

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591161
 研究課題名(和文) インフルエンザ脳症の病態モデル作成と、その増悪及び改善因子の検討
 研究課題名(英文) Establishment of model of Influenza encephalopathy in vitro, and analysis of factors for improvement or aggravation in Influenza encephalopathy
 研究代表者 細矢 光亮
 (HOSOYA MITSUAKI)
 公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：80192318

研究成果の概要：

インフルエンザウイルス (FluV) のヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)への感染とアポトーシス誘導について検討した。FluV は HUVEC に感染・増殖しアポトーシスを誘導した。さらに FluV 感染は TNF- α による HUVEC のアポトーシスを増強させた。各種解熱鎮痛剤の TNF- α 存在下での HUVEC への影響は、アセトアミノフェンはアポトーシス誘導、生細胞数ともにコントロールと同レベルであった。一方、インドメタシン、ジクロフェナックは濃度依存的に細胞毒性を示した。以上の結果は、現在有効な治療法の確立されていないインフルエンザ脳症の病態を明らかにすると同時に、有効な予防・治療法確立の一助になると思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児感染症学、インフルエンザ脳症、アポトーシス、血管内皮細胞、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

わが国におけるインフルエンザに伴う急性脳症(いわゆるインフルエンザ脳症)の発症は毎年 200 - 500 人に達し、その死亡率も 20-30%と極めて高い。しかし、インフルエンザ脳症の病態を再現するモデル動物

がないために、有効な治療法や予防法の確立が困難な状況にある。

インフルエンザ脳症剖検例の解析、および本症患者血液・髄液の炎症性サイトカイン等の検討から、現在本症の病態は、ウイルス感染に伴い産生された高濃度の炎症性

サイトカインが、血管内皮細胞や神経系細胞などの標的細胞にアポトーシスを誘導することにより形成されると推定されている。

2. 研究の目的

アポトーシスの標的細胞であるヒト血管内皮細胞やヒトグリア細胞などの培養細胞を用いて、インフルエンザウイルスを感染させる、あるいはサイトカインやその他のアポトーシス誘導物質を添加するなど、様々な条件下においてアポトーシスを誘導し、invitroにおいてインフルエンザ脳症の病態を再現する。

さらに、このモデルを用いて、各種の免疫抑制剤、プロスタグランジン阻害剤、抗サイトカイン抗体などの薬剤の、アポトーシスの増強あるいは抑制作用を検討することにより、現在有効な治療法の確立されていないインフルエンザ脳症に対する、有効な予防・治療法確立を目的とする。

3. 研究の方法

超遠心にて精製したインフルエンザウイルス(FluV)(Yamagata 株(H1N1)、Ishikawa 株(H3N2)、Murakami 株(H2N2)、Phillipine 株(H3N2))をTNF- α 存在下、あるいは非存在下でヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)に感染させ、インフルエンザウイルスのアポトーシスの増強効果をAPOPercentage法で評価した。

さらに、各種解熱鎮痛剤(アセトアミノフェン、インドメタシン、ジクロフェナック、メフェナム酸)の細胞へのアポトーシス誘導、細胞毒性をAPOPercentageアッセイ、MTT法を用い評価した。

4. 研究成果

(1) FuIV の HUVEC へのアポトーシス誘導にお

ける株間の相違

血清型の異なるヒト FluV を用いヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)へのアポトーシス誘導について FuIV 株の違いによる検討を試みた。FluV は Yamagata 株(H1N1)、Ishikawa 株(H3N2)、Murakami 株(H2N2)、Phillipine 株(H3N2)を用い、各ウイルス株を1時間吸着後、48時間培養し、APOPercentageアッセイで評価した。Phillipine 株のみがウイルス単独でアポトーシスを誘導したことが確認された。

以上より、株の違いにより HUVEC へのアポトーシス誘導能が異なることが示された。

(2)FluV の TNF- α 存在によるアポトーシスの増強効果。

精製した FluV を TNF- α 存在下で HUVEC に感染させ、FluV のアポトーシス増強効果をAPOPercentage法で評価したところ、村上株と Phillipine 株が他のウイルス株に比べて強いアポトーシス増強効果を示した(図1)。これらの結果も株の違いによるアポトーシス誘導能の違いを示唆する。

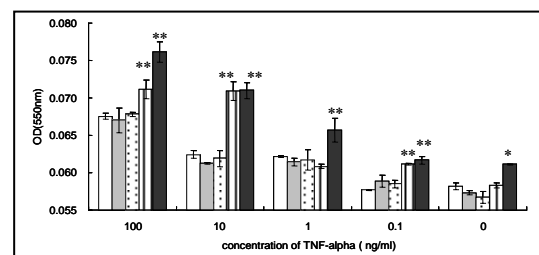


図1 .FluV の HUVEC におけるアポトーシス増強効果(グラフ左より非感染、Yamagata 株、Ishikawa 株、Murakami 株、Phillipine 株)

(3)HUVEC での FluV の増殖能

HUVEC に Phillipine 株を1時間吸着後、48時間培養し、培養上清中の成熟ウイルス量を MDCK を用いた TCID 法で測定したところ、増殖が確認された(図2)。同時に培養細胞から RNA を精製し、定量 PCR 法で感染 HUVEC

中の FluV ゲノム数を求めたところ、ウイルス吸着後 24 時間を最大に FluV ゲノム数の増加が認められた (図 3)。

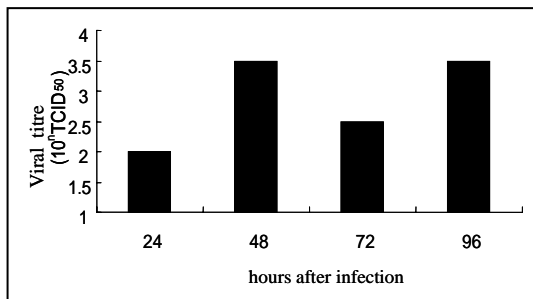


図 2 . TCID 法による HUVEC における FluV 増殖の検討

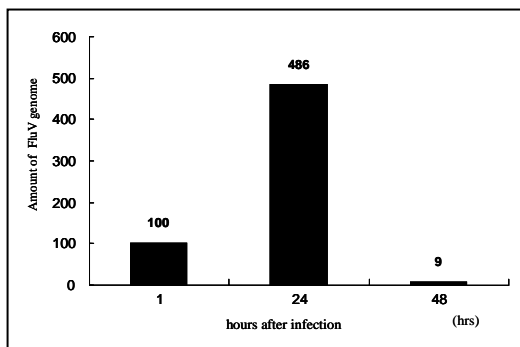


図 3 . 定量 PCR 法による HUVEC における FluV 増殖の検討 (感染後 1 時間のウイルス量を 100 とした。)

(4) 光学顕微鏡による観察

Philippine 株感染 HUVEC では TUNEL 法による陽性細胞が多数観察された。さらに蛍光免疫染色により FluV 感染細胞において核の分葉化が観察され、同時にアポトーシスの指標である活性型カスパーゼ 3 が検出された。フローサイトメトリーにて活性型カスパーゼ 3 陽性細胞数を比較したところ、FluV 感染にて陽性細胞数の増加が確認された (図 4)。

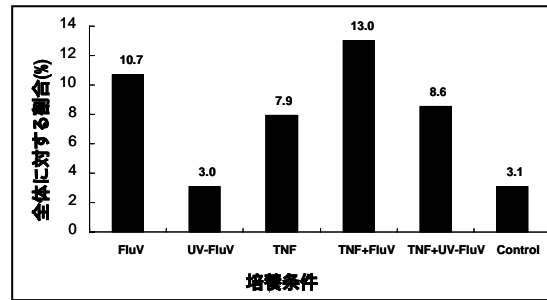


図 4 . 細胞内免疫染色フローサイトメトリーによる活性型カスパーゼ 3 発現検討

(5) 解熱鎮痛薬の HUVEC への影響

HUVEC を TNF- α で 6 時間前処理し、その後、各種解熱鎮痛剤 (アセトアミノフェン、インドメタシン、ジクロフェナック、メフェナム酸) を加え 42 時間後に APOPercentage アッセイで評価した。アセトアミノフェン、イブプロフェンはコントロールと同程度であったが、インドメタシン、ジクロフェナック、メフェナム酸はコントロールに比較しアポトーシスが誘導されず、抑制するという結果であった (図 5)。

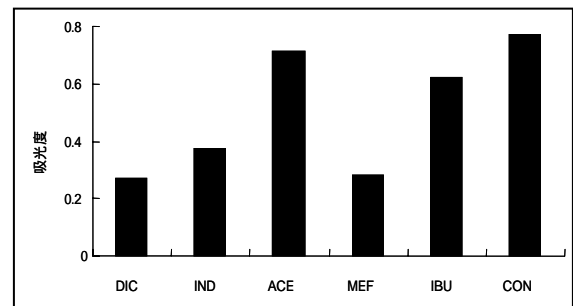


図 5 . 各種解熱鎮痛剤 (250 μ M) のアポトーシス増強作用の検討。(DIC: ジクロフェナック、IND: インドメタシン、ACE: アセトアミノフェン、MEF: メフェナム酸、IBU: イブプロフェン、CON: 薬剤無し、コントロール)

一方、同サンプルにおいて、顕微鏡下で各薬剤条件の細胞を観察すると、インドメタシン、ジクロフェナック、メフェナム酸では細胞の脱落が激しく、アポトーシスが生じた細胞膜の変化を評価する APOPercentage アッセイでは見かけ上アポトーシス抑制の結果になったと予想された。

そこで、各解熱鎮痛剤の細胞毒性について MTT 法を用い、APOPercentage アッセイと同様に各薬剤投与後 42 時間に評価した(図 6)。

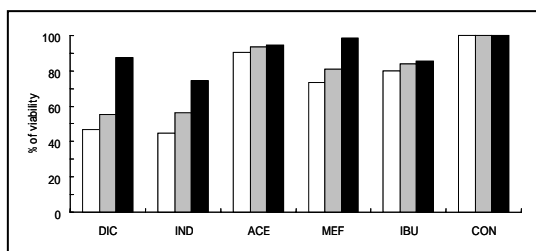


図 6 . 各解熱鎮痛剤の細胞毒性について MTT 法による検討。(□ : 250 μM、▒ : 125 μM、■ : 62.5 μM)

ジクロフェナック、インドメタシンは濃度依存的に細胞毒性を示し、250 μM ではコントロールの約 50%であった。一方、アセトアミノフェンの細胞毒性はほとんど観察されなかった。

以上の結果は、現在有効な治療法の確立されていないインフルエンザ脳症の病態を明らかにすると同時に、有効な予防・治療法確立の一助になるとと思われる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

Sumikoshi M, Hashimoto K, Kawasaki Y, (他 4 名, 2 番目, 3 番目, 最終共著者). Human influenza virus infection and apoptosis induction in human vascular endothelial cells. J Med Virol, 査読あり;80(6):1072-1080, 2008.

Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, (他 6 名, 1 番目, 2 番目). Genetic diversity of coxsackievirus A16 associated with hand, foot, and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003.

J Clin Microbiol, 査読あり ; 45(1):112-20, 2007.

Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, (他 5 名, 1 番目, 2 番目). Genetic diversity of enterovirus 71 associated with hand, foot and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003. Pediatr Infect Dis J. 査読あり; 25(8):691-4, 2006.

Hosoya M, Kawasaki Y, Katayose M, (他 7 名, 1 番目, 2 番目). Prognostic predictive values of serum cytochrome c, cytokines, and other laboratory measurements in acute encephalopathy with multiple organ failure. Arch Dis Child, 査読あり ; 91(6): 469-472, 2006.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

細矢 光亮 (HOSOYA MITSUAKI)

公立大学法人福島県立医科大学・
医学部・教授

研究者番号 : 8 0 1 9 2 3 1 8

(2)研究分担者

川崎 幸彦 (KAWASAKI YUKIHIKO)

公立大学法人福島県立医科大学・
医学部・准教授

研究者番号 : 0 0 3 0 5 3 6 9

橋本 浩一 (HASHIMOTO KOICHI)

公立大学法人福島県立医科大学・
医学部・講師

研究者番号 : 5 0 3 2 2 3 4 2

(3)連携研究者 なし。