

図1. 2002/2003 シーズン～2014/2015 シーズンインフルエンザ定点あたり報告数週別推移 (2014/2015 シーズンは2015年第8週まで；暫定値)

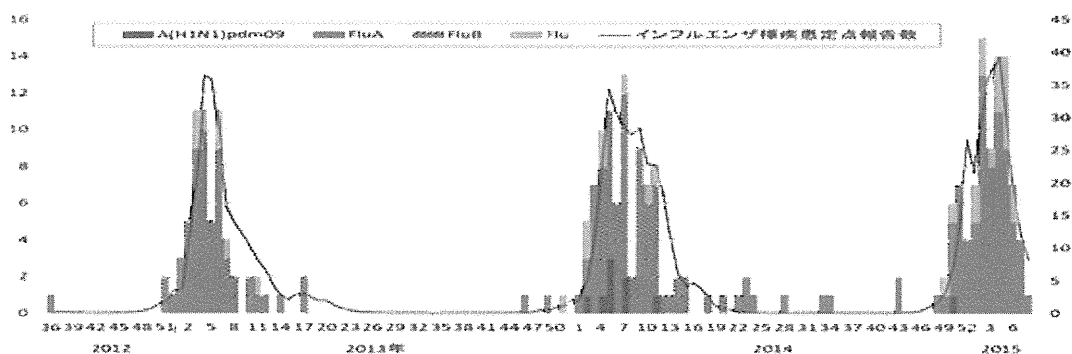


図2 2012/2013～2014/2015 シーズンのインフルエンザ脳症報告数およびインフルエンザ定点あたり報告数週別推移 (2012年第36週～2015年第8週まで；暫定値)

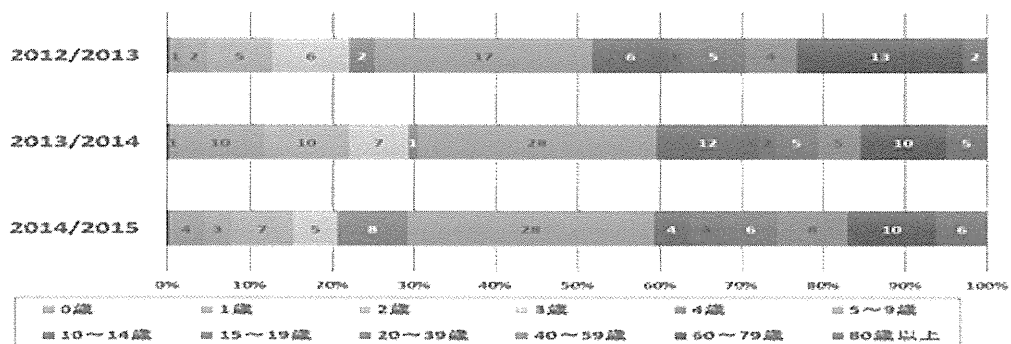


図3 インフルエンザ脳症発生報告年齢別割合グラフ(2012/2013～2014/2015 シーズン:2015年第8週まで；暫定値)

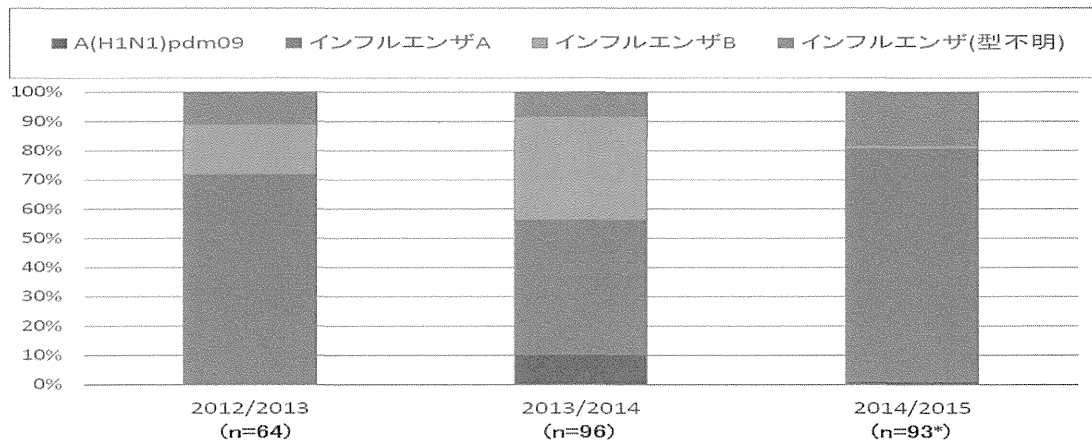


図4 インフルエンザ脳症発生報告ウイルス型別割合(2012/2013～2014/2015 シーズン:2015年第8週まで；暫定値)

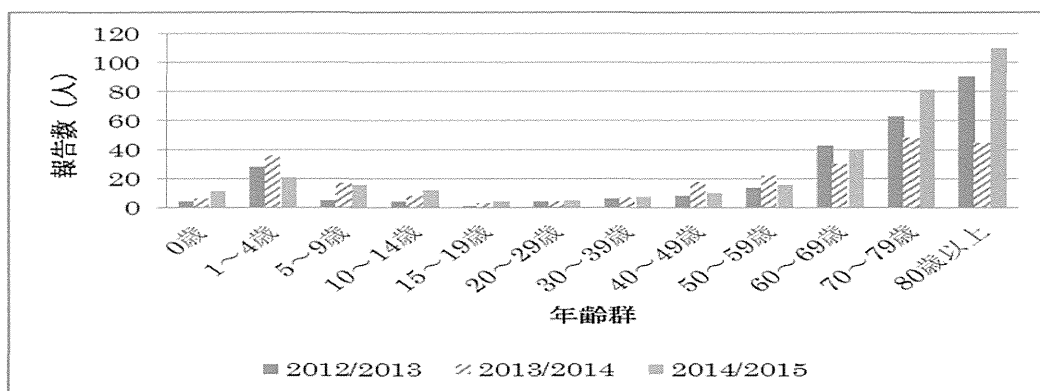


図5 年齢群別 ICU 入室患者報告数 (2012/2013～2014/2015 シーズン:2015年第8週まで；暫定値)

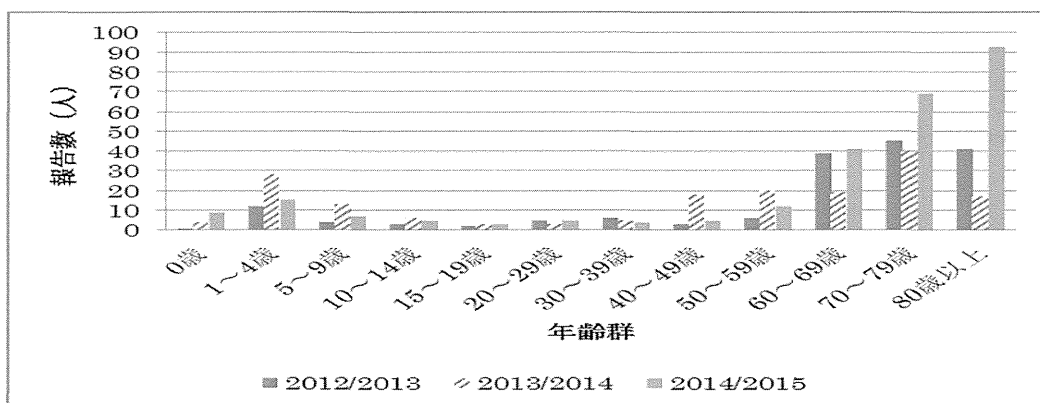


図6 年齢群別人工呼吸器利用患者報告数 (2012/2013～2014/2015 シーズン:2015年第8週まで；暫定値)

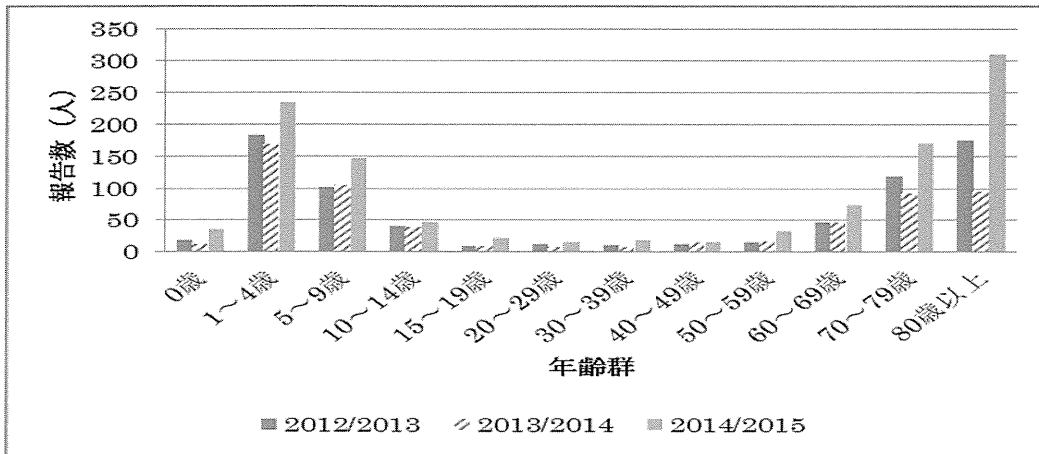


図.7 年齢群別頭部検査（CT、MRI、脳波）実施報告数（2012/2013～2014/2015 シーズン:2015 年第 8 週まで；暫定値）

インフルエンザ脳症の診断および治療に関する研究

研究分担者 奥村彰久 愛知医科大学医学部小児科・教授

研究要旨

インフルエンザ脳症は軽症のものから重症のものまで幅広く、その病態は多様である。したがって、その診断・および治療についても多角的に検討する必要がある。我々は3つの研究を並行して行った。インフルエンザ脳症の実態調査では、過去5年間のインフルエンザ脳症の臨床像は従来と大きな変化がないことを確認できた。また、死亡例では急激な症状の悪化が共通していた。抗神経抗体の検出法の検討では、凍結ラット脳切片を用いた免疫染色と培養ラットニューロンを用いた免疫染色とが有用性が高いことが明らかになった。急性脳症のけいれんに対するホスフェニトインの効果の検討では、ホスフェニトインは有効率が高く有害事象が少ないことが明らかになり、急性脳症の治療の重要な選択肢になりえると思われた。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症は軽症のものから重症のものまで幅広く、その病態は多様である。したがって、その診断・および治療についても多角的に検討する必要がある。

インフルエンザ脳症は流行したインフルエンザウイルスの株によって臨床像が変化することが経験的に知られている。2009年にいわゆる新型インフルエンザ（FluA 2009pdm）が大流行し、そのためインフルエンザ脳症の臨床像が影響を受けた可能性がある。我々は、東海小児神経研究会に集積したデータを用いて09/10シーズン以降のインフルエンザ脳症の実態を調査した。

近年、急性脳炎・脳症における抗神経抗体の関与が注目されている。特に精神症状

が特徴的である辺縁系脳炎については、抗神経抗体が関与することが明らかになりつつある。抗神経抗体の検出法のスタンダードは、培養細胞に標的となる抗原分子を発現させてそれに対する抗体を検出する cell-based assay (CBA) である。しかし、CBA を実施できる施設は限られている。我々は、より簡便な方法により抗神経抗体の検出を試み、検出法間の相関を解析した。

急性脳症の治療においてけいれんの効果的な抑制は、興奮毒性による二次的な神経細胞障害を防ぎ神経学的予後を改善するために重要である。フェニトインは発作抑制効果が強力である上に意識状態への影響が少なく、急性脳症における発作抑制に適した薬剤である。しかし、血管外漏出による

壊死・静注時の血管痛/血管炎・結晶析出によるルート閉塞などのため、小児に対して使用し難い。ホスフェニトイン (fPHT) は、PHT のプロドラッグでこれらの問題が起きにくく、急性脳症のけいれんコントロールに有用と予想される。我々は、急性脳症に対し fPHT を使用した症例を集積し、その有効性と安全性とを検討した。

B. 研究方法

1. インフルエンザ脳症の実態調査

本研究は、東海小児神経研究会のデータベースに登録されている患者情報から、09/10 シーズンから 2013-14 シーズンまでの 5 シーズンに発生したインフルエンザ脳症のデータの提供を受けて検討した。東海小児神経研究会は、愛知県 4 大学小児科およびその関連病院が参加している急性脳炎・脳症の研究組織であり、毎年調査票を用いて急性脳炎・脳症の症例の登録を行っている。症例の妥当性については、毎年研究会を行って討論を行って検証している。

2. 抗神経抗体の検出法の検討

82 例の自己免疫性脳炎の可能性があると診断した症例について検討した。自己免疫性脳炎は以下の条件を満たしたものとした。1) 急性または亜急性の神経症状(精神症状、行動異常、けいれんなど)、2) 自己免疫反応の傍証(感染やワクチンが先行、免疫療法に反応が良好など)、3) 他の疾患の除外。対象の年齢は、中央値 8.7 歳(範囲、5 か月~16 歳)で、男女比は 44 : 38 であった。神経症状の発現から 6 か月以内の血清を用いて検討した。自己抗体は、premade membrane を用いた immunoblot (IB)、凍結ラット脳切片を用いた免疫染色 (IHC)、培養ラットニューロンを用いた免疫染色 (ICC) の 3 つの方法で検出を試みた。

3. 急性脳症のけいれんに対するホスフェニトインの効果

小児神経科医のメーリングリストである蔵王セミナーメーリングリスト用いて、症例の収集を行った。研究に協力を申し出た医師に、連結不可能匿名化を施した調査票を配布しその回答を依頼した。調査票の内容は、症例の臨床情報と fPHT 投与前後のけいれんの経過などである。fPHT の有効性は、著効：発作の消失、有効：発作回数・持続時間の減少、無効：これらに該当しない場合、として判定した。

(倫理面への配慮)

臨床情報は匿名化されて個人が特定できない状態で収集し、個人情報保護に努めた。全ての研究は倫理委員会の承認を得て施行した。

C. 研究結果

1. インフルエンザ脳症の実態調査

5 シーズンでインフルエンザ脳症と診断された症例は 35 例であった。男女比は 20 : 15 で、発症時年齢は中央値 51 か月であった。基礎疾患を認めたのは 8 例であった。原因となったウイルスは、A 型 25 例、B 型 9 例、型不明 1 例であった。脳症のサブタイプは急性壊死性脳症 (ANE) 1 例、二相性脳症 (AESD) 5 例、膨大部病変を伴う脳症 (MERS) 11 例、出血性ショック脳症症候群 (HSES) 2 例、辺縁系脳炎 1 例、その他 15 例であった。転帰は、後障害なし 22 例、後障害あり 9 例、死亡 4 例であった。

シーズンごとの症例数は 4~9 例であり、シーズンによる差は少なかった。発症年齢、脳症のサブタイプ、および転帰についてもシーズンによる相違は明らかでなかった。これらのことから、過去 5 シーズンにおいては、インフルエンザ脳症の臨床像においてシーズンによる差は顕著でないと思われる。

た。

調査期間中の死亡例は 4 例であり、男女比は 1 : 3 であった。原因ウイルスは A 型 3 例、B 型 1 例であった。3 例は脳症の発症から半日以内に昏睡に陥っており、3 日以内に 3 例が死亡したことから、急激に神経症状および全身状態の悪化が進んだことが窺われた。入院時の検査値では一部に逸脱酵素の上昇などを認めるがその程度は重篤ではなく、入院時にその後の急速な増悪を予想することは困難であると思われた。

2. 抗神経抗体の検出法の検討

IB では、24 例で、正常対照では染色されないバンドが検出された。しかし、異なる患者において同じ位置に出現するバンドが、同一の標的分子に対応するかどうかは不明である。IHC では、46 例で陽性であった。核が染色されたのは 33 例で、ニューロンだけでなくグリアや血管内皮も染色され、非特異的な所見の可能性もある。細胞質が染色されたのは 13 例で、特に海馬のニューロンで著明であった。ニューロピルが染色されたのは 12 例で、分子層に特異的に染色された。このうち 5 例は、抗体検出のスタンダードである CBA で抗 NMDAR 抗体陽性であった。ICC では、51 例で陽性であった。染色された部位は、核 31 例、細胞質 21 例、樹状突起 8 例であった。樹状突起が染色された 5 例は、CBA で抗 NMDAR 抗体陽性であった。これらの 3 つの方法の間の相関を解析したところ IHC と ICC との相関は良好であったが、IB は他の方法との相関がなかった。

3. 急性脳症のけいれんに対するホストインの効果

38 例 48 投与機会のデータを集積した。男女比は 23 : 15 で、年齢の中央値は 22 か月であった。二相性脳症が 17 例 26 機会、

その他の脳炎・脳症が 21 例 22 機会であった。fPHT の前に使用した薬剤は、ミダゾラムが 22 機会以最も多く、次いでジアゼパムが 17 機会に使用されていた。

fPHT の効果は、著効が 29 機会、有効が 11 機会、無効が 8 機会であり、投与機会あたりの有効率は 83% であった。二相性脳症における投与機会あたりの有効率は 81%、その他の脳炎・脳症では 86% であり、fPHT の有効性は脳症のタイプによる差を認めなかった。

有害事象は、口部ジスキネジア 1 例、意識レベル低下 1 例、血圧低下および不整脈 1 例であり、ほとんどの症例で問題なく使用することができた。また、投与経路にかかわらずルート閉塞をきたした症例は皆無であった。

D. 考察

1. インフルエンザ脳症の実態調査

今回の研究では、愛知県を中心とする東海地方においては、過去 5 シーズンにおいては急性脳症の臨床像にはシーズンによる相違は明らかでなかった。この理由の一つは、09/10 シーズンの Fl uA 2009pdm の大流行以降は、インフルエンザ流行株に著しい変化がなかったことが挙げられる。また、Fl uA 2009pdm 流行時に発生した急性脳症も、他の型の流行に伴ったものと比べて重症であったという知見はない。したがって、過去 5 シーズンのインフルエンザ脳症の臨床像は、従来の報告と概ね一致していると思われる。

過去 5 シーズンにおけるインフルエンザ脳症の死亡例は 4 例であった。以前の報告と同様にこれらの症例は発症後に急激な神経症状や全身症状の増悪を認めているのが特徴的であった。一方、入院時の検査所見は異常を認めても高度なものではなく、その時点で重篤な予後を予測するのは困難で

あった。我々のFluA 2009pdmに伴う死亡例の調査でも、急性脳症の死亡例は極めて進行が速く治療の困難さが明らかであった。今後はこのような症例の予測と効果的な治療法の検討が必要であると思われる。

2. 抗神経抗体の検出法の検討

我々の研究の結果から、抗神経抗体の検出頻度はその方法によって異なることが明らかになった。組織や細胞を用いた手法では細胞のどの部位が染色されるかが重要であり、非特異的な所見と有意な所見との区別が必要である。IHCにおけるニューロピルの染色とICGにおける樹状突起の染色とはよく相関があり、またCBAによる抗NMDAR抗体との相関も認められたため、抗神経抗体を捕捉したと考えられる。このような知見の蓄積が今後必要である。

3. 急性脳症のけいれんに対するホストインの効果

急性脳症の急性期にはけいれんが高率に出現し、しかもその抑制は困難であることは稀でない。今回の調査では、fPHTの有効率は80%以上と極めて高い有効性を示した。さらに、脳症のタイプによる有効性の差を認めなかった点も注目される。したがって、fPHTの有効性は高く急性脳症のけいれんに対し選択すべき薬剤であるといえる。ミダゾラムやフェノバルビタールはある程度以上の投与量で使用すれば意識レベルに影響が出ることが多く、意識状態をモニタリングする必要がある急性脳症の治療においては不都合である。これに対し、fPHTは意識状態への影響が小さい。我々の調査ではfPHTによる過鎮静や意識レベルの低下を認めた症例はほとんどなく、この点もfPHTの重要な利点である。また、fPHT投与に伴う有害事象は頻度が低く、軽症のものであった。したがって、急性脳症の治療において

fPHTは安全性が高い薬剤であるといえる。さらに、PHTではしばしば治療の障壁となっていたルート閉塞がfPHTでは皆無であったことも注目される。これらの事からfPHTは安全性や利便性も高い薬剤であると思われる。

E. 結論

09/10シーズン以降の5シーズンで35例のインフルエンザ脳症が発生した。年齢の中央値は65か月で、基礎疾患を持つ児が23%であった。サブタイプの中ではMERSが11例で最多であった。死亡は4例で、後障害を9例に認めた。死亡例は、サブタイプ分類が困難な例が多かった。急激に意識障害と多臓器不全が進行していた。

抗神経抗体の検出頻度はその方法によって異なった。組織や細胞を用いた手法では細胞のどの部位が染色されるかが重要である。ニューロピルの染色と樹状突起の染色とはよく相関があり、また抗NMDAR抗体との相関も認められたため、抗神経抗体を捕捉したと考えられる。このような知見の蓄積が今後必要である。

急性脳症のけいれんに対し、fPHTは脳症のタイプにかかわらず高い有効性を示した。また、有害事象も低頻度で軽症であり、ルート閉塞を起こさず利便性も高い。これらのことからfPHTは急性脳症のけいれんの治療に選択すべき薬剤であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okumura A, Tsuji T, Kubota T, Ando N, Kobayashi S, Kato T, Natsume J, Hayakawa F, Shimizu T. Acute encephalopathy with 2009 pandemic flu: Comparison with seasonal flu. *Brain Dev* 2012; 34(1): 13-19.

- Okumura A, Uematsu M, Imataka G, Tanaka M, Okanishi T, Kubota T, Sudo A, Tohyama J, Tsuji M, Ohmori I, Naiki M, Hiraiwa-Sofue A, Sato H, Saitoh S, Shimizu T. Acute encephalopathy in children with Dravet syndrome. *Epilepsia* 2012; 53(1): 79–86.
- Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi J, Nagata R, Okumura A, Kashii H, Tomita S, Kumada S, Kubota M. Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *Brain Dev* 2012; 34(2): 124–127
- Oikawa N, Okumura A, Oyama S, Baba H, Shimizu T, Kato A. A 15-month-old boy with reduced consciousness and convulsion. *J Clin Virol* 2012; 53(4): 276–279.
- Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi J, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev* 2012; 34(5): 337–343.
- Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci* 2012; 320(1–2): 145–148.
- Hayashi N, Okumura A, Kubota T, Tsuji T, Kidokoro H, Fukasawa T, Hayakawa F, Ando N, Natsume J. Prognostic factors in acute encephalopathy with reduced subcortical diffusion. *Brain Dev* 2012; 34(8): 632–639.
- Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Natsume J. Transient reduced diffusion in the cortex in a child with prolonged febrile seizures. *Brain Dev* 2012; 34(9): 773–775.
- Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; collaborating study group on influenza-associated encephalopathy in Japan. National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children. *J Med Virol* 2012; 84(8): 1151–1156.
- Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; The Collaborating Study Group On Influenza-Associated Encephalopathy In Japan. Treatment of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children. *Scand J Infect Dis* 2012; 44(12): 941–947.
- Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Morichi S, Muguruma T, Saito O, Fujimoto JI, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. *J Clin Virol* 2013; 56(1): 25–30.
- Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Unexpected cardiopulmonary

arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respi Viruses* 2013; 7(5): 759–760.

Igarashi A, Okumura A, Kitamura Y, Jinbo K, Akatsuka S, Tanuma N, Shimizu T, Hayashi M. Acute limbic encephalitis with focal hyperperfusion on single photon emission computed tomography. *Brain Dev* 2013; 35(2): 181–184.

Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human herpesvirus 6-associated encephalopathy in a child with Dravet syndrome. *Neuropediatrics* 2013; 44(3): 155–158.

Nakazawa M, Okumura A, Niiijima S, Yamashita S, Shimono K, Hirose S, Shimizu T. Oral mexiletine for lidocaine-responsive neonatal epilepsy. *Brain Dev* 2013; 35(7): 667–669.

Nakano T, Okumura A, Tanabe T, Niwa S, Fukushima M, Yonemochi R, Eda H, Tsutsumi H. Safety evaluation of laninamivir octanoate hydrate through analysis of adverse events reported during early post-marketing phase vigilance. *Scand J Infect Dis* 2013; 45(6): 469–477.

Suganuma H, Okumura A, Kitamura Y, Shoji H, Shimizu T. Effect of hypoxic-ischemic insults on the composition of fatty acids in the brain of neonatal rats. *Ann Nutr Metab* 2013; 62(2): 123–128.

Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T,

Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori A, Yamasaki M, Kumakura A, Sugo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saito H. Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 2013; 73(1): 48–57.

Kubota T, Fukasawa T, Kitamura E, Magota M, Kato Y, Natsume J, Okumura A. Epileptic seizures induced by dexmedetomidine in a neonate. *Brain Dev* 2013; 35(4): 360–362.

Kidokoro H, Kubota T, Hayakawa M, Kato Y, Okumura A. Neonatal seizure identification on reduced channel EEG. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2013; 98(4): F359–361.

Niizuma T, Okumura A, Kinoshita K, Shimizu T. Acute encephalopathy associated with human metapneumovirus infection. *Jpn J Infect Dis* 2014; 67(3): 213–215.

Takanashi J, Taneichi H, Misaki T, Yahata Y, Okumura A, Ishida Y, Miyawaki T, Okabe N, Sata T, Mizuguchi M. Clinical and radiologic features of encephalopathy during 2011 E coli O111 outbreak in Japan. *Neurology* 2014; 82(7): 564–572.

Kato T, Tsuji T, Hayakawa F, Kubota T, Kidokoro H, Natsume J, Watanabe K, Okumura A. A new electroencephalogram classification with reduced recording

time in asphyxiated term infants. *Brain Dev* 2014; 36: 372-379.

Tsuji T, Okumura A, Kidokoro H, Hayakawa F, Kubota T, Maruyama K, Kato T, Oshiro M, Hayakawa M, Watanabe K. Differences between periventricular hemorrhagic infarction and periventricular leukomalacia. *Brain Dev* 2014; 36(7):555-562.

Ando N, Okumura A, Kobayashi S, Negishi Y, Hattori A, Okanishi T, Abe S, Ikeno M, Igarashi A, Saitoh S, Shimizu T. Fulminant encephalopathy with marked brain edema and bilateral thalamic lesions. *Neuropediatrics* 2014; 45(4): 256-260.

Natsume J, Maeda N, Itomi K, Kidokoro H, Ishihara N, Takada H, Okumura A, Kubota T, Miura K, Aso K, Morikawa T, Kato K, Negoro T, Watanabe K. PET in Infancy Predicts Long-Term Outcome during Adolescence in Cryptogenic West Syndrome. *Am J Neuroradiol* 2014; 35(8):1580-1585.

Tanuma N, Miyata R, Nakajima K, Okumura A, Kubota M, Hamano S, Hayashi M. Changes in Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Human Herpesvirus-6-Associated Acute Encephalopathy/Febrile Seizures. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 564091.

Igarashi A, Okumura A, Komatsu M, Tomita O, Abe S, Ikeno M, Saito M, Nakazawa T, Shimizu T. Amplitude-integrated EEG revealed nonconvulsive status epilepticus in children with non-accidental head injury. *Eur J*

Paediatr Neurol 2014; 18(6): 806-810.

Kurahashi N, Tsuji T, Kato T, Ogaya S, Umemura A, Yamada K, Kurahashi H, Maruyama K, Takeuchi T, Kubota T, Saitoh S, Natsume J, Okumura A. Thalamic lesions in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Pediatr Neurol* 2014; 51(5): 701-705.

Nakazawa M, Akasaka M, Hasegawa T, Suzuki T, Shima T, Takanashi JI, Yamamoto A, Ishidou Y, Kikuchi K, Niijima S, Shimizu T, Okumura A. Efficacy and safety of fosphenytoin for acute encephalopathy in children. *Brain Dev* 2014 in press.

2. 学会発表

Akihisa Okumura, Tetsuo Kubota, Motomasa Suzuki, Tatsuya Fukazawa, Shinpei Abe, Mitsuru Ikeno, Mariko Hosozawa, Toshiaki Shimizu, Masaharu Hayashi. Autoimmune Encephalitis Proven by Immunohistochemical Study. 第54回日本小児神経学会総会、札幌、2012.5.17

Akihisa Okumura. Neonatal EEG in determining risk to the preterm brain. Joint congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Brisbane, Australia, 2012.6.1.

奥村彰久、池野充、久田研、東海林宏道、清水俊明. TUBA1A 変異による滑脳症・脳室拡大・小脳低形成の1剖検例. 第48回日本周産期・新生児医学会学術集会、さいたま、2012.7.10.

奥村彰久. 新生児および乳幼児の発作— aEEGによる評価—. 第46回日本てんかん学会、東京、2012.10.10.

Akihisa Okumura, Keiko Shimojima, Tetsuo Kubota, Shinpei Abe, Shintaro Yamashita, Katsumi Imai, Tohru Okanishi, Hideo Enoki, Tatsuya Fukasawa, Takuya Tanabe, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki Yamamoto. PRRT2 Mutation in Japanese Children with Benign Infantile Epilepsy. 第46回日本てんかん学会、東京、2012.10.11.

奥村彰久. Hemorrhagic shock andencephalopathy. 第595回日本小児科学会東京都地方会講話会、東京、2012.10.13.

奥村彰久. 新生児発作の神経画像所見. 第7回小児神経放射線研究会、京都、2012.10.27.

奥村彰久. 小児急性脳症の脳波. 第17回日本神経感染症学会総会、京都、2012.10.19.

奥村彰久. 新生児および小児における amplitude-integrated EEG の臨床応用. 第42回日本臨床神経生理学会・学術大会、東京、2012.11.10.

Akihisa Okumura, Keiko Shimojima, Tetsuo Kubota, Shinpei Abe, Shintaro Yamashita, Katsumi Imai, Tohru Okanishi, Hideo Enoki, Tatsuya Fukasawa, Takuya Tanabe, Shino Shimada, Leanne M Dibbens, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki Yamamoto. PRRT2 Mutation in Japanese Children with Benign Infantile Epilepsy. The 16th Annual Meeting of American Epilepsy Society, San Diego, CA, USA, 2012.12.2.

Akihisa Okumura. Invited lecture: Proposal of semiological categorization of neonatal seizures. The 15th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, Tokyo, Japan, 2013.4.13.

奥村彰久、中川聡、河島尚志、清水俊明、近藤直実、森島恒雄、新型インフルエンザ死亡例調査グループ. インフルエンザに伴う予期せぬ心肺停止:パンデミック2009小児死亡例の実態調査から. 第116回日本小児科学会学術集会、広島、2013.4.20

Akihisa Okumura. Current Clinical Approach to Neonatal Seizures. Pediatric Academic Societies 2013 Annual Meeting, Washington DC, USA, 2013.5.4.

Akihisa Okumura. EEG in term babies. Joint Scientific Meeting of 9th Asian Society of Pediatric Research Congress and 20th Malaysia Society of Pediatrics Annual Congress, Kuching, Malaysia, 2013.5.9.

Akihisa Okumura. EEG in preterm babies. Joint Scientific Meeting of 9th Asian Society of Pediatric Research Congress and 20th Malaysia Society of Pediatrics Annual Congress, Kuching, Malaysia, 2013.5.9.

Akihisa Okumura. Neonatal Seizures. Diagonosis and treatment based on EEG. Joint Scientific Meeting of 9th Asian Society of Pediatric Research Congress and 20th Malaysia Society of Pediatrics Annual Congress, Kuching, Malaysia, 2013.5.11.

Akihisa Okumura, Masaharu Hayashi, Keiko Shimojima, Mitsuru Ikeno, Shinpei Abe, Jun-ichi Takanashi, Nobuhiko Okamoto, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki Yamamoto. Whole-exome sequencing identifies FLNB variant in a unique brain malformation. 第 55 回小児神経学会総会、大分、2013. 5. 30.

奥村彰久. 新生児脳障害と中枢神経モニタリング. 第 55 回小児神経学会総会、大分、2013. 5. 31.

奥村彰久. 急性脳症をいかに理解するか : 今後の研究アプローチ 2. 脳波・aEEG 第 55 回小児神経学会総会、大分、2013. 6. 1.

Akihisa Okumura, Mika Nakazawa, Shinpei Abe, Toshiaki Shimizu. Attitude toward Epilepsy after Media Coverage of Car Accidents Related to Persons with Epilepsy in Japan. 30th International Epilepsy Congress, Montreal, Canada, 2013. 6. 24.

奥村彰久、池野充、久田研、東海林宏道、清水俊明. 新生児発作に対するホスフェニトインの使用経験. 第 49 回日本周産期・新生児医学会学術集会、横浜、2013. 7. 15.

Akihisa Okumura, Mika Nakazawa, Shinpei Abe, Toshiaki Shimizu. Attitude toward Epilepsy after Media Coverage of Car Accidents Related to Persons with Epilepsy in Japan. 第 47 回日本てんかん学会学術集会、北九州、2013. 10. 11.

奥村彰久. 新生児の脳機能研究 第 43 回日本臨床神経生理学会、高知、2013. 11. 8.

奥村彰久、池野充、北村知宏、森真理、久田研、東海林宏道、清水俊明. 母体 IgM 抗体陰性であった先天性サイトメガロウイルス感染症. 第 58 回日本未熟児新生児学会、金沢、2013. 12. 1

五十嵐鮎子, 奥村彰久, 安部信平, 池野充, 山城雄一郎, 清水俊明. 抗アクアポリン 4 抗体陽性であった急性散在性脳脊髄炎の一例. 第 116 回日本小児科学会学術集会、名古屋、2014. 4. 13.

城所博之, 奥村彰久, 辻健史, 久保田哲夫, 安藤直樹, 伊藤祐史, 小川千香子, 山本啓之, 石原尚子, 加藤徹, 早川文雄, 齋藤伸治, 夏目淳. 新生児単純ヘルペス脳炎における脳病変の局在. 第 56 回小児神経学会総会、浜松、2014. 5. 29.

大野敦子, 鈴木基正, 糸見和也, 辻健史, 久保田哲夫, 奥村彰久, 安藤直樹, 齋藤伸治, 夏目淳. 病初期に後頭部皮質優位に病変を呈し、その後 Bright Tree Appearance を示した 3 症例. 第 56 回小児神経学会総会、浜松、2014. 5. 29.

中澤美賀, 奥村彰久, 赤坂真奈美, 長谷川毅, 鈴木智典, 嶋泰樹, 高梨潤一, 山本敦子, 石堂雄毅, 菊池健二郎, 新島新一, 清水俊明. 急性脳炎・脳症の発作に対するホスフェニトインの有効性. 第 56 回小児神経学会総会、浜松、2014. 5. 29.

星野愛, 齋藤真木子, 久保田雅也, 高梨潤一, 豊島光雄, 宮本晶恵, 奥村彰久, 水口雅. 急性壊死性脳症における遺伝的素因 HLA タイピング及びサイトカイン遺伝子多型解析(第 2 報). 第 56 回小児神経学会総会、浜松、2014. 5. 29.

中原絵理, 佐久間啓, 林雅晴, 鈴木智典, 清水俊明, 奥村彰久. 疫学的解析から推定される基底核脳炎の多様性(第一報). 第56回小児神経学会総会、浜松、2014. 5. 29.

堀いくみ, 根岸豊, 服部文子, 安藤直樹, 早川文雄, 辻健史, 久保田哲夫, 奥村彰久, 夏目淳, 齋藤伸治. 重症・劇症型脳症の臨床的検討. 第56回小児神経学会総会、浜松、2014. 5. 30.

石渡久子, 神山潤, 中島啓介, 奥村彰久. 可逆性脳梁膨大部病変を伴う軽症脳炎・脳症(MERS)に小脳炎を合併し、小脳症状が遷延した1例. 第56回小児神経学会総会、浜松、2014. 5. 30.

奥村彰久. 小児の脳炎・脳症: 最近の話題. 第311回日本小児科学会北陸地方会・第9回日本小児科学会福井地方会、福井、2014. 6. 8.

Akihisa Okumura, Atsushi Ishii, Mutsuki

Shioda, Hiroyuki Kidokoro, Masako Sakauchi, Shino Shimada, Toshiaki Shimizu, Makiko Osawa, Shinichi Hirose, Toshiyuki Yamamoto. A Recurrent KCNT1 Mutation in Two Sporadic Cases with Migrating Partial Seizures. The joint congress of the 16th annual meeting of Infantile Seizure Society and the 16th annual congress of the Turkish Child Neurology Association, Cappadocia, Turkey, 2014. 6. 24.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

喘息モデルマウスを用いた A(H1N1)pdm09 感染による 気管支喘息重症化の病態解析

研究分担者 長谷川俊史 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・准教授
研究協力者 大賀正一 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・教授
松重武志 山口大学医学部附属病院・講師
脇口宏之 山口大学医学部附属病院・診療助教
岡田清吾 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・助教
市山高志 鼓ヶ浦こども医療福祉センター・副院長

研究要旨

【目的】 2009 年世界的に流行した新型インフルエンザ (A(H1N1)pdm09) は季節性に比し呼吸器合併症が多く、当科においても喘息症例での重症化が多くみられたが、その病態はいまだ明らかでない。本研究ではその病態解明のため、A(H1N1)pdm09 感染喘息マウスの気管支肺胞洗浄液 (BAL) を解析した。

【方法】 Balb/c マウスを用いて喘息モデルマウスを作製し、A(H1N1)pdm09 および季節性インフルエンザを経鼻感染させ、感染後 3 日および 7 日に BAL を回収した。BAL 中炎症細胞浸潤、サイトカイン濃度およびウイルス力価について検討した。

【結果】 A(H1N1)pdm09 感染では季節性と異なって感染後 3 日および 7 日ともに非喘息マウスに比し、喘息マウスで BAL 中 IL-6 および TNF- α の濃度が有意に高値であった。IFN- γ 濃度は 3 日では有意に高値であったが、7 日では有意に低値であった。BAL 中ウイルス力価は喘息マウスで非喘息マウスに比し有意に高値だった。

【結論】 A(H1N1)pdm09 感染は季節性と異なって喘息マウスの肺において感染後早期から、より高いサイトカイン産生およびウイルス増殖を示し、強い炎症を惹起し、呼吸器症状を重篤化させている可能性が示唆された

A. 研究目的

2009 年に世界的に大流行した新型インフルエンザ (A(H1N1)pdm09) 感染では呼吸器症状を主訴に受診する患者が多く、ときに致命的になる。気管支喘息がその増悪因子の一つと考えられているが、その病態の詳細については未だ不明である。分担者らが当科に入院した A(H1N1)pdm09 感染入院症例について後方視的に検討したところ、季節性インフルエンザに比し、有意に喘息発

作、肺炎や無気肺などの肺合併症が多く、また通常の喘息発作症例に比し、高率に重篤な気管支喘息発作を合併したことを報告した。しかしその病態は十分解明されておらず、予防法もまだ確立されていない。

本研究では病態解明のため A(H1N1)pdm09 および季節性インフルエンザ感染における喘息マウスの気管支肺胞洗浄液 (BAL) を解析した。

B. 研究方法

卵白アルブミン (OVA) で喘息モデルマウス (BALB/c) を作製し, A(H1N1)pdm09 および季節性ウイルス (A/H1N1/Yamagata, A/H1N1/Puerto Rico) (いずれもマウス馴化株, 国立感染症研究所から分与) を経鼻感染 (1×10^5 pfu/マウス) させ, 感染後 3 日および 7 日に BAL を回収した. BAL 中炎症細胞浸潤, サイトカイン濃度およびウイルス力価を測定し, 喘息マウスと非喘息マウスの差異について比較検討する.

(倫理面への配慮)

本研究では培養細胞およびマウスを使用する. マウスの感染実験に関しては敷地内に動物実験施設があり, 研究を行っていく上で同施設内の倫理的かつ技術的な講習を受講し, 研究計画審査を受け, 承認を得たあと本研究を遂行した.

C. 研究結果

A(H1N1)pdm09 感染後 3 日および 7 日において季節性と異なって, 喘息マウスでは非喘息マウスに比して BAL 中 interleukin (IL)-6 が有意に高値であった (図 1, 2). Tumor necrosis factor (TNF)- α (感染後 3 日および 7 日) および IL-10 (感染後 7 日) も同様の結果であった. 一方感染後 3 日の interferon (IFN)- γ 濃度は喘息マウスで有意に高値であったが (図 3), 感染後 7 日では有意に低値であった (図 4). またウイルス力価は喘息マウスで非喘息マウスに比して感染後 3 日, 7 日ともに有意に高値であった (図 5, 6). また A(H1N1)pdm09 感染喘息マウスでは季節性に比して, NK 細胞, CD8⁺T 細胞の細胞性免疫の活性化誘導が弱く, 感染後早期から気管支喘息重症化の病態に関与している可能性も示唆された.

D. 考察

以上の結果から A(H1N1)pdm09 感染喘息マウスでは感染非喘息マウスに比し, 季節性とは異なって肺においてサイトカイン産生およびウイルス増殖が高く, 強い炎症が惹起されていることが示唆された. 当初は A(H1N1)pdm09 感染喘息モデルマウスでは感染非喘息マウスに比し, 肺において Th1 細胞活性化低下により強い炎症が惹起されることを推測していたが, A(H1N1)pdm09 感染後 3 日においては喘息マウスで非喘息マウスに比し, 有意に IFN- γ 濃度が高値であることから感染後 7 日の IFN- γ 濃度の低値は既に急性期をすぎた結果である可能性が示唆された. 今後更なる病態解明が必要である.

E. 結論

A(H1N1)pdm09 感染は季節性と異なって喘息モデルマウスでは非喘息マウスに比して, 肺において感染後早期から, より高いサイトカイン産生およびウイルス増殖を示し, 強い炎症を惹起し, 呼吸器症状を重篤化させている可能性が示唆された.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuroda M, Hasegawa S, et al. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep*. 2015; in press.
2. Wakiguchi H, Hasegawa S, et al. The relationship between T cell HLA-DR expression and intravenous immunoglobulin treatment response in Kawasaki disease. *Pediatr Res*. 2014; in press.
3. Hasegawa S, et al. A nationwide survey of opsoclonus-myooclonus syndrome in Japanese children. *Brain Dev*. 2014; in press.

4. Okada S, Hasegawa S, et al. Acute pericardial effusion representing the TNF- α -mediated severe inflammation but not the coronary artery outcome of Kawasaki disease. *Scand J Rheumatol*. 2014; 29:1-6.
5. Kittaka S, Hasegawa S, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in human herpesvirus-6-infected infants with or without febrile seizures. *J Infect Chemother*. 2014; 20: 716-21
6. Hasegawa S, et al. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine*. 2014, 69; 206-210.
7. Inamura N, Hasegawa S, et al. Management of refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia: Utility of measuring serum lactate dehydrogenase level. *J Infect Chemother*. 2014; 20: 270-3.
8. Takahashi K, Hasegawa S, et al. Serum tau protein level serves as a predictive factor for neurological prognosis in neonatal asphyxia. *Brain Dev*. 2014, 36: 670-5.
9. Hasegawa S, et al. Serum and cerebrospinal fluid levels of visinin-like protein-1 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev*. 2014, 36: 608-12.
10. Momonaka H, Hasegawa S, et al. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2014; 36: 484-8.
11. Okada S, Hasegawa S, et al. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013; 63: 194-200.
12. Hasegawa S, et al. Tau protein levels in children do not increase during severe asthma attack-induced hypoxic conditions. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014; 42: 83-5.
13. Oka M, Hasegawa S, et al. Tau protein concentrations in the cerebrospinal fluid of children with acute disseminated encephalomyelitis. *Brain Dev*. 2014; 36: 16-20.
14. Hasegawa S, et al. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; 35: 626-9.
15. Matsushige T, Hasegawa S, et al. Serum neurofilament concentrations in children with prolonged febrile seizures. *J Neurol Sci*. 2012; 132:290-4.
16. Kudo K, Hasegawa S, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits vascular cellular adhesion molecule-1 expression and interleukin-8 production in human coronary arterial endothelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012; 132:290-294.
17. Inoue H, Hasegawa S, et al. Elevation of tau protein levels in the cerebrospinal fluid of children with West syndrome. *Epilepsy Res*. 2012; 102:8-12.
18. Haneda Y, Hasegawa S, et al. Ovomucoids IgE is a better marker than egg white-specific IgE to diagnose boiled egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129: 1681-2.
19. Shimomura M, Hasegawa S, et al. Intravenous immunoglobulin does not increase Fc γ RIIB expression levels

on monocytes in children with immune thrombocytopenia. Clin Exp Immunol. 2012; 169: 33-7.

20. Hasegawa S, et al. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial endothelial cells. Clin Exp Immunol. 2012; 167: 269-74.
21. Tanaka N, Hasegawa S, et al. High-resolution computed tomography findings of influenza virus pneumonia: a comparative study between seasonal and novel (H1N1) influenza virus pneumonia. Jpn J Radiol. 2012; 30: 154-61.
22. Arakawa M, Hasegawa S, et al. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. J Med Microbiol. 2012; 61: 410-9.

図1 BAL 中 IL-6 濃度 (感染後 3 日)

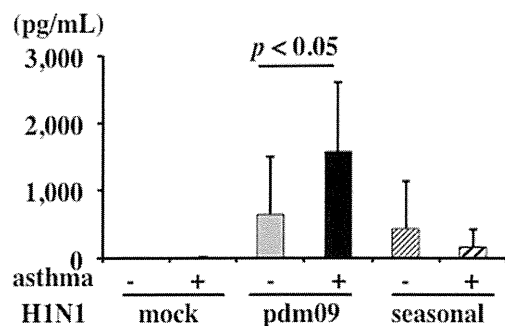


図2 BAL 中 IL-6 濃度 (感染後 7 日)

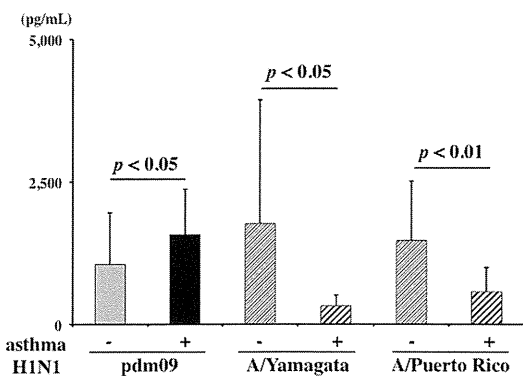


図3 BAL 中 IFN- γ 濃度 (感染後 3 日)

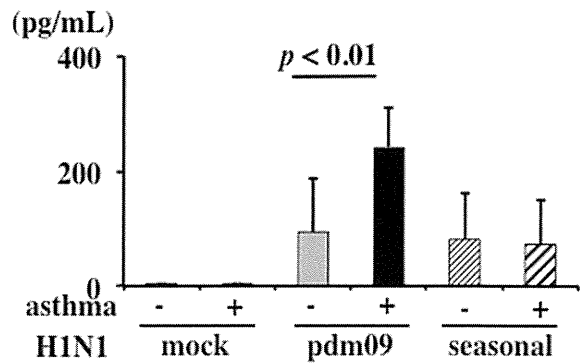


図4 BAL 中 IFN- γ (感染後 7 日)

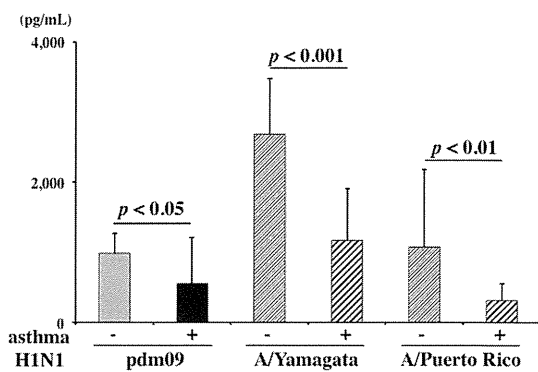


図5 BAL 中ウイルスカ価 (感染後 3 日)

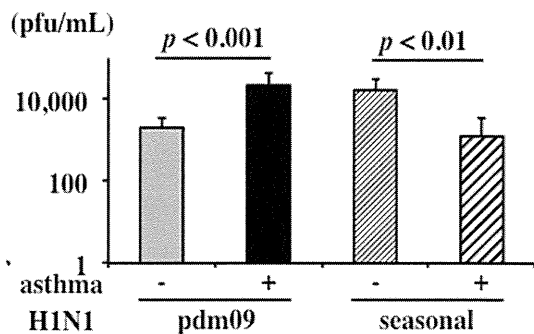
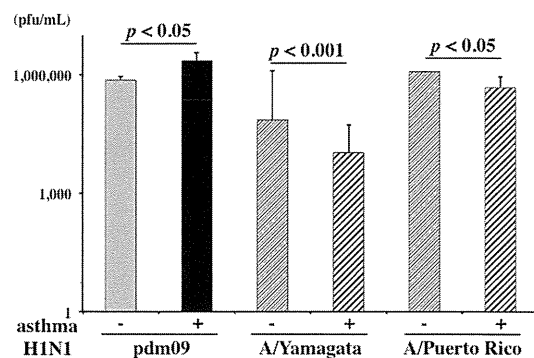


図6 BAL 中ウイルスカ価 (感染後 7 日)



「病態及び解析結果からみた重症インフルエンザ肺炎・脳症治療ガイドライン作成のための根拠収集」

研究分担者 河島 尚志〔東京医科大学小児科主任教授〕

協力研究者 山中 岳〔東京医科大学小児科講師〕

森地 振一郎〔東京医科大学小児科助教〕

研究要旨

①インフルエンザ H1N1pdm09 脳症の全国調査の解析により深昏睡（GCS8 点以下）での抗ウイルス薬の有用性が確認された。また、急性期 MRI は死亡例を除き予後推測に役立たなかった。②脳症を含む重症例におけるペラミビル投与・重症肺炎における APRV は治療に試すべき治療と考えられた。③神経栄養因子 BDNF は急性脳症群ではコントロール群と比較して血清・髄液ともに両群で上昇していた。また、一部の脳症の患者において HMGB1 の関与した病態を伴っていた。④脳症の疑い例を含む入院例の解析では、脳症確定群と否定群間で、髄液 IL-6、AST、ALT、CPK において有意差を認めたが、脳症確定群と脳症非確定群間で有意差はなかった。回復期の SPECT と MRI の併用により予後予測が可能であった。⑤電位依存性イオンチャンネルに関連した遺伝子変異も、急性脳症の予後不良因子の一つとして考えられた。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症治療ガイドライン改訂版が作成され、すでに 5 年以上が経過し、この間に H1N1 pdm 2009 の流行や各種薬剤の開発、特殊治療、画像解析など多くの変化があった。これらの結果を踏まえ、鳥インフルエンザを含めての新たなインフルエンザのパンデミックに対応できるガイドラインや指針を作成することが必要である。特に、重症例の病態解析・診断・治療の **blush up** が求められる。特に、病態解析や診断上における熱性けいれん複合型との鑑別は臨床で大きな問題となっている。

B. 研究方法

以下の点についての検討を行いガイドライン改訂のための検討を行った。

- ① H1N1pdm09 脳症における治療法の解析と急性期 MRI の検討
- ② 重症肺炎における APRV (airway pressure release ventilation) や脳症を含むインフルエンザ感染症におけるペラミビル投与の安全性や有効性の検討
- ③ 小児期中枢神経感染症、特に急性脳症における脳由来神経栄養因子 (BDNF) ・High-mobility group box 1 (HMGB1) からみた病態解析
- ④ 熱性けいれん複雑型と急性脳症の鑑別法の検討
- ⑤ てんかん性脳症と感染性急性脳症の類似点の検討

C. 研究結果

- ① H1N1pdm09 脳症脳症の全国調査をもとに解析を行い、深昏睡（GCS8 点以下）では抗ウイルス薬の有用性が確認された(表 1)。特殊治療は重症例に多く施行されていたため、解析不能であった。時間軸を整理しての MRI 画像解析では、48 時間以内の MRI は死亡例を除き予後推測に役立たなかった(図 1)。
- ② 重症肺炎における APRV の有用性を自験例と文献的調査を行い、治療指針に試すべき治療として入れるべきと考えられた。ペラミビル投与の有用性を示すエビデンスはないが、連日複数日重症例では投与が必要である。
- ③ BDNF は髄膜炎群と急性脳症群ではコントロール群と比較して血清・髄液ともに両群で上昇していた。起因ウイルス別では、血清・髄液 BDNF はインフルエンザ脳症群が他の群より有意に上昇していた。脳症のタイプ別で比較すると血清、特に髄液検体ではサイトカインストーム型が有意に上昇していた(図 2)。神経学的後遺症を呈した例は、BDNF が高値例に集中。興奮毒性型の神経学的後遺症の程度（PCPC）と髄液 BDNF は正の相関性を示した。IL-6 と BDNF の相関性は、血清・髄液検体ともに正の関係を示した。
- HMGB1 は血清中ではインフルエンザ脳症患児は一部の予後不良例で著増していた(図 3)。
- ④ 127 例の脳症多疑い例を含む入院症例を、脳症確定群、脳症非確定群、脳症否定群とわけて解析し、確定群と否定群間で、髄液 IL-6、AST、ALT、CPK において有意差を認めたが、非確定群と脳症否定群間、脳症確定群と脳症非確定群間で有意差はなかった。また、けいれん重責型において、予後不良群と、良好群を比較すると、性別、平均年齢、けいれんの持続時間に差はなかったが、髄液 IL-6、AST、ALT、CPK において、統計学的な有意差はないが、予後不良群が高値の傾向がみられた(表 2)。急性期の SPECT により複雑型熱性けいれんなどの良性疾患と鑑別することは困難であった。回復期 SPECT は MRI と併用することで急性脳症の長期予後予測に有用であった。
- ⑤ Dravet 症候群では、第 5 病日に拡散強調画像で bright tree appearance が認められ、両側視床にも高信号が認められた。サイトカインプロファイリングは BHT 前後の髄液において、Dravet 脳症、感染性急性脳症例ともに BHT を開始してから炎症性サイトカインの IL-6 の速やかな低下が、ケモカインの代表である IL-8 は緩徐に低下した。ケモカインである MCP-1 が感染性急性脳症では上昇していたが、Dravet 脳症例では上昇していなかった(図 4)。

D. 考案

治療法では、抗ウイルス薬を早期に使用することが推奨される。また、新規採用薬剤であるペラミビル投与は、重症例では複数日投与が必要であるが、今後のエビデンスを目標とした情報収集が必要である。また、MRI 画像を含めて早期の予後を推測する指標として、BDNF・HMGB1 測定や、脳症確定群、脳症非確定群、脳症否定群との鑑別に MRI 以外の他の検査の解析がまたれる。回復期の SPECT と MRI の併用により急性脳症の長期予後予測が可能であったが、急性期の SPECT では急性脳症と複雑型熱性けいれんなどと鑑別することは困難であ

った。熱性けいれん（複合型）において急性期に SPECT の異常が認められるとの報告があり、急性期の脳血流評価の難しさを示唆していた。

ヒトてんかんで見出される遺伝子異常のうち、電位依存性イオンチャンネルに関連した遺伝子変異は Dravet 症候群、熱性けいれんプラスなど多岐に報告されている。電位依存性ナトリウムチャンネル α サブユニット 1 型蛋白をコードする *SCN1A* 遺伝子では、重篤度の大きく異なる複数種のてんかんで既に 200 を超える数の疾患変異が報告されており頻度が高く、薬剤による中毒が起りやすいとされ、*SCN1A* 遺伝子異常をもつ急性脳症に対し抗けいれん薬や鎮静薬剤の使用法に慎重な検討が必要である。

E. 研究発表

論文発表

1: Yamamoto T, Mizoguchi Y, Kaneno H, Yamamoto K, Inoue Y, Kawashima H, Kase T, Shimotsuji T. Serum immunoglobulin G subclass levels and estimated clinical severity caused by possible influenza A (H1N1) pdm 2009 infection. *J Infect Chemother.* 2013 Oct;19(5):833-42.

2: Sakai E, Yamanaka G, Kawashima H, Morishima Y, Ishida Y, Oana S, Miyajima T, Shinohara M, Saitoh M, Mizuguchi M. A case of recurrent acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus with carnitine palmitoyltransferase II variation. *Neuropediatrics.* 2013;44(4):218-21

3: Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Unexpected cardiopulmonary

arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013;7(5):759-60.

4: Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Morichi S, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. *J Clin Virol.* 2013;56(1):25-30.

5: Morichi S, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Kawashima H. Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebrospinal fluid and plasma of children with meningitis and encephalitis/encephalopathy. *Int J Neurosci.* 2013;123(1):17-23.

6. Morichi S, Yamanaka G, Ishida Y, Oana S, Kashiwagi Y, Kawashima H. Brain-derived neurotrophic factor and interleukin-6 levels in the serum and cerebrospinal fluid of children with viral infection-induced encephalopathy. *Neurochem Res* 39(11):2143-2149, 2014

7. Kashiwagi Y, Kawashima H, Suzuki S, Nishimata S, Takekuma K, Hoshika A. Marked elevation of excitatory amino acids in cerebrospinal fluid obtained from patients with rotavirus-associated encephalopathy. *J Clin Lab Anal,* 2014 Aug 17. doi: 10.1002/jcla.21774, 2014

8. Ishida Y, Kawashima H, Morichi S, Yamanaka G, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T. Brain magnetic resonance imaging in acute phase of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children.