

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 郡山 尚紀

ジステンパーはイヌにおける代表的なウイルス性伝染病で、呼吸器系、消化器系、中枢神経系に感染して全身症状を示す致死率の高い疾病として知られている。原因とされるイヌジステンパーウイルス (CDV) は近年、これまで自然宿主と考えられていなかった動物 (大型ネコ科獣、海棲哺乳類) への感染が報告され、その重要性は大きくなってきている。一方、著者らの研究グループは 1999 年に世界で初めて CDV リバースジェネティクス系の開発に成功し、さらなる応用へ向けての基礎研究を進めている。本研究第一章において、感染細胞で蛍光を発する EGFP-CDV を用いて中枢神経系での CDV の感染様式を器官培養海馬スライスで解析した。CDV は主にニューロンに感染しシナプスを介して隣接するニューロンに感染していることを明らかにし、電子顕微鏡での解析では、シナプス末端でリボヌクレオプロテインの蓄積およびシナプス外のウイルス粒子を確認した。これらの結果から、著者は CDV が中枢神経系ではシナプス末端からシナプス外にウイルス粒子を放出し、隣接するニューロンのシナプスを介してウイルスの侵入・伝播が起こることを示唆した。第二章では CDV リバースジェネティクス系によりイヌ SOD1 発現組換えウイルスの作出を行い、レスキューされた SOD-CDV は感染細胞において活性を持つ機能的な SOD1 を十分量発現していることを示した。酸化ストレスは神経障害の主な原因と考えられ、SOD-CDV は神経細胞に抗酸化酵素 SOD1 を発現させる効果的な治療用ベクターとしての有用性が示唆された。第三章では組換え CDV の有用性についてさらにワクチンベクターとしての応用の可能性も検討した。ここで標的としたリーシュマニア原虫症はヒトやイヌ等に感染して皮膚および内臓に重篤な病巣を形成する人獣共通感染症であり、この保有宿主ともなるイヌで感染を防ぐことはヒトリーシュマニア症の対策としても有用と考えられる。そこで著者らは未だ有効なワクチンのないリーシュマニアと近年流行型 CDV とに対する有効な多価ワクチンの開発を目的として、リーシュマニア抗原を発現する組換え CDV の作出を試みた。リーシュマニア抗原として TSA, LmSTII1 を選択し、CDV リバースジェネティクス系により組換え CDV (TSA-CDV, LmSTII1-CDV) の作出に成功した。リーシュマニアの攻撃実験に対する抵抗性誘導能は今回作出した TSA-CDV と LmSTII1-CDV に既に作出した LACK-CDV を混合して接種したイヌでもっとも優れており、結節形成の増大を抑制と消失を早め流効果を示した。この結果と LACK-CDV がイヌでの病原性 CDV による攻撃試験に対して防御能を示したことを合わせて考えると、これらの組換え CDV は CDV 及びリーシュマニアに対する多価ワクチンとして有用であると推測された。第四章では、CDV の病原性のコントロールを研究するために必要名ツールとして P タンパクに対するモノクローナル抗体作製を試みた。P 蛋白はこれまで分かっていたウイルスの転写や複製に重要であることに加え、最近病原性の発現に関わっていることが報告されている。そこで CDV Yanaka 株 P 蛋白に対するモ

ノクローナル抗体を作出した結果、得られた7つのモノクローナル抗体は2つの抗原部位を認識するグループに分けられた。更にモービリウイルス間での交差反応性を調べたところ、CDV に対しては近年分離株とのみ反応がみられ、牛痘ウイルスに反応するものも見られた。第五章ではこれまでに詳細な解析が行われていない CDV の微細形態の解析を行った。これまでに作出された組換えウイルスの性状の変化が微細構造の変化と関連する報告があるが、CDV においてはこの基礎となる解析が行われていなかった。そこで CDV のウイルス粒子形態やその内部のゲノム RNA-タンパク複合体 (RNP) の電子顕微鏡による解析を行っていたところ、これまで示されてきた 100-300nm よりも大きなウイルス粒子が観察され、複数のウイルスゲノムが取り込まれている可能性が明らかになった。また、ウイルス粒子内にパッケージングされている RNP には径の異なる RNP が存在することも明らかにし、ウイルス粒子内のウイルスゲノムは多様な形態を構成していることを示した。

本研究によって得られた知見はリバースジェネティクスを用いたモノネガウイルスの生物学的性状の解析およびそのベクターとしての応用に大いに役立つと考えられる。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。