

6. 相内章、伊藤良、浅沼秀樹、鈴木忠樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与によるA/H1N1pdm ウイルスの感染阻害効果の検討 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
7. 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、相内章、長谷川秀樹、藤本陽、千葉丈 インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた遺伝子治療による感染と重症化の阻止 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
8. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、佐藤由子、森川茂、佐多徹太郎 SARS 発症マウスモデルにおける IFN- γ の投与効果 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
9. 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、宇田晶彦、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎 SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の副反応について 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
10. 酒井宏治、田丸精治、前田健、永田典代、網康至、岩田奈緒子、鈴木忠樹、水谷哲也、福士秀悦、須崎百合子、緒方もも子、長谷川秀樹、西條政幸、山田靖子、倉根一郎、森川茂 カニクイザルで致死的感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスのサル及びイヌでの病原性の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
11. 伊藤良、相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、千葉丈、田村慎一、田代真人、佐多徹太郎、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにおける抗原性の異なる株による追加免疫時の免疫応答の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
12. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、佐多徹太郎 日本の 2009 年 H1N1 新型インフルエンザウイルス感染症剖検例の病理 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
13. 池辺詠美、川口晶、田口慎也、川嶋太郎、田中勇悦、堀光雄、澤洋文、西園晃、長谷川秀樹、伊波英克 分子シャペロン阻害剤による Tax と Tax 結合蛋白質の機能相関性に対する抑制的影響 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
14. 浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、許斐奈美、山本典生、中内美奈、網康至、長谷川秀樹、相内章、高下恵美、小淵正次、徐紅、岸田典子、小田切孝人、田代真人 新型インフルエンザウイルス (H1N1pdm) の増殖性に関する検討 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
15. 相内章、田村慎一、鈴木忠樹、伊藤良、浅沼秀樹、谷本武史、五味康行、奥野良信、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅、長谷川秀樹 インフルエンザワクチン経鼻接種による成人での血清および鼻腔洗浄液中のウイルス特異的中和抗体の評価 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
16. 谷本武史、高野大輔、森本孝一、五味康行、長谷川秀樹、田村慎一、宮崎隆、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信 経鼻インフルエンザワクチンによる免疫獲得効果検討 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
17. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
- 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

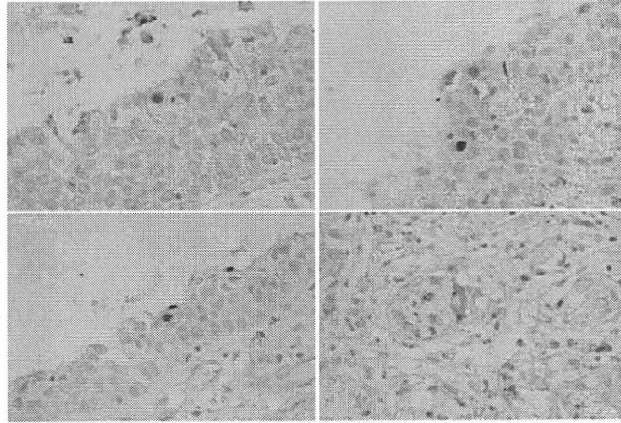


図1 気管支上皮および気管支腺にインフルエンザウイルス NP 抗原が核内に陽性となっている。

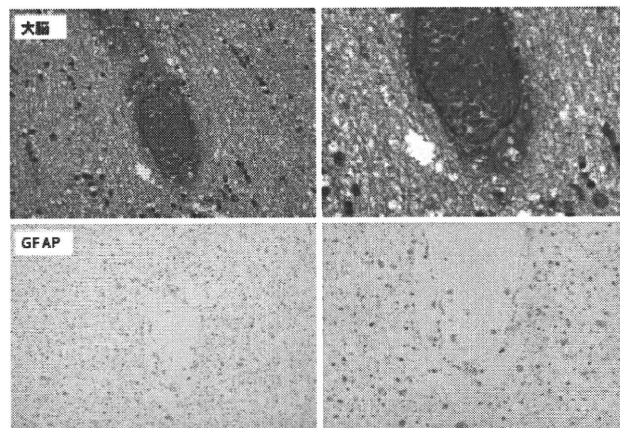


図2 大脳組織における血管周囲の血漿成分の漏出と GFAP 染色によるアストログリアの突起の腫大と断裂像

新型インフルエンザ脳症における血清および髄液 high mobility group box 1 の動態

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・教授

研究要旨

【目的】新型インフルエンザ脳症における血清および髄液 high mobility group box 1 (HMGB1) の動態を検討する。

【対象と方法】対象は平成 21 年 8 月から平成 22 年 2 月までに当院へサイトカイン測定依頼があった新型インフルエンザ脳症(疑い例を含む)の患者 23 例。後方視的に脳症群 15 例と非脳症群 8 例に大別した。非脳症群の定義は便宜上、意識障害が 1 日以内に改善し、頭部 MRI で異常がなく、痙攣直後を除いて脳波上徐波を認めず、後遺症がないものとし、それ以外のものを脳症群とした。脳症群は死亡または重度後遺症を伴った予後不良群 5 例と後遺症のなかった予後良好群 10 例だった。方法は血清及び髄液中の HMGB1 濃度を ELISA キットで測定した。

【結果】血清 HMGB1 値では脳症予後不良群が正常コントロール群に比し、有意に高値だった ($p = 0.009$)。脳症予後不良群と脳症予後良好群に有意差はなかった。髄液 HMGB1 値は脳症群と非脳症群で有意差を認めず、死亡した症例においても上昇を認めなかった。

【結論】炎症性サイトカインのひとつである HMGB1 は新型インフルエンザ脳症予後不良群の血中で高い傾向を示し、高サイトカイン血症を裏付ける所見と考えた。一方、髄液では上昇を認めず、中枢神経系内での炎症所見は乏しいことが示唆された。

A. 研究目的

新型インフルエンザの大流行に伴い、脳症も多く報告された。季節性インフルエンザによる急性脳症における血清・髄液サイトカイン解析を行ってきたが、新型インフルエンザ脳症の免疫病態解析はいまだ明らかでない。本研究の目的は新型インフルエンザ脳症の免疫病態を血清・髄液 high mobility group box 1 (HMGB1)解析の面から行うことである。

B. 研究方法

対象は平成 21 年 8 月から平成 22 年 2 月までに当院へサイトカイン測定依頼があった新型インフルエンザ脳症疑いの患者 23 例。後方視的に脳症群 15 例と非脳症群 8 例に大別した。非脳症群の定義は便宜上、意識障害が 1 日以内に改善し、頭部 MRI で異常がなく、痙攣直後を除いて脳波上徐波を認めず、後遺症がないものとし、それ以外のものを脳症群とした。脳症群は死亡または重度後遺症を伴った予後不良群 5 例(出血性

ショック脳症症候群 (HSES) 2 死亡例、急性壊死性脳症 (ANE) 1 死亡例を含む) と後遺症のなかった予後良好群 10 例だった。

方法は血清及び髄液中の HMGB1 濃度を ELISA キット(シノテスト社)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 HMGB1 値を図 1 に示す。血清 HMGB1 値では脳症予後不良群 (n = 5, 中央値 13.6 ng/ml, 範囲 6.4 - 76.3 ng/ml) が正常コントロール群 (n = 12, 中央値 4.9 ng/ml, 範囲 2.0 - 9.2 ng/ml) に比し、有意に高値だった (p = 0.009)。脳症予後不良群と脳症予後良好群 (n = 8, 中央値 9.2 ng/ml, 範囲 3.0 - 21.8 ng/ml) に有意差はなかった。

髄液 HMGB1 値を図 2 に示す。髄液 HMGB1 値は脳症群 (n = 14, 中央値 0.8 ng/ml, 範囲 0.2 - 2.1 ng/ml) と非脳症群 (n = 8, 中央値 0.7 ng/ml, 範囲 0.3 - 1.1 ng/ml) で有意差を認めず、死亡した ANE 症例においても髄液 HMGB1 値は 0.8 ng/ml と上昇を認めなかった。

D. 考察

HMGB1 は NF- κ B などの転写因子の機能発現に重要な核内 DNA 結合蛋白質であるとともに、壊死細胞や活性化マクロファージ・樹状細胞から分泌されサイトカインとして細胞間情報伝達物質としての機能も有する。この際、炎症のメディエーターとしての作用を有し、敗血症の病態修飾などの機能が報告されている。本研究において HMGB1 は新型インフルエンザ脳症予後不良群の血中

で高い傾向を示し、高サイトカイン血症を裏付ける所見と考えた。一方、髄液では上昇を認めず、中枢神経系内での炎症所見は乏しいことが示唆された。

E. 結論

新型インフルエンザ脳症において HMGB1 値は、予後不良群の血中で高値を示す傾向がみられた。一方、髄液では上昇しなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hasegawa S, Ichiyama T, Hashimoto K, Suzuki Y, Hirano R, Fukano R, Furukawa S. Functional expression of cysteinyl leukotriene receptors on human platelets. *Platelets* 2010; 21: 253-259.
2. Ichiyama T. Acute encephalopathy/encephalitis in childhood: a relatively common and potentially devastating clinical syndrome. *Brain Dev* 2010; 32: 433-434.
3. Aydin ÖF, Ichiyama T, Anlar B. Serum and cerebrospinal fluid cytokine concentrations in subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* 2010; 32: 463-466.
4. Tsuge M, Yasui K, Ichiyama T, Saito Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Yamashita N, Morishima T. Increase of tumor necrosis factor- α in the blood induces early activation of matrix metalloproteinase-9 in the brain. *Microbiol Immunol* 2010; 54: 417-424.
5. Hasegawa S, Ichiyama T, Kohno F, Korenaga Y, Ohsaki A, Hirano R, Haneda Y, Fukano R, Furukawa S. Prostaglandin E2 suppresses β 1-integrin expression via E-prostanoid receptor in human monocytes/macrophages. *Cell Immunol* 2010; 263: 161-165.
6. Saji N, Ichiyama T, Tadano M, Shimizu H, Kawarai T, Kita Y, Yokono K. Elderly case of prolonged hypoglycemic coma

presenting with reversible magnetic resonance imaging changes. Geriatr Gerontol Int 2010; 10: 331-333.

7. Uchiyama A, Kusuda S, Imashuku S, Sakuma I, Yamasaki C, Ichiyama T, Nishida H. Fatal hemophagocytic lymphohistiocytosis in an extremely-low-birthweight infant. Pediatr Int 2010; 52: 661-663.

2. 学会発表

1. 市山高志. シンポジウム「急性脳症の診療・研究最前線」. 病態解析と治療戦略. 第52回日本小児神経学会. 福岡.

2010. 5. 20-22

2. 市山高志. 特別講演. 脳炎・脳症、髄膜炎トピックス. 第134回日本小児科学会徳島地方会. 徳島. 2010. 6. 12

3. 市山高志、庄司紘史、高橋幸利. パネルディスカッション. 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17回ヘルペス感染症フォーラム. 札幌. 2010. 8. 20-21

4. 市山高志. 特別講演. 急性脳症の病態解析と治療戦略. 第86回山陰小児科学会. 米子. 2010. 9. 26

5. 市山高志. レクチャー. 病態からみた治療戦略の構築～分子標的療法の可能性～. 第30回日本川崎病学会. 京都.

2010. 10. 10-11

6. 市山高志. インフルエンザに伴う小児急性死亡. 第17回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会. 出雲. 2011. 3. 4-5

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

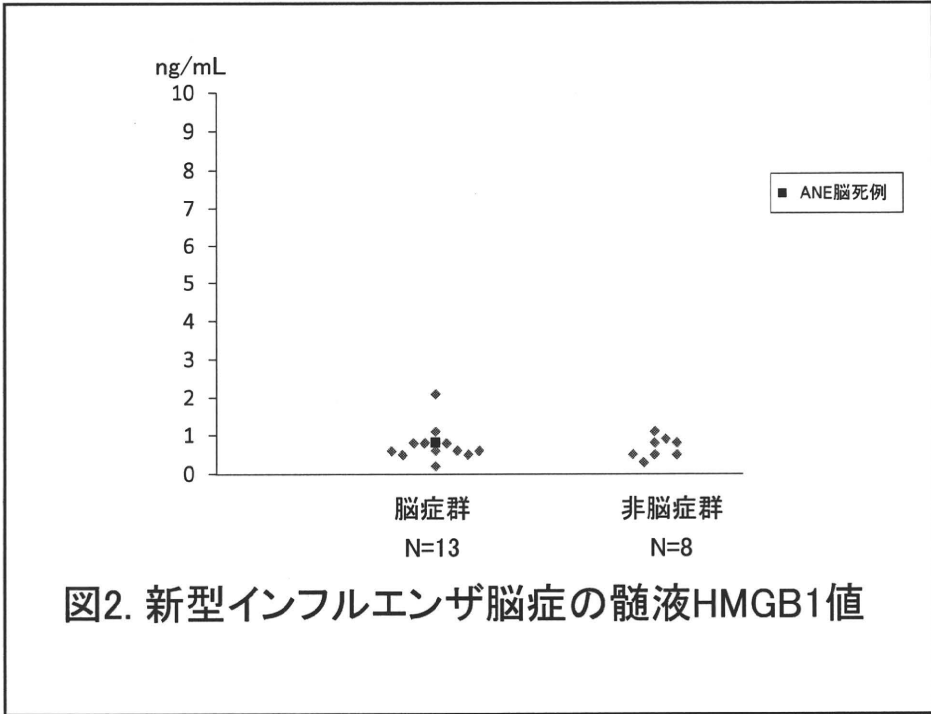
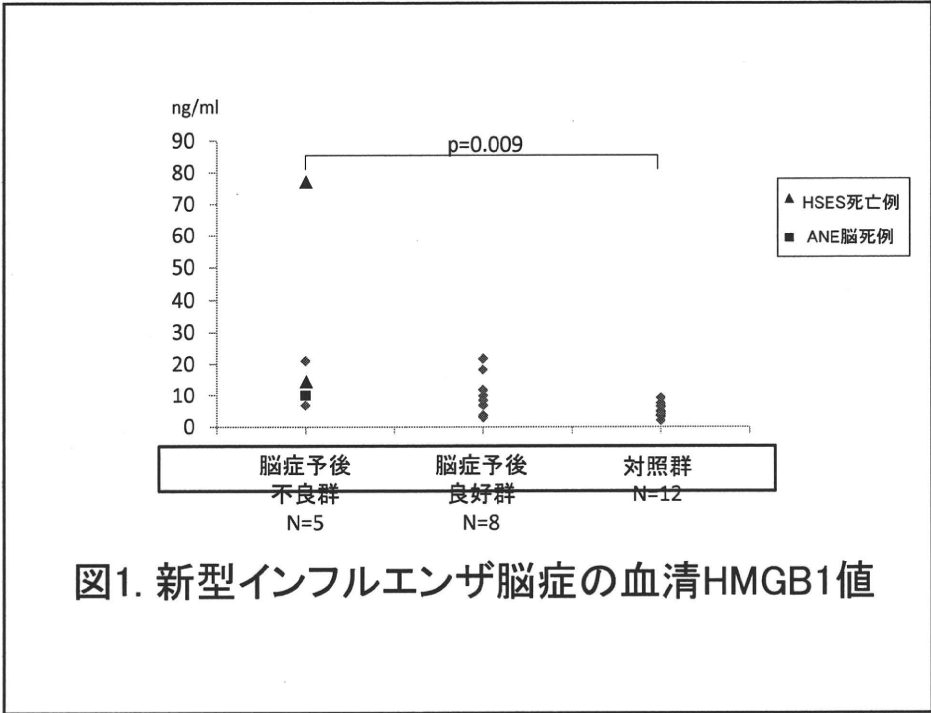
なし

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(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

重症肺炎・急性脳症を合併した 2009 H1N1 インフルエンザ小児例における サイトカインを中心とした炎症性分子の検討

分担研究者 伊藤 嘉規 名古屋大学医学部小児科学・講師

研究要旨 2009 H1N1 インフルエンザの重症合併症(重症肺炎・急性脳症)の病態について検討する目的で、2009 H1N1 インフルエンザインフルエンザ91例(重症肺炎群34例、急性脳症群5例、急性脳症+重症肺炎合併群6例、合併症のないインフルエンザ群(対照群)46例)について、急性期の髄液・血清検体中の27種類のサイトカインおよび血清中のhigh mobility group box-1 (HMGB1)濃度を測定した。その結果、Th2サイトカインは重症肺炎の病態に特徴的であり、HMGB1はこれらのサイトカイン産生の重要な因子であることが示唆された。さらに、急性脳症合併例では、血清中のサイトカイン濃度と髄液中のサイトカイン濃度は異なるプロファイルであり、重症、異なる発症機序によると考えられた。

A. 研究目的

平成21年8月頃から流行したいわゆる新型インフルエンザ(2009 H1N1)では、流行の拡大に伴って、重症肺炎・急性脳症の報告が増大した。2009 H1N1 インフルエンザに伴う急性脳症は小児科領域での患者の割合が多く、治療法の確立のために病態の解明が重要な課題である。これまで季節性インフルエンザに伴う急性脳症において炎症性サイトカインが病態に影響していると報告されており、昨年度は、2009 H1N1 インフルエンザ脳症の急性期の髄液・血清のペア検体を用いて、炎症性サイトカインの濃度を測定し、病態の解析を試みた。今回は、さらに重症肺炎合併例を加え、髄液・血清中のサイトカイン濃度を網羅的に解析した。さらに、サイトカイン産生を誘導する物質である、high mobility group box-1 (HMGB1)を測定し、サイトカイン濃度との関連を比較した。

B. 研究方法

- 2009-10 シーズンに 2009 H1N1 インフルエンザに感染した小児91例を4群(重症肺炎群34例、急性脳症群5例、急性脳症+重症肺炎合併群6例、合併症のないインフルエンザ群(対照群)46例)に分類し、急性期の血清・髄液検体(髄液は脳症例のみ)を用いた。
- 上記検体中の27種類のサイトカイン(IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Basic FGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1,

MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF)の濃度を Bio-plex suspension array system (BIO-RAD) にて測定した。

- 1の血清検体中の high mobility group box-1 (HMGB1)濃度を ELISA キット(シノテスト)により測定した。
- 各サイトカインの健常成人における血清濃度は、IL-1 β < 10 pg/mL; IL-1ra 85.6-660 pg/mL; IL-2 < 15.6 pg/mL; IL-4 < 3.02 pg/mL; IL-5 < 7.8 pg/mL; IL-6 < 4.0 pg/mL; IL-8 < 2.0 pg/mL; IL-10 5.0 pg/mL; IL-12 p70 < 3.15 pg/mL; IL-13 < 28.6 pg/mL; G-CSF < 5.78-27.5 pg/mL; GM-CSF < 2.0 pg/mL; IFN- γ < 0.1 pg/mL; TNF- α , 0.6-2.8 pg/mL; MCP-1 < 149 pg/mL; HMGB1, 検出限界未満。他のサイトカイン及び髄液中のサイトカインについては健常人の濃度は不明。
- 測定した27種類のサイトカイン濃度を4群間で比較した。また、血清中のサイトカイン濃度とHMGB1濃度の相関について解析した。

C. 研究結果

- 対照群と比較して、重症肺炎群において、Th1サイトカイン、Th2サイトカインを含む16種類のサイトカインに有意な上昇を認めた(図1)。
- 急性脳症群では RANTES が、急性脳症+重症肺炎合併群では、RANTES および

Eotaxin が対照群と比較して有意に上昇していた(図1)。

3. HMGB1は重症肺炎群と急性脳症+重症肺炎合併群において有意な上昇がみられた。(図2)。
4. HMGB1と10種類のサイトカイン濃度に有意な相関を認めた。この10種類中、7種類(IL-1ra, IL-5, IL-12 p70, IL-15, eotaxin, TNF- α , VEGF)が、3において、重症肺炎群で有意な上昇を認めたサイトカインであった(図3)。
5. 血清中のサイトカイン濃度と髄液中のサイトカイン濃度は異なるプロファイルであった(図4)。

D. 考察

Th2 サイトカインの上昇は、マウスの実験系で2009 H1N1 インフルエンザに特徴的であることが報告され、本研究で同様の結果が得られたことから、病態に深く関与していると考えられた。急性脳症群と急性脳症+重症肺炎合併群において RANTES が有意に上昇していたことは新たな発見であり、脳症の発症に関与する因子として今後さらなる検討が必要である。HMGB1 は最近新たに発見された炎症性メディエーターであり、通常は核内に局在し転写調節因子として機能する一方で、核外に放出されると RAGE などの受容体を介して炎症を起こす。今回 HMGB1 が重症例で上昇し、炎症性サイトカインと相関がみられたことから、重症化のバイオマーカー、そして治療のターゲットとして注目していくべき分子であると考えられた。

急性脳症例の髄液中のサイトカイン濃度の検討では、病態を十分に説明できる結果を得られなかった。血清中のサイトカイン濃度分布と異なる結果となり、合併症に至る機序が異なると考えられた。

E. 結論

2009 H1N1 インフルエンザの小児例において、急性期の髄液・血清検体における27種類のサイトカインと HMGB1 の濃度を比較した。Th2 サイトカインは重症肺炎の病態に特徴的であり、HMGB1 はこれらのサイトカイン産生の重要な因子であることが示唆された。さらに、重症肺炎と急性脳症の合併は、異なる機序によると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients

with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol* 91(1):42-50, 2010

- 2) Funahashi Y, Iwata S, Ito Y, Kojima S, Yoshikawa T, Hattori R, Gotoh M, Nishiyama Y, Kimura H. Multiplex Real-time PCR Assay for Quantifying BK Polyomavirus, JC Polyomavirus, and Adenovirus DNA Simultaneously. *J Clin Microbiol* 48(3):825-30, 2010
- 3) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Nakamura T, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, Kimura H. Immunologic and Virologic Analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients with Chronic High Epstein-Barr Viral Loads. *J Infect Dis* 202(3):461-9, 2010
- 4) Kawabe S, Ito Y, Ohta R, Sofue A, Gotoh K, Morishima T, Kimura H. Comparison of the levels of human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA and cytokines in the cerebrospinal fluid and serum of children with HHV-6 encephalopathy. *J Med Virol* 82(8):1410-5, 2010
- 5) Ito Y, Takakura S, Ichiyama S, Ueda M, Ando Y, Matsuda K, Hidaka E, Nakatani K, Nishioka J, Nobori T, Sasaki M, Kimura H. Multicenter Evaluation of Prototype Real-time PCR Assays for EBV and CMV DNA in Whole Blood Samples from Transplant Recipients. *Microbiol Immunol* 54(9): 516-22, 2010.
- 6) Gotoh K, Ito Y, Suzuki E, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, Kimura H. Effectiveness and safety of inactivated influenza vaccination in pediatric liver transplant recipients over three influenza seasons. *Pediatr Transplant* 15(1): 112-6, 2011
- 7) Hoshino Y, Nishikawa K, Ito Y, Kuzushima K, Kimura H. Kinetics of Epstein-Barr Virus Load and Virus-Specific CD8+ T Cells in Acute Infectious Mononucleosis. *J Clin Virol* 50(3): 244-46, 2011
- 8) Harai T, Kanegane H, Ito Ya, Ito Yo, Miyawaki T. Acute cerebellar ataxia associated with primary Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Int in press*
- 9) Iwata S, Yano S, Ito Y, Ushijima Y, Gotoh K, Kawada J, Fujiwara S, Sugimoto K, Isobe Y, Nishiyama Y, Kimura H. Bortezomib induces apoptosis in T lymphoma cells and natural killer lymphoma cells independent of Epstein-Barr virus infection, *Int J Cancer in press*
- 10) Ohta R, Torii Y, Imai M, Kimura H, Okada N, Ito Y. Serum concentrations of

- complement anaphylatoxins and proinflammatory mediators in patients with 2009 H1N1 influenza. *Microbiol Immunol* in press.
11. Ikeno M, Okumura A, Ito Y, Abe S, Saito M, Shimizu T. Late-Onset Sensorineural Hearing Loss Due to Asymptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection Retrospectively Diagnosed by Polymerase Chain Reaction Using Preserved Umbilical Cord. *Clin Pediatr* in press.
 - 12) 森島恒雄、岡部信彦、中村祐輔、河岡義裕、山口清次、水口雅、市山高志、長谷川秀樹、奥村彰久、伊藤嘉規、河島尚志、新矢恭子、塚原功一、中野貴司、塩見正司、鍵本聖一、布井博幸、和田智顕、植田育也、山内秀雄、栗原まな、宮崎千明、山田至康、坂下裕子、岩田力、大平雅之、阪井裕一、中村通子、宮澤会美香、吉川秀人、渡部誠一. インフルエンザ脳症ガイドライン(改訂版)(解説). *小児感染免疫* 21:421-66 2010
2. 学会発表
- 1) 1) 後藤研誠、伊藤嘉規、太田里永子、河邊慎司、岩田誠子、木村宏、生体肝移植後に高EBV-DNA血症が持続する小児11例の検討、第20回EBウイルス感染症研究会、東京、2010.3.6
 - 2) 原紳也、鈴木高子、伊藤祐史、野坂宣之、会津研二、清水聖子、藤巻英彦、牛田肇、木戸真二、伊藤嘉規、EBV関連二相性痙攣と遅発性拡散能低下を呈する急性脳症(AESD)の1例、第25回東海ヘルペス群ウイルス感染症研究会、名古屋、2010.3.13
 - 3) 河邊慎司、後藤研誠、伊藤嘉規、岩田誠子、山内洋平、西山幸廣、木村宏、Flow cytometric in situ hybridization法によるEBV感染細胞の迅速定量・同定法の確立とEBV関連疾患への臨床応用、第25回東海ヘルペス群ウイルス感染症研究会、名古屋、2010.3.13
 - 4) 河邊慎司、伊藤嘉規、後藤研誠、岩田誠子、小島勢二、木村宏、Flow cytometric in situ hybridization法を用いたEBV感染症の非侵襲的診断、第113回日本小児科学会学術集会、盛岡、2010.4.23-25
 - 5) 後藤研誠、伊藤嘉規、鳥居ゆか、河邊慎司、小島勢二、鈴木英太郎、木村宏、小児生体肝移植例における季節性インフルエンザワクチンの有用性、第113回日本小児科学会学術集会、盛岡、2010.4.23-25
 - 6) 河邊慎司、伊藤嘉規、後藤研誠、鳥居ゆか、岩田誠子、西山幸廣、木村宏、Flow cytometric in situ hybridization法による非侵襲感染細胞定量/同定法のEBV関連疾患への臨床応用、第25回ヘルペスウイルス研究会、浜松、2010.5.27-29
 - 7) 岩田誠子、斎藤高志、牛島洋子、伊藤嘉規、川田潤一、西山幸廣、木村宏、EBV関連T/NKリンパ腫株に対するHDAC阻害剤の効果と作用機序、第25回ヘルペスウイルス研究会、浜松、2010.5.27-29
 - 8) 伊藤嘉規、インフルエンザの治療戦略、愛知県インフルエンザセミナー、名古屋、2010.9.25
 - 9) 鈴木道雄、伊藤嘉規、河野好彦、鳥居ゆか、河邊慎司、木村宏、特異な経過によりキャリア化したgenotype AeによるB型肝炎ウイルス母子感染例、第14回東海小児感染症研究会、2010.10.9
 - 10) 岩田誠子、牛島洋子、伊藤嘉規、川田潤一、西山幸廣、木村宏、EBV関連T/NKリンパ腫におけるバルプロ酸の効果と作用機序、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.11.7-9
 - 11) 鳥居ゆか、伊藤嘉規、太田里永子、河野好彦、原紳也、吉川哲史、西村直子、尾崎隆男、木村宏、重症肺炎・急性脳症を合併した新型インフルエンザ小児例における炎症性メディエーターの検討、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.11.7-9
 - 12) 河邊慎司、伊藤嘉規、後藤研誠、岩田誠子、西山幸廣、木村宏、Flow cytometric in situ hybridization法によるウイルス感染細胞同定/定量法のEBV関連T/NKリンパ増殖性疾患への臨床応用、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.11.7-9
 - 13) 後藤研誠、伊藤嘉規、丸尾聖爾、高田賢藏、岩田誠子、五島典、木村宏、ヒトリンパ組織を用いたEpstein-Barr Virus感染モデルの確立とその応用、第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.11.7-9
 - 14) 鳥居ゆか、伊藤嘉規、河野好彦、原紳也、松本正、乾あやの、吉川哲史、西村直子、尾崎隆男、木村宏、重症肺炎・急性脳症を合併した新型インフルエンザ小児例における炎症性メディエーターの検討、第42回日本小児感染症学会総会学術集会、仙台、2010.11.27-28

- 15) 河邊慎司、伊藤嘉規、後藤研誠、木村宏、FISH 法によるウイルス感染細胞同定／定量法の慢性活動性 EB ウイルス感染症への臨床応用、第 42 回日本小児感染症学会総会学術集会、仙台、2010.11.27-28
- 16) 川田潤一、岩田直美、伊藤嘉規、メソトレキセートを含む多剤併用療法を行った関節型若年性特発性関節炎患者における EB ウイルスの再活性化の検討、第 42 回日本小児感染症学会総会学術集会、仙台、2010.11.27-28
- 17) 鳥居ゆか、伊藤嘉規、越知信彦、後藤研誠、河邊慎司、木村宏、肝移植後小児例における新型インフルエンザワクチンの有効性・安全性に関する検討、第 42 回日本小児感染症学会総会学術集会、仙台、2010.11.27-28
- 18) 伊藤嘉規、鳥居ゆか、河邊慎司、河野好彦、木村宏、B 型肝炎ウイルスキャリアとなった小児 19 例における感染要因の検討、第 42 回日本小児感染症学会総会学術集会、仙台、2010.11.27-28
- 19) 鳥居ゆか、伊藤嘉規、木村宏、生体肝移植後小児への新型インフルエンザワクチンの接種経験、第 14 回日本ワクチン学会学術集会、東京、2010.11-12
- 20) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Kimura H. Immunologic and Virologic Analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients with Chronic High Epstein-Barr Viral Loads, 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases, Birmingham, UK, 2010.9.4-8
- 21) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Iwata S, Nishiyama Y. Noninvasive identification of EBV-infected lymphocyte subtypes in EBV-associated T/NK lymphoproliferative diseases, 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases, Birmingham, UK, 2010.9.4-8
- 22) Kawada J, Iwata S, Yano S, Ushijima Y, Gotoh K, Ito Y, Fujiwara S, Sugimoto K, Isobe Y, Nishiyama Y, Kimura H. Bortezomib Induces Apoptosis in T Lymphoma Cells and Natural Killer Lymphoma Cells Independent of Epstein-Barr Virus Infection, 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases, Birmingham, UK, 2010.9.4-8
- 23) Hara S, Nosaka N, Kimura H, Ito Y. Acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion associated with Epstein-Barr virus, 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases, Birmingham, UK, 2010.9.4-8
- 24) Suzuki R, Kimura H, Ito Y, Kwong YL, Maeda Y, Hashimoto C, Kim WS, Suh C, Izutsu K, Ishida F, Yamaguchi M, Suzumiya J, Hyo R, Nakamura S, Oshimi K and NK-Cell Tumor Study Group(NKTSG). Pretreatment EBV-DNA Copy Number Is Predictive for Response to SMILE Chemotherapy for Newly-Diagnosed Stage IV, Relapsed or Refractory Extranodal NK/T-Cell Lymphoma, Nasal Type Results of NKTSG Phase Study, 52nd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orland, USA, 2010.12.4-7
- 25) Y. Ito, Y Torii, R. Ohta, M. Imai, H. Kimura, Increased levels of cytokines and high-mobility group box 1 are associated with the development of severe pneumonia, but not acute encephalopathy, in 2009 H1N1 influenza-infected children, Cell Symposia Influenza: Translating basic insights, Washington DC, USA, 2010.12.2-5

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

「生体マーカーを用いた脳炎・脳症患者の病態評価」

研究分担者 塚原宏一、藤井洋輔、斎藤有希恵、長岡義晴、八代将登、山下信子、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)

研究協力者: 林 優子(岡山大学医学部学生)、山本倫子、吉本順子(岡山大学医学部小児医科学)

川谷正男(福井大学医学部小児科)、松原康策(西神戸医療センター小児科)、長坂博範(宝塚市立病院小児科)

研究要旨

小児の脳炎・脳症患者において急性期に脳脊髄液・血清中の脳障害マーカー、酸化ストレスマーカーを計測した結果と臨床経過・予後の関連性を調べることで、後遺症発現の予測や治療効果の判定に有用な手段になるかどうか検討した。

結果: 急性期における脳脊髄液 S100B、脳脊髄液・血清 Tau、脳脊髄液 GFAP、とりわけ、S100B、Tau、GFAP の点数表示(最低0点～最高9点)とそれによる重症度評価は、病初期に予後を推定するための有用な手段になる可能性が示された。FRAS-4 を用いた血清ヒドロペルオキシド濃度の迅速計測は酸化ストレス度を鋭敏に検出し、とりわけ急性疾患やけいれん重積状態で高値を呈する傾向を示した。

結論: 小児の脳炎・脳症患者において急性期に脳脊髄液・血清中の生体マーカーを計測して、後遺症発現の予測や治療効果の判定に有用と考えられる手段を見つけ出すことができた。今後、症例数を増やしてさらに検討を続ける予定である。

A. 研究目的

本研究の目的は、小児の脳炎・脳症患者において急性期に脳脊髄液・血清中の脳障害マーカー、酸化ストレスマーカーを計測した結果と臨床経過・予後の関連性を調べることで、後遺症発現の予測や治療効果の判定に有用な手段を見つけ出すことである。

B. 研究方法

<研究 1>

計測された脳障害マーカーは脳脊髄液 S100B(BioVendor Human S100B ELISA)、脳脊髄液・血清 Tau(Invitrogen Human Tau ELISA)、脳脊髄液 GFAP(SPI bio Human GFAP ELISA)であった。S100B、GFAP はグリア細胞障害、Tau は神経細胞障害のマーカーである。結果はpg/ml 単位で表され(結果が測定感度未満の場合は最小感度の 1/2 値を用いた)、対数(Log₁₀)変換した値が統計学的解析に用いられた。2 群間の比較は t 検定が用いられ、P < 0.05 で有意と判定された

<研究 2>

前年度の研究の続きである。今回、計測された酸化ストレスマーカーは血清中ヒドロペルオキシド(過酸化された脂質、タンパク質、アミノ酸、核酸で体内の「酸化ストレス度」を表す)(Diacron 社製 FRAS-4)であった。単位は U CARR (= 0.08 mg/dl H₂O₂)であり、酸化ストレス度は 320 U CARR 以上で亢進、500 U CARR 以上で著明な亢進と判定された。

<倫理面への配慮>

被験者の保護者に研究の目的と内容を詳しく説明し、同意が得られた方のみを対象にした。検体はすべて暗号で表示しなおしてから検査を開始した。データ保存についても個人が特定されないように十分に配慮した。

C. 研究結果

<研究 1>

(1) 急性脳炎・脳症群と対照群の比較

急性脳炎・脳症と診断された 19 例(平均 5 歳、M/F = 9/10)、対照群 6 例(平均 3 歳、M/F = 3/3)の脳脊髄液を計測した。脳脊髄液 S100B、Tau において脳炎・脳症群で高い傾向

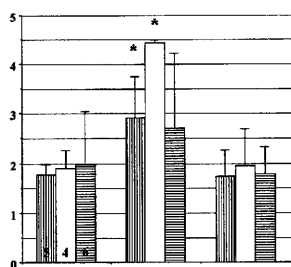
が見られたが、有意差は認められなかった。対数変換後の平均値は脳脊髄液 S100B で 2.1 vs. 1.8、脳脊髄液 Tau で 2.7 vs. 1.9、脳脊髄液 GFAP で 2.0 vs. 2.0 であった。

(2) 急性脳炎・脳症群における後遺症群と非後遺症群の比較

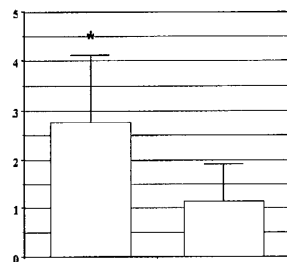
脳炎・脳症群 19 例の中で経過の詳細を把握できた 16 例(インフルエンザ: 6 例、HHV6: 3 例、EV71: 1 例、HSV: 1 例、原因ウイルス不明: 5 例)を後遺症の有無(後遺症あり: 5 例(死亡 1 例を含む)、平均 5 歳、M/F = 3/2; 後遺症なし: 11 例、平均 5 歳、M/F = 5/6)で比較検討した。2 群間で白血球、血小板、AST、CRP、脳脊髄液細胞数・蛋白濃度に有意差は見られなかった。後遺症群ではいずれの生体マーカーも高く、脳脊髄液 S100B、脳脊髄液・血清 Tau で有意差が認められた。対数変換後の平均値は脳脊髄液 S100B で 2.9 vs. 1.7(P < 0.005)、脳脊髄液 Tau で 4.4 vs. 2.0(P < 0.001)、脳脊髄液 GFAP で 2.7 vs. 1.8(図 1)、血清 Tau で 2.8 vs. 1.1(P < 0.05)であった(図 2)。

(3) 脳脊髄液マーカーの点数表示とそれによる重症度評価

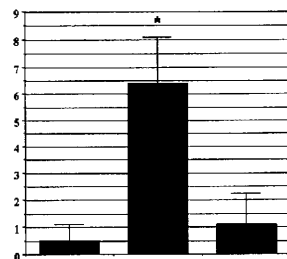
脳脊髄液 S100B、Tau、GFAP について対数変換した値が対照群の平均+1SD~+2SD で 1 点、平均+2SD~+3SD で 2 点、平均+3SD 以上で 3 点として各患者でその総和(最低 0 点~最高 9 点)を求めると、対照群は 0~1 点(平均 0.5 点)、後遺症群は 4~8 点(平均 6.4 点)、非後遺症群は 0~3 点(平均 1.1 点)であり、後遺症群は対照群、非後遺症群よりも有意に高値を示した(ともに P < 0.001)。対照群と非後遺症群の間には有意差は認められなかったが、2 点以上であったのが非後遺症群で 3 名いて、対照群にはいなかった(図 3)。



(図 1: 3 群は左より対照群・後遺症群・非後遺症群、各群において棒グラフは左より脳脊髄液 Log [S100B]、脳脊髄液 Log [Tau]、脳脊髄液 Log [GFAP] の平均・SD である)



(図 2: 左より後遺症群・非後遺症群、血清 Log [Tau]の平均・SD である)



(図 3: 左より対照群・後遺症群・非後遺症群、脳脊髄液マーカーの点数表示の平均・SD である)

<研究 2>

前年度の研究の続きである。血清 NOx、ADMA、8-OHdG、脳脊髄液 acrolein-lysine 濃度の高値基準は下記の通りであった。

- ・血清 NOx $\geq 67.9 \mu\text{M}$
- ・血清 ADMA $\geq 0.84 \mu\text{M}$
- ・血清 8-OHdG $\geq 0.30 \text{ ng/ml}$
- ・脳脊髄液 Acrolein-lysine (ACR) $\geq 7.0 \mu\text{M}$

(Tsukahara, et al. Redox Rep 2000; Tsukahara, et al. Life Sci 2002)

「早期メチルプレドニゾロンパルスが無効であった痙攣重積型 HHV-6 脳症の 1 歳女兒」(岩田、松原、他、小児神経学会、米子、2009)は、入院前日に発熱して約 3 分間の全身痙攣をきたし、入院当日に再び全身痙攣をきたしてジアゼパム、チアミラール静注により約 40 分後に頓挫した患者である。入院当日、頭部 CT、髄液検査で異常所見はなかった。血液中に HHV-6 が $4.8 \times 10^3 \text{ copies/ml}$ で検出された。入院日よりメチルプレドニゾロンパルス療法を施行したが、入院 5 日目の MR 拡散強調画像で前頭葉・頭頂葉白質に高信号領域(bright tree appearance)、EEG で全般性に高振幅徐波が見られ、その後、脳萎縮と著明な発達遅滞をきたした。入院当日の血清 NOx、ADMA、8-OHdG、脳脊髄液-ACR は

21.7 μ M、1.18 μ M(高値)、0.46 ng/ml(高値)、7.8 μ M(高値)、入院 5 日目の血清 NO_x、ADMA、ヒドロペルオキシド、脳脊髄液-ACR は 27.7 μ M、0.77 μ M、416 U CARR(高値)、13.7 μ M(高値)、入院 16 日目の血清 NO_x、ADMA、ヒドロペルオキシド濃度は 43.8 μ M、0.80 μ M、629 U CARR(著明高値)、入院 30 日目の血清 NO_x、ADMA、ヒドロペルオキシド濃度は 95.8 μ M(高値)、1.23 μ M(高値)、941 U CARR(著明高値)であった。

その他の患者の血清 NO_x、ADMA 濃度(ともに μ M)、ヒドロペルオキシド濃度(U CARR)を示す(全例、脂肪酸代謝異常スクリーニング検査で異常を示さず、抗水チャンネル 4 抗体を有するものもいなかった)。

- ・ADEM(13 歳女性): 27.3、0.56、277
- ・脳出血(11 月女性): 32.6、0.51、463(高値)
- ・無菌性髄膜炎(3 歳男性; 9 歳男性): 13.2、0.57、587(著明高値); 9.5、0.68、398(高値)
- ・けいれん重積を伴うてんかん(4 歳男性; 7 歳男性; 7 歳男性): 69.7(高値)、0.66、382(高値); 36.4、0.57、341(高値); 78.4(高値)、0.77、415(高値)
- ・けいれん重積を伴わないてんかん(13 歳女性): 25.6、0.53、287
- ・点頭てんかん(6 月女性): 54.6、0.76、169
- ・胃腸炎関連けいれん(1 歳男性): 67.9(高値)、0.52、376(高値)
- ・熱性けいれん(1 歳男性; 1 歳女性; 2 歳女性): 62.4、0.81、511(著明高値); 19.0、0.66、537(著明高値); 22.5、0.55、377(高値)
- ・A 型インフルエンザ(せん妄)(13 歳男性): 13.2、0.45、318
- ・急性脳症(1 歳男性): 68.1(高値)、0.48、537(著明高値)

D. 考察

<研究 1>

急性期における脳脊髄液 S100B、脳脊髄液・血清 Tau、脳脊髄液 GFAP、とりわけ、S100B、Tau、GFAP の点数表示とそれによる重症度評価は、小児の脳炎・脳症において病初期に予後を推定するための有用な手段になる可能性が示された。

<研究 2>

今回行った FRAS-4 を用いた血清ヒドロペルオキシド濃度計測は 5 分程度で結果を得ることができる。今回の検討では、血清ヒドロペルオキシドは酸化ストレス度を鋭敏に検出するマーカーであり、とりわけ急性疾患やけいれん重積状態で高値を呈する傾向を示した。

E. 結論

小児の脳炎・脳症患者において急性期に脳脊髄液・血清中の生体マーカーを計測して、後遺症発現の予測や治療効果の判定に有用と考えられる手段を見つけ出すことができた。今後、症例数を増やしてさらに検討を続ける予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nagasaka H, Okano Y, Aizawa M, Miida T, Yorifuji T, Tajima G, Sakura N, Takatani T, Sanayama Y, Sugamoto K, Mayumi M, Kobayashi K, Hirano K, Takayanagi M, Tsukahara H. Altered metabolisms of mediators controlling vascular function and enhanced oxidative stress in asymptomatic children with congenital portosystemic venous shunt. *Metabolism* 59 (1): 107-113, 2010.
- (2) Tsukahara H, Nagasaka H. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous NO synthase inhibitor, in human breast milk. *Early Hum Dev* 86 (2): 69-70, 2010.
- (3) Tsukahara H, Nagasaka H, Tokuriki S, Mayumi M. Coupling of the citrulline recycling to endothelial NO production. *Mol Genet Metab* 99 (4): 438, 2010.
- (4) Kawatani M, Nakai A, Okuno T, Kobata R, Moriuchi M, Moriuchi H, Tsukahara H, Mayumi M. Detection of cytomegalovirus in preserved umbilical cord from a boy with autistic disorder. *Pediatr Int* 52 (2): 304-307, 2010.
- (5) Kawatani M, Tsukahara H, Mayumi M. Evaluation of oxidative stress status in children with pervasive developmental disorder and attention deficit hyperactivity disorder using urinary-specific biomarker. *Redox Rep* (in press).
- (6) 塚原宏一. 窒素(N)と酸素(O)の化学・生物学. *日本臨床高気圧酸素・潜水医学会雑誌* 7 (1): 1-8, 2010.
- (7) 塚原宏一. ホタル(火垂る)物語と Mitochondria そして NO、REDOX. *発達腎研究会誌* 18 (1): 1-2, 2010.
- (8) 塚原宏一, 吉本順子, 眞弓光文, 長坂博範. 小児科領域における一酸化窒素および酸化ストレスに関連する生体マーカーの現況. *発達腎研究会誌* 18 (1): 23-28, 2010.
- (9) 長坂博範, 塚原宏一. 先天性代謝疾患と一酸化窒素、酸化ストレス. *発達腎研究会誌* 18 (1): 29-36, 2010.

2. 学会発表

<講演>

(1) 塚原宏一, 川崎病の血管障害マーカー.
第6回岡山川崎病研究会, 岡山, 2010年(10月).

(2) 塚原宏一, 酸化ストレスマーカーの臨床と研究: 小児科領域における臨床的意義.
島根大学医学部附属病院小児科セミナー, 島根, 2010年(12月).

<一般口演>

(1) 山下信子, 津下 充, 斉藤有希恵, 長岡義晴, 藤井洋輔, 八代将登, 塚原宏一, 森島恒雄. 2009 新型インフルエンザの宿主遺伝子発現の検討. 第62回中国四国小児科学会, 広島, 2010年(10月).

(2) 山下信子, 斉藤有希恵, 津下 充, 藤井洋輔, 長岡義晴, 八代将登, 塚原宏一, 森島恒雄. 2009 新型インフルエンザにおける宿主遺伝子発現 - DNA マイクロアレイによる解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010年(11月).

(3) 八代将登, 藤井洋輔, 斉藤有希恵, 長岡義晴, 山下信子, 塚原宏一, 松川明博, 森島恒雄. インフルエンザ感染におけるレドックス制御蛋白チオレドキシシン(TRX)の役割. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010年(11月).

(4) 長岡義晴, 斉藤有希恵, 藤井洋輔, 八代将登, 山下信子, 塚原宏一, 森島恒雄. 新型インフルエンザ脳症と季節型インフルエンザ脳症の臨床像の比較. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010年(11月).

(5) 長坂博範, 塚原宏一, 岡野善行, 真山義民. 成人フェニールケトン尿症患者30名の栄養と骨代謝. 第28回小児代謝性骨疾患研究会, 大阪, 2010年(12月).

G. 知的所有権の取得状況

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

新型インフルエンザにおける宿主遺伝子発現の検討

～DNA マイクロアレイによる解析～

研究分担者 森島恒雄 岡山大学大学院小児医科学 教授
研究協力者 山下信子 岡山大学病院 助教

研究要旨

【目的】2009 新型インフルエンザ(2009 H1N1pdm)による呼吸器症状（肺炎）と中枢神経症状（けいれん、意識障害）が認められた患者の全血遺伝子プロファイルを検討することで、病態に関与する主な遺伝子を推測する。

【方法】2009 新型インフルエンザ罹患者のうち、(1) 肺炎群（5 名）、(2) 中枢神経症状群（6 名）、(3) コントロール群(5 名) の 3 群で、末梢血の遺伝子発現を検討した。アレイは Human Genome U133 Plus 2.0 gene chip array (Affymetrix) を使用し、それぞれの患者における（急性期／回復期）の比を用いて、発現強度を比較した。

【結果】複数の Transcript で発現に有意差が存在した遺伝子について概説する。肺炎群・中枢神経症状群で共に上昇していた遺伝子として、Contactin associated protein like 3 (CNTNAP3), Oleoyl-ACP hydrolase (OLAH)、IL-1 type 1 receptor (IL1R)があげられた。また肺炎群では alkaline phosphatase (ALP), Fc fragment of IgA (FCAR), Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACSL1)、Phospholipid scramblase 1(PLSCR1)、Superoxide dismutase 2 (SOD2)、中枢神経症状群では Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2)と Alpha-synuclein (SNCA) の上昇が特徴的であった。有意に低下していた遺伝子は、肺炎群で Chemokine (C motif) ligand 1(XCL1), Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57^{Kip2}) であった。この発現低下は回復期の上昇を反映していると推測された。GO 解析では ‘innate immune response’ や ‘response to lipopolysaccharide’ 関連カテゴリーが両群で共通して上昇し、‘T cell activation’ や ‘mRNA processing’ 関連カテゴリーが肺炎群で低下していた。

【結論】全血遺伝子プロファイルであっても、有意差が認められた遺伝子の中に、2009 H1N1pdm の臨床症状と関連が示唆されるものが存在した。特に中枢神経症状群の PTGS2 と SNCA の発現の上昇、肺炎群の FCAR や SOD2 などが、病態を考える上で興味深いと考えられた。

A. 研究目的

2009 新型インフルエンザ (2009H1N1pdm) には、気管支喘息・肺炎・呼吸窮迫症候群などの呼吸器症状を多く認めるという臨床的な特徴があった。一方で、インフルエンザ脳症も季節型インフルエンザと同頻度で認められた。本研究の目的は、臨床症状別の宿主遺伝子プロファイルを検討することによって、症状発現に関わる遺伝子を推測するというものである。

B. 研究方法

2009H1N1pdm 罹患者のうち、(1) 肺炎群 (5 名、4~7 歳)、(2) 中枢神経症状群 (6 名、3~9 歳、けいれん and/or 意識障害)、(3) コントロール群 (5 名、8~10 歳、2009H1N1pdm に感染したが合併症なく治癒した者) の 3 群で、末梢血の遺伝子発現を検討した。全症例、オセルタミビルで加療されており、後遺症なく治癒している。

患者の末梢血全血にて検討した。RNA 抽出には Paxgene Blood RNA System Kit (Qiagen)、cRNA 合成には a one-cycle target labeling kit (Affymetrix) を使用した。アレイは Human Genome U133 Plus 2.0 gene chip array (Affymetrix) を使用し、それぞれの患者における (急性期/回復期) の比を用いて、発現強度を比較した。コントロール群では、発症後 1 週間で回復期採血を行っている。解析ソフトウェアとして Subio platform software (Subio Inc., Japan) と、GO 解析には DAVID 6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) を使用した。

C. 研究結果と考察

(1) 発現が上昇していた遺伝子

発現が 2 倍以上、有意に上昇していた遺伝子は中枢神経群で 352 遺伝子、肺炎群で 523 遺伝子あった。このうちの上位 20 を Table 1 に示す。複数

の Transcript で上昇が確認された遺伝子について概説する。中枢神経症状群と肺炎群に共通していた主な遺伝子として、Contactin associated protein like 3 (CNTNAP3、血管内皮細胞に発現)、Oleoyl-ACP hydrolase (OLAH、オレイン酸代謝)、IL-1 type 1 receptor (IL1R) があげられた。肺炎群で上昇していたものは、alkaline phosphatase (ALP、好中球アルカリフォスファターゼと共通)、Fc fragment of IgA (FCAR、気道粘膜の IgA 産生に関与)、Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACSL1)、Phospholipid scramblase 1 (PLSCR1、IFN 産生に関与)、Superoxide dismutase 2 (SOD2) があげられた。中枢神経症状群で上昇していた遺伝子は、Prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2) と Alpha-synuclein (SNCA、中枢神経内の炎症と関連、パーキンソン病レビー小体の構成蛋白) であった。

(2) 発現が低下していた遺伝子

発現が 2 倍以下に有意に低下していた遺伝子は、肺炎群では 3625 遺伝子存在したが、中枢神経症状群では非常に少なかった。発現低下していた遺伝子の Top20 を Table 2 に示す。複数の transcript で低下が確認された遺伝子として、Chemokine (C motif) ligand 1 (XCL1、気管支喘息の気道過敏性と関連)、cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57^{Kip2}) (CDKN1C、低酸素血症と関連) が、臨床症状との関連が示唆されるものであった。Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for (FCER1A) と Histamine receptor H4 (HRH4) といった遺伝子は、フラグの関係で単一の transcript でしか評価することはできていないが、肺炎患者のアレルギー素因との関連が示唆された。

(3) GO 解析

発現が上昇していた遺伝子群に対する GO 解析の結果を Table 3 に示す。中枢神経群と肺炎群で共通している GO category が多く含まれていた。

肺炎群で発現が低下していた遺伝子に対する GO 解析の結果を Table 4 に示す。T 細胞に関わる GO category と mRNA processing に関わる GO category が多いことが特徴としてあげられた。

D. 結語

2009H1N1pdm 罹患者の、末梢血全血の遺伝子プロファイルを臨床症状別に検討した。臨床症状と関連があると考えられるいくつかの遺伝子・遺伝子群について、有意差があることが示された。今後、これらの遺伝子の発現、機能解析を行っていく予定である。

E. 研究発表

1. 学会発表

Yamashita N, Tsuge M, Nagaoka Y, Yashiro M, Saito Y,

Fujii Y, Tsukahara H and Morishima T. Gene expression profiling in patients with respiratory or central nervous system manifestations during the 2009 H1N1 influenza infection. Option for the Control Influenza VII, 3-7 Sep. 2010

山下信子、他. 2009 新型インフルエンザにおける宿主遺伝子発現. 第 58 回日本ウイルス学会 2010 年 11 月 7-9 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

Table 1. Significantly up-regulated top 20 transcripts in patients with 2009 H1N1 influenza associated CNS symptoms or pneumonia

Probe ID	Fold Change (CNS group/ control group)	P-Value	Gene Symbol	Gene Title	Gene Ontology Biological Process
244065_at	29.1	0.0009	CNTNAP3B	Contactin associated protein-like 3B	Cell adhesion
223796_at	18.3	0.0125	CNTNAP3	Contactin associated protein-like 3	Cell adhesion
205239_at	13.8	0.0058	AREG	Amphiregulin	Epidermal growth factor receptor signaling pathway
212768_s_at	9.3	0.0203	OLFM4	Olfactomedin 4	Cell adhesion
206177_s_at	7.3	0.0313	ARG1	arginase, liver	Urea cycle
209185_s_at	6.4	0.0046	IRS2	insulin receptor substrate 2	Glucose metabolic process
206818_at	6.0	0.0118	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	Immune response
204748_at	6.0	0.0223	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Prostaglandin biosynthetic process
209960_at	5.8	0.0056	HGF	Hepatocyte growth factor	Activation of MAPK activity
214433_s_at	5.5	0.0068	SELENBP1	Selenium binding protein 1	Transport
233126_s_at	5.4	0.0020	OLAH	Oleoyl-ACP hydrolase	Fatty acid biosynthetic process
226884_at	5.3	0.0339	LRRN1	Leucine rich repeat neuronal 1	—
205592_at	5.0	0.0126	SLC4A1	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein)	Transport
204466_s_at	4.9	0.0073	SNCA	Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	Microglial cell activation
202948_at	4.8	0.0102	IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I	Immune response
1565673_at	4.6	0.0226	FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity Ila, receptor (CD32)	—
211573_x_at	4.6	0.0289	TGM2	Transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-	Induction of apoptosis
235564_at	4.5	0.0367	ZNF117	Zinc finger protein 117	transcription
204751_x_at	4.4	0.0192	DSC2	Desmocollin 2	Cell adhesion
1554997_a_at	4.3	0.0295	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Prostaglandin biosynthetic process
201941_at	4.2	0.0045	CPD	Carboxypeptidase D	Proteolysis
229460_at	4.1	0.0217	FAM126B	Family with sequence similarity 126, member B	—
219890_at	4.1	0.0278	CLEC5A	C-type lectin domain family 5, member A	Immune response
206209_s_at	4.1	0.0184	CA4	Carbonic anhydrase IV	One-carbon metabolic process
1553861_at	4.1	0.0056	TCP11L2	T-complex 11 (mouse)-like 2	—
205227_at	4.1	0.0302	IL1RAP	Interleukin 1 receptor accessory protein	Immune response

Continued

Pneumonia group

Probe ID	Fold Change (Pneu group/ control group)	P-Value	Gene Symbol	Gene Title	Gene Ontology Biological Process
1557924_s_at	31.4	0.0022	ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	Skeletal system development
244065_at	23.7	0.0013	CNTNAP3B	Contactin associated protein-like 3B	Cell adhesion
219975_x_at	15.6	0.0015	OLAH	Oleoyl-ACP hydrolase	Fatty acid biosynthetic process
223796_at	15.4	0.0156	CNTNAP3	contactin associated protein-like	Cell adhesion
206464_at	15.1	0.0022	BMX	BMX non-receptor tyrosine kinase	Protein amino acid phosphorylation
211307_s_at	13.8	0.0104	FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for	Immune response
206177_s_at	10.9	0.0038	ARG1	Arginase, liver	Urea cycle
206877_at	9.8	0.0022	MXD1	MAX dimerization protein 1	Transcription
1558549_s_at	9.1	0.0074	VNN1	Vanin 1	Acute inflammatory response
215783_s_at	9.0	0.0025	ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	Skeletal system development
207275_s_at	8.9	0.0113	ACSL1	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	Lipid metabolic process
225056_at	8.9	0.0204	SIPA1L2	Signal-induced proliferation-associated 1 like 2	Regulation of small GTPase mediated signal transduction
211372_s_at	8.7	0.0072	IL1R2	Interleukin 1 receptor, type II	Immune response
205403_at	8.6	0.0049	IL1R2	Interleukin 1 receptor, type II	Immune response
232629_at	8.4	0.0005	PROK2	Prokineticin 2	Activation of MAPK activity
201044_x_at	7.9	0.0030	DUSP1	Dual specificity phosphatase 1	Protein amino acid dephosphorylation
202948_at	7.6	0.0035	IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I	Immune response
228648_at	7.5	0.0023	LRG1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	Brown fat cell differentiation
233126_s_at	7.4	0.0338	OLAH	oleoyl-ACP hydrolase	Fatty acid biosynthetic process
230170_at	7.2	0.0024	OSM	oncostatin M	Acute inflammatory response

Table 2. Significantly down-regulated top 20 transcripts in patients with 2009 H1N1 influenza associated pneumonia

Down regulated genes

Measurement ID	Fold	P-Value	Gene Symbol	Gene Title	Gene Ontology Biological Process
214450_at	0.07	0.0024	CTSW	Cathepsin W	Proteolysis, immune response
211734_s_at	0.08	0.0004	FCER1A	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for;	Positive regulation of type I
229025_s_at	0.09	0.0024	IMP1L	IMP1 inner mitochondrial membrane peptidase-	Proteolysis
206366_x_at	0.10	0.0016	XCL1	Chemokine (C motif) ligand 1	Cellular calcium ion homeostasis
213906_at	0.11	0.0004	MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog	Transcription
213183_s_at	0.11	0.0048	CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	Regulation of cyclin-dependent protein
231929_at	0.11	0.0033	IKZF2	IKAROS family zinc finger 2 (Helios)	Transcription
221170_at	0.12	0.0018	HRH4	Histamine receptor H4	Inflammatory response
210321_at	0.12	0.0028	GZMH	Granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-	Proteolysis
207840_at	0.12	0.0061	CD160	CD160 molecule	Cellular defense response
213348_at	0.13	0.0015	CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	Regulation of cyclin-dependent protein
219423_x_at	0.13	0.0029	TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily,	Apoptosis
214567_s_at	0.13	0.0212	XCL1 /// XCL2	Chemokine (C motif) ligand 1 /// chemokine (C	Cellular calcium ion homeostasis,
206914_at	0.13	0.0004	CRTAM	Cytotoxic and regulatory T cell molecule	T cell mediated cytotoxicity
210607_at	0.13	0.0327	FLT3LG	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand	Signal transduction
228050_at	0.14	0.0107	UTP15	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein,	rRNA processing
216191_s_at	0.14	0.0013	TRA@ /// TRD@	T cell receptor alpha locus /// T cell receptor	Immune response
235165_at	0.14	0.0000	PAR6B	par-6 partitioning defective 6 homolog beta (C.	Protein complex assembly
210306_at	0.14	0.0100	L3MBTL	l(3)mbt-like (Drosophila)	Transcription
1566324_a_at	0.15	0.0049	MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma	Cytokine production

Table 3. Gene ontology analysis

Up-regulated GO terms in CNS group			Number of		Down-regulated GO terms in pneumonia group			Number of	
GO category			Genes in the discriminating gene list	p-value	GO category		Genes in the discriminating gene list	p-value	
Up-regulated GO terms in CNS group					Down-regulated GO terms in pneumonia group				
Enrichment score: 2.79					Enrichment score: 7.47				
BP	GO:0032498	response to lipopolysaccharide	9	6.2E-05	CC	GO:0031974	membrane-enclosed lumen	114	6.4E-11
BP	GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	9	1.4E-04	CC	GO:0031981	nuclear lumen	95	1.6E-10
BP	GO:0009617	response to bacterium	11	2.3E-03	CC	GO:0070013	intracellular organelle lumen	109	2.4E-10
Enrichment score: 2.65					CC	GO:0043233	organelle lumen	109	9.3E-10
CC	GO:0000267	cell fraction	34	1.0E-03	CC	GO:0005730	nucleolus	55	7.5E-09
CC	GO:0005626	insoluble fraction	27	2.9E-03	Enrichment score: 5.05				
CC	GO:0005624	membrane fraction	26	3.6E-03	BP	GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	22	9.5E-07
Enrichment score: 2.47					BP	GO:0034660	ncRNA metabolic process	24	4.3E-06
CC	GO:0005833	hemoglobin complex	5	3.9E-05	BP	GO:0016072	rRNA metabolic process	15	4.7E-06
MF	GO:0005344	oxygen transporter activity	4	1.3E-03	BP	GO:0006364	rRNA processing	14	1.4E-05
BP	GO:0015671	oxygen transport	4	1.4E-03	BP	GO:0034470	ncRNA processing	20	2.3E-05
BP	GO:0015669	gas transport	4	3.7E-03	Enrichment score: 4.65				
MF	GO:0019825	oxygen binding	5	6.7E-03	CC	GO:0030526	ribonucleoprotein complex	53	9.1E-13
Enrichment score: 2.46					BP	GO:0008412	translation	35	1.1E-08
BP	GO:0045087	innate immune response	11	1.7E-04	CC	GO:0005840	ribosome	26	6.3E-08
BP	GO:0006855	immune response	24	2.8E-03	MF	GO:0003735	structural constituent of ribosome	21	8.9E-07
BP	GO:0009611	response to wounding	19	6.1E-03	BP	GO:0006414	translational elongation	16	1.7E-06
BP	GO:0006852	defense response	21	6.3E-03	Enrichment score: 4.12				
BP	GO:0006954	inflammatory response	12	3.0E-02	BP	GO:0046649	lymphocyte activation	22	4.8E-06
Enrichment score: 2.24					BP	GO:0045321	leukocyte activation	24	1.0E-05
CC	GO:0031224	intrinsic to membrane	116	4.4E-03	BP	GO:0030098	lymphocyte differentiation	15	1.1E-05
CC	GO:0016021	integral to membrane	109	1.7E-02	BP	GO:0042110	T cell activation	16	2.7E-05
					BP	GO:002521	leukocyte differentiation	16	4.2E-05
					Enrichment score: 2.92				
					BP	GO:0006397	mRNA processing	26	1.2E-04
					BP	GO:0008380	RNA splicing	24	1.2E-04
					BP	GO:0016071	mRNA metabolic process	28	1.9E-04
					BP	GO:0003398	nuclear mRNA splicing, via spliceosome	16	2.5E-04
					BP	GO:0000375	RNA splicing, via transesterification react	16	2.5E-04
					Enrichment score: 2.82				
					BP	GO:0050856	regulation of T cell receptor signaling path	5	2.4E-04
					regulation of antigen receptor-mediated signaling pathway				
					BP	GO:0050854	regulation of antigen receptor-mediated signaling pathway	5	5.4E-04
					BP	GO:0050862	positive regulation of T cell receptor signa	3	3.4E-03
					BP	GO:0050857	positive regulation of antigen receptor-mediated signaling pathway	3	1.1E-02
					Enrichment score: 2.60				
					CC	GO:0042101	T cell receptor complex	7	1.1E-06
					CC	GO:0042105	alpha-beta T cell receptor complex	3	6.5E-03
					CC	GO:0043235	receptor complex	9	4.2E-02
					Enrichment score: 2.48				
					BP	GO:0006259	DNA metabolic process	32	1.3E-03
					BP	GO:0006281	DNA repair	21	1.9E-03
					BP	GO:0006974	response to DNA damage stimulus	25	2.4E-03
					BP	GO:0033554	cellular response to stress	30	2.0E-02
					Enrichment score: 2.35				
					BP	GO:0030217	T cell differentiation	10	3.5E-04
					BP	GO:0046832	alpha-beta T cell differentiation	4	1.1E-02
					BP	GO:0046831	alpha-beta T cell activation	4	2.2E-02
					Enrichment score: 2.23				
					BP	GO:0006350	transcription	102	1.8E-04
					BP	GO:0045449	regulation of transcription	119	5.1E-04
					BP	GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	82	6.8E-03
					BP	GO:0006355	regulation of transcription, DNA-depende	77	2.2E-02
					MF	GO:0003677	DNA binding	94	3.8E-02

B: Biological process, C: Cellular component, M: Molecular function

高病原性鳥インフルエンザウイルス感染による重症肺炎モデル(サル)の解析

研究分担者 新矢恭子 神戸大学・准教授

研究要旨

新型インフルエンザウイルスの流行初期の患者、および、高病原性鳥インフルエンザウイルスの患者では、ウイルス性肺炎を特徴とする重症インフルエンザの病態が多くみられる傾向がある。ウイルス性肺炎の病態機序を解明するため、サルにH5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させた。接種した H5N1 ウイルスは、サルに重症の肺炎を起こしたが、致死性感染ではなかった。H5N1 ウイルスを感染したサルは、臨床的に二峰性の発熱パターンを示したため、肺組織内での発熱関連のサイトカインをコードする代表3つの遺伝子発現パターンを調査した。その結果、二峰性発熱のそれぞれの発熱は、異なる分子機序によって制御されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

重症のウイルス性肺炎の発生機序を解明することを最終目的とする。本感染モデルでは、ウイルス性肺炎の初期から治癒までを網羅して、臨床的、ウイルス学的、病理学的特徴づけをし、マイクロアレイ解析データをもとに宿主反応を研究する。

B. 研究方法

共同研究者とともに、サルを用いたインフルエンザウイルス肺炎の感染モデルを作成し、臨床的・ウイルス学的・病理学的・および分子生物学的解析を行う。

（倫理面への配慮）

動物の倫理申請は、サルの感染実験をおこなった共同施設で行われた。

C. 研究結果

サルにおいて重症のウイルス性肺炎モデルが確立された。14日間の観察中、感染サルは死亡しなかった。体温は感染後2日目と6日目に二峰性のピークを示した (Fig. 1)。

この感染モデルで観察される二峰性の発

熱は特徴的で、以前に小児患者で報告されているものに類似していた。この感染後2日目と6日目をピークとする二峰性発熱の分子基盤を調べるため、3つの発熱関連分子をコードする遺伝子（インターフェロン・ガンマ (IFN γ)、インターロイキン1ベータ (IL1 β)、腫瘍壊死因子 (TNF α)) の分子動態に着目した。第一の発熱ピーク時には、IFN γ 、IL1 β 、TNF α の3つの遺伝子が発現亢進していた。その後、IFN γ および TNF α については、感染後3日目で一旦基本値に戻っており、臨床的に観察された発熱パターンと一致していた。しかしながら IL1 β は発現亢進を保っていたため (Fig. 2A)、IL1 β を制御する分子群の発現動態を調査した。まず、IL1 β の発現促進分子群を調べたところ、持続的な発現 (Caspase-1, Caspase-4, IRF-8, NALP3, NOD2, TLR2, TLR3; Fig. 2B)、二峰性の発現パターン (IRF-1 and u-PA; Fig. 2C) および、3日目または6日目をピークとする単峰性のパターン (Fig. 2C) が観察された。このことから、IL1 β 遺伝子の