

血管内皮細胞のインフルエンザ感染後の
HSP60とThrombomodulin

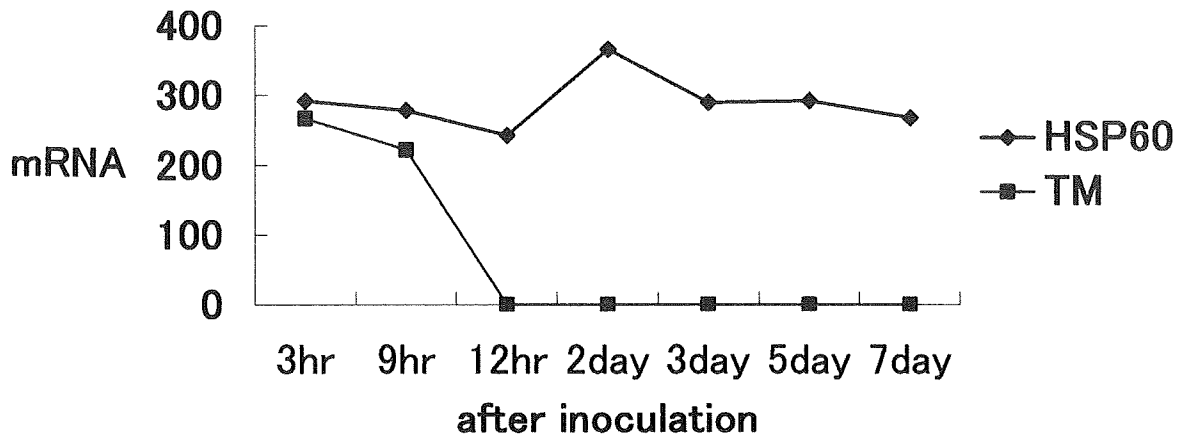


Figure 5: mRNA of HSP 60 and thrombomodulin after inoculation of influenza virus

血管内皮細胞にインフルエンザウイルス感染後
の上清中のNO

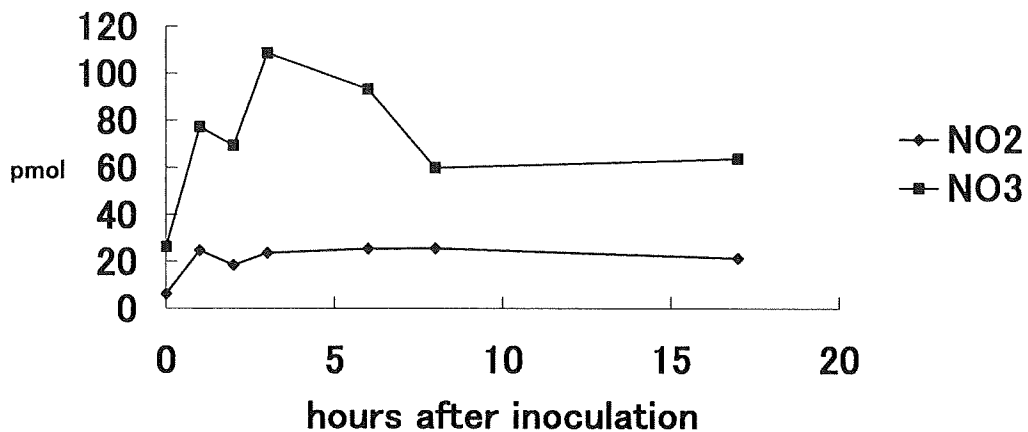


Figure 6: NO_x in supernatant after inoculation of influenza virus

表 1: 当科で経験したインフルエンザ脳症の肝組織所見と Heat Shock Protein の発現

疾患名	HE 染色	電顕像	HSP60 の染色	HSP60 の染色 の比較
症例 1 HSES	広範な肝細胞壊死	mitochondria の腫大 と cristae の崩壊	3+	肝細胞が著明に染まる (壊死部は逆に染色が薄い)
症例 2 HSES	広範な肝細胞壊死 と脂肪滴	mitochondria の腫大 と cristae の崩壊	3+	血管内皮細胞, リンパ球も陽性 肝細胞が著明に染まる (壊死部は逆に染色が薄い)
症例 3 臨床的 Reye 症候群	一部の肝細胞に 脂肪滴	未施行	—	肝細胞は染まらない
対照 a Shwachmann 症候群	慢性肝炎	未施行	1+	限局的に肝細胞が陽性
対照 b 原発性硬化性 胆管炎	胆管中心の炎症	未施行	±	限局的に肝細胞が陽性
対照 c 自己免疫性 肝炎	慢性肝炎	未施行	±	限局的に肝細胞が陽性 Kupfer 細胞, リンパ球陽性
対照 d B 型肝炎	慢性肝炎	未施行	2+	肝細胞が均一に薄く染まる

Table 2. NOx in cerebral spinal fluids (CSF) samples from patients with influenza and controls

age (years)	sex	influenza-associated diseases	cell counts (cc) of CSF and other findings	NO ₂ (pmol)	NO ₃ (pmol)	NOx	prognosis	causes	CT findings	EEG findings	Past history
4	m	febrile convulsion	cc12/3	3.972	22.968	26.94	normal	A	normal	normal	
5	m	febrile convulsion	cc5/3	3.026	27.269	30.295	normal	A	mild brain edema	normal	
1	m	encephalopathy		15.976	70.051	86.027	normal	A	brain edema	slowing	
1	m	encephalopathy		6.161	25.447	31.608	normal	A(H3N2)	normal	slowing	
2	m	encephalopathy	cc3/3	28.393	70.333	98.726	normal	A	normal	normal	FC*(+)
2	f	encephalopathy	cc2/3	2.422	33.304	35.726	normal	A(H1N1)	unknown	unknown	
5	f	encephalopathy		2.584	51.479	54.063	normal	A	brain edema	slowing	
6	m	encephalopathy	cc3/3	48.211	23.658	71.869	normal	A	mild brain edema	normal	
6	m	encephalopathy		2.364	28.87	31.234	normal	A	unknown	normal	
4	f	encephalopathy		2.666	86.161	88.827	unknown	A	normal	slowing	
2	f	encephalopathy		1.948	30.785	32.733	mild sequela	A	brain edema	slowing	
8	f	encephalopathy		7.136	30.584	37.37	mild sequela	B	brain edema	slowing	
1	f	encephalopathy	cc0/3	0.935	52.397	53.332	death	A	brain edema	slowing	FC(+)
2	f	encephalopathy		2.41	56.498	58.908	death	A	unknown	unknown	
3	m	encephalopathy		2.554	46.108	48.662	death	A(H3N2)	brain edema	slowing	
4	f	encephalopathy	cc 0/3, NH3 229	1.791	24.931	26.722	death	A	mild brain edema	unknown	FC(+)
9	f	encephalopathy		19.249	15.511	34.76	death	A	brain edema	slowing	

age-matched control group (mean ± SD, n=14) 5.2 ± 2.03 26.7 ± 7.25

*FC means febrile convulsions.

人体剖検例のウイルス病理学的解析

協力研究者 岩崎琢也（国立感染症研究所感染病理部、長崎大学熱帯医学研）

協力研究者 佐藤由子・佐多徹太郎・長谷川秀樹・倉田 毅（国立感染症研究所）

研究要旨 インフルエンザウイルスに感染した乳幼児が、他の原因なく神経症状を発症し、インフルエンザ脳症として剖検された症例を対象としてウイルス病理学的解析を行った。対象としたのは国立感染症研究所感染病理部に登録されている例ならびに本研究班より連絡をうけた例である。これらの例のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片においてウイルス病理学的にインフルエンザウイルスの抗原陽性細胞の有無とその局在を検討することにより、脳症発症におけるウイルス感染細胞の関与を明らかにすることを目的とした。最初にインフルエンザウイルス抗原の検出系について検討した。A型ならびにB型インフルエンザウイルスのヌクレオプロテイン NP を認識する抗体を用いて、これらのウイルスを経鼻的に感染させたマウスにおいて経時的にウイルス抗原陽性細胞の局在を検討し、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片上でこれらの抗原を検出できる抗体を選別した。また、これらの実験感染マウスにおいてウイルス抗原の経時的出現を検討し、初期感染細胞では NP は核内に、後期には細胞質に検出されることを明らかにした。さらに、神経組織内で増殖可能な H5N1 型 A 型インフルエンザウイルスをマウスに経鼻的に感染させ、神経組織内でウイルスが増殖した場合、ウイルス抗原が検出できるかどうかについて検討した。その結果、神経細胞の核ならびに細胞質が陽性となることが確認できた。これらの抗体を用いて、人体例の解析を開始した。A 型インフルエンザウイルスのみ陽性例が確認できた。A 型 NP を認識する 3 種類の抗体のうち 2 種類は非特異的に非感染細胞の細胞質の一部が陽性となり、1 種類の抗体のみ人体検体の解析に適していることが判明した。この抗体を用いて、16 例の剖検組織について解析したところ、9 例で A 型インフルエンザウイルスの NP 抗原を検出することができた。検出された臓器は気道組織に限局しており、中枢神経組織を含め他の臓器には検出できなかった。以上のことより、インフルエンザウイルス脳症例においても通常の A 型インフルエンザウイルスの標的組織は気道組織であり、他の臓器でのウイルス増殖は生じていないと推定された。

A. 研究目的

インフルエンザ流行期に神経学的症候が急性発症し、重篤な状態に陥り死亡している乳幼児例が多発している。不幸にして亡くなられ病理学的解析を受けた症例においてインフルエンザウイルスが感染した細胞がどこに局在しているかどうかについて明らかにすることにより、神経症状の発症機序が解明できることが期待される。本研究は純形態学的解析で有り、機能的な障害を明らかにすることは非常に困難であることが予想されるが、少なくとも亡くなられた乳幼児におけるインフルエンザウイルス感染細胞の局在を明らかにすることは本症の解明に重要である。

B. 研究方法

臨床検体の収集：1998/99 年、1999/2000 年、2000/01 年に本邦で亡くなられた乳幼児剖検例のうち、本研究班脳炎・脳症病理検討会に呈示された症例のうち、中枢神経組織ならびに気道（扁桃、気管、肺）、さらには他の組織のパラフィン包埋ブロックについて、ブロックあるいはその薄切切片を、各施設の

病理医あるいは臨床医に、国立感染症研究所においてウイルス病理学的解析を実施するため、送付していただくように依頼した。さらに、同時期に国立感染症研究所感染病理部にウイルス病理学的検索が依頼された症例も含めた。

動物実験組織：国立感染症研究所の実験動物施設において B₁LB/c あるいは DDY マウスに、マウスに順応した Influenza virus A/PR/8/34 (PR8, H1N1) ならびに Influenza virus B/Ibaraki/2/85 (B)、さらに Influenza virus A/HK/483/97 (HK483, H5N1) を接種した。PR8 ならびに B は BSL-2 内で、HK483 は BSL-3 内で、決められた規則に基づき実験を行った。経時的にマウスを深麻酔下において採血し、肺組織を取りだし、気管内より緩衝ホルマリンを注入し、固定した。また、脳並びに脊髄、肝、心、脾、腎も摘出し、固定した。固定後通常の方法によりパラフィン包埋し、薄切切片を作製し、APES コートスライドに貼付した。

人体剖検組織については各依頼施設で作製された標本であるが、いずれもホルマリン固定され、APES コ

ートスライドに貼付した薄切切片を使用した。いずれの切片も hematoxylin-eosin (HE)染色を行ない、組織学的変化を光学顕微鏡下で検討した。

インフルエンザウイルス A ならびに B の NP 抗原を認識するマウス単クローン抗体あるいはウサギ血清を使用した。これらの抗体は国立感染症研究所において作製した。結合した一次抗体の検出には LSAB-HRP (DAKO)を用いた。具体的にはパラフィン切片をキシレンで脱パラフィン、エタノール親水化し、0.05% CaCl₂ を含む 0.025% トリプシン処理を 37°C 30 分行った。その後、0.3% H₂O₂/メタノール溶液中で室温 30 分処理し内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化させた。正常山羊・ウマ血清と室温 5 分間反応後、一定濃度に希釈した抗インフルエンザウイルス A 型ならびに B 型 NP 抗体 (マウス単クローン抗体あるいはウサギ血清) と一晩 4°C にて反応させた。PBS 洗浄後、ビオチン標識抗ウサギ免疫グロブリン抗体あるいは抗マウス免疫グロブリン抗体と反応、さらに洗浄後ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた。結合した抗体の局在は DAB を基質とした酵素反応を行い可視化した。さらに、核は必要に応じて hematoxylin あるいは methylgreen で染色した。

C. 研究結果

1. 抗体の解析

国立感染症研究所感染病理部において以前より実施していたインフルエンザウイルスのマウス感染モデルにおいて検討を開始した。ヒト由来のインフルエンザウイルスは特定の株を除き、マウスに病原性はないため、順応させる必要がある。すでにマウスで継代し、マウスに順応させ、発育鶏卵で増殖させた Influenza virus A/PR/8/34 (PR8, H1N1)ならびに Influenza virus B/Ibaraki/2/85 (B)と、順応させる過程無くマウスに病原性を示す Influenza virus A/HK/483/97 (HK483, H5N1)をマウスの鼻腔内に 2 µl ならびに 20 µl の量で接種し、経時的に接種後 1, 3, 5, 7 日目に、深麻酔下で脱血により屠殺し、気道組織、脳ならびに脊髄、心、肝、腎、脾を摘出した。肺は気管より 10%ホルマリン緩衝液を注入し、肺胞が拡張した状態で固定した。インフルエンザウイルス抗原はいずれの型・亜型でも接種後 1 日で検出され、2 µl の接種では上気道に、20 µl では下気道の肺にも検出された。PR8 と B では感染はつねに気道組織の円柱上皮細胞のみであり、他の臓器にウイルス抗原陽性細胞は認められなかった。使用した抗体は主としてインフルエンザウイルスの NP を認識する抗体であるが、初期感染細胞では抗原は核内に、後期には細胞質に

検出された。一方、H5N1 型 A 型インフルエンザウイルスを経鼻接種したマウスでは中枢神経組織に神経細胞の核ならびに細胞質が陽性となることが確認でき、使用した抗体はもし神経細胞でインフルエンザウイルスが増殖している場合、ウイルス抗原を検出できることが確認できた。

2. 脳症例の解析

マウス感染実験モデルの解析に使用した抗体の人体組織での免疫組織学的解析への応用性について検討した。A 型インフルエンザウイルスについては 3 種類の抗体がマウス固定組織でウイルス抗原を検出でき、かつ非特異的反応も、肺ならびに脳組織においては問題とならなかった。人体剖検例で剖検時にインフルエンザウイルス感染が強く示唆された例においてこれらの抗体をもちいて検討したところ、A 型に対する抗体で陽性となる細胞が検出できた。しかし、このうち 2 種類の抗体では明らかに非感染の円柱上皮細胞の細胞質の apical 領域が陽性となった。そこでこの 2 種類の抗体について、インフルエンザウイルス感染が剖検時考えにくい症例のパラフィン切片で免疫組織学的に検討したところ、同様の陽性所見を時に得ることが確認されたので、この抗体による解析は中止した。

残りの一種類の抗 A 型インフルエンザウイルス抗体 (NP 抗原を認識する) と抗 B 型インフルエンザウイルス抗体を用いて、インフルエンザ脳症の疑いがもたれて解剖された 16 例のホルマリン固定パラフィン包埋切片上において、上記の抗体を用いて、A 型ならびに B 型インフルエンザウイルスの抗原の局在を検討した。B 型インフルエンザウイルス感染例は認められなかったが、9 例において、A 型インフルエンザウイルス NP 抗原が陽性の細胞が検出できた。これらの抗原陽性細胞はすべて気道系上皮のみに局在しており、他の組織には確認されなかった。

脳組織が検出された例における組織学的変化には、血管周囲と脳実質間の空隙形成、星状膠細胞の GFAP 陽性、Kluver-Barrera 染色における luxol fast blue の虎斑状の染色性の低下、これらの血管壁ならびに周囲のマクロファージの浸潤が認められた。空隙形成は脳実質の中心部、視床・脳幹部において目立つ傾向であった。

D. 考察

これまで検索を行った脳症例において、中枢神経組織内でインフルエンザウイルスが増殖している所見は得られていない。マウスにおけるインフルエンザウイルスの経鼻感染実験においてもウイルスが中枢神経

組織内に進入することは H5N1 を除き確認出来なかった。H5N1 の感染実験においても中枢神経組織内でウイルス増殖が確認されるのは接種後 3 日からであり、また、中枢神経組織内に炎症性細胞の浸潤も誘発していた。

脳症例の中枢神経病変についてはすでに Nakai ら (Apoptosis and microglial activation in influenza encephalopathy. *Acta Neuropathol* 2003; 105: 233-239)により報告されているが、壊死性変化が主体となる場合、浮腫性変化変化が主体となる場合、ミクログリアの滲出が目立つ場合に大別されると考える。これらの変化は比較的感染初期に脳症状を引き起こし、剖検に至るまでの時間的隔たりを考慮しなければならず、また、本質的にいずれの脳症剖検例も同一の臨床経過をたどるかどうかが不明の現時点では、これらの3種類の病変の関連性も解決できない。

本報告には含めなかったが、HHV6B 101 kDa 蛋白の免疫組織学的検索を行った例において陽性所見はいずれの例でも得られていない。しかし、この抗原検出系で抗原が確実に検出されているのはマクロファージに HHV6 が感染している場合であり、この HHV6 の病理組織切片上の検出系の信頼度は確定的ではなく、本報告には含めなかった。

E. 結論

インフルエンザウイルス脳症において中枢神経組織内でインフルエンザウイルスが増殖している所見はない。中枢神経組織ではウイルス脳炎の際に認められる神経貪食像、血管周囲細胞浸潤などはなく、血管周囲の滲出像、マクロファージの浸潤、星状膠細胞の反応性の増殖、GFP 陽転化などが見られるが、これらの部位にインフルエンザウイルスが増殖しておらず、これらの変化は二次的に生じた変化である。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuo K, Iwasaki T, Asanuma H, Yoshikawa T, Chen Z, Tsujimoto H, Kurata T, Tamura S: Cytokine mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissue during influenza virus infection and nasal vaccination. *Vaccine* 18: 1344-1350, 2000
2. Iwasaki T, Nagata N, Hatano I, Harashima A, Horiuchi A, Konishi K, Koike S, Nomoto A, Kurata T: Transgenic mice bearing human poliovirus receptor for quality control. *Pharmeuropa, Special Issue:*

59-68, 2000

3. Hasegawa H, Kadowaki S, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T: Protection against influenza virus infection by nasal vaccination in advance of sublethal irradiation. *Vaccine* 18: 2560-2565, 2000
4. Matsuo K, Yoshikawa T, Asanuma H, Iwasaki T, Hagiwara Y, Chen Z, Kadowaki S, Tsujimoto H, Kurata T, Tamura S: Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant (cholera toxin). *Vaccine* 18: 2713-2722, 2000
5. Katano H, Iwasaki T, Baba N, Terai M, Mori S, Iwamoto A, Kurata T, Sata T: Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. *J Virol* 74: 3478-3485, 2000
6. Nishimura H, Itamura S, Iwasaki T, Kurata T, Tashiro M: Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection. *J Gen Virol* 81:2503-2510, 2000
7. Iwasaki T, Muraki R, Kasahara T, Sato Y, Sata T, Kurata T. Pathway of viral spread in herpes zoster: detection of the protein encoded by open reading frame 63 of varicella-zoster virus in biopsy specimens. *Arch Virol Suppl.* 2001:S109-S119.
8. Ando Y, Iwasaki T, Terao K, Nishimura H, Tamura S. Conjunctivitis following accidental exposure to influenza B virus/Shangdong/07/97. *J Infect.* 2001; 42: 223-4.48.
9. Hagiwara Y, Iwasaki T, Asanuma H, Sato Y, Sata T, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Effects of intranasal administration of cholera toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. *Vaccine* 19: 1652-1660, 2001.
10. Hagiwar Y, Tsuji T, Iwasaki T, Kadowaki S, Asanuma H, Chen Z, Komase K, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S. Effectiveness and safety of mutant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTH44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine.* 2001;19:2071-9.
11. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Harashima A, Hatano I, Suzaki Y, Yoshii K, Yoshii T, Nomoto A, Kurata T. Comparison of neuropathogenicity of poliovirus type 3 in transgenic mice bearing the poliovirus receptor gene and cynomolgus monkeys.

- Vaccine. 2001;19:3201-8.
12. Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Suga K, Kito H, Iwasaki T, Kurata T, Tanaka T, Saito Y, Asano Y: Fatal acute myocarditis in an infant with human herpesvirus 6 infection. *J Clin Pathol.* 54: 792-5, 2001
13. Inagaki-Ohara K, Iwasaki T, Watanabe D, Kurata T, Nishiyama Y. Effect of the deletion of US2 and US3 from herpes simplex virus type 2 on immune responses in the murine vagina following intravaginal infection. *Vaccine.* 2001; 20:98-104.
14. Hasegawa H, Kadowaki S, Watanabe I, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T. Persistent infection of influenza virus in irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. *Vaccine.* 2002; 20: 1050-7.
15. Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, Tamura S. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J Immunol.* 2002; 168: 2930-8.
16. Yoshikawa T, Asano Y, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, Goshima F, Nishiyama Y. Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis. *J Med Virol.* 2002; 66:497-505.
17. Ando Y, Terao K, Narita M, Oguchi Y, Sata T, Iwasaki T: Quantitative analyses of cytomegalovirus genome in aqueous humor of patients with cytomegalovirus retinitis. *Jpn J Ophthalmol* 46: 254-260, 2002
18. Ishikawa K, Ando Y, Narita M, Shinjoh M, Iwasaki T: Cytomegalovirus retinitis during immunotherapy for common variable immunodeficiency. *J Infect* 2002; 44: 55-56
19. Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, Iwasaki T: Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimeantal infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. *J Med Virol* 67: 207-216, 2002
20. Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Taya C, Sato Y, Li J, Nagata N, Yonekawa H, Koike S: Comparison of neuropathogenicity of poliovirus in two transgenic mouse strains expressing human poliovirus receptor with different distribution patterns *J Gen Virol* 83: 1095-1105, 2002
21. Nakamura H, Tamura S, Watanabe I, Iwasaki T, Yodoi J: Enhanced resistancy of thioredoxin-transgenic mice against influenza virus-induced pneumonia. *Immunol Lett* 2002; 82: 165-170
22. Lokugamage K, Kariwa H, Hayasaka D, Cui BZ, Iwasaki T, Lokugamage N, Ivanov LI, Volkov VI, Demenev VA, Slonova R, Kompanets G, Kushnaryova T, Kurata T, Maeda K, Araki K, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Genetic characterization of hantaviruses transmitted by the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*), Far East Russia. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 768-776
23. Hasegawa H, Tatsumi M, Ogawa-Goto K, Takahashi H, Kojima A, Iwasaki T, Kurata T, Sata T, Takeuchi T, Sheehy N, Sawa H, Nagashima K, Hall WW. Processing of the HTLV-II envelope precursor glycoprotein gp63 by furin is essential for cell fusion activity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18: 1253-1_60
24. Mitsushima H, Oishi K, Nagao T, Ichinose A, Senba M, Iwasaki T, Nagatake T. Acid aspiration induces bacterial pneumonia by enhanced bacterial adherence in mice. *Microb Pathog* 2002 33:203-210

G. 知的所有權の取得状況
なし

インフルエンザ脳炎・脳症の病態と免疫グロブリン製剤の抗炎症作用に関する研究

研究協力者 市山高志 山口大学医学部生殖・発達・感染医科学/小児科 講師

研究要旨 (1) インフルエンザ脳炎・脳症患児 15 例の急性期における髄液中および血清中サイトカインを測定した。髄液では IL-6、TNF- α 、sTNFR1 はそれぞれ 9/12 例、4/12 例、4/12 例で上昇がみられた。血清では IL-6、TNF- α 、sTNFR1、sE-selectin はそれぞれ 10/13 例、2/13 例、5/13 例、7/13 例で上昇がみられた。各サイトカインとも予後不良例で高値の傾向がみられた。(2) 入院後半日以内に死亡した電撃的な経過をとった A 香港型 4 歳女児例と A 香港型急性壊死性脳症 10 歳男児例の血清中サイトカインの検討では、IL-6、IL-10 の著明な上昇がみられた。(3) インフルエンザ脳炎・脳症患児 4 例、インフルエンザ熱性痙攣 5 例、インフルエンザ 9 例の急性期における末梢血単核球中の炎症性サイトカインの転写因子である NF- κ B の活性化率は脳炎・脳症、熱性痙攣、インフルエンザの順に高値だった。(1)～(3) よりインフルエンザ脳炎・脳症の病型は一様でないため、まとめて病態を論じることはできないが、サイトカインの病態への関与と全身の細胞でサイトカインが産生されている可能性が示唆された。(4) 免疫グロブリン製剤 (IVIG) の抗炎症作用をヒト正常血管内皮細胞、単球系細胞 (U-937)、T 細胞系 (Jurkat) を用いて検討した。IVIG は TNF- α 刺激によるヒト正常血管内皮細胞からの IL-6 産生を抑制した。IVIG は TNF- α 刺激による NF- κ B 活性化を 3 種の細胞において抑制した。U-937 は Jurkat に比し、NF- κ B 活性化を高度に抑制したが、これは U-937 が Fc γ RII を高率に発現しており、細胞外での中和作用だけでなく、Fc γ RII を介して抗炎症作用を発揮すると考えた。一方、ヒト正常血管内皮細胞は Fc γ RII の発現はみられなかったが、FcRn を有することより、この受容体を介しての作用が示唆された。

A. 研究目的

インフルエンザ脳炎・脳症の病態は未だ明らかではない。本症の免疫病態を検討するため血清中および髄液中サイトカイン、可溶性サイトカイン受容体；TNF- α 、soluble TNF receptor 1 (sTNFR1)、インターロイキン 6 (IL-6)、IL-10、インターフェロン γ (IFN γ) soluble E-selectin (sE-selectin)、soluble IL-2 receptor (sIL-2R) および末梢血単核球中の炎症性サイトカインの転写因子である NF- κ B の活性化率を測定した。また免疫グロブリン製剤 (IVIG) の抗炎症作用を *in vitro* で検討した。

B. 研究方法

対象は 1995 年 1 月～2003 年 2 月までに山口大学医学部附属病院小児科、東京都立八王子小児病院、国立療養所香川小児病院、東京都立府中病院小児科に入院したインフルエンザ脳炎・脳症 21 例を対象とした。患者の両親に研究の趣旨を説明し、同意を得て採取した血清および髄液を用いた。サイトカイン、可溶性サイトカイン受容体の測定は ELISA キット (sTNFR1 は Bender MedSystems 社、それ以外は R&D Systems 社) を使用して行った。末梢血単核球中の NF- κ B の活性化率は活性化 NF- κ B 染色フローサイトメトリー法で測定した。

また免疫グロブリン製剤の抗炎症作用はヒト正常血管内皮細胞、単球系細胞 (U-937)、T 細胞系 (Jurkat)

を用いて TNF- α 刺激による IL-6 産生抑制作用、NF- κ B 活性化抑制作用を *in vitro* で検討した。さらに各細胞における免疫グロブリン受容体の有無も検討した。

C. 研究結果

IL-6 は血清で 10/13 例、髄液で 9/12 例に上昇が見られた。TNF- α は血清で 2/13 例、髄液で 4/12 例に上昇が見られた。sTNFR1 は血清で 5/13 例、髄液で 4/12 例に上昇が見られた (図 1)。症例により血清と髄液の値で一定の傾向はなかった。血清中 sE-selectin は 7/13 例で上昇を認めた (図 2)。各サイトカインとも予後不良例で高値の傾向がみられた。入院後半日以内に死亡した電撃的な経過をとった A 香港型 4 歳女児例と A 香港型急性壊死性脳症 10 歳男児例の血清中サイトカインの検討では、IL-6、IL-10 の著明な上昇がみられた (表 1)。

末梢血単核球中の NF- κ B 活性化率 (%) は、CD3+T 細胞、CD14+ 単球、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞において、インフルエンザ脳炎・脳症でそれぞれ 41.7 \pm 15.4、39.3 \pm 16.9、36.0 \pm 16.1、49.6 \pm 17.9、インフルエンザ熱性痙攣でそれぞれ 8.5 \pm 4.8、9.8 \pm 5.5、8.1 \pm 4.2、8.9 \pm 5.0、インフルエンザでそれぞれ 3.7 \pm 1.2、3.4 \pm 1.1、3.1 \pm 1.3、3.5 \pm 1.4 だった (図 3)。症例 2、3 は後遺症なく回復したが症例 1、4 は後遺症を残し、予後不良だった。

IVIG は TNF- α 刺激によるヒト正常血管内皮細胞からの

IL-6 産生を有意に抑制した (図 4)。ウェスタンブロットにおいて IVIG は TNF- α 刺激によるヒト正常血管内皮細胞の NF- κ B 活性化を抑制した。またフローサイトメトリーにおいて IVIG は TNF- α 刺激による U-937、Jurkat の NF- κ B 活性化を濃度依存的に抑制した (図 5)。U-937、Jurkat における免疫グロブリン受容体の検討では、U-937 は Jurkat に比し Fc γ RII を高率に発現していた (表 2)。ヒト正常血管内皮細胞では Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII の発現はみられなかった。

D. 考察

インフルエンザ脳炎・脳症の病型は一様でないため、まとめて病態を論じることはできないが、予後不良例で IL-6、TNF- α 、sTNFR1 が血清、髄液で高値の傾向を認めたことからサイトカインの病勢への関与が示唆された。また血清中 sE-selectin の結果から一部の症例で血管内皮細胞傷害が示唆された。電撃的な経過で死亡した 2 例では著明な高サイトカイン血症がみられ、病態への関与が示唆された。以上よりサイトカインが本症の免疫病態を修飾していると考えられた。またインフルエンザ脳炎・脳症例では、インフルエンザ熱性痙攣例、インフルエンザ例に比し、T 細胞、単球とも NF- κ B 活性化率が高値を示した。NF- κ B 活性化はその細胞からの炎症性サイトカインの産生を意味するものであり、全身の細胞でのサイトカイン産生が示唆された。

IVIG の抗炎症作用についての検討では、U-937 は Jurkat に比し、NF- κ B 活性化を高度に抑制したが、これは U-937 が Fc γ RII を高率に発現しており、細胞外での中和作用だけでなく、Fc γ RII を介して抗炎症作用を発揮すると考えた。またヒト正常血管内皮細胞での検討では、IL-6 産生抑制、NF- κ B 活性化抑制がみられた。ヒト正常血管内皮細胞は Fc γ RII を発現していなかったが、FcRn を発現していることが明らかになっており、この受容体を介しての作用が示唆された。

E. 結論

インフルエンザ脳炎・脳症患児の髄液中および血清中で様々な炎症性サイトカインが産生されており、重症度とサイトカイン値は相関傾向にあることよりサイトカインの病態への関与が示唆された。また脳炎・脳症例では末梢血中の T 細胞、単球とも NF- κ B 活性化率が高値を示し、全身の細胞でのサイトカイン産生が示唆された。

IVIG は NF- κ B 活性化を抑制し、炎症性サイトカイン産生を阻害する抗炎症作用が示唆された。T 細胞系に比し単球系細胞において、その作用が顕著だった。またヒト正常血管内皮細胞においても NF- κ B 活性化抑制作用がみられた。

F. 健康危機情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsifuji H, Hayashi T, Nishikawa M, Ichiyama T, Furukawa S. Bromide-induced pseudohypercloridemia. *Pediatr Neurol* 2000 ; 22: 333.
- 2) Ichiyama T, Nishikawa M, Hayashi T, Hayashi S, Ryozaawa M, Furukawa S. Cerebrospinal fluid concentrations of α -melanocyte-stimulating hormone in bacterial and aseptic meningitis. *Acta Paediatr* 2000 ; 89: 803-805.
- 3) Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitami T, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. Elevated cerebrospinal fluid level of ciliary neurotrophic factor in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 2000 ; 177: 146-149.
- 4) Sakai T, Ichiyama T, Whitten CW, Giesecke AH, Lipton JM. Ketamine suppresses endotoxin-induced NF- κ B expression. *Can J Anaesth* 2000 ; 47: 1019-1024.
- 5) Nishikawa M, Matsubara T, Yoshitomi T, Ichiyama T, Hayashi T, Furukawa S. Abnormalities of brain perfusion in echovirus type 30 meningitis. *J Neurol Sci* 2000 ; 179: 122-126.
- 6) Matsubara T, Matsuoka T, Katayama K, Yoshitomi T, Nishikawa M, Ichiyama T, Furukawa S. Mononuclear cells and cytokines in the cerebrospinal fluid of echovirus 30 meningitis patients. *Scand J Infect Dis* 2000 ; 32: 471-474.
- 7) Yoshitomi T, Matsubara T, Nishikawa M, Katayama K, Ichiyama T, Hayashi T, Furukawa S. Increased peripheral blood interferon gamma-producing T cells in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2000 ; 111: 224-228.
- 8) Ichiyama T, Okada K, Campbell IL, Furukawa S, Catania A, Lipton JM. Autocrine α -melanocyte-stimulating hormone inhibits NF- κ B activation in human pulmonary epithelial cells. *Peptides* 2000 ; 21: 1473-1477.
- 9) Ichiyama T, Sato S, Okada K, Catania A, Lipton JM. The neuroimmunomodulatory peptide α -MSH. *Ann NY Acad Sci* 2000 ; 917: 221-226.
- 10) Lipton JM, Catania A, Ichiyama T. Marshaling the anti-inflammatory influence of the neuroimmunomodulator α -MSH. *News Physiol Sci*

2000 ; 15: 192-195.

1 1) Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, Hasegawa S, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. Clarithromycin inhibits NF- κ B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 ; 45: 44-47.

1 2) Ichiyama T, Yoshitomi T, Nishikawa M, Fujiwara M, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. NF- κ B activation in peripheral blood monocytes/macrophages and T cells during acute Kawasaki disease. *Clin Immunol* 2001 ; 99: 373-377.

1 3) Ichiyama T, Nishikawa M, Lipton JM, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. Thiopental inhibits NF- κ B activation in human glioma cells and experimental brain inflammation. *Brain Res* 2001 ; 911: 56-61.

1 4) Ichiyama T, Hasegawa S, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. Theophylline inhibits NF- κ B activation and I κ B α degradation in human pulmonary epithelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001 ; 364:558-561.

1 5) Ichiyama T, Shoji H, Kato M, Sawaishi Y, Ozawa H, Matsubara T, Furukawa S. Cerebrospinal fluid levels of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptor in acute disseminated encephalomyelitis. *Eur J Pediatr* 2002 ; 161: 133-137.

1 6) Tashiro N, Matsubara T, Uchida M, Katayama K, Ichiyama T, Furukawa S. Ultrasonographic evaluation of cervical lymph nodes in Kawasaki disease. *Pediatrics* 2002 ; 109: e77.

1 7) Umeda S, Ichiyama T, Hasagawa S, Matsubara T, Furukawa S. Theophylline inhibits NF- κ B activation in human peripheral blood mononuclear cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002 ; 128: 130-135.

1 8) Ichiyama T, Isumi H, Yoshitomi T, Nishikawa M, Matsubara T, Furukawa S. NF- κ B activation in cerebrospinal fluid cells from patients with meningitis. *Neurol Res* 2002 ; 24: 709-712.

1 9) Kawashima H, Watanabe Y, Ichiyama T, Mizuguchi M, Yamada N, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Mori T. High concentration of serum nitrite/nitrate obtained from patients with influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Int* 2002 ; 44: 705-707.

2 0) Kimura M, Tasaka M, Sejima H, Takusa Y, Ichiyama T, Yamaguchi S. Hemiconvulsion-

hemiplegia syndrome and elevated interleukin-6: case report. *J Child Neurol* 2002 ; 17: 705-707.

2 1) Ichiyama T, Isumi H, Ozawa H, Matsubara T, Morishima T, Furukawa S. Cerebrospinal fluid and serum levels of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptor in influenza virus-associated encephalopathy. *Scand J Infect Dis* in press

2 2) 西河美希, 林 隆, 吉富友美, 井上 保, 市山高志, 古川 漸. 溶血性尿毒毒症候群脳症における経頭蓋超音波 Doppler 法による経時的評価. *脳と発達* 2000 ; 32 : 520-523.

2 3) 市山高志, 林 隆, 伊住浩史, 西河美希, 吉富友美, 古川 漸. 発達障害児支援の観点からみた公的機関と民間施設の受診件数の推移—山口県徳山地区. *小児保健研究* 2001 ; 60 : 46-50.

2 4) 市山高志, 古川 漸. 14 員環系抗生物質 (マクロライド) の抗菌力以外の作用. *小児科* 2001 ; 42 : 216-222.

2 5) 松原知代, 市山高志, 古川 漸. 感染症病態の生体反応からみた解析. *小児内科* 2001 ; 33 : 331-337

2 6) 市山高志, 長谷川恵子, 古川 漸. 新生児髄膜炎. *化学療法の領域* 2001 ; 17 : 1281-1286.

2 7) 市山高志, 松原知代, 古川 漸. 髄膜炎の免疫応答—髄液中の浸潤細胞, サイトカインの面から—. *小児科* 2001 ; 42 : 1649-1656.

2 8) 市山高志. 急性散在性脳脊髄炎. *小児内科* 2001 ; 33 増刊号「小児疾患の診断治療基準」: 678-679.

2 9) 古川 漸, 市山高志, 松原知代. アレルギーと感染の接点. *日本小児アレルギー学会誌* 2002 ; 16 : 1-6.

3 0) 市山高志, 松原知代, 伊住浩史, 古川 漸. サイトカインの動態と臨床的意義について. *小児感染免疫* 2002 ; 14 : 25-29.

3 1) 市山高志, 松原知代, 古川 漸. 小児疾患における転写因子 NF- κ B の役割. *小児科* 2002 ; 43 : 1454-1460.

3 2) 市山高志. 中枢神経系炎症性疾患のサイトカイン動態. *日児誌* 2002 ; 106 : 1391-1395.

3 3) 市山高志, 松原知代, 伊住浩史, 長谷川恵子, 榎田真史, 古川 漸. 末梢血単核球 NF- κ B の解析. *小児感染免疫* 2002 ; 14: 364-370.

3 4) 松原知代, 鮎川浩志, 古賀まゆみ, 市山高志. 小児感染症におけるサイトカインの役割—末梢血 IFN- γ 産生 Tリンパ球を中心に—. *小児感染免疫* 2002 ; 14: 371-376.

2. 学会発表

- 1) 市山高志、吉富友美、西河美希、長谷川俊史、藤原元紀、松原知代、古川 漸. 川崎病における末梢血細胞の転写因子 NF-kB 活性化の検討. 第 103 回日本小児科学会学術集会. 和歌山. 2000.4.14-16
- 2) 市山高志、西河美希、吉富友美、伊住浩史、林 隆、古川 漸. 脳炎モデルにおける Thiopental(チオペンタール)の抗炎症作用—TNF-a 産生抑制と転写因子 NF-kB 活性化抑制—. 第 42 回日本小児神経学会. 大阪. 2000.6.8-10
- 3) 市山高志、西河美希、伊住浩史、林 隆、庄司紘史、古川 漸. ワークショップ. 急性散在性脳脊髄炎と Guillain-Barré 症候群における神経栄養因子について. 第 5 回日本神経感染症研究会. 名古屋. 2000.7.14-15
- 4) 市山高志、林 隆、伊住浩史、古川 漸. バルプロ酸ナトリウムの抗サイトカイン作用. 第 11 回日本小児神経学会中国・四国地方会. 岡山. 2000.7.22
- 5) 市山高志、林 隆、伊住浩史、古川 漸. バルプロ酸ナトリウムの抗サイトカイン作用. 第 34 回日本てんかん学会. 東京. 2000.9.21-22.
- 6) 市山高志、伊住浩史、松原知代、林 隆、古川 漸. 髄膜炎における髄液中細胞の NF-kB 活性化について. 第 32 回日本小児感染症学会. 東京. 2000.11.24-25.
- 7) 市山高志、長谷川俊史、松原知代、古川 漸. 気道上皮細胞及び末梢血免疫担当細胞におけるテオフィリンの NF-kB 活性化と IkB に対する作用. 第 50 回日本アレルギー学会. 横浜. 2000.11.30-12.2.
- 8) 市山高志、松原知代、金子美保、深野玲司、古川 漸. 抗アレルギー薬の抗サイトカイン作用についての検討. 第 4 回中国地区小児免疫薬物療法研究会. 広島. 2001.2.17
- 9) 市山高志、松原知代、古川 漸. プランルカスト水和物の抗炎症作用—NF-kB 活性化抑制作用—. 第 104 回日本小児科学会学術集会. 仙台. 2001.5.18-20
- 10) 市山高志、松原知代、古川 漸. プランルカスト水和物の抗炎症作用—NF-kB 活性化抑制作用—. 第 2 回山口県小児喘息フォーラム. 小郡. 2001.6.7
- 11) 市山高志、小沢 浩、遠藤彰一、伊住浩史、林隆、古川 漸. インフルエンザ脳炎・脳症の血清および髄液中サイトカイン. 第 43 回日本小児神経学会. 岡山. 2001.6.7-9
- 12) 市山高志. シンポジウム. クラリスロマイシンによる NF-kB 活性化抑制作用. 第 8 回マクロライド新作用研究会. 東京. 2001.7.13-14
- 13) 市山高志、松原知代、古川 漸. 末梢血免疫担当細胞におけるプランルカスト水和物の抗炎症作用. 第 51 回日本アレルギー学会. 福岡. 2001.10.29-31.
- 14) 市山高志、松原知代、伊住浩史、古川 漸. シンポジウム. サイトカインの動態と臨床的意義について. 第 33 回日本小児感染症学会. 宇部. 2001.11.23-24.
- 15) 市山高志、松原知代、伊住浩史、長谷川恵子、古川 漸. シンポジウム. 末梢血単核球 NF-kB の解析. 第 33 回日本小児感染症学会. 宇部. 2001.11.23-24.
- 16) Ichiyama T, Yoshitomi T, Nishikawa M, Fujiwara M, Matsubara T, Furukawa S. NF-kappa B Activation in Peripheral Blood Monocytes/macrophages and T Cells during Acute Kawasaki Disease. The 7th International Kawasaki Disease Symposium. Hakone. 2001.12.4-7.
- 17) 市山高志. シンポジウム. ステロイド療法児における末梢血単核球 NF-kB の動態. 第 10 回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会. 東京. 2001.12.8-9.
- 18) 市山高志、藤原元紀、伊住浩史、長谷川恵子、松原知代、古川 漸. 免疫グロブリン製剤の NF-kB 活性化抑制作用. 第 5 回中国地区小児免疫薬物療法研究会. 広島. 2002.2.23
- 19) 市山高志. シンポジウム. 中枢神経系炎症性疾患におけるサイトカイン動態. 第 105 回日本小児科学会学術集会. 名古屋. 2002.4.19-21.
- 20) 市山高志、伊住浩史、加藤光広、小沢 浩、沢石由記夫、古川 漸. 急性散在性脳脊髄炎における髄液中サイトカインの検討. 第 44 回日本小児神経学会. 仙台. 2002.6.27-29.
- 21) 市山高志、伊住浩史、藤原元紀、松原知代、古川 漸. 免疫グロブリン製剤の抗炎症作用—NF-kappaB 活性化抑制作用—. 第 22 回日本川崎病研究会. 北九州. 2002.9.27-28.
- 22) 市山高志、伊住浩史、庄司紘史、加藤光広、小沢 浩、沢石由記夫、古川 漸. 急性散在性脳脊髄炎における髄液中サイトカインの検討. 第 7 回日本神経感染症研究会. 東京. 2002.10.4-5.
- 23) 市山高志、長谷川俊史、松原知代、古川 漸. 末梢血免疫担当細胞におけるプランルカスト水和物の抗炎症作用. 第 39 回日本小児アレルギー学会. 盛岡. 2002.11.1-2.
- 24) 市山高志、伊住浩史、藤原元紀、松原知代、古川 漸. 免疫グロブリン製剤の抗炎症作用—NF-kB 活性化抑制作用—. 第 34 回日本小児感染症学会. 札幌. 2002.11.8-9.
- 25) 市山高志、長谷川俊史、松原知代、古川 漸. ヒト単球系細胞におけるモンテルカストの抗炎症作用—NF-kB 活性化抑制作用—. 第 52 回日本アレルギー学会. 横浜. 2002.11.28-30.
- 26) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、西河美希、古川 漸. 発達障害児の睡眠障害に対するメラトニンの

使用経験. 第 102 回日本小児科学会山口地方会. 宇部. 2002.12.8.

27) 市山高志、上野佳子、伊住浩史、松藤博紀、松原知代、古川漸. 免疫グロブリン製剤の血管内皮細胞活性化抑制作用. 第 6 回中国地区小児免疫薬物療法研究会. 広島. 2003.2.22

28) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、古川 漸. 亜急性硬化性全脳炎多発地域パプアニューギニアにおける急性麻疹の血清中サイトカイン-日本との比較-. 第 6 回山口臨床ウイルス研究会. 宇部. 2003.3.6

29) 市山高志、伊住浩史、松藤博紀、古川 漸. 細菌性および無菌性髄膜炎における髄液細胞での転写因子 NF- κ B 活性化について. 第 15 回日本神経免疫学会. 長崎. 2003.3.12-14

30) 市山高志. 特別講演. 小児の急性脳炎・脳症、髄膜炎-インフルエンザ脳症を中心に-. 第 33 回中国・四国点頭てんかん研究会. 岡山. 2003.3.29

H.知的財産権の出願・登録状況
なし

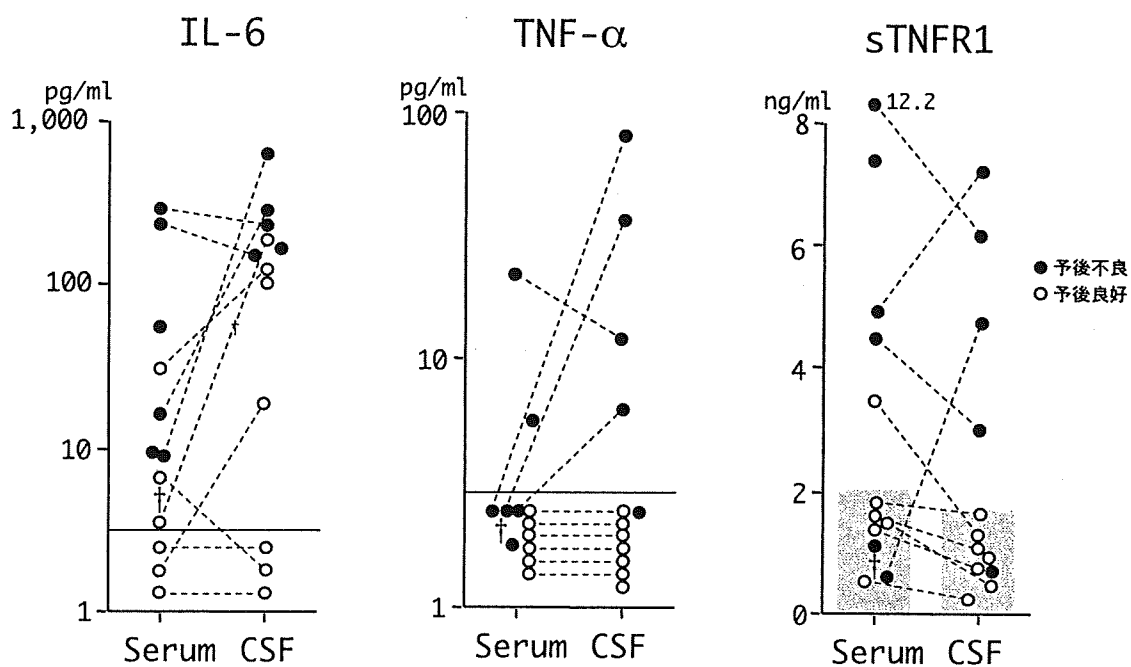


図1. インフルエンザ脳炎・脳症の血清及び髄液中IL-6, TNF- α , sTNFR1値

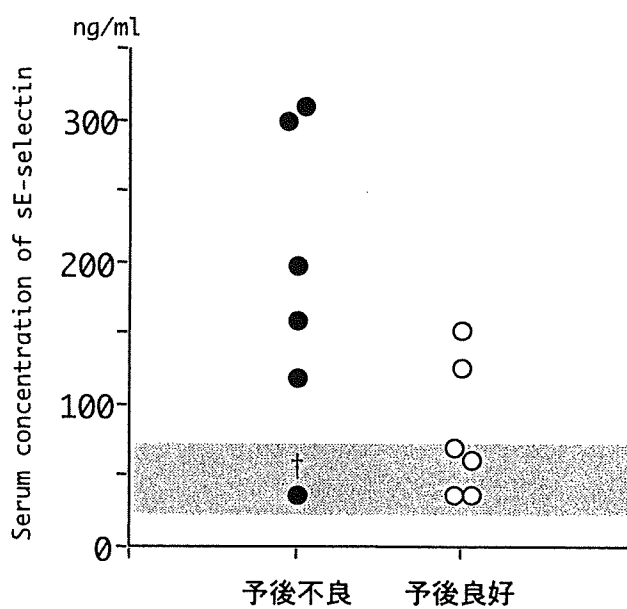


図2. インフルエンザ脳炎・脳症の血清中sE-selectin値

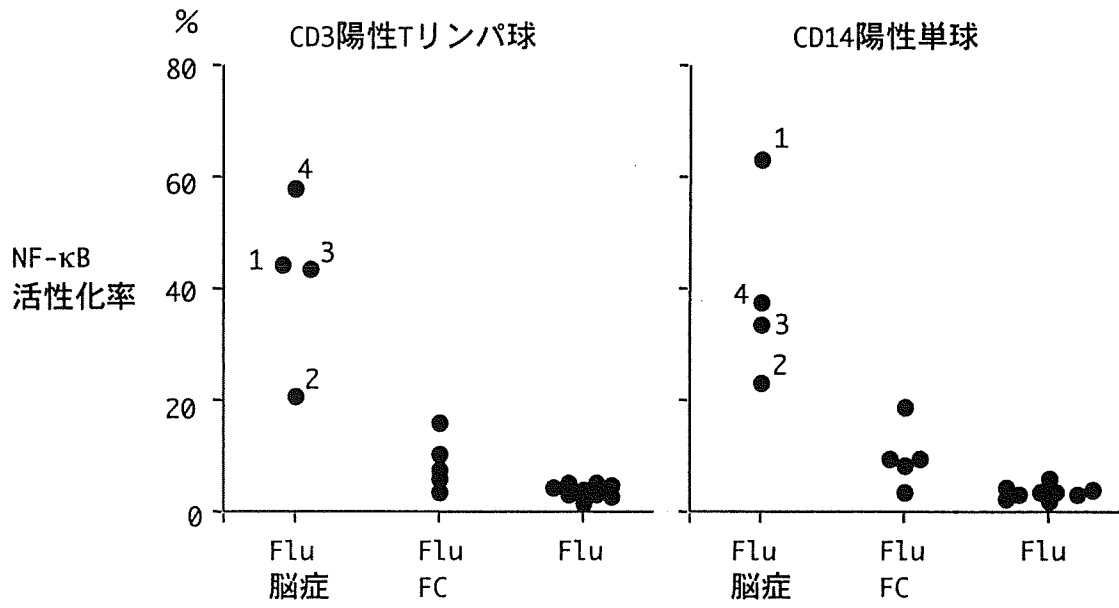


図3. 末梢血単核球のNF-κB活性化率

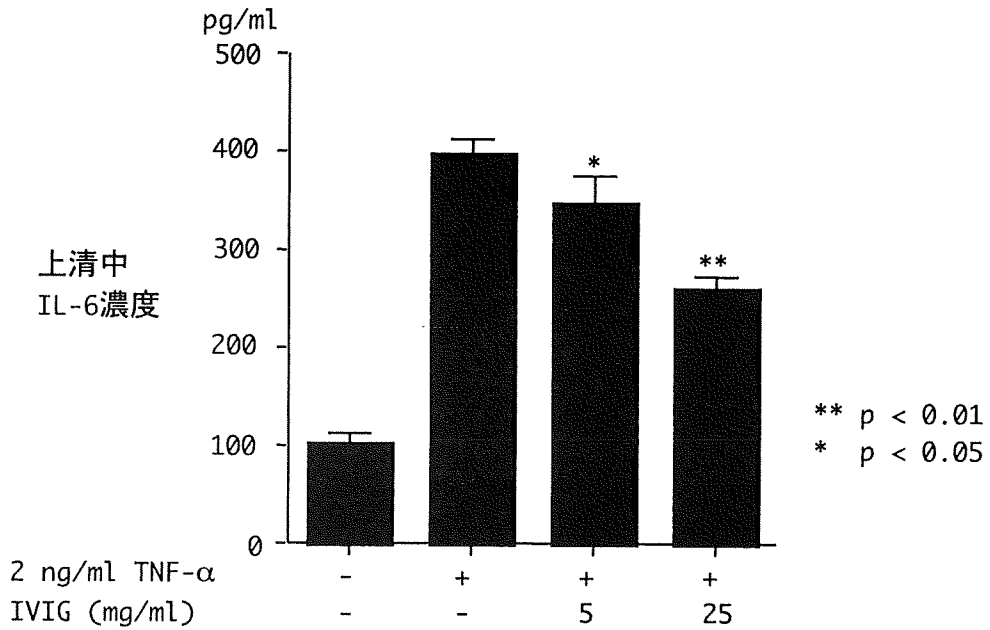


図4. ヒト正常血管内皮細胞におけるTNF-α刺激でのIL-6産生に対するIVIGの抑制作用

核内NF-κB-p65



2 ng/ml TNF-α	-	+	+	+
IVIG (mg/ml)	-	-	5	25

図5. NF-κB活性化に対するIVIGの抑制作用

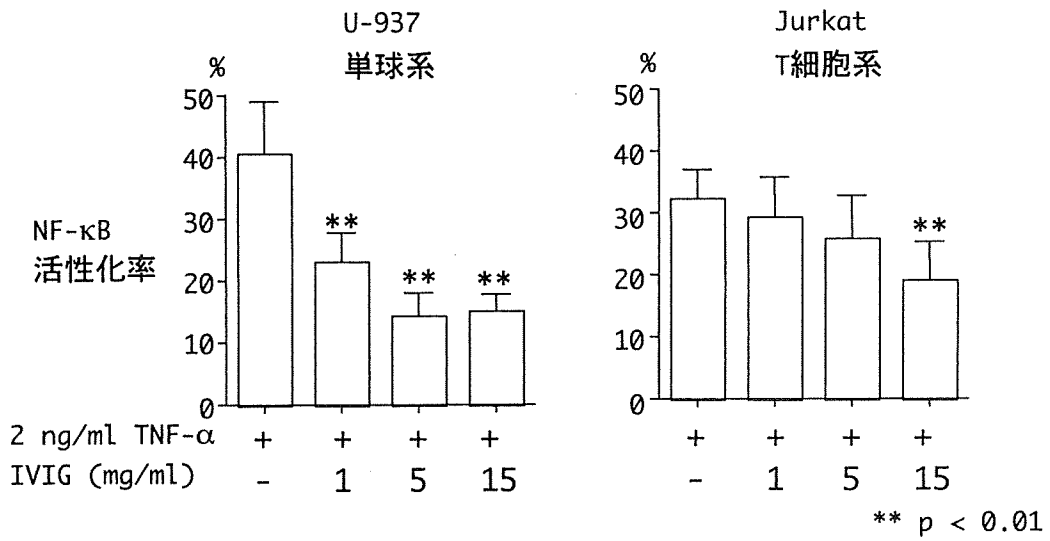


図6. NF-κB活性化に対するIVIGの抑制作用

表1. 電撃的な経過で死亡したインフルエンザ脳炎・脳症2症例の血清中サイトカイン値

患児	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	sTNFR1 (ng/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	sIL2R (U/ml)	sEselectin (ng/ml)
4歳女児	45,462	12.5	ND	701	51.3	ND	ND
10歳男児	2,166	23.6	9.93	508	12.4	1090	52.6
Children with influenza type A virus infection							
(n = 12)	15.9 \pm 16.7	<4.4	3.72 \pm 1.49	13.9 \pm 13.2	10.2 \pm 12.2	1719 \pm 632	55.2 \pm 15.4
Control							
(n = 18)	<3.1	<4.4	1.09 \pm 0.50	<2	<8	382 \pm 91	50.0 \pm 9.9

ND: not done

表2. ガンマグロブリン受容体

受容体	U-937 単球系	Jurkat T細胞系
Fc γ RI CD64	2.0 \pm 0.4	3.4 \pm 0.9
Fc γ RII CD32	84.5 \pm 1.5	0.9 \pm 0.2
Fc γ RIII CD16	13.5 \pm 1.4	19.1 \pm 2.5

(%)

インフルエンザの臨床経過中に発生する脳炎・脳症および病態に関する研究

研究協力者 前田明彦 高知医科大学小児科 講師

研究要旨 インフルエンザ脳症例では横紋筋融解症を合併することはまれでない。横紋筋融解症は骨格筋、筋繊維の融解壊死により、筋細胞成分の遊出を来たす病態である。筋原性酵素の上昇、尿ミオグロビンの上昇を伴い、腎不全に到ることもある。インフルエンザ脳症で、横紋筋融解症を合併する病態生理については不明なところが多く、個々の症例の詳細な解析がその発症メカニズム解明に結びつくものと思われる。種々のウイルス感染症に横紋筋融解症を合併することが知られているが、なかでもインフルエンザは横紋筋融解症を最も起こしやすいウイルスとされる。Singh らの報告では¹⁾、約40%がインフルエンザが原因であり、小児から高齢者まで罹患し、44%が急性腎不全を合併、致命率も12%にのぼる（表1）と報告されている。我々はA型インフルエンザ感染症に横紋筋融解症を合併し、2ヵ月後にReye症候群に罹患した1例を経験したので報告するとともに文献的考察を加えた。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症例では横紋筋融解症を合併することはまれでない。横紋筋融解症は骨格筋、筋繊維の融解壊死により、筋細胞成分の遊出を来たす病態である。筋原性酵素の上昇、尿ミオグロビンの上昇を伴い、腎不全に到ることもある。インフルエンザ脳症で、横紋筋融解症を合併する病態生理については不明なところが多く、個々の症例の詳細な解析がその発症メカニズム解明に結びつくものと思われる。種々のウイルス感染症に横紋筋融解症を合併することが知られているが、なかでもインフルエンザは横紋筋融解症を最も起こしやすいウイルスとされる。Singh らの報告では¹⁾、約40%がインフルエンザが原因であり、小児から高齢者まで罹患し、44%が急性腎不全を合併、致命率も12%にのぼる（表1）と報告されている。我々はA型インフルエンザ感染症に横紋筋融解症を合併し、2ヵ月後にReye症候群に罹患した1例を経験したので報告するとともに文献的考察を加えた。

B. 研究方法：症例報告

C. 研究結果

症例は3歳4ヶ月女児。主訴は発熱、食欲低下。在胎29週、1461gで出生。未熟児、仮死による脳性麻痺、精神運動発達遅滞、てんかんとしてフェニトイン90mg内服中。2歳5ヶ月時低血糖で入院。肺炎で反復入院の既往があった。家族歴には特記事項なし。平成14年1月14日に40℃の発熱・咳嗽を主訴に当科受診。軽度咽頭発赤を認め、WBC 9300/ μ l, CRP 1.0mg/dl, ALT 25 IU/L, AST 40 IU/L, LDH 309 IU/L, Crn 0.3 mg/dl, BUN 23 mg/dl, 胸部X線は正常であった。鼻咽腔スワブでインフルエンザウイルスA型抗原陽性でインフルエンザと診断し、アマンタジン40mg、抗生剤、鎮咳去痰剤を処方された。

以後解熱傾向が認められていたが、経口摂取量が通常の1/3程度に減少、尿回数も1日3-4回と減少

した。16日午後から再び41.4℃の発熱、嘔吐も加わり、経口摂取困難となったため当科再診、入院となった。入院時の体温は40.0℃、血圧106/58、心拍数130/分、呼吸数44/分、意識は清明であった。右肺野に軽度湿性ラ音を聴取した。神経学的には特記すべき所見は認めず、筋には発赤・腫脹・圧痛などの所見は認めなかった。入院時検査成績を表2に示す。Ht 47%, Na 153mEq/Lと高張性脱水を認めた。ALT 96 IU/L, AST 252 IU/LとAST優位のトランスアミナーゼ上昇と、CK 2033 IU/L, ALD 30.3 IU/Lと筋原性酵素の上昇が認められた。Crn 1.3 mg/dl, BUN 102 mg/dlと高値であった。尿は外観、褐色調で軽度蛋白尿が認められた。尿中赤血球は軽度であったが、これに比して高度の尿潜血が認められた。Myoglobinは血清、尿ともに高値（それぞれ1500 ng/ml, 6260 ng/ml）、APTTは59.9%と軽度延長していたが、その他のDICのマーカーは正常範囲であった。CPKアイソザイムはMM型が99%と骨格筋由来が示唆された。心電図、心エコーは問題なし。Ccrは118.4 ml/minと正常、尿 β 2-MG 50600 μ g/L、尿NAG 10.8 U/g Crnと上昇していた。FENaは0.01%と低値で、脱水の関与が疑われた。ペア血清でA型インフルエンザ(H3N2)抗体が<10からx640へと有意な上昇が確認された。A型インフルエンザ感染症に高張性脱水が誘因となり、横紋筋融解症を合併、尿細管障害を惹起したものと考えられた。

初診時、外来でインフルエンザと診断、アマンタジン5mg/kg/日を内服開始していた（図1）。翌日解熱傾向がみられたが、第3病日に再び40℃の発熱、食思低下著明、尿量減少もあり当科入院となった。10%の体重減少、高張性脱水が認められた。筋原性酵素および、血中・尿中myoglobin高値（ピーク値でそれぞれ1500, 6260 ng/ml）であった。横紋筋融解症に対しては、尿アルカリ化に努めつつ輸液を行い、低リン血症は、横紋筋融解症の増悪因子となりうることから、

リン製剤を経口的に補充した。アマンタジンは、血中濃度の上昇が危惧され、かつ、悪性高熱症候群の報告もあるため、中止し、リレンザ吸入に切り替えた。尿量は1 ml/kg/hr以上に維持され、輸液によりBUN、Crも速やかに低下、Ccrも保たれており、腎不全には到らなかった。尿中NAG、 β_2 -MGの上昇があり尿細管障害を伴った。第9病日には解熱し尿量も改善した。第17病日には退院、外来フォローとなり、筋原性酵素は正常化し、一旦全身状態は改善した。

しかしながら、2ヶ月後に、呼吸不全、けいれん、DIC、低血糖を来しReye症候群と診断された。このとき、インフルエンザの関与は証明されなかったが、肝不全、血液濾過透析を要する腎不全、脳浮腫、頭蓋内出血を来し、重篤な後遺症を残した。

D. 考察

現在までに報告されたインフルエンザに伴う横紋筋融解症の報告例を表3^{2) 3)}に示す。合計14例の報告があり、うち9例が女児である。B型インフルエンザは4例のみで10例がA型であった。CK値とMyoglobin値はほぼ相関していた。治療に関しては透析を要する症例はMyoglobin値が高い傾向にある。詳細が不明のものもあるが、症例13は自験例同様、重症心身障害児の症例であり、ハンディキャップ児では本症のリスクが高いものと推測された。

インフルエンザでは筋肉痛を起こすことは多い。筋炎と横紋筋融解症の相違について、表4⁴⁾に示す。横紋筋融解症は筋肉痛に加え、筋力低下も伴うことが多い。筋炎では筋肉痛が症状の前面に現れ、筋原性酵素上昇は軽度のことが多く、Myoglobin上昇、腎障害も伴わない。興味深いことに、横紋筋融解症は脳症同様にA型に、筋炎はB型にそれぞれ合併することが多く発症機序の相違を示唆する。

横紋筋融解症の腎障害については(表5⁵⁾)、組織学的には糸球体病変を伴うことはないとされ、主たる変化は尿細管障害である。基底膜は肥厚・萎縮、間質の一部に線維化、細胞浸潤がみられ、急性尿細管壊死の像である。治療は尿のアルカリ化、血液透析である。16%が死に到り、7%が慢性腎不全に以降すると報告されている。

表3に示した症例には、脳症合併があったと明記されたものはない。患児においては、横紋筋融解症発症時には明らかな意識障害を伴わず、回復したものの、2ヶ月後には、Reye症候群に罹患した。このときには、病初期に、高度な筋原性酵素、Myoglobinなどの上昇を伴い、より重症な横紋筋融解症の再発を思わせる症状を呈した。その後、低血糖、脳浮腫、高アンモニア血症、肝不全、DICなどを呈し、Reye症候群の典型像に進展した。血液濾過透析、血漿交換、ステロイ

ド投与など、Aggressiveな治療に抵抗して、重篤な後遺症をのこした。以上の臨床経過から、患児においては、横紋筋融解症とReye脳症発症には、連続性があるような印象があった。患児は、2歳5ヶ月時に原因不明の低血糖のエピソードがあり、基礎疾患として代謝異常の存在が疑われたため、各種検索を行った。血清カルニチン値が低値であったため、皮膚線維芽細胞を用いて、Carnitine palmitoyl transferase IIの酵素活性を測定したが正常範囲内であった。脂肪酸、有機酸、アミノ酸分析でも明らかな代謝異常症は特定できなかった。

E. 結論

A香港型インフルエンザ感染症に横紋筋融解症を合併した3歳女児例を経験した。インフルエンザの治療として抗ウイルス薬が汎用される趨勢の中で、種々の合併症に対して抗ウイルス剤が発症抑制に有効であるか否かについては重要な検討課題である。自験例では、抗インフルエンザ薬の早期投与にも関わらず脱水を引き金に横紋筋融解症を発症した。輸液、尿アルカリ化、リン補充により、腎不全に至ることなく一旦は治癒した。患児のように、脳性麻痺など基礎疾患を有するハンディキャップ児がインフルエンザ罹患した際には、脱水の有無に注意し、厳重な管理が重要であると考えられた。

文献

- 1) Singh U and Scheld MW: Infectious etiologies of rhabdomyolysis: three case reports and review. Clin Infect Dis 22:642-9, 1995.
- 2) 若杉宏明、黒澤健司、洲鎌盛一、豊田茂、高橋究: B型インフルエンザ感染症に伴った横紋筋融解症の1例. 小児科臨床 53:794-8, 2000.
- 3) 白石泰資、小谷治子、小倉英郎: インフルエンザ肺炎に横紋筋融解を合併した重症心身障害の10歳女児例. 日本重症心身障害学会誌 25: 91-4, 2000.
- 4) 小沢浩、野間清司、埜中征哉: インフルエンザ筋炎・横紋筋融解症. 日本臨床 58:2276-81, 2000.
- 5) 徳田桐子、小川誠、駒沢勝、樋口章浩、岩村喜信、秋山卓士、青山興司、瀧正史、大森浩之: A型インフルエンザウイルス感染症に伴った急性腎不全の1例. 小児科臨床. 45: 305-309, 1992.

F. 健康危険情報

脳性麻痺など基礎疾患を有するハンディキャップ児がインフルエンザ罹患した際には、脱水の有無に注意し、厳重な管理が重要であると考えられた。

G. 研究発表

論文発表

1. 前田明彦、脇口宏：ウイルス感染とアポトーシス。
小児内科, 2003
2. 脇口宏, 前田明彦：血球貪食症候群とウイルス。日
児誌 106: 1211-16, 2002
3. Takeuchi T, Maeda A, Hisakawa H, Wakiguchi H,
Takeuchi T, Sonobe H, Ohtsuki Y: Infiltrations of
epstein-barr virus-carrying cells in granular
lymphocyte-proliferative disorders corresponding
to chronic active epstein-barr virus infection.
Pediatr Hematol Oncol 2002 19: 459-65.
4. Nagy N, Maeda A, Bandobashi K, Kis LL,
Nishikawa J, Trivedi P, Faggioni A, Klein G, Klein E. :
SH2D1A expression in Burkitt lymphoma cells is
restricted to EBV positive group I lines and is
downregulated in parallel with immunoblastic
transformation.
Int J Cancer. 2002 Aug 1;100(4):433-40.
5. Kassis J, Maeda A, Teramoto N, Takada K, Wu C,
Klein G, Wells A.

EBV-expressing AGS gastric carcinoma cell sublines
present increased motility and invasiveness.

Int J Cancer. 2002 Jun 10;99(5):644-51.

6. Nagy N, Mattsson K, Maeda A, Liu A, Szekely L,
Klein E: The X-linked lymphoproliferative disease
gene product SAP is expressed in activated T and
NK cells. Immunol Lett 82, 141-7, 2002.

学会発表

前田明彦、堂野純孝、岡田泰助、脇口 宏：横紋筋融
解症を合併した A 型インフルエンザウイルス感染症。

日本臨床ウイルス学会、2002 年 6 月、秋田

H. 知的財産権の出現・登録状況

なし

表1. 横紋筋融解症とウイルス感染症

ウイルス	報告例数	年齢	CPK (IU/L)	ARF合併率 (%)	死亡例 (%)
Influenza virus	25	3-76y	230-303,200	11/25 (44)	3/25 (12)
HIV	8	18-29y	2,359-398,000	0/8	0/8
Coxsackie virus	8	11m-67y	8,500-600,900	4/8 (50)	2/8 (25)
Epstein-Barr virus	5	6-23y	4,500-482,000	1/5 (20)	0/5
Echovirus	4	17-30y	19,600-890,000	1/4 (25)	0/4
Cytomegalovirus	2	21-27y	4,800-74,850	1/2 (50)	0/2
Adenovirus	2	20-46y	57,800-133,000	0/2	0/2
Herpes simplex virus	1	20y	126,600	1/1 (100)	0/1
Parainfluenza virus	1	38y	66,000	0/1	0/1
Varicella-Zoster virus	3	15-22y	84,000-1,977,600	1/3 (33)	0/3
計	59			20/59 (34)	5/59 (8)

Singh et al., 1996

表2A. 入院時 (1月16日) 検査成績

RBC	549	× 10 ⁴ / μl	Na	153	mEq/L
Ht	47.0	%	K	4.1	mEq/L
Hb	15.5	g/dl	Cl	117	mEq/L
Plt	15.0	× 10 ⁴ / μl	Ca	4.5	mEq/L
WBC	7900	/ μl	P	3.2	mEq/L
Band	8	%	IgG	1660	mg/dl
Pol	65	%	IgA	87	mg/dl
Ly	16	%	IgM	185	mg/dl
Mo	11	%	PHT 血中濃度	6.2	μg/dl
CRP	0.4	mg/dl	末梢血液ガス分析		
TP	7.2	g/dl	PH	7.379	
Alb	4.3	g/dl	PCO ₂	35.5	mmHg
Glu	173	mg/dl	BE	-3.0	mEq/L
ALP	461	IU/L	HCO ₃	27.9	mM/L
T-Cho	183	mg/dl	検尿		
T-Bil	0.1	mg/dl	比重	1.031	
ChE	396	IU/L	PH	6.0	
ALT	96	IU/L	Glu	—	
AST	252	IU/L	prot.	70 mg/dl	
LDH	1018	IU/L	occult	3+	
CK	2033	IU/L	aceton	20 mg/dl	
ALD	30.3	IU/L	RBC	5-9 /HPF	
Crn	1.3	mg/dl	WBC	0-1 /HPF	
BUN	102	mg/dl	顆粒円柱	1+	
UA	8.4	mg/dl	咽頭スワブ	A型インフルエンザ抗原(+)	
NH3	32	μg/dl	咽頭細菌培養	H. influenzae 1+	