

インフルエンザ中枢神経合併症例における マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析

分担協力者 木村 宏 名古屋大学医学部小児科学

研究要旨

インフルエンザ患者を対象として、マイクロアレイ法による末梢血中の遺伝子発現の網羅的解析を行った。インフルエンザ脳症、インフルエンザ関連熱性痙攣、中枢神経系合併症のないインフルエンザ患者より急性期、回復期の血液を採取し、RNAを抽出、cRNAを合成し、Agilent, Human 1A Oligo Microarrayを用い、約18500の遺伝子発現を比較した。インフルエンザの急性期には、134の遺伝子の発現が有意に増強しており、13の遺伝子が有意に抑制されていた。発現が亢進していた遺伝子は主として免疫反応に関係した遺伝子群であった。熱性痙攣群では、合併症の無い群に比べ、20の遺伝子の発現が増強していた。マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析はインフルエンザ脳症の発症機序・重症化の解明および早期診断法の開発に有用な手段となることが示唆された。

A. 研究目的

本研究班を中心とした研究成果の蓄積により、インフルエンザ脳症の発症病理についてはかなりのことが解明されてきた。インフルエンザ脳症の発症にはウイルス感染に伴う免疫の活性化、ことにinterleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF α) などの炎症性サイトカイン関与が大きいことも明らかにされてきている。本症の患者末梢血ではこれら炎症性サイトカイン遺伝子の高発現が認められ、systemicに免疫が亢進しており、脳症の発症には、ウイルスの増殖よりもむしろウイルスに対する生体の過剰な免疫反応が関与している可能性が示唆されている。

しかし、インフルエンザに罹患したすべての個体が脳症を生じるわけではないこと、必ずしもウイルスに対して抵抗力の弱い者が発症するわけではなくむしろ免疫学的に活発な健康小児に多く発症していること、我が国に報告が集中していることなど、インフルエンザ脳症の発症病理については未だ不明な点が多く、そこに遺伝的素因の関与が示唆されてきた。

我々は、インフルエンザ脳症の発症機序や重症化に関わる遺伝的背景・遺伝子異常を明らかにするために、マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子解析の基礎的検討を行ってきた。同法を用いることで、今まで

思いもよらなかった遺伝子の関与が明らかになるかもしれない。今回は、インフルエンザ熱性痙攣患者および中枢神経系合併症のないインフルエンザの患者の末梢血を用い、マイクロアレイ法により、網羅的遺伝子解析を行い患者間の遺伝子発現を比較した。

B. 研究方法

対象はインフルエンザ脳症患者 1 例、熱性痙攣患者 5 例、中枢神経系合併症のないインフルエンザ 4 例、計 10 例とした。以下の手順で遺伝子発現解析を行った。

1. インフルエンザ患者から急性期および回復期に、RNA を安定化するための容器 (PAXgene RNA, QIAGEN) に採血 (2.5ml)。
2. PAX gene Blood RNA Kit (QIAGEN) を用い RNA を抽出。

3. 抽出された RNA の質をバイオアナライザ (RNA6000 Nano Assay, Agilent Technologies) を用いて確認。
4. 急性期および回復期の RNA をそれぞれ 400 ng 使用し Low RNA Input リニア増幅・ラベル化キット (Agilent Technologies) を用い cDNA の合成、ラベル化 cRNA の合成を行った。急性期を Cyanine 3-dCTP、回復期を Cyanine 5. ラベル化 cRNA を QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用い精製。
6. 精製されたラベル化 cRNA の量および Cyanine 3/ Cyanine 5-dCTP の取り込み率を Nano Drop ND-1000 (NanoDrop Technologies) を用い測定。
7. ラベル化 cRNA 各 1 μ g を In Situ Hybridization Kit (Agilent Technologies) を使用しマイクロアレイ (Human 1A Oligo Microarray, Agilent Technologies) に 60°C 17 時間ハイブリダイゼーションさせた。
8. アレイを洗浄した後 DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies) で読みとった。読みとったマイクロアレイの情報を Feature Extraction (Agilent Technologies) と EASE SYSTEM (NIH) で解析した。

C. 研究結果

インフルエンザ患者 10 例を対象に急性期検体として発症後 (発熱後) 平均 1.1 日目、回復期検体として解熱後 2.9 日の血液を採取した。全血より RNA 抽出、cRNA 合成後、Agilent, Human 1A インフルエンザ感染小児における遺伝子の発現について、マイクロアレイを用いて網羅的解析を行い以下の結果を得た。

- 1) インフルエンザの急性期には、134 の遺伝子の発現が有意に増強しており、13 の遺伝子が有意に抑制されていた。発現が顕著に亢進・減弱していた遺伝子を図 1 に示す。
- 2) これらの遺伝子を機能別に分類したところ、インフルエンザの急性期に発現が亢進している遺伝子は、免疫反応に関係したものが多かった (図 2)。最も発現が亢進していた 15 の遺伝子の詳細について表 1 にまとめた。

- 3) 熱性痙攣群と中枢神経系合併症の合った群とを比較したところ、合併症の無い群に比べ、20 の遺伝子の発現が増強し、5 つの遺伝子が減弱していた (図 3)。

D. 考察

インフルエンザ脳症の発症機序については未だ不明な点が多いが、サイトカインを介した炎症反応の亢進や血管内皮細胞の障害に引き続いた多臓器不全が示唆されてきた。我々は、定量的 RT-PCR 法を用い、インフルエンザ脳症患者の末梢血中において、炎症性サイトカインである IL-6 および TNF α 遺伝子の高発現が見られることを報告してきた。これらのことは、脳症では systemic に活性化 T 細胞やマクロファージなどの免疫担当細胞が活性化していることを示している。また、熱性痙攣群でも末梢血中の TNF α の発現が亢進していることも明らかにし、インフルエンザ脳症と熱性痙攣の間には連続した発症病理が存在すると考えられる。このように定量的 RT-PCR 法は鋭敏かつ再現性の高い優れた手法であるが、解析する遺伝指数の数に限りがあり、関連を予想した特定の遺伝子のみの解析しかできないこと、相互の関連がわかりにくいなどの欠点があった。

マイクロアレイ法は従来の遺伝子発現解析法と較べ、以下の様な有利な点がある。1) 多数の遺伝子を解析できるため、いままで思いもよらなかった遺伝子の関与を発見できる可能性がある。2) 発現の亢進に留まらず、発現低下・抑制もとらえることができる。3) 単一遺伝子の発現のみならずクラスター解析を行うことで、遺伝子群、経路の活性化・抑制を見いだすことができる。

今回我々は、インフルエンザ患者を対象にマイクロアレイ法による患者末梢血中の遺伝子発現解析を行った。インフルエンザの急性期には、134 の遺伝子の発現が有意に増強しており、13 の遺伝子が有意に抑制されていた。発現が亢進していた遺伝子は主として免疫反応に関係した遺伝子群であった。熱性痙攣群では、合併症の無い群に比べ、20 の遺伝子の発現が増強していた。このうち 5 つの遺伝子ではインフルエンザ脳症患者でも発現亢

進が認められた。今後これらの遺伝子について、定量的RT-PCR法や（解析が可能であれば）蛋白レベルの解析で発現を確認すべきと考えられる。また今回対象とした症例のうち脳症患者は一例のみであり、脳症症例数を増やして検討する必要がある。

マイクロアレイ法によって得られた知見は、本症の発症・重症化機序の解明に役立つばかりか、急性期に発現が亢進している遺伝子に注目して、脳症の早期診断に応用できるかもしれない。一方で、本研究班を中心に、インフルエンザ脳症を発症した患者に特異的な遺伝的背景を遺伝子多型解析により明らかにする試みがある。遺伝子多型とマイクロアレイ解析は手法も対象も異なるが、両者で得られた結果は共に補完的役割を果たすものと考えられる。

E. 結論

インフルエンザ患者を対象にマイクロアレイ法による患者末梢血中の遺伝子発現解析を行った。同法による網羅的遺伝子発現解析はインフルエンザ脳症の発症機序・重症化の解明および早期診断法開発に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Katano H, Ali MA, Patera AC, Catalfamo M, Henkart PA, Jaffe ES, Kimura H, Dale JK, Straus SE, Cohen JL. Chronic active Epstein-Barr virus infection associated with mutations in Perforin that impair its maturation. *Blood* 103:1244-52, 2004
- 2) Kawada J, Kimura H, Morishima T. Influenza Virus and Febrile Convulsions. *J Infect Dis* 189:564-5, 2004
- 3) Takeoka Y, Nakao Y, Ueda M, Koh KR, Aoyama Y, Nakamae H, Yamamura R,

Ohta K, Takubo T, Yamane T, Hino M, Tokura Y, Ishihara S, Oshima K, Kimura H, Imashuku S. A case of a long-time survivor with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Eur J Haematol* 72:73-6, 2004

- 4) Asano S, Yoshikawa T, Kimura H, Enomoto Y, Ohashi M, Terasaki H, Nishiyama Y. Monitoring herpesvirus DNA in three cases of acute retinal necrosis by real-time PCR. *J Clin Virol* 29:206-9, 2004
- 5) Kawada J, Kimura H, Ito Y, Hoshino Y, Tanaka-Kitajima N, Ando Y, Futamura M, Morishima T. Comparison of real-time and nested PCR assays for detection of herpes simplex virus DNA. *Microbiol Immunol* 48:411-5, 2004
- 6) Kawada J, Kimura H, Yoshikawa T, Ihira M, Okumura A, Morishima T, Hayakawa F. Himiconvulsion-hemiplegia syndrome and primary human herpesvirus 7 infection. *Brain Dev* 6:412-4, 2004
- 7) Kawada J, Kimura H, Ito Y, Ando Y, Tanaka-Kitajima N, Hayakawa M, Nuno H, Endo F, MD, Morishima T. Evaluation of systemic inflammatory responses in neonates with herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* 190:494-8, 2004
- 8) Sugaya N, Kimura H, Hara S, Hoshino Y, Kojima S, Morishima T, Tsurumi T, Kuzushima K. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8⁺ T cells in chronic active EBV infection. *J Infect Dis* 190:985-8, 2004
- 9) Hosoya M, Mori S, Tomoda A, Mori K, Sawaishi Y, Kimura H, Shigeta S, Suzuki H. Pharmacokinetics and Effects of Ribavirin following Intraventricular Administration for Treatment of Subacute Sclerosing Panencephalitis. *Antimicrob Agents Ch* 48:4631-5,

- 2004
- 10) 和泉啓、村田紀子、光武伸祐、山口朋奈、横田吾郎、江頭昌典、高柳俊光、菅谷直美、木村 宏、森内浩幸. 先天性サイトメガロウイルスの一例. 日本小児科学会雑誌 108:1226-1229, 2004
 - 11) 木村 宏、菅谷直美、慢性活動性 EB ウイルス感染症と EB ウイルス特異的 T 細胞 臨床免疫 41:591-4, 2004
 - 12) 川田潤一、木村 宏、単純ヘルペスの母子感染 小児科 増刊号 感染症-最近の話題- 45:758-762, 2004
 - 13) 安田彩子、木村 宏、CMV の母子感染 小児科 増刊号 感染症-最近の話題- 45:766-769, 2004
 - 14) 木村 宏、慢性活動性 EB ウイルス感染症 血液腫瘍科 48:379-383, 2004
 - 15) 安藤嘉浩、木村 宏、神経炎症疾患の特殊治療-抗ウイルス薬の作用機序と使い方 小児内科 36:1059-62, 2004
 - 16) 川田潤一、木村 宏、PCR 法による中枢神経系ウイルス感染症の診断 化学療法の領域 20:1503-7, 2004
 - 17) 林 直美、木村 宏、水痘帯状疱疹ウイルス 今日の治療と看護(第 2 版) 水島裕、黒川清、編. 南紅堂、p1349-50, 2004
 - 18) 木村 宏、造血幹細胞移植と EBV リンパ増殖症. 造血幹細胞移植マニュアル 小寺良尚、齋藤英彦、監修. 日本医学館、p365-367, 2004

ス学会 2005.11.22 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

2. 学会発表

菅谷直美、木村宏、柴田友紀子、原紳也、星野洋、森島恒雄、葛島清隆. 慢性活動性 EB ウイルス感染症における EBV 特異的 CD8+陽性細胞の定量. 第 106 回日本小児科学会学術集会 2004.4.10 岡山

川田潤一、柴田友紀子、木村宏、原紳也、森島恒雄. EBV 関連血球貪食症候群における TNF を介したアポトーシスの亢進について定量. 第 36 回日本小児感染症学会 2004.11.12 東京

木村宏、井平勝、榎本喜彦、川田潤一、柴田友紀子、森島恒雄、吉川哲史
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法による髄液からの HSV DNA 検出定量. 第 52 回日本ウイル

図1 インフルエンザ急性期の発現／抑制遺伝子

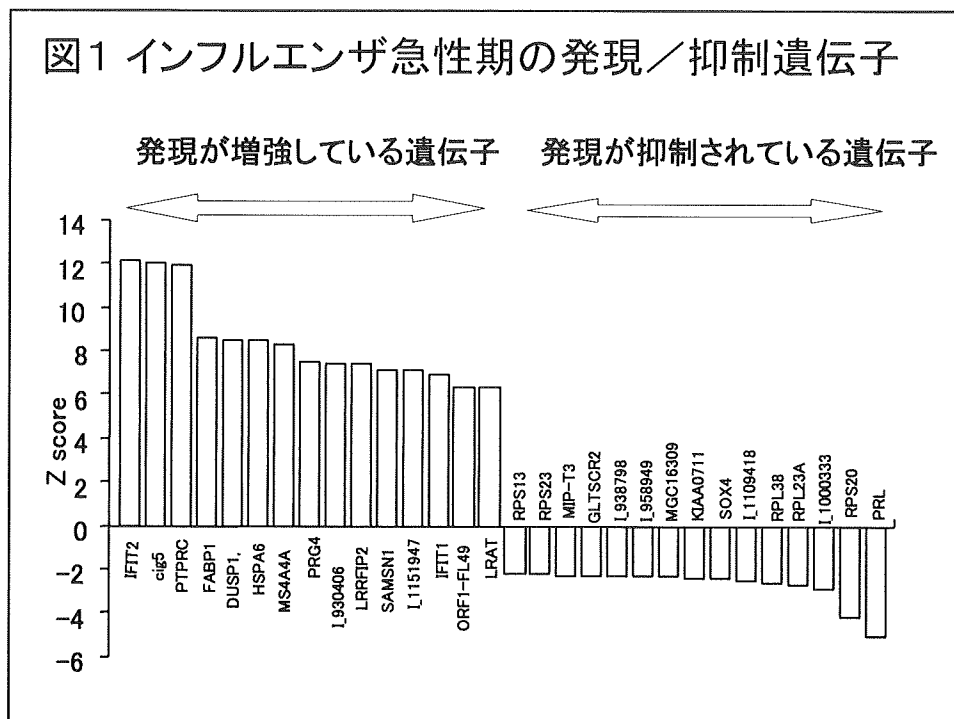


表1 急性期発現遺伝子(上位15)

Z score	Gene Symbol	Gene Name	機能分類
12.2	IFIT2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	immune response
12.1	cig5	Vipirin	immune response
12.0	PTPRC	Protein tyrosine phosphatase receptor type C	immune response
8.6	FABP1	Fatty acid binding protein 1 (liver)	cell-cell signaling
8.5	DUSP1	Dual specificity phosphatase 1	response to biotic stimulus
8.5	HSPA6	Heat shock 70kD protein 6	heat shock protein activity
8.4	MS4A4A	Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 4A	integral to membrane
7.6	PRG4	Proteoglycan 4 (megakaryocyte stimulating factor)	
7.4	I_930406	Protein containing a SAM (sterile alpha motif) domain	
7.4	LRRFIP2	Leucine rich repeat in FLII interacting protein 2	binding
7.2	SAMSN1	Protein containing a SAM (sterile alpha motif) domain	enzyme regulator activity
7.1	L_1151947	Protein containing three IPT or TIG domains	
6.9	IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	immune response
6.4	ORF1-FL49	Protein of unknown function	response to external stimulus
6.4	LRAT	Lecithin retinol acyltransferase	physiological process

図2 発現／抑制遺伝子の機能分類

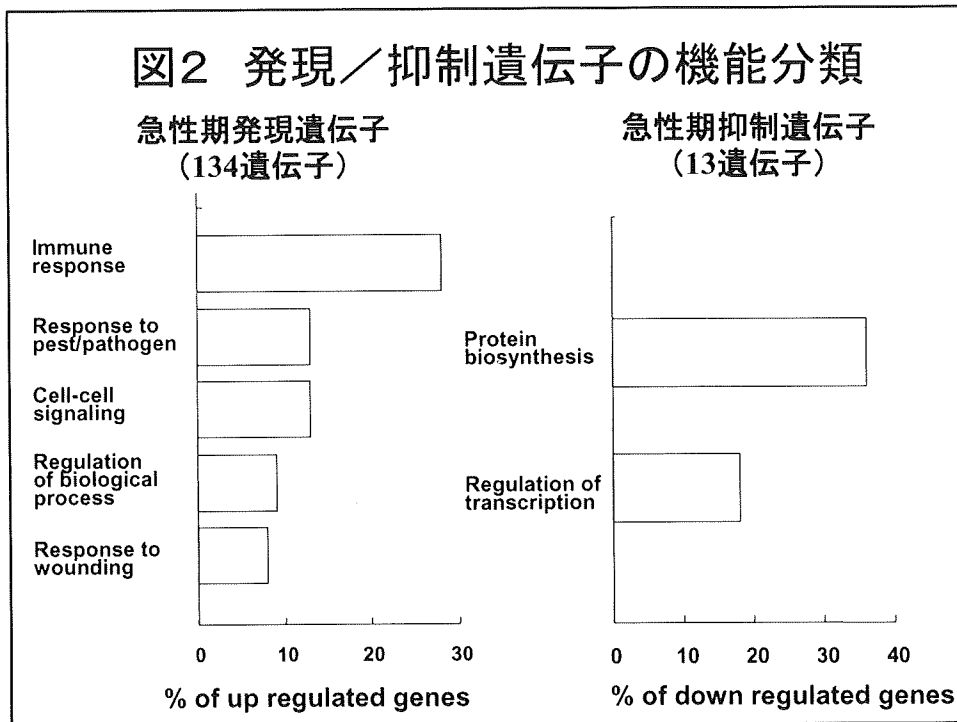
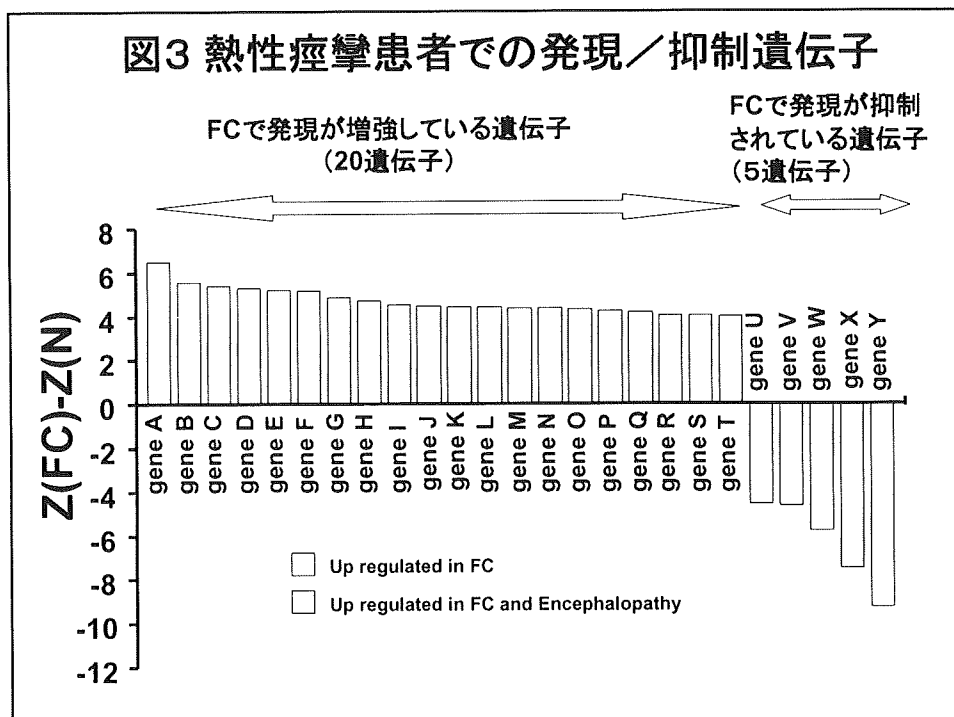


図3 熱性痙攣患者での発現／抑制遺伝子



インフルエンザ脳症発症時のサイトカインプロフィール： 川崎病との比較に関する研究

研究協力者：荒川浩一 群馬大学大学院医学系研究科小児生体防御学

研究要旨：インフルエンザ脳症発症の病態生理に、炎症性サイトカインなどが重要な役割を果たしていることが示唆されているが、その詳細は不明な点が多い。今回、インフルエンザ脳症と同様に、サイトカインストームが重要と考えられている川崎病とのサイトカインプロフィールの相違を検討した。インフルエンザ脳症7名と川崎病47名、コントロール群13名を対象に、急性期の血清を用いて17種類のサイトカイン、ケモカインを測定した。その結果、両疾患で上昇していたが、インフルエンザ脳症の患者血清の方が、川崎病より有意に高値を示したものは、IL-8とMCP-1であった。インフルエンザ脳症でみられるIL-8やMCP-1の産生亢進は、CXCR1/CXCR2を発現する好中球、CCR2などを高発現する単球の接着を誘導し、その病態に強く関与する可能性が示唆され、治療へのアプローチとして重要と考えられた。

研究協力者：小林徹、井上佳也、他
群馬インフルエンザ脳症研究班

A. 研究目的

インフルエンザ脳症の発症病態生理に関しては、不明な点が多い。その病態に、炎症性サイトカインであるIL-6、TNF- α などのサイトカインの重要性が指摘され、特に、最近の報告では、IL-6がインフルエンザ脳症の予後に重要であり、IL-6高発現が、病態下においては、神経毒性となる可能性が示唆されている。

一方、川崎病は、小児の代表的な血管炎であり、その病態に、インフルエンザ脳症と同様に、炎症性サイトカインなどのIL-1 β 、

TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-8、IFN- γ 、IL-4、IL-10が血中で上昇していることが示されている。また、我々は、サイトカインを早期に制御する目的で、 γ グロブリン大量療法に加え、病初期よりステロイドを併用することの有用性を報告してきた。

両疾患において、病態生理は不明な点は多く認められているが、サイトカインストームが何らかの役割を果たしている可能性が強く示唆されている。

今回、これら2つの疾患においてサイトカインプロフィールに相違があるかどうかを、

インフルエンザ脳症を発症した患児と川崎病発症時のサイトカインを測定し検討することを目的とした。

B. 対象および方法

群馬県で発症したインフルエンザ脳症患者で、治療のため3次病院として群馬大学医学部附属病院に紹介となり、ICUに入室した7名（年齢は6ヵ月から11歳）の患者で、病歴の詳細は表に示した。インフルエンザA型が5名でB型が2名である。紹介時の白血球数は4,900~15,400、LDHは262~18,722、CKが72~32,186で、画像的には軽度の脳浮腫から急性壊死性脳症（acute necrotizing encephalopathy）など非常に種々であった。死亡は4名、重度後遺症が1名、改善が2名である。血液は入院時に採血した一部を血清保存した。一方、川崎病は、群馬県内の2次病院に搬送され治療を受けた47名で、治療としてのγグロブリン製剤が投与される前の血液を採取した。コントロールは、川崎病の症例と年齢を一致し、先天性心疾患などで受診した13名の患者から採血したものとした。これらの血液は、血清に分離後、測定まで-20度にて保存した。

血中のサイトカイン測定は、Bio-Plex（日本バイオラッド社）を用い、17項目までのサイトカインを同時に測定した。

C. 研究結果

川崎病とインフルエンザ脳症の両者が、コントロール群と比較して有意に上昇してい

たものはIL-6、IL-10、G-CSFで、川崎病のみ上昇していたものが、TNF-α、IL-2、IL-5、IL-17であった。一方、両疾患で上昇していたが、インフルエンザ脳症の患者血清の方が、有意に高値をしめしたものは、IL-8とMCP-1であった。

IL-7、IL-13、MIP-1b、GM-CSF、IL-4、IL-12では、両疾患で明らかな上昇は認めなかった。

インフルエンザ脳症患者の予後との関連を検討したところ、IL-6、IL-8、IL-10、TNF-αが予後不良群（死亡および重度後遺症）で高値を示した。

D. 考察と結論

インフルエンザ脳症と川崎病では、炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインの両者が上昇する。しかし、そのプロフィールが、一部異なることが見いだされた。インフルエンザ脳症でみられるIL-8やMCP-1の産生は、CXCR1/CXCR2を発現する好中球、CCR2などを高発現する単球の接着を誘導し、その病態に強く関与する可能性が示唆され、治療へのアプローチとして重要と考えられた。

E. 研究発表

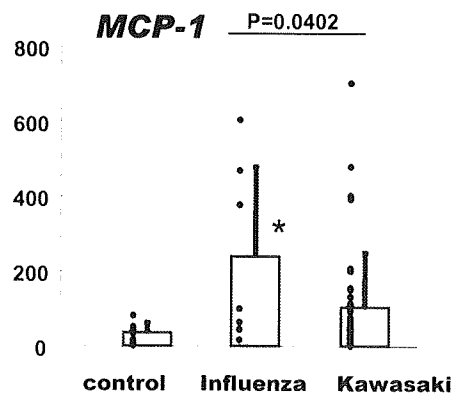
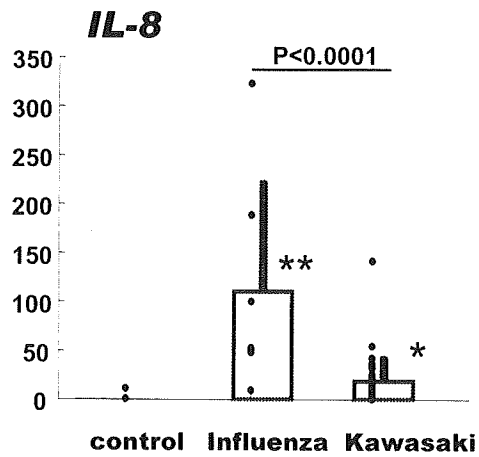
なし

F. 知的所有権の取得状況

なし

インフルエンザ脳症

No	Age	Sex	Flu	WBC	LDH	CK	CRP	Brain-CT
1	11	boy	A	15100	18722	32186	5.8	Mild edema
2	1	boy	A	10400	262	100	3.2	Diffuse edema
3	3	boy	A	6000	9960	137	6.9	ANE
4	4	boy	A	15400	1860	182	0.1	Diffuse edema
5	5	boy	A	6400	6342	6750	0.1	ANE
6	6M	boy	B	4900	899	385	0.8	Mild edema
7	2	girl	B	11400	359	72	0.8	Mild edema



インフルエンザ脳症の発症因子の解明と治療及び 予防方法の確立に関する研究 ーラジカルスカベンジャーの役割ー

分担研究者 河島尚志 東京医科大学小児科 講師

研究要旨

国内においてインフルエンザ脳症は小児を中心に毎年 100-500 名と報告されてきており、その死亡率は 14~30%と高率であり後遺症を残すものも多い。その病態解明は急務となっている。昨年までの調査結果を踏まえ NO_x を中心とした分子モニタリングにより病態解明を試みた。NO_x は髄液中でインフルエンザ脳症において有意差をもって高値を示したが、インフルエンザ脳症を後遺症で分けると必ずしも高値例は予後不良ではなかった。ラジカルスカベンジャーの役割に大事な亜鉛は脳症患者の一部で明らかに低値を示していた。また、インフルエンザ脳症の早期診断と治療方針決定に IL-6、フェリチン、TG は他の血液検査が正常な時期においても有用と考えられた。

A. 研究目的

昨年までの研究結果によりインフルエンザ脳症では血清中・髄液中でフリーラジカルの代表である NO_x が高値をとる症例が多い事が知れた。さらに髄液中のアミノ酸解析の結果から脳内におけるグリア細胞の活性化が推察された。これらの結果を踏まえ、インフルエンザ脳症の治療戦略のため、平成 16 年度はラジカルスカベンジャーの代表である亜鉛に注目し、インフルエンザ脳症患者での検討を行った。また、脳症の早期診断のための IL-6 やフリーラジカルの迅速測定を行うとともに各種のデータを集積解析しその臨床的有用性を検討した。

B. 研究方法

22 例(1 から 9 才)のインフルエンザ脳症(予後不良群 7 例、予後良好群 13 例)を対象

とした。血清では原因不明の発熱患者、肺炎、尿路感染症、白血病などをコントロールとした。インフルエンザ単独患者と熱性痙攣患者の血清も同様に比較した。髄液では発熱精査で入院し、FUO とされたもの、尿路感染、肺炎と最終診断されたものをコントロールとした。NO_x は Griess の方法により HPLC-UV system (ENO-10, NOD-10; EICOM, Kyoto) にて測定した。亜鉛濃度は原子吸光度計にて測定した(正常健康人のコントロールは 61 to 121 μ /dl)。統計的有意差は Fisher's Protected Least Significant Difference または Mann-Whitney's U tests にて検索した。

また、早期診断のため痙攣の持続時間、血液検査(GOT,LDH,CPK,血小板数、クレアチニン、TG,フェリチン、IL-6)をインフルエンザ脳症を3群(A群:重症例(DIC,多臓器不全になった者4例、B群:脳症であるが後遺症なく多臓器

不全等合併症のなかった群4例、C 群:痙攣・意識障害・脳浮腫のいずれかのみ11例)に分けて時間軸を整理して検討した。

C.研究結果

22例のインフルエンザ脳症の髄液中のNO_xはコントロール群より有意に上昇していた(図1)。しかしながら予後でこれらを2群に分けるとNO_xの値との相関はなかった(図2)。これらの内11例において血清中の亜鉛を測定したところ、図3の様にインフルエンザ脳症患者において低値を示していた(11例中4例)。一方、痙攣のないインフルエンザ患者や熱性痙攣を伴ったインフルエンザの患者の一部に低値を認めた。他の疾患群では低値例はいなかった。しかしながら、後遺症との比較では亜鉛濃度と関連は見出せなかった(図4)。

早期診断として、A 群は2例が死亡、2例が後遺症を認めた。B 群では1例が一過性の歩行障害を認めた。A 群は4例中3例が41.2℃以上であったが、B,C 群は全例41℃以下であった(表1～4)。A,B 群とC 群ではCPK,LDH,IL-6の値ならびに意識障害の時間に差を認めた(図5)。また、A 群ではフェリチン高値を早期より、B 群ではCPK高値を早期より認めた(図5,6)。発熱から異常値が出現する時間はIL-6、フェリチン、TGを含めない場合、平均31.4時間から、含める場合23.9時間より異常値を認め、IL-6、フェリチン、TGは病初期から上昇していた(表5)。

D.考察

今回の調査から、インフルエンザ脳症患者ではフリーラジカルが中枢神経系で高値を示し、何らかの役目をしていること、血清中の亜鉛濃度の低値例が脳症患者ではいることが

知れた。このことはフリーラジカルが病態に関与しており、予後に影響していることが推察された。しかしながら、単独では予後との相関がないことより、いくつか因子が加わって予後を決定している事が考えられた。これらの結果を踏まえ、早期に診断加療を開始するため、各種の検査結果を時間軸で整理すると、早期よりCPKが上昇する群は予後良好で、逆に早期はCPK正常で、IL-6やフェリチン、TGなどが上昇している群において予後不良が考えられた。また、他の検査結果が正常な時期にすでにIL-6、フェリチン、TGは上昇しており、早期の診断と治療方針決定の有用な指標になると考えられた。

E.結論

- ①インフルエンザ脳症患者では髄液中のNO_xが有意に高値を示す。また、血清中の亜鉛濃度は低下例を一部に認めた。どちらも単独では予後と相関はしなかった。
- ②インフルエンザ脳症の早期診断として、IL-6や、フェリチン、TG測定は有用であった。

F.研究発表

(1)論文発表

①著書

河島尚志 症候と病態 インフルエンザ脳症を疑う初期症状、pp19-21、《小児科外来診療のコツと落とし穴》5『小児救急』監修:柳澤正義、編集:市川光太郎 中山書店 2004年

②学術論文

1.Kawashima H, Inage Y, Ogihara M, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Mori T, Watanabe Y. Serum and cerebrospinal fluid nitrite/nitrate levels in patients with rotavirus gastroenteritis induced convulsion.Life Sci. 74(11):1397-405.

- 2004
2. Kawashima H, Ihara T, Ioi H, Oana S, Sato S, Kato N, Takami T, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Mori T. Enterovirus-related type 1 diabetes mellitus and antibodies to glutamic acid decarboxylase in Japan. *J Infect.* 49(2):147-51. 2004
3. Kawashima H, Morishima T, Togashi T, Yokota S, Yamanaka G, Ioi H, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Watanabe Y. Extraordinary changes in excitatory amino acid levels in cerebrospinal fluid of influenza-associated encephalopathy of children. *Neurochem Res.* 29(8):1537-40. 2004
4. Kawashima H, Ryou S, Nishimata S, Ioi H, Kashiwagi Y, Iizumi M, Takami T, Sasamoto M, Takekuma K, Hoshika A, Mori T. Enteroviral hepatitis in children. *Pediatr Int.* 46(2):130-4. 2004
5. Kashiwagi Y, Kawashima H, Kanetaka Y, Ioi H, Takekuma K, Hoshika A, Matsubayashi J, Mukai K. Sudden infant death syndrome due to parainfluenza virus 2 associated with hemophagocytic syndrome. *J Infect.* 49(4):329-32. 2004
6. Kashiwagi Y, Numabe H, Kawashima H, Mori M, Miyajima T, Tsuyuki K, Takekuma K, Hoshika A. A case report of Kabuki make-up syndrome with cytomegalovirus infection. *J Infect.* 48(3):278-82. 2004
7. Uzuka R, Kawashima H, Hasegawa D, Ioi H, Amaha M, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Chiba K. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by using multiplex PCR and real time PCR. *Pediatr Int.* 46(5):551-4. 2004
8. Sato S, Kawashima H, Oshiro H, Hasegawa D, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A. Virological and immunological characteristics of a 19-year-old Japanese female with fatal outcome with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome. *J Clin Virol.* 31(3): 235-8. 2004
9. 稲毛祐基子、荻原正明、河島尚志、五百井寛明、柏木保代、武隈孝治、山中奈緒子、星加明德。ロタウイルス感染症によりけいれん一重症例と軽症例の比較検討。小児科臨床 57(6); 1169,1174、2004
10. 稲毛祐基子(東京医科大学 小児科)、荻原正明、河島尚志、柏木保代、武隈孝治、星加明德。ロタウイルス感染症による重症の中中枢神経合併症。小児科 45(1); 62-68、2004
11. 河島尚志、五百井寛明、山中岳 特集 臓器別感染症(脳神経系)～中枢神経感染症—最近の話題 インフルエンザ脳症。化学療法の領域 20(10); 1441-1448, 2004
- (2) 学会発表
1. Kawashima H, Amaha M, Ioi H, Yamanaka G, Kashiwagi Y, Sasamoto M, Takekuma K, Hoshika A, Watanabe Y. NOx and zinc concentration in influenza-associated encephalopathy in children. 24th International Congress of Pediatrics in Cancun Mexico August 16th -20th, 2004
2. 五百井寛明、河島尚志、牛尾方信、天羽将博、柏木保代、武隈孝治、星加明德。パラインフルエンザ 2 型ウイルスの関与が考えられた来院時心肺停止の一例。第 45 回臨床ウイルス学会 (2004.6)
3. 五百井寛明、河島尚志、山中岳、加藤直樹、高見剛、柏木保代、篠本雅人、武隈孝治、星加明德。心肺停止状態で来院した小児とウイ

ルス感染との関連 第 10 回日本 SIDS 学会 2 月 28 日 2004

4. 鈴木一徳、山中岳、天羽将博、牛尾正孝、渡辺嘉章、小穴信吾、河島尚志、宮島祐、武隈孝治、星加明德 エンテロウイルス脳炎・脳症の臨床的検討 第 9 回日本神経感染症学会 10 月 8 日 9 日 2004

5. 菅波祐介、山中岳、中村美影、河島尚志、渡辺嘉章、宮島祐、武隈孝治、星加明德 インフルエンザ脳症の早期診断・重症度予測における髄液中活性酸素(Free Radical;d-ROM)の有用性 第 9 回日本神経感染症学会 10 月 8 日 9 日 2004

6. 山中 岳, 平良尚子, 渡邊嘉章, 五百井寛明, 山田直人, 篠本雅人, 河島尚志, 宮島祐, 武隈孝治, 星加明德. インフルエンザ脳症の初期臨床像および検査所見からの重症度予測. 第 106 回日本小児科学会学術集会. 2004, 4 .

7. 天羽将博, 河島尚志, 五百井寛明, 山中岳, 柏木保代, 篠本雅人, 宮島祐, 武隈孝治, 星加明德, 渡邊泰雄 分子モニタリングによるインフルエンザ脳症の病態解明 第 106 回日本小児科学会学術集会. 2004, 4

8. 山中岳、竹下ちひろ、鈴木一徳、小穴信吾、河島尚志、宮島祐、星加明德. ロタウイルス感染に伴いギラン・バレー症候群を発症したと考えられた 1 女児例. 第 44 回多摩小児神経懇話会. 2004, 5

9. 中村美影、山中岳、河島尚志、武隈孝治、星加明德、早川瑞穂 小児救急領域における IL-6 迅速テストの臨床応用 第 71 回東京医大免疫アレルギー研究会 5 月 25 日 2004

10. 河島尚志 シンポジウム:新興感染症の現況とその対応ーインフルエンザ脳症の現況 第 154 回東京医科大学医学会総会 11 月 6 日 2004

11. 佐藤亜貴子, 五百井寛明, 河島尚志, 西

亦繁雄, 篠本雅人, 飯泉守, 武隈孝治, 星加明德エンテロウイルスの関与が考えられた小児急死例の肝病理 第 31 回日本小児栄養消化器肝臓学会 9 月 18 日 19 日

12. 天羽将博、河島尚志、五百井寛明、牛尾方信、上島肇、熊田篤、星明祥、柏木保代、武隈孝治、星加明德、エンテロウイルスの RNA 定量化法の開発とその臨床応用第 36 回日本小児感染症学会 11 月 13 日 2004

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. インフルエンザ脳症と対照群の髄液中のNO_x値 (*: P<0.05)

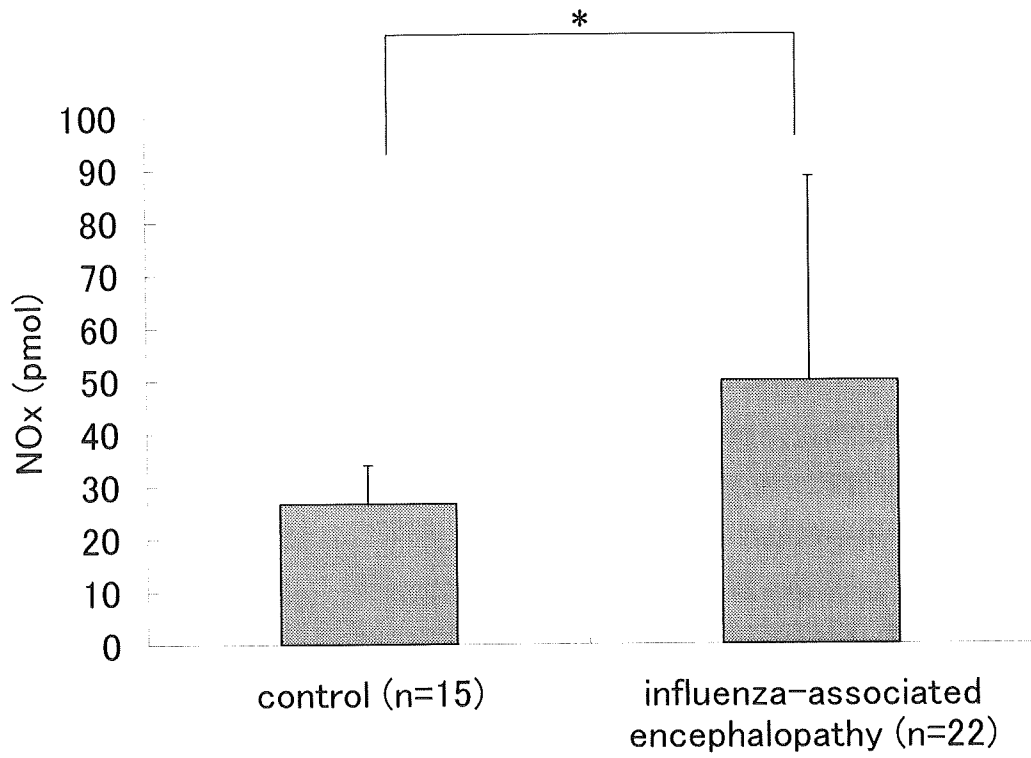


図2. インフルエンザ脳症の予後別の髄液中のNO_x (**: P>0.05)

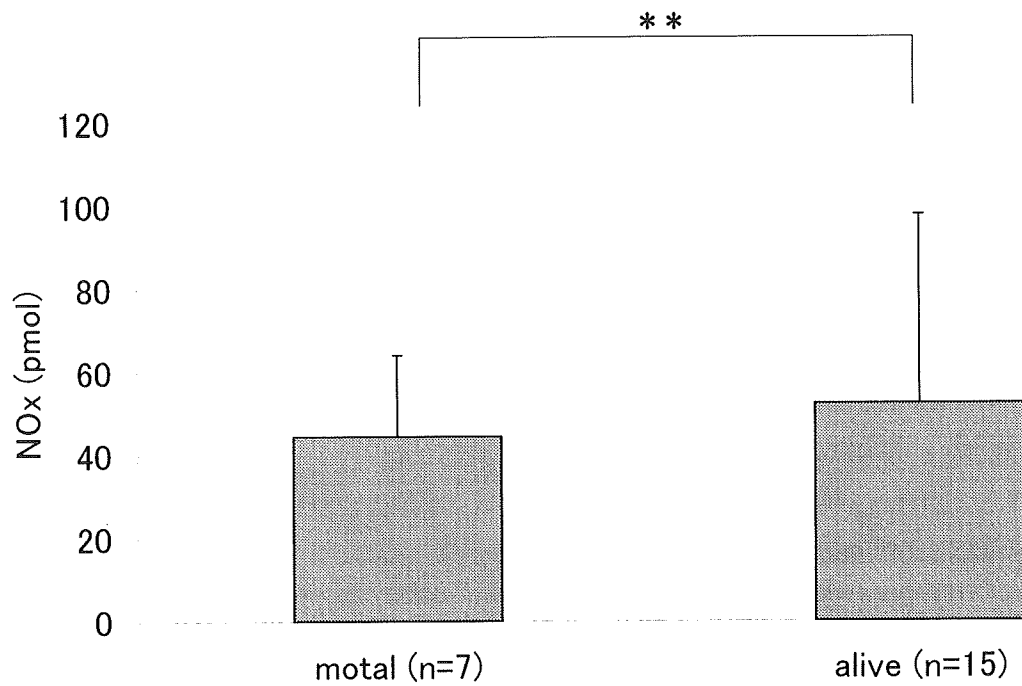


図3. インフルエンザ脳症と各種疾患における血清中亜鉛濃度 (*:P<0.05,**:P>0.05)

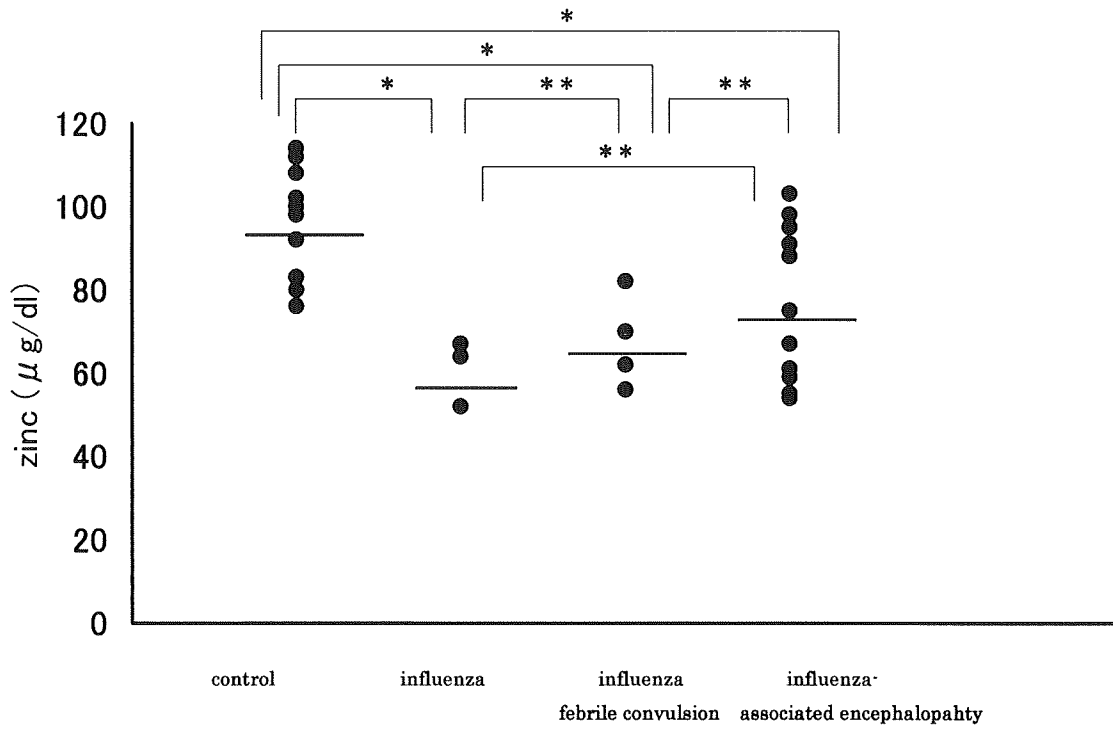


図4. 予後別でみたインフルエンザ脳症における血清中亜鉛濃度 (**: P>0.05)

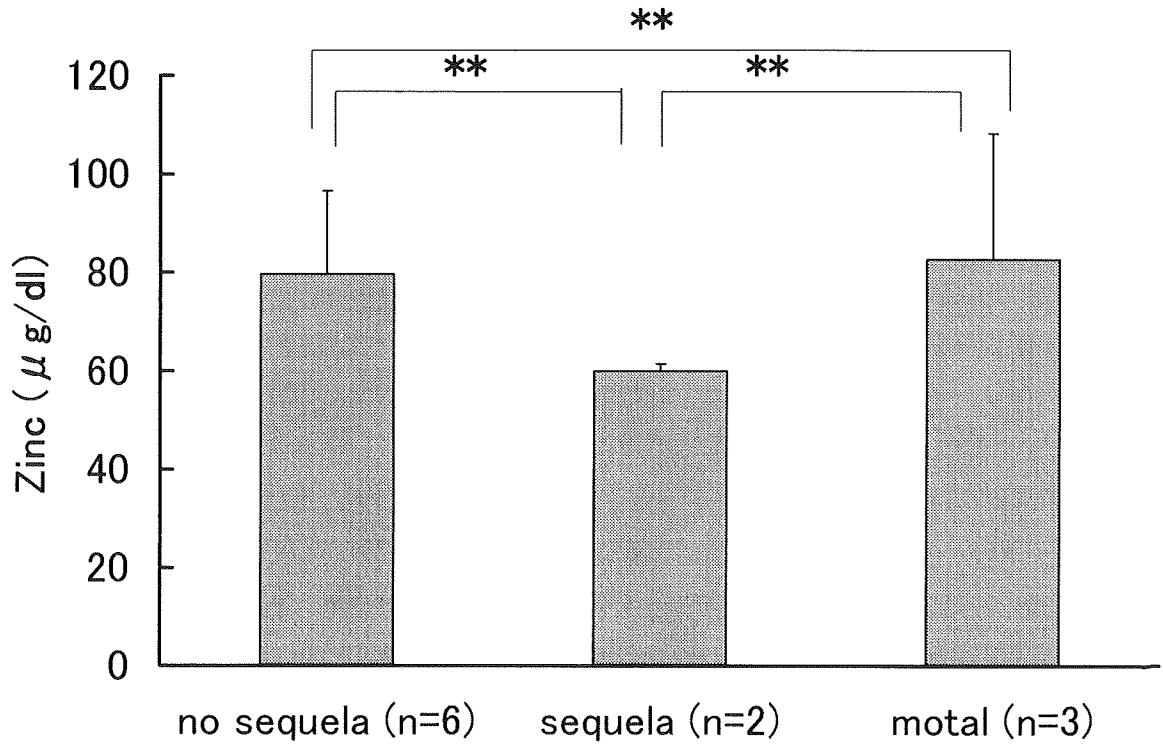


表1. A, B群の臨床的特長

症例	年齢	性別	入院時 意識レベル	脳波	最高体温	持続時間		譫妄	特殊治療	転帰 後遺症	
						意識障害(時)	けいれん(分)				
A	1	3y	男	100	平坦	41.3	*	15	+	DXA	死亡
	2	9y6m	女	100	全般性徐波	41.6	*	80	-	PSL, γ -glo, SYM	死亡
	3	3y5m	男	100	全般性徐波	39.8	360	180	-	PSL, PE, TAM	失語症, 症候性てんかん
	4	4y1m	男	100	全般性徐波	41.2	120	2	-	PSL, PE, TAM	一過性歩行障害
B	5	2y8m	男	100	徐波 (後頭葉優位)	40.6	101	31	+	DXA, SYM	一過性歩行障害
	6	4y	男	200	全般性徐波	40	120	5	+	PSL, TAM	-
	7	1y4m	男	200	徐波混入	40.8	120	60	-	DXA, TAM,	-
	8	6y3m	男	100	高振幅徐派	39.8	108	1	-	-	-

* ; 意識が清明になることなく死亡
DXA ; dexamethasone, PSL ; methylpredonisorone pulse ,
PE ; plasma exchange, γ -globulin
TAM ; oseltamivir, SYM ; amantadine,

表2. A, B群の入院時血液検査所見

症例	型	F - D	GOT	LDH	CPK	Plt (10^3)	Cr	TG	Ferritin	IL-6	
A	1	A	10	39	-	95	301	0.45	ND	ND	89300
	2	A	19	28	422	68	232	0.31	41	ND	65.0
	3	A	13	46	567	124	311	0.42	89	175	91.6
	4	A	57	106	982	145	166	0.92	57	3019	161.0
B	5	A	22	46	932	909	167	0.85	281	61	287.0
	6	B	20	67	632	145	154	0.32	1136	48.8	61.2
	7	A	21.5	98	1014	3294	194	0.2	49	70.3	28.6
	8	A	29	74	598	2646	161	0.33	36	140	18.2

F - D ; 発熱から血液検査するまでの時間

表3. C群の臨床的特長

症例	年齢	性別	入院時 意識レベル	最高体温	持続時間		譫妄	その他	後遺症
					意識障害(時)	けいれん(分)			
9	1y2m	男	100	40	28	15	—	LDH ↑	—
10	2y	男	200	39.3	31	1	—		—
11	7y	男	100	40	22	40	—	IL-6 ↑	—
12	11y10m	男	10-30	40.3	23	?	+	Cr, IL-6 ↑	—
13	2y	男	200-300	41	24	1	—	LDH, Ferritin ↑	—
14	3y2m	女	100	38.5	22	20	—		—
15	3y11m	女	100	40.3	24	40	—		—
16	2y10m	男	20-30	39.4	12	2	—	IL-6 ↑	—
17	5y1m	男	1-2	40	8	2	—	LDH, Ferritin ↑	—
18	2y10m	女	1-3	39.1	5	1	—		—
19	2y	女	20-30	39.6	8	5	—	Ferritin, IL-6 ↑	Todd麻痺

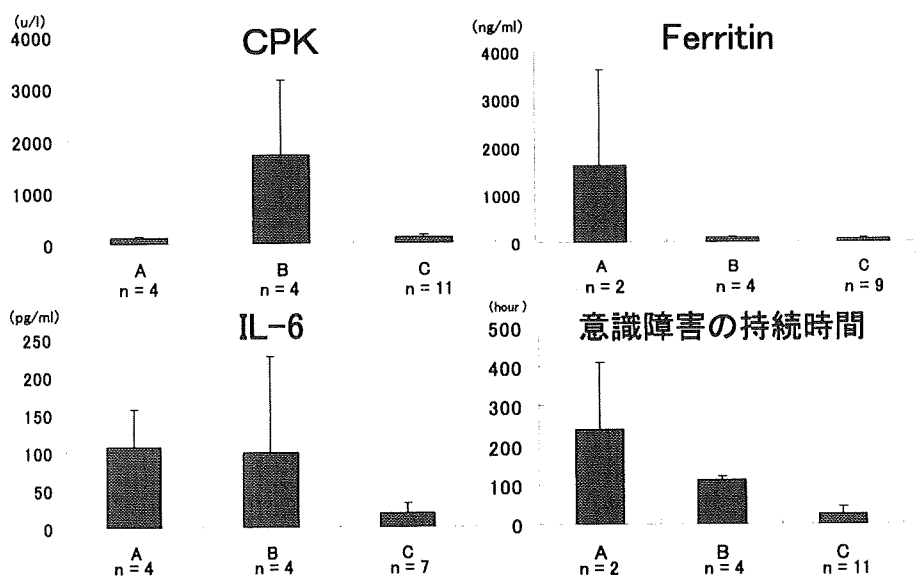
表4. C群の入院時血液検査所見

症例	GOT	LDH	CPK	Plt (10^9)	Cr	TG	Ferritin	IL-6
9	48	745	141	384	0.26	ND	ND	ND
10	29	564	72	215	0.3	37	48.9	3.2
11	32	426	87	213	0.44	37	52.4	42.2
12	37	412	120	177	0.61	1024	56	26.8
13	51	570	63	259	0.38	182	96	ND
14	31	515	79	159	0.25	ND	ND	6.4
15	36	435	78	236	0.37	53	7.4	ND
16	32	551	78	196	0.37	66	37	12
17	58	628	277	204	0.32	84	117.9	ND
18	34	630	66	207	0.28	ND	34	7.3
19	80	554	72	412	0.31	131	67	25.9

表5. 発熱から異常値が検出されるまでの時間

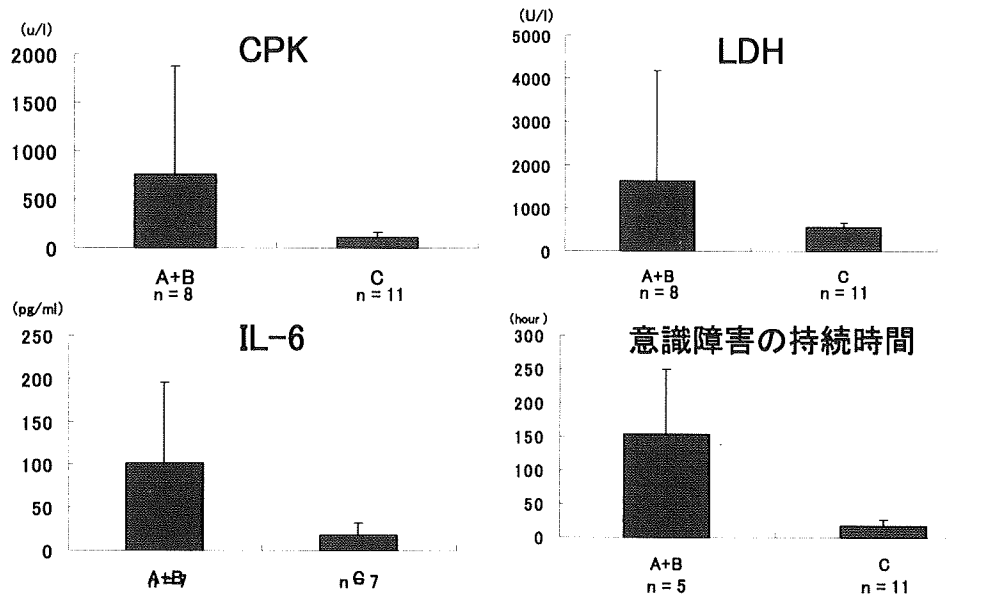
症例	IL-6, Ferritin, TG を除いた値	IL-6, Ferritin, TG を含めた値	初期に上昇した検査項目	
A	1	20	10	IL-6
	2	34	19	IL-6
	3	44	13	Ferritin, IL-6
	4	57	57	GOT, LDH, Cr, Ferritin
B	5	22	22	CPK, Cr, TG
	6	20.5	20	TG, IL-6
	7	21.5	21.5	GOT, LDH, CPK, Ferritin, IL-6
	8	29	29	CPK, Ferritin, IL-6
平均(時間)	31.4±13.1	23.9±14.6		

図5. A, B, C群の比較



3群間(A, B, C)でCPK, Ferritin, IL-6, 意識障害持続時間に有意差 ($p < 0.05$)が確認された。

図6. A+B群とC群の比較



2群間(A+B, C)の差はCPK, LDH, IL-6, 意識障害の持続時間にて有意差($p < 0.05$)が確認された。

インフルエンザ脳症患者の有機酸・脂肪酸代謝プロファイルの検討

分担研究者 山口清次（島根大学医学部小児科教授）

研究協力者 長谷川有紀、小林弘典、内田由里、高橋あんず、木村正彦（島根大学小児科）

鍵本聖一（埼玉県立小児医療センター）

研究要旨

インフルエンザ脳症 23 例の有機酸・脂肪酸代謝プロファイルを検討した。全例インフルエンザ抗原陽性を確認し、A 型 12 名、B 型 9 名、型不明 2 名であった。23 例中 3 名が先天代謝異常の存在を示唆する所見を示した（イソ吉草酸血症、低カルニチン血症、脂肪酸代謝異常症）。このほか 5 名は代謝異常疑いの所見であった。血中カルニチンは正常以下の値を示したものが 2 例、5 例は正常下限であった。有機酸・脂肪酸代謝異常に共通する所見としてカルニチン欠乏をきたしやすいことがあげられる。カルニチン低下をきたす後天的要因として一部の解熱剤、抗生剤、あるいはバルプロ酸などの長期服用もあげられる。さらにインフルエンザに罹患したとき食欲低下による食事水分摂取の不足状態も起こしやすい。インフルエンザ感染細胞で生成されるミトコンドリア機能障害を誘発する蛋白も知られている。これらをあわせて考えると、たとえ軽症であっても背景に有機酸・脂肪酸代謝異常を持っているとインフルエンザ脳症をきたす可能性が高い。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症の発症メカニズムは種々の要因が想定されているがまだ明らかではない。有機酸・脂肪酸代謝異常症は正常に生活していた小児が、感染などを契機に突然急性脳症や突然死のような形態で発症することがあり、インフルエンザ脳症の背景疾患との関連が疑われている。そこで、インフルエンザ脳症と診断された患者の有機酸・脂肪酸代謝について検討した。

B. 研究方法

2004 年 3 月～2005 年 2 月の期間に、イ

ンフルエンザ脳症と臨床的に診断され島根大学に代謝検索を依頼された 23 例の代謝プロファイルを検討した。GC/MS によって尿中有機酸分析を行ない、タンデムマスを用いて血中アシルカルニチンを行なった。タンデムマス分析のアシルカルニチンプロファイルの C0 を血中遊離カルニチンとした。

C. 研究結果

1) 有機酸分析を依頼された急性脳症患者の季節的変動