

博士論文

脳心筋炎ウイルス D 株感染マウスにおける  
唾液腺涙腺炎の病理発生に関する研究

大口 敦子

## 目次

緒言 .....	1
第 1 章 EMCV-D 感染マウスの急性唾液腺涙腺炎の発現様式 .....	7
第 2 章 EMCV-D 感染 DBA/2 マウスの耳下腺および眼窩外涙腺におけるウイルス RNA の発現および病変の推移 .....	18
第 3 章 EMCV-D 感染 DBA/2 マウスの耳下腺及び眼窩外涙腺におけるアポトーシスの惹起と電顕所見 .....	34
第 4 章 EMCV-D 誘発唾液腺涙腺炎の急性期におけるタイプ I インターフェロンシグナルの推移 .....	49
総括 .....	65
参考文献 .....	71
謝辞 .....	80

## 緒言

脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus, EMCV ; 現在はカルディオウイルス A\*)はピコルナウイルス属に属するカルディオウイルスの一種であり、径 20~30 nm のエンベロープを持たない一本鎖 RNA ウイルスである (Matthews *et al.* 1979)。このウイルスは最初に非ヒト霊長類から分離され (Helwig *et al.*, 1945)、次いで豚から分離された (Murnane *et al.*, 1960)。世界中に分布し、自然宿主はマウスやラットなどのげっ歯類 (特に無症候性のラット) とされ、家畜から野生動物まで様々な動物種に感染し心筋炎や突然死を誘発する (Carocci *et al.*, 2012)。\* :ICTV Virus Taxonomy 2018b による

Craighead ら (1966a) はマウスでの臓器親和性に基づき、EMCV を 2 つの variant、すなわち E (神経親和性) 及び M (心筋親和性) に分けた。さらに、Yoon ら (1980) が、EMCV の M 株 (EMCV-M) を繰り返しプラーク精製し、糖尿病誘発性の D 株 (EMCV-D) と糖尿病を誘発しない B 株 (EMCV-B) を樹立して以来、多くの EMCV-D 誘発マウス糖尿病モデルの研究が行われてきた (Doi 2011)。

EMCV はまた、細胞にタイプ I インターフェロン (IFN) を強く誘導することから、IFN を中心とする生体の抗ウイルス反応研究に幅広く利用されてきた (Ning *et al.*, 2019, Freundt *et al.*, 2018)。多くのウイルスは宿主の中で増殖できる臓器・細胞が限られており、これをウイルスの臓器・細胞親和性という。ウイルスの臓器・細胞親和性を規定する因子としてウイルスが細胞内に入るために結合する細胞膜表面のウイルスレセプターが知られている。VCAM1 や ADAM9 といった細胞表面タンパクがに EMCV のレセプターと言われてきている (Baggen *et al.*, 2019) が、EMCV と同じピコルナウイルス科に属するポリ

オウウイルス、コクサッキーウイルス、Theiler マウス脳脊髄炎ウイルスの臓器細胞親和性はウイルスレセプターのみでは説明ができず、宿主側の IFN 応答によっても規定されると言われている (Ida-Hosonuma *et al.*, 2005)。

EMCV の主要標的臓器としては、膝臓 (Fig. 0-1a) (Baek and Yoon, 1990; Hirasawa *et al.*, 1995,1997)、中枢神経系 (Fig. 0-1b) (Takeda *et al.*, 1991; 1995) 及び心臓 (Fig.0-1c) (Doi *et al.*, 1988; Hirasawa *et al.*, 1992) が知られている。さらに、Doi らの研究グループによって、EMCV-D がシリアンハムスター及びマウスに精巣炎を誘発することが明らかにされた (Fig.0-1d) (Hirasawa *et al.* 1991, Shigesato *et al.* 1994)。これらの4つの標的臓器については、病態の発現様式、病変の性状及び病理発生機序についてこれまで多くの研究結果が報告されている。

さらに、EMCV-M 及び EMCV-D はマウスに耳下腺涙腺炎を起こすことが報告されている (Craighead *et al.* 1965; 1966b; Barger and Craighead 1991) が、その後 EMCV 誘発耳下腺涙腺炎の病態の発現様式、病変の性状及び病理発生機序に関する詳細な報告は見当たらない。

マウスの唾液腺及び涙腺の組織解剖学については、Botts ら (1999) の報告に詳しい。すなわち、マウスには3つの大唾液腺、2つの涙腺及びハーダー腺がある (Fig.0-2)。大唾液腺は顎下腺、舌下腺及び耳下腺より構成され、これらは頸部腹側の皮下に位置する (Fig 0-2a-c)。一方、眼窩外涙腺は耳下腺の上部皮下に位置している (Fig 0-2d)。さらに、眼窩内涙腺及びハーダー腺は眼窩内に位置している (Fig 0-2e, f)。これらの腺組織の実質は管状胞状腺房及び導管系より構成されている (Fig 0-2a-f)。顎下腺は粘液及び漿液の両方を産生する混

合腺 (Fig 0-2b)、舌下腺は粘液腺 (Fig 0-2c)、耳下腺 (Fig 0-2a) 及び眼窩内・外涙腺 (Fig 0-2d,e) は腭臓の外分泌腺に類似した漿液腺である。ハーダー腺の腺房腔は広く腺房細胞の細胞質には豊富な脂肪小滴が含まれ、泡沫状の様相を呈している (Fig 0-2f)。これらの腺組織はいずれも外分泌腺で組織学的に類似しており、EMCV-D に惹起される組織学的変化と抗ウイルス反応の比較検討に有用と考えられた。

本研究では、EMCV-D の実験感染によって惹起されたマウスの唾液腺涙腺炎の病態の発現様式、病変の性状及び病理発生機序を明らかにし、親和性のある臓器間の抗ウイルス反応を比較することでウイルスの臓器細胞親和性に関する新たな知見を得ることを目的として行った。

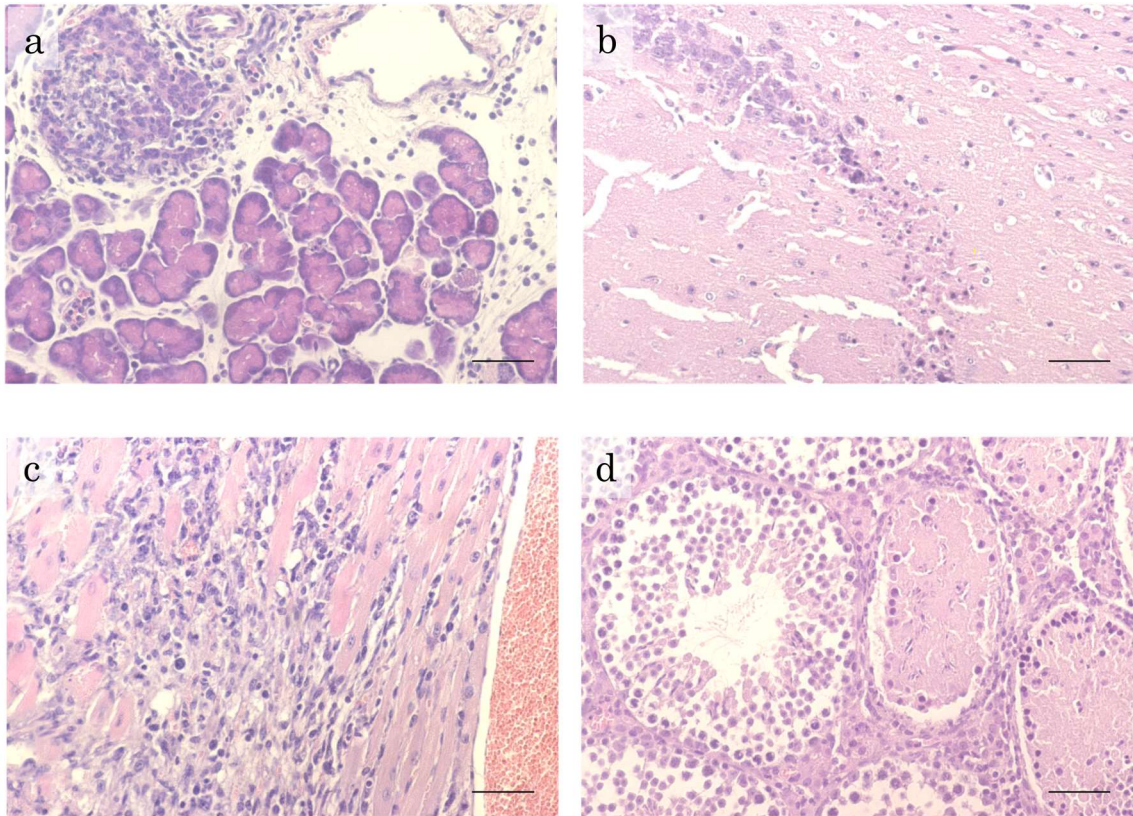


Fig.0-1

Target organs of EMCV-D infection in BALB/c mice. Pancreatitis (a), degeneration of neurons in the hippocampus (b), myocarditis (c), and orchitis (d). HE, Bar = 60  $\mu$ m.

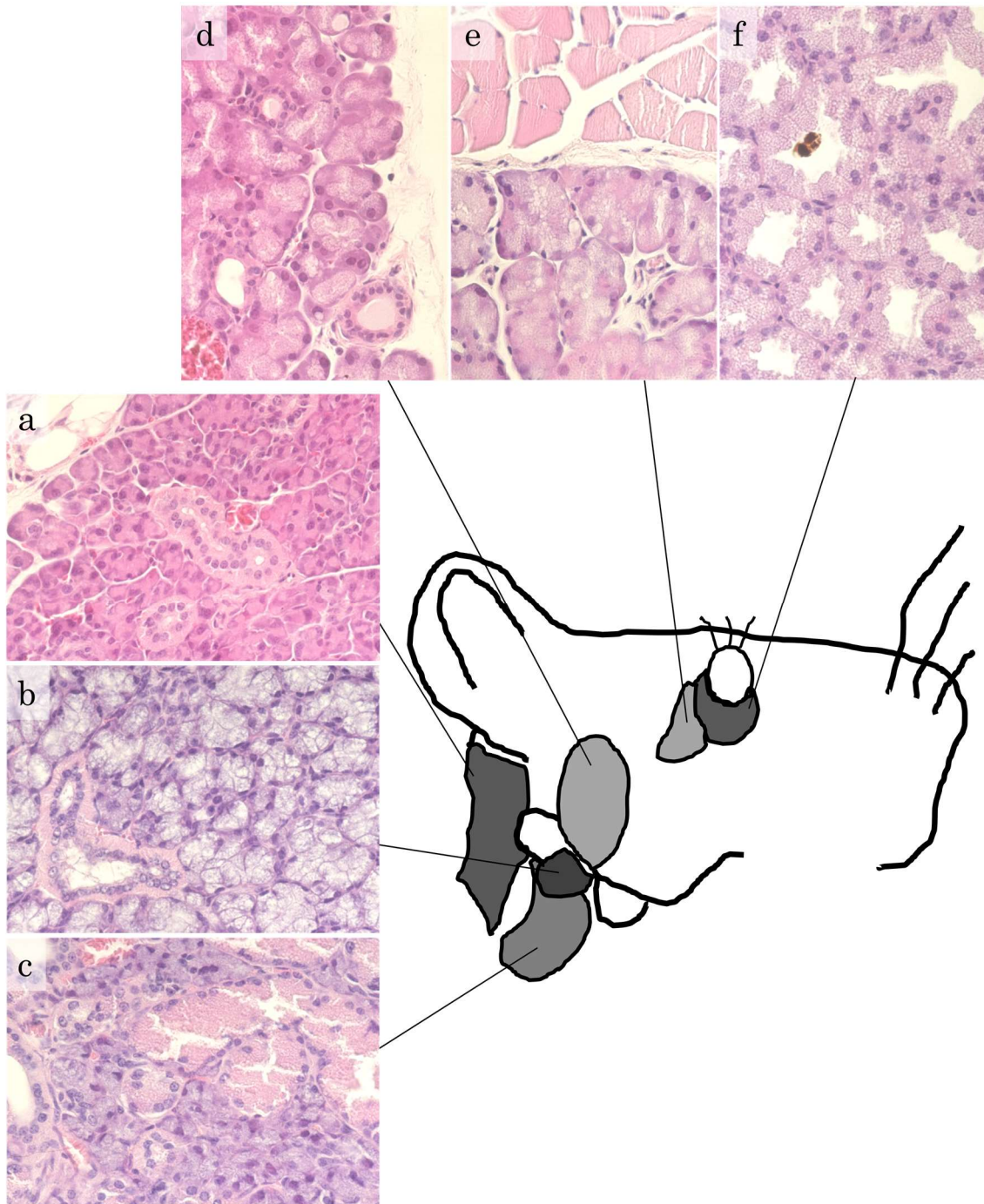


Fig.0-2. Location and histology of the salivary gland, lacrimal gland and Harderian gland. Parotid gland (a), sublingual gland (b), submandibular gland (c), exorbital lacrimal gland (d), intraorbital lacrimal gland (e), and Harderian gland (f). HE, Bar = 50  $\mu$ m.



## 第1章 EMCV-D感染マウスの急性唾液腺涙腺炎の発現様式

## 1. 小序

緒言で述べたように、マウスにおける EMCV-D の標的臓器としては、中枢神経系 (Takeda *et al.* 1991; 1995)、心臓 (Doi *et al.* 1988; Hirasawa *et al.* 1992)、膵臓 (Beak and Yoon, 1990; Hirasawa *et al.* 1995; 1997) に加え、精巢 (Hirasawa *et al.* 1991、Shigesato *et al.* 1994) が知られている。一方、唾液腺・涙腺に関しては、Craighead (1965, 1966) が EMCV-E および EMCV-M の感染による唾液腺涙腺炎について報告しているのみで、その病理発生等詳細については未だ不明である。本章では、この点を明らかにする第一歩として、EMCV-D 誘発糖尿病について感受性の異なる 3 系統のマウスと 2 用量のウイルス接種量の組み合わせで、EMCV-D 感染による急性唾液腺涙腺炎の発現様式について検討した。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 動物

25 匹の DBA/2 マウスおよび 45 匹の C57BL/6 マウス (日本チャールスリバー、神奈川) ならびに 45 匹の BALB/c マウス (日本 SLC、静岡) を 8 週齢で実験に用いた。動物はアイソレーターケイジシステム (仁木商事、東京) を用いて 1 ケージ (215 x 320 x 140 mm) あたり 5 匹を収容し、動物室 (温度 : 23 ± 2°C ; 湿度 : 55 ± 5%) で飼育した。飼料 (MF ; オリエンタル酵母、東京) と水道水は自由に摂取させた。

DBA/2 マウスは EMCV-D 誘発糖尿病に高感受性、BALB/c マウスは中等度感受性および C57BL/6 マウスは低感受性を示すことが知られている (Hirasawa *et al.*, 1996)。

実験は全て東京大学大学院農学生命研究科実験動物委員会の承認のもとで実施した。

## 2.2. ウイルス接種

J.W.Yoon博士 (the University of Calgary, Alberta, Canada) から贈与されたEMCV-DをL929細胞で培養し、-80℃で保存した。これを0.01 MのPBSで希釈し、 $1 \times 10^7$  PFU/ml (高量ウイルス希釈液) および  $1 \times 10^4$  PFU/ml (低量ウイルス希釈液) に調整した。

C57BL/6 および BALB/c マウスそれぞれ 20 匹に 0.01 ml の高量ウイルス希釈液 ( $10^5$  PFU/mouse) を鼻腔内接種した (高量群)。また、C57BL/6、BALB/c および DBA/2 マウスそれぞれ 20 匹には 0.01 ml の低量ウイルス希釈液 ( $10^2$  PFU/mouse) を同様に接種した (低量群)。また、C57BL/6、BALB/c および DBA/2 マウスそれぞれ 5 匹には 0.01 ml/mouse の PBS を同様に投与し、対照群とした。

接種 1, 2, 3 および 4 日後 (DPI) に各群それぞれ 5 匹のマウスをエーテル麻酔下で心臓より全採血し安楽死させた。対照群のマウスについては 4 DPI に同様に安楽死させた。

## 2.3. 血中ウイルス力価

上述した各マウスから心臓採血で得た血液を用いて、血中ウイルス力価を L929 細胞を用い Matsuzaki *et al.* (1989) の方法に従って測定した。

#### 2.4. 病理組織学的検査

右側の耳下腺、舌下腺、下顎腺、眼窩内涙腺、眼窩外涙腺、ハーダー腺および膵臓を 10 %中性緩衝ホルマリン液で固定した。次いで、パラフィン切片（厚さ 4  $\mu\text{m}$ ）を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施し、病理組織学的検査に供した。

### 3. 結果

#### 3.1. 血中ウイルス力価

高量群では、C57BL/6 マウスの血中ウイルス力価は 2 DPI にピークに達し、その後低下し、4 DPI には検出できなかった (Fig. 1-1a)。BALB/c マウスの血中力価は 2 から 3 DPI にかけてプラトーに達し、4 DPI には検出できなかった (Fig. 1-1a)。一方、低量群では、特に BALB/c マウスで個体差が著しかったものの、DBA/2 および BALB/c マウスの血中力価の平均値は 3 DPI にピークに達した (Fig. 1-1b)。前者では 4 DPI まで高価を維持したが、後者では 4 DPI には検出できなかった。C57BL/6 マウスの血中力価は 3 から 4 DPI にかけて上昇した (Fig. 1-1b)。

#### 3.2. 病理組織学的所見

低量群の C57BL/6 マウスでは、病変は観察されなかった。その他の群では唾液腺涙腺における病変は耳下腺および眼窩内外涙腺に認められ、舌下腺、顎下腺およびハーダー腺には認められなかった。

耳下腺では、高量群では 1 DPI から、また、低量群では、2 DPI から、それぞれ腺房細胞の核濃縮が観察された (Fig. 1-2a)。高量群の BALB/c マウスでは、4 DPI に腺房細胞の巣状壊死と間質に炎症性細胞浸潤が観察された (Fig. 1-2b)。一方、他の群においては、核濃縮を呈する腺房細胞が間質への軽度の炎症性細胞浸潤を伴い徐々に増加した (Fig. 1-2c)。導管上皮細胞には 4 DPI に至るまで病理組織学的変化は観察されなかった。

眼窩内涙腺と眼窩外涙腺では同様の病変と推移が見られた。少数の腺房細胞の核濃縮が、高量群では 2 DPI から (Fig. 1-3a)、また、低量群では 3 DPI から (Fig. 1-3b) 観察された。4 DPI には、高度の炎症性細胞浸潤を伴う腺房細胞の壊死が観察され (Figs. 1-3c and d)、同時に、特に高量群において、高度の間質性水腫が認められた。導管系の上皮細胞には病理組織学的変化は認められなかった。

膵臓では、3 DPI に、高量群の BALB/c マウスの膵島で炎症性細胞浸潤を伴う小巣状の凝固壊死が観察された。一方、高量群の C57BL/6 マウスならびに低量群の DBA/2 および BALB/c マウスの膵島では、軽度の炎症性細胞浸潤を伴う散在性の島細胞の核濃縮が認められた。後者においては、4 DPI には炎症性細胞浸潤を伴う凝固壊死が観察された。

#### 4. 考察

本章では、EMCV-D 誘発唾液腺涙腺炎について、3 系統のマウスおよび 2 用量のウイルス接種量間で比較した。

血中ウイルス力価については、個体差はあるものの、概ね高量群で低量群よりも早期にピークに達した。

病理組織学的検査の結果、EMCV-D の標的臓器として良く知られている脾臓では、3 系統のマウス間および 2 用量のウイルス接種量間における病変の程度の差については、これまでの報告 (Hirasawa *et al.*, 1992, 1995, 1996) と一致していた。

耳下腺では、高量群の BALB/c マウスでは 1 DPI から腺房細胞の核濃縮が観察され、その後 4 DPI には腺房細胞の巣状壊死と間質への炎症性細胞浸潤が認められた。これに対し、その他の群 (低量の C57BL/6 マウスを除く) では 4 DPI に至っても病変の程度はやや軽度であった。一方、涙腺の病変は、眼窩内および眼窩外涙腺で同様であった。すなわち、低量群の C57BL/6 マウスを除き、高量群では 2 DPI から (Fig. 3a)、また、低量群では 3DPI から腺房細胞の核濃縮が観察され、4 DPI には、顕著な炎症性細胞浸潤を伴う高度の腺房細胞の壊死が観察された。このように、耳下腺、眼窩内及び外涙腺の病変の強弱は既報 (Hirasawa *et al.*, 1996) の EMCV-D 誘発糖尿病に対する感受性差と同様の傾向であった。また、病変の程度は各群で耳下腺よりも涙腺で高度であった。このことは、涙腺が EMCV-D 感染に非常に高い感受性を有することを示唆している。この点に関し、Craighead は EMCV-M 接種マウスでは涙腺の壊死が観察されるが耳下腺に病変は認められないことを報告している (Craighead, 1965) が、

EMCV-E 接種マウスでは耳下腺および涙腺の双方で壊死が観察されることを報告している (Craighead, 1966)。

ところで、緒言でも述べたように、SDAV はラットに唾液腺涙腺炎を惹起し、下顎腺およびハーダー腺では高度の病変が、耳下腺はでごく軽度の病変が観察されることが報告されている (Doi *et al.*, 1980)。一方、本章の検索の結果、EMCV-D によるマウスの唾液腺涙腺炎では涙腺および耳下腺に限局して高度の病変が観察され、特に涙腺で顕著であることが示された。こうした SDAV と EMCV-D の間における標的組織の違いについて、それぞれのウイルスに対するレセプターの分布が、各唾液腺、涙腺で異なっていることが理由なのかも知れない。

## 5. 小括

EMCV-D 誘発唾液腺涙腺炎の発現様式を、EMCV-D 誘発糖尿病に対する感受性の異なる 3 系統のマウス (C57BL/6 : 低感受性 ; BALB/c : 中等度感受性 ; DBA/2 : 高感受性) を用いて検索した。C57BL/6 及び BALB/c マウスには高量 ( $10^5$  PFU/mouse) または低量 ( $10^2$  PFU/mouse)、DBA/2 マウスには低量の EMCV-D を鼻腔内接種した。その結果、個体差はあるものの、血中ウイルス力は低量投与群よりも高量投与群で概ね早期にピークに達した。低量群の C57BL/6 マウスでは、病理組織学的変化は観察されなかった。その他の群の病理組織学的変化は、耳下腺ならびに眼窩内および眼窩外涙腺に認められた。耳下腺においてみられた早期の病変はこれらの腺組織の腺房細胞の核濃縮であっ

た。その後、高量群の BALB/c マウスでは耳下腺腺房細胞の巣状壊死と間質への炎症性細胞浸潤が観察された。他の群においては、腺房細胞の核濃縮と間質への軽度の炎症性細胞浸潤が徐々に顕著になった。眼窩内及び眼窩外涙腺においてみられた早期の病変も腺房細胞の核濃縮であり、その後、間質に炎症細胞浸潤を伴う腺房細胞の壊死が認められた。また、眼窩内および眼窩外涙腺の病変の性状と程度はほぼ同様であった。いずれの腺組織においても導管に病変は認められなかった。これらの結果から、EMCV-D は 3 系統のマウスについてそれぞれの唾液腺、涙腺に対し同様の明瞭な組織および細胞親和性を示すことが明らかになった。また、唾液及び涙腺病変の強弱は既報の EMCV-D 誘発糖尿病に対する感受性差と同様の傾向であった。



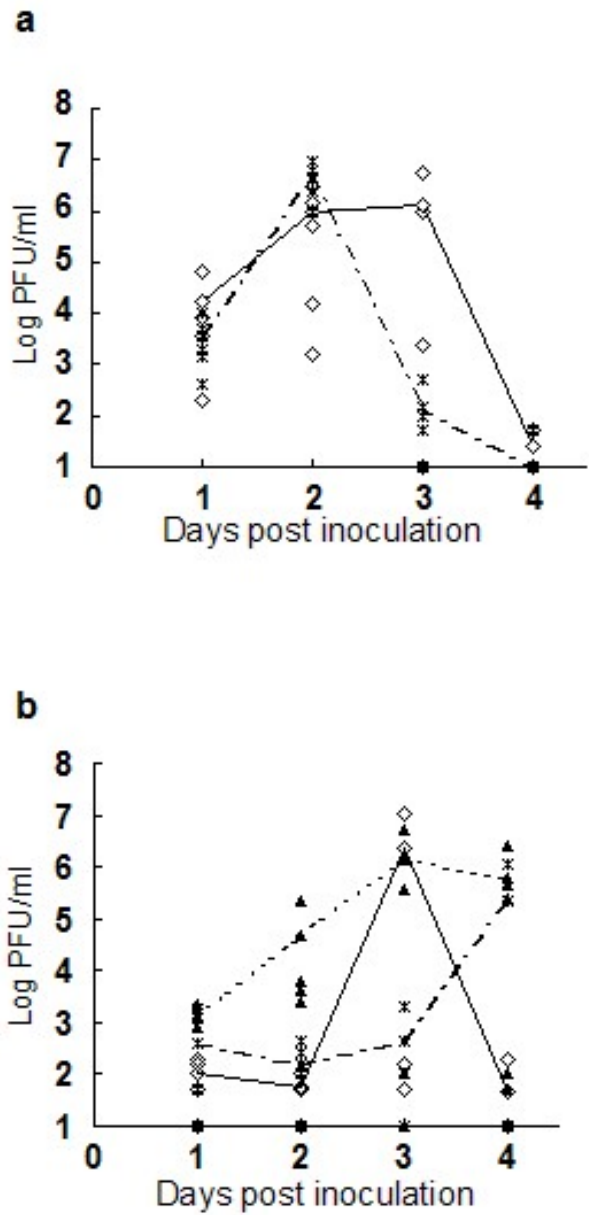


Fig.1-1

Changes in virus titers in blood of high-dose group (a) and low dose group (b). (\*) C57BL/6, (◇) BALB/c, and (▲) DBA/2. Average titers of five mice at each time point are also shown. (— · \* — · ): C57BL/6, (—◇—): BALB/c, and (—▲—): DBA/2.

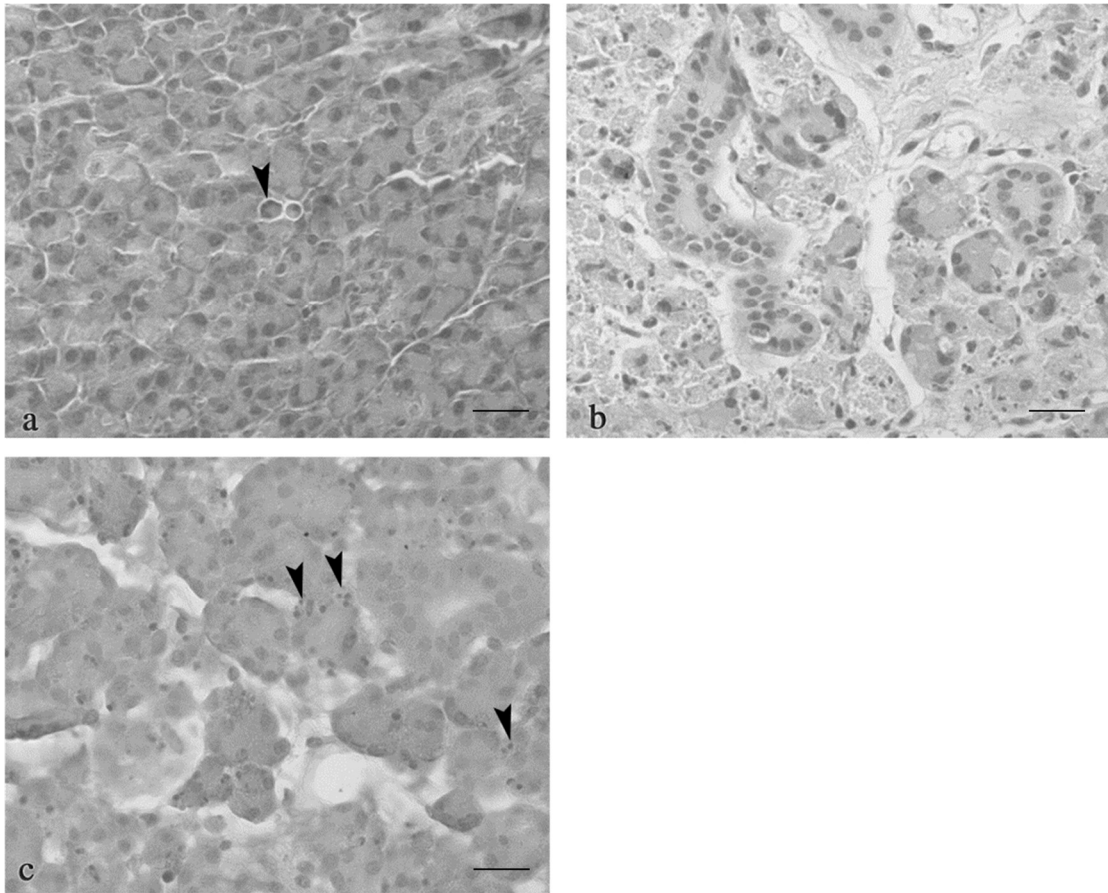


Fig.1-2

Histopathology of the parotid gland of EMCV-D-infected mice. A few pyknotic cells (arrowhead) are seen in DBA/2 mice of low-dose group at 2 DPI (a). Necrosis of acinar cells is seen in BALB/c mice of high-dose group at 4 DPI (b). An increase in the number of pyknotic cells (arrowheads) is seen in DBA/2 mice of low-dose group at 4 DPI (c). HE, Bar = 20  $\mu$ m.

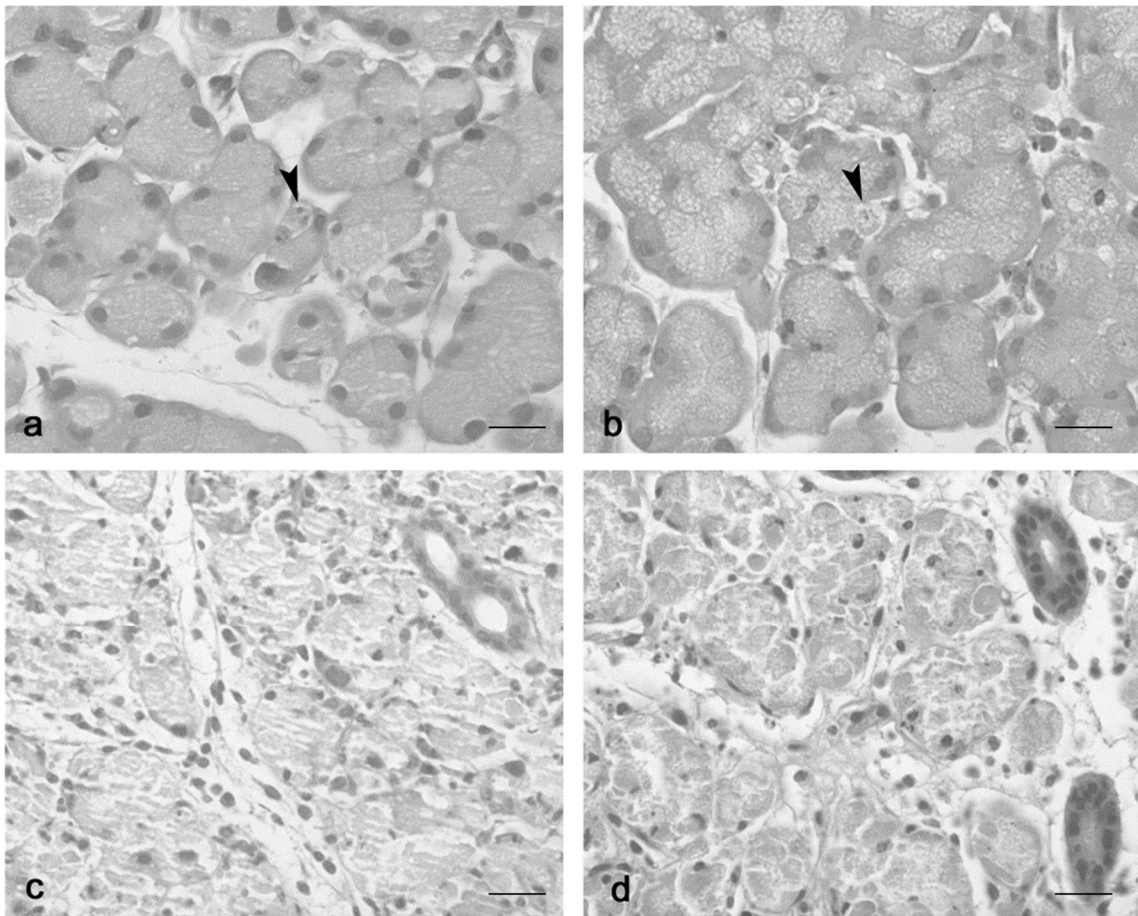


Fig.1-3

Histopathology of the exorbital lacrimal gland of EMCV-D-infected mice. . A few pyknotic cells (arrowheads) are seen in C57BL/6 mice of high-dose group at 2 DPI (a) and BALB/c mice of low-dose group at 3 DPI (b). Necrosis of acinar cells are seen in C57BL/6 mice of high-dose group (c) and BALB/c mice of low-dose group (d) at 4 DPI. HE, Bar = 20  $\mu$ m.

## 第 2 章 EMCV-D 感染 DBA/2 マウスの耳下腺および眼窩外 涙腺におけるウイルス RNA の発現および病変の推移

## 1. 小序

前章では、EMCV-D 誘発糖尿病に対する感受性の異なる 3 系統のマウスと 2 用量のウイルス接種量の組み合わせで EMCV-D による急性唾液腺涙腺炎の誘発を試みた結果、マウスの系統およびウイルスの接種量によって差はあるものの、本質的にはほぼ同様な性状の唾液腺涙腺炎が惹起された。病変は耳下腺および涙腺に限局して認められ、また、眼窩内および眼窩外涙腺の病変の程度はほぼ同様であることが示された。

そこで、本章では、DBA/2 マウスに  $10^2$  PFU/mouse の EMCV-D を鼻腔内接種し、耳下腺および眼窩外涙腺におけるウイルス RNA の発現および病理組織学的変化の推移を、1 から 14 DPI にかけて経時的に検索した。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 動物

実験には 42 匹の 8 週齢の DBA/2 マウス（日本チャールスリバー、神奈川）を用い、前章と同じ方法で飼育した。

実験は全て東京大学大学院農学生命研究科実験動物委員会の承認のもとで実施した。

### 2.2. ウイルス接種と採材

前章と同様に、L-929 細胞を用いたブラックアッセイにより EMCV-D の力価

を求め、0.01 M の PBS で希釈して  $1 \times 10^4$  PFU/ml に調整した。30 匹のマウスに当該ウイルス希釈液をそれぞれ 0.01 ml ( $10^2$  PFU/mouse) 鼻腔内に接種した。また、12 匹のマウスに 0.01 ml/mouse の PBS を同様に投与し、対照群として用いた。

ウイルス接種群のマウスについては、1, 2, 3, 4, 7 および 14 DPI に、前章と同じ方法で剖検した (1~4 DPI の各日においてそれぞれ 4 匹、7 および 14 DPI にはそれぞれ 7 匹)。また、対照群の動物については、4, 7 および 14 DPI にそれぞれ 4 匹ずつ、同様の方法で剖検した。

剖検時に各個体から耳下腺および眼窩外涙腺を採取し、左側を RT-PCR 法によるウイルス RNA の発現の検索用に  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、また、右側を病理組織学および免疫組織化学的検索用に 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

### 2.3. RNA の抽出および半定量 RT-PCR

RT-PCR 用に凍結保存した耳下腺及び眼窩外涙腺から ISOGEN (ニッポンジーン、富山) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA は、Prime Script RT-PCR kit (タカラバイオ、滋賀) を用い、RNA 3  $\mu\text{g}$  を oligo dT primer を含む 60  $\mu\text{l}$  の反応液に添加し、逆転写反応により 1 本鎖 cDNA を合成した。EMCV-D の capsid タンパクである VP-1 のプライマー (センス : GGAGTTGAGAATGCTGAGAGAGGGGTT 、 アンチセンス : GGAATTCATTCCAGCATAAGGACTCCAGCTCTCTCGG) 、及び対照としてグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) のプライマーセット (タカラバイオ) を用いて PCR を行った。

PCRの増幅には、2.5  $\mu\text{L}$ の10 x PCR buffer (タカラバイオ)、1  $\mu\text{L}$ のdNTP (タカラバイオ)、0.25  $\mu\text{L}$ のTaKaRa Ex Taq HS及び0.2  $\mu\text{M}$ のセンス及びアンチセンスプライマーに0.5  $\mu\text{L}$ のcDNAを添加した25  $\mu\text{L}$ の反応液をTakara PCR Thermal cycler SPを用いて増幅した。初めに94°Cで1分cDNAを熱変性した後、94°C、1分で熱変性、58°C、1分でプライマーのアニーリング、72°C、1分で相補鎖の合成のサイクルをVp-1について25サイクル、GAPDHについて27サイクル行った。PCR産物は2%アガロースゲル(ニッポンジーン)で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色(Gibco, Gaithersburg, USA)にて検出した。蛍光バンドはUV-CCDビデオシステム(EpiLightUVFA1100; アイシンコスモス、東京)を用いて可視化し、デンストメトリーで定量しGAPDHバンドとの相対値を算出した。対照群における値の範囲内を陰性とし、ウイルスRNAの発現の程度を以下のようにグレーディングした。陰性: 0.11以下、弱陽性: 0.11~0.5、陽性: 0.5~1.0、強陽性: 1.0以上。

#### 2.4. 病理組織学的検査

10%の中性緩衝ホルマリン液で固定した右側の耳下腺および眼窩外涙腺について、前章と同様な方法でパラフィン切片(厚さ4 $\mu\text{m}$ )を作製してHE染色を施し、病理組織学的検査に供した。

#### 2.5. 免疫組織化学的染色

ウイルス接種群(7および14 DPI)および対照群(7 DPI)のマウスについて、F4/80(マクロファージのマーカー)およびKi67(核分裂のマーカー)に

対する抗体を用いて免疫組織化学的検索を行った。一次抗体として、ラット抗 F4/80 モノクローナル抗体 (Bio-Rad, Hercules, USA) およびラット抗 Ki67 モノクローナル抗体 (DAKO, Carpinteria, USA) を用いた。

上記切片に一次抗体を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識した抗ラット抗体 (ヒストファイン・シンプルステインマウス MAX-PO (ラット)、ニチレイバイオサイエンス、東京) を二次抗体として反応させ、ジアミノベンジジン (DAB) を用いて発色させた。核染色にはヘマトキシリンを用いた。

### 3. 結果

#### 3.1. 半定量 RT-PCR 法によるウイルス RNA の発現

左側の耳下腺および眼窩外涙腺におけるウイルス RNA (VP-1 RNA) の発現の推移を半定量 RT-PCR 法で検討した結果を Fig. 2-1 に示した。

ウイルス RNA は、1 および 2 DPI には耳下腺および眼窩外涙腺ともに陰性であった。その後、耳下腺では 3 および 4 DPI に 4 例中 1 例で、また、7 DPI に 7 例中 1 例で、それぞれ弱陽性であった。一方、眼窩外涙腺では、3 DPI に 4 例中 1 例が強陽性、1 例が陽性で、4 DPI には 4 例中 2 例が強陽性、7 DPI には 7 例中 1 例が軽度陽性を示した。14 DPI には、耳下腺および眼窩外涙腺ともに陰性であった。

対照群では、4, 7 および 14 DPI のいずれにおいても、両腺組織ともに陰性であった。



### 3.2. 病理組織学的変化の推移

耳下腺：1 DPI にはウイルス接種に起因すると考えられる変化は認められなかったが、2 DPI にはごく少数の腺房細胞で核濃縮が認められた (Fig. 2-2a)。3 および 4 DPI には、核濃縮を呈する腺房細胞の数が増加し (Fig. 2-2b)、間質には単核球を主体とする炎症細胞浸潤が観察された。7 DPI には、軽度ないし中程度の腺房細胞の核濃縮および間質への単核細胞浸潤に加え、ごく少数の腺房細胞で核分裂像が観察された (Fig. 2-2c)。14 DPI に至っても、個体によってはごく軽度ないし軽度の腺房細胞の核濃縮および間質への単核細胞浸潤が認められた (Fig. 2-2d)。

眼窩外涙腺：1 および 2 DPI にはウイルス接種に起因すると考えられる変化は認められなかった。3 DPI には、個体によってごく軽度ないし軽度の腺房細胞の核濃縮および間質への単核細胞の浸潤が観察された (Fig. 2-3a)。4 DPI には核濃縮を呈する腺房細胞が広範囲にわたって観察された (Fig. 2-3b)。7 DPI には、漿液性の腺房はほぼ消失し、広範な単核細胞の浸潤が認められた。加えて、内部に死細胞の破砕物を含む管腔構造が増加していた (Fig. 2-3c)。14 DPI には、腺房はほとんど消失し、代わりに管腔構造とその周囲の線維増生および単核細胞浸潤が目立った (Fig. 2-3d)。

### 3.3. 免疫組織化学的所見

耳下腺では、7 DPI に、また、眼窩外涙腺では 7 および 14 DPI に認められた単核細胞の大多数は、免疫染色で F4/80 陽性を示した (Fig. 2-4)。

また、耳下腺で 7 および 14 DPI に腺房細胞の核分裂像が認められたことから、

Ki-67 に対する免疫染色を実施し、対照群と比較した。その結果、7 DPI には腺房細胞の核の陽性像が対照群のそれより高頻度に認められが (Fig. 2-5a)、14 DPI には核の陽性像は対照群のそれと同程度であった (Fig. 2-5b)。

#### 4. 考察

本章では、EMCV-D 接種 DBA/2 マウスの耳下腺および眼窩外涙腺を対象に、半定量 RT-PCR 法によるウイルス RNA の発現および病理組織学的変化の推移を 14 DPI まで経時的に検索した。

半定量 RT-PCR 法によるウイルス RNA の発現の推移をみると、耳下腺および眼窩外涙腺ともに、3, 4 および 7 DPI には発現が認められたが、14 DPI には認められなくなった。また、ウイルス RNA の発現の程度は、耳下腺に比べて眼窩外涙腺でより高度であった。

1 から 4 DPI までの両腺組織の病理組織学的変化は、前章の EMCV-D ( $10^2$  FU/mouse) 接種 DBA/2 マウスのそれとほぼ同様であった。また、耳下腺よりも眼窩外涙腺でより高度な病変が観察された。

すなわち、耳下腺では、2 DPI から腺房細胞の核濃縮がみられ、3 および 4 DPI には核濃縮を呈する腺房細胞の数が増加し、同時に腺房周囲に炎症細胞の浸潤を伴っていた。その後、7 DPI には腺房細胞の核分裂像および Ki-67 陽性像が対照群と比べて多く観察されたことから、腺房細胞の増殖活性化と再生性変化が示唆された。14 DPI には、これらの病変はほとんど観察されなかった。

一方、眼窩外涙腺では、耳下腺よりも少し遅れて、3 DPI から腺房細胞の核

濃縮と腺房周囲への炎症細胞浸潤が観察され、4 DPI には広範囲にわたって腺房細胞の核濃縮がみられた。その後、7 DPI には、漿液性の腺房はほぼ消失し、代わりに管腔構造が散見され、また、高度の単核球の浸潤が認められた。14 DPI には管腔構造とその周囲の線維増生がより顕著となり、単核球浸潤も依然認められた。こうした耳下腺と眼窩外涙腺における病理組織学的変化の程度の差は、両腺組織におけるウイルス RNA の発現強度の差とよく対応していた。

また、上述したように、EMCV-D の耳下腺および眼窩外涙腺での標的細胞は腺房細胞であり、導管上皮細胞には 14 DPI に至るまで変化は認められなかった。この結果は、SDAV 感染によるラットの唾液腺涙腺炎の場合には顎下腺および耳下腺では導管上皮細胞が最初の標的細胞であり、また、ハーダー腺では腺房細胞および導管上皮細胞が同時に標的となること (Doi *et al.*, 1980)、ならびに、mumps ウイルスによるヒトの耳下腺炎では導管上皮細胞が最初の標的細胞であること (Racaniello, 2001) と異なっている。このような標的細胞の違いは、それぞれのウイルスの腺組織内でのレセプターの分布の違いによる可能性がある。また、Ueno *et al.* (1997) は、精巣においては EMCV-D は最初にセルトリ細胞を傷害し、その後、隣接する胚細胞に感染が拡大することを示し、EMCV-D がセルトリ細胞を最初の標的とするのは、EMCV のレセプターのひとつである VCAM-1 が精巣ではセルトリ細胞の基底表面にのみ発現している事実と関連しているのではないかと考察している。しかし、耳下腺や涙腺における VCAM-1 の発現とその分布に関してはこれまで報告はない。

なお、EMCV-D 接種マウスの耳下腺および眼窩外涙腺に浸潤していた単核球は、その大部分が F4/80 に陽性であったことから、マクロファージであると考

えられた。この点に関しては、EMCV-D 接種マウスの睪島炎 (Hirasawa *et al.*, 1996) および精巣炎 (Yamanouchi-Ueno *et al.*, 2004) においてもマクロファージが主たる浸潤細胞であることが報告されている。

## 5. 小括

EMCV-D を鼻腔内接種した DBA/2 マウスの耳下腺および眼窩外涙腺におけるウイルス RNA の発現および病変の推移を 1 から 14 DPI にかけて経時的に検索した。その結果、半定量 RT-PCR 法によるウイルス RNA の発現の推移については、耳下腺および眼窩外涙腺ともに 3 から 7 DPI にかけて発現が確認され、14 DPI には確認できなくなった。ピーク時の 4 DPI におけるウイルス RNA の発現の程度は、眼窩外涙腺の方が耳下腺よりも高度であった。一方、病理組織学的検査では、耳下腺では 2 DPI から、また、眼窩外涙腺では 3 DPI から、それぞれ腺房細胞の核濃縮が発現し、前者では 3 および 4 DPI に、また、後者では 4 DPI に高度になり、同時に間質への単核球の浸潤が目立つようになった。この単核球は F4/80 陽性で、マクロファージであると考えられた。また、ピーク時の 4 DPI における病変は、ウイルス RNA の発現の程度と同じく、耳下腺よりも眼窩外涙腺でより高度であった。その後、前者では 7 から 14 DPI にかけて病変は収束に向かったが、後者では 7 および 14 DPI においても高度の病変が観察され、漿液性腺房の消失、管腔構造の増加およびその周囲での線維増生が目立った。これらの結果から、EMCV-D マウスの耳下腺及び眼窩外涙腺におけるウイルス RNA の発現量と病理組織学的変化の程度は眼窩外涙腺の方が耳下

腺より高度であることが明らかとなった。

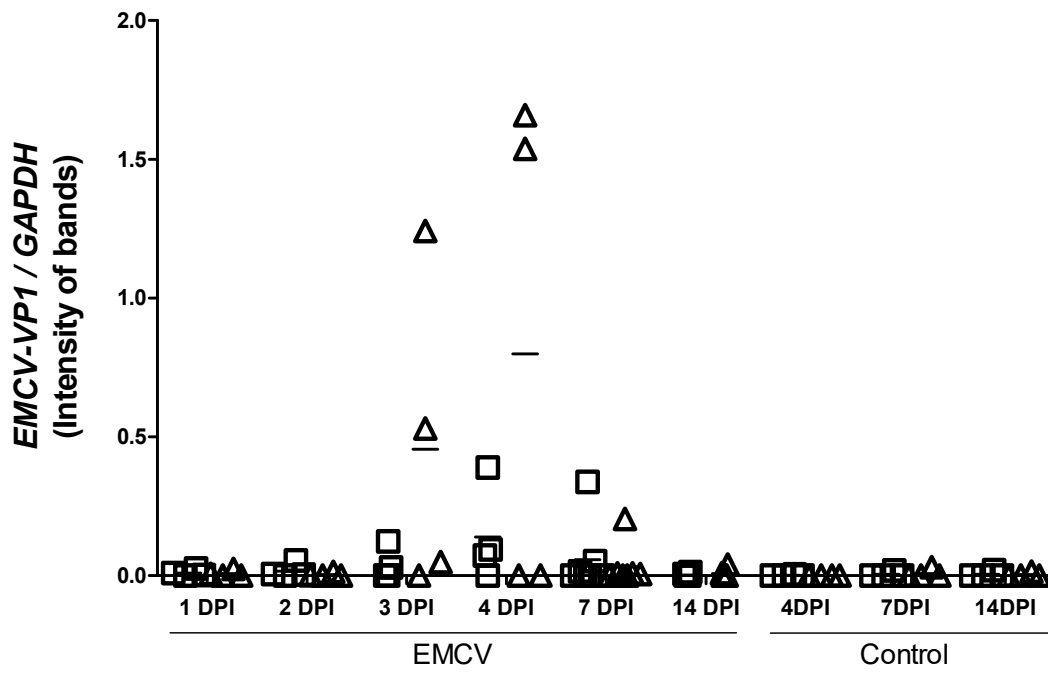


Fig.2-1

mRNA expression of EMCV-VP1. Relative ratios to the GAPDH expression quantified by densitometry. □: parotid gland; Δ: exorbital lacrimal gland; -: means.

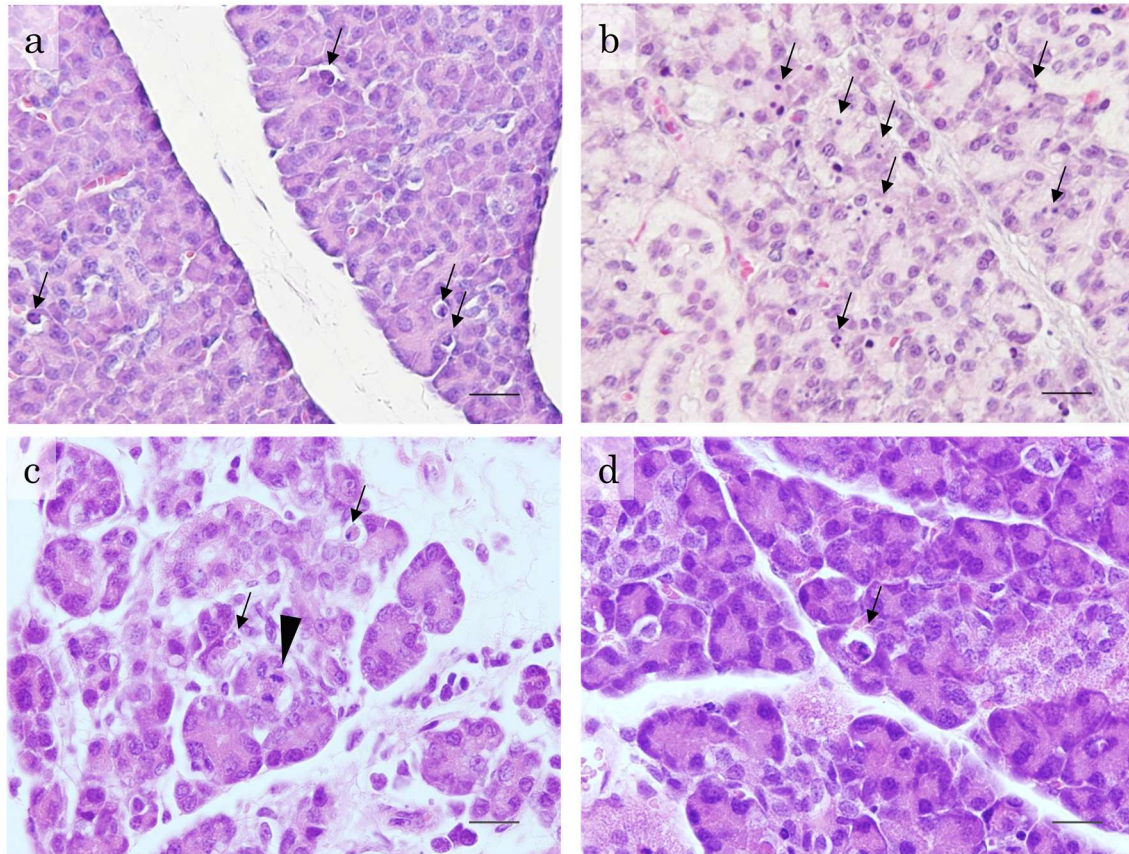


Fig.2-2

Histopathology of the parotid gland of EMCV-D-infected mice. (a) A few acinar cells with pyknotic nuclei (arrows) at 2 DPI. (b) Many pyknotic nuclei (arrows) in acinar cells at 4 DPI. (c) A few pyknotic nuclei (arrows) and mitosis (arrowhead) in acinar cells with slight interstitial inflammatory cell infiltration at 7 DPI. (d) A few acinar cells with pyknotic nuclei (arrow) at 14 DPI. Bar = 20  $\mu$ m.

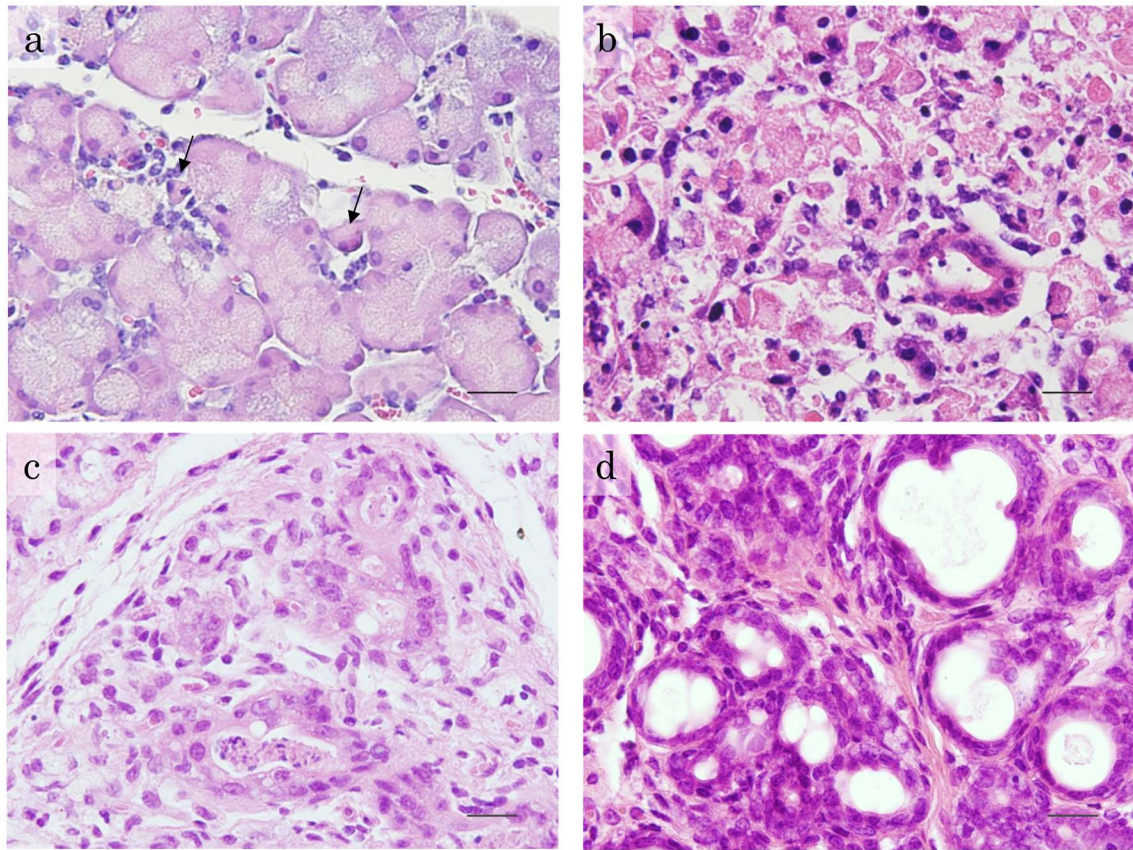


Fig.2-3

Histopathology of the exorbital lacrimal gland of EMCV-D-infected mice. (a) Pyknosis of acinar cells (arrows) and interstitial inflammatory cell infiltration at 3 DPI. (b) Severe acinar cell damage with interstitial inflammatory cell infiltration at 4 DPI. (c) Disappearance of acinar cells and ductal structures with cell debris in the lumen accompanied by interstitial inflammatory cell infiltration at 7 DPI. (d) Disappearance of acinar cells and ductal structures accompanied by interstitial inflammatory cell infiltration and fibrosis at 14 DPI. Bar = 20  $\mu$ m.



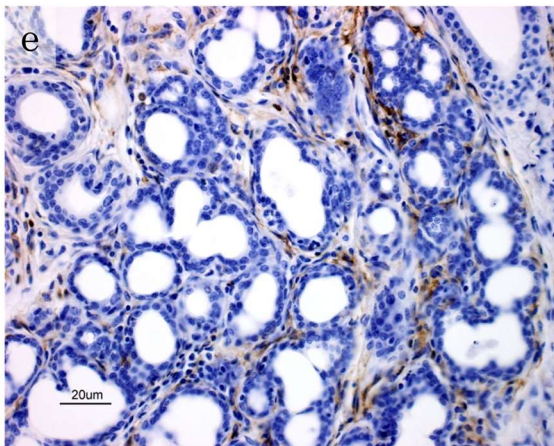
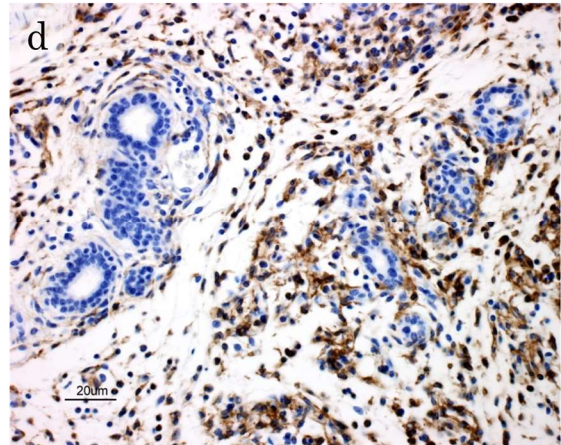
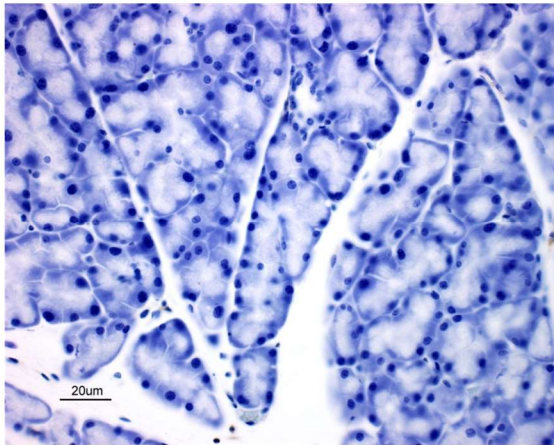
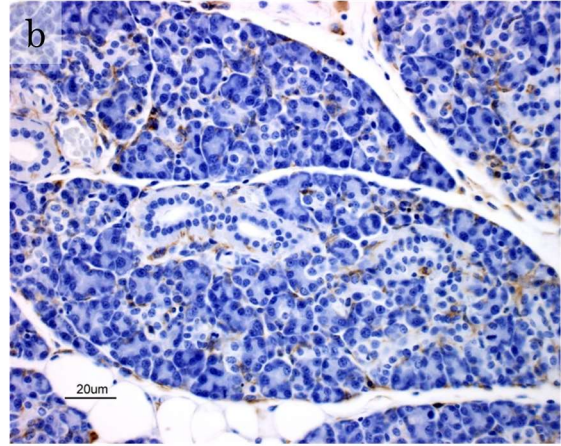
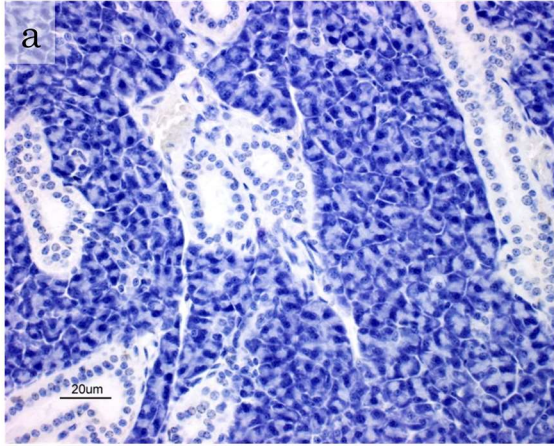


Fig.2-4

Immunohistochemical detection of F4/80 in the parotid gland (a, b) and exorbital lacrimal gland (c-e). (a) Parotid gland obtained from a control mouse at 7 DPI. No positive cells are observed. (b) Parotid gland obtained from an EMCV-D-infected mouse at 7 DPI. The majority of interstitial inflammatory cells showed positive signals. (c) Exorbital lacrimal gland obtained from a control mouse at 7 DPI. No positive cells are observed. (d) Exorbital lacrimal gland obtained from an EMCV-D-infected mouse at 7 DPI. The majority of interstitial inflammatory cells show positive signals. (e) Exorbital lacrimal gland obtained from an EMCV-D-infected mouse at 14 DPI. The majority of interstitial inflammatory cells show positive signals.

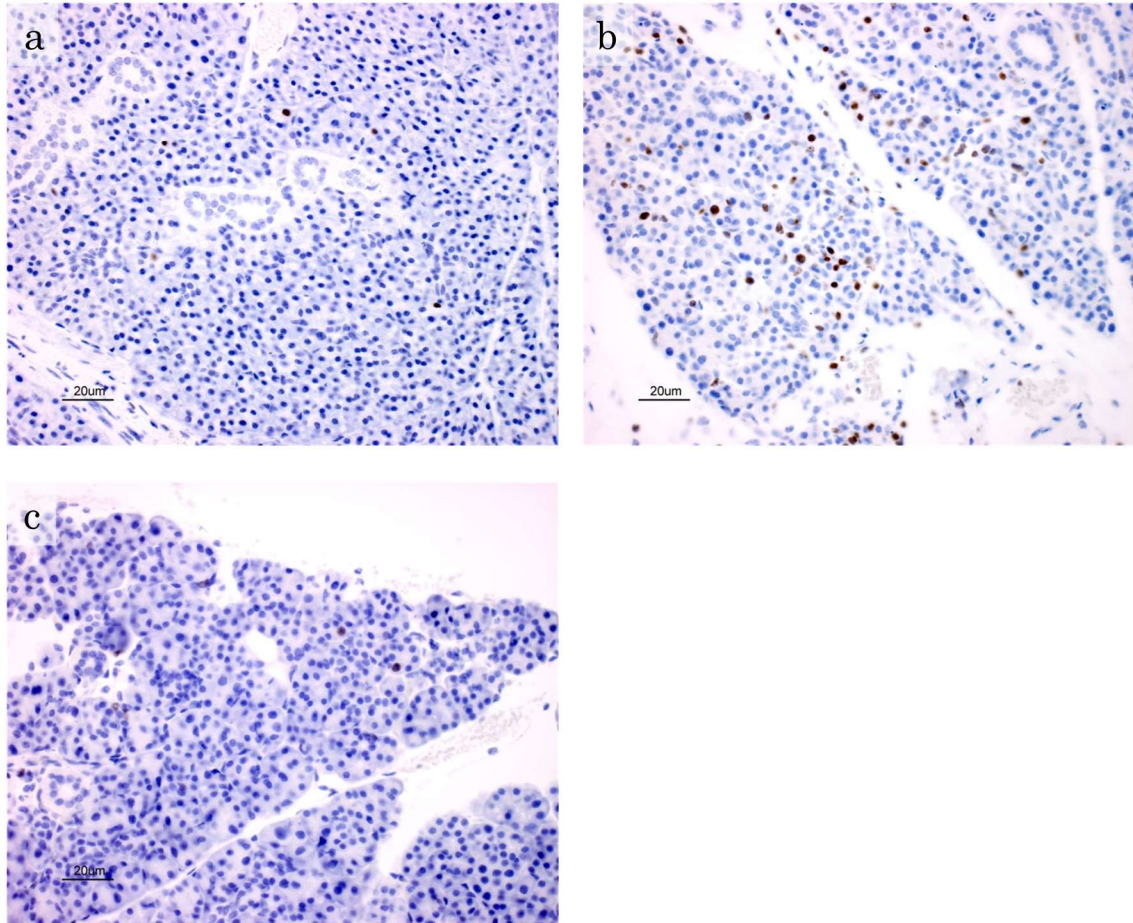


Fig.2-5

Immunohistochemical detection of Ki-47 in the parotid gland. (a) A control mouse at 7 DPI. A few positive cells are observed. (b) An EMCV-D-infected mouse at 7 DPI. A lot of positive cells are detected. (c) An EMCV-D-infected mouse at 14 DPI. A few positive cells are detected.

### 第 3 章 EMCV-D 感染 DBA/2 マウスの耳下腺及び眼窩外涙腺におけるアポトーシスの惹起と電顕所見

## 1. 小序

前章では、EMCV-D を接種した DBA/2 マウスの耳下腺及び眼窩外涙腺中のウイルス RNA の発現量および病理組織学的変化の推移を 1 から 14 DPI にかけて経時的に検索し、ウイルス RNA の発現量及び病理組織学的変化の程度は涙腺の方が耳下腺より高度であることを示した。また、両腺組織の病理組織学的特徴として、腺房細胞のアポトーシスを示唆する核濃縮が観察された。

そこで、本章では、EMCV-D を接種した DBA/2 マウスの耳下腺及び涙腺におけるウイルス RNA の発現の分布と推移及び微細形態学的変化の性状について検索するとともに、腺房細胞におけるアポトーシスの発現と推移について TUNEL 法及び免疫組織化学的検索を実施し、上述した両腺組織間の病変の強度の差との関連について検討した。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 動物

実験には 72 匹の 8 週齢の DBA/2 マウス（日本チャールスリバー、神奈川）を用い、前章と同じ方法で飼育した。

実験は全て東京大学大学院農学生命研究科実験動物委員会の承認のもとで実施した。

### 2.2. ウイルス接種と採材

前章と同様に、L-929 細胞を用いたブラックアッセイにより EMCV-D の力価を求め、0.01 M の PBS で希釈して  $1 \times 10^4$  PFU/ml に調整した。60 匹のマウスに当該ウイルス希釈液をそれぞれ 0.01 ml ( $10^2$  PFU/mouse) 鼻腔内に接種した。また、12 匹のマウスに 0.01 ml/mouse の PBS を同様に投与し、対照群として用いた。

ウイルス接種群のマウスについては、1, 2, 3 および 4DPI にそれぞれ 15 匹ずつ、対照群の動物については、4 DPI に前章と同じ方法で剖検に付した。

剖検時に各個体から耳下腺および眼窩外涙腺を採取し、*In situ hybridization* 用に 4%パラホルムアルデヒド液、TUNEL 法、免疫組織化学的検索及び HE 染色用に 10%中性緩衝ホルマリン液、電顕用に 2.5%グルタルアルデヒド/0.1M リン酸緩衝液で固定した。

### 2.3. *In situ hybridization*

*In situ hybridization* のプローブとして EMCV-D の VP-1 遺伝子の相補配列を持つジゴキシゲニン標識アンチセンス RNA を用いた。このプローブは EMCV-D に特異的であることをノーザンブロットを用いて確認してある (Takeda *et al.*, 1995)。

ハイブリダイゼーションの前処理として、耳下腺及び涙腺のパラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし、エタノールによりキシレンを除去後 0.25% 無水酢酸/0.1M トリエタノールアミン塩酸 (pH8.0) 液に 10 分浸漬し、37°C の 0.2M 塩酸に 20 分、37°C の 2  $\mu$ g/mL のプロテイナーゼ K/PBS に 30 分、4%パラホルムアルデヒド/PBS に 5 分、2 $\times$ SSC に 10 分、50%脱イオン化フォルム

アミド/2×SSC に 60 分浸漬した。前処理後、切片は 50°C で以下の溶液にて 18 時間ハイブリダイゼーションを行った。プローブ溶液（プローブ濃度：2 µg/mL）：40%脱イオン化フォルムアミド、10%硫酸デキストラン、1×デンハート液、4×SSC、10 mM DTT、100 µg/mL 酵母 t-RNA 及び 0.1 mg/mL のサケ精子 DNA。ハイブリダイゼーション後、切片を 50°C の 50%脱イオンフォルムアミド/2×SSC で 60 分洗浄し、20 µg/mL の RNase A/TNE 緩衝液（10 mM Tris-HCl、0.5M NaCl、1 mM EDTA）にて 37°C で 30 分インキュベート後、50°C の 20×SSC 及び 0.2×SSC にて 60 分ずつ洗浄した。

ブロッキングバッファー（1%ブロッキング試薬（ベーリンガーマンハイム、東京）、0.1 M Tris-HCl（pH7.5）、0.15 M NaCl）にて切片を 30 分処理後、ブロッキングバッファーで 500 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体（ベーリンガーマンハイム）と 4°C で一晩インキュベートし Nitro blue tetrazolium/Bromochloroindolyl phosphate にて発色した。

#### 2.4. 電顕観察

2.5%グルタルアルデヒド/0.1M リン酸緩衝液にて固定した組織小片を 0.1% オスミウム/0.1M リン酸緩衝液にて後固定し、エポン 812 に包埋した。超薄切切片は酢酸ウラン及びクエン酸鉛にて二重染色し JEM-1200EX 電子顕微鏡（JEOL、東京）を用いて電顕観察を実施した。

#### 2.5. 核濃縮腺房細胞数の測定

ホルマリン固定した耳下腺及び眼窩外涙腺からパラフィン切片（4 µm）を作

製し、HE染色を行った。アポトーシス細胞の割合を評価するため、腺房細胞の核を光顕下で観察し、核濃縮細胞数を計測した。アポトーシス細胞の割合は全体の核数に対する濃縮核のパーセントとして算出した。

## 2.6. TUNEL 染色

断片化した DNA を検出するために Gavrieli ら (1992) によって提唱され、アポトーシス細胞の検出法として広く使われている TUNEL 染色を実施した。染色にはアポトーシス検出キット (Apop Tag; CHEMICON international, Temecula, USA) を使用した。切片上の DNA 断片の 3'-OH 末端をターミナルヌクレオチドトランスフェラーゼ (TdT) 下でジゴキシゲニン-dUTP で標識した後、ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体で反応させ、DAB を用いて発色した。核染色にはメチルグリーンを用いた。

## 2.7. 免疫組織化学的染色

内因性及び外因性のアポトーシスの実行因子の一つであるクリーブドカスパーゼ3 (Limesand *et al.*, 2003) に対する免疫組織化学的検索を行った。一次抗体として、ウサギ抗クリーブドカスパーゼ3ポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, USA) を用い、ストレプトアビジン (DAKO, Carpinteria, USA) を用いた Labeled StreptAvidin Biotin 法により染色し、DAB を用いて発色させた。核染色にはメチルグリーンを用いた。

## 3. 結果



### 3.1. *In situ* hybridization 法による EMCV-D の RNA の分布

耳下腺では 3 及び 4DPI に少数の腺房細胞にウイルス RNA のシグナルが認められた (Fig. 3-1a)。一方、眼窩外涙腺では、ウイルス RNA の強いシグナルが 3 及び 4DPI に腺房細胞に認められた (Fig. 3-1b)。両腺組織共に導管上皮細胞にはウイルス RNA のシグナルは認められなかった。

### 3.2. 電顕所見

耳下腺では、2 DPI に核クロマチンの濃縮した腺房細胞が複数認められた。また、少数ながらマクロファージに貪食されたアポトーシス小体も観察された (Fig.3-2a)。3 及び 4 DPI にはマクロファージあるいは隣接する腺房細胞に貪食されたアポトーシス小体が多数観察された (Fig. 3-2b)。

眼窩外涙腺では、2 DPI にごく少数の腺房細胞で、濃縮した核クロマチンの核膜近辺への偏在化、核膜の軽度の拡張及び分泌顆粒の融合が認められた (Fig. 3-2c)。3 DPI には核クロマチンの濃縮及び細胞体の収縮が顕著に進行し、少数の細胞では粗面小胞体の拡張も認められた。同時に、核が断片化し、隣接する腺房細胞あるいはマクロファージに貪食された腺房細胞も認められた (Fig. 3-2d)。また、径 20~30 nm のウイルス様粒子の集簇巣が、変性細胞の細胞質及び核クロマチンが核膜に辺縁化した核内に認められた (Fig. 3-2e)。更に、腺房細胞の細胞質には、ウイルス様粒子の結晶様配列も認められた (Fig. 3-2f)。4 DPI には腺房細胞は高度に破壊されていた。

### 3.3. 核濃縮腺房細胞数

第1章の検索結果と同様に、1DPIの耳下腺及び眼窩外涙腺並びに2DPIの眼窩外涙腺には核濃縮を呈する腺房細胞は認められなかった。耳下腺ではその後2DPIに0.2~1.4%の腺房細胞に核濃縮が見られ、3DPIには3~26%、4DPIには17~37%と核濃縮細胞の割合が増えた。一方、眼窩外涙腺では、3DPIに5~19%の核濃縮細胞が認められ、4DPIには個体差が極めて大きく、6~100%の細胞が核濃縮を起こしていた (Fig. 3-3)。

### 3.4. TUNEL 染色及び免疫組織化学的所見

耳下腺及び眼窩外涙腺において腺房細胞の濃縮核のほとんどが TUNEL 法及びクリーブドカスパーゼ 3 に対する免疫染色に陽性を示した (Fig. 3-4)。

## 4. 考察

本章では、EMCV-D 接種 DBA/2 マウスの耳下腺および眼窩外涙腺におけるウイルス RNA の分布の推移及び微細形態学的変化の性状を検索するとともに、腺房細胞におけるアポトーシスの発現とその推移について検索し、前章で認められた両腺組織間における病変の強度の差との関連について検討した。

耳下腺及び眼窩外涙腺の腺房細胞では、*in situ* hybridization 法による EMCV-D のウイルス RNA シグナルは 3 DPI から検出され、眼窩外涙腺の方が耳下腺よりも強かった。この結果は、第2章で述べた RT-PCR 法による EMCV-D のウイルス RNA の発現量の動態と一致していた。また、ウイルス RNA のシグ

ナルは、両腺組織ともに腺房細胞に限局しており、導管上皮細胞には認められず、EMCV-D 感染マウスにおける病理組織学的変化の分布と一致していた。

電顕検索では、眼窩外涙腺の腺房細胞で、ウイルス様粒子の集簇が細胞質及び核クロマチンが核膜周辺へ辺縁化した核内に認められた。更に、細胞質内では、ウイルス様粒子の結晶様配列も観察された。これらの粒子はピコルナウイルスの典型的なサイズ及び構造を示し、EMCV-D 感染後のマウスの心筋細胞 (Hirawasa *et al.*, 1992)、セルトリ細胞及び胚細胞 (Ueno *et al.*, 1996) 並びに胎盤の栄養膜細胞及び巨細胞 (Nakayama *et al.*, 2004) において報告されたものと一致していた。一般的にピコルナウイルスの複製は細胞質で行われるとされている (Racaniello, 2001) が、上記の本章での観察結果の他にも、Psychasら (2001) が EMCV に感染した子豚の心筋細胞において核クロマチンが核膜周辺に辺縁化した核内にウイルス様粒子が見られたことを報告している。このような核内におけるウイルス粒子の出現の意義については今のところ不明である。

ところで、前章までの検索で、マウスの耳下腺及び眼窩外涙腺における EMCV-D 感染初期の病理組織学的変化の特徴として、腺房細胞の核濃縮が認められた。本章では、改めて両腺組織の腺房細胞における核濃縮細胞の推移を検索するとともに、核濃縮細胞のほとんどが TUNEL 法で陽性であることを示した。また、核濃縮細胞は、アポトーシスの最終実行で中心的役割を果たす因子である cleaved caspase-3 に対する免疫染色にも陽性を示した。更に、電顕観察では、両方の腺組織において凝縮した核クロマチンの核膜周辺への辺縁化を示す腺房細胞や隣接する腺房細胞あるいはマクロファージに貪食されたアポトーシス小体が観察された。これらの結果から、核濃縮細胞はアポトーシス細胞と

考えられ、更に、電顕的にアポトーシスの特徴を示す腺房細胞内に EMCV 様粒子が確認されたことから、EMCV の細胞内への感染及び増殖により腺房細胞のアポトーシスが引き起こされたものと考えられた。

また、光顕下でウイルス接種後の各時点での耳下腺及び眼窩外涙腺の腺房細胞中の核濃縮細胞の割合を算出した結果、耳下腺では 2 DPI から核濃縮細胞が見られたのに対し、眼窩外涙腺では 3 DPI から核濃縮細胞が見られはじめ、耳下腺の方がより早期にアポトーシスが誘発されていた。4 DPI での核濃縮細胞率は耳下腺では 40%未満であったのに対し、眼窩外涙腺では、個体差が大きいものの、ほぼ全細胞が傷害（核濃縮）を受けている個体が複数見られ、病変の進展は眼窩外涙腺の方が重篤であった。

アポトーシスはウイルスに対する生体の最初の防御反応であり、初期に感染した細胞が自己を排除することによりウイルスの拡散を防ぐと言われている (Teodoro and Branton, 1997)。Schwarz ら (1998) は p50 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較して EMCV の病原性が軽減することを示し、その理由として p50 ノックアウトによりウイルス感染細胞のアポトーシスが野生型よりも早期に起こることを示唆している。本章において、耳下腺では眼窩外涙腺より腺房細胞のアポトーシスが早期に発現するものの、ピーク時である 4 DPI のアポトーシスの強度は眼窩外涙腺よりも軽度であった。このことは、耳下腺では EMCV-D 感染細胞がより早期にアポトーシスによって排除され、その後の周囲細胞へのウイルス感染の波及が抑制された可能性を示唆しているのかもしれない。

## 5. 小括

EMCV-D を鼻腔内接種した DBA/2 マウスの耳下腺および眼窩外涙腺における急性期のウイルス RNA の発現の分布および病変を 1 から 4 DPI にかけて詳細に検索した。*in situ* hybridization 法及び電顕検索の結果、EMCV-D のシグナルは、耳下腺および眼窩外涙腺ともに腺房細胞に発現しており、導管上皮細胞には認められず、病理組織学的変化の分布及び電顕検索による EMCV 様粒子の出現部位とも一致していたことから、EMCV-D 感染により腺房細胞の病変が惹起されたものと考えられた。また、光顕的に核濃縮を呈する腺房細胞は TUNEL 法及び Cleaved-caspase3 の免疫染色に陽性を示し、また、電顕検索でアポトーシスに特徴的な形態像を示した。さらに、腺房細胞のアポトーシスは耳下腺の方が眼窩外涙腺よりも早期から発現したが、ピーク時である 4 DPI のアポトーシスの強度は眼窩外涙腺の方が強かったことは、耳下腺ではアポトーシスによる EMCV-D 感染細胞の早期の排除がその後の周囲細胞へのウイルス感染の波及による病変の進展を抑制した可能性を示唆しているのかもしれない。

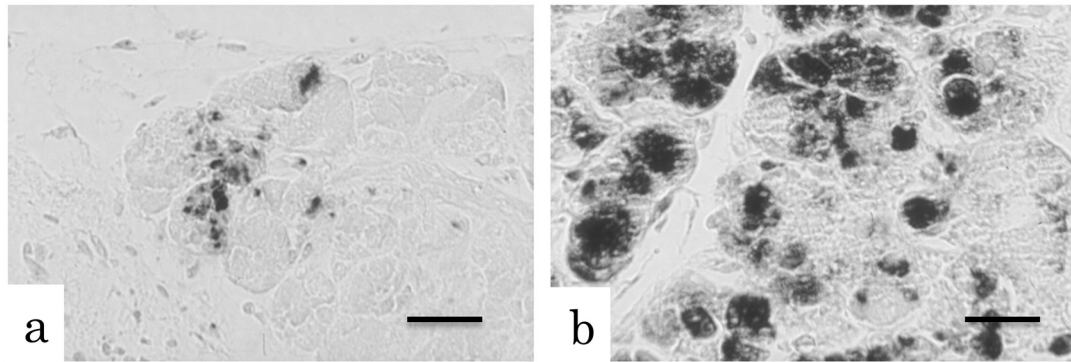


Fig.3-1

Localization of viral RNA signals in acinar cells in the parotid gland (a) and exorbital lacrimal gland (b) at 3 DPI in EMCV-D-infected mice.

ISH, Bar = 20  $\mu$ m.

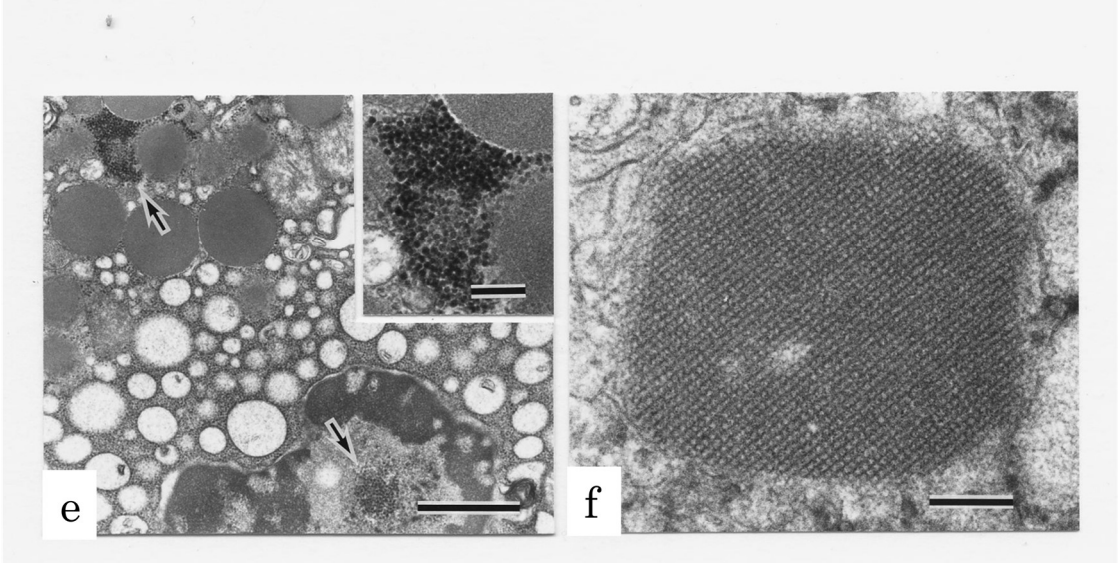
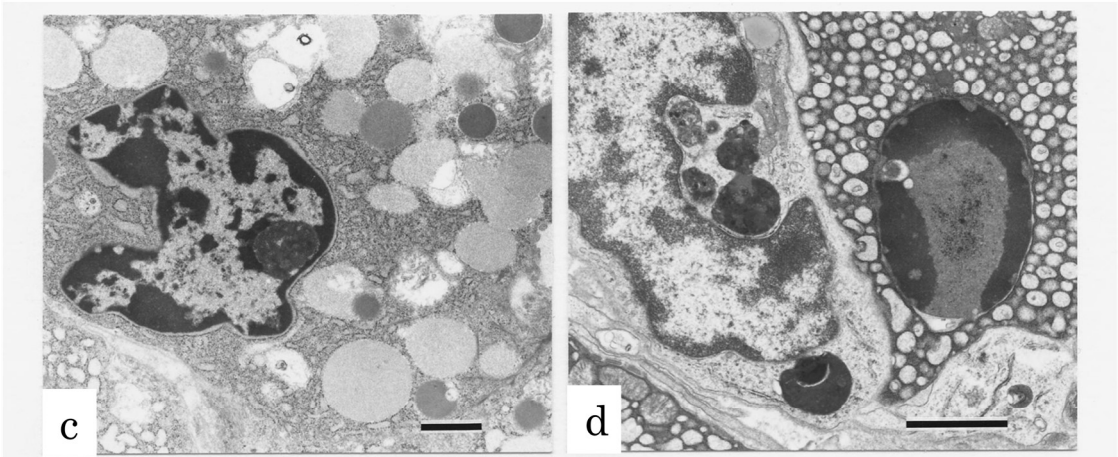
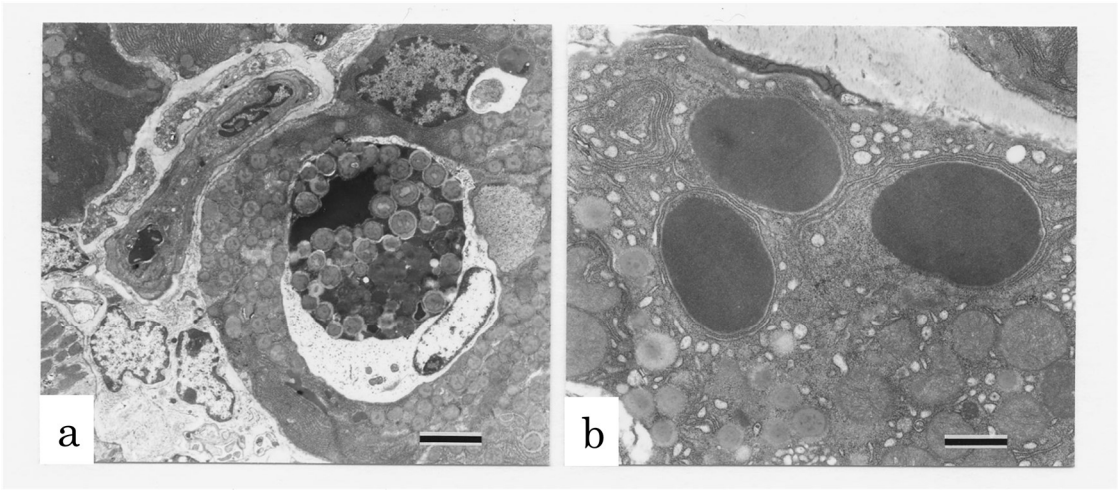


Fig.3-2

Electron micrographs of the parotid gland (a, b) and exorbital lacrimal gland (c - f) from EMCV-D-infected mice. (a) Apoptotic bodies ingested by macrophage at 2 DPI. Bar = 3  $\mu\text{m}$ . (b) Apoptotic bodies ingested by an adjacent acinar cell at 3 DPI. Bar = 1  $\mu\text{m}$ . (c) Margination of condensed nuclear chromatin along the nuclear membrane, slight dilation of nuclear envelope and fusion of secretory granules in an acinar cell at 2DPI. Bar = 1  $\mu\text{m}$ . (d) Apoptotic bodies ingested by a macrophage at 3 DPI. Bar = 2  $\mu\text{m}$ . (e) Aggregates of virus-like particles (arrows) both in the cytoplasm and nucleus at 3 DPI. Bar = 1  $\mu\text{m}$ , Inset: higher magnification of virus-like particles in the cytoplasm. Bar = 200 nm. (f) Crystalline array of virus-like particles in the cytoplasm of an acinar cell at 3DPI. Bar = 200 nm.



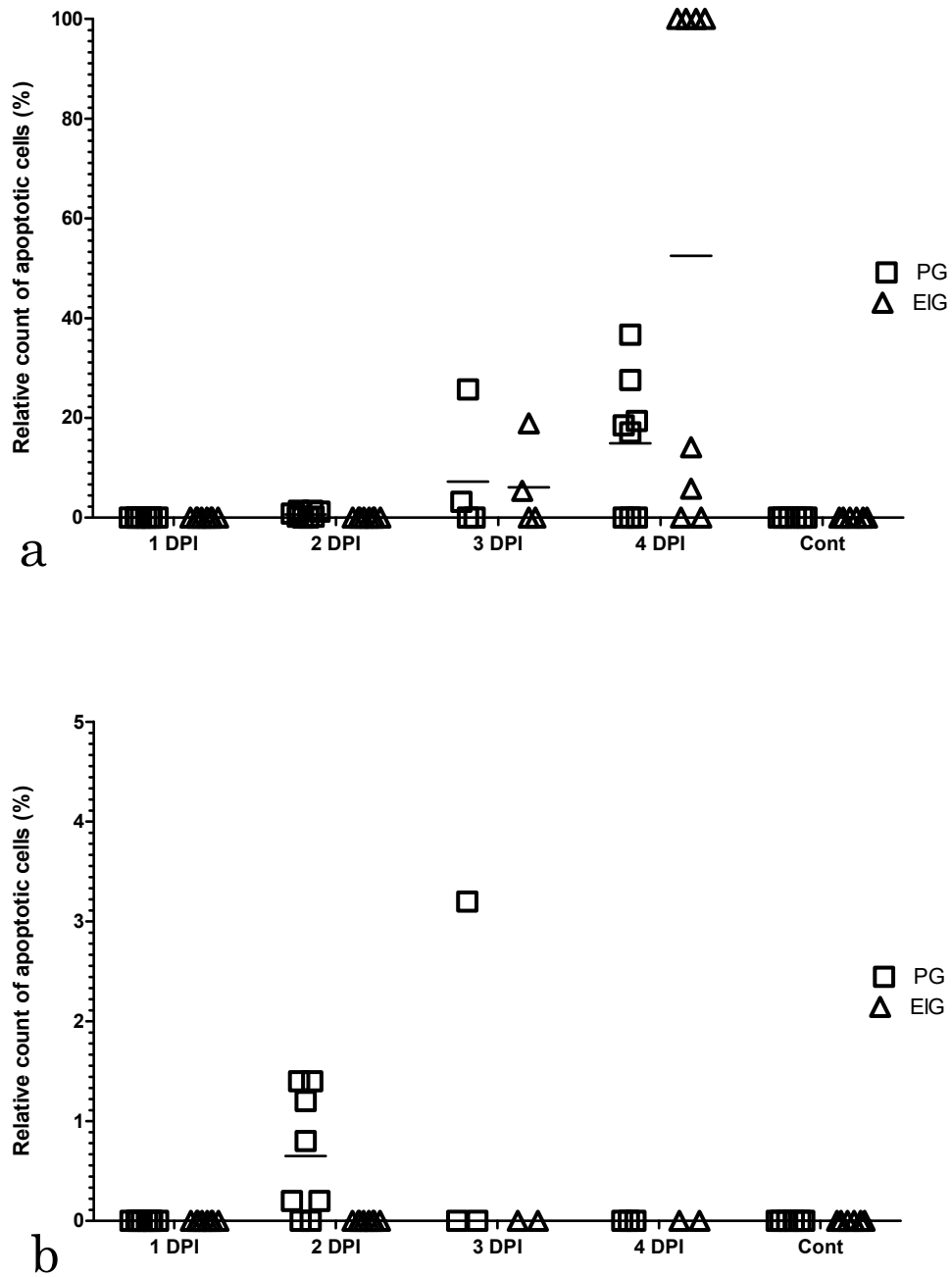


Fig.3-3

Relative ratios of apoptotic acinar cells. (a) Overview graph. (b) Enlargement graph of 0 to 5%. □: parotid gland; △: exorbital lacrimal glands; —: means.

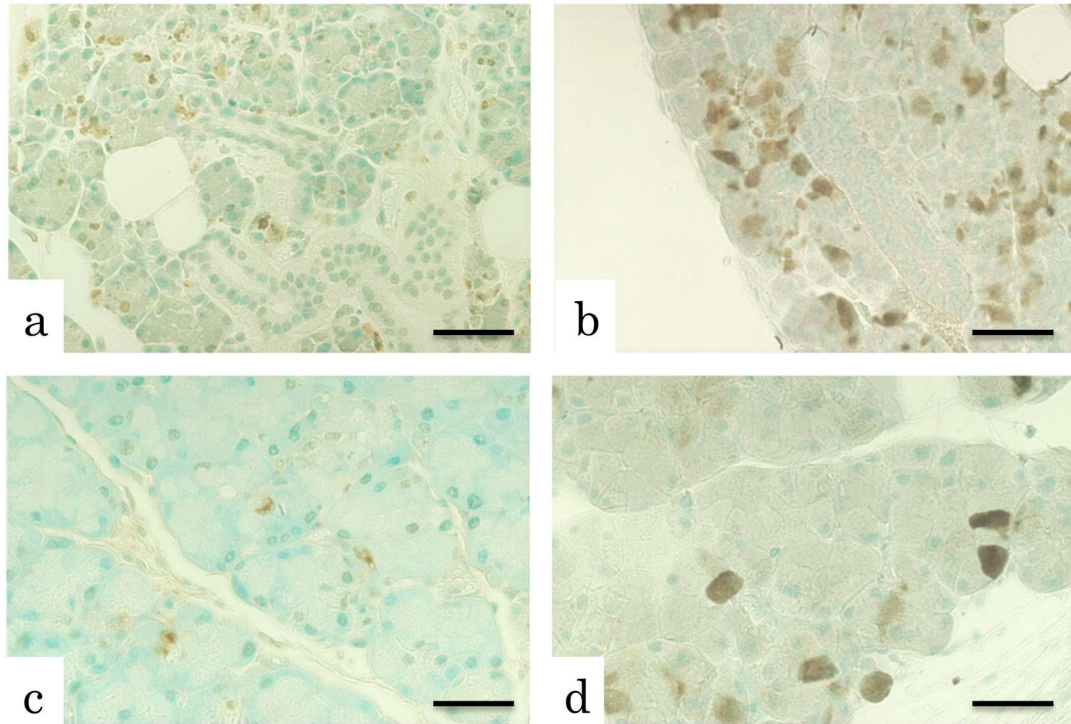


Fig.3-4

TUNEL- and immunostaining of the parotid gland (a, b) and exorbital lacrimal gland (c, d) in EMCV-D-infected mice at 3 DPI. Pyknotic acinar cells are positively stained by TUNEL method (a and c) and immunohistochemistry for cleaved caspase-3 (b and d). Bar = 30  $\mu$ m.

## 第4章 EMCV-D 誘発唾液腺涙腺炎の急性期におけるタイプ

### I インターフェロンシグナルの推移

## 1. 小序

前章までに、EMCV-D 接種 DBA/2 マウスの耳下腺及び涙腺を 1 から 4 DPI にかけて多角的かつ詳細に検索した。その結果、感染の急性期には、耳下腺及び涙腺で腺房細胞のアポトーシスを特徴とする病変が認められ、アポトーシスは涙腺より耳下腺でより早期から発生することを明らかにした。一方、4 DPI 以降の組織傷害は、涙腺より耳下腺で軽度であった。アポトーシスはウイルスに対する生体の最初の防御反応であり、感染した細胞が自己を排除することによりウイルスの拡散を防ぐと言われている (Teodoro and Branton, 1997)。このことから、涙腺と比較して耳下腺において感染初期の防御反応が効果的に機能している可能性が推察された。

そこで、本章では、アポトーシスの発現時期と以後の組織傷害の強度における両腺組織間の差の原因を探るため、EMCV-D 感染急性期における DBA/2 マウスの耳下腺及び涙腺におけるタイプ I インターフェロン (IFN) シグナルの活性化について比較を行った。

INF シグナルの活性化については、以下のことが明らかにされている。すなわち、タイプ I IFN はウイルス感染により活性化する抗ウイルスの主要因子であり、感染細胞のアポトーシスを誘発すると言われている。哺乳類細胞にウイルスが感染すると、初期型のタイプ I インターフェロンの合成及び分泌が誘発される。これらの IFN は感染細胞自身あるいは隣接する非感染細胞の細胞表面 IFN $\alpha$  受容体に結合し、Jak-Stat 経路を活性化する。また、Jak1 及び Tyk2 は、Stat1 及び 2 をチロシンリン酸化する。リン酸化 Stat1 及び Stat2 はヘテロ二量

体化し Irf9 に結合して ISGF3 を形成する。ISGF3 は核へ移行し、IFN $\alpha$ 4 を除く後期型 IFN $\alpha$  及び Irf ファミリー、Pkr、Oas などの IFN 刺激性遺伝子 (ISG (IFN-stimulated genes)) の転写を誘発する。Irf ファミリーの1つである Irf7 はポジティブフィードバックループを介して更なる IFN $\alpha$  産生を促進する (Ivashkiv and Donlin., 2014)。Pkr は不活性状態で合成され、ウイルス増幅中に産生されるウイルス二本鎖 RNA によって活性化する。活性化 Pkr は主として eIF2 $\alpha$  をリン酸化し、リン酸化 eIF2 $\alpha$  は細胞のタンパク合成を阻害し、最終的にアポトーシスによる細胞死を誘発し、感染細胞を除去する (Lee *et al.*, 2007)。Pkr と同様に Oas も不活性状態で合成されウイルス二本鎖 RNA によって活性化する。活性化 Oas は Rnase1 を活性化し、細胞及びウイルスの RNA を分解する。Oas/Rnase1 経路はアポトーシスによってウイルス感染細胞を除去するとも言われている (Zhou *et al.*, 1997)。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 動物

実験には、34 匹の 8 週齢 DBA/2 マウス (日本チャールスリバー、神奈川) を用い、前章と同じ方法で飼育した。

実験は全て東京大学大学院農学生命研究科実験動物委員会の承認のもとで実施した。

### 2.2. ウイルス接種と採材

前章と同様に、L-929 細胞を用いたブラックアッセイにより EMCV-D の力価を求め、0.01 M の PBS で希釈して  $1 \times 10^4$  PFU/ml に調整した。12 匹のマウスに当該ウイルス希釈液をそれぞれ 0.01 ml ( $10^2$  PFU/mouse) 鼻腔内に接種した。また、2 匹のマウスに 0.01 ml/mouse の PBS を同様に投与し、対照群として用いた。

ウイルス接種群については、1, 2 および 4DPI に各 4 匹のマウスを、また、対照群については、4 DPI に 2 匹のマウスを、それぞれ前章と同じ方法で剖検に付した。

剖検時に各個体から耳下腺および眼窩外涙腺を採取し、右側は免疫組織化学的検索用に 10%中性緩衝ホルマリン液で保存し、左側はウエスタンブロット用に  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 2.3. RNA 抽出及び半定量 RT-PCR

第 2 章で採材した 1~4DPI の耳下腺・涙腺のサンプルを RT-PCR 解析に用いた。第 2 章と同様に、ISOGEN (ニッポンジーン、富山) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA は、Prime Script RT-PCR kit (タカラバイオ、滋賀) を用い、RNA 3  $\mu\text{g}$  を oligo dT primer を含む 60  $\mu\text{L}$  の反応液に添加し、逆転写反応により 1 本鎖 cDNA を合成した。IFN $\beta$ 、IFN $\alpha 4$ 、non-IFN $\alpha 4$ 、Irf7、Pkr、Oas 及び GAPDH のプライマーセットを用いて PCR を行った。センス及びアンチセンスプライマーの配列及び PCR サイクル数を Table 1 に示す。

PCR の増幅には 2.5  $\mu\text{L}$  の 10 $\times$ PCR buffer (タカラバイオ)、1  $\mu\text{L}$  の dNTP (タカラバイオ)、0.25  $\mu\text{L}$  の TaKaRa Ex Taq HS 及び 0.2  $\mu\text{M}$  のセンス及びア

ンチセンスプライマーに 0.5  $\mu\text{L}$  の cDNA を添加した 25  $\mu\text{L}$  の反応液を及び Takara PCR Thermal cycler SP を用いた。初めに 94°C で 1 分 cDNA を熱変性した後、94°C、1 分で熱変性、58°C、1 分でプライマーのアニーリング、72°C、1 分で相補鎖の合成のサイクルを行った。PCR 産物は 2%アガロースゲル（ニッポンジーン）で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色（Gibco, Gaithersburg, USA）で検出した。蛍光バンドは UV-CCD ビデオシステム（EpiLightUVFA1100；アイシンコスモス、東京）を用いて可視化し、デンシトメトリーで RNA 量を定量し GAPDH との相対値を算出した。対照群における値の範囲内を陰性とし、RNA の発現の程度を、以下のようにグレーディングした。陰性：0.11 以下、弱陽性：0.11～0.5、陽性：0.5～1.0、強陽性：1.0 以上。

#### 2.4. ウェスタンブロット解析

2.2 項で採取した凍結耳下腺及び眼窩外涙腺を用い、リン酸化 Stat1、2 及び eIF2 $\alpha$  についてウェスタンブロット解析を行った。

150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% NP-40、0.5% DOC、0.1% SDS、10 mM NaF、2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、及びプロテアーゼインヒビターカクテル（Roche Applied Science, Penzberg, Germany）を含む 50 mM トリス塩酸バッファ（pH 8.0）を用い耳下腺及び眼窩外涙腺をホモジナイズした。タンパク濃度はローリープロテインアッセイキット（Bio-Rad, Hercules, USA）により求めた。等量のタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲルにロードし、20 mA で 1 時間電気泳動した後、PVDFメンブレン（Bio-Rad）に転写した。ブロットしたメンブレンは抗リン酸化 Stat1 抗体（Tyr701；1:1000、Cell Signaling Technology, Beverly, USA）、

抗リン酸化Stat2抗体 (Thy689 ; 1:500、Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA) 及び抗リン酸化eIF2 $\alpha$ 抗体 (Ser51 ; 1:1000、Cell Signaling Technology) を用いて免疫染色し、HRP二次抗体 (Cell Signaling Technology) にてインキュベーションした後ECL Plus Western Blotting Detection Reagent

(Amersham, Buckinghamshire,UK) で免疫陽性反応を可視化し、ChemiDoc XRS-J (Bio-Rad) を用いて検出した。等量のタンパクが各レーンに入っていることを確認するため、メンブレンから一次抗体を取り除き、 $\beta$ -actin (1:1000、Cell Signaling Technology) で再度染色した。バンドはデンシトリーにより定量化し、 $\beta$ -actinに対する相対値を算出した。対照群における値の範囲内を陰性とし、タンパクの発現の程度を以下のようにグレーディングした。陰性 : 0.11以下、弱陽性 : 0.11~0.5、陽性 : 0.5~1.0、強陽性 : 1.0以上。

## 2.5. 免疫組織化学的染色

2.2 項で採取したホルマリン固定耳下腺及び眼窩外涙腺のうち、4 DPI に採材したサンプルについて、リン酸化 Stat1 に対する免疫組織化学的検索を行った。一次抗体として、ウサギ抗リン酸化 Stat1 モノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology) を用い、対応するペルオキシダーゼ標識二次抗体 (ヒストファイン シンプルステインマウス MAX-PO (R) : ニチレイバイオサイエンス、東京) を用い DAKO Autostainer Universal Staining system (DAKO, Carpinteria, USA) で染色し、DAB を用いて発色させた。核染色にはヘマトキシリンを用いた。



### 3. 結果

#### 3.1. 半定量 RT-PCR 法によるタイプ I IFN シグナルカスケードの発現

耳下腺及び眼窩外涙腺における IFN $\beta$ 、IFN $\alpha$ 4、non-IFN $\alpha$ 4、Irf7、Pkr 及び Oas mRNA の発現推移を、半定量 RT-PCR 法を用いて解析した。結果を Fig.1 に示す。

耳下腺においては、IFN $\beta$ 、IFN $\alpha$ 4 及び non-IFN $\alpha$ 4 mRNA は、1 及び 2 DPI には陰性、3 及び 4 DPI には弱陽性から陽性を示した。これは第 2 章で示した耳下腺におけるウイルス RNA の発現の推移と関連していた。眼窩外涙腺では 1DPI にウイルス RNA の発現が認められなかったにも拘わらず、IFN $\beta$ 、IFN $\alpha$ 4 及び non-IFN $\alpha$ 4 mRNA の弱～強度の発現が認められた。2 DPI にはこれらの IFN mRNA の発現は認められず、3 及び 4 DPI には弱陽性から陽性を示した。なお、3 及び 4 DPI にウイルス RNA の発現が認められなかった個体では、これらの IFN mRNA の発現も認められなかった。

一方、ISG (Irf7、Pkr 及び Oas) mRNA は耳下腺において 2 DPI に弱陽性、3 及び 4 DPI に弱陽性～陽性を示した。眼窩外涙腺では、ISG mRNA の発現は 1 及び 2 DPI に陰性、3 及び 4 DPI に弱～強陽性であった。

#### 3.2. ウェスタンブロット解析

耳下腺及び眼窩外涙腺におけるリン酸化 Stat1、Stat2 及び eIF2 $\alpha$ タンパクの発現量をウェスタンブロットにより解析した。結果を Fig.2 に示す。1 DPI には、リン酸化 Stat1 タンパクは両方の腺組織共に発現は認められなかった。リン酸

化 Stat2 タンパクは耳下腺では発現はなく、眼窩外涙腺において弱い発現が認められた。2 DPI には、リン酸化 Stat1 タンパクは両方の腺組織共に発現は見られなかった。リン酸化 Stat2 タンパクは両方の腺組織共に弱～強度の発現が認められた。4 DPI には、リン酸化 Stat1 タンパクは両腺組織で弱陽性～陽性を示し、リン酸化 Stat2 タンパクは両腺組織で弱～強度の発現が認められた。

一方、リン酸化 eIF2 $\alpha$ タンパクは耳下腺では1及び4 DPI に弱い発現を示し、2 DPI には発現は認められなかった。眼窩外涙腺では、1 DPI に強度の発現を示したが、2 DPI には減少し、4 DPI には弱陽性～陽性を示した。

### 3.3. 免疫組織化学的所見

4 DPI の両腺組織の腺房細胞に、リン酸化 Stat1 の陽性像が認められたが、導管上皮細胞には認められなかった (Fig.3)。陽性像は主として核に認められ、核陽性細胞の少数においては細胞質にも陽性反応が認められた。

## 4. 考察

本章では、アポトーシスの発現時期と以後の組織傷害の強度について耳下腺と眼窩外涙腺組織間の差の原因を探るため、EMCV-D 感染急性期における DBA/2 マウスの耳下腺及び涙腺におけるタイプ I インターフェロン (IFN) シグナル経路の活性化を精査し、両腺組織間で比較した。

耳下腺では、Pkr 及び Oas mRNA の発現量は 2 から 4DPI にかけて徐々に増加したが、これは前章で示した腺房細胞のアポトーシスと同様のパターンであ

った。眼窩外涙腺では、Pkr 及び OAS mRNA の発現は 3 及び 4 DPI で弱～強陽性であった。Pkr 及び Oas mRNA の転写は Stat1 及び Stat2 のリン酸化により引き起これるとされているが、本章の検索により Stat1 及び Stat2 のリン酸化がウェスタンブロットにより確認された。また、免疫染色により Stat1 タンパクのリン酸化が主に腺房細胞の核で、また時に細胞質にも同時に見られることも確認された。これらの結果から、EMCV-D 感染後、IFN シグナルの経路が腺房細胞で活性化し、リン酸化 Stat1 がまず細胞質で Stat2 とヘテロ二量体化し、核に移動したことが示唆された。

本章の結果から、耳下腺において Pkr 及び Oas の活性化と腺房細胞のアポトーシスが同時に起こることが確認された。すなわち、ISG シグナルとアポトーシスは耳下腺において 2DPI に速やかに誘発され、これが恐らくウイルスの複製を抑制し、感染細胞をアポトーシスにより除去したものと考えられた。一方、眼窩外涙腺では、2DPI には ISG mRNA の発現は認められなかったことから、この時点ではアポトーシスによる抗ウイルス反応は惹起されていなかったものと考えられた。

小序で述べたように、Pkr はウイルスの二本鎖 RNA によって活性化し、eIF2 タンパクをリン酸化する。本章により、リン酸化 eIF2 $\alpha$  は両方の腺組織で 1 DPI に検出され、2 DPI には減少し、4 DPI に再度検出されたが、これらの変動は腺房細胞のアポトーシスの進展とは一致していなかった。このことから、腺房細胞のアポトーシスには eIF2 $\alpha$  だけでなく他のシグナルカスケードも関わっているものと推察された。この点に関しては、Pkr は eIF2 $\alpha$  以外のウイルス誘発アポトーシスを引き起こす転写因子の活性化を制御するとも言われており

(Guerra *et al.*, 2006)、これらの因子が増加した可能性も考えられた。

IFN $\alpha$ と $\beta$ は、耳下腺で 3 及び 4DPI に発現が認められた。一方、眼窩外涙腺では、1DPI に弱～強発現が見られ、この時点ではまだウイルス RNA は検出されていなかった。IFN mRNA は 2DPI には検出されなくなり、3 及び 4DPI に再び発現が認められた。タイプ I IFN は SOCS1、SOCS3 や USP18 などのサイトカイン、ユビキチンを誘導し、タイプ I IFN シグナルの進展を抑制するネガティブフィードバック機構を有すること (Ivashkiv and Donlin, 2014) から 1DPI における IFN $\alpha/\beta$  mRNA の転写誘導によりネガティブフィードバック機構が活性化され、2DPI での IFNmRNA の発現が抑制された可能性が考えられた。また、Irf7 mRNA は、1 及び 2DPI の眼窩外涙腺では検出されなかった。Irf7 はポジティブフィードバックにより IFN $\alpha/\beta$ シグナルを更に進展させる働きがある (Ivashkiv and Donlin, 2014)。したがって、Irf7 が感染早期に発現していないことは、眼窩外涙腺での 2DPI の IFN シグナルのダウンレギュレーションと関連があるのかも知れない。カルディオウイルスには IFN カスケードを抑制するウイルスタンパクがいくつか知られており (Freundt *et al.*, 2018)、EMCV のウイルスタンパク 3C も IFN $\beta$ の誘導を抑制する報告がある (Ng *et al.*, 2013)。眼窩外涙腺に見られた IFN シグナルの抑制には EMCV-D のウイルスタンパクが関与している可能性も考えられたが、抑制がみられた 2DPI にはウイルス RNA は検出されておらず、今後の検討が必要と考えられた。以上より 2DPI に IFNmRNA が抑制されることにより、眼窩外涙腺においてウイルス複製と腺房細胞の病理学的変化が引き起こされた可能性が考えられた。

## 5. 小括

EMCV-D を鼻腔内接種した DBA/2 マウスの耳下腺及び眼窩外涙腺における急性期のタイプ I インターフェロンシグナルカスケードの活性に関わる因子の変動を検索した。耳下腺において IFN $\beta$ 及び IFN $\alpha$ の発現は 3 DPI から認められたが、IFN 誘導遺伝子である Irf7、Pkr 及び Oas は 2 DPI に迅速に誘導され、これらの反応がウイルス増殖抑制及びアポトーシスによる感染細胞の排除に寄与している可能性が考えられた。一方、眼窩外涙腺では IFN $\beta$ 及び IFN $\alpha$ の発現が 1 DPI に認められた後、2 DPI には認められず、3 DPI から再び発現が認められた。IFN 誘導遺伝子の発現は 3 DPI 以降にのみ見られた。この結果から 1 DPI に誘導された IFN による IFN シグナルに対する抑制機構が働き、2 DPI に IFN シグナルが抑制された結果、眼窩外涙腺における顕著なウイルス増殖及び病理組織学的変化につながった可能性が考えられた。

Table 4-1  
Primers and conditions used in PCR

Gene	Sense primer	Antisense primer	Cycle
IFN $\beta$	TCAAACCCACAGCCCAGAGA	TGGTCCAGAAAAGTCCTCTCCA	32
IFN $\alpha$ 4	CATCAACTATAAGCAGCTCCA	TTCAAGTGGAGAGCAGTTGAG	30
non-IFN $\alpha$ 4	ARSYTGTTSTGATGCARCAGGT	GGWACACAGTGATCCTGTGG	37
Irf7	CAGCGGTGCTGTTTGGAGAC	AAGTTCGTACACCTTATGCGG	26
Pkr	CCTGAGCACAGCATGAGTGATGCTAG	AATAAGGCCCAAAGCA	28
Oas	CCCCATCTGCATCAGGAGGTGAAAGTCATAATACTTTGTCCAGTA GAG	G	28
GAPDH	TGATGGGTGTGAACCACGAG	TTGAAGTCGCAGGAGACAACC	27

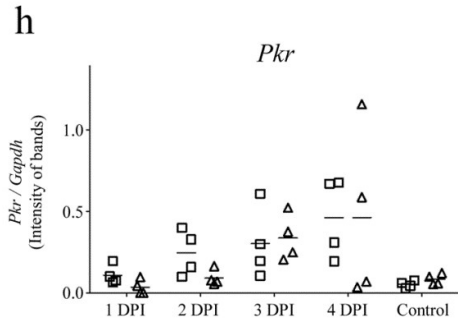
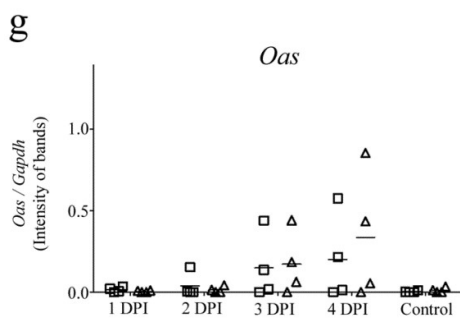
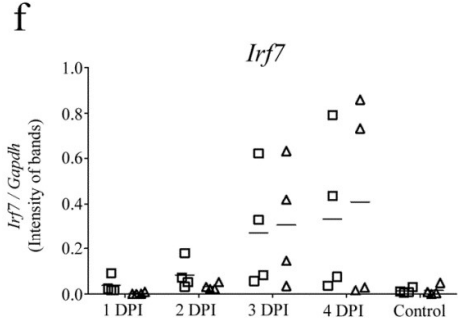
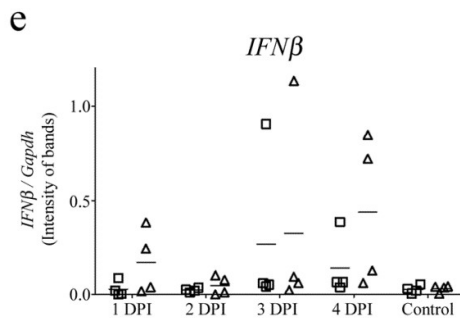
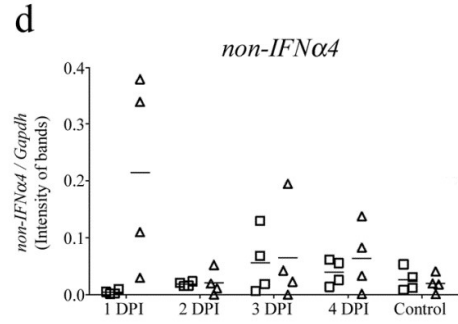
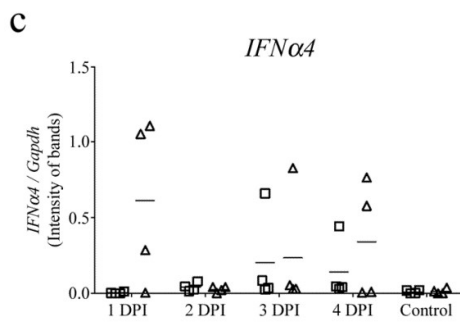
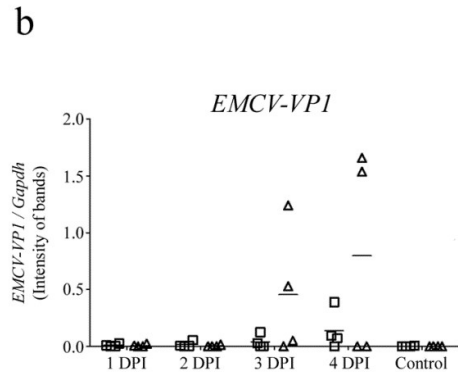
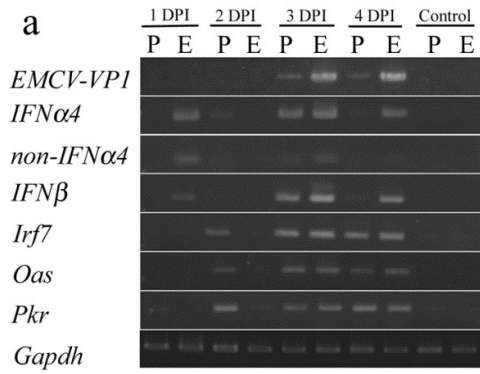


Fig.4-1

mRNA expression of EMCV-VP1, IFN $\alpha$ 4, non-IFN $\alpha$ 4, IFN $\beta$ , Irf7, Oas and Pkr.

(a) A representative picture from four independent experiments of agarose gel electrophoresis. P: parotid gland; E: exorbital lacrimal gland. (b)–(h)

Relative ratios to the GAPDH expression quantified by densitometry.  $\square$ : parotid gland;  $\Delta$ : exorbital lacrimal glands;  $\bar{\cdot}$ : means.



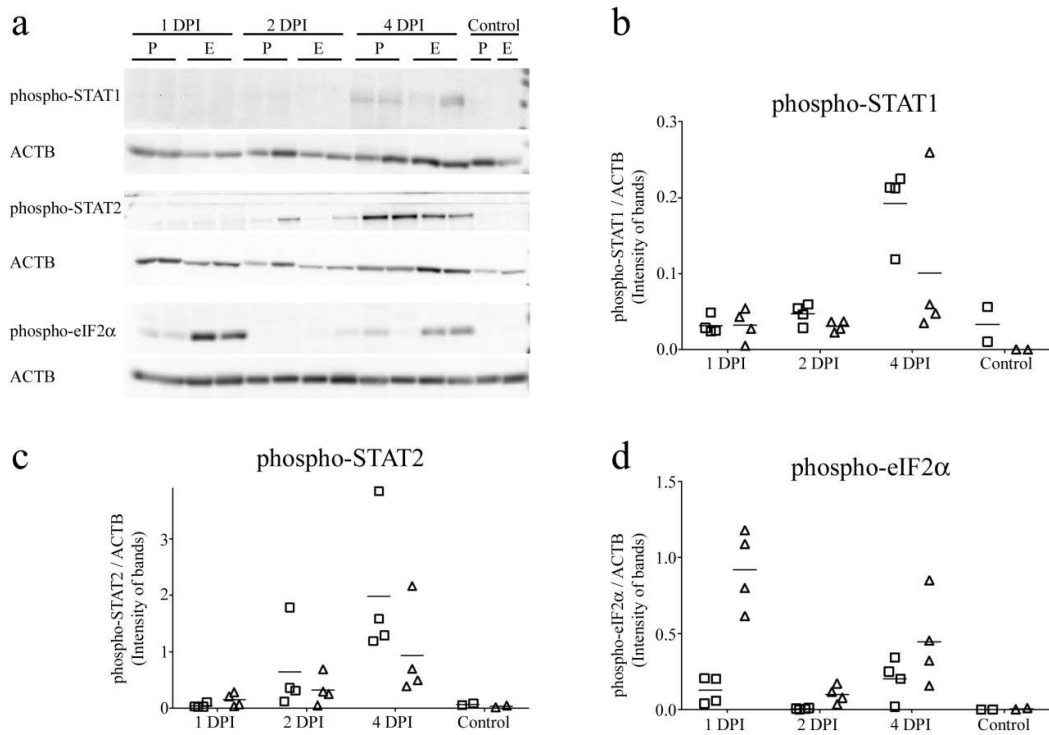


Fig.4-2

Protein expression of phosphorylated Stat1, Stat2 and eIF2α by western blot analysis. β-actin(ACTB)was used as a loading control. (a) A representative picture showing data of 2 animals. P: parotid gland; E, exorbital lacrimal gland. (b)-(d) Relative ratios to the levels of β-actin quantified by densitometry. □: parotid gland; Δ: exorbital lacrimal glands; -: means.

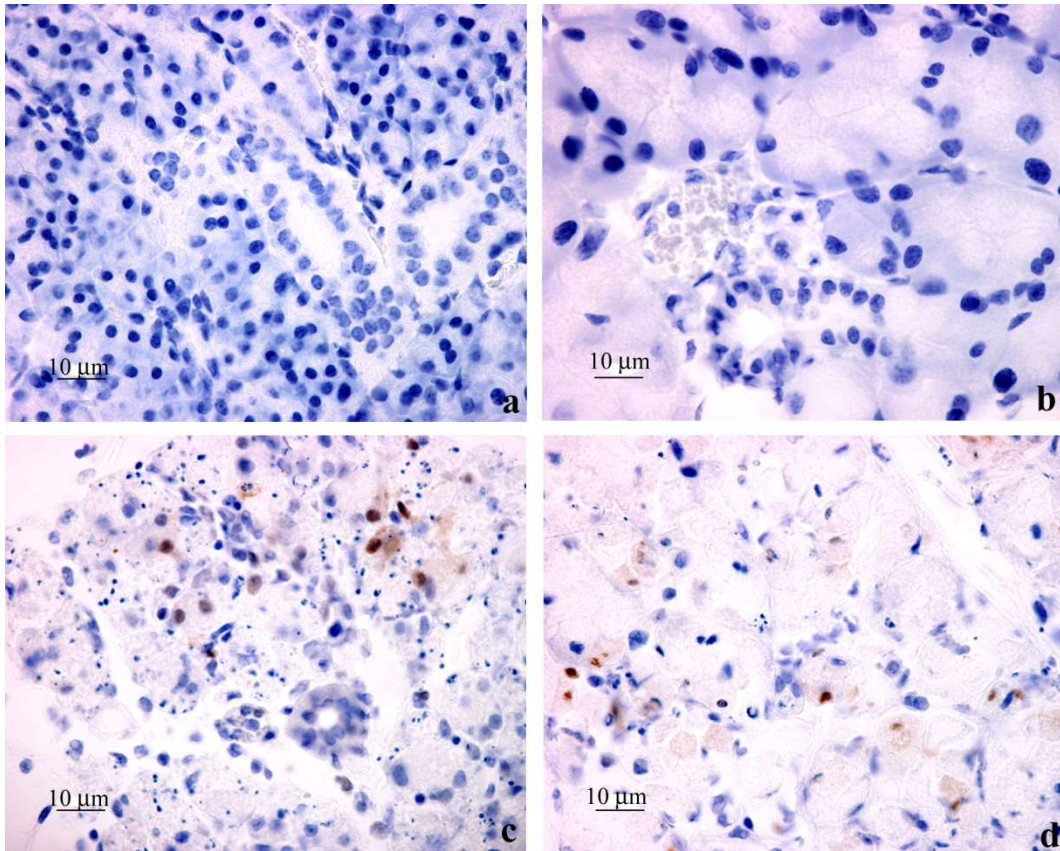


Fig.4-3

Immunohistochemical detection of phosphorylated Stat1 in the parotid gland (a, c) and exorbital lacrimal gland (b, d). (a) Parotid gland obtained from a control mouse. No positive cells are observed. (b) Exorbital lacrimal gland obtained from a control mouse. No positive cells are observed. (c) Parotid gland obtained from an EMCV-D-infected mouse at 4 DPI. Positive signals are detected mainly in the nucleus. Some are also detected in the cytoplasm of acinar cells. (d) Exorbital lacrimal gland obtained from an EMCV-D-infected mouse at 4 DPI. Positive signals are detected mainly in the nucleus. Some are also detected in the cytoplasm of acinar cells.

## 総括

本研究では、EMCV 感染の全体像を把握する一環として、EMCV-D 実験感染マウスの唾液腺涙腺における病態の発現様式、病変の性状及び病理発生機序を明らかにする目的で、多角的な検討を行った。得られた結果は以下の通りである。

第 1 章では EMCV-D 誘発糖尿病に対して感受性が異なる 3 系統のマウス (C57BL/6 : 低感受性 ; BALB/c : 中等度感受性 ; DBA/2 : 高感受性) を用いて血中ウイルス力価及び唾液腺 (耳下腺、顎下腺及び舌下腺)、眼窩外涙腺、眼窩内涙腺及びハーダー腺の病理組織学的変化を 1 から 4DPI にかけて経時的に検索した。C57BL/6 及び BALB/c マウスには高量 ( $10^5$  PFU/mouse) または低量 ( $10^2$  PFU/mouse) 、DBA/2 マウスには低量の EMCV-D を鼻腔内接種した。その結果、個体差はあるものの、血中ウイルス力価は低量投与群よりも高量投与群で概ね早期にピークに達した。低量群の C57BL/6 マウスでは、病理組織学的変化は観察されなかった。その他の群の病理組織学的変化は、耳下腺ならびに眼窩内及び外涙腺のみに認められた。耳下腺において早期にみられた病変は腺房細胞の核濃縮であった。その後、高量群の BALB/c マウスでは腺房細胞の巣状壊死と間質への炎症性細胞浸潤が観察された。他の群では、腺房細胞の核濃縮と間質への軽度の炎症性細胞浸潤が徐々に顕著になった。眼窩内及び眼窩外涙腺において早期にみられた病変も腺房細胞の核濃縮であり、その後、間質に炎症細胞浸潤を伴う高度の腺房細胞の壊死が認められた。眼窩内および眼窩外涙腺の病変の性状と程度はほぼ同様であった。いずれの腺組織においても導管に病変は認められなかった。これらの結果から、EMCV-D は 3 系統のマ

ウスについて唾液腺、涙腺に対し同様の明瞭な組織および細胞親和性を示すことが明らかになった。また、唾液腺及び涙腺の病変の強弱は既報の EMCV-D 誘発糖尿病に対する感受性差と同様の傾向であった。以降の検討は耳下腺と涙腺の病変に差がみられた DBA/2 マウスの低量接種条件にて行った。

第 2 章では低量の EMCV-D を鼻腔内接種した DBA/2 マウスの耳下腺および眼窩外涙腺におけるウイルス RNA の発現および病変の推移を 1 から 14 DPI にかけて経時的に検索した。その結果、半定量 RT-PCR 法によりウイルス RNA の発現が、耳下腺および眼窩外涙腺ともに 3 から 7 DPI にかけて確認され、14 DPI には確認できなくなった。ピーク時の 4 DPI における発現の程度は、眼窩外涙腺の方が耳下腺よりも高度であった。病理組織学的検査の結果、耳下腺では 2 DPI から、また、眼窩外涙腺では 3 DPI から、それぞれ腺房細胞の核濃縮が発現し、前者では 3 および 4 DPI に、また、後者では 4 DPI に高度になり、同時に間質への単核球の浸潤が目立つようになった。この単核球は F4/80 陽性で、マクロファージであると考えられた。また、ピーク時の 4 DPI における病変は、ウイルス RNA の発現の程度と同じく、耳下腺よりも眼窩外涙腺でより顕著であった。その後、耳下腺では 7 から 14 DPI にかけて病変は収束に向かったが、眼窩外涙腺では 7 および 14 DPI においても高度の病変が観察され、漿液性腺房の消失、管腔構造の増加およびその周囲での線維増生が目立った。これらの結果から、ウイルス RNA の発現量と病理組織学的変化の程度は眼窩外涙腺の方が耳下腺より高度であることが明らかとなった。

耳下腺及び眼窩外涙腺において腺房細胞の核濃縮というアポトーシスを示唆する所見が認められたことから第 3 章ではその意義を明らかにするため、低量

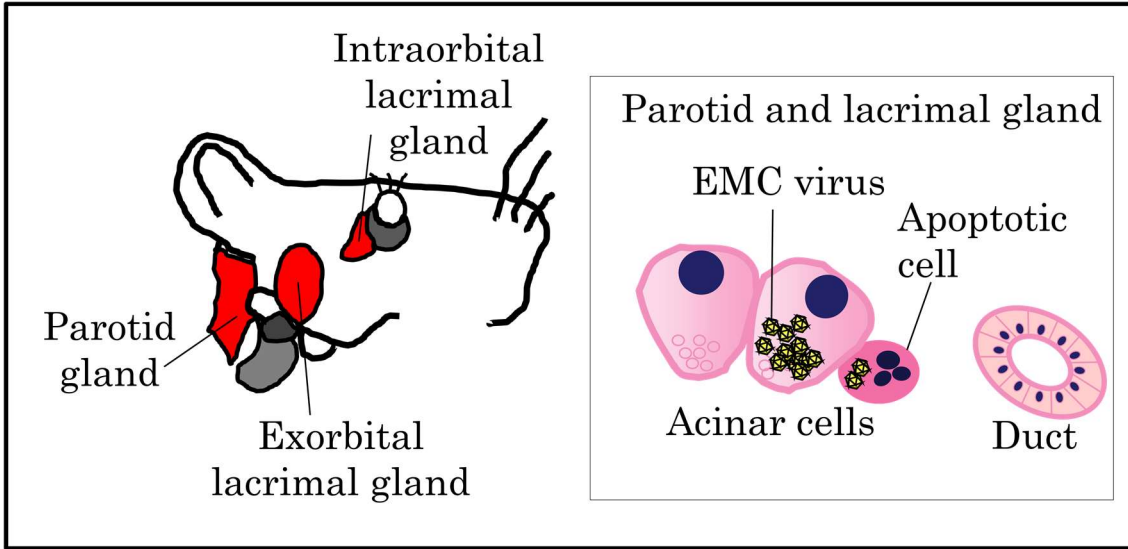
の EMCV-D を鼻腔内接種した DBA/2 マウスの耳下腺および眼窩外涙腺における急性期のウイルス RNA の発現の分布および病変を 1 から 4 DPI にかけて詳細に検索した。*in situ hybridization* 検索の結果、EMCV-D の RNA シグナルは、耳下腺および眼窩外涙腺ともに腺房細胞に発現しており、導管上皮細胞には認められず、病理組織学的変化の分布とも一致していたことから、EMCV-D ウイルスの感染により腺房細胞の病変が惹起されたものと考えられた。また、光顕的に核濃縮を呈する腺房細胞は TUNEL 法及び Cleaved-caspase3 の免疫染色に陽性を示し、電顕検索でアポトーシスに特徴的な形態像を示した。腺房細胞のアポトーシスは耳下腺の方が眼窩外涙腺よりも早期から発現したが、ピーク時である 4 DPI のアポトーシスの強度は眼窩外涙腺の方が強かった。以上のことから、耳下腺ではアポトーシスによる EMCV-D 感染細胞の早期の排除がその後の周囲細胞へのウイルス感染の波及による病変の進展を抑制したと考えられた。これらの結果から、EMCV-D 感染マウスの耳下腺及び眼窩外涙腺の病理発生と病変の推移に腺房細胞のアポトーシスが重要な役割を果たしていることが明らかになった。

タイプ I インターフェロン (IFN) は感染細胞のアポトーシスを誘発する。第 4 章では低量の EMCV-D を鼻腔内接種した DBA/2 マウスの耳下腺及び眼窩外涙腺における急性期のタイプ I (IFN) シグナルカスケードの活性に関わる因子の変動を検索した。その結果、耳下腺において IFN $\beta$  及び IFN $\alpha$  の発現は 3 DPI から認められたが、IFN 誘導遺伝子である Irf7、Pkr 及び Oas が 2 DPI に迅速に誘導され、これらがウイルス増殖抑制及びアポトーシスによる感染細胞の排除に寄与したと考えられた。一方、眼窩外涙腺では IFN $\beta$  及び IFN $\alpha$  の発現が 1

DPI に認められた後、2 DPI には認められず、3 DPI から再び認められた。IFN 誘導遺伝子の発現は 3 DPI 以降にのみ見られた。この結果から、1 DPI に誘導された IFN あるいは EMCV-D のウイルスタンパクによりネガティブフィードバック機構が働き、2 DPI に IFN シグナルが抑制された結果、眼窩外涙腺における顕著なウイルス増殖及び病理組織学的変化につながったと考えられた。

本研究で得られた EMCV-D 感染マウスの耳下腺と眼窩外涙腺における各種変化をまとめると Fig.5-1 のようになる。EMCV-D は唾液腺、涙腺及びハーダー腺組織のうち耳下腺と涙腺の腺房細胞のみに親和性をもち、アポトーシスを誘発することが明らかとなった。耳下腺及び眼窩外涙腺における病変を詳細に検索した結果、腺房細胞のアポトーシスは耳下腺の方が眼窩外涙腺よりも早期から発現したが、ピーク時のアポトーシスの強度は眼窩外涙腺の方が強く、耳下腺で認められた早期の IFN シグナルカスケードの活性化が耳下腺におけるウイルス増殖抑制及びアポトーシスによる感染細胞の排除に寄与し病変の進展を抑制したものと考えられた。本研究の成果は、ウイルスに対する臓器・細胞間の感受性の差を解明する上で、極めて有用な情報を提供するものと考えられ、動物の EMCV による突然死の予防、ウイルス性疾患への IFN 経路の活性化による新規治療や IFN の過剰発現に伴う自己免疫疾患の新規治療に繋がる可能性が期待される。

Salivary and lacrimal glands



Transition of apoptosis and IFN activation in the parotid or lacrimal gland

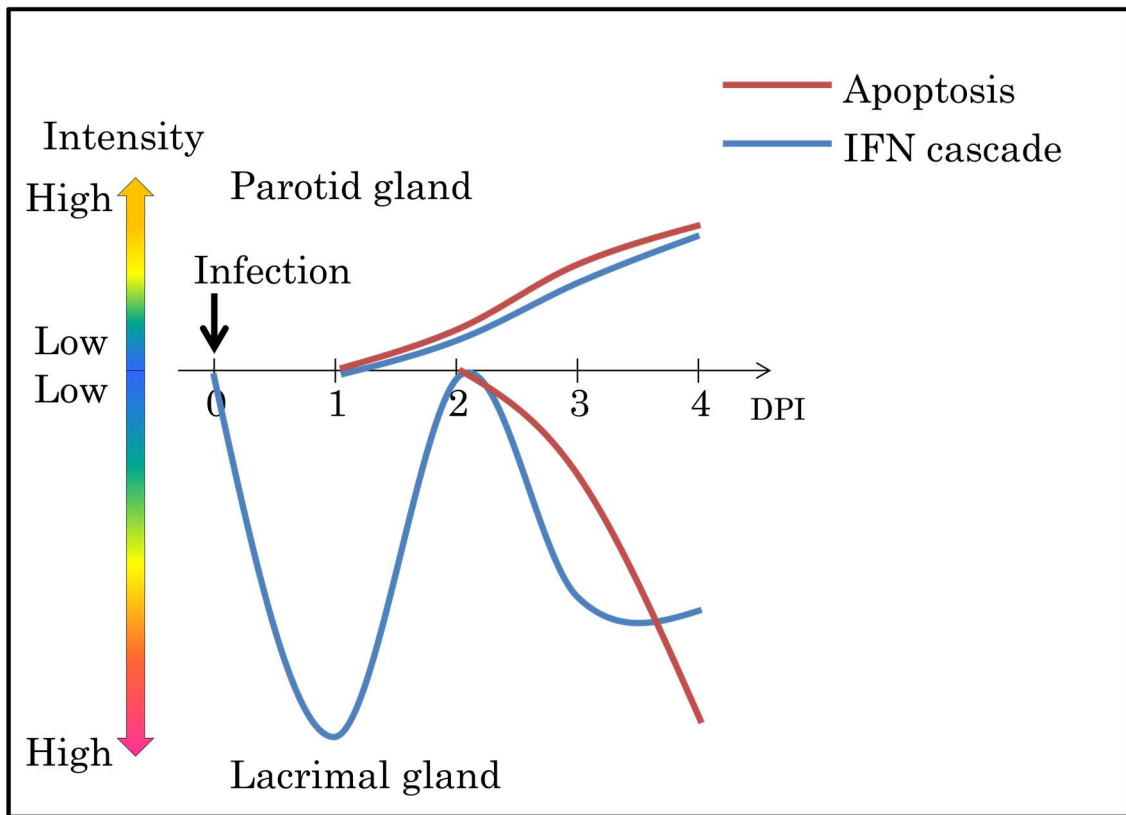


Fig.5-1



## 参考文献

Baek H.S. & Yoon J.W. (1990) Role of macrophages in the pathogenesis of encephalomyocarditis virus-induced diabetes in mice. *J Virol* 64, 5708-5715.

Baggen J., Thibaut H. J., Hurdiss D.L., Wahedi M., Marceau C. D., van Vliet A.L.W., Carette J.E., van Kuppeveld F.J.M. (2019) *mBio* 10, e01780-19.

Barger M.T. & Craighead J.E. (1991) Immunomodulation of encephalomyocarditis virus-induced disease in A/J mice. *J Virol* 65, 2676-2681.

Botts S., Jokinen M., Gaillard E.T., Elweel M.R., Mann P.C. (1999) Salivary, Harderian, and Lacrimal Glands: Pathology of the Mouse (1st Edition) Eds Maronpot R.R., Boorman G.A., Gaul B.W. Cache River Press 2850 Oak Grove Road Vienna, IL 62995 USA. pp. 49-79.

Carocci M., Bakkali-Kassimi L. (2012) The encephalomyocarditis virus. *Virulence* 3, 351-367.

Craighead J.E. (1965) Necrosis of the pancreas, parotid and lachrymal glands associated with encephalomyocarditis virus infection. *Nature* 207, 1268-1269.

Craighead J.E. (1966) Pathogenicity of the M and E variants of the encephalomyocarditis (EMC) virus. II. Lesions of the pancreas, parotid and lacrimal glands. *Am J Pathol* 48, 375-386.

Doi K., Yasoshima A., Kojima A., Okawa H., Kurabe S. & Okaniwa A. (1980) Pathological observations on natural cases of sialodacryoadenitis of rats. *Jikken Dobutsu* 29, 419-426.

Doi K., Onodera T., Tsuda T., Matsuzaki H. & Mitsuoka T. (1988) Histopathology of BALB/c mice infected with the D variant of encephalomyocarditis virus. *Br J Exp Pathol* 69, 395-401.

Doi K. (2011) Experimental encephalomyocarditis virus infection in small laboratory rodents. *J Comp Pathol* 144, 25-40.

Freundt E.C., Drappier M., Michiels T. (2018) Innate immune detection of cardioviruses and viral disruption of interferon signaling. *Front Microbiol* 9, 2448.

Gavrieli Y., Sherman Y. & Ben-Sasson S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501.

Guerra S., López-Fernández L.A., García M.A., Zaballos A., Esteban M. (2006) Human gene profiling in response to the active protein kinase, interferon-induced serine/threonine protein kinase (PKR), in infected cells. Involvement of the transcription factor ATF-3 IN PKR-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281, 18734-18735.

Helwig F.C., Schmidt, E.C.H. (1945) A filter-passing agent producing internal myocarditis in anthropoid apes and small animals. *Science* 102, 31-33

Hirasawa K., Takeda M., Matsuzaki H. & Doi K. (1991) Encephalomyocarditis (EMC) virus-induced orchitis in Syrian hamsters. *Int J Exp Pathol* 72, 617-622.

Hirasawa K., Han J.S., Takeda M., Itagaki S. & Doi K. (1992) Encephalomyocarditis (EMC) virus-induced myocarditis by different virus variants and mouse strains. *J Vet Med Sci* 54, 1125-1129.

Hirasawa K., Ogiso Y., Takeda M., Lee M.J., Itagaki S. & Doi K. (1995) Protective effects of macrophage-derived interferon against encephalomyocarditis virus-induced diabetes mellitus in mice. *Lab Anim Sci* 45, 652-656.

Hirasawa K., Takeda M., Itagaki S. & Doi K. (1996) Involvement of macrophages in the development of encephalomyocarditis (EMC) virus-induced diabetes in mice. *Exp Anim* 45, 77-80.

Hirasawa K., Jun H.S., Maeda K., Kawaguchi Y., Itagaki S., Mikami T., Baek H.S., Doi K. & Yoon J.W. (1997) Possible role of macrophage-derived soluble mediators in the pathogenesis of encephalomyocarditis virus-induced diabetes in mice. *J Virol* 71, 4024-4031.

Ida-Hosonuma M., Iwasaki T., Yoshikawa T., Nagata N., Sato Y., Sata T., Yoneyama M., Fujita T., Taya C., Yonekawa H., Koike S. (2005) The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J Virol* 79, 4460-4469.

Lee E.S., Yoon C.H., Kim Y.S., Bae Y.S. (2007) The double-strand RNA-dependent protein kinase PKR plays a significant role in a sustained ER stress-induced apoptosis. *FEBS Lett* 581, 4325-4332.

Limesand K.H., Barzen K.A., Sanders L.A., Sclafani R.A., Reynolds M.V., Reyland M.E., Anderson S.M. & Quissell D.O. (2003) Characterization of rat parotid and submandibular acinar cell apoptosis in primary culture. *In Vitro*

Cell Dev Biol Anim 39, 170-177.

Matsuzaki H., Doi K., Doi C., Onodera T. & Mitsuoka T. (1989) Susceptibility of four species of small rodents to encephalomyocarditis (EMC) virus infection. *Jikken Dobutsu* 38, 357-361.

Matthews R.E. (1979) The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague, September 1978. *Intervirology* 11, 133-135.

Murnane T.G., Craighead J.E., Mondragon H. & Shelokov A. (1960) Fatal disease of swine due to encephalomyocarditis virus. *Science* 131, 498-499.

Nakayama Y., Su W., Ohguchi A., Nakayama H. & Doi K. (2004) Experimental encephalomyocarditis virus infection in pregnant mice. *Exp Mol Pathol* 77, 133-137.

Ning F., Li X., Zhang B., Zhao Y., Liu Y., Zhao B., Shang Y., Hu H. (2019) Hes1 attenuates type I IFN responses via VEGF-C and WDFY1. *J Exp Med* 216, 1396-1410.

Ivashkiv L.B. & Donlin L.T. (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14, 36-49.

Psychas V., Papaioannou N., Billinis C., Paschaleri-Papadopoulou E., Leontides S., Papadopoulos O., Tsangaris T. & Vlemmas J. (2001) Evaluation of ultrastructural changes associated with encephalomyocarditis virus in the myocardium of experimentally infected piglets. *Am J Vet Res* 62, 1653-1657.

Racaniello V.R. (2001) Picornaviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology* (4th Edition). Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, U.S.A. pp. 685-722

Schwarz E.M., Badorff C., Hiura T.S., Wessely R., Badorff A., Verma I.M. & Knowlton K.U. (1998) NF-kappaB-mediated inhibition of apoptosis is required for encephalomyocarditis virus virulence: a mechanism of resistance in p50 knockout mice. *J Virol* 72, 5654-5660.

Shigesato M., Hirasawa K., Takeda M. & Doi K. (1994) Encephalomyocarditis (EMC) virus-induced testicular lesion in BALB/c mice. *Lab Anim* 28, 330-334.

Takeda M., Hirasawa K. & Doi K. (1991) Lesions in the central nervous system of DBA/2 mice infected with the D variant of encephalomyocarditis virus (EMC-D). *J Vet Med Sci* 53, 1013-1017.

Takeda M., Miura R., Shiota K., Hirasawa K., Lee M.J., Itagaki S.I. & Doi K. (1995) Distribution of viral RNA in the spinal cord of DBA/2 mice developing biphasic paralysis following infection with the D variant of encephalomyocarditis virus (EMC-D). *Int J Exp Pathol* 76, 441-447.

Teodoro J.G. & Branton P.E. (1997) Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 71, 1739-1746.

Ueno A., Takeda M., Hirasawa K., Itagaki S. & Doi K. (1996) Relation between distribution of viral RNA and development of histopathological changes in encephalomyocarditis virus-induced orchitis in mice. *Int J Exp Pathol* 77, 25-30.

Ueno A., Takeda M., Hirasawa K., Itagaki S., Doi K. (1997) Detection of viral RNA by electron microscopic in situ hybridization (ISH-EM) in the germinal epithelium of mice infected with encephalomyocarditis (EMC) virus. *Exp Anim* 46, 79-81.

Yamanouchi-Ueno A., Nakayama Y. & Doi K. (2004) Characteristics of



testicular lesions in mice infected with a low dose of encephalomyocarditis (EMC) virus. *Exp Mol Pathol* 77, 72-76.

Yoon J.W., McClintock P.R., Onodera T. & Notkins A.L. (1980) Virus-induced diabetes mellitus. XVIII. Inhibition by a nondiabetogenic variant of encephalomyocarditis virus. *J Exp Med* 152, 878-892.

Zhou A., Paranjape J., Brown T.L., Nie H., Naik S., Dong B., Chang A., Trapp B., Fairchild R., Colmenares C., Silverman R.H. (1997) Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J* 16, 6355-6363.

## 謝辭

本稿を終えるにあたり、本研究に終始懇切なご指導とご校閲を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医病理学研究室 中山裕之教授並びに土井邦雄名誉教授に深く感謝致します。また、御助言や技術指導いただきました獣医病理学教室の皆様、土居千代さん、電顕観察に御尽力いただきました八十島昭さん、支えてくれた家族に深く感謝致します。