

表2 病理学的検討の概要

- (1) 高度な脳浮腫がある。(しばしば小脳扁桃ヘルニアなどを伴う)
- (2) 脳内に炎症細胞の浸潤は認めない。
- (3) 血管壁の硝子化および血漿成分の脳実質への漏出が著明。
—しばしば全身の血管に認められる—
- (4) 脳および全身のフィブリン血栓。
- (5) 血球貪食像(白血球、赤血球)がしばしば認められる。
—influenza-associated hemophagocytosis—
- (6) 気管支、肺の炎症性変化は軽度。
- (7) 脾臓や消化管などのリンパ節腫脹、リンパ濾胞の壊死、
リンパ球の脱落を認める。
- (8) 脳内にインフルエンザや他のウイルス抗原などを認めない。
- * (9) 神経細胞や肝細胞のapoptosisが急激に進行。
また、astrogliaの活性化が認められる。
(*:新たに明らかになった事項)

インフルエンザ脳症研究班 病理検討会

表3 インフルエンザ脳症の遺伝子多型の解析

なぜ一部の子どもが発症し、重症化するのか？

キーワード: サイトカイン、血管内皮細胞、ミトコンドリア、代謝障害など

本症で重い後遺症を残した児

インフルエンザのみ発症した児

SNPsによる遺伝子多型の解析 全領域の検索

異常部位の機能解析を通じてハイリスクの同定を行なう

平成 14/15 年および 15/16 年シーズンに流行したインフルエンザウイルスの性状解析

分担研究者 田代真人 国立感染症研究所

協力研究者 西藤岳彦 小淵正次 小田切孝人 国立感染症研究所

研究概要 脳症インフルエンザ脳症の発生状況とそのシーズンに流行したインフルエンザウイルスの型・亜型との関連性、および患者から分離されたウイルスにおける特異的な性状変化の有無の解明を最終目的として、主に血清学的手法による抗原解析及び赤血球凝集素(HA)遺伝子上の塩基配列変化から検討した。平成 14 年/15 年シーズンは、例年よりも約1ヶ月早く流行が開始したが、全体的な流行規模は例年並みであった。本シーズンの特徴は、A/H1N1 型および A/H1N2 型の分離報告はなく、90%以上が A/H3N2 型で、残りがB型であった点である。従って、A/H3N2 型の流行規模は前年よりも大きかったことになる。A/H3N2 型の分離ウイルスの抗原性は、ワクチン株と一致〜類似するものが大半を占めたが、一部ワクチン株に対する抗体の反応性が1/8 以下に低下した抗原変異株の分離報告もあった。B 型はほぼ全てがワクチン株と同じ B/Victoria 系統のウイルスであった。平成 15/16 年シーズンは、流行の立ち上がりは1月第3週であり流行の規模も昨年より小規模であった。流行株の 98%を A/H3N2 型が占め、約 2%が B 型ウイルスであった。A/H1N1 型は長野県で 1 株、埼玉県で 2 株が分離されたのみであった。A/H3N2 型の分離ウイルスの抗原性は A/福建/412/2002 類似株が大半を占めたが、それらの株のうちの約 80% はワクチン株に対する抗血清との反応性も維持していた。B 型はほぼ全例がワクチン株と遺伝的系統の異なる B/Yamagata 系統のウイルスであり、A/H1N1 型はワクチン株と抗原性が一致していた。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症の発症にはインフルエンザウイルスの感染が必要条件であると考えられるが、ウイルスが中枢神経系に侵入して増殖したとの所見は乏しく、呼吸器のウイルス感染により誘導される生体応答が直接の原因であると見なされる。これまで患者から分離されたウイルスには、A/H3N2 型が多い傾向にはあるものの、特定の型・亜型に限定されていない。一方、狭義のインフルエンザ脳炎患者から分離されたウイルスには、特異的な遺伝子変異の存在が示唆されているが、その詳細及び普遍性については不明である。そこで、昨年に引き続き、脳症インフルエンザ脳症の発生状況とそのシーズンに流行したインフルエンザウイルスの型・亜型との関連性、および患者から分離されたウイルスにおける特異的な性状変化の有無について、主に血清学的手法による抗原解析及び赤血球凝集素(HA)遺伝子上の塩基配列変化から検討した。

B. 研究方法

インフルエンザウイルス流行動向調査事業により各地方衛生研究所を中心に分離された全てのウイルス株について、まず地方衛生研究所において、型・亜型の同定、およびワクチン株を含む参照ウイルスに対する抗原変異

を、国立感染症研究所が予め分与したインフルエンザ型別・亜型別診断キットを用いた赤血球凝集抑制(KID)試験により解析した。この結果が国立感染症研究所に送られ、更に詳細な抗原解析と遺伝子解析を必要とするウイルス株が感染研へ送付された。また、インフルエンザ脳炎・脳症患者から分離されたインフルエンザウイルスについても、その一部が国立感染症研究所に送付された。国立感染症研究所では、これらのウイルス分離株について、WHO 標準株および国内外の代表的なウイルス株に対するフェレット感染血清を用いて更に詳細な抗原解析を行い、また HA 遺伝子について RNA 塩基配列を決定して、標準株からの遺伝子変異および遺伝学的な系統を検討した。

C. 研究結果

1. 平成 14/15 年のインフルエンザシーズン

(1)平成 14/15 年のインフルエンザシーズンは、昨年よりも1ヶ月程度早く流行が開始したが、全体的には平年並の流行規模であった。流行は平成 14 年 12 月第2週頃より九州地方から始まり、徐々に北上して 15 年 1 月第 3 週のピークの後に減少傾向を示して2月下旬からは終息に向かった。この間に日本全国で 7000 株のウイルスが分離されたが、A/H1N1 型の分離は全く報告されていないことが、諸外国と

大きく異なる流行動向であった。分離株の内訳は、A/H3N2 型が 90%以上を占め、残りの 10%未満がB型で、ほぼ同時に流行した1峰性の流行パターンを示した。

(2)A/H3N2 型分離株の 90%以上は、ワクチン株である A/Panama/2007/99 株と抗原的に類似していた。一方、約 10%のウイルスは、主流のウイルスとは抗原的に2~4 倍程度変異した抗原変異株であった。しかし、地域によっては、4倍以上抗原性が変異したウイルスが 20~25 を占めるとの報告もあった。HA 遺伝子解析では、すべての分離株は A/Sydney/5/97 類似の A/Panama/2007/99 系統のウイルスであった。4 倍以上の抗原変異株もこの系統に含まれていたものの、HA タンパクの 155 と 156 番目のアミノ酸置換を伴う独立した枝を形成していた。

(3)B 型インフルエンザの流行は、全体の 10%未満であり、その内訳は、B/Victoria2/87 系統のワクチン株である B/Shandong/7/97 株と類似のものが大多数を占めていたが、山形株系統のB/Sichuan 株類似のウイルスも若干検出された。更に、B/Shandong/7/97 株とは 2~4 倍程度ずれた抗原変異株も出現していた。本シーズンの B 型ウイルスの特徴は、HA 遺伝子は Victoria 系統の今シーズンのワクチン株 B/Shandong/7/97 株に類似しているが、NA 遺伝子は昨シーズンのワクチン株であるB/Sichuan 株に類似しており、両系統のウイルス間の遺伝子分節再集合体であることである。

2. 平成 15/16 年のインフルエンザシーズン

(1)平成 15/16 年のインフルエンザシーズンの流行は平成 16 年 1 月第 3 週頃より始まり、同 16 年 2 年第 2 週後に減少傾向に転じた。平成 16 年 2 月末日現在、日本全国で 2400 株のウイルス分離があり、このうち A/H3N2 型が約 98%、B型が約 2%を占める1峰性の流行パターンを示した。A/H1N1 型は長野県で 1 株、埼玉県で 2 株が分離されたのみであった。

(2)長野県で分離された A/H1N1 型分離株は抗原的にワクチン株である A/New Caledonia/20/99 株と一致していた。HA 遺伝子の解析でも A/New Caledonia/20/99 株の系統に属していた。

(3)A/H3N2 型分離株の大半は、A/福建/411/2002 株に対する抗血清との反応性の高い福建類似株であった。しかし同時にこれらの株の 8 割はワクチン株である A/Panama/2007/99 株に対する抗血清との反応性も高かった。HA 遺伝子の系統樹解析では、ほぼ全例が A/福建

/411/2002 と同じ系統に属することが示された。

(4) B 型インフルエンザの流行は、小規模であったが分離株の大半がワクチン株である B/Shandong/07/97 株とは HA 遺伝子の系統が異なる山形系統のウイルスであった。またこれらの分離株は同系統のウイルスに対する 2001/2002 シーズンのワクチン株である B/Johannesburg/5/99 とも抗原的・遺伝的に異なっていた。

(5)インフルエンザ脳症患者から分離されたウイルスについては、実験室内の交叉汚染による検査結果の混乱を避けるために、インフルエンザシーズンを避けて、今後解析を行う予定である。

D. 考察

平成 14/15 年シーズンは、全体としての中規模の流行ながら、A/H3N2 型が主流を占めたため、A/H3N2 型の流行規模はかなり大きかった。更に、A/H3N2 型には抗原変異株の出現も報告されており、今シーズンは A/H3N2 型の流行に伴うインフルエンザ脳症の多発が危惧された。B 型については、流行規模も例年以下で、特別な変異株の出現もなかった。HA と NA 遺伝子が交換した遺伝子分節再集合体が主流を占めたが、ワクチンの効果には影響を与えなかったと考えられる。

平成 15/16 年シーズンの流行規模は中規模であり、ほぼ A/H3N2 型の単独流行であった。また福建類似株の流行によって、ワクチン株と抗原性の大きく異なるウイルスの流行が危惧されたが、福建類似株の大半がワクチン株である A/Panama/2007/99 に対する血清との反応性も維持していた。インフルエンザ脳症患者から分離されたウイルス株と、非脳症インフルエンザ患者から分離されたウイルス株について、詳細に比較検討する必要がある。

E. 結論

平成 14 年/15 年シーズンについては、全体的な流行規模は例年並みであった。本シーズンの特徴は、A/H1N1 型および A/H1N2 型の分離報告はなく、90%以上が A/H3N2 型で、残りが B 型であった点である。従って、A/H3N2 型の流行規模は前年よりも大きかったことになる。A/H3N2 型の分離ウイルスの抗原性は、ワクチン株と類似するものが大半を占めたが、一部の地域からはワクチン株に対する抗体の反応性が 1/8 以下に低下した抗原変異株の分離報告もあった。B 型はほぼ全てがワクチン株と同じ B/Victoria 系統のウイル

スであった。

平成 15/16 年シーズンの流行は全シーズンの規模よりさらに小さく、A/H3N2 の単独流行であった。A/H3N2 は抗原的に福建類似株が大多数を占めてきたため、WHO は来シーズンの北半球の A/H3N2 ワクチン株として、福建類似株を推奨した。また B 型に関しては流行の規模が非常に小さかった。しかし、分離株の多くが今シーズンのワクチン株であった B/Shandong/07/97 とは、抗原的にも遺伝的にも異なる山形系統の株であったことから、WHO は来シーズンの北半球の B 型ワクチンとして B/上海/361/2002 を推奨した。

F. 健康危機情報

特記事項無し。

G. 研究発表

Isolation of influenza A H1N2 viruses from an outbreak in Yokohama city during the 2001–2002 influenza season in Japan :Chihara Kawakami, Takehiko Saito, Yoko Nakaya, Setsuko Nakajima, Tetsuya Munemura, Miwako Saikusa, Yuzo Noguchi, Kikushige Fujii, Mikio Takaoka, Reiko Ito, Toshinori Saito, Takato Odagiri and Masato Tashiro :Japanese Journal of Infectious Disease 56:110–113 (2003)

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 病院長

研究要旨 1994/95 から 2002/03 に亘る9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。9シーズンで101例(年平均11.2例)発症し、男58、女43(男女比1.3:1)、平均年齢は 3.9 ± 2.5 歳、発熱から神経症状開始までの間隔は 1.5 ± 1.7 日であった。転帰は死亡35例(34.7%)、後遺症20例(19.8%)、軽快46例(45.5%)であった。臨床症状は発熱が100%意識障害が99.0%にみられ、痙攣が74.3%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93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2002/03シーズンまでの9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101例発症し年平均11.2例であり、男58例、女43例で男女比は1.3:1であった。年齢は9カ月から12歳に発症し、平均年齢は 3.9 ± 2.5 歳で5歳未満の児は69例で66.8%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 1.5 ± 1.7 日

であった。転帰は死亡が35例(34.7%)、後遺症が20例(19.8%)、軽快が46例(45.5%)であった。(表1)(図1)

2. 臨床症状と検査所見

発熱は100%意識障害は99.0%に、痙攣は74.3%にみられた。脳波、脳CT、MRIの異常所見はそれぞれ84.4、76.1、58.8%に、血清AST/ALT、LDH、CPK異常はそれぞれ51.5、46.0、32.4%に、血糖上昇は49.4%にみられた。血液凝固系異常は29.6%に、髄液細胞上昇は20.0%に、血清アンモニアは7.6%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。この年次推移の1996/97シーズンから2002/03シーズンの7シーズンを横軸に、北海道の脳炎・脳症発症数を縦軸にして図示すると、 $R=0.7983$ 、 $p=0.031$ (回帰分析)であった。(図2)

4. インフルエンザ脳炎・脳症患者のワクチン接種歴

1994/95シーズンから2002/03シーズンまでの9シーズンで脳炎・脳症を発症した101例のうち、インフルエンザ不活化ワクチン接種歴の判明している例は85例であり、うち82例が未接種で、シーズン前に2回接種の確認されたものは3例であった。(表3)

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岡山大学教授)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63例発症して9例死亡(死亡率14.3%)、2002年は227

例発症して 33 例死亡(死亡率 14.5%)と纏められた。筆者の纏めた北海道の症例数はそれぞれ 11、7、3、15 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9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。とくに最近7シーズンの推移をみるとさらにその傾向がはっきりしている。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5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がっている。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。

最近アメリカ合衆国から、18 歳未満のインフルエンザ患者の間に罹患後極めて早期に死亡する症例が多発しているとの報告がみられる(CDC、MMWR)。本症との関連で共同研究が必要である。

E. 結論

1994/95 シーズンから9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 11.2 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、なし

2) 雑誌

a. 富樫武弘:インフルエンザ脳症の病理。インフルエンザ 4(1):29-33,2003

b. 富樫武弘:インフルエンザ流行期における鎮痛解熱薬使用の注意。日本耳鼻咽喉科学会専門医通信 74:10-11,2003

c. 富樫武弘:インフルエンザ脳症と最近の話題。香川県小児科会誌 24:30-31,2003

d. 富樫武弘:インフルエンザ脳炎・脳症と解熱薬。小児内科 35(10):1686-1689,2003

2. 学会発表、講演会

1) 富樫武弘:インフルエンザ—最近の話題とワクチン—。香川県小児科医会学術講演会特別講演 平成 15 年2月1日(於高松市)

2) 宇加江進、梅津愛子、岡 洋瑚、高橋 豊、富樫武弘、山中 樹、渡辺 徹、綿谷靖彦:札幌市における小児インフルエンザワクチン接種数の調査。第 28 回札幌市医師会医学会 平成 15 年2月 16 日(於札幌市)

3) 富樫武弘:インフルエンザ脳症。第7回奈良県外来小児科学・感染症サーベイランス研究会学術講演会 平成 15 年2月 22 日(於橿原市)

4) 富樫武弘:インフルエンザウイルス—脳炎・脳症、ワクチン、最近の話題—。第 14 回富山難治性感染症研究会特別講演 平成 15 年3月 13 日(於富山市)

5) 富樫武弘:小児インフルエンザ脳症と最近の話題。第49回秋田県感染症研究会特別講演 平成 15 年9月 19 日(於秋田市)

6) 富樫武弘:耳鼻咽喉科医に必要な感染症の最新情報「小児のインフルエンザ」。第 17 回日本耳鼻咽喉科学会専門医講習会 平成 15 年 11 月 15 日、16 日(於仙台市)

知的財産の有無

なし

インフルエンザ脳症の病理学的研究

分担研究者 佐多徹太郎(国立感染症研究所感染病理部部長)

研究協力者 長谷川秀樹、佐藤由子(同・感染病理部)

研究要旨 インフルエンザ脳症疑い例の剖検例について病理・免疫組織化学的に検討した。気管標本の切り出しを依頼し、検討した標本は気管、肺、脳ほかであった。インフルエンザウイルス抗原は気管と太い気管支上皮細胞にみられ、脳には陰性であった。通常の剖検では気管の標本がなく、末梢肺組織が採取されることが多いが、インフルエンザ脳症例ではインフルエンザウイルス感染の診断にはとくに気管の採取と免疫組織化学的検討が重要である。

A. 研究目的

乳幼児がインフルエンザ罹患後に脳症を併発し急速な経過で死亡する例がインフルエンザ脳症とされている。一般にインフルエンザウイルスは気管・気管支系上皮細胞で増殖し、肺泡領域の感染はほとんどないとされている。また、これらの症例においてインフルエンザウイルスは脳組織には認められずしかも炎症所見はみられないことから、脳炎ではなく脳症とされている。脳症の病理所見としては、肉眼的に浮腫、線状体部の両側性壊死、組織学的には血管周囲の蛋白性漏出とグリア突起の断裂などが指摘されているが必ずしも明瞭ではない。また原因はサイトカインストームによる血管透過性亢進とされているが、不明な点も少なくない。本研究の目的はインフルエンザ脳症の病理学的所見をより明確することで病態を明らかにし、診断や治療に役立てることである。本年度は最近経験した2例について病理所見を報告するとともに、病理検索法について考察する。

B. 研究方法

剖検例2例は、剖検組織でウイルス抗原を検出しインフルエンザウイルス感染について診断することを目的として担当病理医からの依頼により検体を送付されたもので、病理診断を補完するために検索した。両例とも連絡を受けた際に、気管と気管支検体の採取ないし標本送付を依頼した。ほか、肺、肝臓、腎臓、そして数個の脳組織について検討した。

インフルエンザウイルスの抗原検出については通常の免疫組織化学法を用い、NP蛋白に対するモノクローナル抗体を使用した。

1例は剖検直前に連絡を受けたので、ホルマリン

固定組織およびウイルス分離用組織の凍結組織の送付を依頼した。ウイルス分離はウイルス第3部の小田切室長により行われた。

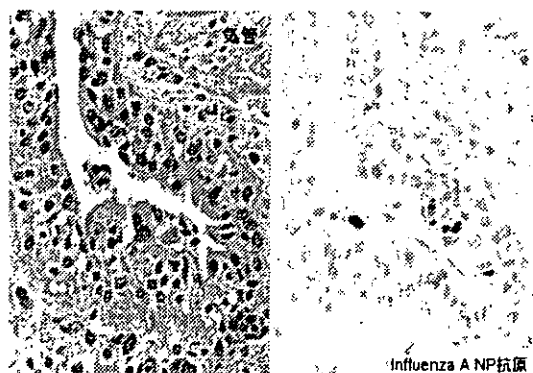
(倫理面への配慮)

当該施設で説明され許可を受けたのち担当病理医によって剖検された。病理医の依頼により、担当病理医の補完的病理業務の一つとしてインフルエンザウイルス感染について検索を行った。当該病理番号と臨床歴の要約を送付され匿名化された。我々のところでは受付通し番号を付し検討作業を行った。結果は担当病理医に報告し剖検診断に役立てた。

C. 研究結果

症例1は9才女児でインフルエンザワクチン接種歴はない。発熱、軽度の咳嗽、意識レベルの低下があり救急搬送された。不随運動あるが、脳CT上浮腫はなく、脳波は徐波化した。インフルエンザ脳症と診断され治療開始するも、発熱後2日目で脳死状態となり、第6病日に死亡した。気管、肺、肝臓、腎臓、脳のホルマリン固定組織を受け取りパラフィンに包埋した。同じ部位の凍結組織標本はウイルス分離用に採取され、培養細胞を用いたウイルス分離が行われた。脳は浮腫と鬱血があるが、炎症性細胞浸潤はなく、ウイルス性封入体もない。小脳顆粒層に壊死がみられた。腎臓や肝臓も鬱血が強く、蛋白様漏出を認めた。肺には出血と水腫があり、気管支に炎症性細胞浸潤があった。免疫組織化学法によるインフルエンザウイルス抗原は気管上皮細胞にのみ検出されたが、その陽性細胞数はわずかであった(図1)。ウイルスは気管のみから分離できた。

図1 気管 (症例1)



症例2は2才男児で発熱、咳嗽があり、翌朝、近医で薬剤を処方された。午後になって呼吸停止状態で発見され、救急搬送された。蘇生できず第2病日に死亡確認された。蘇生時の気管内分泌液からインフルエンザ抗原陽性であった。剖検所見では脳に軽度の浮腫がみられたほか著変はみられなかった。連絡により気管・気管支標本の追加切り出し採取を依頼した。気管、肺、脳のパラフィン切片を受け取り、病理組織学的検討を行った。脳では小血管周囲の空隙やや目立つほかはとくに所見は認められなかった。気管上皮は多層化し化生がみられ、気管壁にはリンパ球や形質細胞の浸潤があった。肺内の気管支には壁の肥厚と炎症性細胞浸潤があり上皮は多層化していた。免疫組織化学では気管上皮細胞に少数の、そして太い肺内気管支上皮細胞にウイルス抗原陽性細胞が認められた(図2、図3)。

図2 気管 (症例2)

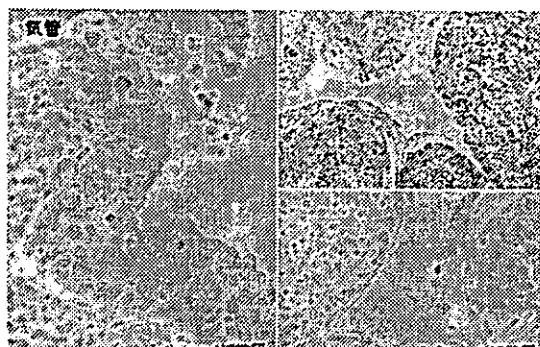
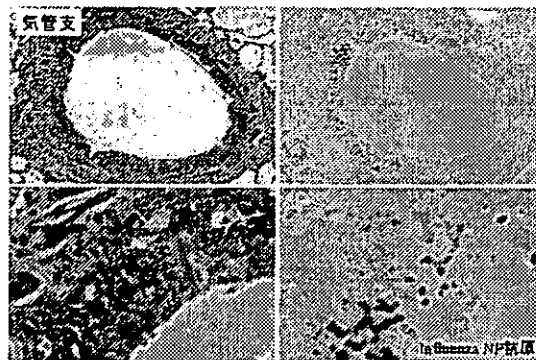


図3 肺内気管支 (症例2)



一部の呼吸細気管支に蛋白性滲出とともにごくわずかにウイルス抗原陽性細胞が認められた。脳内にウイルス抗原は陰性であった。

D. 考察

インフルエンザウイルスは病理学的に、気管・気管支・細気管支の上皮細胞で増殖し肺泡領域へのウイルス感染はなく、肺炎例ではむしろ細菌性の二次感染が主体である。したがって、インフルエンザ脳症例では肺内の気管支系と脳の検索が中心となる。気管粘膜は通常肉眼的に観察するもの大きな変化はみられないことから、組織標本を採取しないことが多い。そのため、軽症の気管・気管支炎ではインフルエンザウイルス感染を証明する検体が剖検組織標本にはないため、剖検で証明できない場合もあると考えられる。

今回はとくにインフルエンザ感染の有無を確認するために太い気管組織の採取を依頼した。2例ともに気管上皮細胞にウイルス抗原が検出された。症例1では第6病日の剖検であったが、ウイルスが分離されまたウイルス感染病変が証明されたので、本疾患の剖検には気管検体の検索が必須であろう。また肺内の気管支・細気管支病変はびまん性ではなく巣状であるため、一つでなく、いくつかの肺組織を検索する必要がある。しかも通常作製する末梢肺野標本ではなく、太くかつ軟骨を有する気管支や細気管支を検索しなければインフルエンザ感染を確認することはできないと考えられる。気管支上皮の何らかの組織変化や気管支壁の炎症性細胞浸潤はそのマーカーとなると思われる。

過去、本症の剖検検索ではPCR法でのウイルスゲノムの検索により、多くの組織での感染が疑われた。PCR法は感度が高いためウイルス血症を検

出していた可能性が考えられる。ウイルス感染組織・細胞の検索には免疫組織化学でのウイルス抗原の検出や in situ hybridization 法でのウイルス核酸の検出による感染細胞の検出が必須と考えられる。検出感度は必ずしも高いとはいえないが、確実なウイルス感染そしてウイルス増殖病変を検出することが可能であり、ウイルス感染症の病理学的検討にはこれが出発点であると信じる。

脳症の病理所見ははっきりしないことが多い。肉眼的な浮腫病変や血管周囲の空隙形成やタンパク質漏出所見のみでは不十分であろう。GFAP 免疫染色による所見等も追加し検討したい。また今後は病因に迫れる検索方法を確立することが必要と考えられ、さらに動物実験での解析が望まれる。その点動物モデルの開発は重要と考えられるので、検討し実施したいと考えている。

E. 結論

インフルエンザ脳症剖検検索では気管組織の採取と検索が重要であることを確認した。脳症の病理検索法をさらに検討する。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito R, Asahi Y, Yoshikawa T, Hasegawa H, Sato Y, Inoue R, Morishima T, Kondo N, Sata T, Kurata T, Tamura S.: Roles of anti-hemagglutinin IgA and IgG antibodies in different sites of the lower respiratory tract of vaccinated mice in preventing lethal influenza pneumonia. *Vaccine* 2003, 21:2362-2371.
2. Watanebe I, Ross TM, Tamura S-I, Ichinohe T, Ito S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H.: Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. *Vaccine* 2003, 21: 4532-4538.

2. 学会発表

1. 一戸猛志、渡邊泉、伊藤智史、千葉 丈、森山雅美、田村慎一、倉田 毅、佐多徹太郎、長谷

川秀樹：新しい粘膜ワクチンアジュバントを用いた経鼻インフルエンザワクチンの作製。第 51 回日本ウイルス学会総会。京都。平成 15 年 10 月。

2. 長谷川秀樹、渡邊泉、森山雅美、一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、千葉 丈、倉田 毅、佐多徹太郎：インロイシン経鼻接種によるインフルエンザウイルスの感染予防の検討。
3. 伊藤智史、一戸猛志、渡邊泉、田村慎一、千葉 丈、倉田 毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹：自然免疫刺激によるインフルエンザウイルス感染の抑制。第 51 回日本ウイルス学会総会。京都。平成 15 年 10 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)

感職第 79 号 平成 15 年 4 月 15 日。発明の名称：インフルエンザウイルス感染予防剤

2. 実用新案登録

なし

現行の不活化ワクチンによるインフルエンザ脳症の 予防効果に関する臨床的検討

主任研究者 森島恒雄 岡山大学大学院小児医科学教授
研究協力者 中野貴司(国立療養所三重病院)

研究要旨 現行の不活化インフルエンザワクチンに、インフルエンザ脳症予防効果があるのか否かについて臨床的側面から検討することを目的とした。予防接種歴を有する児でインフルエンザ脳症に罹患した児の中に、インフルエンザ発症時に原因ウイルスに対するHI抗体価が陰性の症例が存在した。一方、接種歴を有するインフルエンザ罹患児では、発症時HI抗体価が40倍以上の児も多かった。今後、流行株に対する中和抗体価の測定などさらなる検討に努める。

A. 研究目的

現在わが国で使用されている不活化インフルエンザワクチンに、インフルエンザ脳症予防効果があるのか否かについて臨床的側面から検討することが目的である。

平成12-14年度厚生労働科学研究「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)」での全国調査によると、インフルエンザへの関心が低く国民全体におけるインフルエンザワクチン接種率が低率であった1998/1999シーズンは217例のインフルエンザ脳症小児のうちワクチン接種歴を有するものは1名も居なかった。その後、小児におけるインフルエンザ脳症や高齢者の超過死亡などインフルエンザの脅威が広く知られワクチン接種者が増加するに伴い、インフルエンザ脳症を発症した小児でも接種歴を有する者が認められるようになってきた(1999/2000シーズン:3/109(2例死亡)、2000/2001シーズン:1/63、2001/2002シーズン:14/227)。

一方、わが国の小児における不活化ワクチン2回接種によるインフルエンザ発病予防に関する研究は、平成11年度厚生労働科学研究「幼児等に対するインフルエンザワクチンの有効性、安全性に関する基礎的研究(主任研究者:廣田良夫)」、平成12-14年度厚生労働科学研究「乳幼児に対するインフルエンザワクチンの効果に関する研究(主任研究者:神谷齊、加地正郎)」において解析中である。現在までの中間報告では、ワクチン接種により流行期における発熱リスクを0.6-0.7程度に減少させることができる(有効率30-40%)という結果である。年齢別検討では、1歳未満での発病防止効果は認められず、基礎免疫をもたない状態での現行の不活化ワクチン接種の有効性に

については検討の余地がある。

米国では平成15年6月に経鼻投与の弱毒インフルエンザ生ワクチンが認可された。5-49歳のインフルエンザ合併症のリスクが高くない者が接種対象である。インフルエンザ脳症は低年齢小児における合併症である。前項とも関連する事項であるが、現行の不活化ワクチンが基礎免疫をもたない状態で有効性が乏しいのであれば、生ワクチンは予防手段の候補であるが、その一方インフルエンザ脳症が初感染時や小児に特有の病態であれば、小児への生ワクチン導入に際しては注意すべき事項も多々存在する。

B. 研究方法

1. シーズン前に確実に2回のインフルエンザ不活化ワクチン接種歴があり、2回目の接種後2週間以上経過してからインフルエンザを発症し、脳症を合併した小児について調査し、臨床的事項について解析した。具体的には、「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」へ報告された症例や学会発表された症例について調べた。
2. たまたま私たちは、インフルエンザ不活化ワクチン接種歴が2回ありながらAH3型ウイルスによる脳症を発症し死亡した3歳女児を経験した。本児は2回目接種後2ヶ月でインフルエンザに罹患したが、発症時の血清インフルエンザHI抗体は陰性であった。宿主のインフルエンザに対する免疫能を最も簡便に測定できる方法は血清抗体価である。本死亡例の経験より、接種歴があってもインフルエンザに罹患する場合に当該児の血清抗体価はどのようなレベルにあるのかを検討することが必要と考え、三重県下7医療機関で、発熱を主訴に受診し迅速診断でA型インフルエンザと診断された児(13歳未満)の中で、当該シーズン前に2

回の予防接種歴がある児(2回の接種間隔は2週間以上45日以内、2回目接種から発症までの期間は2週間以上)に対して、インフルエンザ発症当日あるいは翌日に採血し血清抗体価を測定した。本研究を実施した2002/2003シーズンは全国的にもAH1の流行はほとんど皆無(分離株は春先に1例のみ)で、三重県内でも分離されたA型ウイルスはすべてAH3であった。よって本シーズンにおけるA型インフルエンザ感染は100%近くがAH3型と考えられ、本研究には好都合であった。

C. 研究結果

1. 確実に2回のインフルエンザ不活化ワクチン接種歴があり、2回目の接種後2週間以上経過してからインフルエンザを発症し(迅速診断あるいはウイルス分離により確定診断されていたことを必要条件とした)、脳症を合併した小児の報告症例は13例(すべて2001/2002シーズン)であった。全例、2回目接種の1-3ヶ月後、すなわち予防接種の免疫効果を期待できる時期にインフルエンザに罹患していた。インフルエンザウイルスが分離された症例は4例(30.8%)であった。ウイルスが分離され、かつ発症時の抗体価が測定してあった症例は2例のみであったが、2例とも分離ウイルス型に対するHI抗体価は陰性であった。予後については、軽快8例(61.5%)、後遺症あり4例(30.8%)、死亡1例(7.7%)であった。意識障害の持続が24時間未満の症例の中にも後遺症を残した例が2例あり、1例は失語と知能障害、もう1例は言語障害であった。

2. 予防接種歴ある児のインフルエンザ発症時抗体価については、予防閾値といわれるHI抗体価40倍以上の児が占める割合が、1-6歳児で77.3%(66例中51例がHI抗体価40倍以上)、7-12歳児では90.0%(10例中9例がHI抗体価40倍以上)であった。

D. 考察

今回解析した予防接種歴のあるインフルエンザ脳症症例13例の中で、ウイルスが分離されかつ発症時の抗体価が測定された例は2例しかなかった。これら2例では、原因と考えられるインフルエンザウイルスに対する抗体価は陰性であったが、さらに症例数を積み重ねて検討する必要がある。

あるレベル以上(40倍以上が予防閾値とされる文献が多い)の血清抗体価を有すれば罹患を予防できるかどうかについて検討した結果は、迅速キットによりA

型インフルエンザと診断した患者の発症時抗体価は、HI抗体40倍以上を有する症例が相当数あった(70-90%)。罹患を予防できなかったとしたら、ワクチン株と流行株の抗原変異、あるいは現行の不活化ワクチンによる予防効果の限界が可能性として考えられる。今後、流行株を用いた中和抗体価も併せて検討する予定である(大阪公衛研、奥野先生との共同研究)。

E. 結論

現行の不活化インフルエンザワクチンにインフルエンザ脳症予防効果があるのか否かについて結論を導くためには、さらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

本研究実施中には、特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 中野貴司. 特集:インフルエンザ Q&A. 医報フジ. 第123号. (P25-28, 44-45, 47). (平成15年7月25日発行). 診療新社.

2. 学会発表

1) 廣田良夫、藤枝恵、田中隆、前田章子、神谷齊、中野貴司(大阪市立大学院医学研究科公衆衛生学、国立療養所三重病院). 第7回日本ワクチン学会. 乳幼児におけるインフルエンザワクチンの有効性. 2003年10月18-19日. 名古屋市.

2) 藤枝恵、田中隆、前田章子、廣田良夫、神谷齊、中野貴司(大阪市立大学院医学研究科公衆衛生学、国立療養所三重病院). 第7回日本ワクチン学会. 乳幼児におけるインフルエンザワクチンの副反応. 2003年10月18-19日. 名古屋市.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

今のところ、なし。

ワクチン接種後に発症したインフルエンザ脳症の研究

分担研究者 水口 雅 自治医科大学小児科 助教授

研究要旨 インフルエンザワクチンを2回接種したにもかかわらず、インフルエンザ脳症を発症する小児例がある。本年度の研究では6症例(自験例1、他施設からの報告例5)を集積し、臨床経過と血清抗体価を分析した。その結果、6症例のうち3症例で、入院時すでに、原因ウイルス型に対する血清抗体価の上昇が見られた。抗体の有無と脳症の予後に、明らかな相関は認められなかった。ワクチン株により抗体価が上昇しても、それはインフルエンザの発症および重症化(脳症発症)に関する予防効果を保証するものではないことが判明した。

A. 研究目的

わが国では1990年代の半ばにインフルエンザ流行にともなう小児期急性脳症の多発が相次いで報告され、社会的にも注目された。これを受けて1990年末からは、わが国の小児におけるインフルエンザワクチン接種率が増加傾向にあり、2002/2003シーズンには、乳幼児のおよそ15%が予防接種を受けたものと推測される。

乳幼児におけるワクチンの効果については、インフルエンザ発症の予防、重症化の予防などを指標とした疫学的研究が、厚生労働省の複数の研究班により、進められてきた。しかし、いまだに確固とした結論は得られていない。

最近、われわれはワクチン接種後にもかかわらずインフルエンザ感染を契機に急性壊死性脳症を発症し、死亡した幼児例を経験した。そこで今年度の研究では、これまでに他施設から報告された症例をも含め、ワクチン接種後のインフルエンザ脳症症例のデータを集積し、解析を試みた。

B. 研究方法

2週間～4か月前に不活化インフルエンザワクチンを2回接種していたにもかかわらずインフルエンザ脳症を発症した6症例を集積し、その臨床経過とデータを比較検討した。

a. 自験例:2003年1月、自治医科大学附属病院に入院した1症例。

b. 他施設よりの報告例:2000年以降に報告され、重要データが記載されていた5症例。

その出典は以下のとおりである。

1) 床枝康伸, 永田映子, 川田優子, 脇田傑, 鈴木五三男: インフルエンザ脳症の3例. 小児科臨床 53(5):789-793, 2000.

2) 松永貞一, 西村浩, 鎌田芳夫, 田中宏, 臼井信男: イン

フルエンザワクチン既接種の5歳女兒に認められたインフルエンザ様疾患罹患時の一過性複視を伴う神経症状と持続する脳波異常. 小児科臨床 54(2):201-207, 2001.

3) 池田優, 森口直彦, 磯川貞之, 吉岡加寿夫, 片岡知, 加瀬哲男, 奥野良信: インフルエンザワクチン接種にも拘わらず、インフルエンザ脳症をきたした1例(抄). 小児感染免疫 14(1): 52, 2002.

4) 伊藤美津江, 中野貴司, 庵原俊昭, 神谷齊, 落合仁: インフルエンザ脳症で死亡したインフルエンザワクチン接種歴のある3歳女兒例(抄). 小児感染免疫 15(1):136-137, 2003.

5) 富田直, 垣内五月, 高橋礼花, 星野英紀, 堀尾恵三, 久保田雅也, 愛波秀男: インフルエンザ予防接種後にインフルエンザ脳症を発症した1症例(抄). 脳と発達 35(5):444-445, 2003.

C. 研究結果

a. 自験例の臨床経過とデータの検討

【症例】5歳 女兒。

【主訴】発熱、痙攣。

【家族歴】特記事項なし。

【既往歴】インフルエンザ様疾患、痙攣性疾患の既往なし。インフルエンザ予防接種は2000年に2回、2001年に2回、2002年に2回(11月、12月)接種済みであった。

【現病歴】2003年1月15日、日中38.9°Cの発熱があり、近医を受診した。インフルエンザ抗原迅速診断は陰性。帰宅後、アセトアミノフェンを使用した後、入眠した。同日の深夜、体温が41.5°Cに上昇した。翌16日午前4時、全身強直性痙攣が始まり、午前5時、外来に到着した。痙攣は約1時間45分持続した。痙攣重積と診断され入院した。

【入院時身体所見】体重 20kg、体温 38.8°C、意識は昏睡

(JCS III -300)、脈拍 132/分、呼吸 44/分、血圧 128/68mmHgであった。瞳孔は左右同大、径 2mm に縮瞳しており、対光反射はなかった。胸部では心音は純、心雑音はないが上肺野に喘鳴が聴取された。腹部は平坦軟、四肢は除脳硬直位で、深部腱反射は低下していた。

【入院時検査所見】静脈血 WBC 31400/ μ l、Hb 16.5g/dl、Ht 49.1%、Plt 25.4×10^4 / μ l、TP 7.9mg/dl、Alb 4.5mg/dl、BUN 37mg/dl、Cre 2.34mg/dl、AST 466U/l、ALT 172U/l、LDH 2554U/l、CK 2029U/l、Na 144mEq/l、K 3.4mEq/l、Cl 103mEq/l、Ca 8.5mg/dl、P 8.8mg/dl、Glu 102mg/dl、NH₃ 47 μ g/dl、CRP 1.8mg/dl。動脈血 pH 7.214、PCO₂ 21.3mmHg、PO₂ 160mmHg、BE -16.5mEq/l。インフルエンザ抗原迅速検査は A(+)、B(-)であった。入院時頭部 CT ではびまん性の脳浮腫に加え、多発性低吸収域が両側の視床・内包、脳幹、小脳髄質に認められた。脳浮腫が著明であり、髄液検査は施行できなかった。

【入院後経過】入院後、ICU にて全身管理を行ったが、深昏睡、弛緩性麻痺の状態が続いた。脳波、ABR は間もなく平坦となった。1月20日(第6病日)の頭部 CT では脳実質がびまん性に低吸収で、髄液腔が消失していた。人工呼吸器管理が続けられたが、脳機能の回復はみられず、3月末より腎機能障害が出現した。5月には腎不全が悪化し、多臓器不全のため死亡した。

インフルエンザ抗体価は1月17日には H1N1 1280 倍、H3N2 160 倍、B 型 160 倍、1月28日には H1N1 1280 倍、H3N2 1280 倍、B 型 80 倍であり、当時流行中の A 香港型に対する抗体が有意に上昇した。咽頭ぬぐい液からのウイルス分離は陰性であった。

b. 集積された報告例の比較検討

上の自験例および他施設よりの 5 報告例のデータの要点を表 1 にまとめた。

年齢は平均 4 歳(2~7歳)、性別は男:女 = 2:4、脳症の発症はインフルエンザの第 1~第 3 病日であった(発熱の始まりを第 1 病日とした)。解熱薬として 2 症例で NSAIDs、1 症例でアセトアミノフェンが使用されていた。

原因ウイルスは AH3 が 3 症例、A(型不明)が 1 症例、B 型が 2 症例であった。これに対する入院直後の血清 HI 抗体価は、3 症例ですでに上昇、2 症例で陰性であった。

予後は死亡 2 症例、重度後遺症 1 症例、後遺症なし 3 症例(うち 2 症例では脳波異常あり)と分かれた。B 型の 2 症

例はいずれも予後良好であった。ウイルス抗体、解熱薬使用の有無は、いずれも予後と無関係に見えた。

D. 考察

不活化インフルエンザワクチンによる発症予防効果は、成人では 70~80%と高いのに対し、6 歳未満では 20~40%と低く、1 歳未満では有効性が明らかでない。乳幼児期にワクチンの効果が低い原因として、免疫機能の未発達に加え、初感染(過去にインフルエンザ罹患歴がないこと)が考えられる。そのいずれの理由にせよ、抗体価の上昇が不十分な事態が予測される。

ところが本研究で集積した 5 症例の入院時データを見ると、6 症例中 3 症例で、じゅうぶんな血清抗体価の上昇が見られている。このことは、3 症例でインフルエンザ発症・重症化を予防できなかった原因が、上の予測とは異なるものであったことを示している。

抗体価の上昇にもかかわらずインフルエンザ脳症を発症した理由として、最も考えやすいのは、ワクチン株と実際に罹患した株の抗原性が異なっていたために、血清抗体が発症・重症化を有効に防ぎ得なかった事態である。この点につき、自験例ではウイルス培養に失敗したため調べ得ず、過去の報告でもじゅうぶんな検討がされていない。今後の研究課題として重要である。またそれ以外にも、抗体が存在しても感染の成立・重症化に結びつきにくい、何らかの免疫学的な原因の存在する可能性が大いに考えられる。

ワクチン接種後のインフルエンザ脳症の発症について、今回は少数例についてしか検討できなかったが、近い将来、より多数の症例を集積して検討し直す必要がある。

E. 結論

3 か月~2 週間前に 2 回のワクチン接種を受けていても、インフルエンザ脳症を発症する小児例がある。予防できなかった原因は、必ずしも血清抗体価が上昇しなかったためではない。また、血清抗体価が上昇していても、脳症で死亡する症例がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 水口雅. [日常よくみる疾患と診療のポイント]神経系疾患. 鴨下重彦、天野暉、松尾宣武、五十嵐隆、松平隆光(編)実践 小児医療. 日本医師会、東京、2003. pp. 264-275.
- 2) 水口雅. [最近話題の用語—知っておきたい豆知識]急性壊死性脳症. 小児科 44(4):509-510, 2003.
- 3) 水口雅. 脳炎・脳症. 有馬正高、加我牧子(編)国立精神・神経センター小児神経学講義—臨床に役立つエッセンスと最新のエビデンス—. 診断と治療社、東京、2003. pp. 77-96.
- 4) 水口雅. [小児疾患診療のための病態生理 第3版]脳炎、急性脳症、脊髄炎. 小児内科 35(Suppl):644-651, 2003.
- 5) 水口雅. [小児救急看護に必要な基礎知識と処置技術Ⅲ 覚えておきたい基礎知識]神経系の特徴. 小児看護 26(9):1274-1279, 2003.
- 6) 水口雅. [小児医療の最前線:臨床編]急性脳症の診断と治療. 医学のあゆみ 206(9):665-668, 2003.
- 7) 水口雅. [インフルエンザ]急性脳炎・脳症からみたインフルエンザ. 小児内科 35(10):1662-1666, 2003.
- 8) 水口雅. [小児救急医療の問題点]インフルエンザ脳症の救急医療. 小児外科 35(10):1223-1228, 2003.
- 9) 水口雅. [フローチャート小児救急初期対応]脳炎・脳症救急・集中治療 15(11):1215-1217, 2003.
- 10) 水口雅. [診断の指針・治療の指針]インフルエンザ脳症. 総合臨床 52(12):3271-3272, 2003.
- 11) 水口雅. [質疑応答 Q&A]インフルエンザ脳症の診断. 日本医事新報 4161:91-92, 2004.
- 12) Mizuguchi M. Lesions of acute necrotizing encephalopathy without a concentric appearance on imaging. *Neuroradiology* 45(9):663, 2003.

2. 学会発表

- 1) 山内秀雄、森雅人、河口修子、山形崇倫、中川栄二、桃井真里子、江口光興、水口雅:両側前頭葉の大脳皮質障害を示す乳幼児期発症の急性脳症。第45回日本小児神経学会総会、福岡、2003年5月23日(脳と発達 35(Suppl):S153, 2003)
- 2) Yamanouchi H, Mori M, Kawaguchi N, Yamagata T, Nakagawa E, Eguchi M, Momoi M, Mizuguchi M. Acute

Infantile Encephalopathy Predominantly Affecting the Bilateral Frontal Lobes. *Child Neurology Society 32nd Meeting*, Miami, October 1-4, 2003

- 3) 水口雅:インフルエンザ感染症と中枢神経系。第37回横浜市東部小児科医会、横浜、2003年9月18日
- 4) 水口雅:インフルエンザ脳症:臨床と病態。第20回茨城県小児科医会研修セミナー、水戸、2003年10月19日

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

表 1. ワクチン接種後の脳症発症の報告例

出典	床枝ら2000	松永ら2001	池田ら2002	伊藤ら2003	富田ら2003	本症例
年齢/性別	7歳/男児	5歳/女児	2歳/女児	3歳/女児	2歳/男児	5歳/女児
ワクチン接種 1回目/2回目	3か月前 /2か月前	2か月前 /2週間前	2.5か月前 /1.5か月前	3か月前 /2か月前	3か月前 /2か月前	2か月前 /1か月前
脳症発病日	第3病日	第1病日	第3病日	第2病日	記載なし	第1病日
初発症状	左上肢強直 性痙攣	意識障害	全身間代性痙 攣	全身強直性 痙攣	痙攣重積	全身強直性 痙攣
原因ウイルス 型	B型	AH3型	B型	AH3型	A型	AH3型
ウイルス 抗体価	B型512 →4096倍	H3N2 4096 →4096倍	陰性→ B型上昇	陰性 (AH3分離)	H1N1 80倍 H3N2 20倍	H3N2 160 →1280倍
解熱薬	イブプロフェン	メフェナム酸	使用無し	記載なし	記載なし	アセトアミノ フェン
予後	脳波異常の み	脳波異常の み	後遺症無し	死亡3病日	重度後遺症	死亡4か月

インフルエンザの初期診療における洋漢統合医療の試み

主任研究者 森島 恒雄 岡山大学大学院小児医科学教授
研究協力者 黒木春郎 医療法人社団永津会齋藤病院 小児科

研究要旨 小児のインフルエンザは有効な抗ウイルス薬、ワクチンの存在にもかかわらず重篤な合併症を有する。従来の治療法に加えて、宿主の免疫能への関与を考慮し漢方薬を併用する洋漢統合医療を試みた。oseltamivir 単独と麻黄湯併用群と比較し、単独群で一例の熱性痙攣を認めた。麻黄湯では重篤な合併症は見られなかった。全例で経過は良好であった。麻黄湯が宿主の免疫能へ作用し、予後を良好にさせる可能性は示唆される。今後、宿主の免疫応答への影響、抗原排出期間、長期、短期の合併症などに関する検討を継続する。

A. 研究目的

小児のインフルエンザは、有効な抗ウイルス薬、ワクチンが存在するにもかかわらず種々の重篤な合併症をきたすことがある。初期治療において宿主側の免疫能に働きかけることにより、良好な予後を獲得できる可能性はあると考えられる。漢方薬はそうした分野に対して歴史的な集積を有する。従来の西洋医学の医療体系の中に漢方薬を加える洋漢統合医療という考えが提唱されている。この方法による有効な治療法の標準化を目的として今回の検討を行った。

B. 研究方法

(医)永津会 齋藤病院小児科外来を受診し、鼻咽頭ぬぐい液からの迅速診断キットによりインフルエンザと確定診断され、外来での追跡が可能であった例を解析の対象とした。有熱期間、合併症、臨床経過などを後方視的に診療簿から検討した。漢方薬は麻黄湯を3日間、ツムラのエキス剤を、投与量は0.1-0.15 g/kg/日、分3、診断時に一律に投与した。原則として内服投与であり、小児への内服させやすさを考え、単シロップに溶解して経口投与したことが多い。初期に内服が困難な場合は、ほぼ同量を生食に溶解して注腸投与した。全例で抗ウイルス薬の oseltamivir (4 mg/kg/day 分2 5日間)を使用した。

C. 研究結果

2003年1月から2月までの受診例から83例が解析の対象となった。症例の内訳を表1に示す。麻黄湯非使用 oseltamivir 単独投与群の一例において、熱性痙攣の合併が見られた。この症例の経過は午前中に外来受診後 oseltamivir を一度内服、その日の17時ごろに熱性痙攣を来たしている。他に重篤な合併症の見られた例はなかった。全例中、抗菌薬を処方した例は

4例であった。表2に症例の経過を示す。発熱初日から解熱までの期間は麻黄湯と oseltamivir 併用群は3日、oseltamivir 単独投与群が2日であった。(U検定 P=0.014)

表1 インフルエンザ症例の内訳

	麻黄湯 + oseltamivir 投与 (n=44)	Oseltamivir 単独投与 (n=39)
平均年齢	8.1 歳	9.0 歳
(range)	(0-16 歳)	(3-18 歳)
性別	M=21, F=23	M=27, F=12
A型	42	37
B型	2	2
合併症	0/44	1/39 (熱性けいれん)

表2 インフルエンザ症例の経過

	麻黄湯 + oseltamivir 投与 (n=44)	oseltamivir 単独投与 (n=39)
麻黄湯 投与病日	1日 (n=44)	—
oseltamivir 投与病日	—	1日 (n=27)
発熱初日から解熱ま で	3日 (n=30)	2日 (n=12)
麻黄湯 + oseltamivir 投与から解熱まで	2日 (n=30)	—
Oseltamivir 投与から解熱まで	—	1日 (n=12)

D. 考察

インフルエンザに対して麻黄湯を選択した理由は、適応疾患であることに加え、小児によく使用されること、麻黄湯の適応となる症状が頭痛、発熱、悪寒、関節痛、筋肉痛、四肢倦怠、咳嗽、発汗傾向が見られない等インフルエンザの初期症状に類似していることによった。

インフルエンザは、有効なワクチンの普及と抗ウイルス薬の登場により、その対策は格段に向上している。本来インフルエンザ対策はワクチンの普及とそれによる予防が第一義であるが、現状では未だに流行を完全に制圧できていない。抗ウイルス薬は有効ではあるが、早期投与によっても重篤な合併症を完全に制御はできていない。そうした背景のもと、宿主の免疫能を賦活化する効果を期待して、抗ウイルス薬に麻黄湯を併用した経験を検討した。結果では、有熱期間は麻黄湯併用群が有意に延長していた。症例数が少ないので、この両群を検定することの意義は不明であるが、臨床経過からは麻黄湯投与により経過が遷延したとは考えづらい。こうした検討の評価に有熱期間が指標として有効であるかに関してはさらに議論が必要であり、また、いずれ感染症に伴う発熱が生体にとって一概に有害事象といえるかどうかについての検討も要する。一般に発熱は生体側の感染微生物に対する防御反応として考えられる。すなわち生体は発熱により微生物の増殖を抑制し、炎症反応を低下させる。したがって発熱は適応反応であり、解熱は限られた範囲でのみ有効である。麻黄湯併用による有熱期間の延長は有害事象としてよりむしろ、oseltamivir によるウイルス量の減少と麻黄湯による生体側への免疫増強作用の結果とも解釈し得る。このような観点からは麻黄湯併用による有熱期間の検討は、長期的な免疫応答、予後、合併症等の検討と関連させる必要がある。

合併症では、麻黄湯併用群に熱性痙攣が見られなかった。このことから、麻黄湯の併用により熱性痙攣の合併を軽減できた可能性は示唆される。麻黄によるインフルエンザウイルスの増殖抑制、麻黄剤の免疫調整・増強効果等も報告されており、今後さらに検討に値する課題であろう。

以上より、漢方薬投与に関する今後の検討課題として、インフルエンザに関しては、抗原排泄期間の差、個体側の免疫反応の差、長期・短期の合併症があげられる。

宿主側への免疫調整薬として作用し得る漢方薬を従

来の西洋医学の中に位置付けることにより、より高いレベルの医療が可能となるであろう。

E. 結論

インフルエンザと麻疹に対して、漢方薬の併用による治療経験を検討した。両者において良好な結果を示し、漢方薬の併用がこうした疾患の予後を改善させる可能性が示唆された。今後の幅広い検討を要すると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 黒木春郎、木元博史：小児のインフルエンザと麻疹に対する洋漢統合医療の経験。千葉県医師会雑誌 55(10): 47-50, 2003.

(2) 黒木春郎：小児のインフルエンザと麻疹に対する洋漢統合医療の経験。小児東洋医学会誌 印刷中

(3) 木元博史、黒木春郎：インフルエンザ流行における漢方薬の意義。千葉県医師会雑誌 55(11): 33-36, 2003.

2. 学会発表

(1) 黒木春郎、木元博史：第22回漢方免疫アレルギー研究会学術集会 2003/06/07 東京。小児のインフルエンザと麻疹に対する洋漢統合医療の経験。

(2) 黒木春郎、木元博史：第23回日本小児東洋医学会 2003/09/14 川崎。小児のインフルエンザと麻疹に対する洋漢統合医療の経験。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

インフルエンザ脳症におけるマイクロアレイを用いた 網羅的遺伝子発現解析に関する研究

主任研究者 森島 恒雄 岡山大学大学院小児医科学教授

研究協力者 木村 宏 名古屋大学医学部小児科学

研究要旨 マイクロアレイ法によるインフルエンザ患者末梢血中の遺伝子発現の基礎的検討を行った。インフルエンザに罹患患者より急性期、回復期の血液を採取し、RNA を抽出、cRNA を合成し、Agilent, Human 1A Oligo Microarray を用い、約 18500 の遺伝子発現を比較した。急性期に3倍以上の発現増加を認められた遺伝子は 209 存在し、逆に急性期に発現低下していた遺伝子が 154 あった。マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析はインフルエンザ脳症の発症機序・重症化の解明に有用と考えられる。

A. 研究目的

本研究班を中心とした研究成果の蓄積により、インフルエンザ脳症の発症病理についてはかなりのことが解明されてきた。インフルエンザ脳症の発症にはウイルス感染に伴う免疫の活性化、ことに interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor・(TNF・) などの炎症性サイトカイン関与が大きいことも明らかにされてきている。本症の患者末梢血ではこれら炎症性サイトカイン遺伝子の高発現が認められ、systemic に免疫が亢進しており、脳症の発症には、ウイルスの増殖よりもむしろウイルスに対する生体の過剰な免疫反応が関与している可能性が示唆されている。

しかし、インフルエンザに罹患したすべての個体が脳症を生じるわけではないこと、必ずしもウイルスに対して抵抗力の弱い者が発症するわけではなくむしろ免疫学的に活発な健康小児に多く発症していること、我が国に報告が集中していることなど、インフルエンザ脳症の発症病理については未だ不明な点が多く、そこに遺伝的素因の関与が示唆されてきた。

本症の発症や重症化に関わる遺伝的背景や遺伝子異常を明らかにするために、様々な分子生物学的手法がとられてきた。患者急性期の遺伝子発現パターンを解析するのもその一方法である。しかしノーザンブロット法や RT-PCR 法など、従来の方法では、解析する遺伝指数の数に限りがあり、関連を予想した特定の遺伝子のみの解析しかできないこと、相互の関連がわかりにくいなどの欠点があった。近年開発されたマイクロアレイ法を用いることによって、より多数の遺伝子を網羅的に解析することで、今まで思いもよらなかった遺伝子の関与が明らかになるかもしれない。我々は、インフルエンザ脳症の発症病理を解明するための一法とし

て、マイクロアレイを用いた末梢血中の遺伝子発現解析の基礎的検討を行った。

B. 研究方法

図 1, 2 にマイクロアレイ法の原理を概説した。実際には以下に示した手順で行う。

1. インフルエンザ患者から急性期および回復期に、RNA を安定化するための容器 (PAXgene RNA, QIAGEN) に採血 (2.5ml)。
2. PAX gene Blood RNA Kit (QIAGEN) を用い RNA を抽出。全血 2.5ml より
厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担 研究報告書
5-15・g の RNA が抽出される。
3. 抽出された RNA の質をバイオアナライザ (RNA6000Nano Assay, Agilent Technologies) を用いて確認。
4. 急性期および回復期の RNA をそれぞれ 400 ng 使用し Low RNA Input リニア増幅・ラベル化キット (Agilent Technologies) を用い cDNA の合成、ラベル化 cRNA の合成を行う。急性期を Cyanine 3-dCTP、回復期を Cyanine 5-dCTP でそれぞれラベル化する。
5. ラベル化 cRNA を QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用い精製する。
6. 精製されたラベル化 cRNA の量および Cyanine 3/ Cyanine 5-dCTP の取り込み率を Nano Drop ND-1000 (NanoDrop Technologies) を用い測定。
7. ラベル化 cRNA 各 1・g を In Situ Hybridization Kit (Agilent Technologies) を使用しマイクロアレイ (Human 1A

Oligo Microarray, Agilent Technologies)に60°C17時間ハイブリダイゼーションさせる(図1)。

8.ハイブリダイゼーションされたマイクロアレイを洗浄した後DNA Microarray Scanner(Agilent Technologies)で読みとる。読みとったマイクロアレイの情報を Feature Extraction (Agilent Technologies)で解析する。マイクロアレイには約18500の遺伝子が搭載されており、急性期と回復期での遺伝子発現の変化を検出できる。急性期(Cy-3)の遺伝子発現は Green Signal、回復期(Cy-5)の遺伝子発現は Red Signal の強度として表現される(図2)。

C. 研究結果

今回は脳症や熱性痙攣などの中枢神経合併症のないインフルエンザ患者を対象とした。インフルエンザに罹患した4歳男児より急性期(発症後2日目)、回復期(発症後9日目)の血液を採取した。全血よりRNA抽出、cRNA合成後、Agilent, Human 1A Oligo Microarray を用い、約18500の遺伝子発現を比較した。図3にDNA Microarray Scanner で読みとった各遺伝子の発現強度を示した。横軸は急性期の発現を縦軸は回復期の発現強度を表している。急性期に3倍以上の発現増加を認められた遺伝子は209存在し、逆に急性期に発現低下していた遺伝子が154あった。

D. 考察

インフルエンザ脳症の発症機序については未だ不明な点が多い。脳症患者の髄液や脳組織からはインフルエンザウイルスは検出されず、ウイルスの直接侵襲により脳症が起こっているとは考えがたい。一方、インフルエンザ脳症の患者において高サイトカイン血症が認められるとの報告が多く、脳症発症のメカニズムとして、サイトカインを介した炎症反応の亢進や血管内皮細胞の障害に引き続いた多臓器不全が示唆されてきた。近年我々は、定量的RT-PCR法を用い、インフルエンザ脳症患者の末梢血中において、炎症性サイトカインであるIL-6およびTNF α 遺伝子の高発現が見られることを報告した。これらのことは、脳症ではsystemicに活性化T細胞やマクロファージなどの免疫担当細胞が活性化していることを示している。また、熱性痙攣群でも末梢血中のTNF α の発現が亢進していることも明らかにし、インフルエンザ脳症と熱性痙攣の間には連続した発症病理が存在すると考えられる。こ

のように定量的RT-PCR法は鋭敏かつ再現性の高い優れた手法であるが、解析する遺伝指数の数に限りがあり、関連を予想した特定の遺伝子だけの解析しかできないこと、相互の関連がわかりにくいなどの欠点があった。

今回我々はマイクロアレイ法によるインフルエンザ患者末梢血中の遺伝子発現の基礎的検討を行った。従来の遺伝子発現法と比べ、同法を用いることで以下の様な有利な点が考えられる。1)多数の遺伝子を解析できるため、いままで思いもよらなかった遺伝子の関与を発見できる可能性がある。2)発現の亢進に留まらず、発現低下・抑制もとらえることができる。3)単一遺伝子の発現のみならずクラスター解析を行うことで、遺伝子群、経路の活性化・抑制を見いだすことができる。一方で短所として、1)再現性の問題、2)マイクロアレイ法に限らずRNA発現解析につきまとうことであるが、遺伝子発現は必ずしも蛋白レベルの結果と相関しない、3)膨大な数の遺伝子発現解析の中で、本質的な異常が埋もれてしまう、などがあげられる。これらに対処するために、マイクロアレイ法によって得られた結果を、定量的RT-PCR法や(解析が可能であれば)蛋白レベルの解析で確認する必要がある。また、インフルエンザ脳症に特異的な遺伝子発現パターンを見いだすためには、脳症患者と脳症を発症しなかったインフルエンザ患者を多数比較し、その最大公約数を求めることが必要であろう。現在、脳症および対照患者ともに症例数を増やし検討中である。

以上、マイクロアレイ法によるインフルエンザ患者末梢血中の遺伝子発現の基礎的検討を行った。同法による網羅的遺伝子発現解析はインフルエンザ脳症の発症機序・重症化の解明に有用と考えられる。一方で、本研究班を中心に、インフルエンザ脳症を発症した患者に特異的な遺伝的背景を遺伝子多型解析により明らかにする試みがある。遺伝子多型とマイクロアレイ解析は手法も対象も異なるが、両者で得られた結果は共に補完的役割を果たすものと考えられる。

E. 結論

マイクロアレイ法によるインフルエンザ患者末梢血中の遺伝子発現の基礎的検討を行った。同法による網羅的遺伝子発現解析はインフルエンザ脳症の発症機序・重症化の解明に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawada J, Kimura H, Ito Y, Hara S, Kawashima H, Okuno T, Morishima T. Absence of Associations between Influenza-Associated Encephalopathy and Human Herpesvirus 6 or Human Herpesvirus 7. *Pediatr Infect Dis J*, 22:115-119, 2003

Kawada J, Kimura H, Ito Y, Hara S, Iriyama M, Yoshikawa T, and Morishima T. Systemic Cytokine Responses in Patients with Influenza-Associated Encephalopathy *J Infect Dis* 188:690-8, 2003.

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担 研究報告書

Hara S, Kimura H, Hoshino Y, Hayashi N, Negoro T, Okumura A, Kajita Y, Sakuma T, Nakayama T, Hosoya M, Tomoda A, Morishima T. Combination therapy with intraventricular interferon- α and ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis and monitoring measles virus RNA by quantitative PCR assay. *Brain Dev* 25:367-369, 2003

Tomoda A, Nomura K, Shiraishi S, Hamada A, Ohmura T, Hosoya M, Miike T, Sawaishi Y, Kimura H, Takashima H, Tohda Y, Mori K, Kato Z, Fukushima A, Nishio H, Nezu A, Nihei K. Trial of Intraventricular Ribavirin Therapy for Subacute Sclerosing Panencephalitis in Japan. *Brain Dev* 25:514-7, 2003

Kimura H, Futamura M, Ito Y, Ando Y, Hara S, Sobajima H, Nishiyama Y, Morishima T. Relapse of Neonatal Herpes Simplex Virus Infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 88:F483-F486, 2003

Kawada J, Kimura H, Morishima T. Influenza Virus and Febrile Convulsions. *J Infect Dis* 189:564-5, 2004

Kawada J, Kimura H, Yoshikawa T, Ihira M, Okumura A, Morishima T, Hayakawa F. Himiconvulsion-hemiplegia syndrome and primary human herpesvirus 7 infection. *Brain Dev* in press

Kawada J, Kimura H, Ito Y, Ando Y, Tanaka-Kitajima N, Hayakawa M, Nuno H, Endo F, MD, Morishima T. Evaluation of systemic inflammatory responses in neonates with herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* in press

2. 学会発表

川田潤一、原紳也、伊藤嘉規、吉川哲史、木村宏、森島恒雄. インフルエンザ脳症における末梢血のサイトカインの発現 第106回日本小児科学会学術集会 2003.4.26 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。