

厚生科学研究費補助金脳科学研究事業

インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の解析と
治療法の開発

平成12年度研究報告書

主任研究者

木戸 博

徳島大学分子酵素学研究センター・酵素分子化学部門

厚生省

まえがき

小児を中心にインフルエンザに伴う中枢神経系の障害（以下インフルエンザ脳炎・脳症）の報告が、近年増加して社会問題にまでなっている。病理学的にはこの疾患は、急速に進展する脳の浮腫を主症状として、数日で死に至る例が多く報告されている。しかしインフルエンザ脳炎・脳症の発症機序の解析や、有効な治療法の確立がなされていない現状にある。さらにインフルエンザ脳炎・脳症の発症に解熱剤の関与が指摘されているものの、明確な相関と発症機序の解明もなされていない。

本研究班はこのような現状の中で、「インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の解析と治療法の開発」を一刻も早く実現することを目標として計画された。本年度は発症機序の解析を目的として、いまだ確立されていないインフルエンザ脳炎・脳症のモデル動物の作成と発症機序の解析、脳炎発症における解熱剤の影響の検討を行った。さらに発症機序の解明と治療法の確立のために、全国の小児科医のネットワークを作成し、検体を集めウイルス株の分離と臨床データを解析を行った。

その結果、新生児マウスを用いたシステムでは、インフルエンザ感染による明らかな脳の浮腫とウイルスの血管内皮細胞への感染、新生児マウスと成熟マウスへ解熱剤を投与することによる有意な増悪を証明することができた。臨床例においては、幸い本年はインフルエンザ脳炎・脳症が疑われた例は少なく、感染の疑われた12例の内、約半数にインフルエンザウイルス株の分離ができたが、血液、尿中の有機酸を初めとする代謝中間体の解析では、インフルエンザ脳炎・脳症に結びつくような代謝異常は観察されなかった。以上の成果をふまえ、今後インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の解析を分子レベルで進め、治療法の開発を試みて行く。

平成13年3月

主任研究者：木戸 博

徳島大学分子酵素学研究センター・酵素分子化学部門

厚生科学研究費補助金脳科学研究事業

[インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の解析と治療法の開発]

平成12年度 班の構成

木戸 博（主任研究者）	徳島大学分子酵素学研究センター・教授
大内正信（分担研究者）	川崎医科大学・微生物学・教授
黒田泰弘（分担研究者）	徳島大学医学部・小児科学・教授
永武 毅（分担研究者）	長崎大学熱帯医学研究所、感染症予防治療分野・ 教授

目次

1、総括研究報告書

インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の解析と治療法の開発に関する研究
主任研究者：木戸 博（徳島大学分子酵素学研究センター）

1

2、分担研究報告書

1. インフルエンザ脳炎・脳症の発症機序の解析：脳炎発症モデルマウスの
作成と発症機序の解析、解熱剤の増悪作用の検討

9

分担研究者 木戸 博（徳島大学分子酵素学研究センター）

共同研究者 唐渡 孝枝、Dengfu Yao、川内 美樹、Bing Yang、
村上 明子、塩田 麻由美、井手 美喜子、赤尾 美代子
（徳島大学分子酵素学研究センター）

桑島正道（徳島大学医学部・臨床検査医学）

2. インフルエンザ脳炎・脳症実験動物モデルの作成

27

分担研究者：大内 正信（川崎医科大学・微生物学）

3. インフルエンザウイルスの病原性に関する咽頭細菌のかかわり

—脳炎・脳症の発症メカニズムに関する研究

35

分担研究者：永武 毅（長崎大学熱帯医学研究所）

4. インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の解析と治療法の開発に関する研究

39

分担研究者：黒田 泰弘（徳島大学医学部・小児科学）

3、患者検体依頼書類

47

1. 総括研究報告

「インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の解析と治療法の開発」に関する
研究

主任研究者 木戸 博（徳島大学分子酵素学研究センター・教授）

研究要旨：近年、小児を中心にインフルエンザ脳炎・脳症、及びライ症候群が疑われる患者のインフルエンザによる脳炎の発症が報告され、発症機序の解析と治療法の確立が望まれている。本研究班は、気道に感染したインフルエンザウイルスにより脳炎・脳症がどのように発症するかについて、発症機序の解析、解熱剤の影響、治療法の確立を目標として組織された。本年度に推進された研究の中から、次ぎに述べる特色ある成果が得られた。

1) ヒトでは、インフルエンザウイルスの経気道感染で脳の著明な浮腫が起きて、種々の神経症状を示すことがあるが、これに類似した経気道感染脳炎発症モデル動物がこれまで確立されていなかった。そこで現在流行株と同一のH3N2型で、マウス馴化型A/Aichi/68(H3N2)を生後2日目のC57BL/6Jマウスに経鼻感染させる脳炎システムを作成した。ここでは、肺炎とウイルス血症に続いて、感染3日目より脳の浮腫とウイルス性血管炎が発症した。解熱剤のDiclofenac sodiumはウイルス感染とマウスの死亡率を著明に増加させた。このシステムにより、ウイルスの脳内侵入経路の解析、解熱剤の影響、浮腫の発症機序の解析が可能となった（木戸班員）。

2) 離乳期以後のddYマウスに、神経向性のA/WSN/33(H1N1)を経鼻感染、又は静脈接種することで、強い神経症状を伴うマウスの作成に成功した。しかし脳内直接接種では、ウイルスは排除され神経症状を伴わなかった（大内班員）。インフルエンザ感染に伴う脳浮腫は、脳のウイルス価が著明に増加する以前から見られた（木戸班員）事から、肺に生じた炎症性サイトカインが浮腫の誘因と疑われた。そこでTNF- α , IL-6の血管内皮に与える影響を検討したところ、これらのサイトカインの血管拡張増強作用が確認された（黒田班員）。平成12-13年の間にインフルエンザ脳炎・脳症が疑われた12例の検体の尿、血液解析の結果、発症原因を示唆する体質的異常は見出せなかった（黒田班員）。インフルエンザの重症化に咽頭の細菌付着率の増加の関与が示唆された（永武班員）。本年度の研究で、インフルエンザ脳炎・脳症の発症機序解析の生物学的基盤が確立された。今後、浮腫発症機序の分子レベルでの解析と、脳血管関門、免疫学とサイトカインからの解析が行われる。

分担研究者

大内正信 (川崎医大・微生物学・教授)

黒田泰弘 (徳島大学医学部・小児科学・教授)

永武 毅 (長崎大学熱帯医学研究所、感染症予防治療分野・教授)

A. 研究目的

本研究班は、気道に感染したインフルエンザウイルスにより脳炎・脳症がどのように発症するかについて、

- ①その発症機序の解析、発症の素因となる代謝異常などの有無の検索、
- ②脳炎・脳症の発症に及ぼす解熱剤の影響、
- ③急速の脳浮腫の病因の解析と治療法の確立、

を研究目標として組織された。これまでにインフルエンザウイルスによる脳炎・脳症の発症機序を解析するモデル動物が確立されたいなかったことから、3年計画の初年度として、1) ヒトのインフルエンザ脳炎・脳症に近い脳浮腫を主症状とする経鼻感染によるモデルシステムの確立のため、インフルエンザ脳炎・脳症のバイオロジーを主体にした研究を計画した。またこのシステムを用いた解熱剤の影響を解析した。さらに、2) インフルエンザ脳炎・脳症が疑われた患者の検体から、発症原因と治療法開発のためのデータを集めるために、全国の主要な小児科の医療施設に依頼して検体を集めるネットワークを作成を試み、1992-1993に渡る患者検体の収集を行った。

B. 研究方法

現在流行しているインフルエンザウイルスH3N2株と同種のウイルス株や、H1N1株など神経向性の強いウイルス株など、種々のインフルエンザウイルス株と種々の系統のマウスを用いて、経気道感染によって中枢神経症状や脳の浮腫が生ずるモデルシステムの検索を行った。また経気道感染以外

に、ウイルスの静脈内投与や脳内への直接接種も行った。使用した解熱剤は、ライ症候群との関係から注目されているDiclofenac sodium (商品名: ボルタレン)を中心に、インフルエンザウイルス感染に及ぼす影響を検討した。1992年12月から1993年3月にかけて12例のインフルエンザ脳症の疑われた患者から、咽頭ぬぐい液と脳脊髄液中のウイルスの採取、尿、血清、乾燥濾紙血の有機酸、脂肪酸、アシルカルニチン、アミノ酸を定量分析した。さらに脳浮腫の発症機序を解析するため、血管内皮に及ぼすサイトカインの影響を検討した。また小児でのインフルエンザ感染の重症化に及ぼす咽頭付着細菌の影響を検討した。

C. 研究結果の概略

本研究班の研究は、次ぎに示す幾つかの柱を中心に遂行され、次のような成果があった。

(I) インフルエンザ脳炎・脳症のモデルシステムの確立とそのバイオロジー

木戸と大内等の研究グループは、インフルエンザ脳炎・脳症のモデル動物システムを作成するため、新生児のモデルマウスシステムの確立(木戸等)と、離乳期以後のモデルマウスシステムの確立(大内)を試みた。新生児のモデルマウスシステムでは、生後2日目のC57BL/6JマウスにH3N2型のマウス馴化型インフルエンザウイルスA/Aichi/68(H3N2)を微量経鼻感染させることで、2-3日目から出現する肺炎とウイルス血症、3日目より出現する

脳浮腫、4日目より9日目まで急速に増加する死亡例を見た。脳浮腫は、Evans Blueの脳組織内への浸潤で評価した。reverse transcription-polymerase chain reaction を用いたウイルスゲノムの検出では、血中のウイルスゲノムの検出が困難な軽度の感染状態でも、脳や肺、肝臓内のウイルスゲノムは明確に検出されたことから、新生児において脳は肺や肝臓と同様にウイルスの増殖し易い臓器と推定された。9日目までに死亡しなかったマウスは、それ以後体重が回復して生存した。一方離乳期以後のマウスでは、神経向性の強いとされているインフルエンザウイルスA/WSN/33(H1N1)株とddYマウスの組み合わせで、しかもウイルスを経鼻接種あるいは静脈内接種した時にだけに、最も明確な神経症状（痙攣、片麻痺、不随意運動）が発症した。但し脳内にA/WSN/33(H1N1)株を直接接種しても、ウイルスは脳内で一過性に増殖するものの神経症状を表さず、ほとんどのマウスが生き延びた。これまでに報告されてきた多くの研究では、インフルエンザウイルスA/WSN/33(H1N1)株の脳内への直接接種による病態の解析が主体であり、ウイルスがどのように脳に侵入するか侵入経路の解析ができなかった。今回我々が確立したシステムでは、このウイルス侵入経路の解析が可能となった。また我々の確立した新生児と離乳期マウスのモデルシステムでは、ウイルスによる肺の炎症の後ウイルス血症を起こし、続いて脳に症状が現れる傾向を示唆した。このことは、脳の浮腫を初めとする様々な神経症状は、ウイ

ルスの脳内での直接の増加以外に、肺の炎症の結果生じたサイトカインなどが、脳に大きな影響を及ぼしている事が考えられた。

(II) 解熱剤のインフルエンザ感染、インフルエンザ脳炎・脳症に及ぼす影響

上記のインフルエンザ脳炎・脳症のモデルシステムに解熱剤のDiclofenac sodiumを投与して、感染に及ぼす解熱剤の影響を検討した（木戸、大内）。新生児のモデルマウスシステム及び離乳期モデルマウスシステムにおいて、Diclofenac sodiumは共にインフルエンザウイルスによる症状を増悪させ、死亡率の増加を招いた。特にこの傾向は新生児マウスで著明であった。また離乳期以後のマウスにおいては、例数は少ないがDiclofenac sodiumの投与により激しい神経症状の増悪が観察された。

インフルエンザウイルスの感染による脳炎と解熱剤との関係は、特にアスピリン系の解熱剤によるライ症候群との関係で注目されていたが、その詳細はこれまで明らかにされていなかった。本研究において、ライ症候群様の脂肪酸代謝異常、脂肪肝、肝機能異常、心臓肥大、腎機能障害などの症状を先天性に示すカルニチン欠乏症マウス（カルニチントランスポーター欠損症jvsマウス）を用いて、インフルエンザ脳炎との関係を解析した。新生児jvsマウスでは、コントロールのC57BL/6Jマウスに比べて明らかにインフルエンザ感染による死亡率が高く、しかも脳内にウイルスゲノムの高い検出率が

確認された。また著明な脳浮腫も観察され、免疫組織化学染色ではウイルスの脳血管内皮細胞での増殖と、血管炎が確認された。Diclofenac sodiumをJvsに投与すると、インフルエンザ感染症の増悪が観察されたが、死亡率においてはコントロールのC57BL/6JにDiclofenac sodiumを投与した場合と差を見なかった。

(III) サイトカインによる血管内皮細胞の障害の検討

これまでのインフルエンザ脳炎・脳症に関する臨床データの解析では、脳の浮腫だけでなく全身の血管障害、血球貪食症候群が観察され、TNF- α 、IL-6などのサイトカインと血管内皮のE-selectinnの増加が報告されていた。そこで正常ラットの血管（内頸動脈）に及ぼすIL-6とTNF- α の効果を検討した（黒田）。その結果、TNF- α とIL-6は共に血管拡張増強作用を示し、肺や脳で産生されたこれらのサイトカインが、脳や全身の血管内皮に作用して浮腫を引き起こすことが推定された。

(IV) インフルエンザウイルスの病原性に関する咽頭細菌のかわりの検討

健常の小児と成人の咽頭粘膜に付着している細菌叢を比べると、両者の間で常在細菌類に違いはなかったが、健常の小児でも病原細菌が一定の割合で付着していることが明らかとなった。かぜ症候群の小児では、特に高率に病原細菌の付着を認め、かぜ症候群の成人では一定の割合で病原細菌が咽頭に

付着するように変化していた（永武）。このように小児で見られる特に高い咽頭付着病原性細菌が、インフルエンザ感染の増悪や、サイトカインの産生に影響する可能性が示唆された。

(V) 1992-1993年度の臨床検体の解析

1992年12月から1993年3月までの間に全国の大学及び関連施設の小児科で、インフルエンザ脳炎・脳症の疑われた患者の中で、検体の供与に同意いただいた12例の患者検体の解析を行った（黒田）。本年度は、昨年度に比べてインフルエンザの流行はほとんど見られず、インフルエンザ脳炎・脳症の疑われた患者の中でも咽頭ぬぐい液からウイルス抗原の検出ができた例は6例で死亡例は無かった。また解熱剤の使用状況では、Diclofenac sodiumの投与例は無く、1例でメフェナム酸、5例でアセトアミノフェンの使用があったが、特に中枢神経症状と解熱剤との関係を示唆する例は無かった。血液、尿の中間代謝産物の定量分析では、全例でアシルカルニチンに異常は認められず、乳酸、ケトーシス、3-ヒドロキシ酪酸、ジカルボン酸の増加が見られたものの、インフルエンザ感染、脳炎・脳症に特有な代謝異常は見出せなかった。

D. 考察

本年度の研究により、ヒトのインフルエンザ脳炎・脳症の病理所見に近い急速な脳浮腫を伴うインフルエンザ脳炎モデルマウスの作成に成功した。これにより、①気道からのウイル

ス感染により脳炎・脳症がどのようにして発症するか解析する基盤ができた。②アスピリンなどの解熱剤によるインフルエンザ感染の増悪機序の解析や、脳炎発症の機序の解析が可能となった。③これらの事実を基に、インフルエンザ脳炎・脳症の治療法開発の基盤と、治療薬を評価するシステムができたと考える。インフルエンザ脳炎・脳症は、脳の急速な浮腫と全身の血管障害を伴うと言われている。この脳浮腫が、今回我々が見出したように、脳の血管で増殖するウイルスによって直接、あるいは間接的に生じたものか、あるいは脳の浮腫が比較的早い段階から発生していることをヒントに、肺炎の結果産生されたサイトカインによって脳浮腫が生じたものかを今後明らかにしてゆく。また新生児マウスと離乳期以後のマウスでは、インフルエンザ脳炎の発症の程度に差が認められたことから、今後インフルエンザウイルス感染に伴う新生児マウスと離乳期以後のマウスの免疫系の違いを比較検討する。さらに肺のインフルエンザ感染により、脳のblood brain barrierが障害された可能性も高いことから、インフルエンザ感染に伴うblood brain barrierの障害因子を検索してゆく。

E. 結論

本研究班では、「インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の解析と治療法の開発」のため、インフルエンザ脳炎・脳症モデル動物の確立、脳浮腫に及ぼすサイトカインの影響の検討、インフルエンザ感染の増悪に及ぼす咽頭付着細

菌の検討、1992-1993年にかけてインフルエンザ脳炎・脳症の疑われた患者の臨床データの解析など、多角的研究が推進され、インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の解析と治療法の開発の基盤ができた。今後本年で確立したシステムを用いて、脳炎・脳症の発症機序の解析を分子レベルで解析し、治療法の開発に結び付けてゆく。

F. 研究発表（論文発表のみ）

- 1) Kido, H., Murakami, M., Oba, K., Chen Y., & Towatari, T.: Cellular proteinases trigger the infection of the influenza A and Sendai viruses. *Mol. Cells.* 9, 235-244 (1999)
- 2) Inoue M., Isobe, M., Itoyama, T., & Kido, H.: Analysis of esp-1 gene (PRSS21). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 564-568 (1999)
- 3) Kido, H., Chen, Ye, Murakami, M., Beppu, Y., & Towatari, T.: Cellular proteinases and viral infection. influenza virus, Sendai virus and HIV-1, In "Proteases of Infectious Agents" (ed. B. M. Dunn) pp.205-217 Academic Press, San Diego (1999)
- 4) Ahmed, K., Wilson, S., Jamal, W.Y., Martinez, G., Oishi, K., Nagatake, T., & Rotimi, V.O.: Causative bacteria of respiratory tract infectious in Kuwait by quantitative culture of sputum. *J. Infect. Chemother.* 5, 217-219 (1999)
- 5) Tani, K., Ogushi, F., Kido, H., Kawano, T., Kunori, T., Kamimura, T., Cui, P., & Sone, S.: Chymase is a

- potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils. *J. Leuko. Biol.* 67, 585-589 (2000)
- 6) Chen, Y., Shiota, M., Ohuchi, M., Towatari, T., Tashiro, J., Murakami, M., Yano, M., Yang, B., & Kido, H.: Tyrtase from pig lungs triggers infection by pneumotropic viruses. *Eur. J. Biochem.* 267, 3189-3197 (2000)
- 7) Amano, H., Yamamoto, H., Senda, M., Oishi, K., Suzuki, S., Fukushima, K., Mukaida, N., Matsushima, K., Eguchi, K., & Nagatake, T.: Impariment of endotoxin-induced macrophage inflammatory protein 2 gene expression in alveolar macrophages in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Infection and Immunity.* 68(5), 2925-2929 (2000)
- 8) Sar, B., Oishi, K., Wada, A., Hirayama, T., Matsushima, K., & Nagatake, T.: Induction of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production by pseudomonas nitrite reductase in human pulmonary type II epithelial-like cells. *Microbial Pathogenesis* 28, 17-23 (2000)
- 9) Watanabe, H., Sato, S., Kawakami, K., Watanabe, K., Oishi, K., Rikitomi, N., li, T., Ikeda, H., Sato, A., & Nagatake, T: A comparative clinical study of pneumonia by pemicillin-resistant and -sensitive *Streptococcus pneumoniae* in a community hospital. *Respiratory.* 5, 59-64 (2000)
- 10) Ahmed, K., Nagatake, T., Nakano, Y., Martinez, G., Ichinose, A., Zheng, C.H., Akai, M., Aikawa, M., & Nagatake, T.: Attachment of *Moraxella catarrhalis* occurs to the positirely charged domain of pharyngeal epithelial cells. *Microbial Pathogenesis.* 28, 203-209 (2000)
- 11) Hara, K., Shiota, M., Kido, H., Ohtsu, Y., Kashiwagi, T., Iwahashi, J., Hamada, N., Mizoue, K., Tsumura, N., Kato, H., and Toyoda, T.: Influenza virus RNA polymerrase PA subunit is a novel serine protease with Ser 624 in the active site. *Gene to Cell.* 2001, in press.
- 12) Kim, RD., Sharmin, S., Inoue, M., and Kido, H.: Cloning and expression of novel mosaic serine protease with and without a transmembrane domain from human lung. *Biochemica Biophysica Acta.* 2001, in press.
- 13) Murakami, M., Towatari, T., Ohuchi, M., Shiota, M., Akao, M., Okumura, Y., Parry, AA., and Kido, H.: Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and sendai virus. *Eur. J. Biochem.* 2001, in press.
- 14) 木戸 博、大内正信、永武 毅 : インフルエンザ 20世紀の総括. *Pharma Medica* 18: 159-169

- (2000)
- 15) 木戸 博:インフルエンザ感染は克服できるか—分子生物学と酵素学からの挑戦. 細胞工学 19: 22-25 (2000)
- 16) 木戸 博、村上明子、楊 兵、唐渡孝枝:インフルエンザ感染を制御する生体内プロテアーゼと気道内制御物質. 細胞工学 19: 33-38 (2000)
- 17) 木戸 博、村上明子、楊 兵、唐渡孝枝:ウイルス感染の制御因子、細胞性プロテアーゼとプロテアーゼインヒビター—蛋白質分解:分子機構と細胞機能 (鈴木 紘一、木南英紀、田中啓二編), Springer-Verlag, Tokyo, p.165-173 (2000)
- 18) 木戸 博、村上明子、川内美樹、唐渡孝枝:宿主側からみたインフルエンザウイルスの感染メカニズム、呼吸と循環 (2000) 48(11): 1105-1111
- 19) 木戸 博、唐渡孝枝、村上明子、楊 兵、赤尾美代子、川内美樹:インフルエンザ発症メカニズムの解明. “インフルエンザQ & A” (永武毅編) 医薬ジャーナル社、p. 42-50 (2000)
- 20) 木戸 博、村上明子、赤尾美代子、唐渡孝枝:インフルエンザウイルス感染のメカニズム—基礎研究の進歩—。カレントセラピー、18(11): 11-17 (2000)
- 21) 木戸 博:インフルエンザウイルス感染と生体防御物質—感染機序の最近の進歩—高知県小児科医会報 11, 7-13, (2000)
- 22) 木戸 博:インフルエンザウイルスの感染感受性を決めている体の因子解析. メディカルQ 121号 ラジオたんぱ (12月20日発行) 1.
- 23) 大内正信:抗ノイラミニダーゼの薬効について. 治療学 34(1), 104, (2000)
- 24) 永武毅:インフルエンザのマネジメント3. インフルエンザの治療 1) インフルエンザに対する対症療法とアマンタジンによる治療. 医薬ジャーナル36(1), 143-146 (2000)
- 25) 大内正信:HAとNAの相互作用. インフルエンザ2(1), 25-3. (2001)
- 26) 大内正信:インフルエンザウイルスの吸着と遊離. 感染症と化学療法 6(1) in press (2001)

2. 分担研究報告

分担研究報告書

インフルエンザ脳炎・脳症の発症機序の解析：脳炎発症モデルマウスの作成と発症機序の解析、解熱剤の増悪作用の検討

分担研究者 木戸 博（徳島大学分子酵素学研究センター）

共同研究者 唐渡 孝枝、Dengfu Yao、川内 美樹、Bing Yang、
村上 明子、塩田 麻由美、井手 美喜子、赤尾 美代子
（徳島大学分子酵素学研究センター）

桑島 正道（徳島大学医学部・臨床検査医学）

研究要旨

インフルエンザ脳炎・脳症、及びインフルエンザに感染したライ症候群患者の脳炎の発症機序の解析と治療法の確立のため、本年度研究において脳炎発症モデルマウスの作成と解熱剤の影響を検討した。モデルマウスの作成は、先天性carnitine transporter欠損症でライ症候群様所見を示すjuvenile visceral steatosis (jvs) マウスについても合わせて検討した。C57BL/6J と jvs new born マウスに、近年流行しているH3N2型のインフルエンザウイルスで、マウスに馴化したA/Aichi/68(H3N2)株を経鼻感染させた。同時に、ライ症候群との因果関係で問題となっている解熱剤のDiclofenac sodium 2 mg/Kg/Dayの影響を検討した。C57BL/6J と jvs new born マウスはインフルエンザ感染後、激しい肺炎と脳浮腫を引き起こした。脳浮腫の程度は、血中に投与したEvans Blueの脳への浸潤で検討したところ、経鼻感染後3日目より経時的に増悪する脳炎と脳浮腫が認められた。このようなマウスでは、脳の血管内皮細胞でウイルス抗原が検出され、肺炎からウイルス血症を経由して脳全体の血管内膜炎へ進展したと推定された。稀ではあるがBlood Brain Barrieを越え、グリア細胞でウイルス抗原が検出される部位も認められた。Diclofenac sodium投与では、それ自体毒性を示さなかったが、インフルエンザウイルスによる死亡率の著明な増加を示した。この増悪効果はC57BL/6J と jvs new born マウスで特に差は認められなかった。抽出された組織RNA当たりの、RT-PCRによるウイルス遺伝子の検出では、肺、脳、肝臓で検出頻度が高く、血液、心臓、脾臓、腎臓など血液を多く含む臓器が続き、全身性ウイルス血症と多臓器不全を示唆した。また脳内でのウイルス増殖を裏付けるウイルス活性化トリプシン型プロテアーゼの検出にも成功し、完全精製を試みている。今後モデルマウスの作成を基盤に、脳炎発症機序の解析をBlood Brain Barrieの破壊機序の解析と、サイトカイン、NOなどの因子による脳浮腫の発症機序の解析から研究を進める。

A、研究目的

3歳児をピークにインフルエンザ感染に伴う中枢神経障害が社会問題にまでなっており、死亡率の高さ、後遺症の出現頻度の高さから、本研究は厚生行政でも重要な課題と認識されている。ここでは、いわゆるインフルエンザ脳炎・脳症と言われている疾患と、慢性のアスピリン服用者に見られるライ症候群患者のインフルエンザ脳炎との違いの有無がいまだに不明確な問題として残っている。これらの問題点の背景から、インフルエンザ感染に伴う中枢神経障害の発症機序の解析と、その治療法の確立が緊急に解決すべき研究課題と考える。そこでこの問題を解決するために、本研究が企画された。本年度は、研究課題を追求する基盤の作成として、インフルエンザウイルスによる脳炎発症モデル動物の作成を試みた。ここでは、気道に感染させたインフルエンザウイルスが、脳にまで到達しているか否か、さらに患者で著明に認められる脳の浮腫が作成したモデル動物でも認められるか、等について詳細な検討を行った。これまでに報告のあったインフルエンザ脳炎・脳症の動物実験系は、ほとんどの場合神経向性の高い特殊なインフルエンザウイルス株のA/WSN/33(H1N1)株を用い、ウイルスを脳内に直接接種して脳内のウイルス増殖部位の病理学的解析や、ウイルスの病原性を分子生物学的に解析する手法が取られていた。しかしこれらの実験では、感染経路を無視している点と、現在では流行していない特殊な神経向性のウイルス株を使用している

点で、その実験結果は必ずしもインフルエンザ脳炎・脳症患者の実像を反映しているとは言えない。これらの点をふまえ、インフルエンザウイルスがどのようにして脳内に侵入するか、増殖するとしたら増殖を可能にする分子基盤が脳に存在しているのか、解熱剤はこれらの因子にどのような影響を与えているかについて以下の検討をおこなった。

B、研究方法

1) 研究材料ウイルス株：インフルエンザウイルスA/Aichi/68(H3N2)。マウス：C57BL/6Jとjuvenile visceral steatosis (jvs)を示すC57BL/6Jを用い、生後2日目から実験に使用した。解熱剤としては、Diclofenac sodium (Sigma)を使用した。

2) ウイルスの感染方法：発育鶏卵で増殖させたインフルエンザウイルスA/Aichi/68(H3N2) 1×10^9 PFU/mlを生理食塩水で300倍に希釈した後、その4mlをエーテル麻酔下に生後2日目のマウスに経鼻感染させた。homozygous mutant (jvs/jvs)とheterozygous (+/jvs)マウスについても、同様な感染方法で処理した。ウイルス感染後、毎日体重測定と死亡率の測定、あるいは、エーテル麻酔下に安楽死させた後、各臓器を採取して実験に用いた。

3) 解熱剤の投与：Diclofenac sodiumを生理食塩水に溶解させた後(1mg/ml)、25mlをマウスの背側頸部に1日

2回皮下注射した。1日の投与量は、体重当たり20 mg/Kg/日とした。

4) Evance Blueによる脳浮腫の検定：マウスをエーテルで麻酔した後、左の胸郭のみを開胸し左心室から micro-capillary でEvance Blue 液10 ml (20 mg/ml生理食塩性)を投与した。10分後に右心房を切開し、左心室から体重の6倍量の生理食塩水を急速に投与して環流し、全身血管内のEvance Blueを取り除き、組織内に浸潤したEvance Blueの程度を測定して、浮腫の指標とした。

5) インフルエンザウイルスRNAの検出：脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、血液、などの各臓器のインフルエンザウイルスRNAの検出は、各組織から全RNAをTRIzol試薬(GibcoBRL)を用いて抽出し、1 mgのtotal RNAを用いてreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)で検出を行った。用いたprimerは、P1: 5'-TGAAGTGACTAATGCTACT G-3', P2: 5'-ACAGACCCCTTACCC AGGGT-3'をFirst PCRに使用して578 bpの検出を行った。P3: 5'-GCA ACTGTTACCCTTATGAT-3', P4: 5'-TCATTGTTTGGCATAGTCAC-3'をSecond PCRに使用して232 bpの検出を行った。

6) インフルエンザウイルス抗原の検出：成熟牡C57BL/6JマウスにインフルエンザウイルスA/Aichi/68(H3N2)を感染させた後、生存し続けたマウスの血液の中でも、特に高いウイルス中和活

性を示す血液を選び、その血液からIg Gをprotein A sepharoseを用いて精製した。さらにこのIg Gを、マウス全血清蛋白質を固相化したsepharose 4Bカラムに通して非特異的反応を示すIg Gを取り除いた後、その未吸着Ig G分画を抗インフルエンザウイルス一次抗体として用いた。この精製Ig G (1 mg/ml)を、緩衝液パラホルムアルデヒドで固定化した脳の切片と4°Cで一晩反応させた後、二次抗体を室温で1時間反応させ、avidine-biotin-peroxidase complex法でウイルス抗原を検出した。

C、研究結果

1) インフルエンザウイルス感染による脳炎発症モデルマウスシステムの確立
インフルエンザウイルスをnew born C57BL/6Jマウスに経鼻感染させ、Diclofenac sodium投与群と非投与群(各群22匹)での致死率を検討した(図1)。Diclofenac sodiumを単独投与した群では、9日間の投与期間中の死亡例は無く、図には示していないが体重の増加率も生理食塩水投与群と全く差を認めなかった。比較的少量のインフルエンザウイルス(1.4×10^4 PFU)を経鼻感染させた群では、感染後4日目より死亡するマウスが出現し、9日目では約55%が死亡した。9日目までに死亡しなかったマウスは全てその後も生存し続けた。通常ヒトに投与している量に相当するDiclofenac sodiumを皮下注射した群に、同じタイターのインフルエンザウイルスを投与した群で

は、感染後3日目より著明な死亡率の増加が認められた。9日目でのマウスの生存率はわずかに20%に過ぎなかった。同様の実験を、carnitine transporter欠損症で脂肪酸の代謝障害とライ症候群様の病理所見を示す homozygous mutant jvs マウスで検討した結果を図2に示す。Wild type C57BL/6Jに比較して、比較的少量のインフルエンザウイルス感染によってもマウスの死亡率は有意に高く、jvs マウスではインフルエンザウイルスによる感染感受性が高いことが示唆された。このシステムにDiclofenac sodiumを投与すると、ここでも感染3日目より明らかな死亡率の増加が認められた。この場合、9日目のマウスの生存率はわずかに5%に過ぎなかった。Diclofenac sodiumを単独に投与した群では、wild typeと比較して体重増加に差を認めず、死亡例もなかった。一方 heterozygous mutant マウスに対して同様の実験を行った結果を図3に示す。此の場合、インフルエンザウイルスのみによる死亡率の推移は、wild type C57BL/6Jに全く一致しており、有意な差は認められなかった。しかし、Diclofenac sodiumを投与した群では、wild type に比較して5日目以後の死亡率に違いが認められ、高い死亡率を示した。なをDiclofenac sodiumを投与した時のhomozygous mutantと heterozygous mutantの死亡率には差が認められなかった。此の事は、インフルエンザウイルス感染による死亡率において、一見wild typeも heterozygous mutantも同じ傾向を示したが、Diclofenac sodium投与という

ストレス下においては、heterozygous mutantはhomozygous mutantと同じ程度の障害にまで発展した事が示唆された。

これまでインフルエンザウイルス感染に対する明らかな解熱剤の増悪効果が実験的に示されていなかったが、我々の用いたnew born マウスとnew born jvsマウスのシステムでは、解熱剤のDiclofenac sodiumによる明らかなインフルエンザウイルス感染の増悪効果と、それによる死亡率の上昇が認められた。この死亡率の上昇が、何に由来するものかは、今後の重要な検討課題である。しかし現時点において、Diclofenac sodiumのインフルエンザウイルス感染の増悪作用が明確に確認された事は意義深い。

2) 各臓器におけるインフルエンザウイルスゲノムの検出

インフルエンザ脳炎・脳症と診断された患者は、肺の炎症以外に、意識障害、脳波異常、頭部CT, MRIの異常や、高アンモニア血症、凝固系異常、肝機能異常などの多臓器不全を示唆する症状を伴う。このことは、気道に感染したインフルエンザウイルスが、ウイルス血症によって他の臓器の感染にまで発展した事が考えられる。このような背景から、重症なインフルエンザ感染を示したhomozygous mutant jvs マウスと、wild-type C57BL/6Jマウスと同じ程度の感染を示した heterozygous mutant jvsマウスの感染後6日目の各種臓器を採取し、total RNAを精製した。このRNAを用いてRT-PCRにより、インフルエンザウイ

ルス膜蛋白質、ヘムアグルチニンゲノムの検出を、First PCR (35 cycles)と second PCR (25 cycles) にて行った。homozygous mutantも heterozygous mutant jvs マウスも、second PCR (nested-PCR) においては調べた全ての臓器、脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、血液においてインフルエンザウイルスゲノムが検出され、ウイルス血症による全身感染が示唆された。しかしFirst PCRでは、肺、脳、肝臓でのみウイルスゲノムが検出されるに過ぎなかった。このことは、血液細胞や血液中のウイルス含量よりも、肺、脳、肝臓ではウイルスの増殖によってウイルスゲノム含量の増加が起きている事が示唆された。則ち、全身の臓器の中でも特に肺、脳、肝臓ではウイルスの臓器親和性が高く、ウイルス増殖率も高いことが示唆された。homozygous mutantと heterozygous mutant jvs マウスのFirst PCRの結果は、肺と肝臓では共に約25-33%の検出率を示し、両者間に差が認められなかったが、脳においてはhomozygous mutant jvsで70%の高い検出率であるのに比べ、heterozygous mutant jvsでは僅かに10%に満たず、両者間で明らかな検出率の差を示した。この事から、homozygous mutant jvsではwild typeやheterozygous mutant jvsに比して、インフルエンザウイルスが脳に侵入し易くなっている事を示唆している。今後さらに検体数を増やすと同時にDiclofenac sodiumの影響も合わせ検討してゆく。

3) 脳におけるウイルス抗原の検出と

脳浮腫

インフルエンザウイルス感染後の脳の浮腫をEvans Blueの組織内浸潤の程度で検討した(図4)。homozygous mutant jvsとheterozygous mutant jvs マウスにインフルエンザウイルスを感染した後、3日目と5日目の代表的な脳へのEvans Blueの浸潤を示す。3日目の未感染homozygous mutant jvsとheterozygous mutant jvsマウスをコントロールとして示しているが、ウイルス感染のない場合、Evans Blueの脳内への浸潤は全く認められなかった。しかしウイルス感染を行った例では、感染後3日目より僅かではあるが、肉眼的にEvans Blueの浸潤を認めるようになり、5日目では組織内への色素の浸潤が激しくなり、著明な脳の浮腫を示唆した。肉眼的には、homozygous mutant jvsとheterozygous mutant jvs マウス間では、homozygous mutant jvsマウスで僅かにEvans Blueの浸潤の程度が強い傾向にあったが、RT-PCRでのウイルスゲノム検出率で示されたような明らかな差は認められなかった。このことは、脳の浮腫の程度は、必ずしも脳内のウイルスゲノム量に平行して生ずるのではなく、肺や肝臓の炎症の結果産生された炎症性サイトカインにより早期から発生する可能性と、脳の血管内皮細胞におけるウイルスの軽度の増加でも浮腫が生ずる可能性も示唆され、今後の検討課題として注目された。

ウイルスを感染させた後、5日目のjvsマウスの脳を抗インフルエンザウイルス抗体で染色した結果を図5に示す。弱拡大で示した図5Aにおいて、イン

フルエンザウイルス抗原は、脳の微小血管の内皮細胞にはっきり認められた。図には示していないが、コントロールIg Gでは全く染色されず、ウイルス抗原が脳の血管内皮細胞で蓄積されていることが示唆された。図5Bに示す強拡大像で、血管内皮細胞全体にウイルス抗原が分布している様子が示されたが、ウイルス抗原が膜表面に付着しているだけなのか、細胞内に分布しているか、今後免疫電顕の手法で検討してゆく。また稀ではあるが、図5Cに示すように脳の実質細胞の中で、グリア細胞かアストロサイトと推定される細胞にウイルス抗原が染色されている像が見られた。このように、インフルエンザウイルスは脳の血管内皮細胞に留まらず、脳の実質細胞にまで感染が広がってゆく様子が稀に認められた。

4) 脳内でのインフルエンザウイルスの増殖を可能にするウイルス活性化酵素の同定

インフルエンザウイルスの生体内での増殖は、宿主細胞の分泌するトリプシン型プロテアーゼにより、厳密にウイルスの感染感受性と増殖性は規定されている。則ち、細胞より出芽したばかりのウイルスは、未熟型で感染能を示さないが、このウイルスの膜蛋白質のヘムアグルチニンが宿主細胞の分泌するトリプシン型プロテアーゼによる限定分解を受けると、膜融合能と感染性を示すようになる。これまで、脳内のウイルス活性化酵素については全く報告がなく、脳内のウイルス増殖機序は不明であった。

ここでは、マウスに変わって同じげっ歯類に属し重量の大きなラットの脳を用いて、脳内のウイルス活性化トリプシン型酵素の同定と、酵素精製を試みた。図6にインフルエンザウイルスと同じ機序によってラットに感染するセンドライウイルスの感染活性化を指標にした、ラットの脳におけるウイルス活性化トリプシン型酵素の精製法を示す。ラットの脳をアセトン処理する事で脂質成分を取り除き、アセトンパウダーを作成する。この分画からウイルス活性化酵素をpH 4.5で抽出し、さらに80%硫酸分画を行い粗精製を行った。その後、pH 4.5の条件で陽イオン交換SP Sepharose カラムクロマトグラフィーを行い、その溶出分画を再度、pH 5.5の条件でSP Sepharose カラムにかけて溶出した。pH 5.5の未吸着分画とカラムからの溶出分画の両方に、ウイルス活性化活性を認めため、それぞれの分画を抗トリプシン-IgG セファロースアフィニティーカラムクロマトグラフィーにかけ、pH 2.5のグリシン塩酸緩衝液で溶出して部分精製標品とした。

部分精製標品のゼラチンゼイモグラフィーの結果を図7に示す。Lane 3に示すように、pH 5.5のSP Sepharose カラムクロマトグラフィーの未吸着分画には、抗トリプシン-IgGと反応するプロテアーゼが存在していた事から、cationic pancreatic trypsinに類似した異所性のcationic trypsin様酵素の可能性が示唆された。一方lane 5に示すように、pH 5.5のSP Sepharose カラムクロマトグラフィーの吸着分画にも、抗トリプシン-Ig Gと反応するプロテ