



# Expression of nitric oxide synthase in a murine model of viral myocarditis induced by coxsackievirus B3

三上, 修司

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1641

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001641>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	三 上 修 司 ろ かみ しゅう じ	(大阪府)
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	
学位記番号	博い第1096号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成9年3月31日	
学位論文題目	Expression of nitric oxide synthase in a murine model of viral myocarditis induced by coxsackievirus B3 (コクサッキーB3ウイルス性心筋炎モデルにおける誘導型NO合成酵素の発現)	
審査委員	主査 教授 伊 東 宏 教授 横 山 光 宏 教授 堀 田 博	

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【緒言】

ウイルス性心筋炎は症状を欠くものから重症の心不全に至るまで多彩な臨床経過をとり、また拡張型心筋症の病態形成に関与しているという報告もある。実験モデルとしてマウスウイルス性心筋炎モデルは広く用いられており、炎症細胞を介した免疫反応が心筋障害に重要な役割を果たしていると考えられている。

一酸化窒素 (NO) は現在では様々な生理作用をもつことが知られており血管拡張作用や神経伝達物質としての作用の他に炎症、免疫系に広く関与している。NOは多くの細胞でL-アルギニンを基質としてNO合成酵素 (NOS) により産生される。NOSには3種類のタイプ、内皮型、神経型および誘導型が同定されており、IL-1やTNF- $\alpha$ のような炎症性サイトカイン刺激により誘導型NO合成酵素 (iNOS) はマイクロファージ、好中球、血管平滑筋細胞、心筋細胞を含む様々な細胞で発現することが知られている。iNOS活性は細胞内カルシウムに非依存性であり一旦産生されると長時間大量のNOを産生し続ける。NOはある環境下ではそれ自体でも細胞障害性であるが、それに加えて心筋収縮性や心機能を調節することが知られている。

本研究でマウスウイルス性心筋炎モデルを作製し、心臓でのiNOS発現の過程をRT-PCR法、酵素活性測定、免疫染色法により検討した。

#### 【方法】

##### (1) ウイルス接種

コクサッキーB3ウイルス (Nancy strain) をVero細胞に感染させウイルス液を分離。3週齢のCSH/HeJマウスに $1 \times 10^6$  pfuを腹腔内投与しウイルス性心筋炎モデルを作製。

##### (2) RT-PCR法

正常心およびウイルス接種後2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 30, 90日目のマウスの心臓を取りだしAGPC法にてtotalRNAを分離。逆転写反応後iNOS sequenceのN末端の240bpの部分 PCR法にて増幅、iNOS mRNAの発現の有無を検討した。

### (3) NOS活性

心筋炎モデルの心臓におけるNOS活性をL-[<sup>3</sup>H]-アルギニンからL-[<sup>3</sup>H]-シトルリンへの変換で測定した。正常心およびウイルス接種後4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 30日目の心臓の抽出液をL-[<sup>3</sup>H]アルギニンでラベルし, Ca<sup>2+</sup>非存在下でのシトルリンの産生を測定し, iNOS活性とした。

### (4) 免疫染色

ウイルス接種後7日目の心臓の凍結切片を作製し, 抗ラットiNOS抗体を用いてLSAB法にて免疫染色, iNOSの局在を検討。

## 【結果】

### (1) iNOS mRNAの発現

RT-PCR法ではiNOS mRNAはウイルスを接種していない正常心では認められなかったが, ウイルス接種後4日目より発現が認められ約1ヶ月間認められた。

### (2) iNOS活性

正常心ではiNOS活性は認められなかったがウイルス接種後4日目より活性は上昇し8日目をピークとして14日目には殆ど認められなくなった。

### (3) iNOS免疫染色

心筋炎の発症はほぼ100%でありウイルス接種後7日目には壊死, 炎症細胞浸潤(リンパ球, マクロファージ, 少数の好中球)は激しくなりそれ以後徐々に線維組織に置換されていった。7日目の免疫染色ではiNOS蛋白は炎症細胞(好中球, マクロファージ)に陽性に認められたが心筋細胞には殆ど認められなかった。

## 【考察】

本研究では, マウスウイルス性心筋炎モデルにおいてiNOS mRNAはiNOS活性と同様に発現しており主に炎症細胞に分布していることが占めされた。このモデルでは心筋壊死組織は炎症細胞で囲まれており炎症細胞を介した細胞障害が心筋障害の進展に重要であることが示されている。我々の観察でも心筋炎の進展は過去の報告と一致しておりウイルス接種後3日目に少数の好中球, マクロファージが浸潤し, 7日目には壊死, 炎症細胞浸潤(NK細胞, Tリンパ球, マクロファージ, 少数の好中球)は激しくなり, それ以降Tリンパ球が中心となるが徐々に炎症細胞数は減少し線維組織に置換されている。

病変部の炎症細胞からはTNF- $\alpha$ , IL-1, IFNなどの炎症性サイトカインが産生されそれらはiNOSを誘導すると言われているが, RT-PCR法や酵素活性測定で示されるようにiNOSは炎症細胞の浸潤と同時に発現し始め炎症細胞の減少した時期には低下している。また免疫染色においてもiNOSは主に炎症細胞に発現しており, 炎症の最も激しい時期においても心筋細胞からの発現は殆ど認められない。最近iNOSが心筋細胞で発現することが報告されているが, 我々のモデルでは抗ラット抗体を用いたこともあり心筋からのiNOSの低レベルの発現は確認出来なかった。心筋細胞からのiNOSは発現しているとしても炎症細胞と比較すると低レベルであると考えられた。尿中, 血中のcGMPレベルやNO<sub>x</sub>レベルは測定出来なかったが, iNOS発現および活性の上昇は感染心におけるNOの産生を強く示唆するものであり炎症細胞由来のiNOSによる大量のNOがウイルス性心筋炎の経過において心機能に影響を与えていると考えられた。

結論として, マウスウイルス性心筋炎モデルではNOは急性期において主に炎症細胞から産生され

ていると考えられる。NOが心機能に保護的に作用しているか障害性であるかどうかは不明であるがNOの役割を探究するにはNOS阻害剤やNOドナーを用い、あるいはNOと他のフリーラジカルとのバランスを検討する必要がある。

## 論文審査の結果の要旨

一酸化窒素（NO）は現在、様々な生理作用をもつことが知られており血管拡張作用や神経伝達物質としての作用の他に炎症、免疫系に広く関与している。NOは多くの細胞でL-アルギニンを基質としてNO合成酵素（NOS）により産生される。NOSには3種類のタイプ、内皮型、神経型および誘導型が同定されており、IL-1やTNF- $\alpha$ のような炎症性サイトカイン刺激により誘導型NO合成酵素（iNOS）はマクロファージ、好中球、血管平滑筋細胞、心筋細胞を含む様々な細胞で発現することが報告されている。iNOS活性は細胞内カルシウムに非依存性であり一旦産生されると長時間大量のNOを産生し続ける。NOはある環境下ではそれ自体でも細胞障害性であるが、それに加えて心筋収縮性や心機能を調節することが知られている。

本研究ではウイルス性心筋炎のマウスモデルを作製し、心臓でのiNOS発現の過程をRT-PCR法、酵素活性測定、免疫染色法により検討した。

実験方法としてはコクサッキーB3ウイルス（Nancy strain）をVero細胞に感染させウイルス液を分離、3週齢のC3H/HeJマウスに $1 \times 10^6$  pfuを腹腔内投与しウイルス性心筋炎モデルを作製した。

その結果RT-PCR法ではiNOS mRNAはウイルスを接種していない正常心では認められず、ウイルス接種後4日目より発現が認められ約1ヶ月間認められた。

また、正常心ではiNOS活性は認められなかったがウイルス接種後4日目より活性は上昇し8日目をピークとして14日目には殆ど認められない。組織学的検査では、心筋炎の発症はほぼ100%で、ウイルス接種後7日目には壊死、炎症細胞浸潤が激しくなりそれ以後徐々に線維組織に置換されていく。7日目の免疫染色ではiNOS蛋白は炎症細胞に陽性に認められるが心筋細胞には殆ど認められない。最近iNOSが心筋細胞で発現することが報告されているが、我々のモデルでは心筋からのiNOSの発現は確認出来なかった。iNOS発現および活性の上昇は感染心におけるNOの産生を強く示唆するものであり炎症細胞由来のiNOSによる大量のNOがウイルス性心筋炎の経過において心機能に影響を与えていると結論づけられた。

本研究は心筋炎モデルマウスを用いてiNOSの活性を研究したもので従来ほとんど研究されていないiNOS mRNAの発現を検索し、ウイルス性心筋炎が炎症細胞に由来するiNOS蛋白が心筋障害を生じ、心機能に影響するという重要な知見を得たものとして本研究者は博士（医学）の学位を得る視覚があると認める。