

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
大黒 恵理子	主査 教授 佐野 浩一 副査 教授 芝山 雄老 副査 教授 河野 公一 副査 教授 玉井 浩 副査 教授 田窪 孝行
主論文題名 Analysis of morphology and infectivity of measles virus particles (麻疹ウイルス粒子の形態と感染性に関する研究)	
学位論文内容の要旨	
<p>【研究の目的】 麻疹は飛沫核により感染するウイルス性疾患である。麻疹の予防には生ワクチンがあり優れた感染予防効果を有するが、本邦ではワクチン接種率の低下によって小児のみならず成人麻疹の発生が多い。また麻疹ウイルスが中枢神経系に持続感染し、亜急性硬化性全脳炎を引き起こすことから今だに重要な病原ウイルスであると考えられている。</p> <p>この麻疹ウイルス粒子の形態や大きさについては 1960 年代に電子顕微鏡の生物試料への応用とともに盛んに研究された。しかしながら麻疹ウイルス粒子の大きさや感染性については一定の見解を得ないまま現在に至っている。そこで申請者は、麻疹ウイルス様粒子の形態的多様性を確認し、麻疹ウイルス粒子の大きさを決定し、その感染性について検討することを目的とした。</p> <p>【材料と方法】</p> <p><u>ウイルス培養</u>: アフリカミドリザル腎臓由来の Vero 細胞を、10%ウシ胎児血清添加培地で培養した。そこへ麻疹ウイルス (Edmonston 株) を接種し培養、細胞変性効果 (CPE) を確認した後、ウイルス感染細胞を電子顕微鏡試料とした。培養上清は粗遠心後、フィルターで濾過して感染価を測定し、またネガティブ染色試料とした。</p> <p><u>通常電顕法</u>: ウイルス感染細胞をグルタルアルデヒドで前固定、四酸化オスmiumで後固定し、定法どおりエタノール希釈系列で脱水後エポキシ樹脂包埋した。超薄切片を作製後、酢酸ウラニルと硝酸鉛の二重染色を施し電子顕微鏡で観察した。</p> <p><u>ネガティブ染色法</u>: 培養上清を超遠心しウイルスを濃縮して収集、蒸留水に再懸濁後 0.5%グルタルアルデヒド固定、1%酢酸ウラニル染色を施し、電顕観察した。</p> <p><u>免疫電子顕微鏡法</u>: 感染細胞を 1%グルタルアルデヒド固定し、前述の方法で脱水後、Lowicryl K4M 樹脂包埋した。超薄切片をニッケルグリッドに載せ、非特異的反応を阻止した後、抗麻疹 M あるいは H 抗体を反応させ、洗浄後金コロイド標識二次抗体を反応させた。1%グルタルアルデヒドで再固定後コントラスト増強法を施し電顕観察した。</p> <p><u>ウイルス感染価測定</u>: 各種孔径のメンブレンフィルターで濾過したウイルス液の希釈系列を作製し Vero 細胞へ接種・培養、Reed and Munch 法に従って感染価を算出した。</p>	

【結果】

電子顕微鏡像において、エンベロープ上のスパイクと粒子内ヌクレオカプシドが確認できるものを麻疹ウイルス様粒子とした。形は一般的に円形であるが、時におたまじゃくし状、棒状、ひょうたん状のものがあつた。長径を計測して分布図を作成すると、350-400 nm に大きなピークがあり、150-200、500-550、700-750 nm に小さなピークがあつた。ネガティブ染色法で、形態学的特徴を有するそれぞれのピークに相当する径の麻疹ウイルス様粒子を確認した。更に免疫電顕法でこれら多様な大きさを示すウイルス様粒子に、粒子形成及び宿主への吸着に必須の蛋白抗原が存在することを明らかにした。培養上清を0.22、0.45、0.8、3.0 μ m のメンブレンフィルターで濾過した濾液中のウイルス感染価は各々 $10^{1.2}$ 、 $10^{1.5}$ 、 $10^{3.0}$ 、 $10^{4.1}$ TCID₅₀/0.1ml と、孔径の小さなフィルターの濾液ほど有為に低下していた。

【考察】

形態学的に特徴のある構造物を有するウイルス様粒子は過去の報告どおり多様な形状を示すことが通常電顕法で確認された。しかし粒子径の分布については過去の報告よりも幅のあるものであつた。申請者は、ウイルス感染細胞から作製した超薄切片を電顕観察するとウイルスではなく細胞の一部である可能性があるとして、培養上清を用いたネガティブ染色法を併用し、これらの粒子は細胞の一部ではなく独立したウイルス様粒子でありその径の分布は従来の報告より幅広いことを証明した。麻疹ウイルス粒子径は含まれるヌクレオカプシドの数によって異なるとの説があり、粒子径分布図において幾つかのピークが認められるのはこのためであると考えた。特に350-400 nm に大きなピークがあり、この径が粒子形成の際最も安定していることを示唆した。また免疫電顕法により、これら多様な大きさのウイルス様粒子は、形態形成や感染に必須の抗原を保有することを明らかにし、これらが麻疹ウイルス粒子であることを示した。

申請者はさらにメンブレンフィルターを用いて220 nm 以下、220-450 nm、450-800 nm、800 nm 以上の径の粒子がそれぞれ感染性を有することを明らかにし、ウイルス径の大小によらず感染性を有した完全なウイルス粒子であることを示した。

麻疹ウイルスワクチン株は免疫持続能に優れ、再病原性が低い。本研究で特に今まで注目されていなかった大型麻疹ウイルス粒子の存在を確認したことは、今後外来ゲノムパッケージングによる新たなキメラウイルスワクチンの作製に重要な知見を加えるものである。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	大黒 恵理子
論文審査担当者		主 査 教授 佐 野 浩 一 副 査 教授 芝 山 雄 老 副 査 教授 河 野 公 一 副 査 教授 玉 井 浩 行 副 査 教授 田 窪 孝 行	
主論文題名 Analysis of morphology and infectivity of measles virus particles (麻疹ウイルス粒子の形態と感染性に関する研究)			
論文審査結果の要旨			
<p>麻疹はワクチン接種によってほぼ完全に予防可能であるものの、本邦では接種率低下による発症や持続感染による脳炎など、社会的に重要な感染症である。その原因ウイルスである麻疹ウイルスについての形態学的研究は、過去に様々な報告があるが一致した見解が得られていない。そこで申請者は特に麻疹ウイルス粒子の形態学的多様性とそれら多様な形態のウイルス粒子の感染性を明らかにしようとした。</p> <p>形態学的に麻疹ウイルスの特徴を有するウイルス様粒子は形態・粒子径ともに多様でまたこれらは細胞の一部ではなく独立したウイルス様粒子であることを示した。また免疫電子顕微鏡法によって多様な径のウイルス様粒子が麻疹ウイルス特異抗原を有することを明らかにし、これらが麻疹ウイルス粒子であることを示した。さらに種々の孔径のメンブレンフィルターで濾過したウイルス浮遊液は、そのフィルター孔径が小さいほど感染価が低いことを示し、それぞれの孔径のフィルターを通過したウイルス粒子に感染性があることを明らかにした。</p> <p>本研究は、未だ決定されていなかった麻疹ウイルスの径を明らかにし、その感染性を証明した。特に申請者が大型ウイルス粒子の存在を明らかにしたことは、今後現行ワクチンの改良のみならず、外来遺伝子のパッケージングによる新たなキメラウイルス作製などの応用に向けての基礎となると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Bulletin of the Osaka Medical College 53(2): 000-000, 2007 (in press)</p>			