

201004009A

厚生労働科学研究費補助金

(地球規模保健課題推進研究事業 (国際医学協力研究事業))

「急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、
感染予防・制御に関する研究」

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森島 恒雄

平成23(2011)年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

(地球規模保健課題推進研究事業 (国際医学協力研究事業))

「急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、
感染予防・制御に関する研究」

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森島 恒雄

平成23(2011)年 5 月

目 次

I 総括研究報告

急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究

森島 恒雄 ----- 1

II 分担研究報告

1. インフルエンザウイルスによる肺炎の臨床的特徴と胸部

CT 所見の解析

堤 裕幸 ----- 13

2. インフルエンザ A/H1N1 2009 pdm による小児肺炎症例における血中酸化
ストレスマーカー、サイトカインの検討

森島 恒雄 ----- 20

3. 海外（ミャンマー、レバノン）におけるインフルエンザと、日本の RS ウイルス
疫学

鈴木 宏、齋藤 玲子 ----- 25

4. 新型インフルエンザ（A/H1N1pdm）オセルタミビル耐性株（H275Y）の
国内発生状況

田代 真人 ----- 33

5. 新型インフルエンザのウイルス学・病態解析と感染制御法の検討

河岡 義裕 ----- 39

6. Programme of Excellence in Influenza-Phase II (2006-2010)

動物インフルエンザのサーベイランスと感染制御体制の検討

喜田 宏 ----- 41

7. 経鼻インフルエンザワクチンにおける抗原性の異なる株による追加免疫時の免疫
応答の解析

長谷川 秀樹 ----- 45

8. 重症呼吸器感染症におけるライノウイルス流行パターンと株間による重症化の比較		
	押谷 仁	50
9. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G タンパクを発現する組換え麻疹ワクチン AIK-C 株の免疫原性		
	中山 哲夫	53
10. 上気道感染症の起炎菌と病原性の検討		
	山中 昇	56
11. 日本人小児における市中肺炎罹患率および肺炎球菌の血清型とシーケンスタイプの分布		
	石和田 稔彦	60
12. 小児肺炎における呼吸器ウイルス—細菌の相互応答		
	大石 和徳	62
13. 肺炎球菌による重症感染症のリスクファクターの評価		
	荒川 宜親	68
14. インフルエンザ菌による小児急性中耳炎の難治化に関する検討		
	渡邊 浩	73
III 研究成果の刊行に関する一覧表		79
IV 研究成果の刊行物・別刷		83

I 総括研究報告

急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究

主任研究者：森島恒雄 (岡山大学大学院小児医科学 教授)

研究概要

(目的)

急性呼吸器感染症 (ARI) はインフルエンザや RS, ライノなどのウイルスおよび、細菌、マイコプラズマなど多種類の病原微生物が関与する。本研究は日米および東・東南アジアにおける ARI 関連疾患の予防・制御を目的とする。この ARI 研究の key words は、①疫学・臨床像、②pathogenesis、③変異と薬剤耐性、④co-infection、⑤ワクチンによる予防である。

(方法)

2010 年度は新型インフルエンザ「以下 AH1N1・2009」の検討が緊急の課題となった。その世界的な動向、ウイルス学的な解析、AH1N1・2009 の特徴である肺炎の臨床像、発症機序の解析などを実施した。また、薬剤耐性についても国内・国外で検討を行った。一方、経鼻インフルエンザワクチンの効果について、動物実験モデルによる研究を実施した。国内で多発した高病原性鳥インフルエンザ H5N1 のサーベイランス調査を実施した。その他 RS ウィルス、ライノウィルスについても引き続き研究を継続させている。細菌感染症については、ウィルス感染との相互作用や近年新たにワクチンが登場した、インフルエンザ菌および肺炎球菌の血清疫学重症化のリスクファクター、中耳炎の難治化のメカニズムおよび病原性などについて検討した。

(結果と考案)

我が国では、小児を中心に AH1N1・2009 による肺炎が多発した。推定では 10,000 人以上の小児が肺炎で入院したと推定される。この小児の肺炎の臨床的特徴は、年長児に多く(中央値 6 歳)、発熱から入院までの期間が短く(中央値 1 日)、低酸素血症をきたす症例が多かった。治療として抗ウイルス剤、酸素投与、ステロイド(静注)などが行われ、多くは 1 週間以内に退院した。基本病態は、ウィルス性肺炎による、肺胞障害と考えられた。基礎疾患として、喘息が 38%、喘息以外のアレルギー素因が 19%と高率に見られたことも特徴的である。発症機序として種々のサイトカイン・ケモカインの上昇が認められた。新型インフルエンザ肺炎の初期には IL-6、sTNF-R1 などの炎症性サイトカイン産生が亢進していた。回復期の NOx 上昇が肺炎群の特徴であった。肺局所で起きた炎症反応により、ROS (活性酸素) が産生され、続いて NOx 産生が誘導されたと推測された。肺における過剰な炎症反応を抑制し、酸化ストレスを軽減することは、重症肺炎の治療上、重要な戦略と考えられた。

「新型インフルエンザ」の予後は、世界各国と比較して良好であった。AH1N1・2009 による我が国の小児(15 歳未満)死亡者数は 41 例であり、諸外国と比較して極めて少なかった。「新型インフルエンザ」の社会での知識の普及や予防対策、発症後早期の医療へ

のアクセスおよび医療機関での診療が大きな成果を上げたと考えられる。

ウィルス学的解析では、AH1N1・2009 ウィルスの種特異性に関与するアミノ酸を調べた。PAの21番目と616番目、HAの127番目と222番目、NPの375番目のアミノ酸の変異が、それぞれマウスへの病原性獲得に寄与していることが分かった。特に、HAの127番目の変異は、マウス肺での持続的なウィルス増殖に関与していることが明らかとなった。

薬剤耐性ウィルスについては、AH1N1・2009の一部がタミフル耐性を示すことが判明したが、現時点ではこの耐性ウィルスの拡散傾向は認められていない。A/H5N1 高原性鳥インフルエンザのモニタリングにおいて、とくに2010/2011 全国で報告された野鳥や家禽のH5N1 高病原性鳥インフルエンザの蔓延は、本研究班の長年の研究の中で明らかにしたインフルエンザウィルスの拡がり、すなわち、東南アジアから野鳥により持ち出されたH5N1が、シベリア・アラスカの営巣湖沼で常在しつつある中で起きた現象であることが推定された。AH1N1・2009 ウィルスに対する不活化経鼻ワクチンの動物実験における有効性の検討が進み、PolyI-PolyC をアジュバンドとして用いた経鼻ワクチンは、交叉免疫の獲得や、血中抗体の上昇の点からも有用性が明らかになり、H5N1 高病原性鳥インフルエンザを含む次世代のインフルエンザワクチンとして期待される。

インフルエンザ以外のウィルスについては、東南アジアにおけるライノウィルスの流行パターン・分子疫学と重症化について興味深い結果が得られた。また、reverse genetics 法による麻疹ワクチン AIK-C 株を用いたRS ワクチンの研究も進行している。

細菌感染症においては、とくに肺炎球菌とインフルエンザ菌について検討が進んだ。国内および東南アジアなどにおいてARI 起因菌検出頻度と抗菌薬感受性を検討した。特に肺炎球菌やインフルエンザ桿菌の薬剤感受性の推移、血清型の分布、薬剤耐性株の遺伝子変異パターンの検討を行った。また、肺炎球菌やインフルエンザ桿菌に対するワクチン導入が進んでいるが、その実際のARI 予防効果や小児での有効性の検討を行った。また、肺炎球菌における重症感染症の予後不良例のリスクファクターの評価を実施した結果、特定のクローンが起炎菌とはならず、宿主側の因子の関与も示唆された。

A. 研究目的

急性呼吸器感染症 (ARI) はインフルエンザやRS, ライノなどのウィルスおよび、細菌、マイコプラズマなど多種類の病原微生物が関与する。本研究は日米および東・東南アジアにおけるARI 関連疾患の予防・制御を目的とする。研究のkey words を、①疫学・臨床像、②pathogenesis、③変異と薬剤耐性、④co-infection、⑤ワクチンによる予防、と設定している。また、本研究は、日米医学研究協力・急性呼吸器感染症 (ARI) 部会の活動とリンクして進めている。

前年の2009年度は「新型インフルエンザ」出現への対応となる研究が中心となった。「新型インフルエンザ」の疫学、全体の臨床像、病態および成人における細菌感染症の合併による、急性肺炎重症化の有無について検討を加えた。

今年度は、さらにそれらの研究を進め、AH1N1・2009 ウィルスの特徴と病原性、小児に多発した肺炎の臨床像とくに画像解析、肺炎発症のメカニズム、病理学的解析などを実施した。また、抗インフルエンザ薬に対する耐性株の出現のモニタリングも重要

な課題と設定した。

一方、国内で鶏や野鳥などが A/H5N1 ウイルスに感染し、死亡する事例が続き、その対策は喫緊の課題となった。また AH1N1・2009 ウイルスワクチンの効果について経鼻不活化ワクチンの抗体産性能・感染防御能・交差防御について検討した。

インフルエンザと同様に重要な病原ウイルスである RS ウイルスとライノウイルスの疫学についても検討した。RS ウイルスについては組替え麻疹ワクチン AIK-C 株を用いた感染予防効果について研究を実施した。

細菌感染症においては、近年「高度多剤耐性菌」が大きな問題となっているが、本研究班では、薬剤耐性獲得のメカニズム、とくにバイオフィーム形成の重要性について、以前より研究を進めてきた（インフルエンザ菌、肺炎球菌など）。今年度は、肺炎球菌及び、インフルエンザ菌における薬剤耐性化の変化、急性中耳炎におけるフェーズ変化、日本人小児における市中肺炎の罹患率及び肺炎球菌のシーケンスタイプの分布、小児肺炎における呼吸器ウイルス・細菌の相互応答、肺炎球菌による重症感染症のリスクファクターの評価、インフルエンザ菌による小児急性中耳炎の難治化に関する検討など多面的研究を実施した。

B. 研究方法

1) AH1N1・2009 インフルエンザの動向について、世界の動向をまとめ、ウイルス学的特徴、臨床的特徴（とくに小児に多発したウイルス性肺炎について）および病態について研究を進めた。また、全国から分離されたウイルスの分子疫学的検討を行った。とくにタミフル耐性 AH1N1・2009 について調査を進めた。東南アジアの中で、ミャンマーにおいて AH1N1・2009 インフルエンザの疫学調査、および細菌感染と混合感染の実態調査を実施した。またマウス、フェレ

ットを用い、A/H5N1 経鼻不活化ワクチン臨床応用に向け、基礎的研究を進めた。

2) 2010/2011 日本で多発した鶏および野鳥の A/H5N1 感染事例を調査し、地球規模での感染経路を推定した。

3) RS ウイルス、ライノウイルスの分子疫学、臨床像の多様性、病態について解析を進めた。麻疹ウイルスのウイルス学的検討：弱毒麻疹ワクチン株を用い、reverse genetics 法を用いて、RS ウイルスゲノムを組み込んだ麻疹/RS 生ワクチンの動物実験を進めた。

4) 成人の重篤な予後を示した肺炎球菌感染症例のリスクファクターについて検討し、肺炎球菌の血清型、遺伝子型が重症化の要因ではなく宿主側因子の可能性が示唆された。

5) 小児の中耳炎における耐性菌の役割、難治化のメカニズムを検討した。

6) ウイルスと細菌の ARI 重感染が重症化につながるか可能性と、その重症化のメカニズムおよび相互作用について研究を進めた。

以上の方法で 2010 年度の研究課題を進めた。方法の詳細は分担報告を参考にしていたきたい。

C. 結果

本研究の多面的検討から各課題について、一部「結果」に加えて「考案・まとめ」も含むことを了承いただきたい。

(1) ウィルス感染症

2010 年度は新型インフルエンザ「以下 AH1N1・2009」の検討が緊急の課題となり、その世界的な動向、ウイルス学的な特徴、臨床症状を明らかにした。

① ウィルス学的解析では、AH1N1・2009 ウイルスの種特異性に関与するアミノ酸を調べるため A/California/04/09 (CA04) のマウス馴化株 (MA-CA04) を作製した。MA-CA04

株で認められたアミノ酸変異のマウスにおける病原性を解析した結果、PA の 21 番目と 616 番目、HA の 127 番目と 222 番目、NP の 375 番目のアミノ酸の変異が、それぞれマウスへの病原性獲得に寄与していることが分かった。特に、HA の 127 番目の変異は、マウス肺での持続的なウイルス増殖に関与していることが明らかとなった。パンデミック (H1N1) 2009 ウイルスが、今後ヒトで増殖を繰り返す中で、HA ならびにウイルス RNA 合成に関与するポリメラーゼ複合体に変異が導入され、よりヒトに馴化したウイルスに変わっていく可能性が示唆された。

②小児の AH1N1・2009 肺炎の臨床的特徴は年長児に多く(中央値 6 歳)発熱から入院までの期間が短く(中央値 1 日)、低酸素血症をきたす症例が多かった。治療として抗ウイルス剤、酸素投与、ステロイド(静注)などが行われ、多くは 1 週間以内に退院した。基本病態は、ウイルス性肺炎による、肺胞障害と考えられた。また、基礎疾患として、喘息が 38%、喘息以外のアレルギー素因が 19%と高率に見られたことも特徴的である。その発症機序として種々のサイトカイン・ケモカインの上昇が認められた。新型インフルエンザ肺炎の初期には IL-6、sTNF-R1 などの炎症性サイトカイン産生が亢進していた。また、回復期の NOx 上昇が肺炎群の特徴であった。肺局所で起きた炎症反応により、ROS (活性酸素) が産生され、続いて NOx 産生が誘導されたと推測された。肺における過剰な炎症反応を抑制し、酸化ストレスを軽減することは、重症肺炎の治療上、重要な戦略と考えられた。

③薬剤耐性株に関する研究では、国内においては全国の地方衛生研究所との共同研究により、AH1N1・2009 について抗インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランスを実施した。その結果、すべての AH1N1・2009 ウイルスはアマンタジンに耐性であった。オセ

ルタミビル耐性ウイルスは 1.2%以下の低頻度で検出されたが、これらの多くはオセルタミビル使用例であり、ペラミビルに対しても交叉耐性を示したが、いずれも伝播拡大伝播傾向は認められなかった。一方、ザナミビル耐性ウイルスは検出されなかった。ミャンマーにおける薬剤耐性インフルエンザについても調査し、世界的な傾向と同様に近年アマンタジン耐性やオセルタミビル耐性インフルエンザが流行の主流を始めたことが判明した。ミャンマーのインフルエンザをモニターすることで世界的なインフルエンザ伝播経路の解析に大きく貢献すると思われる。

④2010-2011 年に国内の野鳥から分離された H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスは、2010 年 5 月にモンゴルの野鳥から分離された H5N1 ウイルスと極めて近縁であり、H5N1 ウイルスが夏季にシベリアの営巣湖沼で受け継がれ、秋の渡りのシーズンに日本に運ばれたと考えられる。また、2009 年にベトナムの家禽から分離された H9N2 ウイルスは、マウスと豚で高い増殖性を示すことがわかった。ヒトへの感染リスクが高いと考えられるこれらのウイルスの流行を家禽の中で抑える対策を徹底する国際連携が喫緊の課題である。

⑤AH1N1・2009 経鼻不活化ワクチンの研究では、感染またはワクチンで免疫された後、抗原性の異なるワクチン株で経鼻ワクチンによる追加免疫した場合の免疫応答について血清中の中和抗体、気道粘膜上に分泌される IgA 抗体の反応性、感染防御及び交叉防御能について検討した。初回免疫で A/PR8 感染、追加免疫にて抗原性が異なる A/Narita 株経鼻ワクチンで免疫すると、交叉反応性の高い免疫が誘導された。暴露歴の無い新型のワクチンを接種する以前に、異なる株での感染歴があると、抗原性の異なる株に対する交叉中和能が高くなる。血清中の IgG 抗体量では抗体産生に対して

差が無い場合でも鼻腔粘膜上での IgA 抗体産生に差があり感染では局所で産生された IgA 産生記憶 B 細胞に何らかの差が見られる可能性が示唆された。

⑥フィリピン・レイテ島において小児重症肺炎患者より PCR にてライノウイルスの検出を試みた。24 ヶ月間の研究期間中に、小児患者 1,067 名のうち 293 件 (27%) よりライノウイルスが検出された (A 型:49%, B 型:9%, C 型:42%)。A~C 型間で流行様式が異なること、および系統により病原性が異なる可能性が示唆された。

⑦弱毒麻疹ワクチン AIK-C 株を生ワクチン ウイルスベクターとして利用し、Respiratory syncytial virus (RSV) subgroup A の F、G タンパク遺伝子を挿入し感染性組換え麻疹ワクチン株 (MVAIK/RSV-F と MVAIK/RSV-G) を作成し MVAIK/RSV/F 免疫後には subgroup A、B に対する高い中和抗体が誘導されることを明らかにした。また本年度はコットンラットに免疫し RSV subgroup A、B で challenge し感染防御能を検討した。MVAIK/RSV-F で免疫後 homo subgroup A の感染を防御し感染性ウイルスは検出できなかったが、hetero subgroup B の challenge に対する感染防御は不十分であった。今後は Subgroup B の F タンパクを導入する必要がある。

(2) 細菌感染症

①小児用肺炎球菌ワクチン (PCV7) の日本における小児市中肺炎に対する予防効果を推測する目的で、小児市中肺炎の罹患率、肺炎球菌の分離率ならびに、分離された肺炎球菌の薬剤感受性、分子疫学を解析した。検討結果から、PCV7 は日本の小児市中肺炎患者由来の肺炎球菌に対して高いカバー率を有しており、小児市中肺炎、とりわけ薬剤耐性菌による肺炎に対する予防効果が期待される。

②肺炎球菌およびインフルエンザ菌におけ

る薬剤耐性化の変化：肺炎球菌の約 31% でペニシリン結合蛋白遺伝子 *pbp1a*、*2b*、*2x* 遺伝子の変異が認められた。*pbp* 遺伝子に変異を認めない株は、わずかに 7% に認めるのみであった。マクロライド耐性遺伝子を有する株は、約 70~80% に認められた。一方、インフルエンザ菌の約 43% に *ftsI* 遺伝子の変異が認められた。ペニシリン耐性肺炎球菌は依然として小児急性中耳炎患児より高頻度に分離されるとともに、近年では β ラクターマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌の増加が注目されている。

③急性中耳炎における肺炎球菌のフェーズ変化：肺炎球菌の莢膜はその構造の差により 2 つのコロニー形態を示す。すなわち、莢膜構造が薄く、透光性の高い Transparent 型コロニーと、莢膜構造が厚く、透光性の低い Opaque 型コロニーに分類される。急性中耳炎患児において、中耳腔および鼻咽腔より分離される肺炎球菌の形態を検討した結果、鼻咽腔分離株では Opaque 株は薬 45% に存在するのに対して、中耳貯留液分離株ではほとんどが Opaque 株であった。同一患者から分離された鼻咽腔 Transparent 型肺炎球菌と中耳 Opaque 型肺炎球菌は同一の株であった。以上から肺炎球菌はその増殖部位によりフェーズを変化し、表面に存在する様々な病原因子を変化させると考えられた。

④小児の急性中耳炎：3 歳未満のインフルエンザ菌による小児急性中耳炎症例のうち、中耳貯留液から分離されたインフルエンザ菌のバイオフィーム産生能および細胞内侵入性を解析し、難治化との関連について検討した。鼓膜所見スコア 4 点以上のグループを H 群、3 点以下を L 群とすると、バイオフィーム産生能については、吸光度の平均が H 群 1.14 ± 0.90 、L 群 1.15 ± 0.88 と有意差は認めなかったが、細胞内侵入性は、H 群 0.38 ± 1.08 (%)、L 群 0.11 ± 0.21 (%) と H 群に高い傾向がみられた。また、中耳炎

の再燃についてもバイオフィーム産生よりも細胞内侵入性の関与が強い傾向であった。小児急性中耳炎の難治化は、免疫未発達など宿主側の要因も考えられるが、インフルエンザ菌の細胞内侵入性が菌側の要因として関与している可能性が示唆された。

⑤ ARI におけるウイルスと細菌の co-infection: バンコク市において、5 歳以下の小児肺炎患者と健常小児における呼吸器ウイルス、鼻咽頭における肺炎球菌、インフルエンザ菌の保菌、およびペア血清中 pneumolysin (Ply), OMP P6 に対する血清 IgG 応答、鼻咽頭上皮細胞における肺炎球菌/インフルエンザ菌レセプターの mRNA 発現、肺炎の重症度との関連性について検討したところ、本前向き臨床研究において、小児の鼻咽頭付着菌の肺炎発症への関与は明らかでなかった。また、肺炎患者で呼吸器ウイルスが高頻度に検出されたが、細菌性肺炎を示唆する症例は約 10%程度であった。肺炎患者の鼻咽頭上皮細胞の PAFR や ICAM-1 の mRNA 発現は増強したが、肺炎球菌やインフルエンザ菌との保菌率と関連しなかった。

⑥肺炎球菌による成人重症感染症例 25 例の解析をおこなった。男性 19 例、女性 6 例で、成人全年齢層にわたり発症が見られた。転帰は死亡 19 例(76%)、回復 6 例、免疫不全をきたす基礎疾患を持つ症例は 2 例(原発性マクログロブリン血症 1 例、脾摘後 1 例)だけであった。血清型、薬剤感受性と予後との関連は見られなかった。肺炎球菌における重症感染症の予後不良例のリスクファクターの評価を行い、特定のクローンが起炎菌とはならず、宿主側の因子の関与も示唆された。

D・E 考察とまとめ

本研究は年 1 回開催される日米医学協力研究 ARI 部会とリンクし活動した(2010 年 1 月、サンフランシスコ、2011 年 11 月和歌山予定など)。とくに「AH1N1・2009 インフルエンザ」の今後の動向予測、および近い将来拡大が危惧される高病原性鳥インフルエンザ H5N1 などの日本・アジア・北米における現状を把握において共同研究を進めた。一方、急性呼吸器感染症の原因菌である肺炎球菌、インフルエンザ菌の薬剤耐性菌の耐性獲得のメカニズムを明らかにしつつ、有効な予防対策(ワクチン・抗菌薬の使い方)を立てるため人事面での交流を深めた。これら課題の解決は日米医学研究協力 ARI 米国側と互いに情報を共有し、共同研究を進めることで大きな成果を得ることができる。一方、班員の多くはタイ、ミャンマー、フィリピンなどアジアを拠点に共同研究を進めており、(インフルエンザ、ライノウイルス、多剤耐性菌など)研究成果は、直接・間接的にアジア諸国の医療に貢献できる。

以下に具体的な研究成果を示す。

1. ウイルス感染症:

インフルエンザ: 本研究班の活動は、①国内の発生を予測、②AH1N1・2009 インフルエンザにおける耐性株の出現をモニタリング、③有効かつ安全なワクチン開発、とくに経鼻不活化ワクチンの実現に向けた研究が進行中、④インフルエンザ重症例の病態(肺炎・脳症・多臓器不全)を明らかにし、その治療法を確立、⑤今後、拡大が危惧される H5N1, H9N2 などの高病原性鳥インフルエンザのアジアにおける流行状況を把握し、拡大予防策を各国と協議、などを実施した。また、班員・研究協力者の多くは、国内の「新型インフルエンザ」および H5N1 高病原性鳥インフルエンザ予防対策に積極的に関わった。

我が国の「新型インフルエンザ」の致命率は、欧米の数十分の一に抑えられ、また

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 の感染も局所の散発的な発生にとどまった。

AH1N1・2009 ウィルスに対する不活化経鼻ワクチンの動物実験における有効性の検討はさらに進み、PolyI-PolyC をアジュバンドとして用いた経鼻ワクチンは、交叉免疫の獲得や、血中抗体の上昇の点からも有用性が明らかになり、次世代のインフルエンザワクチンとして期待される。

RSウイルス、ライノウイルス：小児・成人において大きなインパクトを与えているこれらウイルスの分子疫学・臨床像の解析、安全かつ有効なワクチンの開発 (RSV) にむけても成果を上げることができた。

2. 細菌感染症：

肺炎球菌・インフルエンザ桿菌などの薬剤感受性の推移、薬剤耐性株の遺伝子変異パターンへの検討に加え、耐性獲得のメカニズム (バイオフィーム、細胞侵入性など) について研究を進めた。とくに、肺炎球菌ワクチンの予防効果、安全性、ワクチン導入後の流行株の推移などを検討した。その結果、本ワクチンが普及すれば日本の小児市中肺炎をかなり予防できる可能性が高いと推定される。一方、成人の致死性肺炎球菌感染症のリスクファクターを明らかにし、特定のクローンが起炎菌とはならず、宿主側因子の関与が示唆された点は今後の予防対策上、重要な知見であった。

インフルエンザ菌による、小児急性中耳炎の難治化にはバイオフィーム産生よりも細胞内侵入性が関与している可能性が示唆された点も重要である。ウィルスと細菌の co-infection は重要な課題であり、今後もさらに研究を続けていくべき分野と考えられる。

以上の研究結果から、国民の健康を守るいくつかの有用な情報を得ることができた。

F. 研究成果

1. 論文発表

- 1) Okada K, Komiya T, Yamamoto A, Takahashi M, Kamachi K, Nakano T, Nagai T, Okabe N, Kamiya H, Nakayama T. Safe and effective booster immunization using DTaP in teenagers. *Vaccine* 28: 7626-7633, 2010
- 2) Sakata M, Nakayama T. Protease and helicase domains are related to the temperature sensitivity of wild-type rubella viruses. *Vaccine* 29: 1107-1113, 2011
- 3) Sawada A, Komase K, Nakayama T. AIK-C measles vaccine expressing fusion protein of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in cotton rats. *Vaccine* 29: 1481-1490, 2011
- 4) Ezo H, Akeda Y, Piao Z, Aoshi T, Koyama S, Tanimoto T, Ishii KJ, Oishi K. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A plus poly(I:C) protects against secondary pneumococcal pneumonia in mice. *Vaccine* 29:1754-1761, 2011.
- 5) Kawakami K, Ohkusa Y, Kuroki R, Tanaka T, Koyama K, Harada Y, Iwanaga K, Yamaro T, Oishi K. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumonia and cost analysis for the elderly who receive seasonal influenza vaccine in Japan. *Vaccine*, 28:7063-7069, 2010
- 6) Kerdsin A, Uchida R, Verathamjamrus C, Puangpatra P, Kawakami K, Pathom Sawanpanyalert P, Dejsirilert S, Oishi K. Development of triplex SYBR green

- real-time PCR for detecting *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Legionella* spp., without extraction of DNA. *Jap J Infect Dis* 63: 173–180, 2010
- 7) Champunot R, Tanjatham S, Kerdsin A, Puangpatra P, Wangsai S, Treebuphachatsakul P, Tasnuphaswasdikul S, Kiatvitchukul C, Kasyanan H, Yimsabai J, Akeda Y, Kawakami K, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S, Oishi K. Impact of severity of pandemic influenza (H1N1) virus-associated community-acquired pneumonia among adults in a tertiary hospital in Thailand. *Jap J Infect Dis*, 63:251–256, 2010
- 8) Dapat, C, Suzuki, Y, Saito, R, Kyaw, Y, Myint, YY, Lin, N, Oo, HN, Oo, KY, Win, N, Naito, M, Hasegawa, G, Dapat, IC, Zaraket, H, Baranovich, T, Nishikawa, M, Saito, T, Suzuki, H. Rare Influenza A (H3N2) Variants with Reduced Sensitivity to Antiviral Drugs. *Emerg Infect Dis*. 16 (3):493–496, 2010.
- 9) Barr, I. G., McCauley, J., Cox, N., Daniel, R., Engelhardt, O. G., Fukuda, K., Grohmann, G., Hay, A., Kelso, A., Klimov, A., Odagiri, T., Smith, D., Russell, C., Tashiro, M., Webby, R., Wood, J., Ye, Z., Zhang, W., Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009–2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: Basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009–2010 northern hemisphere season. *Vaccine* 28: 1156–1167, 2010.
- 10) Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Aina, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T. First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63: 67–71, 2010.
- 11) Ichinohe, T., Aina, A., Ami, Y., Nagata, N., Iwata, N., Kawaguchi, A., Suzuki, Y., Odagiri, Tashiro, M., Takahashi, H., Strayer, D. R., Carter, W. A., Chiba, J., Tamura, S., Sata, T., Kurata, T., Hasegawa, H., Ichinohe, T. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J. Med. Virol.* Volume 82: 1754–1761, 2010
- 12) Ujike, M., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Obuchi, M., Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, J., Tashiro, M., Odagiri, T., The working group of influenza virus surveillance in Japan. Oseltamivir-Resistant Influenza Viruses A(H1N1) during the 2007–2009 Influenza Seasons, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 926–935, 2010
- 13) 11. Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, H., Tashiro, M., Kageyama, T. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. *J. Med. Virol.* 83:10–15 2011

- 14) Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. *Intern Med*. 2010;49(5):491-5. Epub 2010 Mar 1.
- 15) Ichinohe T, Aina A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzaki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer D, Carter W, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, and Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* 2010 Oct;82(10):1754-61.
- 16) Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Aina A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One*. 2010 Apr 23;5(4):e10256.
- 17) Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Aina A, Hasegawa H, Chiba J. Passive Immune-Prophylaxis against Influenza Virus Infection by the Expression of Neutralizing Anti-Hemagglutinin Monoclonal Antibodies from Plasmids. *Jpn J Infect Dis*. 2011 Jan;64(1):40-9.
- 18) Aina A, Tashiro M, Hasegawa H. Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant. *Hum Vaccin*. 2011 Jan 1;7. [Epub ahead of print]
- 19) Iwai A, Shiozaki T, Kawai T, Akira S, Kawaoka Y, Takada A, Kida H and Miyazaki T. (2010) Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon {beta} promoter stimulator 1. *J Biol Chem*. (2) Okamatsu M, Tanaka T, Yamamoto N, Sakoda Y, Sasaki T, Tsuda Y, Isoda N, Kokumai N, Takada A, Umemura T and Kida H. (2010) Antigenic, genetic, and pathogenic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from dead whooper swans (*Cygnus cygnus*) found in northern Japan in 2008. *Virus Genes* 41, 351-357.
- 20) Sakoda Y, Sugar S, Batchluun D, Erdene-Ochir TO, Okamatsu M, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Tsuda Y, Yamamoto N, Kishida N, Matsuno K, Nakayama E, Kajihara M, Yokoyama A, Takada A, Sodnomdarjaa R and Kida H. (2010) Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. *Virology* 406, 88-94.
- 21) Tanaka T, Sunden Y, Sakoda Y, Kida H, Ochiai K and Umemura T. (2010) Lipopolysaccharide treatment and inoculation of influenza A virus results in influenza virus-associated encephalopathy-like changes in neonatal mice. *J Neurovirol* 16, 125-132.

2. 学会発表

- 1) Nagaoka Y, Morishima T. et.al: 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Associated Encephalopathy Among Japanese Children.

Option for the Control of Influenza VII.
Sep. 2011/Hong Kong

2) 長岡義晴、森島恒雄ら：新型インフルエンザ肺炎症例における血中酸化ストレスマーカーおよびサイトカインの検討。第42回日本小児感染症学会。2010年11月/仙台

3) Kawakami K, Yamaryo T, Oishi K.

Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumonia and cost analysis for the elderly who receive seasonal influenza vaccine. IDSA 48th annual meeting.

Vancouver, Canada, October 21-24, 2010.

4) 坂東園子、岩垣明隆、大石和徳他。高齢者介護施設利用者での肺炎の前向き調査と肺炎球菌血清型特異 IgG 濃度の基礎値についての検討。第50回日本呼吸器学会総会、京都、2010年4月23-25日。

5) 坂東園子、岩垣明隆、大石和徳他。高齢者における肺炎球菌ワクチン接種後の

multiple opsonophagocytic assay による血清オプソニン活性の評価。第84回日本感染症学会総会、京都、2010年4月4-5日。

6) 大石和徳、田村和世、西順一郎、中野貴司。23価肺炎球菌ワクチン接種後に発症した肺炎球菌性髄膜炎の2症例：その血清型特異 IgG 濃度とオプソニン活性の乖離について。第14回日本ワクチン学会学術集会、東京、2010年12月11-12日。

7) 藤直子等、重症呼吸器感染症におけるライノウイルス流行パターンと株間による重症化の比較、第58回ウイルス学会、2011年11月、徳島

8) 鈴木陽等、Circulation pattern of human rhinoviruses and comparison of severity between genetic types among children with severe pneumonia in the Philippine. Pediatric Infectious Diseases Society of the Philippines、2012年2月、フィリピン・マニラ

9) Reiko Saito, Overview of Myanmar

influenza project. The 3rd Myanmar-Japan Biomedical Workshop —Influenza and other infectious diseases in Myanmar—, Yangon, Myanmar, 2nd Feb, 2010.

10) 長谷川秀樹、永田典代、岩田奈緒子、辻隆裕、佐多徹太郎 新型インフルエンザウイルス A/(H1N1)pdm のフェレットにおける病原性の検討 第99回日本病理学会総会 2010年4月東京

11) 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンによるブースター効果と高病原性 H5N1 ウイルスの感染防御の検討 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島

12) Nagaoka Y, Morishima T. et al: 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Associated Encephalopathy Among Japanese Children. Option for the Control of Influenza VII. Sep. 2010/Hong Kong

13) 長岡義晴、森島恒雄等：新型インフルエンザ肺炎症例における血中酸化ストレスマーカーおよびサイトカインの検討、第42回日本小児感染症学会 2011年11月/仙台

14) 「Potency of the A/2009 (H1N1) pandemic influenza vaccine prepared from an isolate of swine origin,

A/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1)」 M. Okamatsu, N. Yamamoto, Y. Sakoda, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010年、香港)

15) 「H9N2 influenza virus vaccine prepared from a non-pathogenic isolate from a natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with a human H9N2 virus in mice」 N. Nomura, Y. Sakoda, K. Soda, M. Okamatsu, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010年、香港)

16) 「カモとニワトリにおけるインフルエンザウイルスに対するシアル酸レセプターの局在」本島昌幸、岡松正敏、日尾野隆大、迫田義博、喜田宏 日本ウイルス学会北海道支部 第44回夏季シンポジウム(2010年、洞爺湖)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

II 分担研究報告

インフルエンザ A/H1N1 2009 ウイルスによる肺炎の 臨床的特徴と胸部 CT 所見の解析

研究分担者 堤 裕幸 札幌医科大学医学部小児科学講座教授
研究協力者 森 俊彦 NTT 東日本札幌病院小児科

研究要旨

2009年8月初旬から12月下旬にかけて、NTT 東日本札幌病院小児科医において、インフルエンザ A/H1N1 2009 ウイルス感染による入院を88例経験した。88例中53例（60%）が胸部 X 線写真上に陰影を認め肺炎と診断した。また、そのうちの34例は急性期に胸部 CT による解析を行った。胸部 CT 像において多く見られたのは、片側性、あるいは両側性の多巣性浸潤像であり、それらは気管支周囲に摺りガラス状の陰影を伴っていた。次に見られたのは片側性の広汎な浸潤像、あるいは1～複数の肺葉の無気肺であった。酸素投与が必要となった症例は34例中22例であったが、有意な関連が示された画像所見としては無気肺が挙げられた。

A. 研究目的

2009年秋から冬にかけて新型インフルエンザの大流行があったが、季節性インフルエンザでは通常みられない小児期のウイルス性肺炎が多発した。本研究では、当教室の関連病院である NTT 東日本札幌病院小児科で経験した新型インフルエンザによる入院88例について解析し、その特徴を季節性インフルエンザによる入院例と比較した。また、肺炎例の急性期において胸部 CT 撮影を行い、肺炎の特徴について解析した。

B. 研究方法

2009年8月初旬から12月下旬にかけて、NTT 東日本札幌病院小児科医において、インフルエンザ A/H1N1 2009 ウイルス感染

による入院を88例経験した。入院88例の臨床的特徴を、直近3シーズン（2006～2007）における、季節性インフルエンザ（A型）による入院61例と比較検討した。

A/H1N1 2009 による入院88例中、53例が肺炎を発症していた。その臨床経過、治療について後方視的に解析した。また、そのうち34例については胸部 CT 画像所見について解析した。

（倫理面への配慮）

個人を特定できないように配慮した。つまり、報告書においては患児のイニシャルを記載せず、症例の提示が必要な場合は、年齢と性別のみとした。

C. 研究結果

1. A/H1N1 2009 と季節性の入院症例の比較 (表 1)

A/H1N1 2009 による入院例の年齢は中央値が 6 歳、季節性では入院例の中央値が 1 歳であり、A/H1N1 2009 による入院が有意に年長であった。基礎疾患が A/H1N1 2009 では 59%、季節性では 26%と、A/H1N1 2009 で有意に高かったが、特に喘息が A/H1N1 2009 では 35%、季節性で 7%と喘息が多かった。合併症は肺炎が A/H1N1 2009 で 60%もみられたのに対し、季節性では 11%であった。一方、熱性けいれんの合併は A/H1N1 2009 では 6%に過ぎなかったが、季節性では 23%と多かった。これらの違いは何れも統計学的に有意であった。一方、両群で性別に違いは無く、白血球や CRP の最高値にも違いが無かった。

2. A/H1N1 2009 肺炎 53 例の臨床的特徴 (表 2, 3)

男児が 64%を占めた。年齢は 1~16 歳までで、中央値は 6 歳であった。基礎疾患として、喘息が 38%、喘息以外のアレルギー素因が 19%に見られた。インフルエンザ症状の発症から入院までの期間の中央値は 1 日であった。入院期間の中央値は 6 日であった。入院時の酸素飽和度の中央値は 91%であり、91%未満が 25 例：48%、91%以上が 27 例：52%であった。

治療として抗ウイルス剤の投与と抗生剤の投与が全例に行われた。ステロイド剤の使用も 50 例：94%とほとんどの例に行われた。酸素投与は 33 例：62%に行われ、その投与期間の中央値は 2 日であった。ICU のある施設への転院は 2 例であった。

3. A/H1N1 2009 肺炎 34 例の胸部 CT 像 (図 1~4、表 4)

パンデミック 2009 インフルエンザ肺炎の胸部 CT 像において多く見られたのは、片側性、あるいは両側性の多巣性浸潤像であり、30 例：88%に見られた。次に見られたのは気管支周囲に摺りガラス状の陰影であった (20：59%)。両方の合併は 16 例：47%にみられた。広汎な無気肺は 9 例：26%に、胸水貯留も 9 例：26%に見られた。縦隔気腫も 3 例：9%にみられた。

D. 考察

胸部 CT 所見などを解析すると A/H1N1 2009 ウイルス肺炎の基本病態はウイルス性肺炎による肺胞障害と考えられる。発熱後短期間で急速に呼吸状態が悪化し、SpO₂ の低下する例が目立った。多呼吸、陥没呼吸、鼻翼呼吸、チアノーゼなどの症状がある場合や SpO₂ が 93%以下の場合には速やかに入院させ治療が必要である。A/H1N1 2009 ウイルス肺炎においては、気道の分泌物が多く、狭窄~閉塞性呼吸障害を来しやすく、気道狭窄による内圧上昇から肺の過膨張を呈しやすい。また、エアリークを起こし、気胸、縦隔気腫、皮下気腫を伴う場合もあると考えられる。一方、粘調な喀痰により閉塞をきたすと無気肺を呈し、plastic bronchitis となる場合もある。抗インフルエンザ薬が今回の重症肺炎に対して有効であるとのエビデンスはないが、基本病態がウイルス性肺炎と考えられるので、早期の使用が望まれる。

E. 結論

A/H1N1 2009 ウイルス肺炎は 6 歳前後のアレルギー素因を持つ小児に好発し、急速に進行し呼吸困難を呈することがある。その様な児の早期に発見し、適切な入院治療を行うことが肝要である。

F. 研究発表

論文発表

Mori T, Morii M, Terada K, Wada Y, Kuroiwa Y, Hotsubo T, Fuse S, Nishioka S, Nishioka T, Tsutsumi H. Clinical characteristics and computed tomography findings in children with 2009 pandemic influenza A (H1N1) viral pneumonia. Scand J Infect Dis 43:47-54, 2011

学会発表

日本小児科学会北海道地方会第 276 回例会 (2009 年 11 月 22 日、札幌)

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

表1 季節性インフルエンザと新型インフルエンザ入院患者の臨床的特徴

	季節性インフルエンザA (2006/12~2009/6) (n = 61)	新型インフルエンザ (2009/8~2009/12) (n = 88)	P Value
男児 no. (%)	32 (52%)	53 (60%)	P = 0.35
年齢-Yr median (IQR)	1 (1-4)	6 (3-8)	P < 0.001
基礎疾患 no. (%)	16 (26%)	52 (59%)	P < 0.001
喘息 no. (%)	4 (7%)	30 (35%)	P < 0.001
合併症			
肺炎 no. (%)	7 (11%)	53 (60%)	P < 0.001
熱性けいれん no. (%)	14 (23%)	5 (6%)	P < 0.01
入院期間-d median (IQR)	4 (3-5)	5 (4-6)	P < 0.01
検査成績			
WBC per mm ³	8816 ± 4604 (n = 57)	8876 ± 4646 (n = 84)	P = 0.94
CRP mg/dl	2.23 ± 2.63 (n = 58)	2.51 ± 2.62 (n = 84)	P = 0.53