

北里大学大学院獣医学系研究科

博士課程学位論文審査の結果と最終試験の成績

平成28年2月19日

学位論文題目

Pathological studies on the rabid dogs and mice experimentally infected with rabies virus

氏名 Boonsriroj Hassadin 所属 獣医学専攻 獣医病理学

審査委員 主査 北里大学 教授 胡 東良



副査 北里大学 准教授 吉岡 一機



副査 北里第一三共ワクチン(株)
ワクチン研究所第2研究グループ長
本川 賢司



副査 北里大学 教授 小山田 敏文



審査の結果

合格

最終試験の成績

優

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	Boonsriroj Hassadin (4DV12004 獣医病理学)
学位論文題目	Pathological studies on the rabid dogs and mice experimentally infected with rabies virus
担当者	主査 北里大学教授 胡 東良 副査 北里大学准教授 吉岡 一機 副査 北里第一三共ワクチン(株) ワクチン研究所第2研究グループ長 本川 賢司 副査 北里大学教授 小山田 敏文

論文審査の要旨 (3,000 字以内)

狂犬病は狂犬病ウイルスに起因する高致死性の人獣共通感染症である。特にアジアやアフリカにおいては、狂犬病は年間 55,000 人以上の死者をもたらす世界的に極めて深刻な公衆衛生上の問題である。ウイルスは末梢神経から侵入し、求心性に中枢神経系 (CNS) に到達する。最終的に、ウイルスは遠心性に唾液腺を含む末梢組織に広がる。しかしながら、ウイルスが遠心性に広がる機序や中枢以外の非神経性組織の病理学的所見は完全には理解されていない。

本研究の目的は狂犬病発病犬および実験的モデルの頭部の末梢非神経性組織の病理学的変化を観察することである。加えて、狂犬病の神経病理発生について更なる情報を得るために、野外株 (1088-N0)

をマウス右後肢に接種し、末梢組織および CNS における感染中の初期標的細胞や経過を観察した。

(1) フィリピンで発症した狂犬病犬の唾液腺に関する病理学的研究

狂犬病ウイルスは唾液に排出され、咬むことで次なる宿主に伝達することから、自然の狂犬病媒介動物では唾液腺への感染が重要である。しかしながら、唾液腺の病理学的所見の詳細やウイルス排出の機序の解明はなされていない。そこで、狂犬病発病犬 22 頭および対照犬 3 頭の下顎腺および耳下腺を病理学的に観察し、口腔内にウイルスを排出するメカニズムを解析した。

22 頭中 19 頭の下顎腺に、腺房上皮の消失とリンパ球・形質細胞の浸潤を特徴とした軽度から中等度の非化膿性唾液腺炎が観察された。ウイルス抗原は粘液腺房上皮、神経節神経細胞および筋上皮細胞から検出された。腺房上皮およびリンパ球は抗 caspase-3 抗体を用いた免疫染色および TUNEL 染色で陽性を示していた。これとは対称的に、導管上皮や漿液腺房細胞には注目すべき変化は観察されなかった。耳下腺では、腺上皮、筋上皮、導管上皮のいずれもがウイルス抗原陰性であった。

これら所見より、狂犬病ウイルスは脳で増殖した後に、顔面神経を下降して下顎腺の神経節神経細胞に到達し、続いて唾液腺筋上皮を介して腺房上皮に到達する経路が証明された。更に、導管系では筋上皮を通過する神経終末が欠除していたことは、ウイルスの増殖および細胞障害がそこでは生じえず、ウイルスを含む分泌物が効率よく口腔内に排出されることを示唆していた。

(2) 狂犬病罹患犬の口唇におけるウイルス抗原の局在と診断的有用性

医療従事者へのウイルス暴露を防御し、また積極的なアプローチとして特殊な治療を開始するためには、狂犬病の早期診断が重要である。最も一般的に用いられる方法は新鮮な脳サンプルを用いた直接蛍光抗体法である。しかしながら、この方法は困難で時間を要し、狂犬病ウイルスに暴露される危険が高い。それ故、神経以外の組織のサンプルを用いた狂犬病診断の代替法が望ましい。

そこで、9頭の狂犬病発症犬（安楽死3頭、死亡6頭）および対照犬3頭の毛包-洞複合体（follicle-sinus complex ; FSCs）を含む口唇皮膚を観察し、口唇材料の診断的有用性を評価した。

免疫組織化学および免疫蛍光抗体法により、全ての狂犬病発症犬の口唇皮膚にウイルス抗原が検出された（特異性100%）。FSCsにおけるウイルス抗原のほとんどはサイトケラチン20およびCAM5.2陽性のメルケル細胞に検出された。

これら結果から、狂犬病ウイルス抗原が感覚毛の重要な機械的受容体であるメルケル細胞に局在していること、また、脳で増殖した狂犬病ウイルスは三叉神経を下行し、感覚毛のメルケル細胞に到達することが確認された。以上のように、特に狂犬病が常在している発展途上国においては、狂犬病の死後診断の代替法として洞毛を用いることが極めて有用であることが示唆された。

(3) 狂犬病固定株（CVS-11）および野外株（1088）を筋肉内に接種した末梢組織の比較病理学

狂犬病ウイルスは致死的な脳脊髄炎を引き起こすが、頭部の末梢神経、神経以外の組織の変化はあまり調べられていない。本研究では、狂犬病ウイルス固定株（CVS-11）および野外株（1088-N0、1088-N30）を筋肉内に接種した成 C57BK/6J および ddY マウスについて、頭部の末梢神経および非神経組織の病理学的変化およびウイルス抗原の分布を観察した。

CVS-11、1088-N0 を接種したマウスは接種 5 日目に麻痺を示し死亡したが、1088-N30 を接種したマウスは回復した。組織病理学的に軽度から中等度の脳脊髄炎が全ての感染マウスに観察されたが、非神経性の末梢組織の病変はウイルス株により異なっていた。1088-N0 株を接種したマウスではウイルス抗原は三叉神経節、三叉神経、下顎神経、眼窩下神経、舌下神経、網膜、舌粘膜、有郭乳頭の味細胞、舌小唾液腺、顔面筋、そして口唇皮膚に観察された。いっぽう、1088-N30 株ウイルスは三叉神経節、三叉神経、下顎神経、舌下神経、舌粘膜、舌小唾液腺、および口唇皮膚に感染していた。CVS-11 株ウイルスは三叉神経節、三叉神経、舌粘膜および網膜に局限して感染していた。炎症性細胞の数およびウイルス中和抗体価（VNA）は 1088-N30 株で高かった。

これらの所見より、狂犬病の 3 株は CNS で増殖するものの、野外株は急速に頭部の末梢の神経組織および非神経組織に拡散することが明らかにされた。加えて、炎症や VNA の早期の発現が CNS から末梢組織へのウイルス拡散を抑制することに重要な役割を果たしていた。

これら一連の研究により、狂犬病発症のメカニズムの一端が解明

され、さら口唇組織の観察で提示した新規の病理学的診断法は極めて高い価値を有するものと判断された。以上、Hassadin氏が研究者として十分な学識と資質を備えているとの認識が一致し、審査委員一同は博士（獣医学）の学位を授与するに相応しいと認め、合格と判定した。

最終試験の結果の 要旨および担当者

学位申請者	Boonsriroj Hassadin (4DV12004 獣医病理学)
学位論文題目	Pathological studies on the rabid dogs and mice experimentally infected with rabies virus
担当者	主査 北里大学教授 胡 東良 副査 北里大学准教授 吉岡 一機 副査 北里第一三共ワクチン(株) ワクチン研究所第2研究グループ長 本川 賢司 副査 北里大学教授 小山田 敏文

成績：優

最終試験の結果の要旨

審査員一同は、論文提出者に対し、平成28年2月19日、その論文内容および関連事項について詳細な質疑を行った。その結果、論文提出者は博士（獣医学）の学位を受けるに相応しい学識と能力を有するものと認め、優と判定した。