

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658250

研究課題名（和文）小児インフルエンザ性脳症の動物モデル作成と発生メカニズム解明

研究課題名（英文） Pathogenesis of influenza virus-associated encephalopathy of childhood induced in animal model

研究代表者

梅村 孝司 (UMEMURA TAKASHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・特任教授

研究者番号：00151936

研究成果の概要（和文）：乳のみマウスを用いて（1）インフルエンザウイルス（IFV）の肺感染がリポ多糖体（LPS）誘発性の脳症および炎症性サイトカイン産生を増強させること、（2）IFV+LPS接種によって惹起された脳病変、血中サイトカイン動態およびウイルス分布は小児インフルエンザ脳症の特徴を備えていること、および高サイトカイン血症による血管内皮細胞と星状膠細胞のアポトーシス誘導が小児インフルエンザ性脳症の主要な発生メカニズムである可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, I demonstrated that influenza virus (IFV) infection to the lungs of suckling mice enhanced encephalopathy and hypercytokinemia due to lipopolysaccharide (LPS) inoculation, and brain pathology, hypercytokinemia and absence of IFV in the brain of the animal model treated with IFV and LPS were similar to IFV-associated encephalopathy of childhood. Furthermore, it was suggested from the present study that the apoptosis of vascular endothelial cell and astrocytes causing increased permeability of blood brain barrier might be the major contributing factor for IFV-associated encephalopathy of childhood.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：インフルエンザ性脳症、リポ多糖体、小児、血液脳関門、高サイトカイン血症、

1. 研究開始当初の背景

小児インフルエンザ脳症はインフルエンザウイルス (IFV) 感染に伴う致死的な中枢神経疾患である。本症は東アジア、特に日本での発生例が多く、毎年100例前後の患者が発生し、5歳以下の幼児が患者全体の約8割を占めている。死亡率は約30%と高く、神経学的後遺症が遺残することが多いため、効果的な予防・治療法の確立が急務である。本症の特徴的な臨床所見はインフルエンザによる発熱の直後に現れる左右対称性の急性脳水腫で、その後、しばしば播種性血管内凝固や多臓器不全を併発する。患者剖検例の病理組織学的検査では脳血管の傷害による血液脳関門の破綻が明らかであるため、急性経過での脳血管障害が本症の基盤病変であると考えられているが、その発生メカニズムに関しては解明されていない点が多く、動物モデルもこれまでに報告されていない。患者の中枢神経組織および脳脊髄液からIFVが分離されないことが多く、IFV感染による直接的な脳組織傷害が本症の原因である可能性は低い。一方、患者の血液中にはINF- α 、IL-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインの上昇が認められることが多い。また、これらの炎症性サイトカインの血中濃度とインフルエンザ脳症の重篤度が比例することから、本症の原因は高サイトカイン血症による急性脳血管障害であるという説が有力である。しかし、これらの高サイトカイン血症は様々な全身性炎症性疾患でも観察されてきており、高サイトカイン血症が小児インフルエンザ脳症の原因なのか結果あるいは併発症なのか明らかになっておらず、従って、本症の発生機序、予防・治療法はいまだ不明である。

2. 研究の目的

小児インフルエンザ性脳症を実験的に再

現し、その発生機序を解明するために本研究を行った。

3. 研究の方法

ヒト症例では血液脳関門の透過性亢進および高サイトカイン血症が共通して指摘されていること、小児の脳病変が子豚の脳脊髄血管症と呼ばれる大腸菌性内毒素血症に類似していることから、乳のみマウスに小児から分離されたH3N2亜型IFVを経鼻接種し、その後、腹腔内に大腸菌由来リポ多糖体 (LPS) を接種し、小児インフルエンザ脳症の再現を試みた。対照群として、無処置対照群、IFV接種群およびLPS接種群を置いた。接種実験後、各群の全例について、脳および肺の病理組織学的検査、抗IFV抗体を用いた免疫組織化学検査、ウイルス分離を行ったほか、エバンスブルーを腹腔内投与したマウスの脳乳剤を比色計で測定し、血液脳関門の透過性を調べた。また、末梢血中のサイトカイン (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-12p70) 濃度を測定した。また、脳の組織切片についてTUNEL法、カスパーゼ3, GFAPに対する免疫染色を行い、アポトーシス細胞を検索した。さらに、脳乳剤のウエスタンブロット法により、カスパーゼ3およびタイトジャンクション関連蛋白の検出を行った。

4. 研究成果

IFVおよびLPS (IFV+LPS) を接種されたマウスでは、IFVあるいはLPSのみを接種されたマウスに比べ、神経病原性と脳血管透過性の亢進がより重度に発現することが分かった。病理組織学的検査ではIFV+LPS接種マウスの脳に微小出血、水腫および好中球浸潤が認められ、小児インフルエンザ性脳症と同様の血管障害による脳症を示した。また、IFV+LPS接種

マウスは顕著な高サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β および IL-6) 血症を示したほか、IFV+LPS 接種マウス並びに IFV 単独接種マウスの脳に IFV の感染は認められなかった。従って、乳のみマウスに IFV+LPS を接種することによって小児インフルエンザ性脳症の動物モデルを作成できることが分かった。

次に、IFV+LPS 接種マウスで観察された脳血管の透過性亢進、すなわち血液脳関門の破綻の発生機序を調べた。その結果、IFV+LPS 接種マウスの脳では、IFV または LPS 単独接種マウスの脳に比べてアポトーシス細胞が増数しており、アポトーシスに陥った細胞のほとんどは血管内皮細胞と星状膠細胞であった。これらの細胞は血液脳関門を形成することから、IFV+LPS 接種マウスの脳では、これらの細胞のアポトーシスが血液脳関門の破綻を惹起したと考えられた。また、脳血管内皮細胞に発現しているタイトジャンクション蛋白の発現量を各接種群で比較したところ、有意な差異は認められなかった。小児インフルエンザ脳症の過去の報告例では脳グリア細胞と血管内皮細胞のアポトーシスが認められており、本研究によって確立した動物モデルと小児インフルエンザ脳症の脳病変は共通のメカニズムにより形成されていることが示唆された。

以上のように、本研究では、乳のみマウスにおいて (1) IFV の肺感染が LPS 誘発性の脳症および炎症性サイトカイン産生を増強させること、(2) IFV+LPS 接種によって惹起された脳病変、血中サイトカイン動態およびウイルス分布は小児インフルエンザ脳症の特徴を備えていることを明らかにした。また、乳のみマウスの脳病変の発現には血管内皮細胞と星状膠細胞のアポトーシスが関与しており、同様な所見が小児インフルエンザ脳症でも報告されていることから、高サイトカイン血症による血管内皮細胞と星状膠細胞のアポトー

シス誘導が小児インフルエンザ性脳症の主要な発生メカニズムである可能性が示された。さらに、IFV 感染とそれに起因する高熱下で腸管内において異常増殖した大腸菌が産生した LPS の重複作用によって小児インフルエンザ脳症が発生する可能性があることを示した。

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)

1. Lee HK, Lee HK, Sunden Y, Sakai Y, Ochiai K, Umemura T: CXCL12 improves immune responses to neurotropic virus propagation in the CNS by attracting antibody secreting cells. *Vet Immunol Microbiol* 150: 19-26, 2012. 査読有
2. Sakoda Y, Ito H, Uchida Y, Okamatsu M, Yamamoto N, Soda K, Nomura N, Kuribayashi S, Shichinohe S, Sunden Y, Umemura T, Usui T, Ozaki H, Yamaguchi T, Murase T, Ito T, Saito T, Takada A, Kida H: Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in the 2010-2011 winter season in Japan. *J Gen Virol* 93: 541-550, 2012. 査読有
3. Lee HK, Sunden Y, Ochiai K, Umemura T: Experimental intracerebral vaccination protects mouse from a neurotropic virus by attracting antibody secreting cells to the CNS. *Immunol Lett* 139: 102-109, 2011. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村 孝司 (MEMURA TAKASHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・特任教授

研究者番号：00151936