

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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14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年の年末から平成15年の3月にかけて我が国では、インフルエンザが流行して、小児においてはインフルエンザ脳症あるいはその疑いで亡くなった例が数多く報告された。当研究班では、「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」にこれまで取り組み3年目の最終年度を迎え、これまでの患者から得られたデータとモデル動物での確認が一致して、インフルエンザ脳炎・脳症の疾患感受性遺伝子と、発症に直接係わると推定される遺伝子の絞り込みが進んだ。

具体的には、3年間にわたるインフルエンザ脳炎・脳症の疑われた患者の検体解析とモデル動物での実験の結果、インフルエンザ脳症の疑われた患者では高率にミトコンドリアでの脂肪酸代謝障害が存在していることが明らかとなった。さらにミトコンドリアでの脂肪酸代謝障害は、脳の血管内皮細胞の細胞膜とミトコンドリア外膜に局在するチャンネル蛋白質の異常な発現増加を誘発し、チャンネル蛋白質の増加はさらに血管内皮細胞でのミニプラスミンの蓄積と膜の不安定化を引き起こすことが明らかとなった。これらの事実は、今後インフルエンザ脳炎・脳症の予防と治療を考える重要な視点を提案している。以上の研究成果は、協同研究者と研究協力者のたゆまない努力と、御協力いただいた医師の努力の賜物でありここに改めて深く感謝申し上げる。

平成15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

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

[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14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：疾患感受性遺伝子と発症機序（基礎から臨床へ）
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、Ye Chen, 塩田 麻由美、井手 美喜子、一宮 智子、山口 美代子、木下 俊之（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）
13
2. インフルエンザウイルス感染脳症発症マウスの治療の試み
分担研究者：大内 正信（川崎医科大学・微生物学）
研究協力者：大内 礼子（川崎医療短期大学）
27
3. 小児の上気道におけるウイルスと細菌のかかわり
—日本と海外との比較研究を通じて
分担研究者：永武 毅（長崎大学熱帯医学研究所）
39
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
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）
松田 純子（徳島大学医学部・小児科学）
43
5. ウイルス性脳症におけるウイルスの神経親和性
分担研究者：長嶋 和郎（北海道大学医学部脳科学専攻分子細胞病理）
研究協力者：澤 洋文（北海道大学医学部脳科学専攻分子細胞病理）
仙葉 慎吾（北海道大学医学部脳科学専攻分子細胞病理）
49

3、研究成果の刊行に関する一覧表

59

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：昨年が続いて、インフルエンザ脳炎・脳症、及びライ症候群発症の疾患感受性因子、誘因因子の解析と、発症機序ならびに治療法開発が行なわれた。昨年までの研究成果からインフルエンザ脳症の発症には、解熱剤の服用の有無にかかわらずミトコンドリアでの脂肪酸代謝障害が疾患感受性因子として強く示唆され、本年は関連遺伝子解析とモデル動物を用いた発症機序の解析が行われた。検体の収集された中で、死亡例は全て血液と尿のアシルカルニチンの増加が認められ、1例では carnitine palmitoyltransferase II の遺伝子変異がヘテロに観察され、他の1例はグルタル酸尿症2型と診断された。これらの疾患はアジアにおける最も頻度の高い先天性脂肪酸代謝障害であるが、多くの症例では遺伝子変異がヘテロで障害が潜伏している場合が多いと推定された。これらの患者では、血液中の carnitine 量の目立った減少は観察されなかったが、脂肪酸代謝障害を修復するため carnitine の補充療法が今後の検討課題である。以上を背景として、ミトコンドリアの脂肪酸代謝障害を誘発したモデルマウスを作成して、脳の浮腫を主症状とするインフルエンザ脳症の発症機序の解析を行った。その結果、carnitine transporter の障害、carnitine antagonist によるミトコンドリアの脂肪酸代謝障害の誘発、アスピリン投与、インフルエンザウイルス感染をきっかけとして、特に脳の血管内皮細胞膜上のチャネル蛋白質が異常に増加して細胞機能の障害が惹起されること、チャネル蛋白質が plasmin や miniplasmin のレセプターとして働いて、これらのプロテアーゼを血管内皮細胞膜上に蓄積させることが明らかとなった。さらにこれらのプロテアーゼは、血液—脳関門の破壊とウイルス増殖を誘発する。一方治療に関して抗インフルエンザ薬としての neuraminidase 阻害剤と plasmin や miniplasmin の阻害剤の aprotinine の有効性を検討したところ、両者の効果は同等で共にウイルス量の減少、死亡率と症状の改善を示した。脳浮腫の発症には以上に記載した機序以外に、感染後の高サイトカイン血症が注目されており、特に感染初期から急激に増加する TNF- α は、内皮細胞の産生する NO を介して血管を拡張することを *in vitro* で証明した。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、成人との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た。ペニシリン耐性化した上気道の呼吸器親和性病原細菌が近年増大しており、脳症発症への関与を検討する必要がある。H1N1 型インフルエンザウイルス WSN 株の神経細胞親和性は報告されているが、H3N2 型の神経細胞親和性株は報告されていない。JC virus では sialic acid を含む oligosaccharide が神経細胞親和性を決定していることが明らかとなってきた。これらを基盤に、同じく sialic acid を細胞膜上のレセプターとするインフルエンザウイルスの神経細胞親和性を決定している因子の検索を進めている。

分担研究者

- 大内正信 (川崎医科大学・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、国民に大きな不安を引き起こしている「インフルエンザ脳炎・脳症、解熱剤服用に伴うライ症候群」の感染機序の解明と治療法の開発を焦点に、研究を行った。具体的には、①ライ症候群発症に伴うインフルエンザ脳炎・脳症の誘因となる発症感受性因子、発症素因を同定する。②これまで不明とされていたアスピリンやボルタレンによるインフルエンザ脳症の誘発機序を解明する。これらは、今後、解熱剤、鎮痛剤の安全性を確認する上で重要な研究課題である。③インフルエンザ感染に伴う急性脳浮腫の発症機序の分子論的解析を行う。

以上の研究目的を遂行するため、全国の主要な小児科施設に依頼して、インフルエンザ脳炎・脳症の疑いのある患者から血液と尿、咽頭ぬぐい液の提供を受け、発症感受性因子の検索を行った。さらにインフルエンザ脳炎モデル動物の確立を試みて、実験動物を用いて①～③の解析を行い、臨床検体から得られた情報の検証を行った。

B. 研究方法

主治医の十分なる説明の基に、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患者から、尿と

濾紙血、血清を得、タンデムマスを用いて主に有機酸の解析を行い、代謝異常症の有無を検索した。咽頭ぬぐい液からウイルス株の分離を行い脳炎に関連したウイルス株の検出を試みた。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、静脈内投与により、マウスに感染させて脳炎・脳症の発症機序を検索した。臨床データを基に、発症の感受性因子として我々の研究班が注目したミトコンドリアの脂肪酸代謝障害モデル実験動物として、カルニチントランスポーター、OCTN2 欠損症マウスと、カルニチンアンタゴニストの 3-(2,2,2-trimethylhydrazium) propionate dihydrate (THP) を処理した動物を用いることで、インフルエンザ脳症と脂肪酸代謝障害との関係を検証した。解熱剤として、Diclofenac Sodium (Sigma)と Aspirin を使用した。個々の実験条件は、分担研究報告の研究方法を参照いただきたい。

(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、実施したそれぞれの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

研究は次に示す幾つかの柱を中心に遂行され、成果が挙げられた。

(I) インフルエンザ脳症の疾患感受性遺伝子としてミトコンドリアの長鎖遊離脂肪酸代謝障害の一つを同定した。

昨年までの 2 年間に取り扱った 32 症例のインフルエンザ脳症（疑いを含む）の患者血液から、脂肪酸の代謝障害を示唆する症例が 6 例の高頻度(18.2%)で見つかり、その内の 1 例（典型的ライ症候群で死亡した 9 才の女児）の遺伝子解析が終了した。その結果、ミトコンドリアでの長鎖脂肪酸の代謝に必須な carnitine palmitoyl-transferase II (CPT II) の活性が正常の約 1/3 以下に低下する点突然変異が見い出された。このようなインフルエンザ脳症患者の病態は、動物実験から明らかになってきているライ症候群の発症機序としてのミトコンドリアでの長鎖脂肪酸代謝障害と一致した。以上のことから、今後一連のミトコンドリアの脂肪酸代謝に係わる酵素群の異常が疾患感受性原因遺伝子になることが推定された。なお脂肪酸代謝障害の中でも、CPT II の突然変異はアジア人種では最も頻度が高いとされている。

(II) インフルエンザ脳症の発症機序に、ミトコンドリアの遊離脂肪酸代謝障害が直接かかわっていることを、動物実験から明らかにした。

ミトコンドリアの長鎖遊離脂肪酸代謝を細胞外から直接コントロールシステムとして、カルニチントランスポーター(OCTN2)欠損マウスと、カルニチンアンタゴニスト処理を行い、脂肪酸代謝障害を誘発した。これらのマウスでは、インフルエンザ感染をきっかけとして経時的に炎症を伴わない激しい脳浮腫が高率に発症することを見出した。Diclofenac Sodium や Aspirin、インフルエンザウイルス感染は、全身のミトコンドリアの長鎖脂肪酸代謝障害を誘発し、脳でも障害は著名であった。ミトコンドリアの脂肪酸代謝障害は、細胞膜上のアニオンチャネルの著名な発現増加を誘発した。このチャネル蛋白質の異常増加は、炎症と共に増加したアポトーシス誘発サイトカインシグナル、例えば TNF- α 、に敏感に反応して浮腫とアポトーシスを引き起こすと推定された。さらにこのチャネル蛋白質が、インフルエンザウイルスの増殖性を決定している細胞性プロテアーゼのミニプラスミンに対する細胞膜レセプターであることが、本研究班の研究から発見された。

脳症を起こした動物では、インフルエンザウイルスの増殖が脳血管内皮で見られるが、この増殖はチャネル蛋白質によって内皮に補足されたミニプラスミンがウイルス増殖の原因と推定された。なおチャネル蛋白質の異常増加は、特に脳の血管で見られた。以上のように、インフルエンザ脳症の発症機序の概略が分子レベルで明確となり、発症の危険性をあらかじめ診断することが可能と推定された。

(Ⅲ) 解熱剤の副作用評価の座標軸の一つとして細胞膜のチャネル蛋白質を初めて明らかにした。

上記から明らかのように、チャネル蛋白質の発現増加が、脳症の誘因となる。事実 Diclofenac Sodium や Aspirin は、単独でチャネル蛋白質の発現を増加させたことから、脳浮腫発症の準備状態にあること、これに加えてウイルス感染による炎症をきっかけとして、重症な脳浮腫が引き起こされると考えられた。今後解熱剤、鎮痛剤の副作用の診断に、チャネル蛋白質を指標にした評価の導入が重要である。

(Ⅳ) インフルエンザ脳症の治療の試み

抗インフルエンザ薬として近年使

用されているシアール酸の阻害剤と、上記のミニプラスミンの阻害剤であるアプロチニンのインフルエンザ脳症の治療効果を検討した。この実験では、神経毒性の強いインフルエンザウイルス A/WSN 株を尾静脈経路で感染させ、静脈投与した薬剤の治療効果を検討した。その結果、シアール酸の阻害剤とアプロチニンは、共に神経症状の発症率と死亡率をほぼ半減させて、著大な効果を示した。なお患者から分離されたウイルスは、一般的に培養細胞での増殖が悪く MDCK 細胞で継代すると増殖率の改善を見るが、その理由として、細胞のレセプターとの結合に参与するヘマグルチニン部位の糖鎖が消失することが明らかとなった。

(Ⅴ) TNF- α は単独で血管内皮を拡張した。

インフルエンザ脳症患者で見られる脳の血管の拡張と浮腫発症を、血中で増加するサイトカインの TNF- α との関係から解析した。TNF- α は内皮のある血管を単独で弛緩させ拡張を引き起こしたが、内皮を剥離した血管では弛緩も拡張も見られなかった。このことから、TNF- α は強力な血管拡張作用を有する NO を経由していることが推測され、今後 NO 阻害剤の効果も合わせて検討する。

(VI) 小児の上気道におけるウイルスと細菌とのかかわり

インフルエンザ脳症の発症ピークは、免疫系の未発達な2-3歳にあり、急性呼吸器感染症の好発年齢と一致している。このことから、小児の気道内の細菌叢が、インフルエンザ脳症の発症に何らかの役割を果たしていると仮定して、その可能性の検証を試みた。急性呼吸器感染症の起炎菌である肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラクセラ・カタラーリスの全てが、ペニシリンなどの抗菌剤耐性になっておりこれらの菌の気道内増殖の抑制が困難になっていることがインフルエンザの重症化と何らかの関係があると推定している。

(VII) ウイルスの神経親和性を決める因子の解析

インフルエンザウイルスの中には、WSN 株のように神経親和性を持つウイルスが報告されている。特にスペイン風邪のウイルスは激しい神経症状と後遺症を残したとされている。このような背景から、ウイルスの神経親和性について比較的解析の進んでいる JC ウイルスを例に解析系の確立を試みた。JC ウイルスの場合、神経細胞への侵入は、インフルエンザウイルスと同様に、シアール酸を有する oligosaccharide を介して細胞内に

侵入することが明らかとなった。またこのウイルスの場合、核内でのウイルス増殖を引き起こす因子として転写因子の cleavage stimulating factor が関与している事が明らかとなった。これらの知見を基に、インフルエンザウイルスの中でも神経親和性を示す WSN 株の神経親和性を解析してゆく。

D. 考察

ライ症候群の発症機序に脂肪酸代謝障害が関係しているとの推測は、これまで病理学的所見から示唆されていたが、明確に実証されたことはなかった。本研究では、分子生物学的アプローチと臨床検体の解析が一体となって、インフルエンザ脳症とライ症候群の発症機序を明らかにし、疾患感受性遺伝子として、ミトコンドリアでの脂肪酸代謝に関与する酵素群の変異が同定された。多くの患者では遺伝子変異はヘテロで、日常生活上異常が観察されていないケースが多く、このような患者がインフルエンザウイルスに感染するか、aspirin などの解熱剤を服用したときに脂肪酸代謝障害が顕著に表れたと推定している。さらにミトコンドリアでの脂肪酸代謝障害によってチャネル蛋白質の発現が増加して、血液脳関門を破壊するミニプラスミンの血

管内蓄積の誘因となっている事、またウイルス増殖を血管内皮に誘起することを明らかにした。以上の結果は、欧米を中心として疾患そのものの存在が疑われていたインフルエンザ脳症・脳炎の発症機序について、分子論的に証明したものとして、今後の解析が期待される。

これらの成果を基盤に、今後疾患感受性遺伝子解析による早期予防法の確立、治療法の開発が可能と推定された。

E. 結論

本研究においてこれまで不明であったインフルエンザ脳症とライ症候群の疾患感受性遺伝子の発見と発症機序の解析がなされて、疾患感受性遺伝子として、ミトコンドリアでの脂肪酸代謝に関与する酵素群の変異が同定された。解熱剤の安全性評価に対する基準として、ミトコンドリアでの脂肪酸代謝障害によって誘発される細胞膜上のチャネル蛋白質が提案された。インフルエンザ脳症やライ症候群に伴う脳浮腫の予防、治療薬として、ミトコンドリアでの脂肪酸代謝の改善薬、例えばカルニチン、ミトコンドリアでの ATP 産生を促進するグルコース、アプロチニンなどのミニプラスミン阻害剤の治療への応用が期待された。インフルエ

ンザ脳症の血管拡張と浮腫発症に、血中で増加する TNF- α がNOを介して関与していることが推測された。インフルエンザ脳症の発症に、ペニシリンなどの抗菌剤耐性となった小児の気道内の細菌叢が何らかの役割を果たしていることが示唆され、今後さらなる解析の必要性が指摘された。ウイルスの神経親和性について JC ウイルスを例に解析系の確立が試みられた。JC ウイルスの場合、神経細胞への侵入は、インフルエンザウイルスと同様に、シアール酸を有する oligosaccharide を介して細胞内に侵入することが明らかとなった。これらの知見を基に、インフルエンザウイルスの神経親和性を解析してゆく道筋が示された。

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) 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)
- 2) 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.* 269, 2613-2621 (2002)
- 3) Maegawa, M., Kamada, M., Yamamoto, S., Yamano, S., Irahara, M., Kido, H., and Aono, T.: Involvement of carbohydrate molecules on zona pellucida in human fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 53(1-2), 79-89 (2002)
- 4) Kihara, M., Kakegawa, H., Matano, Y., Murata, E., Tsuge, H., Kido, H., and Katuruma, N.: Chondroitin sulfate is a potent enhancer in the processing of procathepsin L. *Biol. Chem.* 383, 1925-1929 (2002)
- 5) Sato, M., Yoshida, S., Iida, K., Tomozawa, T., Kido, H., and Yamashita, M.: A novel enzyme from porcine lungs processing of hemagglutinin of influenza A viruses: Purification and characterization. *Biol. Chem.* 384, 219-227 (2003)
- 6) Yano, M., Kanesaki, Y., Koumoto, Y., Inoue, M., and Kido, H.: Chaperone activities of the 26S and 20S proteasome. *Curr. Prot. Pept. Sci.* in press (2003)
- 7) 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)
- 8) 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* 20, 16-18 (2002)
- 9) 西川舞、Bing Yang、井手美喜子、奥村裕司、木戸博：生体防御物質群の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 *四国医学雑誌* 58(3), 162-167 (2002)
- 10) 木戸博：生体のウイルス感染感受性因子と近未来型感染予防法 *化学療法の領域* 18(7), 15 (2002)
- 11) 木戸博、山田博司、奥村裕司、日吉峰麗、板東美和、矢野仁康：インフルエンザウイルスの特性；増殖と感染メカニズム—最新の知見をもとに *内科* 90, 809-815 (2002)
- 12) 木戸博、奥村裕司、山田博司、井手美喜子、塩田麻由美：肺サーファクタントはインフルエンザ感染に対する重要な生体防御物質の一つである。肺サーファクタントの作用とその分泌促進剤 *日本界*

- 面医学会雑誌 印刷中 (2003)
- 13) 木戸博、Chen Ye、山田博司、奥村裕司：インフルエンザウイルスの感染感受性を決める個体のプロテアーゼ群とインフルエンザ脳症の発症機序 日本薬理学雑誌 122(1) 印刷中 (2003)
- 14) Ohuchi, M., Ohuchi, R., Sakai, T., and Matsumoto, A. Tight binding of influenza virus hemagglutinin to receptor interferes with fusion pore dilation. *J. Virol.* **76** (24):12405 - 12413, (2002).
- 15) 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, p45-53 (2002).
- 16) 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): 4603-4611, (2002).
- 17) 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): 952-958, (2002).
- 18) Tong, S., Li, M., Vincent, A., Compans, R.W., Fritsch, E., Beier, R., Klenk, C., Ohuchi, M., and Klenk, H-D. Regulation of fusion activity by the cytoplasmic domain of a paramyxovirus F protein. *Virology* **301** (2):322-333, (2002).
- 19) Naito E., Ito M., Yokota I., Saijo T., Matsuda J., Ogawa Y., Kitamura S., Takada E., Horii Y., Kuroda Y. (2002) Thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase deficiency in two patients caused by a point mutation (F205L and L216F) within the thiamine pyrophosphate binding region. *Biochim Biophys Acta.* 1588:79-84.
- 20) Naito E., Ito M., Yokota I., Saijo T., Ogawa Y., Kuroda Y. (2002) Diagnosis and molecular analysis of three male patients with thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *J Neurol Sci.* 201:33-7.
- 21) Naito E., Ito M., Matsuura S., Yokota I., Saijo T., Ogawa Y., Kitamura S., Kobayashi K., Saheki T., Nishimura Y., Sakura N., Kuroda Y. (2002) Type II citrullinaemia (citrin deficiency) in a neonate with hypergalactosaemia detected by mass screening. *J Inherit*

- Metab Dis. 25:71-6.
- 22) Ogawa 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* 26:196-200.
- 23) Yamaryo T, Oishi K, Yoshimine H, Tsuchihashi Y, Matsushima K, Nagatake T. Fourteen-member macrolides promote the phosphatidylserine receptor-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages. *Antimicrob. Agents.Chemother.* 47(1), 48-53, 2003.
- 24) Tsuchihashi Y, Oishi K, Yoshimine H, Suzuki S, Kumatori A, T Sunazuka, Omura S, Matsushima K, Nagatake T. Fourteen-member macrolide suppress interleukin-8 production but not promote apoptosis of activated neutrophils. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46: 1101-1104, 2002.
- 25) Hoshino K, Watanabe H, Sugita R, Asoh N, Angelo S, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T. High rate of transmission of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* between parents and children. *J Clin Microb.* 40: 4357-4359,2002.
- 26) Ahmed K, Suzuki Y, Miyamoto D, Nagatake T. Asialo-GM1 and Asialo-GM2 are putative adhesion molecules for *Moraxella catarrhalis*. *Microbiol Immunol.* 191: 5-10,2002.
- 27) Nagatke T, Ahmed K, Oishi K. Prevention of respiratory infections by povidone-iodine gargle. *Dermatology.* 204(Supp) 32-36,2002.
- 28) Komagome R, Sawa H, Suzuki T, Suzuki Y, Tanaka S, Atwood WJ and Nagashima K: Oligosaccharides as receptors for JC virus. *J Virol* 76: 12992-3000., 2002.
- 29) Miyazaki H, Nagashima K, Okuma Y, Nomura Y. Expression of Ret receptor tyrosine kinase after transient forebrain ischemia is modulated by glial cell line-derived neurotrophic factor in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 2002 Jan 18;318(1):1-4.
- 30) Tsuda M, Tanaka S, Sawa H, Hanafusa H, Nagashima K. Signaling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line. *Cell Growth Differ.* 2002 Mar;13(3):131-9.
- 31) Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N. Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase lambda-deficient Mice: possible implication for the pathogenesis of

- immotile cilia syndrome. *Mol Cell Biol.* 2002 Apr;22(8):2769-76.
- 32) Lyons MJ, Nagashima K, Zabriskie JB. Animal models of postinfectious obesity: hypothesis and review. *J Neurovirol* 2002; 8: 1-5.
- 33) Nagashima T, Sato F, Chuma T, Mano Y, Sasaki I, Mori M, Higa T, Masauji N, Kasai M, Orba Y, Shinohara T, Nagashima K. Chronic demyelinating polyneuropathy in graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Neuropathology* 2002; 22:1-8.
- 34) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Nagashima K, Kurata T. Reconstitution of cleavage of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) RNAs. *Biochem Biophys Res Com* 2002; 293:1084-1091.
- 35) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Hall WW, Nagashima K, Kurata T. Topoisomerase I and ATP activate cDNA synthesis of human immunodeficiency virus type 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jun 7;294(2):509-17.
- 36) Nakamura K, Ariyoshi N, Yokoi T, Oghiga S, Chida M, Nagashima K, Inoue K, Kodama T, Shimada N, Kamataki T. CYP2D6.10 present in human liver microsomes shows low catalytic activity and thermal stability. *Biochem Biophys Res Com* 2002; 293: 969-973.
- 37) Okada Y, Sawa H, Endo S, Orba Y, Umemura T, Nishihara H, Stan AC, Tanaka S, Takahashi H, Nagashima K. Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002;104(2):130-6
- 38) Nishihara H, Maeda M, Tsuda M, Makino Y, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. DOCK2 mediates T cell receptor-induced activation of Rac2 and IL-2 transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 23;296(3):716-20.
- 39) Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, Saito S, Anderson CW, Appella E, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Sawa H, Ikeda K, Motoyama N. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J.* 21: 5195-5205, 2002.
- 40) Nishihara H, Maeda M, Oda A, Tsuda M, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. DOCK2 associates with CrkL and regulates Rac1 in human leukemia cell lines. *Blood.* 2002;100:3968-3974.
- 41) Matsumoto K, Sawa H, Sato M,

- Orba Y, Nagashima K, Ariga H. Distribution of extracellular matrix tenascin-X in sciatic nerves. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2002 Nov;104(5):448-54.
- 42) Yoshida H, Okada Y, Kinoshita N, Hara H, Sasaki M, Sawa H, Nagashima K, Mak TW, Ikeda K, Motoyama N. Differential requirement for Apaf1 and Bcl-X(L) in the regulation of programmed cell death during development. *Cell Death Differ*. 2002 Nov;9(11):1273-1276.
- 43) Komagome R, Sawa H, Suzuki T, Suzuki Y, Tanaka S, Walter J. Atwood WJ, Nagashima K. Oligosaccharides as Receptors for JC Virus. *J. Virol*. 2002. 76: 12992-13000.
- 44) Yoshida H, Okada Y, Kinoshita N, Hara H, Sasaki M, Sawa H, Nagashima K, Mak TW, Ikeda K, Motoyama N: Differential requirement for Apaf1 and Bcl-X-L in the regulation of programmed cell death during development *Cell Death Differ* 9: 1273-76, 2002
- 45) Eto K, Tokunaga H, Nagashima K, Takeuchi T. An autopsy case of Minamata disease (methylmercury poisoning) – Pathological viewpoints of peripheral nerves. *Toxicol Pathol* 30: 714-722, 2002.
- 46) Arai Y, Tsutsui Y, Nagashima K, Shinmura Y, Kosugi T, Wakai M, Nishikage H, Yamamoto J: Autopsy case of the cerebellar form of progressive multifocal leukoencephalopathy without immunodeficiency. *Neuropathology* 22: 48-56, 2002.
- 47)大場靖子、澤 洋文、長嶋和郎：JC virus の分子神経病理学。脳と神経 54: 101-109, 2002.
- 48)仙葉 眞吾、澤 洋文、長嶋和郎：JC ウイルスからみたグリアの生物学。神経研究の進歩 46: 557-65, 2002
- 49) 鈴木 忠樹、澤 洋文、長嶋 和郎：ヒトポリオーマウイルス・JC ウイルスとヒト腫瘍の発生。医学のあゆみ 203: 245-47, 2002
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 脳炎・脳症の診断：特願 2003-51678: 2003 年 2 月 28 日

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：疾患感受性遺伝子と
発症機序（基礎から臨床へ）

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、Ye Chen、塩田 麻由美、
井手 美喜子、一宮 智子、山口 美代子、木下 俊之（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）

研究要旨

昨年につき、ライ症候群を含めインフルエンザ脳症を発症する患者の誘因と疾患感受性因子の検索を行った。インフルエンザ脳症が疑われた患者の約18%に脂肪酸の代謝障害が見いだされ、死亡した2症例は共にミトコンドリアでの長鎖脂肪酸の代謝障害と診断された。1例は Carnitine Palmitoyltransferase II(CPTII)遺伝子の point mutation がヘテロにあり、酵素活性は約1/3に低下しているものの、既往歴では特に異常はなかった。他の例は、尿と血液の Acylcarnitine 解析から、 β -酸化酵素の欠損によって生ずるグルタル酸尿症2型と診断され、現在関連酵素の変異を解析している。上記の2例は、我が国で最も頻度の高い脂肪酸の代謝障害で人種的背景を持つ。ミトコンドリアの長鎖脂肪酸代謝障害を誘発したマウスのモデル動物実験では、インフルエンザウイルスの経鼻感染をきっかけとして経時的に激しい脳浮腫が生ずる事と、脳の血管内皮細胞膜上にミニプラスミンの蓄積が起きて、血液-脳関門を破壊する事が明らかとなった。さらに脳血管内皮細胞膜上では通常では見られないことのないインフルエンザウイルスの複製が、ミニプラスミンの蓄積に伴って限局して生じることが見いだした。これらの現象は、ミトコンドリアでの長鎖脂肪酸の代謝障害をきっかけとして、脳の血管内皮細胞膜上のチャンネル蛋白の発現が急速に増加して血管内皮細胞の機能障害を導くだけでなく、このチャンネル蛋白質自身がミニプラスミンやプラスミンの蓄積を誘発するレセプターとして働いていることが証明された。これらの事から、インフルエンザ脳症の疾患感受性因子としてミトコンドリアでの長鎖脂肪酸の代謝障害が、脳症発症の直接のトリガーとしてインフルエンザ感染による炎症反応産物のミニプラスミンや TNF- α などが主に肺で産生されて血液を介して脳に至り、急速な脳浮腫を引き起こすと推定された。これらのことから、今後ミトコンドリアでの長鎖脂肪酸の代謝障害や、ミトコンドリアでの ATP 産生阻害等のミトコンドリアストレスを軽減する対策が、インフルエンザ脳症の予防と治療に有効と推定された。

A. 研究目的

インフルエンザ感染に伴って乳幼児を中心に発症するインフルエンザ脳炎・脳症は、死亡率の高さ、後遺症の出現頻度の高さから社会問題になっており、厚生行政上重要な研究課題である。これまで欧米ではアスピリンやボルタレン (Diclofenac Sodium) の服用に伴って発症するライ症候群が注目されていたが、その発症機序は依然として不明である。一方我が国では、これらの薬剤を服していない小児でも“インフルエンザ脳炎・脳症”が発症することが報告され、人種的、遺伝的背景が示唆されていたが明確な解析がなされていない。これらの疑問点から“インフルエンザ脳炎・脳症”の疾患感受性遺伝子の同定と、脳の浮腫を主症状とするインフルエンザ脳症の発症機序の解析を、臨床検体の解析とこれを基にしてモデル動物実験から検証を行った。

B. 研究方法

(ア) 研究材料

ウイルス株：現在流行しているウイルス株と同型の非神経向性株インフルエンザ A/Aichi/68(H3N2)株を用いモデル実験動物を使用して、脳症・脳炎の検討を行った。神経向性インフルエンザ株として、インフルエンザ

ザ A/WSN/33(H1N1)株を用いた。

実験動物：Wild type として正常 C57BL/6J マウスと Carnitine transporter OCTN2 を欠損し Juvenile Visceral Steatosis (JVS)を示す C57BL/6J マウスを用いた。実験は New Born (授乳期)として生後2日目から離乳期(生後3週齢)までをインフルエンザ脳症・脳炎好発年齢マウスとして主に実験に用いた。

解熱剤：Diclofenac Sodium、Aspirin (Acetylsalicylic acid) (Sigma)を用いた。
β-酸化障害誘発剤：体内脂肪酸のβ-酸化障害を一時的、可逆的に誘発し、JVS マウスに類似した体内状態を誘発する試薬としてカルニチンアンタゴニストのβ-(2,2,2-trimethyl -hydrazium) propionate (THP) を使用した。なお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。

(イ) 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)を生理食塩水で希釈した後、その 4 μl 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 μl をエーテル麻酔下に 3.3×10^4 PFU を経鼻感染させた。ウイルス感染後、毎日体重測定と死亡率