

原著

インフルエンザ脳症における
鼻汁中サイトカインプロファイル呉 宗 憲¹⁾ 河 島 尚 志¹⁾ 柏 木 保 代¹⁾ 武 隈 孝 治¹⁾

要旨 近年、インフルエンザ脳症の致死率は改善を認めるものの、後遺症を含めた予後は依然として不良である。このため、より早期からの治療の介入が必要となるが、病初期における脳症発症の予測は困難なことも多く、何らかの指標が望まれている。

インフルエンザ脳症において発熱後早期に大脳辺縁系の神経症状が発現することより、嗅球-大脳辺縁系のルートを直接介して影響していることが推測されている。われわれは鼻粘膜局所での病態形成への影響因子が脳症発症予測の早期指標となる可能性を考え、非脳症群 73 例と脳症群 4 例の鼻汁中の各種サイトカイン、およびケモカイン 17 種を計測し鼻粘膜局所での免疫応答の差異を知るべく検討を行った。両群とも同じ 8 項目が上昇し、そのうち 2 項目 (G-CSF と CCL4) は脳症群が非脳症群より統計的に有意に高値を示した。また、IL-1 β , IL-6, IL-8 も脳症群に高い傾向を認めた。脳症群の髄液でもほぼ同様な傾向を示した。鼻汁中サイトカインの計測が、インフルエンザ脳症の発症予測に役立つ可能性がある。

はじめに

インフルエンザウイルスは急性呼吸器感染症の原因として一般的であるが、ときとして急性脳症を引き起こし致死的事となることが知られている。インフルエンザウイルスによる急性脳症の発症率は日本で年間 60~500 人程度であり、かつては 30%もの致死率であったが、「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」が公表されてから、近年の致死率は 8%程度まで改善されてきている¹⁾。その一方で、いまだに後遺症を残すものは多く、依然としてインフルエンザ脳症が重篤な疾患であり、その診断および

治療の研究は今なお急務である。また、インフルエンザ脳症診療における問題点として、病初期での熱性けいれんや熱性せん妄との鑑別が非常に困難であることがあげられ、実際軽症例での特異的療法を開始することに躊躇する場面はしばしば遭遇する²⁾。このため、病初期におけるインフルエンザ脳症へ進展する可能性を示す指標が望まれ、各種の試みがなされている³⁾。近年ではサイトカインによる検討も行われ、われわれも血清中の interleukin (IL)-6 が各種の生化学検査を含む一般検査結果に先立ち、脳症患者では早期に上昇しており、診断的・病態的に意義があることを報告してきた⁴⁾。また、多くの臨床例の解析から、

Key words : インフルエンザ脳症, サイトカイン, 鼻汁, CCL4, IL (Interleukin)-6

1) 東京医科大学小児科

[〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1]

発症前に異常言動や異常行動といった大脳辺縁系の刺激症状を高率に認めることや、マウスの実験系において、嗅球でサイトカインや NOx が過剰に産生されることを見出してきた⁵⁾。これらの結果、ヒトにおけるインフルエンザ脳症においてウイルスが鼻粘膜で感染後増殖し、嗅球-大脳辺縁系のルートを直接介して影響している可能性が推察された。今回、われわれはより早期での重症化の予測因子を探る目的で、脳症例を含むインフルエンザウイルス感染症を患った児の鼻汁中の各種サイトカイン、およびケモカインを計測し比較検討を行った。

I. 対象と方法

対象は東京医科大学病院小児科で 2008 年 12 月～2009 年 5 月までにインフルエンザ様の症状を有し、迅速診断キットにて季節型インフルエンザ A 型と診断された 77 例（うち脳症 4 例を含む）。インフルエンザ迅速診断キットは Genzyme Diagnostics 社のラピッドテスト FLU スティックを使用した。インフルエンザ脳症の診断は「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」¹⁾に従い、中枢神経感染症・代謝異常症などの鑑別を行ったうえで各種血液・画像・神経所見を基に確定診断した。検体は、ウイルス感染診断時に鼻汁を吸引、生理食塩水 3 ml を用いてチューブ内鼻汁を吸引後冷凍保存。1 分以上ボルテックスで攪拌を行い、高速遠心（15,000 回転 15 分）施行後の上清を採取した。血清は入院時の治療前のものを、髄液は入院当日に施行したものを -20°C に冷凍保存し、後日鼻汁と同時に測定した。サイトカインプロファイリングは、BIO-RAD 社 Bio-Plex マルチプレックスサイトカインアッセイを使用し、IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor), IFN (interferon)- γ , CCL2 (C-C motif chemokine 2), CCL4 (C-C motif chemokine 4), TNF (tumor necrosis factor)- α の 17 種を測定。高値を認めた各種サイトカイン、およびケモカインを非脳症群 (n=73) と脳症群 (n=4)

で比較検討を行った。統計学的検討にはマン・ホイットニ検定を使用した。

なお、この研究は東京医科大学医学倫理委員会にて承認された (#1907)。

II. 結果

インフルエンザ脳症と診断された 4 症例においては診療録と血液・画像所見より後方視的に「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」¹⁾に照らし再評価を行った。症例は 11 カ月～8 歳の男児 2 例、女児 2 例 (表)。39°C 以上の発熱は 4 例全例で認め、けいれんを伴っていたのは 4 例中 3 例でいずれもけいれん後意識障害が遷延していた。また、2 例は暴力・暴言などの異常言動・行動、性格変化を認めていた (表 C, D)。1 例は Cornelia de Lange 症候群と診断されておりインフルエンザ感染症に伴う気管支喘息重積発作の入院加療中に急性脳症を発症 (表 A)。2 例でけいれん発作の既往を過去に認め熱性けいれんと診断されていた (表 C, D)。初診時頭部 CT 画像所見では 3 例で著明な脳浮腫を認め、1 例では部分的に density の低下を認めた。入院後頭部 MRI 画像所見では 2 例は拡散強調画像で異常信号を認め、うち 1 例は脳梁膨大部を中心とした異常信号を認め MERS (mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion) と考えられた (表 D)。脳波では 3 例で全般化した高振幅徐波を認めた。いずれの症例もインフルエンザ脳症の特徴的所見を十分有しており、対象として問題は認めなかった。

プロファイリングした鼻汁中の各サイトカイン、およびケモカインを非脳症群 (n=73) と脳症群 (n=4) に分け、平均値と標準偏差を求めた (図 1)。非脳症群と脳症群ともに上昇を認めたのは IL-1 β , IL-6, IL-8, G-CSF, IFN- γ , CCL2, CCL4, TNF- α の 8 項目であった。この 8 項目はいずれも脳症群において高い傾向を示した (図 2)。マン・ホイットニ検定を危険率 5% で施行し、統計学的有意差が出たのは G-CSF と CCL4 の 2 項目であった (図 2 d, g)。また、鼻粘膜局所での脳症群と非脳症群の I 型ヘルパー T 細胞 (Th1 細胞) と II 型ヘルパー細胞 (Th2 細胞) の拮抗作

表 The character, clinical findings, imaging findings and laboratory date of patients with encephalopathy

	A	B	C	D
age	4 y	11 m	7 y	8 y
sex	M	F	M	F
fever	>39°C	>39°C	>39°C	>39°C
seizure	全身強直間代性けいれん ×3 回	左半身間代性けいれん ×10 分	—	全身強直間代性けいれん×2 分
consciousness disorder	JCS200	JCS200, GCS (E1V1M1) 3 点	異常言動・行動 (暴言・ 暴力, 性格変化)×24 h 以上	けいれん後せん妄状態継続, 異常言動・行動, JCS30, GCS (E2V1M4) 7 点
pre medicine	喘息に対し PSL+アミノ フィリン, てんかん に対しクロナゼパム・カル バマゼピン・バルプロ酸 ナトリウム・クロラゼパ 酸二カリウム	アセトアミノフェン	総合感冒薬 〔詳細不明〕	—
past history	Cornelia de Lange 症候 群, 2 歳時より気管支喘 息, 3 歳時よりてんかん	—	febrile seizure (2 歳時 1 回)	febrile seizure (3 歳時 2 回)
family history	父: 糖尿病	—	—	兄: 7 カ月時に発熱・けいれ ん, 以降右半身麻痺・知能低 下・養護学校
CT	edema, 両前頭葉・側頭 葉にびまん性に density の低下	edema, 皮髄境界不鮮明	n, p	edema, 脳室狭小化
MRI	拡散強調画像にて両前頭 葉・側頭葉・頭頂葉 (前 部) に高信号域	n, p	—	拡散強調画像にて脳梁膨大 部に高信号域
EEG	高振幅徐波	高振幅徐波 (Rt>Lt)	高振幅徐波・ S-B パターン	徐波なし
IL-6 (serum)	—	51	1.4	1.9
IL-6 (liquor)	169	144.8	10.3	42.5
Hb	11.5	10.0	11.3	12.4
Plt	1.2 万	41.9 万	11.0 万	19.4 万
AST/ALT	2,550/944	37/11	35/5	45/20
BUN/Cre	40.2/0.69	8.6/0.20	10.2/0.56	15.9/0.61
CK	4,100	127	116	685
BS	155	237	117	108
NH3	58	81	14	32
PT	24.2	13.1	15.5	18.5
PT-INR	4.34	1.05	1.29	1.63
APTT	測定不能	35.9	41.5	40.8
FDP	ND	2.8	3.5	2.8
D-dimer	ND	0.95	1.9	1.19

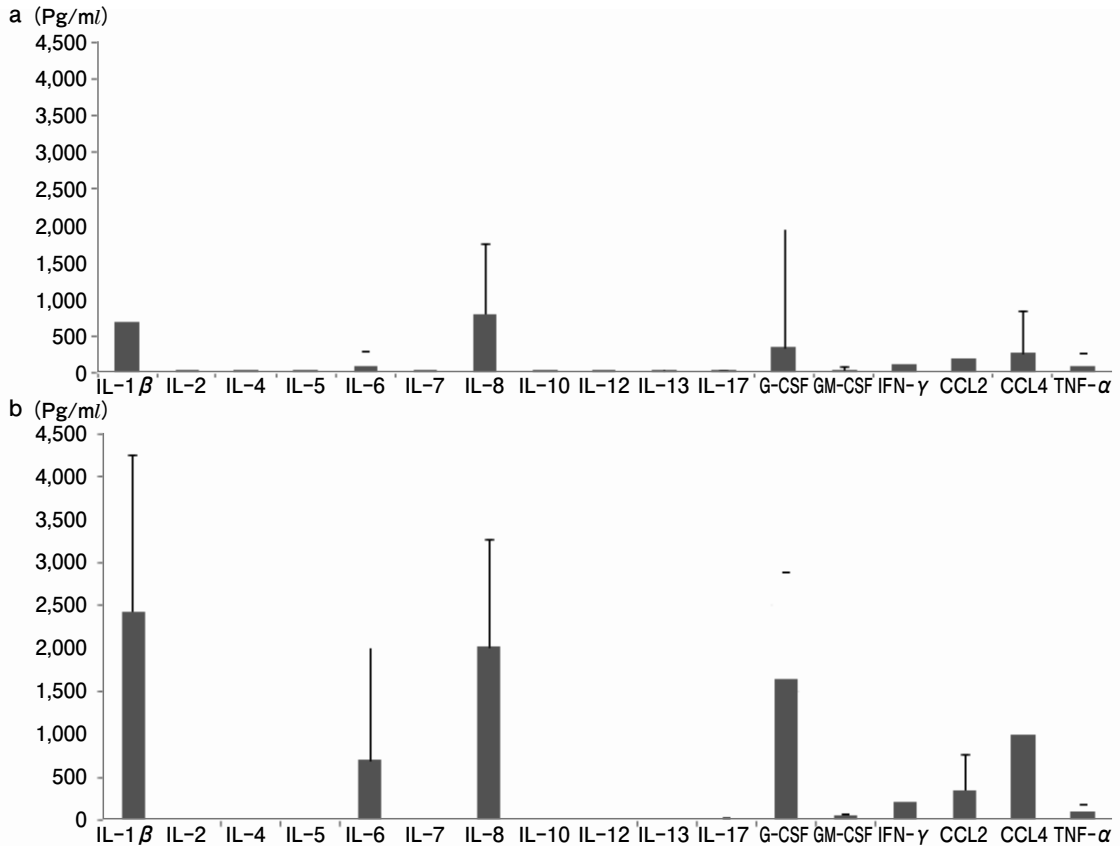


図 1 The mean and standard deviation of non-encephalopathy group (n=73) and encephalopathy group (n=4) in each cytokine and chemokine in the nasal aspirates
a : non-encephalopathy (n=73) b : encephalopathy (n=4)

用のバランスにおける差異の有無を確認するため IFN- γ と IL-4 の比について統計学的検討を行ったが、有意差は認めなかった (図 3 a)。炎症性サイトカインと抑制性サイトカインのバランスの目安とした IL-6, TNF- α と IL-10 の比についても統計学的検討を行ったが有意差は認めなかった (図 3 b, c)。

脳症群 4 例の血清と髄液中のサイトカイン・ケモカインを図 4 に示した。血清中では鼻汁中で上昇がみられた項目に加え、IL-2・IL-7・IL-10 も軽度ながら上昇がみられた。一方髄液では IL-1 β を除けば、鼻汁中で上昇がみられた項目がほぼ同様に上昇していた。

II. 考 察

インフルエンザ脳症に関する研究では病理解剖や詳細な臨床像の検討から、① ウイルスは中枢神経系にはいない、あるいはいても周囲に炎症反応は認めない、② 約半数の症例において血球貪食細胞が各臓器に見出される、③ IL-6 や TNF- α などの proinflammatory cytokine 高値例を多数認める、④ けいれん・意識障害を起こす前に大脳辺縁系の刺激症状と思われる幻視・幻聴を多くの児が訴えることなどが判明している⁶⁾。特に、IL-6 や TNF- α などの proinflammatory cytokine は髄液中ならびに血清中でも著明な高値を示し、高サイトカイン血症とそれに伴う SIRS (全身性炎症反応症候群: systemic inflammatory response syndrome)

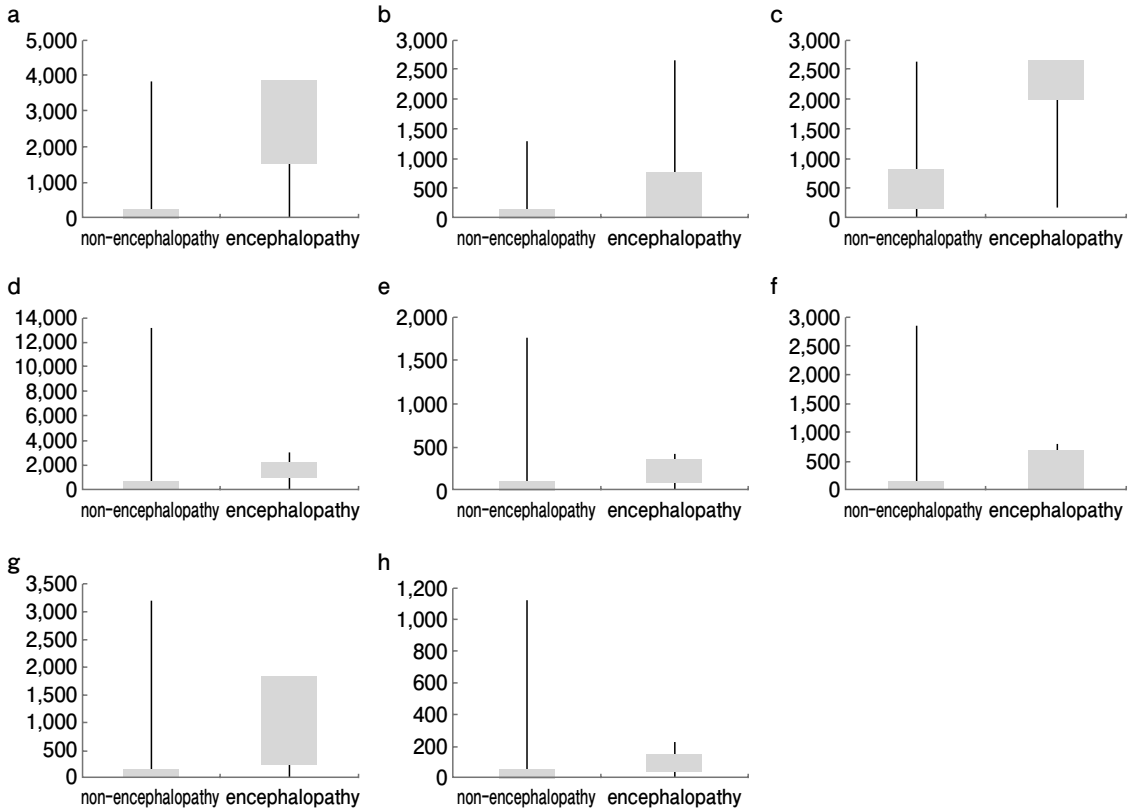


図 2 Examination in non-encephalopathy group and encephalopathy group of eight items of the cytokine and chemokine which are rose in the nasal aspirates

a : IL-1 β (p -value=0.118) b : IL-6 (p -value=0.069) c : IL-8 (p -value=0.096) d : G-CSF (p -value=0.006)
e : INF- γ (p -value=0.089) f : CCL2 (p -value=0.408) g : CCL4 (p -value=0.034) h : TNF- α (p -value=0.161)

が病態を担っていることが報告されている^{6,8)}。また、この臨床像の特徴の一つとして、発熱から神経症状発現までの時間が非常に短いことがあげられる。発症から神経症状発現までは 24 時間以内が 30%で、48 時間以内が 70%以上であり⁶⁾、発熱出現後 6 時間後にけいれんを起し、死亡したケースもみられる。血液尿検査上、予後不良因子として、①血小板数の減少(特に 10 万/ μ l 以下)、②AST/ALT/LDH の上昇、③血液凝固検査の異常、④血清クレアチニン (Cr) の上昇が報告されている⁶⁾。しかしながら、死亡症例では来院時、血液検査は全く正常で、その後急激に状態が悪化した例が多い。当院の症例における検査データを、時間軸を考慮し、死亡もしくは神経学的後遺症を残した群と明らかな神経学的後遺症を伴わない群

に分けると、死亡症例や予後不良症例を含む神経学的後遺症を残した群ほど入院時の一般検査 AST/ALT/CPK は正常に近い値をとっていた⁴⁾。また一方で、IL-6、Ferritin、TG (triglyceride) などのデータは重症なほど早期に、過剰に産生されていることが見出されている^{8~10)}。臨床像では、最初是非特異的な発熱、頭痛といった症状が始まることが多いが、神経障害に起因する症状が急激に出現する。これらの結果から、サイトカインが脳症の早期の診断や重症化の指標になるばかりでなく¹⁰⁾、インフルエンザ脳症の予後不良群では、血球貪食細胞が各臓器に認められることなどと合わせて、高サイトカイン血症を伴った VAHS (virus associated hemophagocytic syndrome) の状態であるといえる。これらのことから、インフル

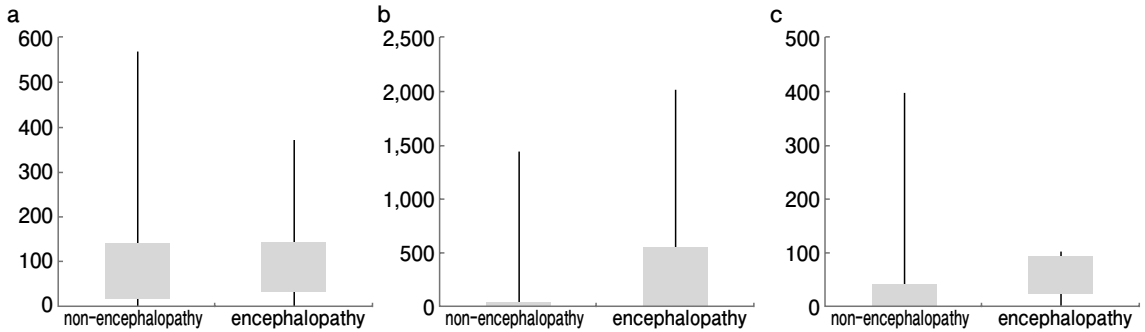


図 3 IFN- γ /IL-4 ratio, IL-6/IL-10 ratio and TNF- α /IL-10 ratio in the nasal aspirates

a : IFN- γ /IL-4 (p -value=1.00) b : IL-6/IL-10 (p -value=0.103) c : TNF- α /IL-10 (p -value=0.251)

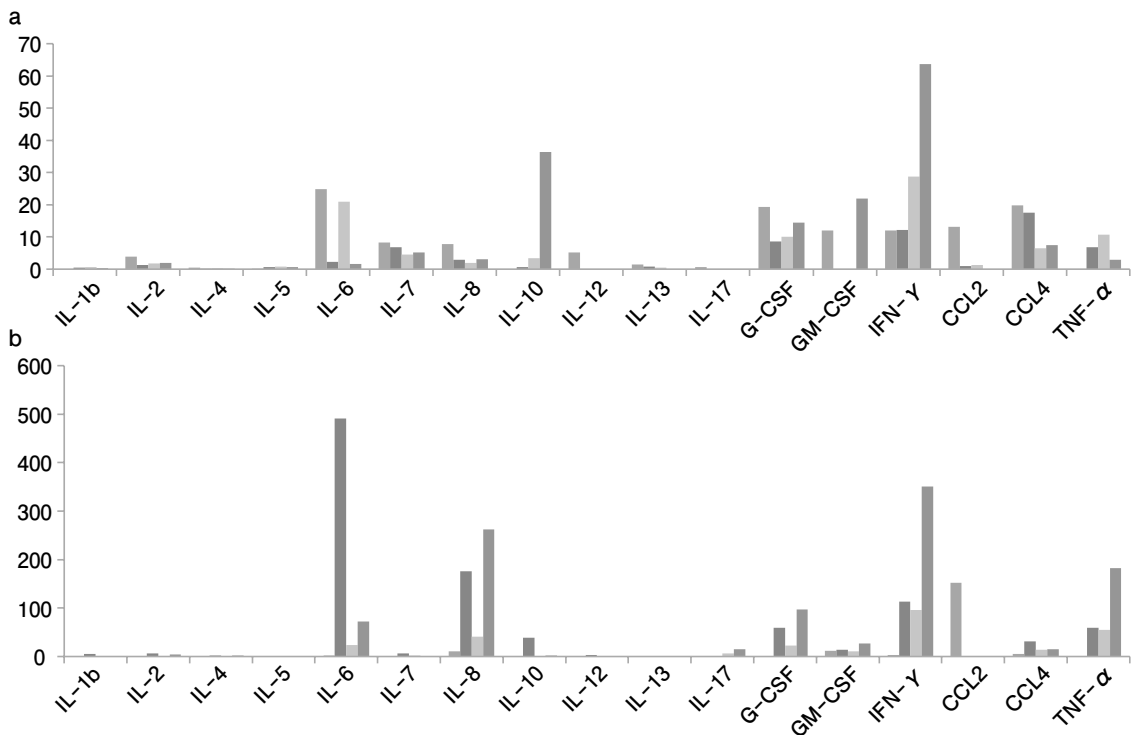


図 4 Cytokine profiles in serum and CSF obtained from patients with encephalopathy

a : Cytokine profile in serum obtained from patients with encephalopathy (pg/ml)

b : Cytokine profile in CSF obtained from patients with encephalopathy (pg/ml)

エンザ脳症における病態は、何らかの遺伝的素因から、高サイトカイン状態を起こしやすい体質があり、サイトカインを制御できない状態から、血管内皮の障害¹¹⁾、NOx の産生過剰¹²⁾、血管透過性の亢進、blood brain barrier の破壊により脳浮腫をきたす¹³⁾と解釈される。特に臨床像より、病初期

には鼻粘膜から嗅球を介しての脳辺縁系の刺激が起きていることが推測される。今回、非脳症群 73 例と脳症群 4 例の鼻汁中の各種サイトカイン・ケモカイン 17 項目を計測し比較検討を行い、有意な結果を得た。インフルエンザ感染者において、脳症患者に限らず IL-1 β 、IL-6、IL-8、

G-CSF, IFN- γ , CCL2, CCL4, TNF- α など多彩なサイトカインならびにケモカインが鼻汁中で上昇していた。インフルエンザ感染中の鼻汁中のサイトカインの報告は多くはないが, Patel らは各種のウイルス感染に伴う上気道感染者の鼻汁中のIL-1 β , IL-6, TNF- α を測定し, アデノウイルスとインフルエンザ感染者では有意にIL-6が高く, この値は発熱と相関することを報告している¹⁴⁾。Fritz らのボランティアによる病日ごとの鼻汁中のサイトカインの検討では, IL-6, TNF- α , IL-8が上昇していると同時に, 抑制性のサイトカインのIL-10の上昇, CCL2, CCL3, CCL4などのケモカインも上昇しているが, IL-10の上昇割合はIL-6やIL-8に比べ, 4~18倍低値であるとしている¹⁵⁾。これらの結果はIL-10を除いて, われわれの結果とほぼ一致していた。われわれの対象とした患児群が, 脳症など発熱後早期であることから, IL-10の検出率が低いと推察される。インフルエンザ感染においては, 鼻粘膜でウイルスが増殖すると同時に, Th1系ならびにTh17系が動員され, 恐らくはIL-10がやや遅れて発現し, 炎症を終息させると考える。脳症患者では成人を含め, 鼻汁中で検討した報告はないが, 咽頭拭い液のウイルス量においては, 脳症群と非脳症群に差がなかったことが知られている²¹⁾。今回の結果において, 2群間で統計学的有意差が出たのはG-CSFとCCL4の2項目であったが, IL-1 β ・IL-6・IL-8において脳症群がより高値である傾向を認めた。インフルエンザ脳症の血液および髄液での検討では, 高サイトカイン血症は顕著でない症例も経験されるが, 中枢神経系でのみ高サイトカイン状態になっている症例もある²²⁾。特に, 中枢神経系においてミトコンドリア障害を起こすと考えられているTNF- α (あるいはsTNFR1) でみると, インフルエンザ脳症の予後不良群において, 髄液中で著増している⁹⁾。一方, IL-6に関しては, 近年その神経保護作用も注目されてきている¹⁶⁾。このため, これらのサイトカインがどのように脳症の病態に関与しているかの真の病態はいまだ不明であるが, 鼻汁中サイトカインプロファイルの解析は, インフルエンザ脳症の発症予測に役立つ可能性があると考えられた。

今回の結果から, 鼻汁中のG-CSFとCCL4が特に脳症群で統計学的に高値であった。G-CSFの病態への関与は不明であるが, 中枢神経感染においても自然免疫が防御機構として初期に働くことは容易に推測される。軸策損傷のマウスの実験系において海馬におけるグリアのケモカインの発現を調べた検討で, CCL4など各種のケモカインの発現が高まることが知られている¹⁷⁾。インフルエンザ脳症ではアストログリアから産生されたと考えられるNO_xが髄液で増加していることや¹⁸⁾, グルタミン酸の減少やグルタミンの高値¹⁹⁾などからグリア細胞の活性化が指摘されている。また, マウスの実験系において, neurovirulentなインフルエンザウイルスの鼻腔接種後, 嗅球にウイルス抗原を認めアポトーシスを起こしていたとしている²⁰⁾。今回脳症群において, 髄液のサイトカインプロファイリングを行ったが, 髄液中で上昇しているサイトカイン・ケモカインの項目は鼻汁中のそれとほぼ同一であった。こういった結果から直接ウイルスが中枢神経系に浸潤しないまでも, 鼻汁中のサイトカインおよびケモカインの高値が嗅球を通して大脳辺縁系の興奮症状ならびにグリアの活性化を起こすことがインフルエンザ脳症の病態と関連することが推測される。

III. 結 論

非脳症群73例と脳症群4例の鼻汁中の各種サイトカイン, およびケモカイン17項目を計測し検討を行った。上昇を認めた項目は2群間で差を認めなかったが, G-CSFとCCL4は脳症群が統計学的に有意に高かった。また, IL-1 β , IL-6, IL-8においても脳症群が高い傾向を認めた。脳症群の髄液でもほぼ同様の項目が上昇していた。鼻汁中サイトカインの計測が, インフルエンザ脳症の発症予測に役立つ可能性がある。

日本小児感染症学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) 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【改訂版】, 2009

- 2) Fukumoto Y, et al : Serum levels of cytokines and EEG findings in children with influenza associated with mild neurological complications. *Brain Dev* 29 : 425-430, 2007
- 3) Kawashima H, et al : Primary biomarkers in cerebral spinal fluid obtained from patients with influenza-associated encephalopathy analyzed by metabolomics. *Int J Neurosci* 116 : 927-936, 2006
- 4) 山中 岳, 他 : インフルエンザ脳症重症度予測. *日小児会誌* 110 : 417-424, 2006
- 5) Watanabe C, et al : Increased nitric oxide production and GFAP expression in the brains of influenza A/NWS virus infected mice. *Neurochem Res* 33 : 1017-1023, 2008
- 6) 森島恒雄, 他 : インフルエンザの臨床経過中に発生する脳炎・脳症の疫学及び病態に関する研究 (H12-新興-11), 平成 12 年度厚生科学研究費補助金研究報告書, 2001, 1-135
- 7) 森島恒雄, 他 : 新型インフルエンザ脳症の臨床的特徴と宿主遺伝子発現解析「インフルエンザ脳症など重症インフルエンザの発症機序の解明とそれに基づく治療法, 予防法の確立に関する研究」平成 23 年度総合・分担研究報告書, 2011, 26-34
- 8) 富樫武弘, 他 : インフルエンザ流行中にみられる小児期脳炎・脳症患者の脳脊髄液中 IL-6, TNF- α . *日小児会誌* 103 : 16-19, 1999
- 9) Ichiyama T, et al : Cerebrospinal fluid and serum levels of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptor in influenza virus-associated encephalopathy. *Scand J Infect Dis* 35 : 59-61, 2003
- 10) Nakamura M, et al : Clinical application of rapid assay of interleukin-6 in influenza-associated encephalopathy. *Dis Markers* 21 : 199-202, 2005
- 11) Hosoya M, et al : Cytochrome c and tumor necrosis factor- α values in serum and cerebrospinal fluid of patients with influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J* 24 : 467-470, 2005
- 12) Kawashima H, et al : Nitrite and nitrate as a new target of treatments in influenza-associated encephalopathy. *J Pediatr Infect Dis* 5 : 171-176, 2010
- 13) Ichiyama T, et al : Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J* 26 : 542-544, 2007
- 14) Patel JA, et al : Nasopharyngeal acute phase cytokines in viral upper respiratory infection : impact on acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 28 : 1002-1007, 2009
- 15) Fritz RS, et al : Nasal cytokine and chemokine responses in experimental influenza A virus infection : results of a placebo-controlled trial of intravenous zanamivir treatment. *J Infect Dis* 180 : 586-593, 1999
- 16) Suzuki S, et al : Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia : inflammatory versus neurotrophic aspects. *J Cereb Blood Flow Metab* 29 : 464-479, 2009
- 17) Babcock AA, et al : Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J Neurosci* 23 : 7922-7930, 2003
- 18) Kawashima H, et al : NOx (nitrite/nitrate) in cerebral spinal fluids obtained from patients with influenza-associated encephalopathy. *Neuropediatrics* 34 : 137-140, 2003
- 19) Kawashima H, et al : Extraordinary changes in excitatory amino acid levels in cerebrospinal fluid of influenza-associated encephalopathy of children. *Neurochem Res* 29 : 1537-1540, 2004
- 20) Mori I, et al : Olfactory receptor neurons prevent dissemination of neurovirulent influenza A virus into the brain by undergoing virus-induced apoptosis. *J Gen Virol* 83 (Pt 9) : 2109-2116, 2002
- 21) Kawada J, et al : Systemic cytokine responses in patients with influenza-associated encephalopathy. *J Infect Dis* 188 : 690-698, 2003
- 22) Ichiyama T, et al : Cerebrospinal fluid and serum levels of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptor in influenza virus-associated encephalopathy. *Scand J Infect Dis* 35 : 59-61, 2003

Cytokine profile of nasal aspirates obtained from patients with influenza-associated encephalopathy

Soken GO, Yasuyo KASHIWAGI, Hisashi KAWASHIMA, Kouji TAKEKUMA

Department of Pediatrics, Tokyo Medical University

Although mortality from influenza-associated encephalopathy is lower than before, its sequelae are still high. Therefore, early intervention by treatments is needed. However, diagnosis of early-stage encephalopathy is difficult to predict by conventional laboratory data. Many children with influenza-associated encephalopathy show neurological symptoms of limbic encephalopathy through suspected olfactory bulb. In order to understand the local immune status, this study assayed 17 cytokines and chemokines in the nasal aspirates from 77 patients, who had influenza with (n=4) and without (n=73) encephalopathy. Their cytokine profiles were identical. The levels of G-CSF and CCL4 in patients with encephalopathy were significantly higher than those of patients without encephalopathy. Furthermore, the levels of IL-1 β , IL-6 and IL-8 in patients with encephalopathy were higher than those of patients without encephalopathy. The cytokine profiles in their CSF showed similar tendencies. These findings are useful for better predictions of encephalopathy.

(受付：2013年8月26日，受理：2014年1月22日)

* * *