

図 1

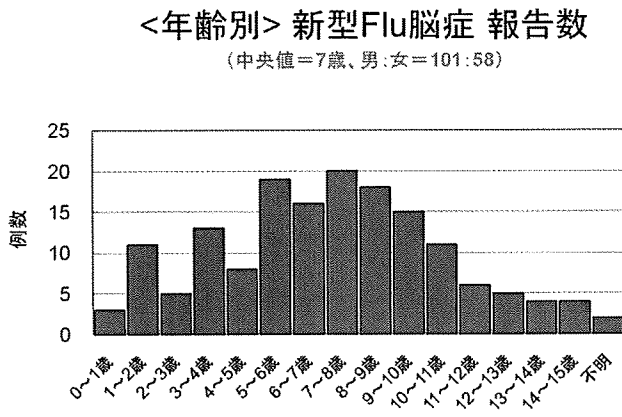


図 4

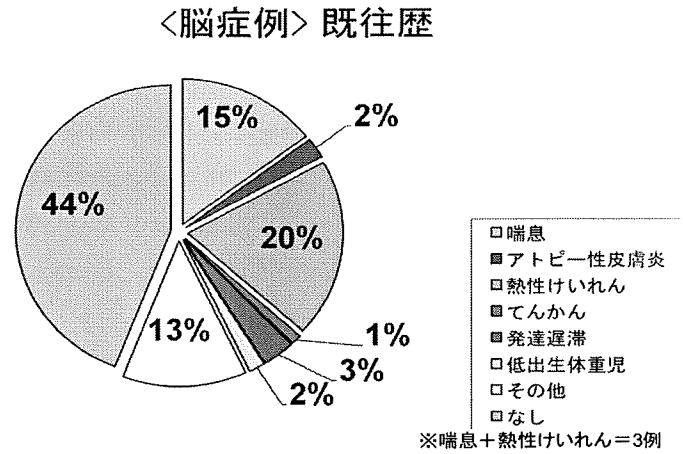


図 2

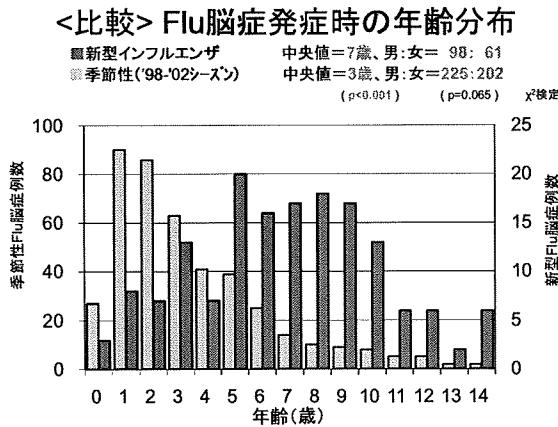


図 5

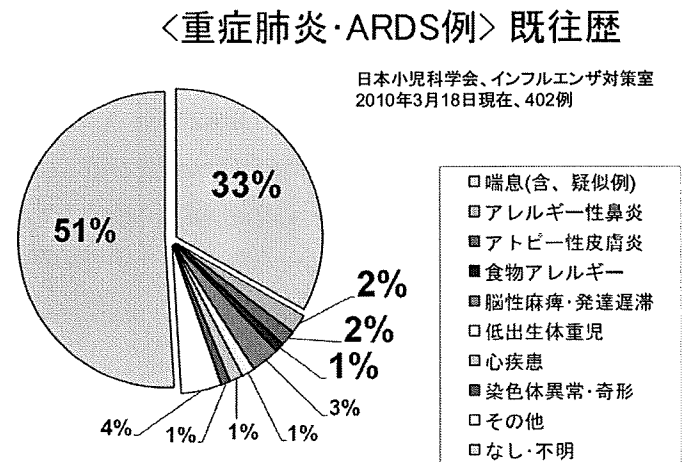


図 3

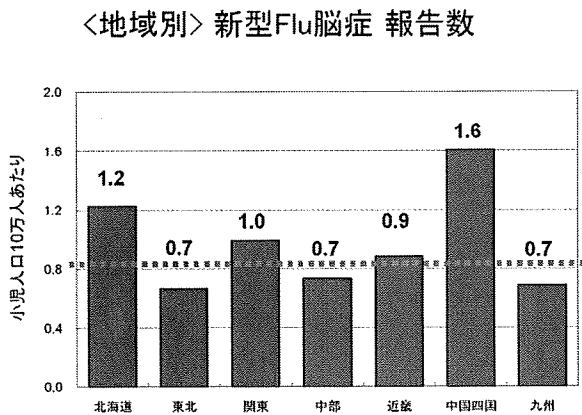


図 6

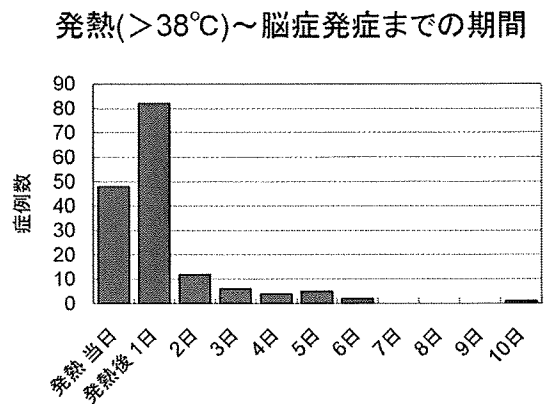


図 7

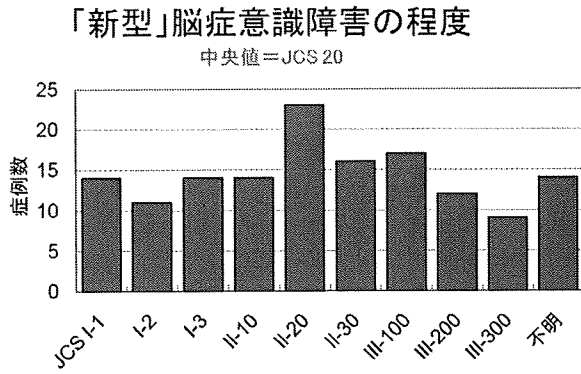


図 10

抗ウイルス薬の使用状況

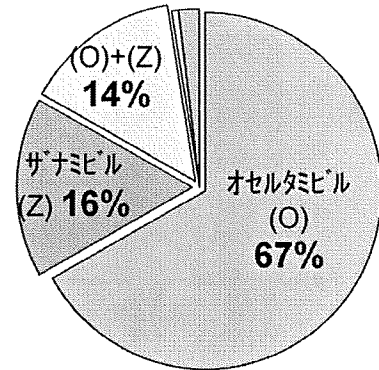


図 8

<比較> 脳症発症時の神経症状

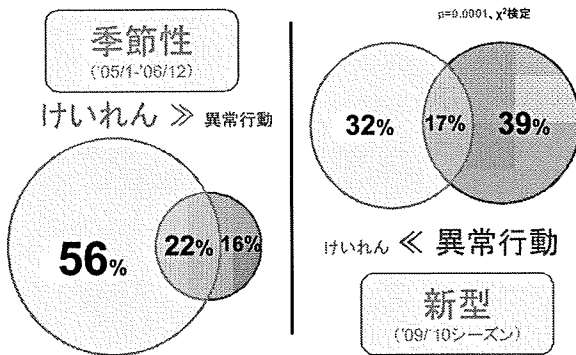


図 9

頭部MRI所見

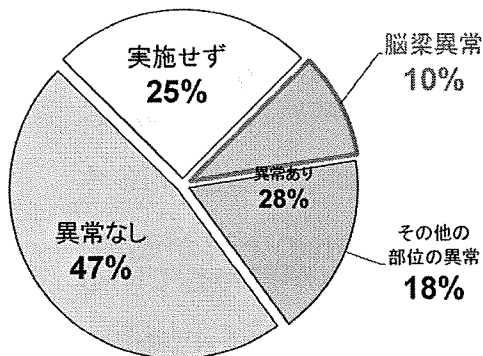


表 1

	症例数	(%)
死亡	6	(3.8)
後遺症なし	133	(83.1)
後遺症あり	23	(14.4)
知的障害 重度	4	(2.5)
知的障害 軽度	7	(4.4)
運動障害 寝たきり	5	(3.1)
運動障害 座位保持可	1	(0.6)
運動障害 独歩可	4	(2.5)
てんかん	5	(3.1)
その他 (※)	6	(3.8)
転帰不明	1	(0.6)

※ 頭痛・不安・落ち着きのなさ、解離性障害(傾眠・情緒不安定・幼児化)、精神病症状(幻覚・妄想)、発語障害、高次脳機能障害、性格変化

表 2

後遺症あり群(n=23)の内訳

	後遺症あり (n=23)	知的障害				合計
		重度	軽度	なし	不明	
運動障害	寝たきり	4	1	0	0	5
	座位保持可	0	1	0	0	1
	独歩可	0	3	0	1	4
	なし	0	2	8	1	11
	不明	0	0	0	2	2
合計		4	7	8	4	23

図11. 脳症発症時の年齢

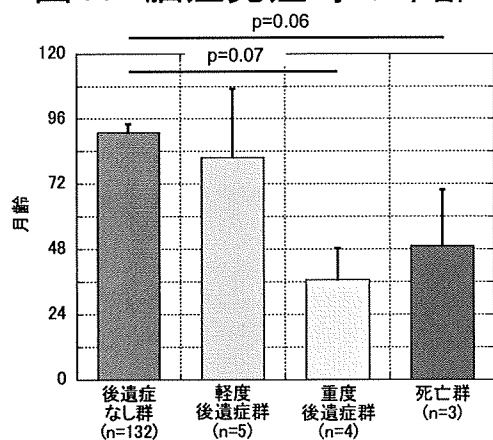


図12. <転帰別> 生化学検査

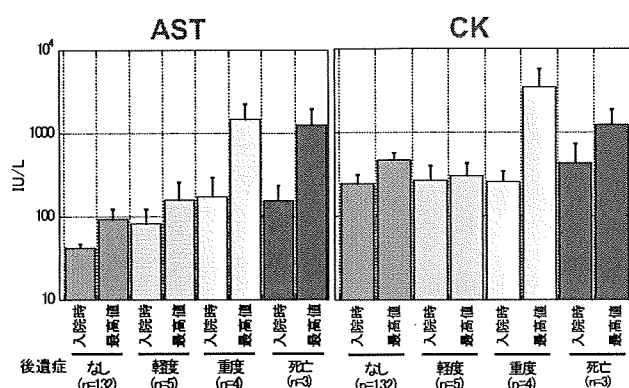


表3 まとめ

- 新型インフルエンザ脳症について、中間解析結果を報告した。
- 2010年2月末現在、162例が報告されている。
- 新型インフルエンザ脳症は、季節型に比べ「年長児」に多く、「男児」に多かった。
- 初発神経症状として、季節型では「けいれん」が多かったが、新型では「異常行動」が多く、発症年齢分布の差が影響していると考えられた。
- 頭部MRI所見で、「脳梁異常」を呈する例があり、異常行動との関連が示唆された。
- 死亡例が6例(4%)、後遺症例が23例(14%)あったが、季節性に比べやや軽症であった。
- 死亡群と重度後遺症群では、治療経過中のAST、CKの上昇が著明で、インフルエンザ脳症の病態にサイトカインストームが関与していると考えられた。
- 新型インフルエンザ脳症例は、他の報告も合わせると最終的に全国で200~220例、死亡例が10例程度、致命率推定約5%程度となるものと推測される。現在その最終作業を実施中。

厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)  
分担研究報告書

「感染症発生動向調査に基づいた 2009 年第 28 週以降のインフルエンザの発生動向と  
同時期のインフルエンザ脳症の報告について」

研究分担者：岡部信彦（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究協力者：安井良則、具芳明、島田智恵、多田有希（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究要旨：

感染症発生動向調査による 2009 年第 28 週以降のインフルエンザの発生動向とインフルエンザ脳症の報告とその解析結果について示す。2009 年 4 月に初めて報告された新型インフルエンザは、同年 5 月に初めて国内発生例の報告があり、インフルエンザ定点からの報告数は第 28 週から増加し始め、第 33 週には全国的な流行開始の指標である 1.00 を超えて 1.69（患者報告数 7750）となり、その後第 48 週には 39.64（患者報告数 190801）と 2009 年の最高点に達し、その後は継続的に減少して、2010 年第 6 週現在 2.81（患者報告数 13,479）となった。2009 年第 28 週～2010 年第 6 週までの 32 週間での推計の累積医療機関受信患者数は約 2,043 万人（95%信頼区間：2,023 万人～2,063 万人）（暫定値）であり、同期間に全国の衛生研究所から 26,850 件のインフルエンザウイルスの検出が報告され、AH1 亜型（A ソ連型）18 件（0.07%）、AH3 亜型（A 香港型）148 件（0.55%）、B 型 14 件（0.05%）、AH1pdm（新型インフルエンザウイルス）26,670 件（99.33%）とインフルエンザウイルスの検出報告数の大半を AH1pdm が占めている。感染症発生動向調査の急性脳炎の届出の一環として報告されているインフルエンザ脳症は、2009 年第 28 週以降 2010 年第 3 週までの 28 週間では、37 都道府県から、計 285 例が報告された。同期間中のインフルエンザウイルスの流行状況を考えると、A 型（亜型不明）および型別不明のものも含めて、その大半が AH1pdm によるものであったと推察される。年齢別にみると、90.5%（258 例）が 15 歳未満の症例であり、年齢中央値は 7 歳（範囲 1 カ月～72 歳）、最も症例が多かったのは 7 歳（39 例、13.7%）、次いで 8 歳（33 例、11.6%）であった。これらを対象として、質問票を送付し、回答を得た 136 例のうち、遺伝子迅速診断検査法（PCR 検査法）にて新型インフルエンザを発症していたことが確認された 120 例に対する解析結果によると、全例に意識障害を認め、発熱から意識障害出現までの期間は 0 日（同日）が 29 例、1 日が 66 例、2 日が 14 例、3 日が 4 例、4 日が 2 例であったが、6、7、8 日との回答もそれぞれ 1 例ずつ認めた（中央値 1 日）。転帰についての回答が得られた 117 例のうち、死亡 7 例、後遺症ありが 14 例、治癒・軽快が 96 例となっていた。感染症情報センターでは、2009 年に発生した新型インフルエンザの国内の流行に当たり、未経験のインフルエンザウイルスによるインフルエンザ脳症に関する情報を全国の医療関係者や公衆衛生関係者に提供することの重要性を考慮し、感染症発生動向調査結果として報告された症例に対して追加の疫学調査を実施し、その結果を迅速に全国に向けて還元した。

## A. 研究目的・背景

国立感染症研究所感染症情報センターでは、1999年4月より全国約5000箇所のインフルエンザ定点医療機関（うち小児科定点医療機関約3000箇所）より週毎のインフルエンザの発生状況が都道府県、政令市を通じて報告され、そのデータ集計を行い、シーズン毎のインフルエンザの発生動向の解析を行っている。一方、急性脳炎は2003年11月に4類定点把握疾患から5類全数把握疾患に変更となり、2004年3月からはインフルエンザ脳症も同疾患による届出対象となった<sup>1)</sup>。

2009年4月24日にメキシコ、アメリカ合衆国においてA/H1N1pdm インフルエンザウイルスによる新型インフルエンザの発生が明らかとなり、同年5月には日本国内での発生例も確認された。その後国内では一旦は患者発生数の減少がみられたが、感染症発生動向調査のインフルエンザ定点サーベイランス上では、2009年第28週から報告数は増加し、第48週をピークとする新型インフルエンザの流行がみられた。

今回我々は、2009年第28週以降現在に至るまでのインフルエンザの発生動向調査結果と、ほぼ同期間中急性脳炎の発生動向調査の一環として報告されたインフルエンザ脳症について取りまとめた結果を本報告書において提示し、その関連性と課題に関する考察を行う。

## B. 方法

全国約5000箇所のインフルエンザ定点医療機関（うち小児科定点約3000箇所）より都道府県、政令市を通じて週毎のインフルエンザの発生状況が報告されており、感染症情報センターでデータを集計している。そのデータを活用して、2009年第28週～2010年第6週のインフルエンザの発生動向の分析を行った。また、全国の地方衛生研究所及び検疫所から送られて

くる病原体検出結果の中のインフルエンザウイルス分離報告についての集計・解析を行った。

インフルエンザ脳症に関しては、2009年第28週以降2010年第3週までに全国の医療機関から5類全数把握疾患として都道府県、政令市を通じて送られてくる急性脳炎の報告例のうち、インフルエンザ脳症と診断されたもののみを抽出して集計を行った。更にこれらを対象として、報告自治体かもしくは自治体の許可を得た上で報告医療機関に予め作成した質問票（資料1）を送付し、回答を得た136例のうち、遺伝子迅速診断検査法（PCR検査法）にて新型インフルエンザを発症していたことが確定されている120例に対して更に解析を行った。

## C. 結果

### 1) 2009年第28週以降のインフルエンザの発生動向について：

2009年5月16日（第20週）、日本国内初の新型インフルエンザ患者の発生例の報告が神戸市からあった。その後兵庫県内と大阪府内における新型インフルエンザの集団発生が確認されたが、両府県内で実施された学校の一斉休校措置等の対策により、新型インフルエンザの流行は一時的に収束傾向を示した。感染症発生動向調査によると、全国約5000か所のインフルエンザ定点医療機関からの報告数に基づいた定点あたり報告数は、新型インフルエンザの初めての国内での患者発生以降も継続的に減少がみられていたが、それが一転して増加し始めたのは2009年第28週（7月6日～12日、定点あたり報告数0.205、患者報告数972）からであった。その後定点あたり報告数は第33週には全国的な流行開始の指標である1.00を超えて1.69（患者報告数7750）となり、その後第48週には39.64（患者報告数190801）と2009年の最高点に達し、その後は継続的に減少して、2010年第6週現在2.81（患者報告数13,479）となって

いる（図1）。2009年第28週～2010年第6週までの32週間で定点当たり累積報告数は420.12（累積患者報告数2,006,579）であり、都道府県別では沖縄県793.28、福井県597.91、愛知県584.03、宮崎県567.61、福岡県562.51の順となっており、全ての都道府県で300.00を超えている（図2）。同期間中の推計の累積医療機関受信患者数は約2,043万人（95%信頼区間:2,023万人～2,063万人）（暫定値）であり、年齢群別では5～9歳約514万人（25.2%）、10～14歳約473万人（23.2%）、15～19歳約279万人（13.7%）、0～4歳約226万人（11.1%）、20～29歳約217万人（10.6%）、30～39歳約153万人（7.5%）の順となっている（図3）。

患者報告数が増加し始めた2009年第28週以降では、2010年第6週までに全国の衛生研究所から26,850件のインフルエンザウイルスの検出が報告され、AH1亜型（Aソ連型）18件（0.07%）、AH3亜型（A香港型）148件（0.55%）、B型14件（0.05%）、AH1pdm（新型インフルエンザウイルス）26,670件（99.33%）とインフルエンザウイルスの検出報告数の大半をAH1pdmが占めている。また、2010年に入っても第1週～6週までの6週間で検出・報告された1422検体中、AH1亜型0件、AH3亜型0件、B型8件（0.56%）、AH1pdm1414件（99.44%）と殆どがAH1pdmである状態が継続しており、現在国内で発生しているインフルエンザの殆どは新型インフルエンザによるものであると推定される状態が続いている（図4、および感染症情報センターホームページ：

<http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/graph/sinin1.gif>参照）。

## 2) 2009年第28週以降のインフルエンザ脳症の報告について（急性脳炎の発生動向調査より）：

感染症発生動向調査では、インフルエンザ

脳症は、感染症法に基づく五類感染症の全数届出疾患である急性脳炎に含まれるものとして、診断したすべての医師に診断から7日以内に届け出ることが義務づけられている。（急性脳炎の届出基準：<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-05-03.html>）。この報告は、2003年3月から開始されているが、2003/2004年シーズンでは5例、2004/2005年シーズンでは53例、2005/2006年シーズンでは51例、2006/2007年シーズンでは42例、2007/2008年シーズンでは34例のインフルエンザ脳症の報告があった。これらはすべて季節性インフルエンザの罹患を原因とするものである。2009年は、第1～27週の季節性インフルエンザの流行が認められた期間のインフルエンザ脳症の報告数は48例であり、大半が新型インフルエンザによる流行が始まった2009年第28週以降2010年第3週までの28週間では、37都道府県から、計285例が報告された。この285例について、インフルエンザウイルスの型及び亜型別にみると、AH1pdm（新型インフルエンザウイルス）240例、A型（亜型不明）38例、B型1例、型別不明6例であり、AH1pdmによるものが84%を占めた（図5）。同期間中のインフルエンザウイルスの流行状況を考えると、A型（亜型不明）および型別不明のものも含めて、その大半がAH1pdmによるものであったと推察される。年齢別にみると、90.5%（258例）が15歳未満の症例であり、年齢中央値は7歳（範囲1カ月～72歳）、最も症例が多かったのは7歳（39例、13.7%）、次いで8歳（33例、11.6%）であった（図6）。

次に、これらを対象として、質問票（資料1）を送付し、回答を得た136例のうち、遺伝子迅速診断検査法（PCR検査法）にて新型インフルエンザを発症していたことが確認された120例に対する解析結果を示す。120例の年齢

分布は1~70歳（中央値7歳）であり、男性74例、女性46例である。57例に基礎疾患や既往歴を認め、その内訳は熱性けいれん24例、気管支喘息16例などであった。気管支喘息16例のうち現在治療薬の投与が行われているのは5例であり、そのうちテオフィリン製剤が投与されていたのは1例であった。全例に意識障害を認め、発熱から意識障害出現までの期間は0日（同日）が29例、1日が66例、2日が14例、3日が4例、4日が2例であったが、6, 7, 8日との回答もそれぞれ1例ずつ認めた（中央値1日）。1例では発熱と意識障害の時間関係が不明であり、1例は発熱の1日前に意識障害をきたしていた。意識障害の程度はJapan Coma Scale(JCS)20以上が79例、JCS10が15例、JCS10未満が24例であり、1例は判定不能、1例は記載なしであった。意識障害の持続時間が記載されていた116例中では、48時間以上が40例、24~48時間が17例、12~24時間が30例、12時間未満が29例であった。けいれんは66例に認められ、うち26例はけいれん重積を認めた。異常行動や異常言動は81例に認められた。脳症に関する検査として脳波検査が施行されていたのは95例で、うち66例で高振幅徐波などの所見を認めていた。頭部CT検査または頭部MRI検査が施行されていた118例のうち、いずれかの検査で何らかの所見を認めたのは62例であった。頭部CT検査では脳浮腫を認めた症例が多く、予後不良例では視床や脳幹に低吸収域を認めた症例もあった。頭部MRIではT2強調画像や拡散強調画像で脳梁膨大部などに高信号領域を認めたとの回答が複数例あった。（表1）。

118例に対して抗インフルエンザウイルス薬が投与されており、その内訳はオセルタミビル80例、ザナミビル17例で、21例ではこの2剤が短期間もしくは全期間で併用されていた。解熱剤は63例で使用されていたが、イブプロフェンが投与されていた1例と不明の2例

を除きすべてアセトアミノフェン製剤であった。

インフルエンザ脳症に対する治療としてステロイドパルス療法が97例と多くの症例で行われており、他にγグロブリン療法（49例）、脳低体温療法（12例）などが行われていた。18例（15%）ではこれらのいずれも行われていなかった。人工呼吸器は32例で使用されていた。36例において脳症以外の合併症を認めたとの回答が得られた。その内訳は気管支炎もしくは肺炎28例、気管支喘息発作4例、低Na血症2例、腎不全2例、心不全2例、多臓器不全1例などとなっていた。転帰についての回答が得られた117例のうち、死亡7例、後遺症ありが14例、治癒・軽快が96例となっていた。後遺症をきたした14例のうち内容が記載されていた13例すべてにおいて精神神経障害を認めたが、8例では身体障害（運動麻痺、失調など）の合併も認められた（表2）。

#### D. 考察

毎年、冬季を中心に新型インフルエンザの流行がみられ、インフルエンザ脳症もその流行時期に報告数の増加がみられている。今回は2009年4月にブタインフルエンザを起源とした新型インフルエンザ発生への報告がメキシコおよび米国からあり（Influenza-like illness in the United States and Mexico: [http://www.who.int/csr/don/2009\\_04\\_24/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2009_04_24/en/index.html)）、同年5月に日本国内に侵入し、第28週以降新型インフルエンザウイルスによる患者数の増加が始まり、インフルエンザとしては全くの季節はずれであり、加えて流行期間の比較的長い流行がみられている（新型インフルエンザパンデミック（H1N1）2009年5~9月：<http://idsc.nih.gov/iasr/30/356/tpc356-j.html>）。発生動向によると、新型インフルエンザウイルスによる今回のインフルエンザの流行は、

夏季休暇中に増大し、夏季休暇終了後に本格化していった。春に新型インフルエンザが日本国内に侵入してきた直後は、高等学校における集団発生が多数発生したが、2009年第28週以降の流行の中心は5～9歳、10～14歳の年齢群であり、小学校、中学校、幼稚園、保育園等のいわゆる小児の集団生活施設が流行の中心であった。特に第36週の夏季休暇終了直後はまず10～14歳の年齢群が急増し、次いで5～9歳で急増がみられたが、日本での侵入直後は高校の年齢層で感染が拡大し、それが次第に中学校、小学校の年齢層に広がっていき、流行が本格化していったものと考えられる。これまでの季節性インフルエンザの流行と比べて、10代の年齢層での患者発生の割合が高いのは、5～9歳の年齢群の小児と同様に大半が学校等において集団生活を行っていることに加えて、季節性インフルエンザとは異なり、全員が過去に感染経験がなく、感染発病を阻止できる免疫を保有していないことが大きな要因であったと思われる。日本では、インフルエンザウイルスの国内への侵入は比較的早かったものの、他の北半球の温帯地域とは異なって、春季には本格的な流行とはならず推移しており、2009年第28週以降に増大した今回の流行が第1波と今後呼ばれる可能性が高いと思われる。この流行は第48週をピークとして、その後減少が続き、2009年第6週には定点あたり報告数2.81（患者報告数13,479）と大幅に減少している。例年であれば、季節性インフルエンザの流行が見られる時期であるが、特にA/H1N1亜型（Aソ連型）およびA/H3N2亜型（A香港型）は日本国内のみならず世界的にも著しく減少してきており、北半球で季節性インフルエンザの流行が見られる時期であるにも関わらず、インフルエンザの流行が過去のシーズンと比べて大きく減少しているものと思われる。

感染症発生動向調査によって報告されるインフルエンザ脳症は、急性脳炎の届け出基準に基づいているため、必ずしも従来のインフルエンザ脳症の定義に当てはまらない症例が含まれている可能性は否定できない。しかしながら2003年3月から同じ基準による届け出が行われてきており、過去の季節性インフルエンザの流行シーズンと比較すると今回の新型インフルエンザの流行によるインフルエンザ脳症の発生報告数は、感染症発生動向調査では2009年第28週～2010年第3週の29週間に285例と大幅な増加がみられている。また、これまでの季節性インフルエンザでは、0～4歳からの報告数が多かったが、今回の新型インフルエンザでは5～9歳の年齢群からの報告数が多く、その中心は7歳児、8歳児であり、発生年齢が季節性インフルエンザよりも高い傾向にあったものと考えられる。

今回は調査票を作成して届け出のあった症例に対する追加調査を行っているが、これは感染症発生動向調査の届け出のみでは臨床経過や重症度等は不明であり、より詳細な疫学情報を収集し、迅速に還元することは今回の新型インフルエンザの流行に際して極めて有用である判断したためである。回答があり、新型インフルエンザであることが確定した120例の分析結果をみると、発熱から意識障害出現までの期間が1日以内と比較的短期間の症例が多くを占めていることが明らかである一方で、意識障害の持続時間が12時間未満の症例が29例と少なからず存在しており、今後他の検査結果や臨床経過も合わせて、インフルエンザ脳症の判断の適正に関する検討も必要であると思われる。

インフルエンザ脳症はインフルエンザに罹患した主に小児に発生する重篤な合併症であり、治療方法の確立等によって予後の大幅な改善がみられてきてはいるものの、未だに死亡例や後遺症を残す例も少なくない。感染症



情報センターでは、2009年に発生した新型インフルエンザの国内の流行に当たり、未経験のインフルエンザウイルスによるインフルエンザ脳症に関する情報を全国の医療関係者や公衆衛生関係者に提供することの重要性を考慮し、感染症発生動向調査結果として報告された症例に対して追加の疫学調査を実施し、その結果を迅速に全国に向けて還元した。本調査を実施するに当たり、ご協力いただいた自治体の公衆衛生機関並びに医療機関の関係者の方々に深謝申し上げます。

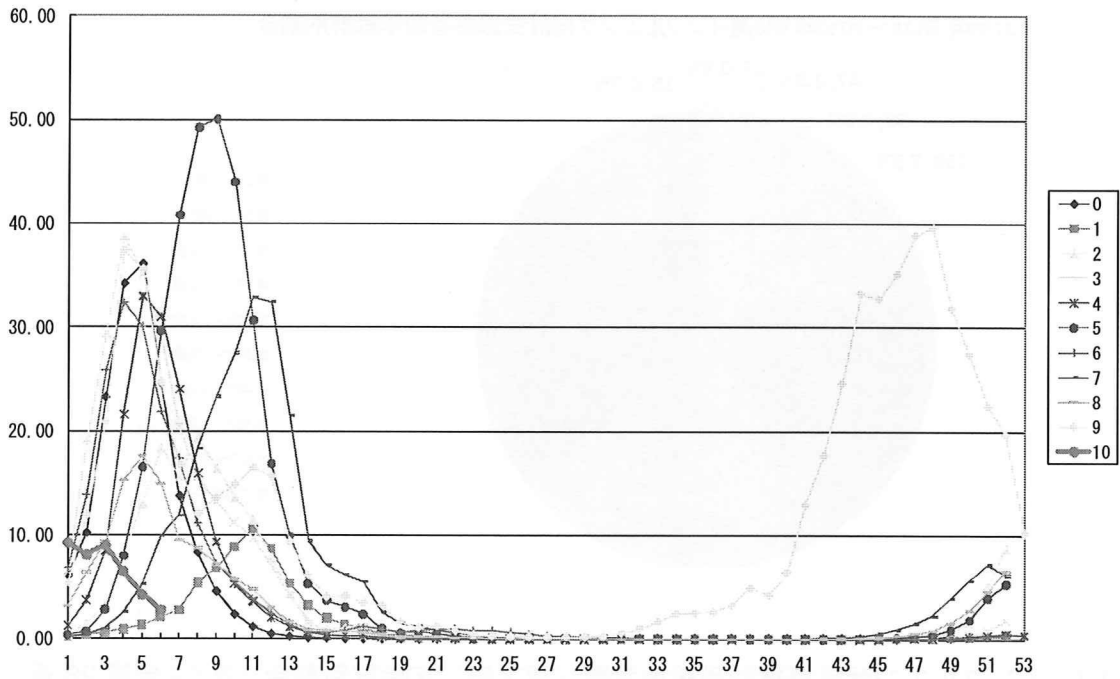


図 1. 2000～2010 年第 6 週インフルエンザ定点当たり週別報告数

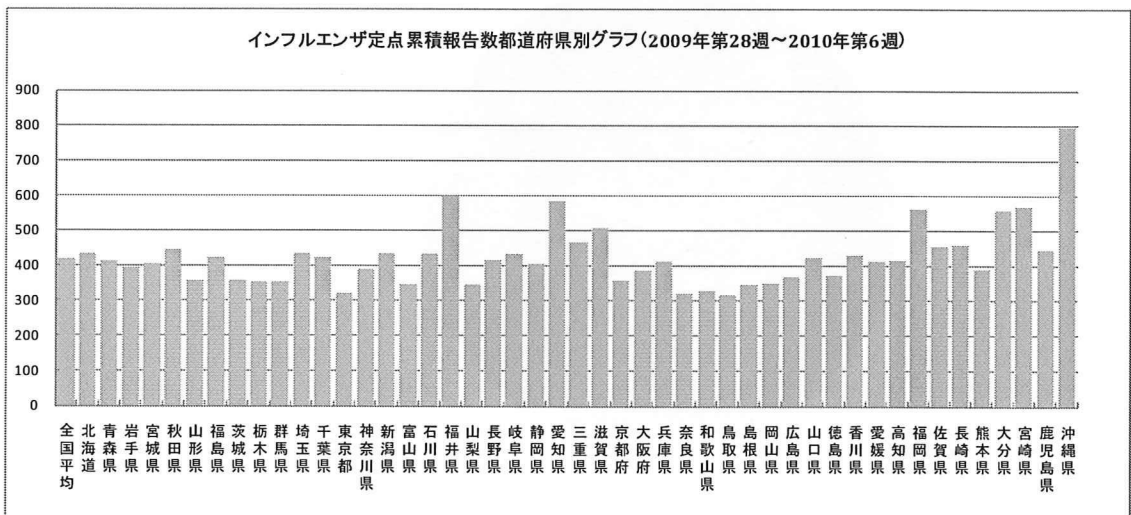


図 2. 2009 年第 28 週～2010 年第 6 週インフルエンザ定点当たり累積報告数県別グラフ (定点当たり累積報告数の全国平均は 420.12、累積患者報告数 2,006,579)

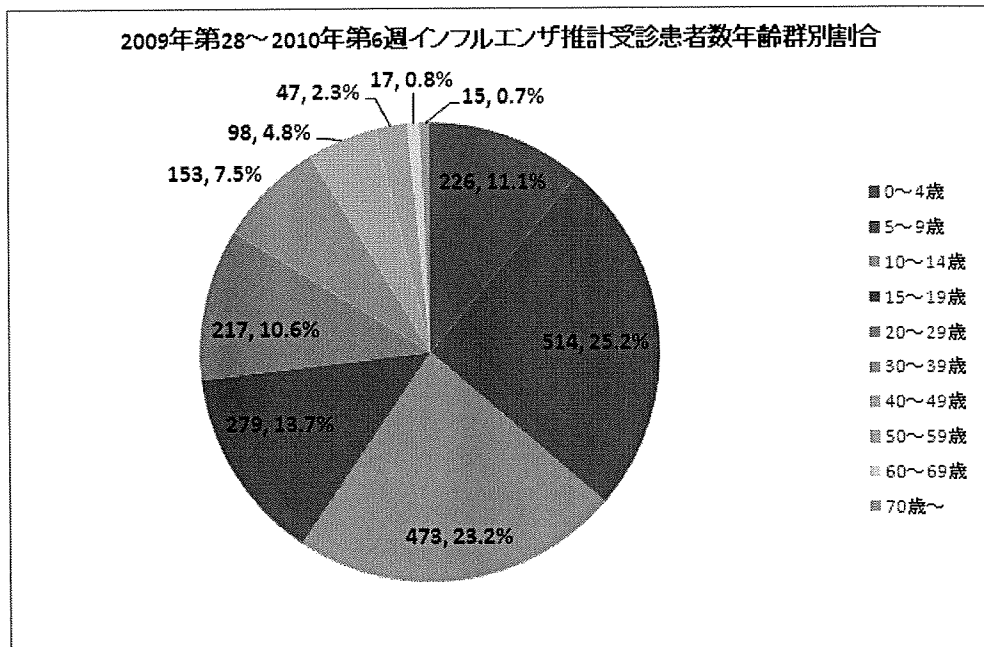


図3. インフルエンザ累積推計受診患者数（暫定値）年齢群別割合（2009年第28週～2010年第6週、同期間の累積推計受診者数=約2,043万人）

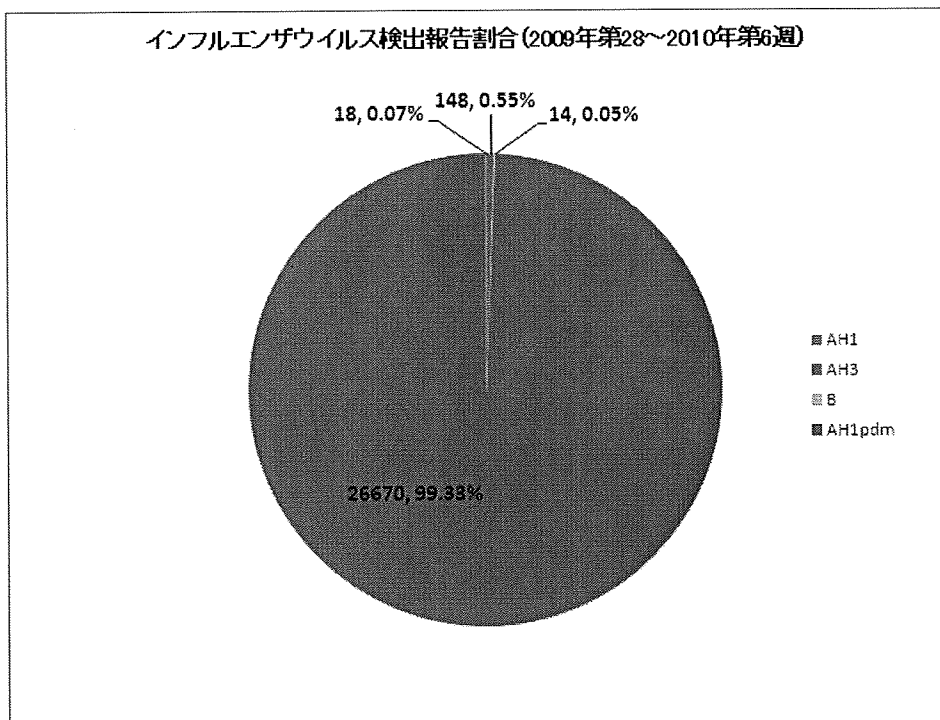


図4. インフルエンザウイルス検出報告数週別推移（2009年第28～2010年第6週、総検出数=26,850）

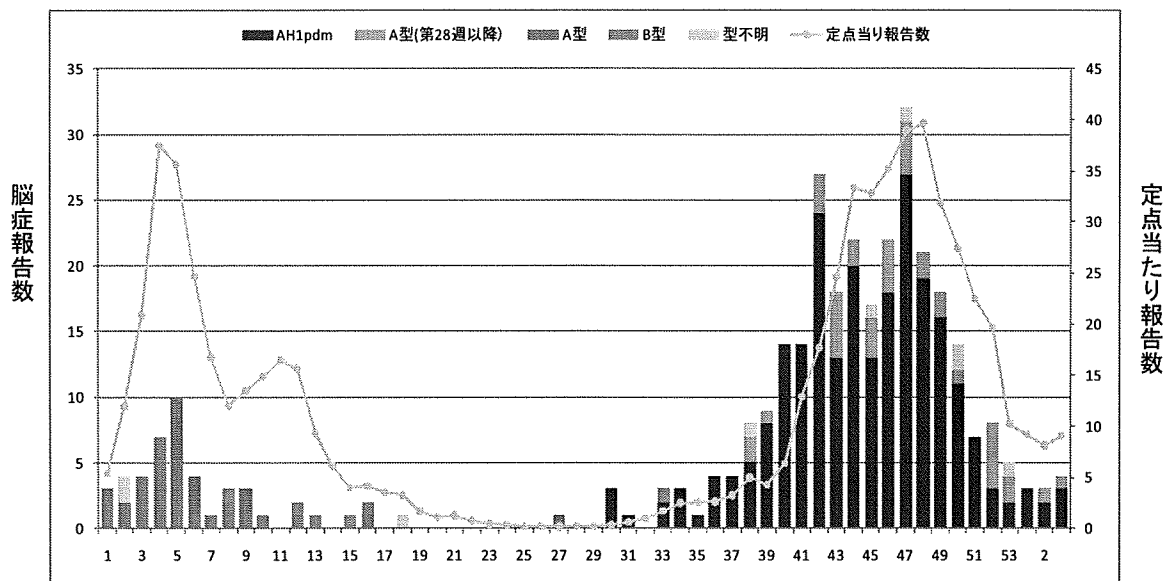


図 5. インフルエンザ脳症報告数およびインフルエンザ定点あたり報告数の推移 (n=333, 2009 年第 1~2010 年第 3 週)

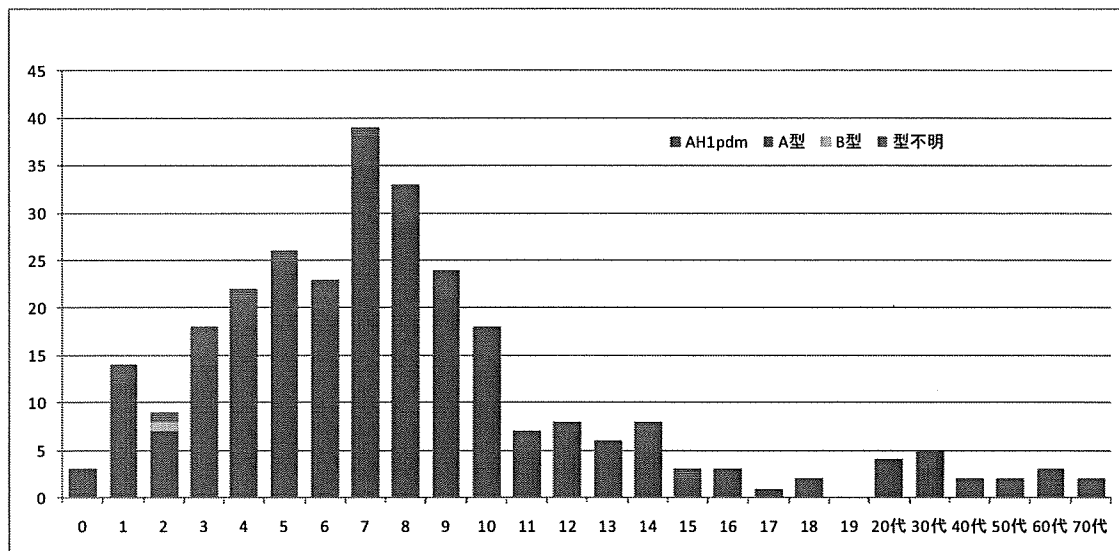


図 6. インフルエンザ脳症の年齢群別報告数 (2009 年第 28 週~2010 年第 3 週、n=285)

背景	
年齢(中央値)	1~70歳(7歳)
性別	男性74(62%)、女性46(38%)
基礎疾患・既往歴あり	57/119(48%)(熱性けいれん 24、気管支喘息 16)
季節性インフルエンザワクチン接種(回数)	0回 27/33(82%)、1回 4/33(12%)、2回 2/33(6%)
新型インフルエンザワクチン接種	0回 34/37(92%)、1回 2/37(5%)、2回 1/37(3%)
症状	
意識障害	120/120(100%)
発熱から意識障害までの期間(中央値)	-1~8日(1日)
けいれん	66/120(55%)
異常行動・言動	81/120(68%)
検査所見	
脳波検査で所見あり	66/95(69%)
頭部CT検査で所見あり	64/105(61%)
頭部MRI検査で所見あり	30/90(33%)

表 1. インフルエンザ A (H1N1) pdm による急性脳症 120 例の臨床像 (背景と症状)

治療	
抗インフルエンザ薬の使用	118/119(99%)
投与された抗インフルエンザ薬	オセルタミビル80/118(68%)、ザナミビル17/118(14%)、両者の併用21/118(18%)
発熱から投与開始までの期間(中央値)	-1~6日(1日)
意識障害発症日と投与開始日の関係	意識障害出現の前日までに投与開始23/112(21%)、同日に投与開始72/112(64%)、翌日以降に投与開始16/112(14%)
解熱剤の使用	63/119(53%)
ステロイドパルス療法	97/120(81%)
γグロブリン療法	49/120(41%)
脳低体温療法	12/120(10%)
アンチトロンビンⅢ大量療法	5/120(4%)
血漿交換	2/120(2%)
シクロスポリン療法	2/120(2%)
人工呼吸器の使用	32/120(27%)
合併症、転帰	
脳症以外の合併症あり	36/118(31%)
うち肺炎、気管支炎	28/36(78%)
転帰	死亡 7/117(6%)、後遺症あり 14/117(12%)、治癒・軽快 96/117(82%)
入院日数(死亡例を除き情報の得られた50例)(中央値)	2~56日(9.5日)

表 2. インフルエンザウイルス A (H1N1) pdm による急性脳症 120 例の臨床像 (治療、転帰、合併症)

## インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析

研究分担者 中村祐輔 東京大学医科学研究所・教授

### 研究要旨

インフルエンザ脳症の発症に関連する遺伝子を、全ゲノム領域を対象とした一塩基多型 (SNP) 解析にて同定し、インフルエンザ脳症の発症リスクを事前に予測するツールを開発することを目的としている。本年度は、既に実施した、日本人小児インフルエンザ脳症患者 72 名を対象とした約 55 万 SNP による genome-wide association study で同定された関連候補 SNP について、追加サンプルのジェノタイピングを実施した。

### A. 研究目的

日本においてインフルエンザの学童罹患数は、年間 50 万から 100 万人である。そのうち 100 から 300 人がインフルエンザ脳症を合併する。インフルエンザ脳症の死亡率は 30%前後と高く、生存例においても重篤な後遺症を残す症例が多いため社会的関心が高まっている。

インフルエンザ脳症の詳細な発症機序は不明であるが、日本人での報告が多いことから遺伝的背景が関与していると考えられる。本研究では、インフルエンザ脳症発症に関与する遺伝的背景を解明するため、一塩基多型 (SNP) を用いて、全ゲノム領域を対象とした関連解析を行った (genome-wide association study: GWAS)。本研究により、インフルエンザ脳症の遺伝的背景を解明することができれば、ハイリスク群を事前に特定でき、積極的にワクチン接種を行うという予防が可能となる。また、感受性遺伝子の特定は、インフルエンザ脳症の新たな治療法の開発にもつながる

と考えられる。

### B. 研究方法

#### 研究期間および規模

5 年間とし、200 名から検体を採取し解析を行う。

#### 研究対象

インフルエンザ脳症を発症した 1 歳以上の小児および脳症を発症しなかった 1 歳以上のインフルエンザ患者とする。

#### SNP 解析

国際 HapMap データベースの情報に基づいて抽出した約 55 万 SNP について、患者 DNA サンプルをジェノタイピングし、インフルエンザ脳症-コントロール関連解析を行う。

(倫理面への配慮)

### I. 研究等の対象とする個人の人権擁護

本研究に同意するか否かは本人 (対象が 16 歳未満の場合は、本人および代諾者) の全くの自由意志に委ねられ、同意しない場

合であってもいかなる不利益も被ることはないことを保証する。本研究は連結可能匿名化を行う。個人識別情報は、担当者が厳重に保管・管理し、外部へは決して提供しない。また、同意はいつでも撤回できることを保証する。同意が撤回された場合は、すみやかに検体をオートクレーブにかけ廃棄する。

## II. 研究への参加者に理解を求め同意を得る方法

検体の提供を受ける際には、説明文書を用いて提供者（16歳未満の場合は、提供者および代諾者）との質疑応答を経て、本研究についてじゅうぶんに理解されたことを確認した後に同意を得る。これらの説明文書では、本研究の意義、目的、遺伝子解析などについて解説し、プライバシーの保護の方法、提供者の権利、研究に協力することの利益と不利益、本研究終了後の検体の取り扱い方針について説明する。同意をいただいた方には、同意書に自署をお願いする。同意書は、鍵のかかるロッカーにて厳重に保管・管理する。

## III. 研究によって生じる個人への不利益ならびに危険性と科学的な貢献の予測

本研究成果により、インフルエンザ脳症の感受性遺伝子が同定されれば、ハイリスク群をスクリーニングすることが可能となる。インフルエンザの感染予防に対してはワクチンの接種という非常に有効な予防法が存在するため、ハイリスク群に対しては積極的にワクチン接種をすすめることにより、インフルエンザ脳症の罹患を予防することが可能となる。

また、感受性遺伝子の同定は、その遺伝子またはカスケードをターゲットとした新たな治療法の確立にも貢献すると確信する。

個人情報の漏洩により人権の侵害を被る

可能性があるが、本研究では、担当者が個人情報厳重に保管・管理し、個人情報・プライバシーの保護には万全をつくす。

インフルエンザ脳症は、ほとんどが10歳までの発症であり、遺伝的背景を研究することは、患者の健康に対して利益はあるものの、その後の社会的な不利益や危険性があるとは常識的に考えられない。

## IV. 遺伝カウンセリング体制の整備

個人情報の管理に記したように、本研究の結果を提供者が知ることにより提供者や血縁者の生命の危機を回避できる可能性がある。この場合には、遺伝子情報を提供者や家族に報告する可能性がある。そのような遺伝情報を知ることは、生命危機を回避することを目的にしているため、患者および家族の利益となるが、そのことを正確に理解し、受け入れることを支援するために日本遺伝カウンセリング学会認定医が遺伝カウンセリングを行う体制を整備している。

## V. 研究終了後の検体の取り扱い

提供者の承諾が得られた場合に限り将来の本研究以外のインフルエンザ脳症に関連した医学研究に用いることがある。ただし、その場合は連結不可能匿名化を行う。研究終了後の保管に関しては、説明文書を用いて提供者（16歳未満の場合は、提供者および代諾者）に十分説明する。

研究終了後の検体の保管を承諾されなかった場合には、すみやかに検体をオートクレーブにかけ破棄する。

## C. 研究結果

本年度は、既に実施した GWAS（日本人小児インフルエンザ脳症患者 72 名（ケース）及び日本人一般集団 934 名（コントロール））で同定された関連候補 SNP の検証を行った。遺伝子 X 上の SNP について、

新たに得られた日本人小児インフルエンザ脳症患者 13 名の DNA サンプルをジェノタイプリングし、GWAS サンプル及び追加サンプルを合わせて解析した結果、 $p = 3.6 \times 10^{-6}$  及びオッズ比 = 128 (95%信頼区間、7.00 – 2,330) を示した。今後、新たな患者 DNA サンプルを対象に、replication study を実施する予定である。

#### D. 考察

疾患感受性遺伝子の同定には、候補遺伝子アプローチまたは、全ゲノム領域を対象とした GWAS が考えられるが、本研究においては、高速・大量 SNP ジェノタイプリングによる GWAS を選択した。今回のように症例数が少ない場合でも、遺伝子型の疾患発症に対する寄与が大きければ十分に疾患関連遺伝子を同定することができるものと考ええる。

#### E. 結論

日本人小児インフルエンザ脳症患者を対象とした GWAS によって、インフルエンザ脳症関連候補 SNP を同定した。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

なし



## H5N1 重症例におけるウイルス学的解析

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所・教授

### 研究要旨

H5N1 インフルエンザウイルスのヒト末梢血由来マクロファージにおけるサイトカイン誘導と増殖性について解析した結果、ヒトでの病原性の高い H5N1 ウイルスが必ずしも高い増殖性や高いサイトカイン・ケモカイン誘導能を示すわけではないことが明らかになった。

### A. 研究目的

H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザ（HPAI）はアジアを中心に世界中で蔓延し、養鶏産業に大きな被害を与えているが、HPAI の広がりとともに、H5N1 ウイルスのヒトへの感染・死亡例は、依然増え続けている。2010 年 2 月現在、473 人が H5N1 ウイルスに感染し、うち 282 人が死亡しており、致死率は 59.6%にのぼる。H5N1 ウイルスに感染したヒトは、ウイルスに対する宿主免疫調節機構が異常をきたし、炎症性サイトカインが過剰に産生されることにより、急性呼吸窮迫症候群や多臓器不全などの症状を引き起こし、死に至る。このサイトカインの過剰放出には、肺胞マクロファージが大きな役割を果たしていると考えられている。そこで、H5N1 ウイルスのヒトに対する病原性の指標を得るため、マクロファージを用いて、ウイルスの増殖生と放出されるサイトカインおよびケモカインを調べた。

### B. 研究方法

ヒト血中に含まれる単球を分離し、CM-GSF を用いてマクロファージを誘導した。得られたヒト末梢血由来マクロファージに様々な H5N1 ウイルスを感染させ、ウイルスの増殖性および培養上清中に放出されたサイトカインおよびケモカインのうち 48 種類について定量を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、ボランティアから採取した血液を使用している。本研究内容は東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を受けている。（承認番号：18-15-0129, 19-24-0430）

### C. 研究結果

H5N1 ウイルスの中でも、ヒトマクロファージでの増殖性が高い株と低い株があった。H5N1 ウイルス感染マクロファージからは、多種類のマクロファージの活性化に関わるサイトカインおよびケモカインが放

出されていた。しかし、その放出量には H5N1 ウイルス株間で大きな差があった。また、血液提供者によってサイトカインおよびケモカイン放出量に差が認められた。

#### D. 考察

これまでの臨床データおよび研究報告から、H5N1 ウイルスは高いレベルのサイトカイン、ケモカインを産生することが示唆されている。季節性インフルエンザでも上昇は認められるがその上昇は H5N1 ウイルス感染においてより顕著である。本研究では、サイトカインおよびケモカイン放出量に H5N1 株間で差がみられたことから、ウイルスの増殖とサイトカイン・ケモカイン放出の関係性について、さらに検討する必要がある。

#### E. 結論

ヒト末梢血由来マクロファージにおいては、ヒトでの病原性の高い H5N1 ウイルスが必ずしも高い増殖性や高いサイトカイン・ケモカイン誘導能を示すわけではない。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

坂部沙織、岩附研子、山下直秀、長村登紀子、河岡義裕「H5N1 インフルエンザウイルスのヒト末梢血由来マクロファージにおけるサイトカイン誘導と増殖性」第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 26 日

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

## 自然免疫刺激による過剰サイトカイン誘導に関する研究

研究分担者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター）

研究要旨：インフルエンザ脳症は小児がインフルエンザに罹患後過剰な免疫応答の誘導によるサイトカインストームの関与が示唆されている。現在インフルエンザ脳症の病態を再現する動物モデルは存在しない。ウイルス感染と同様の自然免疫刺激により過剰のサイトカインを誘導し発症の解明を試みた。

### A. 研究目的

インフルエンザ脳症においては乳幼児がインフルエンザウイルス感染後過剰な免疫応答によるサイトカインストームにより脳症を発症し急速な経過をたどり死に至る場合もある。その病因にはインフルエンザウイルス感染への過剰な免疫応答が引き起こすサイトカインストームの関与が強く示唆されている。脳症の発症メカニズムの解明を目的としてウイルス感染時に類似した様々な自然免疫刺激物質による過剰なサイトカインの誘導を試みた。

### B. 研究方法

#### 材料と方法：

##### ワクチン株

A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8, H1N1) のスプリットワクチンを用いた。

##### 自然免疫刺激物質

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来の細胞壁成分 Zymosan 及びこれまでの実験から経鼻接種型インフルエンザワクチンにおける粘膜炎アジュバントとして効果が明らかとなっている合成二本鎖 RNA Poly (I:C) を用いた。Zymosan

の主要成分として、C型レクチン Dectin-1 のリガンドである  $\beta$ -グルカン、および含有されるとされる TLR-2 のリガンドの代替物として Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> を用いた。

##### 樹状細胞の誘導と刺激の添加

6-12 週齢の BALB/c マウス（雌）の大腿骨および脛骨から骨髄細胞を回収し、10 ng/ml の GM-CSF を添加した RPMI1640 培地で培養することで樹状細胞を分化・誘導した。培養開始 3 日目に GM-CSF を含む培地を添加し、6、8 および 10 日目に培養上清を半量交換した。培養開始 10 あるいは 11 日目に細胞を回収し、樹状細胞として利用した。

回収した樹状細胞を  $5 \times 10^5$  細胞ずつ 24 穴プレートに播き込み、アジュバント候補を添加した。培養 24 時間後の培養上清を回収し、各サイトカインの発現量を定量した。

##### 各サイトカインの定量

培養上清中のサイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IL-6, IL-10) 濃度は、ELISA により測定した。

### C. 研究結果

マウス骨髄細胞から誘導した樹状細胞を自然免疫刺激物質の添加により刺激することで、各サイトカインの産生を測定した (図1)。まず、酵母細胞壁分画 Zymosan と、Toll like receptor3 のリガンドである合成二本鎖 RNA Poly(I:C)を、それぞれ単独あるいは混合し誘導した樹状細胞に添加した。その結果、Zymosan 1  $\mu$ g/ml あるいは Poly(I:C) 10  $\mu$ g/ml の濃度での単独添加にて、TNF- $\alpha$ 、IL-6 および IL-10 の産生が認められ、これらを混合することでこれらサイトカインの産生は相乗的に増強された (図1a)。また、このサイトカインの発現は、ワクチンの存在下においても Zymosan と Poly(I:C)の混合により変わらず増強されることが明らかになった (図1b)。

次に、自然免疫刺激物質の混合によるサイトカイン産生増強の原因を明らかにするために、Zymosan の構成成分とされる物質を個別に Poly(I:C)と併用することでサイトカインの産生を比較した。Zymosan の主要成分は、TLR 非依存的な樹状細胞活性化レセプターDectin-1 のリガンドとなる  $\beta$ -グルカンであることが明らかになっている。さらに物質は同定されていないが、TLR-2 のリガンドになりうる物質が存在されると考えられている。したがって、 $\beta$ -グルカンと TLR-2 のリガンドとして Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>を用いた。樹状細胞への Poly(I:C) 5  $\mu$ g/ml の添加に加え、Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>を段階的に 0.1 および 1  $\mu$ g/ml と添加すると各サイトカインの発現が相乗的に増加するのに対して、 $\beta$ -グルカンを 0.1、1 および 10  $\mu$ g/ml と添加してもサイトカインの産生に変化がみられないことが明らかになった (図2)。

### D. 考 察

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呼吸器への感染に関連した高サイトカイン血症の関連が示唆されている。インフルエンザウイルスの感染時にはウイルスゲノムの核酸や構成蛋白による自然免疫の活性化が行われ、炎症性サイトカインの誘導が行われる。今回 Toll like receptor (TLR)3 のリガンドである二本鎖 RNA と C 型レクチン Dectin-1 のリガンドである  $\beta$ -glucan を含む Zymosan による樹状細胞の刺激で過剰な TNF- $\alpha$  が誘導される事が明らかとなった。ウイルス感染時にはゲノム RNA による TLR-7 への刺激とウイルス増殖の過程で産生される二本鎖 RNA が TLR-3 に刺激を加えると考えられるがそれらの刺激に加えて TLR-2 の刺激が入る事により過剰なサイトカインの誘導が明らかとなり、インフルエンザ脳症発症時のサイトカインストームの引き金にこのような自然免疫刺激が多重に加わる事が係っている可能性があると考えられる。

### E. 結 論

マウス樹状細胞を用いて自然免疫刺激物質による TNF- $\alpha$  等炎症性サイトカインの誘導を調べた。二本鎖 RNA と Zymosan の共刺激により単独では見られない過剰なサイトカインの誘導が見られた。インフルエンザウイルスの感染感染時のインフルエンザ脳症の発症機構にこれら複数の自然免疫が関与している可能性が示唆された。

### F. 健康危険情報

とくになし。