

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
水口雅	急性脳症の診断と治療	日本小児神経学会教育委員会	小児神経学の進歩第31集	診断と治療社	東京	2002	26-36
水口雅	小児急性脳症	医療情報科学研究所	Selected Articles 2003	メディックメディア	東京	2002	1469-1480
水口雅	小児の急性脳症, ライ症侯群	山口徹、北原光夫	今日の治療指針 2003年版	医学書院	東京	2003	944

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Mizuguchi M, Takashima S.	Imaging and pathology in pediatric neurological disorders.	Neuropathology	22(2)	85-89	2002
Mizuguchi M, Hayashi M, Nakano I, Kuwashima M, Yoshida K, Nakai Y, Itoh M, Takashima S.	Concentric structure of thalamic lesions of acute necrotizing encephalopathy.	Neuroradiology	44(6)	489-493	2002
Nakai Y, Itoh M, Mizuguchi M, Ozawa H, Okazaki E, Kobayashi Y, Takahashi M, Ohtani K, Ogawa A, Narita M, Togashi T, Takashima S.	Apoptosis and microglial activation in influenza encephalopathy.	Acta Neuropathologica	105(3)	233-239	2003
水口雅	急性壊死性脳症	医学のあゆみ	200(13)	1131	2002
水口雅	意識障害と脳浮腫除去薬	小児科	43(Suppl)	80-81	2002
水口雅	意識障害と脳代謝賦活薬	小児科	43(Suppl)	82-83	2002
水口雅	急性壊死性脳症	小児感染免疫	14(1)	41-46	2002
水口雅	急性脳炎・脳症の発症メカニズム	小児科	43(7)	910-916	2002
水口雅	ウイルス性髄膜炎、脳炎、感染後急性脳症の現況	小児内科	34(10)	1490-1494	2002
水口雅	ライ症侯群とインフルエンザ脳症の関連	日本医事新報	4106	143-144	2003
水口雅	急性壊死性脳症	小児科	44(2)	189-196	2003
水口雅	脳炎・脳症の診療のポイント	小児内科	35(2)	263-265	2003

インフルエンザ脳症の肝組織におけるミトコンドリア変化とアポトーシスの検討

研究協力者 鍵本 聖一 埼玉県立小児医療センター総合診療科副部長

研究要旨 インフルエンザ脳症（IE）患児の初期の肝生検組織において、中心核性の小脂肪滴の蓄積、核の変形とクロマチンの凝集、ミトコンドリア（mt）の膨化とマトリックスの電子密度低下とクリスタの消失、広範な TUNEL 法による陽性シグナルを検出した。炎症所見は認めなかった。2 週後に再検を行なった 1 例ではこれらの変化は消失しており、IE の初期肝では mt 障害と広範なアポトーシスが短期間、同期的に多発していることが判明した。また、Mt 由来のアポトーシス惹起物質であるチトクローム C（CyC）との同時検出では、Mt に局在する CyC が消失している細胞にアポトーシスが生じていることが判明し、IE での肝障害は免疫反応である肝炎ではなく、Mt 障害とこれにともなう代謝異常、および放出された CyC により肝細胞にアポトーシスが引き起こされることにより生じていることが判明した。他臓器でも同様の病態が生じている可能性が示唆される。

A. 研究目的：

インフルエンザ脳症（IE）はしばしば脳病変にとどまらず、肝、腎、筋肉その他に広範な病変を生じる全身疾患であるが、現場である各臓器の病像については、疾患の進行が急速で重篤なことから、脳その他の臓器の生検は困難であり、剖検では死後変化や蘇生に伴う影響があるため、必ずしも明確ではない。一方、肝生検は確立した手技であり、小児でも比較的安全に施行しうることより、われわれは IE 初期の肝病変を検索することより、IE の病態を検索する機会を得た。一方、IE では初期から血清 CyC が上昇していることが報告され 1)、アポトーシスの関与が指摘されている。CyC はミトコンドリア（mt）膜間腔に存在し、細胞質に流出することにより Apaf-、Caspase 3、Caspase9 等のアポトーシス惹起酵素を活性化し、最終的に DNA 断片化を来す事が知られており 2)3)、肝組織において mt 変化と CyC やアポトーシスの関連を検索した。

B. 研究方法：

症例は 3 例（表 1）年齢は 4 歳、1 歳 2 ヶ月、6 歳のいずれも男児で、A 型、B 型がそれぞれ 1 例、インフルエンザ流行期の急性脳症が 1 例である。肝生検は十分な Informed consent のもとに、発症それぞれ 2 日、1 日、1 日に行い、1 例では 16 日に再検を行なった。対象として発症後 21 日の脳症例、mt 病であり、肝障害を呈していた Pearson 病の患児 1 例、C 型肝炎ウイルスに慢性肝炎 1 例である。肝生検組織は通常の HE 染色、脂肪染色、電子顕微鏡での検索を行ない、パラフィン切片を用いて TUNEL 法は FITC 蛍光発色、CyC は一次抗体として抗 cytochrome C mAb (Promega, G7421)、二次抗体として抗 マウス ロバ抗体 Cy3 (Jackson IR)を用いた免疫組織化学を行い、蛍光レーザー共焦点顕微鏡を用いて検索した。

C. 研究結果（表 2）：

1. 光顕所見

2 例は炎症細胞浸潤や肝細胞脱落の所見はないものの、多くの肝細胞の核のクロマチンが凝集し、核が変形、小径となり、また、凝集したクロマチンは核の周辺部に局在していた（図 1 A）。脂肪染色では全体に微小な脂肪滴が観察されたが、核の偏在を認めなかった。1 例は肝細胞の脱落がわずかに認められたが、炎症反応はなく、核の変形、クロマチンの凝集が認められた。また、核の偏在を伴わない、中小の脂肪滴が混在していた（図 1 B）。

核の変化はアポトーシスに特徴的なクロマチンの凝集と marginalization と考えられた。さらに種々の核の変化がほぼ揃っていた。こうした変化は対象とした慢性肝炎や 16 日目に再検した IE、21 日目に生検した IE では認められず、欠失 DNA を含有する異常 mt の蓄積症である Pearson's marrow pancreas 症候群では微小脂肪滴蓄積を認めたが、核の変化は明らかでなかった。

2. 電顕所見

1 例の mt は膨化し、マトリックスの電子密度の低下とクリスタの消失を認め、内膜、外膜の明瞭な区別は認められなくなっていた。同時に脂肪滴の貯留、核の変形が認められた。肝細胞間の接着は失われ、凝集したクロマチンが核の周辺へ認められた（図 2）。こうした所見は 2 週間にはまったく消失していた。1 例では mt のわずかな膨化と小脂肪滴を、1 例では細胞膜がはっきりしなくなった肝細胞で mt の消失、比較的大きな脂肪滴、凝縮して電子密度のあがった核が認められた。時期の遅い IE や慢性肝炎では明ら肝細胞の変化を認めなかった。Pearson 症候群では著しく膨化した mt を認めた。

3. 蛍光顕微鏡による TUNEL シグナルと CyC の分布
いずれも広範に多くの肝細胞の核に TUNEL 陽性シグナルを認めた (図 3)。共焦点レーザー顕微鏡では解像度よく CyC は肝細胞で粒状に認めたが、2 波長の蛍光による同時検索では、TUNEL 陽性の核をもつ肝細胞で CyC の粒状シグナルは弱いか、消失しているものが多かった (図 4)。これに対し Pearson 病ではアポトーシスシグナルは認められず、CyC のシグナルは大粒状であった。

D. 考察:

IE の初期の肝臓に認められた核のクロマチンの凝集、クロマチンの各周辺への沈着、TUNEL の陽性シグナルは DNA の断片化を表し、肝では特に炎症細胞の浸潤を伴わずに同期的に広範なアポトーシスが生じていることが証明された。1 例で 2 週後には消失していることより、全プロセス数時間といわれる細胞のアポトーシスは短期的に同期的に一挙に生じ、短期で終了したものと考えられる (図 5)。一方、脂肪滴は症例により大きさや分布が異なっていたが、生検時期により生じた違いではないかと考えられた。Mt はそれぞれに膨化していたが、生検時期には GOT が著しい上昇を来していたことよりミトコンドリア由来のものとして納得の行く所見と考えられる。この時期の IE で布井ら 1) は、血清 CyC の著明な上昇を報告しており、CyC の保持が mt 内外膜間腔であることより、傷害された mt より CyC が流出していることが示唆された。CyC を染色した免疫組織化学では通常の肝細胞内に粒状シグナルとして (つまり mt に一致して) 認められるが、全体にこの粒状シグナルが消失している細胞が散見され、また、先の TUNEL と CyC の 2 重染色を 2 波長の蛍光で同時検出した像で、TUNEL 陽性細胞で CyC シグナル低下、すなわち mt に CyC が保持されていない状態が認められた。一方異常 mt の蓄積症である Pearson 病では mt の膨化は著名であったものの、CyC シグナルは粒状に保持され、アポトーシスも認められなかった。

以上より、IE の肝では炎症細胞浸潤による肝炎とは異なる、同時、広範なアポトーシスが生じていること、これと関連して mt が膨化、CyC を放出し GOT (多くは mGOT) を上昇させ、mt 代謝を落として (ベータ酸化やクエン酸回路などの障害) 脂肪滴の蓄積とジカルボン酸の上昇や乳酸の上昇などを引き起こしていることが推測された。mt は種々の刺激によって mitochondrial permeability transition (MPT) という pore を膜に生じ、CyC を放出してアポトーシスを引き起こすことが知られ 4)、この刺激には虚血-再還流 5) やサリチル酸 6) など挙げられている。IE では激しいけいれんに対する蘇生が 100% 酸素で行なわれた

り、高熱に対してメフェナム酸やジクロフェナックなど解熱剤が用いられたりして誘発された可能性が指摘されており、上記のメカニズムが関与していると考えても矛盾はない。

ウイルス感染と mt 障害がどのように関連しているかは現在のところ不明であるが、感染から引き起こされるサイトカインに反応していることが想定される。一方、最近、ウイルスの遺伝子産物である PB1 蛋白の 1 つがある種の細胞の mt に強い親和性を持ち、直ちに mt 膜に結合して mt を膨化させ、感染細胞をアポトーシスに導くことが示された 7)。肝細胞が直接ウイルス感染を受けていることは考えにくい、ゲノムや遺伝子産物の検出も今後行なう必要がある。

MPT は mt 内の cyclophilin D が mt 内膜に凝集して形成するとされているが、免疫抑制剤である cyclosporin A (CsA) は cyclophilin D に結合してこの凝集を阻害し、MPT を形成させないことにより、実験的にアポトーシスを抑制することが知られている 8)。すでに免疫抑制剤としての投与経験は蓄積されており、予後の不良な IE の初期に CsA が有効である可能性があり 9)、検証に値すると考えられる。

E. 結論:

IE の初期肝では mt 障害とチトクローム C の放出により広範なアポトーシスが短期間、同期的に多発している。ウイルス感染、サイトカイン血症とつながりを検証する必要がある。

抗アポトーシス療法による治療の可能性が示された。

F. 研究発表

1. 鍵本聖一. ライ症候群におけるアポトーシスの関与. 肝臓 40 suppl(1):375, 1999
2. 鍵本聖一. 岡崎実, 国松 恵理子, 大石勉. アポトーシス肝細胞クロマチンの凝集と DNA の断片化を認めたライ症候群の 1 例. Minophagen Medical Review 43:263-265, 1999
3. 鍵本聖一. ライ症候群の診断と治療. 総合臨床 49: 699-704, 2000
4. 鍵本聖一. インフルエンザ脳症の臨床像とその病態. ICU と CCU, 投稿中

学会発表

1. 鍵本聖一. ライ症候群におけるアポトーシスの関与 第 35 回日本肝臓学会, 1999
2. Kagimoto S, Okazaki M, Hirata N, Oh-ishi T, Joh K, Kishimoto H. Evidence of apoptosis seen in patients with Reye syndrome. 6th Pan Pacific Congress of Pediatric Gastroenterology and

Nutrition, 1999

3. Kagimoto S, Takano T, Okazaki M, Joh K, Nara T, Kishimoto H, Oh-ishi T. Patterns of existence of virus and mechanisms of liver injury in Epstein-Barr virus associated liver diseases. World Congress of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2000
4. 南波 広行、高野 忠将、鍵本 聖一、城 宏輔、大石 勉、田中 学、岸本 宏志、大竹 明. 急性脳症の1例. 第22回武蔵野小児肝臓病懇話会, 2001
5. 鍵本聖一、南波 広行、高野 忠将、藤巻里香、城 宏輔、大石 勉、岸本 宏志. Reye/Reye like syndromeの肝におけるアポトーシスシグナルとチトクローム Cの局在. 第17回日本小児肝臓病研究会, 2001
6. 南波 広行、藤巻里香、冠木智之、鍵本 聖一、城 宏輔、大石 勉、浜野晋一郎、望月美佳、田中 学、岸本 宏志. 初期の肝組織像を検討したインフルエンザ脳症の3例. 第106回日本小児科学会埼玉地方会, 2001
7. 鍵本 聖一、南波 広行、藤巻里香、冠木智之、城 宏輔、大石 勉、浜野晋一郎、望月美佳、田中 学、岸本 宏志. インフルエンザ脳症の肝におけるミトコンドリア異常とアポトーシス. 第104回日本小児科学会, 2002
8. 鍵本聖一. インフルエンザ脳症の臨床像とその病態. 第13回日本急性血液浄化学会. 2002

mitochondrial permeability transition in salicylate toxicity to cultured rat hepatocytes: implications for the pathogenesis of Reye's syndrome. *Toxicol Appl Pharmacol* 147:431-41, 1997

7. Chen W, Calvo PA, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 7:1306-12, 2001
8. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta*. 1366:79-94 1998.
9. Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci* 18:5151-9 1998

参考文献

1. 布井博幸. インフルエンザ脳炎脳症におけるチトクローム C 測定. インフルエンザの臨床経過中に発症する脳炎・脳症の易学および病態に関する研究 (H12-新興-11). 平成13年度厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業) 研究報告書. 54-56, 2002
2. Yang JC, Cortopassi GA. Induction of the mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome c. *Free Radic Biol Med* 24: 624-31, 1998.
3. Susin SA, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-445, 1999
4. Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol* 18:6353-64, 1998.
5. Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 17:3341-9 1998
6. Trost LC, Lemasters JJ. Role of the

表 1. 対象症例

Case	Age	Gender	peak GOT (IU/l)	peak CK (IU/l)	Pathogenesis	ASA use
1	4 y	male	3568		Influenza B	No
2	1y2m	male	12558	1568	Unknown	No
3	6 y	male	3368		Influenza A	No

We also studied

Pearson's marrow pancreas sx. (2y female)

IE with late timing of LB (4y male)

CPH (HCV positive)

表 2 : 検索結果のまとめ

症例	生検時期 (発症後)	微小脂肪滴	mt 膨化	LSM 所見	
				apoptosis	cytochromeC
1	2 d	+++	++	+++	シグナル低下
	16 d	—	—	—	粒状
2	1 d	+++	+++	++	シグナル低下
3	1 d	+++	++	+	シグナル低下
4	21 d	—	—	—	粒状
5	(Pearson's)	++	+++	±	大粒状
6	(CPH)	—	—	±	粒状

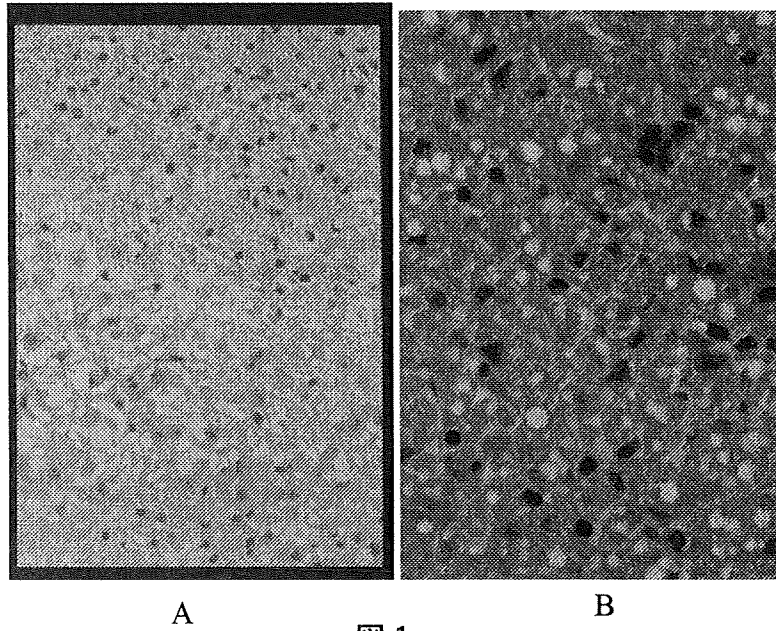


図 1

図 1 B : 中小の脂肪滴とクロマチンの凝集を認める。

図 1 A : 核の縮小とクロマチンの凝集、周辺化を多くの肝細胞に認める。

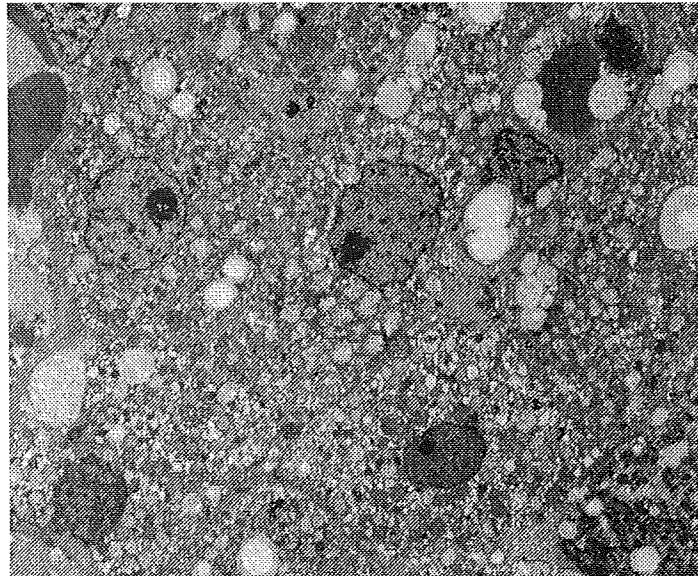


図 2

図 2 : 電顕像。小脂肪滴、膨化したミトコンドリアとマトリックスの電子密度の低下、クリスタの消失を認める。核は変形し、一部にはクロマチンの凝集を認める。

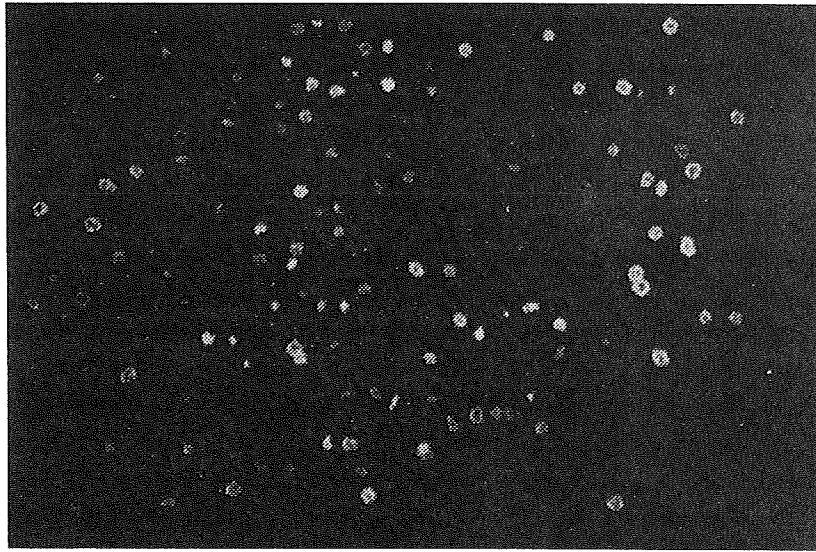


図 3

図 3 : TUNEL 法による蛍光顕微鏡像。多くの肝細胞の核に DNA の断片化シグナルを認める。

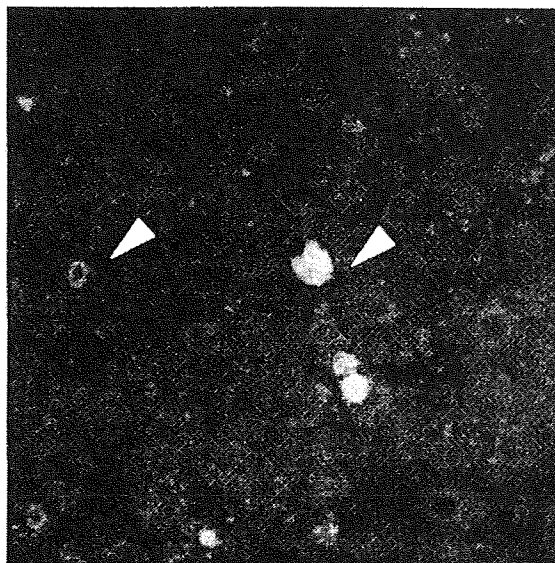


図 4

図 4 : チトクローム C と TUNEL 法の 2 重染色による共焦点レーザー顕微鏡像。核の断片化シグナルのある細胞 (矢印) では CyC の粒状シグナルが消失している。

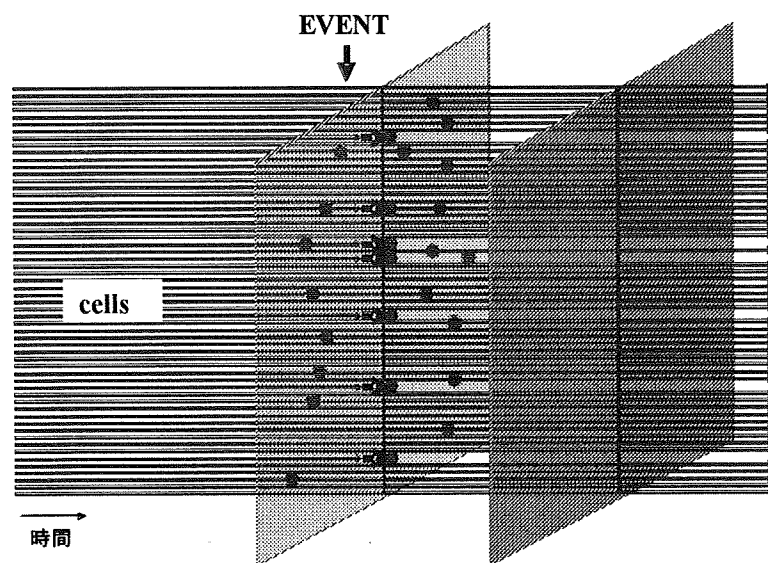


図 5

図 5 : インフルエンザ脳症の肝障害のメカニズムを表した想定図。多くのアポトーシスが一つのイベントに引き続き多発し、短期間に終了することを示している。●はアポトーシスに陥った細胞。

インフルエンザ脳症における cytochrome C 測定の意義

分担研究者 布井 博幸 宮崎医科大学小児科 教授

研究要旨 1997-98 年度に大流行したインフルエンザ感染症の中でインフルエンザ脳症患者を経験し、その病態の解析を血清サイトカイン、血管上皮マーカー、および血清 cytochrome c を指標にこれまでの検討してきた。

今回は高熱性疾患として知られる川崎病で同様のマーカーを用いて検討を加えた。その結果インフルエンザ脳症ではサイトカインのパターンに違いがあるものの、川崎病、インフルエンザによる熱性痙攣患者と比較しても血清 cytochrome c は有意に高値を示していた。また、インフルエンザ脳症と診断したが、血中 cytochrome c の上昇が認められなかったが後遺症が残る可能性のある症例について、後方視的検討を加えた。その結果血中 cytochrome c 測定だけでなく、髄液中の cytochrome c 測定も重要であろうと思われた。

A. 研究目的：

この2年間の研究からインフルエンザ脳症患者では血中 cytochrome c 濃度が病気の発症や経過にもよく関連することから、同疾患ではアポトーシスが誘導されていると考え研究を進めてきた。同様に血球貪食症候群、新生児仮死でも血中 cytochrome c が上昇することより、同様の病態を示すのではないかと考え種々の治療法を検討している。

今回、高熱性疾患である川崎病や他の感染症でも同様の炎症性サイトカインや cytochrome c を測定し、cytochrome c 測定の意義を明らかにしようと考えた。一方、班研究中様々な症例の検討から、cytochrome c がインフルエンザ脳症の指標となりうるのかについて考えさせられた症例に出会ったので報告する。

【方法】

インフルエンザウイルス感染症で、高熱、熱性痙攣患者と脳炎脳症を伴った症例と川崎病と診断された患者症例について初発時経過中の血清を採取し、以下のマーカーの相関について検討した。

血管内皮マーカー、サイトカインマーカーについては e-selectin; sE-selectin ELISA ver2 (Bender med System), sTM; TM test (Teijin; Teijin Diagnostics), TNF- α ; Human TNF- α Cytoscreen Immunoassay Kit (Bioscience International), sFas; sFas ELISA Kit (Medical and Biological), sFas-L; sFas Ligand ELISA Kit (MBL), and IL-6 and IL-8; Biotrak IL6 and IL-8 human ELISA system (Amersham Pharmacia)のキットを用いて測定した。Cytochrome C については我々の開発した ELISA 系を用いた。

症例 1歳4ヶ月 女児

1/16 日より発熱のため近医にて抗生剤処方されている。1/17 夕方布団で嘔吐しうつぶせになっているところを発見、ぐったりして呼びかけにも目の焦点が合わない状態であったため救急車にて病院へ急ぐ、車内

で全身痙攣が始まり、ホリゾン、アレビアチン静脈注射にても止まらず、イソゾール持続点滴治療にて軽快、インフルエンザ脳症もしくは熱性痙攣重積の疑いにて入院となっている。鼻咽頭拭い液からインフルエンザ A(+)/B(-)の結果であった。

入院時体温 40.4℃、JCS 100-200（時折四肢を動かす）対光反射（+）CT 特に異常なし、髄液検査 細胞 1/3、蛋白 17mg/dl、糖 179mg/dl、WBC 20000、LDH 967、Plat 24.9 万/ml、

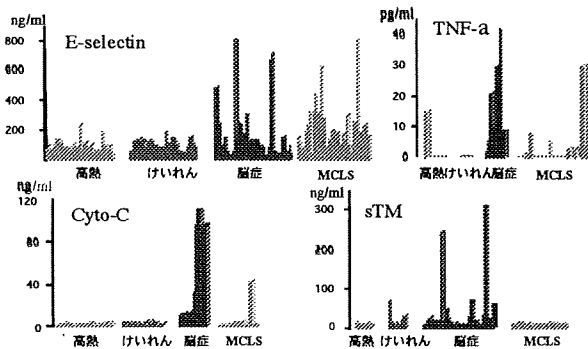
経過：タミフル、グリセオールなどの処置に加え、イソゾール、ドリミカムにて経過を見ていた。1/20 日には体動も多くなりCTも異常がなかったため同薬を中止したところ、再び痙攣が出現、麻酔薬の再導入されている。1/23 日 CT で右半球優位の浮腫が認められたが、体動も多く追視も見られるため、ドリミカム中止、左上下肢の動きが悪いものの、その後も順調に回復し、2/17 日の CT では全体的な萎縮が認められているが、2/18 日に退院となる。退院後は左上下肢の動きはやや悪く、座位は可能だがつかまり立ちや歩行は出来ない。以前に比べてボーとしていることが多いなど精神運動の低下も認められている。しかし症状は日ごとに改善がみられており、今後も回復が期待される。

【結果】

血清 Cytochrome C 値は脳症症例で明らかな上昇が認められたが、川崎病では 1 例を除き上昇は認められなかった。血清 e-selectin は初診時のみでなく経過も含め検討しているが、ほとんどの川崎病とインフルエンザ脳症の症例で上昇していた。sTM については、川崎病ではほとんど上昇が認められず、脳症症例でも、一部の上昇を認める程度であった。TNF- α は病状によって上昇する症例もあったがインフルエンザ脳症の症例とそうでない患者との間で有意差が認められなかった。この他、一部の症例で、sFas、sFas-L、

IL-6、IL-8などの測定を行ったが、各症例群間で有意さが認められなかった。

インフルエンザ感染と川崎病の各サイトカインの比較



症例の血中 cytochrome c は各々0.034 (1/17)、0.08 (1/18)、0.033 (1/19)、0.125 ng/ml (1/20) と上昇していなかった。

D. 考察

インフルエンザ脳症と川崎病患者の炎症性サイトカインや cytochrome c 濃度を比較した。血管内皮マーカーの e-selectin は両者で上昇していたが、sTM はインフルエンザ脳症患者のみでしかも一部の人で上昇しているに過ぎなかった。両者で血管内皮炎は起こっているものの、sTM がインフルエンザ脳症で高いことより、血管内皮炎でも何らかの病態の違いがあるのではないかと考えられる。また、TNF-aは両者でほぼ同等に上昇している症例もあることから、炎症性サイトカインの上昇の違いが両者の本質的な違いではないと考えられた。しかし、血中 cytochrome c の上昇は川崎病患者の一例を除きインフルエンザ脳症患者のみで上昇しており、しかも高熱、痙攣患者ではほとんど上昇していないことから、インフルエンザ脳症症例にかなり特異的に高値を示すことが明らかになった。

上記の様に、統計的に見ると確かに血中 cytochrome c 濃度は痙攣性疾患や高熱性疾患とインフルエンザ脳症との病態の違いを反映できているかにみえるが、今回示した症例の様にかかなりの後遺症を残すのではないと思われる症例でも cytochrome c の上昇が認められなかったことは、注意に値するのではないかと考えている。

この患者は入院時および6日後の CT でも異常を認めず、実際イソゾールを中止しようとしている。その後1月23日に CT で右脳半球に明らかな浮腫を認めている。しかし、実際 cytochrome c を測定出来ているのは20日までであり、その後の推移がわから

ない。本班会議でも福島医科大学細矢先生らの報告によると血中の cytochrome c の上昇は入院中それほどでもないが(1 ng/ml 前後)数日後髄液中の cytochrome c のみが高値を示している報告がある(平成14年第一回班会議にて発表)。今回の報告症例も髄液での cytochrome c の測定が必要だったのかもしれない。同時に、cytochrome c がどの臓器で産生されているのか知るうえでも貴重な症例になるだろうし、髄液での cytochrome c 検査が重要であることを教えてくれる症例だったかも知れない。

E. 結論

インフルエンザ脳症患者でも種々の経過を示すことが示された。統計的に見ると血中 cytochrome c 測定はよくその重症度を反映しているが、今回示したような症例の場合、過小に評価する可能性がある。現在低酸素性虚血性脳症ラットモデルと用いた実験を行っているが、髄液での cytochrome c 測定がよくその病状と相関している。血中のみならず髄液中の測定が重要であることが示唆された。

参考文献

1. 布井博幸、水上智之、レジナ・マルカド、三淵浩、西原重剛、後藤善隆、緒方敬之、森島恒雄、中山慎一、森信二、坂田宏、森裕美、真鍋孝治、足立尚登、遠藤文夫、渡辺啓祐：インフルエンザ感染症における重症度判定のためのマーカーの検討：小児感染症 13：225-232、2001

F. 研究発表

A) 学会発表

B) 発表誌名巻号・頁・発行年

1. Yoshikazu Sugimoto, Satomi Tsukahara, Shigeo Sato, Mutsumi Suzuki, hiroyuki Nunoi, Harry L. Malech, Michael M. Gottesman, and Takhashi Tsuruo. Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 *in vivo* from an *MDR1*-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91. *J Gene Med*. In Press (2003).
2. 布井博幸、林摩耶、早見典子、原田優、林幹夫、広瀬真次、松本栄悠、水間洋、日高文郎、外山誠也、水上智之 小児免疫不全 臨床と研究 79：1404-1410,2002
3. Kuribayashi F, Nunoi H, Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, Sumimoto H. The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J*. 21:6312-20 (2002).

急性脳症患者血清および髄液中のサイトカイン、チトクロームC濃度の検討

研究協力者 細矢 光亮 福島県立医科大学医学部小児科学講座講師

研究要旨 急性脳症の急性期およびその経過中に採取した血液・髄液を検体とし、炎症のマーカーとしてサイトカイン濃度を、アポトーシスのマーカーとしてチトクロームC濃度を測定した。その結果、サイトカイン濃度、チトクロームC濃度ともに、髄液よりも血液中で高値であった。従って、急性脳症の病態には、血管内の炎症やアポトーシスが関与しているものと考えられた。

A. 研究目的

急性脳症の急性期およびその経過中に採取した血液・髄液を検体とし、炎症のマーカーとしてサイトカイン濃度を、アポトーシスのマーカーとしてチトクロームC濃度を測定して、急性脳症の病態解明の一助とすることを目的とした。

B. 研究方法

福島県内の医療機関において診断された急性脳症 13 例（死亡 9 例、後遺症 4 例）において、急性期および経過中に採取した血液・髄液を検体とした。サイトカイン（TNF- α 、IL-6）は、ENDOGEN 社の ELISA キットを用いて測定した。チトクロームCは、布井（宮崎医科大学小児科）らの方法により、エーザイ株式会社、診断薬部開発室において測定した。

C. 研究結果

1. サイトカイン（TNF- α 、IL-6）、チトクロームC濃度は、髄液よりも血液中で高値であった（図1）。
2. 血液中で、まず TNF- α 、IL-6 等のサイトカイン濃度が上昇し、次いでチトクロームC濃度、細胞逸脱酵素が上昇した（図2-5）。
3. 画像上、徐々に脳浮腫が明瞭となり、最終的に脳萎縮を残した 2 例において、神経症状の増悪に一致して、髄液中のチトクロームC濃度が上昇した（図6,7）。
4. 髄液中蛋白濃度（漏出）とチトクロームC濃度（アポトーシス）との間には、関連はみられなかった（図8）。

D. 考案

1. 急性脳症の発症には、血管内の炎症が関与し、血管障害により血漿の漏出や灌流障害をきたすと考えられた。
2. 急性期血清中のチトクロームC濃度が高値であ

ることから、脳症の病態形成にアポトーシスが関与していると思われた。

3. 遅発性に進行する神経症状、脳萎縮には、神経組織のアポトーシスが関与すると考えられた。

E. 結論

急性脳症の病態形成には、血管内の炎症やアポトーシスが関与していると考えられた。また、遅発性に進行する脳萎縮には、神経組織のアポトーシスが関与していると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

細矢光亮、森田浩之、川崎幸彦、片寄雅彦、佐久間弘子、渡部雅勝、鈴木 仁：急性脳症の予後予測因子の検討。第34回日本小児感染症学会、札幌、2002年11月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1 Comparison of cytokine and cytochrome C levels between in serum and in CSF

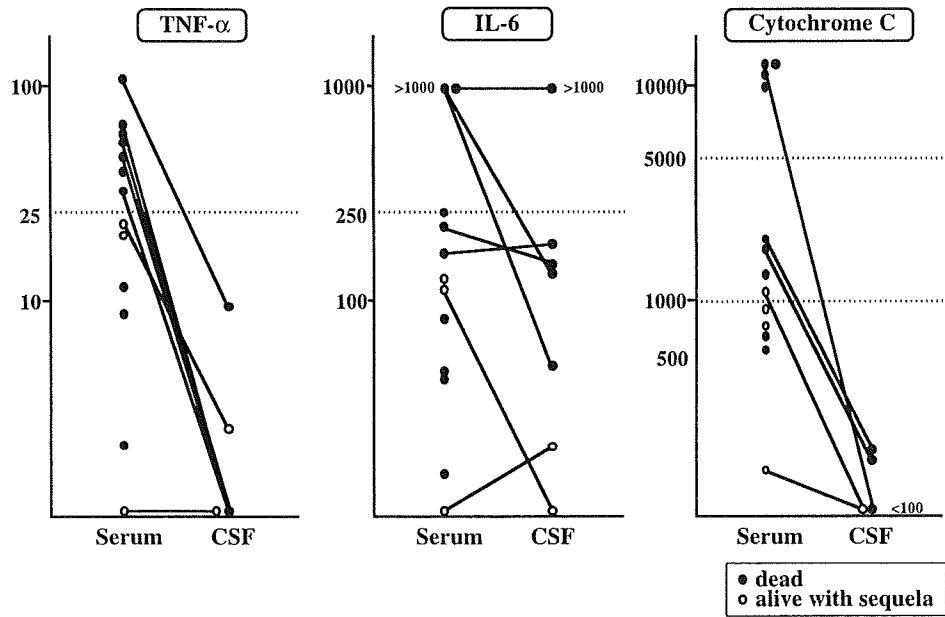


図 2 TNF- α and cytochrome C levels in serum of patients with acute encephalopathy at onset

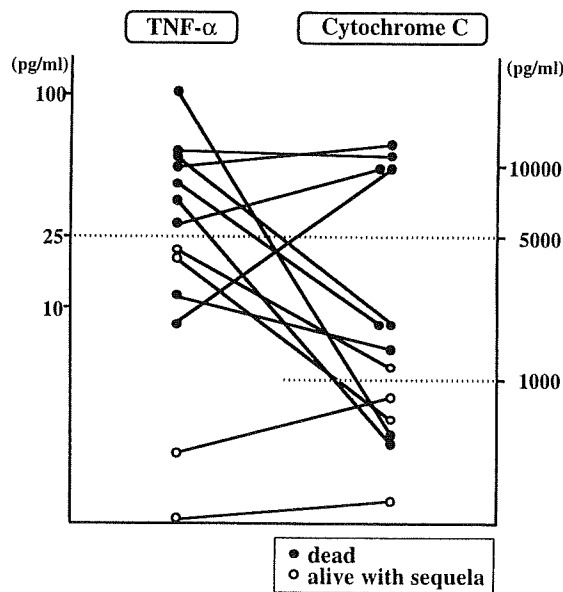


図 3 Case 1 Influenza encephalopathy (7Y, F)

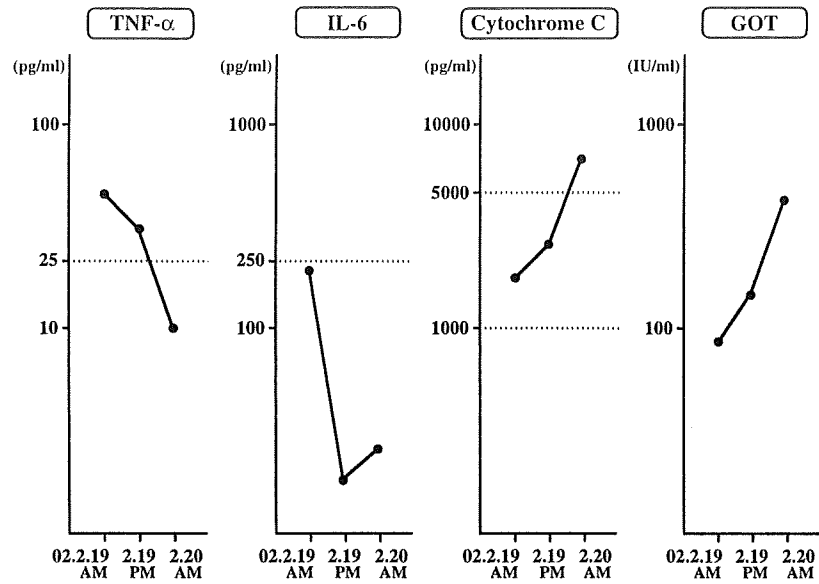


図 4 Case 2 Acute encephalopathy (2Y, M)

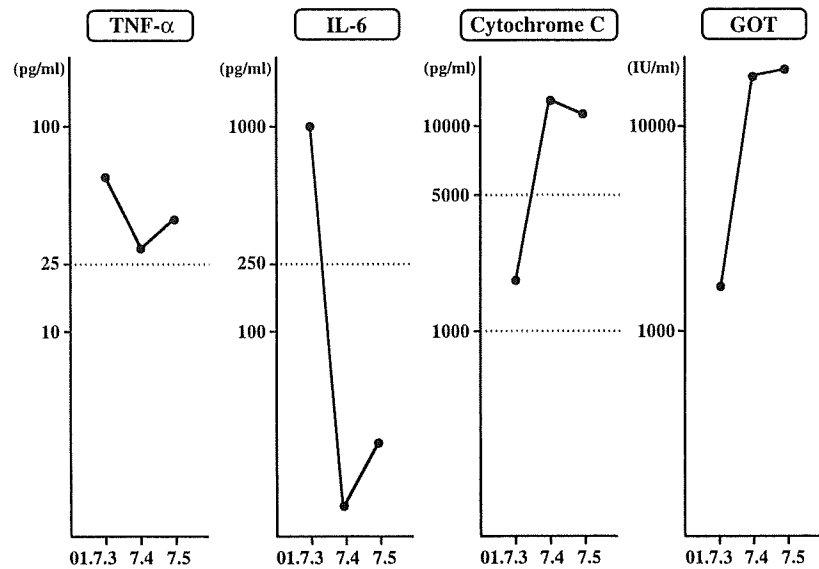
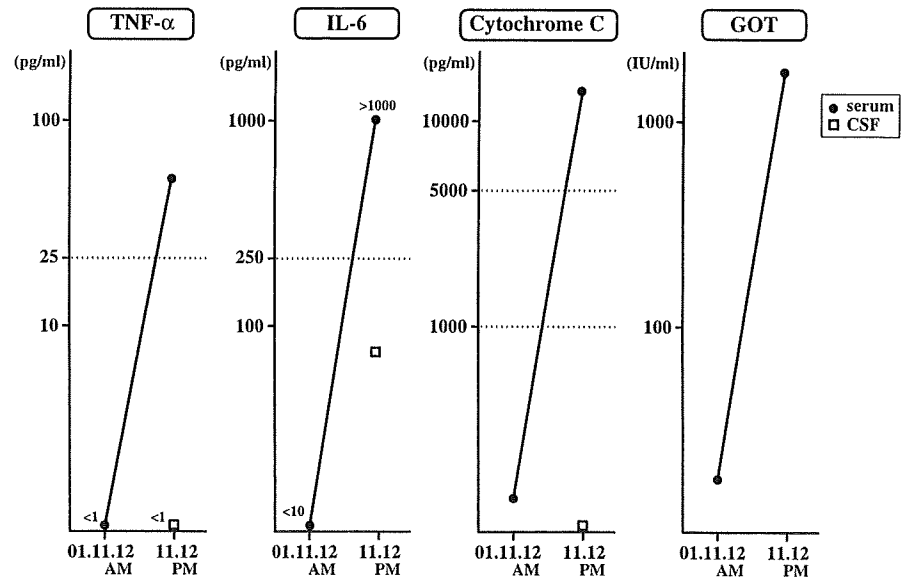


図 5 Case 3 Acute encephalopathy (7Y, F)



CSF : cell 26/3 μ l, Pro 545 mg/dl, Glu 110 mg/dl

图 6

Case 4 Influenza encephalopathy (1Y10M, F)

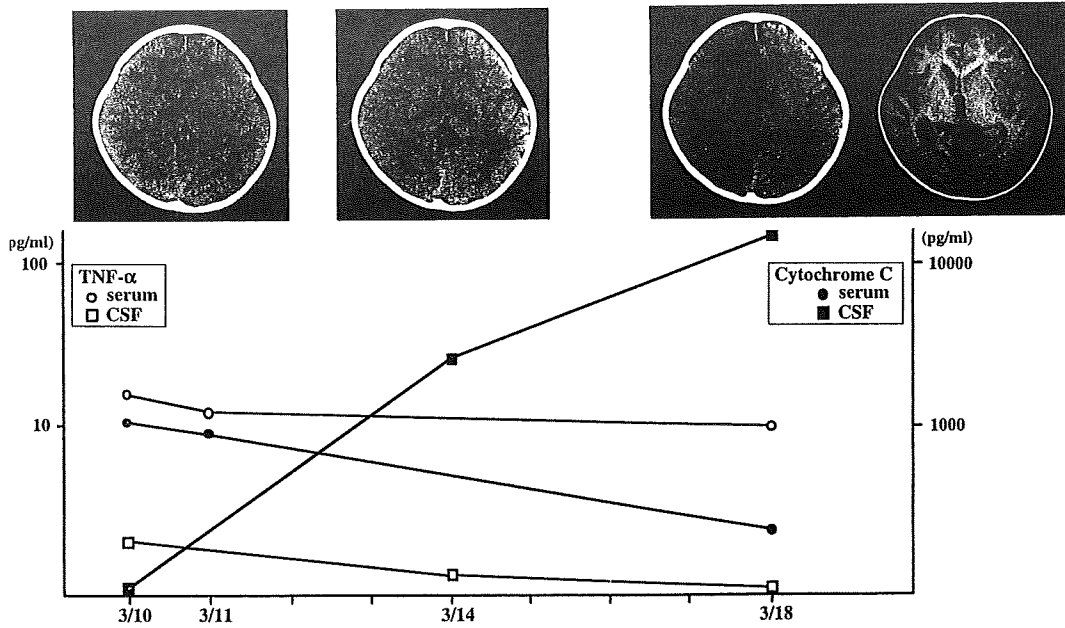


图 7

Case 5 HHV-6 encephalopathy (9M, F)

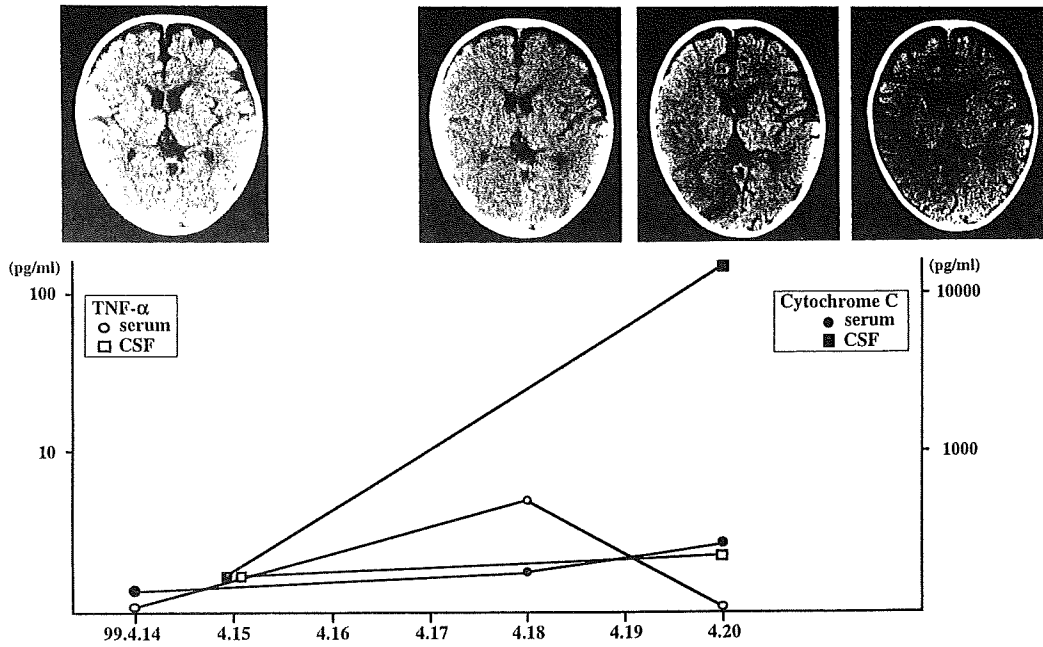
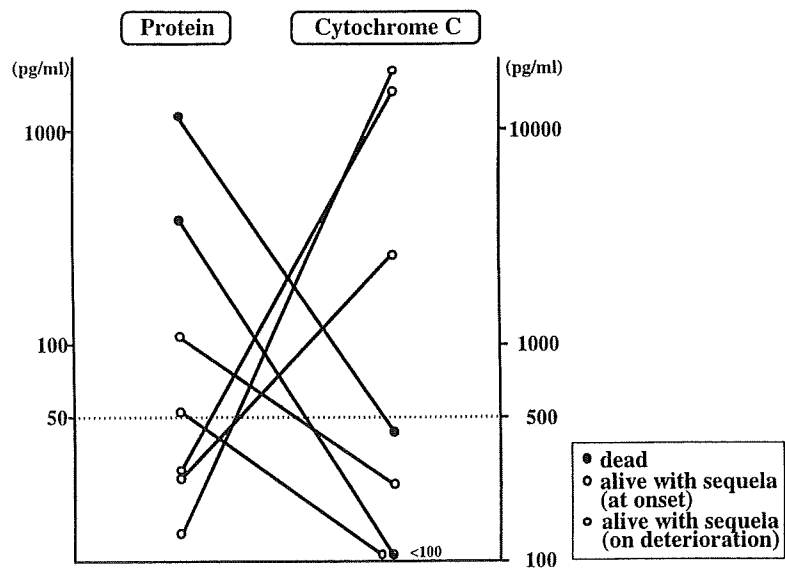


图 8

Comparison between protein and cytochrome C levels in CSF



インフルエンザ脳症に関する研究

研究協力者 河島尚志 東京医科大学小児科 講師

研究要旨 インフルエンザ脳症患者 3 例の肝組織学的に検討し、インフルエンザ脳症では mitochondria の機能の破綻が病態の一つに関与している可能性が示唆された。さらに、HSES と診断された 2 症例において肝細胞に Heat Shock Protein (HSP60) が他の肝疾患に比べ肝細胞に著明に発現していた。また、臨床的には同疾患にステロイドパルス療法中に脳波上改善が認められること、予後不良群で早期のバイクルサインに差を認めた。

ついで、インフルエンザ脳症においてフリーラジカルである一酸化窒素 (NO) が病態に関与しているか、②血管内皮細胞はインフルエンザ感染により NO を産生するか、について調査ならびに検討を行った。結果①インフルエンザ脳症において血清中ならびに髄液中 NOx の高値例が多いことが知れ、特に死亡症例の 5 例中 4 例に髄液中の NOx の高値を確認した。さらに②血管内皮細胞のインフルエンザ感染実験において細胞内の mRNA レベルで thrombomodulin ならびに heat shock protein の発現を、上清中に NOx が産生されること確認した。

A. 研究目的

- ①肝病理所見の検討からインフルエンザ脳症の病態解明を試みる。
- ②予後不良の早期パラメータとステロイドパルス療法の効果の検討を行う。
- ③インフルエンザ脳症患者で一酸化窒素 (NO) が病態に関与しているかを調査した。これはインフルエンザ脳症において高サイトカイン血症がしばしば認められ、その病態の中心であることが想定されている。高サイトカイン血症は細胞質内の NK- κ B を介して iNOS の転写亢進に働き、NO の産生に働く。ショック状態では、NO は酸素と結合し、ONOO⁻ (パーオキシナイトライト) となり、細胞組織レベルにおいて DNA 鎖切断がおこり、これにより核蛋白のリポシル化と NAD や ATP の減少がおこり、細胞死が起き、循環障害や細胞破壊がおこるとされている。このため、インフルエンザ脳症での最終的な細胞ならびに組織破壊に NO が関与していることが推察される。
- ④血管内皮細胞においてインフルエンザ感染後、実際に各種のサイトカインを発現するのを知ることは重要な問題であり、さらに血管内皮細胞の障害が凝固系への影響を及ぼしていないかを検討した。同時に mitochondria にある DNA の修復に働く分子シャペロンである heat shock protein (HSP) 60 の発現も検討した。

B. 研究方法

- ①HE 染色ならびに電子顕微鏡写真にて肝臓を組織学的に検討した。さらに HSP60 抗体を用いた免疫染色を行い、他の肝疾患と比較した。

- ②ステロイドパルス療法中の脳波の検討並びに予後不良患者のバイクルサイン上での早期のパラメータを検討した。

- ③NO の測定は血清 100 μ L 中の NO₂ と NO₃ の値を HPLC-UV system を用いて Griess 法により測定した。対照はインフルエンザ脳症、インフルエンザに伴う熱性痙攣、インフルエンザ肺炎、インフルエンザ単独、高サイトカイン血症として、化膿性髄膜炎、インフルエンザが原因以外の脳炎、脳症とした。髄液では対照として尿路感染症、ムンプス髄膜炎などを用いた。

- ④血管内皮細胞の感染は VE cell にインフルエンザウイルスを感染させ、RNA 抽出後に messenger level で測定した。housekeeping gene には β -actin を用いた。HSP 60 と thrombomodulin は泳動後に画像処理で取り込みを行い定量し測定した。

C. 研究結果

- ①肝生検は 3 例とも家族の同意の元に死亡直後速やかに行った。HSES の 2 症例では肝細胞の massive necrosis を認めた。肝細胞の細胞質はやや淡明化していた。また類洞に炎症性細胞浸潤はなかった。電顕では明瞭に mitochondria の腫大と変形を認め、cristae は崩壊し、matrix は lucent となり dense bodies も消失していた。炎症性細胞の浸潤は認めなかった。2 症例ともにウイルス粒子は認められなかった。臨床的に Reye 症候群と診断された症例は HE 染色で、部分的に肝細胞内泡沫状の空胞形成が認められ、脂肪滴と推察された。一方、免疫染色では HSP 60 が HSES とされた 2 症例において肝細胞が著明に染まった。(表 1)

②ステロイドパルス療法中に脳波上の改善を認めることを確認した。また、予後不良患者（死亡患者）と軽症患者とバイタルサインにおいて頻脈と体温に明らかな差を認めた。（図 1）

③インフルエンザ感染症のなかで、インフルエンザ脳症において血清中 NO₂ 並びに NO₃ の高値例が多いことが知れた（図 2, 3）。一方、インフルエンザ単独や熱性痙攣合併例、化膿性髄膜炎では高値を示さなかった。また、髄液では対照に比べ優位に高値を示し、特に死亡例では 5 例中 4 例が高値を示した（図 4, 表 2）。

④血管内皮細胞のインフルエンザ感染実験において thrombomodulin ならびに HSP60 の発現を確認できた。thrombomodulin の産生は感染後 3 時間をピークに認めた。一方、HSP60 は 48 時間をピークに発現した。また、上清中に NO_x が 3 時間をピークに産生された。（図 5, 6）

D. 考察

インフルエンザ脳症の病態解明のため肝組織の病理像を検討した。インフルエンザ脳症には Reye 症候群、出血性ショック脳症症候群、急性壊死性脳症を含むとされている。今回検討の 2 例は発熱後 24 時間以内に意識障害を認め、その後の臨床経過や検査結果は酷似しており、HSES に一致していた。これら 2 症例の肝組織所見は広範囲の necrosis を認め、電顕では mitochondria の膨大と cristae の消失を認めた。一方、臨床的 Reye 症候群と診断された症例では、脂肪変性を認め Reye 症候群の光顕像に一致した。これらの結果より mitochondria の変化がインフルエンザ脳症の病態の一つである可能性が示唆された。

臨床的にはステロイドパルス療法が一定の効果を認める可能性が示唆された。さらに、初診時の脈拍 180 /分以上、40.5℃以上が予後不良であり、SIRS の病態を早期に見極めることで集学的治療を早期に開始できると考えられた。

インフルエンザ脳症において NO₂ ないし NO₃ が高値である事が知れた。インフルエンザ脳症において病理学的に血管内皮細胞の障害（透過性亢進）が示されており、これらの脳炎・脳症の病態が共通の経路により脳障害がおきている可能性が示唆された。このことは NO 阻害剤の治療的可能性を示唆した。

インフルエンザの血管内皮細胞の感染では thrombomodulin が産生され、HSP60 は分子シャペロンであるが、thrombomodulin の発現より遅れて発現した。脳症の凝固異常は血管内皮細胞の感染が起点になる可能性が考えられた。

E. 結論

インフルエンザ脳症において血管内皮細胞におけるイ

ンフルエンザの直接感染が thrombomodulin などに影響し、血管内皮細胞の障害が起こり、サイトカイン系が活性化し、最終的に NO を介した組織障害が進んでいくという経路が病態の一つとして推察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ①河島尚志, 柏木保代, 芹沢博美, 武隈孝治, 星加明德. インフルエンザ流行中の急死例における肝病理所見. 小児感染免疫 12 : 185-190, 1999
- ②河島尚志, 山田直人, 上島肇, 柏木保代, 武隈孝治, 星加明德. インフルエンザ脳症におけるステロイドパルス療法の効果. 東京医大雑誌 59:149-153, 2001
- ③武隈孝治, 河島尚志, 柏木保代, 久保島慎二, 芹沢博美, 西亦繁雄, 宮島祐, 山田直人. インフルエンザ流行中の死亡症例の検討. 日本医事新報. 4051 : 25-32, 2001
- ④河島尚志, 長谷川友香, 松浦恵子, 柏木保代, 山田直人, 武隈孝治, 星加明德. インフルエンザ脳症の臨床と治療. 小児感染免疫 13 : 359-366, 2001
- ⑤河島尚志, 西亦繁雄, 久保嶋慎二, 柏木保代, 武隈孝治, 星加明德. インフルエンザ流行中の急死症例の肝病理所見. Minophagen Medical Review 46 : 101-107, 2001
- ⑥河島尚志, 五百井寛明. インフルエンザ脳炎・脳症の現況. 小児内科 34(10) : 1495-1498, 2002
- ⑦河島尚志. インフルエンザ脳炎・脳症. メディカル・ダイジェスト放送内容集「インフルエンザ感染対策シリーズ④」2001/12/17 放送 2002
- ⑧ Hisashi Kawashima, Yasuo Watanabe, Takashi Ichiyama, Masashi Mizuguchi, Naoto Yamada, Yasuyo Kashiwagi, Kouji Takekuma¹, Akinori Hoshika¹, Takayuki Mori. High concentration of serum NO_x (nitrite/nitrate) obtained from patients with influenza virus-associated encephalopathy. Pediatr International 44(6) : 705-707, 2002
- ⑨河島尚志, 長谷川友香, 松浦恵子, 柏木保代, 山田直人, 武隈孝治, 星加明德. インフルエンザ脳炎・脳症の臨床と治療. 小児科臨床 55(5) : 771-779, 2002
- ⑩河島尚志. 感染と宿主免疫の異常-インフルエンザ脳症. 小児感染免疫 15, 2003(in press)

2. 学会発表

- ①インフルエンザ脳炎・脳症 3 例の肝組織における HSP の発現. 第 104 回日本小児科学会総会 2001 年 5 月
- ②インフルエンザ脳炎・脳症の臨床. 第 33 回日本小児感染症学会(宇部) 2001 年 11 月 23 日
- ③インフルエンザ脳炎・脳症. メディカル・ダイジェスト. ラジオ短波 2001 年 12 月 17 日

- ④シンポジウムー感染と宿主免疫の異常ーインフルエンザ脳症. 第34回日本小児感染症学会(札幌)2002年11月
- ⑤最近経験したウイルス性疾患-インフルエンザ脳症を中心として. 江戸川医師会講演(東京)2002年11月
- ⑥インフルエンザ脳炎・脳症について.板橋区医師会学術講演会(東京)2003年1月22日

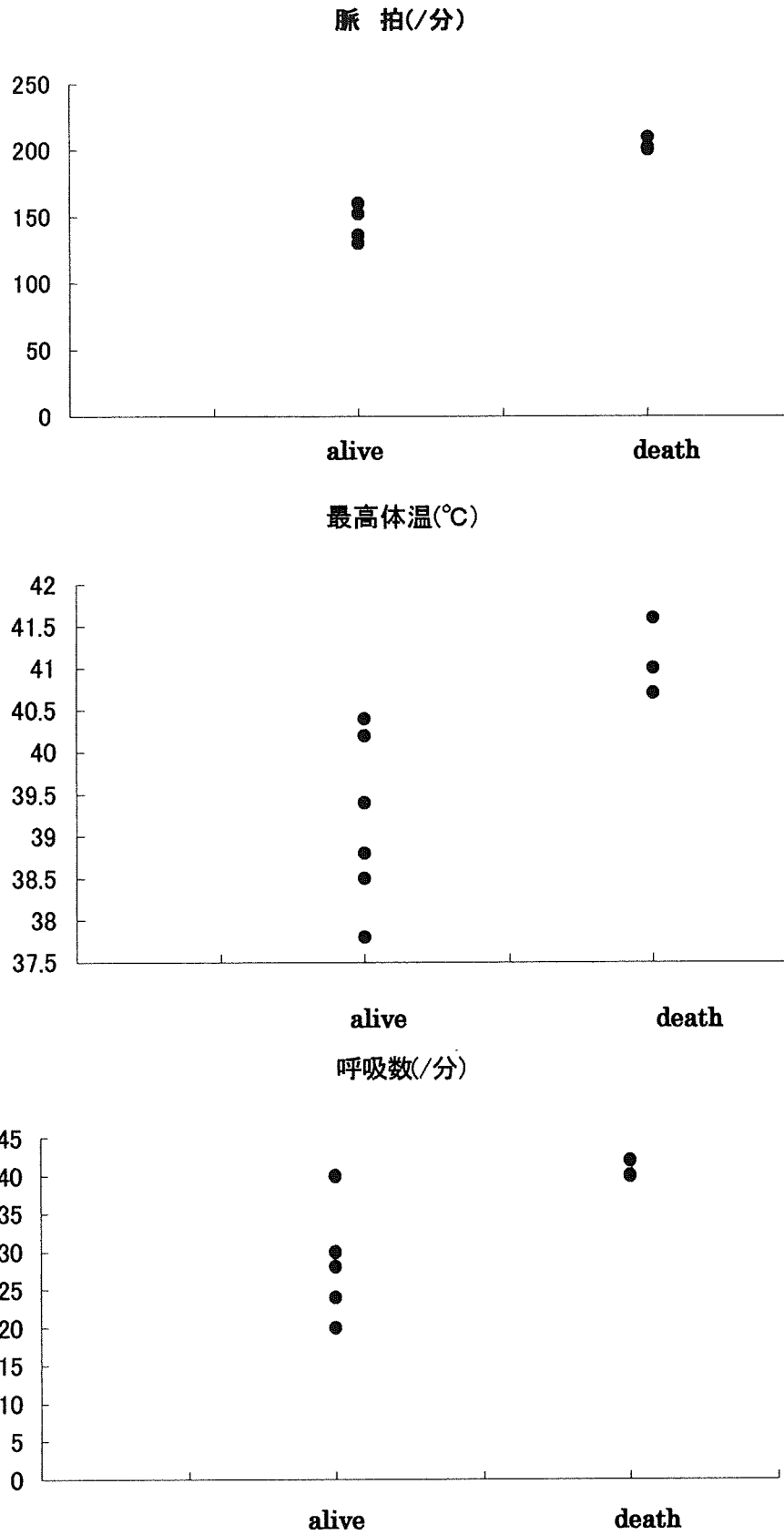


Figure1: Vial signs in influenza-associated encephalopathy

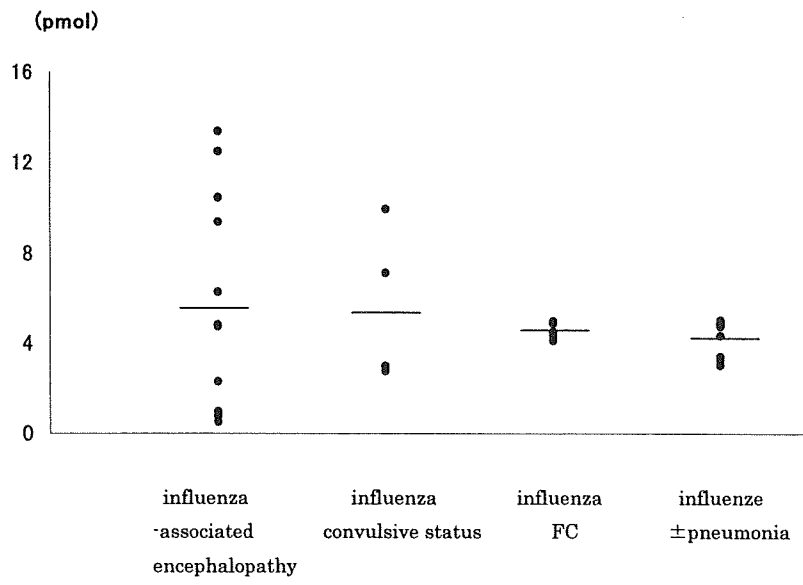


Figure 2: NO₂ levels of serum obtained from patients with influenza infections
 The levels of serum obtained from 5 patients with purulent meningitis were all less than 7.849 pmol.

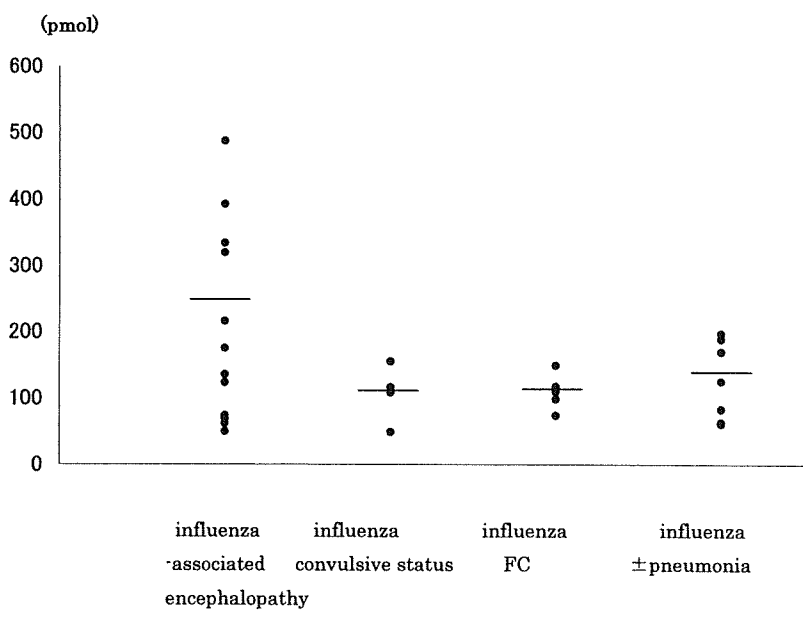
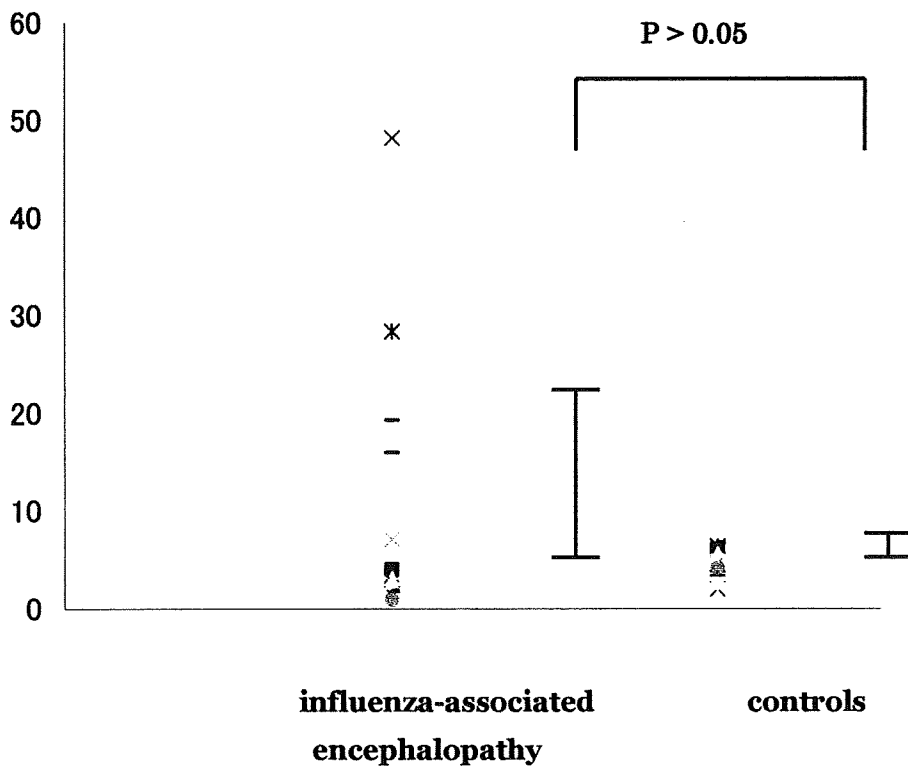


Figure 3: NO₃ levels of serum obtained from patients with influenza infections
 The levels of serum obtained from 5 patients with purulent meningitis were all less than 178.9 pmol.

NO₂(pmol) in CSF from patients



NO₃(pmol) in CSF from patients

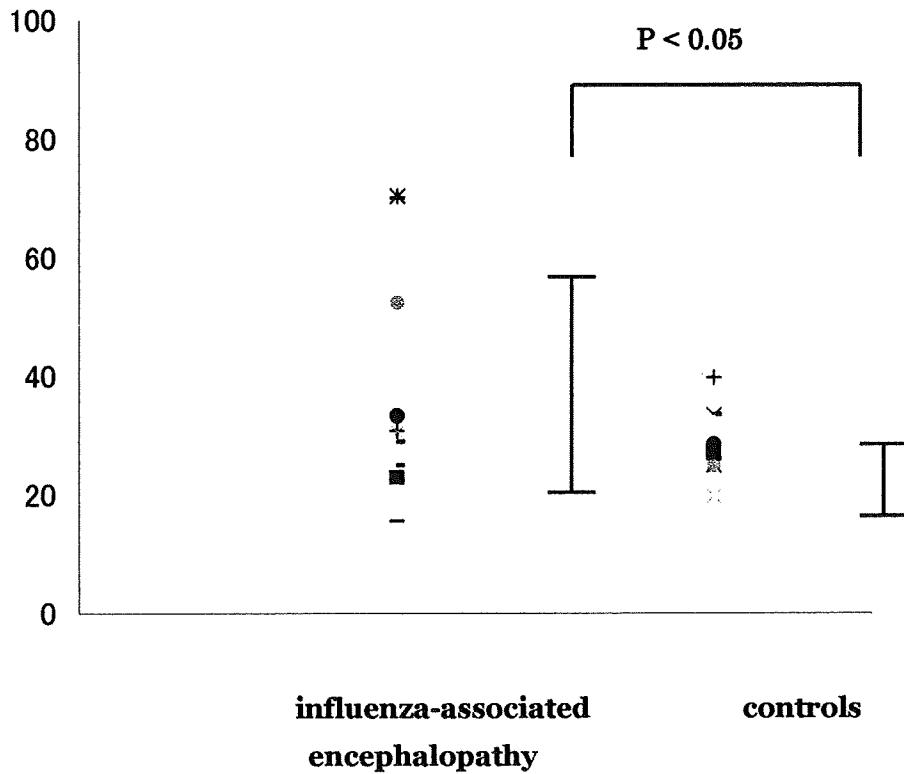


Figure 4: NO₂ and NO₃ in CSF obtained from influenza-associated encephalopathy and control