

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660221

研究課題名(和文)小児インフルエンザ脳症のマウスモデルの作出

研究課題名(英文)Experimental mouse model for influenza-associated encephalopathy

研究代表者

寸田 祐嗣(Sunden, Yuji)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：20451403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ脳症は主に小児に発生する疾患であるが、その発生機序は不明であり、有効な予防・治療法が確立されていない。本研究ではマウスにインフルエンザウイルスを接種し、実験的にインフルエンザ脳症に類似の病態を示すモデルを作出することを目的とした。その結果、ウイルス感染マウスは肺を含む呼吸器に病変を形成するが神経症状は示さず強い脳病変を形成しないこと、少量のウイルス抗原を感染マウスの脳内に投与することで、インフルエンザ脳症に類似したサイトカイン上昇が誘導されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Influenza-associated encephalopathy (IAE) is a severe neurological disease of infant. The pathogenesis of IAE is not well known and no effective preventive/therapeutic treatment is established. The purpose of present study is to establish a mouse model of IAE through influenza virus challenge experiment. It is demonstrated that the virus-inoculated mouse showed respiratory disease including pneumonia, however, no evidence of neurological disorders and/or brain lesions are observed. Further, direct inoculation of a few viral antigens into brain parenchyma induced high cytokine profiles those are partly similar to the findings of IAE patients.

研究分野：獣医病理学

キーワード：pathology influenza virus encephalopathy mouse cytokine

1. 研究開始当初の背景

ヒトのインフルエンザはインフルエンザウイルス (influenza virus, 以下 IFV) 感染によって起こる発熱や呼吸器症状を特徴とする疾患であり、IFV はヒトだけではなく家禽、野鳥、豚、馬、その他にも多数の動物種が感染する (人獣共通感染症)。ウイルスは感染動物から排出され、湖沼などの自然界でも維持されるため、本ウイルスを根絶することは難しい。

毎年、主に冬季にインフルエンザが流行するが、呼吸器症状 (せきや鼻汁) の他に、神経症状が現われることがある。そのような疾患はインフルエンザ関連脳症 (influenza virus-associated enteropathy, 以下 IAE) と呼ばれ、アジア、特に日本で多く報告されており、その多くは小児での発生である。本病は古くから知られている疾患ではあるが、その真の原因や発生機序の詳細は不明であり、治療方法も確立されていないため、致命的経過を辿ることや深刻な後遺症を伴うことが多い。

IAE の制圧を困難にしている要因として、発生機序が未解明である点、疾患モデル動物が確立されていない点が挙げられる。IAE では生きたウイルスは脳内から検出されることは極めて稀である。これまでにウイルス感染による細胞障害に加えて、非ステロイド系抗炎症薬 (解熱・鎮痛剤) の副作用や宿主 (感染者) の遺伝子異常の関与が示唆されているが、詳細は不明である。近年、IAE 患者の多くに過剰なサイトカイン産生が起こっていることが報告されており、ウイルス感染に対する過剰な免疫反応が脳血管透過性を亢進させる可能性が支持されている。しかし、サイトカインの由来やその調節機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究は IAE の制圧に貢献する基礎的知見を得るために計画された。そのために実験動物 (マウス) に IFV の接種試験を行い、IAE のモデル動物を作出すること、IAE との類似点と相違点を明らかにすることを目指した。特に、脳内・脳脊髄液へのサイトカインの供給源について、血液から脳内への供給に加えて、脳内で直接サイトカインや細胞外基質を分解する酵素の産生が起こるのではないかという仮説を立て、それを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

A 型インフルエンザウイルス (H3N2 亜型) をマウスの外鼻孔に滴下して、ウイルスに曝露した。マウスの症状観察、体重変化の記録を行いながら、経日的に一部のマウスより採血、全身臓器のホルマリン固定、凍結生材料の採取を行った。ELISA 法により血液中のサイトカインの測定、各種臓器の肉眼所見および病理組織学的所見、免疫組織化学的所見を

解析した。さらに核酸 (RNA) を抽出して、逆転写反応の後、標的遺伝子 (TNF- α 、IL-6、MMP-9 など) を増幅して定量した。さらにウイルス感染マウスの脳内に不活化ウイルス粒子を少量注入して同様に解析した。

4. 研究成果

ウイルスに曝露したマウスはウイルス接種翌日から体重減少、被毛の粗剛・立毛、運動量の減少を示した (図 1)。

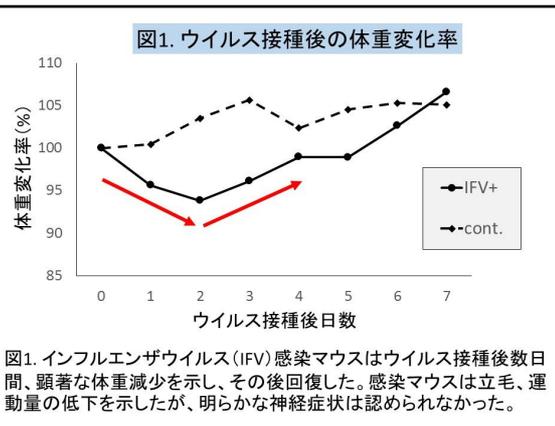


図1. インフルエンザウイルス (IFV) 感染マウスはウイルス接種後数日間、顕著な体重減少を示し、その後回復した。感染マウスは立毛、運動量の低下を示したが、明らかな神経症状は認められなかった。

これらのマウスに神経症状は認められず、明らかな脳病変も形成されていなかった。ウイルス曝露マウスの肺には出血を伴う病変が形成されていた (図 2)。

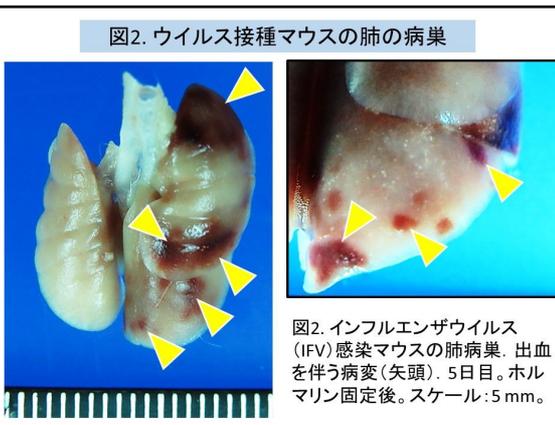


図2. インフルエンザウイルス (IFV) 感染マウスの肺病巣。出血を伴う病変 (矢頭)。5日目。ホルマリン固定後。スケール: 5mm。

病理組織学的解析により肺には多病巣性から癒合性の炎症病変が認められた。同部位には炎症性細胞 (リンパ球や形質細胞) の浸潤を伴い気管支間質性肺炎が形成されていた (図 3)。

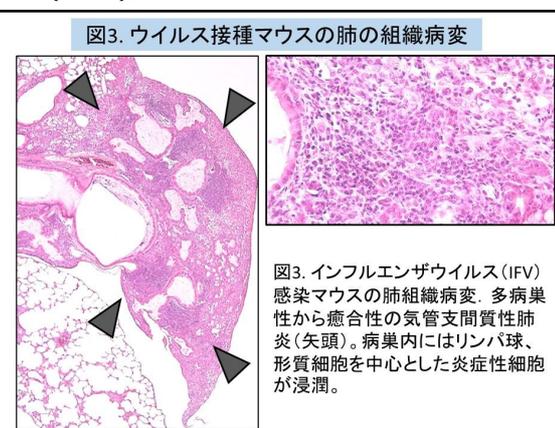
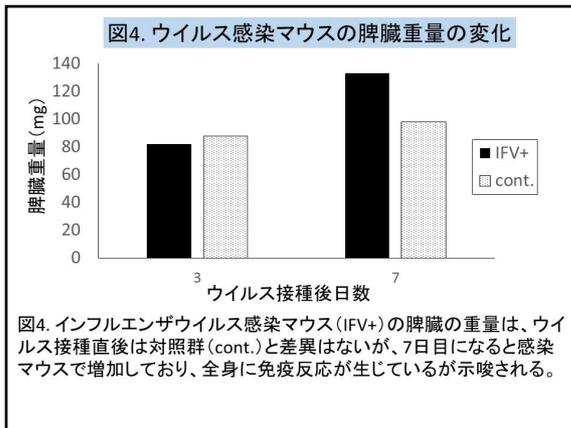


図3. インフルエンザウイルス (IFV) 感染マウスの肺組織病変。多病巣性から癒合性の気管支間質性肺炎 (矢頭)。病巣内にはリンパ球、形質細胞を中心とした炎症性細胞が浸潤。

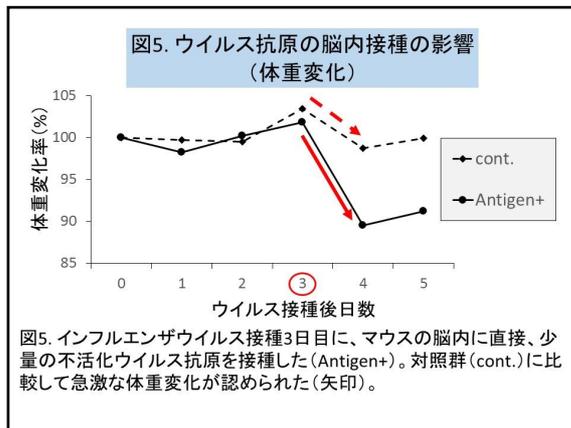
免疫組織化学的解析を実施したところ、鼻粘膜から肺にかけての病巣部にはウイルス抗原陽性細胞が分布していたが、脳内にはウイルス抗原陽性像は観察されなかった。

また脳内の免疫制御に重要な役割を果たすことが知られている頸部リンパ節群に注目したが著変は認められなかった。一方、感染マウスの脾臓重量は、ウイルス接種7日目には対照群に比較して増加しており(図4)、呼吸器のみならずウイルスに対する免疫反応が全身性に生じていることが示唆された。

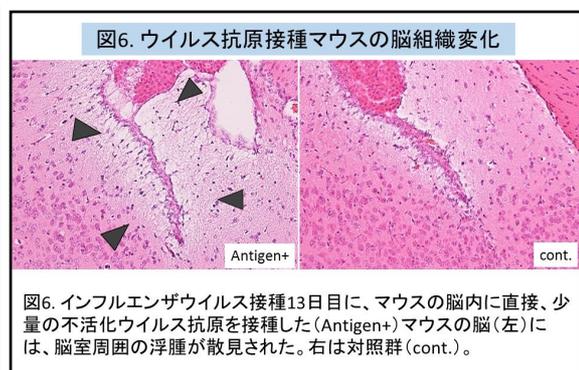


以上の成績から、本研究条件化(ウイルスの単純呼吸器曝露)では神経症状や脳病変を伴うインフルエンザ脳症に類似の病態は再現されないことが明らかになった。

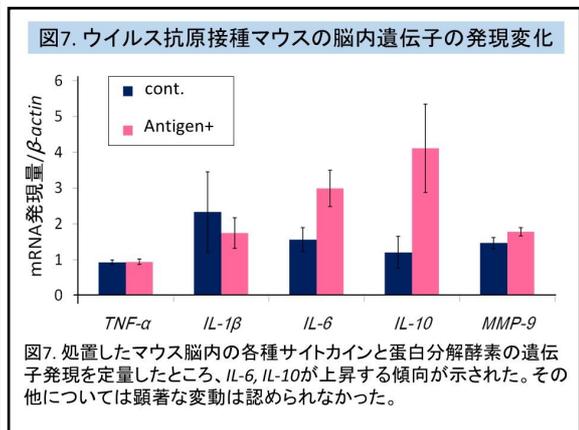
次に、ウイルス感染マウスの脳内に少量の不活化ウイルス抗原を少量注入した。これは一部のインフルエンザウイルスの神経細胞への吸着・侵入および細胞内伝播力を模倣する処置として行った。その結果、抗原を注入したマウスは対照群に比較して強い体重減少を示した(図5)。



これらマウスの脳内には脳内血管透過性の亢進によると推察される浮腫が観察された(図6)。このような所見はヒトIAE患者の検査所見に一部類似するものである。一方で、血管壁の壊死(傷害)や硝子滴(血液中蛋白質の凝集物)形成などの変化は観察されなかった。



さらに脳内での各種サイトカインや蛋白分解酵素の遺伝子発現を調べたところ、IL-6、IL-10の上昇が認められた(図7)。これらは持続的な炎症反応や血管透過性亢進に関わる主要因子である。また血液中のIL-1の増加傾向も観察された。



以上より、呼吸器や血液に由来するサイトカイン等の液性因子のみではなく、脳内その場所で産生される因子がIAEの患者の特徴の一部類似した特徴脳病変の形成を誘導する可能性が支持された。さらにこれら因子の由来として、脳内の異物除去反応に関わる細胞であるミクログリアが初期に活性化して、神経細胞、アストログリア、血管内皮細胞を刺激する可能性が考えられた。

<引用・参考文献>

Kida H. Ecology of influenza viruses in animals and the mechanism of emergence of new pandemic strains. *Nihon Rinsho*. 1997 Oct;55(10):2521-2526.

Kida H. Distribution and circulation of influenza viruses in nature. *Nihon Rinsho*. 2003 Nov;61(11):1865-1871.

Sunden Y, Park CH, Matsuda K, Anagawa A, Kimura T, Ochiai K, Kida H, Umemura T. The effects of antipyretics on influenza virus encephalitis in mice and

chicks. J Vet Med Sci. 2003
Nov;65(11):1185-1188.

Tanaka T, Sunden Y, Sakoda Y, Kida H,
Ochiai K, Umemura T. Lipopolysaccharide
treatment and inoculation of influenza A
virus results in influenza
virus-associated encephalopathy-like
changes in neonatal mice. J Neurovirol.
2010 Mar;16(2):125-132.

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 3 件)

Kesdangakonwut S, Sunden Y, Aoshima K,
Iwaki Y, Okumura M, Sawa H, Umemura T.
Survival of rabid rabbits after
intrathecal immunization. Neuropathology.
2014 Jun;34(3):277-283. 【査読あり】

Iwaki Y, Sakai Y, Ochiai K, Umemura T,
Sunden Y. Enhancement of antibody
production against rabies virus by uridine
5'-triphosphate in mice. Microbes Infect.
2014 Mar;16(3):196-202. 【査読あり】

Kesdangakonwut S, Sunden Y, Yamada K,
Nishizono A, Sawa H, Umemura T. Neurogenic
cardiomyopathy in rabbits with
experimentally induced rabies. Vet
Pathol. 2015 May;52(3):573-575.

【査読あり】

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寸田 祐嗣 (SUNDEN, Yuji)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号 : 20451403

(2)研究協力者

大市 真梨乃 (OICHI, Marino)

曾田 公輔 (SODA, Kosuke)

森田 剛仁 (MORITA, Takehito)

橋口 未迪 (HASHIGUCHI, Miteki)

関口 結佳 (SEKIGUCHI, Yuka)