

## 北海道における小児期インフルエンザ脳炎・脳症の発症状況

分担研究者 富樫武弘 市立札幌病院 副院長

**研究要旨** 1994/95 から 2000/01 に亘る 7 回のインフルエンザシーズンに、北海道で発症したインフルエンザ脳炎・脳症の実態を調査した。7 シーズンで 74 例（年平均 10.6 例）発症し、男 46、女 28（男女比 1.6:1）、平均年齢は  $4.2 \pm 2.9$  歳、発熱から神経症状開始までの間隔は  $1.7 \pm 1.8$  日であった。転帰は死亡 29 例（39.2%）、後遺症 14 例（18.9%）、軽快 31 例（41.9%）であった。臨床症状は発熱と意識障害が 100%にみられ、痙攣が 78.4%にみられた。発症者数の推移を年次別にみると、全国のインフルエンザ様疾患の発症数と平行しており、とくに A(H3N2)の流行の多寡に依存しているとの傾向がみられた。

### A. 研究目的

インフルエンザの流行期にみられる小児期急性脳炎・脳症の、北海道における年次別発症状況を検討し、全国的に纏められる発症状況と比較することを目的とする。また各シーズンにおける亜型の分離状況と脳炎・脳症の発症状況を比較して、亜型との関連を検討することを目的とする。

### B. 研究方法

小児科医が常勤し、小児科の入院ベッドを保有している施設は北海道に 95 ある。この施設の小児科責任者に対し、インフルエンザ流行の終焉する 3 月下旬ないし 4 月上旬にアンケート調査を行った。内容はその地方のそのシーズンのインフルエンザの流行状況、脳炎・脳症を含めた重症合併症で入院した患者の有無である。脳炎・脳症の発症ありと返答のあった施設には、さらに二次アンケートを送付してその症例の詳細を聞いた。期間は 1994/95 シーズンから 2000/01 シーズンまでの 7 シーズンである。

市立札幌病院ではこれと同じシーズン中に、小児科外来を訪れた高熱を訴える患者の鼻咽頭スワブを採取して、北海道衛生研究所あるいは札幌市衛生研究所に送付している。いずれかの施設でインフルエンザウイルスを分離同定して、その結果はその都度報告されている。

### C. 研究結果

#### 1. インフルエンザ脳炎・脳症の発症状況

2000/01 シーズンの 3 例から 1997/98 シーズンの 22 例まで合計 74 例発症し年平均 10.6 例であり、男 46 例、女 28 例で男女比は 1.6:1 であった。年齢は 9 カ月から 12 歳に発症し、平均年齢は  $4.2 \pm 2.9$  歳で 5 歳未満の児は 55 例で 74.3%を占めていた。発熱から神経症状の開始までの期間の平均は  $1.7 \pm 1.8$  日であった。転帰は死亡が 29 例（39.2%）、後遺症が 14 例（18.9%）、軽快が 31 例（41.9%）であっ

た。（表 1）（図 1）

#### 2. 臨床症状と検査所見

発熱と意識障害は 100%に、痙攣は 78.4%にみられた。脳波、脳 CT、MRI の異常所見はそれぞれ 83.3、75.8、65.2%に、血清 AST/ALT、LDH、CPK 異常はそれぞれ 54.1、50.8、32.4%に、血糖上昇は 45.9%にみられた。血液凝固系異常は 28.4%に、髄液細胞上昇は 24.1%に、血清アンモニアは 5.7%にみられた。（表 2）

#### 3. インフルエンザ流行状況と脳炎・脳症の発症状況

国立感染症研究所感染症情報センターでは、インフルエンザ発生報告定点からの報告に、都道府県の教育委員会から報告される学校現場のインフルエンザ様疾患患者数を加えて、インフルエンザ様疾患患者数の年次推移を報告している。この年次推移を 1987/88 シーズンから 2000/01 シーズンの 14 シーズンを図示すると、1994/95 シーズンのように 1,000 万を超える大流行の年もあり、また 1993/94 シーズンのように 200 万を下回る年もあった。これに 1994/95 シーズン以降 7 シーズンに、市立札幌病院小児科外来患者の鼻咽頭スワブから得られた亜型別インフルエンザウイルスの分離数と、北海道で発症した脳炎・脳症数、死亡者数を図に加えて示した。（図 2）

### D. 考察

厚生科学研究「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」班（主任研究者森島恒雄名大教授）は、1999/00 シーズンから各シーズンの 1 月から 3 月に発症した脳炎・脳症症例を全国規模で集計している。これによると、1999 年は 217 例発症して 58 例死亡（死亡率 26.7%）、2000 年は 109 例発症して 31 例死亡（死亡率 28.4%）、2001 年は 55 例発症して 6 例死亡（死亡率 10.9%）と纏められた（図 3）。筆者の纏めた北海道の症例数はそれぞれ 11、7、3 であり、北海道の症例数を大略 20 倍すると全国の症例数と推定されるとの以前か

らの提唱が裏打ちされることとなった。

1994/95 シーズンから実施してきた北海道における7シーズンの推移をみると、脳炎・脳症の発症はインフルエンザ様疾患患者数の多寡すなわち流行の大きさに平行しているとの傾向がうかがわれた。さらに市立札幌病院小児科で同定された亜型分離数から分析すると、インフルエンザウイルス A(H3N2)の流行の規模に依存している傾向がうかがわれた。

研究班の3シーズンに亘る研究で浮上した問題点は、1) インフルエンザ脳炎・脳症の発症メカニズムは何か、2) 日本人に多く発症する理由は何か、欧米人には発症していないのか、3) 解熱剤として使用されたNSAIDsは発症に関与しているのか、あるいは予後にどのように関与しているのか、4) 現行の不活化ワクチンは発症予防に効果があるのか、5) 治療法の確立、の5点である。発症メカニズムに関しては不明の域を出ないが、全身の血管内皮細胞障害が候補に挙げられている。2)に関しては欧米とのコントロールスタディが始まっており、3)に関しては厚生科学研究班がスタートした。4)については他の研究グループとも連携して早急に結論を出さなければならない。治療法に関してはこの研究班とは別に「インフルエンザ脳炎・脳症の治療研究会」を組織して、インフルエンザ脳炎・脳症の特殊治療(試案)を印刷して、全国の主だった施設に配布している。

#### E. 結論

1994/95 シーズンから7シーズンに亘って調査したインフルエンザ脳炎・脳症は、北海道で年平均10.6例であり、各年度全国の発症数は北海道における発症数の約20倍と推定した。インフルエンザウイルスの亜型については、B、A(H1N1)、A(H3N2)いずれの型でも発症しているが、A(H3N2)の流行規模に依存していると推定した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 著書

a. 筆者氏名：Takehiro Togashi, Yoshihiro Matsuzono, Tsuneo Morishima, Mitsuo Narita.

論文タイトル名：Acute encephalitis-encephalopathy during influenza epidemics in Japanese children.

書籍全体の編集者名：Albert Osterhaus, Nancy Cox and Alan Hampson

書籍名：Options for the Control of Influenza IV

出版社：Excerpta Medica

出版地：Amsterdam

出版年：2001年

ページ：609-613

b. 筆者氏名：富樫武弘

論文タイトル名：インフルエンザ脳症

書籍全体の編集者名：柳澤信夫、篠原幸人、岩田誠、清水輝夫、寺本 明

書籍名：Annual Review 神経 2002

出版社：中外医学社

出版地：東京

出版年：2002年

##### 2) 雑誌

a. 富樫武弘。インフルエンザ治療薬におけるNSAIDsの役割。Current Therapy(カレントセラピー)19(5):137-138, 2001

b. 富樫武弘。インフルエンザ脳神経系合併症。JIM11(11):1031-1033, 2001

c. 富樫武弘。インフルエンザ脳炎・脳症における脳障害の機序。小児科42(13):2060-2065, 2001

d. 富樫武弘、松蘭嘉裕、武越靖郎、長野奈緒子。小児期インフルエンザ脳炎・脳症の2剖検例。日本小児科学会雑誌106(1):76-80, 2002

##### 2. 学会発表

1) 富樫武弘：小児インフルエンザ脳炎・脳症の発症病理の検討。第16回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 平成13年1月26-28日(於沖縄本部)

2) 富樫武弘、松蘭嘉裕、穴倉迪彌、岡 洋瑚、山中 樹、綿谷靖彦、高橋 豊、古山正之、渡辺 徹、門脇純一：小児インフルエンザ脳炎・脳症の発症病理の研究。第26回札幌市医師会医学会 平成13年2月18日(於札幌市)

3) 富樫武弘、古田博文、松蘭嘉裕、成田光生：インフルエンザ脳炎・脳症の剖検所見。第104回日本小児科学会学術集会 平成13年5月18-20日(於仙台市)

4) Takehiro Togashi, Yoshihiro Matsuzono, Tsuneo Morishima, Mitsuo Narita.: Pathological and virological findings of influenza associated acute encephalopathy in Japanese children. 23rd International Congress of Pediatrics 2001年9月9-14日(於Beijing China)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1.インフルエンザ流行期の小児期脳炎・脳症  
(北海道、1994/95～2001/01、7 シーズン)

	'94/95	'95/96	'96/97	'97/98	'98/99	'99/00	'00/01	合計
北海道における インフルエンザ の流行	A(H1N1), A(H3N2),B	A(H1N1), A(H3N2)	A(H3N2), B	A(H3N2), A(H3N2), B	A(H3N2), B	A(H3N2), A(H1N1)	B,A(H1N1), A(H3N2)	
症例	12	14	5	22	11	7	3	74
性(男/女) (性比)	9/3	9/5	3/2	15/7	6/5	3/4	1/2	46/28 (1.6:1)
平均年齢 (歳)	3.1 (1-9)	3.9 (1-10)	5.0 (0-12)	4.5 (1-11)	2.5 (1-4)	3.9 (1-8)	4.9 (2-7)	4.2±2.9 (0-12)
発熱-神経 症状(日)	2.5 (1-6)	2.9 (0-10)	3.2 (2-5)	1.2 (0-3)	0.8 (0-1)	1.1 (0-4)	1.0 (0-2)	1.7±1.8
転帰								
死亡	6	7	3	7	5	1	0	29(39.2%)
後遺症	3	2	1	6	1	1	0	14(18.9%)
軽快	3	5	1	9	5	5	3	31(41.9%)

表 2.インフルエンザ流行期の小児期脳炎・脳症  
(北海道、1994/95～2001/01、7 シーズン)

臨床症状	% (例)	検査所見	% (例/検査数)
発熱	100 (74)	脳波異常	83.3 (45/54)
意識障害	100 (74)	脳CT異常	75.8 (50/66)
痙攣	78.4 (58)	脳MRI異常	65.2 (15/23)
咳嗽	50.0 (37)	AST/ALT異常	54.1 (40/74)
鼻汁	39.2 (29)	血糖上昇	50.8 (32/63)
悪心	13.5 (10)	LDH上昇	45.9 (34/74)
頭痛	4.1 (3)	CPK上昇	32.4 (24/74)
疲労感	4.1 (3)	凝固系異常	28.4 (21/74)
		髄液細胞上昇	24.1 (14/58)
		アンモニア上昇	5.7 (4/70)

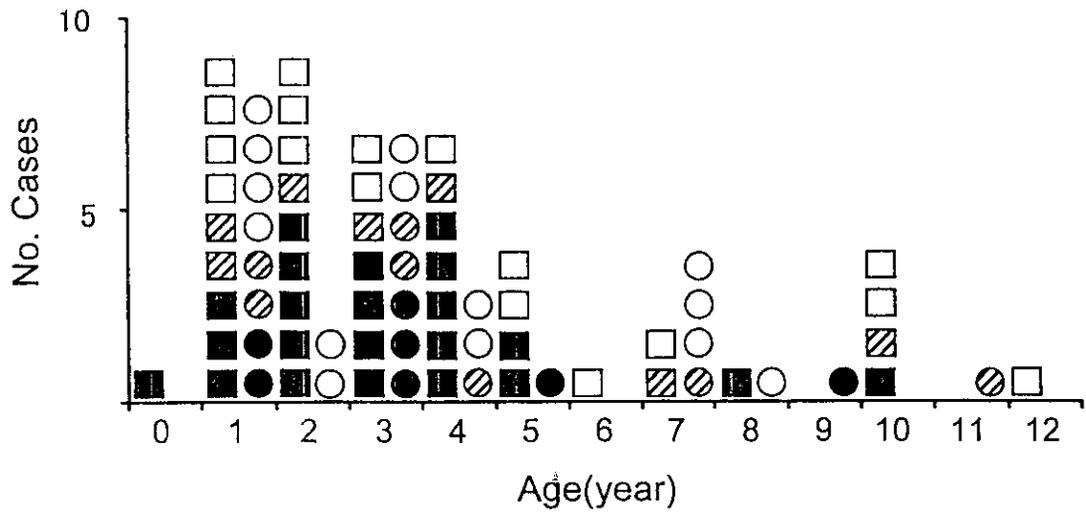


図 1.インフルエンザ流行期の小児期脳炎・脳症の年齢別、性別、予後別発症状況  
 □:男 ○:女 ■●:死亡 ▨▩:後遺症 □○:軽快

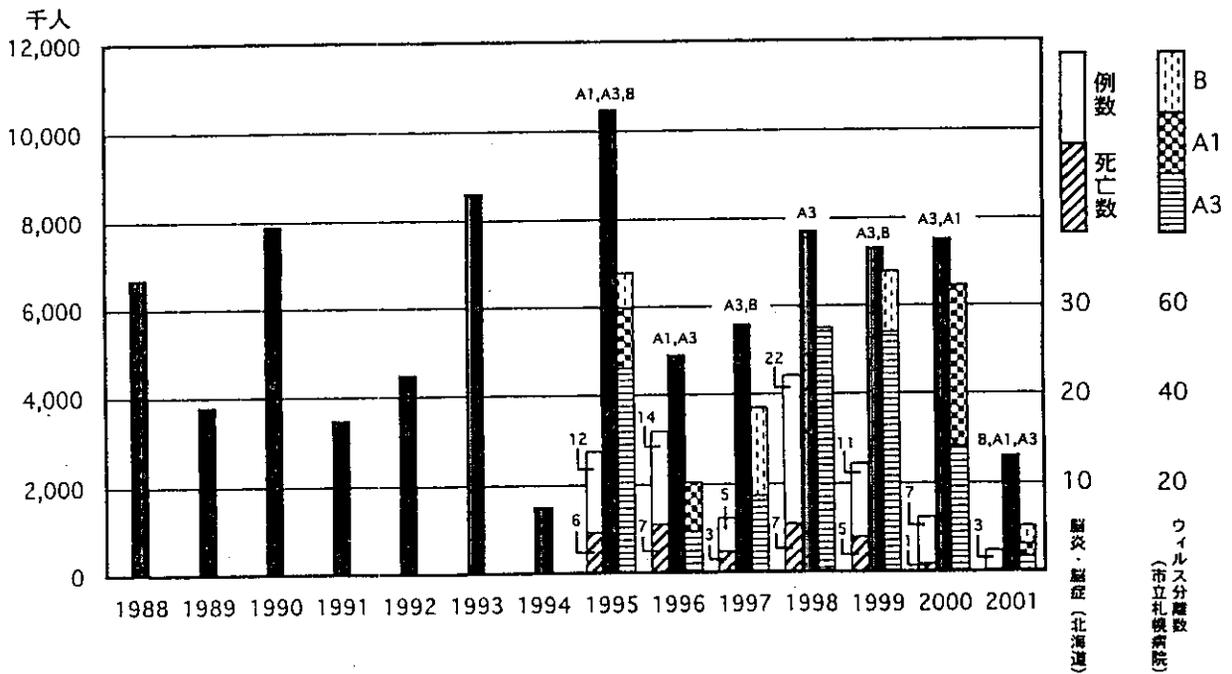


図 2.全国インフルエンザ様疾患患者数の年次推移と北海道の脳炎・脳症発症者数、ウイルス分離の比較

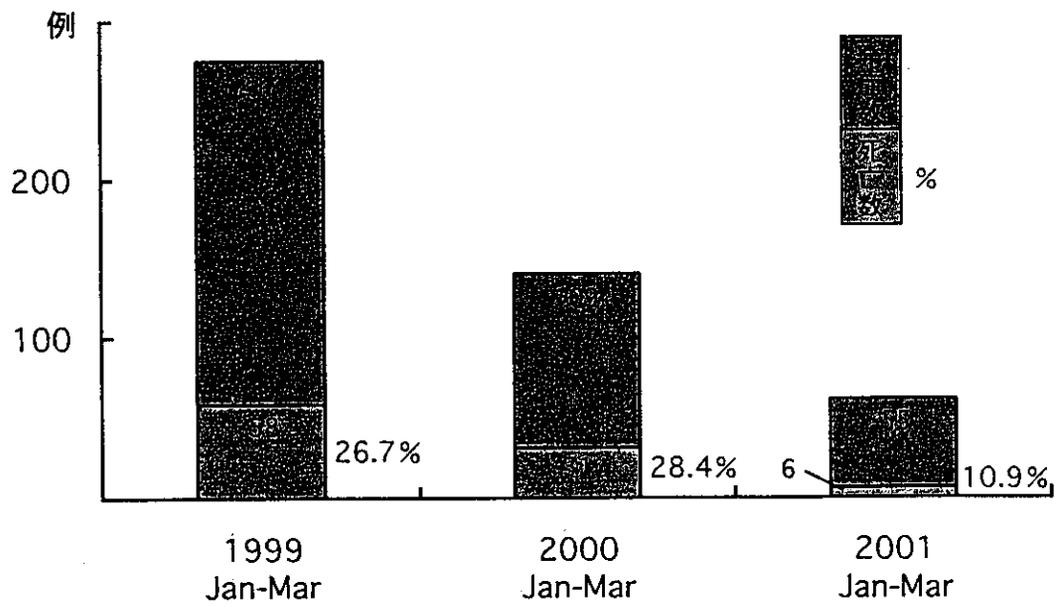


図3.インフルエンザ脳炎発症の推移（インフルエンザ脳炎・脳症研究班）

## インフルエンザ脳炎・脳症のモデル・ラットを用いた研究

分担研究者 横田俊平 横浜市立大学医学部小児科学講座 教授

**研究要旨** インフルエンザ脳炎・脳症は、乳幼児を中心としたわが国特有の疾患であることが判りつつある。病態の進行を観察すると、インフルエンザ・ウイルスの感染により発熱後 0~1 日のうちにけいれん、意識障害を起し、進展すると播種性血管内凝固症候群、多臓器不全に至り、約 30%の患児が死亡する。髄液や脳組織にはウイルス増殖や炎症所見はなく、脳症の要因は不明である。しかし Glia 細胞の異常活性化により脳内の過剰な炎症性サイトカインにより病態が形成されている可能性がある。そこでラットを用いて炎症性サイトカインの「脳内高サイトカイン状態」を誘導し、これをモデルとしてインフルエンザ脳炎・脳症の検討を行い以下の結果を得た。脳室内に留置カテーテルを装着して経時的に髄液を採取した。髄腔へ lipopolysaccharide(LPS)を投与し髄液内の炎症性サイトカインを定量したところ、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ のいずれもが LPS 投与 2 時間後に最高値となる変動を示した。LPS 量を 30 $\mu$ g と 300 $\mu$ g の 2 容量としたところ、LPS 30 $\mu$ g 投与群では髄液中の炎症性サイトカインの増多は認められたが、血清中では上昇を認めなかった。しかし LPS 300 $\mu$ g 投与群ではほぼ同時期に髄液中も血清中の炎症性サイトカインの増多を認めた。これらのことより、LPS の受容体(CD14)を持つ脳内細胞は Glia 細胞であり、Glia 細胞はマクrophage系細胞であることから、炎症性サイトカインは LPS により異常活性化された Glia 細胞に由来することが推察された。また Glia 細胞の活性化は LPS 量に依存性があり、LPS 少量投与では髄腔内を高サイトカイン状態に誘導するものの脳血管門の破綻までには至らず血清中のサイトカインは上昇しない。しかし大量 LPS を髄腔内投与すると Glia 細胞はさらに活性化し異常な高サイトカイン状態は脳血管門の破綻を誘導し、血清中にも炎症性サイトカインの異常高値が観察されたものと考えられた。実際、LPS 投与後の脳組織を観察すると、Glia 細胞のひとつである astrocyte に活性化特有タンパクである GFAP の異常集積像が観察された。以上より、インフルエンザ脳炎・脳症においても、インフルエンザ・ウイルスが関与する Glia 細胞の異常活性化が誘導され、脳内高サイトカイン状態が生じることは充分あり得ることが推察された。

### A. 研究目的

インフルエンザ脳炎・脳症は 5 歳以下の乳幼児に好発し、その約 30%が予後不良となる重大な疾患である。原因は不明で米国との共同の調査研究でも Reye 症候群とは異なりわが国独特の疾患であることを平成 12 年度の研究で明らかにした。またこの研究から中枢神経障害は全身への致死性病態の波及前に出現していることも明らかになった。

そこで平成 13 年度の研究ではラットの中枢神経内に高サイトカイン状態を誘導するモデルを作成し、脳内における高サイトカイン状態の誘導が可能であるか、炎症性サイトカインの異常産生に拘わる責任細胞は脳内のどの細胞であるか、脳内の高サイトカイン状態が脳血管門の破綻に拘わっているか、などに焦点を当てて検討し、インフルエンザ脳炎・脳症の解析に役立てることとした。

### B. 研究方法

Wister ラット(8~12 週齢、雌)の脳室内に Injection Pipe(IP)を留置する技術を開発して IP を留置した後、髄腔内へ lipopolysaccharide(LPS; E. coli 由来)を 30 $\mu$ g または 300 $\mu$ g 投与し、経時的に(0、2、6、12、

24 時間) IP より脳室液約 30 $\mu$ L を採取して液中の炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ )を ELISA 法にて測定した。

次に、LPS 投与後 0.5、1、3、6、12、24、48 時間後にラットを屠殺し、脳から mRNA を抽出して RPA 法により IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ それぞれのメッセージの検討を行った。

脳組織の免疫組織染色を行い、活性化 astrocyte 特異タンパクである GFAP の検出を行った。

### C. 研究結果

髄液中の IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ は LPS 30 $\mu$ g または 300 $\mu$ g 投与 2 時間後に著しく上昇した(8,000~10,000 単位)。同時に血清中の IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ を測定したところ、LPS 300 $\mu$ g 投与により同様に IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ の上昇をみたが、LPS 30 $\mu$ g 投与では上昇しなかった。

脳組織の抽出 mRNA について、それぞれの炎症性サイトカイン mRNA を RPA 法にて検討したところ、LPS 投与 1 時間後よりすべての炎症性サイトカイン mRNA の増多が観察された。

脳組織の免疫染色にて、astrocyte 特異的に GFAP が著しい濃度で染色され、astrocyte の異常な活性化

が推察された。

#### D. 考察

今回の研究から、髄腔への LPS 投与により中枢神経系内に炎症性サイトカイン増多が誘導され、脳実質内において高サイトカイン状態が誘導されることが明らかになった。中枢神経系内で LPS 受容体をもつ細胞は Glia であることが知られており、以上の実験結果から炎症性サイトカインは Glia 活性化に由来することが想定された。炎症性サイトカインの mRNA が、LPS 投与後 0.5~1 時間に発現が始まり、その後徐々に増多することが観察されたことは、脳実質細胞のうちに炎症性サイトカインの産生細胞が存在することを示唆していた。

脳組織の免疫染色により astrocyte が異常活性化している病態が観察され、Glia 細胞の中でも astrocyte が炎症性サイトカインの責任産生細胞である可能性が高いと考えられた。

また髄腔内に投与する LPS の量が低用量の場合は、髄腔内のみを高サイトカイン状態が誘導され、高用量の場合には髄腔内および血清中のサイトカインが増加することは、LPS 30  $\mu$ g では高サイトカイン状態は脳内に留まり、LPS 300  $\mu$ g 投与により脳血管門の破綻が生じ全身性の高サイトカイン状態に至ることが推察された。インフルエンザ関連脳症の軽症例では中枢神経症状のみに留まり、重症例では中枢神経症状発現の後に DIC や多臓器不全を来すことは、前者では脳血管門の破綻に至らない程度の脳内高サイトカイン状態であり、後者では脳血管門が破壊され、病巣が形成されるものと推定された。すなわちインフルエンザ脳炎・脳症の重症例では、Glia 細胞の異常活性化と脳血管門の破綻が病態を形成していることと推定された。

#### E. 結論

今回のラット・モデルの研究から、実際に脳内に高サイトカイン状態を誘導できることが判り、この炎症性サイトカインは Glia 細胞、とくに astrocyte に由来することが判明した。翻って、インフルエンザ脳炎・脳症の病態形成に脳内高サイトカイン状態が関与する可能性を指摘してきたが、当初の誘導原因は不明ながら今回は実際に同様の病態をラットに作成することができ、また脳血管門の破綻の有無により病態が中枢神経系内に留まるか、全身状態の悪化とくに DIC や多臓器不全にまで至るのか、決定されているらしいことも明らかになった。今後インフルエンザ・ウイルスのウイルス蛋白を用いて中枢神経系内に異常な高サイトカイン状態を誘導できるか否かを検討する予定である。

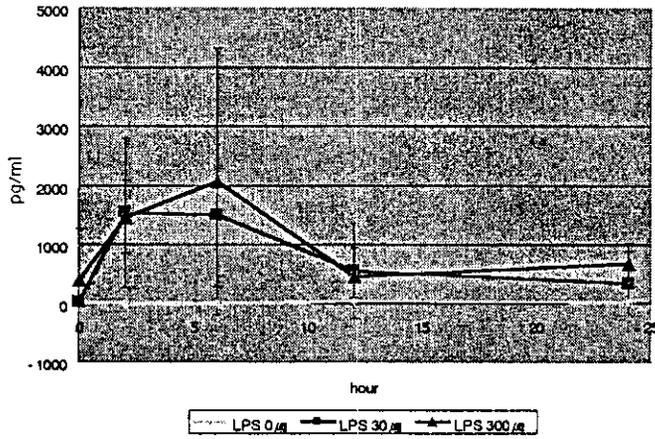
#### F. 研究発表

1. 森島恒雄、富樫武弘、横田俊平、他. インフルエンザに合併する脳炎・脳症に関する全国調査. 日本医事新報 第 3953 号、p26-28, 2000.
2. Yokota S, Imagawa T, Miyamae T, et al. Hypothetical pathophysiology of acute encephalopathy and encephalitis related to influenza virus infection and hypothermia therapy. *Pediatr Int* 42:197-203, 2000.
3. 横田俊平. インフルエンザ関連脳症の治療. *インフルエンザ* 2:307-312, 2001.
4. 横田俊平. インフルエンザ関連脳症の問題点. *Current Concept in Infectious Diseases*. 21:16-17, 2002.
5. 横田俊平、黒岩毅之. インフルエンザ関連脳症とサイトカイン. *Current Insights in Neurological Science* 9:8-9, 2001.

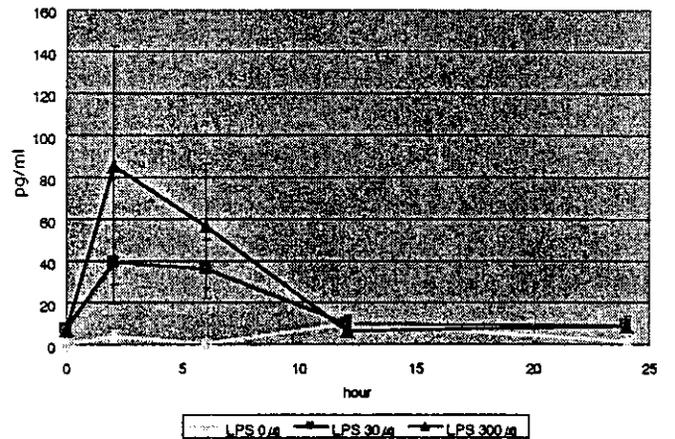
【図1】

LPS投与による髄液中、血清中IL-1 $\beta$ の経時的変化(n=5)

髄液中IL-1 $\beta$



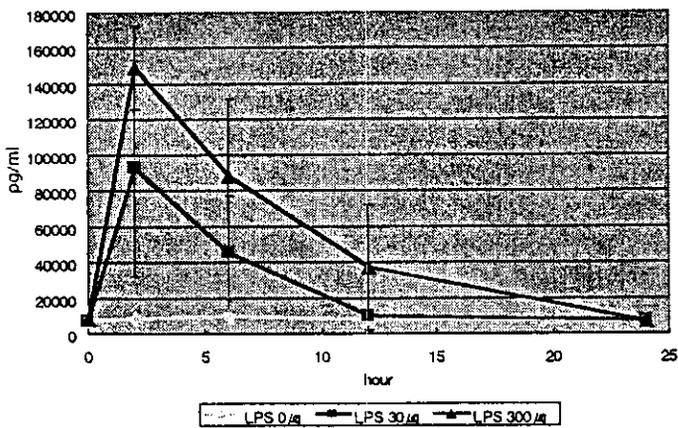
血清中IL-1 $\beta$



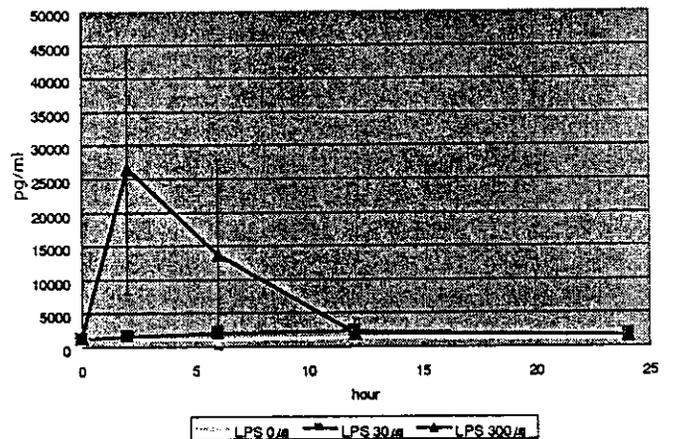
【図2】

LPS投与による髄液中、血清中IL-6の経時的変化(n=5)

髄液中IL-6

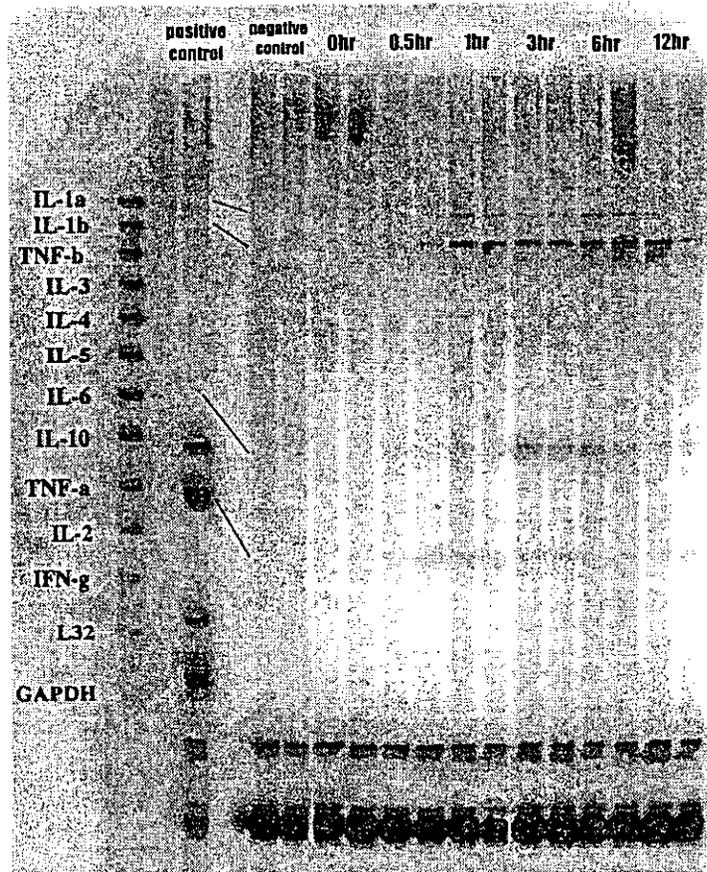


血清中IL-6



### 【図 3】

LPS 300  $\mu$ g 髄腔内投与によるサイトカイン mRNA 発現の経時的変化



## インフルエンザ脳炎・脳症における細胞死とグリアの反応

分担研究者 水口 雅 自治医科大学小児科 助教授  
共同研究者 中居 淑子 国立精神・神経センター神経研究所・研究員  
伊藤 雅之 同・研究員  
高嶋 幸男 同・所長

**研究要旨** インフルエンザ脳炎・脳症の急性期剖検例における神経・グリアの細胞死を DNA 断片化および caspase 活性化について検討し、さらにアストログリア・ミクログリアの反応を免疫組織化学的に観察した。アポトーシスの所見（TUNEL 陽性、活性化 CPP32 陽性）を示す神経・グリア細胞、ならびに Iba-1 陽性ミクログリアの数は、インフルエンザ脳炎およびびまん性の脳浮腫をともなう型のインフルエンザ脳症で最も多く、急性壊死性脳症では少ないながらも対照（非神経疾患）よりは増加していた。

### A. 研究目的

インフルエンザ脳炎・脳症では多数の神経細胞・グリア細胞が死に陥るが、その機序は明確でない。また脳炎・脳症においては炎症性サイトカインの重要な役割が推測されている。グリア細胞、とりわけアストログリア、ミクログリアはサイトカインの標的細胞となっている可能性が高く、その一方では中枢神経系内におけるサイトカイン産生細胞となっている可能性も指摘されている。

われわれは本年度の研究において、インフルエンザ脳炎・脳症の病変形成機序に関する理解を深めるため、急性期剖検例の脳病変の構造について TUNEL 法(TdT-mediated dUTP nick end labeling 法) および免疫組織化学による研究を行った。

### B. 研究方法

インフルエンザ脳炎・脳症の急性期に死亡した 7 症例（脳炎 1 例、急性壊死性脳症(ANE)2 例、他の脳症 4 例）の剖検脳を研究の対象とした。対照症例としてインフルエンザ以外の病因による脳症 4 症例（ANE2 例、他の脳症（びまん性脳浮腫あり）2 例）および非神経疾患により死亡した 5 症例を用いた。

大脳皮質、脳幹のホルマリン固定、パラフィン包埋標本を用いて、TUNEL 法と免疫染色を施行した。TUNEL 法には biotin-dUTP を使った市販検出キットを用いた。免疫染色用の一次抗体としてアポトーシスの検討に活性化 CPP32、アストログリアの同定に glial fibrillary acidic protein (GFAP)、ミクログリアの同定に Iba-1 に対する抗体を用い、biotin-streptavidin-peroxidase 法で検出した。細胞死に陥ったグリア細胞の種類を同定するため、TUNEL 法と GFAP 免疫染色の二重染色を行った。

### C. 研究結果

インフルエンザおよびその他の病因による脳炎・脳

症症例の大脳皮質、脳幹では TUNEL 陽性の神経細胞、グリア細胞が多数、観察された（図 1）。TUNEL/GFAP 二重染色の結果、TUNEL 陽性所見は GFAP 陽性グリア細胞（アストログリア）と陰性細胞（オリゴデンドログリアとミクログリア）の両者に認められた（図 2）。陽性細胞の多い標本では、活性化 CPP32 免疫反応性細胞も多かった（図 3）。TUNEL 陽性細胞はインフルエンザ脳炎および ANE 以外の急性脳症（びまん性脳浮腫をきたす型）で最も多く、ANE では少なく、非神経疾患にはほとんど認められなかった。

Iba-1 陽性ミクログリアはインフルエンザ脳炎では血管周囲に集簇し（図 4）、インフルエンザ脳症では脳実質内に散在していた（図 5）。陽性細胞はインフルエンザ脳炎および ANE 以外の急性脳症（びまん性脳浮腫をきたす型）で最も多く、ANE では少なく、非神経疾患にはほとんど認められなかった（図 6）。またインフルエンザ脳炎・脳症では他の病因による脳症より多かった。

### D. 考察

今年度の研究により、びまん性脳浮腫を示すインフルエンザ脳症（ANE 以外の病型）では CPP32 活性化と DNA 断片化をともなう細胞死、すなわちアポトーシスが多くの神経細胞、グリア細胞で生じていることが判明した。これに対し ANE では激しい脳病変にも関わらず apoptotic な変化を示す細胞は少なかった。したがって ANE における細胞死の主体はネクローシスであることが示唆された。

今回の研究では、インフルエンザ脳炎・脳症でミクログリアの反応が顕著に生じていることが示された。Iba-1 陽性ミクログリアはインフルエンザ脳炎においては血管周囲に多く、インフルエンザ脳症においては脳実質内に散在していた。これらの分布は前述の TUNEL 陽性細胞の分布とは一致しておらず、「ミクログリアによる炎症性サイトカイン産生→paracrine 機

序による周囲の神経細胞・グリア細胞のアポトーシス」という仮説を支持するものではなかった。

#### E. 結論

インフルエンザ脳炎およびインフルエンザ脳症のうちびまん性脳浮腫を示す型では、多くの神経・グリア細胞にアポトーシスが生じており、ミクログリアの増加をともなった。ANE ではアポトーシスの関与は少なく、ミクログリアの反応も小規模だった。F. 健康危険情報なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 水口雅：小児神経学—最近の展望—炎症性疾患. 小児神経学の進歩第30集（日本小児神経学会教育委員会編），診断と治療社，p159-160, 2001.
- 2) 水口雅：（最新の研究のトピックス）急性壊死性脳症. 小児科診療, 64(8):1222-1223, 2001.
- 3) 水口雅：失神・意識障害の重症度と初期対応. 小児科, 42(8):1368-1374, 2001.

#### 2. 学会発表

- 1) 森雅人, 諏訪清隆, 津留智彦, 永井真由美, 山形崇倫, 水口雅, 桃井真里子: 大脳皮質局所症状を呈したインフルエンザ脳症の1例. 第34回日本小児神経学会関東地方会, 東京, 2001年3月17日.
- 2) 水口雅:インフルエンザ脳症:病態と治療. 第8回東日本外来小児科学研究会, 川崎, 2001年3月25日.
- 3) 中居淑子, 伊藤雅之, 大谷恭一, 小林庸次, 成田道彦, 小沢浩, 水口雅, 高嶋幸男:インフルエンザ脳炎・脳症におけるグリアの変化とDNA断片化. 第102回日本小児科学会総会, 仙台, 2001年5月20日.
- 4) 水口雅, 高嶋幸男:小児神経疾患の画像と病理. 第42回日本神経病理学会総会, 東京, 2001年5月26日.
- 5) 水口雅, 中野今治, 高嶋幸男, 中居淑子, 林雅晴, 桑島信, 吉田カツ江:急性壊死性脳症の脳病変の構造に関する病理学的研究. 第6回日本神経感染症研究会学術集会, 札幌, 2001年7月13日.
- 6) 水口雅:急性脳症の診断と治療. 第31回小児神経学セミナー, 神戸, 2001年11月24日.
- 7) 水口雅:インフルエンザと急性脳症. 第397回長野市小児科集談会, 長野, 2002年1月16日.

#### H. 知的所有権の取得状況

なし。

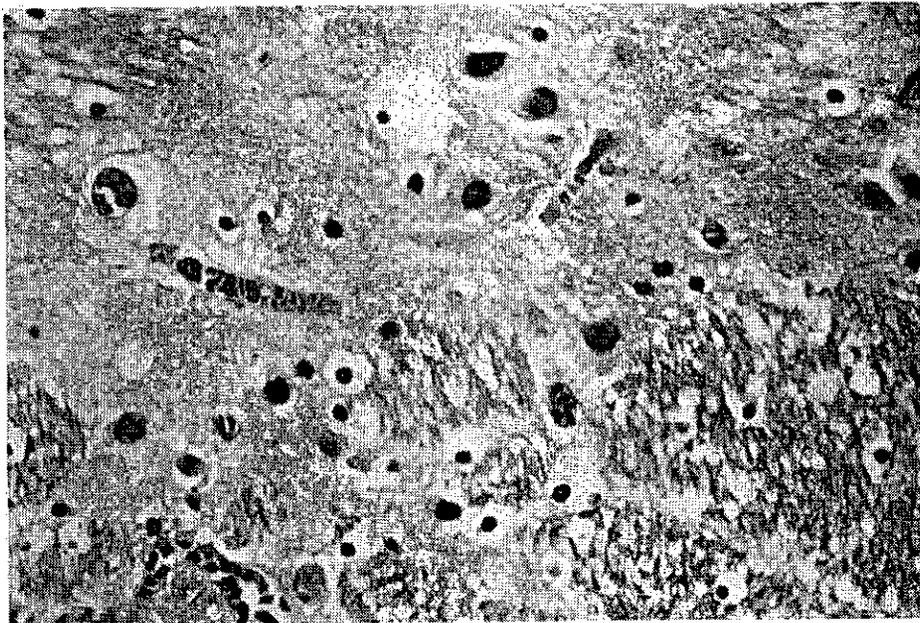


図 1. びまん性脳浮腫を呈したインフルエンザ脳症剖検例の橋におけるアポトーシスの検出 (TUNEL 法プラス HE 染色)。神経細胞、グリア細胞に陽性所見 (核の濃染) が見られる。

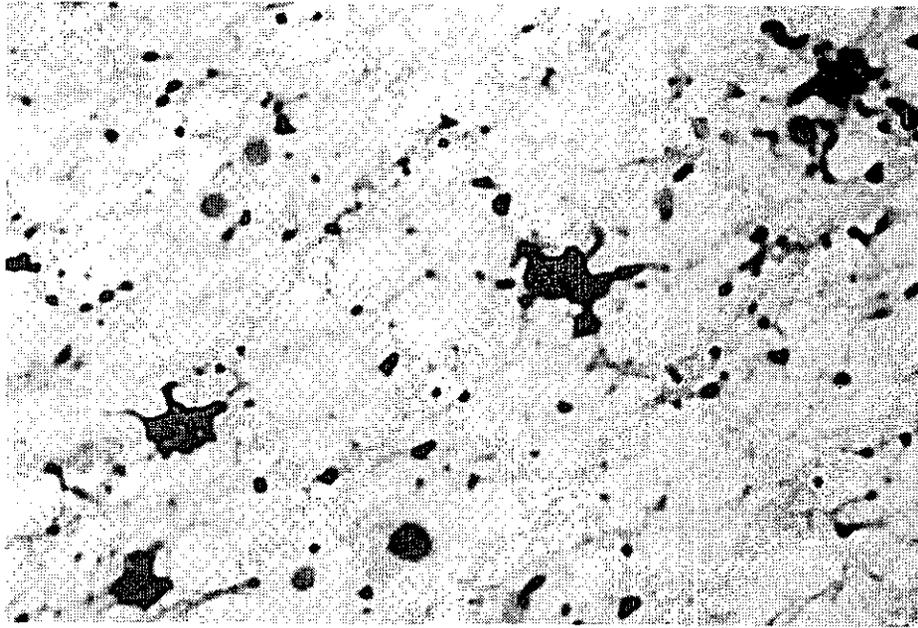


図 2. インフルエンザ脳炎剖検例の脳白質における TUNEL 法と GFAP 免疫染色の二重染色。TUNEL 陽性所見（核の染色あり）は GFAP 陽性（細胞質の染色あり）の細胞（星状の形態を示す）、陰性の細胞の両者に認められる。

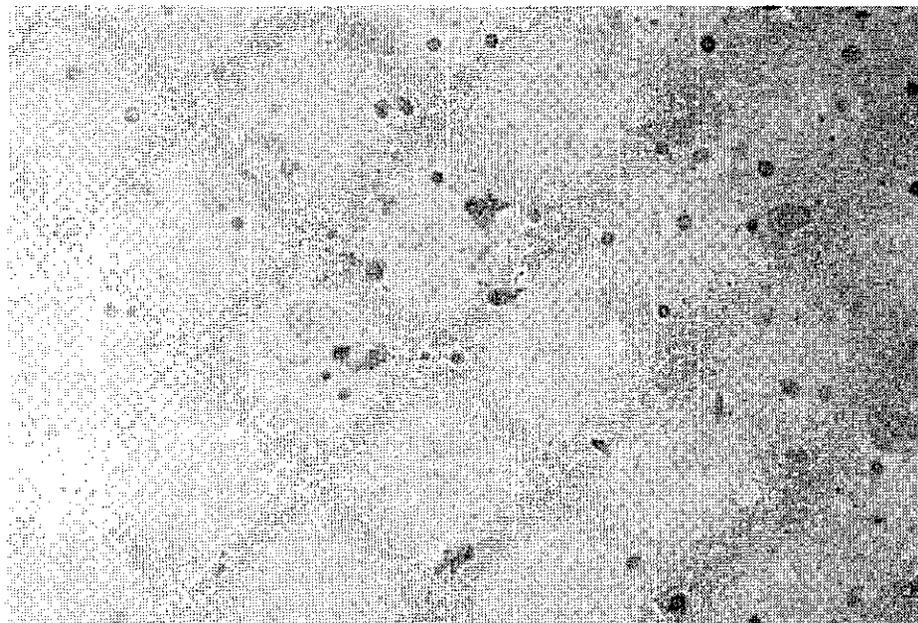


図 3. インフルエンザ脳炎剖検例の橋の活性化 CPP32 免疫染色。陽性のグリアが散在している（中央および下部）。

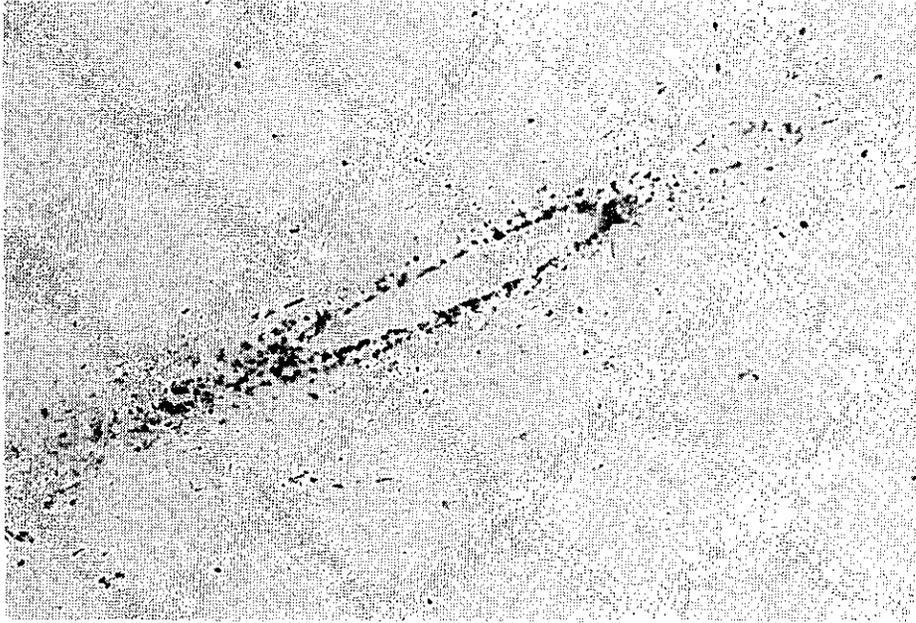


図 4. インフルエンザ脳炎剖検例の大脳白質の Iba-1 免疫染色。陽性のミクログリアが血管周囲に集簇している。

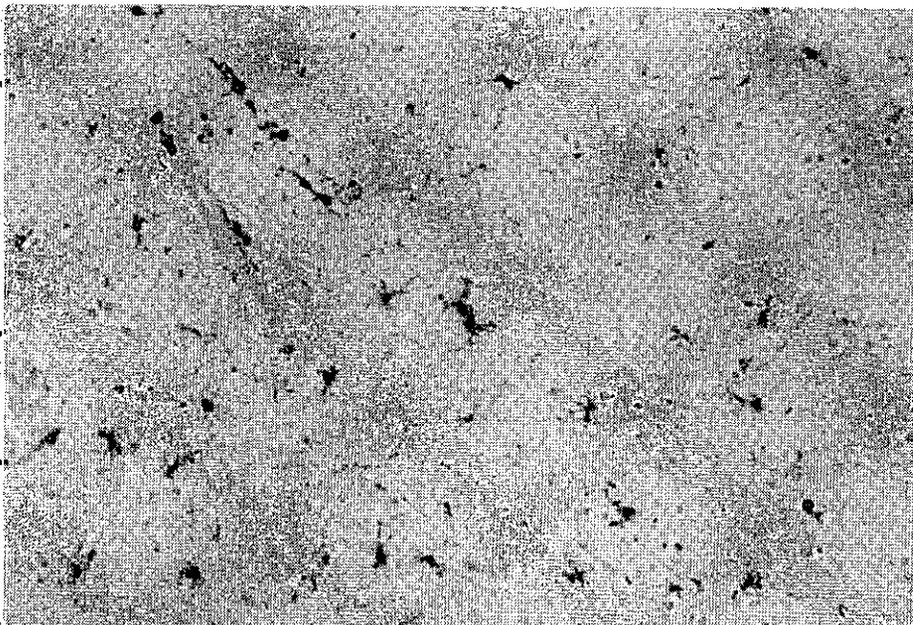


図 5. びまん性脳浮腫を呈したインフルエンザ脳症剖検例の大脳白質の Iba-1 免疫染色。陽性のミクログリアが散在している。

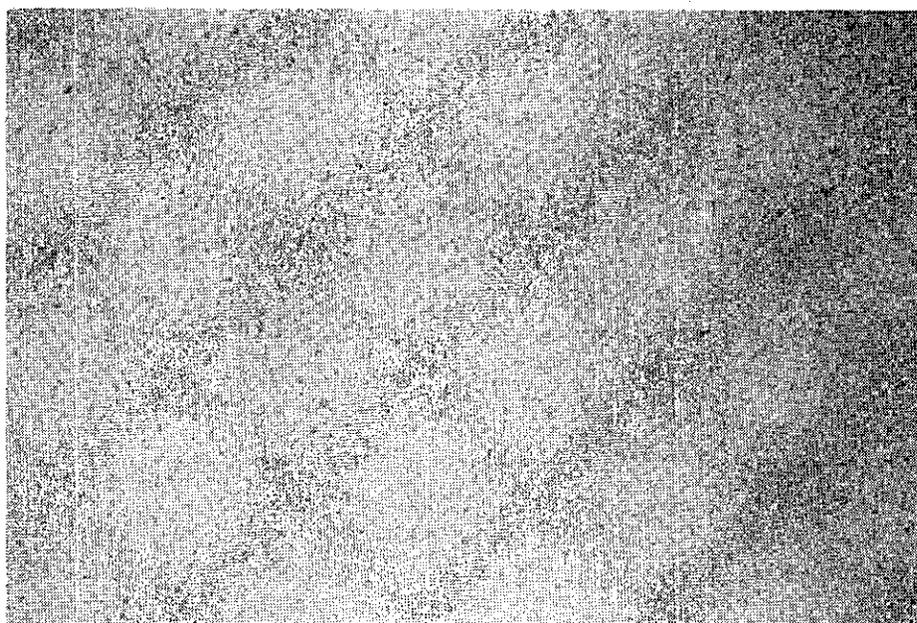


図 6. 非神経疾患剖検例の橋の Iba-1 免疫染色。陽性のミクログリアは認められない。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
水口雅	小児神経学－最近の展望－炎症性疾患。	日本小児神経学会教育委員会	小児神経学の進歩 第30集	診断と治療社	東京	2001	159-160

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
水口雅	(最新の研究のトピックス) 急性壊死性脳症。	小児科診療	64(8)	1222-1223	2001
水口雅	失神・意識障害の重症度と初期対応。	小児科	42(8)	1368-1374	2001

## インフルエンザ脳炎脳症における cytochrome C 測定

分担研究者 布井博幸 宮崎医科大学小児科 教授

**研究要旨** インフルエンザ脳炎脳症患者の血清 cytochrome C 値はこれまでの検討から、脳炎脳症の初期から上昇し、重症度と有意な相関を示すことを明らかにした。このことから、インフルエンザ脳炎脳症患者では apoptosis が誘導されていることを指示していると考えられた。今回、臨床的経過の検討を加えた結果、初期の cytochrome C 濃度と同時に一週間後の血中 cytochrome C 濃度が予後に重要ではないかと考えられた。

### A. 研究目的

前回インフルエンザウイルス感染症で、高熱、熱性痙攣患者と脳炎脳症を伴った 55 症例について初発時および経過中の血清で血管内皮マーカー、サイトカインマーカー、血中 cytochrome C について脳炎脳症患者とそうでない患者の相関について検討した。結果、血清 cytochrome C 値は脳炎脳症の初期からその重症度と有意な相関を示した (<0.001)。他のマーカーについてはインフルエンザ脳炎脳症の症例とそうでない患者との間で有意の相関を得られなかった。このことから、インフルエンザ脳炎脳症では血清 cytochrome C が早期に検出されること、また apoptosis が誘導されていることを指示していると考えられた。今回、検討症例を増やし、上記のことを再検討した。

### 【方法】

インフルエンザウイルス感染症で、MRI または CT で画像的に脳炎脳症と診断された患者 16 症例について初発時および一部においてその経過中の血清を採取した。

インフルエンザウイルス感染症については迅速診断キット (Directigen Flu A; Becton Dickinson, USA または FIU OIA; BIOSTAR, Australia)、血清抗体価の上昇、または咽頭拭い液でのウイルス分離培養により診断した。

### 【結果】

Table 1: 脳炎脳症患者のプロフィールと cytochrome C の経過

患者	年齢	性別	臨床分類	転帰	Cytochrome C ng/ml / 病日								
					1	2	3	4	5	6	7	>8	
1	1y	F	DOA	Died	75								
2	1y3m	M	DOA	Died	58								
3	3y2m	M	St.Epi	Died	56	71	10	8	47	96	100	96	
4	2y	M	St.Epi	ONSsequel	56				6	6			5
5	2y	F	HSE	Died	42								
6	2y	F	St.Epi	Improved	46	37							6
7	1y8m	F	St.Epi	Died	35								98
8	2y	M	ANE	Improved	32		0						0
9	3y2m	F	HSE	Died	30.5								
10	3y	M	ANE	Died	28.5								
11	6y	M	St.Epi	Died	24								
12	7y	M	St.Epi	ONSsequel	11								
13	9y	M	St.Epi	ONSsequel	5.8								
14	1m	M	St.Epi	ONSsequel	2.4		14					9	3
15	3y	F	ANE	Improved	1.2	2.7	0	0				0	0
16	5y	M	St.Epi	ONSsequel	0								

HSE: Hemorrhagic shock and Encephalopathy  
 DOA : Dead on Arrival  
 Status; Status Epilepticus  
 ANE: Acute Narcotizing Encephalopathy  
 Reye: Reye 症候群

Table 2. インフルエンザ脳炎脳症患者の臓器障害

	年齢	Cyt-C	肝障害	腎障害	造血障害	筋障害
1	1y	75	44	0.3	-	n.d.
2	1y3m	58	313	0.5	-	n.d.
3	3y2m	56	53/321	1.2	2.9	-
4	2y	56	6830	n.d.	4.9	-
5	2y	42	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
6	2y	46	13884/7390	1.4	-	580
7	1y8m	35	126/76	1.4	+	-
8	2y	32	102/695	1.0	-	-
9	3y2m	30.5	53,340		1.8,	1139
10	3y	28.5	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
11	6y	24	1174/6168	1.4	-	124,600
12	7y	11	37/144	1.3	-	n.d.
13	9y	5.8	28/48	0.5	-	n.d.
14	1m	2.4	51/33	0.3	+	n.d.
15	3y	1.2	65/381	0.7	-	n.d.
16	5y	0	126/26006	0.4	+	-

Cyt-C;入院時の cytochrome C,

肝障害;入院時 AST/経過中最も悪い時の AST、腎障害;血中クレアチニン、造血障害;経過中  $10 \times 10^4$ /ml 以下の最も低いときの血小板数、筋障害、+/-;凝固障害の有無;経過中最も悪いときの CK、n.i.;情報なし、n.d.:検査されていない、

#### D. 考察

今回はインフルエンザ脳炎脳症患者 3 名が加わり計 16 名の経過および、臓器障害について検討した。前回と同様、入院時の血清 Cytochrome C 値は有意な上昇が認められた。特に 20 ng/ml 以上の Cytochrome C 値を入院時に示した患者 11 名中 8 名が死亡、3 名が神経後遺症を残したが、2 名は回復している。後の 2 名に関してはガンマグロブリン大量療法やシクロスポリン A による特殊治療がなされており、その効果があったのかもしれない。経過中、cytochrome C の再上昇が認められた症例 3, 7 は死亡、上昇の認められなかった症例 4, 6, 8 が回復していることから、治療と cytochrome c の経過を追うことも治療と予後の関係を知る上でも重要であると考えている。二次的臓器障害が何らかの機序で誘発されているのかもしれない。

Table 2 で各臓器障害と cytochrome C の関係を示したが、cytochrome C が上昇しているから必ずし

も強い臓器障害が起こっているわけでもないことから、脳組織の apoptosis が cytochrome C の上昇に最も関わっているものと考えられた。症例 6 と 11 では肝のバイオプシーが施行され、Tunnel 法で陽性の肝細胞が多く示されており、肝細胞の細胞死が明らかに証明されていることから、更に各臓器での細胞死を確認する必要がある。脳組織を含めた各臓器の障害を抑制するためには抗アポトーシス療法が考慮すべきであると考えている。特に、症例 6 においては、病初期の cytochrome C が 46ng/ml と他の症例と比較しても、死亡を免れないような症例で、シクロスポリンが使用されることにより、生存されている。今後、シクロスポリンを含めた、抗アポトーシス療法が工夫されることにより、軽快、治療出来る症例も出てくるのではないかと期待している。

#### E. 結論

インフルエンザ脳炎脳症では前回と同様、血清 Cytochrome C 値の有意な上昇が認められた。apoptosis により細胞内に Cytochrome C が放出される事が知られていることから、インフルエンザ脳炎脳症では、IL-8 や TNF-a などの何らかのサイトカインにより、apoptosis が誘導されているのではないかと考えられた。抗アポトーシス療法の開発が今後重要だと考えている。

#### 参考文献

1. F., Shibasaki et al.: Suppression of signaling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. Nature 386, 728-731, 1997
2. F., Shibasaki et al.: Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. Nature 382, 370-373, 1996
3. Gogvadze V, Richter C: Cyclosporine A protects mitochondria in an in vitro model of hypoxia/reperfusion injury. FEBS Lett. 333: 334 - 338, 1993
4. Wako Nakajima, et al.: Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. J Neuroscience 20: 7994-8004, 2000
5. Puka-Sundvall M, et al.: Cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: Involvement of mitochondrial permeability transition? Dev Neurosci 23: 192-197, 2001

## F. 研究発表

### A) 学会発表

第 33 回日本小児感染症学会（山口県）インフルエンザ脳炎脳症の病態解析 平成 13 年 11 月

### B) 発表誌名巻号・頁・発行年

1) Ishibashi F, Mizukami T, Kanegasaki S, Motoda L, Kakinuma R, Endo F, Nunoi N. Improved superoxide generating ability by interferon-gamma due to splicing pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in *CYBB* gene. *Blood* 98:436-441(2001)

2) Nunoi H, Yamazaki T, Kanegasaki S. Neutrophil cytoskeletal disease. *Int J Hematol.* 74:119-24 (2001)

3) Cui SH, Tanabe F, Terunuma H, Iwatani Y, Nunoi H, Agematsu K, Komiyama A, Nomura A, Hara T, Onodera T, Iwata T, Ito M. A thiol proteinase inhibitor, E-64-d, corrects the abnormalities in concanavalin A cap formation and the lysosomal enzyme activity in leucocytes from patients with Chediak-Higashi syndrome by reversing the down-regulated protein kinase C activity. *Clin Exp Immunol.* 125:283-90 (2001)

4) Yamauchi A, Yu L, Potgens AJ, Kuribayashi F, Nunoi H, Kanegasaki S, Roos D, Malech HL, Dinauer MC, Nakamura M. Location of the epitope for 7D5, a monoclonal antibody raised against human flavocytochrome b558, to the extracellular peptide portion of primate gp91phox. *Microbiol Immunol.* 45:249-57 (2001)

5) 布井博幸、水上智之、レジナ・マルカド、三淵浩、西原重剛、後藤善隆、緒方敬之、森島恒雄、中山慎一、森信二、坂田宏、森裕美、真鍋孝治、足立尚登、遠藤文夫、渡辺啓祐：インフルエンザ感染症における重症度判定のためのマーカーの検討：小児感染免疫 13：225-232、2001

## インフルエンザウイルス感染に伴う宿主患者の包括的遺伝子発現の研究

分担研究者 豊田 哲也 久留米大学医学部ウイルス学講座教授

**研究要旨** インフルエンザウイルス脳炎・脳症の発症に関与すると考えられる宿主因子を同定することを目的として、HLA タイピングと患者の末梢血リンパ球の包括的遺伝子発現の解析を行った。その結果、脳炎・脳症の発症と HLA B60 との関連を示唆する結果を得た。また、B 型ウイルスによる呼吸器感染症の患者では、発現量が 3 倍以上増加した遺伝子は 10 種類、1/3 以下に減少したものは 40 種類であった。

### A. 研究目的

インフルエンザウイルス感染に関連する小児の脳炎・脳症は同じウイルスが流行する中で、ごくまれに重篤になる患者が発生するという特殊な病態である。そして、その中にはインフルエンザウイルスが脳において増殖している症例（脳炎）とそうでない症例があり、後者の原因としてサイトカインによる影響が考えられている。

現在わが国で問題となっているインフルエンザウイルス脳炎・脳症は、アジア風邪流行時に認められた脳炎とは異なり、ウイルスの中枢神経における増殖が認められないものがほとんどであると考えられる。したがって、その病態と原因の解明を行うためには、インフルエンザウイルス感染時における宿主患者（患児）の反応について詳細に解析を行うことが必要である。そこで、脳炎・脳症発症者、熱性痙攣患者、呼吸器症状のみの患者について、インフルエンザウイルス感染に伴う遺伝子発現を包括的に解析し、脳炎・脳症の発症に関与する遺伝子とその発現状態を解明することを目的とする。併せて、HLA のタイピングを行い、その遺伝的背景を同定する。

### B. 研究方法

長崎県、福岡県、佐賀県、大分県において流行したインフルエンザウイルス感染症の症例中、脳炎・脳症発症者、熱性痙攣患者、そして呼吸器感染のみの患児の受診時の末梢血リンパ球を採取した。脳炎・脳症の症例からはさらに髄液を採取した。また、死亡例からは組織を採取した。そして、咽頭ぬぐい液からのウイルス分離、迅速診断キット、ペア血清による HI 抗体価の測定による診断の確定を行った。HLA 型は、リンパ球、剖検臓器より抽出した DNA から MicroSSP Genetic HLA Class I, Class II DNA typing tray (One Lambda) を用いて PCR-SSP 法により決定した。リンパ球からは mRNA を精製し、マイクロアレーにて解析を行った。

### (倫理面への配慮)

HLA の測定、遺伝子発現の解析に関しては各臨床医から、患児の保護者（親）に対して説明を行い、文書による同意を得てから採血した。さらに、サンプルと患者個人の認識ができないように全て、記号により識別を行った。（久留米大学医学部倫理委員会研究番号 9932、2109）

### C. 研究結果

- 1、HLA B60 と脳炎・脳症との関連について  
2 シーズン（1997-1999 年）

インフルエンザウイルス感染者	36 例
脳炎・脳症	5 例
HLA B60	4 例 (80%)
それ以外	1 例
呼吸器感染	31 例
HLA B60	3 例 (9.7%)
それ以外	28 例

- 2、末梢血リンパ球 RNA 発現の包括的解析

症例 B 型インフルエンザウイルスによる呼吸器感染例

感染急性期(1 病日)と 1 ヶ月後のサンプルを Clontech Atlas Galss Array Human1.0 (1081 遺伝子)を用いて比較した。

感染急性期において発現量が 3 倍以上に増加していた遺伝子	10
感染急性期において発現量が 1/3 以下に減少していた遺伝子	40

また、久留米大学医学部ウイルス学講座のホームページにインフルエンザ脳炎研究会の案内をおき、本研究班の資料を公開している。  
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/virol/index.html>

#### D. 考察

1. HLA B60 と脳炎・脳症との関連を示唆する結果が得られた。しかし、日本人の 12.9% が HLA B60 を保有している (Hirayama et al. Tissue Antigens 48:692-697, 1996)、HLA のみではなく、他の要因が組合わさって脳炎・脳症の発症に繋がることは明らかである。

2. B 型インフルエンザウイルス感染による呼吸器感染者の末梢血リンパ球の遺伝子のうち、発現量が 3 倍以上増加した遺伝子は 10 種類、1/3 以下に減少したものは 40 種類であった。これらの遺伝子のうちの遺伝子が脳炎・脳症発症に関与しているかを、脳炎・脳症患者、熱性痙攣患者との比較において特定することが重要である。

#### E. 結論

インフルエンザウイルス脳炎・脳症の発症に関与することが示唆される遺伝子の候補を同定することができた。

#### F. 健康危険情報

インフルエンザウイルス脳炎・脳症発症と HLA B60 との関連については現在検討中であり、まだ症例数が少ないために結論は得られてはいない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yasushi Ohtsu, Yoshikazu Honda and Tetsuya Toyoda. Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase. In 'Options for the control of influenza IV. (A.D.M.E Osterhaus, A.W. Hampson and N. Cox eds.) pp 463-469, Excerpta Medica ICS 1219, Amsterdam, 2001.
2. Koyu Hara, Mayumi Shiota, Hiroshi Kido, Yasushi Ohtsu and Tetsuya Toyoda. Protease activity of influenza virus RNA polymerase PA subunit. In 'Options for the control of influenza IV. (A.D.M.E Osterhaus, A.W. Hampson and N. Cox eds.) pp 479-485, Excerpta Medica ICS 1219, Amsterdam, 2001.
3. Mitsuo Takahashi, Tatsuo Yamada and Tetsuya Toyoda. Detection of viral antigens in the encephalopathy brain by influenza A virus. In 'Options for the control of influenza IV. (A.D.M.E Osterhaus, A.W. Hampson and N. Cox eds.) pp 615-622, Excerpta Medica ICS 1219, Amsterdam, 2001.
4. Koyu Hara, Mayumi Shiota, Hiroshi Kido,

Yasushi Ohtsu, Takahito Kashiwagi, Jun Iwahashi, Nobuyuki Hamada, Kazutoshi Mizoue, Naoki Tsumura, Hirohisa Kato, Tetsuya Toyoda. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 in the active site. Genes to Cells, 6: 87-98, 2001.

5. Jun Iwahashi, Katsuro Tsuji, Tetsuya Ishibashi, Junboku Kajiwara, Yoshihiro Imamura, Ryoichi Mori, Koyu Hara, Takahito Kashiwagi, Yasushi Ohtsu, Nobuyuki Hamada, Hisao Maeda, Michiko Toyoda, Tetsuya Toyoda. Isolation of Amantadine-Resistant Influenza A Viruses (H3N2) from Patients Following Administration of Amantadine in Japan. J. Clin. Microbiol. 39 : 1652-1653, 2001.
  6. Koyu Hara, Takahito Kashiwagi, Yasushi Ohtsu, Kenji Masunaga, Yuko Akasu-Tsujii, Naoki Tsumura, Hirohisa Kato, Jun Iwahashi, Nobuyuki Hamada, Michiko Toyoda, Tetsuya Toyoda. Molecular evolution of Human echovirus 9 isolated from patients with aseptic meningitis in Northern Kyushu during the summer of 1997. Microbiol. Immunol.45: 717-720, 2001.
  7. 豊田哲也、インフルエンザ脳炎・脳症における HLA 抗原、日本医事新報、4028 号、99-100 (2001)
  8. 辻 克郎、岩橋 潤、今村宜寛、吉本静志、梶原 淳睦、石橋哲也、森 良一、山田達夫、豊田哲也、A 型インフルエンザウイルスに対する塩酸アマンタジンの使用の問題点、ウイルス、51 巻、2 号、123-134(2001)
- ##### 2. 学会発表
1. K. Hara, H. Kido and T. Toyoda. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 in the active site. Gordon Research Conferences, New Hampshire, USA. June 24-29, 2001.
  2. インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼのもつプロテアーゼ活性について、原 好勇、塩田麻由美、木戸 博、渡辺 健、永田恭介、豊田哲也、平成 13 年度日本生化学会九州支部例会(2001 年 4 月 28 日~29 日、長崎)
  3. プロテアーゼ活性を有するインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ・PA サブユニットと M1 との相互作用、原 好勇、塩田麻由美、木戸 博、渡辺 健、永田恭介、豊田哲也、第 74 回日本生化学会大会 (2001 年 10 月 25 日~27 日、京都)

4. C型肝炎ウイルス(HCV)における RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RdRp)の生化学的解析、柏木孝仁, 小原道法, 小原恭子, 豊田哲也, 第 74 回日本生化学会大会 (2001 年 10 月 25 日~27 日, 京都)
  5. プロテアーゼ活性を有するインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ・PA サブユニットは M1 と相互作用する、原 好勇, 木戸 博, 渡辺 健, 永田恭介, 豊田哲也, 第 49 回日本ウイルス学会学術集会 (2001 年 11 月 18 日~20 日, 大阪)
  6. C型肝炎ウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(NS5b)の初期反応に関する研究、柏木孝仁, 小原道法, 小原恭子, 豊田哲也, 第 49 回日本ウイルス学会学術集会 (2001 年 11 月 18 日~20 日, 大阪)
  7. インフルエンザウイルス脳炎・脳症の研究 4、豊田哲也, インフルエンザ脳炎研究会、第 49 回日本ウイルス学会学術集会 (2001 年 11 月 18 日~20 日, 大阪)
  8. インフルエンザウイルス・マトリックスタンパク質 M1 による RNA ポリメラーゼ・PA サブユニットのプロテアーゼ活性の阻害、原 好勇, 塩田麻由美, 木戸 博, 渡辺 健, 永田恭介, 豊田哲也, 第 24 回日本分子生物学会年会 (2001 年 12 月 9 日~12 日, 横浜)
  9. C型肝炎ウイルス RNA ポリメラーゼ(RdRp)の鑄型活性比較、柏木孝仁, 小原道法, 小原恭子, 豊田哲也, 第 24 回日本分子生物学会年会 (2001 年 12 月 9 日~12 日, 横浜)
- 布井博幸 (宮崎医科大学小児科学講座)  
濱田哲夫 (産業医科大学病理学講座)  
野口英太郎、上田竜生 (長崎県衛生公害研究所)  
梶原淳睦 (福岡県保健環境研究所)  
森 良一 (日本環境衛生センター)  
船津丸貞幸 (佐賀県衛生研究所)  
塚本伸哉 (大分県衛生環境研究センター)  
城野洋一郎 (化学及血清療法研究所)  
七種啓行 (さいくさ小児科)  
出口雅経 (出口小児科)  
中下誠郎 (佐世保総合病院)  
松尾厚子 (長崎市民病院)  
神戸正彦 (かんべ小児科)  
浦部大策 (聖マリア病院)  
日高靖文 (唐津赤十字病院)  
藤本 保 (藤本小児病院)  
福田 肇 (大村市立病院)  
池口弘一、森 裕美 (大手町病院)  
野口哲彦 (野口内科こども医院)  
山下恭輔 (平戸市民病院)  
松尾光弘 (五島中央病院)  
田中茂樹、末長宜弘 (長崎中央病院)  
立花一憲 (対馬いづはら病院)  
岡 尚記 (佐世保共済病院)  
楊井正紀 (やない小児科医院)  
辻 克郎 (辻クリニック)  
吉岡明彦 (広島県廿日市保健所)

#### H.知的財産の出願・登録状況

無し

#### 研究協力者

濱田信之、原 好勇、岩橋 潤、柏木孝仁、今村宜寛  
(久留米大学医学部ウイルス学講座)  
木村彰方 (東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患研究部門分子病態分野)  
高橋三津雄 (福岡大学薬学部)  
山田達夫 (福岡大学医学部第 5 内科)  
松石豊次郎、津村直幹、升永憲治、大津 寧、吉田一郎、加藤裕久 (久留米大学医学部小児科学講座)  
満留昭久、山口 覚 (福岡大学医学部小児科学講座)  
坂田則行 (福岡大学医学部病理学講座)  
松尾宗明、宮崎澄雄、(佐賀医科大学医学部小児科学講座)  
泉 達郎、浜田優美 (大分医科大学医学部小児科学講座)  
森内浩幸、松坂哲應 (長崎大学医学部小児科学講座)