

し、患者様のプライバシーの保護に努めた。

C. 研究結果

対象となった患者の年齢別構成では、インフルエンザ脳症で1歳以上の発症が全体の93%を占めていた。これに対して急性脳症の患者では77%であった。表1に示しますように、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。

D. 考察

インフルエンザ感染では、発熱、上気道症状から始まり、全身状態の悪化を来とし、脳炎・脳症を引き起こす場合がある。この中には、感染を契機に発症した代謝異常症と考えられる症例もある。

今回の我々の調査では、表に示したようにインフルエンザ脳症で6%、インフルエンザ以外の急性脳症で13%に代謝異常が認められた。また、急性脳症と診断された中の約10%でバルプロ酸の排せつ増加があり、内服中であったと考えられる。このことは、背景にけいれん性疾患を持つ小児ではリスク因子と考えることができる。また、バルプロ酸や抗生剤の内服で2次性のカルニチン欠乏症をきたす。このため一部の症例では、このカルニチン欠乏が急性脳症の発症に関与している可能性もある。

また、両群でFDPase欠損症も発見された。FDPase欠損症ではグリセロール投与は禁忌である。脳圧降下剤としてグリセロール

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

急性脳症の患者の約10%に代謝異常症が存在していた。そのうち両群に1例ずつFDPase欠損症が認められた。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可能性があるため、グリセロール投与については注意を要する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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(2月)
- 2) 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(4月)
- 3) 山口清次：SIDSと先天代謝異常症. 母子保健情報(特集)乳幼児突然死症候群(SIDS)~その歴史と現状~(編集 仁志田博司)、53: 39-45, 2006.
- 4) 山口清次：タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの新時代. 小児保健研究 65(6):725-732, 2006(11月).
- 5) 高橋あんず、田草雄一、安田謙二、南憲明、内山温、渡辺浩、山口清次、根宜由実：ロタウィルス感染によりhemorrhagic shock and encephalopathyをきたした2歳男児例. 小児科臨床 59: 2400-2404, 2006.

2. 学会発表

- 1) 十河剛、小松陽樹、乾あやの、藤澤知雄、長坂博範、高柳正樹、重松陽介、長谷川有紀、山口清次：肝機能異常を契機に発見された脂肪酸代謝異常症が疑われた5例.

第 109 回日本小児科学会学術集会. 金沢, 2006. 4. 21-23

2) 小林弘典, 長谷川有紀, 遠藤 充, 山口清次: 尿中シルカルニチン分析による脂肪酸・有機酸代謝異常症の代謝分析の試み. 第 31 回日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋, 2006. 9. 28-29

3) 遠藤 充, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: 脂肪酸代謝異常症 3 症例のタンデムマスと培養線維芽細胞を用いた評価. 第 31 回日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋, 2006. 9. 28-29

4) Yamaguchi S: Sudden infant death and inherited metabolic disease. 9th SIDS International Conference (Symposium: Genetic Risk Factors for SUD), Yokohama, June 1-4, 2006

5) Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, Yamaguchi S: Evaluation of urinary acylcarnitines for differential diagnosis of cases showing blood carnitine deficit in tandem MS screening.

The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Chiba, 2006. 9. 12-16

6) Jamiyan P, Hasegawa Y, Kobayashi H, Endo M, Yamaguchi S: Metabolic screening of children with influenza-associated encephalopathy by organic acid analysis using GC/MS. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, 2006. 9. 16-19

7) Hasegawa Y, Kobayashi H, Endo M, Jamiyan P, Yang Y, Verma IC, Nguyen NT, Yamaguchi S: Experience of high-risk screening for inborn metabolic disease by GC/MS and tandem MS using dried urine and/or blood filter papers transported from Asian Countries. The 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening. Awaji, 2006. 9. 16-19

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. 急性脳症患者の代謝異常症検査結果

	＜インフルエンザ脳症＞ 129		＜それ以外の急性脳症＞ 186	
1)メチルマロン酸血症	1	} 8 (6%)	1	
2)尿素回路異常症	0		9	
3)CPT2欠損症	1		4	
4)VLCAD欠損症	0		2	
5)MCAD欠損症	0		2	
6)全身性カルニチン欠乏症	1		2	} 24 (13%)
7)グルタル酸尿症Ⅱ型	0		1	
8)脂肪酸代謝異常症疑い (非ケトン性ジカルボン酸尿)	4		2	
9)FDPase欠損症	1		1	
* その他				
バルプロ酸代謝産物	13		11	
2次性カルニチン欠乏症(抗生剤)	1		3	

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

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

分担研究者 浅井清文 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子神経生物学分野・教授

研究協力者

垣田博樹、Mohamed Hamed Hussein

名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学分野

伊藤弘晃、森島徹朗、祖父江和哉

名古屋市立大学大学院医学研究科 麻酔・蘇生学分野

青山峰芳

名古屋市立大学大学院医学研究科 分子神経生物学分野

研究要旨

インフルエンザ脳症における高サイトカイン血症の状態が、中枢神経に与える影響については不明な点が多い。本研究では、 $IL-1\beta$ 、 $TNF\alpha$ 、 $IFN\gamma$ 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。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症の病態生理において、高サイトカイン血症の存在が明らかにされている。一方、臨床経過では急激に脳浮腫を来す症例（急性脳腫脹型）の存在や、病理組織所見ではグリア細胞（アストロサイト、ミクログリア）の活性化が生じていること指摘されている。インフルエンザ脳症では、血液中の高サイトカイン状態が、脳内にも波及し、その結果、サイトカインにグリア細胞が反応し機能異常を生じ、神経細胞の機能を維持できなくなるなりばかり

か、さらには、アストロサイト自身の機能異常を来し、アストロサイトを中心とした急激な浮腫を生じてくるものと推測される。しかしながら、その分子メカニズムは、未だ不明な点が多い。

本研究においては、培養アストロサイトを用い、炎症性サイトカインがアストロサイトにどのような作用をもたらすか、検討を行った。

B. 研究方法

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。10% 胎児牛血清 (FBS) を含む low glucose DMEM 培地を用い、コンフルエントになるまで2 ないし3 日ごとに培地を交換した。トリプシンにて細胞を分散した後、100mm ディッシュに 2.5×10^6 細胞/dish となるよう細胞を播いた。サブコンフルエントになるまで培養を行い、実験の1 日前に 1% N2 supplement を含む high glucose DMEM (FBS free) に交換した。実験開始時に、Interleukin-1 β (IL-1 β) 5ng/ml、Tumor necrosis factor- α (TNF α) 20ng/ml、Interferon- γ (INF γ) 5 ng/ml、ジクロフェナックナトリウム 1000ng/ml または 5000ng/ml 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 (6 時間、12 時間、24 時間、48 時間) に培地を採取し、直ちに-80°Cに保存した。培地中の NOx は Griess の方法を用いた測定キットを用いて定量した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、名古屋市立大学大学院医学研究科動物実験指針に従い実験を行った。

また、ヒト由来の検体は、取り扱っていない。

C. 研究結果

ラット培養アストロサイトに IL-1 β 、TNF α 、INF γ をそれぞれ単独で作用させた場合は、培地中の NOx の濃度は上昇しなかった (data not shown) が、図 1 に示すように、3つのサイトカインを同時に作用させると、添加後 48 時間で有意な上昇を認めた。また、ジクロフェナックナトリウムを共存させると、添加後 12 時間から NOx の産生量が増加し、24 時間、48 時間では有意な上昇を認めた。

D. 考察

本研究において、IL-1 β 、TNF α 、INF γ 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。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 (Kawashima et al. *Neuropediatrics* 34;137-140, 2003) 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。

また、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。

今後、アストロサイトにおける iNOS の mRNA 発現量の変化の検討や、アストロサイト内での細胞内シグナルの解明を通して、NOx の産生上昇が、どのような機序によって生じているのか明らかにしたい。また、アストロサイトばかりでなくミクログリアも、脳内の炎症病態において大きな役割を担っていることが知られており、高サイトカイン状態がミクログリアにどのような影響を与えるか検討を行っていきたいと考えている。

E. 結論

1, IL-1 β 、TNF α 、INF γ 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と NOx の産生が高まる。

2, 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

祖父江和哉、伊藤弘晃、平手博之、杉浦健之、藤田義人、青山峰芳、三浦裕、津田喬子、勝屋弘忠、浅井清文 Interleukin-1 beta induces the expression of aquaporin-4 through a NF-kappaB pathway in rat astrocytes 第49回日本神経化学会大会 名古屋 2006. 9

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

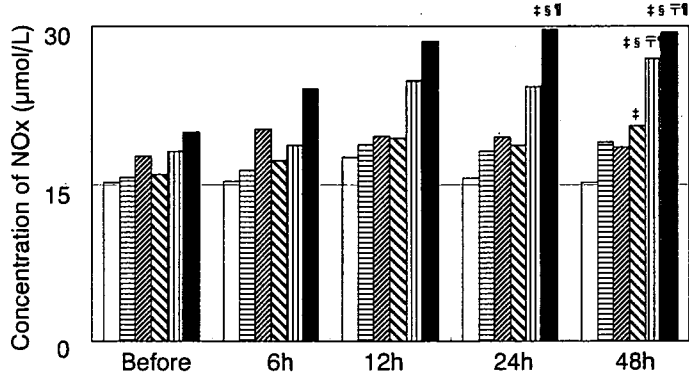
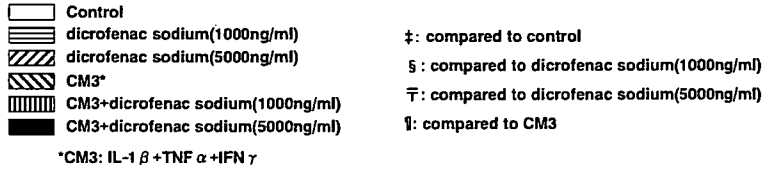
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



☒ 1

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

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

分担研究者 宮崎千明 福岡市立西部療育センター・センター長

研究要旨

小児の原因不明の脳炎・脳症は冬期と初夏に頂点を持ち通年性に発生し、インフルエンザウイルスやエンテロウイルス以外に複数の病原体の関与が示唆された。

リハビリテーションの視点からインフルエンザ脳症後遺症を見ると、他の中枢神経感染症に比しても重篤な後遺症を残す症例が少なくない。しかし症例数もしくは重症例がやや減少してきている可能性がある。また、平成 18 年の健康保険医療費改定や障害者自立支援法により、リハビリテーション医学や療育の現場が厳しくなっている。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症および他の中枢神経感染症の疫学と罹患後のリハビリテーションを要する後遺症の現状を明らかにする。

B. 研究方法

小児急性神経系疾患（AND）調査から、原因不明の脳炎・脳症を抽出し、その疫学的特徴を明らかにし、インフルエンザ脳症と比較する。

また、インフルエンザ脳症後遺症を始めとする中枢神経感染症、特に予後不良の脳炎・脳症と細菌性髄膜炎後遺症の実態についてF市における最近の状況をまとめた。

（倫理面への配慮）

具体的な症例が特定できないように、性別や発症月などのデータをマスクした。

C. 研究結果

AND 調査では原因不明の脳炎・脳症が約 60%あり（図 1）、その年齢分布と季節分布を調べた。脳炎・脳症全体としては 1 歳、2 月が頂点になり、症例数の多いインフルエンザ脳症の分布（既報）に近似した。しかし原因不明の脳炎・脳症は 1 歳が頂点だが、0 歳にも多く、年齢が上昇するにつれ、徐々に症例数が減少した。季節分布は 1 月を頂点に、5-6 月にも緩やかな波が見られた。

主に平成 12 年～平成 17 年に発症した F 市の小児の急性脳炎・脳症のうち、後遺症を残してリハビリテーションを目的に療育施設を受診した症例を検討した。インフルエンザ脳症（表 1）は平成 9～15 年で 7 例（既報）あり、後遺症は重度だった。平成 16 年および 17 年は症例がなかった。対照として、インフルエンザ脳症以外の脳炎・

脳症後遺症児を表2に、細菌性髄膜炎後遺症児を表3に示した。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。

D. 考察

原因不明の脳炎・脳症症例の季節分布は、インフルエンザ脳症の発症ピークである2月とはややずれが見られ、1月を頂点にした冬季、5-6月を中心とした緩やかな山をはじめ、1年中見られるので、インフルエンザ以外の複数の病原体の存在が示唆された。年齢分布でみると、インフルエンザ脳症と比較して、0歳と5歳以上の年長児に原因不明脳炎・脳症が多い傾向がある。今後の病原体検索の努力が期待される。

中枢神経感染性、特に脳炎・脳症や細菌性髄膜炎は、死亡や重篤な後遺症を残す率が高い予後不良の疾患である。今回、インフルエンザ脳症と他の脳炎・脳症、細菌性髄膜炎の後遺症をリハビリテーションの分野からみた。インフルエンザ脳症児は他の疾患に比しても運動まひ、知的な退行、てんかんの3大後遺症が重篤な傾向にあるが、平成9年以来、年平均1例の重度後遺症例が見られていたが、平成16、17年に受診がなかったので、症例数が減少してきたか、軽症化してきた可能性がある。今後注視していきたい。

中枢神経感染性の後遺症には、その他、難聴や学習障害、多動なども見られた。リハビリテーションの充実が期待されるが、平成18年4月の健康保険改訂により、リハビリテーションの期間や点数が大幅に減らされた現状があり、憂慮されている。発達途上にある小児は多面的、長期的にリハビリを継続する必要がある。特に当センターのような理学療法士、作業療法士、言語聴覚士などの療法士の少ない施設では収入が激減している。制度の再改正を望みたい。

また、障害者自立支援法が小児の療育現場にも適応され、軽減措置がない自治体では、療育に関する保護者の自己負担が大幅に上昇している。児童福祉法との整合性もとれおらず、全国的な批判が続いている。この点も国として再考願いたい。

E. 結論

インフルエンザ脳症以外の原因不明の脳炎・脳症がなお多く、その季節分布は冬季と5-6月にあり、かつ通年性で見られるので、インフルエンザ以外の複数の病原体の関与が示唆された。

インフルエンザ脳症の症例数は最近増加はしていないが、後遺症の重症度は他の中枢神経感染症に比して同等またはより重篤であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

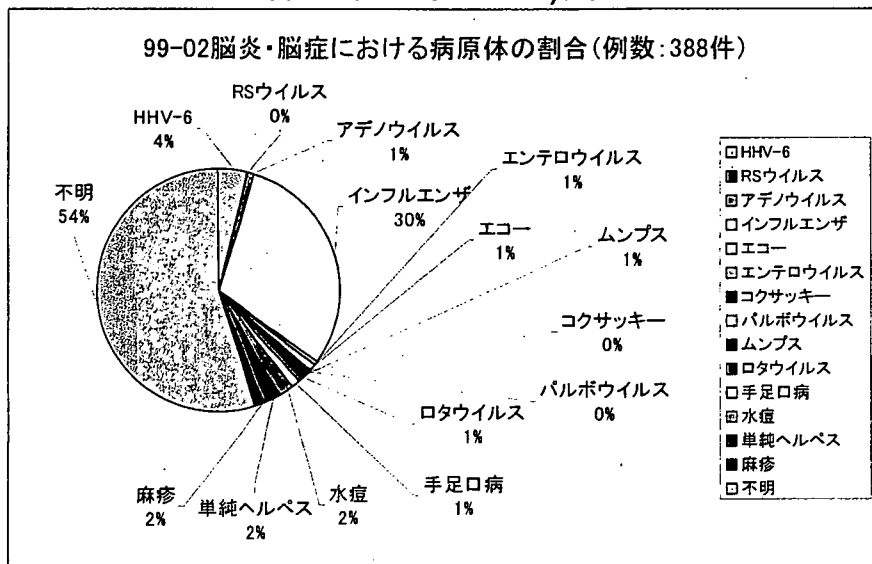
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1) 小児急性神経系疾患(AND)調査1999-2002年



(報告済み)

図2) AND調査2001-02における各疾患の年齢分布
(厚生労働省ワクチン研究班より)

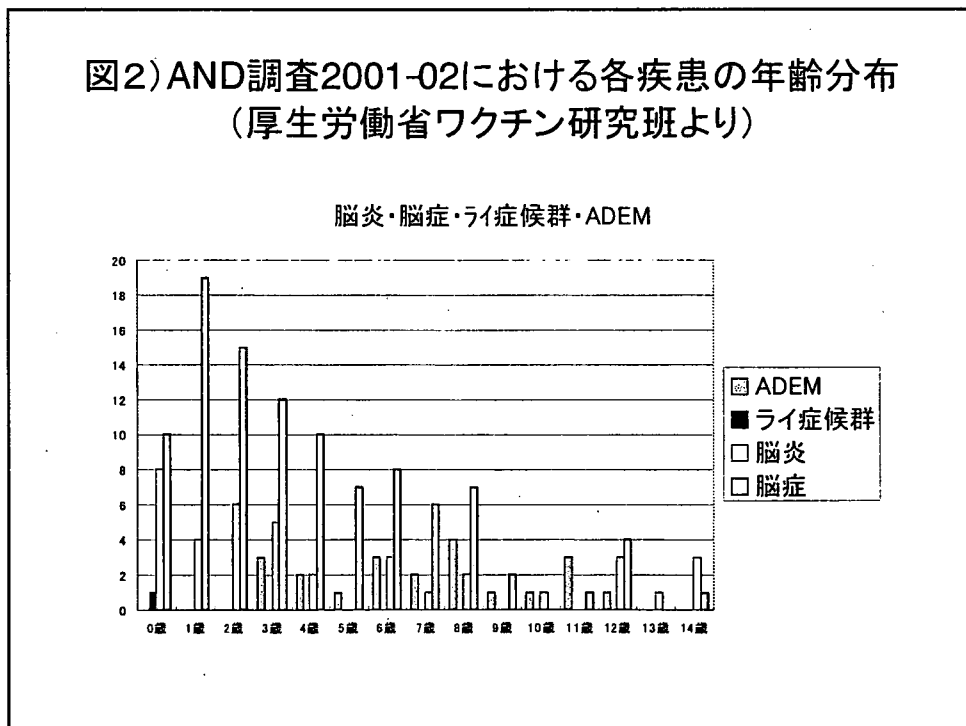
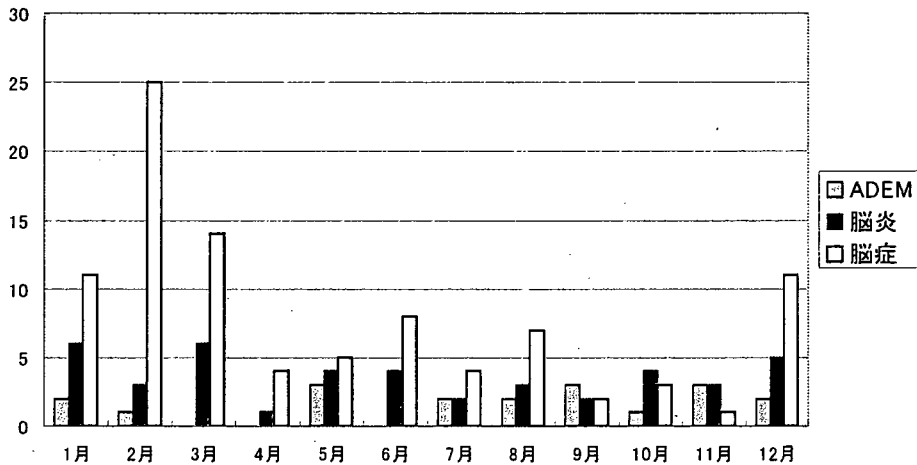


図3) AND調査2001-02における脳炎・脳症・ADEMの季節性

脳炎・脳症・ADEM



(厚生労働省ワクチン研究班より)

図4 AND調査における原因不明の脳炎・脳症の年齢分布

99-02脳炎・脳症で原因が不明-年齢
388例中204

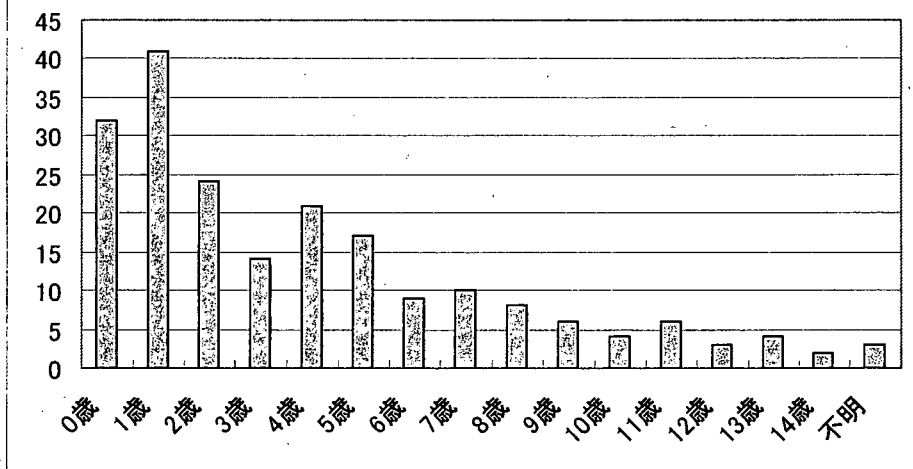


図5 AND調査における原因不明の脳炎・脳症の季節性

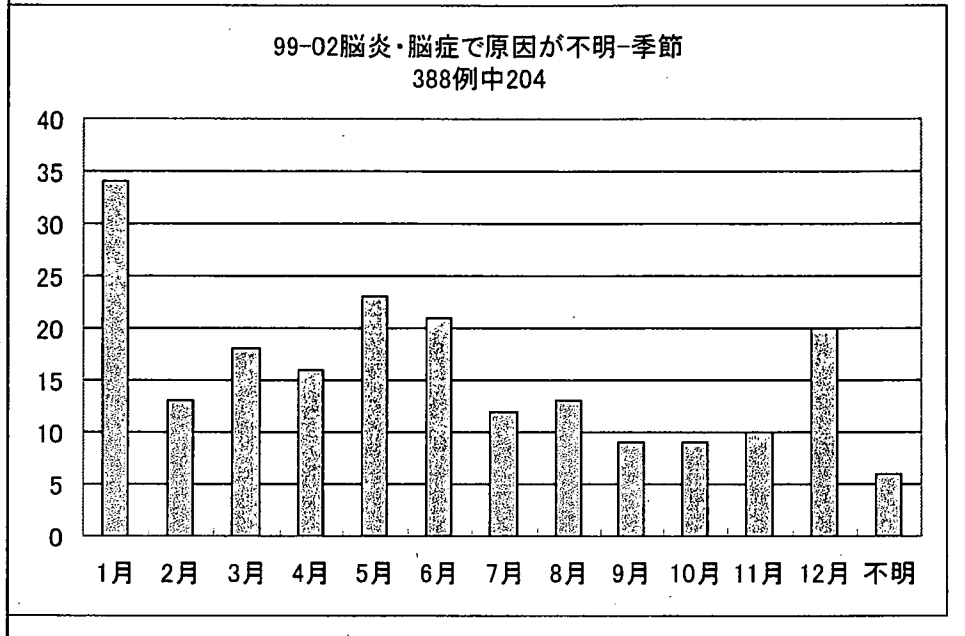


表1) F市内の2療育施設をリハビリテーションを目的で受診した
インフルエンザ脳症後遺症児
(H9-17年)

症例	発症年	年齢(歳)	運動まひ	精神遅滞	その他	ウイルス
1	H.09.	4	痙性片まひ	中度	てんかん	AH3N2
2	H.10.	1	痙性両まひ	軽度	てんかん	A
3	H.10.	1	痙性四肢まひ	重度	てんかん	AH3N2
4	H.11.	1	痙性三肢まひ	軽度	てんかん	AH3N2
5	H.12.	5	痙性四肢まひ	重度	てんかん	A
6	H.14.	2	失調	正常域		A
7	H.15.	2	痙性四肢まひ	重度	てんかん	A

(報告済み)

表2) F市内の2療育施設をリハビリテーションを目的で受診した
インフルエンザ脳症以外の脳炎・脳症後遺症児(H12-17年)

1	発症年齢	発症時期	診断名	原因	まひ	精神遅滞	てんかん	その他
2	2y	H12	急性脳症	細菌性赤痢	四肢まひ	重度	あり	
4	1y	H12	急性脳炎	突発性発疹	四肢まひ	重度		
5	1y	H12	急性脳症	不明	片まひ	境界域	あり	
6	8m	H.12	脳脊髄膜炎	ECHO3?		境界域	あり	言語性LD
7	3y	H.13	急性脳症	単純ヘルペス		重度	あり	
8	4y	H.13	急性脳症	不明		軽度		発達障害
10	2y	H.14	急性脳症	ロタウイルス		境界域		
11	1y	H.14	急性脳症	不明	四肢まひ	重度		視聴覚障害
13	1y	H.15	急性脳症	ロタウイルス	四肢まひ	重度		
14	4y	H.15	急性脳症	不明				多動
15	1y	H.15	急性脳症	HHV-6	左片まひ	軽度	あり	
16	11m	H15	急性脳症	不明		重度	あり	
17	1y	H16	急性脳症	不明	四肢まひ	重度	あり	
18	1y	H16	急性小脳炎	突発性発疹?	失調	境界域		
19	3y	H17	急性壊死性脳症	単純ヘルペス?	失調	境界域		
20	1y	H17	急性脳炎	単純ヘルペス?	左片まひ			

表3) F市内の2療育施設をリハビリテーションを目的で受診した
細菌性髄膜炎後遺症児(H12-17年)

症例	年齢	発症時期	原因	まひ	精神遅滞	てんかん	その他
1	5月	H.13.	S pneumoniae	左片まひ	軽度	あり	
2	1歳	H13	H influenzae b	右片まひ	軽度		
3	0月	H.13.	B群溶連菌	四肢まひ	重度	あり	
4	1歳	H.14.	不明	左片まひ		あり	難聴
5	0月	H14.	不明		中度		
6	2歳	H16.	H influenzae b				両高度難聴

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

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

分担研究者 木村 宏 名古屋大学医学部ウイルス学
研究協力者 伊藤嘉規 名古屋大学医学部小児科

研究要旨

インフルエンザ脳症の鑑別診断としてヘルペスウイルス属による脳炎・脳症が重要である。ヘルペスウイルス属はヒトに潜伏感染し、細胞性免疫の抑制・再構築の遅れに伴い再活性化する。今回、我々はEBV、CMV、HHV-6の3つのウイルスに対してそれぞれ別の蛍光色素で標識したプローブを用い、同一チューブ内で同時測定するマルチプレックス・リアルタイムPCR法を世界に先駆けて確立した。この方法によりEBV、CMV、HHV-6の3種のウイルスDNA量をより簡便かつ迅速に定量するシステムを構築し、造血幹細胞・臓器移植患者のウイルスモニタリングに応用した。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症は、主として1-5歳の幼児に好発する。この年代で、鑑別すべきウイルス関連中枢神経系疾患として、herpes simplex virus や human herpes virus 6 (HHV-6) などのヘルペスウイルス属による脳炎・脳症が挙げられる。これらのヘルペスウイルス属はヒトに潜伏感染し、細胞性免疫の抑制・再構築の遅れに伴い再活性化する。ヘルペスウイルス属は健常人からも微量なウイルスが検出されるため、診断法として、感度に優れなおかつ定量性のある方法が必要である。

近年、蛍光標識プローブを用いたリアルタイムPCR法により個々のウイルスDNAを迅速に定量する方法が開発され、一部は臨床

応用されてきた。しかし、従来のリアルタイムPCR法では、個々のウイルスをそれぞれ別に定量測定しなければならなかったため、時間、手間、コストが掛かっていた。同じチューブ内で、同時に複数のウイルス遺伝子を定量することは理論的には可能であったが、蛍光の干渉など技術的な問題で今まで成功しなかった。今回、我々は3つのウイルスに対してそれぞれ別の蛍光色素で標識した、プローブを用い、同一チューブ内で同時測定するマルチプレックス・リアルタイムPCR法を世界に先駆けて確立した。この方法によりEpstein-Barr virus (EBV)、cytomegalovirus (CMV)、およびHHV-6の3種のヘルペスウイルスDNA量をより簡便かつ迅速に定量するシステムを構

築し、造血幹細胞・臓器移植患者のウイルスモニタリングに応用した。

B. 研究方法

(1) マルチプレックス・リアルタイム PCR 法による測定系の確立

EBV BALF5 領域、CMV IE2 領域、HHV-6 U31 領域にプライマー、プローブを設定し、それぞれ 5' 末端、を 6-carboxyfluorescein (FAM), 6-carboxy-4', 5'-dichloro-2', 7'-dimethoxyfluorescein (JOE)、carbocyanine 5 (Cy5) で、3' 末端を black-hole-quencher (BHQ) 1a、BHQ1a、BHQ3a の蛍光色素でプローブを標識した。プライマー・プローブは既に報告したものをを用いた。プライマーの合成は Greiner bio-one (東京)、プローブの合成・標識は Operon biotechnologies (Huntsville, USA) に委託した。

マルチプレックス・リアルタイム PCR 法は QuantiTect Multiplex PCR キット (QIAGEN, Hilden, Germany) を用い行った。PCR 反応液は 5 ul の DNA 抽出液、12.5 ul の Quantitect Multiplex PCR マスターミックス、結果に示した濃度のそれぞれのプライマー・プローブを加え総量 25 ul とした。ウイルス遺伝子の増幅と蛍光色素の検出は Mx3000P™ リアルタイム PCR システム (Stratagene, La Jolla, USA) を用い、以下の条件で行った: 95° C 15 分に引き続き、95° C 15 秒-60° C 1 分を 50 サイクル。EBV BALF5 領域、CMV IE2 領域、HHV-6 U31 領域を組み込んだプラスミドを陽性コントロールとし、10 倍希釈したものを用い標準曲線を作成した。未知の検体の定量を行う際には、EBV, CMV, HHV-6 の 3 種のプラスミドをミックスしたものを陽性コントロールと

し、標準曲線からウイルスコピー数を算出した。

(2) 単独 リアルタイム PCR 法とマルチプレックス・リアルタイム PCR 法の比較

患者血液由来で、あらかじめウイルス DNA 陽性とわかっている DNA50 検体 (EBV 陽性 20 検体、CMV 陽性 20 検体、HHV-6 陽性 15 検体) を用いて、それぞれ従来の単独の測定系およびマルチプレックスの測定系による定量を行った。

(3) 臨床検体を用いたウイルス検出システムの有用性の検討

名古屋大学医学部附属病院小児科、小児外科、移植外科にて治療を受けた造血幹細胞移植 27 例、生体肝移植 19 例から経時的に血液を採取した。得られた血液 303 検体をそれぞれ全血、血漿に分けた後、DNA を抽出し、EBV, CMV, HHV-6 のウイルス量をマルチプレックス・リアルタイム PCR により定量した。

C. 研究結果

(1) 陽性コントロールプラスミドを用い、マルチプレックス・リアルタイム PCR 法による、EBV, CMV, HHV-6 DNA の同時測定を行った。各色素が干渉なく検出されるためには、プライマー・プローブの濃度設定も重要で、EBV のプライマーは 5' 側が 200nM, 3' 側が 200nM, CMV はいずれも 100 nM, HHV-6 は 5' 側が 100nM, 3' 側が 200nM、プローブの濃度は EBV, CMV, HHV-6 いずれも 100nM であった。陽性コントロールを用いて標準曲線を作成したところ、図 1 に示したごとく各ウイルス 5~5×10⁶ コピーの範囲で良好な直線性が得られ、検出限界はサンプルチューブあたり EBV, CMV, HHV-6 そ

れぞれ2コピー、5コピー、2コピーであった。また、ヒトDNAをコントロールプラスミドに一定量加え、標的遺伝子以外のDNAが測定系に及ぼす影響を調べたところ、この同時検出システムでは標的遺伝子以外のDNA存在下でも標的遺伝子を特異的かつ高感度で検出できることがわかった。

(2)あらかじめいずれかのウイルスが陽性とわかっているDNA検体を用い、単独およびマルチプレックス・リアルタイムPCR法の定量結果を比較したところ、3種のウイルスとも強い相関が見られた(図2; EBV $r=0.978$, $p<0.0001$ / CMV $r=0.939$, $p<0.0001$ / HHV-6 $r=0.956$, $p<0.0001$)。

(3)経時的に血液検体を採取した移植患者46例中、36例(78.3%)の全血、18例(39.1%)の血漿からいずれかのウイルスDNAが検出された。また、全血では13例(28.3%)、血漿で5例から2種類以上のウイルスDNAが検出された。いずれのウイルスも血漿より全血中での陽性率が高かった。

(4)検出されたウイルスDNA量の経時的変化は移植後患者の症状・治療経過と一致した。EBVについて、全血および血漿から検出されたウイルスDNA量を、有症状期・無症状期に分けて比較したところ、全血においてはEBVに関して有症状期の患者検体から有意に多くのウイルス量が検出された(図3)。また、有症状であった患者全血検体はすべてEBV DNA陽性であった。一方、血漿中では有症状期と無症状期でEBV量には差がなく、一部の患者血漿では有症状であったにもかかわらず、ウイルスDNAは検出されなかった。

D. 考察

マルチプレックス・リアルタイムPCR法によるEBV、CMV、HHV-6の同時検出システムはそれぞれを単独で検出する従来の方法と比べて定量性に差はなく、有用な測定系であることが示された。また、造血幹細胞移植・臓器移植患者を対象に血液中のウイルスDNAの定量を行った結果、臨床的にも非常に有用であることが示された。さらに、新たな知見として、全血をサンプルとした時の方がウイルスを高感度で検出できるのみならず、有症状期にウイルス量が多くなることから、全血の方がより臨床経過を反映していることがわかった。しかし、全血からのウイルス検出は、症状を伴わない場合があり、必ずしもそのウイルス関連疾患を意味しない。そのため、全血を用いる場合には、臨床的意義をもつカットオフ値の設定が必要である。現在症例数を増加しカットオフ値の検討を行っている。

マルチプレックス・リアルタイムPCR法を用いることで、3種類の異なったウイルスを同時に測定できるのみならず、測定時間の短縮、労働の減少も期待できる。直接経費だけでなく人件費も大幅に削減できるため、幅広く移植医療で応用される可能性が高い。このシステムによって、より簡便・迅速な移植後ウイルス感染症のモニタリングが可能となる。

今回我々は、EBV・CMV・HHV-6という主として移植に関連したヘルペスウイルス属についての同時定量システムを確立した。インフルエンザ脳症の鑑別診断としては、これらのウイルスに加え、herpes simplex virusやhuman herpes virus 7 (HHV-7)、varicella-zoster virusなどのヘルペスウイルス属も対象となってくる。今後はこれ

らのウイルスを含んだ、複数ウイルス同時検出システムの確立が望まれる。

E. 結論

マルチプレックス・リアルタイム PCR 法を用い EBV、CMV、HHV-6 のウイルス DNA 同時検出システムを確立した。同法は各々を単独で検出する従来法と比べ定量性に差はなく、有用な測定系であることが示された。このシステムにより簡便、迅速な複数ウイルスの感染症の診断・モニタリングが可能になると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawada J, Kimura H, Shibata Y, Hara S, Hoshino Y, Kojima S, Nishikawa K, Morishima T. Evaluation of Apoptosis in Epstein-Barr Virus-Associated Haemophagocytic Lymphohistiocytosis. *J Med Virol* 17;78:400-407, 2006
- 2) Hara S, Hoshino Y, Naitou T, Nagano K, Iwai M, Suzuki K, Yamamoto K, Nagasaka T, Morishima T, Kimura H. Association of virus infected-T cell in severe hepatitis caused by primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol* 35: 250-6, 2006
- 3) Maeda N, Yamashita Y, Kimura H, Hara S, Mori N. Quantitative analysis of herpesvirus load in the lymph nodes of patients with histiocytic necrotizing lymphadenitis using a real-time PCR. *Diagnostic Molecular Pathology* 15:49-55, 2006
- 4) Kawada J, Kimura H, Kamachi 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* 87: 1677-1683, 2006
- 5) Hirose I, Ymaguchi H, Inagaguma D, Ono K, Shimada S, Kawada J, Shiraki K, Kimura H. Fatal Varicella Infection in a Girl with Systemic Lupus Erythematosus after Oral Acyclovir Prophylaxis. *Eur J Pediatr* 165 : 280-1, 2006
- 6) Shibata Y, Hoshino Y, Hara S, Yagasaki H, Kojima S, Nishiyama Y, Morishima M, Kimura H. Clonality Analysis by Sequence Variation of the Latent Membrane Protein 1 Gene in Patients with Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *J Med Virol* 78:770-9, 2006
- 7) Iwata S, Shibata Y, Kawada J, Hara S, Nishiyama Y, Morishima T, Ihira M, Yoshikawa T, Asano Y, Kimura H. Rapid detection of Epstein-Barr virus DNA by loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Virol* 37:128-3, 2006
- 8) Sato Y, Tsuboi T, Mikami T, Kurosawa H, Kanou K, Sugita K, Kimura H, Nagasaka T, Imashyuku S, Eguchi M. Chronic active Epstein-Barr virus infection with dilatation of the Valsalva sinus. *Pediatr Int* 48:643-5, 2006
- 9) Kimura H. Pathogenesis of Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection: Is This an Infectious Disease,

- Lymphoproliferative Disorder, or Immunodeficiency? *Rev Med Virol* 16:251-61, 2006
- 10) Kimura H. Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection; New Developments in Epstein-Barr Virus Research, Constantine S. Umar, ed., Nova Science Publishers, New York, p55-70, 2006
- 11) 木村 宏、河 敬世、大石勉、前田明彦、岡村隆行、大賀正一、金兼弘和、森雅亮、森本 哲、森尾友宏、今井章介、岡野素彦、谷内江昭宏、土屋 滋、脇口宏：慢性活動性 EB ウイルス感染症の長期予後について。日本小児科学会雑誌, 110:1578-80, 2006
- 12) 木村 宏、森島恒雄。ヘルペスウイルス感染の診断 日本臨床 増刊号 ヘルペスウイルス学—基礎・臨床研究の進歩 64:55-8, 2006
- 13) 木村 宏。新生児ヘルペスの治療 日本臨床 増刊号 ヘルペスウイルス学—基礎・臨床研究の進歩 64:302-5, 2006
- 14) 木村 宏。慢性活動性 EBV 感染症 日本臨床 増刊号 ヘルペスウイルス学—基礎・臨床研究の進歩 64:630-4, 2006
- 15) 木村 宏。単純ヘルペスウイルス 小児科診療 増刊号 小児の治療指針 69 Suppl.:204-6, 2006
- 16) 伊藤喜規、木村 宏。EB ウイルス：ウイルス関連疾患とリアルタイム PCR 法の応用。VIRUS REPORT 増 3: 109-116, 2006
- 17) 木村 宏。移植後リンパ増殖症 臨床とウイルス 34: 141-4, 2006
- 18) 木村 宏。慢性活動性 Epstein-Barr virus 感染症 日本小児血液学会雑誌 20: 572-580, 2006
- 19) 木村 宏。無菌性髄膜炎症候群 今日の小児治療指針(第 14 版) 大関武彦、古川漸、横田俊一郎編。医学書院、p257, 2006
- 20) 木村 宏、森島恒雄。単純ヘルペスウイルス 小児感染症マニュアル2007 日本小児感染症学会編 東京医学社、p279-284, 2006
2. 学会発表
- 1) 木村 宏 シンポジウム「致死性 EB ウイルス関連疾患の診断と治療」EBV 関連リンパ増殖症に対するモニタリング 第 80 回日本感染症学会学術講演会 2006. 4. 20. 東京
- 2) 木村 宏 シンポジウム 中枢神経ヘルペス感染症-Update- 小児期のヘルペス脳炎 第 47 回日本神経学会総会 2006. 5. 13. 東京
- 3) 木村 宏 合同シンポジウム「血液疾患に対する感染対策」血液疾患患者におけるウイルス感染症の予防・診断・治療 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会 2006. 10. 6. 福岡
- 4) 伊藤嘉規、木村 宏。Multiplex real-time PCR 法による EBV、CMV、HHV-6 同時検出システムの確立。第 38 回日本小児感染症学会学術集会 2006. 11. 10. 高知
- 5) 和田かおる、伊藤嘉規、吉川哲史、西山幸廣、木村 宏 ワークショップ「ウイルス同定・診断法の新規開発」Multiplex real-time PCR 法による EBV、CMV、HHV-6 のウイルス DNA 同時検出システムの確立。第 54 回日本ウイルス学会学術集会 2006. 11. 19. 名古屋

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特許出願：ウイルス検出用オリゴヌクレオチドセット、EBV、CMV 及び HHV-6 の分析方法及び検出キット（特願 2006-157532）

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

図1 マルチプレックス・リアルタイムPCR法による
EBV, CMV, HHV-6の同時測定
標準曲線の作成

