

5. 社会的負担と医師の援助

急性期の治療費以外にも、後遺症が重い場合、てんかん治療やリハビリテーションなどの医療費・交通費、装具・生活福祉機器費、通園施設費、各種福祉手当、保護者の介護負担など、公私ともに大きな社会的負担が生じる。主治医は患者家族の個人負担軽減のため、身体障害者手帳や療育手帳、障害児医療証の取得、特別児童扶養手当や障害児福祉手当などの福祉サービス利用の手助け（診断書の作成など）を行う。

参考文献

1. 森島恒雄, 他. インフルエンザに合併する脳炎・脳症に関する全国調査. 日本医事新報 2000; (3953): 26-8.
2. 栗原まな, 他. 急性脳症罹患後に発症したてんかん: 重度後遺症合併例における検討. 日見誌 2003; 107: 46-52.
3. 栗原まな. 眼で見る小児のリハビリテーション 第2版. 診断と治療社. 2007. 1-189
4. 栗原まな+アトムの会. ふたたび楽しく生きていくためのメッセージー後天性脳損傷の子どもをもつ家族との対話ー. クリエイトかもがわ 2006. 1-153.
5. 栗原まな. 小児の高次脳機能障害. 診断と治療社. 2008. 1-172

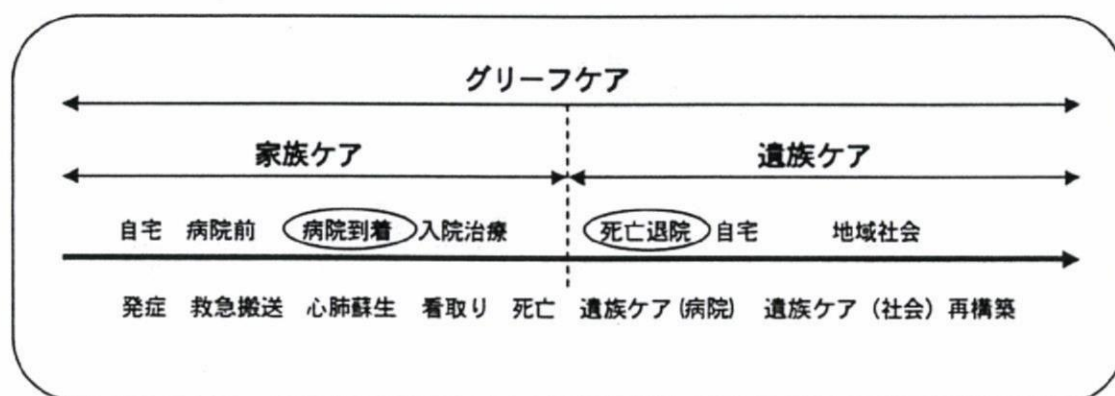
V. インフルエンザ脳症におけるグリーフケア

1. グリーフケア

医療体制の整備にもかかわらず、不幸にしてインフルエンザ脳症で亡くなる子どもたちが、少なからず存在する。子どもを突然失ったことから生じる家族の悲嘆（グリーフ）をどのように支えていくか（グリーフケア）は、医療現場において重要な課題の一つであるが、まだ確立した対策がないのが現状である。そのため、本ガイドラインではグリーフケアの項を設け、「急性脳症に罹患した子どもの家族に対し、医療関係者がどのような配慮をもって接することが望まれているのか」について、100名を超える遺族へのアンケート調査に基づいて、結果をまとめた。これらの内容を一つのグリーフケアのモデルとして考えていただければ幸いである。

A. グリーフケアの発病時期による分類

グリーフケアの考え方は、最重症例ではインフルエンザ脳症発症と同時に必要となる。ここでは、発病から臨終までの「家族ケア」と臨終以後の「遺族ケア」にわけて記載した。



B. 家族の要望と医療者の対応

1) 病院前救急

病院前救急は搬送医療である。いっぽうインフルエンザ脳症の発症直後のため、保護者の不安、動揺は非常に大きいものである。このことを救急隊員は認識し、適正な処置や搬送先の決定だけでなく、搬送中の保護者に対する心理的配慮を行う必要がある。また、事後検証としてメディカルコントロール（MC）におけるフィードバックにより病院前医療の質の向上に努めなければならない。

	現状	保護者の要望	医療者の望ましい対応
病院前救急	・インフルエンザ脳症に対する医学的知識の少なさから保護者への心理的配慮が不足している。	・救急隊員はインフルエンザの知識、搬送トリージング能力の習得が必要。 ・家族の傷つきやすい状況を理解してほしい。 ・死亡が疑われても丁寧な搬送を望む。	・救急隊は適正搬送のために、インフルエンザ脳症の疾患知識の習得が望まれる。 ・保護者の不安や動揺への心理的支援の必要性を学ぶことが望ましい。 ・MC の場での情報のフィードバックが望まれる。

2) 心肺停止で蘇生不可能な場合の対応

心肺停止 (CPA) で蘇生の甲斐なく死亡となった場合の系統だった対応ガイドラインはない。保護者の戸惑いや悲しみは大きいものである。治療にあたっては、保護者と医療者の間には大きなギャップがあることを前提に、下記のような対応が望ましい。

	現状	保護者の要望	医療者の望ましい対応
心肺停止で蘇生不可能な場合	<ul style="list-style-type: none"> 医療機関における死後の対応ガイドラインがない。 医療者に時間的、精神的余裕がない。 保護者と医療者の間には大きなギャップがある。 	<ul style="list-style-type: none"> 検死、剖検までの遺体への配慮が欲しい：剖検台に置かれ、抱いてやれなかった。 個室を提供して欲しい。 死亡後の抱っこ的重要性 剖検結果の説明の重要性 	<ul style="list-style-type: none"> 受付手続きは迅速かつ丁寧に行い、医療スタッフは受け入れ態勢を徹底する。 死亡確認は保護者の児への罪責感に配慮して行う。 死亡確認後も児を遺体と捉えず、家族の抱く機会を与える。 死因の説明は、後日改めて行うことが可能であることを伝え、グリーフ・カードを手渡す。

3) 重症児の搬入と初期対応

脳症をきたした児が搬入されたときは、保護者と医療者の間には医療行為をめぐる認識に大きなギャップがあることを理解する必要がある。蘇生中の保護者の不安、処置への立会い希望、待機中の個室の確保、保護者にとってのカルテの遺品としての重要性などについては、医療者が日常業務の中で気が付かずにいる場合もある。保護者の重要な要望である蘇生への立会いに関しては、以下のことを事前に確認した上で、許可することが望ましい。すなわち、児の受ける処置が痛ましく見えるかもしれないこと、スタッフに話しかけないこと、短時間の立会いとすること、自失状態を来たす場合は中止すること等である。また、援助者（看護師）の望まれる行動は、可能な援助の列挙、治療状況と児の状態のリアルタイムな報告や医師説明の補足、保護者の疑問点への回答等である。

	現状	保護者の要望	医療者の望ましい対応
脳症児の搬入と初期対応	<ul style="list-style-type: none"> 蘇生中、親は隔離・放置されている。 死亡を突然に告知されることがある。 保護者と医療者の間には認識に大きなギャップがある：できることとできないことが不明確。 	<ul style="list-style-type: none"> 医師の救命への熱意・意欲を示してほしい：「助けたい！」という熱意。 蘇生時の立会いと処置への参加を希望する。 親をサポートする専属医療スタッフを希望する。 経験豊かな看護師の援助を希望する。 長時間の隔離後の死亡宣告は無念・後悔・憤りをもたらすため、治療経過のリアルタイムの説明を希望する。 死亡後の経時的サポートを希望する。 	<ul style="list-style-type: none"> 診療録が家族にとってかけがえのない遺品となることを認識する。 保護者の意向を確認の上、早期に処置室へ入室できる状況を整える。 保護者の希望があれば、蘇生に保護者を参加させる 保護者の心理的サポートに専属の看護師が当たる。 待機中の個室を確保する。

4) 回復が望めない病状固定の状態における対応

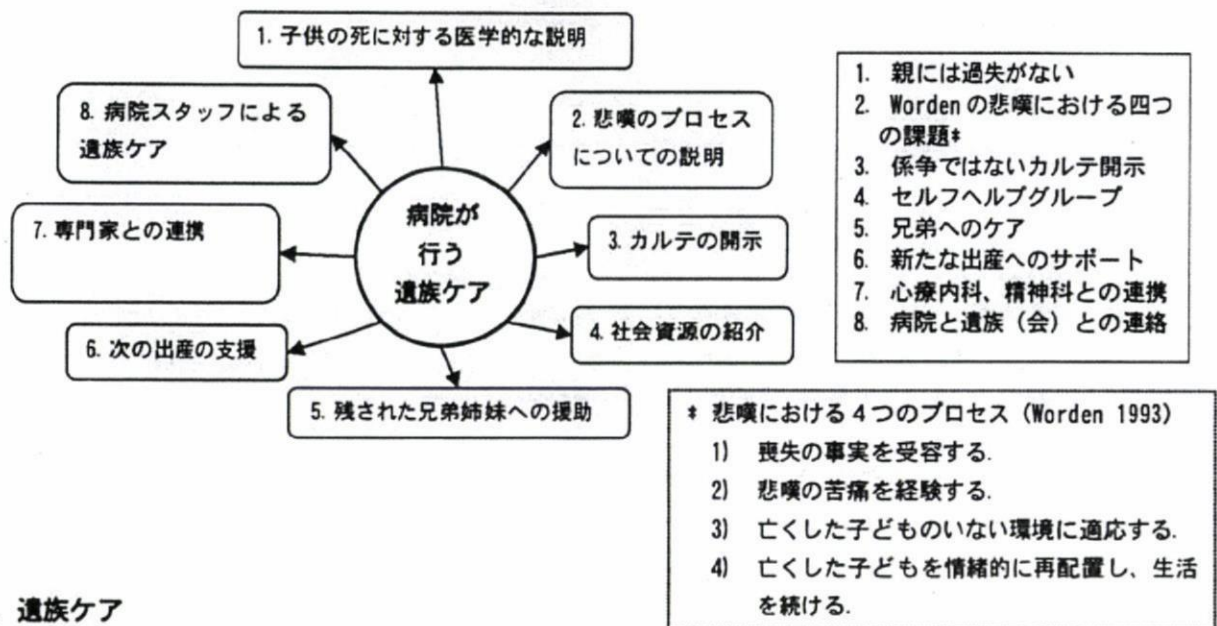
回復が望めない病状固定や終末期においては、保護者の心情に配慮するとともに、感情を共有できるよう努力する。保護者は回復への可能性を捨てきれないため、セカンドオピニオンにも快く応じることが望ましい。児の抱擁（抱っこすること）はわが子への愛情の発露として不可欠であることを理解し、可能な限り機会を作ることに心がける。

	現状	保護者の要望	医療者の望ましい対応
回復が望めない病状固定の状態	<ul style="list-style-type: none"> ・小児の終末期や遷延性意識障害に対する社会的・医学的コンセンサスが未成熟。 	<ul style="list-style-type: none"> ・眠っているようで死が近いことは理解できない。 ・転院すれば別の治療方法があるのではないかと思う。 ・セカンドオピニオンを求める。 ・清拭等のケアを通し家族で大切な時間を持ちたい。 ・児をいとおしく思う医療者の行為に救われる。 ・「長くなると困る」等の不用意な言葉に傷つく。 	<ul style="list-style-type: none"> ・遷延性意識障害や脳死の説明は、保護者の心情に配慮しながら慎重に行う。 ・スタッフは保護者と感情を共有することが望まれる。 ・保護者は回復への可能性を捨てきれないため、セカンドオピニオンを快く承諾する。 ・可能な限り児の抱擁の機会を確保し、清拭等のケアへの参加を支援する。

5) 終末期における対応

終末期における保護者への対応において、わが国では確立された指針はない。欧米における緩和ケア (palliative care)¹⁾に習い、終末期ケアの重要性を認識しなければならない。保護者は何らかの形で治療への参加や抱擁の機会を望んでいることを知ることも重要である。不幸にして救命できなかった場合は保護者への医療者のいたわりを込めて、グリーン・カードを手渡す。

	現状	保護者の要望	医療者の望ましい対応
終末期における対応	<ul style="list-style-type: none"> ・終末医療や看取りへの医療者の理解不足 ・保護者の癒されぬ思いの始まり ・医療者へのケアの体制はない。 	<ul style="list-style-type: none"> ・親の治療への参加(身体を擦り語りかける)を希望する。 ・救命できなかったことで自分の無力感、罪悪感、生きる意欲の喪失を感じる。 ・医療者どうしの無関係な話題の会話や笑い声を心無く感じる。 ・死亡までのできるだけ多くの抱擁の機会を望む。 ・兄弟の看取りへの立会いを思案する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・終末医療としての体への接触や語りかけ、抱擁を医療行為の中に位置づける。 ・心肺機能の低下徴候が認められる場合は速やかに告知し、残された時間の予測を伝える。 ・死期の受容不可能な場合は保護者の気持を配慮しつつ看取りの準備を行う。 ・兄弟の看取りへの参加の有無は保護者の意向を尊重する。 ・家族が静かに最期の時を過ごすことができる環境を確保する。 ・チーム医療の中で終末期のケアや看取りを行う。 ・グリーン・カードを介する保護者への援助を具体的に考える。 ・医療者へのケア体制を考慮する。



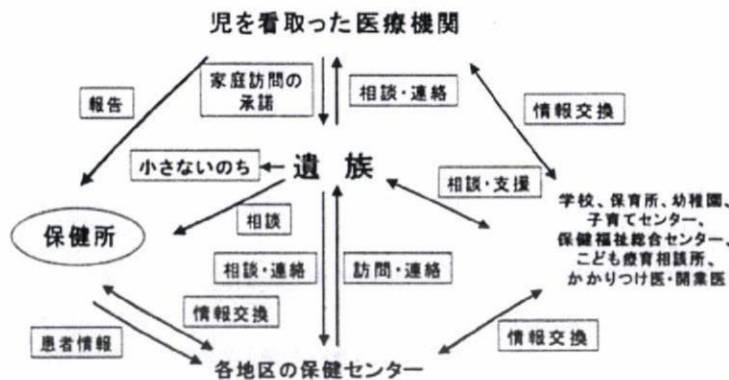
C. 遺族ケア

1) 病院が行う遺族ケア

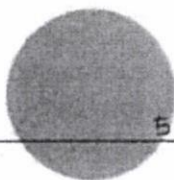
1. 子どもの死の経過、死因についての医学的な説明を行う。
2. 遺族が経験する悲嘆のプロセス (Worden1993 などを参照) について説明する。
3. 遺族から求めがあれば、カルテを開示する。
4. 遺族のセルフヘルプ・グループ (近隣のセルフヘルプ支援センター等で情報収集可能) や保健所などの社会資源を紹介する。(インフルエンザ脳症家族の会「小さないのち」など)
5. 遺された兄弟姉妹への説明の仕方、育児不安についての援助をおこなう。
6. 次の出産についての相談にのる。
7. 心療内科医、精神科医との連携 (重篤な抑うつや心身症、パニック障害などの病的悲嘆、本人の希望時) を行う。
8. 病院スタッフによる遺族ケア (手紙、遺族会の運営等) を検討する。

2) 社会におけるグリーフケア

遺族が社会復帰を早期に果たしていくために、下図のような行政・関係機関の連携の上に、地域の社会的資源を有効に活用することが、将来的には望まれる。



グリーフケアにおける社会的ネットワーク



ちゃんのご家族へ

このカードは、当科で亡くなられたお子様のご家族にお渡しするものです。お家に戻られたのち、次のようなことでお困りのときはいつでもご来院下さい。

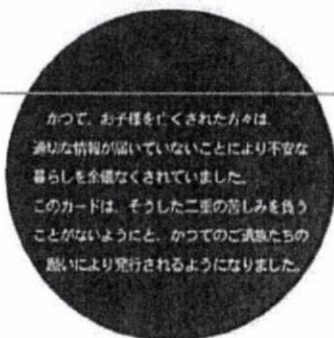
- ・亡くなられたお子様の病気の経過や治療について説明が必要なとき
- ・次の妊娠や出産について不安を感じる時
- ・ごきょうだいの成長や育児に不安を感じる時
- ・悲しみがとても強く、心身の不調を感じる時
- ・その他、あなたが当科のサポートを必要とする時

次のサイトのリンク集からも相談機関や自助グループが探せます。小さないのちのホームページ
[http:// HYPERLINK'http://www.chisananochi.org' www.chisananochi.org](http://HYPERLINK'http://www.chisananochi.org' www.chisananochi.org)

お子様を亡くされたあとの暮らしについて

- ・誕生日や思い出の日が近づくにつれつらくなるかもしれません。
- ・社会生活や対人関係が苦痛に思えるかもしれません。
- ・今まで普通にできていたことを難しく感じるかもしれません。
- ・記憶力や判断力が著しく低下したと感じるかもしれません。
- ・ご夫婦やご家族で悲しみの表現が違うかもしれません。
- ・あらゆることに自信がもてなくなる時期があるかもしれません。
- ・時間が経っても悲しみが深まる一方に思えるかもしれません。
- ・気持ちが和らぐことさえ苦痛を伴うかもしれません。

お子さんが亡くなったあとはこうしたことが起こりやすいですが、少しずつ悲しみにも順応できるようになります。特に最初の1年はきついで、身体をいたわり、流れる涙は止めずに、安心できる場でつらい気持ちを表すといいでしょう。以上は、多くのご遺族が経験をもとに教えてくれたことです。



かつて、お子様を亡くされた方々は、適切な情報が届いていないことにより不安な暮らしを余儀なくされてきました。このカードは、そうした二重の苦しみを負うことがないようにと、かつてのご遺族たちの願いにより発行されるようになりました。

グリーフカード



ご来院前にお電話ください

病院名 _____

〒 _____

住所 _____

電話番号 _____

連絡窓口及び担当者 _____

担当医 _____

お子様のカルテ№ _____

2. 後遺症を持った児の保護者への心理的サポート

1) グリーフケアと共通なもの

救急隊員の対応、病院搬入時の対応、病状固定における対応は、グリーフケアにおけるものとほぼ同様である。救命処置だけに専念することなく、保護者の心情に配慮し家族全体をケアする視点が重要である。

2) グリーフケアと異なるもの

後遺症やリハビリテーションに関することがグリーフケアとは異なり重要となる。後遺症を持った場合は、新たに社会的・経済的負担が始まることを、医療者も認識する必要がある。

以下に後遺症を持った児の保護者への心理的サポートの要点をあげる。これはインフルエンザ脳症に罹患し後遺症を持った児の110名の保護者に対するアンケートの結果に基づくものである。

1. 後遺症について、告知するだけでなく、リハビリの効果がみられた事例や、予想以上の回復が見られた事例について知らせることが好ましい。
2. 後遺症の告知は過酷で、理解は容易でないため、統計上の数字を示すことは重要である。しかし統計がそのまま当てはまるとは限らないことや、個性についても言及することが望ましい。
3. 時間が許せば、看護師が黙って保護者のそばに座り、感情に共感しながら傾聴し、涙することに本人が否定的にならないよう、見守ることが望ましい。
4. 保護者の希望を確かめたうえで、望む場合、同じような後遺症をもつ子どもの保護者と引き合わせることや、家族会を知らせることが望まれる。
5. リハビリが充実していること、あるいはその情報が確保できていることが、気持ちを前向きにさせるといわれている。

参考文献

1. Michelson KN, et al. Pediatric end-of-Life issues and palliative care. Clin Ped Emerg Med 2007; 8: 212-9.
2. Worden JW: Grief counseling and grief therapy. 2nd Ed. Springer, New York, 1991.

インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析

研究分担者 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 (SNP) 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 72 名を対象とした、約 55 万 SNPs による whole-genome association study を実施した。

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 (SNP) 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 association study: GWAS)。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

国際 HapMap データベースの情報に基づいて抽出した約 55 万 SNPs について、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。そのような遺伝情報を知ることは、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

本年度は、約 55 万 SNPs について、日本人小児インフルエンザ脳症患者 72 名 (ケース) 及び日本人一般集団 934 名 (コントロール) を対象とした関連解析を実施した。

その結果、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。

$p \geq 0.01$	494,670 SNPs
$p < 0.01$	6,595 SNPs
$p < 0.001$	572 SNPs

p<0.0001	61 SNPs
p<0.00001	16 SNPs
p<0.000001	1 SNP

最も関連の強い SNP はオッズ比 = 3.65、 $p = 4.7 \times 10^{-7}$ を示した。今後、新たな患者 DNA サンプルを対象に、関連の強い候補 SNP についての replication study を実施する予定である。

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、全ゲノム領域を対象とした GWAS 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 GWAS 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

日本人小児インフルエンザ脳症患者 72 名について、約 55 万 SNPs による GWAS を実施した。

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

炎症性サイトカインとジクロフェナックナトリウムが
アストロサイトの NO_x 産生に及ぼす影響

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

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

垣田博樹、加藤 晋、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

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。平成 18、19 年度の研究では、培養アストロサイトに IL-1 β 、TNF α 、IFN γ の 3 つのサイトカインが同時に作用すると NO_x 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、iNOS mRNA とその蛋白、COX2 mRNA とその蛋白の強い発現誘導が生じ、NO_x の産生が促進されることを示した。平成 20 年度は、ジクロフェナックナトリウムによる NO_x 産生促進メカニズムを明らかにする目的で、培養アストロサイトにおける細胞内シグナルに注目し研究を進めた。その結果、IL-1 β 、TNF α 、IFN γ とジクロフェナックナトリウムによる NO_x 産生誘導は、NF- κ B 活性化を介して生じていることが判明した。一方で、アセトアミノフェンを、サイトカインで刺激を受けたアストロサイトに作用させても NO_x の産生促進が生じないことが判明した。また、サイトカインとジクロフェナックナトリウムで産生誘導された NO_x によりアストロサイトの細胞死が誘導されることも確認した。

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、60mm ディッシュに細胞を播いた。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 (DCF) 1 μ g/ml、アセトアミノフェン (ACE) を 1 μ g/ml または 5 μ g/ml、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、培地および細胞を採取し実験に用いた。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。iNOS 及び COX1、COX2 mRNA の発現量は定量的 RT-PCR、iNOS 及び COX1、COX2 の蛋白発現量はウエスタンブロットにて解析した。また、iNOS の蛋白発現を免疫細胞染色で確認した。さらに PGE2 合成酵素の mRNA を定量的 RT-PCR で確認するとともに、培地中の PGE2 を ELISA にて定量した。NOx による細胞障害性を確認するために、培地中の LDH 活性を測定するとと

もに、細胞核を DAPI にて染色し、細胞死に至った細胞数を顕微鏡下でカウントした。

(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

1) ラットアストロサイトにおける NOx 産生：サイトカイン、ジクロフェナックナトリウム アセトアミノフェンの影響

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時間において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、3つのサイトカインを添加する時よりも、さらに NOx の産生量が増加した (図1)。一方、アセトアミノフェンを添加しても NOx の産生には影響を与えなかった (図2)。

2) ラットアストロサイトにおける iNOS mRNA、蛋白の発現

iNOS mRNA 発現量を測定したところ、図3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6時間で無刺激コントロールに比べ、約200倍の mRNA 発現を認めた。また、ジクロフェナックナトリウムを共存させると、3つのサイトカインを添加するよりもさらに iNOS mRNA 発現量は増加したが、アセトアミノフェンは影響を与えなかった。

iNOS 蛋白の発現を刺激後9時間で検討した。図4に示すように、3つのサイトカインとジクロフェナックナトリウムを共存

させた時に強い発現上昇を認めた。また、免疫細胞染色においても iNOS タンパクの発現を確認した (図 5)。

3) iNOS mRNA の発現誘導を引き起こす細胞内シグナルの検索

サイトカインとジクロフェナックナトリウムを共存時に生ずる iNOS mRNA の発現誘導が、どのような細胞内シグナルを介して生じているか確認するために、p38MAPK inhibitor、Protein kinase A inhibitor、Protein kinase C inhibitor、NF- κ B inhibitor を添加し、iNOS mRNA の発現誘導が生ずるか否かを観察した。その結果、NF- κ B inhibitor を添加したときに、ジクロフェナックナトリウムによる iNOS mRNA の発現誘導作用がなくなることを確認した (図 6)。

4) NOx による細胞障害の観察

アストロサイトから産生された NOx が細胞障害を引き起こすか否かについて、アストロサイト培養系で検討したところ、図 7 に示すように、3つのサイトカインとジクロフェナックナトリウムを共存させた時に培養液中の LDH の強い上昇、細胞死を起こした細胞数の上昇が観察された。また、故細胞障害は、NOS inhibitor である L-NMMA を培地中に加えることによって押さえることが出来 (図 8)、NO を介した細胞障害であることが確認された。

D. 考察

本研究において、IL-1 β 、TNF α 、IFN 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、アストロサイトの iNOS mRNA、蛋白の発現が上昇し、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、iNOS mRNA、蛋白の発現をさらに促進し、NOx の産生を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。一方で、アセトアミノフェンには、iNOS mRNA、蛋白の発現を誘導する効果がないことが確かめられた。

今回、iNOS を誘導する細胞内シグナルとして NF- κ B を介したシグナルが関与していること、産生された NOx によって細胞障害がもたらされることが判明し、NO の産生を押さえるような薬剤が、インフルエンザ脳症の治療に役立つ可能性が示唆された。

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 、IFN 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 iNOS mRNA 蛋白の発現が誘導され、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、iNOS mRNA と蛋白の発現強く誘導し、NOx の産生をさらに促進した。

3, iNOS mRNA と蛋白の発現には、NF- κ B を介したシグナルが関与していることが判

明した。

4, iNOS の誘導によって、増加した NOx によって細胞障害をもたらされることが判明し、NO の産生を押さえるような薬剤が、インフルエンザ脳症の治療に役立つ可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Futakuchi, M., Nannuru, K. C., Varney, M. L., Sadanandam, A., Nakao, K., Asai, K., Shirai, T., Sato, S. Y., Singh, R. K. Transforming growth factor-beta signaling at the tumor-bone interface promotes mammary tumor growth and osteoclast activation *Cancer Sci* 100:1 (2009) 71-81

Nakao, K., Aoyama, M., Fukuoka, H., Fujita, M., Miyazawa, K., Asai, K., Goto, S. IGF2 modulates the microenvironment for osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 378 (2009) 462-466

Sato, S., Futakuchi, M., Ogawa, K., Asamoto, M., Nakao, K., Asai, K., Shirai, T. Transforming growth factor beta derived from bone matrix promotes cell proliferation of prostate cancer and osteoclast activation-associated osteolysis in the bone microenvironment. *Cancer Sci* 99:2 (2008) 316-323

Sugiyama, Y., Mizuno, H., Hayashi, Y., Imamine, H., Ito, T., Kato, I., Yamamoto-Tomita, M., Aoyama, M., Asai, K. and Togari, H. Severity of virilization of external genitalia in Japanese patients with salt-wasting 21-hydroxylase deficiency. *Tohoku J Exp Med* 215:4 (2008) 341-348

Morishima, T., Aoyama, M., Iida, Y., Yamamoto, N., Hirate, H., Arima, H., Fujita, Y., Sasano, H., Tsuda, T., Katsuya, H., Asai, K. and Sobue, K. Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neurosci Res* 61 (2008) 18-26

藤田政隆、浅井清文、山田和雄 (2008)
脳とアクアポリン

Clinical Neuroscience 26(7):760-762, 2008
中外医学社

2. 学会発表

祖父江和哉、森島 徹朗、青山 峰芳、高柳 猛彦、浅井 清文 (2008)

乳酸アシドーシスは水チャネル<アクアポリン>のAstrocyte細胞膜への集積を促進する (Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes)

第 31 回日本神経科学大会 7.9-11, 2008
東京

藤田政隆、小笠原 治、田中三佳、矢口邦雄、岩里琢治、浅井清文、山田和雄 (2008)
GFAP 及び AQP4 プロモーターを用いた Cre トランスジェニックマウスの解析 (Analysis of transgenic mice of Cre recombinase derived from GFAP or AQP4 promoter)

第 31 回日本神経科学大会 7.9-11, 2008
東京

青山峰芳、垣田博樹、加藤 晋、藤田政隆、祖父江和哉、浅井清文 (2008)
Astrocyteの部位特異性に関わる分子の同定 (Identification of the molecules, which are responsible for astrological heterogeneity in the central nervous system)

第 51 回日本神経化学会大会 9.11-13,
2008 富山

藤田政隆、間瀬光人、磯村健一、青山峰芳、
浅井清文、山田和雄 (2008)

カオリン水頭症モデルラットにおけるアクアポリ
ン発現に関しての検討

日本脳神経外科学会第 67 回学術総会
10.1-3, 2008 盛岡

長原正静、永谷祐子、山上貴也、青山峰芳、
浅井清文、多田豊曠、大塚隆信 (2008)

関節水症におけるアクアポリン発現の検討

第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会
10.22-24, 2008 京都

青山峰芳、垣田博樹、加藤 晋、藤田政隆、
祖父江和哉、浅井清文 (2008)

アストロサイトの脳内部位特異性の解析

第 13 回グリア研究会 11.8, 2008 東京

Fujita, M., Ogasawara, O., Tanaka, M.,
Aoyama, M., Iwasato, T., Asai, K.,
Yamada, K., Itohara, S. (2008)

Analysis of a BAC transgenic mouse line
in adulthood: distribution of genomic
recombination by gfap-promotor-derived
cre in the brain.

Neuroscience 2008, the Society for
Neuroscience's 38th annual meeting,
11.15-19, 2008 Washington, DC, U.S.A.

Aoyama, M., Kakita, H., Kato, S., Fujita,
M., Sobue, K., Asai, K. (2008)

Region-specific expression of a water
nervous system.

Neuroscience 2008, the Society for
Neuroscience's 38th annual meeting,
11.15-19, 2008 Washington, DC, U.S.A.

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

Figure 1

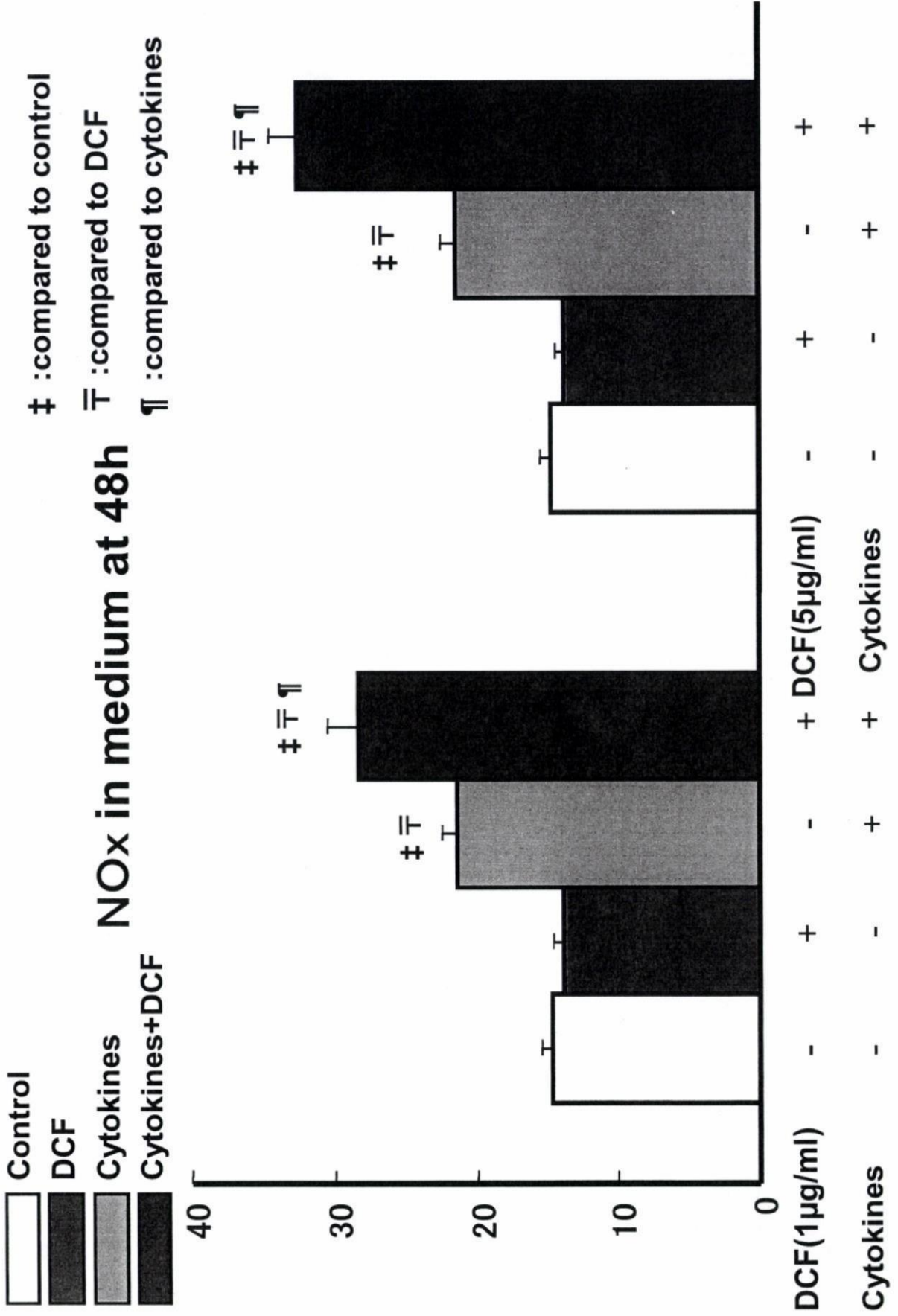


图2

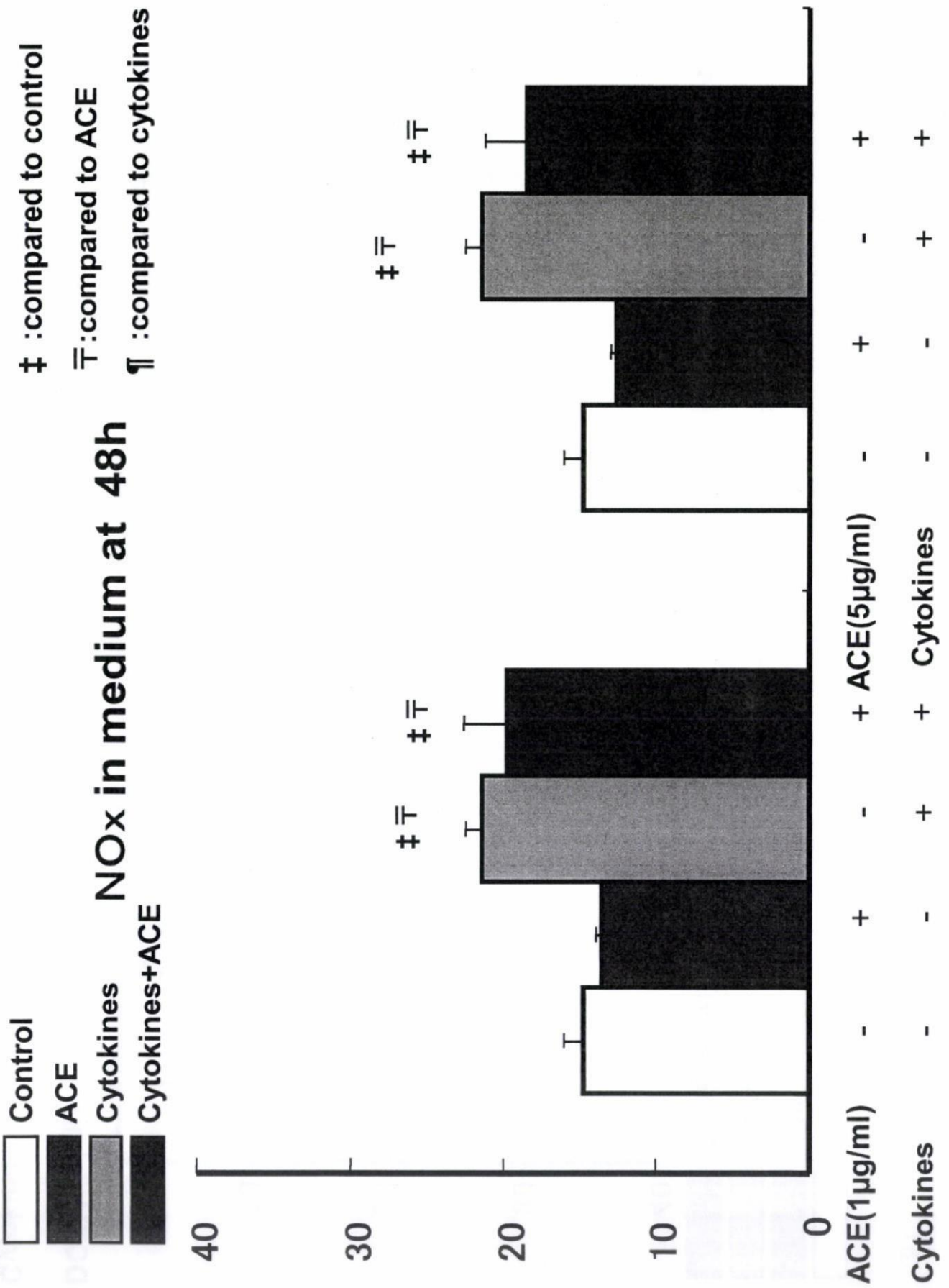
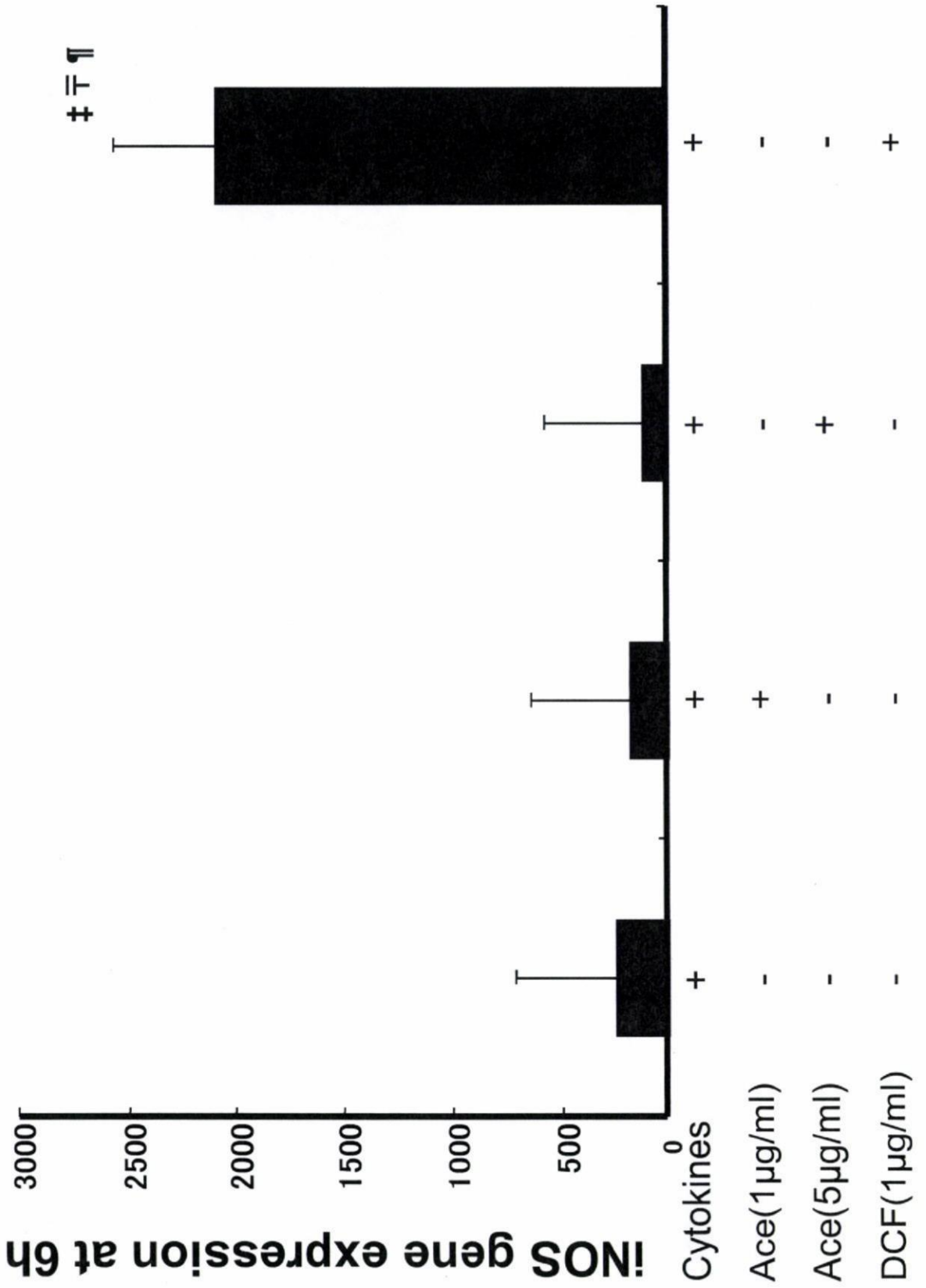


图3

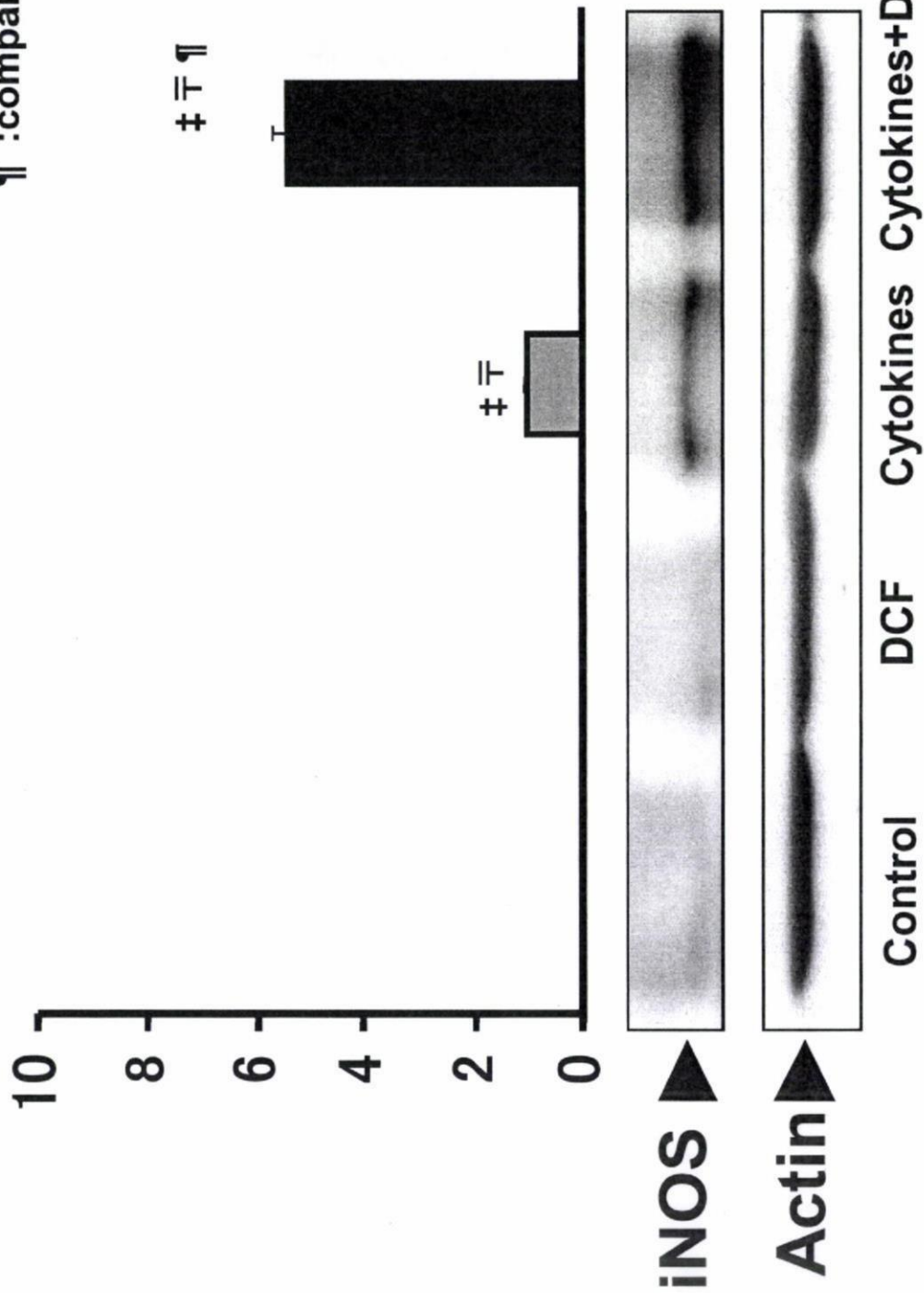
‡ : compared to cytokines
 ¯ : compared to cytokines and ACE(1µg/ml)
 ¶ : compared to cytokines and ACE(5µg/ml)



iNOS protein expression at 9h

‡ : compared to control
 † : compared to DCF
 ¶ : compared to cytokines

■ Cytokines
 ■ Cytokines+DCF



iNOS 免疫染色

