

Fig. 17

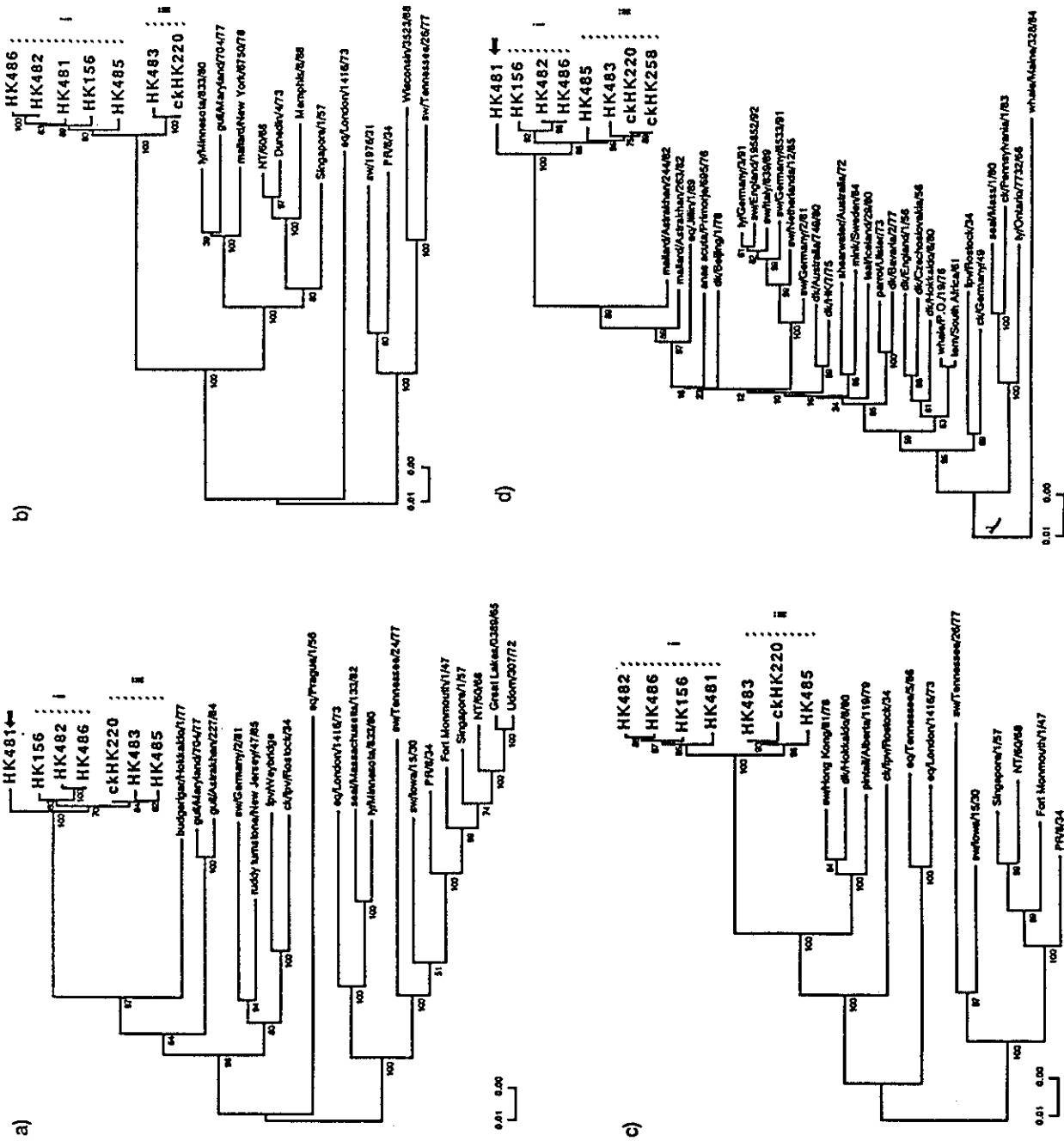


Fig. 1. For legend see facing page.

Fig. 18

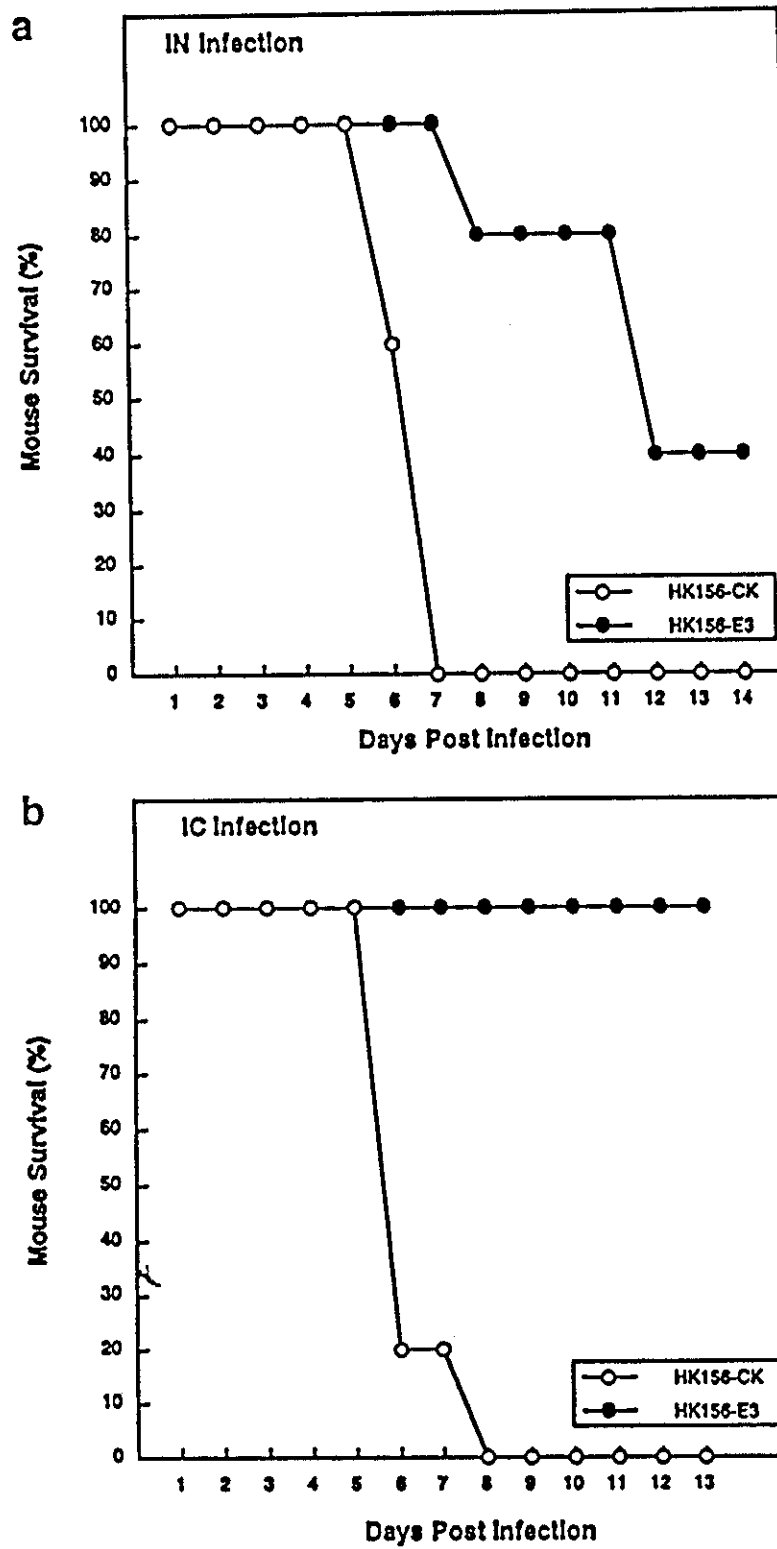


FIG. 1. Survival rates of ddY mice infected with HK156-CK or HK156-E3. Groups of five mice were infected i.n. with  $2 \times 10^8$  pfu (a) and i.c. with  $1 \times 10^8$  pfu (b).

Fig. 19

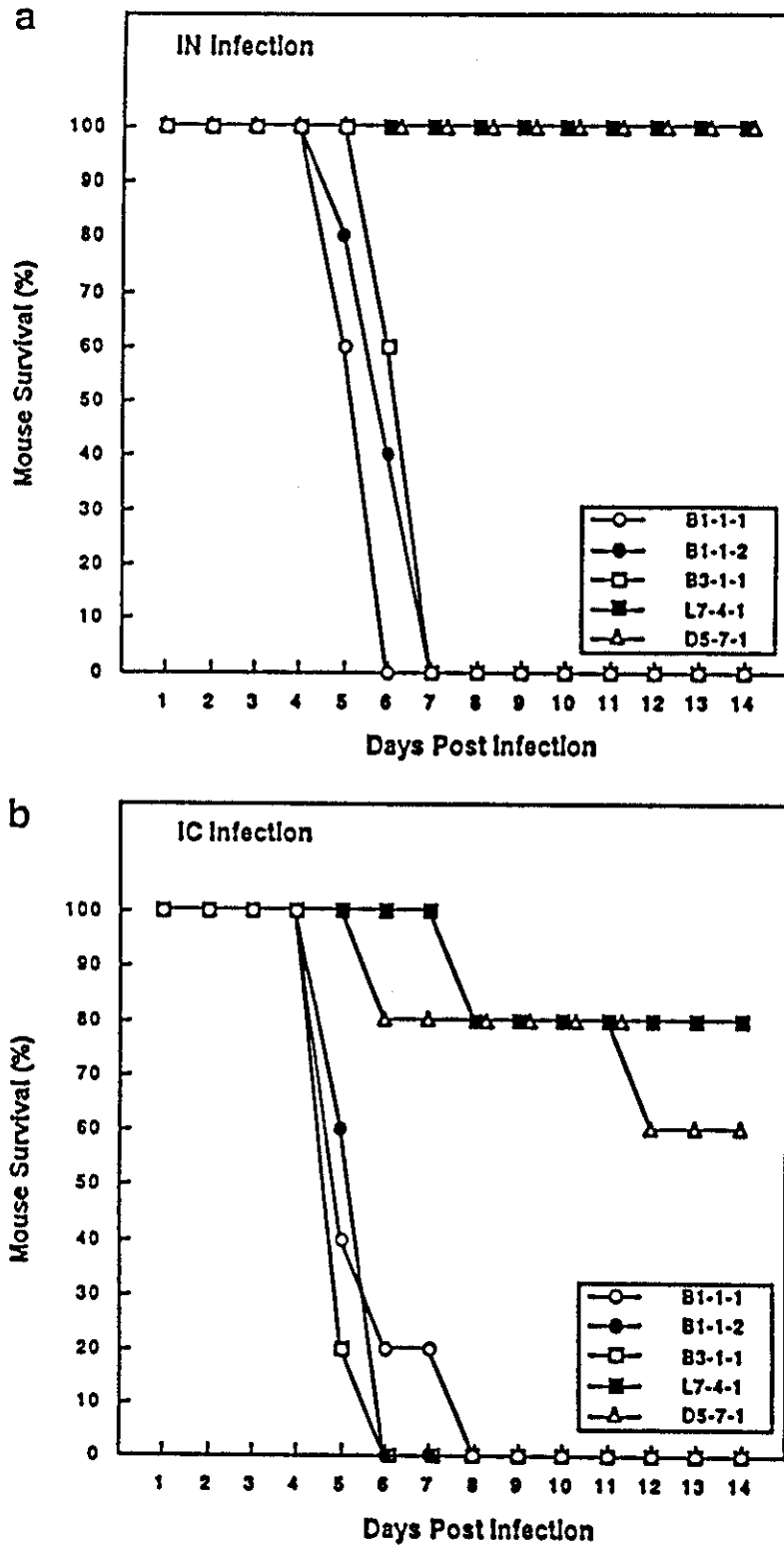


FIG. 2. Survival rates of ddY mice infected with HK156-CK mousse-brain clones and HK156-E3 cloned viruses. Groups of five mice were infected I.n. with  $10^5$  pfu (a) and I.c. with  $1 \times 10^6$  pfu (b).

Fig. 20

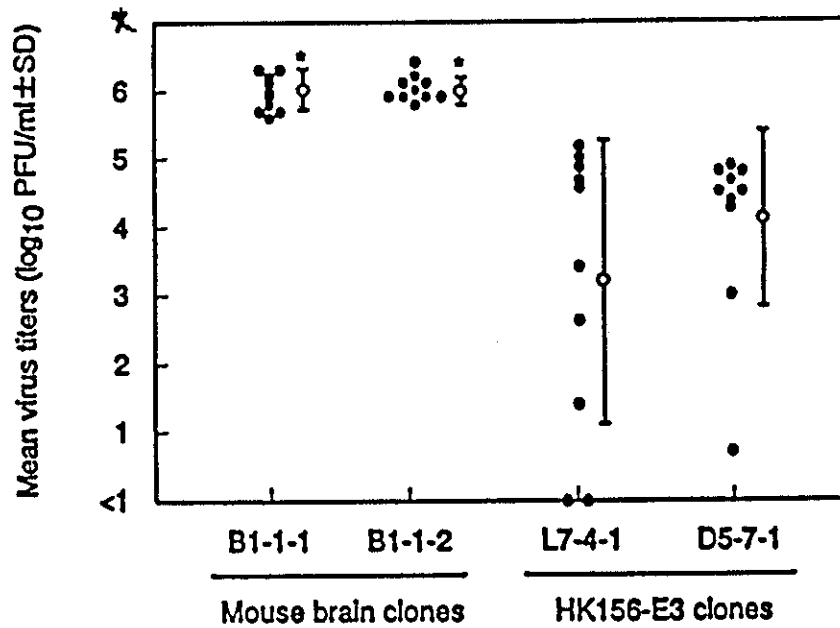
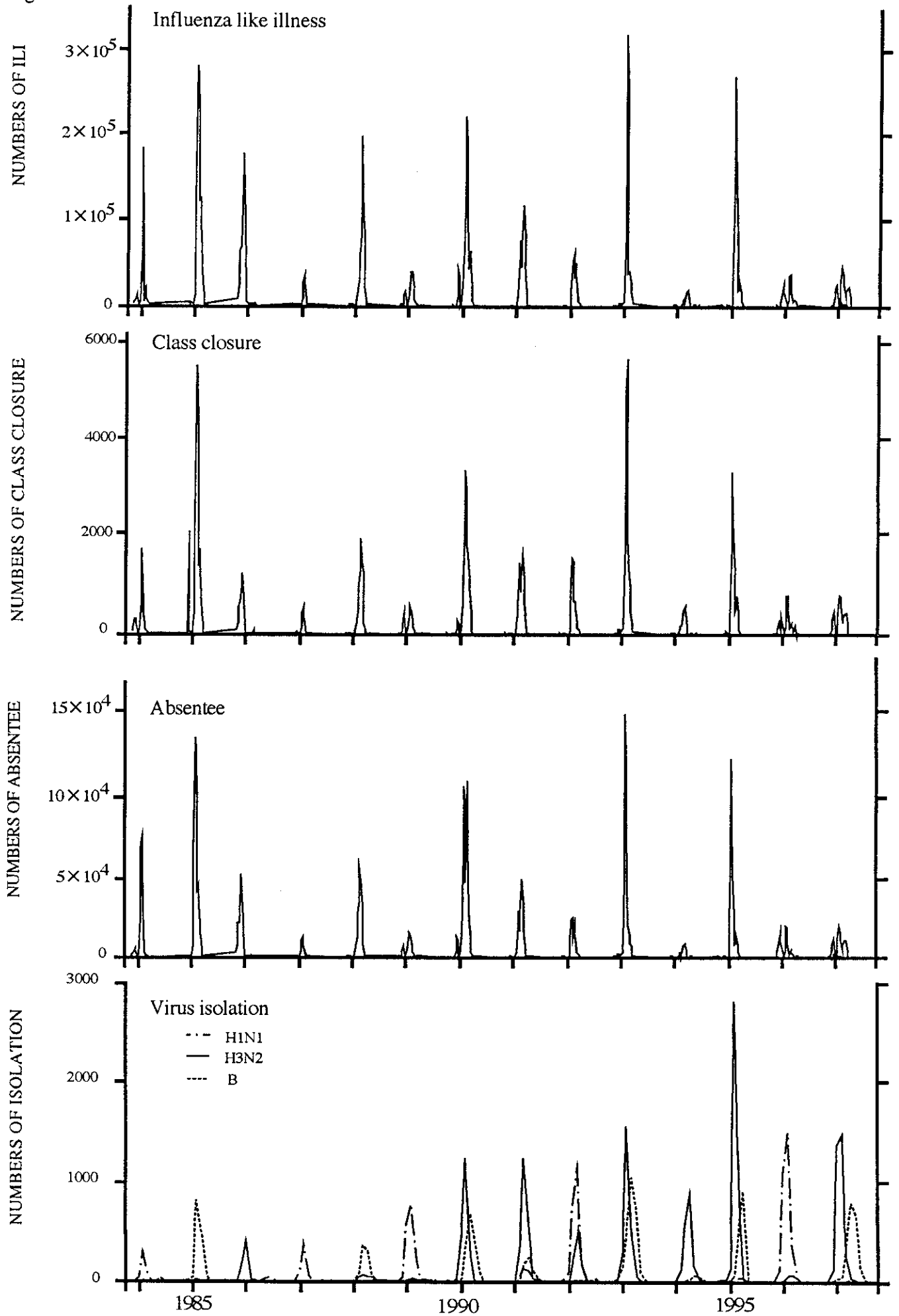


FIG. 3. Replication of HK156-CK mouse brain clones and HK156-E3 cloned viruses in mouse lung after Ln. infection on day 4 p.i. Mice were infected Ln. with  $2 \times 10^5$  pfu of each virus. To determine virus titers in lungs, 10 mice were sacrificed, and virus titers were determined by plaque assay on MDCK cells in the presence of trypsin. \*Differences of virus titers between mice infected with brain-derived clones and those infected with HK156-E3 clones (L7-4-1 or D5-5-1) were significant ( $P < 0.01$ ).

Fig. 21



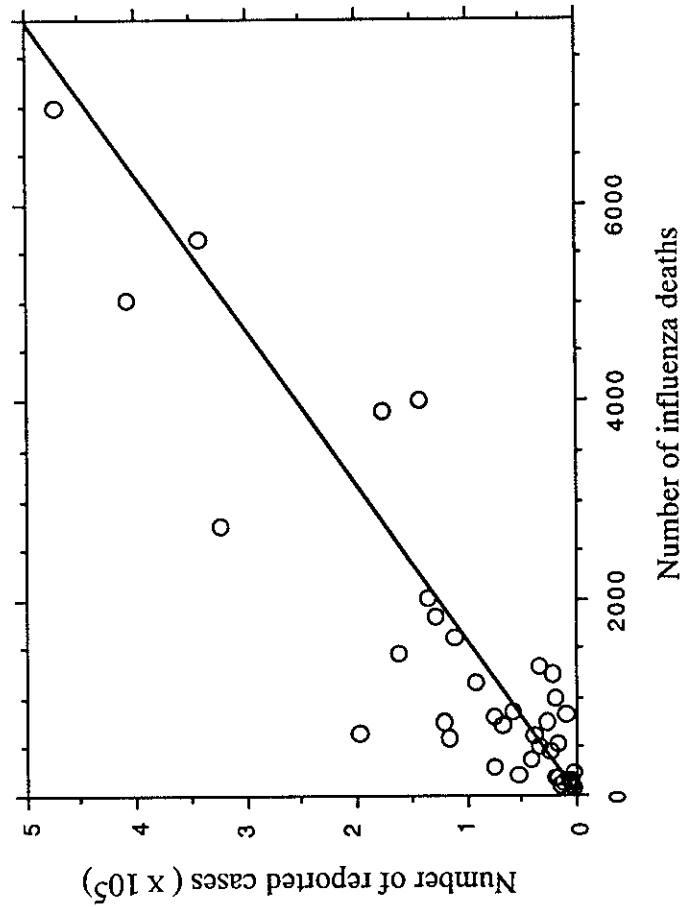


Fig. 22

Fig. 23

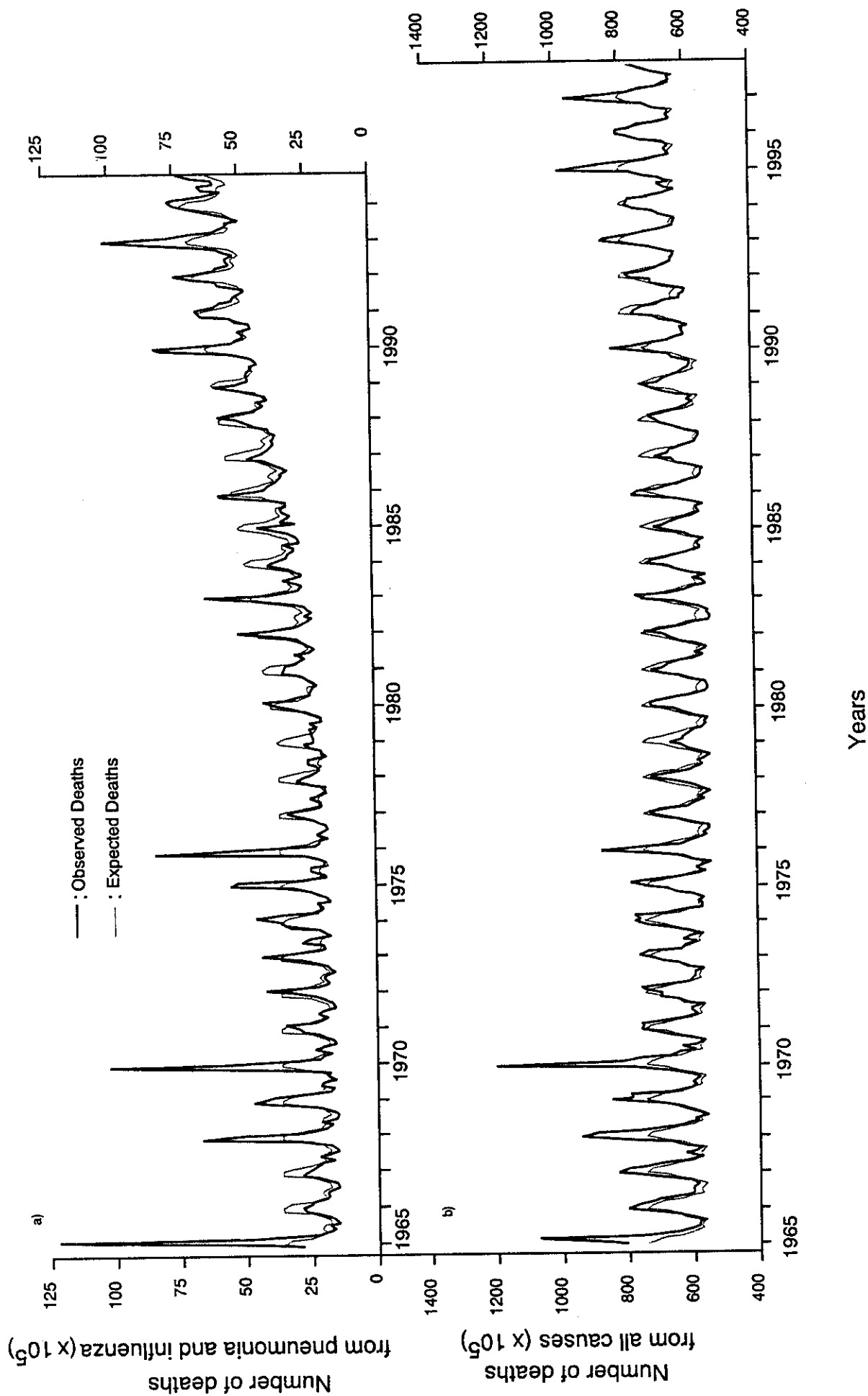
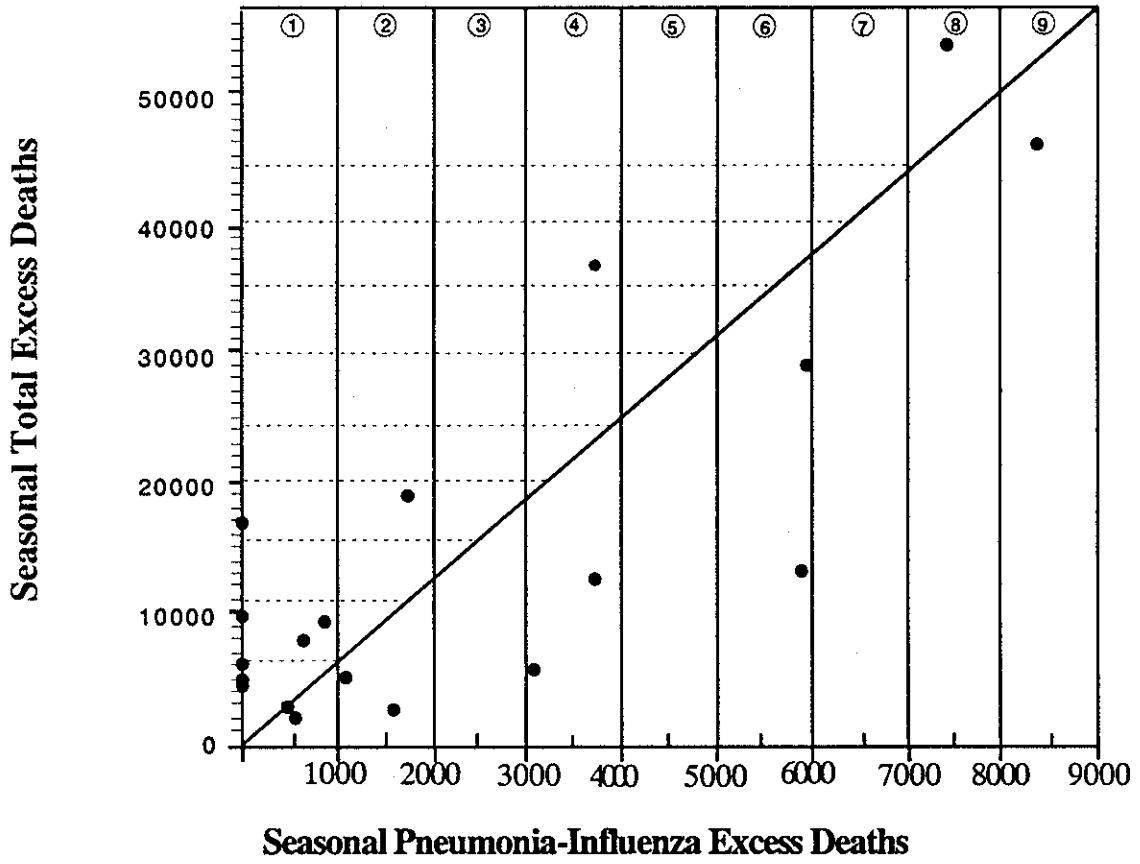


Fig. 24





厚生省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（総括・分担） 研究報告書

インフルエンザ脳炎・脳症に対する抗血清療法の有効性に関する基礎的研究

分担研究者 吉川 堯 北里大学獣医畜産学部教授



【研究要旨】

近年増加傾向にあるインフルエンザ脳炎・脳症の予防に関する基礎的資料を得るため、マウスを用いて A 型インフルエンザウイルス（H7N3）脳馴化株の感染実験と抗血清投与を行い、その効果について病理学的に検討した。

病理学的に経鼻的にウイルスが接種されたマウスでは重度のウイルス性脳炎（非化膿性髄膜脳炎 nonpurulent meningoencephalitis）および間質性肺炎（interstitial pneumonia）が誘起されたが、早期の血清療法では脳炎および肺炎病態は著しく軽減された。本実験結果から、血清療法はインフルエンザ脳炎・脳症の発症予防に期待出来る可能性が考察された。

## インフルエンザ脳炎に対する抗血清療法の有効性

吉川堯，関一洋，村中雅則，植木秀彰

北里大学獣医病理学教室

近年増加傾向にあるインフルエンザ脳炎の治療についての知見を得るため，A型インフルエンザウイルスを用いたマウスモデルでの感染実験と抗血清を用いた治療試験が実施された．病理組織学的に経鼻的にウイルスが接種されたマウスでは重度の脳炎，肺炎が誘起されたが，早期の血清治療群では脳病変，肺病変の形成は見られず，血清療法の有効性が期待された．

### 研究材料ならびに方法

#### ウイルス

A型インフルエンザウイルス A/Turkey/England/1/63 (H7N3) 株を10-11日齢の発育鶏卵で増殖させ，その後のddYマウスへの経鼻感染を経て，脳乳剤を繰り返しマウスに継代することによって脳炎型のウイルス (T-Eng63Br) が作製され，感染実験に使用された．

#### 抗血清

脳に馴化していないT-Eng63の原株を発育鶏卵に接種，培養後，漿尿液が回収された．遠心された漿尿液の沈渣からスクロース密度勾配法によりウイルス分画が取り出され，0.05%ホルムアルデヒドによって不活化された．この方法により得られたワクチンはddYマ

ウスの腹腔内に2回免疫，初回免疫の4週後に全採血，さらに血清分離され，抗血清として治療に用いられた。

#### 実験デザイン

50PFU量のT-Eng63Brがマウスに経鼻的に接種され，その後，抗血清が尾静脈より投与された．全31例のマウスは抗血清投与日により8群に分類され，4日後，14日後，36日後に検索された．ウイルス接種当日に抗血清が投与された群をB群とし，4日後，14日後に各2例ずつ，36日後に1例検索された．同様にウイルス接種1日後抗血清投与群をC群，2日後をD群，3日後をE群，ウイルス接種当日4回連続抗血清投与群をF群，陽性対照群をG群，抗血清単独投与群をH群，陰性対照群をA群とした（表1）．

#### 病理組織学ならびに免疫組織化学

全身諸臓器は10%中性緩衝ホルマリン液で固定され，常法に従ってパラフィン包埋された．厚さ6 $\mu$ mに薄切されたパラフィン包埋標本にはヘマトキシリン・エオジン重染色（HE染色）が施された．

ウイルス抗原検出の目的で，一次抗体にポリクローナル抗influenza A/ Turkey/England1/63 (H7N3)（国立感染症研究所，1,000倍希釈）を用いたstreptavidin-biotin complex method (sABC法)が実施された．

#### 研究成績

陰性対照群（A群）に病的変化は観察されなかった．

#### ウイルス接種当日抗血清投与（B群）

4日後の検索で気管支病変が指摘された。気管支粘膜上皮細胞は分泌亢進を示し、時に粘膜が壊死・剥離し、壊死性の好中球が付着する気管支も認められた（写真1）。14日後には気管支の周辺にリンパ球と形質細胞が浸潤し、一部で粘膜上皮の再生性変化と粘膜直下における線維芽細胞の増生が観察された（写真2, 3）。36日後の肺組織には著明な変化は見られず、小さな気管支付属リンパ装置（BALT）の形成と気管支粘膜の分泌亢進のみが観察された。

中枢神経系ならびにその他実質臓器には変化は見られず、また全ての検索組織においてウイルス抗原は検出されなかった。

#### ウイルス接種1日後抗血清投与（C群）

4日後の肺組織において気管支粘膜の壊死・剥離が観察された。気管支腔内には壊死性の好中球が堆積し、気管支周辺にはリンパ球と形質細胞の浸潤が見られた（写真4）。炎症細胞は気管支周辺にとどまらず、近隣の肺胞間質へと波及していた（写真5）。粘膜上皮細胞の再生が4日後の検索から観察されたが、14日後にはより明らかとなり、固有層における線維芽細胞の増生を伴い、器質化様の病態を呈していた（写真6, 7）。14日後の炎症細胞の浸潤は気管支周辺にのみ観察された。36日後には炎症反応は見られず、BALTの形成と軽度なI型肺胞上皮細胞の増生が見られるのみであった。

肺を含む全ての臓器にウイルス抗原陽性反応は見られず、また肺以外の臓器に異常所見は得られなかった。

#### ウイルス接種2日後抗血清投与（D群）

4日後の肺において，気管支粘膜の壊死・剥離，ならびにこれら気管支の粘膜上皮細胞にウイルス抗原陽性反応が観察された．腔内には好中球が堆積し，気管支周辺性にリンパ球が浸潤していた（写真8）．中枢神経系では，延髄疑核領域を中心としてグリア細胞は崩壊し（写真9，10），これら傷害グリア細胞の細胞質内にウイルス抗原陽性反応が認められた（写真11）．

14日後の気管支の退行性変化は軽微で，むしろ粘膜上皮細胞は再生，分泌亢進を示し，固有層における線維芽細胞の増生が指摘された（写真12）．延髄疑核領域にはミクログリアをはじめとするグリア細胞が増数し，これらの核の濃縮壊死像が頻繁に捉えられた（写真13）．浸潤グリア細胞の核内・細胞質内にウイルス抗原が検出されたが，その数はわずかであった（写真14）．肺においてはウイルス抗原は検出されなかった．

36日後の検索からは，延髄疑核領域に壊死したグリア細胞は観察されなかったほか，肺を含む全身諸臓器に大きな変化は見られず，またウイルス抗原も検出されなかった．

#### ウイルス接種3日後抗血清投与（E群）

本群の検索はウイルス接種後4日後に行われた．

肺においてB，C，D群と同様な気管支粘膜の壊死・剥離と気管支周辺性のリンパ球浸潤が見られたが（写真15），炎症は肺胞間質へび漫性に波及し，強い間質性肺炎像を示す部位も認められた（写真16）．ウイルス抗原は傷害気管支粘膜上皮細胞，気管支腔内の剥離上皮細胞ならびに炎症細胞だけでなく，肺炎巣に散在するⅡ型肺胞

上皮細胞の核内・細胞質内からも検出された。

延髄にはグリア細胞の増数とこれら核の濃縮壊死，リンパ球性の囲管性細胞浸潤，神経細胞の崩壊より成る病変が疑核領域を主体として巣状に形成されていた（写真17）。病巣内のグリア細胞核内・細胞質内ならびに神経細胞核内にウイルス抗原陽性反応が認められた（写真18）。間脳の第三脳室近位部に萎縮したグリア細胞の集簇巣が認められ（写真19），同部のグリア細胞はウイルス抗原陽性であった（写真20）。また所々に髄膜炎病巣が観察された（写真21）。

その他検索臓器には大きな変化は見られず，またウイルス抗原も検出されなかった。

ウイルス接種当日4回連続抗血清投与（F群）

4日後と14日後の検索で，気管支粘膜の分泌亢進と固有層における線維芽細胞の増数および気管支周辺性リンパ球浸潤が見られたが（写真22），全身諸臓器に顕著な変化はなく，軽度の髄膜炎が間脳に見られたのみであった（写真23）。

36日後には肺に小型のBALTの形成が見られるのみであった。

Influenza A/Turkey/England (H7N3)接種4日後の変化（G群）

肺内気管支粘膜は壊死・脱落し，腔内に化膿性の崩壊物が堆積していた（写真24）。これら気管支の周辺にはリンパ球と形質細胞の浸潤が見られた。同様の炎症細胞の浸潤とⅡ型肺胞上皮細胞の増生によって肺胞壁は肥厚し，ほぼ肺全域に間質性肺炎病巣が形成されていた（写真25）。粘膜の壊死と化膿が見られない気管支においては分泌亢進が指摘された。免疫染色によって，傷害気管支の粘膜上

皮細胞ならびに粘膜に付着する炎症細胞にウイルス抗原が検出され、また肥厚した肺胞壁においても陽性を示すⅡ型肺胞上皮細胞が散在性に確認された。

脳においては延髄疑核領域に囲管性細胞浸潤とグリア細胞の増数が見られた。これらグリア細胞の核は濃縮・崩壊し、好塩基性の大小不同性微小顆粒として観察された（写真26）。免疫染色により、浸潤グリア細胞の核内・細胞質内にウイルス抗原が証明され、さらに陽性反応は神経細胞の核内・細胞質内・突起内においても確認された（写真27）。また延髄中心管上衣は一様に褐色に染色され、第四脳室、第三脳室および側脳室を内張りする上衣層も同様の染色態度を示した。間脳から延髄にかけて髄膜へのリンパ球浸潤が認められた（写真28）。

肝臓、脾臓、腎臓、心臓に病理学的変化ならびにウイルス抗原陽性反応は観察されず、中枢神経系では延髄疑核領域と脳室上衣以外に陽性反応は見られなかった。

抗血清単独投与群（H群）に病的変化は観察されなかった。

## 考察

### 1. 抗血清の有効性

ウイルス抗原陽性反応はウイルス接種2日後抗血清投与群（D群）にはじめて観察された。ウイルス接種当日（B群）および1日後抗血清投与群（C群）にはウイルス抗原は検出されなかった。両群とも

にウイルス接種4日後の気管支は傷害されていたものの、ウイルス抗原は検出されず、しかも気管支はウイルス接種14日後には再生し、36日後になるとほぼ完全に治癒していた。よって50PFUのウイルスが経鼻的に感染しても次の日に抗血清を投与すればほとんど無症候性に経過し、治癒するものと思われる。またウイルス接種当日4回連続抗血清投与群（F群）では、4日後の検索ですでに再生性変化が発現しており、気管支粘膜上皮の壊死は観察されなかったことから、抗血清は1回投与に比べ4回連続投与の方が効果的であると考えられる。

D群の4日後検索で気管支病変および延髄病変が観察され、かつ両者からウイルス抗原が検出された。気管支病変は14日後に傷害から回復へと向かっており、ウイルス抗原も陰性であった。延髄病変は4日後と14日後の検索で明らかな相違は見られなかったが、ウイルス抗原陽性反応は経日的に明らかに減少し、36日後にはウイルス抗原および病変は消退していた。これらのことからウイルス感染2日後に抗血清を投与すれば、何らかの症状を発現するものの、やがて治癒に向かうことが予想される。

ウイルス接種3日後抗血清投与群（E群）における肺病変および中枢神経病変はG群に比べてやや穏やかではあるが、間質性肺炎像や延髄疑核領域の非化膿性脳炎像はほぼ共通していた。検索は4日後にのみ行ったが、肺病変は重篤かつ広範で、延髄では、再生しないとされている神経細胞までもが傷害されていたことから、4日後以降経日的に病状が回復する可能性は極めて低いと推測される。

以上のことからウイルスの病原性を抑制する限界は感染2日後以内が望ましく、さらには連続投与がより効果的であるといえる。



## 2. 病変の進行と抑制

経尾静脈的に投与された抗血清はホルマリン不活化ウイルスをマウスに免疫して得られたものであるため、その効果は血中のウイルスを捕捉し、中和することで発現されていると考えられる。抗血清は生体内で細胞に侵入できないので、抗血清投与以前に細胞内に侵入、増殖したウイルスは中和されず、免疫染色で陽性を示すはずである。また抗血清の効果は含まれる抗体の量に依存し、投与量を越えるウイルスが血中に存在すれば、これらは中和されない。100PFU量のインフルエンザウイルスが経鼻的に接種されたマウスにおいて、接種1日後の肺組織から $10^7$ PFUものウイルスが検出された報告[2]もあり、時間の経過に伴い、中和されなかったウイルスの増殖による免疫染色陽性反応が増大していくことが容易に想像される。しかしながら、陽性反応は肺では気管支上皮、中枢神経系では延髄疑核領域にほぼ限定し、遠隔への陽性反応増大傾向がそれほど指摘されなかったことから、使用された抗血清は少なくとも接種2日以内に投与された場合、血中のウイルスを効果的に捕捉すると考えられる。

肺病変；

B群では気管支粘膜の壊死と剥離が見られ、C群では気管支周囲にリンパ球が浸潤し、D群で炎症は肺間質へ波及し始め、E群では間質性肺炎へと進展していた。抗血清が投与されなかったならばウイルス接種4日後にはG群のような肺全域性の間質性肺炎へと進行する

と思われるが、接種当日（B群）、1日後（C群）、2日後（D群）、3日後（E群）それぞれに抗血清が投与、すなわち血中のウイルスが中和されると上記のような変化が見られるので、経鼻的にウイルスが接種されると、気管支粘膜上皮細胞への感染、増殖に端を発し、気管支周辺性に炎症細胞が浸潤、これらは徐々に肺間質へと波及、やがて肺全域に炎症巣を形成するものと解される。

呼吸器系器官へのウイルス感染に関して、ラット気管支上皮のクララ細胞から分泌されるトリプシン様の蛋白分解酵素（Trypsin Clara）はインフルエンザウイルスのhemagglutinin（HA）を開裂させ、感染能を活性化させることが知られ[5]、また気管支上皮細胞から放出されるendothelinはマウスの呼吸器系ウイルス感染時に増大し[1]、さらに呼吸器系器官の特異的免疫グロブリンAが減少すると初感染に対する気管支上皮の再生能が抑制されるといわれている[14]。G群では、リンパ球、形質細胞の浸潤とⅡ型肺胞上皮細胞の増生による間質性肺炎病巣がほぼ肺全域に拡散しているのに対し、ウイルス抗原は主に気管支粘膜上皮細胞に観察された。ウイルスの標的細胞かつ増殖細胞は気管支粘膜上皮細胞であり、直接的なウイルスの影響は気管支上皮にもたらされ、肺組織には至らないと考えられる。インフルエンザウイルス肺炎からの回復とウイルス排除にはT細胞のはたらきが重要であり[16]、またCD4+ T helper 1 Tリンパ球が感染防御に有効であると考えられている[4]が、本実験で観察された気管支周辺のリンパ球浸潤から波及する間質性肺炎は気管支上皮細胞からMHC class Iに挟まれて提示された情報に対してCD4+ T helper 1 Tリンパ球が誘導されて生じた病態であると推察される。

中枢神経病変；

中枢神経病変ならびに抗原陽性反応はD群ではじめて発現した。まず延髄疑核領域におけるグリア細胞の増数とそれらの核崩壊にはじまり，囲管性細胞浸潤，神経細胞の崩壊などが観察される。病変およびウイルス抗原は延髄疑核領域にほぼ限定して観察されたが，G群では同部の陽性反応が最も強く，広範であった。病変はD群，E群，G群へと進行するものと思われる。E群，G群の検索はウイルス接種4日後にのみ実施されたので，それ以降の脳病変の進展については不明である。

ウイルス抗原はD群のグリア細胞の細胞質から検出され，その後経日的にグリア細胞核内・細胞質内，神経細胞核内，そして神経細胞核内・細胞質内・突起内から検出されるようになるため，ウイルスは延髄疑核領域のグリア細胞を標的とし，同細胞で増殖した後近隣の神経細胞へと伝播されていくものと考えられる。Kobayashiらは血管内皮細胞での増殖後に血管周囲のグリア細胞がウイルス抗原陽性反応を示し[6]，またGaoらはグリア細胞と神経細胞が同程度の陽性反応を示すと報告している[2]が，グリア細胞の抗原陽性反応を強調する報告は少なく，ウイルス抗原はほとんどの論文で神経細胞から検出されており[2, 8, 12, 13, 15, 17]，なかにはグリア細胞からはウイルス抗原が検出されないとする報告もある[15]。

中枢神経への侵入経路について，論文報告の多くは，病変が多発性であり，しかも血管内皮がウイルス抗原陽性反応を示すことから，血行性伝播を重要視している[6, 7, 9, 10, 12]。一方で，特に近年，中枢神経病変はある特定の領域に限局して観察され，かつウイルス

抗原は主に神経細胞から検出されることから、神経向性ウイルス伝播の可能性を指摘する報告も増加してきている[8, 12, 13, 15]。本研究では、病変とウイルス抗原陽性反応が延髄疑核領域にほぼ限定して観察され、延髄への侵入は神経向性と考えられる。しかし、ウイルス抗原は神経細胞に先行してグリア細胞から検出された。Hawkeらはインフルエンザウイルス感染初期の脳において高頻度のCD8+リンパ球とMHC class II分子を検出している[3]が、延髄に侵入したウイルスは初感染細胞としてグリア細胞、なかでも脳内で唯一の抗原提示細胞であるミクログリアを標的細胞として選択すると思われる。しかしながら、本研究において免疫染色に使用された一時抗体はポリクローナル抗体である。nucleoproteinとhaemagglutininは感染細胞内の異なる部位から検出されることが証明されており[11]、より正確なウイルス抗原の検出にはモノクローナル抗体を用いた免疫染色が必要であろう。

D群の4日後検索で見られた病変とウイルス抗原は36日後には消退している。グリア細胞から神経細胞へのウイルスの伝達を阻止すれば脳炎への進行を抑制することができ、逆に神経細胞への感染が成立すれば、神経細胞は再生することはないので、病変は消退しないものと推察される。

G群では、陽性反応は疑核領域の他、延髄中心管、第四脳室、第三脳室、側脳室の上衣からも観察された。Reinacherらの報告にもあるように[12]、ウイルスは血行性ないし脳脊髄液向性にも中枢神経に侵入するものと考えられる。しかし、この変化はウイルス接種4日後にならなければ出現しない。感染4日後までに抗血清が投与されなかったならば、脳病変はグリア細胞から近隣神経組織に拡大す