

学位論文題名

Theiler ウイルス感染における
中枢神経内インターフェロン γ

学位論文内容の要旨

研究目的

Theilerウイルス(TMEV)はピコルナウイルス科カルジオウイルス属に属しマウスに自然感染し、腸粘膜上皮と中枢神経に感染親和性を示す。急性感染を生ずるウイルス株のGD VII株はヒトポリオの感染モデルとして、慢性感染を生ずるDA株等は脱髄を生ずるために多発性硬化症のモデルとして研究されてきた。GD VII株はこれまで脳内接種による致死的な急性神経感染が報告されてきたが、静脈内接種によっても中枢神経感染を引き起こし、しかも感染局所における防御の発現は従来のパターンと異なることを見いだした。本研究では、TMEV感染の中枢神経感染の動態とインターフェロン γ (IFN- γ)を中心とした中枢神経内における免疫学的感染防御機構について解析を試みた。

材料と方法

- (1) マウス；4週齢ddY雌マウスを使用した。
- (2) 細胞とウイルス；Baby hamster kidney細胞(BHK-21-P1436)を5% fetal calf serum(FCS)含有RPMI 1640培地にて増殖させた。増殖後FCS不含RPMI培地中にてTMEV GD VII株ウイルスを接種、増殖させ培養系全体を2回凍結融解した。その後500gで30分間遠心し上清を径0.2 μ mのミリポアフィルターにて濾過滅菌した。濾液は 5×10^8 PFU/mlのウイルス価でこれをウイルスストックとした。
- (3) ブラックアッセイ；脳脊髄内ウイルス量の定量はBHK-21細胞を用いたブラックアッセイ法にて行った。感染マウスの脳と脊髄はRPMI 1640培地中にて各々30% (weight/volume)、10% (weight/volume)となるようにホモジナイズし、2回凍結融解した後500gにて30分遠心し上清中のウイルス量を測定した。
- (4) 抗体；マウスIFN- γ に対するラットIgG1モノクローナル抗体はハイブリドーマ細胞(R4-6A2)を腹腔内移植したプリスタン処置CD-1ヌードマウスに生じた腹水を採取し硫酸沈澱することで得た。同様にして、抗CD3抗体(2C-11)、抗TCR- $\alpha\beta$ 抗体(H57-597)、抗CD4抗体(GK1.5)、抗CD8抗体(Lyt-2)を得た。正常ラットグロブリンはウイスターラット血清を硫酸沈澱し精製した。
- (5) ウイルス感染と抗体投与； 1×10^8 PFUのウイルスを静脈内投与により感染さ

せた。感染の1日後に抗IFN- γ モノクローナル抗体あるいはコントロールとして正常ラットグロブリンを投与した。また、抗CD3抗体は感染3日前に、他の抗体は感染2時間前に投与した。

(6) FACS解析；脳または脊髄組織よりパーコール比重遠心法により単核細胞を分離しCD3、CD4、CD8、TCR- $\gamma\delta$ 各細胞表面抗原の発現について2 color analysisを行った。

(7) IFN- γ アッセイ；IFN- γ のアッセイは抗マウスIFN- γ モノクローナル抗体(R4-6A 2)とラット抗マウスIFN- γ 抗血清を用いたサンドイッチELISA法によって行った。スタンダードにはリコンビナントマウスIFN- γ を用いた。

(8) 組織学的検討；感染6日目と9日目にマウスを屠殺し免疫組織学的方法によるIFN- γ 陽性細胞の検索とH & E染色による炎症細胞浸潤の検討を行った。

(9) 統計解析；各モノクローナル抗体投与マウスとコントロールマウスとの間のウイルス量、内在性IFN- γ 量、死亡率の差についてWilcoxon testにより有意差検定を行った。

結果

(1) 静注感染によっても血中ウイルスが消失した後、中枢神経内にてウイルスの増殖が認められた。脳内では感染4～6日目に、脊髄内では10～14日目にウイルス増殖のピークを認めた(ウイルス価は 10^5 PFU/g前後)。また感染局所である脳内、脊髄内にウイルス増殖の動態と一致してIFN- γ が検出され、脳内で20IU/g、脊髄内では25IU/gのIFN- γ が検出された。また、免疫組織学的方法によりIFN- γ 陽性細胞が脳幹炎症細胞浸潤部に認められた。

(2) 抗IFN- γ モノクローナル抗体投与マウスではコントロール群のマウスより著しく死亡率が増加した($P < 0.0001$)。感染9日目、11日目に抗IFN- γ モノクローナル抗体投与マウスの脊髄内ウイルス量はコントロール群マウスより10倍以上増加し有意な差を認めた($P < 0.05$)。これに対し、脳内ウイルス量はモノクローナル抗体投与群とコントロール群との間に差を認めなかった。また脊髄における組織学的炎症所見は感染6日目、9日目の抗IFN- γ モノクローナル抗体投与マウスではコントロール群マウスに比べ悪化していた。これに対し、脳における炎症所見はモノクローナル抗体投与群とコントロール群との間で差を認めなかった。

(3) 脳内には感染5日目よりCD4、CD8陽性細胞の浸潤を認めたが脊髄内には感染9日目まで認めなかった。また、CD3+/TCR- $\gamma\delta$ +細胞が脳、脊髄いずれの組織においても認められた。

(4) 脳内のIFN- γ 産生は抗CD4抗体投与によって一時的に抑制されたが脊髄内のIFN- γ 産生は抑制されなかった。これに対し、抗CD3抗体投与による脳内、脊髄内のIFN- γ 産生はいずれも持続的に抑制された。抗TCR- $\alpha\beta$ 抗体、抗CD8抗体投与は中枢神経内IFN- γ 産生を抑制しなかった。

(5) 抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗TCR- $\alpha\beta$ 各抗体いずれも脳内ウイルス量を増加させたが脊髄内ウイルス量は抗CD3抗体投与によってのみ増加した。

考察

感染症における内在性IFN- γ の重要性はリステリア、トキソプラズマ、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス、マウス肝炎ウイルスなどのモデルにおいて報告されている。しかし、感染モデルにおける内在性IFN- γ の動態については中根らのリステリアにおける報告があるのみである。TMEV感染における中枢神経内IFN- γ の産生動態はウイルス増殖動態と一致していた。抗IFN- γ 抗体投与の結果から内在性IFN- γ はTMEV感染における重要な防御因子と考えられる。また抗体投与の影響が脊髄にのみ認められることから内在性IFN- γ の役割は脊髄組織における感染防御メカニズムにおいて重要である可能性が考えられる。FACS解析からは脳内にはT細胞性の防御がより早期から成立していることが示唆され、抗リンパ球抗体投与による脳内ウイルス量の変化の結果からもCD4+細胞、CD8+細胞の脳組織における重要性が明らかである。一方脊髄内においては、CD4+細胞、CD8+細胞ともに浸潤がなくTリンパ球以外の細胞による防御機構の存在が考えられる。中枢神経内ではTリンパ球以外の免疫担当細胞としてはマクロファージ系レジデント細胞のミクログリアが知られており、この細胞にはIFN- γ レセプターの存在が報告されている。IFN- γ はマクロファージ活性化因子であることからTMEV感染における内在性IFN- γ の役割はミクログリアの活性化にあることが考えられる。IFN- γ の産生については、抗リンパ球抗体投与の結果から、脳内ではCD4+細胞とCD3+/TCR- $\alpha\beta$ -/CD4-/CD8-の形質を有する細胞の2種類が、脊髄内ではCD3+/TCR- $\alpha\beta$ -/CD4-/CD8-の細胞が産生細胞と考えられた。中枢神経内においてCD3+/CD4-/CD8-細胞はTCR- $\gamma\delta$ +細胞である。このCD3+/TCR- $\gamma\delta$ +細胞は中枢神経内に存在するIFN- γ 産生能を有するレジデント細胞であり、ミクログリアとともに中枢神経系における固有の生体防御機構を形成し、脊髄組織における感染防御機構として作動している可能性がある。これに対し脳内の防御は主にCD4+ Tリンパ球によって担われていると考えられる。

結論

- (1) TMEV GD VII株静脈内感染においては中枢神経系における感染防御の観察が可能であり、ウイルス増殖の動態と一致した内在性IFN- γ の産生が認められた。
- (2) 本感染系においては特に脊髄の防御における内在性IFN- γ の重要性が証明された。
- (3) 脳内感染防御にはT細胞が重要と考えられたのに対し、脊髄ではミクログリアとIFN- γ の相互関係の重要性が示唆された。
- (4) 内在性IFN- γ の産生細胞は脳内においてはCD4+細胞とCD3+/TCR- $\gamma\delta$ +細胞であるのに対し、脊髄内においてはCD3+/TCR- $\gamma\delta$ +細胞のみであることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 長 島 和 郎

学 位 論 文 題 名

Theiler ウイルス感染における 中枢神経内インターフェロン- γ

研究目的

Theilerウイルス(TMEV)はピコルナウイルス科カルジオウイルス属に属しマウスに自然感染し、腸粘膜上皮と中枢神経に感染親和性を示す。急性感染を生ずるウイルス株のGD VII株はこれまで脳内接種による致死的な急性神経感染が報告されてきたが、静脈内接種によっても中枢神経感染を引き起こし、しかも感染局所における防御の発現は従来のパターンと異なることを見いだした。

本研究では、TMEV感染の中枢神経感染の動態とインターフェロン- γ (IFN- γ)を中心とした中枢神経内における免疫学的感染防御機構について解析を試みた。

材料と方法

- (1) マウス ; 4 週齢ddY雌マウスを使用した。
- (2) 細胞とウイルス ; TMEV GD VII株ウイルスとウイルス増殖にはBaby hamster kidney細胞(BHK-21-P1436)を使用した。
- (3) ブラックアッセイ ; 脳脊髄内ウイルス量の定量はBHK-21細胞を用いたブラックアッセイ法にて行った。
- (4) 抗体 ; マウスIFN- γ に対するラットIgG1モノクローナル抗体はハイブリドーマ細胞(R4-6A2)を腹腔内移植したプリスタン処置CD-1ヌードマウスに生じた腹水を採取し硫酸沈澱することで得た。同様にして、抗CD3抗体(2C-11)、抗TCR- $\alpha\beta$ 抗体(H57-597)、抗CD4抗体(GK1.5)、抗CD8抗体(Lyt-2)を得た。正常ラットグロブリンはウイスターラット血清を硫酸沈澱し精製した。
- (5) ウイルス感染と抗体投与 ; 1×10^8 PFUのウイルスを静脈内投与により感染させた。感染の1日後に抗IFN- γ モノクローナル抗体あるいはコントロールとして正常ラットグロブリンを投与した。また、抗CD3 抗体は感染3日前に、他の抗体は感染2時間前に投与した。
- (6) FACS解析 ; 脳または脊髄組織よりパーコール比重遠心法により単核細胞を分離しCD3、CD4、CD8、TCR- $\gamma\delta$ 各細胞表面抗原の発現について2 color analysisを行った。
- (7) IFN- γ アッセイ ; IFN- γ のアッセイは抗マウスIFN- γ モノクローナル抗体(R4-6A2)とラット抗マウスIFN- γ 抗血清を用いたサンドイッチELISA法によって行った。スタンダードにはリコンビ

ナントマウスIFN- γ を用いた。

(8) 組織学的検討 ; 感染6日目と9日目にマウスを屠殺し免疫組織学的方法によるIFN- γ 陽性細胞の検索とH & E染色による炎症細胞浸潤の検討を行った。

(9) 統計解析 ; 各モノクローナル抗体投与マウスとコントロールマウスとの間のウイルス量、内在性IFN- γ 量、死亡率の差についてWilcoxon testにより有意差検定を行った。

結果

(1) 中枢神経内にてウイルスの増殖が認められ、脳内では感染4～6日目に、脊髄内では10～14日目にウイルス増殖のピークを認めた(ウイルス価は 10^5 PFU/g前後)。また感染局所である脳内、脊髄内にウイルス増殖の動態と一致してIFN- γ が検出され、脳内で20IU/g、脊髄内では25IU/gのIFN- γ が検出された。

(2) 抗IFN- γ モノクローナル抗体投与マウスではコントロール群のマウスより著しく死亡率が増加した($P < 0.0001$)。感染9日目、11日目に抗IFN- γ モノクローナル抗体投与マウスの脊髄内ウイルス量はコントロール群マウスより10倍以上増加し有意な差を認めた($P < 0.05$)。これに対し、脳内ウイルス量はモノクローナル抗体投与群とコントロール群との間に差を認めなかった。また脊髄における組織学的炎症所見は感染6日目、9日目の抗IFN- γ モノクローナル抗体投与マウスではコントロール群マウスに比べ悪化していた。これに対し、脳における炎症所見はモノクローナル抗体投与群とコントロール群との間で差を認めなかった。

(3) 脳内には感染5日目よりCD4、CD8陽性細胞の浸潤を認めたが脊髄内には感染9日目まで認めなかった。また、CD3+/TCR- $\gamma\delta$ +細胞が脳、脊髄いずれの組織においても認められた。

(4) 脳内のIFN- γ 産生は抗CD4抗体投与によって一時的に抑制されたが脊髄内のIFN- γ 産生は抑制されなかった。これに対し、抗CD3抗体投与による脳内、脊髄内のIFN- γ 産生はいずれも持続的に抑制された。抗TCR- $\alpha\beta$ 抗体、抗CD8抗体投与は中枢神経内IFN- γ 産生を抑制しなかった。

(5) 抗CD3、抗CD4、抗CD8、抗TCR- $\alpha\beta$ 各抗体いずれも脳内ウイルス量を増加させたが脊髄内ウイルス量は抗CD3抗体投与によってのみ増加した。

結論

(1) TMEV GD VII株静脈内感染においては中枢神経系における感染防御の観察が可能であり、ウイルス増殖の動態と一致した内在性IFN- γ の産生が認められた。

(2) 本感染系においては特に脊髄の防御における内在性IFN- γ の重要性が証明された。

(3) 脳内感染防御にはT細胞が重要と考えられたのに対し、脊髄ではミクログリアとIFN- γ の相互関係の重要性が示唆された。

(4) 内在性IFN- γ の産生細胞は脳内においてはCD4+細胞とCD3+/TCR- $\gamma\delta$ +細胞であるのに対し、脊髄内においてはCD3+/TCR- $\gamma\delta$ +細胞のみであることが示唆された。

以上の結果、Theilerウイルス感染において中枢神経内において産生されるIFN- γ はミクログリアの活性化を通して感染防御上重要な役割を担うことが示唆された。

以上の結果、本研究は博士(医学)の学位論文として妥当なものと判断される。