

## B-17 マウス実験モデルを用いてのライ症候群の成因 に関する研究

### —脳細胞におけるインフルエンザBの増殖様式—

研究協力者：古川 宣（金沢医科大学 微生物学教室）

共同研究者：村山次哉（金沢医科大学 微生物学教室）

目的：乳幼児期における原因不明の脳症の中、ライ症候群は各種の呼吸器系のウイルスとの関係、特にインフルエンザB感染との関係が疫学的にも示唆されている。

（1-4）インフルエンザBウイルスをマウスに脳内接種することにより、けいれんと脂肪肝、ミトコンドリアの変化を併なうライ様症候群を呈する実験動物モデルを先に発表した。（5，6）（別刷参照）

この実験モデルではインフルエンザBは脳細胞では増殖せず、脳膜上皮にのみウイルス抗原が発現された。本年度は、このインフルエンザBの脳内での増殖様式を人脳培養細胞を用いて研究を行なった。

方法：

#### 1. ウイルス

インフルエンザウイルスB型Lee株を発育鶏卵の10日卵の漿水膜腔に接種し、37℃で、2日間増殖させた。漿尿膜中のウイルスは低速遠心後、超遠心（80,000 G、60分間）により集めた。超遠心後のウイルスは0.1%ウシ血清アルブミンを加えたリン酸緩衝液に浮遊し、-80℃で保存して使用した。

#### 2. 細胞及び培養方法

MDC K細胞（7，8）は、EagleのMEMに2%の割合いで仔牛血清（北里研究所）を加えた培地を用い、37℃、5%のCO<sub>2</sub>存在下で培養を行なった。ヒトの稀少突起神経膠腫由来であるKGC細胞は、東京大学医科学研究所の山内博士より分与された。KGC細胞は、DM 160培地（極東製）10%の牛胎児血清（Gibco）を添加して、37℃で5% CO<sub>2</sub>存在下で行なった。

#### 3. 細胞へのウイルス感染及び感染価の測定

ウイルス感染は、培養された細胞に旧培地を除き、リン酸緩衝液で3回、細胞表面を洗浄した。その後、ウイルスを接種し、37°Cで60分間吸着させた。未吸着ウイルスをリン酸緩衝液で2回洗浄により取り除いた。ウイルス増殖用培地は、それぞれの培地から血清を除き、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  トリプシンとウシ血清アルブミンを1  $\text{g}/\ell$  の割り合いで加えて使用した。産生されたウイルスの感染価の測定は、先の報告に従った。

#### 4. 赤血球凝集反応

赤血球はニワトリの血液を遠心、洗浄した後、リン酸緩衝液に0.5%の赤血球浮遊液になる様に調製した。凝集反応は室温で1時間反応させて行なった。

#### 5. ポリアクリルアミド電気泳動

ウイルス感染6時間後に5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  の<sup>35</sup>S-メチオン (Specific activity 800 Ci/mmol, New England Nuclear Corp.) を加えた無血清培地で60分間培養した。細胞表面をリン酸緩衝液で2回洗浄した。2% SDSで細胞を破壊した。泳動用緩衝液に浮遊し、加熱後、ポリアクリルアミド電気泳動を行なった。泳動後はX線フィルムに-80°Cで感光させた。

#### 6. 蛍光抗体法

カバーガラス上で細胞を培養後、ウイルスを感染させた。アセトンで固定後、ヒト抗インフルエンザBウイルス抗体を用いた間接法で観察した。使用したFITCは抗ヒトIgG(カッペル社製)を用いた。

成績：

##### 1. 感染細胞からのウイルス産生

MDC K細胞およびKGC細胞にMOI約1の割り合いで感染させた後、経時的に培養上清を採取し、産生されたウイルスの感染価を測定した。表1に示す如く、MDC K細胞では、感染後6時間頃よりウイルス産生を明らかに認めたが、KGC細胞では少量の産生しか認めなかった。形態学的にはMDC K細胞の場合だけでなく、KGC細胞の場合でも6~8時間頃より細胞質内に空腔を認め、細胞変性が進行し、24時間頃より細胞の崩壊を認めた。KGC細胞は感染性を持つ完全なウイルスの産生より、感染性のない不完全なウイルス粒子が多数産生されている可能性を考えて、培養上清中の赤血球凝集価を測定した。MDC K細胞の場合には、凝集価

が16倍から256倍と経時的に上昇がみられたが、KGC細胞の場合には、感染価と同様に低かった。以上の結果から、KGC細胞でのウイルス産生は、極く少量であるが、細胞変性を著明に認めたので、細胞内でのウイルスの増殖を知るために次の実験を行なった。

## 2. ウイルス抗原の検出

ウイルス感染細胞内でのウイルス抗原の検出は、間接蛍光抗体法で行なった。使用した抗体はヒト抗体で、インフルエンザウイルスのB/singapore/222/79に対する抗体で赤血球凝集抑制価 $\times 1024$ のものを20倍希釈後使用した。MDC K細胞とKGC細胞とを比較すると、前者の場合には24時間迄に全細胞質にウイルス抗原を検出出来るが、後者の場合には感染後48時間でも約50%の細胞しかウイルス抗原を検出出来なかった。

## 3. 細胞内外のウイルス量の比較

ウイルス感染後、一定時間の培養上清に放出されているウイルス量と、感染細胞内に存在しているウイルス量との比較を行なった。細胞内に存在するウイルス量の測定は、細胞表面をリン酸緩衝液で洗浄後、ラバー・ポリスマンで細胞を剥離し、トリプシン $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の培地に浮遊後、凍結融解を3回繰り返した後の細胞破壊浮遊を用いた。それぞれのウイルス量の比較は赤血球凝集法で検討した。(表2) MDC K細胞の場合には、細胞内外の比は、時間経過とともに1になって行っているが、KGC細胞の場合には、細胞内のウイルス量は増加しているが、細胞外の放出は少なく、内外の比が $1/2\sim 1/8$ であった。この事実は先の実験結果と一致し、KGC細胞内でウイルスの複製が進行しているが、ウイルス放出機構に問題があると考えられた。

## 4. 細胞内でのウイルス蛋白合成

感染細胞内では、KGC細胞でもウイルス抗原が生成されており、さらに、ウイルスの存在も確認されたので、ウイルス蛋白の合成の検討を行なった。(9) 感染後6時間目に $^{35}\text{S}$ -メチオニンで60分間ラベルした。ポリアクリルアミド電気泳動で解析した結果、KGC細胞でも核蛋白(NP)、赤血球凝集素(HA)、及びマトリックス(M)蛋白がMDC K細胞の場合とほぼ同様に生成されていた。(図1)

考察：インフルエンザBウイルスを脳内に接種し、ライ症候群のモデル実験で、ウ

ウイルスが脳膜上皮に抗原が発現されウイルスが増殖しない結果(6)を試験管系の実験で検討を行なった。即ち、ヒトの脳由来の細胞であるKGC細胞に、インフルエンザB型ウイルスを感染させウイルスの増殖を検討した。ウイルスの産生は極く少量認められ、神経細胞に馴化していないウイルス株で細胞変性、抗原発現のみられた事は興味深い知見である。産生されているウイルス量が少量であっても、細胞は変性に陥り崩壊する事実は、マウスの脳内接種で観察された結果が不完全増殖であり脳膜上皮に抗原が見られるという結果と類似していた。

これらの一連の研究の示唆するものは、ライ症候群がインフルエンザBで起るものとすれば、インフルエンザウイルスが何らかの機序により脳内侵入を起せば、脳細胞に不完全増殖、細胞変性を来す可能性を示す。従ってライ症候群患者の脳の検索にインフルエンザBの感染の痕跡(例えばインフルエンザBのRNA、抗原)を調べる必要性を示唆するものと考えられる。

結論：ライ症候群マウスモデルのインフルエンザBウイルスの増殖をKGC脳培養細胞を用い研究し、次の結果を得た。

インフルエンザBはKGC細胞で不完全増殖を示す。この不完全増殖はインフルエンザの主要ウイルス抗原である赤血球凝集素、NP、M蛋白は産生されるが、ウイルスの粒子が構築されず、粒子形成の過程に障害があると考えられる。

#### 文 献

1. Reye RDK, Morgan G., Baral J. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera. A disease entity in the child. Lancet 2:749-752, 1963.
2. Ruben F.L. Reye syndrome. In Belshe R.B.(Ed.) Human Virology pp.1033-1044, PSG Publishing Company, Inc., 1984.
3. Crocker J.F.S., Bangnell P.C. Reye's syndrome:A clinical review. Can. Med. Assoc. J. 124:375-382, 1981.
4. Linnemann C.C., Schea L., Partin J.C., Schubert W.K., Schiff G.M. Reye's syndrome:Epidemiological and viral studies, 1963-1977. Am. J. Epidemiol. 101:517-526, 1975.

5. Davis L.E., Cole L.L., Lockwood S.J., Kornfeld M. Experimental influenza B virus toxicity in mice: A possible model for Reye's syndrome. *Labo. Invest.* 48:140-147, 1983.
6. 村山次哉, 古川宣。インフルエンザB感染マウスとライ症候群。  
——モデル実験系の確立——臨床とウイルス 12:175-181, 1984。
7. Nakajima S., Sugiura A. Neurovirulence of influenza virus in mice. II. Mechanism of Virulence as studied in a neuroblastoma cell line. *Virology* 101:450-457, 1980.
8. 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.
9. Takeura S., Aoki H., Tsurumi T., Nishikawa Y., Fujioka H., Yoshii S., Maeno K. Abortive infection of L cells by influenza B virus: Defect in bud formation. *Microbiol. Immunol.* 28:427-437, 1984.

**Table 1.** Titration of virus infectivity

Time	Cells	
	MDCK	KGC
2 hr.	$2.3 \times 10^5$ #	$1.1 \times 10^4$ #
4	$2.7 \times 10^5$	$3.3 \times 10^4$
6	$7.0 \times 10^6$	$3.7 \times 10^4$
8	$1.3 \times 10^7$	$5.4 \times 10^4$
12	$1.7 \times 10^7$	$4.0 \times 10^4$
24	$3.6 \times 10^6$	$8.6 \times 10^4$

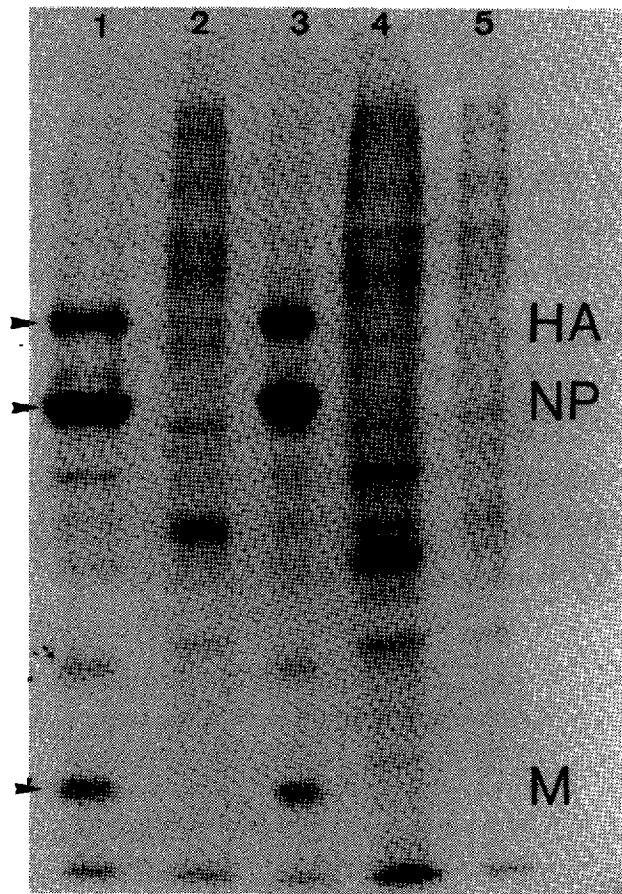
Culture fluids of infected cells were assayed by method of plaque formation on MDCK cells

# : PFU/ml

**Table 2.** Comparison of haemagglutination test between culture fluids and intracellular components

Cells	Timm	Intracellular	Extracellular
MDCK	8hr	$\times 64$	$\times 8$
	16	$\times 128$	$\times 128$
	24	$\times 256$	$\times 256$
KGC	8	$\times 4$	$\times 2$
	16	$\times 128$	$\times 8$
	24	$\times 128$	$\times 16$

Intracellular components were obtained after harvested cells were done freezing and thawing  $\times 3$  times.  
Haemagglutination test was done using chick blood cells in the cold room for overnight.



**Fig. 1.**

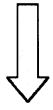
Title : Analysis of structural proteins of virus in infected cells by acrylamide gel electrophoresis.

Explanation : Cells were infected with influenza B virus for 6 hours and labeled with  $^{35}\text{S}$ -methionine for 60 minutes. Then, they were destructed with 2% SDS and the synthesis of structural proteins of virus was analysed by polyacrylamide gel electrophoresis.

Then, they were destructed with 2% SDS and the synthesis of structural proteins of virus was analysed by polyacrylamide gel electrophoresis.

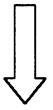
Lane 1 ; Infected MDCK cells. Lane 2 ; Leave out. Lane 3 ; Infected KGC cells. Lane 4 ; Non-infected MDCK cells. Lane 5 ; Non-infected KGC cells. Arrows ; HA ; Haemagglutinin. M. W. ca.78,000. M ; Matrixprotein. M. W. ca 26,000

NP ; Nucleoprotein. M. W. ca 58,000.



## 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:乳幼児期における原因不明の脳症の中、ライ症候群は各種の呼吸器系のウイルスとの関係、特にインフルエンザ B 感染との関係が疫学的にも示唆されている。(1-4)インフルエンザ B ウイルスをマウスに脳内接種することにより・けいれんと脂肪肝、ミトコンドリアの変化を併なうライ様症候群を呈する実験動物モデルを先に発表した。(5,6)(別刷参照)この実験モデルではインフルエンザ B は脳細胞では増殖せず、脳膜上皮にのみウイルス抗原が発現された。本年度は、このインフルエンザ B の脳内での増殖様式を人脳培養細胞を用いて研究を行なった。