

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に
関する研究（重症肺炎・脳症の実験病理学的研究）

研究分担者 新矢恭子 神戸大学・准教授

研究要旨

インフルエンザ脳症（IAE）のメカニズムはまだ不明な点が多い。本研究では、IAV 感染とリポ多糖（LPS）の重投与で、マウスの IAE 様モデルを作成した。本マウスモデルでは、対照群に比べて約 3 倍の脳浮腫と血清中サイトカイン濃度が観察された。遺伝子発現プロファイリングでは、一部の主要なサイトカイン関連遺伝子は脳内で発現上昇しておらず、血液脳関門（BBB）の破壊に関与するとされている蛋白質分解酵素の関連遺伝子の発現上昇が顕著だったことが判明した。遺伝子オントロジー（GO）でイオンチャネル、カルシウム、および膜輸送活動関連に分類される機能群が多く抽出された。したがって、本研究における IAE モデルの BBB 破壊は、サイトカインストームに加えて、神経組織の細胞内電解質の不均衡によって影響を受けている可能性があると考えた。

A . 研究目的

インフルエンザ脳症は、複数の症候群（亜型）の集合体であり、その原因も複数の要因が関わっていると考えられる。近年、マイクロバイオームという概念が提唱され、人体の生物学的恒常性維持における細菌叢の重要性が指摘されている。本研究では、細菌の LPS 暴露後のインフルエンザウイルス重感染を想定し、その脳浮腫発症における影響を調べ、脳内遺伝子発現プロファイリングを行った。

B . 研究方法

ウイルス： A/Puerto Rico/8/34; H1N1。 50% マウス致死量（MLD50）は、 6×10^2 pfu/50 μ l。
動物： Balb/c マウス、SPF、5 週令、雌。

実験計画：マウスを 4 グループに分類（ PBS、インフルエンザ（IAV）、 LPS、 LPS+IAV）し、まず、PBS または LPS（ 1.25mg/kg, 100ul volume in PBS）を経鼻投与し、12 時間後に、PBS または IAV（ 100 MLD50 in 50ul PBS）を経鼻投与した。2 日後に、エバンスブルー（EB； 2% in PBS）を腹腔内投与した後、安楽死させ詳細な検索を行った。

（倫理面への配慮）本実験は、学内の動物実験承認を得た（承認番号： P110910）。

脳浮腫の検証：マウスの脳 1.54g を、500 μ l ホルムアミド内で 2 日間 38 °C で EB を抽出した（ 630nm 波長フィルターで測定）。

免疫染色（ IHC）：肺と脳組織を 10%中性緩衝

ホルマリンで固定し、常法に従って、パラフィン包埋した。薄切片に対し、抗 H1 ウイルス抗体を用いた免疫染色を行った。

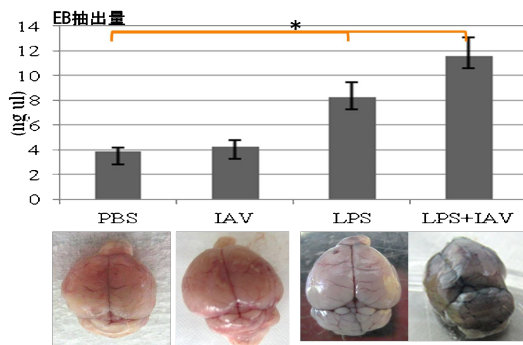
ウイルス学的検索：MDCK 細胞を用いたブラック法を行った。

血清サイトカイン濃度測定：血清 50 μ l を用いて ELISA 法により IL-6 および TNF- α 濃度を測定した (Quantikine Mouse Immunoassay; R&D Systems, USA)。

RNA 抽出とマイクロアレイ解析：脳幹部分を採取し、全 RNA 抽出キットにて RNA を抽出した (Agilent Technologies, USA)。タカラバイオにマイクロアレイ解析を委託した (Agilent Expression Array、SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray)。データマイニングは、Subioplatform (Subio Inc., Japan) を活用した。その後、Gene ontology (GO) 解析を行った (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)。

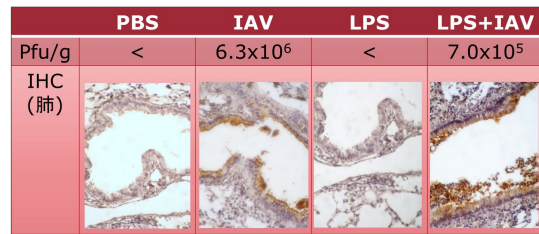
C . 研究結果

脳浮腫の評価：LPS + IAV 群において、他群と比較して強い脳浮腫が認められた (図 1)。



(図 1)

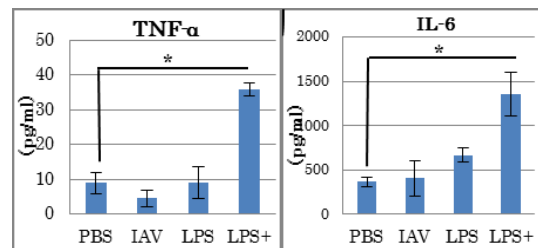
ウイルス学的/病理学的検索結果：ウイルス感染群では、LPS 処理の有無に関わらず肺へのウイルスの感染が確認された。脳ではウイルスが検出されなかった (図 2)。



<: 検出限界以下

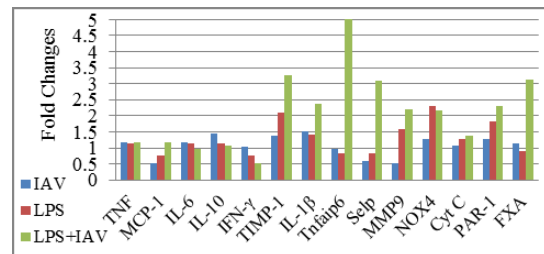
(図 2)

血清中サイトカイン濃度：LPS+IAV 群において、血清中、IL-6・TNF- α の著しい増加が見られた (図 3)。



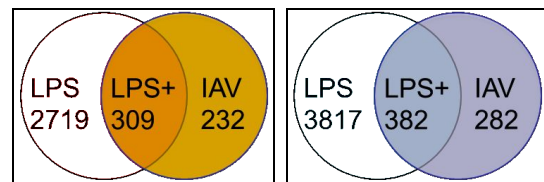
(図 3)

脳内遺伝子発現：TNF- α 、IL-6、IL-10 などの主要サイトカイン関連の遺伝子は変動がなかった (図 4)。上記結果より、本モデルでは、インフルエンザ感染を伴った脳症の病態が再現されていると判断した。



(図 4)

LPS+IAV 群に特異的な遺伝子動態として、309 個の発現上昇、382 個の発現減少が観察された (図 5)。



(図 5)

GO 解析によって、LPS+IAV 群に特異的に発現変動している遺伝子群は、主に、channel

activities、calcium、ion 等であることが判明した (表 1)。

表 1

- calcium ion binding
- passive transmembrane transporter activity
- substrate specific channel activity
- ion channel activity
- gated channel activity
- cation channel activity
- voltage-gated channel activity
- Voltage-gated ion channel activity
- SH3 domain binding
- calcium channel activity
- ion binding
- metal ion binding

Up-regulated Gene Expression

- calcium ion binding
- channel activity
- passive transmembrane transporter activity
- substrate specific channel activity
- ion channel activity
- calcium channel activity
- cation channel activity
- ion binding
- gated channel activity
- metal ion binding
- voltage-gated channel activity
- Voltage-gated ion channel activity
- SH3 domain binding

Down-regulated Gene Expression

D . 考察

本モデルでは、IAV または LPS の単独投与時よりも、重投与時において、強い脳浮腫が惹起されることが示された。この病態には血清サイトカイン量の増加も伴っていた。ただし、脳組織内での主要サイトカイン関連遺伝子にはあまり変化が見られなかった。脳浮腫病態発現において、高サイトカインの一次供給場所が末梢で、中枢は末梢の高サイトカイン発現に対する二次的な反応である可能性が示された。

また、本モデル解析により、主要な発現

変動遺伝子が、calcium、ion および channel の機能に分類されることが判明した。Ca²⁺ は、BBB における機能的恒常性維持に重要であると言われており、本 IAE モデルの BBB 破壊には、サイトカインに加えて、神経組織の細胞内電解質の不均衡が影響している可能性があると考えた。

E . 結論

本モデルは、ひとつの IAE 病態モデルとなり得ると考える。本モデルにおける BBB 破壊は、血中高サイトカイン濃度に加えカルシウム代謝の不均衡が関与している可能性がある。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Shinya K, et al., Integrated clinical, pathologic, virologic, and transcriptomic analysis of H5N1 influenza virus-induced viral pneumonia in the rhesus macaque J Virol. 2012; 86(11): 6055-66.

2 . 学会発表

該当なし。

G . 知的所有権の取得状況

1 . 特許取得

該当なし。

2 . 実用新案登録

該当なし。

3 . その他

該当なし。