

論文内容要旨

【目 的】

タイラーウイルスは、ピコルナウイルス科に属し、二つの亜群に分けられる。急性亜群はマウスに致死的な灰白脳脊髄炎を起こし、脱髄も持続感染も起こさない。一方、慢性亜群はその脊髄に持続感染し、単核球浸潤を伴った一次性脱髄を引き起こす。このため慢性亜群はウイルス性脱髄疾患または多発性硬化症の動物モデルとして注目されている。現在両亜群の発症機序については不明であるが、急性亜群では神経細胞の lytic infection が、慢性亜群では免疫学的機序とウイルス学的機序が提唱されている。我々は両亜群が異なる生物学的性状を示す機序、ひいては慢性亜群の持続感染及び脱髄の機序を明らかにすることを目的とし、両亜群における急性期の炎症病変を中心に比較検討した。

【方 法】

急性亜群 GD VII株 (0.9×10^5 PFU/ml)、慢性亜群 DA 株 (1.3×10^5 PFU/ml) を各々 $20 \mu\text{l}$ 、C3H/He マウス (雄、3 週令) の右大脳半球に接種した。GD VII株では、接種後 4 日目、6 日目に、DA 株では 6 日目、11 日目、35 日目に、末梢血を採取後、マウスを生理食塩水で十分に灌流し、 $3 \mu\text{m}$ パラフィン切片及び $5 \mu\text{m}$ 凍結切片を作成した。パラフィン切片では、抗 VP1 抗体を用いた ABC 法による免疫染色で中枢神経内ウイルス抗原を RCA-1 レクチン組織化学で単核貪食細胞の検索を行った。凍結切片では抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体を用いて T 細胞の検索を行った。同時に末梢血内及び中枢神経内浸潤単核球を比重遠心法にて分離後、単核球の各サブセットのマーカーに対するモノクローナル抗体で蛍光標識し、FACScan で解析した。T 細胞について抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、B 細胞については抗 IgG 抗体、単核貪食細胞については抗マクロファージ抗体 (F4/80) を使用した。また、中枢神経内ウイルス感染価をブラック法で、血清中和抗体価を 50%ブラック減少テストで測定した。更に脾臓より単核球を分離し、ウイルス抗原特異的単核球増殖反応を MTT 法で検討した。

【結 果】

GD VII株ではウイルス接種後、脳炎症状を示し、約 1 週間で全例死亡した。一方、DA 株では感染後約 10 日目の急性期に 32%に麻痺が認められた。麻痺は約 1 週間で寛解したが、感染後約 1 カ月目の慢性期には 13%に麻痺の出現が認められた。病理学的には、GD VII株は HE 染色では炎症所見に乏しく、一部の神経細胞に壊死が散見されるのみであったが、免疫染色にて広範に神

経細胞にウイルス抗原が認められた。また実質を中心に単核貪食細胞の反応も認められた。一方、DA 株では感染後 6 日目をピークとした血管周囲性細胞浸潤が認められた。RCA-1 陽性細胞は主に実質に認められた。浸潤した細胞の多くは RCA-1 陰性の単核貪食細胞以外の細胞でウイルス抗原は感染早期には GD VII 株と同様に灰白質の神経細胞に認められたが、慢性期には、白質の単核貪食細胞に局在していた。

単核球のサブセットは、FACScan による解析では、中枢神経内浸潤単核球の主体は、GD VII 株では単核貪食細胞で T 細胞の出現は軽度であった。DA 株では 6 日目で単核貪食細胞に加えて有意に T 細胞が出現し、11 日目以降では、浸潤単核球の主体は T 細胞となった。DA 株での CD4/8 比は、末梢血中では全経過中、2.5 から 3.2 であったのに対し、中枢神経内浸潤単核球では 0.8 から 1.4 であった。両株において B 細胞の出現は殆ど認められなかった。凍結切片を用いた免疫組織学的検索からも T 細胞の中枢神経内浸潤は確認され、DA 株では実質の浸潤細胞の CA4/8 比は 0.4 から 0.8 で、CD8 陽性細胞が優位であった。

中枢神経内ウイルス感染価は、DA 株に比べ GD VII 株で、より高値であった。また、血清中和抗体価、ウイルス抗原特異的単核細胞増殖反応は共に、DA 株でのみ、6 日目から有意に検出された。

【考 察】

病理学的には、両亜群とも感染早期にはウイルスの宿主細胞は神経細胞であったが、GD VII 株でより広範なウイルス抗原陽性細胞が認められ、ウイルス感染価の結果からも、GD VII 株において中枢神経内でより高度なウイルス増殖が起こっている事が推測された。DA 株では、病理所見及び FACScan による中枢神経内浸潤 T 細胞の動態、血清中和抗体価の変動、ウイルス抗原特異的単核細胞増殖反応の結果より、GD VII 株に比べ高度な宿主免疫応答が引き起こされていることが推測された。浸潤細胞のサブセットの解析では、DA 株において、FACScan で、CD8 陽性細胞の中枢への選択的浸潤が、免疫組織化学で、CD8 陽性細胞の実質内浸潤が示された。これにより、CD8 陽性細胞が DA 株の病態形成に関与していると思われた。

更に、DA 株ではウイルス抗原は感染早期には灰白質の神経細胞に、慢性期には白質の単核貪食細胞に局在していた。ウイルスの宿主細胞の経時的推移に着目することは、DA 株の持続感染、ひいては脱髄の機序を解明するために重要と思われた。

審査結果の要旨

ピコルナウイルス科に属するタイラーウイルスは自然宿主のマウスに急性脳脊髄炎をおこす GDV II 群（急性亜群）と慢性脊髄炎をおこす DA 群（慢性亜群）の二つに大別されており、脊髄白質に病変の主座をもつ後者はヒトのウイルス性脱髄疾患の動物モデルとして研究されている。この異なる病原性を示す二つの亜群の病態の解析はウイルスの神経病原性を決定する因子を解明するうえで重要であるが、この二亜群の比較研究は今まではほとんど行なわれていなかった。

GDV II 株 (0.9×10^5 PFU) 又は DA 株 (1.3×10^5 PFU) を脳内接種した成熟雄 C3H/He マウスの中枢神経から経時的に回収した単核細胞と末梢単核球について、その phenotype を CD3, CD4, CD8, sIgG に対する単クローン抗体と抗マクロファージ抗体 (F4/80) を用い、FACScan により定量的に解析した。更に、中枢神経組織での炎症細胞の phenotype とその局在は、パラフィンまたは凍結切片について免疫染色を行い観察した。ウイルス感染価は plaque 法でウイルス抗体価は 50% plaque reduction 法で測定した。MTT 法によるウイルス抗原特異的単核球増殖反応の比較も行なった。

急性株接種マウスは脳炎症状により接種後ほぼ一週間で全例死亡した。一方、慢性株接種マウスの 32% に接種後ほぼ 10 日に四肢麻痺が出現したが全例生存し、接種後一月目に 12% マウスに後肢麻痺が再現した。ウイルス接種後 6 日目に中枢神経から分離された浸潤細胞数は急性株接種群で $15.9 \pm 12.2 \times 10^4$ 、慢性株接種群で $26.2 \pm 9.4 \times 10^4$ で CD3 の割合が急性群では 25% なのに対し慢性群では 37% であった。慢性群では CD3 細胞の割合は 11 日目には 83% に達していた。T 細胞 subset の解析では両群で CD8 細胞の選択的浸潤が推測された。脾臓から分離した単核細胞の増殖反応は急性群では陰性であったが、慢性群では 6 日目から陽性であった。ウイルス抗体は急性群では検出されなかったが、慢性群では 6 日目に既に検出可能であった。6 日目のウイルス感染価は急性群で 10^8 PFU なのに対し慢性群では 10^4 で慢性群ではその後も感染価の上昇がみられなかった。

このように宿主の免疫応答の差が急性病変と慢性病変のちがいを生み出す基盤となっていることが明らかにされた。ウイルス抗原の分布をみると、急性期には両群で神経細胞にほぼ局限していたのに対し、慢性株接種群の慢性期には抗原は単球に選択的に検出された。

本論文はタイラーウイルスの二亜群の感染における宿主の免疫応答のちがいを明らかにした最初の研究報告であり、また、研究の将来性を示すものとして、感染の持続に伴う神経組織内の宿主細胞の変化を明確に示しており、これは学位授与に値する研究であると認める。