

佐野仁志 学位論文審査要旨

主 査 景 山 誠 二
副主査 神 崎 晋
同 林 一 彦

主論文

EBNA-2-deleted Epstein-Barr virus from P3HR-1 can infect rabbits with lower efficiency than prototype Epstein-Barr virus from B95-8

(P3HR-1株由来の*EBNA-2*遺伝子欠損Epstein-Barrウイルス[EBV]はB95-8株由来プロトタイプEBVよりもウサギへの感染効率が低い)

(著者：佐野仁志、長田佳子、加藤郁、金井亨輔、山本清成、奥野啓介、桑本聡史、森（檜垣）裕美、杉原弘貢、加藤雅子、村上一郎、神崎晋、林一彦)

平成25年 Intervirology 掲載予定

参考論文

1. Epstein-Barr virus can infect rabbits by the intranasal or peroral route: an animal model for natural primary EBV infection in humans

(Epstein-Barrウイルスは経口/経鼻ルートでウサギに感染可能である：ヒトの自然なEBV初感染の動物モデル)

(著者：奥野啓介、高島一昭、金井亨輔、大橋誠、日向亮輔、杉原弘貢、桑本聡史、加藤雅子、佐野仁志、西連寺剛、神崎晋、林一彦)

平成22年 Journal of Medical Virology 82巻 977頁～986頁

学 位 論 文 要 旨

EBNA-2-deleted Epstein-Barr virus from P3HR-1 can infect rabbits with lower efficiency than prototype Epstein-Barr virus from B95-8

(P3HR-1株由来の*EBNA-2*遺伝子欠損Epstein-Barrウイルス [EBV]はB95-8株由来プロトタイプEBVよりもウサギへの感染効率が低い)

Epstein-Barrウイルス (EBV) はヒトに普遍的に感染しているヘルペスウイルスで、多くは不顕性感染であるが、一部のヒトでは伝染性単核球症や稀に血球貪食症候群を発症することがある。また、バーキットリンパ腫、鼻咽頭癌、移植後リンパ増殖性疾患などの腫瘍の原因となる腫瘍ウイルスである。これまで、EBVは一部の希少な霊長類にしか感染しないとされ、*in vivo*でのEBV研究は困難であった。しかし、最近ウサギにも感染することが確認されて、その管理や*in vivo*の研究が容易に行えるようになった。本研究では、P3HR-1細胞株由来の一部のウイルス遺伝子 (*EBNA-2*) が欠損したEBVを、経口あるいは経鼻からウサギへ投与して、その感染性とその後の経過について病態を検討した。また、これまでに報告されているprototype EBV (B95-8)を用いたウサギ感染実験結果との比較検討も行った。

方 法

体重2~3 kgの雄性日本白ウサギを12羽用いた。EBV産生細胞株の1つであるP3HR-1 (*EBNA-2*欠損株)の培養上清を高速遠心にて濃縮した後、経口または経鼻で投与した。経時的に耳静脈から採血し、血液一般検査を行い、末梢血単核球 (PBMC; peripheral blood mononuclear cells) 中のEBV-DNAコピー数、EBV関連遺伝子のmRNA発現、EBV関連抗体をそれぞれ、real time PCR、RT-PCR、ELISA法で解析した。EBV投与70-84日後に各ウサギを解剖し、肝臓、脾臓、扁桃、腸間膜リンパ節、盲腸の病理組織学的検討を行った。EBV感染の指標として、生存中はPBMC中のEBV-DNAコピー数を用い、解剖後は各組織での*in situ* hybridization (ISH) によるEBV-encoded RNA (EBER) -1発現の検索を行った。

結 果

12羽中2羽について、EBV-DNAが末梢血液中に検出された。経鼻投与群は2/8羽で生存中感染が確認されたが、経静脈投与群は0/4羽で生存中末血での感染は確認できなかった。長期

に渡ってEBV-DNAが検出された1羽（0-23）では、抗EA-IgG抗体価の上昇が長期にわたって持続し、PBMCではEBNA-1、*BamHI Z Leftward reading Frame (BZLF) -1*、EA遺伝子のmRNAが検出された。また、剖検により病理学的に、虫垂、脾臓、肝臓、腸管リンパ節、扁桃腺の検索を行ったが、肉眼的およびヘマトキシリン-エオジン染色標本では明らかな病変はなかった。しかし、ISH法により虫垂を中心に各組織からEBER-1陽性リンパ球浸潤が検出された。一過性にEBV-DNAが末血に検出された1羽に関しては、組織中にはEBER-1陽性細胞は検出されなかった。静脈投与した3/4羽でリンパ組織中に僅かながらEBER-1陽性細胞が検出された。

考 察

プロトタイプEBV（B95-8株由来）の経静脈および経鼻投与によるウサギ感染モデルの解析が報告されているが、今回、EBNA-2遺伝子欠損EBV（P3HR-1株由来）を投与することにより、その感染効率や感染病態について比較検討を行った。今回の検討では、EBV投与後のEBV-DNA検出パターンは、(1)末血PBMC（EBV-DNA）および組織（EBER-1-ISH）共に陽性、(2)EBV-DNA陽性だがEBER-1-ISH陰性、(3)EBV-DNA陰性だがEBER-1-ISH陽性、(4)EBV-DNAおよびEBER-1-ISH共に陰性の4種類が観察された。末血EBV-DNAおよび組織のEBER-1-ISH共に陽性であった1羽（0-23）について、虫垂とくに一部リンパ濾胞のマントル領域にEBER-1陽性リンパ球の集簇を認めたが、ウサギにとって虫垂が免疫学的に最も重要な臓器と考えられている点で興味深い。P3HR-1由来EBVとB95-8由来EBVの感染性比較では、末血EBV-DNAの陽性率は、それぞれ2/12（17%）と10/11（91%）であり、明らかにP3HR-1の感染効率が悪いことが示された。その理由としては、EBNA-2遺伝子を欠損することによりEBV潜伏感染3型のEBV感染形式がとれず、EBVは直接centroblastやcentrocyte、memory B細胞に感染することにより拡大する必要があり、非常に効率が悪い感染経路しかとれないからではないかと推測している。

結 論

P3HR-1株由来EBNA-2遺伝子欠損EBVもウサギで溶解感染を起こすが、プロトタイプのB95-8由来EBVに比べて感染効率が低く、EBV感染動物モデルとしてはB95-8由来EBVを用いる方がEBV感染動物モデルとして利用しやすい。しかし、P3HR-1-EBV投与ウサギは、*in vivo*におけるEBNA-2遺伝子欠損EBVの感染病態を研究するには重要な動物モデルである。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は日本白ウサギを用いて、P3HR-1由来*EBNA-2* 遺伝子欠損株Epstein-Barrウイルス (P3HR-1-EBV) 投与による感染病態をプロトタイプEBV (B95-8-EBV) 投与の感染と比較・検討したものである。その結果、P3HR-1-EBVもウサギにEBVの溶解感染を惹起する能力はあるが、B95-8-EBVに比べて感染効率が低いことが判明した。その原因として、*EBNA-2*遺伝子欠損株EBVではリンパ組織内で効率が低い感染経路しかとれないためと考えられた。本論文の内容は、*EBNA-2*遺伝子の *in vivo*でのEBV感染病態に与える影響についてEBV感染ウサギモデルを用いて初めて示唆したものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。