

## 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。インフルエンザ脳症を発症した日本人小児患者 34 名を対象に、約 5 万 SNPs を用いた whole-genome association study (GWAS) で同定した関連候補 SNP 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。そこで、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 についての GWAS 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与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

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。また、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、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、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

日本人小児インフルエンザ脳症患者 34 名 (ケース) 及び日本人一般集団 1,554 名 (コントロール) を対象とした、約 5 万 SNPs による関連解析によって同定した、関連の強い候補 SNP-X および SNP-Y ( $p=7.2 \times 10^{-13}$  および  $p=2.1 \times 10^{-6}$ ) について、新たなインフルエンザ脳症患者 34 名を対象に 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。

そこで、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、約 55 万 SNPs による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 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。関連候補 SNP 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 GWAS を行う必要があると考えられた。

### E. 結論

日本人小児インフルエンザ脳症患者 34 名について、約 5 万 SNPs による GWAS で同定した関連候補 SNP 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。そこで、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 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

## インフルエンザ脳症における先天代謝異常の関与

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 李紅、Jamiyan P、虫本雄一、小林弘典、長谷川有紀  
（島根大学医学部小児科）

### 研究要旨

インフルエンザ脳症の背景因子として、先天代謝異常の関与について研究した。特に有機酸・脂肪酸代謝異常症は、安定しているときは正常にみえて感染などのストレスによって急性脳症類似の発症形態をとることが多い。そこで、1) 有機酸・脂肪酸代謝異常の代謝スクリーニングを行った。その結果、インフルエンザ脳症 136 例のうち代謝異常と判明したのは 4 例 (2.9%)、疑い例は 12 例 (9.6%) であった。また 2) インフルエンザ脳症では、それ以外の脳症に比べ血中カルニチン濃度の低い傾向がみられた。カルニチンは脂肪酸酸化を促進するビタミンの一種であり、インフルエンザ感染とカルニチン代謝についてさらに検討する必要がある。次に 3) 発熱ストレスの脂肪酸β酸化系に及ぼす影響について、培養細胞を用いる *in vitro* probe assay によって検討した。その結果、高熱環境では一般的にβ酸化系は亢進しアセチルカルニチンの産生も増加することがわかった。一方、体質的に長鎖脂肪酸β酸化系の脆弱な細胞では高熱環境下では長鎖脂肪酸のβ酸化が抑制されることが観察された。したがって体質によっては発熱ストレスがβ酸化系の代謝不全を引き起こす可能性を示唆した。(結論) インフルエンザ脳症の発症には、一部の患者において脂肪酸代謝の異常が何らかの形で関係している可能性がある。

### A. 研究目的

インフルエンザ脳症は、発熱後早い時期から発症し急性経過をとることが多い。一方、先天代謝異常のうち有機酸・脂肪酸代謝異常症の一部の疾患では、感染などのストレスを契機に急性経過で発症するため、インフルエンザ脳症と発症形態に類似点がある。そこで、インフルエンザ脳症と有機酸・脂肪酸代謝異常との関連性を検討した。

インフルエンザ脳症患者の尿中有機酸分析、血中アシルカルニチン分析によって代謝スクリーニングを行い、また脂肪酸代謝異常患者の培養細胞に発熱ストレスをかけて培養し前後の代謝プロフィールを検討した。

### B. 研究方法

1. インフルエンザ脳症の代謝スクリーニング



(対象) 2001~2008年春の約7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 136例とインフルエンザ以外の急性脳症 224例を対象とした。

(分析方法) GC/MSによる有機酸代謝分析およびグリセロール関連代謝産物の分析と、タンデムマスによる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。

(倫理面への配慮) 当大学が定めている個人情報保護法に遵守し、患者プライバシーの保護に配慮して行った。

## 2. 発熱ストレスによる代謝能の評価

(in vitro probe assay) 既報の方法に準じて (Ventura F V, et al. J Inher Metab Dis, 1997; Sim, K.G, et al. Mol. Genetics Metab, 2002; Okun JG, et al. BBA, 2002)、培養細胞とタンデムマスを用いて脂肪酸 $\beta$ 酸化能を評価した。すなわち皮膚線維芽細胞の培地に、基質としてパルミチン酸 (またはオクタン酸) を負荷して 96時間培養した後、培養メディウム中のアシルカルニチンをタンデム型質量分析計 (タンデムマス) で分析した。

(温度条件) 基質を加えて 96時間培養する環境温度を 37℃のほかに 41℃で培養した。

(培養細胞) 正常コントロールの他に、 $\beta$ 酸化系へのストレスをより強調するために脂肪酸代謝異常症である長鎖脂肪酸アシル-CoA脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症、および中鎖脂肪酸アシル-CoA脱水素酵素 (MLCAD) 欠損症の細胞を用いて検討した。

## C. 研究結果

### 1. インフルエンザ脳症の代謝スクリーニング

(代謝スクリーニング結果) 有機酸分析とアシルカルニチン分析を行った結果は、**表1**に示すように、インフルエンザ脳症のうち明らかな代謝異常と診断された症例は 136例中4例 (2.9%)、疑い例 12例 (9.6%) で、合わせる

と 12.5%であった。一方インフルエンザ脳症以外の急性脳症例で新しい代謝異常が発見されたのは 224例中 12例 (5.4%)、疑い例は 14例 (6.3%) で、合わせると 11.7%であった。

(カルニチン) タンデムマス分析によって測定した血中遊離カルニチン値を、インフルエンザ脳症とそれ以外の急性脳症例とで比較した。**図1**に示すように、血中遊離カルニチン値の基準値は 20-60 $\mu$ M/Lであるが、インフルエンザ脳症では 25 $\pm$ 14 $\mu$ M/L、それ以外の急性脳症では 37 $\pm$ 12 $\mu$ M/Lであった ( $p < 0.05$ )。

## 2. 発熱ストレスによる代謝能の評価

培養環境を 37℃と 41℃にしてアシルカルニチンのプロファイルと比較した。**図2**に示すように、正常対照および MCAD 欠損症では、37℃環境に比べ高温環境 (41℃) の方が、アセチルカルニチン (C2) が増加し、反対に中鎖-長鎖のアシルカルニチン (C4、C6、C8、C10-C16) は減少傾向がみられた。このことは高温下では全般的に $\beta$ 酸化が亢進することが推測された。

長鎖脂肪酸代謝異常である VLCAD 欠損症は、高温環境では C2 が増加し、中鎖アシルカルニチン (C4、C6、C8、C10) は減少傾向を示したが、一方、長鎖のアシルカルニチン (C14、C16) が有意の増加を示した。このことは、長鎖脂肪酸代謝障害を持つ細胞では、高温環境下では長鎖脂肪酸の $\beta$ 酸化が抑制されることを示唆する。

## D. 考察

インフルエンザ脳症の背景因子としての先天代謝異常 (有機酸・脂肪酸代謝異常) の頻度は 2.9%ないし疑い例を含めると最大 12.6%であった。それ以外の急性脳症の場合は、それぞれ 5.4-11.7%であった。このことからインフルエンザ脳症の背景因子として有機酸・脂肪酸代謝異常をスクリーニング

する意義は大きい。

またタンデムマスで測定した遊離カルニチンの値は、インフルエンザ脳症で低下する症例が少なからずあることがわかった。カルニチンは脂肪酸代謝に重要な役割を果たすビタミンの一種であり、急性期の治療法として検討する価値がある。またカルニチンの値に変化が見られたことは、インフルエンザ脳症と脂肪酸 $\beta$ 酸化障害との関連が少なからずあると思われる。

また発熱ストレスをかけると、長鎖脂肪酸代謝異常の体質のある小児では長鎖脂肪酸代謝不全が起こる危険があることが明らかになった。以上のような体質を持った小児のインフルエンザ脳症対策として、脂肪酸 $\beta$ 酸化を保護する対策、例えばブドウ糖の早期の大量投与あるいはカルニチンなどを検討する価値がある。

実際に、インフルエンザ脳症患者の遺伝子解析で、長鎖脂肪酸 $\beta$ 酸化酵素の一つであるCPTII 遺伝子の異常を同定した症例も報告されている (Chen Y, et al. FEBS Letter, 2005; Yao DB, et al, Hum Mut, 2008)。脂肪酸代謝異常症は、安定している時は無症状で知能も正常なことが多い。長鎖脂肪酸代謝異常症の軽症型あるいは保因者のような体質的に代謝系の脆弱性と急性脳症発症の関連をさらに検討する必要がある。

## E. 結論

一部のインフルエンザ脳症と先天性有機酸・脂肪酸代謝異常の関連性があることがわかった。またカルニチン代謝の関連性もさらに検討する必要がある。さらにインフルエンザのような急激で強烈な発熱ストレスは、一般的に $\beta$ 酸化系が活性化される傾向があるが、一方で、特に長鎖脂肪酸の $\beta$ 酸化計の脆弱な体質の小児にとっては長鎖脂肪酸の代

謝障害が起こり急性代謝不全に陥る危険性がある。

## 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: 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).
- 3) Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, Purevsuren J, Yamaguchi S: ESI-MS/MS study of acylcarnitine profiles in urine from patients with organic acidemias and fatty acid oxidation disorders. J Chromat B 855: 80-87, 2007 (Aug).
- 4) Kobayashi H, Hasegawa Y, Endo M, Purevsuren J, Yamaguchi S: A retrospective ESI-MS/MS analysis of newborn blood spots from 18 symptomatic patients with organic acid and fatty acid oxidation disorders diagnosed in infancy or in childhood. J. Inherited Met. Dis. 30: 606 (doi:10.1007/s10545-007-0642-7), 2007.
- 5) Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Endo M, Yamaguchi S: Urinary organic metabolite screening of children with infkuenza-associated encephalopathy for inborn errors of metabolism using GC/MS. Brain & Develop 30: 520-526, 2008.
- 6) 四本由郁, 長谷川有紀, 山口清次, 安達昌功: インフルエンザ脳症の発症を機に見されたビタミン B<sub>12</sub> 反応型メチルマロン酸血症の 3 歳男児例. 小児科診療 71 (4): 726-729, 2008 (4月)
- 7) 山口清次: 先天代謝異常マススクリーニ



ング検査：新しい動き．産婦人科治療  
96 (増刊)：840-845, 2008 (4月)

8) 四本由郁、長谷川有紀、小林弘典、内田  
由里、山口清次、石川順一、塩見正司：脂肪  
酸代謝障害の所見を示したセレウス菌食中  
毒に伴う急性脳症の5歳男児例．日児誌、  
113 (1)：75-78, 2009 (1月)

## 2. 学会発表

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

2) 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

3) 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

4) Yamaguchi S: Newborn screening in  
Japan: Restructuring for the new era. 6<sup>th</sup>  
Asia-Pacific Regional Meeting  
International Society for Neonatal  
Screening (Plenary Lecture), Singapore,  
2007 (Aug).

5) Yamaguchi S: Newborn screening in

Japan: introduction of tandem mass  
spectrometry and diagnostic supports. SCL  
International Symposium, Seoul,  
September 2008

6) 虫本雄一、小林弘典、遠藤 充、長谷川  
有紀、山口清次：SIDS 様症状で発症する脂  
肪酸代謝異常症：中鎖アシル CoA 脱水素酵素  
(MCAD) 欠損症日本人症例の発症形態の検討。

第14回日本SIDS学会、岐阜、2008年3月

7) 吉川陽子、長谷川由紀、遠藤 充、山田  
健治、小林弘典、山口清次：非典型的な発  
症形態を示した有機酸・脂肪酸代謝異常症例  
の検討。第111回日本小児科学会学術集会。  
東京、2008年4月

8) 李 紅、遠藤 充、小林弘典、長谷川有紀、  
福田誠司、山口清次：Bezafibrate and heat  
stress alter the  $\beta$ -oxidation capacity in  
VLCAD deficiency. 第111回日本小児科学会  
学術集会。東京、2008年4月

9) 山口清次、虫本雄一、吉川陽子、四本由  
郁、小林弘典：有機酸・脂肪酸代謝異常症の  
新生児期発症例の臨床所見と予後。第44回  
日本周産期・新生児医学会総会。横浜、2008  
年7月

10) 内田由里：インフルエンザ脳症における  
先天代謝異常症の関連。第5回出雲小児感  
染症カンファレンス。2008年11月

## 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. インフルエンザ脳症を含む急性脳症の代謝異常検査結果

疾患名	インフルエンザ 脳症 (N=136)	その他の 急性脳症 (N=224)
1) メチルマロン酸血症	1	1
2) 尿素回路異常症	0	3
3) $\beta$ ケトチオラーゼ欠損症	0	1
4) 高乳酸血症	0	1
5) CPT2 欠損症	1	1
6) VLCAD 欠損症	0	2
7) MCAD 欠損症	0	1
8) 全身性カルニチン欠乏症	1	1
9) FDPase 欠損症	1	1
10) その他の疑い例		
・ 有機酸代謝異常疑い*	2	3
・ 脂肪酸代謝異常症疑い**	6	6
・ 遊離カルニチン低値	5	5

略字：CPT2= カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-2；VLCAD= 極長脂肪酸アシル-CoA 脱水素酵素；MCAD= 中鎖脂肪酸アシル-CoA 脱水素酵素；FDPase= フルクトース-1,6-ジホスファターゼ；\*疑われた有機酸代謝異常は=以下のうちいずれか（メチルマロン酸血症；プロピオン酸血症；イソ吉草酸血症；マルチプルカルボキシラーゼ欠損症；グルタル酸血症2型）。\*\*非ケトン性ジカルボン酸尿症（ $\beta$ 酸化異常を示唆する所見）。



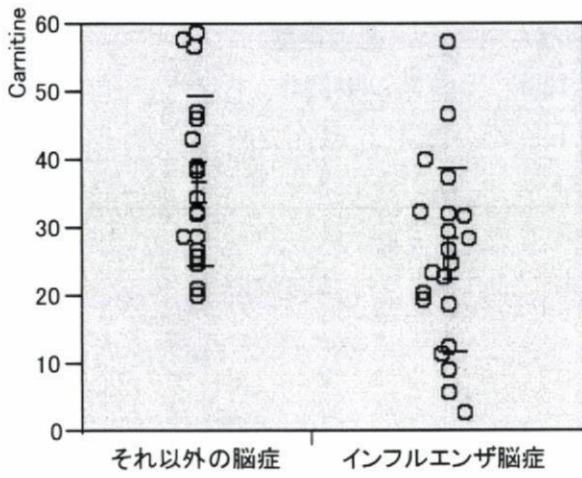


図1. インフルエンザ脳症急性期における遊離カルニチン値の比較  
2004-2005年。p<0.05 (Student t検定)

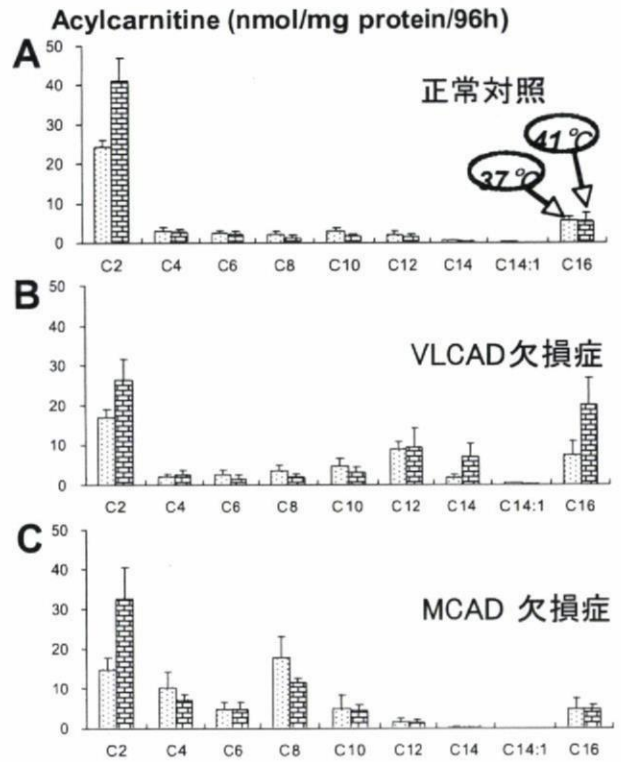


図2. 高熱環境下のアシルカルニチンプロファイルの変化 (パルミチン酸負荷)

## 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

分担研究者 伊藤 嘉規 名古屋大学医学部小児科学・助教

研究協力者 木村 宏 名古屋大学医学部ウイルス学・准教授

**研究要旨** インフルエンザ脳症の発症に関連する遺伝子の探索をマイクロアレイにより網羅的に行った。合併症のないインフルエンザ群（対照群、4例）と比較して、熱性痙攣を合併したインフルエンザ症例（熱性痙攣群、5例）での発症に関連する遺伝子を検討した結果、熱性痙攣群では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。増強あるいは減弱した遺伝子群には、脂質代謝や細胞内輸送、シグナル伝達に関する分子などが含まれていた。マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析はインフルエンザ脳症の病態解明に有用な手段となり得ることが示唆された。一方、ヒトヘルペスウイルス6型（HHV-6）脳症の病態について検討する目的で、HHV-6脳症13例について、急性期の髄液・血清ペア検体中のHHV-6 DNA量、サイトカインおよびマトリックス分解酵素濃度を測定した。比較のために単純ヘルペス脳炎3例についても検討した。単純ヘルペス脳炎症例と比較して、HHV-6関連脳症例では血清中に比し髄液中のウイルス量が少なく、ウイルスの直接侵襲が脳症の主な原因ではないことが示唆された。炎症性サイトカイン濃度の上昇が髄液と血清では異なり、特に、血清と比べて有意に上昇していたインターロイキン-8は脳症発症に関連している可能性が考えられた。

### A. 研究目的

インフルエンザ脳症の発症にはウイルス感染を契機に大量に分泌された interleukin-6 (IL-6)、および tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) などの炎症性サイトカインの関与が示唆されている。しかし、インフルエンザに罹患したすべての個体が脳症を生じるわけではないこと、日本での報告が中心であることなどから遺伝的素因の関与が疑われてきた。

私共は、インフルエンザ脳症の発症機序や重症化に関わる遺伝的背景・遺伝子異常を明らかにするために、マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子解析の基礎的検討を行ってきた。同法を用いることで、今まで検討課題と考えられなかった遺伝子の関与が明らかになるかもしれない。今回は、インフルエンザ熱性痙攣患者および中枢神経系合併症のないインフルエンザの患者の末梢血を用い、マイクロアレイ法により、網羅的遺伝子解析を行い患者群間の遺伝子発現を比較した。

次に、乳幼児期に好発するウイルス関連脳炎・脳症の中でインフルエンザ脳症に次いで頻度が高い、ヒトヘルペスウイルス6型

(HHV-6)脳症について検討した。HHV-6 脳症では、インフルエンザ脳症と同様に炎症性サイトカインの過剰産生などの「間接的」発症機序を示唆する報告があるが、不明な点も多い。そこで、HHV-6 脳症の急性期の髄液・血清のペア検体を用いて、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を測定し、病態の解析を試みた。

### B. 研究方法

#### (1) インフルエンザ脳症の検討

対象は熱性痙攣患者5例、中枢神経系合併症のないインフルエンザ4例、計9例とした。臨床検体の使用にあたり、ドナーの承諾を得た。

遺伝子発現解析は以下の手順で行った。

1. インフルエンザ患者から急性期に採血。
2. PAX gene Blood RNA Kit (QIAGEN) を用い RNA を抽出。
3. 抽出した RNA をそれぞれ 400 ng 使用し Low RNA Input リニア増幅・ラベル化キット (Agilent Technologies) を用い cDNA の合成、ラベル化 cRNA の合成を行った。急性期を Cyanine 3-dCTP でラベル化した。
4. ラベル化 cRNA 各 1 $\mu$ g を In Situ



Hybridization Kit (Agilent Technologies) を使用し、マイクロアレイ (Human 1A Oligo Microarray, Agilent Technologies; 17,086 遺伝子を搭載) に 60°C で 17 時間ハイブリダイゼーションさせた。

- アレイを洗浄した後 DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies) で読みとった。読みとったマイクロアレイの発現情報を Feature Extraction (Agilent Technologies) で解析した。
- 発現情報から、各遺伝子について Z score を算出した。遺伝子 A の熱性痙攣群における Z score の計算式;  $Z \text{ score} = (A \text{ の発現強度} - \text{熱性痙攣時のすべての遺伝子の平均発現強度}) / \text{熱性痙攣時のすべての遺伝子の平均発現強度の標準偏差}$

#### (2) HHV-6 脳症の検討

- HHV-6 脳症と考えられた患者 (8 か月 - 2 歳 7 か月、平均 1 歳 5 か月) の急性期における髄液・血清ペア検体から DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により HHV-6 DNA を定量した。
- 比較検討のため、単純ヘルペスウイルス (HSV) 脳炎と診断した 3 名の患者の急性期における髄液・血清ペア検体中の HSV DNA を定量した。
- 1 で HHV-6 を定量した髄液・血清ペア検体中のサイトカインおよびマトリックス分解酵素を測定した。サイトカインはサイトメトリック・ビーズ・アレイを用いて IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 p70、TNF $\alpha$  を同時に測定した。マトリックス分解酵素は、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9 を ELISA により測定した。

#### C. 研究結果

- インフルエンザ患者 9 例 (熱性痙攣 5 例、合併症なし 4 例) を対象に急性期検体として発症後 (発熱後) 平均 1.1 日目の血液を採取した。全血より RNA 抽出、cRNA 合成後、インフルエンザ小児例における遺伝子の発現について、マイクロアレイを用いて網羅的解析を行った。熱性痙攣群と対照群とを比較したところ、熱性痙攣群では、22 の遺伝子の発現が増強し、7 つの遺伝子が減弱していた (図 1)。さらに、これらの遺伝子を機能別に分類したところ、発現が増強あるいは減弱した遺伝子群には、脂質代謝や細胞内輸送、シグナル伝達に関する分子などが含まれていた。(表 1)。
- HHV-6 脳症 13 例の髄液・血清中の HHV-6 DNA を定量した。髄液では 7 例

(54%)、血清では 1 例 (7.7%) でウイルス DNA は検出されなかった。ウイルス DNA の平均は  $5.70 \times 10^2$  コピー/mL、血清中では  $1.64 \times 10^4$  コピー/mL であり、後者が有意に高値であった ( $p=0.003$ )。また、平均ウイルス量の比は髄液:血清=1:288 であった。一方、HSV 脳炎 3 例では、髄液では全例でウイルスが検出され、髄液中では平均  $1.81 \times 10^4$  コピー/mL であった。血清では全例で HSV DNA は検出されなかった (図 2)。

- HHV-6 脳症 13 例の検討で、血清中の IL-6、IL-8、IL-10 は上昇が認められた。これらの分子は髄液では異なる存在パターンを示した。特に、髄液中の IL-8 は血清中の値より有意に高かった (図 3)。

#### D. 考察

インフルエンザ脳症の発症機序については、サイトカインを介した炎症反応の亢進や血管内皮細胞の障害の機序が報告されてきた。今回私共は、熱性痙攣を伴ったインフルエンザ患者を対象とし、マイクロアレイ法による患者末梢血中の遺伝子発現解析を行った。熱性痙攣群では、対照群に比べ、22 の遺伝子の発現が増強しており、この中のいくつかのものはインフルエンザ関連中枢神経合併症と関連している可能性がある。今後これらの遺伝子について、定量的 RT-PCR 法や蛋白レベルの解析が必要と考えられる。

HHV-6 脳症の検討では、急性期の髄液中ウイルス量が血清ウイルス量の 1/300 程度であった。HHV-6 脳症では、ウイルスの直接侵襲による限局性病変を主体とする HSV 脳炎の病態とは対比的に、脳局所においてウイルスが増殖しない病態を反映する結果と考えられた。他方、炎症性サイトカイン濃度の検討では、IL-6、IL-8、IL-10 はウイルス DNA の局在とは異なった上昇パターンを示した。IL-8 の上昇は中枢神経内における炎症を示す結果と考えられるが、脳症の発症につながる機序についてさらに検討する予定である。

#### E. 結論

インフルエンザ患者を対象にマイクロアレイ法による患者末梢血中の遺伝子発現解析を行った。同法による網羅的遺伝子発現解析はインフルエンザ脳症の発症機序・重症化の解明および早期診断法開発に有用と考えられる。他方、HHV-6 脳症において、急性期の髄液・血清ペア検体におけるウイルス量およびサイトカイン濃度の比較から、HHV-6 感染後の中枢神経内への直接的な



侵襲は脳症惹起の主な要因ではなく、IL-8などの因子が脳症の発症に関係していることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ito Y, Kondo E, Demachi-Okamura A, Akatsuka Y, Tsujimura K, Tanimoto M, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K. Three immunoproteasome-associated subunits cooperatively generate a CTL epitope of the EBV-LMP2A by overcoming specific structures resistant to epitope liberation. *J Virol* 80: 883-890, 2006
- 2) Demachi-Okamura A, Ito Y, Akatsuka Y, Tsujimura K, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K. Induction of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1-specific cytotoxic T lymphocytes with mRNA-transduced antigen presenting cells targeting EBV-carrying natural killer cell malignancies. *Eur J Immunol*, 36:593-602, 2006
- 3) Tsujimura K, Obata Y, Matsudaira Y, Nishida K, Akatsuka Y, Ito Y, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, Takahashi T. Characterization of murine CD160+ CD8+ T lymphocytes. *Immunol Lett*, 2006 15;106 (1) :48-56, 2006
- 4) Morishima S, Akatsuka Y, Nawa A, Kondo E, Kiyono T, Torikai H, Nakanishi T, Ito Y, Tsujimura K, Iwata K, Ito K, Koderu Y, Morishima Y, Kuzushima K, Takahashi T. Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: The combined effects of bortezomib and interferon-gamma on the presentation of a cryptic epitope. *Int J Cancer*, 120 (3) :594-604, 2006
- 5) 伊藤嘉規. 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* 3:109-116, 2006
- 6) 伊藤嘉規. HIVとγヘルペスウイルス *日本臨床* 64 Suppl (3) :594-597, 2006
- 7) Ito Y, Demachi-Okamura A, Ohta R, Akatsuka Y, Nishida K, Tsujimura K, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K. Full-length EBNA1-mRNA-transduced dendritic cells stimulate CTLs recognizing a novel HLA-Cw\*0303 and Cw\*0304-restricted epitope on EBNA1-expressing cells. *J Gen Virol*, 88 (3) :770-780, 2007
- 8) Wada K, Kubota N, Ito Y, Yagasaki H, Kato K, Yoshikawa T, Ono Y, Ando H, Fujimoto Y, Kiuchi T, Kojima S, Nishiyama Y, Kimura H. Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*, 45 (5) :1426-1432, 2007
- 9) 伊藤嘉規, 木村宏. EBウイルス：慢性活動性EBウイルス感染症の病態と治療. *血液・腫瘍科* 54:74-80, 2007
- 10) Kubota N, Wada K, Ito Y, Shimoyama Y, Nakamura S, Nishiyama Y, Kimura H. One-step multiplex real-time PCR assay to analyse the latency patterns of Epstein-Barr virus infection. *J Virol Methods*, 147 (1) :26-36, 2008.
- 11) Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Ushijima Y, Kawada J, Nishiyama Y, Kojima S, Kimura H. Oligonucleotide Microarray Analysis of Gene Expression Profiles followed by a Real-time RT-PCR Assay in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *J Infect Dis*, 197 (5) :663-666, 2008.
- 12) Gotoh K, Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Kawada J, Takahashi Y, Yagasaki H, Kojima S, Nishiyama Y, Kimura H. Clinical and virologic characteristics of 15 patients with chronic active Epstein-Barr virus infection treated with hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*, 46 (10) :1525-34, 2008.
- 13) Demachi-Okamura A, Ito Y, Akatsuka Y, Tsujimura K, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K. Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific CD4+ T cells directly kill EBV-carrying NK and T cells. *Cancer Sci*, 99 (8) :1633-42, 2008
- 14) Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol*, 18 (3) :305-319, 2008



- 15) Ono Y, Ito Y, Kaneko K, Shibata-Watanabe Y, Tainaka T, Sumida W, Nakamura T, Kamei H, Kiuchi T, Ando H, Kimura H. Simultaneous monitoring by real-time PCR of Epstein-Barr virus, human cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 in juvenile and adult liver transplant recipients. *Transplantation Proceedings* 40 (10):3578-3582, 2008
- 16) Wada K, Mizoguchi S, Ito Y, Kawada J, Yamauchi Y, Morishima T, Nishiyama Y, Kimura H. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7. *Microbiol Immunol*, 53 (1):22-29, 2009
- 17) Tanaka-Kitajima N, Iwata N, Ando Y, Sakurai H, Iwami M, Tsuzuki K, Kondo M, Ito Y, Kimura H. ARN Acute retinal necrosis caused by herpes simplex virus type 2 in a 3-year-old Japanese boy, *Eur J Pediatr in press*
- 18) 伊藤嘉規, 木村宏. 単純ヘルペスウイルス感染症: 小児内科 40(増刊号):1130-1135, 2008
2. 学会発表
- 1) Ito Y, Demachi-Okamura A, Kuzushima K. Full-Length EBNA1-mRNA-transduced dendritic cells stimulate CTLs recognizing a novel HLA-Cw\*0303 and Cw\*0304-restricted epitope on EBNA1-expressing cells. 31st International Herpesvirus Workshop, Seattle, 2006. 7. 22-28
- 2) 伊藤嘉規, 木村宏, Multiplex real-time PCR 法による EBV, CMV および 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, 高知, 2006. 11. 10-11
- 3) 伊藤嘉規, 渡邊友紀子, 吉川哲史, 谷ヶ崎博, 小島勢二, 木村宏, EBV, CMV および HHV-6 同時定量システムの確立と診断への応用, 第 110 回日本小児科学会, 京都, 2007. 4. 20-22
- 4) 後藤研誠, 伊藤嘉規, 渡邊柴田友紀子, 高橋義行, 谷ヶ崎博 2, 3—小島勢二, 2 木村宏, 造血幹細胞移植を施行した慢性活動性 EB ウイルス感染症例の予後因子の検討, 第 110 回日本小児科学会, 京都, 2007. 4. 20-22
- 5) 伊藤嘉規, 後藤研誠, 吉川哲史, 木村宏, 全血検体を使用した EBV, CMV および HHV-6 同時定量システムの移植後感染症診断への応用, 第 48 回日本臨床ウイルス学会, 富山, 2007. 6. 2-3
- 6) Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Kawada J, Kojima S, Kimura H. Oligonucleotide Microarray Analysis of Gene Expression Profiles followed by Real-Time PCR Assay in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. 32nd International Herpesvirus Workshop, Asheville, 2007. 7. 7-12
- 7) Kimura H, Wada K, Kubota N, Ito Y, Yoshikawa T, Kojima S, Nishiyama Y. Simultaneous quantification of EBV, CMV, and HHV-6 in transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. 32nd International Herpesvirus Workshop, Asheville, 2007. 7. 7-12
- 8) 伊藤嘉規, 渡邊友紀子, 川田潤一, 西山幸廣, 木村宏, マイクロアレイおよびリアルタイム RT-PCR 法による慢性活動性 EB ウイルス感染症病因遺伝子の探索, 第 55 回ウイルス学会, 札幌, 2007. 10. 21-23
- 9) 木村宏, 和田かおる, 伊藤嘉規, 西山幸廣, Multiplex Real-time PCR 法による HSV-1, HHV-6, HHV-7 同時検出システムの確立と脳炎・脳症診断への応用, 第 55 回日本ウイルス学会, 札幌, 2007. 10. 21-23
- 10) 岩田誠子, 和田かおる, 伊藤嘉規, 西山幸廣, 木村宏, One-step multiplex real-time RT-PCR 法による EB ウイルス関連遺伝子の定量解析, 第 55 回日本ウイルス学会, 札幌, 2007. 10. 21-23
- 11) 伊藤嘉規, 渡邊友紀子, 後藤研誠, 木村宏, EB ウイルスおよびサイトメガロウイルスの重感染と考えられた重症感染 3 例の検討, 第 39 回日本小児感染症学会, 横浜, 2007. 11. 9-11
- 12) 笠場友佳代, 小関直子, 中島翠, 齊田吉伯, 那須敬, 三河誠, 小林一郎, 伊藤嘉規, 木村宏, 金兼弘和, NK 細胞に感染し, 良好な経過を辿った EB ウイルス関連血球貪食症候群の一例, 第 39 回日本小児感染症学会, 横浜, 2007. 11. 9-11
- 13) 伊藤嘉規, 渡邊友紀子, 川田潤一, 小島勢二, 木村宏, 慢性活動性 EB ウイルス感染症においてマイクロアレイ解析で発現増強を認めた遺伝子, 第 111 回日本小児科学会, 東京, 2008. 4. 25-27
- 14) 河邊慎司, 伊藤嘉規, 川田潤一, 後藤研



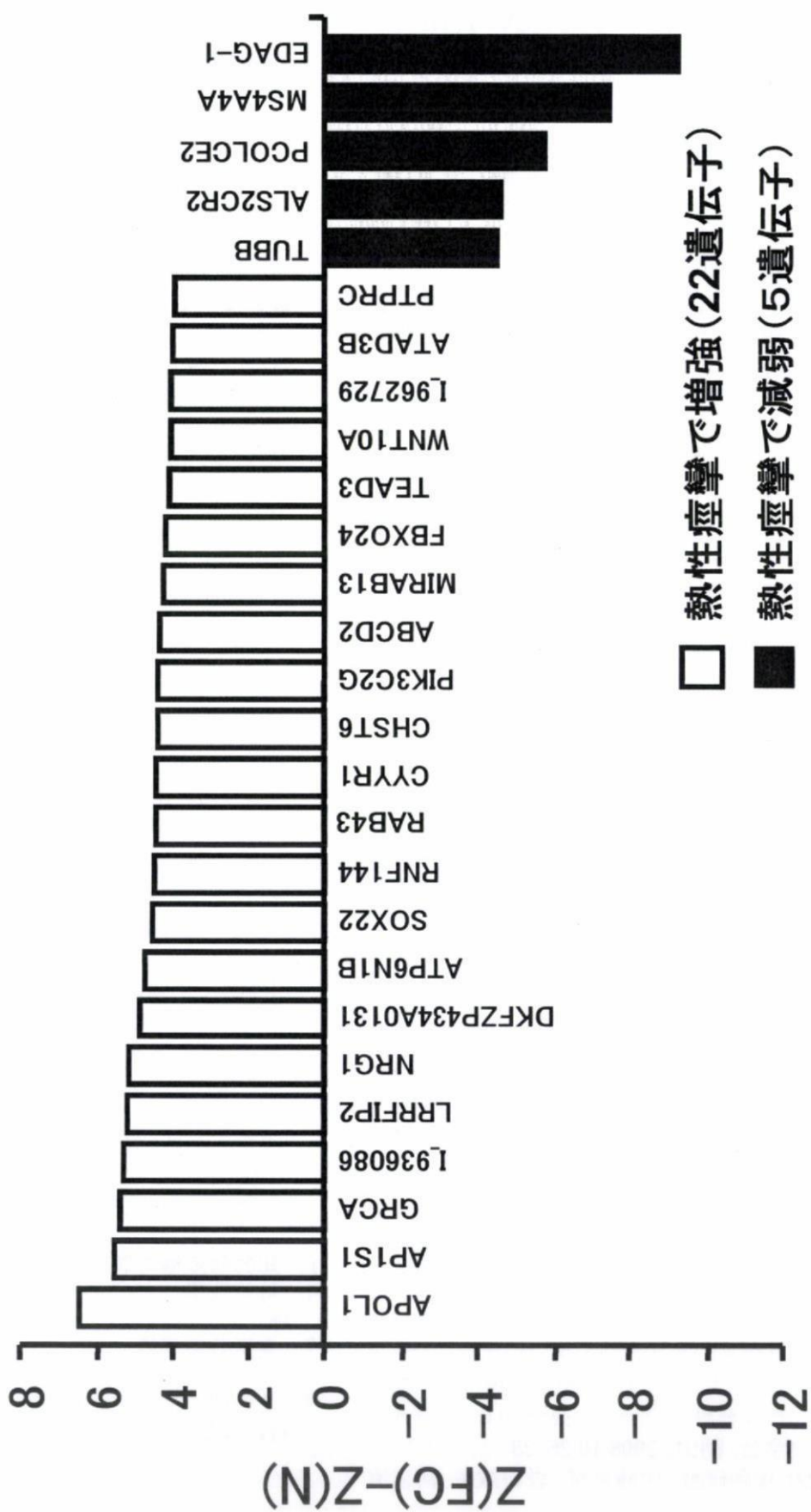
- 誠、岩田誠子、木村宏、HSV-1、HHV-6およびHHV-7同時定量システムの確立と脳炎・脳症診断への応用、第111回日本小児科学会、東京、2008.4.25-27
- 15) 岩田誠子、後藤研誠、伊藤嘉規、木村宏、EBV関連遺伝子の迅速定量システムの確立と慢性活動性EBV感染症への応用、第111回日本小児科学会、東京、2008.4.25-27
- 16) 後藤研誠、伊藤嘉規、木村宏、肺炎、重度肝障害およびDICを合併した重症水痘男児例の検討、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山、2008.6.14-15
- 17) 河邊慎司、伊藤嘉規、後藤研誠、木村宏、脳炎・脳症迅速診断のためのHSV-1、HHV-6およびHHV-7同時定量システムの確立と髄液・血清中のウイルス量の比較、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山、2008.6.14-15
- 18) 北島直子、伊藤嘉規、木村宏、単純ヘルペスウイルス2型による急性網膜壊死(acute retinal necrosis:ARN)の小児例、第49回日本臨床ウイルス学会、犬山、2008.6.14-15
- 19) Yoshinori Ito, Kaoru Wada, Sachiko Mizoguchi, Jun-ichi Kawada, Yohei Yamauchi, Tsuneo Morishima, Yukihiko Nishiyama and Hiroshi Kimura. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7. 33rd International Herpesvirus Workshop, Estoril, 2008.7.27-8.1
- 20) Kensei Gotoh, Yoshinori Ito, Yukiko Shibata-Watanabe, Jun-ichi Kawada, Yoshiyuki Takahashi, Hiroshi Yagasaki, Seiji Kojima, Yukihiko Nishiyama and Hiroshi Kimura. Clinical and virologic characteristics of 15 patients with chronic active Epstein-Barr virus infection treated with hematopoietic stem cell transplantation. 33rd International Herpesvirus Workshop, Estoril, 2008.7.27-8.1
- 21) 伊藤嘉規、木村宏、臓器・造血器幹細胞移植後の臨床検体を用いた比較検討によるEBVおよびCMV定量法の標準化に向けた多施設共同試験、第56回日本ウイルス学会、岡山、2008.10.26-28
- 22) 後藤研誠、伊藤嘉規、岩田誠子、河邊慎司、太田里永子、木村宏、無症候性高EBウイルス血症が長期間持続する生体肝移植後小児例についての検討、第56回日本ウイルス学会、岡山、2008.10.26-28
- 23) 木村宏、山内洋平、後藤研誠、伊藤嘉規、西山幸廣、Flow cytometry/*in situ* hybridization法を用いたEBV感染リンパ球の新規定量・同定法の確立と臨床応用、第56回日本ウイルス学会、岡山、2008.10.26-28
- 24) 岩田誠子、和田かおる、後藤研誠、伊藤嘉規、西山幸廣、木村宏、One-step multiplex real-time RT-PCR法を用いたCAEBVにおけるEBV関連遺伝子発現の解析、第56回日本ウイルス学会、岡山、2008.10.26-28
- 25) 祖父江文子、長谷川慎司、森田誠、深沢達也、伊藤嘉規、後遺症を残したHHV-6関連脳症2症例の臨床経過および病態についての検討、後遺症を残したHHV-6関連脳症2症例の臨床経過および病態についての検討、第40回日本小児感染症学会、名古屋、2008.11.15-16
- 26) 荒井直子、伊藤嘉規、西村直子、鈴木道雄、成田敦、小山慎郎、牛田肇、木村宏、尾崎隆男、07-08シーズンのノロウイルス胃腸炎入院例の臨床像(ロタウイルス胃腸炎との比較)、第40回日本小児感染症学会、名古屋、2008.11.15-16
- 27) 中原宏、久枝義也、白数明彦、瓜生久美子、井代学、徳永千恵美、大田和美、島川哲郎、伊藤嘉規、病初期に脳梁膨大部病変を認めたけいれん群発型HHV-6脳症の一例、第40回日本小児感染症学会、名古屋、2008.11.15-16
- 28) 安井正宏、安藤秀男、伊藤嘉規、CPTII遺伝子変異が認められたHHV-6脳症の一例、第40回日本小児感染症学会、名古屋、2008.11.15-16

## G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし



(図1) 熱性痙攣を合併したインフルエンザ患者での  
発現／減弱遺伝子



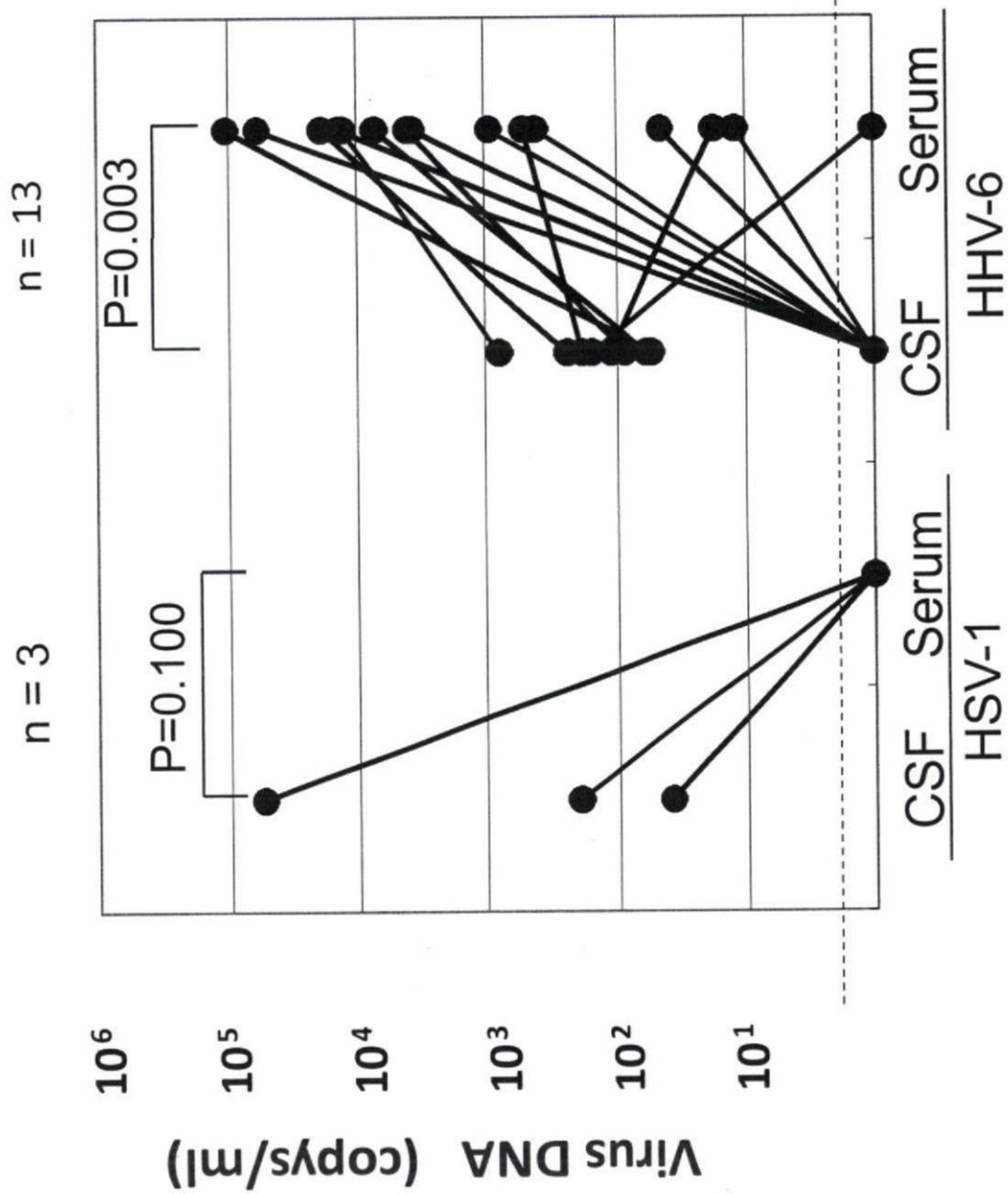
(表1) 熱性痙攣患者での発現/減弱遺伝子の定義一覧

Z (FC) - Z (N)	GenBank accession no.	Gene symbol	Gene name	Gene ontology (biological process)
<b>Upregulated genes</b>				
6.50	NM_145344	APOL1	Apolipoprotein I	Lipid metabolism
5.53	NM_057089	AP1S1	Adaptor protein complex 1 sigma 1 subunit	Endocytosis; intracellular protein transport
5.39	NM_019858	GRCA	Gene-rich cluster, A gene	G-protein-coupled receptor protein signalling pathway
5.32	AB065742	OR5M1	Olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 1	Signal transduction
5.21	NM_006309	LRRFIP2	Leucine-rich repeat- (in FLII) interacting protein 2	Unclassified
5.13	NM_013956	NRG1	Neuregulin 1	Cell differentiation; embryonic development; neurogenesis
4.84	NM_018991	DKFZP434A0131	DKFZp434A0131 protein	Unclassified
4.69	NM_020632	ATP6N1B	ATPase (H <sup>+</sup> transporting) lysosomal V0 subunit A isoform 4	Proton transport; regulation of pH
4.50	NM_006943	SOX22	SRY (sex-determining region Y)-box 22	Regulation of transcription from Pol II promoter
4.48	NM_014746	RNF144	Ring-finger protein 144	Protein ubiquitination
4.42	AY166852	RAB41	RAB41, member RAS oncogene family	Intracellular protein transport; small GTPase-mediated signal transduction
4.42	NM_052954	CYYR1	Cysteine- and tyrosine-rich 1	Biological process unknown
4.36	NM_021615	CHST6	Carbohydrate sulfotransferase 6	N-Acetylglucosamine metabolism
4.35	NM_004570	PIK3C2G	Class II phosphoinositide-3-kinase gamma	Intracellular signalling cascade
4.32	NM_005164	ABCD2	ATP-binding cassette, subfamily D (ALD), member 2	Fatty acid metabolism; transport
4.23	NM_033386	MIRAB13	Molecule interacting with Rab13	Vesicle-mediated transport
4.19	NM_033506	FBXO24	Protein containing an F-box domain	Protein ubiquitination
4.09	NM_003214	TEAD3	TEA domain family member 3	Regulation of transcription, DNA-dependent
4.01	NM_025216	WNT10A	Wingless-type MMTV integration site family member 10a	Development; frizzled-2 signalling pathway
4.01	NM_025152	NUBPL	Nucleotide-binding protein-like	Unclassified
4.00	NM_031921	ATAD3B	ATPase family, AAA domain-containing 3B	Cell division
3.94	NM_080923	PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	Cell-surface receptor-linked signal transduction; protein amino acid dephosphorylation
<b>Downregulated genes</b>				
-9.24	NM_018437	HEMGN	Haemogen	Signal transduction
-7.50	NM_024021	MS4A4A	Membrane-spanning 4-domain subfamily A member 4A	Signal transduction
-5.80	NM_013363	PCOLCE2	Procollagen C-endopeptidase enhancer 2	Transport
-4.64	NM_018571	ALS2CR2	Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosome region candidate 2	Protein amino acid phosphorylation
-4.56	NM_001069	TUBB	Tubulin, beta polypeptide	Microtubule polymerization; microtubule-based movement; natural killer cell-mediated cytotoxicity

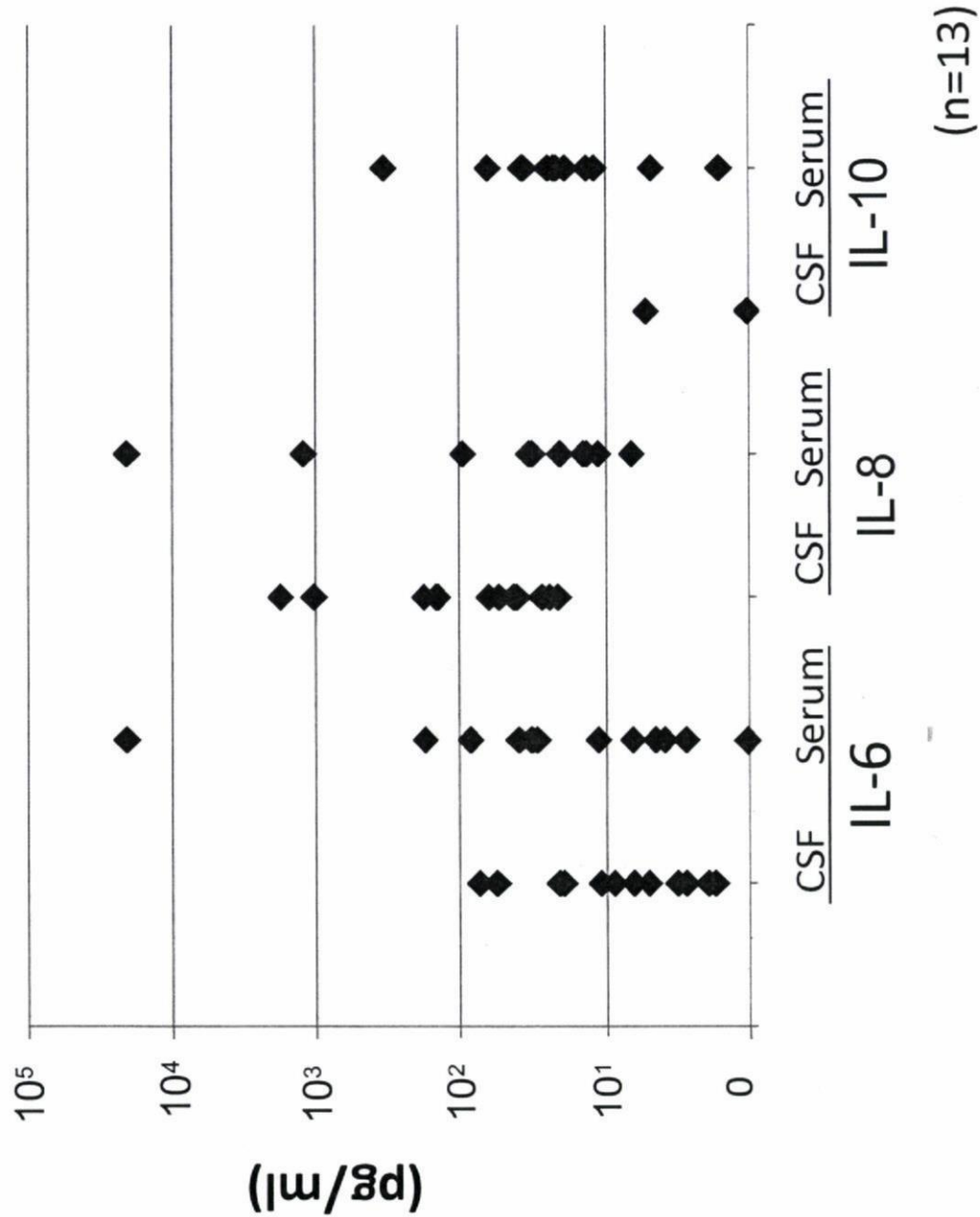
Z scoreは方法に記載した方法で計算。>3.92あるいは<-3.92を有意と判定。



(図2)HHV-6脳症患者の髄液・血清ペア検体  
 におけるウイルスDNA量



(図3)HHV-6脳症患者の髄液・血清ペア検体  
 におけるサイトカイン濃度





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

けいれん重積型急性脳症の病態解析に関する研究

研究分担者 市山高志 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・准教授

研究要旨

【目的】インフルエンザ脳症の1病型であるけいれん重積型急性脳症の病態はいまだ明らかでない。本症の病態を血清および髄液サイトカイン、血清 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)、neurofilament 解析の面から検討した。

【方法】けいれん重積型急性脳症患者の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)、MMP-9、TIMP-1、neurofilament を ELISA 法で測定した。

【成績】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。血清 MMP-9 値および MMP-9/TIMP-1 比は高値で血清 TIMP-1 値は低値だった。第2~7病日より血清 neurofilament 値が上昇した。

【考察】本症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 値の上昇は炎症とは考えにくい。文献的考察を加え、けいれん重積による神経興奮毒性に対する脳保護反応を示唆する所見と考えた。また血清 MMP-9 と TIMP-1 の不均衡が重篤な神経学的後遺症に関与している可能性が示唆された。さらに第2~7病日より血清 neurofilament 値が上昇したことは本症による神経細胞傷害を示唆した。

【結論】けいれん重積型急性脳症においてけいれん重積による神経興奮毒性および血液脳関門傷害の存在が示唆され、発症早期より神経細胞傷害を来することが示唆された。

A. 研究目的

matrix metalloproteinase-9 (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、tissue inhibitor of metalloproteinase-1

(TIMP-1) は MMP-9 活性を阻害する。従って血液脳関門に対し、MMP-9 は攻撃因子、TIMP-1 は防御因子である。neurofilament (NF) は神経細胞を構成する主要な細胞骨格蛋白であり、NF-L、NF-M、

NF-Hの3つのサブユニットからなっている。NFは軸索損傷、変性、神経細胞脱落の特異的なバイオマーカーであり、髄液や血清中濃度の上昇は神経細胞の損傷を示唆する。中でもリン酸化型NF-Hはプロテアーゼに抵抗性であり、神経損傷の際に安定してELISA法で検出することができる。インフルエンザ脳症ではその免疫病態として高サイトカイン血症が明らかにされている。しかし、インフルエンザ脳症の病型は一様でなく、高サイトカイン血症では説明できない病型も存在する。けいれん重積型急性脳症の病態はいまだ明らかでない。本症の病態を血清および髄液サイトカイン、血清MMP-9、TIMP-1、リン酸化型NF-H解析の面から検討したので報告する。

## B. 研究方法

けいれん重積型急性脳症の定義は1)発熱時の30分以上の痙攣重積または群発で発症し、その後意識障害や麻痺が遷延、2)数日後の頭部MRI拡散強調像で皮質下白質病変を主とする所見を認めたものとした。けいれん重積型急性脳症患児の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)、MMP-9、TIMP-1、リン酸化型NF-HをELISA法で測定した。

### (倫理面への配慮)

本研究は保存血清および髄液を用いた研究であり、個人名等の個人情報保護され、公表はされないことより倫理面への影響はない。

## C. 研究結果

血清IL-6、IL-10、sTNFR1および髄液IL-6の上昇を認めた(図1)。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。血清MMP-9値およびMMP-9/TIMP-1比は高値で血清TIMP-1値は低値だった(図2-4)。全例で2~7病日より血清NF-H値が上昇した(図5)。死亡した2例では最高1,896 ng/mL、1,448 ng/mLと著明に上昇した。いわゆるsecond seizureを有し、second seizure発症前の血清が解析できた3例中1例で血清NF-H値の上昇を認めた。

## D. 考察

### 1) サイトカイン解析

血清では炎症性サイトカインであるinterleukin-6 (IL-6) および抗炎症メディエーターであるIL-10、soluble tumor necrosis factor receptor 1 (sTNFR1)の上昇があり、炎症の存在を示唆する。一方、髄液ではIL-10、sTNFR1の上昇を伴わないIL-6上昇がみられた。本症の髄液IL-6値は熱性けいれん重積群より高値であり、文献的考察を含め、けいれん重積による神経細胞傷害に対する脳保護反応によるものと示唆された。

### 2) MMP-9、TIMP-1解析

けいれん重積を伴った3群では共通して血清MMP-9は高値であり、MMP-9高値はけいれん重積に関与していると考えられる。一方血清TIMP-1値は本症でのみ有意に低値だった。原因として、けいれん重積によるMMP-9過剰状態にもかかわらず宿主側のTIMP-1産生能が不十分であること、もしくは過剰なMMP-9活性抑制のためTIMP-1が著しく速く消費され、結果的にTIMP-1濃度が低下することなどが考えられた。

### 3) neurofilament解析

近年NF測定は、成人領域で微細な神経傷害の有無の診断、治療効果判定、予後予測、鑑別診断に有用であることが報告されている。しかしながら、小児領域での報告は、少ない(Blennow et al. 2001; Kristjánsdóttir et al. 2001; Osterlundh et al. 2008; Matsushige et al. 2008)。けいれん重積型急性脳症において2~7病日より血清NF-H値が上昇したことは本症による神経細胞傷害を示唆した。preliminaryな研究であるが血清NF-H値は神経細胞傷害の程度を反映することが示唆された。またsecond seizure発症前の血清NF-H値の測定で本症発症を予測しうる可能性が示唆された。

## E. 結論

けいれん重積型急性脳症ではけいれん重積自体による脳障害とそれに対する脳保護反応が惹起され、血液脳関門機能傷害も併存することが示唆された。また発症早期より神経細胞傷害を来すことが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ishizu T, Minohara M, Ichiyama T, Kira R, Tanaka M, Osoegawa M, Hara T, Furukawa S, Kira J. CSF cytokine and chemokine