

厚生科学研究費補助金（インフルエンザ脳炎・脳症
の発症機序の解析と治療法の開発研究事業）
分担研究報告書

インフルエンザウイルスの病原性に関する咽頭細菌のかかわり
—脳炎・脳症の発症メカニズムに関する研究
分担研究者 永武 毅 長崎大学熱帯医学研究所教授

研究要旨

小児とりわけ幼小児に発症するインフルエンザ脳炎・脳症はその発症メカニズムを解明し、予防策を立てることが急務となっている。5才以下の小児は免疫学的にも未熟であり、かつウイルスや細菌をはじめとするあらゆる種類の病原体の粘膜面への付着と感染にさらされることで免疫学的に鍛えられてゆく。基礎研究の成果としてインフルエンザの発症メカニズムに細菌などの関与も明らかになる中で、病原細菌類を高率に咽頭・鼻腔に付着させている幼児においてインフルエンザの重症化の過程にウイルスと細菌がいかなるかかわりを持つかの解明はなされていない。本研究では小児の咽頭付着細菌がインフルエンザウイルスの病原性にいかなるかかわりを持つかの臨床研究を通して脳炎・脳症の発症メカニズムを明らかにしようとするものである。

A. 研究目的

小児の咽頭付着細菌類がインフルエンザウイルスの病原性にいかなるかかわりを持つかの臨床研究を通して脳炎・脳症の発症メカニズムを明らかにすることを目的に研究を行う。

B. 研究方法

1) 小児の上気道における病原細菌類を中心とする細菌付着の調査研究を行う。

：小児科、耳鼻科の先生方とも協力して小児の咽頭、鼻腔粘膜の病原細菌付着について、時間的、空間的な伝搬の様式を含めて検討する。

2) インフルエンザ脳症を発症した小児上気道におけるウイルスと細菌のかかわりの検討を行う。咽頭・鼻腔ぬぐい液を用いたウイルスと病原細菌の検討に加えて、プロテアーゼの関与等についても調査する。

3) インフルエンザ脳症の治療・予防に関する検討

インフルエンザワクチン、抗インフルエンザウイルス療法その他、発症重症化予防に有用性の高い手法の開発をめざす（長期的視野から）。

C. 研究結果

1) 小児の上気道における病原細菌の付着調査

これまでの幼稚園、学校等の協力で得られた健康な小児の咽頭付着病原細菌のデータでは
①乳幼児では年長児に比較して呼吸器病原細菌と常在細菌の両者共に多い菌量で付着している。

②小児では高率に呼吸器病原細菌が咽頭に付着している。

③健康な成人では呼吸器病原細菌が咽頭に付着することはほとんどみとめられない。

(図1)

④かぜ症候群（ウイルス感染）の先行によって小児ではさらに高率に呼吸器病原細菌の咽頭付着率が高くなる。（健康成人群でもかぜ症候群に伴って病原細菌が咽頭に一定の割合で付着するようになる）（図2.3）

2) 小児の咽頭付着病原細菌の伝搬と同一性に関する臨床研究

現在、耳鼻科開業医との共同研究で小児の咽頭付着病原細菌について時間的、空間的要因での伝搬様式を追跡調査を開始した。菌の同一性とcolonizationの研究を通して小

Results of throat culture (Healthy group)

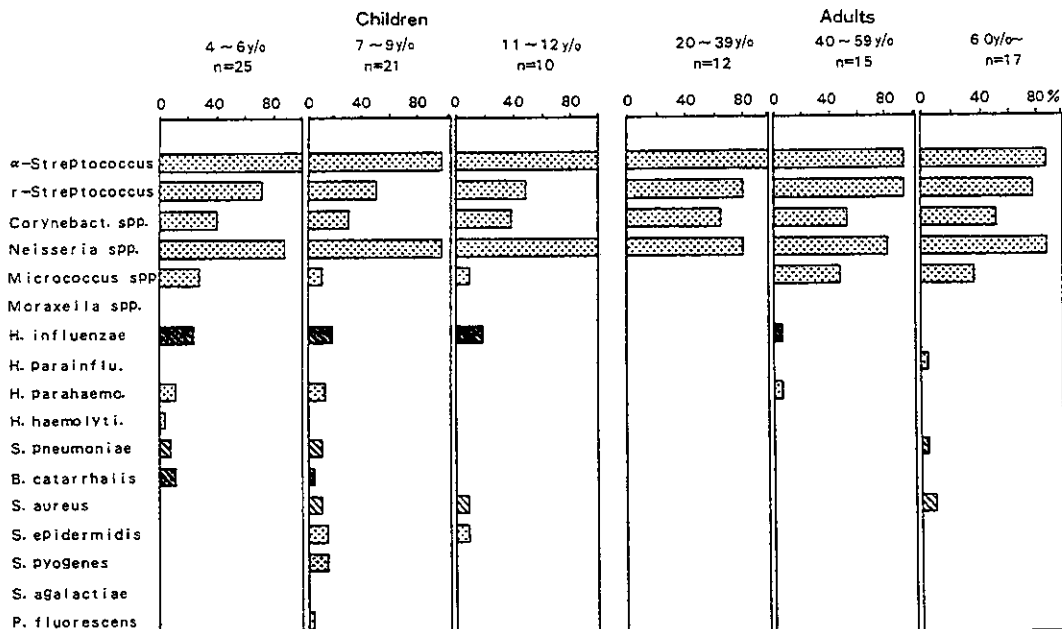


図1 健康人の咽頭付着細菌

小児と成人で常在細菌類はほとんどの健康人に付着しているのに対し、病原細菌類は小児ではある一定の割合で付着している。一方、健康な成人の咽頭にはほとんど病原細菌の付着はみられない。

Results of throat culture (Common cold group)

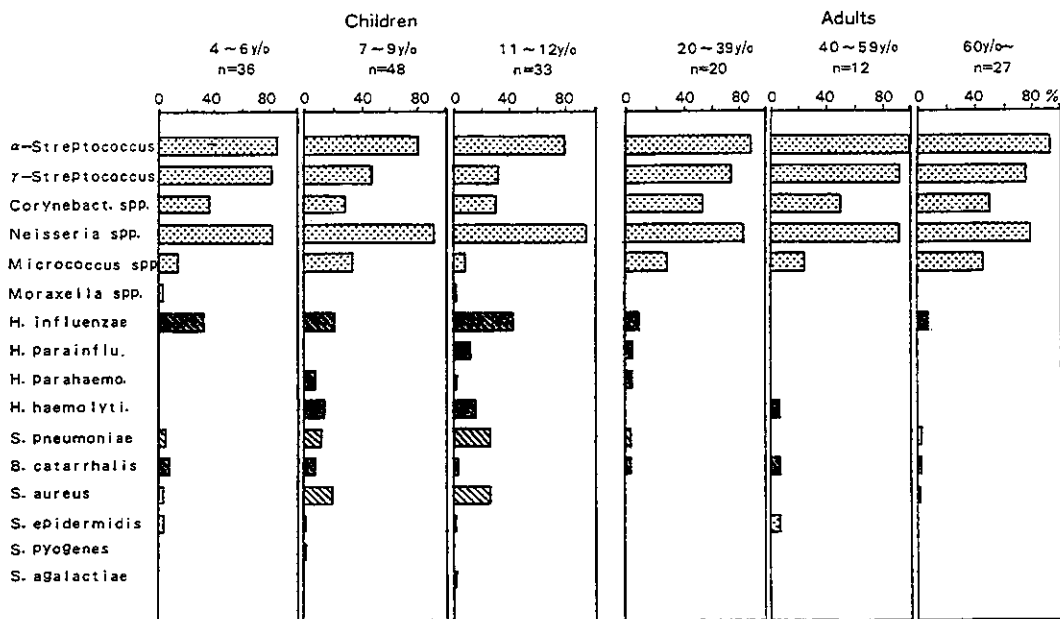


図2 健康人で「かぜ症候群」のみられる場合の咽頭付着細菌

かぜ症候群のみられる場合の小児には高率に病原細菌付着をみとめ、成人でも一定の割合で咽頭に病原細菌が付着している。

児免疫システムと感染メカニズムの解明から脳炎・脳症などへの急激な症状悪化の要因についての検討をすすめる。

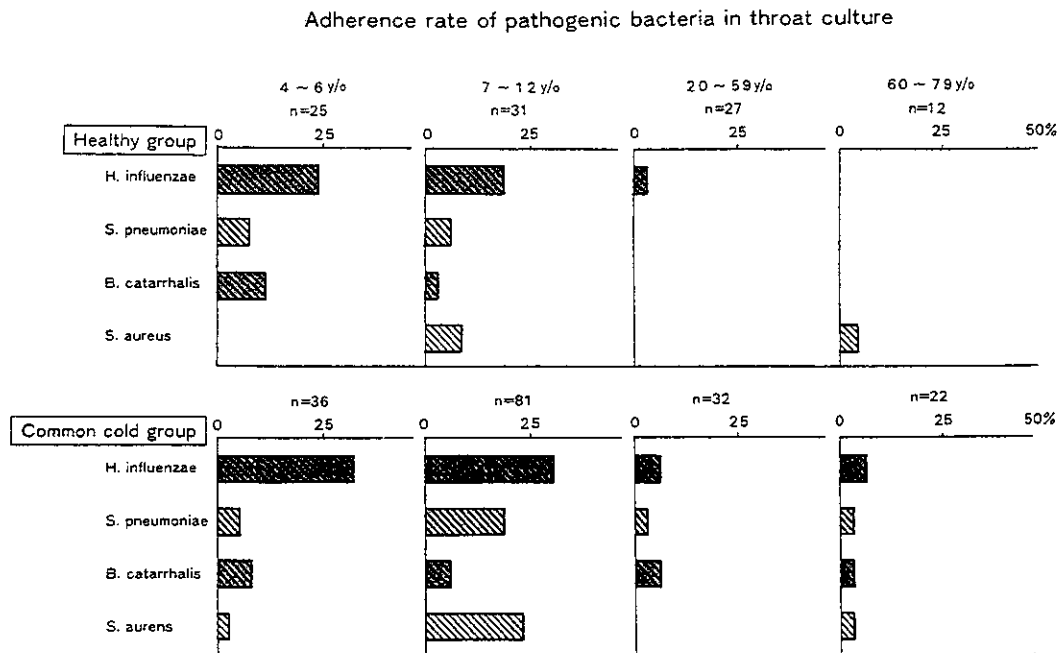


図3 「かぜ症候群」の有無による健康人（小児と成人）での咽頭付着病原細菌「かぜ症候群」などのウイルス感染によって咽頭への病原細菌付着は亢進するものである。

D. 考察

インフルエンザ脳炎・脳症は5才以下、とりわけ幼児を中心に発症しており、いわば免疫学的にも未熟で、あらゆる種類の感染症の危険にさらされている年齢層でみられている。従って本症発症メカニズムの解明には急激な生長過程にある小児の生体側における免疫系を含めた易感染要因とインフルエンザウイルスが脳炎・脳症を発症するに際してのウイルスそのものの病原因子と小児が同時に高率に上気道に付着させている病原細菌を含む細菌類の関与の有無について検討してゆく必要がある。Reye症候群ではアスピリンがその発症に関与すること*が示されており、日本特有とされているインフルエンザ脳炎・脳症の一部の小児でも強い解熱剤使用との関連がみられるとされる。しかるに、すべての症例が解熱剤の関与で説明出来ないこと、さらに最近の10年間、呼吸器親和性の病原細菌のすべての菌種で急速に進行しているペニシリンをはじめとする抗菌薬への耐性化の問題がある。これらの事実は、病原細菌を上気道粘膜に高率に付着・増殖させている小児において、イ

ンフルエンザウイルスの活性化の重要な因子の存在を示唆している。インフルエンザウイルスの感染により、上気道・下気道粘膜上皮細胞はサイトカイン、ケモカインの産生を誘導し、同時に細胞障害により病原細菌付着が容易となることから小児での、しかも健康な小児に急速に進行する脳炎・脳症の発症メカニズムにウイルスと細菌とのかかわりの可能性を示している。今後、小児でのインフルエンザ合併症の最重症型の一つである脳炎・脳症の病態解明と同時に小児の成長期の過程で病原体による宿主の免疫賦活とその破綻がいかにして発生するのかを見極めることが求められている。本研究は小児科、耳鼻科、内科医などが連携してインフルエンザの重症化メカニズムの解明を行うものであり、これまで十分に検討されているとはいえないヒトの成長と脳炎・脳症とのかかわりに視点を置いた臨床研究である。

E. 結論

小児は出生直後の無菌状態から母体からの受動免疫を背景に粘膜面の常在細菌叢を急速に完

成させてゆくことが知られている。しかるに、母体免疫と小児自身が作り出す免疫がクロスする出生半年後位からあらゆる感染病原体との出会いが始まる。インフルエンザウイルス感染もかかる中でみられ、ヒトが小児期に出会うウイルス感染症としても代表的なものとなっている。呼吸器親和性ウイルスの中では強毒に属するものの、インフルエンザの多くは自然治癒するものである。しかるに、健康であった小児に急激な病状の進行と時に致命的であるインフルエンザ脳炎・脳症が、今日までいかなる病因、病態が関連してくるかの原因追求は緒についたばかりである。私共は多くの病原細菌や常在細菌が産生し、あるいはヒトの気道上皮細胞からも感染の刺激で産生され、インフルエンザウイルスの活性化と感染拡大に大きく関与するプロテアーゼ（木戸ら）に着目し、この未解決の脳炎・脳症の発症メカニズムの解明に今後、臨床サイドから取り組んでゆく準備を整えている。

F. 研究発表

1. 永武 毅：特集 インフルエンザと呼吸器病原ウイルス 2. 臨床編 2. 成人のインフルエンザ. 化学療法の領域 Antibiotics & Chemotherapy 15 (11) 24-30, 1999.
2. 永武 毅：〈ウイルス感染症の診断と治療〉インフルエンザ 特集 感染症診療の実際 - 今日から役立つ臨床判断のコツ. 内科. 84 (4) 673-676, 1999
3. Kamruddin Ahmed, Sunita Wilson, Wafa Y. Jamal, Glenda Martinez, Kazunori Oishi, Tsuyoshi Nagatake, Vincent O. Rotimi : Causative bacteria of respiratory tract infections in Kuwait by quantitative culture of sputum. J. Infect Chemother 5. 217-219, 1999
4. 永武 毅：インフルエンザのマネジメント 3. インフルエンザの治療 1) インフルエンザに対する対症療法とアマンタジンによる治療. 医薬ジャーナル. 36 (1) 143-146, 2000
5. Hideaki Amano, Hidefumi Yamamoto, Masachika Senba, Kazunori Oishi, Shoichi Suzuki, Kenichi Fukushima, Naofumi Mukaida, Kouji Matsushima, Katsumi Eguchi, Tsuyoshi Nagatake : Impairment of Endotoxin - Induced Macrophage Inflammatory Protein 2 Gene Expression in Alveolar Macrophages in Streptozotocin - Induced Diabetes in Mice. Infection and Immunity. 68 (5) 2925-2929,

2000

6. Borann Sar, Kazunori Oishi, Akihiro Wada, Toshiya Hirayama, Kouji Matsushima, Tsuyoshi Nagatake : Induction of monocyte chemoattractant protein - 1 (MCP - 1) production by Pseudomonas nitrite reductase in human pulmonary type II epithelial - like cells. Microbial Pathogenesis 28.17-23, 2000
7. Hiroshi Watanabe, Satoshi Sato, Kenichi Kawakami, Kiwao Watanabe, Kazunori Oishi, Naoto Rikitomi, Tsuyoshi Ii, Hideaki Ikeda, Akiyoshi Sato, Tsuyoshi Nagatake : A comparative clinical study of pneumoia by penicillin - resistant and - sensitive Streptococcus pneumoniae in a community hospital. Respiratory. 5.59-64, 2000
8. Kamruddin Ahmed, Tomomi Nakagawa, Yamaji Nakano, Glenda Martinez, Akitoyo Ichinose, Can Hong Zheng, Mayumi Akaki, Masamichi Aikawa, Tsuyoshi Nagatake : Attachment of Moraxella catarrhalis occurs to the positively charged domains of pharyngeal epithelial cells. Microbial Pathogenesis. 28.203-209, 2000

厚生省科学研究費補助金 (脳科学研究事業) 分担研究報告書

インフルエンザ脳炎・脳症発症機序の解析と治療法の開発に関する研究

分担研究者 黒田泰弘 徳島大学医学部小児科教授

研究要旨

インフルエンザ脳炎・脳症患者12名の検体が提供され、うち7名の尿、血清及び乾燥血液濾紙の有機酸、脂肪酸、アシルカルニチン、アミノ酸を定量分析した。先天性及び本症に特有な後天性代謝異常は見出せなかったが7例中2例でVPA代謝産物が検出された。インフルエンザ脳炎・脳症で血中に増加するTNF- α 及びIL-6は培養リンパ球と培養皮膚線維芽細胞のエネルギー代謝は障害しなかったが、正常ラット血管の内皮を介する血管拡張増強作用を有することが明らかになった。インフルエンザ感染後、高サイトカイン血症及び強度の血管炎を来すと血管透過性が亢進し、その結果、脳浮腫による脳症を発症することが推測される。今後、サイトカインの血管拡張増強作用を分子レベルで解析することにより新たな薬物療法の開発が期待できる。

A. 研究目的

近年、小児を中心にインフルエンザに伴う中枢神経系の障害、すなわちインフルエンザ脳炎・脳症の報告が増加し問題になっている。本症は、高熱と痙攣とを伴い急速に意識障害が進行し、半数の患者は数日で死に至るか、生存しても中枢神経障害を残す。インフルエンザ脳炎・脳症では、発症から中枢神経症状の発現までの日数が大多数例で0-1日と短く、病理学的には、著明な脳浮腫、脳及び全身の血管の障害、血球貪食症候群などがみられる。また、TNF- α 、IL-6などのサイトカインや血管内皮細胞のみで発現し、白血球のrollingの過程に機能するE-

selectinが血中に増加する。

これらのことから、インフルエンザ脳症の本体は、脳の血管炎と脳浮腫であり、次のような発症機序が考えられる。インフルエンザウイルス感染時に血中に増加するサイトカイン、白血球からのinducible一酸化窒素(NO)、中間代謝産物等の分子が血管内皮細胞の代謝を直接的あるいは間接的に障害して内皮機能は一時亢進状態となり血管は拡張する(図1)。しかし、その後、内皮細胞機能自体が血管炎により損傷されて血管は拡張状態のままそのトーンスを維持できなくなり間質に水分が多量に流出して脳浮腫をきたす。この考えのもとに次の研究を実施した。

1)インフルエンザ脳炎・脳症の基礎疾患としての先天代謝異常症及びインフルエンザ脳炎・脳症に特有な代謝異常を検索するために本症患者の尿及び血液中の中間代謝産物を定量分析した、2)血管収縮・拡張機能及び細胞エネルギー代謝に及ぼすTNF- α 及びIL-6作用を解析した。

B.研究方法

1) 検体採取法：

全国の大学小児科教授42名と徳島大学小児科の関連病院の小児科部長・医長26名宛てに検体〔咽頭ぬぐい液、尿、乾燥血液濾紙、血清、髄液〕採取用容器、インフルエンザ脳炎・脳症チェックリスト及び説明・同意書を送付し、関連病院も含めて患者発生時の検体採取と提供とを依頼した。

2) 有機酸、脂肪酸、アシルカルニチン、アミノ酸等中間代謝産物の定量分析法：全国の医療施設から送付されてきた尿、血清、髄液及び乾燥血液濾紙は、直ちに島根医科大学小児科、久留米大学小児科及び福井医科大学小児科に送付し、gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS) 法及び tandem mass spectrometry (MS/MS) 法で中間代謝産物を定量分析した。

3) 血管拡張機能測定法(図2)：ラットの内頸動脈を摘出し、正常な血管リングと血管内皮を剥離した血管リングとを作成した。血管リングに1gの張力を加え、フェニレフリン(Phe) $5 \times 10^{-7} M$ で血管を収縮させた後、アセチルコリン(Ach)は、 $1 \times 10^{-9} M$ より $1 \times 10^{-5} M$ までの血管弛緩率を、ニトログリセリン(NTG)は、 $1 \times 10^{-8} M$

から $1 \times 10^{-5} M$ までの血管弛緩率を張カトランスデューサーを用いて測定した。この測定系にIL-6(100ng/ml)およびTNF- α (1ng/ml)を加えて血管弛緩率に及ぼす作用を評価した。

4) 培養細胞ピルビン酸脱炭酸能測定法：培養リンパ球、培養皮膚線維芽細胞をPBSに浮遊させた後、ピルビン酸脱水素酵素(PDH)の活性化剤であるジクロロ酢酸ナトリウム(DCA) 10mM、及び種々のサイトカインを添加して、30分間、37度で保温した。次いで、〔1-14C〕ピルビン酸を加えて30分間、保温し、発生したCO₂の測定によりピルビン酸脱炭酸能を算出した。

C.研究結果

1) 検体の採取と中間代謝産物の定量分析：

インフルエンザ脳炎・脳症12例の検体が得られた。現時点までに分析された7例の乾燥血液濾紙のアシルカルニチンには異常がみられなかった(表1)。分析された7例の尿検体中6検体では、ケトースと3-ヒドロキシ酪酸、バルプロ酸(VPA)代謝産物、乳酸およびジカルボン酸の増加がみられたが、先天性代謝異常症及びインフルエンザ脳炎、脳症に特有な代謝異常は見出されなかった(表1)。

2) 正常ラット血管の拡張機能に及ぼすTNF- α とIL-6の作用：

正常血管におけるAch(内皮依存性弛緩物質)の弛緩反応は血管内皮がある群では良く、内皮の剥離により減弱した(図2)。IL-6 (100ng/ml)の添加により内皮がある群では弛緩反応が増強され、IL-6 無添加では弛緩反応がほと

んど見られないAch 1×10^{-9} でも弛緩反応が見られたが内皮剥離群ではIL-6の増強効果はみられなかった(図3)。TNF- α (1ng/ml)の添加でも内皮がある群では弛緩反応の増強がみられたが、内皮剥離群ではみられなかった(図4)。NTG(内皮非依存性弛緩物質)による弛緩反応は内皮がある群と内皮剥離群、両群でみられた(図5)。しかし、IL-6とTNF- α の添加によっても弛緩反応は増強されなかった(図6, 7)。

3) ヒト培養細胞のエネルギー代謝に及ぼすTNF- α とIL-6の作用:

培養リンパ球[1-14]ピルビン脱炭酸能は、TNF- α (1, 10ng/ml)及びIL-6 (10, 100ng/ml)の添加により軽度低下傾向を示した(表2, 3)。培養皮膚線維芽細胞[1-14C]ピルビン酸脱炭酸能は、IL-6 (10, 100ng/ml)の添加でも変化なかった(表3)。

D. 考察

インフルエンザ脳炎・脳症はわが国の小児に多くみられ、厚生省インフルエンザ脳炎・脳症研究班の報告によれば、91例全体の予後については、死亡が27例(30%)、重度後遺症7例(8%)、軽度後遺症15例(16%)と非常に悪く、後遺症なく治癒した症例は42例(46%)に過ぎなかった。この報告が示すようにインフルエンザ脳炎・脳症の予防・治療法の開発は一刻も早くなされねばならない重要な研究課題である。我々は、代謝異常の視点から本症の病態を解析し、治療・予防法開発への展開を試みた。

有機酸代謝異常症、尿素サイクル異

常症等先天代謝異常症は、稀な疾患ではあるが、感冒等の感染症により生体に負荷がかかると重篤なアシドーシスや高アンモニア血症発作が誘発されて脳症をしばしば発症する。

そこで、インフルエンザ脳炎・脳症児の基礎疾患としての先天代謝異常症及びインフルエンザ脳炎・脳症に特有な代謝異常を検索するために、尿および血液中の中間代謝産物を定量分析するGC/MS法とMS/MS法とを確立し、検体の提供を全国の大学病院小児科及びその関連病院に依頼した。

本年度は、インフルエンザがあまり流行しなかったにもかかわらず各病院の協力により3月1日現在、12例の検体が提供された。今後、全大学病院小児科教授への依頼によりさらに多くの検体の提供を受けられることが期待できる。また、アシルカルニチン、有機酸等が分析された7例の中には先天代謝異常症や本症に特有な代謝異常は見出されなかった。しかし、Rye症候群の発症に関与するVPAの代謝産物が7例虫2例で見られたことはインフルエンザ脳炎・脳症の病因を考える上で興味深い。今後、さらに症例数を増やして検索を続ける価値があろう。

インフルエンザ脳炎・脳症では脳血管のみならず全身の血管の内皮機能が障害されることが知られている。しかし、その程度や内皮障害と中枢神経障害や多臓器不全との関係に関しては不明な点が多い。我々は、インフルエンザ脳症の本体は、発症後、短時間で脳症を発症する、血管炎がみられる、血中にTNF- α , IL-6などのサイトカインが増加する等今までに報告された知見

から脳血管内皮細胞における何らかの代謝障害に起因する脳浮腫と考慮して研究を進めた。

本研究で行った正常ラット頸動脈を用いた張力実験で、インフルエンザ脳症患児で検出される血中レベルのTNF- α やIL-6が内皮を介して血管の弛緩反応を増強することが明らかになった。したがって、インフルエンザ発症の初期にはサイトカインによる過度の血管拡張により血管透過性の亢進が惹起されるとともに強度の炎症により内皮が傷害されて血管透過性の更なる亢進により脳浮腫をきたし脳症を発症することが十分考えられる。この仮説が正しければ血漿交換により高サイトカイン血症を是正することは治療法として理にかなっている。本研究では、TNF- α とIL-6とは培養リンパ球及び培養皮膚線維芽細胞のピルビン酸脱炭酸能を障害しなかった。しかし、今後、培養血管内皮細胞について検討することが必要である。また、血管内皮細胞で産生されるNOは強力な血管拡張作用を有することが知られているので本研究で明らかにしたTNF- α およびIL-6の血管拡張増強作用を分子レベルで明らかにすれば新たな薬物療法の開発への展開が望めよう。

E. 結論

インフルエンザ脳炎・脳症患児7例中2例でVPA代謝産物が検出されVPA服用と本症の発症との関連性を症例を増やして検討する必要がある。本症で血中に増加するTNF- α 及びIL-6はNOの血管拡張作用を増強することが明らかとなり脳浮腫の発生に関与すること

が推察される。本症の治療法としてNO阻害薬の使用も考えられる。

No.	イニシヤル	性別	年齢	抗原	血液	尿	臨床症状	ウイルス株分離
1	T.K	M	3		AC:異常なし	ケトーシス 3-OH-butyric acid の軽度上昇	意識障害 髄液細胞増加	
2	S.Y	M	8	-		VPA 代謝産物	意識障害 痙攣、メフェナム酸使用、劇症肝炎	-
3	T.T	M	2	+	肝機能障害	VPA 代謝産物	痙攣、意識障害 アセトアミノフェン使用、脳 CT 異常	-
4	M.I	F	1	-	AC:異常なし 肝機能障害	異常なし VPA 代謝産物	意識障害 痙攣 脳 CT 異常	-
5	N.M	F	5	-	AC:異常なし 血液凝固異常	異常なし	痙攣 意識障害 脳 CT 異常	+
6	K.Y	F	1	+	AC:異常なし	ケトーシス(+++) 乳酸排泄増加	痙攣、意識障害 アセトアミノフェイン使用	+
7	K.K	M	2	+	AC:異常なし 高血糖	ケトーシス(+++) 乳酸排泄 軽度増加	痙攣 意識障害	+
8	N.A	F	1	-	AC:異常なし 高血糖	ケトーシス ジカルボン酸	痙攣、意識障害 アセトアミノフェイン使用	-
9	A.T	F	2	+	AC:異常なし	ケトーシス 軽度	痙攣、アセトアミノフェイン使用 脳 CT 異常	+
10	K.K	M	8	+		乳酸排泄 軽度増加	意識障害 脳 CT 異常	+
11	S.Y	M	4	+		ケトーシス (3-OH-butyric acetoacetic acid)	意識障害、 アセトアミノフェイン使用	+
12	H.T	F	7	-			痙攣 意識障害	

表2 TNF- α 存在下での[1- 14 C]ピルビン酸脱炭酸能 (nmol/hr/mg protein)

TNF- α (pg/ml)	0	1,000	10,000
培養リンパ球	142	134	131

表3 IL-6存在下での[1- 14 C]ピルビン酸脱炭酸能 (nmol/hr/mg protein)

IL-6 (ng/ml)	0	1	10	100
培養リンパ球	113	110	105	103
培養皮膚線維芽細胞	27	28	28	29

インフルエンザ脳炎・脳症患児の髄液中濃度 TNF- α ; 10~1000 pg/ml (正常 7.5pg/ml以下)

IL-6 ; 1~100 ng/ml (正常 30pg/ml以下)

図 1

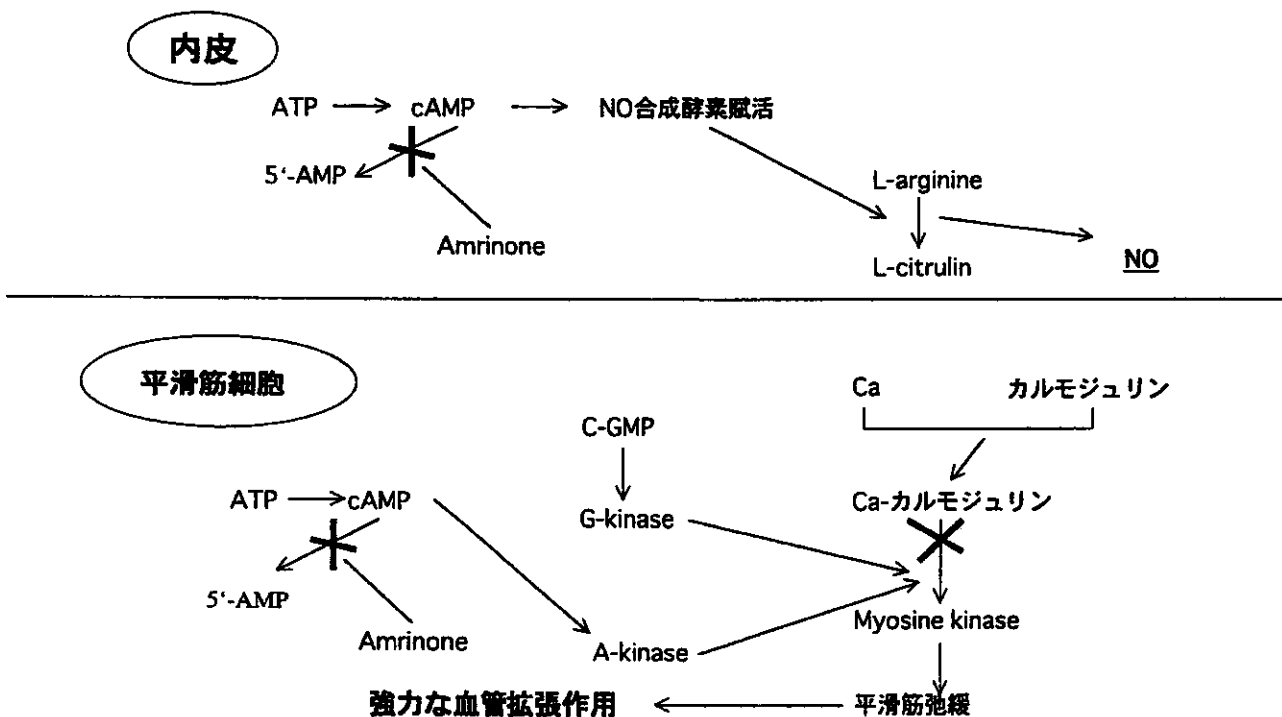


図 2

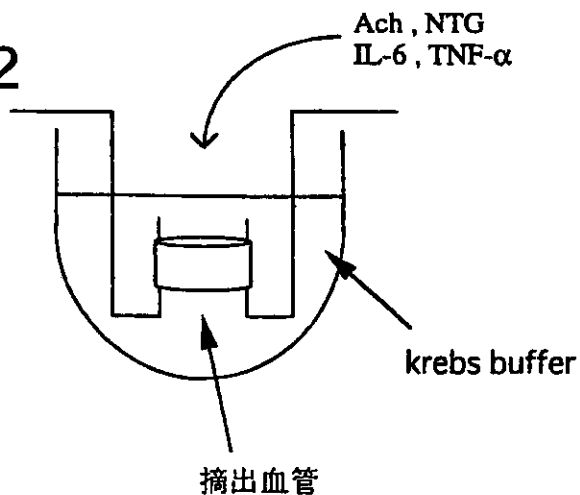


図3

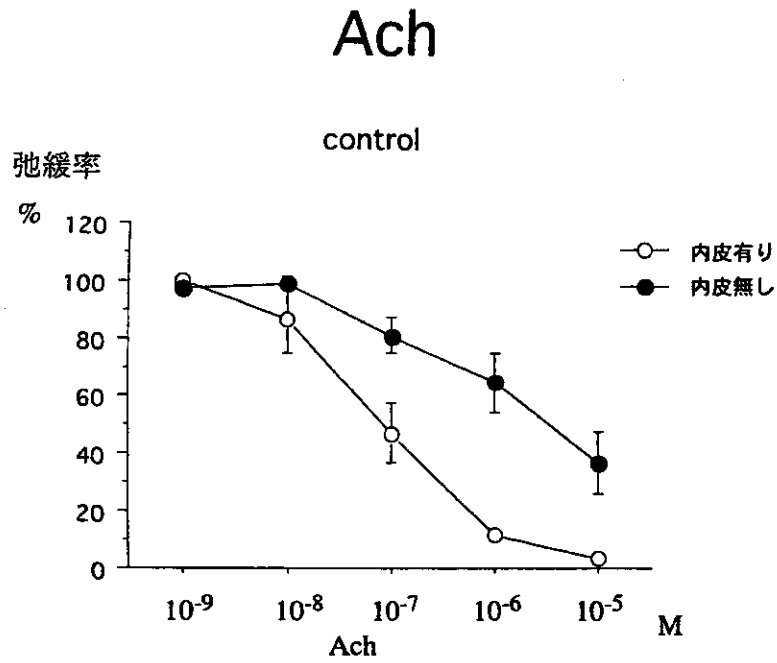


図4

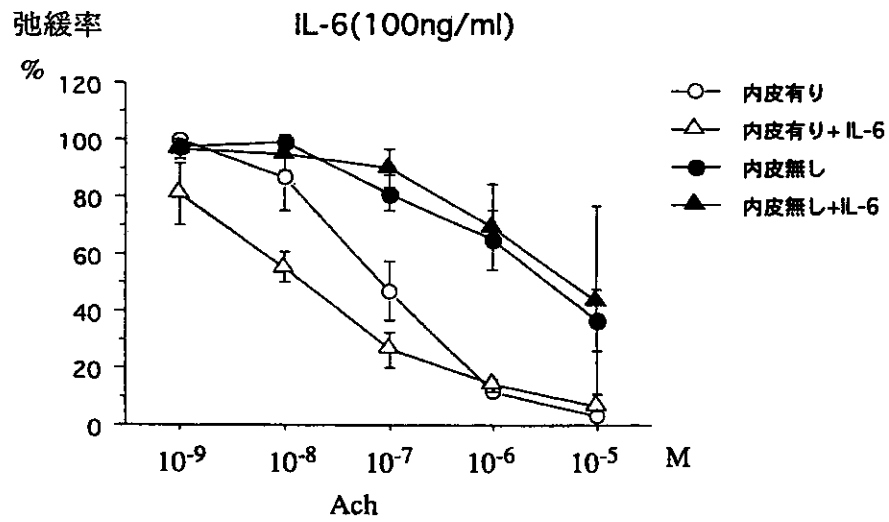
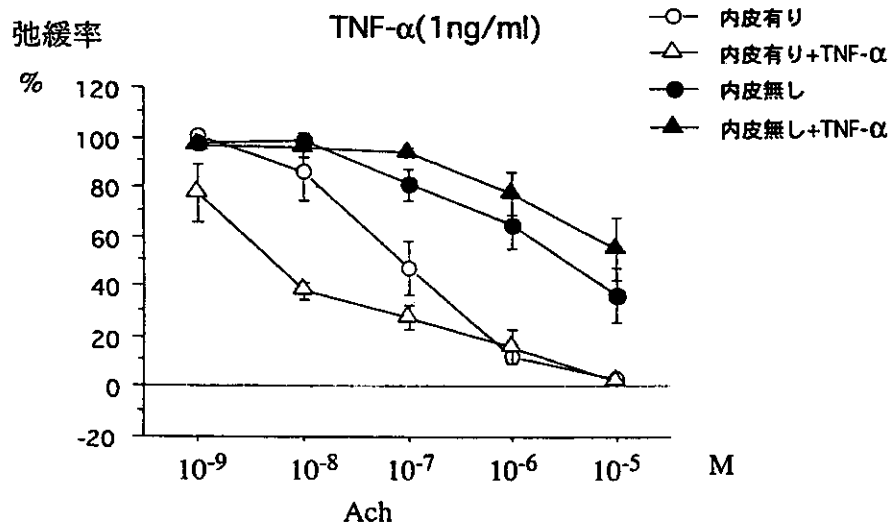


図5



NTG

図6

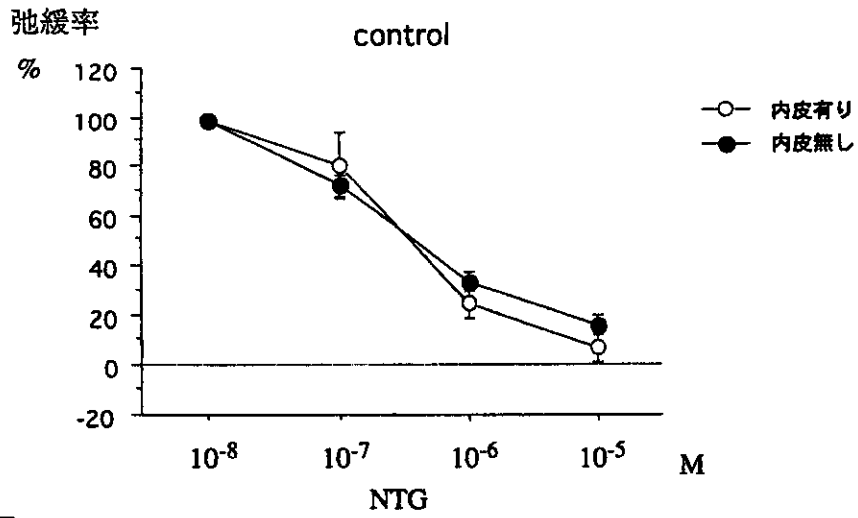


図7

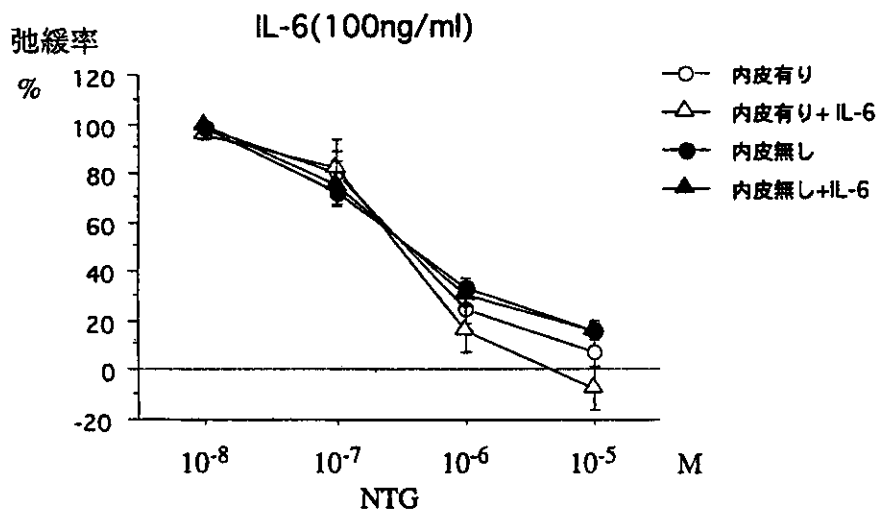
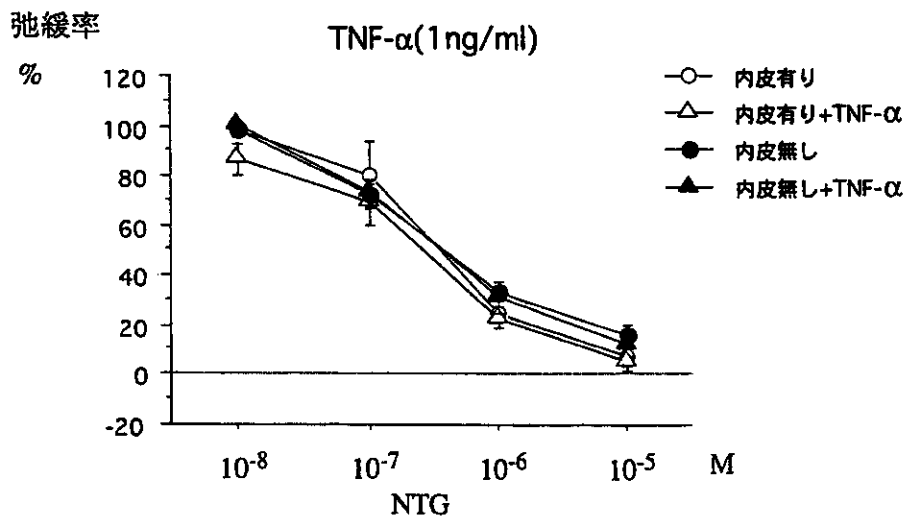


図8



3. 患者検体依頼書類

平成13年1月5日

殿

インフルエンザ脳炎・脳症患者の検体採取について（依頼）

拝啓

初冬の候、先生におかれましてはますます御清栄のこととお慶び申し上げます。

さて、この度平成12年度厚生科学研究、「インフルエンザ脳炎・脳症の発症機序の解析と治療法の開発」（課題番号 H121-脳-015）の研究を命ぜられ、現在研究を進めております（別紙1研究計画書）。

御存じのようにインフルエンザ脳炎・脳症の発症原因は、現在全く不明であり有効な治療法もございません。そこで4つの分担研究班を組織して1）インフルエンザウイルスの脳内侵入機構と増殖機序の生化学的解析、モデル動物作成（木戸） 2）インフルエンザウイルスの脳内侵入機構と増殖機序のウイルス学的解析、特に患者から分離したウイルスの性状解析（大内） 3）インフルエンザ脳炎・脳症患者の基礎疾患（代謝異常症）の検索（黒田） 4）インフルエンザ脳炎・脳症患者の咽頭内細菌叢の検索と増悪因子の解明と治療法開発（永武）を目指しております。この研究課題に取り組むに当たりまして、ウイルスの性状解析のためのウイルス分離材料と、病態解析と治療法開発のための臨床検査材料が不可欠です。そこで、先生が診察されておられる患者さんの中でインフルエンザ脳炎・脳症が疑われる患者さんがおられましたら、別紙2の同意書で患者さんあるいは御家族の了解をいただいた上、ぜひ検体（別紙3）と患者チェックリスト（別紙4）をお送り下さいますようお願い致します。

研究の主旨に御理解いただき、ぜひとも御助力のほどお願い申し上げます。

敬具

木戸 博

徳島大学分子酵素学研究センター、酵素分子化学部

〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15

TEL: 088-633-7423 FAX: 088-633-7425

e-mail: e-mail:kido@ier.tokushima-u.ac.jp

(別紙2)

患者さんとお家族の皆様へ

私たちは、インフルエンザ脳炎・脳症がなぜ起こるのかを明らかにして、新しい治療法を見つけるための研究をしています。今回、下に書いたような研究を進めるために、本日、血液、髄液、尿と咽頭ぬぐい液（綿棒でのどを軽くこすって取った粘液）を取らせて頂きたいと思っております。研究の目的をご理解いただいてご協力下さいますようお願い致します。

研究の目的：

- 1) 脳炎・脳症を起こすインフルエンザ・ウイルスは、どのような性質を持っているか？
- 2) インフルエンザ・ウイルスを助けて脳炎・脳症を起こす細菌や他のウイルスがのどにいないか？
- 3) インフルエンザにかかった時に脳炎・脳症を起こす体質でないか？
- 4) インフルエンザにかかった時に脳炎・脳症を起こすものが血液や髄液に含まれていないか？

取らせて頂くもの（下記のうち可能なもの）

- 1) 咽頭ぬぐい液, 2) ガスリーテスト用の濾紙血, 3) 尿1cc, 4) 血液0.5～1.0cc, 5) 髄液0.1～0.5cc

お約束：

- 1) 患者さんの名前が判ってしまうような情報は一切公表しません。
- 2) 同意が頂けない場合でも診療面での不利益は一切ありません。
- 3) 頂いた血液などはこの研究以外には利用しません。
- 4) 今回、同意を頂いた後であっても、担当医に申し出て頂ければその血液等を研究に使うことはありません。
- 5) 研究結果を学会発表や論文などに利用することがあります。

小児科担当医

印

上記の説明を受けて血液などの採取およびその研究利用に同意します。

平成 年 月 日

住所

患者氏名

印

保護者氏名

印

(別紙3)

検体リストと採取上の注意事項

同意を確認した上、できる範囲内で御協力をお願い致します。

- 咽頭ぬぐい液 I——ウイルス抗原（インフルエンザ A 抗原, EIA 測定）：
4°Cで冷蔵庫、当日同封した依頼書を添えて SRL に依頼（月一金）
- 咽頭ぬぐい液 II——ウイルス検索用：4°Cで冷蔵庫、数日以内に送付
- 乾燥血液濾紙（ガスリーテスト用の濾紙を御使用いただき、ビニール袋に
いれてお送り下さい）。——代謝異常症検索用：室温乾燥後 4°Cで冷蔵
庫、10 日以内に送付
- 血液：0.5-1 ml（採血後速やかに EDTA 入りの採血チューブに入れる。）
——生化学的検索用：4°Cで冷蔵庫、10 日以内に送付
- 尿：1 ml——代謝異常症検索用：-20°Cで冷蔵庫、10 日以内に送付
- 髄液：0.1-0.5 ml（容器内に streptomycine, kanamycine を含みます）——
ウイルス検索用：4°Cで冷蔵庫、数日以内に送付

(採取上の注意事項)

1. 咽頭ぬぐい液 II を滅菌綿棒で採取した後綿棒を培養液につけ、壁に擦り付け
て絞った後培養液を 4°C保存の上、当日か数日中にお送りいただければ幸いです。
やむお得ず 1 週間以上保存する時は -80°C をお願い致します。
2. 尿検体のみ -20°C での保存をお願い致します。

(送る方法) 病院を担当する SRL に電話をして、輸送と検査を依頼して下さい。

御不明な点、御質問等がありましたら、徳島大学分子酵素学研究センター・教授、
木戸博または助教授・唐渡孝枝 (Tel:088-633-7423, Fax: 088-633-7425)まで御連絡
下さい。

(別紙4)
急性インフルエンザ脳炎・脳症患者のチェックリスト

記入者氏名 ()
記入者所属施設 ()

1. 病歴

- 1) _____ (イニシャル) ____年__月__日 (生年月日)
- 2) 発症時年齢 _____ 歳
- 3) 性別 男 女
- 4) 発熱から脳症 (脳炎) までの期間 _____ 日
- 5) 後遺症の有無 有 無
どのような後遺症ですか。 _____
- 6) 家族内、親戚に同じ様な症状を示したヒトがいますか。 いる いない
いる場合: 家族内 () 親戚 ()

2. 臨床症状

- | | | |
|----------------|----|----|
| 1) 発熱 | あり | なし |
| 2) 痙攣 | あり | なし |
| 3) 意識障害 (非痙攣時) | あり | なし |
| 4) 咳 | あり | なし |
| 5) 嘔吐 | あり | なし |
| 6) 鼻汁 | あり | なし |
| 7) 下痢 | あり | なし |

3. 臨床検査

- | | | | |
|-----------------------|----|----|-----|
| 1) 肝機能異常 | あり | なし | 未実施 |
| 2) 血液凝固能異常 | あり | なし | 未実施 |
| 3) 高血糖 | あり | なし | 未実施 |
| 4) 高アンモニア血症 | あり | なし | 未実施 |
| 5) 血清TNF- α 上昇 | あり | なし | 未実施 |
| 6) 血清IL-6上昇 | あり | なし | 未実施 |
| 7) 髄液TNF- α 上昇 | あり | なし | 未実施 |
| 8) 髄液IL-6上昇 | あり | なし | 未実施 |
| 9) 髄液細胞数増加 | あり | なし | 未実施 |
| 10) 髄液蛋白増加 | あり | なし | 未実施 |
| 11) 脳CT異常 | あり | なし | 未実施 |

4. ウイルス学的検査

- | | | | |
|----------------------------------|----|----|-----|
| 1) 迅速診断 (Directigen flu A など) 陽性 | あり | なし | 未実施 |
| 2) ウイルス分離陽性 | あり | なし | 未実施 |
| 3) HI抗体上昇 | あり | なし | 未実施 |
| 4) RT-PCR法陽性 | あり | なし | 未実施 |

5. 解熱剤の使用

- | | | |
|-------------------------|----|----|
| 1) ジクロフェナクナトリウム (単剤) | あり | なし |
| ジクロフェナクナトリウム + α | あり | なし |
| 2) メフェナム酸 (単剤) | あり | なし |
| メフェナム酸 + α | あり | なし |
| 3) アセトアミノフェン (単剤) | あり | なし |
| アセトアミノフェン + α | あり | なし |
| 4) その他の解熱剤 | あり | なし |
| その他の解熱剤 + α | あり | なし |