

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）**  
**令和元年度分担研究報告書**

**血清および髄液のサイトカイン解析による急性脳症の病態解明に関する研究**

研究分担者：山形 崇倫（自治医科大学 小児科学教室）

研究協力者：川原 勇太、森本 哲（自治医科大学 小児科学教室）

**研究要旨**

急性脳症(AE)の病態解明とバイオマーカー検索のため、AE患者の血清と髄液中の49種類のサイトカイン・ケモカインレベルを熱性痙攣(FC)患者と比較した。

(対象)AE 17例とコントロールとしてFC患者8例。AE群は、急性壊死性脳症(ANE) 1例、けいれん重積型急性脳症(AESD) 3例、可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症(MERS) 4例、分類不能の脳症(UCAE) 9例であった。

(結果) OPN、CC chemokine ligand (CCL)4、および interleukin (IL)-10の髄液：血清比がAE群で有意に高く、macrophage inhibitory factor (MIF)と leukemia inhibitory factor (LIF)の髄液中レベルがAE群のなかの予後不良群で高値だった。また、osteopontin (OPN)の髄液：血清比がAESDとMERSで高く、MIFとOPNの髄液：血清比がMERSで高かった。

(考察)OPN、MIF、およびLIFなどのミクログリア関連サイトカイン/ケモカインがAEのバイオマーカーになると考えられた。また、既報のIL-10とCCL4に加え、MIFとLIFが予後不良に関連すると考えられた。

**A . 研究目的**

急性脳症(AE)、特に、けいれん重積型急性脳症(AESD)の病態は不明な点も多く、診断に寄与するバイオマーカーも確立していない。本研究では、急性脳症の病態解明に近づくためと、早期診断のバイオマーカー検索のため、血中および髄液中のサイトカイン・ケモカインを網羅的に解析した。

**B . 研究方法**

(対象) 当院に入院したAE患者17例(年齢の中間値29か月)を対象とし、熱性痙攣(FC)患者8例(年齢の中間値18か月)をコントロールとした。AE患者は、発熱に伴いJCS 20以上の意識障害が24時間以上持続し、他の神経疾患が除外された患者で、急性壊死性脳症(ANE) 1例、AESD 3例、可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎・脳症

(MERS) 4例、分類不能の脳症 (UCAE) 9例であった。FCは、38度以上の発熱に伴うけいれんを起こし、意識障害が遷延しなかった患者とした。

AE群のUCAEの1例以外全例とFC群の1例はステロイドパルス療法を受けた。

AE群で、死亡1例と後遺症を残した5例 (ANE 1例、AESD 2例、MERS 1例、UCAE 1例)を予後不良群とし、後遺症を残さなかった12例を予後良好群とした。

(方法) 血清と髄液各1mlを解析に使用した。血清と髄液は入院直後の急性期に、ステロイドパルス療法実施前に採取した。採取時間は、痙攣発症後、AE群は2-120時間(中間値7時間)、FC群は2-12時間(中央値3時間) ( $p = 0.043$ )と差があった。AE群4例が発症後24時間以降に転院してきたためである。血清および髄液のサイトカインレベルは、Bio-Plex suspension array system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて、以下の48サイトカインを測定した。interleukin (IL)-1a, IL-1b, IL-1 receptor antagonist, IL-2, IL-2 receptor a, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferon (IFN)-a2, IFN- c, tumor necrosis factor (TNF)-a, TNF-b, TNF-related apoptosis-inducing ligand, macrophage inhibitory factor (MIF), granulocyte-colony stimulating factor, macrophage-colony stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, stem cell factor, leukemia inhibitory factor (LIF), basic fibroblast growth

factor, hepatocyte growth factor (HGF), nerve growth factor-b, vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor-BB, stem cell growth factor-b, CC chemokine ligand (CCL)2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL11, CCL27, CXC chemokine ligand (CXCL)1, CXCL9, CXCL10, and CXCL12.

また、osteopontin (OPN) レベルを、ヒト OPN Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

研究は、自治医科大学の倫理委員会での承認を得て、患者の親のインフォームドコンセントを得て実施した。

## C . 研究結果

(1) AE群とFC群のサイトカインレベルの比較

髄液:血清比で、OPN ( $p = 0.032$ )、IL-10 ( $p = 0.048$ )およびCCL4 ( $p = 0.020$ )はAE群で有意に高かった。他のサイトカインでは、血清レベル、髄液レベル、髄液:血清比とも、有意なものはなかった。

また、ANE患者では、血清中のIL-6、IL-16、IL-18、CCL2、およびCXCL9が著明に高値であった。

(2) サイトカインレベルと予後の関連

髄液中のMIF ( $p = 0.012$ )、LIF ( $p < 0.001$ )レベルとLIFの髄液:血清比 ( $p = 0.037$ )が、予後不良群で有意に高かった。

(3) AESDあるいはMERSに関連するサイトカイン

HGF ( $p = 0.035$ )、OPN ( $p < 0.001$ )とMIF ( $p = 0.003$ )の髄液:血清比が、AESD、MERS、およびUCAEで異なっていた。HGF比はAESDで

FCより高い傾向があったが( $p = 0.055$ )、統計学的に有意ではなかった。AESDでOPNの髄液血清比はFC群よりも有意に高かったが( $p = 0.020$ )、MERSやUCAEとは差がなかった。また、OPNの髄液血清比はMERSでUCAE ( $p = 0.005$ )あるいはFC ( $p = 0.001$ )よりも有意に高かった。MIFの髄液血清比はMERSでUCAEよりも高かったが ( $p = 0.001$ )、Fcとの差はなかった ( $p = 0.055$ )。

#### D . 考察

これまで、AEでは、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17 およびCCL4の高値が報告されていた。しかし、われわれの解析では、IL-10とCCL4のみがAEと関連していた。また、OPN、MIFおよびLIFとAEとの関連を初めて示した。特に、OPNはAEのバイオマーカーとなる可能性を示唆した。OPNは、マクロファージやT細胞の遊走、 $T_H1$  と  $T_H17$ 分化の増強、 $T_H2$ サイトカインの抑制等に関与し、多発性硬化症のバイオマーカーの可能性としても関心を持たれている。OPNは、脳ではミクログリアで産生、分泌される。ミクログリアは、ANEやAESDでも活性化されることが報告されており、OPNが脳症に関連することも十分考えられる。

CCL4は、CC chemokine receptor 5 (CCR5)と結合し、マクロファージやミクログリアの活性化や遊走に関与する。髄液中のCCL4レベルがAEでは高いとの報告もあり、われわれの結果も、CCL4がAEでの脳の炎症に影響していることを支持する。

また、髄液中のMIF高値と、LIFの髄液中での高値、髄液：血清比高値がAEの予後不良との関連を示した。

MIFは、ミクログリアを含む組織球で産生

される炎症性サイトカインで、中枢神経系の炎症ではミクログリアの活性化に必須で、MSの悪化や再燃に関与することも報告されている。LIFはIL-6サイトカインファミリーに属し、MSの治療薬候補とも考えられている。IL-6受容体を拮抗し、 $Treg:T_H17$ 比を増加させ、抗炎症作用を示す。また、OPNの髄液：血清比がAESDで高いことを示した。HGF髄液：血清比も高い傾向があった。HGFは、ミクログリアで作られるサイトカインで、中枢神経での $Treg$ 反応を増強し、病的なT細胞反応を抑制する。両者は、AESDのバイオマーカー候補である。

AEおよびFCは、感染に伴って発症することも多く、血中サイトカインが上昇することも多い。よって、AEの判断には髄液：血清比が有用と考えられる。実際、我々の解析では、OPN、CCL4およびIL-10の血中および髄液レベルはAEで有意ではなかったが、髄液：血清比はAEで有意に高い結果が得られた。

#### E . 結論

OPN、MIFおよびLIFなどのミクログリア関連サイトカイン・ケモカインがAEのバイオマーカーに、また、既報のIL-10とCCL4に加え、MIFとLIFが予後不良に関連すると考えられた。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

Kawahara Y, Morimoto A, Oh Y, Furukawa R, Wakabayashi K, Monden Y, Osaka H, Yamagata T. Serum and cerebrospinal fluid cytokines in children with acute

encephalopathy. Brain Dev.  
2019;42(2):185-191.  
Shibata A, Kasai M, Hoshino A,  
Miyagawa T, Matsumoto H, Yamanaka G,  
Kikuchi K, Kuki I, Kumakura A, Hara S,  
Shiihara T, Yamazaki S, Ohta M,  
Yamagata T, Takanashi JI, Kubota M,  
Oka A, Mizuguchi M. Thermolabile  
polymorphism of carnitine  
palmitoyltransferase 2: A genetic risk  
factor of overall acute

encephalopathy. Brain Dev.  
2019;41(10):862-869.

2. 学会発表  
なし

**G . 知的財産権の出願・登録状況**

( 予定を含む。 )

なし