



Title	SARS-CoV-2の口腔と鼻腔を介した感染波及部位の解析
Author(s)	五條, 菜央
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91857
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

氏 名 (五條 菜央)

論文題名 SARS-CoV-2の口腔と鼻腔を介した感染波及部位の解析

論文内容の要旨

【研究目的】

コロナウイルスは、ニドウイルス目・コロナウイルス亜科・コロナウイルス科に分類される、直径約1000 nmの球形のウイルスである。Nucleocapsid (N蛋白) に巻き付いた1本鎖RNAが、脂質二重膜から成るエンベロープで覆われており、エンベロープ表面にはスパイク蛋白、メンブレン蛋白、エンベロープ蛋白が配置されている。ほとんどのコロナウイルスは風邪のような軽度の症状を引き起こす侵襲性の低いウイルスだが、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV) や中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV) のように重症肺炎を引き起こし、比較的高い致死率をもたらすコロナウイルスも存在する。

2019年12月、原因不明の肺炎が中国湖北省武漢市で発生し、その後急速に世界中へと広がった。この感染症の原因ウイルスはSARS-CoVと関連する新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) であると同定され、このウイルスにより誘発される疾患は新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) と名付けられた。COVID-19の症状は様々であり、ほとんどの場合、熱、咳、疲労感、味覚や嗅覚の消失を伴う軽症であるが、高齢者や基礎疾患を有する者は重症化し、重症呼吸器窮迫症候群を発症することがある。

SARS-CoVと同様に、SARS-CoV-2のスパイク蛋白は標的細胞の表面に発現しているアンギオテンシン変換酵素 (ACE2) を受容体として利用し、膜貫通型セリンプロテアーゼ2 (TMPRSS2) とFurinによりスパイク蛋白が切断されることで、より効率的に細胞内に侵入することができる。COVID-19は呼吸器疾患であり、SARS-CoV-2の主な標的は気道上皮で、鼻腔粘膜上皮に最初にウイルスが付着すると考えられている。しかしながら、口腔粘膜や唾液腺、舌背、歯肉など口腔内にもACE2が発現しており、口腔を介した感染も考えられる。特に、唾液腺に関しては、唾液腺導管上皮にACE2が発現しており、ヒト唾液腺がSARS-CoV-2に感染し、唾液中にウイルスを排出していることが報告されている。これらの報告により、唾液腺が感染することで、唾液を介して体内外へ感染が波及する可能性が示唆された。ハムスターの鼻腔からSARS-CoV-2を接種することで、鼻腔粘膜や細気管支が感染し、重度の肺病変を引き起こすと報告されている。しかしながら、鼻腔から口腔への感染波及や口腔を介した体内への感染波及については明らかとなっていない。そこで本研究では、SARS-CoV-2の鼻腔投与に加え、唾液腺を介さない感染を想定した舌上投与、唾液腺を介した感染を想定した舌下投与を行い、異なる侵入経路による感染波及部位、肺損傷の程度の差を解析した。

【材料と方法】

1. SARS-CoV-2感染実験

7週齢のSyrian系ハムスターに30 μ Lのウイルス培養上清液 (SARS-CoV-2、神奈川衛研株・武漢型 5×10^5 TCID₅₀) を以下の3つの方法で投与した。

- ・鼻腔投与 (鼻腔からの経気道感染モデル)
- ・舌上投与 (口腔からの唾液腺を介さない感染モデル)
- ・舌下投与 (口腔からの唾液腺を介した感染モデル)

2. 異なるウイルス侵入経路による肺、鼻腔粘膜、顎下腺の組織学的比較

感染3日後、安楽死の後に、4%PFAにより灌流固定を行い、肺、鼻腔、顎下腺を摘出した。通法に従ってパラフィン切片を作成した。免疫組織染色法にて抗SARS-CoV-2 N蛋白抗体を用いてN蛋白陽性面積を比較し、感染の評価を行った。また、抗CD45抗体を用いてアポトーシス細胞数を比較した。さらに抗cleaved caspase-3抗体を用いて炎症像の比較を行った。

3. 肺へのウイルス到達性の比較

異なる侵入経路におけるウイルス培養上清液の肺への流入量(ウイルス到達性)を比較する目的で、感染実験と同様に、3つの投与方法により、炭を混ぜた生理食塩水(炭混濁液)を投与した。投与3時間後、4%PFAで灌流固定を行い、肺を摘出し、BABB法により組織の透明化を行った。透明化した肺を実体顕微鏡で撮影し、肺に流入した炭の面積を比較した。

4. SARS-CoV-2感染関連蛋白(ACE2、TMPRSS2、Furin)の解析

顎下腺、肺、鼻腔粘膜における感染関連タンパクの発現局在を免疫組織染色で、発現量の比較をウェスタンブロッティングで解析した。

【結果】

1. 異なるウイルス侵入経路による感染波及部位の比較

鼻腔投与は、細気管支上皮におけるSARS-CoV-2感染が3つの投与方法の中で最も著しく、肺の炎症とアポトーシスも重度であった。鼻腔粘膜の感染は鼻腔投与でのみ確認された。顎下腺における感染も認められたが、舌下投与と比較するとSARS-CoV-2感染と炎症細胞数は少なかった。

舌上投与では、細気管支上皮におけるSARS-CoV-2感染と肺の損傷は軽度だった。鼻腔粘膜における感染は認められず、顎下腺におけるSARS-CoV-2感染は舌下投与よりも少なかった。

舌下投与では、細気管支上皮におけるSARS-CoV-2感染は非常に少ないものの、肺胞における炎症細胞数は鼻腔投与に次いで多かった。鼻腔粘膜における感染は認められなかった。顎下腺におけるSARS-CoV-2感染と炎症細胞数は最も多かった。全ての投与方法で顎下腺におけるアポトーシス細胞は認めなかった。

2. 異なるウイルス侵入経路による肺へのウイルス到達性の比較

異なるウイルス侵入経路による肺感染の差は、肺への直接的なウイルス流入量(ウイルス到達性)が影響している可能性がある。つまり、鼻腔投与ではウイルス培養上清液が気管を通して直接肺に流入していると考えた。それを確認するために、ウイルスの代わりに炭混濁液を用いて、SARS-CoV-2感染実験と同様に3つの方法で投与した。その後、肺を透明化し定量的な評価を行ったところ、舌上投与で肺に炭の流入が顕著に確認され、舌下投与と鼻腔投与では非常に少なかった。このことから、肺への直接的なウイルス流入量は肺感染や炎症の程度に影響を与えない可能性が示唆された。肺ではウイルス感染・複製が行われにくく、鼻腔粘膜や唾液腺で複製されたウイルスが間接的に肺に到達する可能性が示された。

3. SARS-CoV-2感染関連蛋白の解析

SARS-CoV-2感染に関わる、ACE2、TMPRSS2、Furinの局在と発現量を免疫組織染色法とウェスタンブロッティングにより解析した。免疫組織染色では、ACE2、TMPRSS2の発現を細気管支上皮、顎下腺導管上皮、鼻腔粘膜上皮に認め、Furinについては肺胞、顎下腺導管上皮、鼻腔粘膜上皮で認めた。ウェスタンブロッティングで発現量の評価を行ったところ、ACE2の発現量は肺で少なく、顎下腺と鼻腔粘膜で多い傾向にあった。Furin発現量は顎下腺で最も多く、鼻腔粘膜で少なく、肺でさらに少なかった。TMPRSS2の発現量は鼻腔粘膜でやや低い傾向にあった。このことから、肺よりも唾液腺、鼻腔粘膜がSARS-CoV-2に感染しやすく、ウイルスを複製しやすい環境であることが示唆された。

【結論および考察】

これまで多くの研究で使用されているSARS-CoV-2の鼻腔投与では、ウイルスが直接肺に到達し、肺炎を引き起こすと予想された。しかし本研究により、鼻腔投与により鼻腔粘膜と肺でSARS-CoV-2感染が確認され、肺炎を示しているにもかかわらず、ウイルス投与直後にはウイルスがまだほとんど肺に到達していない可能性が示された。顎下腺への感染が生じる舌下投与では、肺炎像を呈するが、投与された炭混濁液は肺にほとんど到達しておらず、炭はほぼ検出されなかった。一方、舌上投与方法では、炭混濁液が直接肺に到達しているにもかかわらず、感染3日後の肺でウイルスはほとんど検出されず、炎症も軽度であった。感染の成立に関与する蛋白の発現を検討したところ、鼻腔粘膜や唾液腺はACE2、Furinの発現量が多い傾向にあった。これらの結果より、SARS-CoV-2は、まず鼻腔粘膜や唾液腺に感染し、そこで大量に複製されたウイルスが分泌物と共に気管支を通過して持続的に肺に到達することで重症化を招く可能性が示された。また、舌下投与では肺での感染が少ないにもかかわらず炎症像が見られたことから、ウイルスの直接的な作用だけではなく、他の要因を含めた間接的な影響が肺に炎症を生じさせる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (五 條 菜 央)			
		(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	阪井 丘芳
	副 査	教授	川端 重忠
	副 査	准教授	久保庭 雅恵
	副 査	講師	大嶋 淳

論文審査の結果の要旨

本研究は、SARS-CoV-2 の経気道感染を想定した鼻腔投与、唾液腺を介さない経口感染を想定した舌上投与、唾液腺を介した経口感染を想定した舌下投与の 3 種類の方法で SARS-CoV-2 を投与し、ウイルス侵入経路による感染波及部位や組織の炎症の差異を検討したものである。

その結果、SARS-CoV-2 受容体や感染関連蛋白が多く発現している鼻腔粘膜や唾液腺でウイルスが複製され、肺へと感染が波及することが示唆された。特に、鼻腔を介した感染で肺の感染や炎症が重度であることが明らかとなった。また、唾液腺を介した感染でも肺の感染と炎症を認めたことから、唾液腺感染も重症化のリスクとなり得ると考えられた。

以上の研究結果は、SARS-CoV-2 の体内への感染波及について重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。