

- profiles in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2006; 175: 52-58.
2. 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* 2006; 54: 2314-2320.
  3. Makata H, Ichiyama T, Uchi R, Takekawa T, Matsubara T, Furukawa S. Anti-inflammatory effect of intravenous immunoglobulin in comparison with dexamethasone in vitro: implication for treatment of Kawasaki disease. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006; 373: 325-332.
  4. Nagafuchi M, Nagafuchi Y, Sato R, Imaizumi T, Ayabe M, Shoji H, Ichiyama T. Adult meningism and viral meningitis, 1997-2004: clinical data and cerebrospinal fluid cytokines. *Internal Med* 2006; 45: 1209-1212.
  5. 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* 2007; 252: 45-48.
  6. Mizuguchi M, Yamanouchi H, Ichiyama T, Shiomi M. Acute encephalopathy associated with influenza and other viral infections. *Acta Neurol Scand* 2007; 115: 45-56.
  7. Ichiyama T, Kajimoto M, Hasegawa M, Hashimoto K, Matsubara T, Furukawa S. Cysteinyl leukotrienes enhance TNF- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-9 in human monocytes/macrophages. *Clin Exp Allergy* 2007; 37: 608-614.
  8. Ichiyama T, Morishima T, Kajimoto M, Matsushige T, Matsubara T, Furukawa S. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26: 542-544.
  9. Hotta N, Ichiyama T, Shiraishi M, Takekawa T, Matsubara T, Furukawa S. Nuclear factor- $\kappa$ B activation in peripheral blood mononuclear cells of children with sepsis. *Crit Care Med* 2007; 35: 2395-2401.
  10. Ichiyama T, Suenaga N, Kajimoto M, Tohyama J, Isumi H, Kubota M, Mori M, Furukawa S. Serum and CSF levels of cytokines in acute encephalopathy following prolonged febrile seizures. *Brain Dev* 2008; 30: 47-52.
  11. Ichiyama T, Matsushige T, Kajimoto M, Tomochika K, Matsubara T, Furukawa S. Dexamethasone decreases cerebrospinal fluid soluble tumor necrosis factor receptor 1 levels in bacterial meningitis. *Brain Dev* 2008; 30: 95-99.
  12. Suenaga N, Ichiyama T, Kubota M, Isumi H, Tohyama J, Furukawa S. Roles of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in acute encephalopathy following prolonged febrile seizures. *J Neurol Sci* 2008; 266: 126-130.
  13. Asada K, Ichiyama T, Okuda Y, Okino F, Hashimoto K, Nishikawa M, Furukawa S. Cytokine levels in sputum of patients with tracheostomy and profound multiple disabilities. *Cytokine* 2008; 42: 71-76.
  14. Ichiyama T, Matsushige T, Siba P, Suarkia D, Takasu T, Miki K, Furukawa S. Cerebrospinal fluid levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in subacute sclerosing panencephalitis. *J Infect* 2008; 56: 376-380.
  15. Shiraishi M, Ichiyama T, Matsushige T, Iwaki T, Iyoda K, Fukuda K, Makata H, Matsubara T, Furukawa S. Soluble tumor necrosis factor receptor 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hemolytic uremic syndrome with encephalopathy. *J Neuroimmunol* 2008; 196: 147-152.
  16. Nagao T, Morishima T, Kimura H, Yokota S, Yamashita N, Ichiyama T, Kurihara M, Miyazaki C, Okabe N. Prognostic factors in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 384-389.
  17. Ichiyama T, Hasegawa M, Hashimoto K, Matsushige T, Hirano R, Furukawa S. Cysteinyl leukotrienes induce macrophage inflammatory protein-1 in human monocytes/macrophages. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 148: 147-153.
  18. Ichiyama T, Shoji H, Takahashi Y,

Matsushige T, Kajimoto M, Inuzuka T, Furukawa S. Cerebrospinal fluid levels of cytokines in non-herpetic acute limbic encephalitis: comparison with herpes simplex encephalitis. *Cytokine* 2008; 44: 149-153.

19. Fukano R, Matsubara T, Inoue T, Gondo T, Ichiyama T, Furukawa S. Time lag between the increase of IL-6 with fever and NF- $\kappa$ B activation in the peripheral blood in inflammatory myofibroblastic tumor. *Cytokine* 2008; 44: 293-297.

20. Matsushige T, Ichiyama T, Anlar B, Tohyama J, Nomura K, Yamashita Y, Furukawa S. CSF neurofilament and soluble TNF receptor 1 levels in subacute sclerosing panencephalitis. *J Neuroimmunol* 2008; 205:155-159.

21. Honda R, Ichiyama T, Sunagawa S, Maeba S, Hasegawa K, Furukawa S. Inhaled corticosteroid therapy reduces cytokine levels in sputum from very preterm infants with chronic lung disease. *Acta Paediatr* 2009; 98: 118-122.

22. Tomochika K, Ichiyama T, Shimogori H, Sugahara K, Yamashita H, Furukawa S. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection-associated acute otitis media. *Pediatr Int* in press

23. Ichiyama T, Ito Y, Kubota M, Yamazaki T, Nakamura K, Susumu F. Serum and cerebrospinal fluid levels of cytokines in human herpesvirus-6 encephalopathy. *Brain Dev* in press

24. Sunagawa S, Ichiyama T, Honda R, Fukunaga S, Maeba S, Furukawa S. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in perinatal asphyxia. *Brain Dev* in press

25. Motoyama M, Ichiyama T, Matsushige T, Kajimoto M, Shiraishi M, Furukawa S. Clinical characteristics of benign convulsions with rotavirus gastroenteritis. *J Child Neurol* in press

26. Ichiyama T, Kajimoto M, Matsushige T, Shiraishi M, Suzuki Y, Furukawa S. Mononuclear cell subpopulations in CSF and blood of children with bacterial meningitis. *J Infect* in press

27. Hashimoto K, Ichiyama T, Hasegawa M, Hasegawa S, Matsubara T, Furukawa S. Cysteinyl leukotrienes induce monocyte chemoattractant protein-1 in human

monocyte/macrophages via maitogen activated protein kinase and NF- $\kappa$ B pathways. *Int Arch Allergy Immunol* in press

28. Kajimoto M, Ichiyama T, Ueno Y, Shiraishi M, Hasegawa M, Furukawa S. Enhancement of activated  $\beta$ 1-integrin expression by prostaglandin E2 via EP receptors in isolated human coronary arterial endothelial cells: implication for the treatment of Kawasaki disease. *Inflamm Res* in press

29. Suzuki Y, Ichiyama T, Ohsaki A, Hasegawa S, Shiraishi M, Furukawa S. Anti-inflammatory effect of  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human coronary arterial endothelial cells: implication for treatment of Kawasaki disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* in press

30. Fukunaga S, Ichiyama T, Maeba S, Okuda M, Nakata M, Sugino N, Furukawa S. MMP-9 and TIMP-1 in the cord blood of premature infants developing BPD. *Pediatr Pulmonol* in press

31. Kawahara N, Hasegawa S, Hashimoto K, Matsubara T, Ichiyama T, Furukawa S. Characteristics of asthma attack with long-term management for bronchial asthma. *Pediatr Int* in press

## 2. 学会発表

1. 市山高志、梶本まどか、末永尚子、前場進治、松原知代、古川 漸. 急性散在性脳脊髄炎における blood-brain-barrier 機能. 第 109 回日本小児科学会学術集会. 金沢. 2006. 4. 21-23
2. 市山高志. シンポジウム. ロイコトリエン受容体拮抗薬の新しい側面. 第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 東京. 2006. 5. 30-6. 1
3. 市山高志、末永尚子、梶本まどか、吉良龍太郎、原 寿郎、遠山 潤、松原知代、古川 漸. 亜急性硬化性全脳炎における blood-brain-barrier 機能. 第 47 回日本小児神経学会. 浦安. 2006. 6. 1-3
4. 市山高志、梶本まどか、末永尚子、松原知代、古川 漸. インフルエンザ脳症における血清 MMP-9 および TIMP-1 の動態. 第 11 回日本神経感染症学会. 三重. 2006. 10. 13-14
5. 市山高志. シンポジウム. 免疫病態からみたインフルエンザ脳症診療のポイント. 第 58 回中国四国小児科学会. 宇部.

2006. 10. 21-22
6. 市山高志、長谷川真成、真方浩行、松原知代、古川 漸. 単球/マクロファージの cysteinyl leukotriene 受容体機能—TNF- $\alpha$ による MMP-9 産生に対する影響—. 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京. 2006. 11. 2-4
7. 市山高志、梶本まどか、末永尚子、松原知代、古川 漸. インフルエンザ脳症における血清 MMP-9 および TIMP-1 の動態. 第 38 回日本小児感染症学会. 高知. 2006. 11. 10-11
8. 市山高志、長谷川真成、真方浩行、松原知代、古川 漸. 単球/マクロファージの cysteinyl leukotriene 受容体機能—TNF- $\alpha$ による MMP-9 産生に対する影響—. 第 43 回日本小児アレルギー学会. 千葉. 2006. 11. 25-26
9. 市山高志、梶本まどか、末永尚子、友近喜代子、松原知代、古川 漸. 細菌性髄膜炎におけるデキサメサゾン療法時の髄液中 soluble TNF receptor 1 の動態. 第 10 回中国地区小児免疫薬物療法研究会. 広島. 2007. 3. 10
10. 市山高志. 教育講演. 小児神経疾患とサイトカイン. 第 49 回日本小児神経学会. 大阪. 2007. 7. 5
11. 市山高志. シンポジウム. サイトカインからみたけいれん重積型急性脳症の病態. 第 49 回日本小児神経学会. 大阪. 2007. 7. 5
12. 市山高志. シンポジウム. 検体検査による発達障害の鑑別診断. 第 42 回日本発達障害学会. 山口. 2007. 8. 5
13. 市山高志. シンポジウム. 臨床免疫からみた SSPE. 第 12 回日本神経感染症学会. 福岡. 2007. 10. 12
14. 市山高志、松重武志、梶本まどか、友近喜代子、松原知代、古川 漸. 細菌性髄膜炎における dexamethasone 療法時の髄液中 soluble TNF receptor 1 と interleukin-6 の動態. 第 39 回日本小児感染症学会. 横浜. 2007. 11. 10
15. 市山高志、末永尚子、久保田雅也、伊住浩史、松重武志、梶本まどか、古川 漸. 熱性痙攣重積における血清 MMP-9 および TIMP-1 の検討. 第 2 回日本てんかん学会中国四国地方会. 広島. 2008. 2. 23
16. 市山高志、長谷川真成、橋本邦生、前場進治、松原知代、古川 漸. 気管支喘息における単球/マクロファージのロイコトリエン受容体機能. 第 11 回中国地区小児免疫薬物療法研究会. 広島. 2008. 3. 1
17. Ichiyama T, Makata M, Uchi R, Takekawa T, Matsubara T, Furukawa S. Anti-inflammatory effect of intravenous immunoglobulin in comparison with dexamethasone in vitro: implication for treatment of Kawasaki disease. The 9th International Kawasaki Disease Symposium. Taipei, Taiwan. 2008. 4. 10-12
18. 市山高志、久保田雅也、伊藤嘉規、梶本まどか、松重武志、古川漸. Human herpesvirus-6 脳症における血清および髄液サイトカイン解析. 第 111 回日本小児科学会学術集会. 東京. 2008. 4. 25-27
19. 市山高志、松重武志、梶本まどか、伊予田邦昭、古川漸. 溶血性尿毒症症候群 (HUS) 脳症におけるサイトカインおよび MMP-9、TIMP-1 解析. 第 50 回日本小児神経学会. 東京. 2008. 5. 28-31
20. 市山高志、庄司紘史、高橋幸利、松重武志、梶本まどか、古川漸. 非ヘルペス性辺縁系脳炎の髄液サイトカイン解析: 単純ヘルペス脳炎との比較検討. 第 13 回日本神経感染症学会. 東京. 2008. 10. 10-11
21. 市山高志、松重武志、梶本まどか、友近喜代子、白石昌弘、古川 漸. 細菌性髄膜炎における髄液および血液中単核球サブセットの解析. 第 40 回日本小児感染症学会. 名古屋. 2008. 11. 15-16
22. 市山高志. 特別講演. 感染症に伴う小児神経疾患トピックス. 第 113 回日本小児科学会山口地方会. 宇部. 2008. 12. 7
23. 市山高志、橋本邦生、長谷川真成、平野玲司、長谷川俊史、古川漸. シンポジウム. 単球/マクロファージにおける cysteinyl leukotriene による MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$  産生とその制御. 第 45 回日本小児アレルギー学会. 横浜. 2008. 12. 13-14

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

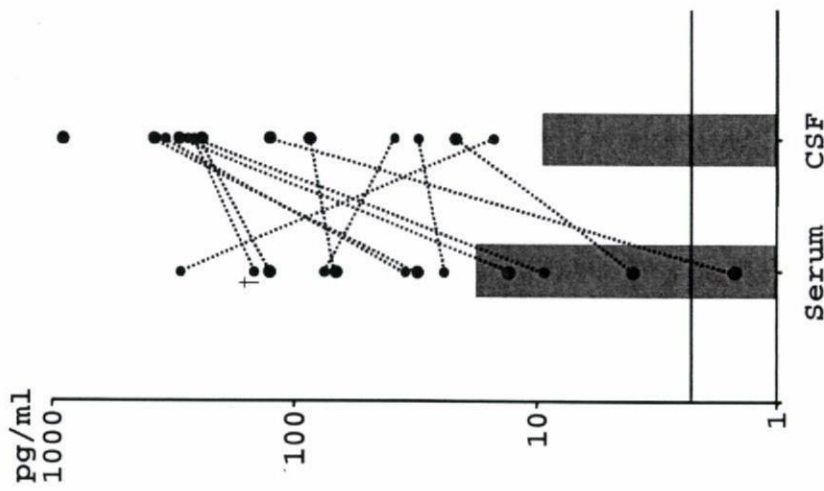
##### 2. 実用新案登録

なし

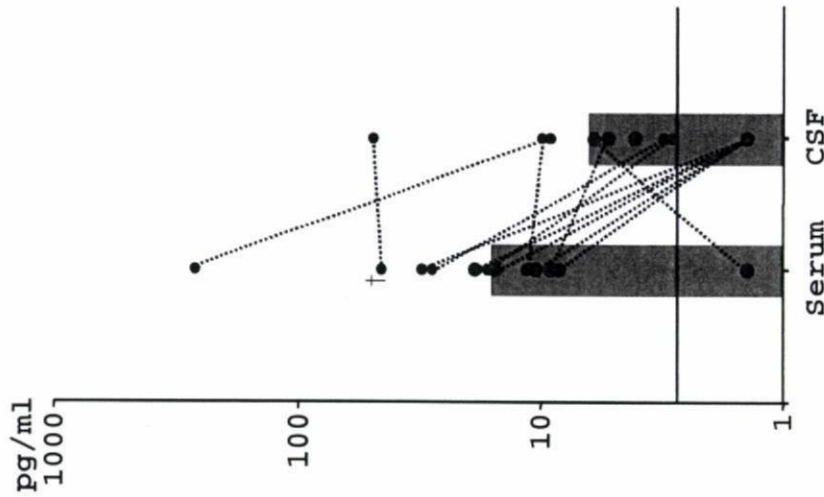
##### 3. その他

なし

IL-6



IL-10



sTNFR1

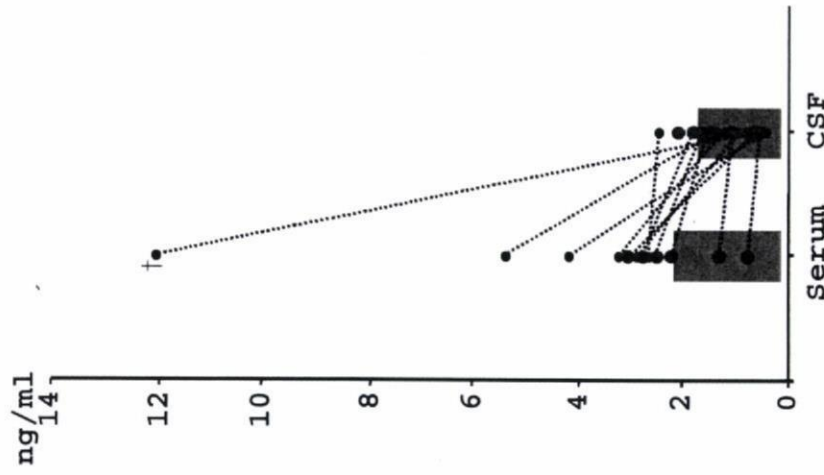


図1. けいれん重積型急性脳症の血清および髄液中IL-6、IL-10、sTNFR1値.

†: 死亡例

■: 正常範囲

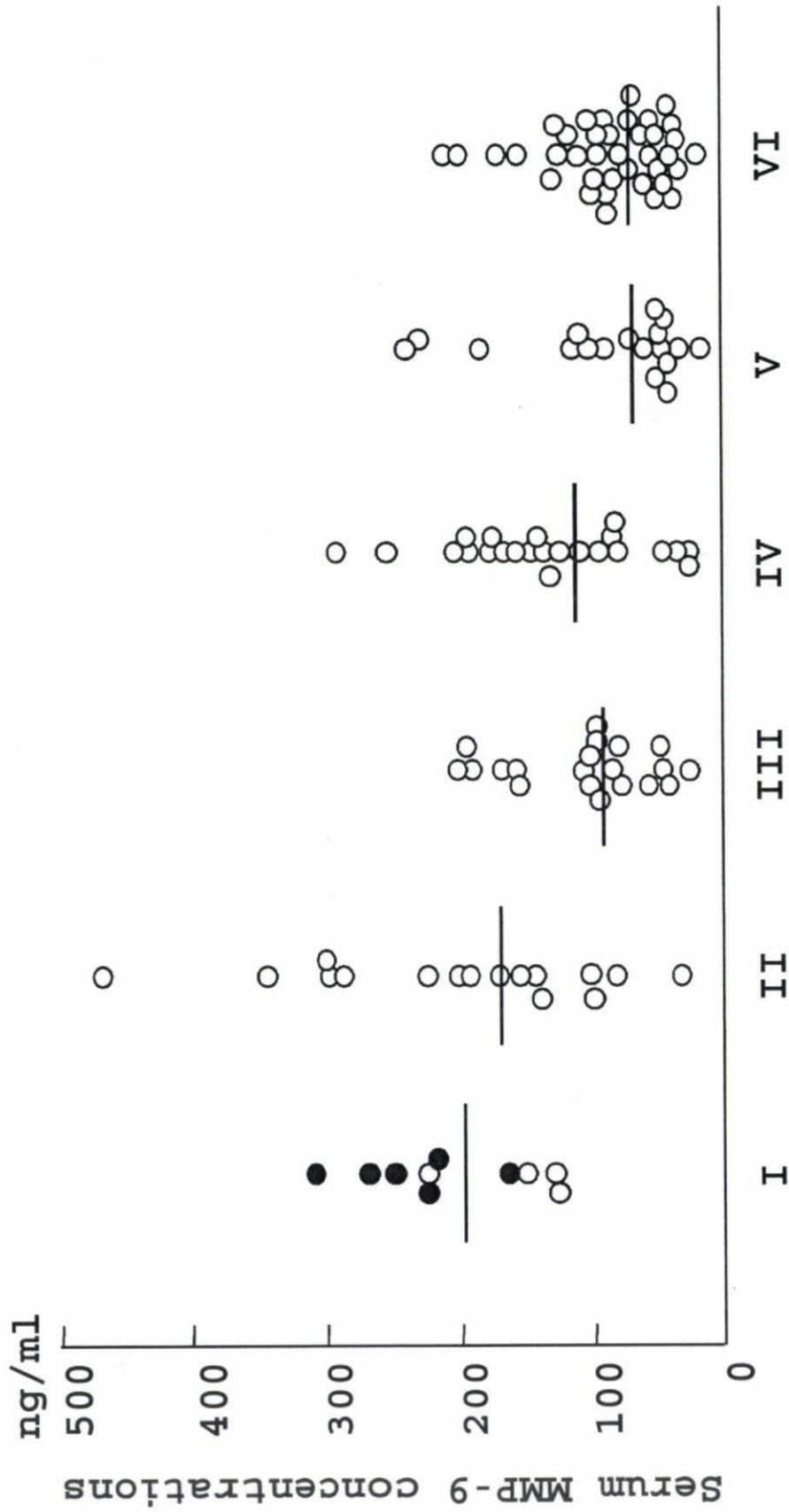


図2. 血清MMP-9値.

I, けいれん重積型急性脳症; II, 熱性けいれん重積; III 単純型熱性けいれん;  
 IV, てんかん重積状態; V, West syndrome; VI, コントロール

●: 重度後遺症例

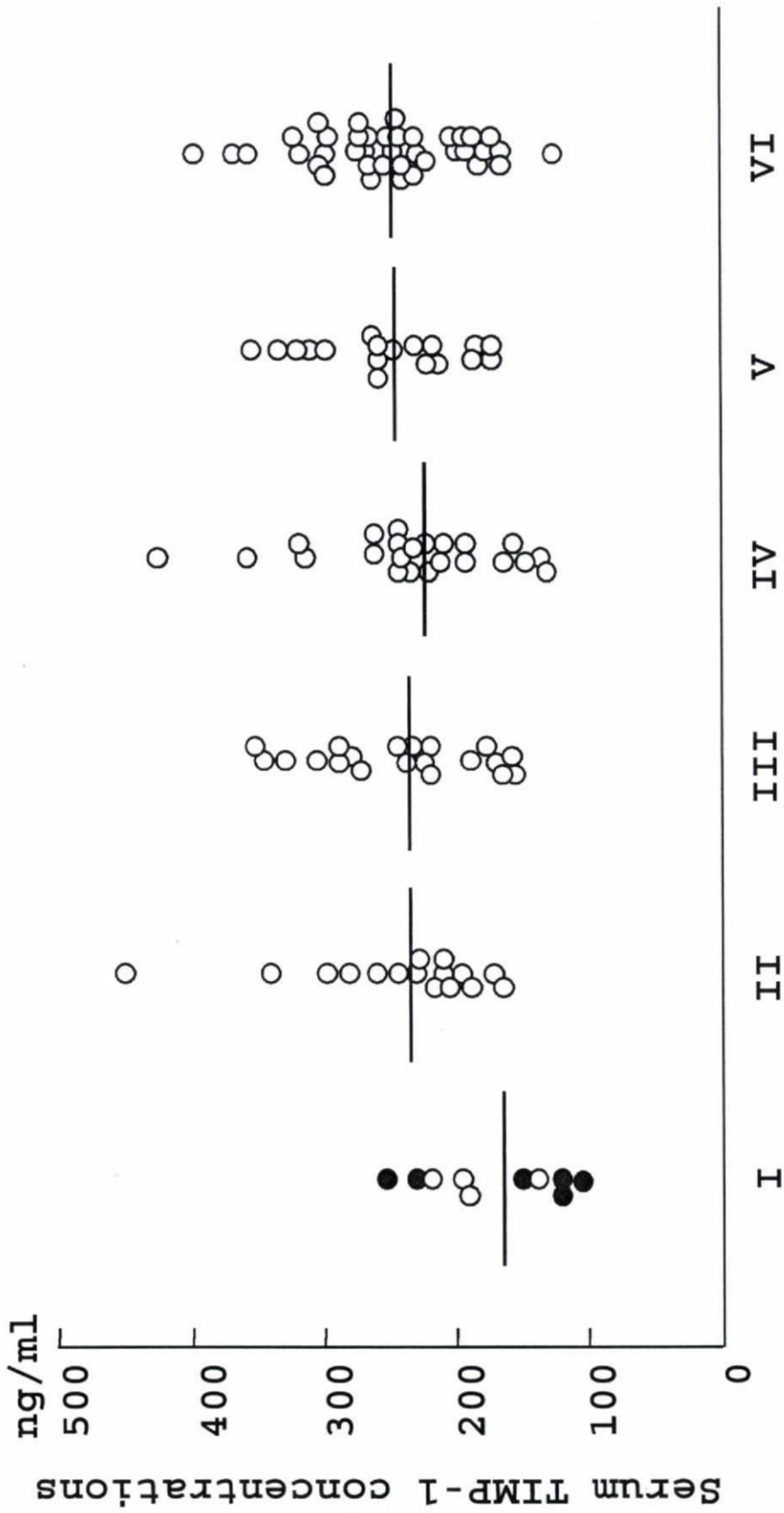


図3. 血清TIMP-1値.

I, けいれん重積型急性脳症; II, 熱性けいれん重積; III 単純型熱性けいれん;  
 IV, てんかん重積状態; V, West syndrome; VI, コントロール

●: 重度後遺症例

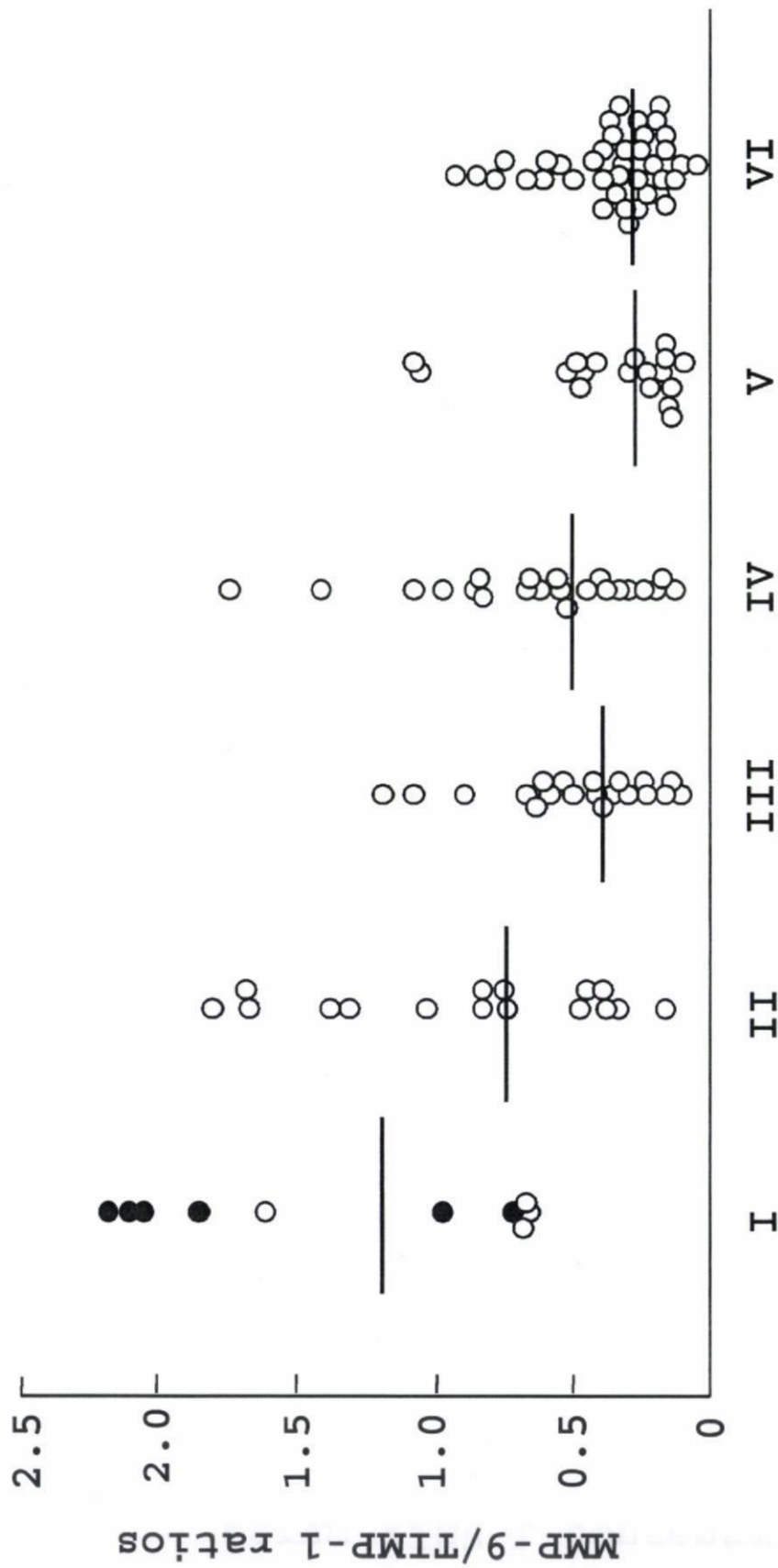


図4. 血清MMP-9/TIMP-1比.

I, けいれん重積型急性脳症; II, 熱性けいれん重積; III 単純型熱性けいれん;  
 IV, てんかん重積状態; V, West syndrome; VI, コントロール

●: 重度後遺症例

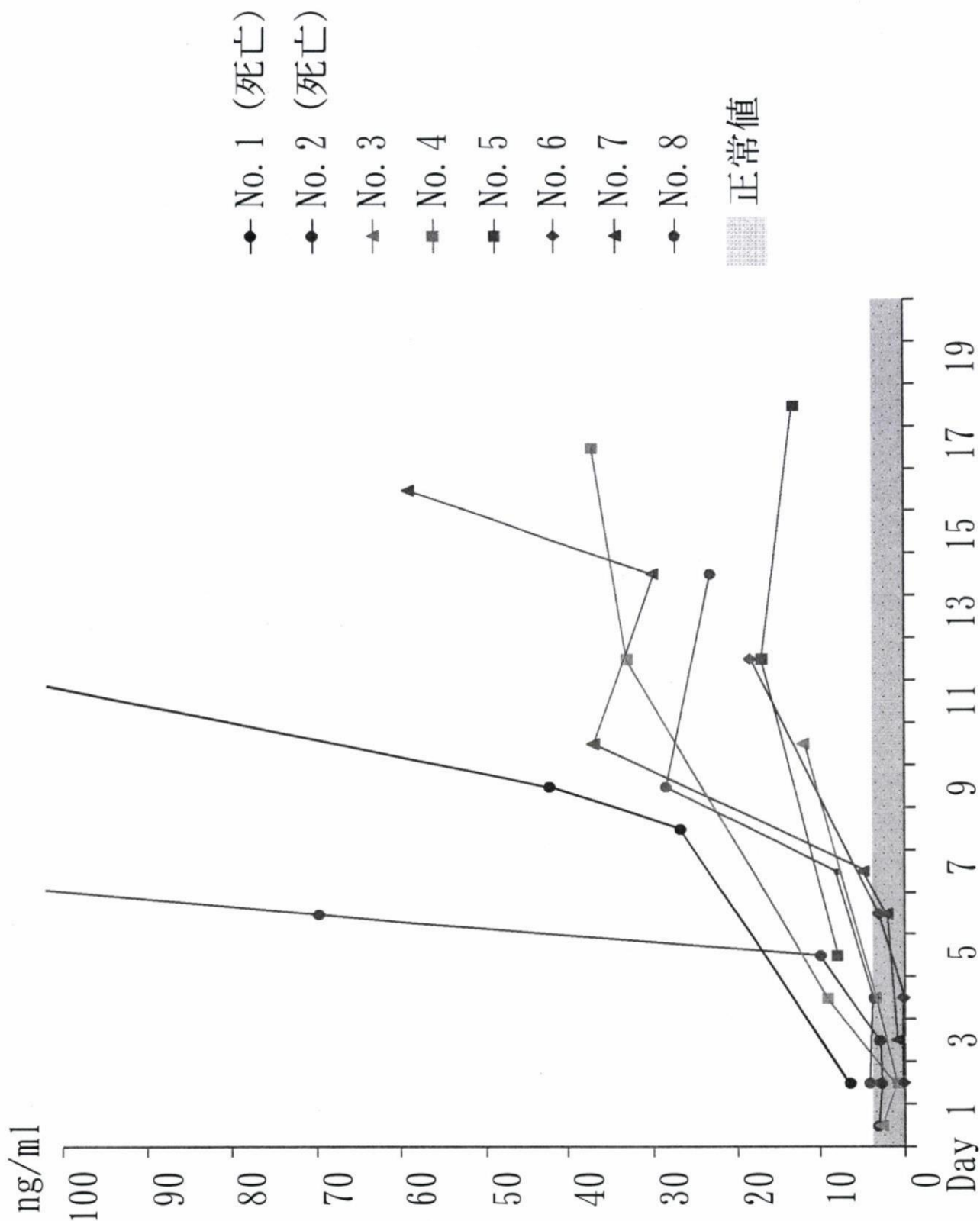


図5. けいれん重積型急性脳症の血清neurofilament値



## 「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」

研究分担者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所感染病理部）

**研究要旨：**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。更にインフルエンザ脳症と同様のメカニズムで発症すると考えられるロタウイルス感染に伴った脳症により死亡した患者の病理解剖検体を病理学的に解析しその病態を調べた。

### A. 研究目的

乳幼児がインフルエンザ罹患後に脳症を併発し急速な経過で死亡する例がインフルエンザ脳症とされている。その病因にはインフルエンザウイルス感染への過剰な免疫応答が引き起こすサイトカインストームの関与が強く示唆されている。しかし現在のところこの事を動物モデルを用いて検証する方法が確立されていない。そこで本研究においてヒトでの病態と高サイトカイン血症との関連が示唆されている高病原性鳥インフルエンザを用いマウスへの感染実験を行い、各種サイトカインの発現を調べ病態との関連を比較し更に、予防法として免疫応答の制御によるウイルス感染予防とサイトカインの発現との関連や感染防御を目指した経鼻ワクチンの効果を評価する。また同様のメカニズムで発症する他のウイルス感染に伴った脳症の例を病理学的に検討し

インフルエンザ脳症の発症機構の解明を目的とする。

### B. 研究方法

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 Mouse Cytokine multi-plex antibody bead kit (Biosource)を用いて測定した。

また感染防御ワクチンの検討には 2005/2006 年シーズンのワクチン株である A/New Caledonia (H1N1), A/New York (H3N2), B/Shanghai のそれぞれの株を用いたスプリットワクチンを合成二本鎖 RNA と経鼻接種しその後の血清および鼻腔洗浄液

中の抗体価を ELISA 法で測定した。またロタウイルス関連脳症の人体例については剖検で得られた検体をホルマリン固定後 HE 染色および抗ロタウイルス抗体を用いた免疫化学染色法を用いて染色し病理学的に解析した。

### C. 研究結果

Chitin microparticles を投与した群、及び非投与群の BALB/c マウスに高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Vietnam/1194/04(H5N1) 100pfu 及び 1000pfu を感染させ生存率の違いを比較を行った。1000pfu 感染群においては Chitin microparticles 投与、非投与に関わらず 13 日までに全てのマウスが死亡した。一方 100pfu 感染群では Chitin microparticles 非投与群の致死率が 40% だったのに対し非投与群では 80% と改善がみられた。

Chitin microparticles による高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)の感染防御と増殖抑制効果とサイトカイン産生を比較した。感染後の血中サイトカイン価を経時的に測定した。測定した FGF basic, GM-CSF, IFN-g, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IP-10, KC, MCP-1, MIG, MIP-1 $\alpha$ , TNF-1, VEGF のうち IL-6 及び IP10 の値が CMP 投与群において非投与群と比較し低かった。

ヒトでの安全性が確認されている合成二本鎖 RNA polyI:polyC12U を粘膜アジュバントに用い A/New Caledonia (H1N1), A/New York (H3N2), B/Shanghai 株の 3 価スプリットワクチンを皮下接種及び経鼻投与した

時のそれぞれの株に対する特異的な IgA 抗体及び IgG 抗体応答を調べた。経鼻接種したマウスの鼻腔洗浄液中にはそれぞれのウイルス株に対する分泌型 IgA 抗体が高いレベルで検出された。アジュバントを含まない群や皮下接種群においてはこれらの IgA 抗体の誘導は認められなかった。それぞれのワクチン株に対する血清中の IgG 抗体価はワクチンと polyI:polyC12U の経鼻接種群と皮下接種群において有意に上昇が認められた。アジュバント無しの経鼻接種群やアジュバントのみの投与群においては血中の IgG 抗体応答はみられなかった。

3 価ワクチンを polyI:polyC12U とともに経鼻接種した群のマウスより得られた T 細胞は 3 価ワクチンの構成抗原の量依存的に IFN- $\gamma$  を産生した。しかし 3 価ワクチン単独や非免疫群の T 細胞では抗原刺激により IFN- $\gamma$  の産生はみられなかった。

ロタウイルス関連脳症の人体例の病理組織学的検査では腸管は上皮が剥離し、腸管上皮細胞、上皮マクロファージ、粘膜下層リンパ濾胞のマクロファージにロタウイルス抗原が免疫組織化学染色により検出された。しかし脳組織においては脳、小脳ともにロタウイルス抗原は認められず、炎症細胞浸潤も認められなかった。脳内の血管周囲蛋白漏出は見られず、脳の浮腫が顕著であった。

RT-PCR を用いロタウイルスゲノム RNA の検出を行ったところ腸管検体からゲノム RNA が同定された。脳検体においては脳小脳ともにウイルスゲノムが検出されなかった。

#### D. 考察

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。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。ウイルス感染に対する免疫を調節する物質である Chitin microparticle 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 Chitin microparticles 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。

ワクチン接種によりインフルエンザウイルスの感染自身を防御する事ができれば脳症の発症も防げると考えられる。しかし現在の皮下接種によるインフルエンザワクチンは感染そのものを防ぐ事はできない。感染防御の為には感染部位である呼吸粘膜上への分泌型抗体の誘導が必要である。今回の結果は 3 価のスプリットワクチンの経鼻接種により 3 株全ての株に対する粘膜誘導が得られた事が示され、季節性インフルエンザの感染阻止に繋がる方法として期待される。

インフルエンザ脳症の類似疾患であるロタウイルス感染に伴った脳症の剖検例につい

て病理学的、免疫組織化学的に解析を行った。本症例は重症の下痢症、嘔吐の後に神経症状を呈し死亡した症例である。本症例の神経所見は脳症が死因である可能性を示唆する。ウイルス抗原は大腸の腸管上皮細胞や粘膜下リンパ装置のマクロファージに陽性に染まりまた PCR によるウイルスゲノム検出において腸管組織でゲノム RNA が陽性である。一方脳検体では大脳及び小脳共に免疫組織化学および PCR によるウイルスゲノムの検出では陰性となっている。この点はインフルエンザ脳症と同様である。インフルエンザ脳症の肝臓組織においてしばしば小脂肪滴がみられるが本症例においても肝細胞内に小脂肪滴が認められた。ウイルス感染に伴ったサイトカインの過剰産生による病態と考えられる。

#### E. 結論

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 Chitin microparticles 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。マウスモデルを用いて 3 価の季節性インフルエンザスプリットワクチンを合成二本鎖 RNA と共に経鼻接種する事により 3 株全てに対する粘膜免疫の誘導が可能である事が示された。様々な流行株に対する感染防御効果が高い事が期待され、季節性インフルエンザの感染防御によりインフルエンザ脳症の発症予防にもつながる予防法である事が期待される。

ウイルス感染関連脳症例としてロタウイルス感染に伴う脳症の剖検例について病理学的、免疫組織化学染色を用いて解析を行

った。ロタウイルス感染が中枢神経では見られず、感染は腸管上皮にのみに認められた。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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]
3. Hasegawa H\*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert Review of Vaccines*, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.
4. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H\*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol*. 2007 Jun;79(6):811-819
5. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H\* Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes and Infection* 2007 Sep;9(11):1333-40.
6. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol*. 2008 Jun;172(6):1625-37.
7. Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H\*, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection

- against influenza viruses.  
**Mucosal Immunol.** 2008  
 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5.  
 \*corresponding author
8. Ichinohe T, Iwasaki A, Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines. **Expert Rev Vaccines.** 2008 Nov;7(9):1435-45.
  9. Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. **Therapeutic and Clinical Risk Management**, in press.
  10. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. **J Infect Dis.** in press.
2. 学会発表
1. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、川口晶、岩田奈緒子、須崎百合子、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 カニクイザルを用いた高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) 経鼻ワクチンによる感染防御。第 54 回日本ウイルス学会総会 (2006 年 11 月名古屋)。
  2. 一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 自然免疫による高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) の感染抑制効果。第 54 回日本ウイルス学会総会 (2006 年 11 月名古屋)。
  3. 一戸猛志、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討。第 54 回日本ウイルス学会総会 (2006 年 11 月名古屋)。
  4. 一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 高病原性鳥インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討。第 10 回日本ワクチン学会学術集会 (2006 年 10 月大阪)
  5. Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall WW, Hasegawa H, Adult T cell leukemia/lymphoma(ATLL): Exploitation of transgenic mouse model to understand disease pathogenesis and for the development of rational therapeutics. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology 21th-25<sup>th</sup> May 2008 Hakone
  6. 長谷川秀樹、一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅 2005/2006 シーズナルインフルエンザワクチンの経鼻接種による高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 感染の交叉防御効果の検討 第 11 回日本ワクチン学会学術集会(2007 年 11 月横浜)

7. 長谷川秀樹、一戸猛志、相内 章、田村 慎一、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、佐多徹太郎:キノコ類菌糸体抽出物を用いた経鼻粘膜ワクチンによる粘膜免疫増強作用とインフルエンザウイルスの感染防御。第56回日本ウイルス学会総会(岡山)2008年10月
8. 相内 章、一戸猛志、田村慎一、倉田 毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹:経鼻ワクチンにおけるDectin-1リガンドによるアジュバント効果の亢進。第56回日本ウイルス学会総会(岡山)2008年10月
9. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川 茂、佐藤由子、佐多徹太郎:SARS-CoV感染動物モデルを用いたSARS発症機序の解明と治療法の検討。第56回日本ウイルス学会総会(岡山)2008年10月
10. 長谷川秀樹、一戸猛志、網 康至、永田典代、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、佐多徹太郎:経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンのカニクイザルを用いた効果検討。第12回日本ワクチン学会学術集会(熊本)2008年11月

#### 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

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 18-20 年度分担研究報告書

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

研究分担者 布井博幸<sup>1)</sup>（宮崎大学医学部小児科 教授）

研究協力者 弓削昭彦<sup>2)</sup>、水上智之<sup>1)</sup>、高木純一<sup>1)</sup>、西口俊朗<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 宮崎大学医学部小児科, <sup>2)</sup> 県立宮崎病院小児科

**研究要旨**

インフルエンザ脳症患者で、血中 cytochrome c が上昇していることを見だし、高サイトカイン血症による全身臓器の apoptosis が病態の中核をなす事を提案した。平成 18 年宮崎における急性脳症の現状を基に、その原因の一つとして TLRs, と RIG-I の網羅的塩基配列検索を行い、TLR3 変異 (F303S) を報告した。翌年 Casanova らは家族性単純ヘルペス脳炎の症例で TLR3 変異 (P554S) を報告している。しかし、その後 TLR3 KO mice などの実験からまだ病因としての位置づけは明らかではない。平成 19-20 年には、血球でも各臓器と同様にアポトーシスが起きているのではないかと考え、これまで報告されていた小児急性リンパ性白血病でよく検出される TEB (ETV=TEL)/AML1 (RUX1) (12:21) 等 3 種類の染色体転座についても検出を試みたが、検出出来ず、検体数を増やしての検討が必要である。一方ウイルス性急性脳症で 17 種類のサイトカイン測定を行い、血中と髄液中でのサイトカインの産生機構が異なっていること明らかにした。また H1N1 および H5N1 インフルエンザウイルス側の病原性の文献的検討も行い、この 3 年間で種々の方面からインフルエンザ脳症の成因に関する検討を行なった。

**A. 研究目的**

インフルエンザ脳症を含むウイルス性重症感染症では、急速に症状が起こり、死に至る。インフルエンザ脳症患者の病態解析から、何らかの原因で細胞死（アポトーシス）が起こっていること、また、アポトーシスを誘導する原因としてサイトカインの上昇がほぼ共通していることなどを明らかになってきた。この班研究では、インフルエンザ脳症または重症感染症の病因に関して、多方面からのでも同様なことが起こっているか検討し、小児における急性脳炎・脳症の病態を明らかにすることを目的としている。

**B. 研究方法**

1) 宮崎大学付属病院および宮崎県立宮崎病院で急性脳症およびインフルエンザ心筋炎と診断された患者を対象とし、臨床的解析を行った。

2) インフルエンザ脳症患者でインフォームドコンセントが得られた 5 名について TLRs と RIG-I の塩基配列決定を行い、変異の有無を確かめた。同時に変異を in vitro の系で機能解析を行った。続いて報告された TLR3 変異とノックアウトマウスでのインフルエンザ感染実験結果との相違を論文で考察した

3) 急性脳症を含む、重症感染症を起こした症例で17種類のサイトカインの血中および髄液内濃度をBio-plexにて測定し、その相違を比較した。

4) これまで報告されていた小児急性リンパ性白血病でよく検出されるTEB (ETV=TEL)/AML1 (RUX1) (12:21)等3種類の染色体転座についても検出を試みた。

5) インフルエンザウイルス側の病原性および生体側のインフルエンザ感染防御機構に監視の文献的検討を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析には十分なインフォームドコンセントを得て行った。

#### C. D. 研究結果と考察

1) 宮崎県の県央部では平成17年から19年までに26名の急性脳炎脳症患者を経験した。インフルエンザ脳症は9例で、HHV-6 脳炎脳症5例、ロタウイルス感染2例、その他RSウイルス感染と帯状疱疹による患者が各々1例、その他原因が特定できなかった症例が8例であった。基礎疾患として、一例はB細胞欠損型の免疫不全で、1例のインフルエンザ脳症症例ではTLR3変異を持った症例であった(1)。男女各々15名、11名で、後遺症なし17例、精神発達遅延5例、てんかん1例、死亡2例であった。死亡例はRSウイルスおよびRotaウイルスによる急性脳症であった。

インフルエンザ脳症症例に関しては9例全例メチルプレドニゾロン・パルス療法が施行され、7例で非常に良好な結果を得ている。しかし、2例のうち1例は両側肺野の浸潤影を示しARDS様の症状とともに血小板減少と、右側後頭葉の血流低下を伴い、重度の障害を残し、現在もリハビリテーション

に励んでいる。もう一例はTLR3変異を示した症例で、半年後には言語障害、高次機能障害も回復し、日常生活が送られている(1)。インフルエンザ感染後に突然死として報告されて事例が1例あった。

2) 我々が平成18年に報告したTLR3変異(F303S)を、平成19年にCasanovaらが報告した単純ヘルペス脳炎を起こしたTLR3変異(P554S)(2)の両者の違いについて検討した。我々が報告したF303S変異はTLR3のLRR12に、Casanovaらの報告したP554S変異はLRR20にあり、各々TLR3の重要なドメインに位置していた(3)。F303S変異ではTLR3に共通した刺激であるpoly I:Cでの反応性が低下しているのに対し、P554S変異ではHerpes Simplex特異的に反応が低下するという生物活性を示していた。その後TLR3ノックアウトマウスへのインフルエンザ感染実験がなされ、野生型より軽症の経過をたどることが明らかとなっていた(4)。

3) 11名のインフルエンザ感染症が確認された患者血液からmRNAを抽出し、第一および第二PCRまで行ったが結果、小児急性リンパ性白血病でよく検出されるTEB (ETV=TEL)/AML1 (RUX1) (12:21)、BCR/ABL (9:22)、と小児骨髄白血病でよく検出されるAML1 / MTG8 (EVI-1) (8:21)の癒合遺伝子はいずれも検出出来なかった(詳しくは本年度報告)。

4) Bio-plexによる17種類のサイトカインの血中濃度および髄液中を各種疾患で比較した。

インフルエンザ脳症症例では病初期にはIL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ を中心としたサイトカインの上昇が認められていた。同じインフルエンザ感染でも心筋炎を起こした症例ではIL-6、-8が主体であった。他のウイル



スによる急性脳症では血中では IL-6, -8 と MIP-1b が上昇していたが、髄液中では IL-8, GM-CSF と MCP-1 が血中より上昇し、血中と髄液中でのサイトカインの産生機構が異なっているのではないかとまた脳組織でのサイトカイン産生細胞に違いがあるのではないかと考えられている。

5) ウイルス側の病原性に関して、これまで報告されている H5N1 ウイルスの対象物として、H5N1 ウイルスがコードする 8 遺伝子とその翻訳物である 10 蛋白に加え、最近 PB1 遺伝子のフレームがずれて翻訳されている第 11 番目の PB1-F2 蛋白がある。各々の蛋白について病因となる遺伝子と、その塩基配列を持った Reversegenetic な方法で作成されたウイルスを用いて、動物実験が繰り返されており、その結果に注目が集まっている。

Haemoagglutinin (HA) は、現在ベトナムや中国のヒトから分離された H5N1 インフルエンザウイルスにはそのどちらにも結合出来る変異が報告されているが、この結合能だけでは大規模な感染は起こらないのかもしれないと考察されている。また細胞への感染に関係する HA 蛋白の酵素感受性も病原性と関連している。

PB2 タンパク質の 627 アミノ酸変異がウイルスの増殖のために重要で、病原性に関わっていると考えられている (5)。

NS1 (73 アミノ酸、18 kDa) は塩基性アミノ酸 (19-38 aa) が広い範囲をしめ、sNt や dsNt に強く結合する陽性荷電領域を持っているため、正常な mRNA 翻訳を 2 カ所で抑制し、同時に RIG-I に緩く結合し、炎症性サイトカインの産生抑制をしたり、感染細胞にだけ見られ、多くの細胞側の機能を制御したり、細胞のアポトーシスにも関

わっている (6, 7, 8)。

PB1-F2 は第 11 番目の蛋白として確認されミトコンドリア外膜に穴を形成し細胞をアポトーシスに至らせる機能など病原性に関わる蛋白として注目されている。(9, 10) 6) 生体反応としては、インフルエンザ感染ではプラズモイド DC では TLR3 が、非プラズモイド DC では RIG-I がその初期免疫を司っていることが知られていた。RIG-I はインフルエンザウイルスの 5' phosphate ssRNA を認識していることが明らかにされている (11)。RIG-I ノックアウトマウスは胎生致死であったため、研究が期待されたが、結果が出ていない。代わって、RIG-I の下流の IPS-1 ノックアウトマウス (12) や TLR3 ノックアウトマウスが作成され (13)、インフルエンザなどのウイルス感染実験がなされたが、いずれも重症感染は起こらず、wild type のマウスよりもウイルスを早く排除している。このことは、TLR3 や RIG-I を主体とした初期免疫機構は初期炎症反応をむしろ増悪させる様に働いている可能性がある。

## E. 結論

宮崎においても、全国と同様の急性脳症症例が入院治療されていた。その中でもインフルエンザ脳症が最も多く、ステロイド・パルス療法が有効であった。一人の患者で TLR3 変異を見出し、初期免疫機構の一部の変異が病因に関与する可能性をしめしたが、最近の TLR3 KO mouse のインフルエンザ感染実験からその病因説には疑問がある。初期のサイトカインをみると脳内と血中ではサイトカイン産生機構が違うのではないかと考えられた。その他ウイルス側からと生体反応側から見たインフルエンザ脳症での病因を検索している。PB1-F2 蛋白の機能に

注目している。

## 参考文献

- 1) *Clinical Immunology*. 119(2):188-194,2006
- 2) *Science* 317(5844): 1522-1527. 2007
- 3) *Science* 309(5734): 581-5. 2005
- 4) *PLoS Pathog.* 2(6): 526-535,2006
- 5) *Science* 293(5536): 1840-1842,2001
- 6) *J Virol.* 81(2): 514-524,2007
- 7) *J Virol.* 82(3): 1146-1154,2008
- 8) *J Virol.* 78(12): 6304-6312,2004
- 9) *J Virol.* 82(3): 1146-1154,2008
- 10) *J Virol.* 78(12): 6304-6312,2004
- 11) *Science* 314(5801): 997-1001,2008
- 12) *PNAS.* 105(37): 14046-14051,2008

## F. 研究発表

### 論文発表

- 1) Hidaka F, et al., A missense mutation of the Toll-Like receptor 3 gene in a patient with influenza-associated encephalopathy. *Clinical Immunology*. 119:188-194,2006
- 2) 久保 尚美、大塚 珠美、小泉 博彦、此元 隆雄、高木 純一、布井 博幸、柳邊 安秀. インフルエンザ流行時期に心膜心筋炎に横紋筋融解症を合併した10歳女児例. *小児科* 47: 1413-1417. 2006
- 3) 布井博幸 ヒト (H1, H3) と鳥 (H5N1) インフルエンザウイルスによる重症感染症の病態と発症機序の違い *医学のあゆみ* 224 (11) :832-833, 2008

### 学会発表

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

インフルエンザ脳症ガイドライン：EBMによる再検討

研究分担者 水口 雅 東京大学大学院医学系研究科発達医科学・教授

研究要旨

インフルエンザ脳症ガイドライン（2005年11月刊行）についてEBMの観点から再検討を行った。初版におけるエビデンスはほとんどがレベルIIIないしIVであった。今後の研究により、本症の診断と治療に関するエビデンスをさらに積み重ねつつ、ガイドラインを改訂してゆく必要性があると考えられた。

A. 研究目的

厚生労働省のインフルエンザ脳症研究班（森島班）は1998年に発足し、まず疫学と病理・病態を研究した。その結果、日本における症例数は年間50～数百であること、死亡率は30%と高率であること、さらに死亡にいたるような最重症の病型ではサイトカインの嵐(cytokine storm)、血管性脳浮腫の生じていることを明らかにした。予後を改善するための治療として、従来の特症療法（呼吸・循環・体液管理、けいれん抑制、頭蓋内圧降下療法など）のみでは不十分と判断し、より積極的な抗サイトカイン療法、脳保護療法を考案した。これらを盛り込んだパンフレット「インフルエンザ脳炎・脳症の特殊治療（試案）」を同研究班のメンバーが2000年度に刊行した（改訂版を翌年度に刊行した）。これにより、全国的に

ステロイド・パルス、ガンマグロブリン大量などの抗サイトカイン療法が積極的に施行されるようになった。研究班は2002/03シーズンおよび2003/04シーズンの治療成績に関する全国調査を行い、その知見を踏まえて「インフルエンザ脳症ガイドライン」をまとめ、2005年11月に公表した。

インフルエンザ脳症は20世紀末の日本で新たに認識された症候群で、研究の歴史は浅く、診断・治療に関するエビデンスは乏しい。このような状況で作成・公表されたガイドラインは、他の疾患に対するものとは性質が大きく異なった。待望のガイドライン誕生をマスメディアなどが歓迎する一方で、救急病院の小児科医などに懸念・当惑の声も聞かれた。

これらの経緯と現状を踏まえ、本研究では本ガイドラインについて evidence-based

medicine (EBM) の見地から再検討した。

## B. 研究方法

「インフルエンザ脳症ガイドライン」は次の5章から成る。

- I. インフルエンザ脳症が疑われる症例の初期対応
- II. インフルエンザ脳症の診断指針
- III. インフルエンザ脳症の治療指針
- IV. インフルエンザ脳症のリハビリテーション
- V. (インフルエンザ) 脳症におけるグリーフケア

本研究では、ガイドライン各章において、エビデンスの有無が問題となる箇所を拾い出した。関連する文献を評価し、エビデンスレベルを判断した。エビデンスレベルの分類は AHCPR (Agency for Health Care Policy and Research) 1993 に準拠した。

## C. 研究結果

### I. 初期対応

本章のフローチャートは、けいれん後の意識障害ないし異常言動・行動が概ね1時間以上続いた際に「脳症の疑い」として二次または三次医療機関への転送を推奨している。しかし「概ね1時間」の根拠は不明確で、本研究班における専門家の意見の集約に過ぎない(レベルIV)。

### II. 診断指針

本章のフローチャートは、来院時に Japan Coma Scale (JCS) 20 以上の意識障害があれば直ちにインフルエンザ脳症の「確定例」と

診断し、特異的治療(ステロイド・パルスなど)を介しすることを推奨している。しかし、JCS 20 をカットオフラインとする理由は明確でない(レベルIV)。また、特異的治療を推奨する根拠は必ずしも明確でなく、「脳症の症例に対する特異的治療開始の時期が遅れるのは非常にまずい。脳症でない症例(複雑型熱性けいれんなど)に対し早まって(誤って)ステロイド・パルスなどをやっても、大きな実害はないであろう。」という、専門医の経験にもとづく見解に過ぎない(レベルIV)。

診断における検査の有用度(efficacy)の階層分類は示されていない。

### III. 治療指針

特異的治療・特殊治療のうちステロイド(メチルプレドニゾロン)・パルス療法については、森島班の調査で「投与開始時期が早いほど予後が良かった」事実にもとづいて、有効性が強く示唆されている。しかし、後方視的な比較研究であり、エビデンスレベルはIIに近いIIIである。

他の治療のうちガンマグロブリン大量、脳低温療法、血液浄化療法については1例ないし少数例で有効であったとの論文が複数ある(レベルIII)。抗ウイルス薬(オセルタミビル)、シクロスポリン、アンチトロンビン-III 大量療法についての報告はさらに少なく、各々について1~2の論文ないし学会報告のみである(レベルIII)。

治療法の勧告(お勧め度)の強さの分類は示されていない。

### IV. リハビリテーション