

2008-29005A・B

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20年度 総合・総括研究報告書

平成21年3月

研究代表者 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

平成18-20年度 総合研究報告

- 1 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
森島 恒雄 1
- 2 感染症発生動向調査に基づいた2007/08シーズンおよび2008/09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 17
- 3 2007/08シーズンのインフルエンザウイルス流行株の解析
田代 真人 30
- 4 インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析
中村 祐輔 36
- 5 インフルエンザ脳症における先天代謝異常の関与
山口 清次 39
- 6 インフルエンザ脳症およびヒトヘルペスウイルス6型脳症における発症に関連する因子の検討
伊藤 嘉規 45
- 7 けいれん重積型急性脳症の病態解析に関する研究
市山 高志 54
- 8 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
長谷川 秀樹 64
- 9 小児におけるインフルエンザ脳症の病態・診断・治療に関する研究のまとめ
布井 博幸 70

- 10 インフルエンザ脳症ガイドライン：EBMによる再検討
水口 雅 74
- 11 インフルエンザ脳症病態解析のための in vitro モデル確立の試み
田中 輝幸 82
- 12 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
浅井 清文 85

平成20年度 研究報告

- 1 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
森島 恒雄 107
- 2 インフルエンザ脳症における血液脳関門の障害メカニズム
森島 恒雄 112
- 3 インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析
中村 祐輔 169
- 4 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
浅井 清文 172
- 5 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
長谷川 秀樹 185
- 6 ヒトヘルペスウイルス6型脳症における髄液・血清中のウイルス量、サイトカインおよびマトリックス分解酵素濃度の比較
伊藤 嘉規 191

7 療育施設から見た急性脳炎・脳症のリハビリテーションと医療費改定の影響	宮崎 千明 196
8 インフルエンザ感染時の染色体転座検出の試み	布井 博幸 203
9 インフルエンザ脳症における先天代謝異常の関与 発熱ストレスの脂肪酸 β 酸化系に及ぼす影響について	山口 清次 208
10 けいれん重積型急性脳症における血清 neurofilament の解析	市山 高志 213
11 インフルエンザ脳症ガイドラインに関するアンケート調査	水口 雅 221
研究成果の刊行に関する一覧	227

平成 18-20 年度 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）
総合報告書

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 岡山大学

研究要旨：（1）インフルエンザ脳症の発症因子の解明のため SNP の解析を実施した。本症の発症因子として、可能性のある SNP 「X」 が示された。しかし、最終的な判定には症例の蓄積が必要であり、現在その解析を進めている。「X」 は、アミノ酸代謝に関連する酵素のプロモーター領域の変異であり、この変異によりプロモーター活性が増強され、高サイトカイン、ROS、NOx の存在下で細胞が容易に apoptosis が誘導されることが明らかになった。つまり、この変異は細胞のサイトカイン感受性などを高める働きがあり、インフルエンザ脳症で認められる病態と一致している。今後、「X」 についての解析をさらに進めていく予定である。

（2）同様に、インフルエンザ脳症の発症因子として有機酸代謝異常および脂肪酸 β 酸化異常の存在が重要であることが明らかとなった。すなわち、インフルエンザ脳症の 5～10%において、カルニチンの低下などが認められた。すなわち、背景にインフルエンザ感染までは明らかになっていなかった先天性代謝異常症がインフルエンザを契機に脳症として顕在化するメカニズムが示された。この結果は、インフルエンザ脳症の早期治療（カルニチンの早期投与など）の可能性を示唆するものであった。

（3）一方、脳障害のメカニズムの検討を進めた。インフルエンザ脳症の病態として MMP-9、TIMP-1 の異常が認められた。すなわち、インフルエンザ脳症の患者では、MMP-9 が増加する一方、これを抑制する TIMP-1 の低下が認められた。マウスにおいて、炎症性サイトカインのうち、特に TNF α によって、BBB が破壊され脳内において早期に MMP-9 が活性化することが明らかになった。これは、インフルエンザウイルスが脳内で増殖することなく、かつ、多臓器不全に先立ち、神経症状が認められることのよい説明になると思われた。

（4）インフルエンザ脳症の発症メカニズムを解明するため、インフルエンザウイルスのマウス感染モデルを用い検討した。インフルエンザ脳症の発症には過剰な免疫応答の誘導によるサイトカインストームの関与が示唆されている。本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルスを用い、感染後のサイトカインの誘導を調べその抑制による病態改善の研究を行った。また季節性インフルエンザワクチンを用いた感染防御ワクチンの研究を行った。

（5）一方、本症の病態の中で、重要な位置を占める BBB の破壊とそれに対応する治療法の確立の上で Boyden Chamber 法による実験法を確立した。すなわち、ヒト由来脳血管内皮細胞を用いて透過性を評価するシステムであり、ウイルス感染やそのサイトカインによる障害を抑制する薬剤の評価が可能となった。iNOS の抑制剤が実際に BBB の障害を抑制することが明らかとなった。

（6）2001 年、本研究班により一部の NSAIDs がインフルエンザ脳症の予後を悪化させることを

示したが、今回の研究においてこのメカニズムが明らかになった。すなわち、神経系細胞、特にアストロサイトにおいて TNF α の存在下で NF- κ B が活性化され細胞障害がもたらされるが、このメカニズムがジクロフェナク Na により強く増強されることが明らかとなった。

(7) 本症の診療ガイドラインは 2005 年 11 月に研究班により示され、現在全国的に広く活用されている。その結果、30%であった致命率が 8%まで改善しつつある。ただし、神経学的後遺症は 20~25%に認められ、決して満足すべきものではない。2005 年以降、新たに明らかになったエビデンスを加え、現在インフルエンザ脳症ガイドラインの改訂がほぼ終了している。

A. 研究目的

(1) 発症因子の解明: インフルエンザ脳症は致命率が 30%と高く、毎年数百例の発症がある。本症の発症因子の解明とそれに基づく治療法の確立およびハイリスク児の発症前診断法の確立は重要な課題である。

(2) 病態の解析; 本症の病態解析の研究結果は、新たな治療法の開発にも繋がる。

(3) インフルエンザ脳症研究結果の応用:

A. インフルエンザ脳症の病態研究は、年間 1,000 例に達するその他の病因による小児の急性脳炎・脳症の診断・治療法の確立に応用できる。B. cytokine storm による重症化が注目されている H5N1 トリインフルエンザ重症例の治療法の開発にも寄与しうる。

(4) 本症の疫学調査およびガイドラインの改訂: インフルエンザ脳症の疫学調査の継続を通じて、現在、広く普及しているインフルエンザ脳症ガイドライン (2005 年版) の効果の検証と新たな知見に基づく改訂を実施した。

B. C. 研究方法および結果

①これまで本研究班は、インフルエンザ脳症の①疫学、②臨床像、③診断、④治療、⑤病態、⑥発症素因などについて明らかにし、国内に広く現状を明らかにしてきた。また、平成 15 年 11 月厚生労働省研究班として「インフルエンザ脳症ガイドライン」を作成し、現在このガイドラインは全国的に広く普及し、

一般臨床の中で用いられていた。その結果、30%であった本症の致命率が 8%まで低下しており、一定の成果を上げていると思われた。しかし、その後エビデンスの蓄積によりガイドラインの改訂を計画した。

②当該研究の中では、インフルエンザ脳症発症素因の解明を終了すること、また、それに基づく発症前診断の体制を広く構築することを目標とした。

一方、本研究の中で、種々の病態が明らかになった。それに基づくさらに有効な治療法を開発した。動物実験などを通じて、現在脅威となっている新型インフルエンザ、特に重症例の病態との比較とそれに基づく治療法の構築も同時に目指した。すなわち、新型インフルエンザを含む「重症インフルエンザ」の治療法の確立を視野に入れ研究を進めた。

③インフルエンザ脳症ガイドラインの改訂

新たに明らかになったエビデンスを加えて、さらに今後の改善を旨として改訂を行うこととした。改訂にあたっては研究協力者にインフルエンザ脳症親の会 (小さないのち) の代表に参加してもらい患者家族からのアドバイスや提案を検討していった。改訂にあたっては、外部評価委員を定め広く意見を求めた。また、本研究全体の中で倫理的な疑問点が生じた時はこの外部評価委員会に相談した。な

お、外部評価委員会は、関連学会代表、メディア、疫学研究者、生命倫理研究者、患者家族の会などから構成され、現在ほぼ完成し、2009年中に改訂版公表予定で作業が進んでいる。

④現在脅威となっている新型インフルエンザ、特に H5N1 インフルエンザ重症例の病態に基づく治療法については全く確立していないのが世界的な現状である。一方、インフルエンザ脳症で我々が明らかにしてきた病態と H5N1 インフルエンザ重症例には高サイトカイン血症、神経障害などいくつかの点で近似していた。動物実験及び、*in vitro* 実験系を通じて新型インフルエンザを含む「重症インフルエンザ」の治療法の確立も同時に目指した。又、動物モデルによる病態の解析と H5N1 経鼻ワクチンの感染予防効果が明らかになった。

⑤一方、脳障害のメカニズムの検討を進めた。インフルエンザ脳症の病態として MMP-9、TIMP-1 の異常が認められた。すなわち、インフルエンザ脳症の患者では、MMP-9 が増加する一方、これを抑制する TIMP-1 の低下が認められた。マウスにおいて、炎症性サイトカインのうち、特に TNF α によって、BBB が破壊され脳内において早期に MMP-9 が活性化されることが明らかになった。これは、インフルエンザウイルスが脳内で増殖することなく、かつ、多臓器不全に先立ち、神経症状が認められることのよい説明になると思われた。

⑥従来の研究の中で、種々の病態を明らかにしてきた（炎症性サイトカインの役割、アポトーシスの関与、血管内皮細胞の障害、フリーラジカルの関与、REDOX の関与など）。これ

らの解析から新たな治療法の確立をめざす。一方、本症の病態の中で、重要な位置を占める BBB の破壊とそれに対応する治療法の確立の上で Boyden Chamber 法による実験法を確立した。すなわち、ヒト由来脳血管内皮細胞を用いて透過性を評価するシステムであり、ウイルス感染やそのサイトカインによる障害を抑制する薬剤の評価が可能となった。iNOS の抑制剤が実際に BBB の障害を抑制することが明らかとなった。

⑦インフルエンザ脳症の病態解析の中で明らかになった点、すなわち高サイトカイン血症や血管内皮細胞の障害、全身のアポトーシスの急速な進展、フリーラジカルの関与、酸化の影響などが明らかになり、それに対する制御が治療法の中心となってきた。これらの病態解析と治療法はその他の急性脳炎・脳症にも応用できる可能性がある。

⑧2001 年、本研究班により一部の NSAIDs がインフルエンザ脳症の予後を悪化させることを示したが、今回の研究においてこのメカニズムが明らかになった。すなわち、神経系細胞、特にアストロサイトにおいて TNF α の存在下で NF- κ B が活性化され細胞障害がもたらされるが、このメカニズムがジクロフェナク Na により強く増強されることが明らかとなった。

D. 考察

本研究班の特徴はインフルエンザ脳症の疫学・臨床像・病態解明・それに基づく診断法や治療法の開発・発症素因の解明・他のウイルス性急性脳症への研究成果の応用などを基礎研究者、疫学研究者、臨床医が多面的に検討する点にある。

これまで示したように、本症の疫学・臨床像・病態についてはかなり明らかにすることができ、それが平成15年のインフルエンザ脳症ガイドラインの作成につながった。そしてそれは本症の致命率を30%から約8%に改善することができた。一方、後遺症は未だ25%に認められ、更なる改善が求められていた。したがって、その後の病態の更なる解明に基づくガイドラインの改訂は、必須であった。約2年間の検討を経てようやくガイドライン改訂版の完成に近づくことが出来た。

病態の解明については、本症の予後の悪化にNSAIDsが関与することがすでに明らかであったが、今回の研究の中でそのメカニズムを明らかにすることが出来た。すなわち、ジクロフェナクNaは炎症性サイトカインの存在下でNF κ Bの活性化と引き続き惹起されるapoptosisを神経系グリア細胞にもたらす機序が明らかになった。また、本症では、多臓器不全に先立ち神経系内のウイルスの増殖がないにもかかわらず、病初期に神経症状が出現する機序が不明であったが、マウスを用いたTNF- α によるMMP9の活性化が、まず神経系内で出現することが示され、これがよい説明になると思われた。また、脳浮腫の重要な要因と思われる血管内皮細胞の障害が同様に炎症性サイトカインにより引き起こされ、これらがROSなどフリーラジカルにより促進されること及びステロイドやiNOS合成阻害剤などにより血管透過性の亢進が抑制されることが示された。この実験系により今後さらに有効な血管内皮細胞障害に対する薬剤の開発が可能となる。

臨床的にはサイトカインによる脳障害が中心となるインフルエンザ脳症の他に、痙攣重積が脳障害につながる二相性脳症の病態や、代謝異常特に脂肪酸 β 酸化異常症が背景にあ

り、インフルエンザ感染をきっかけに発症する型があることが明らかになった。後者については、カルニチン代謝異常症が重要であり、今後治療法の開発につながると思われる。

また、このインフルエンザ脳症の病態は現在世界的にも確立していないH5N1高病原性鳥インフルエンザのヒト重症例に近似しており、サイトカインの制御、REDOX制御を基本として治療上応用しうるものと考えられた。また、このH5N1感染症予防には不活化経鼻ワクチンの有効性が動物実験レベルで示唆された。

インフルエンザ脳症の発症素因としてのSNPs解析については、引き続き検討を進めている。複数のSNPが複雑に関与している可能性もあり、今後症例を重ねて検討をしていきたい。

この他多くの領域でインフルエンザ脳症の診療につながる重要な研究成果が示された。

E. 結論

以上のように、多面的な解析により確実にインフルエンザ脳症の病態が明らかになり、それにより有効な治療法が開発され、ガイドラインの改訂に結びついている。今後さらに発症素因の解析や、H5N1など重症の新型インフルエンザに対する治療法の確立へ本研究班の成果が応用可能かどうかについても研究を進めていきたい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表 2. 学会発表が多く、重複を避けるため共に各分担研究者の報告を参照していただきたい。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）

なし

2. 実用新案登録

なし

本研究の目的と意義

(1)発症因子の解明:

インフルエンザ脳症は致命率が30%と高く、毎年数百例の発症がある。
本症の発症因子の解明とそれに基づく治療法の確立およびハイリスク児の
発症前診断法の開発は重要な課題である。

(2)病態の解析:

本症の病態解析の研究結果は、新たな治療法の開発にも繋がる。

(3)インフルエンザ脳症研究結果の応用:

A インフルエンザ脳症の病態研究は、年間1,000例に達するその他の
病因による小児の急性脳炎・脳症の診断・治療法の確立に応用できる。

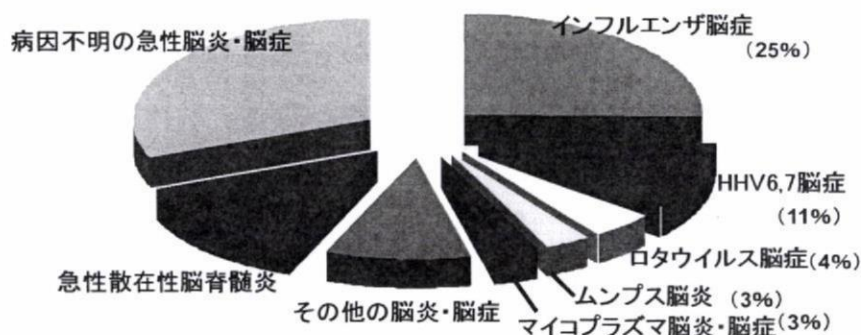
B **cytokine storm** による重症化が注目されているH5N1トリインフルエンザ重症例
の治療法の開発にも寄与しうる。

(4)本症の疫学調査およびガイドラインの改訂:

インフルエンザ脳症の疫学調査の継続を通じて、現在、広く普及しているインフルエン
ザ脳症ガイドライン(2005年版)の効果の検証と新たな知見に基づく改訂を実施する。

急性脳炎・脳症 病因別患者数

全国調査結果



→ 小児の急性脳炎・脳症: 年間 推定約1,000例の発症

図 1

研究班が明らかにしたインフルエンザ脳症の発症機序

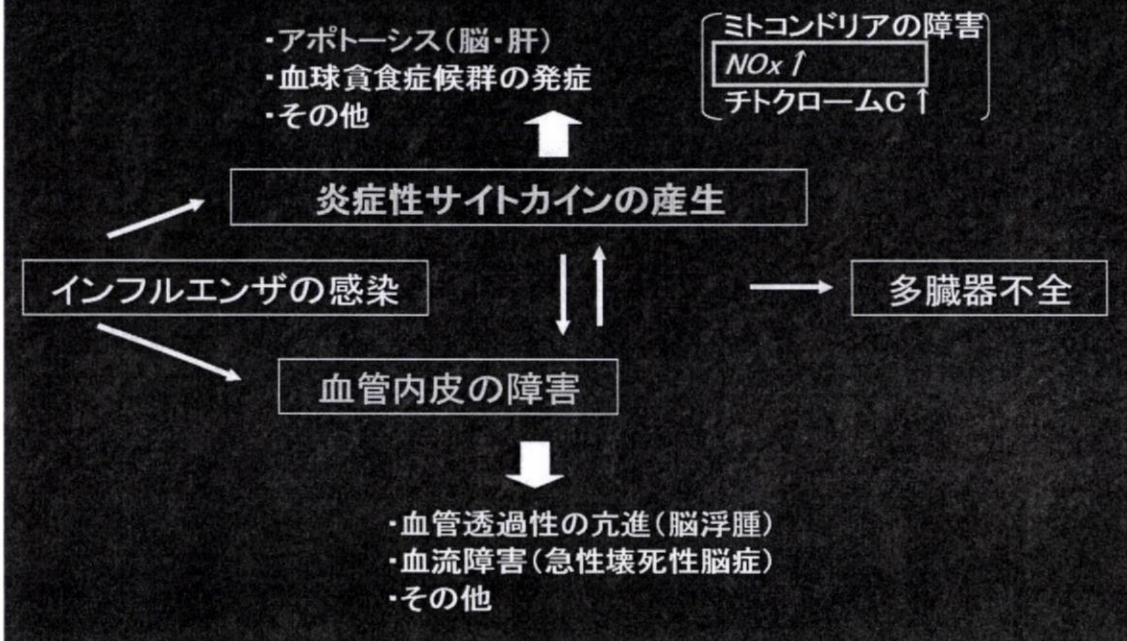


図1

(1) ガイドライン普及による予後の改善

研究班結果より

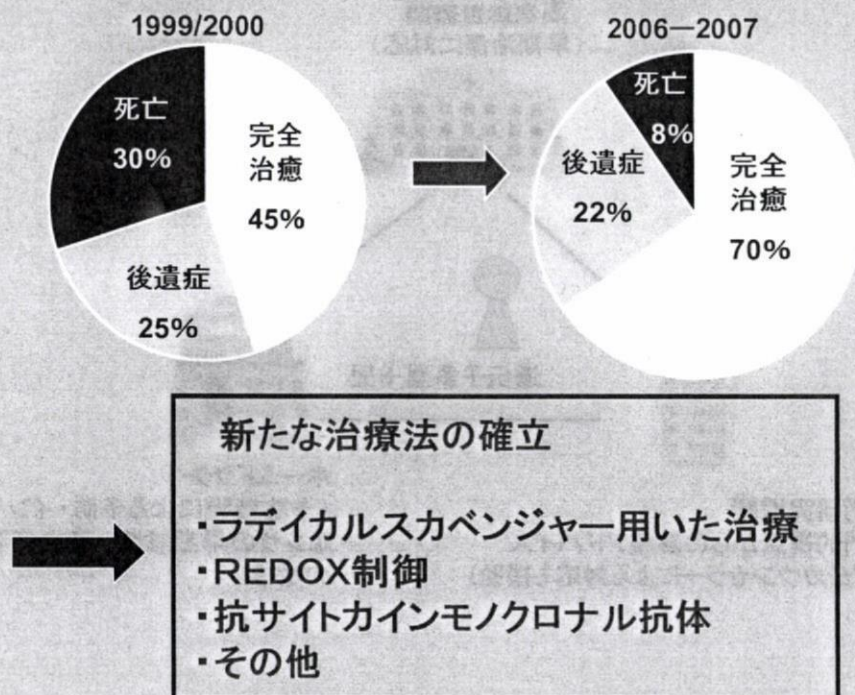


図2

(2) インフルエンザ脳症の発症素因の解明

- TLR発現の異常(TLR-3) *Nunoi et al.*
- CPTII(carnitine palmitoyltransferase II)の異常
- Thioredoxin-binding Protein-2 の異常
- TIMP-1 (MMP-9抑制不全) *Ichiyama et al.*
- その他、先天性代謝異常症
 脂肪酸β酸化の異常(3-5%) *Yamaguchi et al.*
- X, Y (東大医科研とのSNPs共同研究) *Nakamura and Morishima*

複数の因子の関与 → 多面的解析の重要性

図3

発症前ゲノム診断をどう診断に役立てるか？

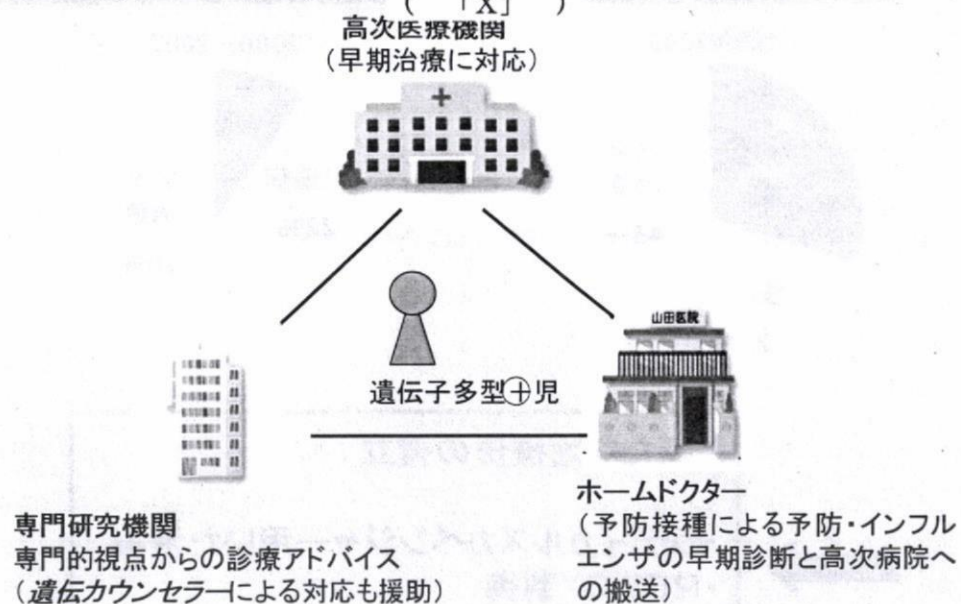


図4

3. 病態の解明による新たな治療法の確立

Cytokine 血管内皮細胞 (BBB)、神経細胞の障害機序

インフルエンザ脳症では、MMP-9の活性が増強、TIMP-1の活性が低下。

(2007、Ichiyama, Morishima)

Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)

MMP : 細胞外マトリックス分解酵素

MMP-9 : 脳血管床の主要な構成成分である

コラーゲンIVを分解

↓ 攻撃

Blood-Brain-Barrier

↑ 保護

Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)

図 5

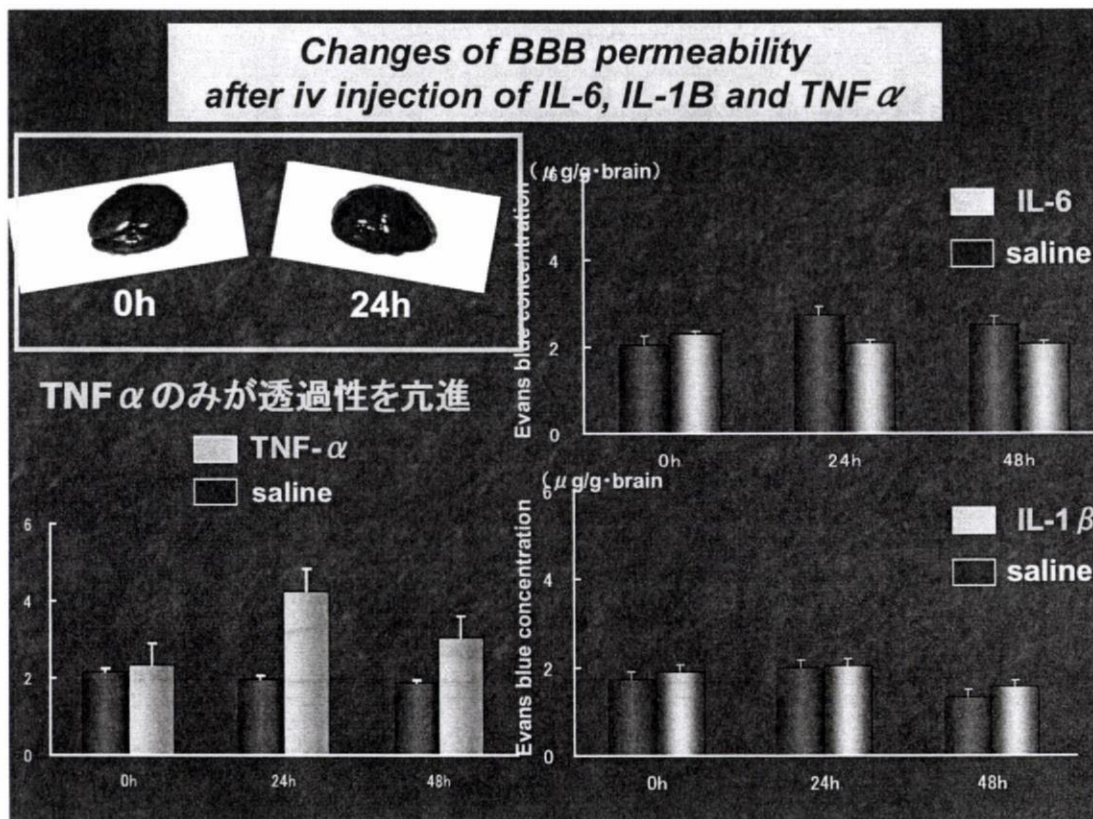


図 6

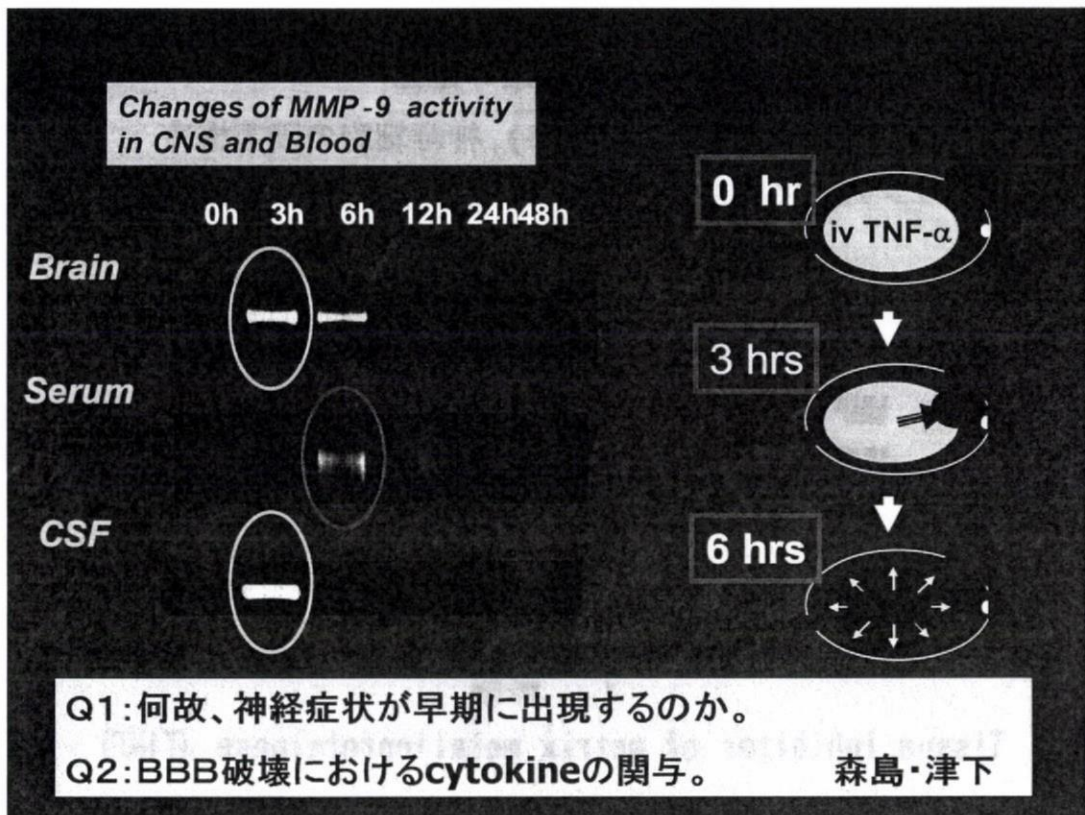


図 7

1

Boyden Chamber法

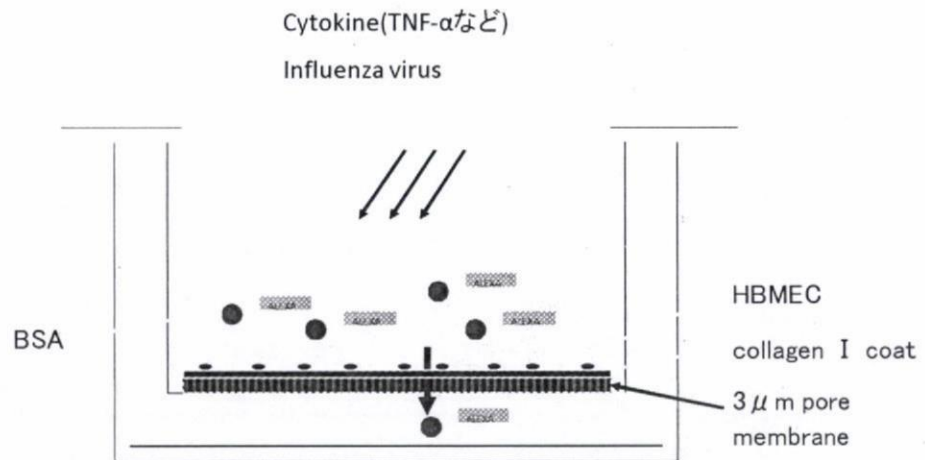


図 8 (図 9 の実験系)

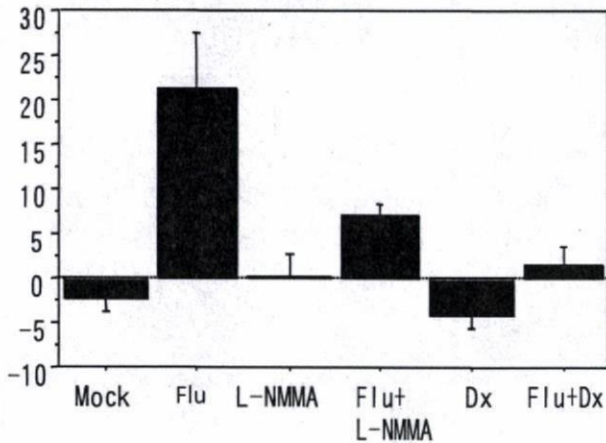
(4)ヒト脳由来血管内皮細胞を用いた透過性亢進とその抑制

—新たな治療法の確立に向けて— **wada 2009**

ヒト脳血管内皮細胞の透過性の抑制 (steroid, L-NMMAその他)

PI (%) **BBBなど障害抑制に働く薬剤の開発**

Flu : Panama MOI=10



L-NMMA : 1mM
NOSアイソフォーム
全てに対する阻害剤

Dx : Dexamethasone
100 μM
血管内皮細胞に
おいてiNOSのみを
特異的に阻害

図9

(4)熱譫妄とは？ —何が起きているのか—

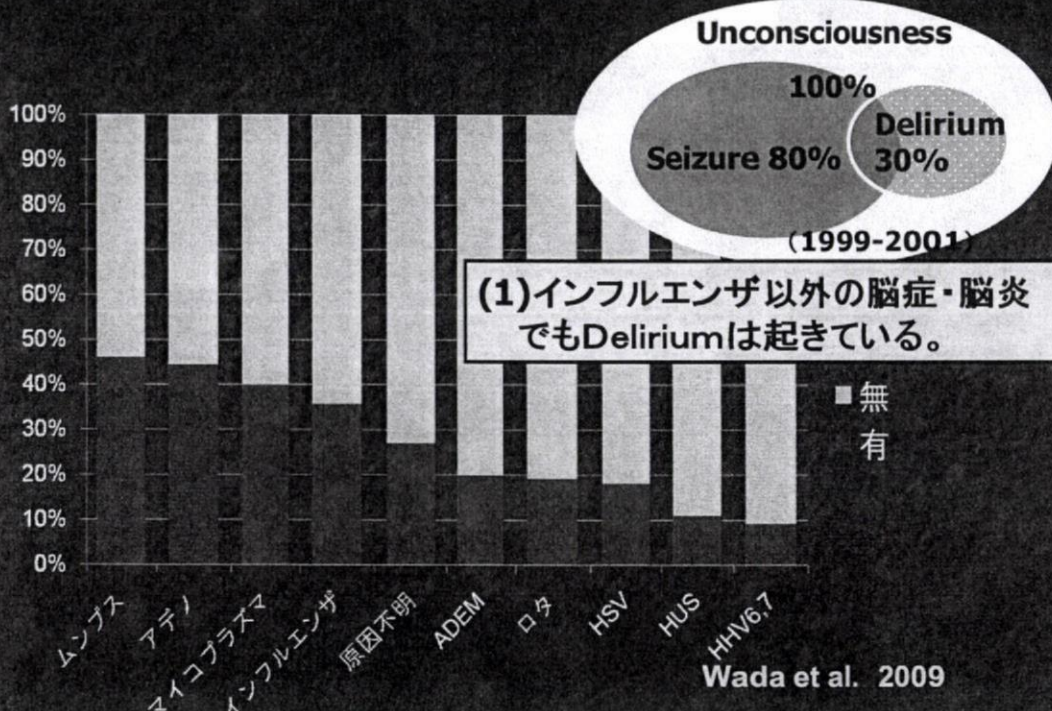
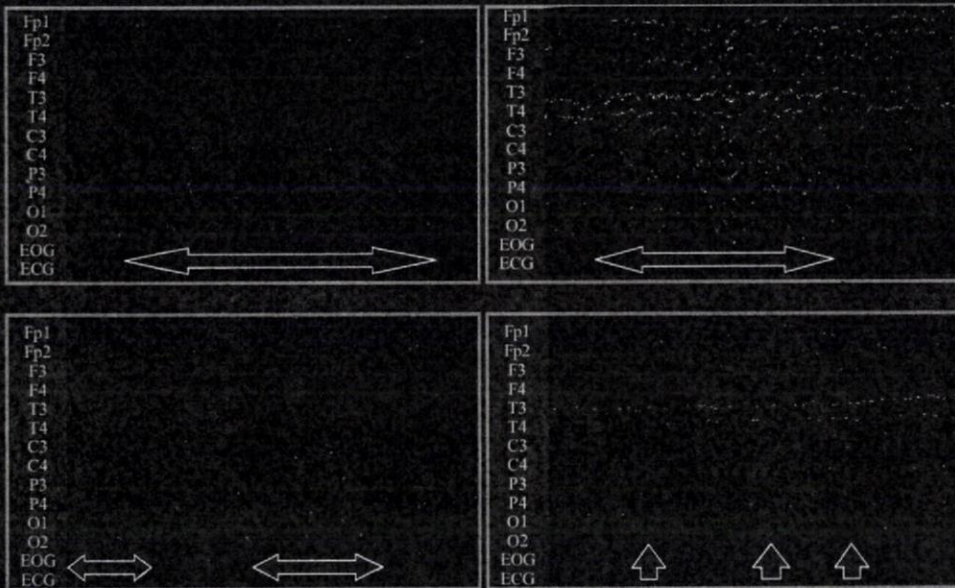


図10

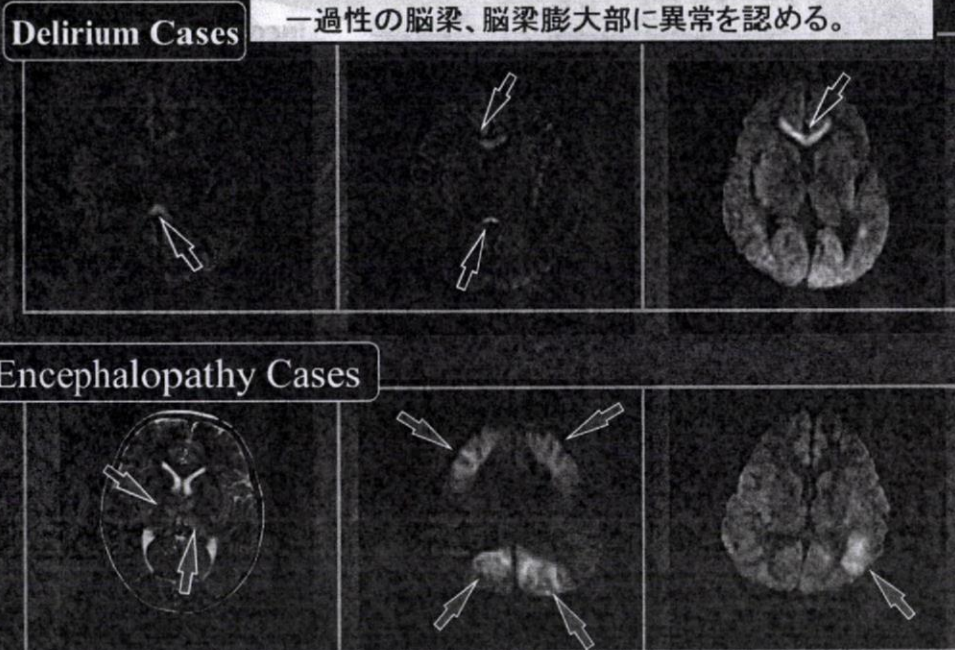
(2)インフルエンザに伴うdeliriumで一過性の脳波異常(後頭部優位のHVS)を認める。



Okumura et al. 2009

図 1 1

(3)インフルエンザに伴うdeliriumのMRIで、一過性の脳梁、脳梁膨大部に異常を認める。



Okumura et al. 2009

図 1 2

- ・熱せん妄では一過性の特徴的な脳波異常
(後頭部優位のHVS)を示す例が多い。
- ・熱せん妄では一過性の特徴的な画像
(MRI DWIにおける脳梁・膨大部の異常)を示す例が多い。
- ・同様の異常を高梨らは
「軽い一過性インフルエンザ脳症」として報告。
- ・ただし、これが主病変部位かどうかについては
今後の検討が必要である。

表1

新たな治療法の可能性

(抗サイトカイン、抗apoptosis、抗炎症)

- ・ラディカルスカベンジャーを用いた治療
- ・レドックス制御
- ・抗サイトカインモノクロナル抗体
- ・その他

表2

小児のH5N1重症感染症のまとめ

ウイルスが多くの細胞・臓器で増殖している。
その結果、多臓器不全が発症。
要因として、高サイトカイン・ケモカイン血症が発症。
【血縁】が重症化に関与(背景に遺伝的素因の存在)。
重症例の治療法として、抗サイトカイン、抗apoptosis、
「レドックス制御」などの応用が可能か？
有効なワクチン接種方法の確立が急務。

表3

インフルエンザ脳症患者の末梢血白血球中のmRNAの発現の検討 (real time PCR法)

13種類のサイトカインmRNAを定量したところ、IL-6、IL-10 mRNAの発現量がインフルエンザ脳症患者では有意に上昇していた (Kawada et al, *JID*, 2003)

Real time PCR法は高感度で定量に優れた方法であるが、調べる遺伝子の数には限界がある

➡ インフルエンザ感染時の遺伝子の発現について網羅的な解析を行うためマイクロアレイを用いた

表4

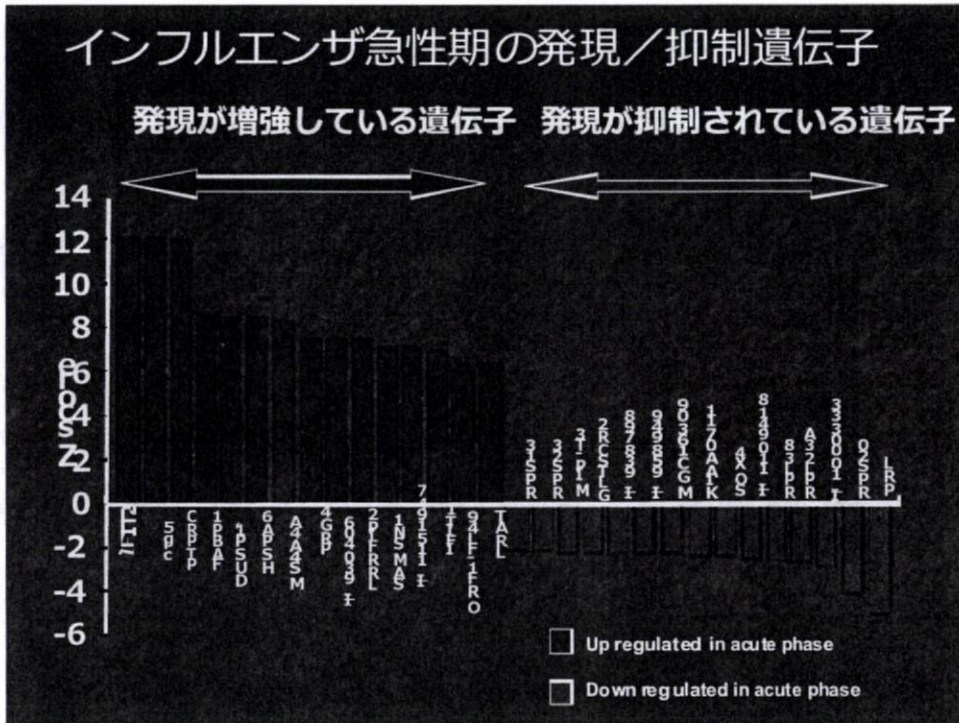


図 1 2

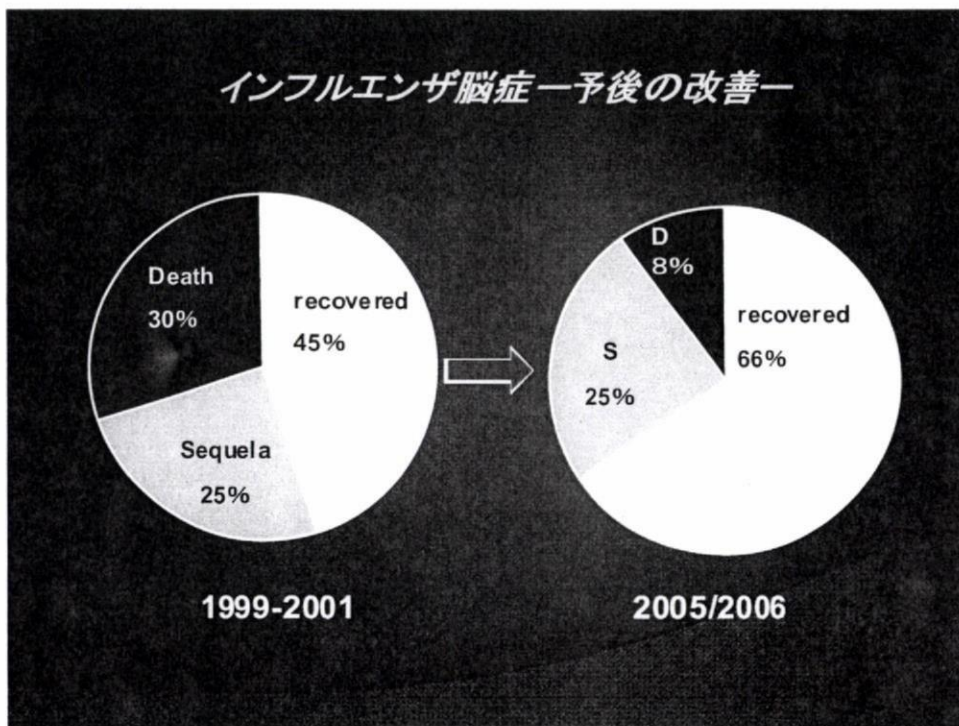


図 1 3