

267236: 2001年9月4日
2)JC ウイルス agno を対象とした
PML の治療
(特願 2001-356836 号)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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・酵素分子化学部門）
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）
大内 正信（川崎医科大学・微生物学）

研究要旨

ライ症候群を含めインフルエンザ脳炎を発症する患者の誘因の解析を行った。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るため、①体内 ATP 産生の主たる栄養源が、Glucose からミトコンドリアでの遊離脂肪酸の β 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。以上に注目して、ミトコンドリアの遊離脂肪酸代謝異常とインフルエンザ脳炎との関係を解析した。ミトコンドリアの遊離脂肪酸代謝異常を誘発するカルニチンの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の遺伝的欠損マウスを用いて実験が行われた。Newborn 期と離乳期マウスでは、カルニチンアンタゴニスト処理とカルニチントランスポーター欠損症マウスにおいて、インフルエンザの著明な重症化と生存率の低下が見られた。しかし成熟マウスでは影響されなかった。この場合、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、Newborn マウスの脳内ウイルスゲノムコピー数が著明に増加し、脳浮腫の増悪が観察された。インフルエンザウイルスの感染臓器トロピズムは、ウイルス側のゲノムの塩基配列と宿主側因子としてのウイルス外膜蛋白質 HA のプロセッシングプロテアーゼが知られている。本研究で用いた非神経向性インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)ウイルス株の場合、経鼻感染させた Newborn マウスにおいて通常では脳内ウイルス抗原はほとんど検出できないにもかかわらず、ミトコンドリアの遊離脂肪酸の β 酸化障害を誘発させると、脳血管内皮にウイルス抗原が多量に蓄積して血管炎を引き起こすことが判明した。ウイルス抗原の蓄積の原因として、インフルエンザウイルス外膜糖蛋白の HA をプロセッシングしてウイルスの増殖サイクルを回転させる宿主因子のミニプラスミンが、肺に多量に出現した後重症化に伴い脳の血管内皮に蓄積することが昨年の研究から明らかになっている。これらのことから、ミニプラスミンがウイルスの感染トロピズムを変え、脳内で増殖する一因と考えられた。なを神経向性インフルエンザウイルス株の静脈内投与では、ウイルスは脳の血管内皮に留まらず、脳実質にまで広がり激しい神経症状を引き起こした。

A. 研究目的

乳幼児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。これまで“インフルエンザ脳炎・脳症”が欧米ではほとんど報告が多く、我が国のみで報告されていることから、この疾患に対する基本的疑問、及びライ症候群患者で見られるインフルエンザ脳炎とその誘因とされるアスピリンとの因果関係、さらに治療法の解明等の重要な研究課題がいまだ未解明となっている。これらの疑問点や問題点を解決するために、①神経向性インフルエンザウイルスと非神経向性インフルエンザウイルスとの違いを明確にすること。②インフルエンザ脳炎・脳症やライ症候群患者で見られるウイルス性脳炎が乳幼児に限られて発症することの原因を解明する必要がある。

本年度の研究では、1) 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 Free Fatty Acidの β 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などから、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が“インフルエンザ脳炎・脳症”や“ライ症候群患者で見られるインフルエンザ脳炎”を誘発する原因の一つではないかと仮定して、1968年以來流行をくりかえしている非神経向性インフルエンザウイルス(H3N2)株を用いて脳炎と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2) ウイルスの体内への侵入経路の違いにより、神経症状と病理像の違いがあるか否かを、神経向性のインフルエンザA/WSN/33(H1N1)株と非神経向性株のインフルエンザA/Aichi/68(H3N2)株を経鼻感染と静脈感染させ、神経症状と病理像を比較検討した。

B. 研究方法

1) 研究材料 ウイルス株：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)株を用いた。

マウス：C57BL/6JとJuvenile Visceral Steatosis (JVS)を示すC57BL/6Jを用いた。実験はNew Born(授乳期)として生後2日目から、

離乳期実験として生後 3 週齢を、成熟マウスとして生後 6 週齢を使用した。解熱剤としては、Diclofenac Sodium (Sigma)を、カルニチンアンタゴニストとして α -(2,2,2-trimethyl-hydrazium) propionate (THP) を使用した。

2) ウイルスの感染方法：発育鶏卵あるいは MDCK 細胞で増殖させたインフルエンザウイルス A/Aichi/68 (H3N2), インフルエンザ A/WSN/33(H1N1)を生理食塩水で希釈した後、その 4 μ l をエーテル麻酔下に生後 3 日目のマウスに 1.2×10^4 PFU 経鼻感染させた。また離乳期マウスには 8 μ l をエーテル麻酔下に 3.3×10^4 PFU を、成熟マウスには 20 μ l をエーテル麻酔下に 6.6×10^4 PFU 経鼻感染させた。尾静脈内接種は、成熟マウスに 0.1 ml のウイルスを 1×10^5 PFU 接種した。ウイルス感染後、毎日体重測定と死亡率を測定した。脳浮腫、ウイルス量の検定には、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、THP の投与：Diclofenac Sodium を生理食塩水に溶解させた後 (1 μ g/ml)、25 μ l 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 4 mg/Kg/日と

した。THP は生理食塩水に溶解した後 1 日 2 回に分けて 25 μ l をマウス背側頸部に 300 mg/Kg/日投与した。

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 Microcapillary で Evance Blue 液 10 μ l (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 倍量の生理食塩水で環流し、全身血管内の Evance Blue を取り除き、組織内に浸潤した Evance Blue を再抽出して量を測定して、浮腫の指標とした。

5) インフルエンザウイルス RNA の定量：脳、肺、肝臓、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 μ g 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、インフルエンザウイルスの hemagglutinine (HA) の塩基配列から、P1: 5'-TGAAGTGACTAATGCTACTG-3', P2: 5'-ACAGACCCCTTACCCAGG-GT-3' を First PCR に使用して 578 bp の検出を行った。P3: 5'-GCAACTGTT- ACCCTTATGAT-3', P4: 5'-TCATTGTTTGGCATAGTCAC-3' を Second PCR に使用して 232 bp の検出

を行った。蛍光標識 probe を用いた Real Time PCR は、P5: 5'-TCTGGCTCTCGGCCAAGA-3', P6: 5'-TTGGCACCGCATGATGTC-3' と、Taq Man probe, 5'-(FAM)TTCCAGGAAATGA-CAACAGCACAGCAA-(TRMRA)-3' を用い、ABI Prism 7700 にて測定した。なを、検量線はインフルエンザウイルス A/Aichi/68(H3N2)の HA cDNA を p-GEM-T Vector (Promega)に入れた plasmid を用いて、これを標準検量線として検量した。

6) インフルエンザウイルス抗原の検出: インフルエンザウイルス A/Aichi/68(H3N2)をウサギに免疫して得られた抗体(大内正信 川崎医科大学・微生物学教授より供与)を Protein A Sepharose を用いて精製して用いた。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 カラムに通すことで非特異的応答を示す Ig G を取り除いた後、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た。この精製 Ig G (1 µg/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。

(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

1) 非神経向性株インフルエンザウイルスのマウスへの経鼻感染では、重症化による死亡が Newborn マウスで見られるが、離乳期と成熟マウスではほとんど見られない。

インフルエンザ感染の重症化と脳炎は、ヒトでは乳幼児でのみ観察される。そこでモデル実験動物を用いてマウスの年齢とインフルエンザ感染の重症化との関係を検討した。非神経向性インフルエンザウイルス A/Aichi/68(H3N2)株を、Newborn, 離乳期、成熟マウスにそれぞれ“研究方法”で記載した方法に従って経鼻接種し、マウスの致死率を検討した。図 1 に示すように、Newborn マウスでは感染 10 日目で 40%の生存率しか示さなかったが、3 週齢の離乳期マウスでは 90%, 成熟マウスでは 100%の生存率を示した。栄養源を授乳に頼る Newborn マウスでは、脂肪を主体にした栄養接種であることと、感染やストレスによって授乳量が低下して容易に飢餓状態になる、このよう

な状態では、体内のエネルギー生産はミトコンドリアでの脂肪酸の β -酸化に依存せざるをえない。さらにライ症候群の発症原因として注目されているアスピリンは、ミトコンドリアでの脂肪酸の代謝異常を引き起こすことが知られている。そこでミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化を一時的、可逆的に阻害するため、カルニチンアンタゴニストの THP を各年齢のマウスに投与し、脂肪酸の β -酸化障害とインフルエンザの重症化を検討した。

2) ミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化障害の誘発は、Newborn マウス及び離乳期マウスのインフルエンザ感染を著明に重症化したが、成熟マウスではほとんど影響を示さなかった。

図1に示すように、カルニチンアンタゴニストの THP を5日間処理することでいずれの年齢のマウスも、肝臓重量が増加して明らかな脂肪肝と軽度の心肥大が認められた。なをライ症候群では、肝臓での脂肪酸の β -酸化障害が主症状の一つである。このような条件下に非神経向性インフルエンザウイルスを経鼻感染させると、Newborn と離乳期マウスで明らかな感染の重症化による致死率の増加が認められた。しかし成熟マウスでは、THP の効果はほとんど認められな

かった。なをいずれの年齢のマウスでも THP の単独処理において、体重減少などの毒性は認められなかった。以上のことから、エネルギー生産をミトコンドリアの β -酸化に依存する度合いの高い Newborn 期と離乳期では、インフルエンザ感染の増悪が観察された。

3) 解熱剤 Diclofenac Sodium は Newborn マウスのインフルエンザ感染の重症化を引き起こす。

Newborn マウスに皮下注射することによるストレスをさけるためとより効果的なカルニチン欠乏症を起こすため、細胞膜のカルニチントランスポーターを遺伝的に欠損した JVS マウスにインフルエンザウイルスを経鼻感染させて、ミトコンドリアでの脂肪酸の β -酸化障害とインフルエンザ感染の重症化を検討した。図2に示すように THP 処理と同様な生存曲線が JVS マウスでも観察された。次に治療量の解熱剤 Diclofenac Sodium を、JVS と Wild-type の Newborn マウスに投与したときのインフルエンザ感染の重症化を検討した。図2に示すように Diclofenac Sodium は、Wild-type の Newborn マウスの生存率を著明に低下させた。さらにミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化障害が起きている JVS Newborn マウスでも

Diclofenac Sodium は、さらなる生存率の低下を引き起こした。以上の結果は、ライ症候群の発症原因やアスピリン作用点と推定されるミトコンドリアでの脂肪酸 β -酸化障害は、インフルエンザ感染の重症化の原因になることが示唆された。さらに ATP 産生を脂肪に依存する授乳期や飢餓、ストレス状態におけるミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化障害は、重症なインフルエンザ感染を誘発すると推定された。

4) 非神経向性株インフルエンザウイルスの New Born マウスへの経鼻感染で、肺以外に肝臓と脳でウイルス RNA が増加する。

神経向性インフルエンザウイルス株が脳に侵入して、神経細胞で増殖することは、マウスを使用したこれまでの多くの研究から明らかである。しかし、感染トロピズムが、肺にあり脳には親和性を示さないヒトの非神経向性インフルエンザウイルス株 (H3N2) 型の感染で、脳炎が報告されるのはどのような理由によるのだろうか。この理由を明らかにするため、ミトコンドリアでの脂肪酸 β -酸化障害によってインフルエンザ感染が重症化する JVS Newborn マウスと対照群としての Wild-type Newborn マウスを用いて、体内のウイルス増殖と

分布を検討した。

図 3.a に肺、肝臓、脳、血液での RT-PCR の結果を示す。JVS マウスの場合、1st RT-PCR (35 Cycle) で血液を除くそれぞれの臓器でインフルエンザ HA に由来する cDNA が検出された。Nested PCR (2nd PCR) (25 Cycle) では、血液からもインフルエンザゲノムが検出されている。しかし Wild-type マウスの場合、1st RT-PCR で肺のみでインフルエンザゲノムが検出され、2nd PCR で血液を除く各臓器でウイルスゲノムが検出可能となった。さらに肺、肝臓、脳について蛍光標識 Probe による定量的 PCR を行い、各臓器の Total RNA 当たりのウイルス RNA のコピー数を測定した。図 3.B に示すように、ウイルスとの臓器親和性の高い肺では、JVS マウスと Wild-type マウスでウイルスゲノムコピー数に有意差は認められないが、肝臓と脳では JVS マウスのほうが Wild-type マウスに比較して、それぞれ約数十倍から数百倍高いウイルスゲノムのコピーが検出された。このようにミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化障害を示す JVS マウスでは、脳や肝臓で高いウイルス複製能が検出された。データには示していないが、感染性と膜融合活性のあるウイルスに特長的な HA1 と HA2 サブユニットに解裂した HA 外膜蛋白の存在が JVS

マウスの脳において検出されている。以上の結果は、JVS マウスの脳の血管内皮にウイルス HA 抗原が検出された昨年度の研究結果を裏付ける。このように、Newborn マウスへの非神経向性株インフルエンザウイルスの経鼻感染では、ミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化障害に伴ってウイルスは脳の血管内皮で増殖することが明らかとなった。

5) ミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化障害を伴うマウスの脳では、インフルエンザ感染で脳浮腫が増悪する。

脳の血管内皮でのウイルスの増殖は、血液—脳血管関門の破壊と脳浮腫を導くことが推定された。図4に非神経向性インフルエンザウイルス A/Aichi/68(H3N2)株を経鼻感染させた後、3日目と5日目の Wild-type Newborn マウスと JVS Newborn マウスの脳浮腫を、Evans Blue を定量することで測定した。Wild-type Newborn マウスと JVS Newborn マウスは、共にウイルス感染の進行につれて脳浮腫が増悪したが、浮腫の程度はミトコンドリアでの脂肪酸 β -酸化障害を伴う JVS Newborn マウスにおいて、有意に増悪していた。

6) 神経向性インフルエンザ A/WSN/33 (H1N1)ウイルス株と非神経向性インフルエンザ A/Aichi/2/68(H3N2)ウイ

ルス株の経静脈感染による脳内ウイルス分布の違いの検討。

6週齢の成熟Wild-typeマウスに、神経向性インフルエンザ A/WSN/33 (H1N1)ウイルス株と非神経向性インフルエンザ A/Aichi/2/68 (H3N2)ウイルス株を 1×10^5 PFU 経静脈摂取した後、ウイルス量がピークとなる5日目のマウスの脳のウイルス分布を検討した。非神経向性インフルエンザ A/Aichi/2/68 (H3N2)ウイルス株の場合、経鼻接種の場合と同様に図5に示すように、インフルエンザウイルス抗原は脳の血管内皮で広範囲に検出され、脳の実質細胞への浸潤は認められなかった。この場合マウスに痙攣、麻痺などの著明な神経症状はほとんど認められなかった。一方、神経向性インフルエンザ A/WSN/33 (H1N1)ウイルス株を 1×10^5 PFU 経静脈摂取した場合、図6に示すようにウイルス抗原は脳の血管内皮で検出されるだけでなく、図7に示すように脳の実質細胞へ感染が広がっている病巣が認められた。この場合、マウスは痙攣、麻痺を発症した。このような病巣では、神経細胞と推定される脳実質細胞でウイルス抗原が観察され、非神経向性インフルエンザ A/Aichi/2/68 (H3N2)ウイルス株の場合と明らかな違いを示した。以上のことから、気道に感染トロピズム

を示す非神経向性インフルエンザ A/Aichi/2/68 (H3N2)ウイルス株は、脳の実質細胞にまで浸潤することではなく主に血管内皮で感染が留まるが、神経向性インフルエンザ A/WSN/33 (H1N1)ウイルス株では、脳の血管内皮から脳実質にまで浸潤することが明らかとなった。

7) 神経向性インフルエンザ A/WSN/33(H1N1)ウイルス株を脳室内投与した場合のウイルス脳内分布。

通常の間接感染ルートではないが、神経向性インフルエンザ A/WSN/33(H1N1)ウイルス株を脳室内に直接投与した場合の、ウイルス抗原の分布と症状を検討した。神経向性インフルエンザ A/WSN/33(H1N1)ウイルス株を脳室内投与した場合、図 8 に示すように脳室壁と脳室周囲の脳の実質で、所々限局したウイルス抗原が検出されたが、脳の血管内皮にはウイルス抗原は検出されなかった。この場合、同じウイルス株を経静脈摂取した例で見られたような痙攣、麻痺の発症は少なかった。おそらく病巣の分布が限局しているため、痙攣、麻痺などの症状が発症しにくかったと推定される。

D. 考察

ライ症候群を含めインフルエンザ

脳炎を発症する患者のほとんどが乳幼児であること、さらに患者の多くが発熱に伴う強い食欲不振と嘔吐があることを基盤に、脳炎発症の因子の解析を行った。これらの患者では、①いずれのケースも体内の ATP 産生の主たる栄養源が、Glucose ではなくミトコンドリアの Free Fatty Acid の β 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)が大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とする最近の報告に注目した。さらに、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も報告されている。これらの背景から、遊離脂肪酸の代謝異常を誘発する全身のミトコンドリアの機能障害と、脳炎やインフルエンザの重症化が相関するか否か検討がなされた。ミトコンドリアの遊離脂肪酸代謝異常の誘発は、長鎖脂肪酸のミトコンドリアへの輸送に不可欠なカルニチンのアンタゴニストの THP 処理と、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で行われた。その結果、THP 単独処理では特に毒性が認められないにもかかわらず、Newborn マウスと離乳期マウスに THP を処理した場合と、カルニチントランスポーター欠損症マウスにおいて、

インフルエンザ感染による生存率の著明な低下と、Newborn マウスの脳内ウイルスゲノムコピー数の著明な増加、脳浮腫の増悪が観察された。これらのことから、遊離脂肪酸の代謝異常を誘発する全身のミトコンドリア機能障害は、インフルエンザ脳炎のリスク因子に成り得ることが明らかになった。しかしインフルエンザ脳炎の疑われた実際の患者の血液検査からは、脂肪酸代謝異常を示唆するような例は今の所ほとんどなく、本年死亡した9才の女児の血液でアシールカルニチンが血液中に軽度増加していた例のみであった。今後さらなる臨床データの解析が必要である。しかし、インフルエンザ感染時のミトコンドリアの遊離脂肪酸代謝異常は、明らかにインフルエンザ感染を重症化させることから、Glucose 投与やインシュリン投与により β 酸化に依存した状態からGlucose 依存型に変えることで、病状が改善される可能性が示唆された。

神経向性インフルエンザウイルス株と非神経向性インフルエンザウイルス株があるように、インフルエンザウイルスの感染臓器トロピズムはウイルスのゲノムの塩基配列の違いに依存した感染臓器トロピズムと、感染臓器特異性を決定する宿主側の因子としてウイルス外膜糖蛋白質 HA

のプロセッシングプロテアーゼが知られている。本年度と昨年度の研究から、気道への感染臓器トロピズムを示す非神経向性インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)ウイルス株は、経鼻感染させた Newborn マウスにおいて、通常では脳のウイルス抗原は検出限界以下であるが、ミトコンドリアの β 酸化障害を伴う場合において、脳の血管内皮にウイルス抗原が多量に蓄積することが判明した。気道への感染臓器トロピズムを示す非神経向性インフルエンザウイルスが、ミトコンドリアの機能異常に伴ってなぜ脳の血管内皮に蓄積するかについて機序はいまだ不明である。しかし昨年度の研究から、ミトコンドリアの β 酸化障害を伴うJVSマウスでは、インフルエンザ感染の進行に伴って肺内にインフルエンザウイルス外膜糖蛋白質の HA をプロセッシングするミニプラスミンが多量に出現し、重症化に伴い脳の血管内皮に蓄積することが判明している。ミニプラスミンは、細胞膜表面から出芽したインフルエンザウイルスの HA 蛋白質をプロセッシングして、感染力と膜融合活性のあるウイルスに活性化することから、脳の血管内皮細胞上でウイルス増殖を引き起こすと推定された。則ちミニプラスミンは、非神経向性インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)ウイ

ルス株を脳で増殖可能に変える誘因になっていると推定された。一方、ミトコンドリアの β 酸化障害をともしない成熟マウスの脳でも、非神経向性と神経向性インフルエンザウイルスを経尾静脈内接種で大量に感染させた場合、脳血管内皮でウイルス抗原の蓄積が認められた。この場合も、ウイルスの脳血管内皮での蓄積にミニプラスミンが関与しているか否か、あるいは血液中の HA プロセシング酵素としてこれまでに報告のあった Factor 8, Factor 10 を含め、今後検討をしてゆかなくてはならない。さらにミトコンドリアの β 酸化障害を伴う JVS マウスの脳で、ミニプラスミンがなぜ蓄積されたのかを脳血管内皮で発現量の増加する接着因子との関係から解明を進めてゆく。

これまで神経向性インフルエンザ A/WSN/33(H1N1)ウイルス株の神経細胞への親和性を決定する因子として、ウイルス外膜糖蛋白質の HA と Neuraminidase の 1 次構造が指摘されていた。この場合、ウイルスを静脈内に投与すると脳の血管内皮に留まらず脳の実質細胞にまで浸潤して広範囲で感染することが明らかとなった。しかし 1968 年以後のインフルエンザウイルス感染は、香港かぜの H3N2 型と 1977 年以後のソ連かぜの H1N1 型で、いずれも強い神経向性は報告

されていない。従って、現在流行しているインフルエンザによる脳炎は、気道に対する感染臓器トロピズムを持つウイルスが何らかの原因で脳の脳血管内皮を障害するようになったと考えられる。

E. 結 論

本年度の研究では、ライ症候群を含めインフルエンザ脳炎を発症する患者のほとんどが乳幼児であること、さらに患者の多くが発熱に伴う強い食欲不振と嘔吐があることを基盤に、脳炎発症の因子の解析を行った。これらの患者では、①いずれのケースも体内の ATP 産生の主たる栄養源が、Glucose ではなくミトコンドリアの β 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。さらに、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、等が注目される。これらの背景から、ミトコンドリアの遊離脂肪酸の代謝異常を誘発するカルニチンのアンタゴニストの THP 処理と、カルニチントランスポーターの遺伝的欠損マウスを用いた実験が行われた。その結果、Newborn マウスと離乳期マウスで THP 処理と、カルニチントラ

ンスポーター欠損症マウスにおいて、インフルエンザ感染による生存率の著明な低下と、Newborn マウスの脳内のウイルスゲノムコピー数の著明な増加、脳浮腫の増悪が観察された。

気道へ感染臓器トロピズムを示す非神経向性インフルエンザ A/Aichi/68 (H3N2)ウイルス株は、経鼻感染させた Newborn マウスにおいて、通常では脳内のウイルス抗原の検出はほとんどできないか極軽度であるが、ミトコンドリアの β 酸化障害を伴う場合、脳の血管内皮にウイルス抗原が多量に蓄積することが判明した。気道への感染臓器トロピズムを示す非神経向性インフルエンザが、ミトコンドリアの機能異常に伴ってなぜ脳の血管内皮に蓄積するかについての機序はいまだ不明である。しかし昨年度の研究から、ミトコンドリア内の β 酸化障害を伴う JVS マウスでは、インフルエンザの感染の進行と重症化に伴って肺の中にインフルエンザウイルス外膜糖蛋白の HA をプロセッシングするミニプラスミンが多量に出現し、重症化に伴いウイルス抗原の検出される脳の血管内皮に蓄積することが判明している。則ちミニプラスミンは、非神経向性インフルエンザ A/Aichi/ 2/68(H3N2)ウイルス株を脳で増殖可能に変える誘因になっていると推定された。

F. 健康危険情報

本年度の研究において、インフルエンザ感染に伴う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の代謝異常、ミトコンドリアの機能障害が関与していることが明らかになった。具体的には遊離脂肪酸のミトコンドリアへの輸送因子として不可欠なカルニチンと結合して、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に依存することとなり、以上の薬物による障害が出易い状態を形成すると推定された。

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 ϵ , γ , and ξ isoforms in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neuronal destruction. *Clinica Chimica Acta* 312 (1-2), 97-105 (2001)
 - 7) 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)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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)
 - 12) 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)

- 13) 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シソールの抗インフルエンザ効果 呼吸器 News & View 印刷中 (2002)

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. 7th International Symposium on proteinase inhibitors and biological control (Ljubliana, Slovenia). June 16-20, 2001.
- 2) 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.
- 3) 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
- 4) 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
- 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 ling. 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. 2nd General Meeting of the
International Proteolysis Society
(Freising, Germany). Oct. 31- Nov. 4,
2001.
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

抗インフルエンザ薬: 特願 2001-
267236: 2001年9月4日

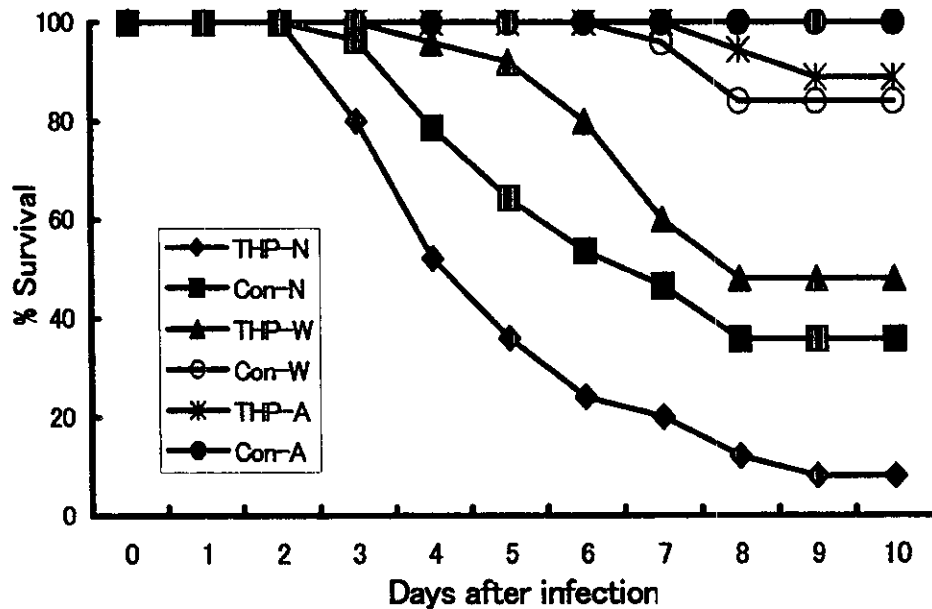


図 1. マウスの年齢によるインフルエンザウイルスの易感染性と、カルニチンアンタゴニスト THP 処理による感染増悪

非神経向性インフルエンザウイルス A/Aichi/68(H3N2)株を、Newborn, 離乳期 (3 週齢)、成熟 (6 週齢) の C57BL/6J コントロールマウスと THP を 5 日間処理した C57BL/6J マウス (1 日 2 回処理) に経鼻感染させ、経時的な生存率を検討した。ウイルスは、 1.2×10^4 PFU (Newborn 期), 3.3×10^4 PFU (離乳期)、 6.6×10^4 PFU (成熟期) をエーテル麻酔下に経鼻感染させた。THP-N: THP treated newborn mice; Con-N: Control newborn mice; THP-W: THP treated weanling mice; Con-W: Control weanling mice; THP-A: THP treated adult mice; Con-A: Control adult mice.

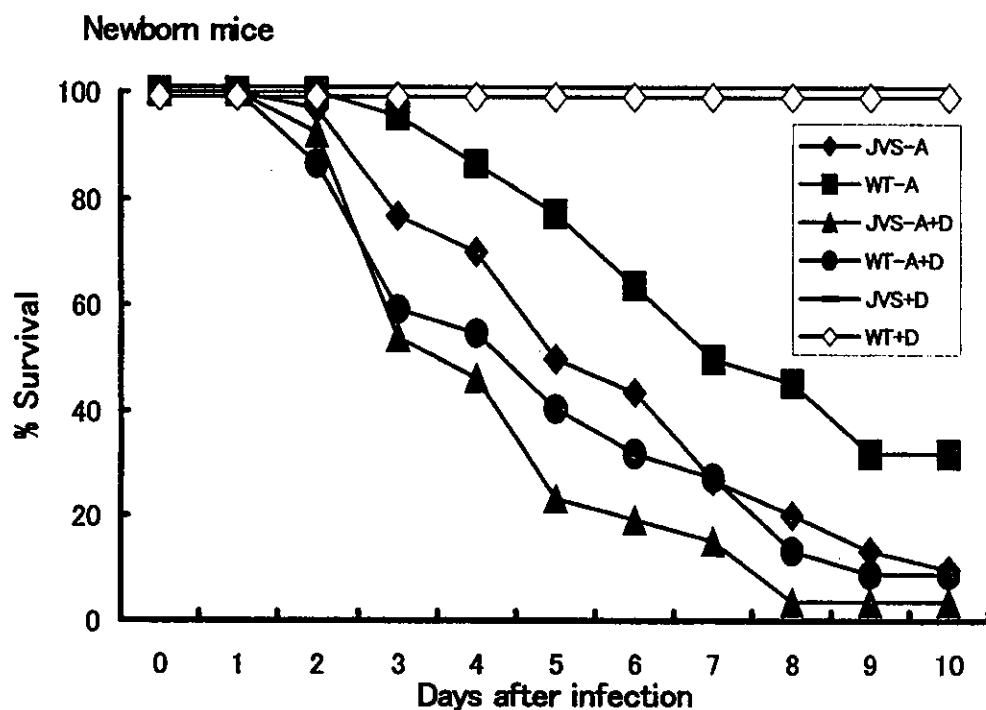
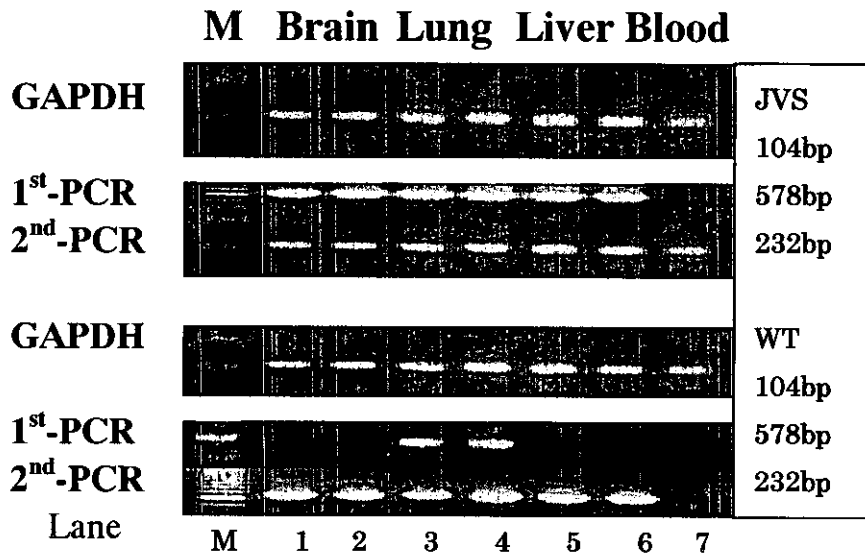


図 2. Newborn Wild-type C57BL/6J コントロールマウスとカルニチントランスポート欠損症 JVS マウスにおける、解熱剤 Diclofenac sodium のインフルエンザの感染増悪

インフルエンザ A/ Aichi/ 68(H3N2)株を Newborn Wild-type と JVS マウスに経鼻感染させ、感染直後から Diclofenac sodium (20 mg/ Kg/ day) を皮下投与した時のマウスの生存率を示す。JVS- A: JVS mice treated with influenza A virus; WT- A: Wild-type mice treated with influenza A virus; JVS- A+D; JVS mice treated with virus and diclofenac sodium; WT- A+D; Wild-type mice treated with virus and diclofenac sodium; JVS+D: JVS mice treated with diclofenac sodium; WT+D: Wild-type mice treated with diclofenac sodium

a. RT-PCR



b. Real-time PCR

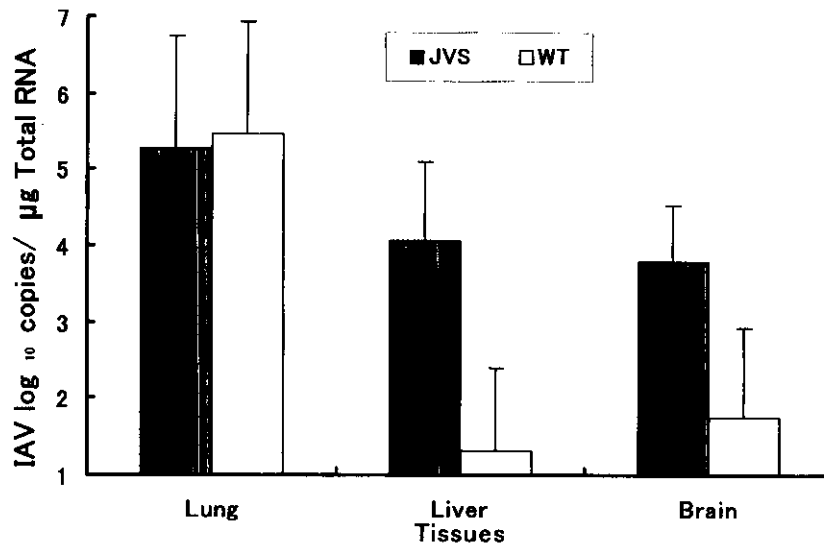


図3. JVS マウスと Wild-type マウスにインフルエンザウイルスを感染させた後、5日目の脳、肺、肝臓、血液中のウイルスゲノムの RT-PCR による検出 (a) と Real time PCR 測定によるウイルスゲノムの定量 (b)

(a)インフルエンザ A/ Aichi/ 68(H3N2)株を Newborn JVS マウスに経鼻感染させた後、5日後の脳、肺、肝臓、血液中のウイルス Hem agglutinin の 1st RT-PCR と 2nd RT-PCR による検出. GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; JVS : JVS newborn mice; WT: Wild-type newborn mice

(b)Real time PCR 測定によるウイルス Hem agglutinin の定量
定量法は、研究方法に記載。

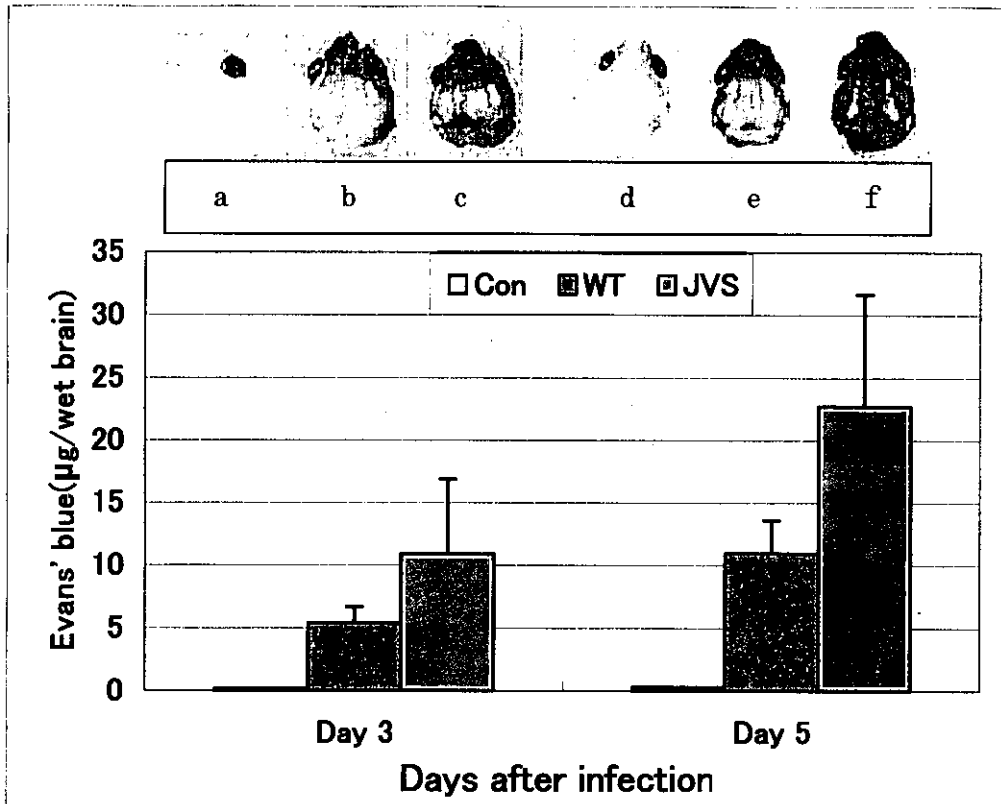


図4. インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株を Newborn wild-type C57BL/6J マウスと JVS マウスに感染させた後、感染3日目と5日目の脳内への Evans Blue の浸潤の定量。

Newborn wild-type C57BL/6J マウスに生理食塩水を経鼻投与 (a, d)、wild-type C57BL/6J マウスにウイルスを経鼻感染 (b, e)、JVS マウスにウイルスを経鼻感染(c, f) させた後、3日目と5日目のマウス脳内の Evans Blue 色素浸潤を研究方法に従って測定した。