

学 位 論 文 題 名

馬動脈炎ウイルスによる流産の発生機序に
関する実験病理学的研究

学位論文内容の要旨

馬ウイルス性動脈炎は、馬動脈炎ウイルス（E A V）の感染による急性呼吸器感染症で、発熱、浮腫、結膜炎、下痢など、さまざまな臨床症状を示す。また本病は、妊娠馬では、約50%の割合で流産が生じるので、馬産地では伝染性流産の原因の一つとして注目されている。このように、流産は本病の重要な臨床症状であるが、その発生機序には不明な点が多い。そこで、本研究は、E A Vの実験感染により流産を誘発した症例を病理組織学的、免疫組織化学的および超微形態学的に調べ、流産の発生機序を明らかにする目的で行った。

1. 妊娠馬の生殖器および胎子におけるE A Vの増殖様式はほとんど知られていない。そこで、最初に、培養細胞（B H K - 21）におけるE A Vの増殖動態をウイルス学的に調べるとともに、その複製過程を超微形態学および免疫細胞化学的に検索した。

感染培養細胞における最初の変化はウイルス感染後8時間目にみられ、それは細胞質内における粗面小胞体（R E R）の発達、リボソームの増加・集積および棍棒状構造物の出現であった。感染後12時間目では、多数の成熟ウイルス粒子がR E R腔内にみられた。ウイルス粒子は等軸性のコア（平均径 37.8 nm）と外層からなる二重構造を示し、外層は球形の基本単位（径 13-20nm）で構成されていた。また、表層には小さなプロジェクションを有するエンベロープが認められた。この成熟ウイルス粒子は外径が79-122nm（平均 101nm）で、従来報告されているウイルス粒子よりも大型であった。この他、細胞質空胞内には、しばしば小型粒子（径約40nm）が認められた。ウイルスの成熟に伴う出芽像は、R E R膜および外核膜にみられ、細胞膜では認められなかった。以上のE A Vの複製過程は、超微形態学的にはコロナウイルスのそれに類似していた。

EAV感染細胞の細胞質にみられた棍棒状構造物は、従来からヌクレオカプシドと考えられてきた。本研究におけるウイルスの出芽過程の観察においては、棍棒状構造物とコアとの形態学的連続性が確認された。この所見により、棍棒状構造物はEAVのコアになる前駆的構造物であることが明らかとなった。従来から、EAV感染細胞の核には変化がないとされてきた。しかし、本研究において、紐状構造物が核内に出現することが超微形態学的に観察され、これが細胞質に出現する棍棒状構造物と同一の抗原性を有することが、金コロイド法により免疫電顕的に確認された。

2. EAVの感染様式を検索するためには、免疫病理組織化学的手法が有用である。同手法を用いる場合、検索材料における抗原の反応性（抗原性）および組織の形態学的特徴がともに保持されていることが望ましい。そこで、ホルマリン固定およびパラフィン包埋切片において、間接蛍光抗体（IFA）法によりEAV抗原を検出するための前処理法を検討した。

EAV感染組織材料には、感染実験により流産を誘発した雌馬の子宮および胎子の主要臓器から作製したパラフィン包埋切片を用いた。切片は脱パラフィン・水洗後、抗原露出液（TUF）による加熱処理あるいはプロナーゼ処理を施し、抗原検出感度を比較した。IFA法は常法に従い、0.5%牛血清アルブミンで非特異的吸着を防止後、一次血清に抗EAVモノクローナル抗体(mB1A3)を用い、二次血清には蛍光標識抗マウスIgG 山羊血清を用いた。その結果、TUFは90℃で10分間処理、プロナーゼは0.1%溶液とし、室温で1分間処理することにより、EAV抗原を検出することができた。この方法により、最少量として $\log 10^{3.5}$ pfu/g のウイルスを含む組織において抗原の検出が可能であった。

EAV自然感染馬のパラフィン包埋切片における免疫組織化学的研究に関する報告はみあたらない。一般に、ウイルスや細菌の抗原検出を目的とした蛋白分解酵素処理時間は、概ね10分程度とされている。これに対し、EAV抗原の検出を目的とした場合のプロナーゼの前処理条件は、室温で約1分間であり、極めて短時間であった。また、TUFを用いた加熱処理によっても、その後のIFA法で安定した結果が得られた。

3. 本病の流産の発生機序を解明するため、妊娠6～8カ月の5例の馬に $10^{5.3}$ pfu/5ml のEAVを鼻腔内噴霧接種して流産を誘発し、

流産した母馬の子宮、胎盤および胎子を病理組織学的、免疫組織化学的、超微形態学およびウイルス学的に検索した。

ウイルスを接種した5例のうち4例が接種後10日および12日目に流産し、1例は接種後8日目に死亡した。流産胎子は、全例が胎膜に覆われており、すでに死亡していた。病理組織学的検索では、母馬の全例に子宮筋層炎が認められた。また、1例ではしばしば子宮腺上皮細胞の変性が認められた。胎盤は水腫性で、絨毛下層では線維芽細胞の変性ならびにマクロファージ、単球およびリンパ球の浸潤が認められた。胎子では脾臓およびリンパ節にリンパ球崩壊を伴った濾胞萎縮が観察された。抗EAVモノクローナル抗体を用いたIFA法によって母馬の子宮、胎盤ならびに胎子の肝臓、脾臓、腎臓、肺、胸腺およびリンパ節に、陽性反応が認められた。EAV抗原が検出された細胞は、母馬では子宮筋層の平滑筋細胞、子宮腺上皮細胞およびマクロファージ胎盤では絨毛下層の線維芽細胞、マクロファージ、単球およびリンパ球、胎子では上記の臓器・組織中の線維芽細胞、単球およびリンパ球であった。電子顕微鏡観察では子宮筋層の平滑筋細胞、胎盤の線維芽細胞および胎子の脾臓被膜の単球に、EAV感染培養細胞のウイルスの増殖過程にみられた桿状あるいは棍棒状構造物が確認された。EAVは母馬、胎盤および胎子のすべての材料から分離された。これらのうち、最大量のウイルスを含んだ組織は胎盤であった。

以上の所見から、妊娠馬のEAV感染実験において、胎子への経胎盤感染が証明された。すなわち、呼吸器から感染したEAVは妊娠馬の子宮筋層に強い趨向性を有して増殖し、マクロファージやリンパ球および子宮腺上皮細胞でも増殖した。これらEAVを含んだ細胞は、子宮筋層炎による循環障害により損傷を受けた胎盤の血液-胎子接合部を通過する。続いて、胎盤では絨毛膜上皮から絨毛下層に侵入し、そこで線維芽細胞をはじめマクロファージ、単球およびリンパ球などに感染し、臍帯血管を介して胎子に感染したと考えられる。また、流産胎子は、母馬の子宮内ですでに死亡していたことから、胎子感染は本病における流産発生機序の重要な一因と考えられた。一方、EAVによる流産の発生状況をみると、多くの場合は母馬の病気の急性期に生じるが、回復後あるいは無症状のまま流産する場合も報告されている。また、妊娠末期に子宮内で感染した新生子馬が、生後4日目に重篤な症状におちいて安楽死された例も報告されている。このような症例では、EAVの胎子感染が重要な意味を持つと考えられる。

結論として、馬動脈炎ウイルスの流産発生機序に関する要因として母馬の生殖器の損傷が重要であるが、同時に経胎盤感染による胎子の傷害も重視されると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	板倉	智敏
副査	教授	金川	弘司
副査	教授	藤永	徹
副査	教授	岩永	敏彦

学位論文題名

馬動脈炎ウイルスによる流産の発生機序に 関する実験病理学的研究

馬動脈炎ウイルス (EAV) が妊娠馬に感染すると約50%の割合で流産が生じる。本研究は、EAVの実験的感染馬を形態学的に検索し、流産の発生機序を明らかにする目的で行った。

最初に、EAV感染培養細胞 (BHK-21) を超微形態学的に検索した。感染細胞は粗面小胞体の発達、リボゾームの増加および棍棒状構造物形成を示し、粗面小胞体腔内には多数の成熟ウイルス粒子が見られた。成熟ウイルス粒子はコア (平均37.8nm) と表層にプロジェクションを有するエンベロープで構成され、これらの外径は79~122nmであった。ウイルス粒子の出芽像は粗面小胞体膜および外核膜で見られた。棍棒状構造物はコアの前駆的構造物とみなされた。

次に、EAV感染による流産の機序を形態学的に究明するために、EAV抗原検出のための抗EAVモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法、特にその前処理法を検討した。その結果、抗原露出液は90℃で10分間処理、またはプロナーゼは0.1%溶液とし、室温で1分間処理で、最少量 $\log 10^{3.5}$ pfu/gのウイルスを含む組織の抗原を検出し得た。

最後に、妊娠6~8ヶ月の5例の馬に $10^{5.3}$ pfu/5mlのEAVを鼻腔内接種した結果、4例で接種後10~12日に流産が誘発された。病理学的には、母馬では子宮筋層炎、胎盤の絨毛下層では線維芽細胞の変性と炎症性細胞浸潤、胎子では脾およびリンパ節のリンパ球崩壊が所見された。上記の間接蛍光抗体法では、母馬の子宮、胎盤、胎子の肝、脾、腎、肺、リンパ節などにEAV抗原が検出された。電顕的検索では、子宮筋層の平滑筋細胞、胎盤の線維芽細胞、胎子の脾の単核細胞に前述の棍棒状構造物が認められた。以上の所見から、EAVの胎子への経胎盤感染 (胎子死)、母馬の子宮筋層への趨向性 (子宮筋層炎) が証明され、これらが流産の発生機序として重要視された。

以上の成果は、EAVによる馬の流産の発生機序の解明に大きく貢献する。よって審査員一同は、和田隆一氏が博士 (獣医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。