

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13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

厚生労働省

## まえがき

平成 14 年 1 月 21 日、鳥取中央病院に来院した 9 歳の女児がインフルエンザ脳炎で亡くなりました。家にあった解熱剤を服用して約 1 日後には意識がなくなるという急速な経過をとって死亡したケースで、インフルエンザ脳炎が強く疑われた。当研究班では、この患者の検体の解析と昨年続く動物実験から、インフルエンザ脳炎にはミトコンドリアの機能障害が関わっている疑いが高いと仮定して解析を進めている。理由には、発症する患者の多くが乳幼児か、発熱に伴う強い食欲不振と嘔吐があり、①いずれのケースも体内の ATP 産生のための主たる栄養源が、Glucose ではなくミトコンドリアの Free Fatty Acid の  $\beta$  酸化に依存しなくてはならない状況であること、②インフルエンザウイルス由来の蛋白質が多量にミトコンドリア内に蓄積され、ミトコンドリアの機能障害を誘発すること、③アスピリンはミトコンドリアの脂肪酸代謝の障害を引き起こすこと、などが挙げられる。全身のミトコンドリアの機能障害、特に遊離脂肪酸の代謝異常を誘発する条件で、脳炎を含めたインフルエンザの重症化に関する動物実験が行われた。さらに、神経向性とされているインフルエンザ A/WSN/33(H1N1)株と非神経向性株のインフルエンザ A/Aichi/2/68(H3N2)を経鼻感染と静脈感染、脳室内接種して、侵入経路の違いによる神経症状と生存率の違いの検討がなされた。インフルエンザ感染における脳浮腫の発症機序の解析が、TNF- $\alpha$ , IL-6 などのサイトカインとの関係、咽頭細菌との関わりから解析された。また以上のデータを基にしたインフルエンザ脳炎の治療法に関する動物実験が行われた。臨床例の解析では、平成 12 年末から平成 13 年始めにかけて全国の関連病院から送られてきた 19 例のインフルエンザ脳炎、脳症の疑いのある患者検体の解析が行われた。その中で 2 症例においてバルプロ酸ナトリウムの代謝産物が尿中に検出され、カルニチンの低下とミトコンドリアの機能障害を誘発すると推定される抗痙攣剤のバルプロ酸ナトリウムが誘因になっている可能性が示唆された。また最近インフルエンザウイルス遺伝子由来する新規タンパク質 PB1-F2 がミトコンドリアに多量に蓄積されることが報告されている。このような機能不明なウイルス由来するタンパク質の解析を進めるため、ヒト JC virus に由来する機能不明なタンパク質、agnoprotein の機能解析で実績のある北海道大学の長嶋和郎博士が新たに分担研究者として研究グループに加わった。

以上の研究が平成 13 年度に本班で行われ、インフルエンザ脳炎の発症と解熱剤による重症化の解析、それらの誘因の解析、急速な脳浮腫の発症因子の解析が行われ、インフルエンザ脳炎の発症機序の解析において新規な発見を含む成果を示すことができたと考えている。今後は、引き続き、インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の解析を解熱剤との関係から分子レベルで解析を進めると共に、脳症状、脳浮腫に対する具体的な治療法を提案したい。

平成 14 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

## 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13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）	川崎医大・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
長嶋和郎（分担研究者）	北海道大学医学部・分子細胞病理・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。 17

分担研究者：木戸 博 徳島大学分子酵素学研究センター  
研究協力者：Dengfu Yao, 奥村 裕司、山田 博司、川内 美樹、  
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・酵素分子化学部門）  
桑島 正道（徳島大学医学部・臨床検査医学）  
前川 洋一（徳島大学医学部・寄生虫学）

2. インフルエンザ脳炎・脳症実験動物モデルの作成 39  
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 51  
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・脳症発症機序の代謝異常解析と治療法の開発に  
関する研究 53

分担研究者：黒田 泰弘（徳島大学医学部・小児科学）  
研究協力者：山口 清次（島根医科大学・小児科学）  
吉田 一郎（久留米大学・小児科学）  
重松 陽介（福井医科大学・基礎看護学）  
内藤 悦雄（徳島大学医学部・小児科学）  
森 一博（徳島大学医学部・小児科学）

5. ウイルス性脳症の発症機序に関する研究 61  
分担研究者：長嶋 和郎（北海道大学医学部・分子細胞病理）

## 3、研究成果の刊行に関する一覧表

68

# 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：インフルエンザ脳炎・脳症、及びライ症候群発症の誘因解析が行なわれた。罹患者が授乳期の乳幼児を含む小児に限定され、多くの場合高熱、強い食欲不振と嘔吐のため、①体内 ATP 産生の主たる栄養源が、Glucose ではなくミトコンドリアでの遊離脂肪酸の  $\beta$  酸化に依存しなくてはならない状況であること、②インフルエンザウイルス由来の蛋白質(PB1-F2)が多量にミトコンドリア内に蓄積され、ミトコンドリアの機能障害を誘発すること、③アスピリンはミトコンドリアの脂肪酸代謝の障害を引き起こすことから、ミトコンドリアでの遊離脂肪酸代謝異常がインフルエンザ脳炎の誘因になるか否かの検討がなされた。遊離脂肪酸代謝異常を誘発するカルニチンアンタゴニスト処理マウスとカルニチントランスポーター欠損症マウスを用いた実験から、脂肪酸代謝障害は成熟マウスに影響を与えないが、Newborn と離乳期マウスでは非神経向性インフルエンザウイルスの経鼻感染であるにもかかわらず、脳内ウイルスゲノムコピー数の著明な増加と脳浮腫が観察された。臨床検体からは、インフルエンザ脳炎患者の尿中に体内カルニチンの低下を引き起こす抗痙攣剤のバルプロ酸代謝産物が検出される例がみられるなど、発症危険因子としてミトコンドリアの遊離脂肪酸代謝異常が確認された。非神経向性インフルエンザウイルス株の経鼻感染と経静脈感染では、脳の血管内皮でのウイルス抗原の蓄積と脳浮腫が確認されウイルス性血管炎の病態を示したが、脳の実質には広がらなかった。これに対して神経向性インフルエンザウイルス WSN 株では、脳の血管内皮だけに留まらず脳実質にまで広がり、激しい神経症状を引き起こした。脳浮腫の発症原因として TNF- $\alpha$  と IL-6 について検討がなされた。ラット頸動脈を用いた *in vitro* のシステムでは、これらのサイトカインはラット頸動脈の弛緩と拡張を引き起こすことが確認され、浮腫の誘因と推定された。しかし抗 TNF- $\alpha$ 、抗 IL-6 抗体を *in vivo* に投与してもマウスに生存率、神経症状の改善は見られず、今後さらなる検討が必要である。抗サイトカイン抗体を含め、グリチルリチン、ノイラミニダーゼ阻害剤、ウイルス中和抗体による治療効果の検討がなされた。その結果、ウイルス中和抗体による血清療法で最も著しい延命効果と神経症状の改善が認められた。またインフルエンザ脳炎の発症が小児に特徴的であることから、成人と大きな違いを示す咽頭内細菌叢の検索と細菌付着率の検討がなされ、データの集積が進行している。本年度から班員に、ヒト JC virus に由来する機能不明なタンパク質、agnoprotein の機能解析で実績を挙げている北海道大学の長嶋和郎博士が加わり、ミトコンドリアに蓄積される機能不明なインフルエンザウイルス由来の蛋白質(PB1-F2)の機能解析の検討が始まった。

## 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)

長嶋和郎 (北海道大学医学部・分子細胞病理)

## 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って脳炎・脳症がどのような機序で発症するかについて、①その発症機序の解析、発症の誘因となる因子の中で、発症年齢にかかわる因子、代謝異常症の有無、ライ症候群の誘因となるアスピリンや抗痙攣剤の作用機序の検討がなされた。さらに、②現在一般に見られるインフルエンザ脳炎が、非神経向性のインフルエンザウイルスであるにもかかわらず、神経症状を引き起こす機序の解明とウイルス侵入経路の解析。③急速の脳浮腫の病因の解析と治療法の確立。以上を研究目標として組織された。本年度は昨年度確立したインフルエンザ脳炎モデル動物を用い、ライ症候群とインフルエンザ脳炎の誘因解析を行った。具体的には、罹患する患者の多くが授乳期の乳幼児や、授乳期以後の小児でも発熱に伴う強い食欲不振と嘔吐があり、体内の ATP 産生の主たる栄養源が Glucose ではなく、ミトコンドリアでの遊離脂肪酸の $\beta$ 酸化に依存しなくてはならない状況であること。さらに、インフルエンザウイルス由来の蛋白質(PB1-F2)が多量にミトコンドリア内に蓄積され、ミトコンドリアの機能障害を誘発すること。アスピリンはミトコンドリ

アの脂肪酸代謝の障害を引き起こすこと。以上を背景に、ミトコンドリアでの遊離脂肪酸代謝異常がインフルエンザ脳炎の誘因になるかの検討がなされた。さらに従来神経向性と言われていたインフルエンザWSN/(H1N1)株と非神経向性のインフルエンザウイルス Aichi/68(H3N2)株を用いて、脳内でのウイルス抗原の分布と神経症状、および脳内への侵入経路の検討が行われた。脳浮腫の原因解明と治療法は、TNF- $\alpha$ と IL-6などのサイトカインについて作用機序の検討、抗インフルエンザ薬とウイルス中和抗体の検討がなされた。

## B. 研究方法

動物実験には、神経向性インフルエンザ A/WSN/33(H1N1)株と非神経向性株インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株を経鼻感染、静脈内投与、脳室内投与方法により、以下のマウスに感染させた。脳炎発症の年齢による影響を検討するため、C57BL/6J と Juvenile Visceral Steatosis (JVS) C57BL/6J の Newborn (生後2日目)、離乳期(3週齢)、成熟(6週齢)、及び DDY (SLC) (3-4週齢)マウスを用いて検討した。解熱剤には、Diclofenac Sodium (Sigma)を、カルニチンアンタゴニストとして $\beta$ -(2,2,2-trimethyl-hydrazium)

propionate (THP) を使用した。

インフルエンザ脳炎による脳浮腫は Evance Blue を用い、インフルエンザウイルス RNA の定量は、蛍光標識 probe を用いた Real Time PCR でウイルス Hemagglutinine (HA) のコピー数を測定した。脳浮腫と神経症状の改善の検定には、抗マウス IL-6, 抗 TNF- $\alpha$ 抗体 (Upstatebiotechnology 社)、グリチルリチン (Wako 社)、ノイラミニダーゼ阻害剤のオセルタミビル (GS4104, ロッシュ社)、ザナミビル (GC167, グラクソウエルカム社)、抗 WSN 抗血清を検討した。(倫理面への配慮) 主治医の十分な説明の基に、検体の提供に同意した患者あるいは保護者の同意を得た後に、検体を採取して測定を行った。マウスを用いた動物実験は、実施した大学の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果の概略

研究は次ぎに示す幾つかの柱を中心に遂行され、以下の成果が挙げられた。

(I) ミトコンドリアの遊離脂肪酸代謝異常はインフルエンザ脳炎の誘因となる。

インフルエンザ脳炎・脳症、及びライ症候群の発症は、授乳期の乳幼児を含む小児に限定され、多くの場

合高熱、強い食欲不振と嘔吐を伴う。

このような状態では、①体内の ATP 産生の主たる栄養源が、Glucose ではなくミトコンドリアでの遊離脂肪酸の  $\beta$  酸化に依存しなくてはならないこと、②インフルエンザウイルス由来の蛋白質(PB1-F2)が多量にミトコンドリア内に蓄積され、ミトコンドリアの機能障害を誘発すること、③アスピリンはミトコンドリアの脂肪酸代謝の障害を引き起こすこと、以上の背景から、ミトコンドリアでの遊離脂肪酸代謝異常がインフルエンザ脳炎の誘因になるか否かの検討がなされた。ミトコンドリアでの可逆的な遊離脂肪酸代謝異常を誘導する確立されたシステムとして、長鎖脂肪酸のミトコンドリアへのトランスポートに必須なカルニチンのアンタゴニスト、 $\beta$ -(2,2,2-trimethylhydrazium) propionate (THP)を5日間処理したマウスの確立されたモデルシステムと、細胞膜のカルニチントランスポーターの遺伝的欠損症マウスのシステムを用いた。非神経向性株インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株を経鼻感染させ、これらのマウスで脳炎の発症を検討した。ミトコンドリアの遊離脂肪酸代謝異常は、インフルエンザ感染の増悪と脳浮腫、脳内でのウイルスゲノムコピー数を著明に増加させ生存

率の低下を導いたが、これらの現象は Newborn マウスと離乳期のマウスのみ認められ成熟マウスでは見られず、あきらかな年齢依存性を示した。授乳期と離乳期のマウスでは、栄養を主として乳汁などの脂肪に依存しておりミトコンドリアでの遊離脂肪酸代謝異常が体内状態に大きな影響を与え易い年齢と推定された。ミトコンドリアの脂肪酸代謝の障害を引き起こすアスピリンは、授乳期と離乳期のマウスでのみ感染を増悪させ生存率を低下させた。なをインフルエンザ脳炎の疑われた患者の尿から、カルニチンの低下を誘導する抗痙攣剤のバルプロ酸ナトリウムの代謝産物が検出されており、今後危険因子としての可能性を注意深く見守らねばならない。

## (II) 非神経向性株インフルエンザウイルス A/Aichi/68(H3N2)の脳内侵入は、血管内皮に限局される。

本来気道に感染親和性を示す非神経向性インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)ウイルス株であつても、ミトコンドリアの脂肪酸代謝の障害を伴う場合には感染トロピズムは肺に留まらず脳内にも侵入することが明らかになった。ウイルスはこの場合、脳の実質にまで浸潤することはなく血管内皮に限局された。一方、神経

向性インフルエンザウイルス株の場合、脳の血管内皮に留まることなく脳の実質にまで侵入して強い神経症状を示し、両者の間で病巣部位の広がりの違いを示した。ミトコンドリアの脂肪酸代謝障害を伴う脳の血管内皮で、どのような機序でウイルスが増殖し易い環境ができるのかまだ不明であるが、ウイルス抗原の検出に先立って脳の浮腫が検出されることからウイルスの血管内皮での増殖が、血液—脳血管関門の障害を引き起こしていることが考えられた。昨年度の研究から、ミトコンドリアの脂肪酸代謝障害を伴う脳の血管内皮では、肺炎の進行に伴って多量のミニプラスミンが血管内皮に蓄積されることが明らかになっている。このミニプラスミンは、インフルエンザウイルスの増殖サイクルを促進するだけでなく、血液—脳血管関門の障害を引き起こすことからインフルエンザ脳炎発症の一因と考えられる。

## (III) サイトカインによる血管内皮細胞の障害と脳浮腫。

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、血球貪色症候群が観察され、TNF- $\alpha$ , IL-6 などのサイトカインと血管内皮の E-selectin 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- $\alpha$  の効果を in vitro の系で検討した。その結果、TNF- $\alpha$  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。また TNF- $\alpha$  と IL-6 のミトコンドリアのエネルギー代謝に及ぼす影響を培養リンパ球で検討したが、これらのサイトカインはエネルギー代謝には影響を及ぼさなかった。一方 TNF- $\alpha$  と IL-6 の体内での作用を中和するため抗 TNF- $\alpha$  と IL-6 中和抗体を投与した動物実験では、神経症状の発現抑制効果も生存率の改善効果も認められず、感染初期に抗 TNF- $\alpha$  抗体を投与した系では、むしろ死亡率が上昇する傾向が見られた。

#### (IV) 咽頭内細菌叢のプロテアーゼとインフルエンザ感染の増悪

学童期以前の幼児期の小児では、常在細菌と病原細菌が共に多く咽頭に付着していることが明らかになった。このような付着菌の増加は菌の分泌するウイルス活性化プロテアーゼの増加を導き、気道でのインフルエンザの感染増悪に結びつくと考えられる。そこで、付着菌の増加の原因を解明すると共にインフルエンザ

感染の増悪機序の解明を進めている。

#### (V) ウイルス性脳症の発症機序とウイルス蛋白質

ウイルス性脳症の発症には、ウイルスに由来する蛋白質が直接関与する可能性が示唆されている。インフルエンザウイルスでは、新規のインフルエンザ蛋白質 PB1-F2 がミトコンドリアに蓄積され細胞のアポトーシスを誘導することが 2001 年 Nature Medicine に報告された。PB1-F2 の作用機構についてはまだ不明な点が多く、今後ミトコンドリアの機能不全、ミトコンドリア内の遊離脂肪酸代謝異常との関係を明らかにして行く必要がある。一方、中枢神経系の oligodendrocyte に感染して脱髄性脳症を引き起こすヒト JC virus では、ウイルス産生蛋白質、Agno protein の機能解析が注目されている。これまでの解析から Agno protein は核内外を移行して、細胞質では tubulin と結合、核内では DNA と結合して転写を制御していると予想されている。今後インフルエンザウイルスの PB1-F2 についてもミトコンドリアへの蓄積機序の解析、ミトコンドリア機能障害の作用機序の解析を進める。

#### (VI) 臨床検体の解析

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

われた患児 19 例の尿、血清及び乾燥血液濾紙の有機酸、脂肪酸、アシルカルニチン、アミノ酸を定量した。これまでのところ、先天性代謝異常及び本症に特有な後天性代謝異常はみいだせなかった。しかし 19 例中 2 例で抗痙攣薬のバルプロ酸ナトリウムの代謝産物が検出され、バルプロ酸ナトリウムがカルニチン低下症を介したミトコンドリア内の遊離脂肪酸代謝異常を誘導すると言われていたことから、今後のさらなる追跡が必要である。

#### D. 考察

インフルエンザ脳炎・脳症、及びライ症候群の発症が、授乳期の乳幼児を含む小児に限定され、多くの場合高熱や強い食欲不振と嘔吐を伴う。このような状態では、①体内の ATP 産生の主たる栄養源が、Glucose ではなくミトコンドリアでの遊離脂肪酸の $\beta$ 酸化に依存しなくてはならないこと、②インフルエンザウイルス由来の蛋白質(PB1-F2)が多量にミトコンドリア内に蓄積され、ミトコンドリアの機能障害を誘発すること、③アスピリンはミトコンドリアの脂肪酸代謝の障害を引き起こすことから、ミトコンドリアでの遊離脂肪酸代謝異常がインフルエンザ脳炎の誘因になるか否かの検討がなされた。その

結果、ミトコンドリアの遊離脂肪酸代謝異常を誘発した場合、本来脳に感染トロピズムを示さない非神経向性インフルエンザウイルス株でも、経鼻感染で脳の血管内皮に感染してウイルス抗原の蓄積と脳浮腫が確認された。さらにウイルス感染トロピズムを気道から脳へ変える誘因として、昨年度の研究からミニプラスミンの脳血管内皮での蓄積を考えているが、ミトコンドリアの遊離脂肪酸代謝異常でなぜミニプラスミンが脳血管内皮で増加するか、今後血管内皮細胞の接着因子を中心に検索を進める。

一方これまでに解析した 19 例の臨床検査（死亡例なし）からは、アシルカルニチンの異常を示す例はなく、カルニチン代謝以外の理由によるミトコンドリア機能の異常が誘因になることも含め今後検討して行く必要がある。しかし、平成 14 年 1 月 21 日、鳥取中央病院で扱ったインフルエンザ脳炎の死亡例では、血中のアシルカルニチンの軽度増加が認められ、Carnitine palmitoyltransferase II の異常が疑われており、カルニチンの関与したミトコンドリア機能不全の可能性が高く、現在解析を進めている。

これまでライ症候群を除くとインフルエンザ脳炎に関する報告が欧米

でほとんどなく、我が国のみでインフルエンザ脳炎・脳症が報告されていることから、ライ症候群とインフルエンザ脳炎・脳症との区別、及び発症機序の解明が望まれていた。インフルエンザウイルスの中には、歴史的に見ると明らかに神経親和性の感染トロピズムを示すウイルスが存在しており、動物実験でも確認されその原因について解析が進んでいる。しかし現在流行している香港かぜ（H3N2）型やソ連かぜ（H1N1）型のウイルスでは、神経親和性は報告されていない。そこで体内に侵入した後、気道親和性のウイルスが神経親和性に変異する可能性も否定できないが、神経症状が感染直後から見られることから、別の原因と考えている。これまでの研究から、何らかの理由でミトコンドリアの機能が障害されると、本来気道で発現していたウイルス活性化蛋白質分解酵素（ミニプラスミン）が脳の血管でも発現して、ウイルスは脳へも親和性を示すように変異することが示唆される。但しこの場合、ウイルスは脳の血管内皮でのみ増殖し、神経向性のインフルエンザウイルスのように脳の実質にまで侵入しない。今後、血管内皮のウイルス増殖と脳浮腫、血液—脳血管関門障害との関係を明らかにして行く必要がある。一方、脳浮腫

の発症原因の解明として、TNF- $\alpha$ とIL-6 による血管拡張作用と脳浮腫について、*in vitro* の系と *in vivo* の系で解析された。TNF- $\alpha$ と IL-6 による血管拡張作用が *in vitro* で認められるものの、抗 TNF- $\alpha$ と 抗 IL-6 中和抗体の作用が *in vivo* で認められないことから、今後さらなる解析が必要である。

治療についていくすかの試みも行われた。中でも中和抗体による血清療法が最も効果的で、ノイラミニダーゼ阻害剤（抗インフルエンザ薬）も効果を示した。脳の浮腫を主症状とするインフルエンザ脳炎に対して、浮腫を効果的に抑制する方法はまだ見い出されておらず、今後の課題である。

## E. 結論

インフルエンザ脳炎・脳症の発症が特に小児で好発する年齢依存性と、高熱、強い食欲不振と嘔吐を伴う場合の多いことから、誘因としてミトコンドリアの遊離脂肪酸の代謝異常を疑ってモデル動物で検討した。その結果、ミトコンドリアの遊離脂肪酸の代謝異常を誘発した動物実験では、本来脳に感染トロピズムを示さない非神経向性インフルエンザウイルス株でも、経鼻感染することで脳の血管内皮でウイルス抗原が蓄積さ

れ、脳浮腫が確認された。これに対して神経向性インフルエンザウイルス WSN 株では、ウイルスは脳の血管内皮だけに留まらず、脳実質にまで広がり激しい神経症状を引き起こした。TNF- $\alpha$ と IL-6 は動脈の弛緩と拡張を引き起こし、脳浮腫の発症原因になりうる事が確認されたが、抗 TNF- $\alpha$ 、抗 IL-6 中和抗体の効果は *in vivo* で確認できなかった。ウイルス中和抗体、ノイラミニダーゼ阻害剤は、神経症状の改善など治療効果を示した。臨床検体の解析からは、19 例中 2 例にミトコンドリアの機能不全を誘発する可能性のある抗痙攣薬バルプロ酸ナトリウムの代謝産物が検出された。

#### F. 健康危険情報

インフルエンザ感染の重症化と脳炎の危険因子として、ミトコンドリアの遊離脂肪酸代謝異常とミトコンドリア機能障害が明らかになった。具体的には、カルニチン欠乏症を誘発する抗生物質、抗痙攣薬、その他の薬物、腎臓透析、アスピリンなどが考えられる。さらに発熱、嘔吐による飢餓状態は、エネルギー産生系を遊離脂肪酸代謝依存性として、上記の薬物障害が出易い状態を形成する。

#### G. 研究発表

##### 1 : 論文発表

- 1) 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. *Genes to Cell*. 6 (2), 87-97, (2001)
- 2) 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*. 1518 (1-2), 204-209, (2001)
- 3) 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*. 268 (10), 2847-2855 (2001)
- 4) Hara, K., Shiota, M., Kido, H., Ohtsu, Y., Toyoda, T.: Protease activity of influenza virus RNA polymerase PA subunit. *Int. Congress Series* 1219, 479-485 (2001)
- 5) Kondo, S., Kagami, S., Kido, H.,

- Strutz, F., Muller, G.A., and Kuroda, Y.: Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 1668-1676 (2001)
- 6) Wakabayashi, H., Yano, M., Tachikawa, N., Oka, S., Maeda, M., and Kido, H.: Increased concentrations of 14-3-3  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , and  $\zeta$  isoforms in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neuronal destruction. *Clinica Chimica Acta* 312 (1-2), 97-105 (2001)
- 7) 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の解析日本病院薬剤師会雑誌 11, 7-13 (2001)
- 8) 木戸博：プロテアーゼとプロテアーゼインヒビターが決定する、インフルエンザウイルスの感染と防御、第 15 回大学と科学公開シンポジウム組織委員会編、“タンパク質分解の不思議” グバプロ p. 105-119 (2001)
- 9) 木戸博、鳥居新平：生体防御物質の気道分泌を促進する去痰剤の抗インフルエンザ効果と今後の展望日経メディカル 30 (11), 93-96 (2001)
- 10) 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 5 (6): 21-24, 2001.
- 11) 松島敏春、二木芳人、国富泰二、小倉英郎、大内正信。Medical Tribune (2001.11.22), 第2部1-8, 2001.
- 12) Naito E., Ito M., Yokota I., Saijo T., Ogawa Y., Shinahara K., Kuroda Y. Gender-specific occurrence of West syndrome in patients with pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Neuropediatrics* 32: 295-298, 2001.
- 13) Yamaguchi S., Iga M., Kimura M., Suzuki Y., Shimosawa N., Fukao T., Kondo N., Tazawa Y., Orii T. Urinary organic acids in peroxisomal disorders: a simple screening method. *J. Chromatogr. B* 758: 81-86, 2001.
- 14) S. Sato, K.Oishi, A.Iwagaki, M.Senba, T. Akaike, M.Akiyama, N. Muakida, K. Matsushima, T.Nagatake: Dexamethasone impairs pulmonary defence against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS gene expression and peroxyhitrite production in mice. *Clin.Exp. Immunol.* 126. 266-273. 2001
- 15) Cheikh Tidiane Ndour, Kamruddin Ahmed, Tomomi Nakagawa, Yamaji Nakano, Akitoyo Ichinose, Gulnur Tarhan, Masamichi Aikawa, Tsuyoshi Nagatake: Modulating effects of mucoregulating

- drugs on the attachment of *Haemophilus influenzae*. *Microbial Pathogenesis*. 30,121-127, 2001
- 16) 永武毅：呼吸器感染症の分子医学 4. インフルエンザ感染と予防薬：新しい病態解析と予防法. *日本胸部臨床*, 60 (S) 18-23. 2001
- 17) Okada, Y., Endo, S., Takahashi, H., Sawa, H., Umemura, T., and Nagashima, K. Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirol*, 7: 302-306., 2001.
- 18) Safak, M., Barrucco, R., Darbinyan, A., Okada, Y., Nagashima, K., and Khalili, K. Interaction of JC virus agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *J Virol*, 75: 1476-1486., 2001.
- 19) Hayashi H, Endo S, Suzuki S, Tanaka S, Sawa H, Ozaki Y, Sawamura Y, Nagashima K: JC virus large T protein transforms rodent cells but is not involved in human medulloblastoma. *Neuropathology* 21: 129-137, 2001
- 20) Suzuki, S., Sawa, H., Komagome, R., Orba, Y., Yamada, M., Okada, Y., Ishida, Y., Nishihara, H., Tanaka, S., and Nagashima, K. Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. *Virology*, 286: 100-112., 2001
- 21) Yang, B., Yao, D.F., Ohuchi, M., Ide, M., Yano, M., Okumura, Y., and Kido, H.: Ambroxol suppresses influenza-virus proliferation in the mouse airway by increasing antiviral factor levels. *Eur. Respir. J.* 19 (5), 1-7, (2002)
- 22) Towatari, T., Ide, M., Ohba K., Chiba, Y., Murakami, M., Shiota, M., Kawachi, M., Yamada, H., and Kido, H.: Identification of ectopic anionic trypsin I in rat lungs potentiating pneumotropic virus infectivity and increased enzyme level after virus infection. *Eur. J. Biochem.* in press (2002)
- 23) 木戸博、唐渡孝枝、山田博司：インフルエンザウイルスの感染増悪を制御する生体内プロテアーゼインヒビター *Molecular Medicine* 39 (1), 48-53 (2002)
- 24) 木戸博、Bing Yang, 井手美喜子、奥村裕司、山田博司：生体防御物質の気道内分泌を促進する塩酸アンブロキソールの抗インフルエンザ効果 呼吸器 *News & View* 印刷中 (2002)
- 25) Ohuchi, M., Sakai, T., and Ohuchi, R. Receptor binding and fusion

- activities of influenza virus hemagglutinin— Modification of the biological activities by glycosylation and acylation —, “Recent Advances in Influenza Virus Research” (Ed. Hayase), Research Signpost, Trivandrum, India, (in press), 2002.
- 26) Sakai, T., Ohuchi, R., and Ohuchi, M. Fatty acids on the A/USSR/77 influenza virus hemagglutinin facilitate the transition from hemifusion to fusion pore formation. *J. Virol.* 76 (9): (in press), 2002.
- 27) Ogaa Y., Naito E., Ito M., Yokota I., Saijo T., Shinahara K., Kuroda Y. (2002) Three novel SURF-1 mutations in Japanese patients with Leigh syndrome. *Pediatric Neurology* 26: in press.
- 28) 土橋佳子、永武毅：インフルエンザ発症のメカニズム. *臨床検査*. 46 (2) 139. 2002
- 29) 内藤悦雄、小川由紀子：複合体 IV 欠損症—SURF1 遺伝子変異 平成 14 年 4 月発行予定 日本臨床第 60 巻増刊号 4 に掲載予定。
- 30) Okada, Y., Sawa, H., Endo, S., Orba, Y., Umemura, T., Nishihara, H., Stan, A. C., Tanaka, S., Takahashi, H., and Nagashima, K. Expression of JC virus (JCV) agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) brain. *Acta Neuropathologica*, in press.
- 2 : 学会発表
- 1) Kido, H., Murakami, M., Yao, D. F., Kawachi, M., and Towatari, T. : Distribution and expression of cellular trypsin-type proteases and their inhibitors determine the pathogenicity of influenza A virus in the lungs and the brains. 7<sup>th</sup> International Symposium on proteinase inhibitors and biological control (Ljubliana, Slovenia). June 16-20, 2001.
- 2) 川内美樹, 唐渡孝枝、赤尾美代子、木戸博：脳内のセンダイウイルス、インフルエンザウイルス活性化酵素の同定と性状解析. 第 6 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 (宮崎) 平成 13 年 8 月 3-4 日
- 3) 唐渡孝枝、井手美喜子、村上明子、木戸博：Sendai virus 感染ラット肺に増加する Virus 活性化 Trypsin 様 Protease. 第 6 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 (宮崎) 平成 13 年 8 月 3-4 日

- 4) Kido, H., Yao, D. F., Kuwajima, M., Shiota, M., Ide, M., and Ohuchi, M.: Destruction of blood-brain barrier by miniplasmin in the systemic carnitine deficiency newborn mice after infection with influenza A virus. The International Conference on Neuroregeneration (Nantong, P. R. China). Sept. 21-24, 2001.
- 5) 木戸博、奥村裕司、Bing Yang: 生体防御物質の気道分泌を促進する去痰剤の抗インフルエンザ効果と、今後の展望。第 38 回日本小児アレルギー学会 (北九州市) 平成 13 年 10 月 6 日
- 6) 唐渡孝枝、井手美喜子、村上明子、木戸博: Sendai virus の感染によってラット肺に増加する Virus 活性化 Trypsin 様 Protease. 第 74 回日本生化学会 (京都) 平成 13 年 10 月 25-28 日
- 7) Yao, D., Kuwajima, M., Shiota, M., Ohuchi, M., Murakami, M., Okumura, U., Towatari, T., and Kido, H.: Brain in neonatal mice of carnitine deficiency is a target organ of influenza A virus other than lung. 第 74 回日本生化学会 (京都) 平成 13 年 10 月 25-28 日
- 8) 川内美樹, 唐渡孝枝、赤尾美代子、木戸博: 脳内のセンダイウイルス、インフルエンザウイルス活性化酵素の同定と性状解析。第 74 回日本生化学会 (京都) 平成 13 年 10 月 25-28 日
- 9) 原好勇、塩田麻由美、木戸博、渡辺健、永田恭介、豊田哲也: プロテアーゼ活性を有するインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ・PA サブユニットと M1 との相互作用。第 74 回日本生化学会 (京都) 平成 13 年 10 月 25-28 日
- 10) Kido, H., Murakami, M., Yao, D. F., and Towatari, T.: Pathogenicity of influenza virus in the lung and the brain is determined by cellular trypsin-type proteases and their inhibitors. 2<sup>nd</sup> General Meeting of the International Proteolysis Society (Freising, Germany). Oct. 31- Nov. 4, 2001.
- 11) 飯田謙二、石村雅子、渡邊洋子、木戸博、山下誠: ブタ肺由来新規インフルエンザウイルス HA 切断プロテアーゼのクローニング。第 24 回日本分子生物学会 (横浜) 平成 13 年 12 月 9-12 日
- 12) 原好勇、塩田麻由美、木戸博、渡辺健、永田恭介、豊田哲也: プロテアーゼ活性を有するインフルエンザウイルス・マトリックスタンパク質 M1 による RNA ポ

- リメラーゼ・PA サブユニットの  
プロテアーゼ活性の阻害。第 24  
回日本分子生物学会（横浜）平  
成 13 年 12 月 9-12 日
- 13) 佐藤昌之、渡邊洋子、吉田淑、  
友澤尚徳、木戸博、山下誠：ブ  
タ肺の新規インフルエンザウイ  
ルス HA 切断プロテアーゼの精製。  
第 24 回日本分子生物学会（横浜）  
平成 13 年 12 月 9-12 日
- 14) 大内正信． インフルエンザウイ  
ルスの吸着と遊離． 第 17 回中  
国・四国ウイルス研究会（米子），  
2001.
- 15) 大内正信、別所敬子、大内礼子． イ  
ンフルエンザ脳炎・脳症モデル  
動物実験系作成の試み． 第 17 回  
中国・四国ウイルス研究会（米  
子），2001.
- 16) 大内正信、大内礼子． インフル  
エンザ脳炎・脳症モデル動物実  
験系作成の試み． 日本ウイルス  
学会第 49 回学術集会（大阪），  
2001.
- 17) 堺立也、大内礼子、大内正信． イ  
ンフルエンザウイルス HA 蛋白質  
のアシル化の意義． 日本ウイル  
ス学会第 49 回学術集会（大阪），  
2001.
- 18) 大内正信． 抗インフルエンザ剤  
の作用機序 第 4 回リサーチフ  
ォーラム「ウイルスとヒト」（京  
都），2001.
- 19) Okada Y, Endo S, Sawa H,  
Nagashima K: Distribution and  
function of JCV agnoprotein:  
The Biology of JC Virus and PML  
workshop, 2001, IL, USA
- 20) Okada Y, Sawa H, Tanaka S,  
Suzuki S, Hasegawa H, Hall WW,  
Nagashima K: Neural cell  
specific activation of the JC  
virus (JCV) promoter in the  
presence of HTLV-I Tax. 10<sup>th</sup>  
International conference on  
human retrovirology: HTLV and  
related viruses, 2001, Dublin,  
Ireland
- 21) 岡田 由紀、澤 洋文、遠藤 秀  
一、大場 靖子、西原 広史、田  
中 伸哉、長嶋 和郎：JC virus  
(JCV) agnoprotien の発現と機能  
に関する研究。第 90 回 日本病理  
学会、2001 年、東京
- 22) 林 宏恵、鈴木 聡子、駒込 理  
佳、西原 広史、大西 晶子、田  
中 伸哉、澤 洋文、長嶋 和郎：  
JC virus T 抗原と t 抗原の局在  
と機能の解析。第 42 回 日本神  
経病理学会総会学術研究会、2001  
年、東京
- 23) 遠藤 秀一、岡田 由紀、澤 洋  
文、大場 靖子、田中 伸哉、長  
嶋 和郎：JC virus (JCV)

- agnoprotein の細胞内局在および tubulin との結合。第 49 回 日本ウイルス学会、2001 年、大阪
- 24) 澤 洋文、鈴木 聡子、駒込 理佳、岡田 由紀、田中 伸哉、長嶋 和郎：JC virus の細胞への吸着及び侵入に関する検討。第 49 回 日本ウイルス学会、2001 年、大阪
- 25) 岡田 由紀、澤 洋文、遠藤 秀一、大場 靖子、田中 伸哉、長嶋 和郎：JC virus (JCV) agnoprotien の機能に関する検討。第 34 回北海道病理談話会 病理分科会、2001 年、札幌
- 26) 駒込 理佳、西原 広史、田中 伸哉、澤 洋文、長嶋 和郎：JC virus capsid protien VP1 の糖脂質、糖蛋白質への結合。第 24 回 日本分子生物学会、2001 年、横浜
- 27) 逸見 千寿香、岩田 博司、駒込 理佳、佐藤 真実、田中 伸哉、澤 洋文、長嶋 和郎：JC virus (JCV) VP1 による外来遺伝子 packaging 効率の検討。第 24 回 日本分子生物学会、2001 年、横浜
- 28) 遠藤 秀一、岡田 由紀、澤 洋文、大場 靖子、田中 伸哉、長嶋 和郎：JC virus (JCV) agnoprotein は tubulin 結合蛋白質である。第 24 回 日本分子生物学会、2001 年、横浜
- 29) 岡田 由紀、澤 洋文、遠藤 秀一、田中 伸哉、梅村 孝司、長嶋 和郎：JC virus (JCV) agnoprotien の核移行の検討。第 24 回 日本分子生物学会、2001 年、横浜
- 30) 岡田 由紀、澤 洋文、遠藤 秀一、田中 伸哉、梅村 孝司、長嶋 和郎：JC virus (JCV) agnoprotien (agno) の核内外移行シグナルとリン酸化部位の同定。第 37 回 日本ウイルス学会北海道支部会総会、2001 年、札幌
- 31) 藤村宜憲、大内正信、秋定健、原田保、春間賢。腸管外 M 細胞の機能形態に関する研究-インフルエンザウイルスの侵入門戸としてのアデノイド組織の M 細胞-。第 39 回日本消化器免疫学会総会 (新潟) , 2002.
- 32) 大内正信、田中康子、堺立也、大内礼子、大森幸代、山田作夫。インフルエンザウイルス感染時におけるノイラミニダーゼ阻害剤の働き。第 12 回抗ウイルス化学療法研究会 (東京) , 2002.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 抗インフルエンザ薬：特願 2001-