

論文の内容の要旨

論文題目

ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス TgPVR21 を用いた
ポリオウイルス経粘膜感染モデルの開発

氏 名 永田 典代

1988 年に開始されたポリオ根絶計画によって世界中のポリオウイルス野生株とポリオ(小児麻痺)の根絶が推進され、すでに、アメリカ地域(1992 年)、日本を含む西太平洋地域(2000 年)、欧州(2002 年)においてポリオ根絶が宣言された。しかしながら世界中のポリオ根絶が目前といわれている現在、予防接種プログラムを中心に種々の問題が浮上してきた。中でも最も注目されているのは経口生ポリオワクチン由来株 (VDPV) の毒力復帰によるポリオ発生である。ポリオウイルスはワクチン由来の弱毒株でも人体に感染、増殖することによって毒力が復帰することがあり、また、数週間糞便中に排泄され、河川などの自然界に一定期間感染性を有したまま存在可能なことが知られている。このように長期にわたってヒトからヒトへ伝播したワクチン由来株はその神経毒力を復帰し、その結果、免疫が不十分なヒトに感染した場合に野生株と同様に麻痺を引き起こすことがある。また、このようなワクチン由来株は変異や組み換えをおこしており、現行のワクチンが有効であり続けるのか不明である。

ポリオウイルスはヒトのみが自然宿主であり、実験的には非ヒト霊長類のみに感受性が確認され、ワクチン開発やポリオウイルスの病原性に関する研究には主としてカニクイザルやミドリザルが用いられてきた。1990 年前後にポリオウイルスが細胞に侵入する際に利用するヒトポリオウイルスレセプター (hPVR) が同定され、これに基づきヒトポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス (TgPVR) が作製された。TgPVR はポリオウイルスに感受性を示し、ヒトと同様にポリオ様の弛緩性麻痺を生ずることが確認され、以来、サルに比べて安価で飼育管

理、維持と扱いが容易で、さらに遺伝的背景が均一であるこの新しい動物が、ポリオウイルスの神経病原性の解析に用いられるようになった。TgPVR のポリオウイルスに対する感受性はサルとほぼ同等で、非経口的接種経路(脊髄内、脳内、静脈内、皮下、腹腔内接種)による発症は明らかにされてきた。しかし、実際のヒトにおけるポリオは糞口感染が示すように腸管や口腔の経粘膜感染によって起きるので、ポリオウイルスの病原性やワクチン開発研究のためには経粘膜感染モデルの使用が望ましい。そこで本研究では、TgPVR の系統の一つである、TgPVR21 を用いてポリオウイルスの経粘膜感染後の病態と粘膜免疫を研究するための感染動物実験モデルを開発することを目的とした。まず、TgPVR21 に対し 1 型ポリオウイルス強毒 OM1 株を経口、胃内、経鼻感染させた。その結果、このマウスは経鼻感染に対し高い感受性を示し典型的なポリオ様弛緩性麻痺を発症した。しかし同じ経路について弱毒 Sabin 1 株では発症しなかった。そこで、これらの現象に着目し、TgPVR21 を用いたポリオウイルス経鼻感染実験の経粘膜感染モデルへの有用性を検討した。

第一章では TgPVR21 の 1 型ポリオウイルス経鼻感染について検討した。まず、1 型ポリオウイルス強毒 OM1 株を 10^7 CCID₅₀/10 μ l 経鼻接種したところ、80%以上が 6-8 日目に麻痺を発症し、死亡した。ウイルス接種量の検討、病理組織学的解析、免疫組織化学によるウイルス抗原の検出、RNA *in situ* hybridization によるウイルスゲノムの検出および RT-PCR による組織中のウイルスのマイナス鎖中間体の検出から、OM1 株の経鼻接種後の最初の感染増殖部位は、鼻腔粘膜であることを明らかにした。また、中枢神経系における OM1 株の感染、増殖は脳幹部が最初で、麻痺発症時には腰髄前角の運動神経細胞、脳幹および大脳の運動領の錐体細胞におよぶことを病理組織学的解析と免疫組織化学によるウイルス抗原の検出結果から明らかにした。OM1 株を 10^7 CCID₅₀/2 μ l 経鼻接種後 6 時間、1、3、4、5 日及び発症時の TgPVR21 の組織からウイルス分離を行ったところ、上顎組織とともにリンパ節、脾臓、Peyer 氏板でのウイルス感染価の経時的な増加がみられ、中枢神経系での顕著なウイルス感染価の増加が症状の進行に相関していた。麻痺発症期のみ血漿中において微量のウイルス($10^{3.5}$ CCID₅₀/ml)が検出され、これは静脈内接種によるウイルス感染成立の 1/10 から 1/1000 であったので、中枢神経系への侵入経路としてはリンパ行性あるいは神経行性が主要であると考えられた。中枢神経系へ侵入したウイルスは OM1 株の場合、運動神経細胞で増殖し病原性を発揮するのに対し、Sabin 1 株の経鼻接種後の上顎組織内でのゲノム複製は確認したが、中枢神経系におけるウイルスの増殖は認められず、病原性の発揮に相違があった。また、Sabin 1 株経鼻接種後のポリオウイルス特異的 IgG の誘導を TgPVR21 の血清において ELISA 法を用いて確認した。そこで、前処理として Sabin 1 株 10^6 CCID₅₀/2 μ l を3週間隔で2回経鼻接種後に OM1 株 10^6 CCID₅₀/2 μ l を経鼻接種したところ麻痺発症率は 0% (n=10) であり、対照に用いた細胞培養液前処理群の麻痺発症率の 60%に比べて有意に発症を防御し

た。以上のことから、TgPVR21 の 1 型ポリオウイルス経鼻感染モデルは経粘膜感染モデルとして使用し得る。

第二章ではこの系を用いたポリオウイルス経粘膜免疫実験モデルの確立とその応用性について検討した。まず、Sabin 1 株 10^6 CCID₅₀/2 μ l で 3 回経鼻免疫した TgPVR21 に対して OM1 株 10^7 CCID₅₀/2 μ l の経鼻攻撃を行い、非免疫群と生存率を比較したところ、3 回免疫群で有意に生存率が高かった。3 回繰り返し実験を行い、再現性を確認したところ、免疫群の生存率 80%、50%、100% だったのに対し、非免疫群の生存率は 40%、10%、40% であり再現性を認めた。一方、攻撃実験を経静脈的に OM1 株 10^6 CCID₅₀/100 μ l を用いて行ったところ、非免疫群は 50% 生存し免疫群は 100% 生存した。また、経鼻攻撃後 1 あるいは 2 日目と 21 日目の血中の抗体産生について ELISA 法で解析した結果、3 回免疫群において有意にポリオウイルス特異的 IgM、IgG、IgA の産生が認められ、ヒトと同様の免疫反応が得られることが示された。また、OM1 株経鼻攻撃後の糞便中への排泄について調べたところ、ウイルスを排泄した動物数は 2 日目で非免疫群 100%、免疫群 80%。3 日目には非免疫群 80%、免疫群 10% (n=10) であり、経鼻攻撃後 2 日目以降のウイルス排泄は免疫群と非免疫群でプロビット解析により有意な差を認めた。また、糞便中のウイルス感染価にも免疫群、非免疫群で有意差があり(データは示さない)、経鼻免疫によって糞便へのウイルス排泄が抑制されることを明らかにした。また、鼻汁中のポリオウイルス特異的 IgA の誘導(免疫群の 20%) および、局所の炎症性反応 (100%) と IgA 陽性細胞 (40%) を病理組織学的に確認し、これらの現象は非免疫群では観察できなかった。経鼻免疫によって、経鼻攻撃後の最初の感染部位である鼻腔粘膜で早期に局所免疫反応が誘導され、その結果、ウイルス増殖が抑制されウイルスの病原性発揮が阻止されることが示唆された。そこで、さらにこの実験モデルの有用性を調べるために、2000 - 2001 年に Hispaniola で起きたポリオの発生の際に急性弛緩性麻痺 (AFP) 患者から分離された VDPV の DOR-20 株を用いて同様の実験を行った。この株はすでに神経病原性に関与する 480 番目の塩基が弱毒株から強毒株に変異していることを確認しており、TgPVR21 の脳内接種試験でも神経毒力が高いことが明らかにされている。免疫—攻撃実験の結果、免疫群は DOR-20 株 10^6 CCID₅₀/2 μ l、 10^7 CCID₅₀/2 μ l 攻撃による生存率がそれぞれ 100% 90% であったのに対し、非免疫群では 70%、50% の生存率であり、プロビット解析によって有意差を認めた。また、OM1 株の経鼻接種では 50% 麻痺発症ウイルス量 (PD₅₀) は $10^{6.7}$ CCID₅₀、DOR-20 株の PD₅₀ は $10^{6.6}$ CCID₅₀ で神経病原性は同等であった。また、同時に DOR-20 株経鼻攻撃後の糞便中へのウイルス排泄について調べた結果、ウイルス排泄動物数は 2 日目で非免疫群 100%、免疫群 90%。3 日目には非免疫群 70%、免疫群 20% (n=10) であり、経鼻攻撃後 2 日目以降のウイルス排泄は免疫群と非免疫群でプロビット解析によって有意な差がみられ、同時にウイルス感染価についても差をみとめた(データは示さな

い)。このように、**Sabin 1** 株の経鼻免疫によって、**VDPV** の **DOR-20** 株による麻痺の発症と糞便へのウイルス排泄を阻止あるいは抑制することが可能になることを *in vivo* で証明した。よって、このポリオウイルス経鼻感染による経粘膜免疫モデルは **VDPV** の病原性やワクチン開発研究に有用であると結論した。

今回確立した **TgPVR21** を用いたポリオウイルス経粘膜感染モデルは、高価で飼育管理、維持と扱いの困難なサルに代わる有用な動物モデルであり、現行のワクチンの **VDPV** に対する有効性に関する評価や、新しいポリオワクチンの開発に大きく貢献することを期待する。また、ポリオ根絶後にはポリオウイルスの取り扱いは現行のバイオセーフティーレベル (**BSL**) **2** から **BSL3**、世界でのワクチン投与中止後、最終的には **BSL4** が要求されており (**WHO**)、**AFP** が発生した際の病原性研究にはサルに代わる実用的なモデルとして使用されるであろう。