原 著

サイトメガロウイルス潜伏感染マウスにみられる
Sjögren 症候群様変化に関する研究

大 澤 篤 子

東北大学歯学部口腔診断・放射線学講座（指導：三條大助教授）

〔受付：平成3年9月15日〕

A study of Sjögren's syndrome-like changes in mouse
cytomegalovirus latent infected mice

Atsuko Ohsawa

Department of Oral Diagnosis, Tohoku University School of Dentistry
(Director : Prof. Daisuke Sanjo)

〔Accepted for publication : September 15, 1991〕

Key words : mouse cytomegalovirus/focal lymphoid cell infiltration/antisalivary duct antibody/
antinuclear antibody/Sjögren's syndrome

Abstract : The pathogenesis of Sjögren's syndrome (SjS) is not yet sufficiently elucidated, but recently it has been said that viruses, especially cytomegalovirus (CMV), can cause sialadenitis and may be associated with disease of SjS. The purpose of this study was to observe pathologically the effect of CMV infection on BALB/c mice.

Specific pathogen-free female 4 week old BALB/c mice were infected i.p. with $2 \times 10^{5.0}$ PFU of mouse cytomegalovirus (MCMV, Smith strain), which was grown in BALB/c mouse embryo cells (MEC), and they were sacrificed under etherization during time intervals ranging from 4, 16, 20, 24, 30, 40, 46, 60 weeks after infection. The sera of MCMV infected or normal mice were tested for antinuclear antibody (ANA) and antisalivary duct antibody (ASDA) by indirect immunofluorescent antibody technique using MEC or frozen sections of normal female BALB/c submandibular glands. The sections of the submandibular glands in MCMV infected or normal mice were stained with hematoxylin and eosin.

And then, ANA could be detected since 20 weeks after infection while ASDA since 24 weeks after infection. Their incidences had a tendency of increase with advancing age. Focal lymphoid cell infiltration could be seen in the periductal areas of submandibular glands at 20 weeks after infection and the foci could be seen in all of the MCMV infected mice since 24 weeks after infection. Numbers of foci and infiltrated cells tended to increase with advancing age.

These results indicated that the serologic and pathologic changes occurring in persistent and latent MCMV infected mice are very similar in respects to those which characterize SjS in human.

緒 言

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome; 以下 SjS と略す) は外分泌腺の慢性炎症に基づく乾燥症状を主体とする自己免疫疾患で、その特徴として、抗核抗体 (antinuclear antibody; 以下 ANA と略す)、抗唾液腺管抗体 (antisalivary duct antibody; 以下 ASDA と略す) などの自己抗体産生や、唾液腺導管周囲における集簇的なリンパ球を主体とする単核細胞浸潤があげられる。SjS の病因はいまだ不明であるが、その発症に関与する環境因子の1つとして、サイトメガロウイルス (cytomegalovirus; 以下 CMV と略す) や Epstein-Barr ウイルスなどのウイルス感染説が注目されている¹⁻¹⁹⁾。

このうち CMV はヘルペスウイルス科に属するウイルスで、唾液腺に親和性を示すことから唾液腺ウイルスともいわれ、SjS 発症の環境因子として有力視されてきた。CMV は、ヒトでは一般に小児期に不顕性感染し、体内で持続感染から潜伏感染へ移行し、終生体内に CMV ゲノムの状態で存在するといわれている。潜伏感染状態の CMV は臓器移植における免疫抑制剤使用時、または妊娠、悪性腫瘍、AIDS など免疫機能低下時に再活性化し、間質性肺炎などの日和見感染を起こすことが知られている²⁰⁻²²⁾。

しかし、ヒトの唾液腺組織における CMV の潜伏感染、再活性化の機序は明らかではなく、本教室の古内²³⁾は BALB/c マウスに $2 \times 10^{5.0}$ plaque forming units (PFU) のマウスサイトメガロウイルス (mouse cytomegalovirus; 以下 MCMV と略す) を腹腔内接種し、唾液腺における MCMV の動向を追及した。その結果、MCMV は唾液腺の介在部導管細胞に特異的に感染し、感染後6週目までは急性感染期で、その後同部で持続感染状態になり、感染後28週には潜伏感染へ移行すること、免疫抑制時には MCMV は介在部導管細胞で再活性化することが明らかになった。

一方、臨床的に SjS と CMV との関連性を追及した研究には、SjS 患者血清中の抗 CMV 中和抗体価を測定した報告があるが¹⁶⁻¹⁹⁾、一定した見

解は得られていない。また、CMV の持続感染、潜伏感染時に CMV が周期的に放出されることにより、唾液腺や涙腺の導管細胞表面抗原が自己変性抗原蛋白となり、免疫反応が惹起されて SjS 病態を導くという仮説が立てられている²⁾が、ヒトや実験動物においてそれを実証するには至っておらず、CMV 感染による SjS 発症の病因論的解析はなされていない。

そこで、CMV 感染と SjS 発症との因果関係の一端を探るために、BALB/c マウスに MCMV を腹腔内接種し、血清中の自己抗体産生、唾液腺の組織変化について経日的に検索し、CMV の持続感染、潜伏感染と SjS との関連性について検討した。

材料および方法

1. マウス

Specific pathogen-free (SPF) の4週齢雌 BALB/c マウス (東北大学医学部附属動物実験施設より搬入) を使用した。

2. ウイルス

MCMV (Smith 株、宮崎医大南嶋教授より分与) は BALB/c 胎児の2~3代継代培養細胞 (mouse embryo cells; 以下 MEC と略す) で増殖し、感染細胞を3回凍結融解した遠心上清をウイルス液とした。感染価は $10^{6.0}$ PFU/ml で、 -80°C で凍結保存し、実験に用いた。

3. ウイルス接種および試料採取方法

実験群は4週齢の SPF BALB/c 雌 (44匹) の腹腔内に 0.2 ml の MCMV を接種し、東北大学医学部附属動物実験施設の感染実験室アイソレーター内で飼育し、急性感染期である8週齢、持続感染期である20, 24, 28週齢、潜伏感染期である34, 44, 50, 64週齢の8グループについて、おのおのエーテル麻酔下にて鎖骨下動脈を切断し採血した。採取した血液は 4°C 、3,000 rpm、20分遠心分離し、血清分離後 56°C 30分で非働化を行い、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で5倍希釈し、自己抗体の検索に用いた。臓器については顎下腺を摘出し、10%中性ホルマリンによる固定を行い、組織学的検査に供した。

Fig. 1 Immunofluorescent staining of MEC using sera of MCMV infected mice. ANA (+) speckled staining pattern ($\times 200$)

Fig. 2 Immunofluorescent staining of MEC using sera of MCMV infected mice. ANA (+) homogeneous staining pattern ($\times 200$)

対照群については4週齢の SPF BALB/c 雌(15匹)を無菌的に飼育し, MCMV 持続感染期の対照として24週齢, 潜伏感染期の対照として44週齢と64週齢の3グループについて, MCMV 感染群と同様に試料を採取した。

4. ANA の検索

血清中の ANA は間接蛍光抗体法で検索した。すなわち tissue culture glassware (Flow 社) 上に培養した MEC のアセトン固定したものを抗原とし, 一次抗体として, 希釈したマウス血清を 37°C 60 分反応させ, 洗浄後に, 二次抗体として, FITC 標識 rabbit anti mouse immunoglobulins F (ab')₂ (DAKO社) を反応させ, Nikon Fluophoto 顕微鏡で観察した。ANA の判定は核, 核膜に特異的に蛍光が認められる染色パターン, すなわち核内に散布する大小様々な斑紋状に染色される斑紋型 (speckled pattern) (Fig. 1), 核全体が均質に染色される均質型 (homogeneous pattern) (Fig. 2), 核膜に近い辺縁部のみが強く染色され, 中心はやや暗い辺縁型 (peripheral pattern) (Fig. 3) の3種類を陽性とした。

5. ASDA の検索

血清中の ASDA は ANA と同様に間接蛍光抗体法で検索した。ただし, 抗原には正常 BALB/c 雌の顎下腺凍結切片 (厚さ $4\mu\text{m}$) を用いた。ASDA の判定は宮脇らの分類²⁴⁾に従い, 唾液腺導管細胞の細胞質にのみ特異的蛍光を示し, 腺実質には特異的蛍光が認められないものを陽性とし

Fig. 3 Immunofluorescent staining of MEC using sera of MCMV infected mice. ANA (+) peripheral staining pattern ($\times 200$)

た (Fig. 4, 5)。

6. 唾液腺病理組織変化の観察

唾液腺病理組織変化は, 採取した顎下腺を10%中性ホルマリン固定後, 通法に従いパラフィン包埋を行い, 厚さ $4\mu\text{m}$ の連続切片を作製し, ヘマトキシリン エオジン (H-E) 染色で観察した。顎下腺の切片標本作製にあたっては, 可能な限り最大割面になるように行い, 導管周囲のリンパ球様細胞の浸潤病巣 (focus), 導管の拡張, 腺房細胞の萎縮, 筋上皮島の形成, 線維化などの変化について観察した。Focus については厚生省シェーグレン病診断基準²⁵⁾に従い, リンパ球様細胞数が50個以上の浸潤病巣を focus と定義した。また, MCMV 感染後の唾液腺病理組織の経日的変化を

Fig. 4 Immunofluorescent staining on section of salivary tissue using sera of MCMV infected mice.

ASDA (+) cytoplasm of salivary ducts was specifically stained but nucleus was not stained with fluorescence. ($\times 400$)

Fig. 5 Immunofluorescent staining on section of salivary tissue using sera of MCMV infected mice.

ANA (+), ASDA (+) cytoplasm of salivary ducts and nuclei were specifically stained with fluorescence. ($\times 200$)

把握するために、個々のマウスの顎下腺連続切片の中で1切片中に認められた focus の最大数を focus 数とし、各週齢における focus 数の平均数を調べ、唾液腺病理組織変化の指標とした。

結 果

1. ANA の出現頻度

感染群の血清中の ANA 出現率は、8、20週齢では0%，24、28週齢では33%，34週齢では60%，44週齢では57%，50週齢では60%，64週齢では

■ ; mice infected i.p. with $2 \times 10^{5.0}$ PFU of MCMV at 4 weeks old

□ ; non-infected mice

Fig. 6 Frequency of ANA positive sera of mice after various weeks from MCMV infection.

Percent indicates numbers of ANA positive sera of mice. Sera diluted 5-fold with PBS were used for test of ANA.

67%であった。Fig. 6 は感染群における ANA の出現頻度を、持続感染期である24週齢、潜伏感染期である44週齢と64週齢について、対照群と比較した結果を示したもので、縦軸に ANA 出現率、横軸に週齢を示す。感染群では24週齢から ANA が出現するのに対し、対照群では24週齢では ANA は認められなかった。44週齢では感染群が57%であるのに対し対照群では20%，64週齢では感染群が67%であるのに対し対照群では40%であった。

2. ASDA の出現頻度

感染群の血清中の ASDA 出現率は、8、20、24週齢では0%，28週齢では33%，34週齢では40%，44週齢では43%，50週齢では40%，64週齢では50%であった。Fig. 7 は感染群における ASDA の出現頻度を持続感染期である24週齢、潜伏感染期である44週齢と64週齢について、対照群と比較した結果を示したもので、縦軸に ASDA 出現率を、横軸に週齢を示す。感染群、対照群とも24週齢では ASDA は認められなかったが、44週齢では感染群が43%であるのに対し対照群では20%，64週齢では感染群が50%であるのに対し対照群では20%であった。

Fig. 7 Frequency of ASDA positive sera of mice after various weeks from MCMV infection.

Percent indicates numbers of ASDA positive sera of mice. Sera diluted 5-fold with PBS were used for test of ASDA.

3. 唾液腺病理組織変化

顎下腺の組織変化としては Fig. 8~11 に示すようなリンパ球様細胞を主体とする細胞浸潤すなわち focus の形成が認められた。

感染群では 8, 20 週齢では focus は認められず、腺組織の変化としては一部に空腔変性がみられたのみであった。持続感染期の 24 週齢になると 67% の個体に focus が出現し、28 週齢以降はすべての個体に focus が出現した。Focus は主として導管周囲に形成されていたが、一部血管周囲にも認められた。24, 28 週齢では focus の大きさは浸潤細胞数が約 50~150 個と小~中等度であり、focus 内の導管上皮の反応性増殖や、導管の拡張、顆粒管上皮の膨化が認められた (Fig. 8)。34 週齢以降になると、浸潤細胞数が 1,000 個以上の大きな focus が出現し、focus 内部に筋上皮島の形成を伴うものもあった (Fig. 9, 10)。さらに週齢が進むと、中等度~高度の focus が数個点在し、focus に隣接する腺房細胞の萎縮が認められた。また focus のほかに腺組織全体にリンパ球様細胞が瀰漫性に浸潤している個体もあった (Fig. 11)。

Fig. 8 Photomicrograph of submandibular gland after 20 weeks from MCMV infection. This gland showed a focus infiltrated with lymphoid cells in periductal area, proliferation of ductal epithelium and slight dilation of ducts. (H-E, $\times 400$)

Fig. 9 Photomicrograph of submandibular gland after 30 weeks from MCMV infection. This gland showed a large focus infiltrated with lymphoid cells. (H-E, $\times 200$)

一方、対照群では 24 週齢では focus は認められず、44, 64 週齢ではすべての個体に focus が出現した。Focus の大きさは感染群よりも小さい傾向が認められ、腺組織における focus 以外の著明な変化は認められなかった。

感染群の focus 数は 8, 20 週齢では 0 個であったが、24 週齢では平均 2.4 個、28 週齢では 1.7 個、34 週齢では 2.0 個、44 週齢では 2.1 個、50 週齢では 3.4 個、64 週齢では 2.5 個であった。Fig. 12 は感染群における focus 数を持続感染期である 24 週齢、潜伏感染期である 44 週齢と 64 週齢について対照群と比較した結果を示したもので、縦軸

Fig. 10 Photomicrograph of submandibular gland after 30 weeks from MCMV infection. This gland showed a large focus infiltrated with lymphoid cells and epimyo-epithelial island-like structure was observed in it. (H-E, $\times 200$)

Fig. 11 Photomicrograph of submandibular gland after 60 weeks from MCMV infection. This gland showed a moderate type of focus in periductal area and diffuse lymphoid cell infiltration was seen. (H-E, $\times 200$)

には1切片上に認められた focus の最大数を各週齢の個体数について平均した数を、横軸には週齢を示す。Focus 数は24週齢では感染群が2.4個であるのに対し対照群では0個、44週齢では感染群が2.1個であるのに対し対照群では1.2個、64週齢では感染群が2.5個であるのに対し対照群では1.3個であった。

考 察

SjS の病因はいまだ明らかではないが、その発

Fig. 12 Number of foci in submandibular glands from mice of various weeks after MCMV infection.

An aggregation of more than 50 lymphoid cells in periductal area was counted as a focus according to the criteria for SjS determined by the Ministry of Health and Welfare, Japan. Maximum number of foci per section was counted in longitudinal sections of submandibular glands.

症には遺伝的素因、免疫異常、性ホルモンなどのほかに、ウイルス感染などの環境要因の関与があげられている^{1-19,26,27)}。ウイルス感染による自己免疫疾患の発症には、1) 免疫反応の活性化、2) ウイルスが自己抗原と共通抗原性を有することにより生じる交叉反応、3) ウイルス感染による生体成分の変化から新たに発現する抗原性、などの機序が考えられ¹⁵⁾、ウイルスの潜伏感染、持続感染が重要な意義を持つといわれている。上記の要件を満たすウイルスの中で SjS との関連の可能性があるとされているものには、ムンプスウイルス^{26,27)}、Epstein-Barr ウイルス^{1,3-15,17)}、CMV^{1,2,6,9,11,15-19)}がある。これらのうち、CMV は唾液腺に親和性を示すことから唾液腺ウイルスともいわれ、早くから SjS との関連が考えられていた。Shillitoe ら¹⁶⁾は、SjS 患者血清中の抗 CMV 中和抗体価が対照群よりも特異的に高値を示したことから、CMV 感染が直接 SjS 発症に関与する可能性や、SjS 発症に伴う免疫異常によって CMV

が再活性化し抗体価が上昇する可能性のあることを報告している。が、一方では、SjS 患者血清中の CMV 中和抗体価は対照群と同じであったという報告もある^{17,19)}。本教室で行った研究では、SjS と対照群について抗体価には差はなかったが、保有率は対照群が 88.2% であったのに対し、SjS は 100% と差があり、SjS 確実例の抗体価は対照群よりもばらつきが大きい傾向が認められた¹⁸⁾。このようにヒト SjS における抗 CMV 中和抗体価に関する見解は一致しておらず、CMV は幼児期より広く不顕性感染し頻回に再活性化をくり返しているウイルスであることから、まだ明確な結論は得られていない。また、CMV は中和抗体存在下で潜伏感染となり、潜伏細胞内ではウイルス DNA の形となって細胞 DNA に組み込まれて存在することから、SjS 患者の唾液からの CMV 分離やウイルス様微細構造の確認は困難であり、ヒト SjS における CMV の関与はいまだ推論の域を出ていないと思われる。

一方、実験動物を用いての SjS の病態に関する研究報告は数多くあり、NZB^{28,29)}、NZB/NZW^{28,30,31)}、MRL/l³²⁻³⁴⁾、SL/Ni^{35,36)}、NOD³⁷⁾ などの自然発症モデルや、ウサギ³⁸⁾、ラット³⁹⁻⁴⁴⁾、マウス^{27,45-47)} などを自己組織をはじめとする各種抗原で感作し、実験的に自己免疫性唾液腺炎を作成した研究がある。しかし、ウイルスを用いた研究は少なく、わずかに CRJ:CD-1 マウスをムンプスウイルスを *in vitro* で感染させた顎下腺細胞で感作し、アレルギー性唾液腺炎を作成した報告²⁷⁾、ムンプスウイルスをサルに感染させ自己抗体や唾液腺の単核球浸潤について検討した報告²⁸⁾があるのみである。そこで、今回、BALB/c 雌に MCMV を感染させ、長期間飼育し、MCMV 感染が個体にどのような影響を及ぼすのか、血清中の自己抗体産生、唾液腺の組織変化について経日的に検索し、CMV の持続感染、潜伏感染と SjS との関連性について検討する目的で実験を行った。

MCMV の感染性にはマウス系統間において大きな差異がみられ、H-2 genes との関係が疑われている²³⁾。BALB/c はハプロタイプ H-2^d で遺伝的に MCMV に対して感受性を示す²³⁾とされており、しかも自己免疫非自然発症マウスであること

からこの系統を選択した。またヒト SjS の性差は女:男=10~14:1 と女性に多い^{6,48)}ことから雌を使用した。飼育期間については、マウスを用いた自己免疫性唾液腺炎や MCMV 感染実験では 30 月齢まで飼育したものが⁴⁹⁾あるが、おおむね 30~68 週齢まで飼育しており^{27-37,45-47)}、これらの実験結果と比較しながら、MCMV 感染の影響を長期的に観察したいと考え、64 週齢まで飼育した。

1. MCMV と自己抗体産生

ANA は自己免疫疾患の診断上または経過観察上重要な指標となる自己抗体である。Bertram⁵⁰⁾により発見された ASDA は出現頻度、病態との関連性、抗原の性状などに未解決な問題があり、いまだ臨床応用に至っていないが、SjS における臓器特異抗体として注目されている。ヒトにおける CMV 感染ではクームス溶血性貧血、抗核抗体、リウマチ因子などの自己免疫現象が生じることが知られている^{1,51)}が、CMV 持続感染や潜伏感染と自己免疫現象との関係は不明である。一方、マウスを用いた MCMV 感染実験での長期にわたる自己抗体産生に関する報告は少なく、特に ASDA についての報告は見当たらない。ANA については、Olding ら⁵²⁾が BALB/c を含む 6 系統のマウスを用いて、MCMV 潜伏感染期における ANA 産生について報告している。それによると、胎内または出生時に MCMV を感染させ長期飼育したところ、6~9 月齢の C57Br/cdJ にのみ対照群と比較し ANA 出現率と抗体価の上昇が認められたことから、MCMV 感染による自己免疫反応には遺伝的な因子が関与していると報告している。また実験的自己免疫性唾液腺炎の研究で、実験動物の血清中に ANA、ASDA が認められたとの報告があるが、それらの出現率ならびに経日的な出現率の変化を調べたものは少なく、Tonietti ら⁵³⁾が NZB、NZB/NZW を用いて、Hayashi ら⁴⁷⁾が C3H/He、BALB/c、C57BL/6 を用いて報告しているに過ぎない。このうち Hayashi らは C3H/He、BALB/c、C57BL/6 を用い生後 3 日目に胸腺摘出術を行い、その後 4 週齢または 6 週齢で顎下腺をホモジネートしたもので感作し、実験的自己免疫性唾液腺炎を作成し、その ASDA について最終感作時期から 4、8、16 週後に検索したとこ

ろ、C3H/He のみに最終感作時期から8週以降に ASDA が60~90%出現したことから、自己免疫非自然発症マウスでは遺伝的な感受性が病態の発生に関係していると述べている⁴⁷⁾。このように従来の MCMV 感染や、自己組織抗原による感作などの動物実験では、BALB/c は他の系統のマウスと比較して遺伝的に ANA, ASDA などの自己抗体は産生されにくい系統であるとされている。本実験では BALB/c のみを使用したこと、MCMV の感染時期ならびに感染方法、ANA, ASDA 検索方法の違いなどから、これらの研究とは一概に比較できないと思われるが、BALB/c は前述したように MCMV に遺伝的に感受性がある系統であり、感染群では ANA 出現率は24, 28週齢で33%, 44週齢で57%, 64週齢で67%, ASDA 出現率は28週齢で33%, 44週齢で43%, 64週齢で50%であったことから、BALB/c は MCMV 感染による実験的自己免疫性唾液腺炎のモデルとなり得るものと思われる。

本実験では64週齢と長期飼育しているので、自己免疫現象について考察する場合、ウイルス感染以外に加齢という因子も考慮しなければならない。ヒトでは Bertram⁵⁴⁾ が65歳以上の健常な高齢者を調査したところ、26%が ANA 陽性、18%が ASDA 陽性であったと報告している。マウスでは Hayashi らが自己免疫非自然発症マウスである BDF1 雌に ASDA が12月齢から認められ、12月齢では ASDA 出現率は20%、18月齢では60%、24, 30月齢では100%であったと報告している⁴⁹⁾。自己免疫非自然発症マウスである BALB/c の加齢による ANA, ASDA 産生に関する報告は見当たらない。本実験の対照群では、24週齢で ANA 出現率、ASDA 出現率はともに0%、44週齢では ANA 出現率が20%、ASDA 出現率が20%、64週齢では ANA 出現率が40%、ASDA 出現率が20%であった。これらのことから、加齢現象には種差があると考えられ、自己免疫疾患発症の誘因の1つとして加齢を考慮する必要がある、さらに加齢に伴うヘルペスウイルス科に属するウイルスの再燃や、内因性レトロウイルスの活性化^{55,56)}などの要因も考慮しなければならない。

本実験では感染群と対照群とでは ANA, ASDA

出現率に明らかに差が認められ、さらに感染群では ANA, ASDA 出現率が24, 28週齢から、34, 44週齢にかけて上昇率が大きいことから、MCMV 持続感染ならびに潜伏感染初期では、自己抗体産生に対し明らかに MCMV 感染が影響を及ぼしていると思われる。今回の一連の実験で、潜伏感染状態の BALB/c に免疫抑制剤として、抗マウス T細胞抗体 (α T), cyclosporin A (CsA), steroid (st) をおのおの1クール8日間連続投与したところ、3クール投与群では α T, CsA では ANA の出現頻度がほぼ100%に上昇したのに対し、st では ANA 出現頻度は非投与群とほぼ同じであった(未発表)。このことは、免疫抑制剤投与は MCMV の再活性化に関与するとともに、免疫系細胞の異常を惹起し、ANA 産生に対して誘導的に作用することを示すものと考えられる。

ANA の染色パターンについては核均質型、斑紋型、辺縁型の3種が認められた。阪本は SjS 患者血清中の ANA を SV₄₀ によるトランスフォームで得られたヒト唾液腺導管細胞を substrate に用いて調べたところ、SjS 確実例では斑紋型の陽性率が73.9%と最も高かったことから、斑紋型の検出は疾患特異性を示すものとして十分とはいえないが、自己免疫疾患のスクリーニングに役立つと述べている⁵⁷⁾。本実験では血清の希釈倍数が5倍であったことから、斑紋型が均質型にマスクされている可能性が高く、3つの染色パターンがおのおの混在した型としてみられたものが多かった。ヒト SjS における ANA, ASDA 陽性率は、ANA は60~70%、ASDA は20~70%である。本実験では、マウス血清の希釈倍数または自己抗原とした substrate など相違点は多々あるが、ヒト SjS と類似した傾向が得られた。

2. MCMV と唾液腺病理組織変化

マウスを用いた CMV 感染実験で、持続感染期、潜伏感染期での唾液腺の組織変化を長期的に観察した報告は少なく、わずかに古内が BALB/c 顎下腺での MCMV 感染細胞の同定を H-E 染色ならびに免疫組織学的に行った報告²³⁾があるに過ぎない。それによると MCMV は介在部導管細胞に特異的に感染し、円形細胞浸潤は持続感染期に移行する段階で giant cell 周囲に軽度認めら

れるのみで、感染後9週では giant cell や円形細胞浸潤は認められず、正常組織に回復していることを報告している。本実験では古内の実験よりも長期飼育し、MCMV 持続感染、潜伏感染の影響を組織学的に観察した。

ヒトの唾液腺組織では、加齢により腺房の萎縮、消失、脂肪組織の増生、導管周囲のリンパ球浸潤や線維化などの変化が生じること⁵⁸⁻⁶²⁾が知られている。また自己免疫非自然発症マウスにおいても、長期飼育する場合加齢により種々の自己抗体や自己免疫的な組織変化が生じる^{48,49)}ことが報告されている。したがって、唾液腺病理組織変化について考察する場合、ANA, ASDA の場合と同様に、MCMV 感染のほかに加齢を考慮する必要がある。

マウスの実験的自己免疫性唾液腺炎には大きく分類して、自己免疫自然発症、各種抗原で刺激し作成したもの、自己免疫非自然発症ではあるが加齢変化として自己免疫性唾液腺炎を生じるものがある。自己免疫自然発症マウスには NZB, NZB/NZW, SL/Ni, MR/1 などがあり、本実験で得られた感染群の顎下腺病理組織変化はおおむねこれらの実験結果と一致していた。すなわち、導管周囲のリンパ球様細胞浸潤、導管の肥厚、拡大、腺房細胞の萎縮、筋上皮島の形成である。ただし、SL/Ni には筋上皮島の形成を伴うような重度の細胞浸潤は認められないこと、種々の抗原刺激で作成した実験的自己免疫性唾液腺炎や NZB, NZB/NZW では広範囲にわたるリンパ球様細胞浸潤や腺実質の破壊がみられることなど、組織変化の grade には差が認められた。本実験の感染群では、focus が多数認められた個体でも、腺房細胞の萎縮は NZB, NZB/NZW ほど著明ではなく、線維化も軽度で、ヒト SjS の進行例にみられるような著明な腺組織の破壊や線維組織への置換は認められず、同じ自己免疫性唾液腺炎でも組織変化には系統間に大きな差があることが判明した。加齢による顎下腺組織変化については BDF1 での研究報告がある。それによると、自己免疫性唾液腺炎は雄よりも雌によく発生し、6, 12月齢では20%の個体に、18月齢以上では約80%の個体に単核細胞数が20個以上の focus が1腺体当たり

6個以上認められたと報告している⁴⁹⁾。本実験での対照群では浸潤細胞数が20個以上の focus が1腺体当たり6個以上認められた個体は44週齢で20%, 64週齢で25%であり、focus 以外の組織変化についても BDF1 と比べて病理組織変化の grade は低く、BALB/c は BDF1 よりも加齢による組織変化が少ないことがわかった。また、BALB/c 雌を用いて、胸腺摘出後同種の顎下腺で刺激した実験では、16週齢では20%に、24週齢では10%の個体に、単核細胞数が20個以上の focus が1腺体当たり6個以上認められたが、特に目立った組織の破壊はなかったとの報告がある⁴⁷⁾。これらのことから、加齢による組織変化または抗原刺激に対する感受性には遺伝的な差があり、BALB/c は自己免疫非自然発症マウスの中でも加齢による変化または抗原刺激に対する感受性は低いと考えられる。しかし、すでに述べたように BALB/c は H-2^d で MCMV に感受性の高い系統とされていることから、本実験で得られた病理組織変化は MCMV 感染の影響と関連があると思われる。すなわち、MCMV は唾液腺組織では介在部導管細胞に特異的に感染し、同部で持続感染、潜伏感染へ移行し、さらに同部で再活性化する²³⁾ことや、本実験で focus が唾液腺導管周囲に認められたことから、MCMV の増殖過程でエンベロープの糖蛋白合成にあたり導管細胞の生体成分が変化し、新たな抗原性が発現し、細胞浸潤が生じた可能性が考えられる。

臓器特異的抗体である ASDA と唾液腺病理組織変化との関係については、ヒトでは ASDA は局所病変の進行に関連するといわれている^{63,64)}。丸茂は、唾液腺病理組織変化の grade が進むにつれて ASDA 陽性率が高くなる傾向を示したが、唾液腺破壊が進行した症例では ASDA 陰性のものもあったと報告している⁶⁴⁾。マウスでは Haya-shi らが自己免疫非自然発症マウスである BDF1 について、ヒト SjS と同様に、ASDA と病理組織変化との間には相関関係があり、ASDA 陽性マウスの65%が grade 2以上の病理組織変化であったと報告している⁴⁹⁾。本実験では ASDA 陽性マウス(12匹)の平均 focus 数は2.4個であったのに対し、ASDA 陰性マウス(32匹)の平均

focus 数は1.7個であったが、focus が認められた24週齢以降に限定すると、ASDA 陽性マウスの平均 focus 数は2.4個、ASDA 陰性マウスの平均 focus 数は2.3個で、ASDA と病理組織変化との間に明確な関係は得られなかった。ただし、focus の数や大きさ、focus 以外の組織変化が著明なマウスでは ANA, ASDA 両者とも陽性であるものが多かった。今後、ANA, ASDA の抗体価と組織変化についてのさらなる検討が必要だと思われる。

以上の結果から、BALB/c では MCMV 持続感染、潜伏感染により、ANA, ASDA 産生、唾液腺導管周囲の focus の形成など SjS 類似の変化が生じることが判明し、MCMV 感染は SjS 発症に関与していることが示唆された。

結 論

シェーグレン症候群 (SjS) は原因不明の自己免疫疾患であるが、発症に関与する環境因子の1つとして、サイトメガロウイルス (CMV) 感染説があげられている。そこで、マウスサイトメガロウイルス (MCMV) を4週齢雌 BALB/c マウスに i.p. 感染させ最長64週齢飼育し、血清中の自己抗体、唾液腺病理組織変化について検索したところ、以下のような結論を得た。

1. 感染群における抗核抗体 (ANA) の出現率は、急性感染期である8週齢では0%, 持続感染期である20, 24, 28週齢ではおのの0, 33, 33%, 潜伏感染期である34, 44, 50, 64週齢ではおのの60, 57, 60, 67%であった。それに対し対照群では24週齢では0%, 44週齢では20%, 64週齢では40%であった。

2. 感染群における抗唾液腺管抗体 (ASDA) の出現率は、急性感染期である8週齢では0%, 持続感染期である20, 24, 28週齢ではおのの0, 0, 33%, 潜伏感染期である34, 44, 50, 64週齢ではおのの40, 43, 40, 50%であった。それに対し対照群では24週齢では0%, 44週齢では20%, 64週齢では20%であった。

3. 感染群における唾液腺導管周囲の細胞数50個以上のリンパ球様細胞浸潤 (focus) は8, 20週齢では出現せず、持続感染期の24週齢から認められ、28週齢以降ではすべての個体に認められた。対照群では24週齢では focus は認められず、44, 64週齢ではすべての個体に focus が認められた。感染群における1切片上の focus の最大数の平均は急性感染期である8週齢では0個、持続感染期である20, 24, 28週齢ではおのの0, 2.4, 1.7個、潜伏感染期である34, 44, 50, 64週齢ではおのの2.0, 2.1, 3.4, 2.5個であった。それに対し対照群では24週齢では0個、44週齢では1.2個、64週齢では1.3個であった。また focus の大きさは感染群の方が対照群に比較し大きかった。

4. Focus 以外の組織変化としては、持続感染期では導管の拡張、顆粒管上皮の膨化、導管上皮の反応性増殖などが認められ、潜伏感染期ではそれらに加えて筋上皮島の形成、腺房細胞の萎縮、腺組織全体の瀰漫性の細胞浸潤などの変化が認められた。対照群では感染群ほど明らかな組織変化は認められなかった。

以上の結果から、BALB/c マウスでは MCMV の持続感染、潜伏感染により、ANA, ASDA 産生、唾液腺導管周囲の focus の形成など SjS 類似の変化が生じることが判明し、MCMV 感染は SjS 発症に関与していることが示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり、終始ご懇切なるご指導、ご校閲を賜りました本学歯学部口腔診断・放射線学講座三條大助教授、丸茂町子講師ならびに口腔細菌学講座熊谷勝男教授、清水義信助教授に深甚なる謝意を表します。

また終始ご援助、ご協力いただきました口腔診断・放射線学講座ならびに口腔細菌学講座教室員各位に心から感謝いたします。

本論文の要旨は第41回日本口腔科学会総会 (1987年4月5日)、第31回歯科基礎医学会総会 (1989年9月2日)、第38回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会 (1990年11月29, 30日) において発表した。

本研究の一部は平成2年度文部省科学研究費補助金 (課題番号：02771244) により行った。

抄録：唾液腺ウイルスといわれるマウスサイトメガロウイルス (MCMV) を $2 \times 10^{5.0}$ PFU, 4 週齢雌 BALB/c マウスに i.p. 感染させ、血清中の抗核抗体 (ANA), 抗唾液腺管抗体 (ASDA) 産生、唾液腺導管周囲のリンパ球様細胞浸潤 (focus) について経日的に観察し、CMV 感染と Sjögren's syndrome (SjS) との関連について検討した。

ANA は持続感染期である 24 週齢から出現し、潜伏感染期である 34 週齢以降では出現率は約 60% であった。ASDA は 28 週齢から出現し、潜伏感染期である 34 週齢以降では出現率は約 40% であった。唾液腺については 24 週齢から浸潤細胞数 50 個以上の focus が認められ、28 週齢以降はすべての個体に認められた。Focus の数、大きさは加齢により増加傾向を示した。導管上皮の反応性増殖、導管の拡張、顆粒管上皮の膨化、筋上皮島の形成、focus に隣接する腺房細胞の萎縮、腺組織全体の瀰漫性の細胞浸潤等が観察された。以上から MCMV 持続感染、潜伏感染は SjS 類似の変化を惹起することが判明した。

文 献

- 1) 森川 茂, 原田孝之: ヒト自己免疫疾患とウイルス. 臨床免疫 15 : 761-777, 1983.
- 2) Burns, J.C. : Persistent cytomegalovirus infection—The etiology of Sjögren's syndrome. Med. Hypotheses 10 : 451-460, 1983.
- 3) Whittingham, S., McNeilage, J. and Mackay, I.R. : Primary Sjögren's syndrome after infectious mononucleosis. Ann. Intern. Med. 102 : 490-493, 1985.
- 4) 原田孝之, 長崎真琴: 自己免疫疾患と EB ウイルス. 最新医学 41 : 2097-2105, 1986.
- 5) 宮坂信之, 山岡國士, 佐藤和人, 西岡久寿樹: シェーグレン症候群—免疫異常と治療. 最新医学 41 : 2076-2081, 1986.
- 6) Little, J.W. : Sjögren's syndrome : Clinical and laboratory features, immunopathogenesis, and management. Oral Surg. 62 : 510-523, 1986.
- 7) 山岡國士, 宮坂信之, 佐藤和人, 西岡久寿樹, 奥田正治, 山本興太郎: Sjögren 症候群 (SjS) における Epstein-Barr ウイルス (EBV) の関与—SjS における EBV 関連血清抗体価, 口腔内 EBV 排出及び末梢血由来自律増殖 B 細胞株の EBV 産生に関する検討—日本臨床免疫学会誌 10 : 254-260, 1987.
- 8) 宮坂信之: Sjögren 症候群. Medical Immunology 15 : 221-226, 1988.
- 9) Scully, C. : Viruses and salivary gland disease : Are there associations? Oral Surg. 66 : 179-183, 1988.
- 10) Yamaoka, K., Miyasaka, N. and Yamamoto, K. : Possible involvement of Epstein-Barr virus in polyclonal B cell activation in Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum. 31 : 1014-1021, 1988.
- 11) Keinänen, R., Kontinen, Y.T., Kontinen, M.S., Kempainen, P., Kulomaa, M., Tuominen, S., Grönblad, M. and Malmström, M. : Contemplation of virally induced changes in salivary glands in Sjögren's syndrome : on the use of *in situ* hybridization in such studies. J. Autoimmunity 2 : 569-578, 1989.
- 12) Saito, I., Servenius, B., Compton, T. and Fox, R.I. : Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjögren's syndrome. J. Exp. Med. 169 : 2191-2198, 1989.
- 13) Schuurman, H.J., Schemmann, M.H.G., Weger, R.A., Aanstoot, H. and Hene, R. : Epstein-Barr virus in the sublabial salivary gland in Sjögren's syndrome. Am. J. Clin. Pathol. 91 : 461-463, 1989.
- 14) Venables, P.J.W., Teo, C.G., Baboonian, C., Griffin, B.E., Hughes, R.A. and Maini, R.N. : Persistence of Epstein-Barr virus in salivary gland biopsies from healthy individuals and patients with Sjögren's syndrome. Clin. exp. Immunol. 75 : 359-364, 1989.
- 15) 宮坂信之, 檜垣 恵, 山本興太郎, 立石睦人: Sjögren 症候群とウイルス. 内科 65 : 836-839, 1990.
- 16) Shillitoe, E.J., Daniels, T.E., Whitcher, J.P., Strand, C.V., Talal, N. and Greenspan, J.S. : Antibody to cytomegalovirus in patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum. 25 : 260-265, 1982.
- 17) Venables, P.J.W., Ross, M.G.R., Charles, P.J., Melsom, R.D., Griffiths, P.D. and Maini, R.N. : A seroepidemiological study of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in rheumatoid arthritis and sicca syndrome. Ann. Rheum. Dis. 44 : 742-746, 1985.
- 18) 古内 寿, 大沢篤子, 阪本真弥, 丸茂町子, 三条大助, 清水義信: Sjögren 症候群の免疫学的検討 第 3 報 抗 cytomegalovirus 血清中和抗体価. 口科誌 38 : 82-87, 1989.
- 19) Scully, C. : Sjögren's syndrome : no demonstrable association by serology of secondary Sjögren's syndrome with cytomegalovirus. J. Oral Pathol. Med. 19 : 43-44, 1990.

- 20) 南嶋洋一: ヘルペスウイルス c) サイトメガロウイルス. 免疫薬理 **6**: 173-176, 1988.
- 21) 南嶋洋一: サイトメガロウイルスの感染. 最新医学 **44**: 68-72, 1989.
- 22) 森 良一, 皆川洋子: ヘルペス科のウイルスに対する感染防御機構. 最新医学 **44**: 83-87, 1989.
- 23) 古内 寿: 唾液腺におけるマウスサイトメガロウイルスの潜伏感染に関する研究. 歯基礎誌 **28**: 620-632, 1986.
- 24) 宮脇昌二, 大藤 真, 小豆沢秀夫, 景山ケイコ: 抗唾液腺管抗体に関する基礎的検討. 厚生省特定疾患シェーグレン病調査研究班昭和52年度研究業績: 219-228, 1978.
- 25) 厚生省シェーグレン病調査研究班: 厚生省シェーグレン病診断基準. 厚生省特定疾患シェーグレン病調査研究班昭和52年度研究業績: 6, 1978.
- 26) 宍戸 亮, 鶴留雅人, 速水正憲, 茅野文利: ムンプスウイルス接種サルにおける自己免疫反応. 厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班昭和56年度研究業績: 131-138, 1982.
- 27) Hayashi, Y., Yura, Y., Yoshida, H., Yanagawa, T. and Sato, M.: Development of allergic sialadenitis in mice immunized with mumps virus-infected submandibular salivary gland. *Am. J. Pathol.* **123**: 271-279, 1986.
- 28) Kessler, H.S.: A laboratory model for Sjögren's syndrome. *Am. J. Pathol.* **52**: 671-685, 1968.
- 29) 金久純也: New Zealand Black マウスの唾液腺炎・涙腺炎に関する免疫病理学的研究 第1報 Sjögren 症候群自然発症モデル New Zealand Black マウスの検討. 歯基礎誌 **26**: 152-162, 1984.
- 30) Greenspan, J.S., Gutman, G.A., Weissman, I.L. and Talal, N.: Thymus-antigen-and immunoglobulin-positive lymphocytes in tissue infiltrates of NZB/NZW mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **3**: 16-31, 1974.
- 31) Keyes, G.G., Vickers, R.A. and Kersey, J.H.: Immunopathology of Sjögren-like disease in NZB/NZW mice. *J. Oral Pathol.* **6**: 288-295, 1977.
- 32) Kanehisa, J., Shi-Feng, Y., Hori, Y. and Takeuchi, H.: Spontaneous sialoadenitis and dacryoadenitis in MRL/l mice. A model for human Sjögren's syndrome. *Jpn. J. Oral Biol.* **26**: 1339-1343, 1984.
- 33) Jonsson, R., Tarkowski, A., Bäckman, K., Holmdahl, R. and Klareskog, L.: Sialadenitis in the MRL-l mouse: morphological and immunohistochemical characterization of resident and infiltrating cells. *Immunol.* **60**: 611-616, 1987.
- 34) Watanabe, Y., Miyamoto, H., Yamaoka, T., Kondo, I. and Hisada, T.: Immunohistochemical characterization of the oral lesions in MRL/l mouse (autoimmunity and lymphoproliferation). *Jpn. J. Oral Biol.* **29**: 770-773, 1987.
- 35) 武田泰典, 鈴木鍾美, 小守 昭, 石川梧朗: SL/Ni mice における唾液腺の病理組織学的検討. 歯基礎誌 **23**: 427-438, 1981.
- 36) Takeda, Y. and Ishikawa, G.: Experimental autoallergic sialadenitis in mice. Histopathological and ultrastructural studies. *Virchows Arch. [Pathol. Anat.]* **400**: 143-154, 1983.
- 37) Miyagawa, J., Hanafusa, T., Miyazaki, A., Yamada, K., Fujino-Kurihara, H., Nakajima, H., Kono, N., Nonaka, K., Tochino, Y. and Tarui, S.: Ultrastructural and immunocytochemical aspects of lymphocytic submandibulitis in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]* **51**: 215-225, 1986.
- 38) 浜田和家: ウサギにおける Sjögren 症候群様病変の作成に関する実験的研究. 口病誌 **41**: 77-90, 1974.
- 39) Sela, J., Dishon, T., Rosenmann, E., Ulfmanský, M. and Boss, J.H.: Experimental allergic sialoadenitis. *J. Oral Pathol.* **2**: 7-15, 1973.
- 40) White, S.C.: Experimental autoallergic parotitis. *J. Oral Pathol.* **2**: 341-343, 1973.
- 41) White, S.C. and Casarett, G.W.: Induction of experimental autoallergic sialadenitis. *J. Immunol.* **112**: 178-185, 1974.
- 42) Boss, J.H., Rosenmann, E. and Sela, J.: Experimental allergic sialoadenitis. X. Chronic destructive parotitis induced in immunized rats by daily intraductal challenges with antigen. *J. Oral Pathol.* **6**: 96-105, 1977.
- 43) 竹内 宏, 金久純也, 堀 泰典: 唾液腺の免疫病理学的研究, 第1報, 臓器非特異性抗原(DNA)に対するラット唾液腺の反応. 歯基礎誌 **23**: 451-463, 1981.
- 44) 佐島三重子, 竹下信義, 佐藤方信, 鈴木鍾美: ラット各種系統における実験的自己免疫性唾液腺炎の発症に関する病理学的研究. 歯基礎誌 **24**: 379-384, 1982.
- 45) Takeda, Y. and Ishikawa, G.: Animal model for Sjögren's syndrome—Experimental autoallergic sialadenitis in SL/Ni mice—. *Jpn. J. Oral Biol.* **24**: 756-758, 1982.
- 46) Hayashi, Y., Sato, M. and Hirokawa, K.: Induction of experimental allergic sialadenitis in mice. *Am. J. Pathol.* **118**: 476-483, 1985.
- 47) Hayashi, Y. and Hirokawa, K.: Immunopathology of experimental autoallergic sialadenitis in C3H/He mice. *Clin. exp. Immunol.* **75**: 471-476, 1989.

- 48) Hayashi, Y., Kurashima, C., Utsuyama, M. and Hirokawa, K. : An animal model of autoimmune sialadenitis in aged mice. *Pathol. Immunopathol. Res.* **8** : 118-124, 1989.
- 49) Hayashi, Y., Kurashima, C., Utsuyama, M. and Hirokawa, K. : Spontaneous development of autoimmune sialadenitis in aging BDF1 mice. *Am. J. Pathol.* **132** : 173-179, 1988.
- 50) Bertram, U. and Halberg, P. : A specific antibody against the epithelium of the salivary ducts in sera from patients with Sjögren's syndrome. *Acta Allergol.* **XIX** : 458-466, 1964.
- 51) Kantor, G.L., Goldberg, L.S., Johnson, B.L., Derechin, M.M. and Barnett, E.V. : Immunologic abnormalities induced by postperfusion cytomegalovirus infection. *Ann. Intern. Med.* **73** : 553-558, 1970.
- 52) Olding, L.B., Kingsbury, D.T. and Oldstone, M.B.A. : Pathogenesis of cytomegalovirus infection. Distribution of viral products, immune complexes and autoimmunity during latent murine infection. *J. gen. Virol.* **33** : 267-280, 1976.
- 53) Toniatti, G., Oldstone, M.B.A. and Dixon, F.J. : The effect of induced chronic viral infections on the immunologic diseases of New Zealand mice. *J. Exp. Med.* **132** : 89-109, 1970.
- 54) Bertram, U. : Xerostomia. *Acta. odont. Scand.* **25** (Suppl. 49) : 60-94, 1967.
- 55) 近藤信夫, 吉木 敬 : 自己免疫疾患とレトロウイルス. *最新医学* **41** : 2106-2112, 1986.
- 56) 立野正敏, 吉木 敬 : ウイルス感染による自己免疫現象の発症機構. *細胞工学* **8** : 958-965, 1989.
- 57) 阪本真弥 : ヒト唾液腺導管樹立細胞による Sjögren 症候群の血清学的診断—抗唾液腺管抗体と抗核抗体—. *口科誌* **38** : 172-186, 1989.
- 58) 久野 勇 : 加齢に伴う人顎下腺の病理組織学的観察. *久留米医学会誌* **39** : 411-430, 1976.
- 59) 小守 昭 : 唾液腺における加齢と病変. *歯界展望* **59** : 751-755, 1982.
- 60) Syrjänen, S. : Age-related changes in structure of labial minor salivary glands. *Age Ageing* **13** : 159-165, 1984.
- 61) Takeda, Y. and Komori, A. : Focal lymphocytic infiltration in the human labial salivary glands : a postmortem study. *J. Oral Pathol.* **15** : 83-86, 1986.
- 62) Kurashima, C. and Hirokawa, K. : Age-related increase of focal lymphocytic infiltration in the human submandibular glands. *J. Oral Pathol.* **15** : 172-178, 1986.
- 63) 東條 毅, 本間光夫 : シェーグレン症候群の免疫異常. *臨床免疫* **12** : 421-427, 1980.
- 64) 丸茂町子, 三条大助, 清水義信, 熊谷勝男 : Sjögren 症候群の免疫学的検討 第1報 抗唾液腺管抗体. *口科誌* **34** : 546-553, 1985.