

図1 マイクロアレイ法の原理—その1

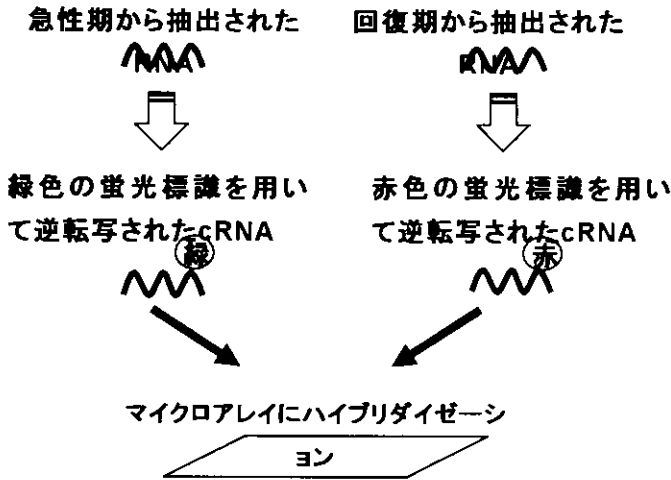
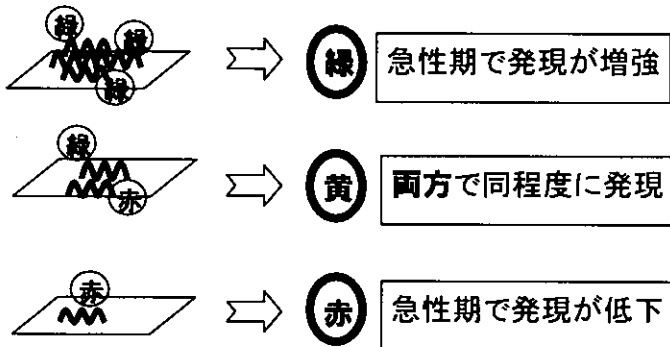
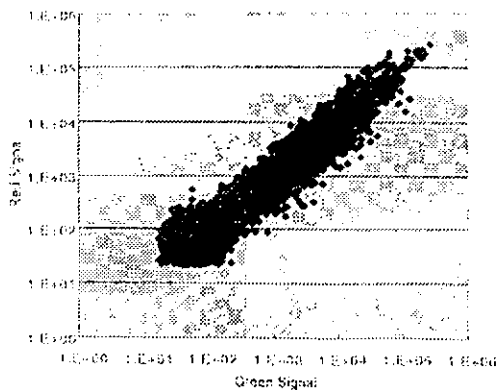


図2 マイクロアレイ法の原理—その2



共焦点スキャナーでスキャン

図3 マイクロアレイ法によるインフルエンザ患者末梢血の網羅的遺伝子発現



分子モニタリングによるインフルエンザ脳症起因物質に関する研究

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での髄液中のアミノ酸の検討を行ったところ、Glu、Gln の値で、他の化膿性やウイルス性髄膜炎に見られないパターンを示し、Glu-Gln cycle の活性化がおきていることが推測された。ついで、脳症起因物質ないし、インフルエンザ脳症特異物質の同定のため、低分子有機化合物をメタボロミックスにて特異物質の検出を試みた。その結果、インフルエンザ脳症患者共通の髄液特異物質として、分子量 168~784 の 16 種類の物質が検出された。また、死亡例にのみ検出される物質が 3 種類見出され、一部のものは pyrolidine 誘導体、Methylpropylamide 誘導体と考えられた。

A. 研究目的

インフルエンザワクチンの定期接種中止後、本邦において小児を中心にインフルエンザ脳症が多発してきており、可及的速やかにこのインフルエンザ脳症の病態解明と治療法の開発が必要とされている。しかし、他の脳炎と異なり、ウイルス自体は脳の局所には浸潤していないことが確認されており、詳細な病態は不明である。近年の研究から種々のサイトカインが血清ならびに髄液で高値であることから、高サイトカイン血症がおきていることが確認され、また、血球貪食細胞が組織に検出されることなどが知られてきている。そこで、サイトカイン産生に基づき、NO が直接的に脳組織の障害をもたらしていることが推測される。このことを確認するため脳症患者の検体を用い NOx の測定を行ったところ、脳症患者では血清中で NOx は高値をとり、NOx が上昇してくる例は全例死亡した。また、髄液中では急性期の検体で、対照群と比べ高値をとり、さらに死亡した 5 例中 4 例で著増していた。これらの結果から、NO が脳症の病態を形成していると考えられた。しかしながら、他のロタウイルスに伴う痙攣重責群において測定を行なったところ、インフルエンザ脳症と同様に高値例を多数認めた。しかしながら、これらのロタウイルス感染に伴う患児は全例後遺症なく軽快している。このことより、NO が単独でインフルエンザ脳症の脳障害をおこすとは考えにくい結果が得られた。そこで、今回は脳内の興奮性アミノ酸や抑制性アミノ酸が病態に関与している可能性を考え、髄液中のアミノ酸の検討を行った。さらに、その結果グリア細胞において Glu-Gln cycle の活性化がおきていることが考えられたため、グリア細胞を活性化する neurotransmitter を同定するため、

低分子有機化合物に注目し、メタボロミックスにて特異物質の検出を試みた。

B. 研究方法

研究対照に用いた検体は 1-9 歳の 22 例の脳症患者(死亡 5 例、後遺症 1 例、不明 1 例、後遺症なし 15 例)の髄液ないし血清であり、対象群は発熱性差、白血病、尿路感染症などで、PCR にてエンテロウイルスなど陰性であった髄液を用いた。また、無菌性髄膜炎はエンテロウイルスないしムンプス髄膜炎患者 20 例、化膿性髄膜炎患者 4 例においても同様にアミノ酸を検討した。

まず、Blood Brain Barrier が正常であるかを確認するため、血中と髄液中のアルブミンを latex immunoassay にて測定し、albumin ratio (CSF albumin/serum albumin) を計算した。

ついで、髄液中のアミノ酸は 7 種類のアミノ酸 (Asp, GLU, Gln, GLycine, taurine, alanine, GABA) を HPLC にて測定した。有意差検定は Fisher の protected least Significant difference により行った。さらに、脳症患者 3 例において、サンプルをイオン化し、FT-MS にてスペクトログラムを作成し、正確な質量を測定し、各元素の正確な分子量を元に、可能性のある分子式を計算し、物質同定を行った。

C. 研究結果

6 例のインフルエンザ脳症患者の髄液中の albumin 濃度は 62 から 154 mg/l であり、albumin ratio は正常であった。このため、インフルエンザ脳症では BBB は少なくとも発症早期は正常であると考えられた。

一方、アミノ酸の動きは、興奮性アミノ酸の Glutamin が有意な高値を、Glutamate が有意な低値を示した。これは無菌性髄膜炎や化膿性髄膜炎をまったく異なった動きを示した (Figure 1A,B)。また、抑制性アミノ酸の GABA は 21 例中 2 例で検出された (Table1)。

メタボロミックスではインフルエンザ脳症患者 3 例に共通の髄液特異物質として、分子量 168~784 の 16 種類の物質が検出できた。また、死亡例にのみ検出される物質が 3 種類見出された。分子量から推定されるものとして一部のものは pyrrolidine 誘導体、Methylpropylamide 誘導体と考えられた。(figure2)

D. 考察

髄液中のアミノ酸の研究では、化膿性髄膜炎や Reye 症候群などの肝性脳症において報告されており、Glutamate が上昇し、脳組織に障害を与えることが言われている。また、低酸素性脳症においても Glutamate が障害の病態と考えられている。インフルエンザ脳症においてはまったく別のパターンをとっており、glutamate は低下し、glutamine が高値を示した。脳内において glutamate-glutamine はニューロンとグリア細胞間で cycle が行われている。このことから、インフルエンザ脳症においてはグリア細胞の吸収が活性化し、glutamate を吸収していることが推察される。近年アルツハイマー病においても同様にグリア細胞が活性化し、glutamate が枯渇することが病態と考えられている。これらことから、また、病理学的にもグリア細胞の変化がおきていることから、インフルエンザ脳症においてはグリア細胞の異常な活性化がひとつの病態と考えられる。グリア細胞の活性化をおこしている物質は ATP などが推測されるが、物質の同定のために、網羅的に低分子有機物質のスクリーニングを行った。今回 3 例の患者の検討において、16 種類に物質が検出されたが、物質に同定には検体数ならびに量を増やす必要があり、これらにより病態との関連がより明確になると考える。

E. 結論

昨年までの研究結果によりインフルエンザ脳症において血清中ならびに髄液中 NO_x の高値例が多く、特に死亡症例のほとんどが、髄液中の NO_x の高値

であることが知れ、インフルエンザ脳症患者において、フリーラジカルである NO が病態に関与していることが確認できた。今回は NO の産生にアミノ酸の関与が大きく関わっていることから、髄液中のアミノ酸の定量を行ったところ、他の脳炎とはまったく異なるアミノ酸の動きを示し、これはインフルエンザ脳症においてグリア細胞の活性化がおきていると推測された。また、なんらかの脳症起因物質が低分子有機化合物のなかに存在することが考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

① H Kawashima, Y Watanabe, T Morishima, T Togashi, N Yamada, Y Kashiwagi, K Takekuma, A Hoshika, T Mori. Nox(Nitrite/Nitrate) in cerebral spinal fluids obtained from patients with influenza-associated encephalopathy. *Neuropediatrics*.34;137-40,2003

② 河島尚志,五百井寛明、山中岳、柏木保代、篠本雅人。インフルエンザおよびインフルエンザ脳症の治療の進歩。化学療法の実験 19:1555—61,2003

③ 河島尚志,渡邊泰雄、五百井寛明インフルエンザ脳症における一酸化窒素(NO)動態。小児内科 35:1734-8,2003

④ 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 15:19-24,2003

⑤ 河島尚志,五百井寛明、柏木保代、篠本雅人かぜ症候群、III かげの合併症 中枢神経。小児科診療 66:2223-8,2003

⑥ 中嶋光博、山名岳、篠本雅人、田口文士、新後関幸江、柏木保代、河島尚志、星加明德。ステロイドパルス療法と血漿交換療法で救命できたインフルエンザ脳症の 1 例。東医大誌 61:354-59,2003

2. 学会発表

①インフルエンザ脳症の起因物質とその分子モニタリング、河島尚志(第 8 回神経科学領域における分子モニタリング。2003 年 10 月)

② 河島尚志,五百井寛明、柏木保代、山田直人、篠本雅人。武隈孝治、星加明德、渡邊泰雄。イン

フルエンザ脳症における髄液中 NOx とアミノ酸の検討。(第 35 回日本小児感染症学会。2003 年 11 月)

③河島尚志、五百井寛明、柏木保代、山田直人、篠本雅人。武隈孝治、渡邊泰雄、インフルエンザ脳症における NOx 動態(第 106 回日本小児科学会学術集会。2003 年 4 月)

④平良良子、森美佳、塚本真貴子、有瀧健太郎、柏木保代、河島尚志、露木和光、星加明德。インフルエンザ脳症 10 例についての重症度別検討(第 8 回日本神経感染症学会 2003 年 10 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Figure 1A. Glutamin in CSF (mean \pm SD)

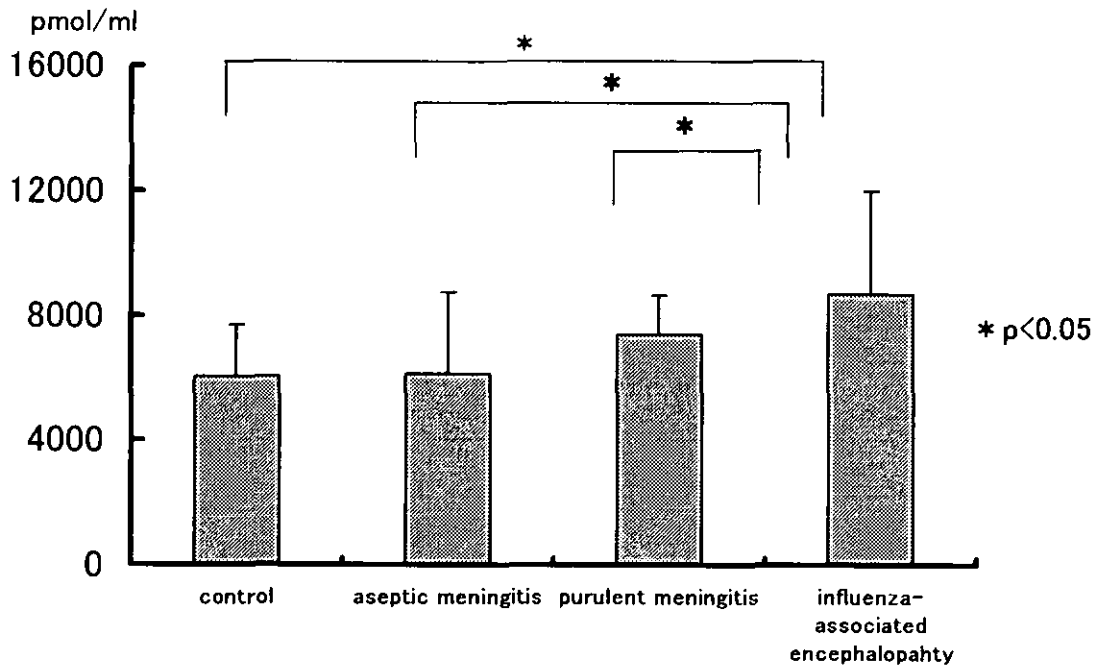
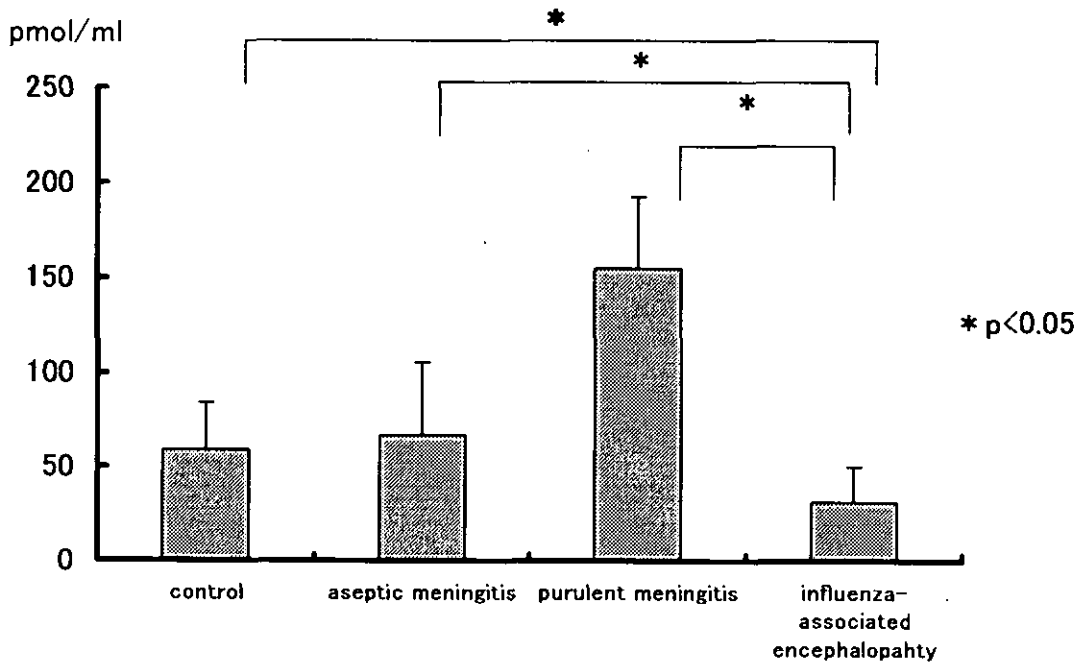


Figure 1B. glutamate in CSF (mean \pm SD)



脳内高サイトカイン状態が中枢神経・全身に及ぼす影響に関する研究 (モデル動物を用いた検討)

分担研究者 横田俊平 小林慈典 横浜市立大学医学部小児科学講座

研究要旨 乳幼児に発生するインフルエンザ脳症は症状の経過が急速で予後は不良であるが、病態メカニズムは不明な点が多い。しかし最近の症例の蓄積から脳内の炎症性サイトカインの異常増多が原因と推察されている。今回ラットの髄液中に LPS を投与し、中枢神経内に高サイトカイン状態を誘導し、それが中枢神経および全身に及ぼす影響を検討した。LPS 髄注により髄液中の炎症性サイトカインは上昇し、また高濃度の LPS では同時に血清中の炎症性サイトカインも上昇した。さらに組織学的検討では活性化 microglia およびアポトーシスが証明され、また LPS 髄注により静脈内に投与された FITC-DEXTRAN の脳組織内への漏出が認められた。以上のことより LPS 髄注による microglia の活性化により中枢神経内の高サイトカイン状態が誘導され、過剰な炎症性サイトカインは脳内のアポトーシス、ついで脳血管関門の破綻をきたし、全身性に高サイトカイン血症をきたすことが実験的に証明された。

A. 研究目的

冬季のインフルエンザ流行期に乳幼児を中心に、発熱から短期間で痙攣や意識障害などの神経症状を呈し、高頻度に死亡したり神経学的な後遺症を残すインフルエンザ脳症が発生している。予後が極めて不良で、症状の進行が急激であり、病態についても不明な点が多いため近年社会問題化している。死亡例の剖検所見では脳神経細胞障害が認められるが、脳実質の炎症所見は認められない。また髄液中の炎症性サイトカインの上昇を認めるが、脳内からウイルスが検出される例は例外的である。従ってインフルエンザ関連脳症における神経障害の直接の原因は、脳内の免疫系の過剰反応により生じる高サイトカイン状態が原因と推察される。今回実験動物を使用し、脳内の高サイトカイン状態が実際に誘導されるものなのか、また中枢神経の細胞に及ぼす影響、全身に及ぼす影響、などを検討した。

B. 研究方法

Wistar Rat ♀ 11~14 週齢の小脳延髄叢にインジェクションパイプを埋め込み、髄腔内に Lipopolysaccharide(LPS: E.coli O55B1)を 0,30,300 μ g 投与した。投与前、投与後 2,6,12,24 時間後に髄液、血清を採取し、ELISA 法にて IL-1 β 、IL-6、TNF α を測定し、サイトカインの発現の時間的経過を検討し、同時に脳組織から RNA を抽出し、Rnase Protection Assay (RPA: BD PharMingen®)を用い

て、サイトカイン mRNA、アポトーシス関連蛋白 mRNA の発現を検討した。次に組織切片を作成し、TUNEL 法を用いアポトーシスの検出、また NF- κ B の免疫染色および microglia の活性化マーカーである Griffonia simplicifolia isolectin B4 による染色を行った。さらに FITC-DEXTRAN を LPS 髄腔内投与と同時に静注し、脳内の高サイトカイン状態が脳血管関門に及ぼす影響について検討した。

C. 研究結果

LPS30,300 μ g 髄腔内投与群は 2 時間をピークに髄腔内 IL-6、は上昇し、その後低下した。血清では LPS300 μ g 髄腔内投与群は髄液中と同様に 2 時間をピークに上昇したが、LPS30 μ g 髄腔内投与群では上昇しなかった。また IL-1 β 、TNF α でも同様の傾向が見られた。脳組織では LPS 髄腔内投与後 30 分より IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF α の mRNA の発現が認められ、同時に Fas、Fas-L、bcl-2、caspase-1 などのアポトーシス誘導蛋白 mRNA の発現も認められた。

脳組織では LPS 投与により TUNEL 陽性細胞も認められ中枢神経内でのアポトーシスが証明された(図 1)。また LPS 髄腔内投与により脳組織内に NF- κ B 陽性細胞、Griffonia simplicifolia isolectin B4 陽性細胞が認められ、活性化細胞は脳内 microglia と推察された。

さらに LPS 髄腔内投与により FITC-DEXTRAN の脳実質内への漏出が認められ BBB の障害が証明

された。

D. 考察

Rat 髄腔内に LPS を投与することにより髄液中の IL-1 β 、IL-6、TNF α は上昇し中枢神経内で高サイトカイン状態が形成された。脳組織から抽出した RNA 中に炎症性サイトカイン mRNA が認められ、また脳組織内に NF- κ B 陽性細胞、Griffonia simplicifolia isolectin B4 陽性細胞が認められることより、炎症性サイトカインは脳内の microglia により産生されることが示唆された。

また LPS 髄腔内投与により脳組織内に Fas、Fas-L、bcl-2、caspase1 の発現が見られ、TUNEL 陽性細胞も認められたことより、炎症性サイトカインにより脳組織のアポトーシスが誘導されることが証明された。

さらに LPS 髄腔内投与により静脈血流中 FITC-DEXTRAN の中枢神経内への漏出が認められ、血清中のサイトカインの上昇が見られることより脳内の高サイトカインにより脳血管関門が破綻し、全身の高サイトカイン血症が起こる可能性が示された。

E. 結論

今回の動物実験より脳内の高サイトカイン状態を実験的に誘導可能であり、その産生細胞は microglia であることが証明された。また炎症性サイトカインにより中枢神経のアポトーシスが誘導され、さらに脳血管関門の障害により脳内の高サイトカインが全身に波及することが判明した。このことはインフルエンザ脳症においても未知の誘導因子が microglia を活性化すれば、脳内に高サイトカイン状態が出現しうることを示唆しており、その病態を説明できる。

F. 研究発表

論文発表

1. 横田俊平:インフルエンザ脳症.チャイルドヘルス 6:798-801,2003
2. 横田俊平:インフルエンザ脳症 病態と発症メカニズム.日本臨床 61:1953-1958,2003
3. 横田俊平, 河島尚志:インフルエンザの治療.医学のあゆみ 206:627-632,2003
4. 横田俊平:インフルエンザ関連脳症の発症機序

と対策.化学療法の領域 18:1773-1778,2002

5. 小林慈典, 河島尚志, 横田俊平:インフルエンザ脳症の特殊治療.小児内科 35 :1682-1685,2003

6. 小林慈典, 横田俊平:インフルエンザ脳症の発症機.小児内科 35:1673-1675,2003

学会発表

1. 小林慈典,横田俊平,他:ラット髄液内 LPS 投与による髄液内サイトカインの動向とアポトーシス誘導蛋白 mRNA の発現に関する検討.第 31 回日本免疫学会,2001.12,福岡

2. 小林慈典,横田俊平,他:インフルエンザ脳症モデル LPS による髄液中サイトカインと脳組織アポトーシス.第 105 回日本小児科学会,2002.4,名古屋

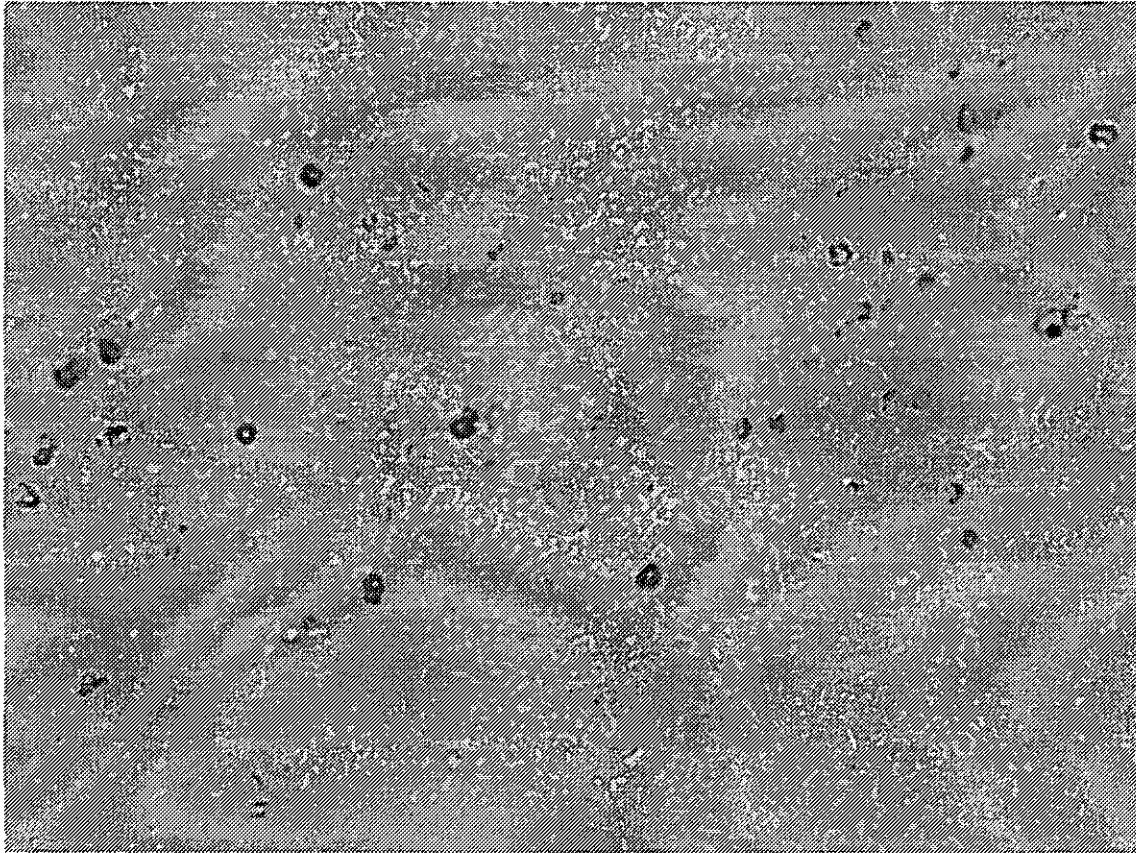


図 1 LPS 髄腔内投与により中枢神経内に TUNEL 陽性細胞が認められる。

サイトカイン値による脳症と熱せん妄との鑑別に関する研究

分担研究者 奥村彰久 名古屋大学大学院医学研究科小児科学 助手

研究要旨 我々は急性期のサイトカイン値と一過性の熱せん妄および脳症との関係を検討し、両者の鑑別に対する有用性を検討した。

発熱に伴う異常行動のために受診した 13 例について、IL-6・TNF α 値を測定した。7 例はインフルエンザ抗原陽性であった。このうち 9 例は脳症を伴わない熱せん妄、4 例は脳症と最終診断した。

脳波所見は、熱せん妄では全例で徐波の混入または軽度の徐波化であったのに対し、脳症群では全例で著明な高振幅徐波化を認めた。初回の頭部 CT は全例で異常を認めなかった。IL-6 値は熱せん妄では中央値 10.8 pg/ml(範囲 5.0-64.5 pg/ml)、脳症では中央値 719 pg/ml(範囲 38.4-31900 pg/ml)であり、脳症で有意に高値であった。TNF α は全例で 5pg/ml 未満であり、上昇を認めなかった。

急性期の IL-6 値は、発熱に伴う異常行動を来した患者において、一過性の熱せん妄と脳症の一症状としての異常行動との鑑別に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は、現在までインフルエンザ脳症の急性期に異常行動がみられることがあることに注目し、早期診断に役立てることができないか検討してきた。これまでの検討で、異常行動を認めた症例における脳症と脳症以外の熱せん妄との鑑別に、脳波が有用である可能性を示した。しかし、脳波は時間外などに施行することは必ずしも容易とは限らない。今回は、異常行動を認めた症例における脳症と脳症以外の熱せん妄との鑑別に、サイトカインの測定が有用であるかのパイロットスタディを行った。

B. 研究方法

1999/00、2000/01 の 2 流行シーズンにおいて、発熱に伴う異常行動を呈して入院した 13 例について調査した。インフルエンザの定義は、咽頭ぬぐい液の抗原検査にて陽性であったもの、またはペア抗体の測定にてインフルエンザ抗体が 4 倍以上上昇したものとした。脳波は、可能であれば異常行動中に記録し、困難な場合も可及的速やかに記録した。入院時に血清を採取し、IL-6・TNF α 値を測定した。対象とした 13 例のうち、9 例は脳症を伴わない熱せん妄(以下熱せん妄)、4 例は脳症と最終診断した。

C. 研究結果(表)

男女比 7:6 で、年齢は 1-14 歳(中央値 4 歳)であった。7 例はインフルエンザ抗原陽性であった。そのうち 6 例は A 型、1 例は B 型であった。
年齢・異常行動時の体温・けいれんの有無・最高 AST

値・最高 ALT 値・最高 LDH 値は熱せん妄と脳症との間で有意差を認めなかったが、最高 CK 値は脳症で中央値 939 IU/l(範囲 214-138021 IU/l)、熱せん妄で中央値 81 IU/l(範囲 42-392 IU/l)であり、脳症で有意に高値であった。

脳波所見は、熱せん妄では全例で徐波の混入または軽度の徐波化であったのに対し、脳症群では全例で著明な高振幅徐波化を認めた。初回の頭部 CT は全例で異常を認めなかった。

IL-6 値は熱せん妄では中央値 10.8 pg/ml(範囲 5.0-64.5 pg/ml)、脳症では中央値 719 pg/ml(範囲 38.4-31900 pg/ml)であり、脳症で有意に高値であった(表)。TNF α は全例で 5pg/ml 未満であり、上昇を認めなかった。

D. 考察

発熱に伴って異常行動を起こす「熱せん妄」が小児に多いことは、従来から知られている。発熱に伴う異常行動については現在まで十分な研究が行われていなかったが、インフルエンザ脳症の急性期に異常行動が起きることがあることが明らかとなり大きな注目を浴びている。インフルエンザ脳症の早期診断において、一過性の熱せん妄と脳症の一症状としての異常行動とを区別することは重要であるが、現時点では確実な方法は知られていない。

我々の脳波を用いた検討では、一過性の熱せん妄 15 例中 13 例で脳波変化を認めたがその程度は軽微であった。一般に、脳炎・脳症では著しい徐波化を呈することが知られており、脳波を用いて熱せん妄と脳症の一

症状としての異常行動とを客観的に鑑別することができる可能性があると思われる。

しかし、脳波を施行することは、特に時間外や夜間では容易でないことが多い。また、脳波判読には経験が要求されるため、脳波を記録するだけでは十分ではない。したがって、脳波以外にも一過性の熱せん妄と脳症の一症状としての異常行動とを鑑別する方法があることが望ましい。今回は、インフルエンザ以外による患者も含めて IL-6・TNF α 値を測定し、検討を試みた。その結果、IL-6 は脳症では熱せん妄に比べて有意に高値を呈し、一過性の熱せん妄と脳症の一症状としての異常行動との鑑別に有用である可能性が示唆された。今後、インフルエンザに伴って異常行動を起こした症例で同様の結果が得られるか、検討する必要がある。また、現時点では IL-6 は迅速測定が一般には行われておらず、測定法の開発も必要であると思われる。

E. 結論

インフルエンザに伴う異常行動では、IL-6 値が一過性の熱せん妄に比べて有意に高値であり、脳波と併せて鑑別に有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Okumura A, Takemoto T, Ozaki T. Serum beta 2-microglobulin and neopterin levels in children with febrile illness: their relation to influenza and febrile seizures. *Journal of Pediatric Neurology* 1: 35-38, 2003.
Okumura A, Uemura N, Suzuki M, Itomi K, Watanabe K. Unconsciousness and delirious behavior in children with febrile seizures. *Pediatric Neurology* in press.

奥村彰久. インフルエンザ脳炎・脳症の前駆症状としての異常行動と熱せん妄. *小児内科* 35: 1730-1733, 2003.

学会発表

奥村彰久、鈴木基正、植村直子、糸見和也、根来民子、渡辺一功. 熱性けいれんと異常行動および遷延性意識障害. 第 106 回日本小児科学会総会、福岡、2003.4.25.

奥村彰久、根来民子、福本由起子、樋口和郎、渡辺一功. インフルエンザに伴う異常行動の臨床的特徴. 第

45 回日本小児神経学会総会、福岡、2003.5.23.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表：結果のまとめ

症例 (歳)	性	年齢	診断	意識状態	けいれん	INF	抗原	脳波所見	AST (IU/l)	ALT (IU/l)	LDH (IU/l)	CK (IU/l)	IL-6 (pg/ml)	TNF α (pg/ml)
1	男	8	熱せんもう	傾眠	なし	陰性		徐波混入	17	18	133	42	16	<5
2	女	2	熱せんもう	傾眠	あり	A型		徐波混入	55	18	363	81	8	<5
3	男	5	熱せんもう	問題なし	なし	A型		徐波混入	30	13	217	52	5	<5
4	女	4	熱せんもう	問題なし	なし	陰性		徐波混入	30	10	219	45	6.4	<5
5	男	4	熱せんもう	傾眠	なし	陰性		徐波混入	29	12	259	96	9.3	<5
6	女	4	熱せんもう	問題なし	なし	A型		徐波混入	42	17	678	69	34.6	<5
7	男	4	熱せんもう	傾眠	あり	A型		徐波混入	32	14	265	214	64.5	<5
8	女	14	熱せんもう	傾眠	あり	B型		軽度徐波化	38	67	465	392	10.8	<5
9	男	8	熱せんもう	傾眠	あり	陰性		軽度徐波化	39	16	267	118	12.6	<5
10	男	1	急性脳症	傾眠	あり	A型		高振幅徐波	121	64	395	777	117	<5
11	女	3	急性脳症	III-200	あり	陰性		高振幅徐波	56	47	317	1101	1320	<5
12	女	9	急性脳症	III-300	あり	陰性		高振幅徐波	10020	5190	11890	138021	31900	ND
13	男	2	急性脳症	III-100	あり	A型		高振幅徐波	27	11	240	214	38.4	<5

INF:インフルエンザ、ND:施行せず

インフルエンザ脳症の血清及び髄液中サイトカインに関する研究

分担研究者 市山高志 山口大学医学部生殖・発達・感染医科学/小児科

研究要旨 インフルエンザ脳症(IE)30例、インフルエンザ関連熱性痙攣(IFS)20例、合併症のないインフルエンザ(Flu)39例の急性期における髄液中および血清中サイトカイン(IL-6、TNF- α 、soluble TNF receptor 1 (sTNFR1)、IL-10、interferon- γ 、IL-2、IL-4、soluble E-selectin (sE-selectin)を測定した。(1)血清中IL-6、sTNFR1、IL-10はIE予後不良群で、IE予後良好群、IFS、Fluに比し、有意に高値だった。特に死亡5例では血清中IL-6、sTNFR1、IL-10は著明な高値を示した。(2)髄液中IL-6はIE予後不良群で、IE予後良好群、IFSに比し、有意に高値だった。(3)IE5例、IFS6例、Flu9例の急性期における末梢血単核球中の炎症性サイトカインの転写因子であるNF- κ Bの活性化率はIE、IFS、Fluの順に高値の傾向を認めた。(1)~(3)よりインフルエンザ脳症の病型は一様でないため、まとめて病態を論じることはできないが、血清中IL-6、sTNFR1、IL-10、髄液中IL-6及び末梢血単核球のNF- κ B活性化率は重症度の指標になりうることを示唆された。

A.研究目的

インフルエンザ脳症(IE)の病態は未だ明らかではない。本症の免疫病態を検討するため血清中および髄液中サイトカインおよび末梢血単核球中の炎症性サイトカインの転写因子であるNF- κ Bの活性化率を測定した。

B.研究方法

対象は1995年1月~2003年3月までに山口大学医学部附属病院小児科及び8研究協力病院に入院したIE30例、山口大学医学部附属病院小児科を受診したインフルエンザ関連熱性痙攣(IFS)20例、合併症のないインフルエンザ39例を対象とした。患者の両親に研究の趣旨を説明し、同意を得て採取した血清および髄液を用いた。サイトカイン、可溶性サイトカイン受容体の測定はCytometric Bead Array(IL-6、TNF- α 、interferon- γ 、IL-2、IL-4、IL-10)、ELISAキット(sTNFR1はBender MedSystems社、sE-selectinはR&D Systems社)を使用して行った。末梢血単核球中のNF- κ Bの活性化率は活性化NF- κ B染色フローサイトメトリー法で測定した。

C.研究結果

血清中IL-6、sTNFR1、IL-10はIE予後不良群で、IE予後良好群、IFS、Fluに比し、有意に高値だった(図1)。特に死亡5例では血清中IL-6、sTNFR1、IL-10は著明な高値を示し、死亡例を除いたIE予後不良群に比しても有意に高値だった(IL-6: $16,343 \pm 18,194$ pg/ml vs. 71.9 ± 416 pg/ml, $p = 0.0041$, sTNFR1: 30.3 ± 19.3 ng/ml vs. 4.1 ± 6.2 ng/ml, $p = 0.0278$, IL-10: $754.0 \pm 1,960$ pg/ml vs. 30.9 ± 326

pg/ml, $p = 0.0093$)。血清中sE-selectinはIE予後不良群の一部の症例で高値だった。(2)髄液中IL-6はIE予後不良群で、IE予後良好群、IFSに比し、有意に高値だった(図2)。(3)IL-6については症例により血清と髄液の値で一定の傾向はなかった。sTNFR1、IL-10、TNF- α については髄液に比し、血清中で高値の症例がほとんどだった。(4)IE5例、IFS6例、Flu9例の急性期における末梢血単核球中の炎症性サイトカインの転写因子であるNF- κ Bの活性化率はIE、IFS、Fluの順に高値の傾向を認めた。特にIE予後不良群で高値だった(表1)。

D.考察

インフルエンザ脳症の病型は一様でないため、まとめて病態を論じることはできないが、予後不良例で血清IL-6、sTNFR1、IL-10及び髄液中IL-6が有意に高値であり、重症度の指標になりうる可能性が示唆された。血清と髄液の比較では、sTNFR1、IL-10、TNF- α については髄液に比し、血清中で高値の傾向にあったが、IL-6については一定の傾向はなく、病態の相違や採取時期の時間差の影響等が要因として考えられた。

IE例(特に予後不良例)では、IFS、Fluに比し、T細胞、単球ともNF- κ B活性化率が高値を示した。NF- κ B活性化はその細胞からの炎症性サイトカインの産生を意味するものであり、末梢血単核球でのサイトカイン産生が示唆された。

E.結論

IEでは血清中及び髄液中でサイトカインが産生され、血清中IL-6、sTNFR1、IL-10、髄液中IL-6及び末梢血単核球のNF- κ B活性化率は重症度の指標になりうる

ことが示唆された。

F.健康危機情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsubara T, Anwar R, Fujiwara M, Ichiyama T, Furukawa S. CTLA-4 (CD152) expression in peripheral blood T cells in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 169-173.
- 2) Ichiyama T, Isumi H, Ozawa H, Matsubara T, Morishima T, Furukawa S. Cerebrospinal fluid and serum levels of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptor in influenza virus-associated encephalopathy. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 59-61.
- 3) Hasegawa K, Ichiyama T, Isumi H, Nakata M, Sase M, Furukawa S. NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells in neonatal asphyxia. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 261-264.
- 4) Yoneshima Y, Ichiyama T, Ayukawa H, Matsubara, Furukawa S. Fosfomycin inhibits NF- κ B activation in U-937 and Jurkat cells. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 589-592.
- 5) Ichiyama T, Hasegawa S, Umeda M, Terai K, Matsubara T, Furukawa S. Pranlukast inhibits NF- κ B activation in human monocytes/macrophages and T cells. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 802-807.
- 6) Ichiyama T, Endo S, Kaneko M, Isumi H, Matsubara T, Furukawa S. Serum cytokine concentrations of influenza-associated acute necrotizing encephalopathy. *Pediatr Int* 2003; 45: 734-736.
- 7) Ichiyama T, Ueno Y, Isumi H, Niimi A, Matsubara T, Furukawa S. An immunoglobulin agent (IVIG) inhibits NF- κ B activation in cultured endothelial cells of coronary arteries *in vitro*. *Inflamm Res* in press
- 8) Ichiyama T, Ueno Y, Isumi H, Niimi A, Matsubara T, Furukawa S. Intravenous immunoglobulin inhibits NF- κ B activation and affects Fc γ receptor expression in monocytes/macrophages. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* in press

2. 学会発表

- 1) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、古川 漸. 細菌性および無菌性髄膜炎における髄液細胞での転写

因子NF- κ B活性化について. 第15回日本神経免疫学会. 長崎. 2003.3.12-14

- 2) 市山高志. 特別講演. 小児の急性脳炎・脳症、髄膜炎—インフルエンザ脳症を中心に—. 第33回中国・四国點頭てんかん研究会. 岡山. 2003.3.29

- 3) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、長谷川恵子、井上保、古川 漸. 敗血症における末梢血単核球のNF- κ B活性化について. 第106回日本小児科学会. 福岡. 2003.4.25-27

- 4) 市山高志. シンポジウム. テオフィリンによる転写因子NF- κ B活性化の抑制. 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会. 横浜. 2003.5.12-14

- 5) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、古川 漸. 亜急性硬化性全脳炎多発地域パプアニューギニアにおける急性麻疹の血清中サイトカイン—日本との比較—. 第45回日本小児神経学会. 福岡. 2003.5.22-24

- 6) 市山高志、伊住浩史、藤原元紀、松原知代、古川 漸. Fc γ 受容体発現に対するヒト免疫グロブリン製剤 (IVIG) の影響. 第23回日本川崎病研究会. 名古屋. 2003.9.26-27

- 7) 市山高志. シンポジウム. 喘息治療薬の抗炎症作用—NF- κ B活性化の抑制—. 第40回日本小児アレルギー学会. 岐阜. 2003.10.3-4

- 8) 市山高志. シンポジウム. 髄膜炎へのアプローチ. 第8回日本神経感染症学会. 宇部. 2003.10.10-11.

- 9) 市山高志. ワークショップ. 単純ヘルペス脳炎治療ガイドラインの作成に向けて. 第8回日本神経感染症学会. 宇部. 2003.10.10-11.

- 10) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、古川 漸. インフルエンザ脳症における血清および髄液中サイトカイン解析と末梢血単核球NF- κ B活性化の検討. 第35回日本小児感染症学会. 富山. 2003.11.7-8

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

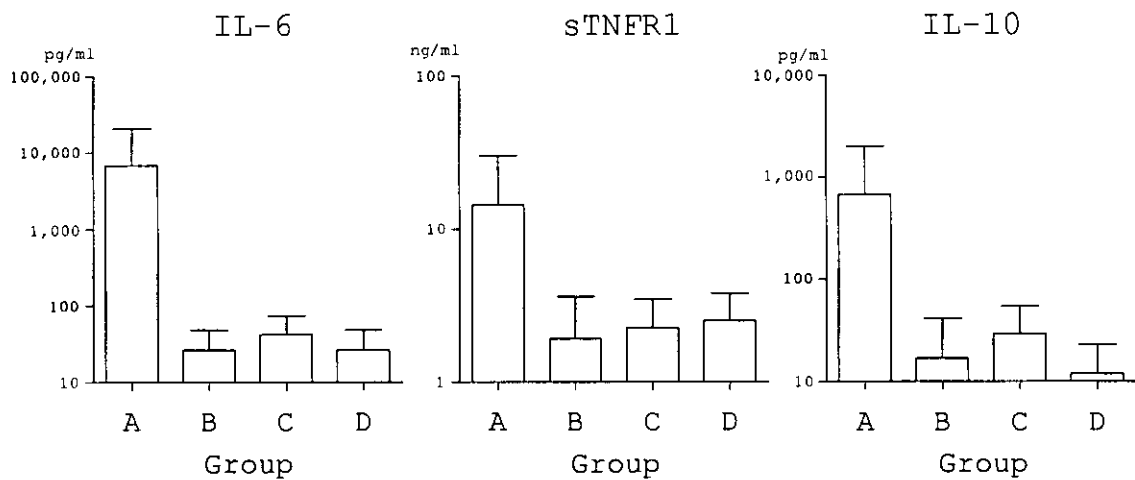


図 1. IE、IFS、Flu における血清中 IL-6、sTNFR1、IL-10 値。
 Group A : IE 予後不良群 (n=14)、Group B : IE 予後良好群 (n=14)、
 Group C : IFS (n=13)、Group D : Flu (n=39)

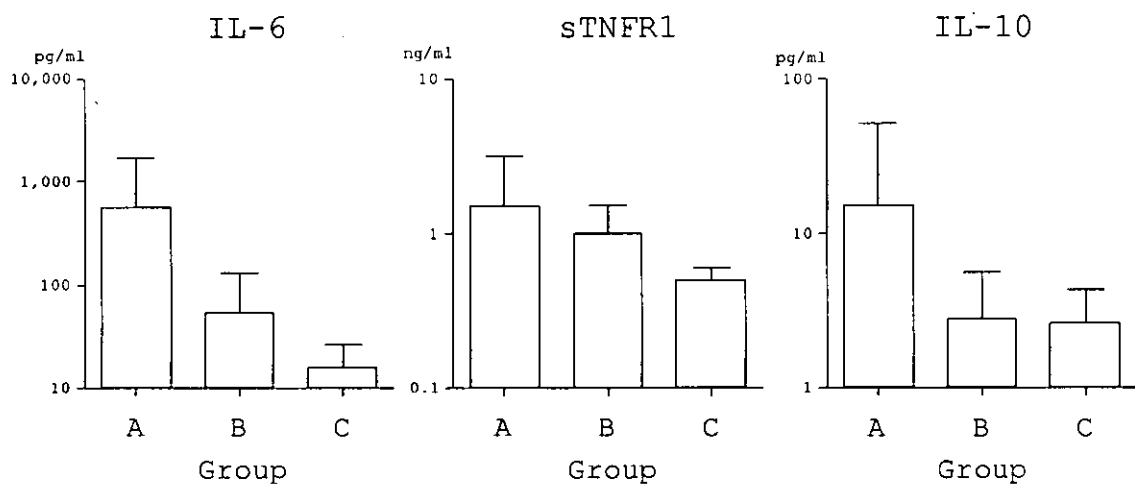


図 2. IE、IFS における髄液中 IL-6、sTNFR1、IL-10 値。
 Group A : IE 予後不良群 (n=10)、Group B : IE 予後良好群 (n=14)、
 Group C : IFS (n=12)

表 1. IE、IFS、Flu における末梢血単核球 NF- κ B 活性化率とサイトカイン値.

No./Age/Sex	Percentage of cells exhibiting NF- κ B activation (%)				Serum	Serum	Serum
	CD3+ cells	CD4+ cells	CD8+ cells	CD14+ cells	IL-6	sTNFR1	IL-10
					(pg/ml)	(ng/ml)	(pg/ml)
Group A							
6/2/M	44.4	37.8	47.7	63.0	923	7.41	100
7/1/F	58.0	50.8	72.9	37.6	767	4.91	151
Group B							
8/2/M	20.8	13.2	29.3	23.1	15.6	1.47	22.1
9/7 mo/F	43.5	42.3	48.5	33.5	195	0.19	78.5
10/6/M	15.3	17.0	9.0	5.5	13.5	2.23	7.4
Median \pm SD	43.5 \pm 17.8	33.5 \pm 16.4	37.8 \pm 23.9	47.7 \pm 21.1	195 \pm 432	2.23 \pm 2.90	78.5 \pm 58.6
Group C (n = 6)							
Median \pm SD	13.0 \pm 6.7	14.1 \pm 7.5	11.6 \pm 6.2	13.4 \pm 9.0	19.3 \pm 41.9	1.77 \pm 0.34	12.3 \pm 26.0
Group D (n = 9)							
Median \pm SD	5.2 \pm 2.6	4.3 \pm 3.3	3.4 \pm 2.4	5.1 \pm 3.3	12.7 \pm 16.3	1.43 \pm 0.50	5.9 \pm 5.9
P value							
A+B vs. C	0.0446	NS	NS	NS	NS	NS	NS
A+B vs. D	0.0027	0.0027	0.0075	0.0092	0.0468	NS	0.0092
C vs. D	0.0183	0.0133	0.0183	0.0249	NS	NS	NS

Group A, IE with a poor prognosis; Group B, IE with a poor prognosis; Group C, IFS; Group D, F.

NS, not significant.

軽症のインフルエンザ脳症について

分担研究者 布井 博幸 宮崎大学医学部小児科 教授

研究要旨 インフルエンザ関連脳症の重症症例については、病初期から cytochrome c の上昇が認められ、apoptosis が全身で、さらに脳浮腫も起こっているものと考えられる。しかし、インフルエンザ感染症では高熱による熱性けいれんから脳症までを判定する適当なマーカーも無く、治療を行うべきか否かの選択に苦慮するケースが多い。我々は軽度の脳症と単純性熱性けいれん後に難治性側頭葉けいれんと考えられる症例を経験し、SPECT 検査を含めた検討を行ったので報告する。インフルエンザ感染症では病初期は軽症例と思われても、脳の高次機能障害を伴いやすく、十分な治療と経過観察が必要だと考えている。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症の発症機序について、我々は血管内皮マーカーやサイトカインマーカーに加え、apoptosisを誘導するcytochrome cなどを血清で測定してきた。重症例ではcytochrome cの上昇が明らかで、病初期からapoptosisが誘発されていると考えられた¹⁾。しかし、細矢ら²⁾は血液と髄液のcytochrome cを測定し、血中でcytochrome cが上昇しない症例でも髄液で4日後にcytochrome cが上昇する症例を報告し、脳症後の萎縮時にcytochrome cがよい指標になるのではないかと考えている。我々もcytochrome cが上昇しないような比較的軽微な臨床的異常を示した患者での検討をしていなかったため、今回8年前に右側頭葉に萎縮を来しインフルエンザ脳症と診断された患者のSPECT検査を含め、その経過について検討した。また、同様にインフルエンザウイルス感染後の単純性熱性けいれんで始まり、難治性前側頭葉けいれんを来した症例の経過についても、single photo emission CT (SPECT)を用いてその病態を検討した。インフルエンザ・ウイルス感染によるけいれんは軽度であっても後遺症を残す症例があり、その程度をどのように判断し、どのような治療法を行うべきか考えさせられた。

B.C. 方法・結果

【症例1】10歳 男子

既往歴:1歳10ヶ月まで、成長発達異常なかった。
現病歴:約8年前、家族がインフルエンザに感染し、本人も1月8日に発熱があった。翌日9日近医にて感冒と診断された。日中は比較的活気があったが、夕方突然、38.5°Cの発熱とともに、左側優位の顔面、四肢の間代性けいれんが始まり、持続するため熊本地域医療センターを受診している。DZPが無効、呼吸抑制が強く気管内挿管、PHT 静注にて2日間管理された。そ

の1週間後と1ヶ月後にMRI検査がなされており、右側頭葉を中心に海馬、扁桃体に浮腫を認めている(図1)。病初期に撮ったTc-99ECDをトレーサーとするSPECTでは左右差はなかったが、3ヶ月後には右側頭葉のSPECTで血流低下が明らかとなっている(図2)。

その後の経過:多動、言葉の遅れを認めるようになった。側頭葉けいれんに移行する可能性が考えられたため、予防的な抗けいれん剤内服(VPA)が行われていた。その後、言葉の教室に通ったり、幼稚園でも一人遊びが多く、ADHD、LD等が疑われていた。小学校一年では相手の気持ちの理解が弱い、着席困難であった。小学校3年頃は週2回の通級中場面の切り替えが苦手で、朝の支度や学校の準備ができない。文章問題が苦手だが、計算は得意(時に100点)であった。現在、WISC-III 言語性検査:VIQ 70、動作性検査:PIQ 69、全検査:IQ66の発達段階と考えられる。
心理士の所見:通常会話は説明が長く、一方的、質問に対してはうまく言葉が搜せないことも多い。言葉使いはやや単調動き回るほどではないが、動きは多い。

MRIでは頭蓋内において、脳室や脳槽などの状況はほぼ年齢相応と思われる。しかし、SPM(Statisticcal Parametric Mapping)解析法にて、両側海馬の血流低下、大脳半球(脳梁辺縁、中心前回、中心回、角回、側頭葉)小脳に血流の左右差が認められる(図3)。

【症例2】3歳 男児

主訴:ピクツキ痙攣と意識消失発作
現病歴:1月19日インフルエンザ罹患時、2-3分の熱性けいれんを起こした。けいれん後は意識も鮮明で全身強直性の単純性けいれんだった。同年2月7日に無熱性全身強直性けいれんを起こした。その後小さなピクツキのような痙攣と短い意識消失発作があり、2

月 14 日某病院に入院となる。入院中もピクツキ発作が頻発したため、デパケンを増量、エトサクシミド 10mg/kg を併用するも痙攣おさまらず、精査目的のため、宮崎大学小児科に入院となる。

<脳波>

覚醒時脳波: 背景は 4-5c/s のシーター波で、突発性発作波としては、前頭葉中心に spike and wave 複合体から diffuse spike and wave が目立っていた。3c/s diffuse spike and wave も認められる。<SPECT>発作時に明らかな左側頭葉の血流増加・右視床の血流増加がみられた(図4)。

入院後経過: GZP、PHT、メイラックスいずれも眠気が強く痙攣が頻発したので中止している。その後 MRI では何ら病的所見を認められなかったが、脳波や SPECT により前頭葉てんかんと診断、ZSM を開始した。痙攣が 0~5 回/日であったが、1 ヶ月後には 0.1 回/日と安定した。ZNS 使用後一時的に diffuse spike and wave も消失するも再発し、アロプリノール内服により、発作が消失している。背景も 5-7c/s となり、前より高波長になった。

D. 考察

症例1では初期には SPECT で片側の病血流変化は認められず、1 ヶ月のちに血流低下が明らかとなり、8 年後には両側海馬の血流低下、大脳半球(脳梁辺縁、中心前回、中心回、角回、側頭葉)小脳に血流の左右差が認められる(図3)ようになっている。臨床症状としては、下村ら³⁾も報告しているように、症例1と同様、脳症後に ADHD 様症状を呈している。

また、症例2のようにインフルエンザウイルスによる初回熱性けいれんは、回復がよく、CT や MRI でも異常は認められず、痙攣時の SPECT で両側前頭葉を中心に血流上昇が認められている。大城ら⁴⁾も症例2と同様に、MRI では異常は認められないものの、脳波や SPECT 所見で右前頭葉の血流低下を認め、一時的に精神症状のみを示し、回復した症例を報告している。水口らは⁵⁾両側前頭葉または一側大脳半球に起こりやすい痙攣重積型のなかでも頭部画像所見から「局所性皮質型」を対象に SPECT による検討をしており、急性期の前頭葉血流は低下し、その後遅発性神経細胞死が引き続き生じ、数ヶ月から2年間で前頭葉血流は回復傾向を示すと述べている。

症例1, 2はいずれも、インフルエンザ脳症に対する脳減圧治療はなされているものの、抗サイトカイン治療を考えた特殊な治療は施されていない。インフルエ

ンザ脳症としては軽度から中等度の障害といっても、きわめて重要な脳機能が犯される場合が多い。臨床的には熱性けいれんにおいては5分以上の痙攣・30分以上の遷延性意識障害・異常行動の合併がそれぞれ11%、8%、2%で例外的にいわれている⁶⁾が症例2は初回のけいれんはいずれの症状もしめさない単純性熱性けいれんである。インフルエンザ関連脳症に関するこれまでの病態解析から、遺伝的背景が背景にあるのではないかと考えられているものの、高サイトカイン血症のもと、全身特に脳浮腫が起こっていることが知られている(図5)。病勢を予測するマーカーとして、IL-6, TNF- α , sTNF- α , cytochrome c なども知られている。しかし、ベッドサイドでの迅速キットとしては手に入らず、病初期から予後が予測されない以上、予後に不安があるときには、高サイトカイン血症に対する脳症の治療マニュアルに基づいた治療も考慮されなければならないと考えている。

E. 結論

インフルエンザ関連脳症は、高サイトカイン血症のもと、全身特に脳浮腫が起こっていることが知られている。病初期から予後が予測されない以上、臨床上予後に不安があるときには、高サイトカイン血症に対する脳症の治療マニュアルに基づいた治療も考慮されなければならないと考えている。

参考文献

- 1) 布井博幸、他: 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。小児感染免疫 13: 225-232, 2001
- 2) 細矢光亮: 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。平成12~14年度 総合研究報告書 厚生労働科学研究費補助金 92-95, 2003
- 3) 下村修司、インフルエンザ関連脳症による意識障害後に ADHD 様症状を呈した1児童例 臨床精神医学 29:77-79, 2001
- 4) 大城聡、城間直秀、太田孝男、精神症状のみで経過したインフルエンザ関連脳症の13歳男児例 日本小児科学会雑誌 106: 1463-1465, 2002
- 5) 水口雅ら: 痙攣重積型脳症、とく両側前頭葉障害をきたす症例に関する研究。平成12~14年度 総合研究報告書 厚生労働科学研究費補助金 77-82, 2003

6)奥村彰久：熱性けいれんと異常行動および遷延性意識障害。平成12～14年度 総合研究報告書 厚生労働科学研究費補助金 72-76, 2003

F. 研究発表

A)学会発表:なし

B) 発表誌名巻号・頁・発行年(別表にも記載)

1: Moritake H, Sugimoto T, Kuroda H, Hidaka F, Takahashi Y, Tsuneyoshi M, Yoshida MA, Cui Q, Akiyoshi K, Izumi T, Nunoi H. Newly established Askin tumor cell line and overexpression of focal adhesion kinase in Ewing sarcoma family of tumors cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* (2003) 146: 102-9.

2: Nunoi H, Kohi F, Kajiwara H, Suzuki K. Prevalence of inherited myeloperoxidase deficiency in Japan. *Microbiol Immunol.* (2003) 47: 527-31.

3: Sugimoto Y, Tsukahara S, Sato S, Suzuki M, Nunoi H, Malech HL, Gottesman MM, Tsuruo T. Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 in vivo from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91. *J Gene Med.* (2003) 5: 366-76.

4: Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem.* (2003) 278: 25234-46.

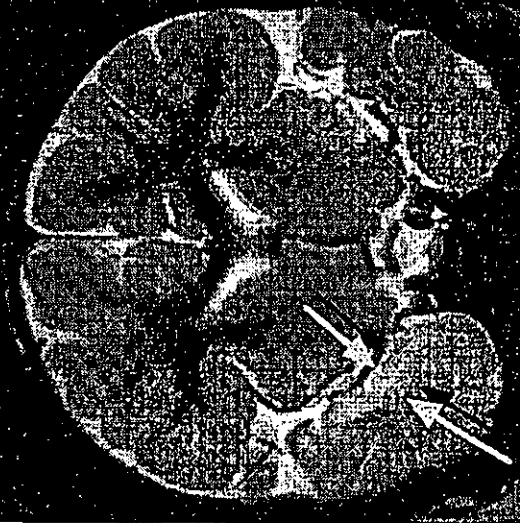
5: Sonoda T, Kouno K, Sawada K, Takagi J, Nunoi H, Harada N, Matsumoto N. Duplication (22)(q11.22-q11.23) without coloboma and cleft lip or palate. *Pediatr Int.* (2003) 45: 97-9.

6. 慢性肉芽腫症研究の進歩と治療の問題点 布井博幸、小児感染免疫(2003)15:311-319

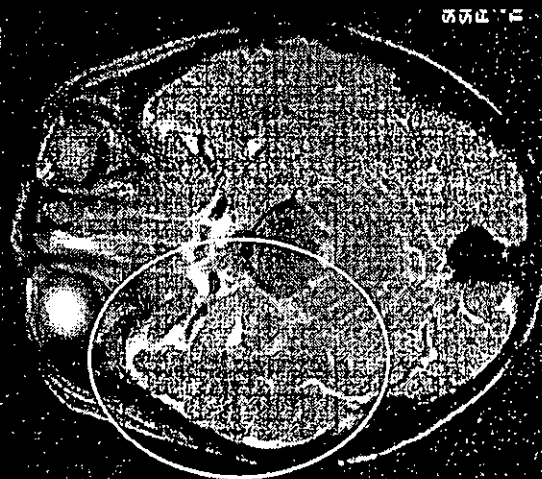
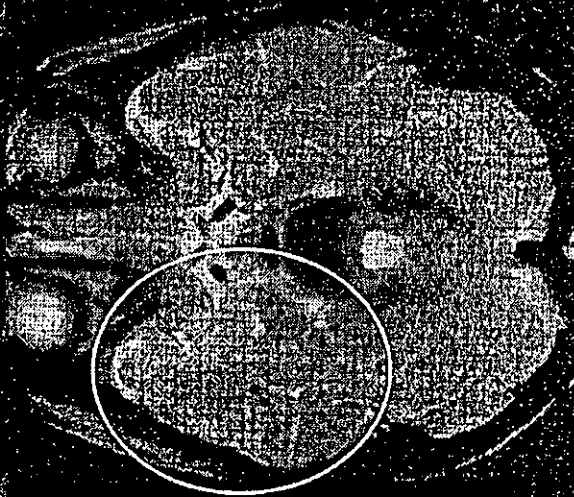
7. 原発性免疫不全症の遺伝カウンセリングと予後。水上智之、布井博幸、周産期医学(2003) 33:1145-1149

MRIの比較 (発作1か月後)

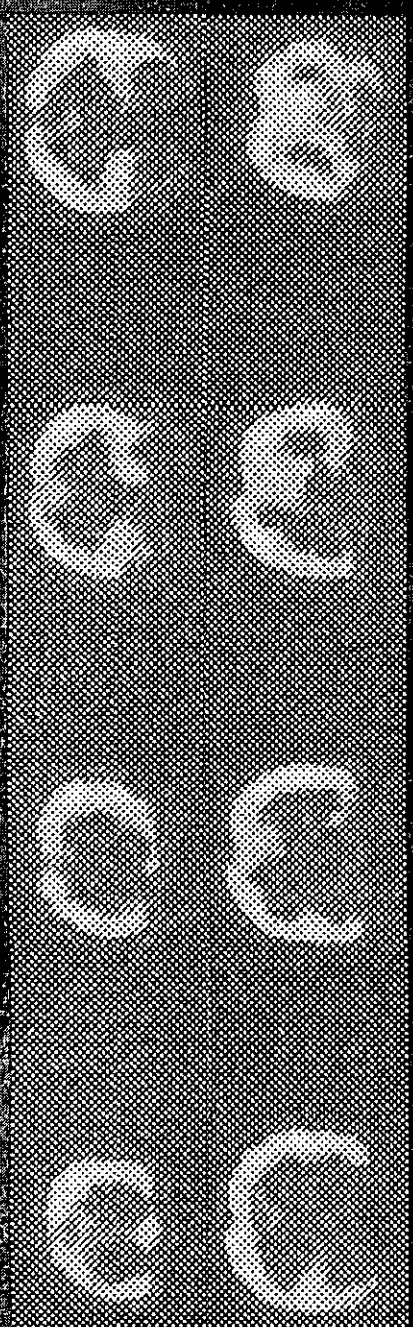
1.17.



2.20.



8年前のSPECT検査



急性期



回復期
3ヶ月後