

V. グリーフケア

IV章、V章の記載について、ピアレビューの雑誌に刊行されたエビデンスはない(レベルIV)。

D. 考察

インフルエンザ脳症は日本、台湾など東アジアに多く、研究面において日本は世界を主導している。しかし、診断・治療のエビデンスとなると、まだ乏しい現状である。本研究の結果も、このことを如実に反映したものであった。

インフルエンザ脳症の概念は新しく、これが普及したのは約10年前である。急性壊死性脳症、けいれん重積型急性脳症などの病型は近年確立された概念であり、その病態はまだ広く知られてはいない。知名度の高さに反してインフルエンザ脳症の罹病率は低く、個々の小児科医が脳症症例を経験する機会は少ない。機序・臨床経過を異にする複数の病型を含む上、重症度も症例毎にまちまちで、発症初期の病型・重症度を診断し予後を予測することはしばしば困難である。症状はしばしば重篤で、急激に悪化しやすく、治療開始の遅れは予後の悪化を招きかねない。診断が不確実で、病態の把握も不十分なまま、治療開始に踏み切らざるを得ないことが稀でない。保護者に対する病態・治療の説明にじゅうぶんな時間を取れないことも多い。治療法を途中で変更したり、同時に複数の治療法を施行することがよくあり、個々の治療の効果判定はむずかしい。治療法を無作為に割り付けた

り、治療内容を知らされない医師がその効果を判定したりすることは、倫理的・社会的理由により不可能に近い。

このように、インフルエンザ脳症はEBMにとって最悪の諸条件を兼ね備えた症候群である。厚生労働省研究班における治療研究も、このような制約下で進めるしかなかった。前述の「試案」パンフレットを全国の小児救急担当施設に配布した後、アンケート調査を行い、インフルエンザ脳症症例の臨床症状・検査所見と治療内容・予後についての調査を行った。特殊治療の各々について、施行の有無と予後の関係を解析した。この解析には多くの困難があったが、とくに大きい問題は、治療法の選択が脳症の重症度に左右されることであった。例えば脳低体温療法、血漿交換療法などの治療法は、脳症の中でも特に重症の症例で施行される傾向が強いため、施行群と非施行群を単純に比較すると前者の方が予後不良という結果が出てしまった。この問題を克服するには、個々の症例の治療開始前の重症度を判定し、変数化した上で統計解析に持ち込む必要があった。しかし現実には症例数が少なく、重症度を適切に評価・表現できなかつたため、解決できなかった。

なおステロイド・パルス療法の効果に関するデータについても、施行群と非施行群の背景が同一とは考えにくい。しかし、種々の交絡因子の存在を考慮しても、この結果が同療法の有効性を強く示唆していることは間違いないと思われる。ただし1日目に同療法を開始した症例の予後が予想外に良

いため、アンケート調査の過程で何らかのバイアスがかかったのではないかという疑いもある。

E. 結論

インフルエンザ脳症ガイドラインの根拠となったエビデンスのレベルはおしなべて低い。また、日本の小児救急医療体制の厳しい現状とインフルエンザ流行期における負荷の著しい増大を考えれば、現実の医療が本ガイドラインの指針どおりに患者の移送や診療を遂行できるとも思われない。したがって、ガイドラインに合わない診療が行われたからといって担当医が非難を浴び、医事紛争に巻き込まれる事態は何としても避けたい。インフルエンザ脳症は元来、医事紛争につながりやすいだけに、なおさらである。

他の多くのガイドラインが対象としている諸疾患とは異なり、インフルエンザ脳症は歴史が新しく、患者数が少なく、知見の蓄積が乏しい症候群である。本来、現段階での指針はオプションであり、ガイドラインと銘打つのはある意味で時期尚早であったかも知れない。

しかし一方で、この急激・重篤で予後不良な症候群に対する早期診断・早期治療の指針を実践的な診療マニュアルとしてまとめ、その内容につき研究班ないし厚生労働省が一定の責任を持つ形で示してもらいたいという要望が、小児科医一般の間で強かったことも事実である。顧みると2000年の「試案」の編集者は、形式的には研究班と

別の「インフルエンザ脳炎・脳症治療研究会」であった。2005年のガイドライン初版は、エビデンスレベルの面で「試案」から著しく向上したとまではいえないが、「研究会の試案」から成長して、「厚生労働省研究班の公式のガイドライン」として結実した意義は大きい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamanouchi H, Kawaguchi N, Mori M, Imataka G, Yamagata T, Hashimoto T, Momoi M, Eguchi M, Mizuguchi M. Acute infantile encephalopathy predominantly affecting the frontal lobes. *Pediatric Neurology* 2006; 34 (2): 93-100.
2. Yamanouchi H, Mizuguchi M. Acute infantile encephalopathy predominantly affecting the frontal lobes (AIEF): A novel clinical category and its tentative diagnostic criteria. *Epilepsy Research* 2006; 70 (Suppl): S263-268.
3. Okumura A, Kidokoro H, Mizuguchi M, Kurahashi H, Hirabayashi Y, Morishima T, Watanabe K. The mildest form of acute necrotizing encephalopathy associated with influenza a. *Neuropediatrics*. 2006; 37 (4): 261-263.
4. Mastroianni, SD, Giannis D, Voudris K, Skardoutsou A, Mizuguchi M. Acute necrotizing encephalopathy of childhood in non-Asian patients. Report of three cases and literature review. *Journal of*

- Child Neurology 2006; 21 (10) : 872-879.
5. 有田健一、菅谷憲夫、稲松孝思、水口雅：インフルエンザウイルス感染症と関連するワクチンの臨床：インフルエンザウイルス感染症と関連するワクチンの臨床。日本医師会雑誌 2006; 134 (10) : 1889-1901.
 6. 水口雅：インフルエンザウイルス感染症と関連するワクチンの臨床：インフルエンザウイルス脳症。日本医師会雑誌 2006; 134 (10) : 1926-1928.
 7. 水口雅：意見・異見 テオフィリン関連けいれん：序文-ミニ特集「テオフィリン関連けいれん」に寄せて。小児科臨床 2006; 59 (2) : 175-176.
 8. 森島恒雄、富樫武弘、中村祐輔、横田俊平、田代真人、岡部信彦、奥野良信、布井博幸、山口清次、細矢光亮、市川光太郎、水口雅、河島尚志、塩見正司、市山高志、玉腰暁子、佐多徹太郎、木村宏、山田至康、宮崎千明、黒木春郎、鍵本聖一、岩崎琢也、栗原まな、奥村彰久、前田明彦、中野貴司、荒川浩一、尾内一信、藤井史敏、安井良則、坂下裕子、黒川雅代子、瀬藤万里子、井上ひとみ、多屋馨子、岡田晴恵、二宮伸介、山下信子、長尾隆志、和田智顕、厚生労働省インフルエンザ脳症研究班：インフルエンザ脳症ガイドライン。小児科臨床 2006; 59 (2) : 339-364.
 9. 水口雅：小児のおもな症状と診療の要点：痙攣。別所文雄（編）これだけは知っておきたい小児医療の知識。新興医学出版社、東京、2006、pp. 349-352.
 10. 水口雅：小児のおもな症状と診療の要点：意識障害。別所文雄（編）これだけは知っておきたい小児医療の知識。新興医学出版社、東京、2006、pp. 353-358.
 11. 水口雅：けいれん・意識障害を起こす疾患の治療・管理のポイント：その他の急性脳症。小児内科 2006; 38 (2) : 360-363.
 12. 水口雅：実践 救急医療：急性脳症。日本医師会雑誌 2006; 135 (Suppl 1) : S306-307.
 13. 水口雅：小児リハビリテーションが必要となる主な疾患：脳炎・脳症。小児看護 2006; 29 (8) : 1046-1049.
 14. 水口雅：脳炎・脳症：診断と治療の進歩：インフルエンザ脳症とライ症候群。日本内科学会雑誌 2006; 95 (7) : 1263-1267.
 15. 水口雅：小児中枢神経画像診断 top 10：感染症 top 10。“画像”が重要な小児中枢神経感染症。画像診断 2006; 26 (8) : 959-968.
 16. 水口雅：診断の指針・治療の指針：小児の急性脳症。総合臨床 2006; 55 (10) : 2515-2516.
 17. 水口雅：一週一話：インフルエンザ脳症の診断と治療。日本医事新報 2006; 4314: 85.
 18. 小林慈典、富樫武弘、水口雅、宮崎千明、市山高志、河島尚志、木村宏、奥村彰久、栗原まな、黒木春郎、塩見正司、布井博幸、細矢光亮、鍵本聖一、森島恒雄、横田俊平。インフルエンザ脳症特殊治療の全国調査。日本小児科学会雑誌 2007; 111 (5) : 659-665.
 19. Takahashi K, Saitoh M, Hoshino H, Mimaki M, Yokoyama Y, Takamizawa M, Mizuguchi M, Lin Z-M, Yang Y, Igarashi T. A case of primary erythermalgia, wintry hypothermia and encephalopathy. Neuropediatrics 2007;

- 38 (3) : 157-159.
20. Mizuguchi M, Yamanouchi H, Ichiyama T, Shiomi M. Acute encephalopathy associated with influenza and other viral infections. *Acta Neurologica Scandinavica* 2007; 115 (4) : 45-56.
 21. 水口雅: 腸管出血性大腸菌感染症の治療: 脳症の治療における留意点. *小児感染免疫* 2007;19 (1) : 71-74.
 22. 水口雅: 感染症との新たな闘い: インフルエンザ脳症の発症とその治療. *日本薬剤師会雑誌* 2007;59 (1) : 61-65.
 23. 水口雅: 小児の急性脳症、ライ症候群. 山口徹、北原光夫、福井次矢 (編) 今日の治療指針 2007 年版、医学書院、東京、2007, pp. 996-997.
 24. 水口雅: インフルエンザ脳症ガイドラインが勧めたいこと. 五十嵐隆、石井正浩、滝田順子、平岩幹男、水口雅、横田俊平、横谷進、渡辺とよ子 (編) *EBM 小児疾患の治療* 2007-2008、中外医学社、東京、2007, pp. 306-312.
 25. 水口雅、岡明: 神経疾患. 飯沼一宇、有阪治、竹村司、渡辺博 (編) *小児科学・新生児学テキスト*、診断と治療社、東京、2007, pp. 558-615.
 26. 水口雅: 一般的症候: 意識障害. *小児科診療* 2007;70 (Suppl) : 99-102.
 27. 水口雅: 神経筋疾患: 急性脳炎・急性脳症. 五十嵐隆 (編) *小児科診療ガイドライン*、総合医学社、東京、2007, pp. 183-186.
 28. 水口雅: 臨床医のための神経病理: インフルエンザ脳症と急性壊死性脳症. *Clinical Neuroscience* 2007; 25 (11) : 1194-1195.
 29. 水口雅: 冬のウイルス感染症: インフルエンザ脳症. *小児科診療* 2007; 70 (12) : 2217-2222.
 30. 水口雅: 小児中枢神経疾患の画像診断 感染症、脳症: 急性壊死性脳症. *小児内科* 2007; 39 (Suppl) : 324-326.
 31. Okumura A, Mizuguchi M, Kidokoro H, Tanaka M, Abe S, Hosoya M, Aiba H, Maegaki Y, Yamamoto H, Tanabe T, Noda E, Imataka G, Kurahashi H: Outcome of acute necrotizing encephalopathy in relation to treatment with corticosteroids and gammaglobulin. *Brain and Development* (Tokyo) 2008; in press
 32. Okumura A, Mizuguchi M, Aiba H, Tanabe T, Tsuji T, Ohno A. Delirious behavior in children with acute necrotizing encephalopathy. *Brain and Development* (Tokyo) in press.
 33. Sato A, Mizuguchi M, Mimaki M, Takahashi K, Jimi H, Oka A, Igarashi T. Cortical gray matter lesions in acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus. *Brain and Development* (Tokyo) in press.
 34. 水口雅: 小児神経疾患-内科、外科: インフルエンザ脳症ガイドライン. 柳澤信夫、篠原幸人、岩田誠、清水輝夫、寺本明 (編) *Annual Review 神経* 2008、中外医学社、東京、2008, pp. 344-351
 35. 水口雅: 小児における脳症の画像診断. *日本小児放射線学会雑誌* 2008; 24 (1) : 42-50.

36. 水口雅、塩見正司：急性脳症の新分類-けいれん重積型の概念・病態・治療：序論。脳と発達 2008; 40 (2) : 115-116.
37. 水口雅：急性脳症の新分類-けいれん重積型の概念・病態・治療：急性脳症の分類とけいれん重積型。脳と発達 2008; 40 (2) : 117-121.
38. 水口雅：急性脳症の臨床・検査・画像。小児感染免疫 2008; 20 (1) : 43-50.
39. 水口雅：神経系感染症：脳炎・脳症。有馬正高（監），加我牧子，稲垣真澄（編）小児神経学，診断と治療社，東京，2008，pp. 222-228.
40. 水口雅：インフルエンザ脳症ガイドライン：初期対応と診断。Neuroinfection 2008; 13 (1) : 133-137.
41. 水口雅：サイトカインと小児疾患：インフルエンザ脳症，ウイルス感染による急性脳症。小児科診療 2008; 71 (12) : 2181-2189.
42. 水口雅：鑑別すべき疾患：テオフィリン関連けいれん。五十嵐隆，岡明（編）小児科臨床ピクシス3：小児てんかんの最新医療，中山書店，東京，2008，pp. 84-85.
43. 水口雅：小児救急 Q&A-適切な初期対応のために- 脳炎・脳症。救急・集中治療 2008; 20 (11/12) : 1527-1533.
44. 水口雅：急性脳症の話。藤沢市医師会報 2008; 393: 2-3.
2. 学会発表
1. 水口雅、山内秀雄、市山高志、塩見正司：小児期急性脳症の病型分類と病態解析：急性壊死性脳症と痙攣重積型急性脳症。第109回日本小児科学会、金沢、2006年4月21日
2. 高橋寛、三牧正和、齋藤真木子、水口雅：MRI上広範な対称性白質病変を認めた急性散在性脳脊髄炎 (ADEM) の1例。第48回日本小児神経学会総会、浦安、2006年6月1日
3. 山内秀雄、高梨潤一、吉川秀人、森雅人、水口雅：Acute Infantile Encephalopathy Predominantly Affecting the Frontal Lobes (AIEF) の暫定的診断基準。第48回日本小児神経学会総会、浦安、2006年6月3日
4. 高橋寛、星野英紀、三牧正和、齋藤真木子、水口雅：高度の低体温を合併した肢端紅痛症の1例。第45回日本小児神経学会関東地方会、東京、2006年9月30日
5. 星野英紀、高橋寛、三牧正和、齋藤真木子、水口雅：急性壊死性脳症に類似した脳症の同胞例における画像所見の検討。第11回日本神経感染症学会総会学術集会、伊勢、2006年10月14日
6. Mizuguchi, M., Yamanouchi, H., Ichiyama, T., Shiomi, M.: Acute encephalopathies associated with influenza and other viral infections. 2nd Congress of Asian Society for Pediatric Research, Yokohama, 2006年12月10日
7. 小林慈典、富樫武弘、水口雅、岡部信彦、奥野良信、宮崎千明、森島恒雄、横田俊平：インフルエンザ脳症特殊治療の全国調査。第110回日本小児科学会、京都、2007年4月20日
8. 安部信平、奥村彰久、水口雅、城所博之、細矢光亮、愛波秀男、山本仁、前垣義弘、田辺

- 晋也、野田映子：急性壊死性脳症における早期ステロイド投与の有効性。第49回日本小児神経学会総会、大阪、2007年7月6日
9. 鳥巢浩幸、花井敏男、泉達郎、水口雅、前垣義弘、田角勝、岡崎富男、平林伸一、池澤誠、高橋幸利、疋田敏之、市山高志、神山潤、浜野晋一郎、原寿郎：急性散在性脳脊髄炎における宿主遺伝要因の検討（第一報）-CTLA4遺伝子の解析-。第49回日本小児神経学会総会、大阪、2007年7月6日
10. 佐藤敦志、高橋寛、三牧正和、水口雅：けいれん重積型急性脳症の1症例における拡散強調画像所見の経時的变化。第47回日本小児神経学会関東地方会、東京、2007年9月8日
11. 自見英子、狩野博嗣、鶴岡美幸、佐藤敦志、高橋寛、三牧正和、高見沢勝、水口雅、五十嵐隆：RSウイルスによる急性脳症の1女児例。第39回日本小児感染症学会総会、横浜、2007年11月10日
12. 三牧正和、佐藤敦志、高橋寛、伊藤雅之、高橋幸利、岡明、水口雅：初診時より大脳皮質病変と体側の基底核病変を認めたRasmussen syndromeの1例。第50回日本小児神経学会総会、東京、2008年5月29日
13. 水口雅：HHV6感染に伴う急性脳症の検討（指定発言）。第557回日本小児科学会東京都地方会講話会、東京、2008年6月7日
14. 西田裕哉、佐藤敦志、高橋寛、三牧正和、岡明、五十嵐隆、関正史、水口雅：けいれん重積型脳症を呈した滑脳症の1男児例。第560回日本小児科学会東京都地方会、東京、2008年10月11日
15. Kohno S, Mizuguchi M, kida H, Shimada J, S-021812 Clinical Study Group: Efficacy, safety and pharmacokinetics of the intravenous neuraminidase inhibitor peramavir in the treatment of acute influenza: a randomized, double-blind, placebo-controlled study in Japan. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington DC, 2008年10月28日

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。

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

分担研究者 田中輝幸 東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室・准教授

研究要旨

インフルエンザ脳症による中枢神経系の病態解析を目指して、マウス脳スライス培養に IL-6、TNF-alpha、グルタミン酸、等の本症の脳内に特徴的な化学物質を直接添加し、アポトーシス、イオンチャンネル系、炎症性サイトカイン等の反応を、免疫染色、RT-PCR、ウエスタンブロット等で確認する in vitro モデル系を構築した。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症は、インフルエンザウイルス感染に伴う反応性の多因子による急性の脳興奮性異常状態と考えられる。その症例を対象とした病態・治療の研究は、症例間のheterogeneityが高いために困難である。また、これまでのところ、良い動物モデルは確立されていない。齧歯類を用いたけいれん重積による遅発性神経細胞死モデルでも、病巣は海馬に局限し、ヒトけいれん重積型に見られるような大脳皮質の層状壊死は再現できていない。

そこで本年度の研究では、インフルエンザ脳症の病型に特徴的と考えられる大脳皮質ニューロン過興奮状態、高サイトカイン血症、等の脳内状態を、マウスの脳スライス培養系で模倣し、各負荷に対するニューロンアポトーシス、イオンチャンネル系蛋白・シナプス蛋白発現変化、反応性サイトカイン産生、等を in situ で評価可能なモデルの確立を試みた。

B. 研究方法

1. マウス大脳スライス培養

野生型 C57BL/6 マウスを安楽死させ、直ちに大脳を 4°C HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) 内に取り出す。大脳を 0.5% アガロースゲル上に載せ、MX-TS tissue slicer (Siskiyou, Grants Pass, USA)を用いて、300 um 厚で大脳の全スライスを作製する。各スライスを注意深く分離後、新鮮な 4°C HBSS 内で 30 分間 incubation。目的のスライスを、50 mm 径培養ディッシュ内の polycarbonate membrane (8.0 um pore sie, Whatman 110414)上に移し、1 mL 血清培地 (MEM-alpha, 10% Fetal bovine serum, 1X Penicillin/Streptomycin)を membrane 下に注入、membrane を浮遊させる。37°C、5% CO2 インキュベーター内で 2 時間培養。培地を、血清無し培地 (Neurobasal medium, 1X B27 supplement, 1X L-glutamine, 1X Penicillin/ Streptomycin)に置換し培養する。

2. グルタミン酸、炎症性サイトカイン等の

マウス大脳スライスに対する影響の解析

グルタミン酸ナトリウム (NMDA アゴニスト)、Recombinant murine IL-1, IL-6, TNF-alpha、等の化合物を、スライス培養培地内へ添加し、毎日培地と化合物を交換しながら、3~4日間スライス培養を行う。培養終了後、免疫染色及びtunel染色には、スライスを4°Cの4% paraformaldehyde/PBSで4時間固定、20% sucrose/PBS、30% sucrose/PBS 置換後、OCT Compound (Sakura Tissue-Tek)で包埋、クライオスタット(凍結切片作製装置)で12um厚の凍結切片を作製する。凍結切片に対し、目的の一次抗体を用い免疫染色あるいはtunel染色を行う。また、スライス培養後、局所のmRNA及び蛋白発現定量解析には、目的の組織をメスを用いて解離後、Isogen、あるいはprotein lysis buffer内で溶解し、RNAあるいは蛋白解析へ進む。

(倫理面への配慮)

組換えDNA実験及び動物実験は、東京大学医学部にて行った。組換えDNA実験、動物実験共に、東京大学医学部組み換えDNA実験安全委員会、実験動物委員会の承認を受けている。法律と動物利用指針を遵守して研究を行っている。

C. 研究結果

1. 日齢7日~14日の若年マウスより大脳を解離し、脳スライス作製を行った。脳を保持するアガロースベッドの濃度と、スライス厚の条件設定を行い、0.5%アガロース、300umスライス厚で安定したスライス作製が可能であった。スライス作製の侵襲による反応性のサイトカイン放出を抑えるため、tissue slicerで作製したスライスは直ちに4°CのHBSSで30分間冷却した。polycarbonate membraneへの生着を促進する目的ではじめに血清培地で培養し、その後サイトカイン等の濃度をコントロール

可能な血清無し培地で培養を行った。培養5日目に感染からスライスの状態が不良となる結果が多かったが、3~4日間の培養が可能であった。

2. スライス培養の条件設定後、Recombinant murine IL-6 (PeproTech)、TNF-alphaを10ng/mlの濃度で培地へ添加し4日間培養した。4% paraformaldehydeで固定、凍結切片を作製した。現在、抗カルシウムチャンネル(L-type) $Ca_v1.2 \alpha 1C$ (L-Type)、抗GluR1、抗GluR2/3、抗NR1、抗NR2A、抗NR2B、抗PSD95、抗Synapsin I、抗GAD67、等の抗体で免疫染色を行い、大脳興奮性の変化について解析中である。

D. 考察

インフルエンザ脳症患者においては、痙攣に加え、飛び降り等の行動異常や過剰興奮状態が大きな問題となっている。これらの異常が、全般的な大脳興奮性の亢進によるのか、大脳内部の領域特異的な亢進と抑制によるのかは、まだ全くわかっていない。この問題解決のためには、モデル動物を用いた大脳の興奮性の分子生化学的、電気生理学的な局所比較解析が必要となるが、良い動物モデルの確立されていない現在、困難である。本研究では、通常の全身投与ではblood brain barrierにより脳への移行が難しい化合物を、スライス培養に直接添加し反応させるシステムを確立し、in situでの局所解析が可能となった。

本研究により確立した脳スライス培養のシステムを、今後インフルエンザ脳症研究に更に応用してゆきたい。

具体的なstrategyとして、

- 1) NMDAアゴニスト、グルタミン酸ナトリウムを添加し、神経細胞のアポトーシスやグリア細胞によるサイトカイン発現などを観察する。
- 2) IL-6にIL-1、TNF-alphaなどの炎症性サイ

トカインを追加し、神経細胞のアポトーシスやCaチャンネル、NMDAレセプターの変化などを観察する、

などを想定・計画中である。これらの変化が、大脳新皮質、海馬、扁桃体といった、脳内の機能分画で差があるかどうか、解析を行い、サイトカインとNMDAアゴニスト、アポトーシスとの関係をシステムチックに評価していく。

E. 結論

インフルエンザ脳症による中枢神経系の病態解析を目指して、マウス脳スライス培養に炎症性サイトカイン、NMDAアゴニスト等の本症に特徴的な化学物質を直接添加し、アポトーシス、イオンチャンネル系、炎症性サイトカイン等の反応を、in situ で解析可能なシステムを構築した。今後炎症性サイトカイン、NMDAアゴニスト、等の投与によるアポトーシス、大脳興奮性及び反応性サイトカイン産生に対する影響の解析を進めていく。

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

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。本研究では、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、これら3種の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。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 の産生促進は生じなかった。細胞内シグナルの検索の結果、ジクロフェナックナトリウムによる NO_x 産生促進は、NF- κ B 活性化を介して生じていることが判明した。さらには、産生された 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。このような NO_x 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。

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。また、ジクロフェナックナトリウムの使用は、インフルエンザ脳症悪化をもたらすことが臨床的に知られているが、炎症性サイトカインによって刺激を受けたアストロサイトにジクロフェナックナトリウムが与える影響について検討を加えた。

B. 研究方法

生後1日の Wistar 系ラットの脳皮質から、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) 1 μ g/ml または 5 μ g/ml を、それぞれ単独、または組み合わせで培地に添加した。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 NO $_x$ 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。NO $_x$ 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 NO $_x$ 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 NO $_x$ 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 NO $_x$ 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 NO $_x$ 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 mRNA 発現量を経時的に測定したところ、図 4、5 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 1 時間で有意な上昇を認め、3 時間後にピークとなり、48 時間後ま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、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、6 時間をピークとして 48 時間においても無刺激群に比して数十倍の増加を認め、発現のピークが遅くなる傾向を示した（注：同じデータを図 4 では縦軸を log スケール、図 5 は linear スケールで表した）

次に、iNOS 蛋白の発現をウエスタンブロットによって刺激後 9 時間で検討した。図 6 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ウエスタンブロットの結果とほぼ一致する iNOS タンパクの発現を確認した（図 7）。

3) ラットアストロサイトにおける COX mRNA、蛋白の発現

COX1 および COX2 mRNA 発現量を測定したところ、図 8 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 3 時間及び 6 時間で COX2 の有意な上昇を認めた。また、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は、COX2 mRNA 発現量は増加傾向にあったがサイトカインのみの時と比べ有意差はなかった。一方、ジクロフェナックナトリウムを単独で投与したときは、COX2 mRNA は低下し、サイトカインの存在の有無によって、ジクロフェナックナトリウムが、COX2 mRNA の発現に与える影響が異なることが判明した。

次に、COX1 および COX2 蛋白の発現をウエスタンブロットによって刺激後 3 時間及び 6 時間で検討した。図 9 に示すように、

mRNA の発現変化とほぼ一致する傾向を示した。

4) ラットアストロサイトにおける PGE2 合成酵素 mRNA の発現と PGE2 産生

PGE2 合成酵素 mRNA および PGE2 の産生を検索したところ、図 10 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 3 時間及び 6 時間で PGE2 合成酵素 mRNA の有意な上昇を認めた。また、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は、サイトカインのみの時と比べ有意差はなかった。一方、ジクロフェナックナトリウムを単独で投与したときは、PGE2 合成酵素 mRNA は低下し、COX2 の場合と同様、サイトカインの存在の有無によって、ジクロフェナックナトリウムが、PGE2 合成酵素 mRNA の発現に与える影響が異なることが判明した。

図 11 に示すように、PGE2 の培地中への産生量を添加後 1 時間及び 3 時間で検討したところ、3つのサイトカインを同時に作用させると有意な上昇を認めたが、ジクロフェナックナトリウムによる効果は認められなかった。

5) 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-kB 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-kB 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 12）。

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13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14)、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。

さらには、iNOSを誘導する細胞内シグナルとしてNF-kB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の産生やNOから生ずる活性酸素種を抑制するような薬剤が、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 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-kB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によって細胞障害がもたらされることが判明し、NOの産生を抑制するような薬剤が、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
- Ito, J., Nagayasu, Y., Okumura-Noji, K., Lu, R., Nishida, T., Miura, Y., Asai, K., Kheirollah, A., Nakaya, S., Yokoyama, S. Mechanism for FGF-1 to regulate biogenesis of apoE-HDL in astrocytes. *J Lipid Res* 48 (2007) 2020-2027
- Murai, H., Terada, A., Mizuno, M., Asai, M., Hirabayashi, Y., Shimizu, S., Morishita, T., Kakita, H., Hussein, M. H., Ito, T., Kato, I., Asai, K., Togari, H. IL-10 and RANTES are Elevated in Nasopharyngeal Secretions of Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Allergol Int* 56 (2007) 157-163
- Yamazaki, D., Ohya, S., Asai, K., Imaizumi, Y. Characteristics of the ATP-Induced Ca²⁺-Entry Pathway in the t-BBEC 117 Cell Line Derived From Bovine Brain Endothelial Cells. *J Pharmacol Sci* 104 (2007) 103-107
- Wake, H., Watanabe, M., Moorhouse, A. J., Kanematsu, T., Horibe, S., Matsukawa, N., Asai, K., Ojika, K., Hirata, M., Nabekura, J. Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress result in functional downregulation. *J Neurosci* 27 (2007) 1642-1650
- Tanikawa, T., Waguri-Nagaya, Y., Kusabe, T., Aoyama, M., Asai, K., Otsuka, T. Gliostatin/thymidine phosphorylase-regulated vascular endothelial growth-factor production in human fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatol Int* 27 (2007) 553-559
- Itaya, M., Sakurai, E., Nozaki, M., Yamada, K., Yamasaki, S., Asai, K., Ogura, Y. Upregulation of VEGF in murine retina via monocyte recruitment after retinal scatter laser photocoagulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48 (2007) 5677-5683
- Yamazaki, D., Aoyama, M., Ohya, S., Muraki, K., Asai, K., Imaizumi, Y. Novel functions of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in enhanced cell proliferation by ATP in brain endothelial cells. *J Biol Chem* 281 (2006) 38430-38439
- Ito, H., Yamamoto, N., Arima, H., Hirate, H.,

Morishima, T., Umenishi, F., Asai, K., Katsuya, H., and Sobue, K. Interleukin 1b induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor- κ B pathway in rat astrocytes. *J Neurochem* 99 (2006) 107-118

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>のアストロサイト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 promotor)

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)

アストロサイト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する検討

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.

森島徹朗、祖父江和哉、飯田裕子、津田喬子、浅井清文、勝屋弘忠 (2007)

乳酸アシドーシスは培養アストロサイトにおける水チャネルアクアポリン4の発現を増加させる (Lactic acidosis increases the expression of

aquaporin-4 in cultured rat astrocytes)

日本麻酔科学会第54回学術集会 5.31-6-2,
2007 札幌

祖父江和哉、大原健太郎、藤田義人、草間宣
好、浅井清文、勝屋弘忠 (2007)

肝性脳症における脳浮腫発生への水チャネ
ル<アクアポリン>の関与 (Water channel,
aquaporin, plays a role in brain edema
formation due to fulminant hepatitis)

日本麻酔科学会第54回学術集会 5.31-6-2,
2007 札幌

平手 博之、祖父江和哉、伊藤弘晃、有馬 一、
浅井清文、勝屋弘忠 (2007)

マンニトールによる水チャネル aquaporin4を介
した脳浮腫改善効果の発現機序-第2報-
(Mannitol maintained aquaporin4 expression
in the cryogenically damaged rat brain and
suppressed edema formation.)

日本麻酔科学会第54回学術集会 5.31-6-2,
2007 札幌

森島徹朗、祖父江和哉、飯田裕子、大原健太
郎、高柳猛彦、平手博之、青山峰芳、有馬
一、藤田義人、津田喬子、勝屋弘忠、浅井清
文 (2007)

乳酸アシドーシスは培養アストロサイトにおけ
る水チャネルアクアポリン 4 の発現を増加させ
る

(Lactic acid increases expression of aquaporin
4 in rat astrocytes.)

第50回日本神経化学大会 9.10-12, 2007
横浜

森島徹朗、祖父江和哉、飯田裕子、伊藤弘晃、
平手博之、有馬 一、津田喬子、勝屋弘忠、
山本直樹、青山峰芳、浅井清文 (2006)

脳におけるアクアポリンの機能と発現調節機構
第2回アクアポリン研究討論会 3.2-3, 2006

名古屋

森島徹朗、祖父江和哉、伊藤弘晃、平手博之、
飯田裕子、藤田義人、浅井清文 勝屋弘忠
(2006)

脳腫瘍に伴う脳浮腫発生に果たす水チャネル
<アクアポリン>の機能

第10回日本神経麻酔・集中治療研究会
4.14-15, 2006 大阪

平手博之、祖父江和哉、伊藤弘晃、有馬 一、
浅井清文、勝屋弘忠 (2006)

マンニトールによる水チャネル aquaporin4を
介した脳浮腫改善効果の発現機序

(mechanism of the effect of the water
channel aquaporin 4 expressed by
administration of mannitol on
improvement of brain edema)

日本麻酔科学会第53回学術集会 6.1-3,
2006 神戸

Sobue, K., Ito, H., Hirate, H., Sugiura, T.,
Fujita, Y., Aoyama, M., Miura, Y., Tsuda,
T., Katsuya, H., Asai, K. (2006)

Interleukin-1 β induces the expression of
aquaporin-4 through a NF κ -B pathway
in rat astrocytes

(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)

第49回日本神経化学会 9.14-16, 名古屋

Morisima, T., Sobue, K., Iida, Y., Aoyama,
M., Miura, Y., Katsuya, H., Asai, K.
(2006)

Lactic acidosis induces expression of
aquaporin 4 in rat astrocytes

(森島徹朗、祖父江和哉、飯田裕子、青山峰
芳、三浦 裕、勝屋弘忠、浅井清文)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

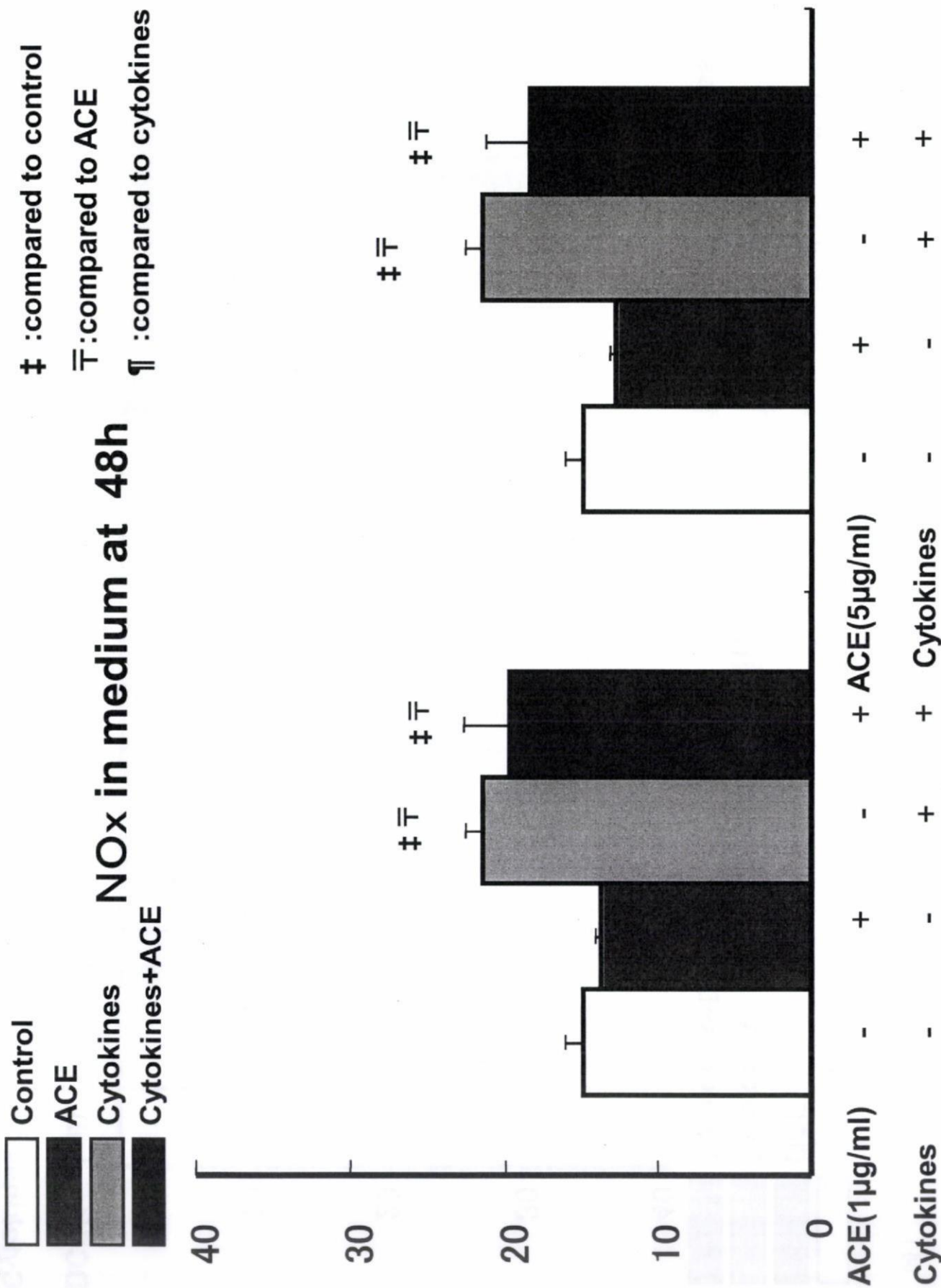
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

图2



‡ :compared to cytokines

▬ :compared to cytokiens and ACE(1µg/ml)

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

