

論文内容の要旨

論文題目：

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

氏名：大口 敦子

脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus, EMCV) はピコルナウイルス属の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。このウイルスは最初に非ヒト霊長類から分離され、次いで豚から分離された。宿主域は実験動物、家畜から野生動物までと広く、また、世界中に分布している。

Craighead らはマウスにおける臓器親和性に基づき、EMCV を 2 つの variant すなわち E 株 (神経親和性) 及び M 株 (心筋親和性) に分類した。さらに、Yoon らは、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) を樹立した。その後、ウイルス性糖尿病のモデルとして EMCV-D 接種マウスを用いた研究が精力的に行われている。

EMCV-D の主要標的臓器としては、膵臓のほか、中枢神経系及び心臓が知られている。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。これらの標的臓器における病変の性状、発現様式及び病理発生についてこれまで多くの研究結果が報告されており、ヒトのウイルス性心筋炎、中枢神経炎及び精巣炎との比較病理学的研究の対象としても注目を集めている。

マウスの EMCV-D 感染症についてはこのほか、唾液腺涙腺炎に関する報告がごく少数あるが、その病変の性状、発現様式及び病理発生の詳細は明らかにされていない。本研究は、これらの点を明らかにすることを目的として行った。得られた結果は 4 章からなり、その概要は以下の通りである。

1. EMCV-D 感染マウスの急性唾液腺涙腺炎の発現様式

唾液腺涙腺における病変の発現様式を明らかにする目的で、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)、涙腺(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検索した。マウスには高量(10^5 PFU/mouse)または低量(10^2 PFU/mouse)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。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、舌下腺、顎下腺およびハーダー腺には認められなかった。また、低量群の C57BL/6 マウスでは、病変は観察されなかった。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ける初期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。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。

2. 耳下腺及び眼窩外涙腺におけるウイルス RNA の発現と病変の推移

耳下腺及び眼窩外涙腺におけるウイルス RNA の発現と病変の推移を明らかにする目的で、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接種後 1 から 14 日 (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 (VP-1 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出現し、前者では 3 および 4 DPI に、また、後者では 4 DPI に最も高度になり、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、前者では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においても顕著な病変が観察され、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、耳下腺及び眼窩外涙腺におけるウイルス RNA の発現の推移と病理組織学的変化の推移との関連が明らかになった。

3. 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

第1章及び第2章で耳下腺及び眼窩外涙腺で腺房細胞の核濃縮というアポトーシスを示唆する病理組織学的変化が認められたことから、その詳細及び意義を明らかにするため、下記の実験を行い検討を加えた。

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 発現の分布および組織病変を1から4 DPIにかけて詳細に検索した。*in situ* hybridization 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なかった。こうした所見は、病理組織学的変化の分布と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、核濃縮を呈する腺房細胞は TUNEL 法及び Cleaved-caspase3 の免疫染色に陽性で、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出現したが、ピークである4 DPI の病変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可能性が考えられた。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。

4. 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

第3章の結果および、タイプ I インターフェロン (IFN) がウイルス感染により活性化する主要な抗ウイルス因子であり、感染細胞のアポトーシスを誘発すると言われていることから、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半定量 RT-PCR などを用い検索した。その結果、耳下腺において IFN α 及び IFN β 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 の mRNA が 2 DPI に迅速に誘導された、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ている可能性が考えられた。一方、眼窩外涙腺では IFN α 及び IFN β の mRNA 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 に発現誘導された IFN 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可能性が考えられた。

以上、本研究で、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にのみ親和性を有し、アポトーシスを誘発することが明らかとなった。また、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、ピーク時の病変の強度は眼窩外涙腺の方が強かった。このことは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ためと考えられた。このように、本研究の成果は、ウイルス感染の病理発生に親和性細胞のアポトーシスが関与すること示すものとして、また、ウイルス感染における臓器・細胞間の感受性の差を解明する上で、きわめて有用な情報を提供するものと考えられる。