

を測定した。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。

(ウ) 解熱剤、THP の投与

Diclofenac Sodium を生理食塩水に溶解させた後 (1 µg/ml)25 µl を、Aspirin は 30 µg/ml,25 µl 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 Diclofenac Sodium 4 mg/Kg/日、Aspirin 120 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 µl をマウス背側頸部に 300 mg/Kg/日投与した。

(エ) 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 µl (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。

(オ) インフルエンザウイルス RNA の定量

脳、肺、肝臓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 µg 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'-TGAAGTIGACTAAT-GCTACTG-3', P2: 5'-ACAGACCCCTA-CCCAGGGT-3' を First PCR に使用して 578 bp の検出を行った。P3: 5'-GCAACTGTTACCC-TTATGAT-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'-TCTGGCTCT-CGGCCAAGA-3', P6: 5'-TTGGCACCGCATGATGTC-3' と、Taq Man probe, 5'-(FAM) TTCCAGG-AAATGACAACAGCACAGCAA-(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-TV 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) 免疫組織化学によるインフルエンザウイルス抗原、ミニプラスミン、チャネル蛋白質の検出

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反応を示す 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。ミニプラスミンに対する特異一次抗体は、Murakami, M., 等の方法 (Eur. J. Biochem. 268, 2847-2855, 2001)により作成、チャンネルに対する一次抗体もウサギにて作成して実験に用いた。これらの特異精製抗体 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 法で各々の抗原を検出した。

C. 研究結果

1) ミトコンドリアでの脂肪酸代謝障害時に、脳浮腫発症の危険性 (感受性) が増加する。

ミトコンドリアでの ATP 産生は、主として Acetyl CoA を介して TCA サイクルによって行われるが、細胞内の Acetyl CoA 量を低下させる様々な原因、具体的には長鎖脂肪酸が Acyl carnitine を介してβ-酸化で代謝される経路の障害で、脳浮腫発症の個体の感受性が増加することを見いだした。

全国から送られてきたインフルエンザ脳症の疑われた 32 例の患者検体 (血液、尿) 中の 6 例で、ミトコンドリアの長鎖脂肪酸代謝障害が推定され、2 例の死亡した患者では特に明らかな異常が検出された。これら事実を基盤に、ミトコンドリア内膜中の長鎖脂肪酸代謝障害を細胞膜レベルで誘導するモデル動物を作成して、長鎖脂肪酸代謝障害とインフルエンザ脳症との関係を検証した。具体的には、carnitine transporter OCTN2 の欠損マウス (JVS マウス) と、carnitine antagonist THP のマウス皮下注射のシステムを用いた。Evans Blue の組織浸潤を指標にした脳浮腫の測定では、インフルエンザウイルス感染後経時的に脳浮腫が増加し、JVS マウスでは Wild Type (WT) マウスに比して明らかな脳浮腫が認められ、脳実質の Evans Blue は経時的に増加した。インフルエンザ感染の無い状態では WT, JVS 共に脳の浮腫が無いことから、ミトコンドリアでの長鎖脂肪酸代謝障害は脳浮腫発症の感受性増加を引き起こすが、それ単独では脳浮腫の発症を導く引くことはない。しかしこのような状態にインフルエンザウイルス感染が重なると脳浮腫を主症状とするインフルエンザ脳症が発症すると推定された。

2) インフルエンザ脳症・脳炎モデルマウスの脳では、脳浮腫に伴って脳血管内皮に血液-脳関門を破壊するミニプラスミンの増加とウイルス増殖が認められた。

脳浮腫発症因子として、これまでに様々な因子が考えられてきた。例えばインフルエンザ脳症局所で浮腫を引き起こすとされる NO や Endothelin の増加、NO 産生を触媒する iNOS の発現増加が報告されている。しかし図 1 に示すように、ミトコンドリアの長鎖脂肪酸代謝障害に関連して、インフルエンザウイルス感染を直接のきっかけとして脳血管内皮で起きている著名な変化は、ミニプラスミンの蓄積であった。ミニプラスミンは、これまでに血液脳関門を破壊する因子として知られている(Blood Coag. Fibrinol. 1, 429-457, 1994)だけでなく、インフルエンザウイルスの増殖サイクルに必須な因子として我々によって明らかにされてきた (Eur. J. Biochem. 268, 2847-2855, 2001)。図 1 に示すように、JVS マウスの脳血管内皮細胞に感染後数日よりミニプラスミンの蓄積が始まり、これに伴い脳血管内皮でのウイルス増殖と脳浮腫が認められた。この脳で蓄積されるミニプラスミンは、肺の炎症局所で多量に作られた後血液を介して全身に輸送され、特

に脳の血管内皮細胞膜上に蓄積されると推定された。

3) ミニプラスミンは脳血管内皮細胞膜上に発現増加したチャネルをレセプターとして蓄積される。

なぜミトコンドリアの長鎖脂肪酸代謝障害に関連して、脳血管内皮細胞にミニプラスミンが蓄積するのであろうか。このミニプラスミンはどこで作られ脳血管内皮細胞に運ばれてくるのだろうか。我々は、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では、特に脳血管内皮細胞膜でのチャネル蛋白質の発現が高まり、増加したチャネル蛋白質がミニプラスミンのレセプターになっていることを見いだした。

図 2 に示すように PVDF 膜に固定化された Plasminogen, Miniplasmin, Microplasmin に対して、チャネル蛋白質の結合を検討した。チャネル蛋白質に、Kringle 1-5 を持つ Plasminogen と、Kringle 5 を持つ Miniplasmin が結合し、Kringle 領域を持たない Microplasmin は結合しなかった。このことから、少なくとも Kringle 5 領域が、チャネル蛋白質との結合に関与していることが明らかになった。

4) 脳の血管内皮細胞でのチャネル蛋白質の発現は低い、ミトコンドリアでの脂肪酸代謝障害により発現

量が著明に増加する。

Wild type (WT)マウス脳のチャンネル蛋白質の発現は、通常状態では比較的 low レベルにあるが、インフルエンザ脳症や脳炎の誘因物質にさらされると、チャンネル蛋白質の発現は増加して脳浮腫の準備状態（感受性増加状態）になる。図 3 には、WT マウスに解熱剤や THP などの脂肪酸代謝障害物を投与したり、インフルエンザウイルスを感染させた時の、脳のチャンネル mRNA の発現増加を検討した結果を示す。授乳期の WT マウスにインフルエンザウイルスを経鼻感染させると、感染 3 日後には明らかに脳のチャンネル m-RNA の発現増加が認められた。さらにインフルエンザウイルス感染の無い状態でも、carnitine antagonist の THP を処理したり、ライ症候群の誘因物質として知られている Aspirin を投与することで、脳のチャンネル m-RNA の著明な増加が認められた。同様な現象が脳以外の肺でも認められたが、脳においては特に上記の処理に敏感に反応してチャンネル m-RNA の発現増加が認められた。

5) 脳の血管内皮のチャンネル蛋白質はインフルエンザ感染によって著明に増加する。

図 4、5 に、インフルエンザの経鼻

感染に伴う JVS マウスの脳血管内皮と神経細胞におけるチャンネル蛋白質発現の増加を示す。ミトコンドリア内の長鎖脂肪酸代謝障害を持つ JVS マウスでは、WT に比べて脳におけるチャンネル蛋白質の発現レベルは高いが、図 4 に示すようにチャンネル蛋白質の発現は主に神経細胞のみで観察され、血管内皮でははっきり確認できない。しかしインフルエンザウイルスを経鼻感染させた 5 日目の脳では、図 5 に示すように、チャンネル蛋白質の脳血管内皮での著明な増加と、神経細胞での同様な発現増加が認められた（特許出願中）。ここでは示していないがコントロール実験として用いた Non-immunized IgG では、いずれの検体も全く染色されず、図 4、5 で検出された蛋白質はチャンネル蛋白質の抗体に特異的に反応して染色されたと推定された。

D. 考察

インフルエンザ感染に伴って小児では、意識障害、熱性痙攣、重積痙攣、嘔吐などの中枢神経症状がしばしば認められ、時に急速な経過をたどって死に至ることがある。このような患者の中で、Aspirin, Diclophenac Sodium, などの解熱剤をきっかけにして脳症の起る疾患に対してライ症候群と、インフルエンザウイルス感

染に伴うその他の原因不明なケースに、我が国では特にインフルエンザ脳症・脳炎と呼んでいる。しかし先天的脂肪酸代謝障害児の場合、特に日本が多い Carnitine palmitoyltransferase II, Glutaric aciduria type 2 欠損症, 欧米で多い Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase 欠損症では、インフルエンザ感染が無くともライ様症候群として脳症を発症することが報告されている。これらの遺伝子がホモに欠損している場合、3歳以前に筋肉症状や心肥大を伴って発見されることが多く、遺伝子欠損がヘテロの場合、通常は症状が無くインフルエンザやその他の感染でライ様症候群を示して死に至ることがあると推定される。これまで、これらの疾患（ライ症候群、インフルエンザ脳炎・脳症、先天性脂肪酸代謝障害児のライ様症候群）における脳浮腫や脳の機能障害の発症機序が不明であったため、正確な鑑別診断、治療法、予防法が無かった。本研究の結果から我々は、これらの疾患では共通して脳の血管内皮細胞のチャネル蛋白質の発現が異常に増加し、脳浮腫の準備状態（脳浮腫高感受性状態）が作られていると推定している。このような状態に、インフルエンザウイルス感染による炎症反応の結果、ミニプラスミンが産生される

と、脳血管内皮細胞膜上のチャネルに結合したミニプラスミンの蓄積が生ずる。その結果、血液—脳関門の破壊や内皮細胞の機能不全が生じ、脳症が発症すると推定された。

脳血管内皮細胞膜上のチャネル蛋白質の発現をモニターすることで、インフルエンザ脳症発症の準備状態にあるか無いかを診断できると推定された。さらにミトコンドリアでの脂肪酸代謝障害を軽減する治療法や、チャネルブロッカー、miniplasmin, plasmin, plasminogen とチャネル蛋白質との結合阻害薬が治療に有効であることが示唆された。

E. 結論

本年度の研究から、インフルエンザ脳症の多くに発症感受性因子として、ミトコンドリアの長鎖脂肪酸代謝障害が存在していると推定された。既往歴において特に異常の無い多くのインフルエンザ脳症患者では、ミトコンドリアの長鎖脂肪酸代謝酵素群の遺伝子変異がヘテロで日常生活には異常が無いと思われる。しかし、インフルエンザ感染によりミトコンドリアストレスがかかると、長鎖脂肪酸代謝障害が顕在化すると推定された。ミトコンドリアの長鎖脂肪酸代謝障害の結果、脳の血管内皮細胞膜上のチャネル蛋白質の増加に

よる細胞機能障害、これに加えてこのチャンネル蛋白質をレセプターとするミニプラスミンの蓄積が起きる。その結果、ミニプラスミンの増加による血液-脳関門の破壊と血管内皮細胞におけるウイルス増殖が生じる。以上のインフルエンザ脳症発症感受性因子と発症機序が推定された。

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と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。特にアジア人種に多いとされている Carnitine palmitoyl-transferase II, Glutaric aciduria type 2 欠損症,あるいはこれらの遺伝子変異をヘテロに持っており通常では発症しないが、潜在的な脂肪酸代謝障害のある患者がインフルエンザに感染すると、重症で致命的に経過する危険があると推定された。

G. 研究発表

1 : 論文発表

- 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 Katunuma, 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., Kanasaki, 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ー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)
- 2 : 学会発表
- 1) Kido, H., and Yao, D.F.: Mini-plasmin accumulation in the brain capillary triggers non- neurotropic influenza A virus invasion in the brain. 16th International Congress of Fibrinolysis and Proteolysis. (Minich) Sept. 8-13 (2002)
- 2) Lin, C., Yamada, H., Okumura, Y., Yao, D.F., and Kido, H.: Cat D converts plasmin into mini-plasmin which stimulates pro-MMP-9 activation and influenza virus proliferation in lungs and brains. (Portrotz, Slovenia) Sept. 14-18 (2002)
- 3) 木戸博：生体防御物質の気道分泌を促進する塩酸アンブロキソールノ抗インフルエンザ効果と今後の展望：第25回日本気管支学会（札幌）5月10日 (2002)
- 4) Chen Y., Yao, D.F., Kuwajima, M., Sharmin, S., and Kido, H.: Increase in expression of endothelin and iNOS in lungs and brains after influenza A virus infection. 第75回日本生化学会大会（京都）10月14-17日(2002)
- 5) Yao, D.F., Kuwajima, M., and Kido, H.: Impaired free fatty acid metabolism in mitochondria causes brain vascular invasion of epidemic

- influenza A virus in newborn/cuckling perion. 第75回日本生化学会大会 (京都) 10月14-17日(2002)
- 6) 林春興、木戸博：新規プロセシングプロテアーゼ、ミニプラスミンによる Pro-MMP-9 活性化機構 第75回日本生化学会大会 (京都) 10月14-17日(2002)
- 7) 西川舞、奥村裕司、日吉峰麗、藤内美恵子、大内正信、木戸博：新規膜型トリプシン型プロテアーゼ、TMSPi は、肺においてセンダイウイルスの増殖を促進する。第75回日本生化学会大会 (京都) 10月14-17日(2002)
- 8) 木戸博：抗インフルエンザ作用を示す去痰剤の不思議、新たな薬理作用と機序 第52回日本アレルギー学会総会 (横浜) 11月28-30日(2002)
- 9) 木戸博、奥村裕司、山田博司、井手美喜子：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 第38回日本界面医学会学術研究会 (徳島) 10月5日 (2002)
- 10) 木戸博：インフルエンザの感染感受性決定因子群とその検索法 第180回徳島呼吸器疾患談話会 (徳島) 10月10日

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

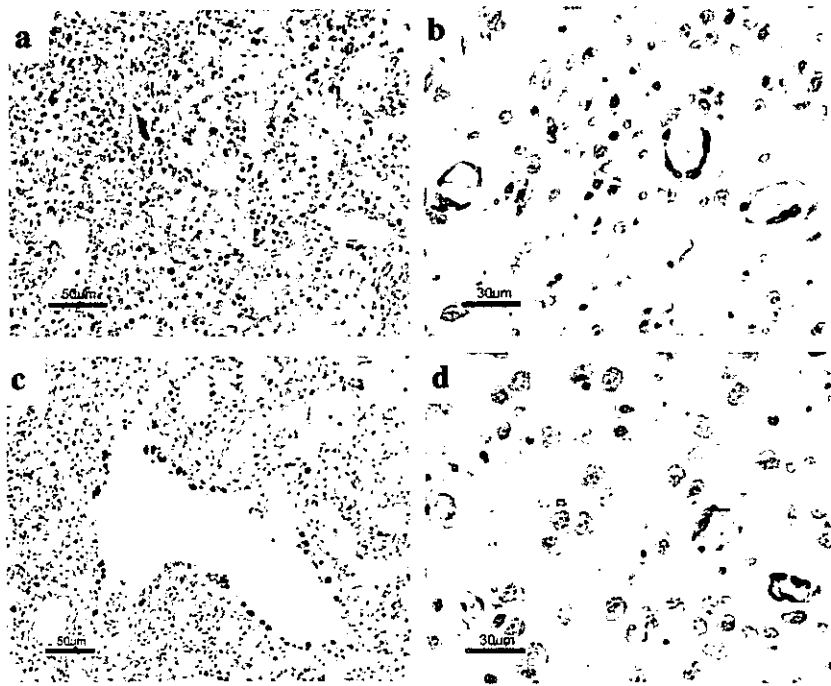


図1：免疫組織化学的解析による JVS マウスの肺 (a, c) と脳 (b, d) のインフルエンザウイルス抗原とミニプラスミン。

a, b: インフルエンザウイルス抗原の検出 c, d: ミニプラスミンの検出

Plasminogen Miniplasmin Microplasmin

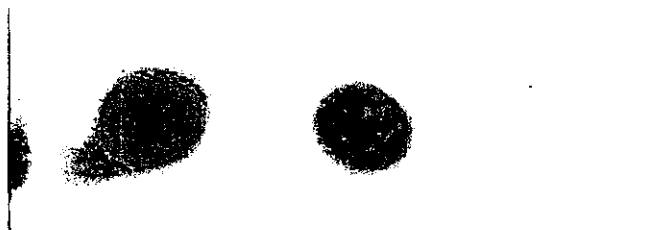


図2： Plasminogen, miniplasmin, microplasmin と精製チャネル蛋白質との結合性の検討

Plasminogen, miniplasmin, microplasmin (各 50 ng) をニトロセルロース膜にドットプロットした後、精製チャネル蛋白質溶液 (100 ng/ml) と反応させた。結合したチャネル蛋白質は抗チャネル蛋白質抗体を用いて ECL ケミルミネッセンス試薬 (Amersham) で検出した。

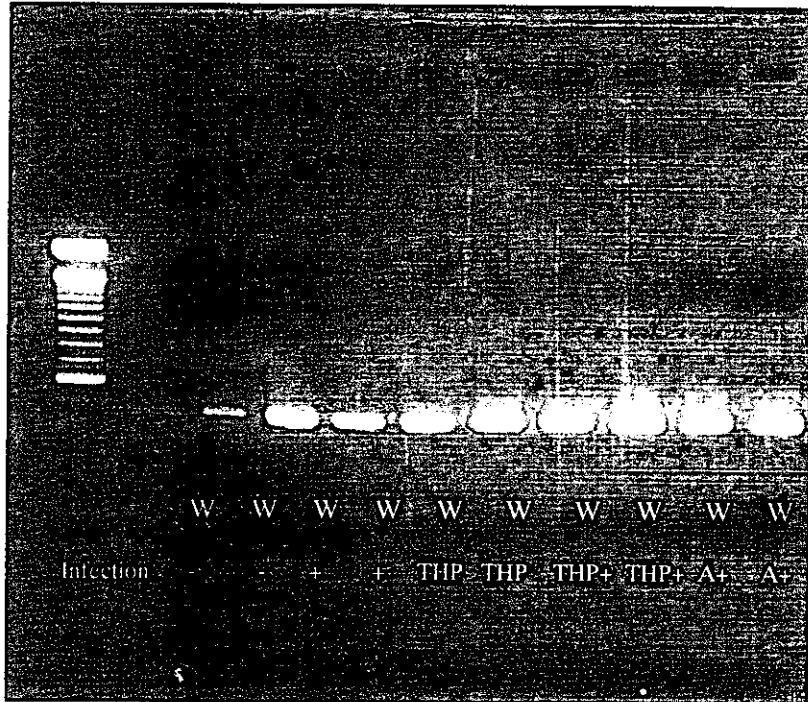


図3：脳のチャンネル蛋白質の m-RNA はインフルエンザウイルス感染、carnitine antagonist の THP, Aspirin によって発現が強く増強される。

—：インフルエンザウイルス感染なし。生理食塩水の注射

＋：インフルエンザウイルス経鼻感染後5日目

THP 投与：THP (300 mg/Kg/Day) 5日間単独投与

A: Aspirin (120 mg/Kg/Day) 5日間単独投与

各2匹のチャンネル蛋白質の発現を RT-PCR にて検討した結果を示す。

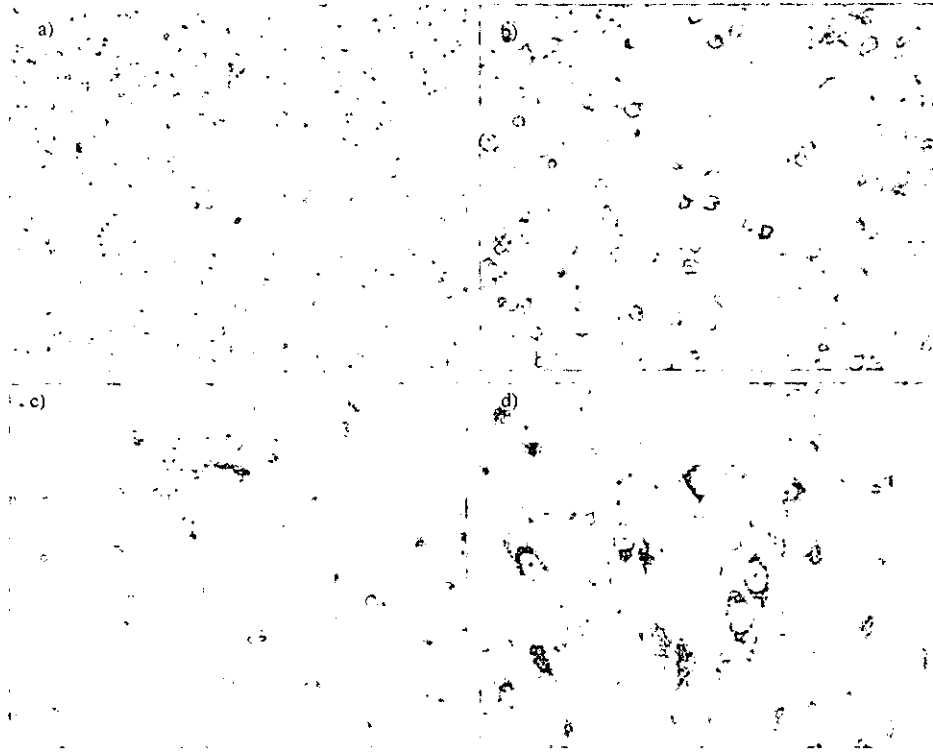


図4：未感染 JVS マウス脳チャンネル蛋白質の発現

a), c)は $\times 140$ の弱拡大像を b), d)は $\times 420$ の強拡大像を示す。血管内皮は染色されていないが、d)に示すように神経細胞は染色されている。

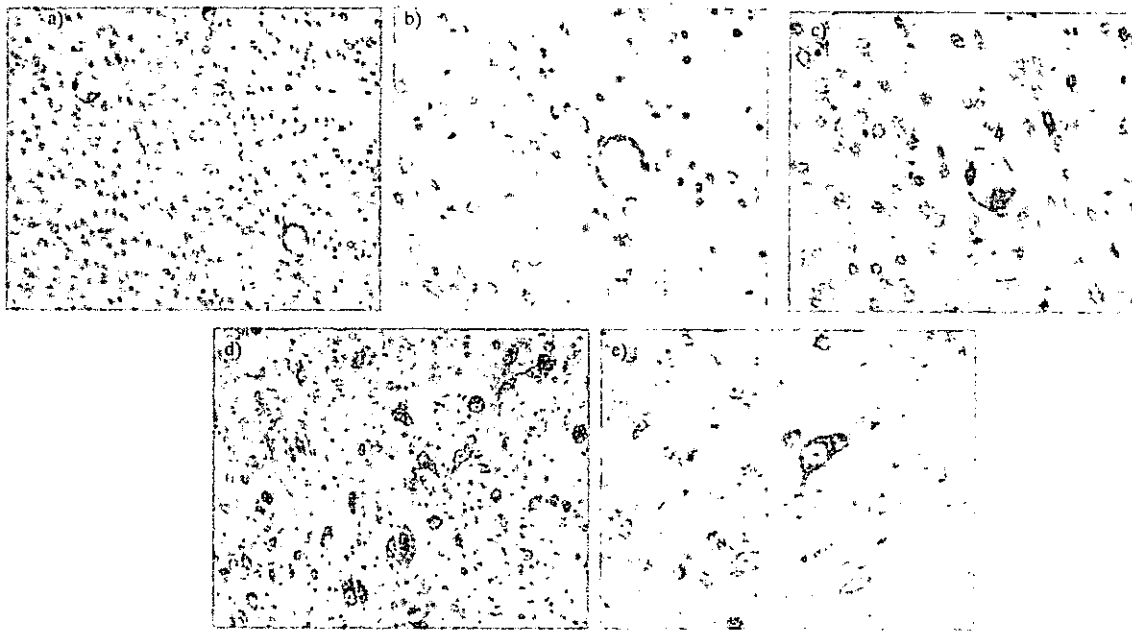


図5: インフルエンザウイルス感染5日目のJVSマウス脳のチャンネル蛋白質発現増強

a), d)は $\times 140$ の弱拡大像を、b), c), e)は $\times 420$ の強拡大像を示す。ウイルス感染後 a)~c)に示すようにチャンネル蛋白質は血管内皮細胞に特異的かつ著明に発現増加した。d), e)に見られるように神経細胞での発現も増加していた。

平成 14 年度厚生科学研究（脳科学研究事業）

分担研究報告書

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・微生物学教室）

共同研究者：大内礼子（川崎医療短期大学）

研究要旨

従来の研究によって、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、ウイルス尾静注感染マウスに抗血清を投与すると非常に効率良く神経症状の発現が抑制され、生存率が著しく改善されることが明らかとなった。本年度は脳内直接感染ではいかなることが起きているかを解析するとともに、致死感染がプロテアーゼ阻害剤アプロチニンによってどれくらい治療が可能かを解析し、また患者から分離された直後のウイルスとそれを細胞で数代継代したウイルスの性状を比べ、ヒトの身体の中でのウイルスの実態を明らかにすべく研究を行った。その結果、インフルエンザウイルスの脳内直接感染では Defective interfering (DI) 粒子の存在によって感染後の経過が著しく影響を受ける可能性が見出され、またプロテアーゼ阻害剤の投与によってウイルス感染マウスの神経症状の発現と死亡率の抑制されることが明らかとなり、さらに患者から分離されたばかりのウイルスは一般に細胞での感染増殖効率が悪いが、MDCK 細胞で継代すると感染増殖効率の良いウイルスと置き変わることで、その過程でウイルスヘムアグルチニン (HA) のレセプター結合部位周辺の糖鎖結合部位が一つ消失することなどが明らかとなった。

A. 研究目的

インフルエンザ脳炎・脳症の発症機構の解明については、本班の班長である木戸教授らにより、ようやくその分子メカニズム解明の第一歩が開かれようとしている。研究分担者大内らのグループではその解明のための基礎となるウイルス学的情報を提供すべく、インフルエンザ脳症類似の症状を発現するマウスモデルの作成し、神経症状発現の条件の解明およびその抑制のための手段と条件の解明、さらに患者から分離されたウイルスの性状の解析などを行った。昨年度までの研究において、インフルエンザウイルス A/WSN 株を尾静脈経由で離乳～成熟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、他の臓器からは全くウイルスが分離されなかった。またこれらのマウスにノイラミニダーゼの阻害剤を投与すると神経症状の発現はそれほど抑制されないが生存率を改善することが明らかとなった。一方、抗 WSN 株マウス抗血清を投与した場合には劇的な治療効果を表すことが明らかとなった。今回は、プロテアーゼ阻害剤の治療効果を検討するとともに、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、加えて、患者から分離直後のウイルスと数代継代したウイルスの性状の違いについても検討した。

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 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ PFU のウイルスを、脳内には $2 \sim 2 \times 10^5$ 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、腎臓を摘出し、乳鉢、注射器を使ってホモジネートを作成し、10,000 rpm、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。

薬剤：アプロチニンは牛肺から分離・精製したもの (Sigma) を購入した。インフルエンザウイルス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. ウイルス静注感染マウスのアプロチニンによる治療実験

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路で感染 (2×10^5 PFU/mouse) させ、感染翌日あるいは 2 日後から、アプロチニン (1 mg/ml) を静脈内に 0.2 ml 投与し、アプロチニンに発症阻止効果あるいは死亡率減少効果があるか否かを調べた。

図 1B は感染翌日と 2 日後にそれぞれ 1 回アプロチニンを投与したマウスの体重変化を経時的に表したもので、図 1A は対照として生理食塩水を投与した群である。対照群では 3/7 のマウスが死亡したのに対しアプロチニン投与群ではすべてのマウスが体重減少から回復して生き延びた。

図 2B は感染 2 日と 3 日後に各 1 回アプロチニンを静注投与したものであるが対照群 (図 2A) の死亡率が 5/6 に対し、アプロチニン投与群では 6/12 であった。他の実験成績も含めて、アプロチニンのウイルス感染マウスにおける神経症状発症率と死亡率の抑制効果をまとめると下の表 1 のようになる。

表 1. WSN 株ウイルス感染マウスにおけるアプロチニンの治療効果

----- 感染 1,2 日後アプロチニン投与		
	発症率	死亡率
対照群	9/14 (64%)	9/14 (64%)
投与群	6/17 (35%)	5/17 (29%)

----- 感染 2,3 日後アプロチニン投与		
	発症率	死亡率
対照群	6/6 (100%)	5/6 (83%)
投与群	12/12 (100%)	6/12 (50%)

インフルエンザウイルスなどエンベロープを有するウイルスが感染性を獲得するためには、ウイルスエンベロープの膜融合を行うウイルス蛋白が宿主のプロテアーゼによって活性化されなければならない(本間・大内の研究によって明らかにされた)。呼吸器系におけるウイルスの活性化をつかさどるプロテアーゼは本班の班長である木戸らによってはじめて分離同定された。アプロチニン¹⁾は牛肺などから得られる蛋白で、強いプロテアーゼ阻害活性が知られており、それによって呼吸器系ウイルスの活性化が抑制されることをロシアの Zhirnov²⁾らが報告している。表1に示された成績は、アプロチニンがマウスの神経症状発症率を抑制し死亡率を低下させる効果があることを示しており、その効果は昨年度報告したノイラミニダーゼ阻害剤の効果と同等であった。作用機序の全く異なるこれらの蛋白と薬剤の同時併用効果が期待される。

2. マウス脳内直接感染における WSN 株インフルエンザウイルスの感染様式について。

平成 12, 13 年度の感染実験において、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、しかしウイルス液を十分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観察された。このような現象は静注感染や経鼻感染では観察されず、ウイルスの脳内感染に特有のものと考えられた。

この仕組みとして、1) 脳内では大量のウイルス接種で誘導された免疫反応によってウイルスは速やかに駆逐されマウスは感染死から免れるが、少量のウイル

ス接種では十分な免疫反応が誘導されず、ウイルスの感染拡大を阻止することができない可能性、2) 大量のウイルス接種では共存する DI 粒子 (defective interfering particles) が感染性ウイルスと同時に同一細胞に感染し、感染性ウイルス粒子の産生を妨げ、DI 粒子の産生を促進する可能性が考えられる。ウイルス液を十分に希釈して接種すれば、DI 粒子との同時感染が避けられるため、interfering が起こらないと考えられる。また大量のウイルスを接種する場合でも、静注感染では血流によって全身に希釈され、経鼻感染では呼吸器全体に希釈されと考えられるが、脳内直接感染では接種部位に感染巣が限局されると考えられるため DI 粒子の影響を受けやすいと思われる。

上記 1) 2) の可能性を検証するため、ウイルス脳内直接感染後の感染性ウイルスの産生を経時的に調べた。マウス脳内にそれぞれ 2PFU, 20PFU, 200PFU, 2×10^5 PFU の WSN 株ウイルスを接種した群を準備し、各群から 2 匹ずつ取り出し、脳内における感染性ウイルスの産生を MDCK 細胞を用いたブラック方によって測定した。200PFU 接種と 2×10^5 PFU 接種の成績を図 3a, b に示した。

大量のウイルス接種では脳内のウイルス価が 1×10^4 PFU を越えることがなく、接種 6 日後にはウイルスがほぼ消失していたが、少量接種の場合には感染 2~3 日で脳内のウイルス価はピークに達し、その後 1×10^5 PFU 以上をキープし、ほぼ 1 週間でマウスは全滅した。すなわちウイルスを大量に脳内接種した場合には初期の段階から感染性ウイルスの産生は抑制されていることが分かり、DI 粒子の関与が強く示唆された。DI 粒子自身はウイルスを産生できないが感染性ウイルスと共存することによって感染性のないウイ

ルス粒子 (DI 粒子) の産生を促し、それが宿主の免疫反応を誘導すると考えられる。そのため、あたかもワクチンを接種したかのような効果も期待される。ウイルスの脳内からのクリアランスが DI 粒子の interfering 効果のみによるのか、DI 粒子によってウイルス感染拡大のスピードが抑制されるとともに、脳内の免疫系が活性化され、免疫系の働きによってウイルスのクリアランスが起こったのかは、今のところ明らかでない。

3. 患者から分離したウイルスの性状

インフルエンザ脳炎・脳症患者の咽頭ぬぐい液からインフルエンザウイルスを分離することができるが、髄液からの分離報告は極めて稀である。本研究でも多くの患者の咽頭ぬぐい液からインフルエンザウイルスが分離されたが、髄液から分離できた例はなかった。分離ウイルスの大多数は A 型 H3N2 サブタイプであるが、実験室で継代されてきた H3N2 とは MDCK 細胞における増殖様式が次の点で異なっていた。すなわち、1) 実験室継代株はクリアな (境界のはっきりした) 大きなブラックを作り、患者から分離されたウイルスは濁った (境界のはっきりしない) 小さなブラックを作る、2) 液体培地下で培養された細胞において実験室継代株の感染はトリプシン存在下でどんどん拡がり、その CPE (細胞変性効果) は培養器全体に及ぶ。一方、患者から分離されたウイルスでは感染の拡がりは早期に終焉し、CPE を起した細胞が脱落した空き地は周辺から増殖した正常細胞で埋められ、やがて、感染の痕跡は消失する。1) と 2) は基本的には同じ性質を別の観点から見たものと考えられる。ただし、このような性状は脳症患者から分離されたウイルスに特有のものではなく、最近

の臨床分離ウイルスに共通して見られた。この違いが何に基づくものであるかを明らかにするため、大阪府公衛研・奥野氏より分与された A/Osaka/981 /98 (H3N2) 株 (以後 OS 株と略記) と 2001 年にインフルエンザ脳症患者 K.Y. から分離した A/Okayama/1/01 (H3N2) 株 (以後 KY 株と略記) を MDCK 細胞で継代し、性状の変化を調べた。

その結果、MDCK 細胞で 9 代継代したウイルスでは両ウイルス (それぞれ OS-CK9 株、KY-CK9 株と命名) とともに、上記 1) 2) に挙げた性質の違いは消失し、実験室継代ウイルスと同様な感染増殖様式を示した (図 4 参照)。そこで、分離当初のウイルスと MDCK 細胞で継代後のウイルスについてインフルエンザウイルスの感染性を規定するうえで重要な役割を果たすと考えられている HA (ヘムアグルチニン) 遺伝子の比較を行った。

図 5、図 6 に示したごとく、両ウイルスとも MDCK 細胞で継代することによって、レセプター結合部位近傍に位置する糖側鎖の結合部位が消失していた。この変異は、他の臨床分離ウイルスを MDCK 細胞で継代した場合にも観察されたが、ヒト肺ガン由来の A549 細胞を継代した場合 (図 5 の KY-A9 株参照) には観察されなかった。従って、この糖側鎖の消失は MDCK 細胞での感染効率を規定する重要な因子と考えられる。

D. 考察

1. インフルエンザウイルス WSN 株を静注感染された離乳～成熟マウスは感染 4 日後に突然激しい神経症状を伴って発症するが、感染 1～3 日後にプロテアーゼ阻害効果を持つアプロチニンを静注することによって、NA 阻害剤投与と同様な治療効果が得られた。プロテアーゼ阻害剤が呼吸器系のみならず、脳血管系ある

いは中枢神経系でもウイルス感染の拡がりを抑制することが示された。本班の研究において木戸教授らのグループは、脳内毛細血管表面にミニプラスミンが吸着することで脳血管関門の傷害が起こる可能性を見出している。上に見られたアプロチニンの効果が脳内毛細血管表面に吸着したミニプラスミンの酵素活性を抑制した結果である可能性も考えられる。

2. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) の脳組織から分離された神経病原性麻疹ウイルス (SSPE ウイルス) を離乳～成熟マウス脳内に接種すると数日後にマウスは激しい神経症状を表し発症するが、SSPE ウイルス感染後に通常の麻疹ウイルスを脳内に大量接種するとマウスは発症を免れることを我々は見出している (Ohuchi et al. *Microbiol. Immunol.* 30: 203-211, 1986)。インフルエンザウイルスの脳内感染実験においても類似の現象が観察され、脳内では一旦免疫反応が誘導されれば、ウイルスクリアランス効率は極めて高いことが予想された。今年度はウイルス脳内接種後のウイルス産生量を経時的に調べたところ、大量接種の場合には感染性ウイルスの産生そのものが初期より抑制されていることが分かり、DI 粒子による interference が関与していると考えられた。今後、DI 粒子を利用した感染後ワクチン治療法開発の可能性が考えられる。

3. インフルエンザ脳炎・脳症患者の咽頭ぬぐい液からインフルエンザウイルスが分離されたが、MDCK 細胞や A549 細胞における感染増殖様式は通常のインフルエンザから分離されたウイルスと異なる点は観察されなかった。実験結果には示していないが、離乳～成熟マウスの静注感染や脳内接種でも何らかの神経症状を

表したマウスは皆無であり、通常の臨床分離ウイルスと異なる点は見られなかった。また、図 4、図 5 で示した成績では脳症患者から分離された株の HA にはアミノ酸 144 に新たな糖鎖付加部位が生じているが、この糖鎖付加部位の増加は 1999 年以後の多くの分離ウイルス株に見られ、脳症患者由来のウイルス株に特有のものではない。

E. 結論

1. WSN 株インフルエンザウイルス感染マウスにおいてアプロチニンの静注投与は NA 阻害剤と同等の神経症状発現抑制効果と死亡率減少効果を示した。
2. ウイルスの脳内直接接種は DI 粒子の影響を受けやすく、高濃度接種では感染性ウイルスの産生が抑制された。
3. 患者から分離された当初のウイルスは MDCK 細胞での感染増殖効率が悪いが、継代を重ねると感染増殖効率の良いウイルスに置き変わる。この変換には、HA のレセプター結合部位近傍の 1 つの糖側鎖結合部位の消失が伴うことが明らかとなった。この現象は通常のインフルエンザ患者から分離されたウイルスでも等しく見られた。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 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).
 - 2) 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).

3) 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).

4) 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).

5) 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).

2. 学会発表

1) 大内正信、大内礼子. インフルエンザウイルス感染と神経症状発現の条件について. 第18回中国四国ウイルス研究会(岡山)2002.

2) 綾田稔、新開大史、大内正信、石田博、Deng Yangou、松永勇、片山友子、小倉壽. 麻疹封入体脳炎患者の脳から分離された麻疹ウイルス(大分株)に生

じた変異. 第50回日本ウイルス学会学術集会(札幌)2002.

3) 大内正信、大内礼子、木戸博. インフルエンザウイルス感染マウスの神経症状発現の条件について. 第50回日本ウイルス学会学術集会(札幌)2002.

4) 大内正信、田中康子、大森幸代、大内礼子. 神経病原性インフルエンザウイルス感染マウスにおけるNA阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、抗血清の治療効果の比較. 第13回抗ウイルス化学療法研究会(習志野)2003.

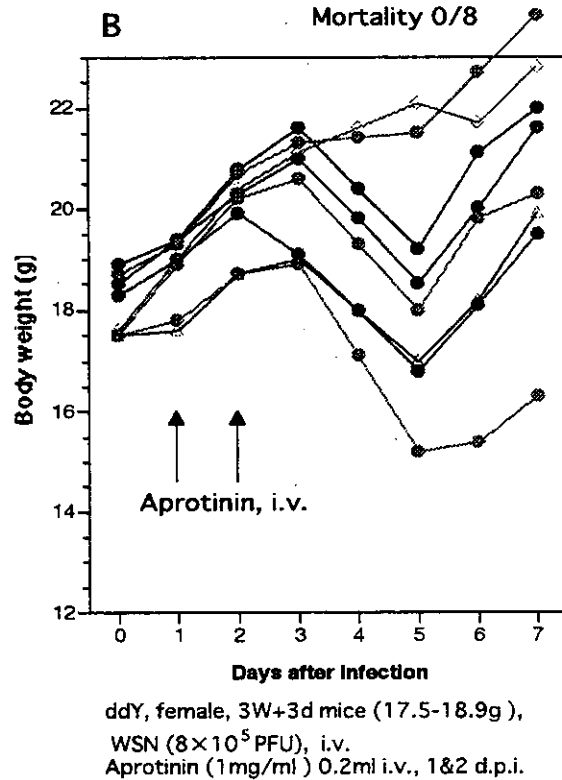
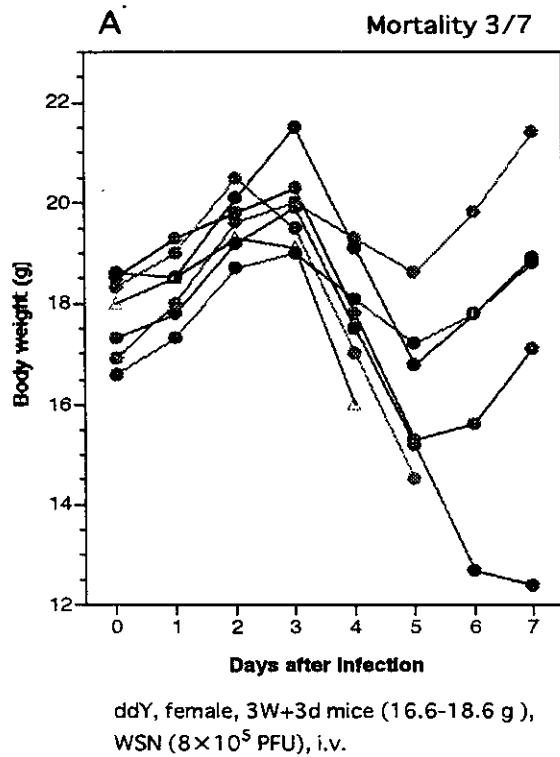


図 1. WSN 株ウイルス静注感染マウスに対するアプロチニンの治療効果-その 1

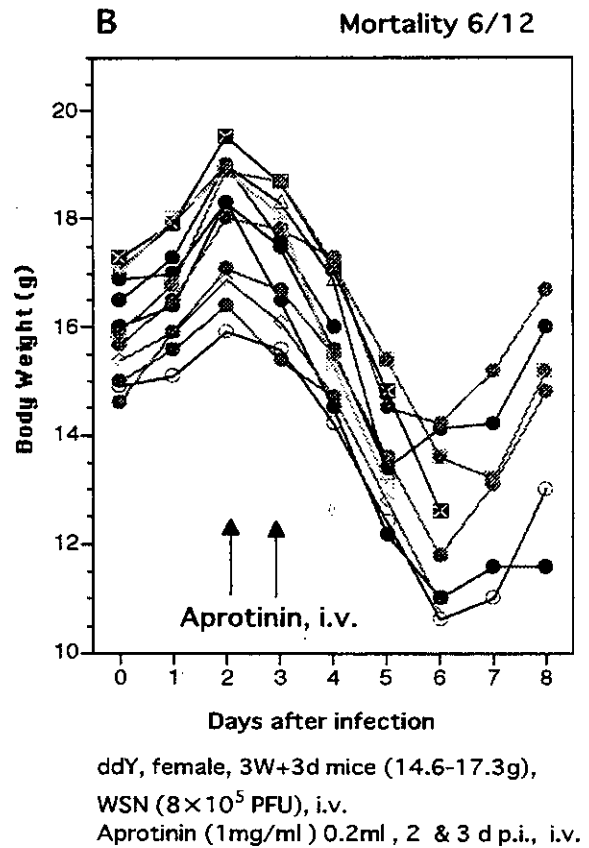
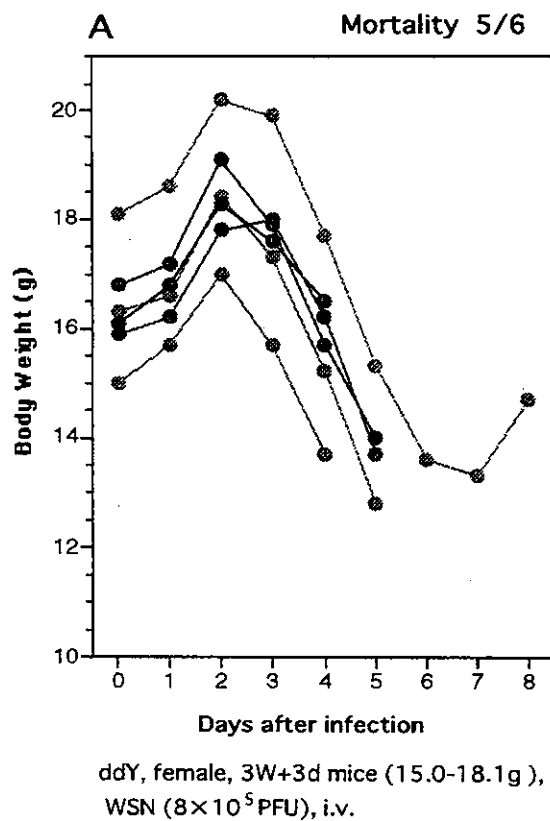


図 2. WSN 株ウイルス静注感染マウスに対するアプロチニンの治療効果-その 2

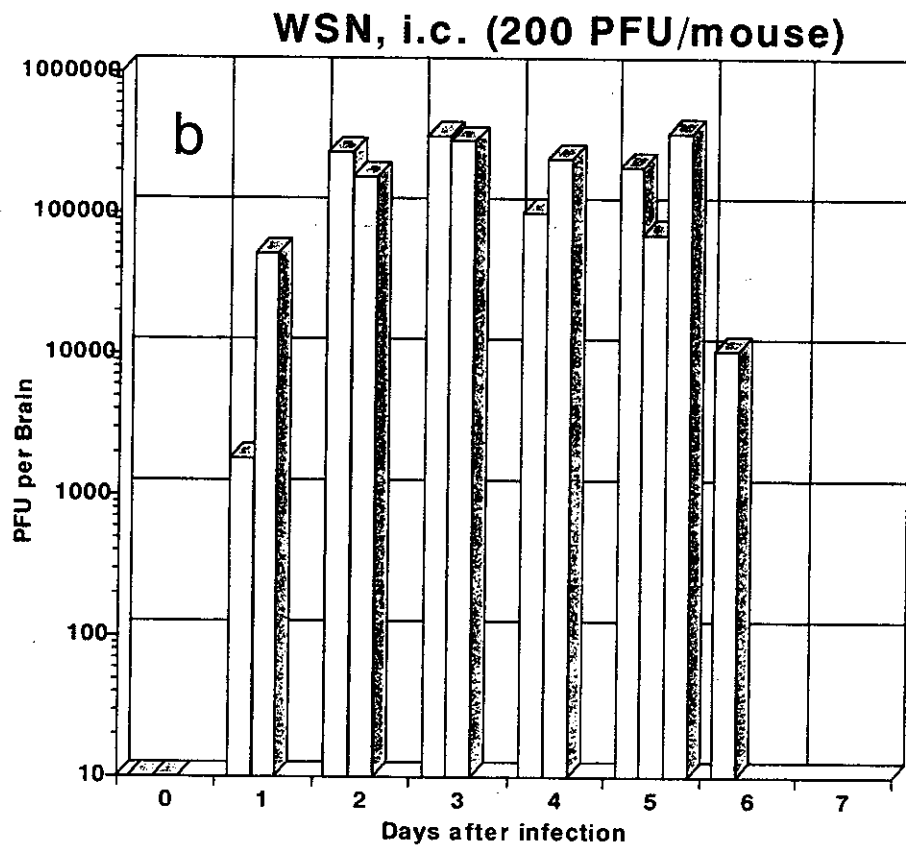
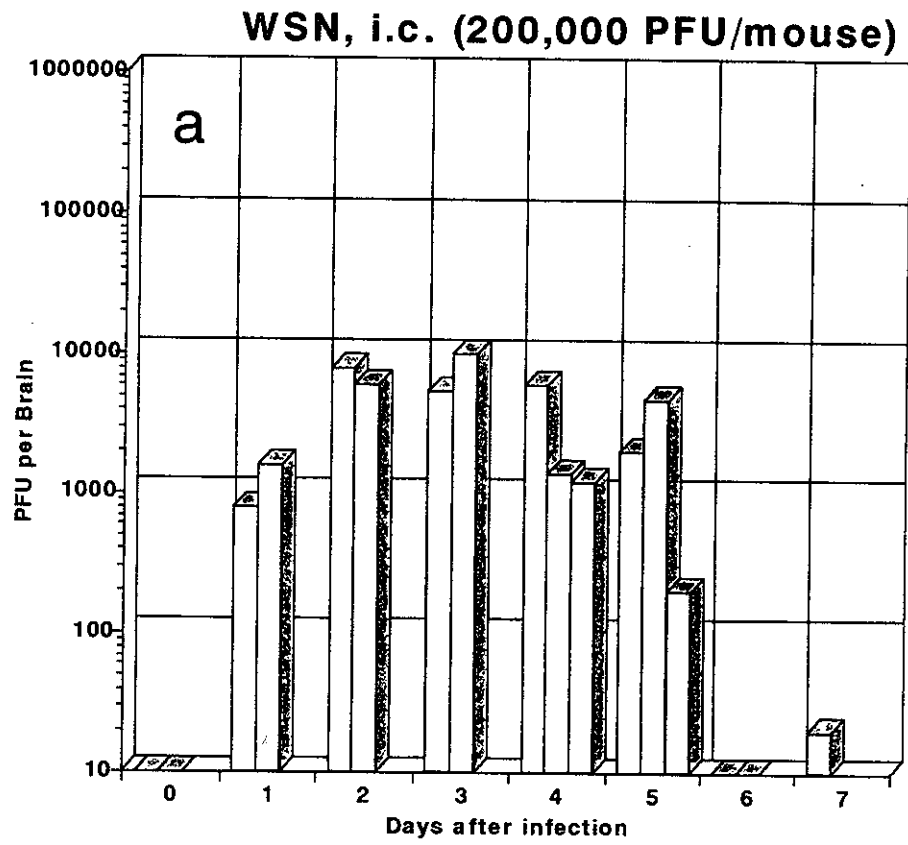


図3. WSN株ウイルス脳内接種マウスの脳内における感染性ウイルスの産生