

200628033A

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

インフルエンザ脳症の発症因子の解明と  
それに基づく発症前診断方法の確立に関する研究

平成18年度 研究報告書

平成19年3月

主任研究者 森 島 恒 雄

（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学 教授）

## 目 次

I. 平成18年度 総合研究報告	主任研究者 森島恒雄	1
II. 平成18分担研究報告		
1 インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析	中村 祐輔	11
2 インフルエンザ脳症に認められる遺伝子多型の機能解析	森島 恒雄	14
3 2005/06シーズンのインフルエンザウイルス流行株の解析と2006/07シーズン向けワクチン株の選定	田代 真人	16
4 感染症発生動向調査に基づいた2005/06シーズンの国内におけるインフルエンザの発生動向とインフルエンザ脳症の発生報告について	岡部 信彦	23
5 インフルエンザ脳症モデルの開発とその予防	長谷川 秀樹	31
6 インフルエンザ脳症における先天代謝異常の関与 最近5年間で経験したインフルエンザ脳症とそれ以外の急性脳症の代謝プロフィールの比較検討	山口 清次	36
7 炎症性サイトカインがグリア細胞に与える影響について	浅井 清文	40
8 原因不明の脳炎・脳症の疫学と、インフルエンザ脳症および他の中枢神経感染症後遺症児の療育施設受診状況に関する研究	宮崎 千明	44

- 9 マルチプレックス・リアルタイムPCR法を用いた複数ウイルス同時定量システムの開発に関する研究  
木村 宏 50
- 10 マイクロアレイを用いたインフルエンザ脳症発症に関連する遺伝子の探索に関する研究  
伊藤 嘉規 59
- 11 けいれん重積型急性脳症のサイトカイン解析に関する研究  
市山 高志 65
- 12 テオフィリンの投薬中に発症した急性脳症に関する研究  
塩見 正司 70

## I. 平成 18 年度 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
総括研究報告書

インフルエンザ脳症の発症因子の解明と  
それに基づく発症前診断方法の確立に関する研究

主任研究者 森島 恒雄

研究要旨

インフルエンザ脳症発症因子の解明、病態解析を目的として以下の研究を行った。

- (1) 平成 18 年、本症の発症因子解明のための SNPs 解析（東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターとの共同研究）では、methionine 関連蛋白「X」の遺伝子多型が、有意に本症の発症に関与する結果を得たが、今年度の 2 回目の調査では、有意な結果は得られなかった。現在、3 回目の更に大規模な「X」についての検討を行っており、最終結果とする予定（中村班員）。
- (2) 「X」の機能解析については、遺伝子多型の存在の結果、高発現した「X」により炎症性サイトカインとくに TNF- $\alpha$  に対する感受性の変化をきたし、feedback が働かず、細胞に apoptosis がより強く誘導されることが判明した（森島）。以上の結果は、推定される「X」の機能が、インフルエンザ脳症の発症機序として矛盾しないことを示していると思われる。
- (3) 痙攣重積型インフルエンザ脳症は、インフルエンザ脳症の中で特殊型と位置づけられるが、通常のインフルエンザ脳症と比較して、髄液・血清サイトカインの profile が異なることが明らかになった。また、インフルエンザ脳症でみられる脳血管門障害のマーカーとなりうる MMP-9 (matrix metalloproteinases-1) (血管の基底膜を選択的に分解する) とその阻害因子である TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) について、そのバランスについて他疾患との違いがみられることがわかった〔市山班員〕。
- (4) DNA マイクロアレイによる解析で、インフルエンザに伴う熱性けいれんでは、インフルエンザのみの群に比較して、22 の遺伝子の発現が増強し、5 つの遺伝子の発現が減弱していた。今回の結果は、熱性けいれん群の結果であり、脳症群での解析は今後

の課題であるが、この解析は新たな治療法の確立に繋がる可能性がある（伊藤、木村班員）。

(5) マウスの脳血管門を形成するアストロサイトにおいて水分子であるアクアポリン-4が発現しており、この遺伝子の発現レベルはサイトカインのひとつである Interleukin-1 $\beta$  によって NF- $\kappa$ B の経路を介して増強されることが判明し、本症における脳浮腫発症の機序の一因を担う可能性を報告してきた。一方、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  を培養アストロサイトに作用させ、アストロサイトからの NOx 産生量を測定したところ、3つのサイトカインが同時に作用すると NOx の産生量が有意に上昇すること、また、サイトカイン刺激を受けたアストロサイトに、さらにジクロフェナックナトリウムを作用させると、NOx の産生が促進されることが判明した。（浅井班員）。

(6) インフルエンザ脳症と診断された症例の中で、約6%に先天代謝異常症が認められ、インフルエンザ感染を契機にこれらの代謝異常が顕在化したものと考えられた〔山口班員〕。

(7) インフルエンザ脳症は A 香港型で発症頻度が増加することが明らかとなっている。国内のインフルエンザ流行株の解析と発症状況の把握、およびインフルエンザ脳症（急性脳炎として感染症動向調査として届出られる）発症動向調査を行なった〔田代、岡部班員〕。また、他の急性脳炎・脳症と比較した本症の発症頻度などの特徴が AND 調査として示された（宮崎班員）

(8) インフルエンザ脳症のマウスモデルはまだ確立していない。高病原性トリインフルエンザ AH5N1 ウイルスを用いた感染実験でマウス脳へのウイルスの侵入経路として、経鼻感染にもかかわらず、嗅神経ではなく三叉神経を介した脳内への感染ルートが強く示唆された。また、この感染モデルにおいて、インフルエンザ脳症同様、サイトカインストームが関与していることが、感染病理の結果からも推測された。

#### A. 研究目的

本研究は（1）発症に関与する全ての遺伝子多型の解明と、（2）それに基づく発症前診断法及び、発症予防システムの確立を目指す。（3）この異常部位の機能解析を進め、発症メカニズムの詳細を明らかにすることで、さらに有効な治療法・予防方法の開発をめざす。

インフルエンザ脳症は、主に6歳以下の幼児がインフルエンザに感染した時、急激に発症する脳症である。致死率が30%、後遺症が25%に達する重篤な疾患であり、毎年数百例の発症がある。社会の関心も高い。インフルエンザの流行期には、乳幼児の両親のみならず、診療する医療従事者も本症

合併の危険性を常に考慮せねばならず、今まで医療現場は過度の緊張を余儀なくされている。また、本症はインフルエンザの感染に伴い急激に発症し、死亡に至るため、早期治療が困難な症例が多い現状である。

したがって、本症の発症因子の解明によるハイリスク児の発症前診断を可能にすることは、脳症患者の診療のみならず、多くの通常の小児インフルエンザ患者診療の質的向上にも役立つと思われ、その社会的意義は大きい。一方、ゲノム解析と結果の告知には、慎重な対応が必要である。倫理的に十分配慮しつつ、両親（可能であれば本人も）の理解が得られれば、SNPs異常を示した児に対応する「発症予防システム」を確立することができる。すなわち、ホームドクター、地域の高次機能病院と専門研究機関が連携し、遺伝子多型を示した児のA. ホームドクターによる予防接種の確実な実施と流行期のインフルエンザ感染の早期診断、B. 高次医療機関への搬送（脳症発症前に）、C. 高次医療機関におけるステロイドパルスなどの早期治療の開始を骨子とした「オーダーメイド医療」的な発症予防システムを組むことが現実的に可能となる。この「発症予防システム」により、児を、脳症発症が極めて少ない成人になるまで発病予防することが本プロジェクトの目的である。

また、本症の病態解析は、現在「インフルエンザ脳症ガイドライン」が作成され、普及後致命率は30%から10%以下に改善しつつあるが、さらなる予後の改善に繋がることを期待される。また、現在治療法がない多くのインフルエンザ以外の脳症（年間1000例の発症）の診断・治療法の確立にも

応用可能である。一方、近年世界的な脅威となっているAH5N1トリインフルエンザのヒト重症感染例（サイトカインストームによるARDSと多臓器不全が主な病態）の病態がインフルエンザ脳症に近似するといわれており、本研究が重症AH5N1ヒト感染症における治療法の開発にも役立つと考えられる。

## B. 研究方法

### 1. 発症に関与する遺伝子多型の解明

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った。

①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した。②SNP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をジェノタイプングし、インフルエンザ脳症-コントロール関連解析を行った。

### 2. 遺伝子多型「X」の機能解析

SNP「X」の機能とサイトカインの影響について、種々の細胞を用いて検討中である。その詳細については、まだ最終的な結果は得られていない。

### 3. 痙攣重積型インフルエンザ脳症の cytokine profile の解析

対象はけいれん重積型急性脳症13例。男児3例、女児10例、年齢7か月～2歳（中央値1.5歳）。急性期（1-5病日、平均3.2病日）に採取した血清および髄液を用い、interferon- $\gamma$ 、tumor necrosis factor-

$\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interleukin-2 (IL-2)、IL-6、IL-4、IL-10 を cytometric bead array で、soluble TNF receptor 1 (sTNFR1) を ELISA 法で測定した。

#### 4. インフルエンザ脳症における先天代謝異常の関与

2001~2005 年の 5 年間に当科へ診断依頼のあった症例のうち、インフルエンザ脳症 129 例 (男:女=71:51) とインフルエンザ以外の急性脳症 186 例 (男:女=100:86) を対象とした。GC/MS による有機酸代謝分析およびグリセロール代謝異常とタンデムマスを用いた血中アシルカルニチン分析により代謝異常の有無について検討した。

#### 5. インフルエンザおよび脳症の疫学

感染症発生動向調査による全国のインフルエンザ定点医療機関からのインフルエンザ患者発生報告結果と、インフルエンザウイルス分離報告結果、及び 5 類全数把握疾患として急性脳炎の中での届出対象疾患であるインフルエンザ脳症の発生報告結果を集計・解析した。

#### 6. インフルエンザ脳症における BBB・神経細胞障害のメカニズム

生後 1 日の Wistar 系ラットの大脳皮質から、アストロサイトを初代培養した。Interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ )、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )、Interferon- $\gamma$  (INF  $\gamma$ )、ジクロフェナックナトリウムをそれぞれ単独、または組み合わせて培地に添加した。経時的に培地中の NOx 濃度を測定した。

#### 7. インフルエンザ脳症と H5N1 トリインフルエンザ (マウスモデルの解析)

感染ウイルスとして 2004 年ベトナムにおいてヒトから分離された高病原性鳥インフルエンザ A/Vietnam/1194/04 (H5N1) を用い BALB/c マウスに経鼻感染を行った。感染前に免疫制御の働きを持つ物質 CMP (Chitin microparticles) を経鼻接種し、その病態に与える影響とサイトカインの発現を測定した。マウスは CMP (Chitin microparticles) 接種群と非接種群に分けウイルスを経鼻接種し、接種後のマウスの生存をおよびウイルスの拡がり、病理像、各サイトカイン・ケモカイン濃度などを検討した。

#### C. 研究結果

##### 1. 発症に関与する遺伝子多型の解明

平成 17-18 年、本症の発症因子解明のための SNP s 解析 (東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターとの共同研究) では、methionine 関連蛋白「X」の遺伝子多型が、有意に本症の発症に関与する結果を得たが、今年度の 2 回目の調査では、有意な結果は得られなかった。すなわち、本年度は、インフルエンザ脳症を発症した患者 34 名を対象に、whole-genome study で同定した関連候補 SNPs についての replication study を実施したが、インフルエンザ脳症との関連をバリデートすることはできなかった。さらに解析対象症例数を増やした上で再度 whole-genome study を行う必要があると考えられた。現在、3 回目の更に大規模な「X」についての検討を行っており、最終結果とする予定 (中村班員)。



## 2. 遺伝子多型「X」の機能解析

遺伝子多型の存在の結果、高発現した「X」により炎症性サイトカインとくに TNF- $\alpha$  に対する感受性の変化をきたし、feed back が働かず、細胞に apoptosis がより強く誘導されることが示唆される結果を得ている。詳細については「A」の意義が明らかになった時点で示したい（森島）。

## 3. 痙攣重積型インフルエンザ脳症の cytokine profile

インフルエンザ脳症の中で特殊型と位置づけられるが、通常インフルエンザ脳症と比較して、髄液・血清サイトカインの profile が異なることが明らかになった。すなわち、血清 IL-6、IL-10、sTNFR1 および髄液 IL-6 の上昇を認めた。IL-6 値は血清に比し、髄液で有意に高値だった。IL-10 および sTNFR1 値は髄液に比し、血清で有意に高値だった。interferon- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4 は有意な上昇を認めなかった。また、インフルエンザ脳症でみられる脳血管門障害のマーカーとなりうる MMP-9 (matrix metalloproteinases-1) (血管の基底膜を選択的に分解する) とその阻害因子である TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) について、そのバランスについて他疾患との違いがみられることが判明しており、現在検討を進めている〔市山班員〕。

## 4. DNA マイクロアレイによる解析

インフルエンザに伴う熱性けいれんでは、インフルエンザのみの群に比較して、22 の遺伝子の発現が増し、5 つの遺伝子の発現が減弱していた。今回の結果は、熱性けいれん群の結果であり、脳症群での解析は今

後の課題であるが、この解析は新たな治療法の確立に繋がる可能性がある（伊藤、木村班員）。

## 5. インフルエンザ脳症の BBB 障害のメカニズム

マウスの脳血管門を形成するアストロサイトにおいて水分子であるアクアポリン-4 が発現しており、この遺伝子の発現レベルはサイトカインのひとつである Interleukin-1 $\beta$  によって NF- $\kappa$ B の経路を介して増強されることがわかり、これをもとにこの遺伝子が本症における脳浮腫発症の機序の一因を担う可能性が推測されている。さらに今年度の研究では、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  を培養アストロサイトに作用させ、アストロサイトからの NOx 産生量を測定したところ、3 つのサイトカインが同時に作用すると NOx の産生量が有意に上昇すること、また、サイトカイン刺激を受けたアストロサイトに、さらにジクロフェナックナトリウムを作用させると、NOx の産生が促進されることが判明した。（浅井班員）。

## 6. インフルエンザ脳症における代謝異常症

インフルエンザ脳症で 129 例中 8 例（8%）に、それ以外の急性脳症で 186 例中 24 例（13%）になんらかの代謝異常症が発見された。内訳は、有機酸代謝異常がインフルエンザ脳症で 1 例、それ以外の急性脳症で 10 例であった。脂肪酸代謝異常症ではそれぞれ、6 例、15 例であった。また両群に FDPase 欠損症を 1 例ずつ認めた。〔山口班員〕。

## 7. インフルエンザおよびインフルエンザ脳症の疫学

2005/06 シーズンは、全国のサーベイランスネットワークから 5,246 株のウイルスが分離された。流行の主流は AH3 亜型で全分離数の 65% を占め、AH1 亜型が 25%、B 型が 10% であり、3 種類のウイルスの混合流行であった。2005/06 シーズンの脳症報告数は現時点で 51 例であり、ウイルス型別では「A 型」47 例 (92.2%)、「B 型」4 例 (7.8%) であった。また、報告時点での死亡例は 5 例 (9.8%) であった。報告例はインフルエンザの流行期間中とほぼ合致していた。発症者の年齢は 0~15 歳までであり、6 歳以下からの報告数が 44 例 (86.3%) であった。〔田代、岡部班員〕。

他の急性脳炎・脳症と比較した本症の発症頻度などの特徴が AND 調査として示された。AND 調査では原因不明の脳炎・脳症が約 60% あった。脳炎・脳症全体としては 1 歳、2 歳が頂点になり、症例数の多いインフルエンザ脳症の分布に近似した。インフルエンザ以外に突発性発疹 (HHV-6)、単純ヘルペスウイルス、ロタウイルスが目立ち、重症例も少なくなかった。(宮崎班員)

## 8. インフルエンザ脳症と H5N1 トリインフルエンザ (マウスモデルの解析)

高病原性トリインフルエンザ AH5N1 ウイルスを用いた感染実験でマウス脳へのウイルスの侵入経路として、経鼻感染にもかかわらず、嗅神経ではなく三叉神経を介した脳内への感染ルートが強く示唆された。また、H5N1 感染症において、インフルエンザ脳症同様、サイトカインストームが関与していることがマウスモデルの結果からも推測された。マウスモデルにおいて高病原性鳥

インフルエンザ (H5N1) の感染の中枢神経系への広がり及び免疫応答調節物質である CMP による感染抑制とサイトカインの発現における相関性が認められた。高サイトカイン血症を特徴とするインフルエンザ脳症への応用も期待される。(長谷川班員)。

## D. 考察および結論

### 発症に關与する遺伝子多型の解明と機能解析

インフルエンザ脳症の発症因子の解明によるハイリスク児の発症前診断を可能にすることは、脳症患者の診療のみならず、多くの通常の小児インフルエンザ患者診療の質的向上にも役立つと思われる。今年度の研究は、インフルエンザ脳症を発症した患者 34 名を対象に、whole-genome study で同定した関連候補 SNPs についての replication study を実施したが、前回の結果と異なり、インフルエンザ脳症との関連をバリデートすることはできなかった。さらに解析対象症例数を増やした上で再度 whole-genome study を行う必要があると考えられた。一方、「X」の機能解析の結果からは、細胞におけるサイトカインとくに TNF- $\alpha$  による apoptosis の誘導を容易にする傾向がみられており、インフルエンザ脳症の病態とよく一致していた。

### 痙攣重積型インフルエンザ脳症の cytokine profile の解析

痙攣重積型脳症はインフルエンザ脳症の特殊型であるが、本症の中でも頻度が高く、また治療に難渋する。本型では血清と髄液でサイトカインプロファイルが異なった。

血清での IL-6、IL-10、sTNFR1 上昇は炎症を示唆する。一方、髄液では IL-10、sTNFR1 の上昇を伴わない IL-6 上昇がみられ、この髄液 IL-6 値の上昇は炎症反応の結果とは考えにくく、脳虚血の状態を反映していると考えられた。したがって、このけいれん重積型には、サイトカインストームを想定した治療法は効果が少ないと考えられ、新たな治療戦略が必要と思われる。

### インフルエンザ脳症における神経細胞障害のメカニズム

本研究において、IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$  の3つのサイトカインが同時にアストロサイトに作用することによって、アストロサイトからの NOx の産生が高まることが判明した。本研究班 (Kawashima ら) によって、インフルエンザ脳症患者の髄液中 NOx が高値を示すことが報告されているが、今回の結果は、インフルエンザ脳症の病態において、サイトカインによって刺激されたアストロサイトも、NOx の産生の要因となっている可能性を示唆している。この結果は、フリーラジカルの制御・レドックス制御が治療法として重要となる可能性を示した点で重要である。本研究班は、すでに一部の NSAIDs がインフルエンザ脳症の予後の悪化に繋がることを示してきた。今回、ジクロフェナックナトリウムは、サイトカインで刺激を受けたアストロサイトにおいて、NOx の産生をさらに促進する作用があることが確かめられ、この NOx 産生促進作用が、ジクロフェナックナトリウムの使用によってインフルエンザ脳症悪化をもたらす機序の一部をなしているのではないかと考えられた。

### インフルエンザ脳症と H5N1 トリインフルエンザ (マウスモデルの解析)

インフルエンザ脳症の発症にはインフルエンザウイルスの呼吸器への感染に関連した高サイトカイン血症の関連が示唆されている。また感染時にサイトカイン応答の著しい事が知られている高病原性鳥インフルエンザ由来のウイルスがヒトでのパンデミックを起こした場合、現在にも増してインフルエンザ脳症例が発生する可能性が高いことが想定される。今回の感染実験で高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) の中枢神経系への広がりを観察した。経鼻感染にも関わらず臭神経を介した前頭葉への広がりは見られず、三叉神経を介して脳幹部へ広がって行ったのは興味深い。また、ウイルス感染に対する免疫を調節する物質である CMP の前投与によってウイルスの広がりが遅くなり、低い感染価においては生存率が改善した。そのときの血中のサイトカイン応答のうち炎症性サイトカインである IL-6 及び IP-10 の減少がみられた。これらのことからウイルス感染に対する免疫応答を調節 CMP を応用した新しいインフルエンザ抑制剤の可能性があると考えられる。

### E. 研究発表

#### 論文発表

・ Morishima T. Guideline for the management of influenza associated encephalopathy. 日本臨床、2006、64(10):1897-1905.

・ Okumura A, Kubota T, Kato T, Morishima T. Oseltamivir and delirious behavior in children with influenza. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2006, 25(6):572.

- Kawada J, Kimura H, Kawachi Y, Nishikawa K, Taniguchi M, Nagaoka K, Kurahashi H, Kojima S, Morishima T. Analysis of gene-expression profiles by oligonucleotide microarray in children with influenza. *J. Gen. Virol.*, 2006, 87(Pt6):1677-1683.
- Okumura A, Fukumoto Y, Hayakawa F, Nakano T, Higuchi K, Kamiya H, Watanabe K, Morishima T. Antipyretics and delirious behavior during febrile illness. *Pediatr. Int.*, 2006, 48(1):40-43.
- 山口清次：SIDS 様症状で発症する先天代謝異常と診断へのアプローチ. *日本 SIDS 学会雑誌* 6(1):15-24, 2006
- 山口清次、小林弘典：検診・検査後の対応とその評価：先天性脂肪酸代謝異常症. *小児科臨床* 59:643-651, 2006
- Ito H, Yamamoto N, Arima H, Hirate H, Morishima T, Umenishi F, Tada T, Asai K, Katsuya H, Sobue K. Interleukin-1beta induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor-kappaB pathway in rat astrocytes. *J Neurochem.* 2006 Oct;99(1):107-18.
- Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H\* Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. *J Med Virol*, 2006 78:954-963.
- Asahi-Ozaki Y., Itamura S., Ichinohe T., Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T., Kurata T., Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes and Infection* 2006 Oct;8(12-13):2706-14. 2006 Aug 28; [Epub ahead of print]
- Kawaoka, Y. et al.:The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*, 24; 3669-3676, 2006
- Monto, A. S., Macken, C., McKimm-Breschkin, J. L., Hampson, A. W., Hay, A., Klimov, A., Tashiro M., Webster, R. G., Aymard, M., Hayden, F. G., Zambon, M. :Influenza viruses resistant to the neuraminidase inhibitors detected during the first three years of their use. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2395-2402, 2006
- Imai, M., Ninomiya, A., Minekawa, H., Notomi, T., Ishizaki, T., Tashiro M., Odagiri, T.:Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection *Vaccine* 24; 6679-6682, 2006
- Asahi-Ozaki, Y., Itamura, S., Ichinose, T., Steng, P., Tamura, S., Sawa, H., Moriyama, M., Tadano, M., Sato, T., Kurata, T., Hasegawa, H. Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbiol. Infect.* (in press)
- Ishizu T, Minohara M, Ichiyama T, Kira R, Tanaka M, Osoegawa M, Hara T, Furukawa S, Kira J: CSF cytokine and

chemokine profiles in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 175: 52-58, 2006.

· Matsubara T, Hasegawa M, Shiraishi M, Hoffman HM, Ichiyama T, Tanaka T, Ueda H, Ishihara T, Furukawa S: A severe case of chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome treated with biologic agents. *Arthritis Rheum* 54: 2314-2320, 2006.

· Ichiyama T, Siba P, Suarkia D, Reeder J,

Takasu T, Miki K, Kira R, Kusuhara K, Hara T, Toyama J, Furukawa S: Serum levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurol Sci* in press.

F. 知的所有権の取得状況

なし

## II. 平成 18 年度 分担研究報告

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、インフルエンザ脳症を発症した患者 34 名を対象に、whole-genome study で同定した関連候補 SNPs についての replication study を実施したが、インフルエンザ脳症との関連をバリデートすることはできなかった。さらに解析対象症例数を増やした上で再度 whole-genome study を行う必要があると考えられた。

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 (whole-genome study)。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)

1. 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。そのような遺伝情報を知ることが、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

既に、インフルエンザ脳症患者群 45 名、日本人一般集団 1,554 名を対象とした whole-genome study によって、関連の強い候補 SNP-X および SNP-Y を同定した。SNP-X および SNP-Y はそれぞれ  $7.2 \times 10^{-13}$  および  $2.1 \times 10^{-6}$  の p 値を示した（それぞれ dominant inheritance モデルおよび allele frequency モデル）。本年度は、新たにインフルエンザ患者 8 名（全てインフルエンザ脳症発症患者）の DNA サンプルを収集した。これらと昨年度に収集した 26 名のインフルエンザ脳症患者、合計 34 名を対象に、SNP-X および SNP-Y についての replication study を実施した。SNP-X では 34 名全員がノンリスクアレルの homozygote であった。その結果、全症例 79 名における p 値は  $9.9 \times 10^{-7}$  であり、症例追加前に比べて大きいものであった。SNP-Y の全症例における p 値は  $3.8 \times 10^{-6}$  であり、やはり症例追加前より大きかった。

### 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 whole-genome study 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 whole-genome study を選択した。今回実施した、関連候補 SNPs の replication study ではインフルエンザ脳症との関連をバリデートすることはできなかった。さらに解析対象症例数を増やした上で再度 whole-genome study を行う必要があると考えられた。

### E. 結論

インフルエンザ脳症患者 34 名について、Whole-genome study で同定した関連候補 SNPs の replication study を実施したが、インフルエンザ脳症との関連をバリデートするには至らなかった。

### 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）  
総括研究報告書

インフルエンザ脳症に認められる遺伝子多型の機能解析

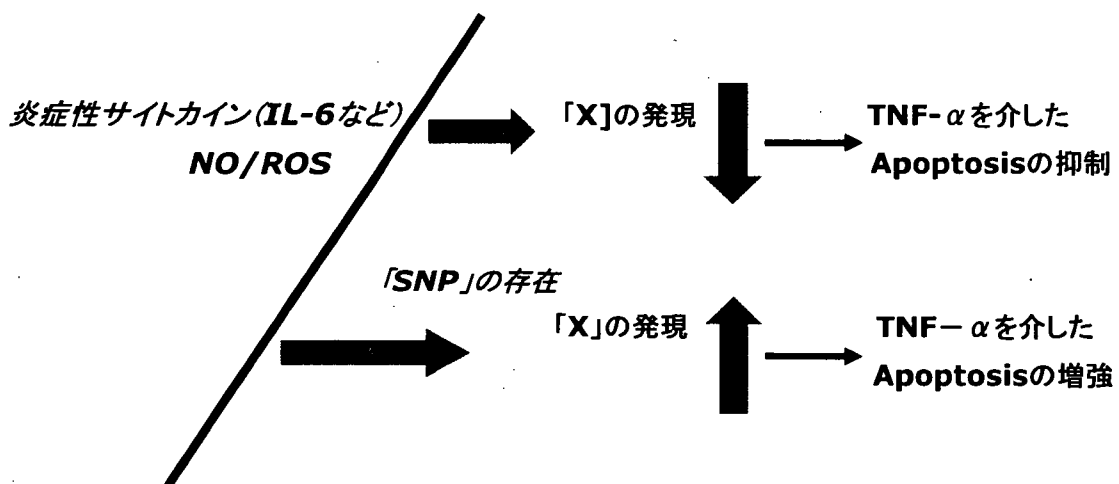
主任研究者 森島恒雄

研究要旨

本症の発症因子解明のための SNPs 解析（東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターとの共同研究）では、methionine 関連蛋白「X」の遺伝子多型が、非常に有意に本症の発症に関与することが示唆されている。「X」については、現在、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターにおいて、3回目の検討が実施されている。現在、まだ最終結果は得られていないが、高発現した「X」により下図で示すような TNF に対する感受性の変化をきたし、細胞に apoptosis が誘導されることがほぼ明らかになった。

すなわち、炎症性サイトカイン IL-6 や NO/ROS などが、インフルエンザ脳症患者で有意に高く、神経系障害に強く関与することが明らかになっている。また、TNF- $\alpha$  を介した apoptosis が全身の諸臓器で認められることもすでに確認されている。「X」の無い正常の細胞では、IL-6 や NOS/ROS などの影響下でも「X」関連蛋白のフィードバックメカニズムが働き、TNF- $\alpha$  存在下でも、apoptosis の誘導は抑制されるが、遺伝子多型の存在は、このフィードバックメカニズムが働かず、容易に apoptosis が進行することが判明した。

現在、ヒト血管内皮細胞を用いた検討、ノックアウト、ノックインマウスの作成などを行っている。



## 研究発表

## 論文発表

・ Morishima T. Guideline for the management of influenza associated encephalopathy. 日本臨床、2006、64(10):1897-1905.

・ Okumura A, Kubota T, Kato T, Morishima T. Oseltamivir and delirious behavior in children with influenza. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2006, 25(6):572.

・ Kawada J, Kimura H., Kawachi Y, Nishikawa K, Taniguchi M, Nagaoka K, Kurahashi H, Kojima S, Morishima T. Analysis of gene-expression profiles by oligonucleotide microarray in children with influenza. *J. Gen. Virol.*, 2006, 87(Pt6):1677-1683.

・ Okumura A, Fukumoto Y, Hayakawa F, Nakano T, Higuchi K, Kamiya H, Watanabe K, Morishima T. Antipyretics and delirious behavior during febrile illness. *Pediatr. Int.*, 2006, 48(1):40-43.

・ Ito H, Yamamoto N, Arima H, Hirate H, Morishima T, Umenishi F, Tada T, Asai K, Katsuya H, Sobue K. Interleukin-1beta induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor-kappaB pathway in rat astrocytes. *J Neurochem.* 2006 Oct;99(1):107-18.

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

2005/06 シーズンのインフルエンザウイルス流行株の解析と  
2006/07 シーズン向けワクチン株の選定

分担研究者 田代真人 国立感染症研究所 ウイルス第3部長

研究要旨

2005/06 シーズンは、全国のサーベイランスネットワークから 5,246 株のウイルスが分離された。流行の主流は AH3 亜型で全分離数の 65% を占め、AH1 亜型が 25%、B 型が 10% であり、3 種類のウイルスの混合流行であった。A/H1N1 ウイルスは、2002/03 シーズン以降の 2 シーズンは流行がなかったが、前シーズンから少数が分離され、2005/06 シーズンは分離数がさらに増えて全分離株数の 4 分の 1 を占めた。流行の主流を占めた A/H3N2 ウイルスは、2005 年夏季の非流行期から一部の地域で散発的な発生がみられ、9、10 月にもごく少数ながらウイルスが分離された。これら分離株は、2004/05 シーズンの主流株であった A/California/7/2004 類似株とは抗原性が異なり、この抗原変異株が 2005/06 シーズンの主流株となった。前シーズン主流であった B 型の流行規模は今シーズンでは小さく、分離株の多くは 3 月以降に分離され、沖縄県や岩手県など数県では 6 月に入っても学級閉鎖や学校閉鎖を伴う散発的な流行がみられた。また、前シーズンの B 型分離株の 99% は山形系統であったが、2005/06 シーズンに分離された B 型はすべて Victoria 系統株であった。この傾向は近隣アジア諸国においても同様であり、欧米諸国でも当該シーズンの後半には Victoria 系統株が大半を占め、B 型の流行は世界的にも山形系統から Victoria 系統への移行が見られた。

研究組織

分担研究者

田代真人 国立感染研ウイルス第3部長

協力研究者

小田切孝人 同 第1室長  
板村繁之 同 主任研究官  
小淵正次 同 主任研究官

今井正樹 同 主任研究官  
二宮 愛 同 研究官  
影山 努 同 研究官  
氏家 誠 同 研究官  
斎藤利憲 同 研究官