

5. Arita M, Iwasaki T, et al. Temperature sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys: Implication of temperature sensitivity as a determinant of attenuation. *J Gen Virol.* 2005; 86: 1391-401.
6. Jongwutiwes S, Iwasaki T, et al. Mitochondrial genome sequences support ancient population expansion in *Plasmodium vivax*. *Mol Biol Evol.* 2005; 22:1733-9.
7. Honda R, Ohno Y, Iwasaki T, Okudaira S, Okada M, Kamitamari A, Ohshima K, Moriuchi H, Kanematsu T. Langerhans' cell histiocytosis after living donor liver transplantation: report of a case. *Liver Transpl.* 2005;1:1435-8.
8. Putaporntip C, Iwasaki T, et al. Ancient common ancestry of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* as inferred from its homologue in *Plasmodium knowlesi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 146:105-8.
9. Yoshikawa T, Iwasaki T, et al. Role of alpha/beta interferon response in the acquisition of poliovirus susceptibility of kidney cells in culture. *J. Virol.* 2006 in press

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：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

D-galactosamine/lipopolysaccharide を用いた apoptosis の誘導と
cytochrome c の細胞内移行および細胞外流出の観察

分担研究者 横田俊平 横浜市立大学大学院医学研究科産生成育小児医療学教授

研究要旨

インフルエンザ脳症は、臨床的には発熱の後、異常言動などを呈し、短時間のうちにけいれん・意識障害を生じ、やがて全身系の組織障害、血管内凝固症候群、多臓器不全へと進行する病呈変化を示す疾患である。この経緯を病理学的に対応させると、まずインフルエンザ・ウイルス感染による鼻腔粘膜の破綻が生じ、中枢神経系内にサイトカイン・ストームを生じる。このため辺縁系の活性化が異常言動の原因となり、やがて astrocyte の異常活性化が脳内サイトカイン・ストームの原因と想定できる。脳血管門が破綻し、やがて病態は全神経へと移行していく。このような病態仮説を証明すべく、D-galactosamine(D-GalN)+lipopolysaccharide(LPS)を投与したところ cytokine storm が生じ、病態が進行するにつれて細胞障害のマーカーである cytochrome c はミトコンドリアから細胞質へ移行し、やがて血清中へと移行していくことが判明した。この経時的変化を組織学的に追跡すると、ミトコンドリアの崩壊、組織の apoptosis と順を追って変化しており、cytokine storm が病態形成に濃厚に関わっていることが示唆された。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症では中枢神経内の高サイトカイン状態、神経細胞のアポトーシスのほかに、重症例で肝細胞のアポトーシス、血清中の cytochrome c の上昇が報告されており、全身性の高サイトカイン血症の病態への関与が判明している。発症機序としては中枢神経内でのグリア細胞の異常活性化により過剰な炎症性サイトカインが産生され、脳血管関門の破壊により脳内の過剰な炎症性サイトカインが全身に波及し高サイトカイン血症生じると考えられている。

今回 D-galactosamine(D-GalN)

/Lipopolisaccharide(LPS)投与によりラットに高サイトカイン血症を誘導し、血清中のサイトカイン、アポトーシスのマーカーである cytochrome c の経時的変化、および組織学的な経時的変化また細胞内の cytochrome c の局在の変化に関して検討した。

B. 研究方法

生後 10 週ラットに D-GalN(700mg/kg)/LPS(200 μg/kg)を投与し、投与前、投与後2, 6, 12時間で尾静脈より採血した。ELISA 法にて IL-6, TNF α, IFN γ, cytochrome c の測定を

行い、サイトカイン、cytochrome c の経時的な変化を検討した。さらに肝臓組織切片を作成し、高サイトカインによる組織学的変化を HE 染色で検討し、TUNEL 法にてアポトーシスの検出を行った。また cytochrome c の免疫染色により組織学的に cytochrome c の局在の検討を行った。次に肝臓蛋白のミトコンドリア分画、細胞質分画を抽出し、cytochrome c の Western Blot を行い、肝細胞内での cytochrome c の局在について検討した。

C. 研究結果

D-GalN/LPS 投与前は cytochrome c はミトコンドリア内のみ局在しており、D-GalN/LPS 投与後2時間で血清中の TNF α の上昇により cytochrome c の細胞質への流出が認められた。4時間後には HE 染色にて肝細胞の障害が認められ、TUNEL 法にて TUNEL 陽性細胞が認められることより、アポトーシスによる細胞障害が証明された。また細胞質内の cytochrome c の減少に伴い12時間後には血清中 cytochrome c の上昇が認められ細胞障害により細胞外へ cytochrome c が流出することが証明された。

E. 考察

TNF α により cytochrome c はミトコンドリアから細胞質に放出され細胞にアポトーシスを誘導し、最終的には循環血液中に放出される。インフルエンザ脳症により生じる高サイトカイン血症における TNF α によるアポトーシスのマーカーとして血清中 cytochrome c は有効である可能性がある。

F. 結論

D-GalN/LPS 投与によりラットに cytokine storm を誘導することができた。その結果、組織学的に apoptosis が進行し、それに伴いミトコンドリアの変性が進行して、cytochrome c はミトコンドリアから細胞質へと移行した。さらに進行すると、cytochrome c は血清中へ移行し細胞障害により細胞外へ流出することが判明した。

G. 研究発表

1) Yoshinori Kobayashi, Masaaki Mori, Takuya Naruto, Naoki Kobayashi, Toshiyuki Sugai, Tomoyuki Imagawa, Shumpei Yokota. Dynamic Movement of Cytochrome c from Mitochondria into Cytosol and Peripheral Circulation in Massive Hepatic Cell Injury Induced by D-galactosamine/Lipopolysaccharide.

Pediatrics International
46(6):685-92,2004

2) 横田俊平.インフルエンザ脳症。
チャイルドヘルス 8:806-808, 2005.

3) 森雅亮, 矢崎茂義, 勝呂宏, 横田俊平. 2003~2004年シーズンにおける横浜市内における1歳未満インフルエンザ・ウイルス感染児に関する検討 抗ウイルス薬の投与およびその有害事象の発現状況。
小児感染免疫 17:87-93, 2005

4) 横田俊平.インフルエンザ脳症の発症機序と対策. 日本小児臨床薬理学会雑誌 17:147-150, 2005.

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
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

国内においてインフルエンザ脳症は小児を中心に毎年報告されており、その死亡率は 14～30%と高率で、後遺症を残すものも多く、その病態解明は急務となっている。昨年までの調査結果からフリーラジカルの代表である NOx が髄液中で有意差をもって高値を示すことが判明している。そこで、ラジカルスカベンジャーの迅速測定がどの程度臨床的に有用であるかを検討した。さらに高サイトカイン血症が病態に関与することから、IL-6 の迅速測定応用と多臓器不全のスコアである PELOD score がインフルエンザ脳症で有用かを検討した。結果、フリーラジカル・IL-6 の迅速測定ならびに PELOD score の有用性が確認された。しかしながら、一部に血液上まったく異常値を示さない予後不良なタイプがいることが知れた。

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 NOx および IL-6 が高値をとる症例が多い事が知れた。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時間軸を踏まえた PELO score の重症度予測の臨床的有用性を検討した。

B. 研究方法

1) 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 *f* (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

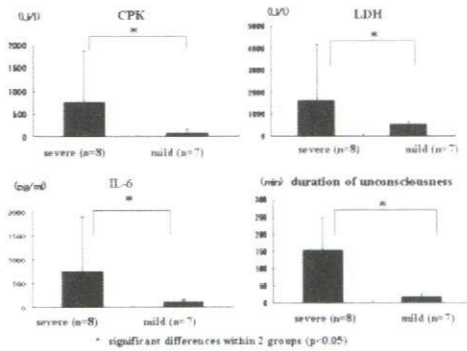
に反映させた。対象として 9 例の熱性痙攣、5 例のロタウイルス関連痙攣を用いた。

2) 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。

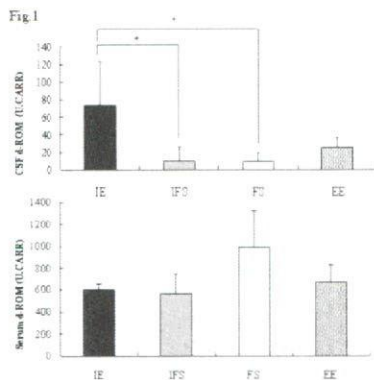
3) PELOD score の検討: インフルエンザ脳症 15 例とインフルエンザ感染に伴う有熱時けいれん 13 例を対象とした。IE は死亡もしくは神経学的後遺症を伴った A 群(5 例)と神経学的後遺症を伴わなかった B 群(10 例)に分類し、IFS を C 群(13 例)とした。

C. 研究結果

1) IL-6: 血清 IL-6 は熱性痙攣や痙攣を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があり、IL-6 の迅速測定は重症度の予測に役立つことが知れた。(図参照)



2) 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 以外に群間で有意な差がでるものはなかった。(図参照)



3) 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 (発症から 25.6 時間) 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 Δ PELOD score を評価したところ、A 群が明らかに高値を示した (表)。急性期における ferritin の測定が重症度予測に、血清 IL-6、CK、LDH、CRP の測定が IFS との鑑別に有用であると思われた。

| | A | B | C | A+B |
|----------------|-----------|-----------|---------|------------|
| PELOD | 45.8±8.8 | 15.9±10.9 | 6.5±6.5 | 25.9±17.6 |
| 入院時PELOD | 26.4±11.6 | 15.4±10.8 | 6.3±6.4 | 19.06±11.9 |
| Δ PELOD | 19.4±8.5 | 0.5±0.5 | 0.2±0.4 | 6.8±10.3 |

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

前回の調査から、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が知れた。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。これらの結果を踏まえ、早期に診断加療を開始するため、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。そのために血清 IL-6 ならびに髄液中の IL-6 と d-ROM の迅速測定は有用であることが判明した。また、臨床像から、PELOD score、 Δ PELOD score は IE の重症度と相関していた。PELOD score などの多臓器不全の scoring が重症度予測に使用可能である。また、今後血液検査正常例についてのデータ収集が必

要であることが示唆された。

E. 結論

- ①インフルエンザ脳症患者では髄液中のフリーラジカル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

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, Amaha M, Ioi H, Yamanaka G, Kashiwagi Y, Sasamoto M, Takekuma K, Hoshika A, Watanabe Y. Nitrite/nitrate (NOx) and zinc concentrations in influenza-associated encephalopathy in children with different sequela. *Neurochem Res.* 30(3):311-4.2005
2. Kawashima H, Togashi T, Yamanaka G, Nakajima M, Nagai M, Aritaki K, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A. Efficacy of plasma exchange and methylprednisolone pulse therapy on influenza-associated encephalopathy. *J Infect.* 51(2):E53-6. 2005
3. Nakamura M, Yamanaka G, Kawashima H, Watanabe Y, Ioi H, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Hayakawa M, Suzuki S Clinical application of rapid assay of

interleukin-6 in influenza-associated encephalopathy *Disease Markers* 21:1-4(in press)2005

4. Yamanaka G, Kawashima H, Suganami Y, Watanabe C, Watanabe Y, Miyajima T, Takekuma K, Oguchi S, Hoshika. Diagnostic and predictive value of CSF d-ROM level in influenza virus-associated encephalopathy. *J Neurological Science (In press)*2006
5. 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
6. 河島尚志、菅波祐介、山中岳、本間宙、高見剛、齋田晃彦. 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
7. 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、星加明德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. 河島尚志、長井誠、五百井寛明、渡邊義章、山中岳、柏木保代、武隈孝治、星加明德. 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回小児科学会総会平成17年4月22-24日
2. 牛尾方信、渡邊知愛子、五百井寛明、上島肇、柏木保代、河島尚志、武隈孝治、星加明德. 細菌性髄膜炎と無菌性髄膜炎の鑑別、治療効果判定における血清、髄液 IL-6 及び髄液 d-ROM の有用性第37回日本小児感染症学会平成17年11月12日
3. 山中岳、河島尚志、渡邊義章、小穴信吾、宮島祐、武隈孝治、星加明德. 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 4
7 回日本小児神経学会

4. 管波佑介、山中岳、本間宙、高見剛、
齊田晃彦、河島尚志。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

5. 五百井寛明、河島尚志、管波佑介、山
中岳、武隈孝治、星加明德。小児のウイル
ス感染と心肺停止。第 19 回日本小児救急
医学会

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

インフルエンザ脳症の血液脳関門機能に関する研究

分担研究者 市山高志 山口大学小児科・講師

研究要旨

目的：インフルエンザ脳症における脳血管関門機能を血清 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、tissue inhibitors of metalloproteinases 1 (TIMP-1) の動態から解析した。

方法：対象はインフルエンザ脳症 35 例、インフルエンザ関連熱性痙攣 13 例、合併症のないインフルエンザ 46 例、疾患コントロールとして伝染性単核球症（EB ウイルス感染症）8 例、RS ウイルス感染症 37 例。方法は急性期の血清 MMP-9 および TIMP-1 値を ELISA 法で測定した。

結果：血清 MMP-9 では脳症予後不良群（死亡 7 例、後遺症 10 例、計 17 例）が合併症のないインフルエンザ、正常対照群に比し、有意に高値だった。血清 TIMP-1 では脳症予後不良群が脳症予後良好群（18 例）、インフルエンザ関連熱性痙攣、正常対照群に比し、有意に高値だった。脳症予後良好群、インフルエンザ関連熱性痙攣の血清 TIMP-1 は正常対照群に比し、有意に低値だった。合併症のないインフルエンザは、EB ウイルス感染症、RS ウイルス感染症に比し、血清 MMP-9 と MMP-9/TIMP-1 比は有意に高値で、血清 TIMP-1 有意に低値だった。

結論：インフルエンザウイルス感染では MMP-9、TIMP-1 のアンバランスが生じ、脳血管関門機能が低下しやすい状態にあることが示唆された。従って、容易に熱性痙攣や脳症に発展しやすい可能性が示唆された。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症の病態における脳血管関門機能の関与を血清 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) および tissue inhibitors of metalloproteinases 1 (TIMP-1) の面から解析した。

B. 研究方法

対象はインフルエンザ脳症 35 例、インフルエンザ関連熱性痙攣 13 例、合併症のないインフルエンザ 46 例、疾患コントロールとして伝染性単核球症（EB ウイルス感染症）8 例、RS ウイルス感染症 37 例。方法は急性

期の凍結保存血清を用いて MMP-9 および TIMP-1 値を ELISA 法で測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は血清を用いた実験であり、個人名は特定されず、倫理面への影響は皆無である。

C. 研究結果

血清 MMP-9 では脳症予後不良群（死亡 7 例、後遺症 10 例、計 17 例）が合併症のないインフルエンザ、正常対照群に比し、有意に高値だった。血清 TIMP-1 では脳症予後不良

群が脳症予後良好群（18例）、インフルエンザ関連熱性痙攣、正常対照群に比し、有意に高値だった。脳症予後良好群、インフルエンザ関連熱性痙攣の血清TIMP-1は正常対照群に比し、有意に低値だった。合併症のないインフルエンザは、EBウイルス感染症、RSウイルス感染症に比し、血清MMP-9とMMP-9/TIMP-1比は有意に高値で、血清TIMP-1有意に低値だった。

D. 考察

MMP-9は脳の血管基底膜の主要構成成分であるコラーゲンIVを分解する。一方、TIMP-1はMMP-9活性を阻害する。従って脳血管関門に対し、MMP-9は攻撃因子、TIMP-1は防御因子である。インフルエンザウイルス感染ではEBウイルス感染症やRSウイルス感染症に比し、MMP-9上昇にも関わらずTIMP-1が低値であり、脳血管関門機能が低下しやすい状態にあることが示唆された。従って、容易に熱性痙攣や脳症に発展しやすい可能性が示唆された。

E. 結論

インフルエンザ脳症の病態に血清MMP-9およびTIMP-1の間接的な関与が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichiyama T, Ueno Y, Hasegawa M, Ishikawa Y, Matsubara T, Furukawa S: Intravenous immunoglobulin does not increase Fc γ RIIB expression in monocytes/macrophages during acute Kawasaki disease. *Rheumatology*. 44: 314-317, 2005
- 2) 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

- 3) Maeba S, Ichiyama T, Ueno Y, Makata H, Matsubara T, Furukawa S: Montelukast inhibits NF- κ B activation and proinflammatory molecules. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 94: 670-674, 2005
- 4) Matsubara T, Ichiyama T, Furukawa S: Immunological profile of peripheral blood lymphocytes and monocytes/macrophages in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*. 141: 381-387, 2005
- 5) Ozawa H, Toba M, Nakamoto M, Noma S, Ichiyama T, Takahashi H: Increased cytokine levels in a cerebral mycotic aneurysm in a child with Down's syndrome. *Brain Dev*. 27: 434-436, 2005
- 6) 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
- 7) Hirai R, Ayabe M, Shoji H, Kaji M, Ichiyama T, Sakai K: Herpes simplex encephalitis presenting with bilateral hippocampal lesions on magnetic resonance imaging, simultaneously complicated by small cell lung carcinoma. *Intern Med*. 44: 1006-1008, 2005
- 8) 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
- 9) Sato R, Ayabe M, Shoji H, Ichiyama T, Saito Y, Hondo R, Eizuru Y: Herpes

simplex virus type 2 recurrent meningitis (Mollaret's meningitis): a consideration for the recurrent pathogenesis. *J Infect.* 51: e217-e220, 2005

10) Matsufuji H, Ichiyama T, Isumi H, Furukawa S: Low-dose carbamazepine therapy for benign infantile convulsions. *Brain Dev.* 27: 554-557, 2005

11) Imaizumi T, Nishizaka S, Ayabe M, Shoji H, Ichiyama T, Sugita Y: Probable chronic viral encephalitis with microglial nodules in the entire brain: a case report with necropsy. *Med Sci Monit.* 11: CS23-26, 2005

12) 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

13) 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

1) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、末永尚子、松重武志、古川 漸. インフルエンザ脳症の型別サイトカイン解析. 第108回日本小児科学会学術集会. 東京. 2005. 4. 22-24

2) 市山高志、西河美希、綿野友美、末永尚子、松藤博紀、松原知代、古川 漸. ムンプス髄膜炎とエコーウイルス30型髄膜炎の髄液中サイトカインの解析. 第47回日本小児神経学会. 熊本. 2005. 5. 19-21

3) 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

4) 市山高志、金子美保、松原知代、古川 漸. NF- κ B活性化およびCD16 (Fc γ 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

5) 市山高志、末永尚子、梶本まどか、松原知代、古川 漸. インフルエンザ脳症における血清 soluble CD40 ligand 値の臨床的意義. 第10回日本神経感染症学会. 東京. 2005. 10. 20-21

6) 市山高志、末永尚子、梶本まどか、松原知代、古川 漸. インフルエンザ脳症における血清 soluble CD40 ligand 値の臨床的意義. 第37回日本小児感染症学会. 三重. 2005. 11. 11-12

7) 市山高志、上野佳子、内 龍太郎、長谷川真成、松原知代、古川 漸. 免疫グロブリン製剤とステロイド薬の抗炎症作用の比較検討—in vitro—. 第9回中国地区小児免疫薬物療法研究会. 広島. 2006. 3. 4

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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

糖新生系異常症としてフルクトース-1,6-ジホスファターゼ（FDPase）欠損症がある。本症では、乳幼児期に感染などが契機となって低血糖発作、急性脳症をきたす。グリセロール、果糖の投与は禁忌である。また本症では、尿中グリセロール、グリセロール-3-リン酸（G3P）の排泄パターンから、GC/MSによって生化学診断が可能である。インフルエンザ脳症 70 例について検討したところ、本症を強く示唆する症例が 1 例見いだされた。この他にグリセロール投与によってグリセロール排泄の増加のみられた症例が 23 例あったが、これらの中に FDPase 欠損症のかくれている可能性は否定できない。また FDPase 欠損症ではグリセロール投与は禁忌であり、急性脳症の治療として念頭におく必要がある。

A. 研究目的

糖新生系異常症としてフルクトース-1,6-ジホスファターゼ（FDPase）欠損症がある。本症では、図 1 に示すように、グリセロールからグリセロール-3-リン酸（G3P）を経て、フルクトース-1,6-リン酸（FDP）からフルクトース-6-リン酸への代謝が障害される。FDPase 欠損症では、尿中グリセロールとグリセロール-3-リン酸（G3P）が上昇することが知られている。通常は正常と変わらぬ生活をしているが、乳幼児期に感染などが契機となって低血糖発作、急性脳症をきたす。グリセロール、果糖の投与は禁忌である。インフルエンザ脳症の背景に FDPase 欠損症の有無について検討した。

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 例について、我々が以前報告した方法（直接乾燥による検体前処理、誘導體化、GC/MS 分析・選択イオンモニタリング法：Iga M, Yamaguchi S et al. : J Chromat B 746: 75-82, 2000）で尿中グリセロール、グリセロール-3-リン酸を分析した。

C. 研究結果

70 例中 24 例に尿中グリセロール排泄増加がみられた。このうち FDPase 欠損症のパターンを示唆する症例が 1 例発見された。

D. 考察

FDPase 欠損症は、図 1 に示すように急性期にグリセロールとともに G3P の上昇が見られる。グリセロールの増加する疾患、病態として、FDPase 欠損症の他に、グリセロールキナーゼ (GK) 欠損症、グリセロール投与中があげられる。GK 欠損症ではグリセロール/G3P 比が著しく高い。グリセロール投与中でもこの比が高いが GK 欠損症よりは低い値をとる。FDPase 欠損症では G3P が相対的に高いためにこの比はもっとも低く正常範囲である。またグリセロールを投与された状態では、グリセロール排泄が著しく高値をとるために、FDPase 欠損症であっても鑑別が困難になると考えられる。従って本症を生化学診断するためには、回復期のグリセロール投与されていない状態の尿で再評価することが望ましい。

今回インフルエンザ脳症患者の尿中グリセロールと G3P を検討したところ、70 例中 1 例に FDPase 欠損症を強く示唆する症例が見出された。インフルエンザ脳症の背景に FDPase 欠損症が隠れている可能性を考えるべきである。また尿中有機酸分析でグリセロール排泄増加が 70 例中 23 例にみられたが、これらの中に FDPase 欠損症がかくれている可能性は否定できない。また FDPase 欠損症に禁忌であるグリセロールを投与することは急性脳症を増悪させることも念頭におくべきである。

E. 結論

インフルエンザ脳症患者の中に FDPase 欠損症がかくれている可能性がある。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ことが示唆されたが、本症ではグリセロール投与は禁忌である。FDPase 欠損症がかくれている場合、グリセロール投与が症状を増悪させる可能性があり

注意を要する

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) Chen Y, Mizuguchi H, Yao D, Ide M, Kuroda Y, Shigematsu YY, Yamaguchi S, Yamaguchi M, Kinoshita M, Kido H: Thermolabile phenotype of carnitine palmitoyltransferase II variations as a predisposing factor for Influenza-associated encephalopathy. *FEBS Letter* 579: 2040-2044, 2005.
- 3) 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: Significance of Early Detection of Organic and Fatty Acid Disorders Using Mass Spectrometry (GC/MS and Tandem MS): Current Trend in Newborn Mass Screening. 3th Vietnam Diabetes and Endocrinology Meeting (Special Lecture), Hue, 2005
- 2) 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

- 3) 小林弘典, 長谷川有紀, 木村正彦, 山口清次 : タンデムマスでの血中アシルカルニチン分析によるカルニチン欠乏症の診断評価. 第30回医用マススペクトル学会 大阪, 2005
- 4) 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
- 5) 山口清次 : インフルエンザ脳症から子どもを守ろう～島根大学で行っている障害予防のためのチャレンジ～. 出雲

ケーブルテレビ「まめなか健康クラブ」、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。

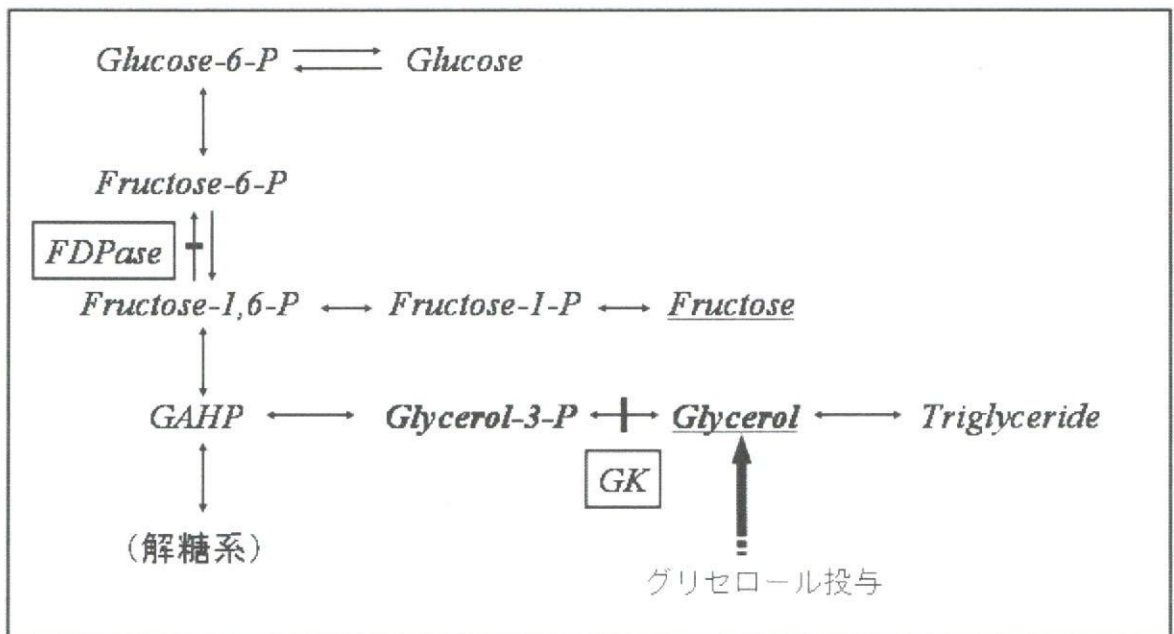


図1. フルクトース-1,6-ジホスファターゼ(FDPase) 欠損症とグリセロール代謝
略字：GK＝グリセロールキナーゼ

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

ヒトインフルエンザウイルスのヒト血管内皮細胞への
感染とアポトーシスの誘導

分担研究者 細矢光亮 (福島県立医科大学小児科・講師)

研究要旨

ヒト FluV がヒト血管内皮細胞に感染しアポトーシスを誘導する可能性を検証するため、組織培養系においてヒト血管内皮細胞に対するヒト FluV の感染実験を試みた。その結果、ヒト FluV は TNF- α 存在下でヒト血管内皮細胞において感染・増殖し、アポトーシスを誘導することが証明された。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症例では血液中の TNF- α や IL-6 などのサイトカインが高値を示し、特に重症例では血液中のチトクローム c が高値であることから、インフルエンザウイルス(FluV)感染に伴い産生された炎症性サイトカインが血管の拡張と透過性亢進を起こし、さらに血管内にアポトーシスが誘導され、血管障害により脳を含む全身の臓器障害が起これと考えられる。TNF- α 存在下では FluV が血管内皮細胞に感染し、アポトーシスを誘導することによりインフルエンザ脳症が生じると仮説をたて、その可能性を検証するため、組織培養系において、ヒト血管内皮細胞を用いて FluV の感染実験を行った。

B. 研究方法

① 細胞

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) を用いた。

② ウイルス

FluV は、A/Yamagata/120/86 (H1 N1) : Yamagata 株、A/Murakami/ 4/64(H2N2) : Murakami 株、A/Ishikawa/ 7/82 (H3N2) : Ishikawa 株、A/philippine /2/82 (H3N2) : Philippine 株を用いた。

③ アポトーシスの誘導

HUVEC を TNF- α で前処理し、FluV (Yamagata 株、Murakami 株、Ishikawa 株、Philippine 株)を感染させ、42 時間培養した後に APOP ercentage 法 (Biocolor, Newtonabbey, North Ireland)によりアポトーシスを評価した。

④ 培養上清中のウイルス感染価の測定

HUVECにPhilippine株を吸着させた後、培養24時間、48時間に上清を回収した。MDCK細胞を用い、TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infectious Dose) 法でウイルス感染価を測定した。

⑤ 蛍光免疫染色法によるFluV抗原と活

性型カスパーゼ3の検出

蛍光免疫染色法により、HUVECでのFluV抗原の発現、および活性型カスパーゼ3の検出を試みた。

④ リアルタイムPCRによるFluVゲノムの定量

HUVECにPhilippine株を吸着させた後、24時間、48時間に細胞を回収し、RNAを抽出、精製した。FluVゲノム量をリアルタイムPCR法により定量した。

⑤ TUNEL法によるアポトーシスの確認

HUVECにPhilippine株を感染させ、48時間後に*in Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, Mannheim, Germany)を用いTUNEL法によりアポトーシス細胞を検出した。

⑥ フローサイトメトリーによる活性型カスパーゼ3陽性細胞の検出

Philippine株感染単独群(FluV)、TNF- α 単独処理群(TNF)、紫外線不活化Philippine株単独添加群(UV-FluV)、TNF- α 処理+Philippine株感染群(TNF+FluV)、TNF- α 処理+紫外線不活化Philippine株添加群(TNF+UV-FluV)、培地のみ群(Control)の6群を設定した。HUVECをTNF- α 存在下で6時間培養した後、ウイルスを感染させ24時間培養した。1次抗体としてウサギ抗Cleaved

Caspase 3抗体(ASP 175、# 9661)を用い、2次抗体としてPE標識ロバ抗ウサギIgG抗体を用いて細胞を染色し、FACS解析した。

C. 研究結果

① TNF- α により誘導されるアポトーシスのFluVによる増強効果

TNF- α 単独処理において、APOPercentage色素の細胞内への取り込み量がTNF- α 濃度依存的に増加した。FluVによるアポトーシス増強効果はいずれの株でも認められたが、Philippine株(H3N2)で顕著であった。

② 培養上清中のウイルス感染価のTCID₅₀法による測定

HUVECへFluVを吸着、洗浄後24、48時間の培養上清における感染性ウイルスの確認をFluV感受性細胞のMDCK細胞を用いて行った。48時間後の培養上清を添加した場合はCPEが観察され、感染価は $10^{2.8}$ TCID₅₀/mlであった。

③ 蛍光免疫染色法によるHUVECへのFluV感染の確認(図1)

FluVの増殖の特徴である、細胞の核内でのウイルス特異蛋白発現を示す像が確認された。

④ 細胞におけるFluVゲノム量の変化

FluVのHUVECへの吸着終了時(感染後1時間)におけるFluVのゲノム量を100とし、時間経過で比較した。感染24時間後では約5倍となった。

⑤ TUNEL法によるアポトーシスの確認(図2)

FluV非感染HUVEC(コントロール)と比べ、FluV感染HUVECにおいて、

TUNEL 法による陽性細胞（緑色）が明らかに増加していた。DAPI 染色で濃染する核（高輝度）と、TUNEL 陽性の核が一致していた。

⑥ 活性型カスパーゼ 3 発現の蛍光免疫染色による確認（図 3）

FluV 感染 48 時間後に、抗 FluV 抗体、DAPI、抗活性型カスパーゼ 3 抗体を用い重染色した。明視野で輝度の高い膨化した細胞に一致し、FluV 抗原陽性、DAPI 染色での核の分葉化・濃染、活性型カスパーゼ 3 染色陽性が観察された。

⑦ 活性型カスパーゼ 3 陽性細胞のフローサイトメトリーによる解析（図 4）

HUVEC 総数に対し活性型カスパーゼ 3 陽性細胞の割合を各条件で検討した。FluV 群は Control 群に比べ約 3 倍陽性細胞が増加していたが、UV-FluV 群は Control 群と同等であった。

D. 考察

現在までヒト FluV によるヒト血管内皮細胞でのアポトーシス誘導の報告はない。

FluV を HUVEC に感染後、48 時間で培養上清中に $10^{2.8}$ TCID₅₀/ml の感染性を有する FluV が産生された。また蛍光免疫染色法で HUVEC においてウイルス特異蛋白が合成されていることが確認された。さらに定量 PCR にて細胞内における FluV ゲノムの増加が認められた。従って、FluV は HUVEC に感染し、細胞内で増殖し、感染力のあるウイルス粒子が上清中に産生されることが示された。

アポトーシス細胞ではその変性過程において、DNA のヌクレオソーム単位への

断片化、クロマチンの凝集、カスパーゼの活性化、細胞膜成分であるホスファチジルセリンの細胞表面への表出が認められる。従って、DAPI 染色、TUNEL 法、活性型カスパーゼ 3、APOPercentage 法はいずれもアポトーシスの指標として用いられる。本研究では FluV 感染 48 時間後に TUNEL 法によりアポトーシスが確認された。さらに核の濃染化、分葉化の像に一致して、FluV 抗原、活性型カスパーゼ 3 が認められた。またフローサイトメトリーにて FluV 感染による活性型カスパーゼ 3 陽性細胞の増加が確認された。

インフルエンザ脳症においては、血液中の炎症性サイトカインが高値であり、またアポトーシスのマーカーであるチトクローム c の上昇がみられることから、TNF- α などのサイトカインにより血管内皮細胞にアポトーシスが誘導され、血管障害をきたすと考えられる。しかし、高サイトカイン血症を伴う川崎病、敗血症、膠原病などにおいては、通常同様の症状を呈することはない。インフルエンザ脳症では、サイトカイン以外に血管内皮細胞にアポトーシスを誘導する機序の存在が推定される。本研究において、FluV が血管内皮細胞に感染し、細胞内で増殖すること、感染細胞がアポトーシスをおこすことが証明された。すなわち、FluV 感染がアポトーシスを助長し、血管障害を増強している可能性が示唆された。

E. 結論

ヒト FluV は、TNF- α 存在下でヒト血管内皮細胞に感染、増殖し、アポトーシスを誘導することが証明された。

F. 研究発表

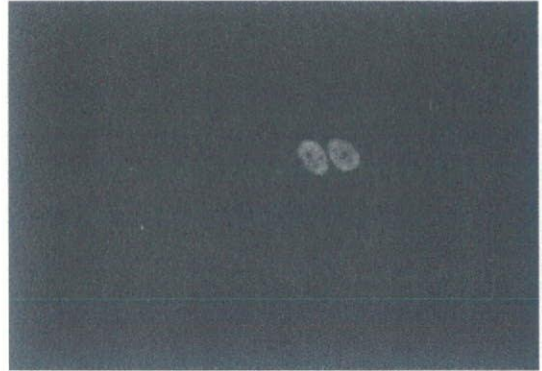
なし

G. 知的所有権の取得状況

なし



明視野

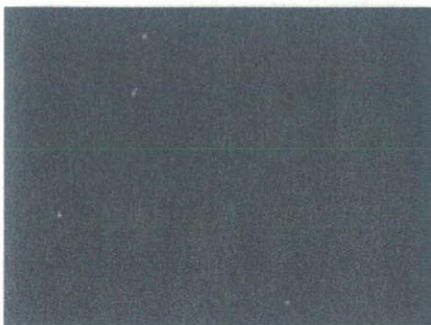


FluV 抗原

図 1



DAPI



TUNEL



コントロール

ウイルス感染

図 2

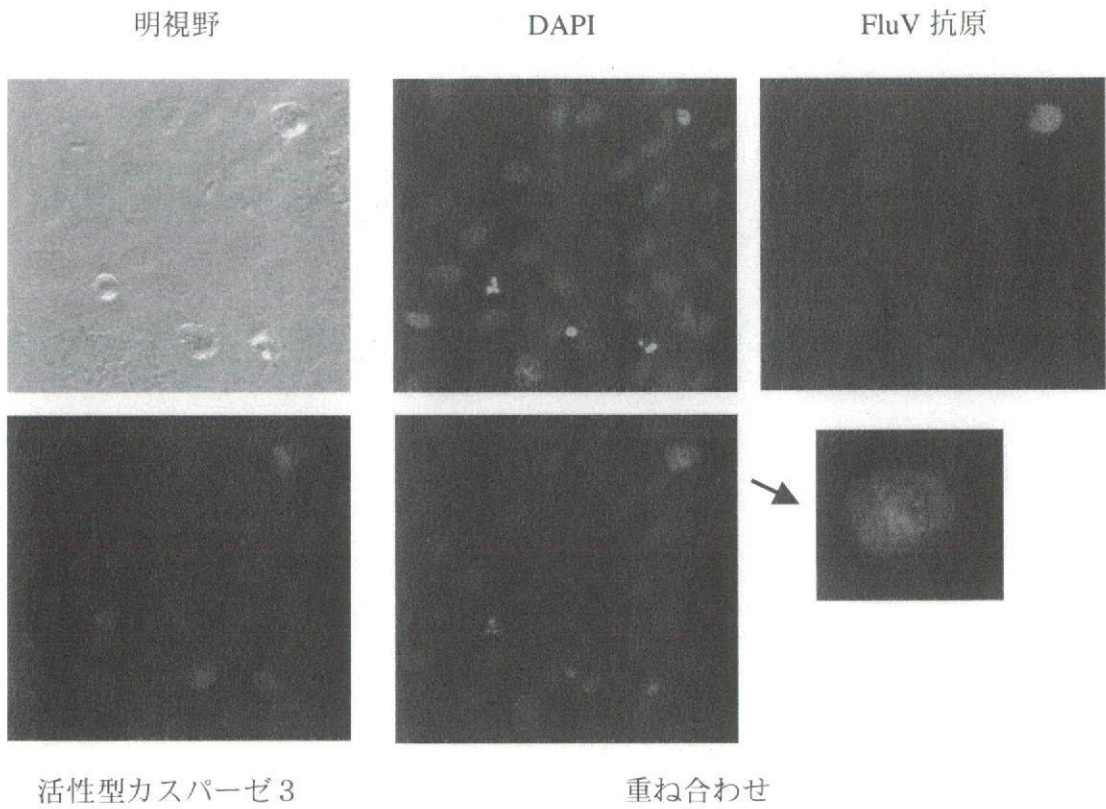


図 3

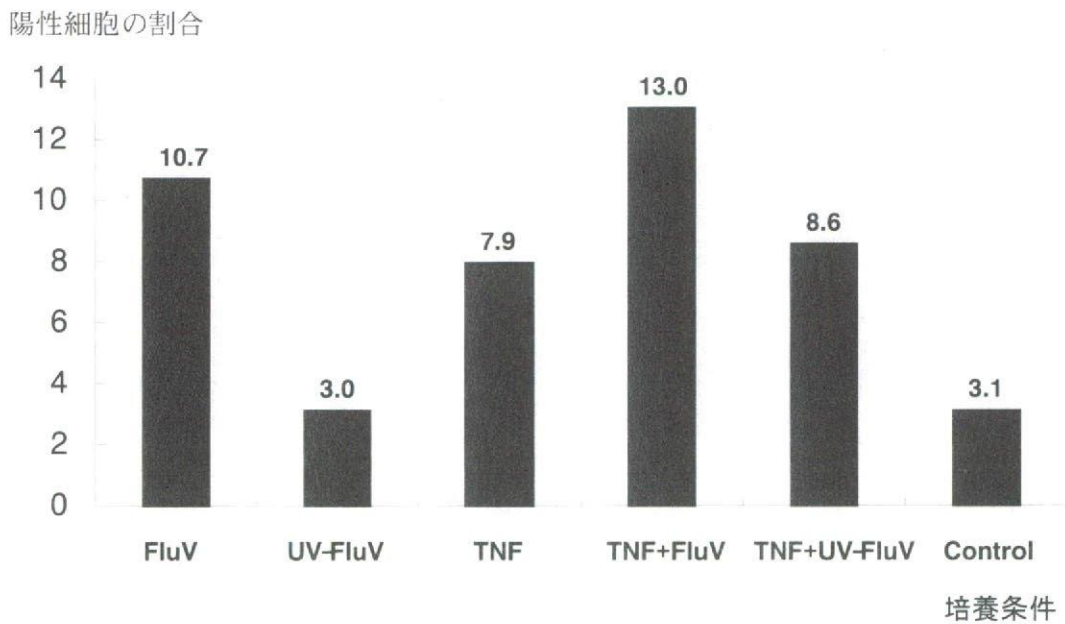


図 4

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。本年度は、日本人小児インフルエンザ脳症患者を対象とした 52,608 SNPs についてのジェノタイプデータに基づいて、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与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 をジェノタイプピングし、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