

## B-19 インフルエンザウイルスB型感染マウスによる Reye's syndrome のモデル実験系

招待講演者 古川 宣 金沢医科大学微生物学教室  
 共同研究者 村山 次哉 "  
 " 筒井 洋博 愛知県心障者コロニー  
 " 西村 豊 豊橋市民病院小児科

目的：ライ症候群は、インフルエンザ、ECHO、HSV、VZ等各種ウイルスの先行感染にひきつづき、発熱・嘔吐をくりかえし、意識低下・死亡という急激な経過をとり、脳浮腫と特有の脂肪肝およびミトコンドリア異常、血中アンモニア値の上昇等の症状を呈する疾患である。しかしながらその成因については、現在まだ不明である。

これらのウイルスの先行感染が、ライ症候群の病因にいかなる役割を果たしているか明らかではないが、臨床的・疫学的な背景の中で、その因果関係を示唆する結果が報告されている。我々は、1946年にHenleらがインフルエンザBウイルスが感染マウスにけいれん、致死を来すことを報告しているのに注目し、インフルエンザBウイルス—マウスの系がライ症候群成因の解明に役立つ実験系にならないかと考え実験を行ったので、その成績を報告する。

方法：ウイルスはインフルエンザB型Lee株を使用し、発育鶏卵にて増殖させたものを超遠心法により濃縮し、血球凝集価14,000倍/ml、MDCK細胞による感染価 $2.5 \times 10^7$  PFU/mlのものをStock virusとして用いた。ウイルス接種は、C3H/Heの8週齢前後の雌マウスを用い、脳内に直接0.02 ml注射された。

成績：脳内接種を受けたマウスは、接種後3日までの間に嗜眠状態となりcomaにおちいり、けいれんを起こして死亡した。

このような致死効果を現わすためのウイルスの dose は、 $LD_{50}$  値で  $3.5 \times 10^5$  PFU/ml を必要とした。また、ウイルスを UV 照射および  $56^\circ\text{C} \cdot 30$  分間の熱処理することにより、この致死効果は消失した。これらのことより、致死効果発現には生きたウイルスが必要であると考えられた。

最近、ライ症候群とアスピリン投与との関係が問題となっているので、次の実験を行った。すなわち、マウスにウイルス接種前 24 時間に、 $100 \text{ mg/kg}$  の割合でアスピリンの腹腔内注射を行い、ウイルス攻撃に対する効果を検討した。ところが、アスピリン投与群、非投与群間での致死効果に差は見られなかった。

次に、ウイルス投与後の血中アンモニア値の推移について、微量拡散法により検討した。 $3 LD_{50}$  値のウイルス接種後、対照群（白丸印）に比較して感染後 24、48 時間とやや減少を示したが、死亡直前の 72 時間後になると約 2 倍の上昇を示した（図 1）。

脳内に入ったウイルスがどのような運命をたどるのかを知るために、臓器中の感染性ウイルスの有無と、ウイルス核蛋白である NP 抗原が発現するか否かを直接蛍光抗体法により検索した。経時的に摘出した全脳のウイルス感染価を追跡してみると、 $4 \times 10^5$  PFU のウイルスを接種されたマウスは、6 時間後では  $1.3 \times 10^5$  PFU となり、その後対数的に減少して 42 時間後では、 $2.1 \times 10^2$  PFU となった。したがって脳内では、ウイルスの増殖は生じないことが示唆された（図 2）。

NP 抗原の発見については、ウイルス投与 6 時間後より見られ始め、48 時間後では明確に証明された（写真 1）。抗原発現部位は脳膜上皮に局在し、脳実質細胞には見られなかった。なお、これらの所見は不活化ウイルスでは観察されなかった。また、他の臓器でのウイルスの増殖、NP 抗原の発現はともに見られなかった。以上の所見から、ウイルスは脳内において一種の Abortive type の感染を起こすことが示唆された。

ウイルス脳内接種後、各臓器を 48 時間、72 時間後に摘出し、顕微鏡および電顕による病理学的検索を行った。肝臓の電顕像では（写真 2-a, b, c）、ミトコンドリアの球形変化、クリステの異常空胞の出現および特有の脂肪肝等が観察された。さらに、ズダン・ブラックによる脂肪染色を行ったところ、微細な脂肪滴が蓄積した細胞が小葉内に広範に認められた（写真 3-a, b, c）、また、脳には軽度ではあるが浮腫がみられた。しかしながら、脾臓や肺には著明な変化は認められなかった。

考察：Ful-B とライ症候群の因果関係を研究するためのモデル実験系を確立する目的で、マウスと、Ful-B を用いた実験系で、種々の興味ある知見を得た。マウスに順応していない Ful-B の

脳内接種は、マウスを致死させることができるとともに、肝臓の脂肪変性を来すことがわかった。この致死効果の本体が、ウイルス増殖に依存するものであるかどうかを検討するために、UV処理したウイルスと熱処理したウイルスを投与したところ、UVの5秒間処理群では致死効果を保持したが、60秒間処理群では死亡例はみられなかった。また熱処理群での致死効果も消失してしまった。Ful-Bによる動物の致死作用のメカニズムは、まだ明らかにされていないが、我々の今回の実験から感染性ウイルスを必要とすることが示唆された。同様の結果を他の研究者も報告している。

しかしながら、脳および他の器官での完全ウイルスの増殖は見られなかった。ところがNP抗原が感染脳膜上皮に出現することを見出した。これは接種ウイルスの残存ではなく、脳内接種後6時間頃より現われること、感染ウイルスの増殖のみられない点より、不完全増殖の結果NP抗原が表現されたものと考えられる。

マウスに順応していないこのFul-Bの投与は、ライ症候群と類似のいくつかの特徴をもつ病的症状をひきおこした。たとえば①血中アンモニア値が上昇した。②肝では脂肪変性がみられた。③脳内接種によりけいれんを起し死亡した。また、肝ミトコンドリアの形態的異常も、SvobodaやIancuらによるライ症候群での報告と類似していた。このようにモデルとライ症候群とは、病態生理学的にかなり類似性を示したが、モデルでは感染経路が直接脳内接種によって起こり、自然感染経路と考えられる呼吸器経路では起こっていない。ライ症候群患者の脳にFul-B抗原が証明されたという報告はないが、しかしマウスではウイルスの増殖が見られず、NP抗原が発現され死亡したという事実は、もし何らかの機転でウイルスが血中より脳へ移行する可能性を考えれば、ライ症候群患者の脳で同様の機序が起こる可能性があると考えられる。

脂肪肝の出現は、脳内に接種したウイルスが肝に移行し障害を伝えたという可能性も否定できないが、UV不活化ウイルスを用いての実験でこれらのことが起こらない点、またウイルスが肝で増殖していない点から考えると、生ウイルスの脳内における不完全増殖が肝細胞でも起こり、代謝異常を来した結果とも考えられるが、今後の研究課題である。Davisらは、静脈内投与した実験でもライ症候群と同様の症状を観察できたと報告している。

このようにいくつかの相違点があるにもかかわらず、この実験モデルは、Coreyらや1981 Rey's Syndrome consensus conferenceで作られたライ症候群の診断基準に適合することができた。

Ful-Bとマウスを使ったこの実験モデルは、ライ症候群の主要な臨床的、生化学的および病理学的特徴のいくつかを再現することができる。このことは、ライ症候群研究のよき実験モデルとなり得る。

結論：インフルエンザB型ウイルス（Ful-B）を成熟マウスへ脳内接種し、その致死効果や生化学的観察および病理学的観察を行った結果、次のような興味ある知見が得られた。

- 1) 脳内接種されたマウスは、3日後までの間に嗜眠状態となり、けいれんを起こして死亡した。このときのLD<sub>50</sub>値を示すウイルス感染価は、 $3.5 \times 10^5$  PFU/mlであった。
- 2) ウイルスのマウスに対する致死効果は、UV処理により減弱され、熱処理により失活した。またアスピリンの前投与は、死亡率に影響を及ぼさなかった。
- 3) 血中アンモニア濃度は、死亡直前に約2倍に上昇した。
- 4) 接種ウイルスの脳内での増殖は、認められなかった。しかしながら、脳上皮でのNP抗原の産生が観察された。
- 5) 肝細胞中のミトコンドリアの形態変化および肝脂肪の出現が認められた。

以上ここで観察された諸症状は、小児ライ症候群患者に報告されている症状と類似していた。以上の事実よりこの実験系は、ライ症候群に関する研究のためのよきモデル実験系になり得ることが示唆された。

#### 文 献

- Reye RDK, Morgan G, Baral J: Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera: A disease entity in child-hood. *Lancet* 2, 749-752, 1963
- Crocker JFS, Bagnell PC: Rey's syndrome: A clinical review. *Can Med Assoc J* 124, 375-382, 1981
- Linnemann CC, Schea L, Partin JC, Schubert WK, Schiff GM: Rey's syndrome: Epidemiologic and viral studies, 1963-1977. *Am J Epidemiol* 101, 517-526, 1975
- Chaves-carballo E: Epidemiology of Rey's syndrome. *Adv Neurol*, 19, 231-248, 1978
- Henle W, Henle G: Studies on the toxicity of influenza viruses. II. The effect of intra-abdominal and intravenous injection on influenza viruses. *J Exp Med* 84, 639-660, 1946
- Henle G, Henle W: Studies on the toxicity of influenza viruses. I. The effect of intracerebral injection of influenza viruses. *J Exp Med* 84, 623-638, 1946
- Hale WM, Mckee AP: The intracranial toxicity of influenza virus for mice. *Pro Soc Exp Biol Med* 59, 81-84, 1945

Barker SM, Hoyle L: The nature of the toxic reaction of influenza virus towards lung tissue. *J Hyg (Camb)* 70, 425-437, 1972

Sugg JY: An influenza virus pneumonia of mice that is nontransferable by serial passage. *J Bacteriol* 57, 399-403, 1949

Evans CA, Rickard ER: The toxic effect of influenza virus in the rabbit eye. *Proc Soc Exp Med* 58, 73-74, 1945

Tobita K, Sugiura A, Enomoto C, Furuyama M: Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* 162, 9-14, 1975

Tobita K: Permanent canine kidney (MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses. *Med Microbiol Immunol* 162, 23-27, 1975

Mims CA: An analysis of the toxicity for mice of influenza virus. II. Intravenous toxicity. *Br J Exp Pathol* 41, 593-598, 1960

Davis LE, Cole LL, Lockwood SJ, Kornfeld M: Experimental influenza B virus in mice: A possible model for Reye's syndrome. *Lab Invest* 48, 140-147, 1983

Svoboda DJ, Reddy JK: Pathology of the liver in Reye's syndrome. *Lab Invest* 32, 571-579, 1975

Iancu TC, Mason WH, Neustein HB: Ultrastructural abnormalities of liver cells in Reye's syndrome. *Hum Pathol* 8, 421-431, 1977

Corey L, Rubin RJ, Bregman D, Gregg MB: Diagnostic criteria for influenza B-associated Reye's syndrome: Clinical VS. pathologic criteria. *Pediatrics* 60, 702-708, 1977

National Institute of Health Consensus Conference; Diagnosis and treatment of Reye's syndrome. *J Am Med Assoc* 246, 2441-2444, 1981

写真1

Photograph of direct immunofluorescent staining of brain cells using NP antibody of influenza B/Lee.

写真2

Electron-micrograph of liver cells.

a :Liver of control mouse, magnification x20,000

b :Liver of mouse inoculated with influenza B/Lee virus,  
magnification x20,000

c :Liver of mouse inoculated with influenza B/Lee virus,  
magnification x2,500

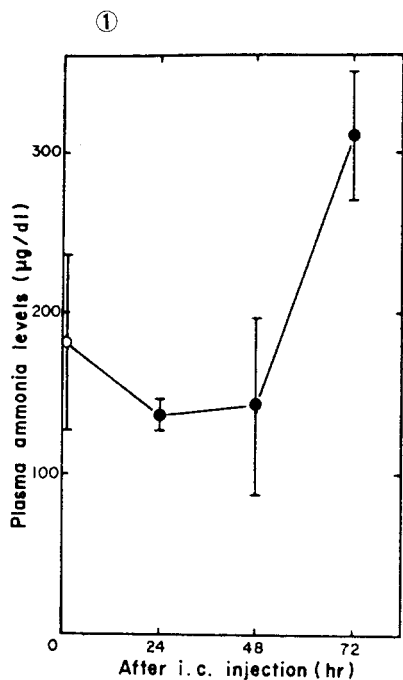
写真3

Photograph of liver cells with Sudan-black stain.

a :Control

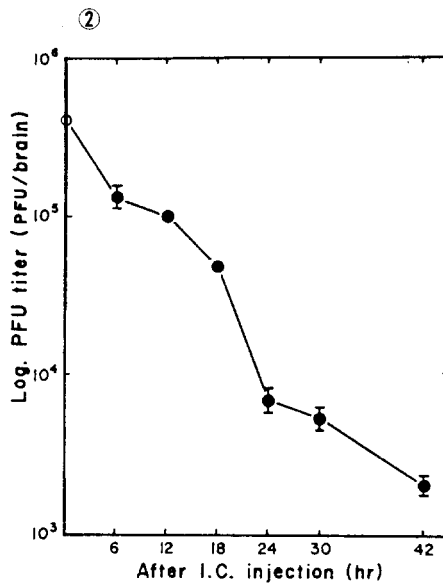
b :Liver of mouse sacrificed at 48 h after inoculation  
with influenza B/Lee virus

c :Liver of mouse sacrificed at 72 h after inoculation  
with influenza B/Lee virus



Mean plasma ammonia levels of 5 mice at each time point after intra-cerebral injection of about  $LD_{50}$  influenza B/Lee virus. Vertical bars represent the standard error.

☒ 1



Decrease in PFU titer in mouse brain after intra-cerebral injection of influenza B/Lee virus.

☒ 2



写真 1



写真 2 - a

⑤

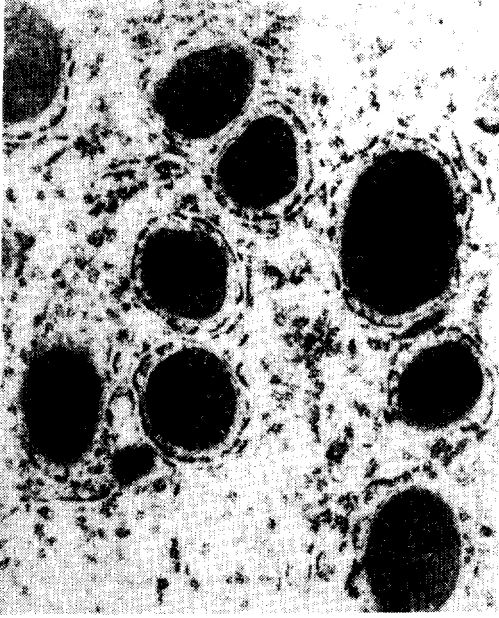


写真2-b

⑥



写真2-c

⑦

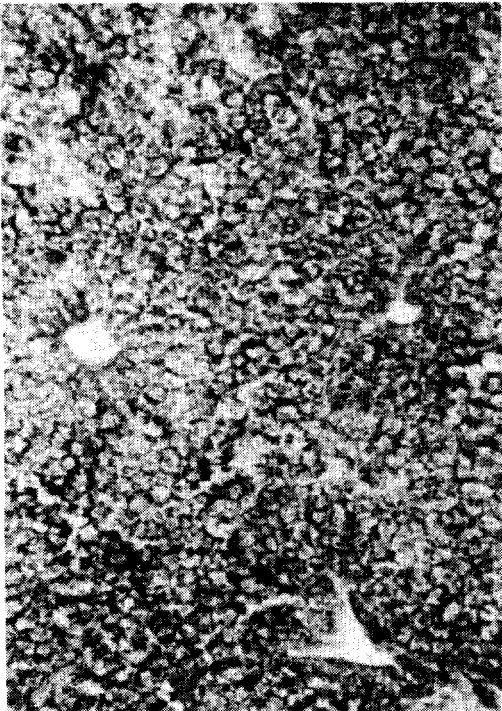


写真3-a

⑧



写真3-b



⑨

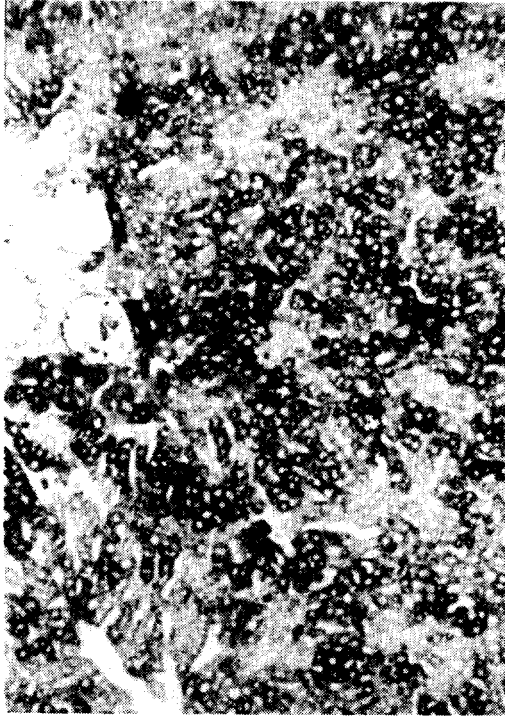
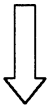


写真3-c



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



目的:ライ症候群は,インフルエンザ,ECHO,Hsv,VZ 等各種ウイルスの先行感染にひきつづき.発熱・嘔吐をくりかえし,意識低下・死亡という急激な経過をとり,脳浮腫と特有の脂肪肝およびミトコンドリア異常,血中アンモニア値の上昇等の症状を呈する疾患である。しかしながらその成因については,現在まだ不明である。

これらのウイルスの先行感染が,ライ症候群の病因にいかなる役割を果たしているか明らかではないが,臨床的・疫学的な背景の中で,その因果関係を示唆する結果が報告されている。我々は,1946年にHenle,らがインフルエンザBウイルスが感染マウスにけいれん,致死を来すことを報告しているのに注目し,インフルエンザBウイルス-マウスの系がライ症候群成因の解明に役立つ実験系にならないかと考え実験を行ったので,その成績を報告する。