The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Inhibitory Role of Neutrophils on Influenza Virus Multiplication in the Lungs of Mice
Author(s)	藤澤, 治男
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43134
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名　藤澤治男（ふじさわ はるお）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　16672　号

学位授与年月日　平成14年3月8日

学位授与の要件　学位規則第4条第2項該当

学位論文名　Inhibitory Role of Neutrophils on Influenza Virus Multiplication in the Lungs of Mice
（マウスのインフルエンザウイルス肺内感染に対する生体防御機構における好中球の役割）

論文審査委員　（主査）
教　授　生田　和良

（副査）
教　授　松浦　善治　　教　授　塩田　達雄

論文内容の要旨

【目的】

感染に対する生体防御機構の中で細胞性のeffector機構が重要な役割を演じるためには、1）effector細胞数の増加、2）effector細胞の感染部位への集積、3）effector細胞の機能的活性化、という免疫応答プロセスが必要と考えられる。しかし、これらの考えに基づいて、ウイルス感染に対する好中球の防御的役割を動物モデルを用いて直接明らかにした成績はほとんどない。そこで、本研究では、インフルエンザウイルスをモデルとしてこの点を明らかにするために、担癌マウスにしばしば認められる好中球増多状態とchemotactic peptideの一つであり、好中球機能の強力なactivatorでもあるfMLPを用い、感染局所への好中球の集積と機能的活性化をもたらす事で、好中球のウイルス感染に対するeffector細胞としての重要性について検討した。また、その作用機構の一つとして、好中球が産生し、抗菌活性や抗腫瘍活性が知られている蛋白質の一つであるcalprotectinの関与についても検討を加えた。

【方法】

ICR、BALB/c及びC57BL/6マウスに各々S-180、Meth A及びLLC細胞を皮下接種し各担癌マウスを作製した。経時的に末梢血中有核細胞数、白血球分類を計測した。腫瘍接種後3週目に、インフルエンザウイルス（IF）A/PR/8/34（H1N1）を経鼻感染し、経時的に肺ホモジネート中のウイルス感染価をMDCK細胞を用いたplaque assayにより測定した。*In vitro*における好中球のウイルス増殖阻害効果を調べるために、単層培養したMDCK細胞にIFを感染し4から6時間培養後、好中球浮遊液を加えさらに培養を1から2日間続けた。fMLP及び$ZnSO_4$は、好中球の添加後直ちに加えた。培養後、culture plateごと凍結し融解後、細胞及び培養液中のウイルス感染価をplaque assayにより測定した。好中球の遊走能の測定は、Casein-AMでラベルした好中球を24-well culture plateに装着したHTS FluoroBlok Inserts内に加え、RPMI1640（10% FBS）、正常及び担癌マウスの血清を各々Insertとwellの両方に添加し、最後にfMLPをchemoattractantとして各wellに加え90分間培養後、Insert membraneを遊走通過した細胞の蛍光をFluoroscan IIを用いて検出する事により行った。

【成績】

1）腫瘍接種後3週目には、3系統全ての担癌マウスに約30から100倍の好中球増多状態が観察された。

2）肺におけるウイルス増殖は、担癌ICR及びBALB/cマウスでは、感染初期ならびに後期で有意に抑制されていたが、担癌C57BL/6マウスでは、この抑制は認められなかった。

3）組織学的観察から、担癌 C57BL/6 マウスでは肺への好中球浸潤の低下が認められたが、ウイルス感染後 fMLP の鼻腔内投与により、肺浸潤が著しく増強される事が確認された。

4）正常及び担癌 C57BL/6 マウスに、ウイルス感染後 fMLP を鼻腔内投与し、翌日の肺内ウイルス量を比較したところ明らかな低下が見られた。正常 C57BL/6 マウスではこのウイルス量の低下はその後も維持されていたが、担癌 C57BL/6 マウスでは逆にウイルス量の増加が見られた。

5）担癌 C57BL/6 マウス好中球の fMLP により誘導される遊走能は、他の 2 系統の担癌マウスの遊走能に比べ低下していた。

6）正常及び担癌マウス好中球の *in vitro* における IF 増殖阻害効果は、同程度を示し fMLP の培養系への添加により増強された。また、正常 ICR マウスの好中球による *in vitro* IF 増殖阻害効果は、$ZnSO_4$の添加によりほぼ完全に消失した。

7）担癌マウスでは、中和抗体の産生及び肺胞マクロファージの貪食能は何れも低下しており、IF に対する血清中の nonspecific inhibitor も正常マウスに比べ同程度か、又は低値を示した。

【総括】

IF 感染に対する防御機構の一つとして、好中球が effector 細胞の役割を有し、そのウイルス感染部位における集積と機能的活性化が、ウイルスの排除に効果的に働いている事が明らかになった。また、好中球による IF 増殖阻害効果の機序の一つとして、好中球の産生する calprotectin が関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

ウイルス感染防御における特異的免疫機構については詳細な検討が行われているが、非特異的免疫機構、特に好中球が果たす effector 細胞としての役割については不明の点が多い。

本研究では、インフルエンザウイルス感染防御機構における好中球の役割について、マウスをモデルに解析を行った。インフルエンザウイルス感染マウスにおいて、好中球が effector 機能を発揮するためには、1）effector 細胞数の増加、2）effector 細胞の感染部位への集積、3）effector 細胞の機能的活性化、の 3 つの免疫応答プロセスが重要と考えられる。そこで、この条件を充すために好中球増多状態にある 3 系統の担癌マウスを用いて検討した。その結果、2 系統のマウスにおいて有意な肺内ウイルス感染価の抑制が認められた。この抑制には、好中球の肺への遊走能との相関性が認められた。肺内ウイルス感染価の抑制が認められなかった 1 系統のマウスでは、この好中球の肺への遊走能が低い事が原因と考えられた。そこで、好中球機能の activaor であり chemotactic peptide でもある fMLP を投与したところ、肺内ウイルス感染価の明らかな抑制が認められた。

本研究の成果は、ウイルス血症を伴うようなウイルス感染に対する効果的な防御機構としての好中球の役割を明らかにしたものであり、今後の急性ウイルス感染症への対応において重要な知見を提供するものと思われ、博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。