



Induction of cytomegalovirus-infected labyrinthitis in newborn mice by lipopolysaccharide: a model for hearing loss in congenital CMV infection

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 李, 立 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/786

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 524号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏 名	李 立		
論文題目	Induction of cytomegalovirus-infected labyrinthitis in newborn mice by lipopolysaccharide: a model for hearing loss in congenital CMV infection (新生仔マウスにおけるリポポリサッカライド投与によるサイトメガロウイルス内耳炎の誘導：先天性 CMV 感染による難聴モデル)		

博士(医学) 李 立

論文題目

Induction of cytomegalovirus-infected labyrinthitis in newborn mice by lipopolysaccharide: a model for hearing loss in congenital CMV infection

(新生仔マウスにおけるリポポリサッカライド投与によるサイトメガロウイルス内耳炎の誘導: 先天性 CMV 感染による難聴モデル)

論文内容の要旨

[はじめに]

サイトメガロウイルス(CMV)は胎生期に感染して脳障害を起こす最も頻度の高い病原微生物である。全出産の 0.4-1.0%に CMV の胎内感染が報告され、そのうち 5-10%は出生時に、小頭症、小脳低形成、全身の黄疸、肝脾腫などを示して死亡する場合と、残りの約 10%は出生時には無症状で、生後数年して精神発達遅滞、視力障害、難聴、てんかん等の脳機能障害が生じてくることが知られている。特に感音性難聴は高頻度に認められ、小児の難聴の 30%近くが先天性 CMV 感染症による可能性が高いとされている。本研究の目的は、発育期の CMV の感染による難聴の発生机序を解明するためのマウス実験モデルを作成し、その病理発生に関わる要因を明らかにし、予防法の基礎を確立することである。

[材料ならびに方法]

1. 感染方法: (1)腹腔内(ip)感染: 生後 2 日目の BALB/c マウスの腹腔内へ 1×10^5 PFU 接種した。感染前 1 日、感染後 1 日、3 日、5 日に右脳内に細菌のエンドトキシンである lipopolysaccharide (LPS)を $5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ 投与して感染 6 日目に脳を取り出した。(2)脳内(ic)感染: 生後 2 日目の BALB/c マウスの右脳内へ MCMV を 2×10^4 PFU 接種し、感染 6 日目(生後 8 日目)に脳を取り出した。
2. 内耳における組織標本の作製: 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した脳と側頭骨部を別々にして 2 日間固定し、側頭骨部は 0.3M EDTA で 1 週間脱灰し、蝸牛の前額断と平行に頭部を切り出し、パラフィン包埋した。
3. 免疫染色: ウイルス感染細胞は MCMV 前初期遺伝子産物(IE1 抗原)、早期遺伝子産物(Q3 抗原)に対するモノクローナル抗体を用いた。ウイルス抗原陽性細胞は右側内耳及び右側大脳切片当たりで数えた。血管内皮は Factor VIII、好中球は myeloperoxidase (MPO)、神経細胞は NeuN に対する抗体を用いた。免疫二重染色は二次抗体をアミノエチルカルバゾールで標識して赤く、アルカリホスファターゼで標識して青く染め出した。
4. ウイルス感染価の測定: 両側の側頭骨の内耳を含む部分を切り出し、ホモジネートにして、ブランクアッセイを行った。ウイルス感染価は臓器当たりで示した。
5. 聴力検査: auditory brainstem response (ABR)を測定した。

[結果]

1. 腹腔内感染における LPS による内耳及び脳内感染の増強: LPS を 4 回脳内投与することによって、内耳及び脳のウイルス感染価が上昇し、特に内耳での上昇が顕著であった。ウイルス抗原陽性細胞は LPS 非投与群では認めなかったが、LPS 投与することによって出現した。
2. ウイルス抗原陽性細胞の内耳における分布: ウイルス抗原陽性細胞は蝸牛の間葉細胞(M)で目

立ち、次いで蝸牛神経(CN)及び鼓室階(ST)、前庭階(SV)を含む外リンパに認め、内リンパである中央階(SM)には感染細胞は認めず、それに接する螺旋靱帯(SL)では2例のみに認められた。

3. 脳内感染:LPSを投与しなくても蝸牛に感染し、特に蝸牛神経(CN)及び鼓室階(ST)で目立ったが、内リンパへの感染は認めなかった。
4. 免疫二重染色による感染細胞の性質:血管内皮に感染を認め、感染間葉細胞の目立つ部分にはMPO陽性の炎症細胞が目立ち、また神経細胞は感染を認めなかった。
5. PS投与ip感染において4週間飼育したマウスにおいて、実際に難聴が生ずることをABR測定で明らかにした。

[考察]

先天CMV感染による感音性難聴は、出生時に無症候であった症例に最も頻度の高い症候で、その発生機序の解明と予防法の確立が臨床的に重要な課題となっている。また先天性CMV感染症は新生児難聴全体の主要な原因の一つと考えられている。内耳が先天性CMV感染症においてなぜ感受性が高いかが問題であり、いかなる要因が関与するか、適切な実験モデルの作成が重要である。本実験モデルは新生仔マウスのCMVの全身感染がLPSの投与によって内耳への感染が亢進することを示した。このとき感受性細胞は蝸牛の間葉細胞で目立ち、炎症細胞の浸潤を伴うことが示された。このことは、CMVが血行性に感染し、LPSの刺激によって蝸牛の間葉細胞がCMVに対して感染感受性が高まる可能性を示している。また、ip感染においても、ic感染においても、外リンパに感染するが、内リンパには感染しないという今までの報告も再確認された。

この実験モデルによって、無症候性先天性CMV感染症の症例において、生後に全身性の細菌感染を伴うと難聴になる可能性を初めて提起した。

[結論]

新生仔マウスの全身性CMV感染において、LPSの投与によって内耳感染が促進されることを明らかにした。蝸牛の間葉細胞において感受性が最も高く血行性感染の内耳の標的細胞になると考えられる。この実験モデルから、ヒトの無症候性先天性CMV感染において、全身性細菌感染が難聴の誘因になる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

サイトメガロウイルス (CMV)は胎生期に感染して脳障害を起こす最も頻度の高い病原微生物である。全出産の0.4-1.0%にCMVの胎内感染が生じ、そのうち5-10%は出生時に死亡する。残りの約10%は出生時には無症状で、生後数年して精神発達遅滞、視力障害、難聴、てんかん等の脳機能障害が生じ、特に感音性難聴は高頻度に認められる。そこで申請者はCMV感染による難聴の発生機序を解明するためにマウス実験モデルを作成し、その病理発生に関わる要因を検討した。

[実験方法]

1. 生後2日目のBALB/cマウスを使用し、(1)腹腔内感染群(腹腔内投与MCMVを 1×10^5 PFU投与し、感染前1日、感染後1日、3日、5日に右脳内に細菌のエンドトキシンであるlipopolysaccharide

(LPS)を 5 µg/ 5 µl 投与)と(2)脳内感染群(右脳内へ MCMV を 2×10^4 PFU 投与)とを作成した。感染 6 日目(生後 8 日目)に脳を取り出した。

2. 組織標本は 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した後、脳と側頭骨部を 2 日間固定し側頭骨部は 0.3M EDTA で 1 週間脱灰した。そして蝸牛の前額断と平行に頭部を切り出しパラフィン包埋した。
3. ウイルス感染細胞は、MCMV 前初期遺伝子産物(IE1 抗原)と早期遺伝子産物(Q3 抗原)に対するモノクローナル抗体で免疫染色を行い同定した。また Factor VIII(血管内皮)、myeloperoxidase (MPO: 好中球)、NeuN(神経細胞)に対する抗体も用いて免疫二重染色を行い、ウイルス感染細胞の種類を調べた。
4. ウイルス感染価の測定は、両側の側頭骨の内耳を含む部分を切り出し、プラークアッセイを行い臓器毎に示した。
5. 聴力検査は LPS 投与腹腔内感染を起こし 4 週間飼育したマウスで、auditory brainstem response (ABR)を測定した。

[結果]

1. LPS を 4 回脳内投与することによって内耳及び脳のウイルス感染価が上昇し、特に内耳での上昇が顕著であった。しかし LPS 非投与群では上昇しなかった。
2. ウイルス抗原陽性細胞は、内耳では蝸牛の間葉細胞、次いで蝸牛神経及び鼓室階、前庭階を含む外リンパに認められた。内リンパである中央階には感染細胞は認められなかったが、それに接する螺旋靱帯では 2 例に認められた。
3. 脳内感染群では、LPS を投与しなくても蝸牛に感染し、ウイルス感染細胞は蝸牛神経及び鼓室階で認められたが、内リンパでは認められなかった。
4. 血管内皮にもウイルス感染を認めたが、神経細胞には認めなかった。また感染した間葉細胞の多い部分には MPO 陽性の炎症細胞が見られた。
5. LPS 投与腹腔内感染したマウスでは ABR は消失していた。

以上の結果から、新生仔マウスの CMV の全身感染が LPS の投与によって血行性に内耳へ感染が広がることが認められた。また腹腔内感染においても、脳内感染においても、外リンパに感染するが、内リンパには感染しない点が再確認された。この実験モデルによって、無症候性先天性 CMV 感染症例では、生後に全身性の細菌感染を伴うと血行性に広がり、内耳炎を起こして難聴になる可能性を提起した。

審査委員会では、先天性 CMV 感染による難聴の発症モデルを作成し、生後の細菌感染が契機となることを初めて証明した点を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) マウスの系について
- 2) LPS 投与の濃度・量・時期について
- 3) ウイルス感染細胞の部位(ライスネル膜は、鼓室階の内側か)について
- 4) 使用した抗体の選択理由について
- 5) ウイルス関連タンパクの発現時期と細胞局在について
- 6) 病理検査をした時期について
- 7) 聴覚中枢路の病理の確認について

- 8) ABR 検査のコントロールについて
- 9) Blood Labyrinth Barrier について
- 10) CMV 感染した人間の内耳病理との差異について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 峯田 周幸

副査 上田 啓次

大野 浩司