

monocytes/macrophages during acute Kawasaki disease. *Rheumatology* 2005; 44: 314-317.

8) Ichiyama T, Maeba S, Suenaga N, Saito K, Matsubara T, Furukawa S: Analysis of cytokine levels in cerebrospinal fluid in mumps meningitis: comparison with echovirus type 30 meningitis. *Cytokine* 30: 243-247, 2005

9) Ichiyama T, Hasegawa M, Ueno Y, Makata H, Matsubara T, Furukawa S: Cysteinyl leukotrienes induce monocyte chemoattractant protein 1 in human monocytes/macrophages. *Clin Exp Allergy* 35: 1214-1219, 2005

10) Ichiyama T, Morishima T, Suenaga N, Kajimoto M, Matsubara T, Furukawa S: Analysis of serum soluble CD40 ligand in patients with influenza virus-associated encephalopathy. *J Neurol Sci* 239: 53-57, 2005

11) Ichiyama T, Kajimoto M, Suenaga N, Maeba S, Matsubara T, Furukawa S. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor (TIMP-1) in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* in press

12) Ichiyama T, Siba P, Suarkia D, Reeder J, Takasu T, Miki K, Maeba S, Furukawa S. Analysis of serum and cerebrospinal fluid cytokine levels in subacute sclerosing panencephalitis in Papua New Guinea. *Cytokine* in press

## 2. 学会発表 (シンポジウム、ワークショップのみ)

1) 市山高志. シンポジウム. テオフィリンによる転写因子 NF- $\kappa$ 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

2) 市山高志. シンポジウム. 喘息治療薬の

抗炎症作用—NF- $\kappa$ 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

3) 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.

4) 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.

5) 市山高志, 長谷川真成, 真方浩行, 金子美保, 松原知代, 古川 漸. ワークショップ. Cysteinyl leukotriene による CD14<sup>+</sup> 単球からの MCP-1 産生. 第 107 回日本小児科学会学術集会. 岡山. 2004. 4. 9-11

6) 市山高志. シンポジウム. 脳炎・脳症のサイトカイン解析. 第 9 回日本神経感染症学会. 弘前. 2004. 10. 8-9

7) 市山高志. シンポジウム. ウイルス性発疹症に伴う急性脳炎・脳症. 第 29 回日本小児皮膚科学会. 宇部. 2005. 7. 2-3

8) 市山高志, 金子美保, 松原知代, 古川 漸. NF- $\kappa$ B 活性化および CD16 (Fc $\gamma$ RIII) 発現抑制に対する免疫グロブリン製剤とステロイド薬の比較. 第 25 回日本川崎病研究会. 東京. 2005. 10. 14-15

## G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

インフルエンザ関連脳症の早期診断における脳波・

IL-6 の有用性に関する研究

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 講師  
研究協力者 福本由紀子 岡崎市民病院小児科 医員

**研究要旨**

インフルエンザの中枢神経合併症において、発症早期に脳波および血清サイトカインを測定しその有用性について検討した。脳波では、全般性徐波化を脳症 2 例と熱せんもう 1 例とに、局所性徐波化を熱せんもう 4 例と熱性けいれん 4 例とに認めた。血清 IL-6 値は、脳症 2 例で 100pg/ml 以上、熱せんもう・熱性けいれんでは 20-100pg/ml の症例が多く、合併症なしでは 20pg/ml 未満が大半を占めた。脳波における全般性徐波化と血清 IL-6>100pg/ml との両者を満たした症例は、脳症の 2 例のみであった。血清 IL-6 値と脳波所見とを組み合わせることが、インフルエンザ関連脳症の早期診断に有用であることが示唆された。

**A. 研究目的**

熱せんもうは高熱時におこる一過性の意識障害で、インフルエンザをはじめとする小児の熱性疾患においてしばしば経験する。一方、インフルエンザ関連脳症の初期に異常行動がみられることがあることが一般に認知され、脳症と脳症を伴わない熱せんもうとの鑑別がしばしば問題になる。インフルエンザ関連脳症にはサイトカインが関与していることが報告されているが、熱せんもうにおいてサイトカインを検討した報告はほとんどない。我々は、熱せんもうをはじめとするインフルエンザの中枢神経合併症において脳波および血清中サイトカインを測定し、臨床像との関係について検討した。

**B. 研究方法**

平成 14 年から 16 年の冬季に咽頭ぬぐい液のインフルエンザ抗原が陽性であった患者 36 例について、血清中サイトカイン

を測定した。意識障害が 24 時間以上持続し、かつ脳波で明らかな徐波化を認めたものを脳症群（2 例）、脳症を伴わない異常行動を認めた症例を熱せんもう群（10 例）、熱性けいれんを認めた症例を熱性けいれん群（17 例）とし、中枢神経合併症を認めない症例（7 例）を対照群とした。

中枢神経症状合併例では、中枢神経症状が出現後可能な限り速やかに脳波を記録した。脳波は覚醒時を必ず記録し、正常の基礎波を認める群（正常）、後頭部に限局した高振幅徐波が混入する群（局所性徐波化）、基礎波が消失して高振幅徐波で置換される群（全般性徐波化）の 3 つに分類した。また、全例でインフルエンザと確定診断後、可能な限り速やかに血清中サイトカインを測定した。

**C. 研究結果**

1) 中枢神経合併症と脳波所見  
脳波は脳症群 2 例、熱せんもう群 9 例、

熱性けいれん群 5 例で記録された。全般性徐波化は脳症群の 2 例と熱せんもう群でそれぞれ 1 例ずつ認めた。局所性徐波化は熱せんもう群 4 例と熱性けいれん群の 4 例とに認めた。

## 2) 中枢神経合併症とサイトカイン

血清 IL-6 は、脳症群では 2 例とも 100pg/ml 以上であった。一方、熱せんもう群では平均 31.2pg/ml (範囲 7.5-64.5 pg/ml)、熱性けいれん群では平均 42.3pg/ml (範囲 8.0-196.0 pg/ml)、対照群では平均 15.4pg/ml (範囲 7.2-28.0 pg/ml) だった。熱せんもう群・熱性けいれん群・対照群の 3 群間には有意差を認めなかった。しかし、血清 IL-6 値を 100pg/ml 以上、20-100pg/ml、20pg/ml 未満に区切ると、脳症群は 2 例とも 100pg/ml 以上、熱せんもう群・熱性けいれん群は 20-100pg/ml の症例がそれぞれ 9 例・11 例で、対照群は 20pg/ml 未満が 6 例であった。

血清 TNF- $\alpha$  は熱せんもう群・熱性けいれん群・対照群の 3 群間に有意差を認めなかった。また、血清 sTNF-R1 は脳症の死亡例では 2570pg/ml と脳症群・熱せんもう群・熱性けいれん群に比べ高値だったが、熱せんもう群・熱性けいれん群・対照群の間には有意差を認めなかった。

## 3) 中枢神経合併症と脳波・サイトカインとの関係

脳波における全般性徐波化と血清 IL-6 >100pg/ml と両者を満たした症例は、脳症の 2 例のみであった。脳波で全般性徐波化を認めた熱せんもうの患者の血清 IL-6 は 100pg/ml 未満であった。熱せんもう群・熱性けいれん群では局所性徐波化と軽度の IL-6 上昇とを認める症例が多かった。

## D. 考察

インフルエンザ関連脳症については現在まで確立された治療法はなく、その予後

の改善には早期診断が望まれる。インフルエンザ関連脳症の初期にみられる異常行動と脳症でない熱せんもうとの鑑別を行い、早期に治療を開始することが可能になれば予後の改善に有用であると考えられる。これまでの我々の研究で、熱せんもうでは脳波所見で後頭部に比較的限局した徐波化を示し、脳症との鑑別に有用であることを明らかにした。また、インフルエンザ関連脳症の重症度と IL-6 をはじめとするサイトカイン値との間には相関があることが知られている。我々はこれらの組み合わせによるインフルエンザ関連脳症の早期診断について検討した。

今回の研究の結果から、血清 IL-6 は熱せんもうや熱性けいれんでも軽度に上昇するが、その上昇の程度は脳症のほうが熱せんもう・熱性けいれんよりも強いことが明らかになった。したがって、発症早期に血清 IL-6 を測定することが脳症と脳症以外の熱せんもうとの鑑別に有用になる得ることが示唆された。また、血清 sTNF-R1 も急性脳症で、著しく上昇することがあり、脳症と脳症以外の熱せんもうとの鑑別に有用である可能性が示唆された。

一方脳波所見では、脳症では全般性徐波化を認めた一方で、熱せんもうの症例でも 1 例のみであるが同様の所見を認めた。このことは、脳波所見のみから完全に脳症と熱せんもうとを鑑別することが困難であることを示唆する。したがって、単独のパラメータではなく複数のパラメータを用いる必要がある。

そこで、脳波所見と血清 IL-6 値とを組合せた結果、脳波における全般性徐波化と血清 IL-6 >100pg/ml との両者を満たした症例は脳症の症例に限られた。したがって、脳波所見とサイトカイン値とを組み合わせることにより、より高い精度で脳症と脳症以外の熱せんもうや複雑型熱性けいれ

んとの鑑別ができることが期待されると思われた。

## E. 結論

インフルエンザに伴う中枢神経合併症の重症度と血清 IL-6 値との間には相関関係が認められた。また脳波では、脳症では全般性徐波化を認めたのに対し、脳症以外の熱せんもうでは局在性徐波化を認めた。血清 IL-6 値と脳波所見とを組み合わせることが、インフルエンザ関連脳症の早期診断に有用であることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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* 2003; 1: 35-38.
- 2) Okumura A, Uemura N, Suzuki M, Itomi K, Watanabe K. Unconsciousness and delirious behavior in children with febrile seizures. *Pediatric Neurology* 2004; 30: 316-319.
- 3) Okumura A, Nakano T, Fukumoto Y, Higuchi K, Kamiya H, Watanabe K, Morishima T. Delirious behavior in children with influenza: its clinical features and EEG findings. *Brain and Development* 2005; 27: 271-274.
- 4) Okumura A, Fukumoto Y, Hayakawa F, Nakano T, Higuchi K, Kamiya H, Watanabe K, Morishima T. Antipyretics and delirious behavior during febrile illness. *Pediatrics International* 2006; 48: 40-43.
- 5) Okumura A, Morishima T, Kubota T, Kato T. Oseltamivir and Delirious

Behavior in Children with Influenza. *Pediatric Infectious Disease Journal*, in press.

- 6) Kakizawa H, Okumura A, Suzuki Y, Natsume J, Kimura H, Negoro T, Watanabe K. Congenital cytomegalovirus infection diagnosed by polymerase chain reaction with the use of preserved umbilical cord. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2005; 24: 653-654.
- 7) 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.
- 8) 奥村彰久. テオフィリンと有熱時けいれん. *小児科臨床* 59: 223-228, 2006.
- 9) 奥村彰久. 生理検査の選択と解釈. *小児内科* 38: 155-158, 2006.
- 10) 糸見和也, 奥村彰久, 加藤徹, 藤本伸治, 根来民子, 久野邦義, 渡辺一功. 亜急性に発症して高次脳機能障害を残す脳炎・脳症. *脳と発達* 37: 467-472, 2005.
- 11) 福本由紀子, 奥村彰久, 伊藤浩明. テオフィリン投与中に発症した熱性けいれん. *小児科* 46: 269-272, 2006.

### 2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 生田岳人, 辻健史, 近藤容子, 柿澤裕子, 加藤徹, 奥村彰久, 根来民子,

夏目淳、祖父江文子、柳瀬陽一郎、服部哲夫. 特異な MRI 所見を呈したインフルエンザ関連脳症の 1 例. 第 21 回日本小児神経学会東海地方会、名古屋、2005. 6. 26.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)  
分担研究報告書

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

分担研究者 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において分子モニタリングにより病態解明を試み、NOx は髄液中で有意に高値を示した。また、ラジカルスカベンジャーの役目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ることを見出した。また、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。IL-6 とフリーラジカルの迅速測定を用い臨床応用を行った。しかし、一部には血液上異常を示さないタイプの患者もいることが判明した。また、PELOD の重症度スコアリングもインフルエンザ脳症の臨床に用いられることが知れた。

A. 研究目的

以前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 NOx 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、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

1) 血清亜鉛: 11例のインフルエンザ脳症を対象とした。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、インフルエンザ単独患者と熱性痙攣患者の血清とも比較した。亜鉛濃度は原子吸光度計にて測定した。

2) IL-6: 15例のインフルエンザ脳症(1-11歳)において来院時の血清中の IL-6 を chemoluminescence Enzyme Immunoassay (CLEIA) by using Lumipulse 1 (Fujirebio Diagnostics Inc, Tokyo, Japan) で測定した。結果は 30 分以内に結果を得て治療方針に反映させた。対象として 9 例の熱性痙攣、5 例のロタウイルス関連痙攣を用いた。

3) d-ROM: インフルエンザ脳症 8 例(4 例は死亡ないし後遺症あり)、インフルエンザ関連熱性痙攣 2 例、熱性痙攣 3 例、エンテロウイルス関連脳症 4 例(1 例は後遺症)を対象として髄液中の総フリーラジカル d-ROM (Diacron- Reactive Oxygen

Metabolites, Italy) を FRAS にて測定し臨床像や血液検査等と比較検討した。

4) PELOD score の検討：インフルエンザ脳症 15 例とインフルエンザ感染に伴う有熱時けいれん 13 例を対象とした。IE は死亡もしくは神経学的後遺症を伴った A 群(5 例) と神経学的後遺症を伴わなかった B 群(10 例) に分類し、IFS を C 群(13 例) とした。

### C. 研究結果

1) 血清亜鉛：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。

2) IL-6: 血清 IL-6 は熱性痙攣や痙攣に伴うロタウイルス患者と有意差はなかった。しかし、重症群と軽症群では有意差を認めた。

3) d-ROM: 髄液中の d-ROM は脳症群でインフルエンザ関連痙攣や熱性痙攣群に比べ有意に高かった。一方、髄液中の IL-6 と d-ROM 以外に群間で有意差はなかった。

4) PELOD score: 意識障害の持続時間における 3 群間の比較では、A 群が B、C 群に比べ明らかに持続時間が長かった。しかしながら、けいれんの持続時間では有意差は確認されなかった。入院初期の検査所見で、血清 IL-6、CK、LDH、CRP は A+B 群は C 群に比べ有意に高値であった。3 群間の比較では、ferritin のみが A 群で明らかに高値であった。その他の血液検査(白血球、血小板、血糖、AST、Cr、TG) は 3 群間の比較で有意差は認められなかった。A+B 群にお

いて、発熱後平均 34.5 時間、けいれん後平均 19.4 時間後に一般血液検査で異常値を示し、TG、ferritin、IL-6 を含めれば入院時に 1 例を除き異常値が検出可能であった。PELOD score と共に最重症時から入院時を差し引いた  $\Delta$ PELOD score を評価したところ、A 群が明らかに高値を示した。その他に血液上まったく異常値を認めない予後不良例があり、この患者でも髄液中の IL-6 と d-ROM は高値であった。

### 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 NOx 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。

②インフルエンザ脳症患者では髄液中のフ

リーラジカルの迅速測定が臨床的に有用である。

- 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 測定は有用である。
- ③多臓器不全の scoring がインフルエンザ脳症でも有用である。
- ④血液上全く異常値を示さない予後不良患者がいる。

## F. 研究発表

### (1) 論文発表

#### ①著書

1. 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. 河島尚志 インフルエンザ脳炎・脳症について 医療者のためのインフルエンザの知識-医学書院 pp86-90

#### ②学術論文

1. Kawashima H. et al. Extraordinary changes in excitatory amino acid levels in cerebrospinal fluid of influenza-associated encephalopathy of children. *Neurochem Res.* 29 (8) :1537-40. 2004
2. Kawashima H. et al. Nitrite/nitrate (NOx) and zinc concentrations in influenza-associated encephalopathy in children with different sequela. *Neurochem Res.* 30 (3) :311-4. 2005
3. Kawashima H. et al. Efficacy of plasma exchange and methylprednisolone pulse therapy on influenza-associated encephalopathy. *J Infect.* 51 (2) :E53-6. 2005

4. Nakamura M. et al. Clinical application of rapid assay of interleukin-6 in influenza-associated encephalopathy *Disease Markers* 21:1-4 (in press) 2005
5. Yamanaka G. K et al. Diagnostic and predictive value of CSF d-ROM level in influenza virus-associated encephalopathy. *J Neurological Science* (In press) 2006
6. 河島尚志、他 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
7. 河島尚志 インフルエンザ脳症の現状 *東京医科大学雑誌* 63: 97-103. 2005
8. 河島尚志他. 特異な経過を呈した分類不能なインフルエンザ脳症の1男児例. *東医大誌* 64 [2]、(in press)、2006
9. 山中岳、平良尚子、河島尚志、渡邊嘉章、五百井寛明、宮島 祐、武隈孝治、星加明徳インフルエンザ脳症重症度予測。日本小児科学会誌 (in press)

### (2) 学会発表

1. Kawashima H. et al. and zinc concentration in influenza-associated encephalopathy in children 24th International Congress of Pediatrics in Cancun Mexico August 16th -20th, 2004
2. 菅波祐介他 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 2004
3. 山中 岳他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. 天羽将博他 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

5. 中村美影他 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

6. 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 2004

7. 河島尚志他。metabolome によるインフ  
ルエンザ脳症髄液中の特異 biomarker の検  
出。第 108 回小児科学会総会 2004

8. 山中岳他。小児中枢神経疾患の早期診  
断・重症度予測における髄液中 Free  
Radical (d-ROM) の有用性。第 47 回日本小  
児神経学会 2005

9. 管波佑介他。特異な経過を呈した分類  
不能なインフルエンザ脳症の 1 男児例、第  
354 回東京医科大学臨床懇話会 2005

#### G.知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

病態の解明特に先天代謝異常との関連に関する研究

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、Jamiyan P、小林弘典、遠藤充  
（島根大学医学部小児科）

研究要旨

質量分析を用いた代謝スクリーニングによって、インフルエンザ脳症患者 70 例中 8 例（11%）に先天代謝異常を疑わせる所見がみられた。インフルエンザ脳症の少なくとも 10% 近くに先天代謝異常が隠れている可能性がある。インフルエンザ脳症の中に FDPase 欠損症が見い出されたが、本症ではグリセロール投与は禁忌であり注意を要する。インフルエンザ脳症患者 70 例中 23 例にグリセロール投与が行われていた。パルプロ酸代謝産物が 70 例中 10 例にみられたが、背景にけいれん性疾患を持っている小児はインフルエンザ脳症のリスクが高いと考えて診療に当たるべきである。また長期間セフェム系抗生剤が投与されたために 2 次性カルニチン欠乏に陥り脳症を発症した症例もあった。診療の場で注意を要する。

A. 研究目的

通常は正常と変わらぬ生活をしているが、感染、発熱、下痢などを契機に急性脳症のような形態で発症する先天代謝異常がある。代表的な疾患として有機酸・脂肪酸代謝異常が知られている。インフルエンザ脳症の背景にこの領域の疾患がないかどうかを検討した。

B. 研究方法

2001～2005 年の 5 年間にインフルエンザ脳症と診断された患者 70 例の尿と血液を分析した。分析項目は以下の通りである。

1) 尿中有機酸：溶媒抽出法で検体を前処理して誘導体化して行う GC/MS 分析。

2) 尿中グリセロール、グリセロール-3-リン酸：直接乾燥による検体前処理、誘導体化、GC/MS 分析・選択イオンモニタリン

グ（SIM-GC/MS 法）。

3) 血中アシルカルニチン：血液ろ紙、または血清を用いた ESI-タンデム型質量分析（タンデムマス）。

C. 研究結果

表 1 に示すように、70 例中 8 例に先天代謝異常を疑わせる所見がみられた。メチルマロン酸血症が 1 例見いだされた。インフルエンザ脳症を契機に初めて顕在化した。低血糖発作を主徴とする糖新生系酵素異常症であるフルクトース-1, 6-ジホスファターゼ（FDPase）欠損症を示唆する症例も 1 例発見された。脂肪酸代謝異常症として CPT2 欠損症、全身性カルニチン欠乏症を各 1 例同定された。この他に、ミトコンドリア  $\beta$  酸化異常を示唆する非ケトン性ジカルボン酸尿がみられた症例が 4 例あった。

後天的な所見として、グリセロール治療によると思われるグリセロール尿が 23 例にみられた。またバルプロ酸代謝産物が 10 例にみられ、抗生剤長期使用によるカルニチン欠乏症と考えられる症例が 1 例見いだされた。

#### D. 考察

最近 5 年間に分析依頼を受けたインフルエンザ脳症 70 例のうち、先天代謝異常の疑われた症例は 8 例あった。この中に非ケトン性ジカルボン酸尿症 4 例が含まれているが、4 例すべてが先天性脂肪酸代謝異常とは断定できない。なぜならインフルエンザ脳症の非特異的所見の可能性が否定できないからである。以上の結果から、インフルエンザ脳症の背景にある先天代謝異常の頻度は 5～10%程度と推測される。

インフルエンザ脳症 70 例中 1 例に FDPase 欠損症と考えられる症例が見出された。本症では、グリセロール投与は禁忌と考えられており、FDPase 欠損症がかくれている場合、症状を増悪させる可能性があるので注意を要する。インフルエンザ脳症 70 例中 23 例にグリセロールが使用されている所見がみられた。また FDPase 欠損症患者でグリセロールと G3P を経時的に追跡した経験によると、本症を生化学診断するためには、グリセロールを投与されない状態で急性期から 12 時間以内の尿の分析が望ましいと思われる。

ミトコンドリア脂肪酸代謝異常症として CPT2 欠損症、全身カルニチン欠乏症が発見された。ミトコンドリア脂肪酸酸化異常を示唆する非ケトン性ジカルボン酸尿症が 4 例にみられたが、特異的診断には限界があり、他の方法による確定診断が必要である。

この他の 2 次的所見として、バルプロ酸の代謝産物が 70 例中 10 例に検出された。この頻度は一般集団に比べ有意に高い。こ

のことを考えるとインフルエンザ脳症の起こる要因として、背景にけいれん性疾患のあることも念頭におくべきである。またセフェム系抗生剤の長期間投与によって 2 次性低カルニチン欠乏症の見られた症例も 1 例あった。一般診療の場で留意すべきである。

#### E. 結論

インフルエンザ脳症患者の 10%近くが、背景疾患として先天代謝異常を持っている可能性があると考えべきである。カルニチン欠乏など脂肪酸代謝障害が関与していることが多い。FDPase 欠損症も見出されたが、本症ではグリセロール投与は禁忌であり急性脳症の治療の際に注意を要する。けいれん性疾患を持っている小児はインフルエンザ脳症のリスクが高いと思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 山口清次：新生児マススクリーニングの新しい動き— 質量分析の導入による新展開 — 日本医事新報 4175 (2004. 5. 1) : 19-25, 2004.
- 2) 長谷川有紀、山口清次：インフルエンザ脳症に対する先天代謝異常スクリーニングの重要性. 小児科 45 : 1611-1620, 2004.
- 3) Hori D, Hasegawa Y, Kimura M, Yang YL, Verma IC, Yamaguchi S: Clinical onset and prognosis of Asian children with organic acidemias, as detected by analysis of urinary organic acids using GC/MS, instead of mass screening. Brain & Development 27: 39-45, 2005.
- 4) Chen Y, Mizuguchi H, Yao D, Ide M, Kuroda Y, Shigematsu YY, Yamaguchi S, Yamaguchi M, Kinoshita M, Kido H: Thermolabile phenotype of carnitine

palmitoytransferase II variations as a predisposing factor for Influenza-associated encephalopathy. FEBS Letter 579: 2040-2044, 2005.

5) 長谷川有紀、山口清次：先天代謝異常—有機酸・脂肪酸代謝異常患者に対する感染時の対応—。小児科臨床 58(12)：2480-2484, 2005.

2. 学会発表

1) Yamaguchi S: Natural history and prognosis of children with organic and fatty acid disorders. 5<sup>th</sup> Asia Panpacific Regional Meeting of International Society for Neonatal Screening. Shanghai, 2004.

2) 長谷川有紀, 堀 大介, 木村正彦, 安達昌功, 立花克彦, 黒田泰弘, 重松陽介, 山口清次：インフルエンザ脳症の発症と有機酸血症との関連：GC/MSによる有機酸分析結果の検討。第107回日本小児科学会学術集会。岡山, 2004.

3) 山口清次：SIDS様の症状で発症する先天代謝異常：有機酸・脂肪酸代謝異常の重要性。第11回日本SIDS学会、盛岡、2005.

4) 山口清次：日常診療における代謝疾患の重要性とアプローチ。第103回日本小児科学会福島地方会。福島、2005.

5) 小林弘典, 長谷川有紀, 木村正彦, 山口清次：原発性及び2次性カルニチン欠乏症のタンデムマスによる診断アプローチ。第48回日本先天代謝異常学会 熊本、2005.

G. 知的所有権の取得状況

特許取得、実用新案登録：該当なし。

表1. インフルエンザ脳症 70 例の代謝解析結果

1) メチルマロン酸血症	1 例
2) FDPase 欠損症	1 例?
3) CPT2 欠損症	1 例
4) 全身性カルニチン欠乏症	1 例
5) 脂肪酸代謝異常疑い (非ケトン性ジカルボン酸尿症)	4 例?
6) その他	
バルプロ酸代謝産物	10 例
2次性カルニチン欠乏症 (抗生剤)	1 例

## －アポトーシスとミトコンドリアと脳圧降下剤－ インフルエンザ脳症における関与について

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部長

### 研究要旨：

B 型インフルエンザの心筋炎による死亡例で心筋と肝にも同時に広範なアポトーシスを認め、アポトーシスが同時に多臓器に引き起こされる可能性が示された。一方、ミトコンドリアで代謝されるべき脳圧降下剤がインフルエンザ脳症の発症や増悪に影響を与えている可能性を調査するため、インフルエンザ脳症患児の臨床経過と照合し、グリセロール使用 6 例では死亡 3、重度後遺症 1 例に対し、マニトール使用 3 例では 1 例が回復、1 例が死亡、1 例は重度後遺症を残したことが判明した。グリセロール使用後に脳浮腫の進行、トランスアミナーゼ上昇、カルシウムの低下が認められるものがあり、インフルエンザ脳症の発症、増悪に影響する可能性が考えられた。

### A. 研究目的

インフルエンザ脳症の一部には近年の研究により、アポトーシスのプロセスが関わることが明らかになりつつある<sup>1)2)</sup>が、多臓器不全の急速な成立にアポトーシスが関与した証左は臨床的には得られておらず、症例を対象として調査した。

インフルエンザ脳症の病態の一部はミトコンドリアの形態変化をとまなうアポトーシスであり、エネルギークライシスであることが明らかになりつつある。この点でインフルエンザ脳症における脳浮腫治療剤の代謝が通常と変化し、病態を変容させている可能性が考えられる。治療戦略の上で必要な脳浮腫対策に寄与するため、脳圧降下剤の使用状況と臨床経過、予後を臨床的に検討した。

### B. 研究方法

症例は 8 才女児。来院時心肺停止。来院 4 日

前から咳、喘鳴、3 日前から発熱、来院 2 日前にインフルエンザ B 型と診断されオセルタミビルを服用したが、入院前日に嘔吐。当日自宅で失禁、廊下で倒れて救急隊到着時点では心肺停止。体温 32℃、瞳孔散大、自発呼吸・心拍なし。蘇生により一旦自己心拍再開したが、次第に血圧低下、来院後 3 時間で死亡。TP 4.9 g/dl、AST 755 IU/l、ALT 383 IU/l、CK 4531 IU/l、LDH 1958 IU/l、BUN 22 mg/dl、Cr 0.6 mg/dl、Na 142 mEq/l、K 7.1 mEq/l、Cl 104 mEq/l、Ca 7.9 mg/dl、P 13.5 mg/dl、BS 325 mg/dl、pH 6.48、PCO<sub>2</sub> 106.4、BE -34.4、HCO<sub>3</sub> 37.7、咽頭インフルエンザ抗原 B 型陽性、髄液 PCR 陰性、ウイルス分離陰性（心嚢液、髄液）。剖検では心筋に広範な細胞脱落、壊死が認められ、左室により強かった。肝、脳には明らかな炎症、壊死は認めなかった。アポトーシス検出には、TUNEL 法による蛍光染色を行ない、連続切片状の組

織像と重ね合わせて局在についても検討した。脳圧降下剤の検討を行なった症例は当科に入院し集中治療を行なったインフルエンザ脳症の14例。年齢は10ヶ月から13才、男児5例、女児9例である。A型が8例、B型4例、流行時の急性脳症が2例である。臨床経過と脳圧降下剤の使用状況をそれぞれ検討した。

### C. 結果

心筋、肝の両者で広範なTUNEL陽性シグナルを心筋細胞、肝細胞にそれぞれ認めた。心筋では陽性シグナルは左室に多く認められ、肝では中心静脈周囲に多く認められた。一方、脳では明らかな陽性シグナルは認められなかった。心筋の電顕では膨化し、変形したミトコンドリアが観察された。

一方、集中治療を要した症例6例でグリセロールが投与されており、このうち3例が死亡、1例が重度の後遺症を残した。これら予後不良例ではGOTの上昇（初診時39~1693IU/l、ピーク339~26360IU/l）が見られ、正常に回復した2例ではGOTの上昇が軽微であった。マニトール投与例は3例あり、1例が死亡、1例が重度障害、1例がGOTの上昇が著しかったが正常に回復した。2例でグリセロール使用後に脳浮腫の進行、トランスアミナーゼ上昇、カルシウムの低下が認められた。インフルエンザ流行期の有熱性けいれん重積の14例にグリセロールが使用されていたが、死亡例はなく、てんかんに移行した1例と歩行障害を来した1例があったが、予後は良好であり、GOTの上昇は認めなかった。

### D. 考案

インフルエンザ脳症においてはアポトーシスが病態の一端をなしており、少なくとも肝ではその証左が認められている<sup>12)</sup>。これにはミトコンドリア障害が影響していると考えられ、

インフルエンザ感染を契機に神経系を中心とした臓器にアポトーシスが生じるのではないかと考えられてきた<sup>3)</sup>。今回の症例は心筋と肝細胞の2臓器に同時に広範なアポトーシスを認め、インフルエンザ感染と多臓器のアポトーシスが同一個体に生じ、これが死因につながったことが示された。ミトコンドリアの膨化も認められた。患児は8歳でウイルスはB型で典型的なインフルエンザ脳症とは異なり、こうした病態がインフルエンザ脳症で生じているかはさらに検証の必要がある。脳には変化が認められず、侵されていないのか、変化がこれから生じる場所で死亡してしまったのかは不明である。インフルエンザウイルス感染とアポトーシスの関連については明らかでないが<sup>4)</sup>、ウイルスの直接的な影響、サイトカインなどの影響、虚血再還流障害、高体温による代謝異常、先天性代謝異常症の顕在化などの可能性があり、残存検体を用いた解析やインフルエンザウイルスの免疫染色等を行なう必要がある。

インフルエンザ脳症は本邦には特異的に多く、この理由は明らかではないが、遺伝的な要因も考えられている。今回の検討では欧米では使用されていないグリセロールについて脳症確定例では投与6例中3例が死亡、1例に重篤な後遺症を生じていた。死亡例はGOTの上昇例が多く、以前の検討でも肝細胞でミトコンドリアの膨化、中心核性の小脂肪滴、広範なアポトーシスが認められ<sup>12)</sup>、グリセロールが過量に投与された場合、エネルギー産生ではなく、ATPの消費、NADH<sub>2</sub>の蓄積へ向かわせ、さらにエネルギークライシスを悪化させる可能性が考えられる。ミトコンドリア膜移送タンパク Citrinの欠損症である成人型シトルリン血症では高度の脳浮腫を来し死亡した例の多くがグリセロールの投与を受けていたことが判明しており<sup>5)</sup>、また

Fructose 1, 6-bisphosphatase 欠損症ではグリセロールで悪化するなど<sup>6)</sup>、ミトコンドリア代謝異常の存在する場合のグリセロールの高濃度投与については慎重にすべきと考えられる。けいれん重積に対する投与では、ほぼ予後良好に経過したが、GOTの大きな上昇は認めなかった。GOT上昇に対しグリセロールが使用された例が所期の脳圧効果作用を得られず、いずれも重篤な予後を呈したのに対し、1例ながらGOTが著しく上昇したマニトール使用例では脳浮腫へ移行することなく、ほぼ正常に回復していた。グリセロール非使用例でも死亡や重度後遺症はあり、脳症発症に必須ではないが、脳症症例への使用が病態を悪化させる可能性や脳症の背後に代謝異常症が潜んでいる可能性を鑑み、脳症の疑診例、GOT上昇例では使用を控えるべきであろう。

#### D. 結語

インフルエンザB感染中に心肺停止に至った8歳女児の肝と心筋に広範なアポトーシスを認めた。インフルエンザ脳症の一部には同時に多臓器に進行するアポトーシスが生じることが示唆された。

インフルエンザ脳症に対する脳圧降下剤としてグリセロールは勧められない。

#### E. 文献

- 1) 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臓におけるミトコンドリア異常とアポトーシス。日本小児科学会雑誌 106:324、2002
- 2) 鍵本聖一、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。厚生労働省：インフルエンザの臨床経過中に発生する脳炎、脳症の疫学及び病態に関する研究 平成12年度～14年度 総合

研究報告書 pp83-89

- 3) Nunoi H, Mercado MR, Mizukami T, Okajima K, Morishima T, Sakata H, Nakayama S, Mori S, Hayashi M, Mori H, Kagimoto S, Kanegasaki S, Watanabe K, Adachi N, Endo F. Apoptosis under hypercytokinemia is a possible pathogenesis in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Int.* 47:175-9, 2005.
- 4) 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
- 5) 佐伯武頼、小林圭子、アンモニア処理機構とその先天性異常。成人発症II型シトルリン血症を中心として。肝胆膵 47:83-92、2003
- 6) Hasegawa Y, Kikawa Y, Miyamaoto J, Sugimoto S, Adachi M, Ohura T, Mayumi M Intravenous glycerol therapy should not be used in patients with unrecognized fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Pediatr Int.* 45:5-9, 2003

#### F. 研究発表

1. 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 27: S37-38、2003

#### G. 学会発表

1. 関島 俊雄、インフルエンザウイルスによる急性心筋炎の1剖検例。第39回日本小児循環器学会、2003
2. 鍵本聖一、関島俊雄、岡崎健一、菊池健二郎、鈴木光幸、浜野晋一郎、インフルエンザ脳症におけるシクロスポリン投与の検討。第17回小児救急医学会、2003
3. 鍵本 聖一、インフルエンザ脳症と脳圧降下剤。第18回小児救急医学会、2004

4. 鍵本聖一、関島俊雄、佐藤智幸、大嶋宏一、平野大志、森本宜義 インフルエンザ脳症から見えた小児救急の課題 第 108 回日本小児科学会 2005
5. 鍵本聖一、関島俊雄、佐藤智幸、大嶋宏一、平野大志、森本宜義 臓器不全に対するミトコンドリアを標的とした治療 第 19 回日本小児救急医学会、2005
6. 鍵本聖一、関島俊雄、森本宜義、犬尾千聡、増田青空、後藤文洋、藤永裕一郎、高田大生体肝移植を考慮に入れた小児肝不全に対する血液浄化、第 31 回日本小児栄養消化器肝臓病学会、2005
7. 増田青空、森本宜義、犬尾千聡、関島俊雄、鍵本聖一、小熊栄二、岩中督、菊地陽、花田良二、後藤雄一、Pearson 症候群の 1 例第 122 回日本小児科学会埼玉地方会 2005

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析

分担研究者 中村祐輔 東京大学医科学研究所・教授

**研究要旨**

インフルエンザ脳症の発症に関連する遺伝子を、全ゲノム領域を対象とした一塩基多型 (SNPs) 解析にて同定し、インフルエンザ脳症の発症リスクを事前に予測するツールを開発することを目的としている。日本人小児インフルエンザ脳症患者を対象として 52,608 SNPs についてのジェノタイピングを実施し、インフルエンザ脳症-コントロール関連解析を行った。インフルエンザ脳症患者群 45 名、日本人一般集団 1,554 名において、最も関連が強い SNP はオッズ比 = 10.9、 $\chi^2 = 51.5$ 、 $p = 7.2 \times 10^{-13}$ を示した。

**A. 研究目的**

日本においてインフルエンザの学童罹患数は、年間 50 万から 100 万人である。そのうち 100 から 300 人がインフルエンザ脳症を合併する。インフルエンザ脳症の死亡率は 30%前後と高く、生存例においても重篤な後遺症を残す症例が多いため社会的関心が高まっている。

インフルエンザ脳症の詳細な発症機序は不明であるが、日本人での報告が多いことから遺伝的背景が関与していると考えられる。本研究では、インフルエンザ脳症発症に関連する遺伝的背景を解明するため、一塩基多型 (SNPs) を用いて、全ゲノム領域を対象とした関連解析を行った。本研究により、インフルエンザ脳症の遺伝的背景を解明することができれば、ハイリスク群を事前に特定でき、積極的にワクチン接種を行うという予防が可能となる。また、感受性遺伝子の特定は、インフルエンザ脳症の新たな治療法の開発にもつながると考えら

れる。

**B. 研究方法**

研究期間および規模

5 年間とし、200 名から検体を採取し解析を行う。

研究対象

インフルエンザ脳症を発症した 1 歳以上の小児および脳症を発症しなかった 1 歳以上のインフルエンザ患者とする。

SNP 解析

J-SNP データベースよりタグ SNP 情報に基づいて抽出した 52,608 SNPs について、multiplex PCR-invader assay system を用いて患者 DNA をジェノタイピングし、インフルエンザ脳症-コントロール関連解析を行う。

(倫理面への配慮)

I. 研究等の対象とする個人の人権擁護

本研究に同意するか否かは本人 (対象が

16歳未満の場合は、本人および代諾者)の全くの自由意志に委ねられ、同意しない場合であってもいかなる不利益も被ることはないことを保証する。本研究は連結可能匿名化を行う。個人識別情報は、担当者が厳重に保管・管理し、外部へは決して提供しない。また、同意はいつでも撤回できることを保証する。同意が撤回された場合は、すみやかに検体をオートクレーブにかけ廃棄する。

## II. 研究への参加者に理解を求め同意を得る方法

検体の提供を受ける際には、説明文書を用いて提供者(16歳未満の場合は、提供者および代諾者)との質疑応答を経て、本研究についてじゅうぶんに理解されたことを確認した後に同意を得る。これらの説明文書では、本研究の意義、目的、遺伝子解析などについて解説し、プライバシーの保護の方法、提供者の権利、研究に協力することの利益と不利益、本研究終了後の検体の取り扱い方針について説明する。同意をいただいた方には、同意書に自署をお願いする。同意書は、鍵のかかるロッカーにて厳重に保管・管理する。

## III. 研究によって生じる個人への不利益ならびに危険性と科学的な貢献の予測

本研究成果により、インフルエンザ脳症の感受性遺伝子が同定されれば、ハイリスク群をスクリーニングすることが可能となる。インフルエンザの感染予防に対してはワクチンの接種という非常に有効な予防法が存在するため、ハイリスク群に対しては積極的にワクチン接種をすすめることにより、インフルエンザ脳症の罹患を予防することが可能となる。

また、感受性遺伝子の同定は、その遺伝子またはカスケードをターゲットとした新

たな治療法の確立にも貢献すると確信する。

個人情報の漏洩により人権の侵害を被る可能性があるが、本研究では、担当者が個人情報を厳重に保管・管理し、個人情報・プライバシーの保護には万全をつくす。

インフルエンザ脳症は、ほとんどが10歳までの発症であり、遺伝的背景を研究することは、患者の健康に対して利益はあるものの、その後の社会的な不利益や危険性があるとは常識的に考えられない。

## IV. 遺伝カウンセリング体制の整備

個人情報の管理に記したように、本研究の結果を提供者が知ることにより提供者や血縁者の生命の危機を回避できる可能性がある。この場合には、遺伝子情報を提供者や家族に報告する可能性がある。そのような遺伝子情報を知るとは、生命危機を回避することを目的にしているため、患者および家族の利益となるが、そのことを正確に理解し、受け入れることを支援するために日本遺伝カウンセリング学会認定医が遺伝カウンセリングを行う体制を整備している。

## V. 研究終了後の検体の取り扱い

提供者の承諾が得られた場合に限り将来の本研究以外のインフルエンザ脳症に関連した医学研究に用いることがある。ただし、その場合は連結不可能匿名化を行う。研究終了後の保管に関しては、説明文書を用いて提供者(16歳未満の場合は、提供者および代諾者)に十分説明する。

研究終了後の検体の保管を承諾されなかった場合には、すみやかに検体をオートクレーブにかけ破棄する。

## C. 研究結果

インフルエンザ脳症を発症した患者45名、インフルエンザ脳症を発症しなかった患者21名のDNAサンプルを収集した。

インフルエンザ脳症患者群 45 名、日本人一般集団 1,554 名について関連解析した結果、患者の遺伝子型とインフルエンザ脳症発症の関連の強さを示す p 値の分布は下記のとおりであった。

p>=0.01	51,315 SNPs
p<0.01	699 SNPs
p<0.001	79 SNPs
p<0.0001	9 SNPs
p<0.00001	2 SNPs

最も関連の強い SNP はオッズ比 = 10.9、 $\chi^2 = 51.5$ 、 $p = 7.2 \times 10^{-13}$  を示した (dominant-inheritance モデル)。

さらに患者 30 名の DNA サンプルを収集した。これらのうちインフルエンザ脳症を発症した患者 26 名を対象に、関連の強い候補 SNPs についての replication study を実施中である。

#### D. 考察

疾患感受性遺伝子の同定には、候補遺伝子アプローチまたは、全ゲノムを対象としたゲノムワイドアプローチが考えられるが、本研究においては、高速・大量 SNP ジェノタイピングによるゲノムワイド解析を選択した。今回のように症例数が少ない場合でも、遺伝子型の疾患発症に対する寄与が大きければ十分に疾患関連遺伝子を同定することができるものと考ええる。

#### E. 結論

インフルエンザ脳症患者群 45 名について、全ゲノム領域を対象とした SNP 解析を行い、インフルエンザ脳症関連候補 SNPs を同定した。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

## 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

### 分担研究報告書

#### 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 網羅的遺伝子解析に関する研究

分担協力者 木村 宏 名古屋大学医学部ウイルス学

**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。熱性痙攣を合併したインフルエンザ、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17,000の遺伝子発現を比較した。インフルエンザの急性期には、200の遺伝子の発現が有意に増強しており、20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、22の遺伝子の発現が増強しており、7つの遺伝子の発現が減弱していた。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を含む中枢神経合併症の発症機序・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

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  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 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9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採血。
2. PAX gene Blood RNA Kit (QIAGEN)を用いRNAを抽出。
3. 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-dCTPでそれぞれラベル化した。
4. ラベル化cRNA各1 $\mu$ 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; 17,086遺伝子を搭載)に60 $^{\circ}$ C 17時間ハイブリダイゼーションさせた。
5. 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