

図5. インフルエンザ A/ Aichi/ 68(H3N2)ウイルス株を成熟 C57BL/ 6J マウスの尾静脈接種した後、5日目の脳の免疫組織化学によるウイルス抗原の検出。
a : 1:50 µm , 脳内の微小血管にウイルス抗原が検出される。
b : 1:20 µm, a の拡大



図 6. 神経向性インフルエンザ A/WSN/33(H1N1)ウイルス株を成熟 C57BL/6J マウスの尾静脈接種した後、5日目の脳の免疫組織化学によるウイルス抗原の検出。
a : $\times 200 \mu\text{m}$, 脳内の微小血管にウイルス抗原が検出された部位。
b : $\times 20 \mu\text{m}$, a の拡大



図7. 神経向性インフルエンザ A/WSN/33(H1N1)ウイルス株を成熟 ddY マウスの尾静脈接種した後、5日目の脳の免疫組織化学によるウイルス抗原の検出。

a : 1:200 μm , 脳実質にウイルス感染巣が検出された部位。

b : 1:20 μm , a の拡大



図8. 神経向性インフルエンザウイルス A/WSN/33(H1N1)ウイルス株を成熟 ddY マウスの脳室内に直接接種した後、3 日目の脳の免疫組織化学によるウイルス抗原の検出。

a : \times 200 μm , 脳室周囲の神経細胞にウイルス抗原が検出された。

b : \times 20 μm , a の拡大

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

研究経過の要旨：昨年度の研究によって、離乳～成熟マウスにインフルエンザウイルス A/WSN/33(H1N1)株を尾静脈経由で感染させると、数日後に突然激しい神経症状を伴って多くのマウスが発症し死亡すること、一方、脳内に直接ウイルスを感染させた場合には体重減少以外には目立った症状を示さず、かなりのマウスが体重減少から回復して生き延びることが判明した。本年度は先ず、静注感染マウスにいかなる処置をすれば神経症状の発現を免れ生き延びることができるかを明らかにするための実験を行った。抗 TNF α 抗体、抗 IL-6 抗体の投与では神経症状の発現は抑制されず、感染初期に抗 TNF α 抗体を投与するとむしろ死亡率が上昇する傾向が見られた。抗炎症作用、NK 細胞の活性化、IFN 誘導能等の作用が知られているグリチルリチンは、本系では無効であった。ノイラミニダーゼ阻害剤を感染翌日より投与した群では、対照群が 62% の死亡率に対し、死亡率が 20～39%と低下し、治療効果が認められた。マウス回復期血清（中和抗体価 1：1000）の投与は感染 3 日後でも有効であり、対照群が感染 4 日後に発症し、全マウスが死亡した場合でも、血清を静注されたマウスは全て生き延びた。以上の成績は、感染マウスの発症死を防ぐために血清療法が著しい効果があることを示している。

さらに今年度の研究によって、脳内感染マウスの発症死亡率はウイルスの接種濃度を下げると逆に上昇することが判明した。その機構については現在、解析中である。

A. 研究目的

インフルエンザ脳炎・脳症の発症機構はほとんど解明されていない。その問題点として 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。さらに治療法として何が最も有効なのかをも緊急に明らかにしなければならない。これらの課題を遂行するためには、ヒトのインフルエンザ脳炎・脳症と類似した病態を示す、モデル動物実験系は不可欠である。我々は、昨年度

の研究において、インフルエンザウイルス A/WSN 株を尾静脈経由で離乳マウスに感染させると、数日後にマウスは突然激しい神経症状（痙攣、片マヒ、不随意運動）を伴って高率に発症することを見出した。通常の経鼻接種や脳内接種ではこのような顕著な神経症状は殆ど観察されなかった。激しい神経症状を表しているマウスでは肺と脳からウイルスが分離されるが、脳からウイルスが分離されない例もあった。本年度は先ず、静注感染マウスにいかなる処置をすれば神経症状の発現を免れて生き延びることができるかを明らかにするための実験を行った。さらにウイルスの脳内直接感染で顕著な神経症状が表れないのはなぜかを明らかに

しようと試みた。

B. 研究方法

ウイルス： インフルエンザウイルス A/WSN/33 (H1N1)株を MDCK 細胞あるいは発育鶏卵漿尿液腔で増殖させたウイルスを希釈して使用した。

マウス： 3~4 週齢の ddY (SLC) 雌マウスを感染実験に使用した。

ウイルス感染方法： 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。尾静脈内にはマウスあたり 1~2 \times 10⁵ PFU のウイルスを接種した。

ウイルス感染価の測定： 発症マウスから脳、肺、肝臓を摘出し、注射器、乳鉢、ポッター型ホモジナイザーを使って乳剤を作成し、10,000rpm、3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。

抗体、薬剤： 抗マウス tumor necrosis factor (TNF) α モノクローナル抗体 (ラット)は upstate biotechnology 社 (USA) から、抗マウス interleukin-6 (IL-6)モノクローナル抗体 (ラット)は Techne 社 (USA) から、グリチルリチンは Wako 社 (日本) およびコレステロール 3 硫酸は Sigma 社 (USA) から、それぞれ購入した。インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ阻害剤オセルタミビル

(GS4104) は ロッシュ社より、ザナミビル (GG167) は グラクソ・ウエルカム社より分与された。抗 WSN 抗血清は、WSN ウイルス実験感染を生き延びた ddY マウスの血清をプールしたもの (中和抗体価 1:1000) を使用した。

(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. 静注感染マウスの治療実験

インフルエンザウイルス A/WSN 株を 3~4 週齢の ddY 雌マウスに尾静脈経由で感染させ、感染後にさまざまな薬剤、抗体等を腹腔内あるいは静脈内に投与し、発症阻止効果あるいは死亡率減少効果を調べた。

1) 抗マウス TNF α 抗体、抗マウス IL-6 抗体の投与効果。

脳症の発症に血中サイトカイン (特に TNF α や IL-6) が関与している可能性が考えられているが、A/WSN 静注感染マウスへ感染 2 日後と 3 日後に抗 TNF α 、抗 IL-6 のモノクローナル抗体をマウス 1 日あたりそれぞれ 20 μ g 静注しても神経症状発現抑制効果は見られなかった (表 1 参照)。

一方、感染初期 (感染 8 時間後と 22 時間後) に抗 TNF α モノクローナル抗体 40 μ g/mouse を静注投与した場合にはむしろ死亡率が上昇する傾向が見られた (表 2 参照)。

2) コレステロール 3 硫酸の投与効果。

最近、endotoxin 投与によって、大量のサイトカインが血中に放出されると共に、high mobility group-1 (HMG-1) protein が血中に放出され、それが広範な組織傷害を引き起こして、動物を死に至らしめることがマウスの実験系で明らかにされている (参考文献 1)。さらに、コレステロール 3 硫酸 (CH-3S) は HMG-1 に特異的に結合し HMG-1 の構造変化を引き起こす効果があることが報告されてい

る（参考文献2）。そこで、本研究においても、マウスの発症死にHMG-1が関与しているかどうかを調べるために、CH-3Sの投与によってWSNウイルス静注感染マウスの発症率や死亡率を低下させることができるどうかを検討した。

ウイルス感染後、翌日から4日後まで1mMのCH-3Sを0.2ml/day腹腔内に投与したが、対照群の死亡率が8/12に対して、投与群の死亡率は9/12であり、有意な治療効果は見られなかった。

3) グリチルリチンの投与効果。

グリチルリチンには抗炎症作用、ナチュラルキラー細胞の活性化、インターフェロン誘導能、数種のウイルスに対する抗ウイルス作用が知られており、グリチルリチンを予め投与されたマウスではインフルエンザウイルスの感染が抑制されると報告されている（参考文献3）。本研究でもグリチルリチンに発症阻止あるいは治療効果があるか否かを調べた。

WSNウイルス静注感染マウスへ感染翌日から3日間、腹腔内に10mg/kg/day/mouse投与した群での死亡率は5/6であった。対照群の死亡率は4/6であるので、グリチルリチンの有意な治療効果は認められなかった。

4) ノイラミニダーゼ阻害剤の投与効果。

WSNウイルス静注感染マウスにノイラミニダーゼ（NA）阻害剤オセルタミビルあるいはザナミビルを腹腔内にあるいは静注で投与すると、神経症状の発現率と死亡率は有意に低下した（図1A, Bと図2A, B参照）。

NA阻害剤投与による神経症状発現率の低下と死亡率の低下の成績は表3にまとめた。

5) 抗体の投与効果

WSN静注感染マウスに感染翌日から2日間、WSN感染を生き延びたマウスの血清（中和抗体価1:1000）を0.2ml/day静注してやると、マウスは発症を免れ、全てのマウスが生き延びた（このとき対照群のマウスの発症死亡率は10/11であった）。

感染2日後に1回、上記マウス血清0.2mlを静注された群では一部のマウスで体重減少が見られたが神経症状の発現はなく、全てのマウスが生き延びた（図3参照）。

抗血清の投与は感染3日後でも有効であった（図4参照）。感染3日後の抗血清投与ではマウスの体重減少は免れないが、神経症状を表したマウスはなく、全て生き延びた。

以上の成績は、この感染系でマウスの神経症状発現を抑制するのに抗血清療法は著しい効果があることを示している。

2. マウス脳内におけるインフルエンザウイルス感染の特殊な様式について。

昨年度の研究において、インフルエンザウイルスWSN株を直接脳内に接種した場合には、マウスは体重減少以外には目立った症状を表すことなく、多くのマウスはやがて体重減少から回復して生き延びることを見出したが、本年度の研究において、ウイルス液をさらに100~10000倍に希釈して脳内に接種するとほとんどのマウスは死亡することが判明した。

1) 例えば50000PFUのWSN株ウイルスを脳内に接種すると12匹中7匹が生き延びた（図5A参照）が、1000倍に薄めたウイルス液（50PFU/mouse）を接種するとすべてのマウスが死亡（図5参照）した。

このような現象はWSN株ウイルスの静

注感染や経鼻感染では観察されず、脳内感染に特有のものと考えられた。

2) 50PFUのWSN株ウイルスを脳内に接種した翌日、A/Aichi株(H3N2)やUV照射して感染価を低下させたWSNウイルスをマウス脳内に投与すると死亡率が若干低下する傾向が見られた。

3) 500PFUのWSN株ウイルスをマウス脳内に接種した後、感染2日後に抗血清をマウス脳内に投与するとほとんどのマウスが生き延びた(図6参照)。ウイルスの脳内直接感染の場合でも血清治療(抗体の脳内投与)は著しい効果を挙げることが判明した。

D. 考 察

マウス脳内に直接WSN株ウイルスを感染させた場合、あるいは経鼻感染させた場合には目立った神経症状が表れることは極めて稀であるが、尾静脈経由で感染させると高率に激しい神経症状が出現することから、脳内と肺内でウイルスが同時に増殖していることが神経症状の発現に必要なのかも知れない。ウイルス感染後に、抗ウイルス抗体をマウスに静注するとマウスは発症死から効率良く免れることができた。抗体の投与は神経症状の出現の前日でも有効であった。

本年度の研究によって脳内には独特のウイルス感染様式あるいは免疫応答機構が存在する可能性が示唆された。すなわち、高濃度のウイルスを脳内に接種した場合にはかなりのマウスは生き延びることができるが、希釈したウイルスを接種された場合には、ほとんどのマウスが死亡することである。この仕組みとして考えられるのは、高濃度のウイルス接種により誘導された免疫反応によってウイルスは駆逐され、マウスは感染死から免れ

るが、ごく少量のウイルス接種では十分な免疫反応が誘導されず、結局、ウイルスの感染拡大を阻止することができずにマウスは死亡する可能性である。神経病原性麻疹ウイルスとマウスの系でこれとよく似た現象を1986年に申請者ら(参考文献4)が、1997年にSakaeら(参考文献5)が報告している。これらの成績も加味すると、脳内の免疫系においては、抗原の検出感度が鈍い(つまり大量の感染が起こらないと反応が開始されない)が、いったん開始されると極めて速く効率的(ウイルス感染が起こった後でも発症を十分に阻止できる)と考えられる。脳内のウイルス感染様式および免疫応答反応に関する情報は極めて乏しく、未開発の分野であり、今後の検討課題である。

E. 結 論

- 1) 神経症状の発現抑制に血清治療(抗体の投与)は著しい効果があることが判明した。
- 2) 脳内には特有の免疫機構あるいはウイルス感染様式があることが示唆された。

F. 参考文献

- 1) Wang et al. (1999). *Science* **285**: 248-251.
- 2) Okano et al. (2001). *BBRC*. **281**: 1325-1330.
- 3) Utsunomiya et al. (1997). *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 551-556.
- 4) Ohuchi et al. (1986). *Microbiol. Immunol.* **30**: 203-211.
- 5) Sakae et al. (1997). *Arch. Virol.* **142**: 1937-1952.

G. 研究発表

1. 論文発表
1) Murakami, M., Towatari, T., Ohuchi,

- M., Shiota, M., Akao, M, Okumura, Y., Parry, M. A. A., 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**: 2847-2855, 2001.
- 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
2. 学会発表
- 1) 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.
 - 2) 大内正信、別所徹子、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.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.

表 1. 抗 TNF α 、抗 IL-6 抗体*の投与効果

	対照群	抗体投与群
発症率	11/11	11/11
神経症状発現日 (平均)	4 日後	4 日後
死亡日 (平均)	6 日後	6 日後
死亡率	10/11	10/11

*monoclonal rat IgG each 20 μ g/day/mouse

表 2. 抗 TNF α 抗体*の早期投与の効果

	対照群	抗体投与群
発症率	11/11	5/5
神経症状発現日 (平均)	4 日後	4 日後
死亡日 (平均)	6 日後	6 日後
死亡率	7/11	5/5

*monoclonal rat IgG each 40 μ g/mouse

表 3. NA 阻害剤の治療効果

実験 1

	神経症状の発現率	死亡率
対照群	11/11 (100%)	7/11 (64%)
Zanamivir 静注投与群	7/10 (70%)	2/10 (20%)

実験 2

	神経症状の発現率	死亡率
対照群	12/13 (92%)	8/13 (62%)
Oseltamivir 腹腔内投与群	13/18 (72%)	7/18 (39%)

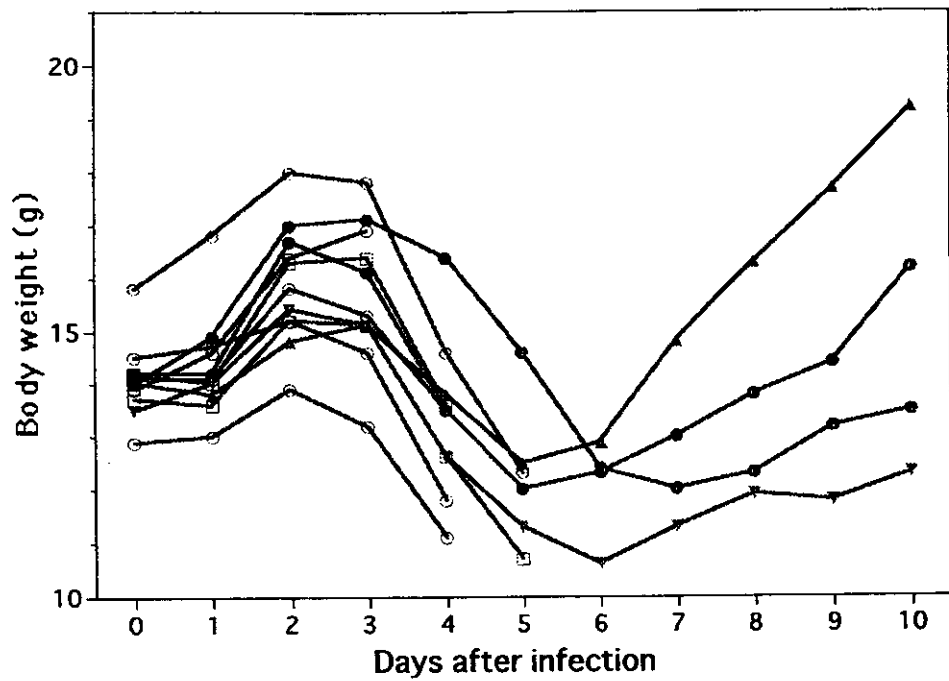


図 1A. WSN 静注感染マウスに対する NA 阻害剤の治療効果その 1 (対照群)

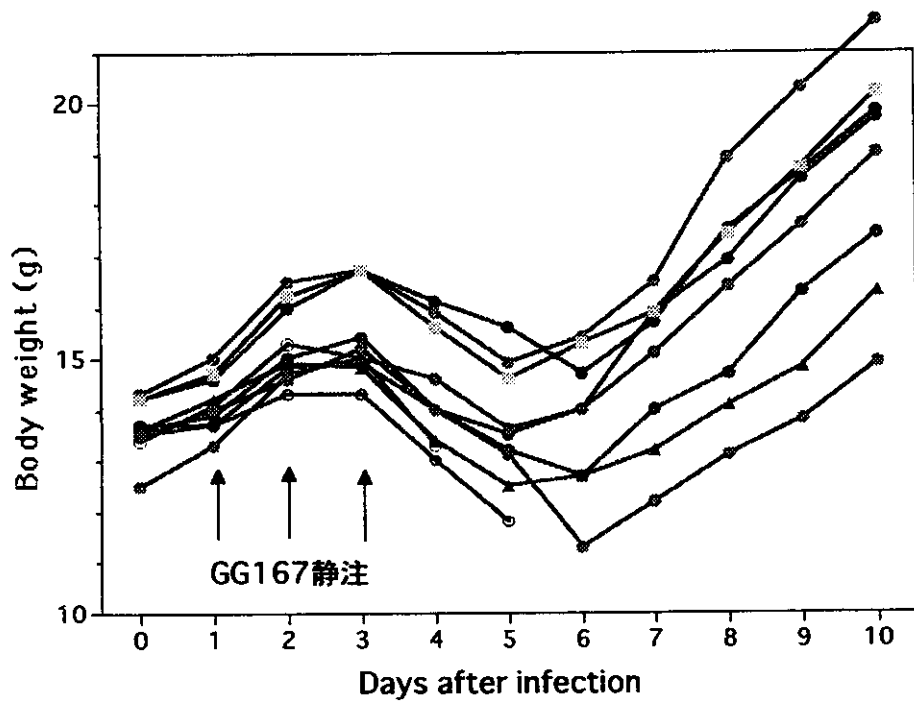


図 1B. WSN 静注感染マウスに対する NA 阻害剤の治療効果その 1 (GG167 静注投与群) : 感染 1 日後から 3 日後まで GG167 (zanamivir) を 3.5mg/kg/day あたり静脈内投与した。

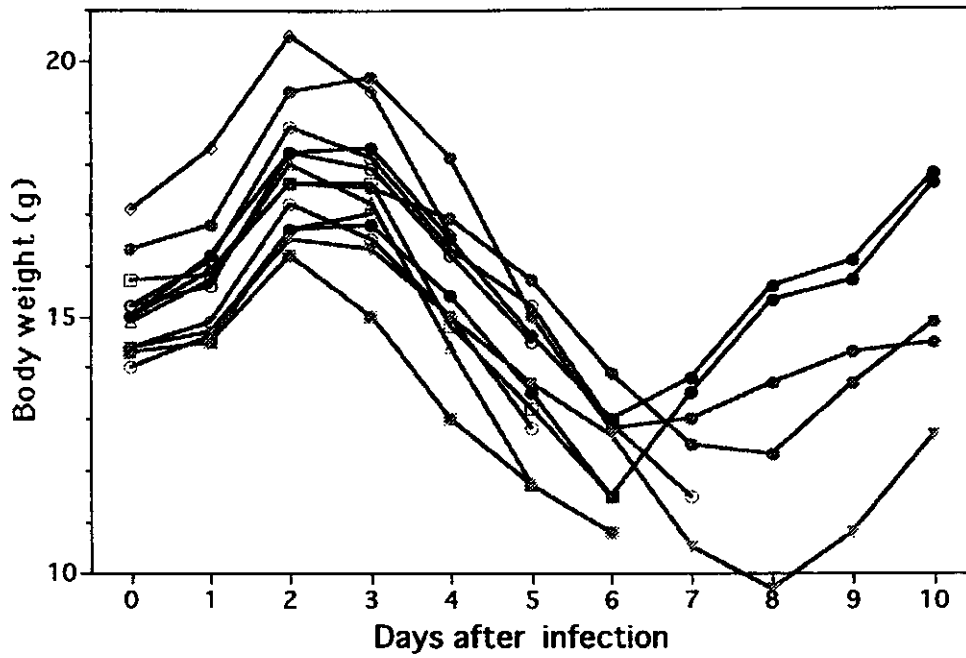


図 2A. WSN 静注感染マウスに対する NA 阻害剤の治療効果その 2 (対照群)

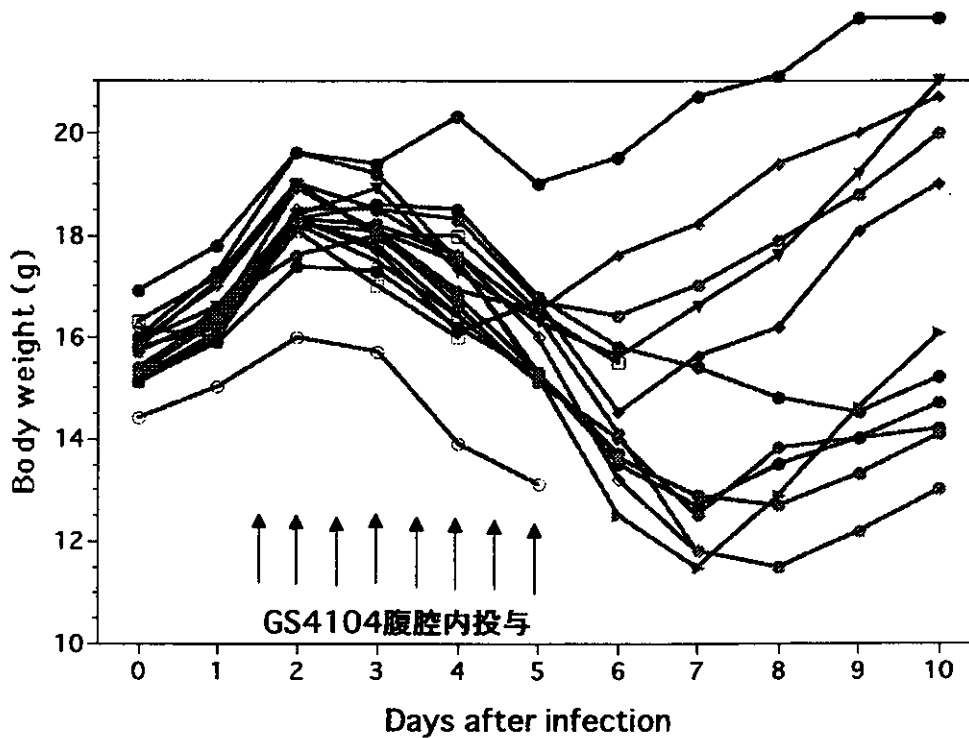


図 2B. WSN 静注感染マウスに対する NA 阻害剤の治療効果その 2 (GS4104 腹腔内投与群) : 感染 1 日後から 4 日後まで GS4104 (oseltamivir) を $2.6\text{mg} \times 2/\text{kg}/\text{day}$ で腹腔内に投与した。

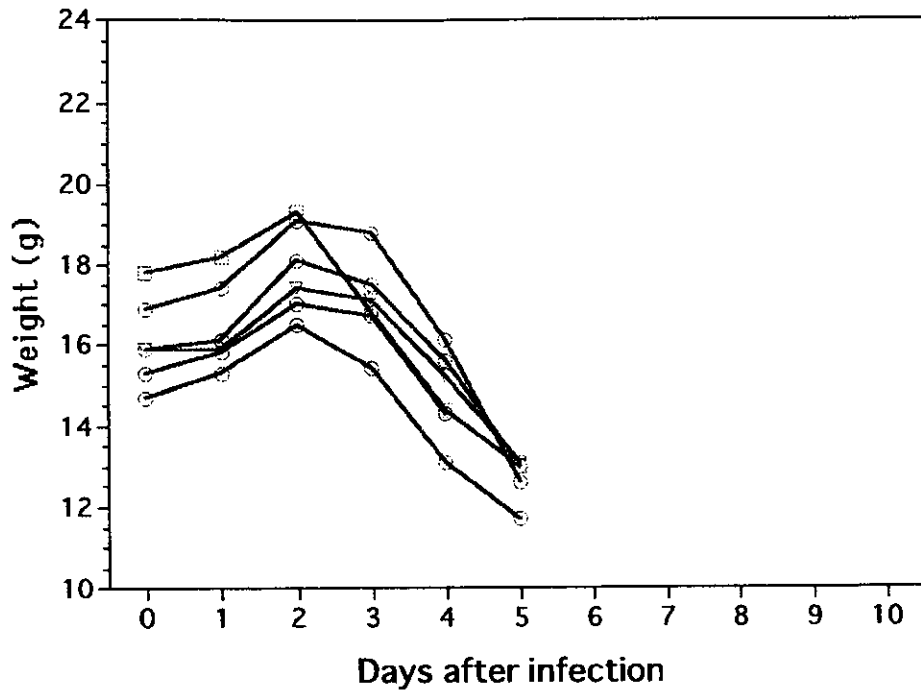


図 3A. 抗 WSN 抗血清、感染 2 日後投与の治療効果 (対照群)

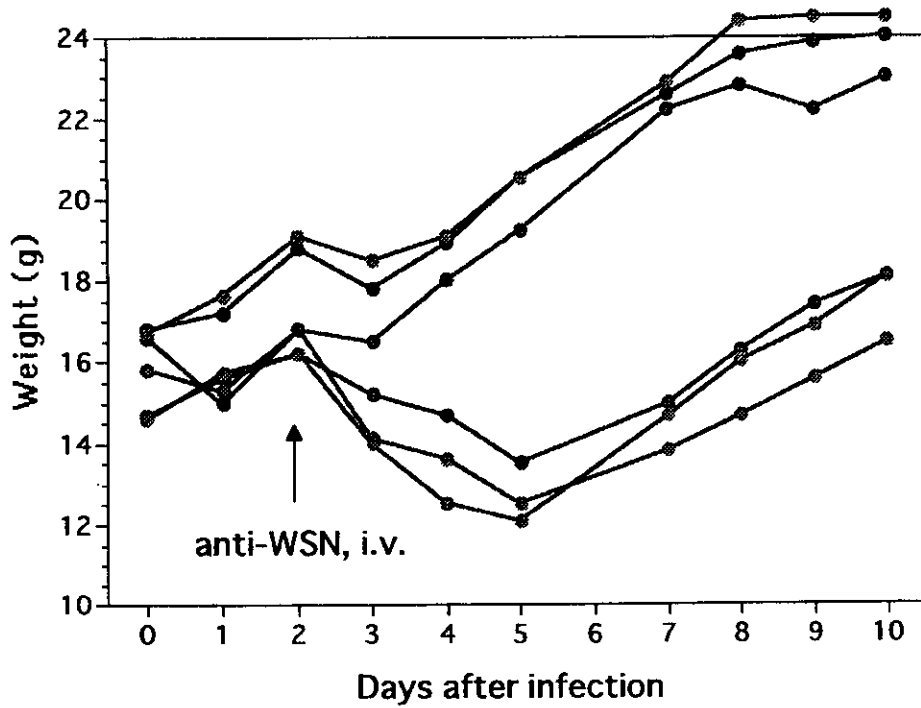


図 3B. 抗 WSN 抗血清投与、感染 2 日後投与の治療効果 (血清治療群) : 抗 WSN マウス抗血清を感染 2 日後に 0.2ml 静注した。

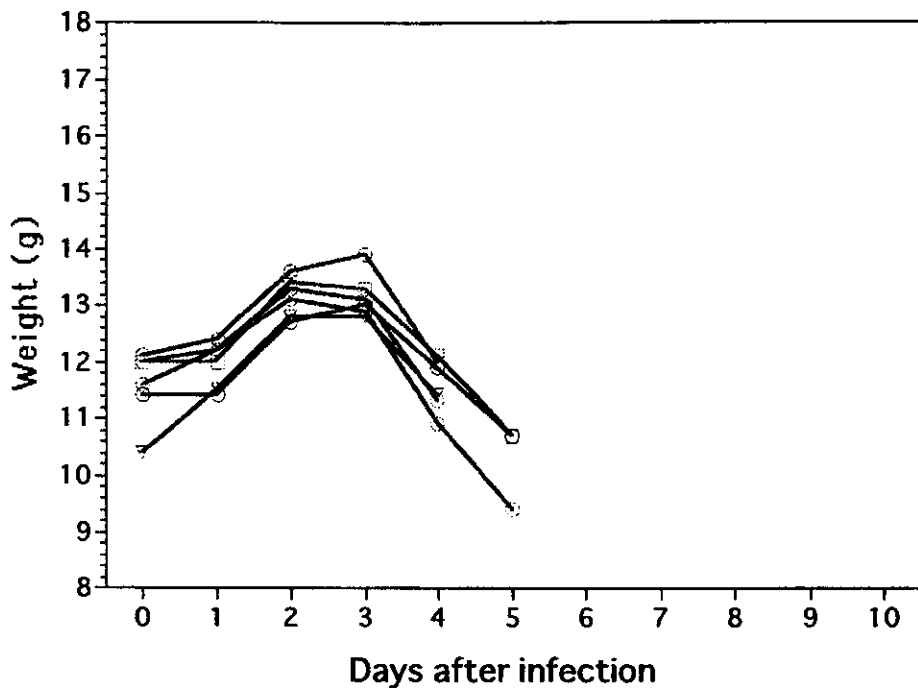


図 4A. 感染3日後抗血清投与の治療効果 (対照群)

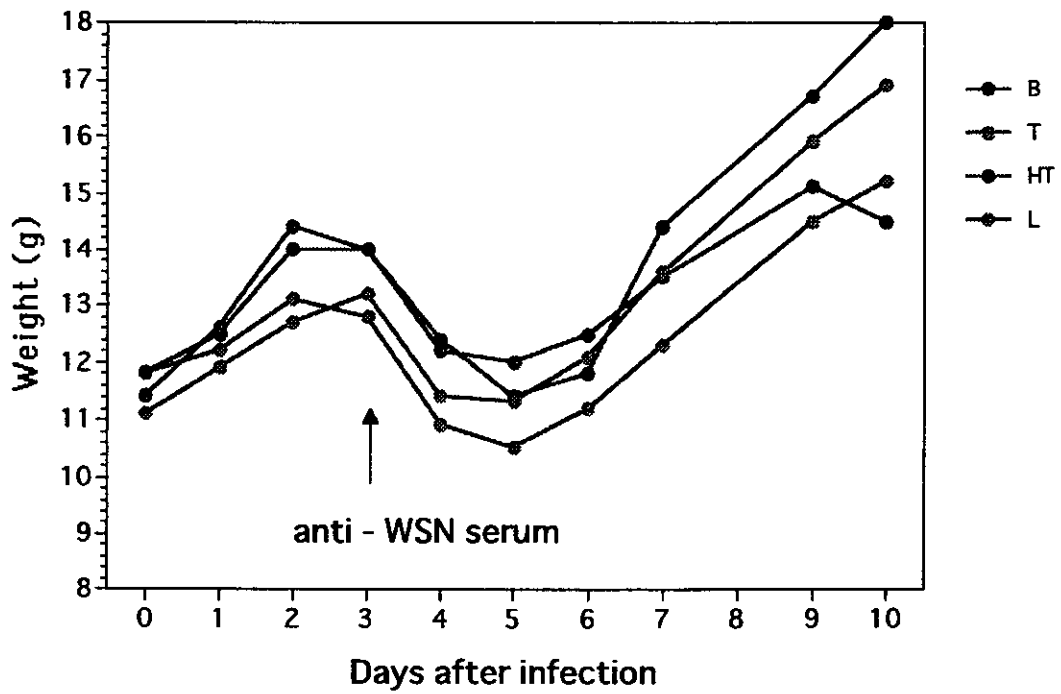


図 4B. 感染3日後の抗血清投与の治療効果その2 (治療群)

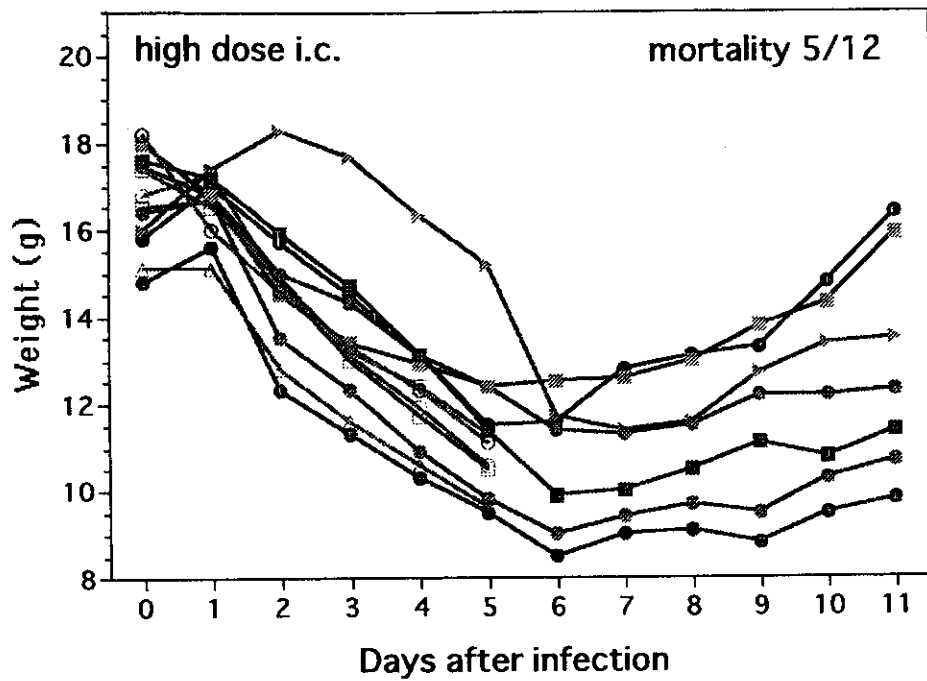


図 5A. WSN 株ウイルスの脳内接種実験：マウスあたり 50,000PFU のウイルスを脳内に接種した。

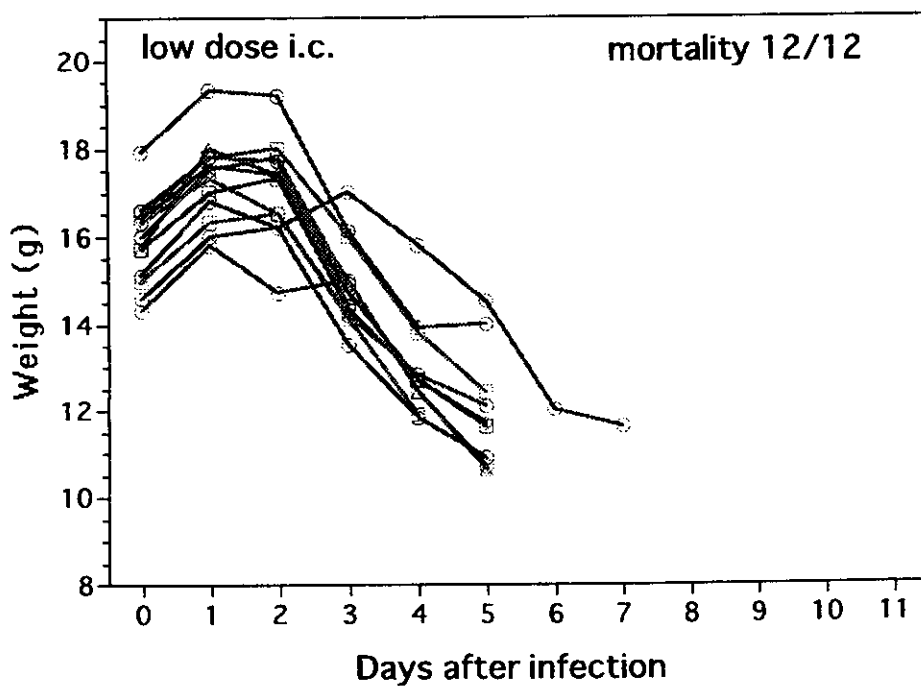


図 5B. WSN 株ウイルスの脳内接種実験：マウスあたり 50PFU のウイルスを脳内に接種した。

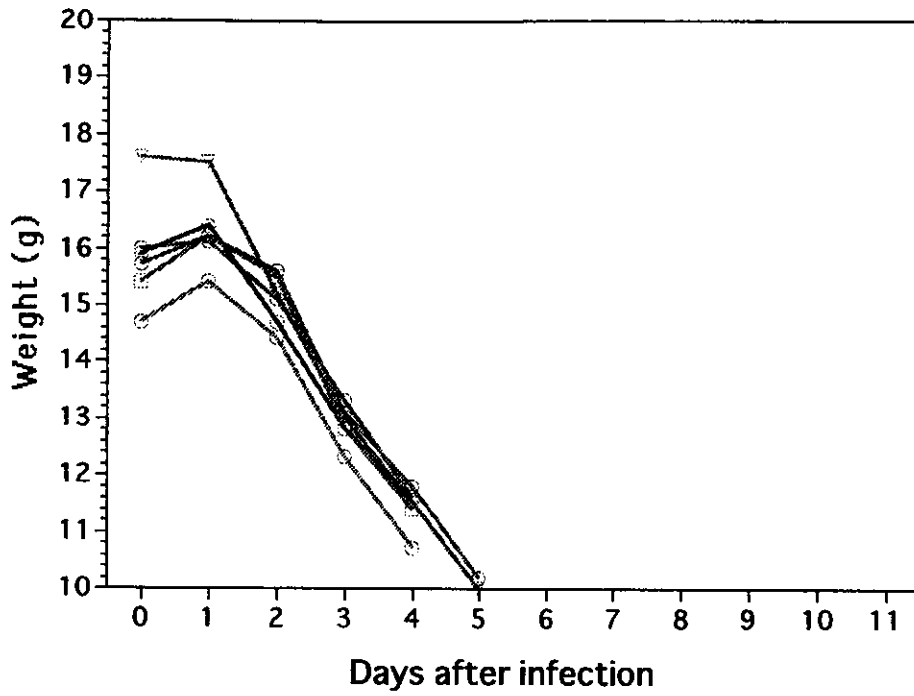


図 6A. WSN 脳内感染と抗体投与の効果：500PFU のウイルスを脳内に接種（対照群）

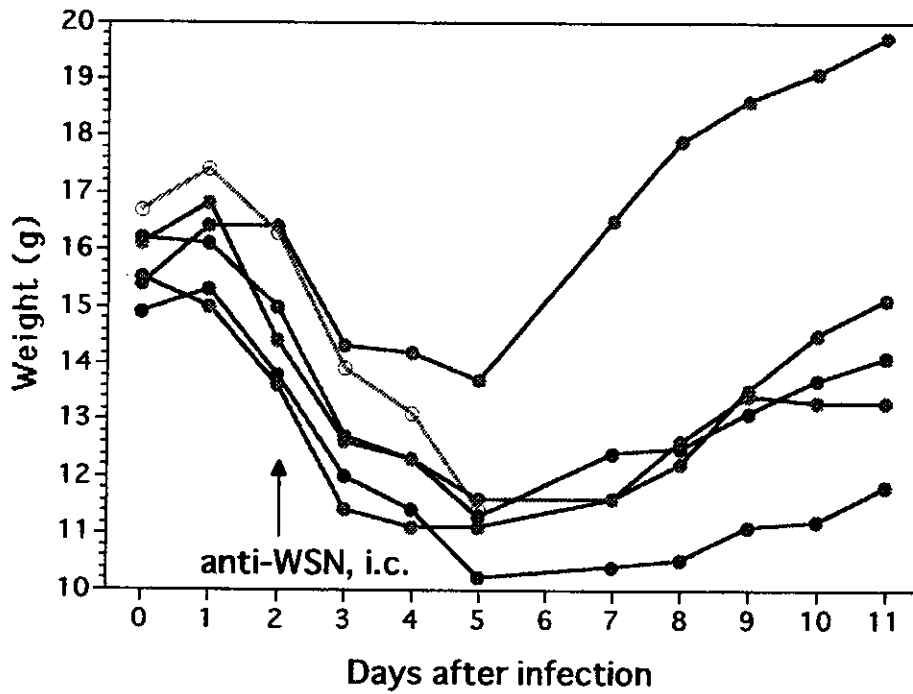


図 6B. WSN 脳内感染と抗体投与の効果：500PFU の WSN 株ウイルスを脳内に接種、2 日後に抗 WSN マウス抗血清を脳内に 50 μ l 投与した。

厚生科学研究費補助金（インフルエンザ脳炎・脳症
の発症機序の解析と治療法の開発研究事業）分担研究報告書

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
分担研究者 永武 毅 長崎大学熱帯医学研究所教授

小児におけるインフルエンザ脳炎・脳症の発症メカニズムにウイルスと細菌とのかかわり、とりわけ咽頭付着細菌およびプロテアーゼの役割についての検討を開始した。現在、咽頭付着病原細菌のデータを集積している。

A. 研究目的

小児が高率に上気道粘膜に付着させている種々の細菌類から産生されるプロテアーゼや細菌感染の刺激によって気道上皮細胞からも産生されるウイルス活性化プロテアーゼがインフルエンザの感染に重要な役割をはたしていることはすでに一部が明らかとなっている。ここでは、脳炎・脳症が小児において集中的に発生することに着目し、ウイルスの活性化や脳炎・脳症の臨床病態にこれらのプロテアーゼや細菌類のはたす役割の有無を検討することを目的とする。

B. 研究方法

県内の小児科医・内科医と連係してインフルエンザおよびインフルエンザ脳症を発症した小児・成人の患者咽頭ぬぐい液を採取し、ウイルス分離、細菌叢の定量培養と同時に後日プロテアーゼ測定の為の冷凍保存を行う。また、ベトナムにおいては脳炎・脳症の疾患概念は必ずしも確立したものではないが、ウイルスと細菌を同一患児から分離するシステムが可動するようになりつつあり、ここでも同様の検討を行う。

C. 研究結果

①小児におけるインフルエンザ脳炎・脳

症患者および成人のインフルエンザ発症患者でみられる咽頭細菌叢とプロテアーゼの関連の関連についての検討では平成13年度は小児のインフルエンザ脳炎・脳症の検体は得られなかった。一方、成人のインフルエンザ発症患者ではワクチン接種者の高抗体価群でみられるインフルエンザ発症に細菌の関与を強く示唆する成績が得られている。

②すでに、継続して検討している小児の咽頭付着細菌叢に関する成績では幼児期が学童期に比べて、常在細菌と病原細菌の両者共に付着菌量が多い傾向をみとめた。これらの成績は髄膜炎の発症年齢が5歳以下とりわけ生後6ヶ月以後2歳以下に集中しており、特に咽頭付着細菌との関連が示唆されている。この方向からもウイルスと細菌との病原性のかかわりの検討がさらに求められる。

③ベトナムの小児における急性気道感染症に関する検討でウイルスと細菌を同時検出する手法を確立しつつある。現在は喀痰・咽頭ぬぐい液での定量培養成績を集積している。

D. 考 察

インフルエンザ脳炎・脳症は5才以下、とりわけ幼児を中心に発症しており、いわば免疫学的にも未熟で、あらゆる種類

の感染症の危険にさらされている年齢層でみられている。従って本症発症メカニズムの解明には急激な生長過程にある小児の生体側における免疫系を含めた易感染要因とインフルエンザウイルスが脳炎・脳症を発症するに際してのウイルスそのものの病原因子と小児が同時に高率に上気道に付着させている病原細菌を含む細菌類の関与の有無について検討してゆく必要がある。Reye 症候群ではアスピリンがその発症に関与することが示されており、日本特有とされているインフルエンザ脳炎・脳症の一部の小児でも強い解熱剤使用との関連がみられるとされる。しかるに、すべての症例が解熱剤の関与で説明出来ないこと、さらに最近の10年間、呼吸器親和性の病原細菌のすべての菌種で急速に進行しているペニシリンをはじめとする抗菌薬への耐性化の問題がある。これらの事実は、病原細菌を上気道粘膜に高率に付着・増殖させている小児において、インフルエンザウイルスの活性化の重要な因子の存在を示唆している。インフルエンザウイルスの感染により、上気道・下気道粘膜上皮細胞はサイトカイン、ケモカインの産生を誘導し、同時に細胞障害により病原細菌付着が容易となることから小児での、しかも健康な小児に急速に進行する脳炎・脳症の発症メカニズムにウイルスと細菌とのかかわりの可能性を示している。今後、小児でのインフルエンザ合併症の最重症型の一つである脳炎・脳症の病態解明と同時に小児の成長期の過程で病原体による宿主の免疫賦活とその破綻がいかにして発生するのかを見極めることが求められている。本研究は小児科、耳鼻科、内科医などが連携してインフルエンザの重症化メカニズムとりわけ脳炎・脳症発症メカニズムの解明を行うものであり、これまで十分に検討されているとはいえないヒトの成長と疾患とのかかわりに視点を置いた臨床研究である。

F. 研究発表

1. 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
2. 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
3. S. Sato, K. Oishi, A. Iwagaki, M. Senba, T. Akaike, M. Akiyama, N. Mukida, K. Matsushima, T. Nagatake: Dexamethasone impairs pulmonary defence against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS gene expression and peroxynitrite production in mice. Clin. Exp. Immunol. 126. 266-273. 2001
4. 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
5. Can Hong Zheng, Kamruddin Ahmed, Naoto Rikitomi, Glenda Martinez, Tsuyoshi Nagatake: The effect of S-Carboxymethyl-cysteine and N-Acetylcysteine on the Adherence of *Moraxella catarrhalis* to Human Pharyngeal Epithelial Cells. Microbiol. Immunol. 43(2); 107-113, 1999
6. Hideaki Arano, Hidefumi Yamamoto, Masachika Senba, Kazunori Oishi, Shoichi Suzuki, Kenichi Fukushima, Naofumi Mukaida, Kouji Matsushima, Katsumi Eguchi, Tsuyoshi Nagatake : Impairment 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

平成 13 年度厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者：黒田泰弘 徳島大学医学部小児科教授

研究要旨

インフルエンザ脳炎・脳症患者 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、アミノ酸を定量分析した。先天性代謝異常及び本症に特有な後天性代謝異常は見出せなかった。しかし、2 例で抗けいれん薬、バルプロ酸ナトリウムの代謝産物が検出された。バルプロ酸ナトリウムがインフルエンザ脳炎・脳症の発症を助長することも考えられる。今後、症例数を増やして検討したい。インフルエンザ脳炎・脳症で血中に増加する TNF- α 及び IL-6 は、培養リンパ球のエネルギー代謝は障害しなかったが、正常ラット血管の内皮を介する血管拡張作用を単独で有することが明らかになった。インフルエンザ感染後、高サイトカイン血症及び強度の血管炎を来すと血管透過性が亢進し、その結果、脳浮腫による脳症を発症することが推測される。今後、サイトカインの血管拡張作用を分子レベルで解析することにより新たな薬物療法の開発が期待できる。

研究協力者：

山口清次（島根医科大学小児科教授）

吉田一郎（久留米大学小児科教授）

重松陽介（福岡医科大学基礎看護学教授）

内藤悦雄（徳島大学小児科講師）

森 一博（徳島大学小児科講師）

みられる。また、TNF- α 、IL-6 などのサイトカインや血管内皮細胞のみで発現し、白血球の rolling の過程に機能する E-selectin が血中に増加する。

これらのことから、インフルエンザ脳症の本体は、脳の血管炎と脳浮腫であり、次のような発症機序が考えられる。インフルエンザウイルス感染時に血中に増加するサイトカイン、白血球からの inducible NO, 中間代謝産物等の分子が、血管内皮細胞の代謝を直接的あるいは間接的に障害して内皮機能は一時亢進状態となり血管は拡張する（図 1）。しかし、その後、内皮細胞機能自体が血管炎により損傷されて血管は拡張状態のままそのトーンスを維持できなくなり間質に水分が多量に流出して脳浮腫をきたす。

この考えのもとに昨年度に引き続き、次の研究を実施した。1)インフルエンザ

A. 研究目的

近年、小児を中心にインフルエンザに伴う中枢神経系の障害、すなわちインフルエンザ脳炎・脳症の報告が増加し問題になっている。本症は、高熱と痙攣とを伴い急速に意識障害が進行し、半数の患者は数日で死に至るか、生存しても中枢神経障害を残す。インフルエンザ脳炎・脳症では、発症から中枢神経症状の発現までの日数が大多数例で 0-1 日と短く、病理学的には、著明な脳浮腫、脳及び全身の血管の障害、血球貪食症候群などが

脳炎・脳症の基礎疾患としての先天代謝異常症及びインフルエンザ脳炎・脳症に特有な代謝異常を検索するために本症患者の尿及び血液中の中間代謝産物を定量分析した。

2) 血管収縮・拡張機能及び細胞エネルギー代謝に及ぼす TNF- α 及び IL-6 の作用を解析した。

B. 研究方法

1) 検体採取法：

全国の大学小児科教授 42 名と徳島大学小児科の関連病院の小児科部長・医長 26 名宛てに検体〔咽頭ぬぐい液，尿，乾燥血液濾紙，血清，髄液〕採取用容器，インフルエンザ脳炎・脳症チェックリスト及び説明・同意書を送付し，関連病院も含めて患者発生時の検体採取と提供とを依頼した。

2) 有機酸，脂肪酸，アシルカルニチン，アミノ酸等中間代謝産物の定量分析法：

全国の医療施設から送付されてきた尿，血清，髄液及び乾燥血液濾紙は，直ちに島根医科大学小児科，久留米大学小児科及び福井医科大学小児科に送付し，gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) 法及び tandem mass spectrometry (MS/MS) 法で中間代謝産物を定量分析した。

3) 血管拡張機能測定法 (図 2)：

SD ラット (6 週齢，雄) の内頸動脈を摘出し，正常な血管リングと血管内皮を剥離した血管リングとを作成した。血管リングに 1g の張力を加え，フェニレフリン (Phe) $5 \times 10^{-7} M$ で血管を収縮させた後，アセチルコリン (Ach) は， $1 \times 10^{-9} M$

から $1 \times 10^{-5} M$ までの血管弛緩率を，ニトログリセリン (NTG) は， $1 \times 10^{-8} M$ から $1 \times 10^{-5} M$ までの血管弛緩率を張力トランスデューサーを用いて測定した。この測定系に IL-6 (100ng/ml) および TNF- α (1ng/ml) を加えて血管弛緩率に及ぼす作用を評価した。

4) 培養細胞ビルビン酸脱炭酸能測定法：

培養リンパ球を PBS に浮遊させた後，ビルビン酸脱水素酵素 (PDH) の活性化剤であるジクロロ酢酸ナトリウム (DCA) 10mM 及び種々のサイトカインを添加して，30 分間，37 度で保温した。次いで， $[1-^{14}C]$ ビルビン酸を加えて 30 分間，保温し，発生した CO_2 の測定によりビルビン酸脱炭酸能を算出した。

C. 研究結果

1) インフルエンザ脳炎・脳症 19 例の臨床的特徴：

1. 病歴

発症時年齢は，1 歳 3 例，2 歳 3 例，3 歳 4 例，4 歳 3 例，5 歳 1 例，7 歳 2 例，8 歳 3 例であった。性別は，男児 8 例，女児 11 例であった。発熱から脳炎・脳症発症までの期間は，0 日 5 例，1 日 8 例，2 日 2 例，3 日 1 例，5 日 1 例，不明 2 例であった。後遺症は，有 3 例，無 8 例，不明 6 例，無記入 2 例であった。家族内に同様な症状の人がいるは，いる 1 例，いない 16 例，無記入 1 例であった。

2. 臨床症状

発熱 19 例，けいれん 14 例，意識障害 18 例，咳嗽 13 例，嘔吐 6 例，鼻汁 11