

審査の結果の要旨

氏名 仲尾（多田）朋美

本研究は、インフルエンザウイルス性肺炎の病態を理解することを目的に、インフルエンザウイルスの感染病態において重要な役割を持つと考えられる好中球に着目し、新規の電子顕微鏡法を用いた形態学的解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 走査型電子顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を合わせた光子・電子相関顕微鏡法（CLEM 法）によって、マウスの肺組織を観察する方法を確立した。蛍光タンパク質 Venus を発現するレポーターウイルス（MA-Venus-PR8）を用いることによるインフルエンザウイルス感染細胞の標識、および蛍光抗体法による好中球の標識を行うことで、CLEM 法によって、肺組織内における感染細胞と好中球の分布や、細胞表面の微細構造を観察することが可能となった。
2. 集束イオンビーム走査型電子顕微鏡法（FIB-SEM 法）を用いてインフルエンザウイルス感染マウス肺を観察し、肺組織に浸潤した好中球の表面に、触手様の形態変化が見られることを明らかにした。この触手様構造は、インフルエンザウイルスの主な感染標的である II 型肺胞上皮細胞と好中球の接着面にも見られた。
3. *in vitro* の共培養系を用いて、インフルエンザウイルス感染細胞に対する好中球の接着の特異性を調べた。インフルエンザウイルス A/WSN/33 に感染したマウス肺胞上皮由来細胞株（MLE-12）と、マウス腹腔から分離した好中球を共培養したところ、感染細胞に接着した好中球の数は、非感染細胞に接着したそれよりも有意に多いことがわかった。このことから、好中球の接着は、インフルエンザウイルスの感染によって誘導されることが示された。
4. 生体内において、好中球がインフルエンザウイルス感染細胞に接着するのかを調べるために、CLEM 法を用いてインフルエンザウイルス感染マウス肺を観察したところ、好中球が感染細胞に接着する様子が多数観察された。好中球が接着している感染細胞の表面には、ウイルス様粒子が観察された。このことから、生体内においても好中球が感染細胞に接着することが示された。
5. 生体内でインフルエンザウイルス感染細胞と好中球の接着がどの程度の頻度で起きているのかを調べるために、MA-Venus-PR8 感染マウス肺において蛍光抗体法にて好中球を標識し、共焦点レーザー顕微鏡で撮影し、三次元モデルを構築した。好中球が接着している感染細胞数を計数したところ、感染細胞のうち 12.03 %～18.66 %が好中球と接着していた。このことから、感染細胞と好中球の接着は、インフルエンザウイルス感染マウス肺組織内で一定の頻度で起こっている現象であるということが示さ

れた。

以上、本論文は、最新の形態学的解析技術を用いることで、インフルエンザウイルス感染マウスの肺組織内で、感染局所に浸潤した好中球が感染細胞に直接接着できることを明らかにした。本研究は、インフルエンザウイルス感染の病態解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。