分布を解析したものであり、序論、方法、結果および考察から構成されている。以下にその要旨を述べる。

#### 【序論】

神経病原性マウス肝炎ウイルス MHV-JHM 株は脱髄などヒトの疾患のモデルとして研究されてきたウイルスである。しかし、感染初期でのウイルス抗原分布や病変の解析はほとんど報告されていない。JHM 株から分離された c1-2 株は神経病原性が強く、MHV のレセプターを発現していない神経細胞にも感染が認められる。一方、c1-2 株由来の変異株である srr7 は c1-2 に比べ神経病原性が弱く神経細胞への感染は認められない。c1-2 感染マウスは感染後 3 日以内にすべて死亡するが、srr7 感染マウスは 5 日間以上生存し、感染後 10 日以内にほとんどのマウスが死亡する。感染後 48 時間のウイルス抗原および病変は、c1-2 感染マウスでは主として灰白質に認められるが srr7 感染マウスでは白質に分布している。c1-2 と srr7 の致死率や病変およびウイルス抗原分布の違いの原因は明らかになっていない。我々は感染初期に注目して c1-2 と srr7 の病変およびウイルス抗原分布の検索を行った。またサイトカインや細胞外マトリックスを介したネットワークが c1-2 と srr7 に見られた致死率やウイルス抗原分布の違いに影響している可能性について検討した。

#### 【方法】

7 週齢の BALB/c および BALB/c の遺伝背景をもつ Fucosyltransferase 9 (Fut9) ノックアウトマウス (Fut9<sup>-/-</sup>) を用い本大学が定める倫理規定に基づいて飼育した。1×10<sup>2</sup> の c1-2 および srr7 をマウスに脳内接種した。感染後 12 時間から 48 時間、感染後 5 日目で脳と脾臓を取り出し、サイトカインアッセイおよび免疫組織染色に使用した。脾臓の一部からリンパ球を分離し、培養またはサイトスピンに用いた。

#### 【結果および考察】

感染初期では c1-2 と srr7 でウイルス増殖とウイルス抗原分布にほとんど違いが認められないことを確認した。ウイルス抗原分布は感染後 12 時間に、ともに髄膜に浸潤した細胞に認められた。感染後初期には全ての種類の免疫担当細胞にウイルス抗原が認められ、両者における感染細胞の種類にも違いがないことを確認した。さらに srr7 感染マウスでは、感染後 48 時間という短時間で脳実質に空胞変性が認められ、主として小脳や橋に海綿状脳症と

いう病変が生じることを明らかにした。感染後 48 時間以降には脳室壁の上皮細胞やタイプ B 細胞へ感染が広がることを確かめたが、空胞変性の近傍にはウイルス抗原が検出されなかった。感染部位と初期の空胞変性の形成部位が離れていたことから病変はウイルスの直接傷害の結果ではないことが示唆された。

感染後初期の脳内のサイトカイン産生量は c1-2 感染マウスの方が srr7 感染マウスに比べ非常に高いことが確認され、c1-2 が srr7 に比べ致死率が高い原因になっていると考えられた。このことは  $\alpha 1, 3$  フコース転移酵素群のひとつである  $\alpha 1, 3$  フコシルトランスフェラーゼ 9 ノックアウトマウスに srr7 を感染させた実験でも確かめられた。サイトカイン産生細胞は脳の広範囲に分布しており、ウイルス抗原が検出されない場所にも認められた。

感染後 48 時間のウイルス抗原は脳室周囲に限局していたにもかかわらず、ウイルス抗原が検出されない場所にウイルス抗原、サイトカインおよび病変が認められた。これより脳内にはウイルス感染が起こった後に情報が伝達されるルートが存在する可能性が考えられた。リンパ組織で検出され情報を運ぶ役割をする Fibroblastic Reticular Network (FRN) に注目し、FRN を同定するマーカーのひとつである ER-TR7 抗体を用いて脳内における FRN 様の構造を検索した。第 4 脳室とクモ膜下腔を結ぶ通路であるルシュカ孔付近に ER-TR7 陽性の繊維構造が認められた。ER-TR7 陽性の繊維構造は感染したマウスの脳内で発現量が増加し、物質を誘導する機能を有することを脳内ではじめて明らかにした。さらにこの繊維構造に沿ってウイルス抗原および CD11b 陽性の浸潤細胞が侵入する様子が観察された。

感染した CD11 b 陽性細胞を中心とする細胞が髄膜の ER-TR7 陽性の繊維構造に沿って脳室内に入りネットワークが形成された結果、ウイルス抗原が認められない場所で病変が誘導されることが示唆された。このネットワークが形成される場所の違いが c1-2 と srr7 の病変およびウイルス抗原分布の違いの原因であることが推測された。

以上の結果の一部は下記の学術雑誌に掲載された。

(1) Kashiwazaki H, Nomura R, Matsuyama S, Taguchi F, Watanabe R. Spongiform degeneration induced by neuropathogenic murine coronavirus infection. *Pathology International*. Vol. 61: pp. 184-191, 2011.

(2) Kashiwazaki H, Taguchi F, Ikehara Y, Watanabe R. Characterization of splenic cells during the early phase of infection with neuropathogenic mouse hepatitis virus. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. Vol. 64: pp. 256-259, 2011.

#### <論文審査結果の要旨>

本論文は、神経病原性マウス肝炎ウイルスによる病変誘導機構について、上記に示した点を明らかにしたものである。これらは本研究で初めて明らかにされたものであり、それを証明する十分なデータも有することから、学位論文に値する内容であると認定する。