

アーゼが存在しており、その性質から anionic pancreatic trypsin に類似した異所性の anionic trypsin 様酵素の可能性が示唆された。両酵素とも分子量は約 20 kDa を示し、lane 6 に示すように、我々によってラットの肺から最近発見されたインフルエンザウイルスを活性化する異所性肺内 trypsin と同一の分子量を示した。pH 5.5 の条件で、SP Sepharose カラムクロマトグラフィーの吸着分画と未吸着分画に溶出される脳のトリプシン様の酵素は、図 8 の lane 3 と lane 5 に示すように、共に [3H]glucosamine で標識した Sendai ウイルスの膜融合蛋白質前駆体 F0 を、そのサブユニットの F1 と F2 に限定分解した。則ち、脳内には、ウイルスの膜融合蛋白質前駆体を限定的に分解して、ウイルスの感染感受性を高めるプロテアーゼの存在することが初めて明らかになった。この酵素の基質特異性とインヒビター特異性を次に検討した。市販のラットの膵臓より精製されたトリプシン、及びラットの肺から我々によって初めて精製された異所性のトリプシン、さらに今回ラットの脳より部分精製され、SP Sepharose、pH 5.5 カラムクロマトグラフィーから溶出されたウイルス活性化酵素の人工基質に対する基質特異性を、図 9 に示す。P1 部位に Arg か Lys を持ついわゆるトリプシン型セリン性プロテアーゼの人工基質の中で、インフルエンザウイルスの HA や sendai ウイルスの F0 蛋白質の限定分解部位の切断モチーフ、Glu(Gln)-X-Arg 配列を含む基質、Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA, Boc-Gln-Gly-Arg-MCA, Boc-Gln-Ala-Arg-MCA に特に

高い親和性を示した。この基質特異性は、コントロールとして検定したラット膵臓由来のトリプシンや、肺の異所性トリプシンと同じ特異性を示した。しかし、Boc-Val-Leu-Lys-MCA や Boc-Leu-Thr-Arg-MCA に対する基質特異性においては、膵臓由来のトリプシンとの違いを示したことから、脳のウイルス活性化トリプシン型プロテアーゼが膵臓のトリプシンと同じ酵素であるか否かについては、今後の詳細な検討が必要である。

ラットの膵臓由来のトリプシンと、脳由来のウイルス活性化トリプシン型プロテアーゼのインヒビター特異性を図 10 に示す。脳由来のウイルス活性化トリプシン型プロテアーゼは、トリプシン型プロテアーゼインヒビターの Aprotinin と Benzamidin で強く阻害された。また活性中心の Ser との親和性は弱いながらも不可逆的に結合する diisopropylfluorophosphate と金属キレート作用を示す O-Phenanthroline で弱く阻害された。これらのインヒビター特異性は、コントロールとして検討したラットの膵臓のトリプシンとほぼ一致した。今後この酵素のさらなる精製と、局在部位の決定を行ってゆく。

D、考察

今回、new born C57BL/6J マウスにインフルエンザウイルスを経気道感染させる事により、脳炎発症モデルシステムの確立に成功した。従来のインフルエンザ脳炎の研究が、直接脳にウイルスを接種していたのに比して、経気道感染であることから、今後ウイルスの

脳内侵入経路と機序の解析に重要な情報を与える。さらにこれまでの研究では、ほとんどの実験が神経向性の高いインフルエンザウイルスA/WSN/33 (H1N1)株を使用した研究であったが、ここでは1968年の香港カゼ以降、現在まで流行しているH3N2型のインフルエンザA/Aichi/68 (H3N2)を使用することで、あきらかな脳の浮腫などの脳炎・脳症の発症に成功している。またヒトでは、インフルエンザ脳炎・脳症の発症が3歳をピークとして見られるが、アスピリンなどの解熱剤の服用とインフルエンザ脳炎・脳症の発症との関係が疑われている。今回の実験から、解熱剤のDiclofenac sodiumはインフルエンザウイルス感染による死亡率を有意に増加させた。またこれまでインフルエンザ脳炎・脳症の発症に、何らかの体質的要因、例えば先天性の代謝異常症が議論されてきたが、明確な結果が得られていない。ライ症候群では、脂肪酸の代謝異常が認められ、著明な脂肪肝、肝臓の機能異常などを特色とし、インフルエンザに感染すると高い頻度でインフルエンザ脳炎・脳症が発症することが知られている。ライ症候群に似た脂肪肝、肝臓の機能異常、心筋肥大などの症状を示すcarnitine transporter 欠損症のjvsマウスでは、インフルエンザウイルス感染による高い死亡率と脳内のウイルスゲノムの高い検出率を見た。このことは、インフルエンザウイルスの脳内への侵入機序に、carnitine transporter欠損症に基づく何らかの原因が関与していることを示唆した。現在インフルエンザ感染と共に、中枢神経障害を伴う

患者の血液と尿中の有機酸とアシルカルニチンを測定して、carnitine transporter欠損症を含む先天性代謝異常症の有無を検討している。

インフルエンザ脳炎・脳症は、急速な脳の浮腫を特色としている。今回我々が確立したモデルシステムでは、インフルエンザウイルス感染による明らかな脳の浮腫を伴った。しかし脳浮腫の発症機序に関してはまだ不明で、脳の血管内皮のウイルス感染は証明されたものの、浮腫はウイルス増殖がまだ著明でない感染後3日目から見られ始めている。以上のことから、脳浮腫の発症を①脳の血管内皮細胞の軽度なウイルス感染で、機能障害が引き起こされ、blood brain barrierの破壊と浮腫が生ずる可能性。さらに、これまでに我々は、肺へのウイルス感染により炎症性サイトカインのTNF- α が、感染後2—3日をピークに肺や気道内に激しく増加する事を観察していることから、②このような肺由来のTNF- α やその他のサイトカインが血液を介して脳の血管内皮に作用して浮腫を生じた可能性（肺 ∇ 脳相互作用説）が考えられる。そのために、今後、肺と脳における各種炎症性サイトカインとNOの測定、endothelinや血管内皮の細胞接着因子の測定を行い、浮腫発症の原因を解析する。

一方新生児では、気道のインフルエンザウイルス感染から全身のウイルス血症、さらに脳炎にまで感染が拡大した。しかし、4週齢以後のマウスでは炎症は肺に留まり、ウイルス血症、脳炎へと発展するケースは稀であった。そこで、新生児の免疫系の未熟さが脳

炎発症の基盤である可能性が高く、ウイルス感染とDiclofenac sodiumを投与した時のTH1, TH2細胞の比率、Ig A, Ig Gの産生能などを指標に、新生児でのインフルエンザウイルス感染の重症化メカニズムを解析する。

またこれまで不明とされていた脳内のウイルス活性化プロテアーゼが、トリプシンに類似した酵素である可能性が本研究によって証明された。最近我々は、肺でのインフルエンザウイルスの活性化にミニプラスミンが大きく関与している事を明らかにしている。このミニプラスミンは、特に脳の血管内皮細胞の可逆的な収縮を引き起こし、Blood Brain Barrierを一時的に破壊することが注目されている。その機序はまだ不明であるが、脳あるいは肺のウイルス活性化プロテアーゼがウイルス増殖に関与するだけでなくBlood Brain Barrierの破壊にも関与することが強く示唆された。今後これらの問題点を含め、インフルエンザ脳炎・脳症の発症機序を解決して行く必要がある。

E. 結論

本年度の研究では、現在流行しているインフルエンザウイルスのH3N2型と同型の、マウス馴化型インフルエンザA/Aichi/68(H3N2)株を経鼻感染させることで、明らかな脳の浮腫を伴うインフルエンザ脳炎の発症モデルシステムの作成に成功した。さらにライ症候群様の症状を示すjvsマウスを用いて同様の実験を行うことで、Wild typeに比してインフルエンザの重症化と高い死亡率が確認された。また解熱剤の

Diclofenac sodiumによっては、Wild type、jvsマウス共に明らかなインフルエンザ感染の重症化が確認され、解熱剤による重症化機序解析の必要性がクローズアップされた。激しい脳の浮腫を伴って死亡したjvsマウスの場合、脳の血管内皮でのウイルス抗原の出現と、稀ではあるがグリア細胞でのウイルス抗原の検出が確認され、Blood Brain Barrierの破壊が示唆された。さらにこのような脳内でのウイルスの増殖を可能にする物質的根拠として、脳のウイルス活性化トリプシン型プロテアーゼの部分精製に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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) 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)
- 5) Chen, Y., Shiota, M., Ohuchi, M., Towatari, T., Tashiro, J., Murakami, M., Yano, M., Yang, B., & Kido, H.: Tryptase from pig lungs triggers infection by pneumotropic viruses. *Eur. J. Biochem.* 267, 3189-3197 (2000)
- 6) 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 polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser 624 in the active site. *Gene to Cell*. 2001, in press.
- 7) 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. *Biochimica Biophysica Acta*. 2001, in press.
- 8) 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.
- 9) 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)
- 10) 木戸 博:インフルエンザ感染は克服できるかー分子生物学と酵素学からの挑戦。 *細胞工学* 19: 22-25 (2000)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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
- 14) 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)
- 15) 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ー基礎研究の進歩ー。 *カレントテラピー*、18(11): 11-17 (2000)
- 16) 木戸 博：インフルエンザウイルス感染と生体防御物質ー感染機序の最近の進歩ー高知県小児科医学会報 11, 7-13, (2000)
- 17) 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)

6) 原好勇、塩田麻由美、木戸博、
豊田哲也：インフルエンザウイル
スRNAポリメラーゼ・PAサブユ
ニットはセリンプロテアーゼ活性
を持つ。第73回日本生化学会
(横浜) 平成12年10月11-14日

2、学会発表

1) Hara, K., Kido, H., and Toyoda, T.:
Protease activity of influenza virus
RNA polymerase PA subunit. The
Control of Influenza IV. (Scotland)
June 20, 2000.

2) 村上明子、唐渡孝枝、塩田麻由美、
赤尾美代子、木戸博：センダイウイ
ルスとインフルエンザウイルスの
感染性を決定する宿主のプロテア
ーゼの一つはミニプラスミンであ
る。第5回病態と治療におけるプ
ロテアーゼとインヒビター研究会
(名古屋) 平成12年8月18-19日

3) 唐渡孝枝、川内美樹、村上明子、
塩田麻由美、井手美喜子、木戸博：
Sendai virus感染ラット肺に増加す
るVirus活性化Trypsin様Protease.
第73回日本生化学会 (横浜)
平成12年10月11-14日

4) 村上明子、唐渡孝枝、塩田麻由美、
赤尾美代子、木戸博：インフルエン
ザウイルスとセンダイウイルスの
感染性を決めるプラスミンとミニ
プラスミンの比較。第73回日本生
化学会 (横浜)
平成12年10月11-14日

5) 楊 兵、大内正信、井手美喜子、
木戸博：Effect of Ambroxol on
biological responses in mouse
infected with influenza A virus.
第73回日本生化学会 (横浜)
平成12年10月11-14日

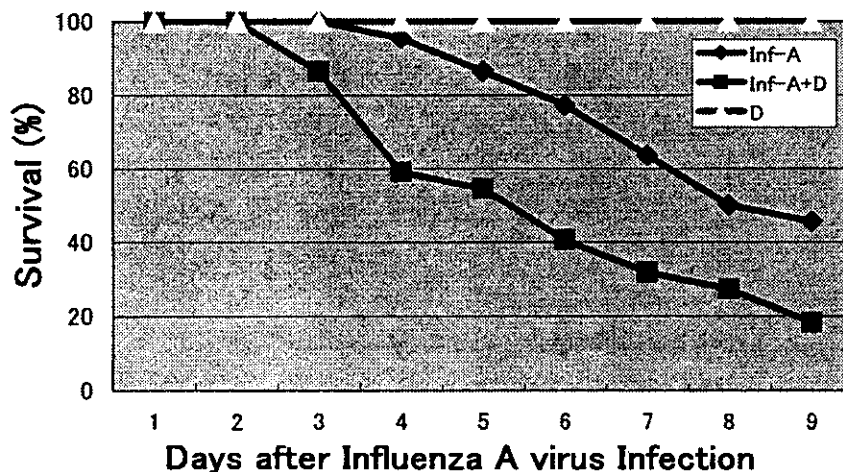


図 1. インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株を C57BL/6J マウスに経鼻感染させた時の、解熱剤の有無によるマウスの生存率

インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株（感染価 3.3×10^6 PFU/ml）を、生後 2 日目の C57BL/6J マウスに、エーテル麻酔下に $4 \mu\text{l}$ 接種し、さらに Diclofenac sodium 又は生理食塩水を毎日 2 回背部に皮下投与した。経時的な生存率を示す。Inf-A: Influenza virus A/Aichi/68(h3N2); D: Diclofenac sodium 20 mg/kg/day

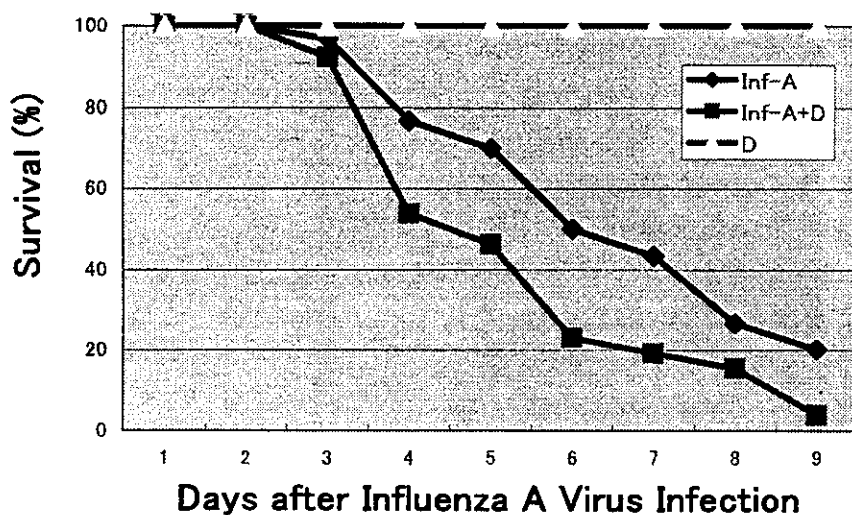


図 2. インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株を homozygous mutant マウス(jvs/jvs) に経鼻感染させた時の、解熱剤の有無によるマウスの生存率

インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株（感染価 3.3×10^6 PFU/ml）を、生後 2 日目の homozygous mutant マウス(jvs/jvs)にエーテル麻酔下に $4 \mu\text{l}$ 接種し、Diclofenac sodium 又は生理食塩水を毎日 2 回背部に皮下投与した。経時的な生存率を示す。Inf-A: Influenza virus A/Aichi/68(h3N2); D: Diclofenac sodium 20 mg/kg/day

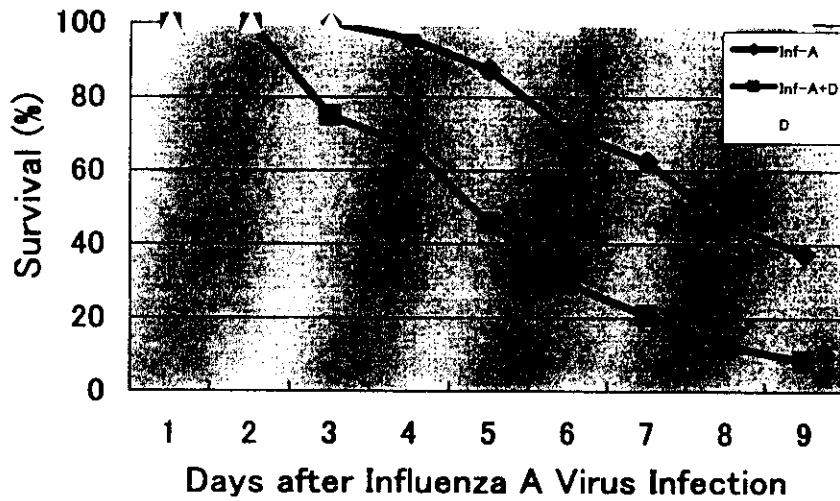


図3. インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株を heterozygous mutant マウス(+jvs) に経鼻感染させた時の、解熱剤の有無によるマウスの生存率

インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株 (感染価 3.3×10^6 PFU/ml) を、生後2日目の heterozygous mutant マウス(+jvs)にエーテル麻酔下に $4 \mu\text{l}$ 接種し、Diclofenac sodium 又は生理食塩水を毎日2回背部に皮下投与した。経時的な生存率を示す。Inf-A: Influenza virus A/Aichi/68(h3N2); D: Diclofenac sodium 20 mg/kg/day

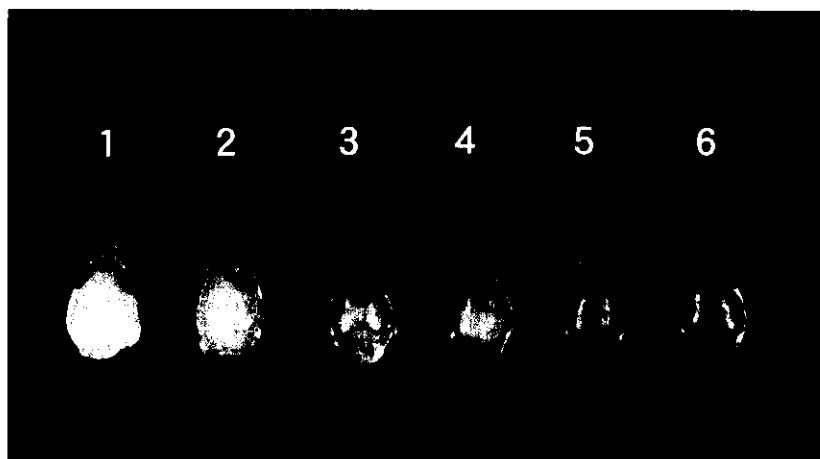


図4. インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株を homozygous と heterozygous mutant マウスに感染させた時の、感染後3日目と5日目の脳内への Evans Blue の浸潤.

1, 3, 5: (jvs/jvs); 2, 5, 6: (+jvs)マウスを示し、1、2 : 3日目の未感染マウス ; 3、4 : 3日目の感染マウス ; 5、6 : 5日目の感染マウスの脳内への色素の浸潤

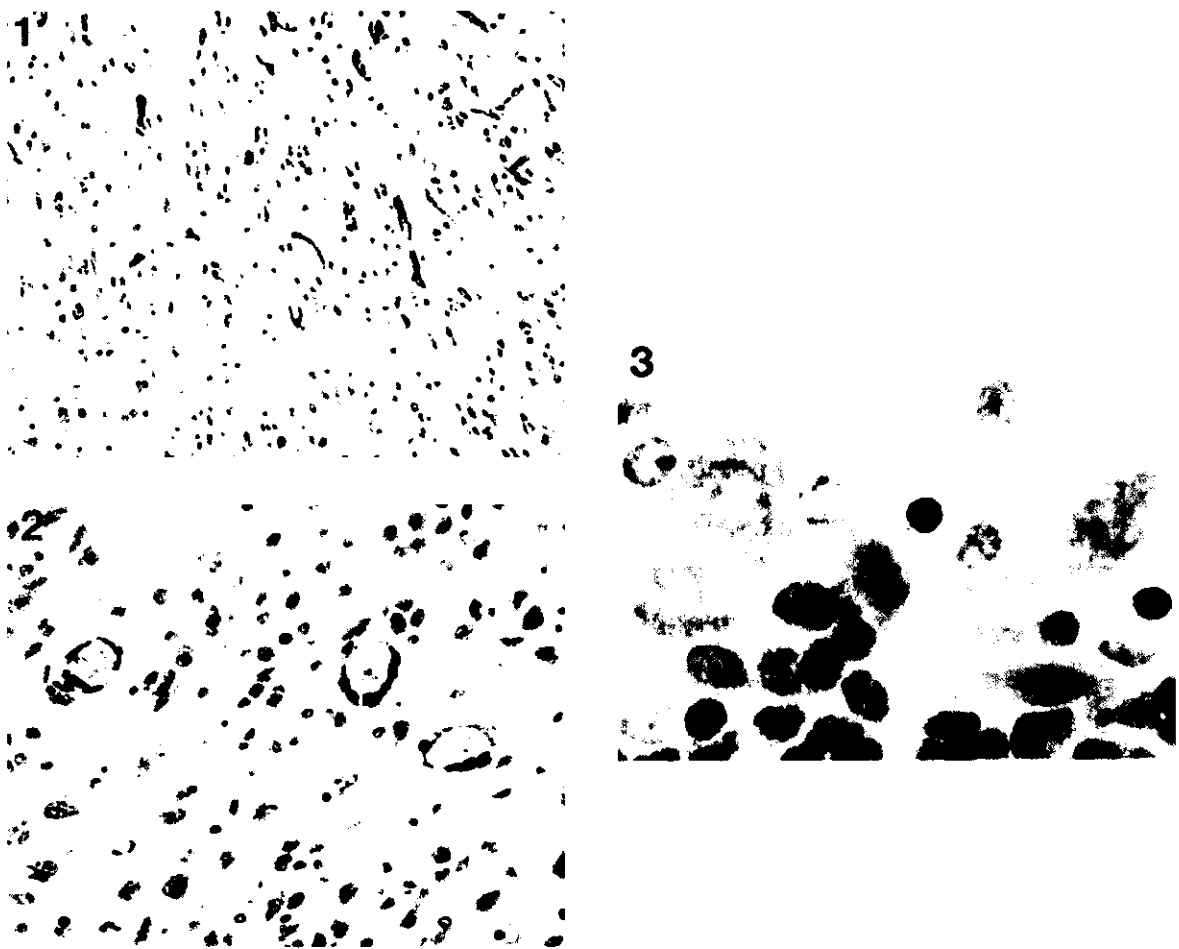


図5. インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株を homozygous mutant (jvs/jvs) マウスに感染させた時の、感染後5日目の脳の免疫組織化学によるウイルス抗原の検出。

- 1 : × 98, 脳内の微小血管にウイルス抗原が検出される。
- 2 : × 196, 血管内皮細胞全体にウイルス抗原が検出される。
- 3 : × 589, グリア細胞と思われる細胞にウイルス抗原が検出される。

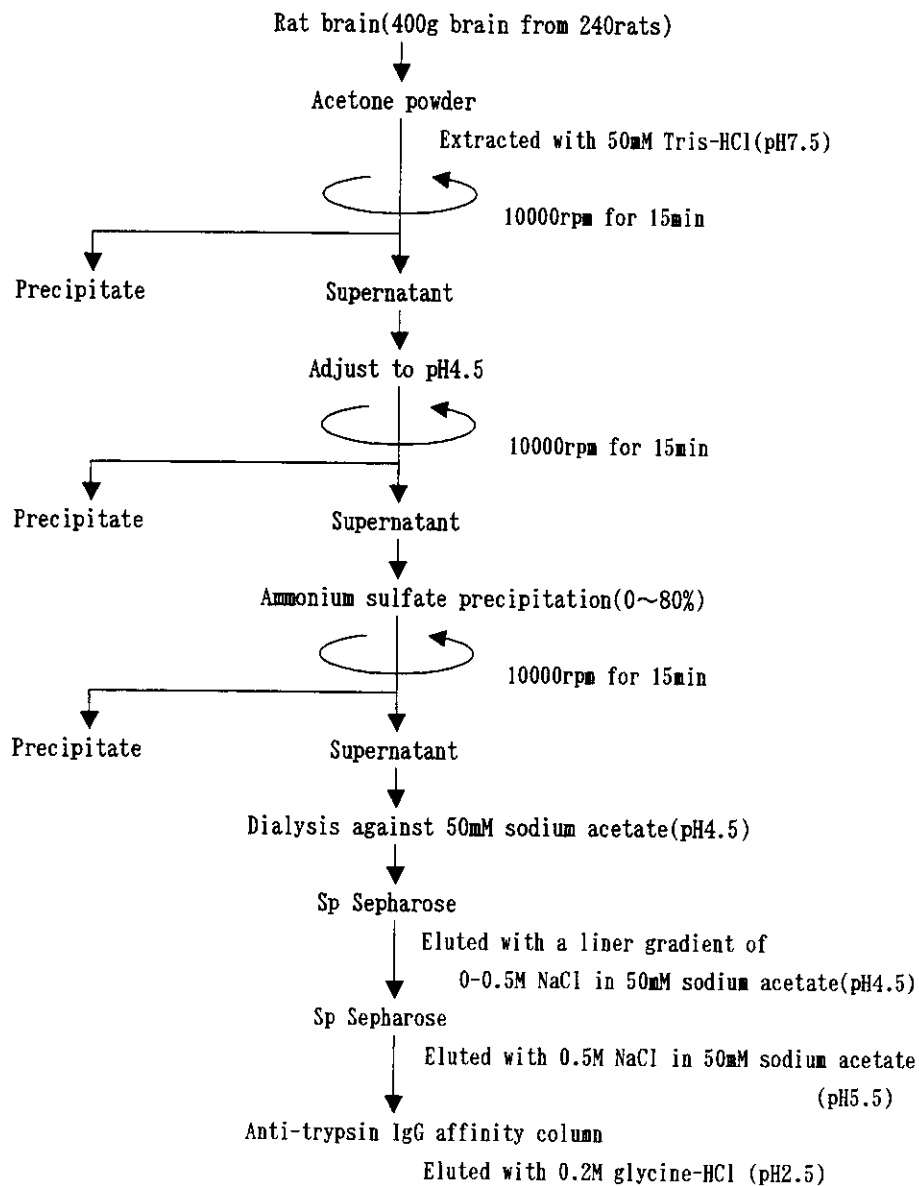
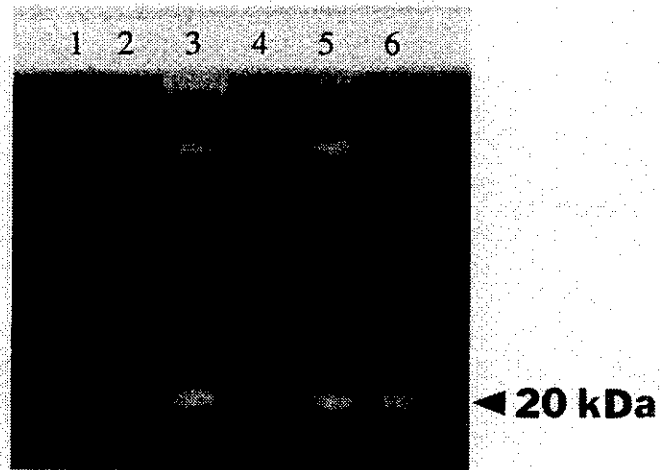


図6. ラット脳からのウイルス活性化トリプシン型プロテアーゼの精製法



- lane1: Molecular weight marker
- lane2: The flow - through fraction
from anti - trypsin IgG affinity colume
- lane3: The eluated fraction
from anti - trypsin IgG affinity colume
- lane4: The flow - through fraction
from anti - trypsin IgG affinity colume
- lane5: The eluated fraction
from anti - trypsin IgG affinity colume
- lane6: Rat pancreatic trypsin
- The flow - through fraction
from Sp Sepharose(pH5.5)
- The eluated fraction
from Sp Sepharose(pH5.5)

図7. ラット脳ウイルス活性化トリプシン型プロテアーゼのゼラチンザイモグラフィー

lane 2 と 4: 1 μ g のサンプルを使用

lane 3 と 5: 52 μ U のサンプルを使用

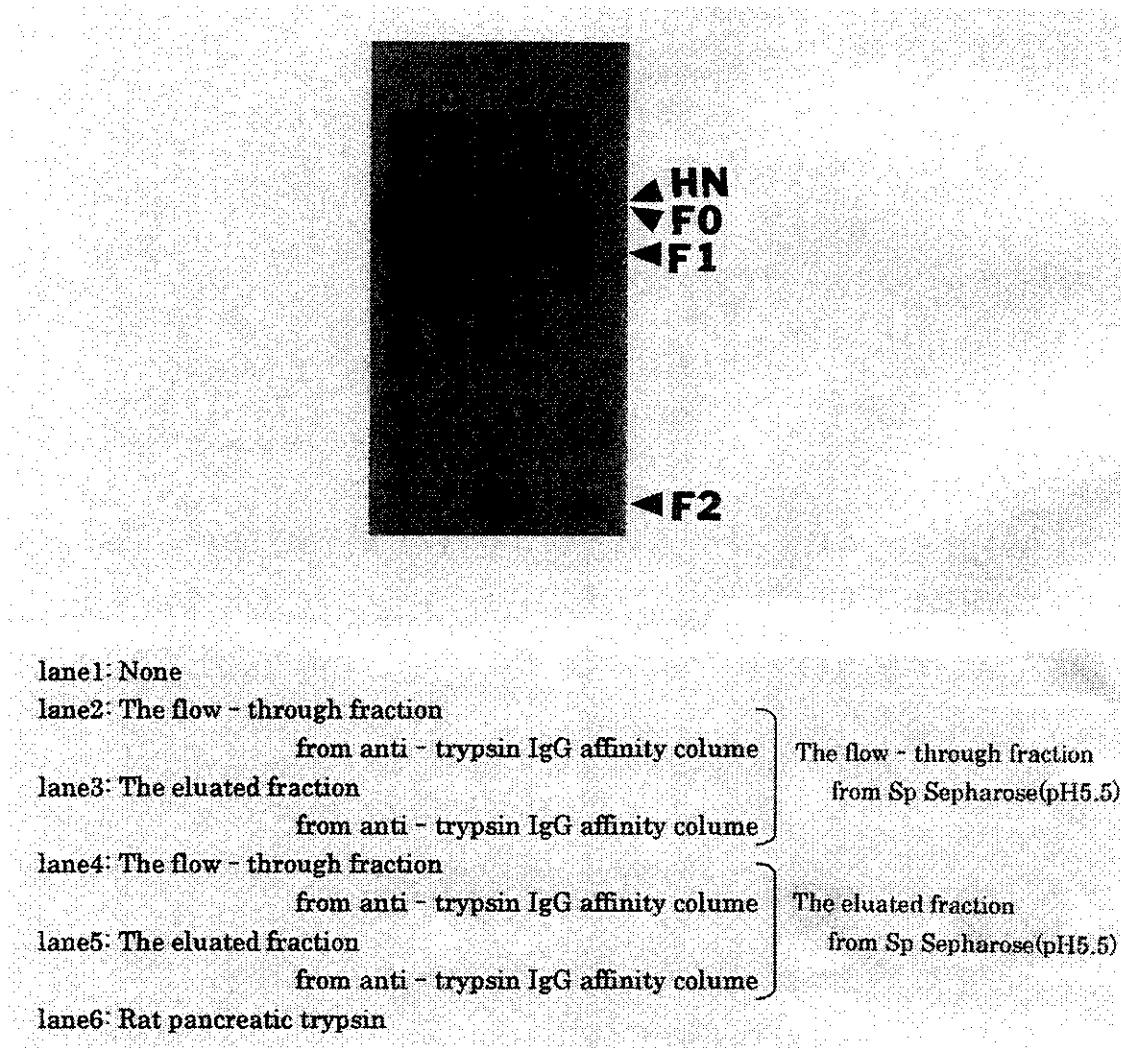


図 8 . $[^3\text{H}]$ glucosamine でラベルした Sendai ウイルスのラット脳ウイルス活性化
 トリプシン型プロテアーゼによる限定分解

lane 2 と 4: $1\ \mu\text{g}$ のサンプルを使用

lane 3 と 5: $52\ \mu\text{U}$ のサンプルを使用

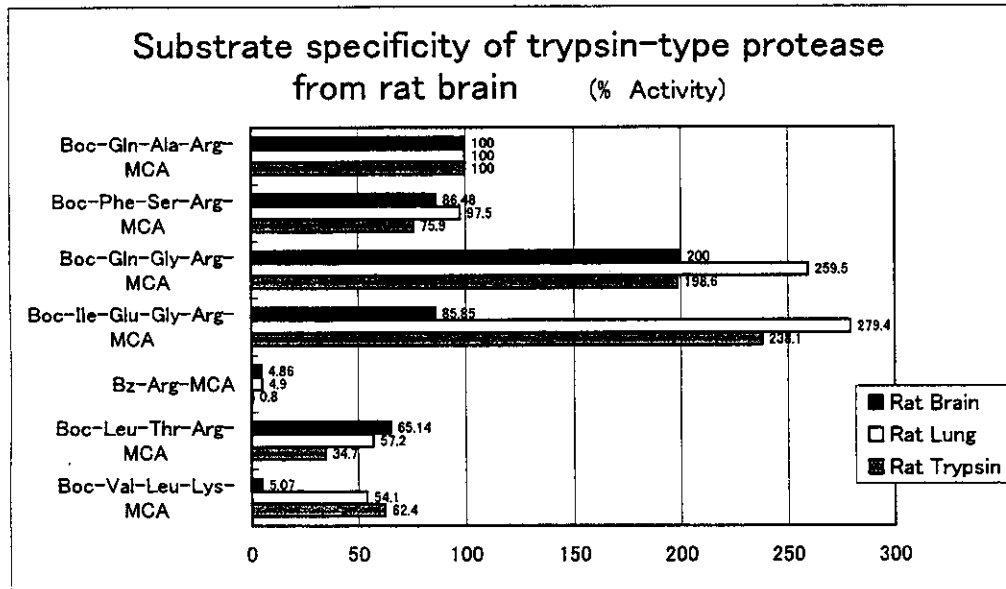


図9. ラット脳ウイルス活性化トリプシン型プロテアーゼ (SP Sepharose pH 5.5 の溶出画分) の基質特異性

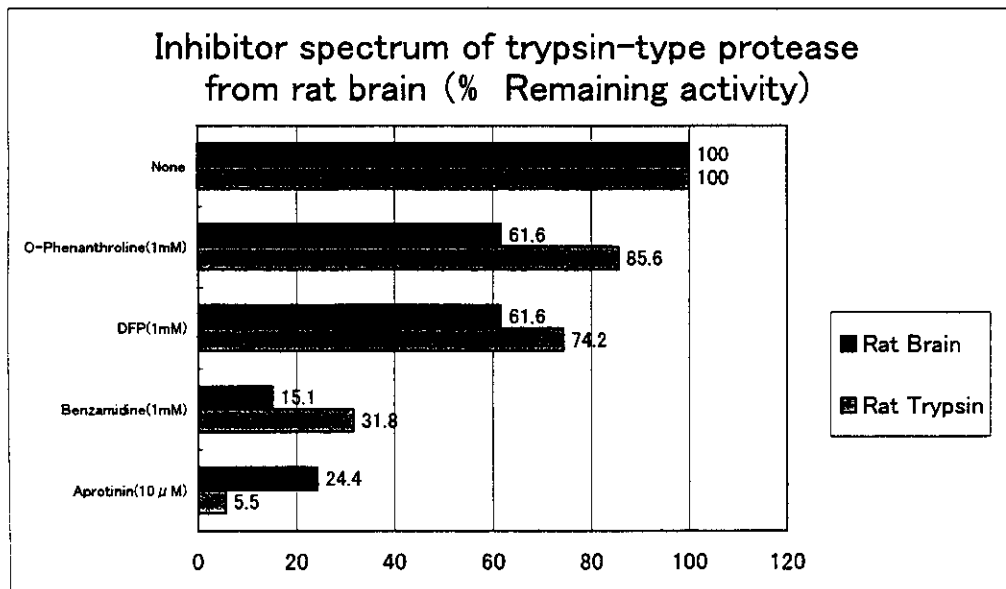


図10. ラット脳ウイルス活性化トリプシン型プロテアーゼ (SP Sepharose pH 5.5 の溶出画分) のインヒビター特異性

インフルエンザ脳炎・脳症実験動物モデルの作成

分担研究者 大内正信 川崎医科大学・微生物学教授

研究要旨： インフルエンザ脳炎・脳症の発症機構を明らかにするために動物モデル実験系の確立は不可欠である。我々は、種々のウイルス株と数種のマウス系統を用いて実験を重ね、離乳 ddY マウスとインフルエンザウイルス A/WSN/33(H1N1)株の組合わせで、ヒトのインフルエンザ脳炎・脳症と類似した病態を再現させることに成功した。WSN 株ウイルスを離乳 ddY マウスに経鼻感染後、解熱剤フェナセチンあるいはジクロフェナクナトリウムを投与すると、例数は少ないが激しい神経症状（痙攣、片マヒ、不随意運動）を表し死亡するマウスが出現した。ウイルスを静脈内に接種した場合には神経症状の発現例数が増加し、解熱剤投与無しでも神経症状を現すマウスが出現した。特筆すべきは、同一のウイルスを脳内に直接接種した群では、ウイルスが脳内で一過性に増殖するものの、目立った神経症状を表すこともなく、殆どのマウスは体重減少から回復して生き延びたことである。激烈な神経症状を表したマウスに共通して見られたことは肺内における高いウイルス価である。一方、脳内におけるウイルス価はまちまちで、検出されない例もあった。静脈内接種が神経症状を発現する効率が高いことから、インフルエンザウイルスが肺で増殖中に、ウイルスによる脳血管障害が起こった場合、あるいはそれを通してウイルスが脳内に侵入した場合、激烈な神経症状が発現する可能性が考えらる。このことから、発症に血中サイトカインが重要な役割りを果たしていることも予測される。今後、この実験系を基に、サイトカインの役割も含め、神経症状発現に及ぼす因子を更に詳しく解析することが必要である。

A. 研究目的

最近、小児科領域で注目を集めているが、その発症機構はほとんど解明されていない。問題点としては1) 脳炎・脳症を起こすウイルスは通常のインフルエンザウイルスとは異なるのか？2) ウイルスは脳内に侵入、感染を起こしているのか？3) もしそうだとすればその侵入経路は？4) 血中のサイトカインは発症にどう関与しているか？5) 解熱剤の関与はあるか？などが挙げられる。これらの課題の解析を通して、どのような条件が揃えばインフルエンザ脳炎・脳症が起きるのかを明らかに、その予防法と治療法を確立することが本研究の最終目的である。これらの課題を遂行するためには、先ず、ヒトのインフルエンザ脳炎・

脳症と類似した病態を示す、適当なモデル動物実験系が不可欠である。

我々は、種々のウイルス株と数種のマウス系統を用いて実験を重ね、モデル実験系の確立を目指して研究を展開している。

B. 研究方法

ウイルス株：インフルエンザウイルス A/Aichi/68(H3N2)野生株およびマウス馴化株、A/Osaka/981/98 (H3N2)株、A/Kurashiki/2/00(H1N1)株、A/WSN/33 (H1N1)株を MDCK 細胞あるいは発育鶏卵内で増殖させたものを使用した。

マウス：3～4 週齢の ddY (SLC) 、ICR (SLC) 、BALB/c (SLC) 系統の離乳雌マ

ウスを感染実験に使用した。

ウイルス感染方法：経鼻感染の場合はエーテル麻酔下に 10~30 μ l、経静脈感染の場合は尾静脈内に 0.1~0.2ml、脳内感染の場合はエーテル麻酔下に 50 μ l のウイルス液を接種した。

ウイルス感染価の測定：発症マウスから脳、肺、肝臓等を摘出し、ハサミと注射器を使って乳剤を作成し、3500rpm、5分遠心後、上清中のウイルス感染価を MDCK 細胞を用いてブラック法にて測定した。

解熱剤：フィナセチン 40mg/kg/day、ジクロフェナクナトリウム 20mg/kg/day を経口ゾンデで経食道投与、あるいは注射器で腹腔内投与した。

(倫理面への配慮) マウスを使った実験は、飼育環境の整備された医用生物センター内の専用の感染実験室内において行われた。すべての実験は川崎医科大学動物実験倫理委員会の承認を得たものである。

C. 研究結果

1. 神経症状発現マウス実験系の探索

最新臨床分離ウイルス A/Osaka/98 (H3N2)、A/Kurashiki/00(H1N1)株、および実験室継代ウイルス A/Aichi/68(H3N2)の野生株とマウス馴化株を、それぞれ ddY、ICR、BALB/c 系統の離乳マウスに、経鼻あるいは尾静脈内に接種して、神経症状の出現を観察した。接種ウイルスの感染価は 1×10^4 ~ 1×10^7 PFU/ml で、マウス馴化株を経鼻感染させた系では多くのマウスが肺炎を起こして死亡したが、それ以外の組み合わせでは何の症状も出現しなかった。また解熱剤投与を含め、いずれの組み合わせでも神経症状を表したマウスは皆無であった。

2. A/WSN 株ウイルス経鼻、尾静注感染による神経症状の出現

インフルエンザウイルス WSN 株は new born マウスの脳内に接種すると脳内で増殖してやがてマウスは死亡することが知られ

ている。我々は、離乳あるいは成熟マウスにおいて脳以外のところに接種したウイルスが脳内に侵入できるか否かを確認するため、脳内で増殖可能な WSN 株を用いて図 1 のごとく感染実験を行った。

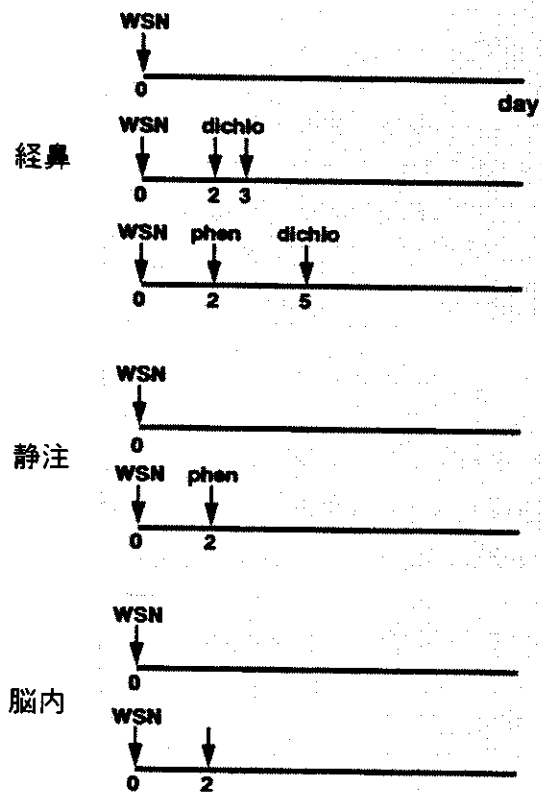


図 1. A/WSN 株感染実験

3~週齢の ddY マウスに MDCK 細胞で継代された WSN 株ウイルス (感染価 6×10^5 PFU/ml) を経鼻、尾静注、脳内接種した。dichlo : ジクロフェナクナトリウム、phen : フィナセチン

経鼻感染マウスは肺炎を起こして死亡するマウスとそこから回復するマウスが観察された。図 2 はそれらのマウスの体重変化を表したものである。体重の回復したマウスはすべて生き延びた。経鼻感染後に解熱剤を投与された群では、例数は少ないが、激的な神経症状 (けいれん、マヒ、不随意運動) を示すマウスが出現した(図 3 の実線)。

WSN 株ウイルスを尾静脈内に接種した群では、神経症状を表すマウスの割合は経鼻感染の場合よりはるかに高く、解熱剤の投

与なしでも激的な神経症状を表すマウスが出現した（図 4 の実線）。

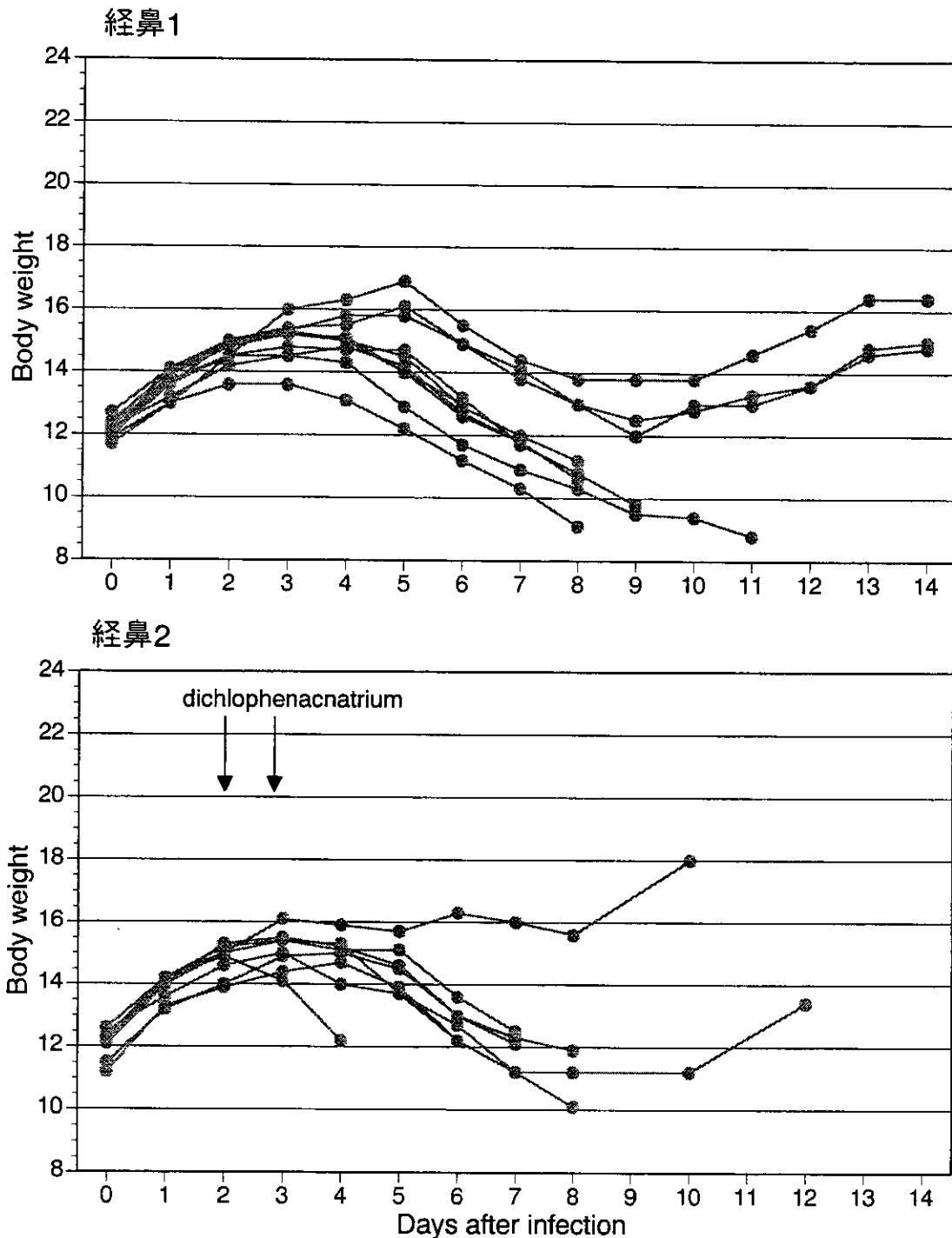


図 2. WSN 株ウイルス経鼻感染マウスの体重変化

インフルエンザ A/WSN 株ウイルス（感染価 6×10^5 PFU/ml）を 3 週齢の離乳 ddY マウスに、エーテル麻酔下、鼻腔内に $30 \mu\text{l}$ 接種した。

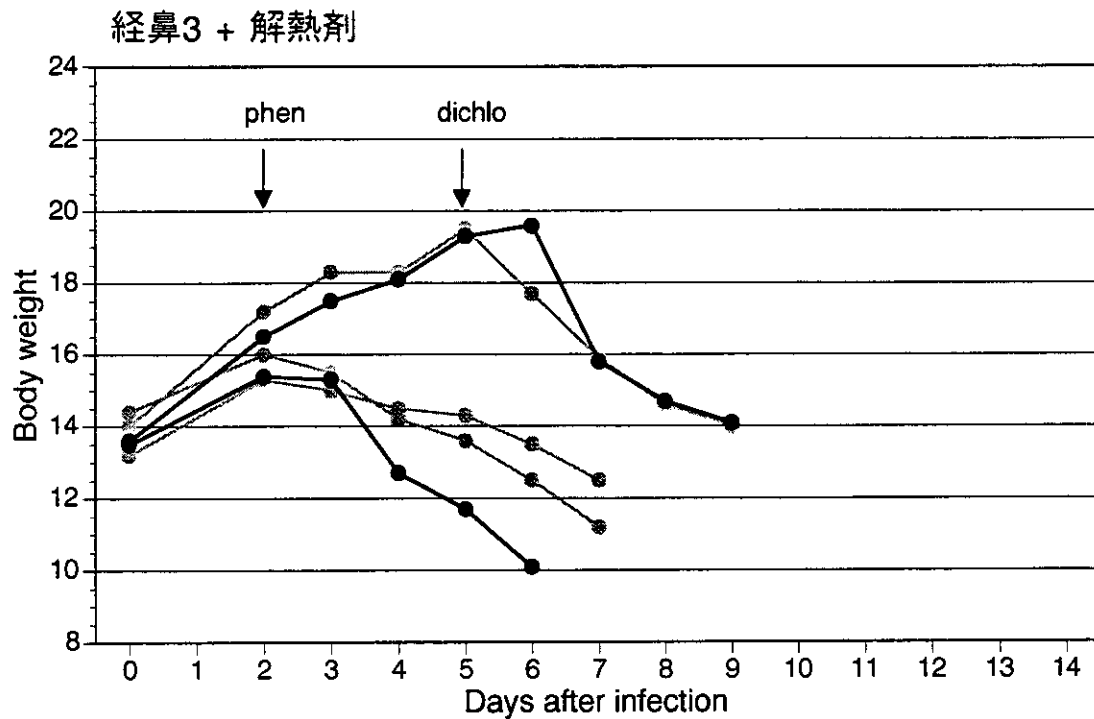
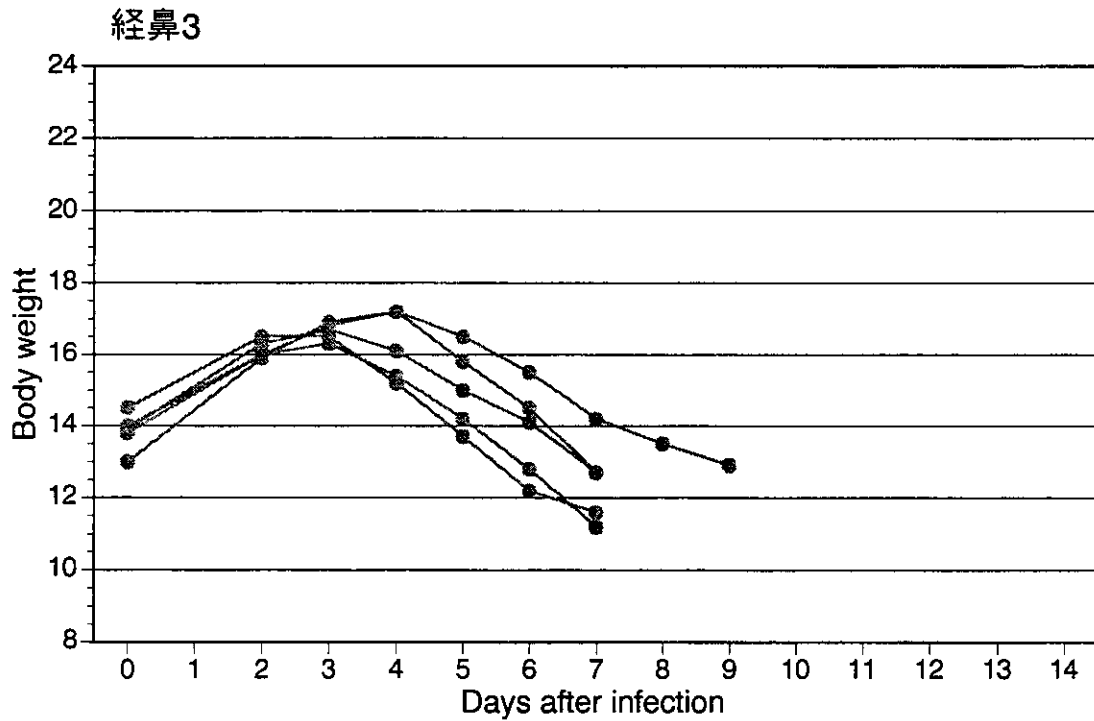


図 3. WSN 株ウイルス経鼻感染マウスの体重変化 (その 2)

インフルエンザ A/WSN 株ウイルス (感染価 6×10^5 PFU/ml) を 3 週齢の離乳 ddY マウスに、エーテル麻酔下、鼻腔内に $30 \mu\text{l}$ 接種した。フィナセチン、ジクロフェナクナトリウム投与については研究方法の項を参照されたい。実線は神経症状を表したマウス。

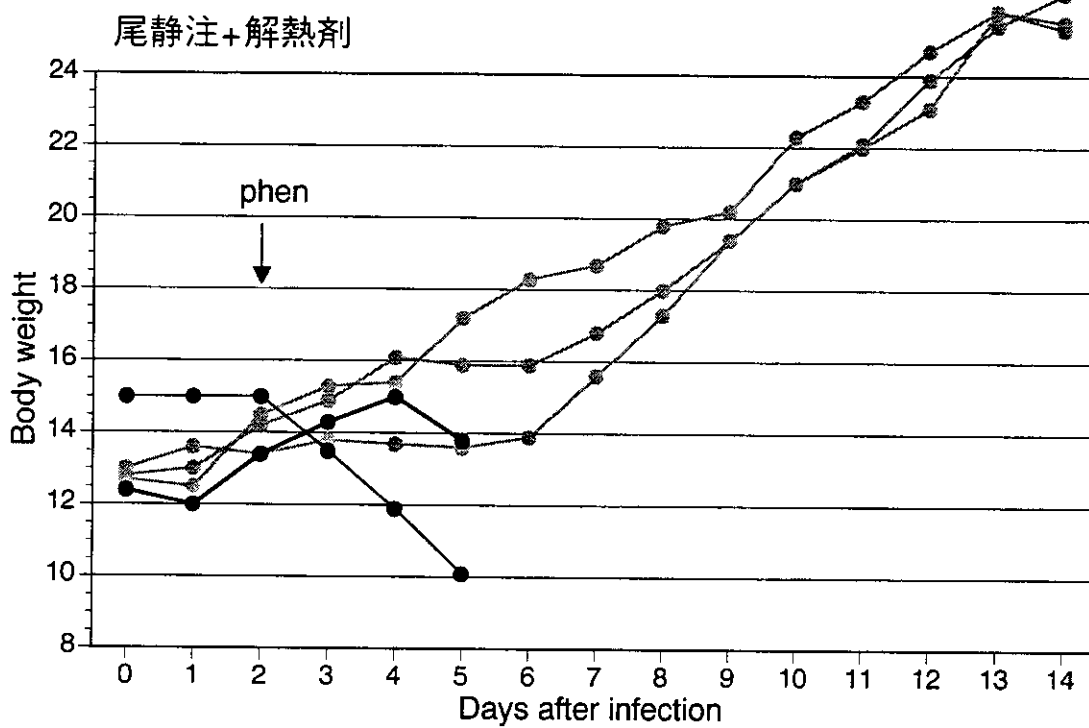
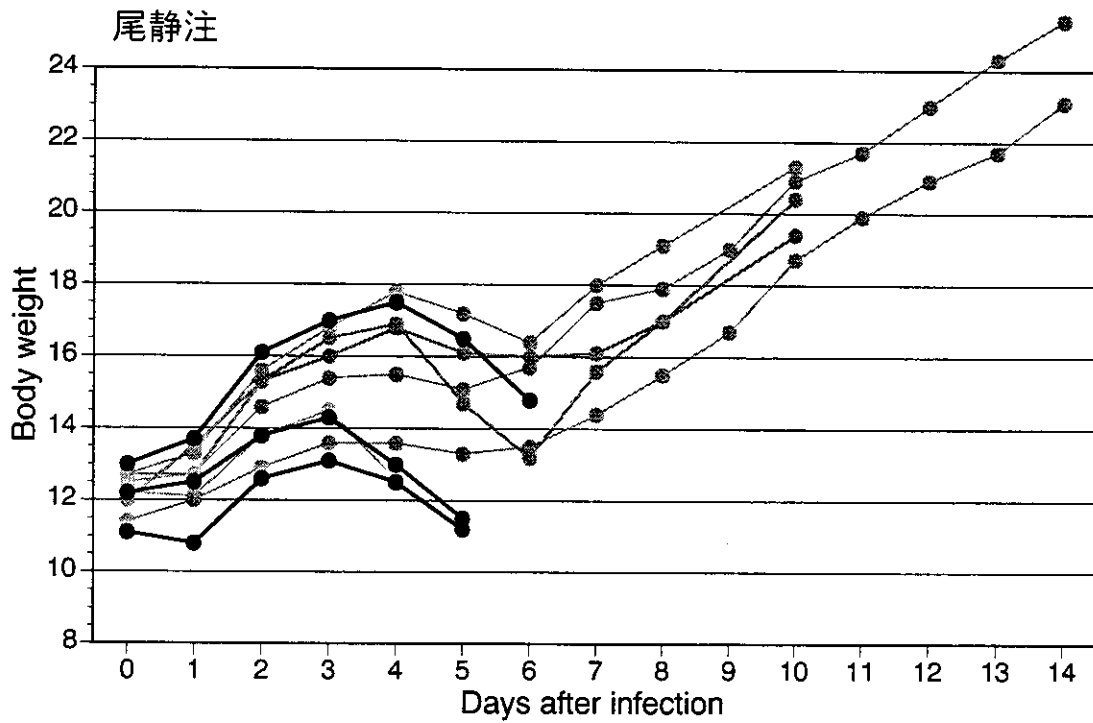


図 4. WSN 株ウイルス経静脈感染マウスの体重変化
 インフルエンザ A/WSN 株ウイルス (感染価 6×10^5 PFU/ml) を 3~週齢の離乳 ddY マウスの尾静脈内に 0.1ml 接種した。フィナセチン投与については研究方法の項を参照されたい。実線は神経症状を発現したマウス。

3. 神経症状発現マウスの肺および脳内のウイルス価の測定

神経症状を表しているマウス肺内のウイルス価は高く、ウイルスが盛んに増殖していることが分かる（表1参照）。しかしこれらのマウスの肺は、経鼻感染により肺炎を起こして死亡するマウスの肺と異なり、外見は正常でコンソリデーションを起こし

ていないように見えた。

一方、神経症状を表しているマウスの脳を摘出し、ウイルス感染価を測定したところ、その値はまちまちで、なかには全くウイルスが検出されないケースも見られた。

肺と脳内のウイルス価と肺重量を測定した成績の一部を表1にまとめた。

表1. マウス脳内、肺内のウイルス価および肺重量の比較

	脳内 (PFU)	肺内 (PFU)	肺重量 (g)
肺炎群	$<10^2$	4.0×10^5	0.37
	$<10^2$	1.8×10^5	0.31
	$<10^2$	7.0×10^4	0.37
	$<10^2$	2.0×10^4	0.39
脳炎脳症群	6.0×10^4	1.8×10^4	0.11
	3.0×10^3	1.3×10^5	0.11
	7×10^2	9.0×10^4	0.14
	$<10^2$	1.8×10^4	0.14
脳内接種群	1.3×10^3	$<10^2$	0.10
	7×10^2	$<10^2$	0.11
	$<10^2$	$<10^2$	0.10

脳重量はすべて $0.40\text{g} \pm 0.02$

驚くべきことに、WSN株ウイルスを直接脳内に接種した場合には、マウスは直ちに体重減少をきたし（次ページの図5参照）、マウス脳内でのウイルスの増殖も確認されたが、神経症状を表すマウスは皆無であり、ほとんどのマウスが一過性の体重減少を示した後、生き延びた。従って、離乳 ddY マウスにあっては脳内にウイルスが侵入し、そこでウイルスがある程度増殖しただけでは神経症状は出現せず、ウイルスはやがて脳内から消失して、マウスは生き延びることが分かった。ごく少数のマウスにおいて

は脳内接種後の体重減少が止まらずに死に至るケースが見られたが、その場合も神経症状の発現は見られなかった。

マウス12匹を用いて、脳内接種後のウイルスの増殖を見た実験では、接種2日目より脳内にウイルスが検出され、3日目にピークを迎えた後、4日目には減少し、接種5日後には脳内にウイルスは検出されなかった（data not shown）。今後さらに、マウスの例数を増やして、正確な感染価を測定する予定である。

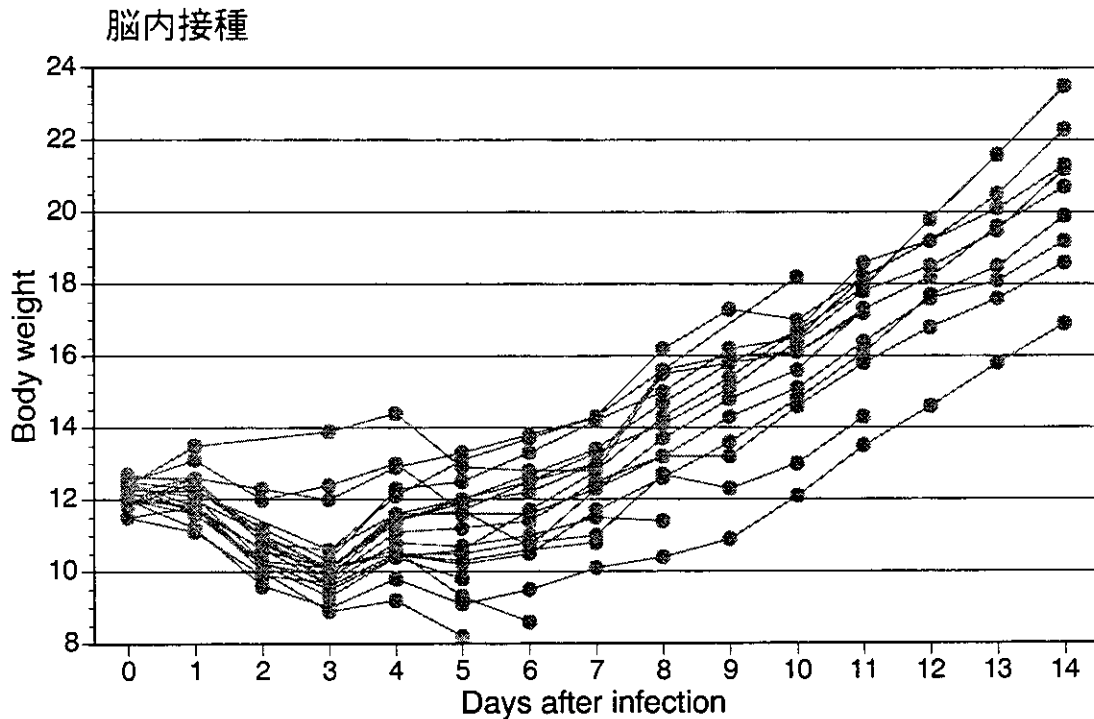


図 5. WSN 株ウイルス脳内感染マウスの体重変化

インフルエンザ A/WSN 株ウイルス (感染価 6×10^5 PFU/ml) を 3 週齢の離乳 ddY マウスに、エーテル麻酔下、大脳半球内に $50 \mu\text{l}$ 接種した。感染 2 日後にフィナセチンあるいはジクロフェナクナトリウムを投与した群もあるが、経過に全く影響を及ぼさなかったため、同一グラフ内にまとめて記載してある。

D. 考察

激烈な神経症状を表したマウスに共通して見られたことは肺内における高いウイルス価である。一方、脳内におけるウイルス価はまちまちで、検出されない例もあった。そして特筆すべきことは、脳内に直接ウイルスを接種した群では神経症状の発現が見られず、ウイルスは速やかに脳内から排除されてしまったことである。従って、単にウイルスが脳内に侵入して、そこで増殖しただけでは激しい神経症状は起こらないと考えられる。(ただし、極端に高い感染価のウイルスを脳内に大量接種した場合は別問題である。)

さらに、静脈内へウイルスを接種すると

神経症状を発現する効率が低いことなどを考え合わせると、インフルエンザ脳炎・脳症の発症機構として次のような作業仮説が考えられる。すなわち、インフルエンザウイルスが肺で盛んに増殖中に、ウイルス血症を起こして、それによって脳血管障害が起こった場合、あるいはそれを通してウイルスが脳内に侵入した場合に、激烈な神経症状が発現する可能性が考えられる。インフルエンザウイルス増殖中には高サイトカイン血症になっていることが予想されるので、これが発症に重要な役割りを果たしていることも考えられる。今後、この実験系を基に、サイトカインの役割そして解熱剤の関与も含め、神経症状発現に及ぼす因子を更

に詳しく解析することが必要である。

また、結果の中では触れなかったが、ウイルスの静脈内接種によって顕著な神経症状を表したにもかかわらず、後遺症を残したまま、あるいは後遺症を残すことなく生き延びたマウスも観察された。これは、ヒトのインフルエンザ脳炎・脳症にも見られることであり、どのような条件によって生き延びたのかを解析することも重要である。

E. 結論

本研究によって不完全ながらも、インフルエンザ脳炎・脳症に近い病態を再現するモデル実験動物系が得られた。

この系を通して、激しい神経症状の発現には、単に脳内にウイルスが侵入するだけでは不十分で、同時に肺における激しいウイルス増殖が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

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)

大内正信 HA と NA の相互作用. インフルエンザ 2 (1): 25-30. (2001)

Chen, Y., Shiota, M., Ohuchi, M., Towatari, T., Tashiro, J., Murakami, M., Yano, M., Yang, B., and Kido, H. Mast cell tryptase from pig lungs triggers infection by pneumotropic Sendai and influenza A viruses. Eur. J. Biochem. 267: 3189-3197. (2000)

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 (2):159-159-169. (2000)

大内正信. 抗ノイラミニダーゼ薬の薬効について. 治療学 34(1): 104. (2000)

2. 学会発表

大内正信、別所敏子、大森幸代、大内礼子. インフルエンザ脳炎・脳症動物モデル実験系作成の試み. 第 16 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウムー日米合同フォーラムー沖縄. (2001)