

201028046A

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

高病原性鳥インフルエンザの 診断・治療に関する国際連携研究

(H22-新興-一般-014)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河内 正 治

平成23 (2011) 年 3 月

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

高病原性鳥インフルエンザの 診断・治療に関する国際連携研究

(H22-新興-一般-014)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河内 正治

平成23 (2011) 年 3 月

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）
総括・分担研究報告書

高病原性鳥インフルエンザの診断・治療に関する国際連携研究

研究代表者：所属施設：国立国際医療研究センター 手術部 部長
氏 名：河内正治

研究分担者

所属施設：宮崎大学医学部生殖発達学講座 小児科学分野 教授

氏 名：布井博幸

所属施設：東邦大学医療センター大森病院 呼吸器内科 教授

氏 名：本間 栄

所属施設：国立感染症研究所感染病理部 主任研究官

氏 名：中島典子

所属施設：国立感染症研究所感染病理部 部長

氏 名：佐多徹太郎

所属施設：千葉大学大学院医学研究院 特任教授

氏 名：鈴木和男

所属施設：国立感染症研究所免疫部 室長

氏 名：大島正道

所属施設：東北大学大学院医学系研究科 教授

氏 名：川上和義

所属施設：国立国際医療研究センター研究所 国際臨床研究センター長

氏 名：山本健二

所属施設：熊本大学大学院生命科学研究部微生物学分野 教授

氏 名：赤池孝章

所属施設：熊本大学大学院生命科学研究部微生物学分野 助教

氏 名：岡本竜哉

所属施設：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 室長

氏 名：影山 努

所属施設：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 室長

氏 名：長谷川秀樹

所属施設：国立国際医療研究センター麻酔科 医師

氏 名：志賀由佳

所属施設：国立国際医療研究センター麻酔科 医師

氏 名：佐藤正規

目 次

I. 総括研究報告書

高病原性鳥インフルエンザの診断・治療に関する国際連携研究

河内正治・・・ 1

II. 分担研究報告書

1. 臨床班分科会

- 1) ハノイでの ARDS/FARDS 症例における血中 KL-6 と cytochrome c を用いた病態解析
布井博幸・・・ 15
- 2) 高病原性鳥インフルエンザの人感染症に対する診断/治療ガイドライン
本間 栄・・・ 23
- 3) 2009 パンデミックインフルエンザウイルス感染症の病理学的解析
中島典子・・・ 27

2. 基礎分科会

- 1) インフルエンザ感染誘導の劇症型肺障害機構の解析とその治療薬の開発
鈴木和男・・・ 35
- 2) インフルエンザウイルス感染に対する宿主側抵抗性因子とその誘導発現系による解析
大島正道・・・ 43
- 3) FARDS マウスモデルを用いた発症病態の解析と治療薬の開発
川上和義・・・ 49
- 4) 非炎症性マウス劇症肺炎モデルにおけるマクロファージの解析
山本健二・・・ 55
- 5) インフルエンザウイルス肺炎・ARDS における酸化ストレスバイオマーカー
赤池孝章、岡本竜哉・・・ 59
- 6) Direct RT-LAMP 法による H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス遺伝子検査系の構築
影山 努・・・ 67

III. 班会議プログラム等資料・・・ 71

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・ 77

高病原性鳥インフルエンザの診断・治療に関する国際連携研究

（H22-新興-一般-014）

研究代表者 河内正治 国立国際医療センター 手術部部長

研究要旨：新型インフルエンザ（AH1pdm）によるパンデミックが世界中の脅威となったが、高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)は 80%に達する高い死亡率が特徴であり、主な死因はウイルス性肺炎からの ARDS である（Kawachi: JID, 2009）。この重症化要因である H5-ARDS の病態解明と診断／治療の研究は、パンデミックを考えると緊急を要する重大な社会的要請である。高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)は我が国でのヒト感染事例はないため、臨床例を得るためには国際医療協力が必須である。我々は、18 年度からベトナム国と連携し、鳥インフルエンザ（H5N1）感染における ARDS の共同研究を行ない、小児例では鳥インフルエンザ（H5N1）の ARDS は極めて重症化し劇症型 H5-ARDS となることを発表した（JID 2009）。一方、H5N1 死亡例サイトカインの分析については今年度に成果を公表した（J Infect (2011) 62; 104）。病理班は、当該病院で H5-ARDS 死亡例に直ちに対応できる体制を構築しており、22 年度も病理学者が訪問して連携を確約した。23 年度も症例集積を行ない、治療プロトコルを発動可能な状況にしておく（共同研究続行）。22 年度は国際連携地域として新たにインドネシア国を選定した。インドネシア国は鳥インフルエンザ（H5N1）感染などの実態に不明瞭な点が多く、臨床／疫学的／基礎の研究協力を得ることは大きな意味を持つ。河内が *Plenary Annual Scientific Meeting on Infectious Diseases IV Pertemuan Ilmiah HIV/AIDS Indonesia* にてベトナムでの H5-ARDS の臨床成果を発表し、臨床医や研究者と意見交換/情報収集を行なった。さらにインドネシアの感染症疾患の中心病院である Prof. DR. Sulianti Saroso Infectious Disease Hospital（Jakarta, Indonesia）にて、今後の共同研究について研究計画書を手渡した。インドネシア政府の承認が得られるまで数ヶ月を要するためにまだ結論は出ていないが、インドネシア国との共同研究が可能になれば臨床／疫学的に大きな突破口になると考えられ、23 年度の臨床班の重要課題の一つと位置づけている。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)は 80%に達する高い死亡率が特徴であり（Kawachi,S: JID, 2009）、その死因の大部分はウイルス性肺炎からの ARDS である。このインフルエンザ重症化要因である ARDS の病態解明と診断／治療の研究は、パンデミックを考えると緊急を要する重大な社会

的要請である。高病原性鳥インフルエンザ（H5N1)は我が国でのヒト感染事例はないため、国際医療協力が必須である。これら問題解明の目的で本研究班は結成され、以下の特徴を持つ。

1. 海外との連携. 1-1. ベトナム・ハノイの国立病院と連携:18 年度からの共同研究で臨床上の差異の発見（JID, 2009）、病理標本の解析

(JJID, 2008) などの成果を上げた。さらに鳥インフルエンザ (H5N1) 症例を集積／解析して現在の研究を発展継続する。今後迅速キットなどを用いたインフルエンザ H5N1 の疫学的研究に踏み込む。 1-2. インドネシア国との国際協力：22 年度に新たにインドネシア国を選定、インドネシア国との臨床／疫学的／基礎研究協力は大きな意味を持つ。 1-3. 治療法の開発：ベトナム国などの実際の臨床現場で有効と考えられる薬剤、呼吸管理法などの治療方法を現地医師団とともにこなう。 1-4 診断法の開発／改良：22 年度はインドネシア、ベトナムにおいて迅速診断法実践の共同研究計画を立案した。23 年度以降はこの計画を推進する。

2. 動物モデルによる治療法の検証. 我々が開発した ARDS 動物モデルを用いた治療実験。
3. 病理標本、及び培養細胞を用いた免疫組織学的病態解明。
4. サイトカイン／MPO／チトクローム C／ニトロ化合物などの変動の現地での定量。
5. 臨床班の試料から劇症型 ARDS 発症の特定マーカーとなる因子を抽出する。
6. 臨床班の試料からサイトカイン／MPO／ニトロ化合物などと調節にかかわる分子の特定。
7. インフルエンザ (AH1 pdm) の重症化例の臨床像／肺病理の解析。

以上の成果から、診断法の確立と新たな治療法の提案を含む「インフルエンザによる劇症型 ARDS の診断・治療の手引」書を作成する。

B. 研究方法

各分担者の報告参照、主任者が行った研究については成果の各項に記載。

C. 研究成果

倫理規定について

患者の血液・血清の使用に当たっては、主任研究者の該当部分については、国立国際医療研究センターの倫理委員会（以下「委員会」）規定に従い実施

した。患者の検体が派生することが予想される場合には、1) 研究計画を含む具体的な研究計画書、2) 主治医を含む共同研究者との合意文書、3) 患者とのインフォームドコンセントに関する実施計画概要を記載した書式を、予め「委員会」に提出し「委員会」の許可を得て実施した。患者個人情報はコード化し、ネットワークでの個人情報交換はしないなど、プライバシー情報の漏洩がないよう万事を期した。分担研究者において実施する場合も同様の手順により行い、所属機関の倫理規定により許可を得て実施した。動物実験に関しては、動物実験計画書を所属機関の動物委員会（分担研究者においては当該機関の同等委員会）に提出し、その許可を得て動物愛護のもとに研究を実施した。

高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)は重症の肺急性呼吸障害 (ARDS:急性呼吸窮迫症候群) を短時間で誘発し、短期間で高い死亡率をもたらすことが特徴である (Kawachi,S: JID, 2009)。その死因の大部分はウイルス性肺炎からの劇症型の ARDS である。この重症化要因である ARDS の病態解明と診断／治療の研究は、緊急を要する重大な社会的要請である。本研究では以下の目的にて研究を行い、最終的には 8. にてその成果を公表することが目標である。

1. 海外との連携. 1-1. ベトナム・ハノイの国立病院と連携 1-2. インドネシア国との国際協力 1-3. 治療法の開発 1-4 診断法の開発／改良
2. 動物モデルによる治療法の検証。
3. 病理標本、及び培養細胞を用いた免疫組織学的病態解明。
4. サイトカイン／MPO／チトクローム C／ニトロ化合物などの変動の現地での定量。
5. 劇症型 ARDS 発症の特定マーカーとなる因子の抽出。
6. サイトカイン／MPO／ニトロ化合物などと調節にかかわる分子の特定。
7. 鳥インフルエンザ (AH1 pdm) の重症化例の臨床像／肺病理の解析。
8. 診断法の確立と新たな治療法の提案を含む

「インフルエンザによる劇症型 ARDS の診断・治療の手引」書作成。

以下に主任者が主たる研究者として行った部分の研究手法と研究成果、ならびに各分担研究者の研究成果の概要をまとめた。

1. 臨床班分科会：劇症型 ARDS の病態解析に関する臨床分科会

臨床班として今年度は、(1) ベトナムにおけるインフルエンザ (H5N1) 感染症例を含む劇症型 ARDS 臨床例の解析 (prospective study) (ハノイの国立小児病院、国立熱帯感染症研究所スタッフと共に) (河内、布井、岡本、病理：佐多、中島)、(2) インドネシア国との国際協力 (河内、布井、岡本)、(3) 日本の臨床現場における ARDS の現状調査および ALI/ARDS に対する PMX-DHP の有用性 (本間)、(4) 日本、およびベトナムにおける H5N1 を含むインフルエンザ脳症について調査 (布井)、(5) インフルエンザ (AH1 pdm) の重症化例の臨床像/肺病理の解析、(6) 診断法の確立と新たな治療法の提案を含む「インフルエンザによる劇症型 ARDS の診断・治療の手引」書作成準備、以上 6 点を行なった。

1) ベトナムにおけるインフルエンザ (H5N1) を含む ARDS 臨床例の解析計画 (J-V FARDS)

(河内正治、松下竹次：国立国際医療センター、中島典子、佐多：国立感染症研究所、布井博幸：宮崎大学医学部、岡本達哉：熊本大学医学部、鈴木和男：千葉大学大学院医学研究院)

研究方法：ハノイの国立小児病院 (NHP-Hanoi: National Hospital Pediatrics)、および国立熱帯感染症研究所 (NIITD: National Institute of Infectious Tropical Diseases) との ARDS 共同研究計画書に基づいて、22 年度は先行的研究を行った。内容は、①インフルエンザ (H5N1) 感染を病因とする劇症型 ARDS (H5N1-FARDS) の臨床病態の解明 (河内、松下、布井、岡本、鈴木)、②H5N1-FARDS

を含む ARDS 症例検体の生体活性物質の測定 (鈴木、布井、岡本、河内)、③病理学的・組織学的解析 (佐多、中島、鈴木) である。

研究成果：2011/3 までに集積した先行的に集積できた症例データは 71 症例分で、3 例の H5N1 症例を含んでいる。解析可能症例は 67 例で、うちインフルエンザ感染が PCR にて証明された症例は 7 例、内訳は高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1) 3 例、パンデミックインフルエンザ A(H1N1) 3 例、季節性インフルエンザ A(H3) 1 例であった。H5N1 は 2/3 死亡、A(H1N1) は 3/3 死亡、A(H3) は混合感染を来とし、別要因で死亡した。また、この重症 ARDS 症例のうち、23 例に気道洗浄液から何らかのウイルスが PCR にて同定されており、中には Rhinovirus のようになりに非特異的な一般には肺炎 (ARDS) の原因とは考えられない病原も含まれていたところが特徴的であった (図 1)。さらにこのウイルス感染が証明されたウイルス肺炎と思われる症例の死亡率は異常に高く 78%以上に達しており、解析症例全体の死亡率が 45%以下である (30/67) ことを考えると、H5N1 の病態生理/重症化要因/治療を追求するにあたって、この辺りにも何らかの検討要因が隠されていると考えられた。今後さらに症例集積を重ねて解析/検討する。

No.	Gender	Age	FARDS	Prognosis	MOF	Days	IVIg (2g/kg)	Cause of ARDS
p1	M	4	Y	D	DOB 7.5y, DOA 10y	12		Pneumonia (H5N1)
p3	F	0.18	Y	D	+	10		Pneumonia (Rhinovirus)
p4	F	0.18	Y	D	+	13		Pneumonia (Rhinovirus)
p5	F	0.18	Y	D	+	6	Y	Pneumonia (Adenovirus)
p6	F	0.25	Y	D	+	8	Y	Pneumonia (Rhinovirus)
p7	F	0.18	Y	D	+	22	Y	Pneumonia (Rhinovirus)
p14	M	7	N/Y	A	-	18	Y	Pneumonia (H5N1)
p19	M	11	Y	D	-	10	Y	Pneumonia (H5N1)
p21	M	0.25	Y	D	-	22	Y	Pneumonia (Adenovirus)
p24	M	0.33	Y	A	-	41	Y	Pneumonia (RSV)
p25	F	0.15	Y	A	+	17		Pneumonia (RSV)
p26	F	0.5	Y	D	-	29		Pneumonia (RSV)
p38	M	2	Y	D	DOA 5y	19	Y	Pneumonia (A(H3)+Adenovirus)
p49	M	3	Y	D	DOA 10y	8	N	Pneumonia (H1N1)
p50	M	3	Y	D	DOB 7.5y, DOA 19y	9	N	Pneumonia (H1N1)
p51	F	8	Y	D	-	10	N	Pneumonia (H1N1)
p52	M	0.33	Y	D	DOA 18y, Ad	13	Y	Pneumonia (measles)
p61	F	0.3	Y	D	DOB DOA	34	Y	Pneumonia (CMV)
p62	F	0.3	Y	D	DOA 15y	43	Y	Pneumonia (CMV)
p63	F	0.6	Y	D	DOB DOA	29	Y	Pneumonia (Adenovirus)
p68	F	0.3	Y	A	-	43	Y	Pneumonia (CMV)
p69	F	0.2	Y	A	-	25	Y	Pneumonia (Rhinovirus)
p71	F	0.2	Y	D	DOA	25	Y	Pneumonia (Rhinovirus)

図 1 先行集積した重症 ARDS のうちウイルス肺炎と考えられた全症例 (2007/Oct. - 2011/Mar.)

一方、NHP においては 2009 年以降 H5N1 感染症例の入院は無い。したがって新たな H5N1 ヒト感染例は今年度も得られなかった。2007 年 10 月以降 2008 年 10 月までの NHP における ARDS の結果は *Journal of Infectious Diseases* に発表した (Kawachi S, et al. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome followed by avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children, *JID* 2009; 200: 510-515)。

1. NHP PICU に入院した ARDS 症例 (H5N1 感染症例を含む) で、年齢一か月以上、P/F 値 100 未満の症例を先行的に集積した。
2. 内訳は H5N1 感染 ARDS 症例 12 例と他病因 ARDS 27 例であった (total:39 例)。
3. H5N1 感染例では生存率が有意に低かった (13 日 vs. 32 日) (図 2)。
4. H5N1 感染例では受診時は他の ARDS 症例に比較して呼吸機能は保たれていた。
5. H5N1 感染症例で報告されている特徴的な血清検査値は同様であった。1) 白血球数の減少、2) 血小板数の減少、3) 肝トランスアミナーゼ値の上昇。
6. H5N1 感染 ARDS の病理診断は ARDS であるが、通常の ARDS とは死亡率など異なった臨床経過を呈し、われわれはこの差を明らかにするために劇症型 ARDS (Fulminant ARDS) (H5N1-FARDS) と命名した。

ハノイ国立小児病院に受診した全 H5N1 症例は、2003 年以降 13 例で、平均年齢 6.5 ± 3.8 歳、男：女=9：3 であった。ほぼ半数の 6 例に鳥との直接接触歴が確認された。死亡は 9 例、生存 3 例 (死亡率 70%) で、死亡までの期間 7-16 日であった (図 3)。

治療法については、従来のタミフル、ステロイドの標準治療方法に、ベトナムで使用可能な大量ガンマグロブリン療法 (2g/kg) を現地医師団と協

議の上開始したが、その後症例が得られなかったために有意差のある効果が得られなかった (図 4)。今後さらに症例を集積する必要がある。

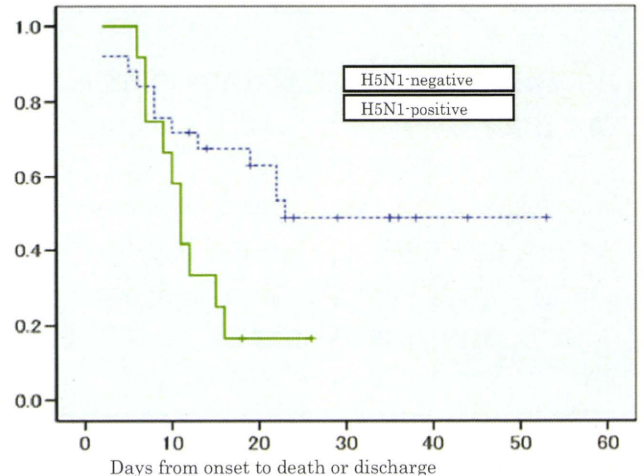


図 2 H5N1-FARDS 症例と ARDS 症例の生存率曲線 (Kaplan-Meier)

No.	Gender	Age	H5N1	Contact	Prognosis	IVIg (g/kg)	Tamiflu	Steroids	Days
1	F	12	Y	U	D	N	N	Y	7
2	M	5	Y	U	D	N	N	N	16
3	M	4	Y	U	A	N	N	N	20
4	M	10	Y	U	D	N	N	Y	11
5	F	5	Y	Y	D	N	N	Y	7
6	M	4	Y	Y	D	N	N	N	15
7	F	1	Y	Y	D	N	Y	Y	6
8	M	1.3	Y	N	D	N	Y	Y	9
9	M	11	Y	N	D	N	Y	Y	11
p1	M	4	Y	Y	D	N	Y	Y	12
10	F	9	Y	N	A	Y	Y	Y	26
p14	M	7	Y	Y	A	Y	Y	Y	18
p19	M	11	Y	Y	D	Y	Y	Y	10
Number of patients	M:F=9:4	6.5±3.8	13	6	D:A=10:3	3	7	10	12.9±5.9

図 3 ハノイ国立小児病院における全 H5N1 症例 (2003/Dec. - 2008/Mar.)

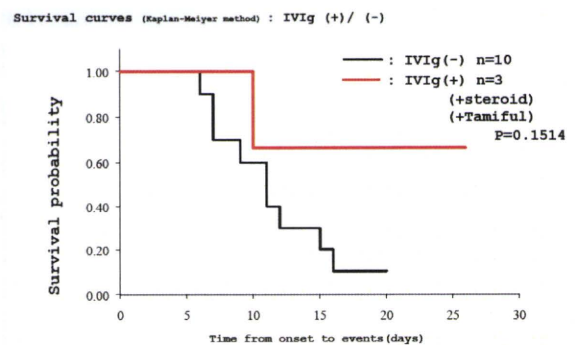


図 4 IVIg 療法とその生存曲線

病理学的検索

病理標本：症例 No.4 は発表した(JJID, 2008,)。
症例 p-1、p-19 は詳しい検索を現在行っている
(図 5, 6, 7)。

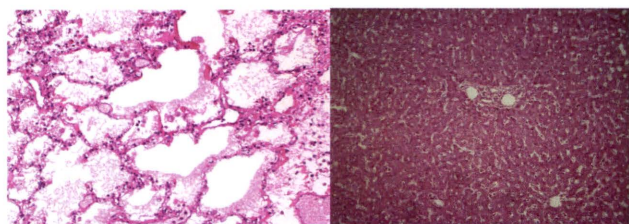


図 5 症例 No. p1:肺/肝臓の HE 染色

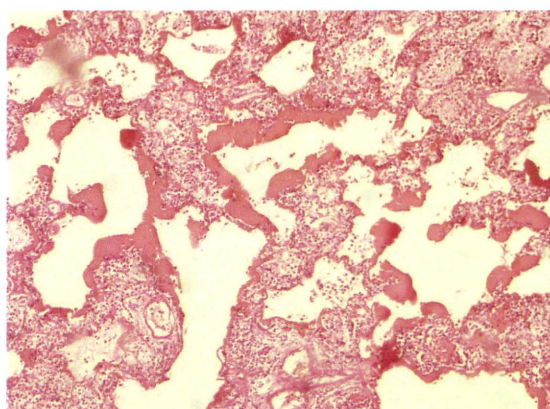


図 6 症例 No. p19 : 肺の HE 染色

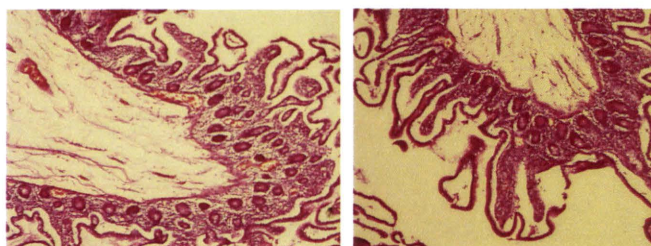


図 7 症例 No. p19 : 空腸の HE 染色

2) インドネシア国との国際協力 - 協力研究計画の作成 -

(河内正治、秋山透：国立国際医療センター、布井博幸：宮崎大学医学部、岡本竜哉：熊本大学)
研究方法：感染症疾患の中心病院である Prof. DR. Sulianti Saroso Infectious Disease Hospital (Jakarta, Indonesia) と、今後の共同研究について疫学的研究を視野に入れて研究計画書を提案した。

研究成果：インドネシアにおける鳥インフルエン

ザ(H5N1)感染状況について臨床医と討議し、その基本的情報を得るために、まず 2010/11/06 に *Scientific Meeting of HIV/AIDS and the Annual Plenary Meeting on Infectious Disease IV in Jakarta* (インドネシア感染症学会) にてハノイ国立小児病院の H5N1 症例 12 例について、提示/討論した。感染症学会では、感染症についてフィラリア、レプトスピラ感染症の重症型、鳥インフルエンザ (H5N1) のヒト感染例などについて報告があり、われわれはベトナムの症例の臨床を中心に発表した。インドネシアからは、鳥インフルエンザ (H5N1) のヒト感染例が重症化して ARDS から死亡する経過などが報告されたが、ほぼわれわれの知見と同様で、臨床症状/検査所見などに大きな差はなかった。その後、Prof. DR. Sulianti Saroso Infectious Disease Hospital (Jakarta, Indonesia) を訪問し、我々の研究班で作成した迅速キットを使用する臨床計画書について検討した (図 2)。インドネシアでは、迅速診断キットが高価で入手がたく、特に AH1-pdm や、A(H5N1)等については重症化して入院した時点で、いきなり (可能であれば) PCR にて確定診断をする、とのことで、迅速診断可能で経済的にコントロール可能な方法が望まれている。われわれの迅速キットは、季節性インフルエンザ A, B、パンデミック A(H1N1)、鳥インフルエンザ(H5N1)を三種類のキットを、一回のサンプルから得られた同じバッファー/溶出液で同時に検査可能としたシステムで、鳥インフルエンザ感染などの早期発見/早期鑑別診断に有効なように計画された (図 1)。パンデミック A(H1N1)迅速検査キットは秋山らと 21 年度に作成、鳥インフルエンザ(H5N1)キットは 22 年度に研究班として作成したものである。これらを用いて、ILI (influenza like illness)の疫学的研究を中心とした研究計画を立案し、サンプルの迅速キットの使用を提案した。

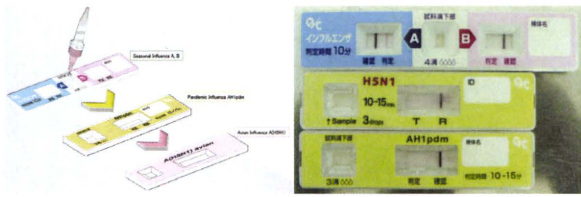


図 1 3 種類の迅速キット使用模式図 (左) との実際の測定 (季節性 A 陽性)

WHO に公表されているデータによれば、インドネシアにおける鳥インフルエンザ (H5N1) 感染者数は、2008 年 24 (20) 人、2009 年 21 (19) 人、2010 年 9 (7) 人であり、上記診断法の問題があるのではないかと考えられた。以上の他国における状況から、日本においても鳥インフルエンザ (H5N1) のような高病原性インフルエンザがパンデミック化したときの感染対策を、具体的に立てておく必要がある。特に、前回のパンデミックから得られた治療上の重要な成果などを生かした最終治療方針やトリアージも含めた具体的方針の決定と、高病原性インフルエンザについての治療法を含む具体的指針の作成が必要である。

101108
Confidential Protocol only for Listed Researchers

Protocol for the Study on the Survey of Influenza-like-illness (ILI) with Rapid Diagnosis Kit

Title: The Study on the Survey of Influenza-like-illness (ILI) using Rapid Diagnosis Kit
-Japan-Indonesia joint study-

Clinical Investigators:

Indonesia side: Dr Drg Nurriahary Suddia, Dr Sidi Wirokta, Dr Tony Soezano,
Dr Achmad Djohari, Dr Hendri Zafrid, Dr I Made Setawan
Japan side: Tarusya Okamoto, Hiroyuki Noma, Yuriko Egami and Shoji Kawachi

Institutions: Prof. DR. Sulianti Saroso Infectious Disease Hospital (SS-IDH),
National Center for Global Health and Medicine (NCGM)-Tokyo,
National Institute of Infectious Diseases (NIID)-Tokyo,
Kumamoto University-Kumamoto,
Miyazaki University-Miyazaki and MOH-Indonesia (Jakarta)

Background

The re-assortment of influenza viruses (H5N1pdm etc) in the swine has been to be highly pathogenic influenza virus with the ability of human-to-human infection. Recently another highly pathogenic influenza A/H5N1 virus was also identified as the swine from several points of Indonesia). We wonder if the co-infection of the influenza viruses might occur in the human body and the incidence of the novel highly pathogenic influenza virus like the re-assorted H5N1pdm and H5N1 might be much more higher under these condition. We developed the novel and rapid influenza diagnosis kit against H5N1pdm and H5N1 in addition to the conventional influenza viruses. In our project, we would like to propose the study on the survey of influenza-like-illness (ILI) with rapid diagnosis kits comparing with Indonesia and Japan, and the clinical studies about H5N1 influenza virus infection like in Hanoi.

In this project, we will use rapid diagnosis kit of four types of influenza virus on the same Nasopharyngeal swab specimens.

1. To diagnose influenza infection and identify the type of influenza in ILI (influenza like illness) patients.
2. To detect seasonal Influenza A or B virus, Influenza AH1pdm virus and Influenza A/H5N1 virus in Nasopharyngeal swab specimens.
3. To confirm the patient of double or triple influenza virus infections, if any.
4. If those specimens positive for Influenza A/H5N1, specimens should be analyzed with RT-PCR to confirm the diagnosis.
5. To analyze laboratory observations and the levels of several cytokines in the serum and Nasopharyngeal swab specimens.

図 2 研究計画書

3) ハノイでの ARDS/FARDS 症例における血中 KL-6 と cytochrome c を用いた病態解析

(布井博幸：宮崎大学医学部、河内正治：国立国際医療センター、鈴木和男：千葉大学大学院医学研究院、岡本竜哉：熊本大学)

ハノイ国立小児病院でのこれまでの調査研究から、H5N1 インフルエンザ感染では約 1 週間の高熱期をへて、急速に劇症呼吸促進症候群 (Fulminant Acute Respiratory Syndrome: FARDS) を呈することを明らかになった。今回、肺胞上皮細胞の障害のバイオマーカーである血中 KL-6 について、ハノイの ARDS/FARDS 患者において解析を行った。その結果、血中 KL-6 は肺の重症度示す指標とはなっていたが、必ずしも生死を分ける指標とはなっていなかった。血中 KL-6 は ARDS 患者でも異常高値を示す症例が多かったが、H5N1 インフルエンザによる FARDS 患者 3 名の内 2 名ではむしろ低下していた。しかし、正常コントロールや麻疹肺炎、H1N1pdm 肺炎では日本での報告と同等であり、個人や人種的な遺伝子変異の可能性や、熱帯地方での感染症や生活背景まで含めた更なる考察が必要である。一方、血中 cytochrome c は重症 ARDS/FARDS 患者でも高値ではない症例が多く、インフルエンザ脳症のような全身の臓器不全というより、ARDS/FARDS の病態は肺局所での激しい炎症による呼吸不全が主体の病態と考えられた。この事から、ARDS/FARDS 症例では心肺補助療法 (PCPS-ECMO) が重要な治療法になると考えられた。

4) 高病原性鳥インフルエンザの人感染症に対する診断/治療ガイドライン

(本間栄、菊地直、杉野圭史：東邦大学医療センター、布井博幸：宮崎大学医学部、河内正治：国立国際医療センター)

高病原性鳥インフルエンザに対するより簡便

な迅速遺伝子診断法の開発、関連バイオマーカーの検索ならびに、より有効な薬剤の選択、投与方法、呼吸管理法の開発が喫緊の課題である。そこで、新たな H1N1-pdm より病原性の高い鳥インフルエンザ pdm が到来した際の有用な臨床ガイドラインとなりうる汎用性と実用性の高い診断/治療の手引き作成を目指している。

対象疾患・記載内容は、H5N1 以外に H1N1 も含め、小児から成人患者に対応した内容にする。本研究班の特徴として基礎研究のより学術的な内容も含める。対象読者としてプライマリーケア医の診断の助けとなるものを目指す。

執筆・レビューワーはガイドライン作成委員のみならず班員の中からも選出する。各項目にレビューワー1-2名程度を設ける。

5) 2009 パンデミックインフルエンザウイルス感染症の病理学的解析

(中島典子、佐多徹太郎、長谷川秀樹：国立感染症研究所、河内正治、：国立国際医療センター、布井博幸：宮崎大学医学部、鈴木和男：千葉大学大学院医学研究院、岡本竜哉：熊本大学)

2009H1N1 パンデミックインフルエンザウイルス感染症 20 例の剖検組織を病理学的に解析した。慢性肺胞障害 (DAD) を呈したウイルス性肺炎は 5 例、気管支炎に急性の肺うっ血、肺水腫、肺出血などを呈した例は 5 例であった。その他、二次性の細菌性肺炎が 5 例、基礎疾患の増悪が 2 例、肺病変のない例が 2 例、解析不可が 1 例であった。ウイルス抗原は呼吸器官に限局し 10 例で陽性であったが、季節性インフルエンザと異なり肺胞上皮細胞に検出された例が 4 例あり、これらの組織所見はすべて硝子膜を伴う DAD であった。また肺胞領域から多量のウイルス核酸が回収された例においては、鳥型レセプターに親和性の高い D222G のクローンが major であることが

わかり、重症肺炎の病因の 1 つであると考えられた。

2. 基礎分科会：劇症型 ARDS モデルマウス使用の治療法開発ならびにサイトカイン、免疫機能、病理組織解析

1) インフルエンザ感染誘導の劇症型肺障害機構の解析とその治療薬の開発

(鈴木和男、長尾朋和：千葉大学大学院医学研究院)

鈴木らは、ハノイ国立小児病院における試料を解析して以下の知見を得た。1) H5N1 インフルエンザ感染誘導の劇症型肺炎にかかわる因子の解析：高病原性 H5N1 トリインフルエンザ感染の劇症型肺炎にかかわる因子を解析し、サイトカイン IL-12p40、TNF レセプター 2 (TNFR2) および好中球ライソゾーム酵素 Myeloperoxidase (MPO) の活性上昇が認められ発表した (Phung *et al.*, *J Infect* 2011; **62**: 104-108)。一方、マウスモデルを使用して治療法開発実験を行なった。2) H1N1 感染により誘導される劇症型肺炎モデルを使った治療薬の検討：H1N1(PR-8)感染によって誘導した劇症型肺炎モデルマウスの初期の肺腔には、ケモカイン KC, MIP-2, MCP-1 の上昇が認められ、MPO 欠損マウスでは PR-8 の増殖抑制と病態の軽減が認められた (投稿中)。これらの結果から、新構造マクロライドライブラリーの 1056 種類を使って好中球の MPO 放出阻害効果を示す複数の物質を見出した。数種類を PR-8 感染誘導の劇症肺炎モデルマウスに投与し、肺組織でのウイルスの核酸量および延命効果が認められた。以上から、高病原性 H5N1 トリインフルエンザによって感染誘導される劇症型肺炎の誘導因子が挙げられ、インフルエンザウイルス感染誘導による劇症型肺炎モデルに対する新構造マクロライドの治療薬の

候補が浮かび上がった。

2) インフルエンザウイルス感染に対する宿主側抵抗性因子とその誘導発現系による解析

(大島正道:国立感染症研究所)

大島は、細胞のウイルス抵抗性因子について培養細胞を用いて検討した。外部からのウイルス感染に対して宿主側ではインターフェロン、MxA, OAS, Fas など感染防御に働く宿主遺伝子が誘導され感染に対抗する。一方インフルエンザウイルスはウイルス蛋白 NS1 を発現し宿主の抵抗因子発現を抑制し細胞を自らの複製の場に改変する。気管支系の細胞株 NCI-H292 はインフルエンザウイルスを排除できるが肺胞系の細胞株 A549 は排除できず死滅する。ジーンチップによる解析の結果インフルエンザウイルス感受性の A549 細胞ではウイルス感染誘導遺伝子(VSG)の発現は抵抗性の NCI-H292 細胞に比べて抑制されている。細胞のウイルス抵抗性因子の誘導発現の相違が一次防御における結果の相違をもたらしていることが示唆される。VSG の誘導発現の系を作製してこのメカニズムを解析している。

ウイルス感受性 A549 細胞にインフルエンザウイルスを感染すると一部に死滅を免れる細胞を見いだした。その細胞をクローン化してウイルス感染の抵抗性メカニズムを解析している。

3) FARDS マウスモデルを用いた発症病態の解析と治療薬の開発

(川上和義:東北大学医学部)

これまでに川上らは、Natural Killer (NK) T 細胞の活性化剤である α -galactosylceramide を気管内に前投与したマウスに LPS を投与することで、急性呼吸窮迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS) に特徴的な病理所見である Diffuse Alveolar Damage (DAD) を呈するモデル

マウスを作成することに成功した。今回は、このモデルを用いることで、シベレスタットナトリウム、ガンマグロブリン製剤、マクロライド薬 (クラリスロマイシン、新規エリスロマイシン誘導体) についてその治療効果を検証したが、致死性 ARDS に対する治療効果を示すことができなかった。今後は、投与条件などさらに検討する必要性があると考えられた。一方、インフルエンザウイルス誘発 ARDS の病態により近いモデルを作製する目的で、LPS の代わりにインフルエンザウイルス A/H1N1 あるいは TLR7 リガンドを投与したところ ARDS を発症することがなかったことから、I 型インターフェロンに着目しその治療効果について解析を行った。上記 ARDS モデルマウスにヒト IFN- α /D を投与したところ、生存期間の延長、肺における DAD の改善、湿乾肺重量比の低下、肺内 IFN- γ 産生の低下が観察された。これらの結果から、I 型インターフェロンが抗ウイルス作用に加え、抗炎症作用によって高病原性鳥インフルエンザウイルス感染にともなう劇症型 ARDS の治療薬の候補になりうると考えられた。今後さらに詳細な検討が必要である。

4) 非炎症性マウス劇症肺炎モデルにおけるマクロファージの解析

(山本健二:国立国際医療研究センター研究所臨床研究センター)

山本らは、近年腹腔マクロファージを中心に研究した結果、ケモカインレセプターとそのライガンドが腹腔マクロファージの発生に極めて重要な役目を担っていた事をつきとめた。そこで本研究においては、本研究主任研究者である河内らの人工呼吸振動を利用した非炎症性マウス肺炎モデルにおける、マクロファージの解析を行う事を目的とした。特に非炎症性肺炎におけるケモカインやサイトカインの変化について検討し、好中球

やリンパ球と異なるマクロファージの時間的挙動について、検討した。結果、本研究に於ける肺胞マクロファージが、ケモカインレセプターの発現が骨髄のマクロファージと殆ど変化無いことが確認された。この結果はこれまでの予想を覆すものであり、この結果こそが肺胞マクロファージの特徴と考えられる。今後非炎症性マウス肺炎モデルの解析によって原因と結果を明らかにすることが可能であると考えられた。

5) 小児致死性 ARDS および鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質中の 3-ニトロチロシンの解析

(赤池孝章、岡本竜哉：熊本大学大学院医学薬学研究部)

赤池らはこれまで、マウスのインフルエンザウイルス肺炎モデルを用いて、NO・ROS による生体分子の酸化・ニトロ化修飾について解析を行ない、感染肺局所にて 3-ニトロチロシン (3-NT) や 8-ニトログアニン関連化合物が生成することを、証明し病態との関連性について報告してきた。そこで本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) および新型インフルエンザウイルス (AH1pdm) 感染症を含む小児の致死性 ARDS 症例における血漿蛋白質中の 3-NT の HPLC-ECD 法による解析を行った。2008-2009 年にベトナムハノイ国立小児病院にて入院加療を受けた ARDS 症例 (49 検体・40 症例) と非 ARDS 症例 (15 検体・15 症例) を対象とし解析した。ARDS 検体において有意に高いレベルの血漿蛋白質 3-NT の生成を認め、特にインフルエンザウイルス感染 ARDS 例においては非感染 ARDS 例に比べてより高い傾向が見られた。また 3-NT のレベルは、死亡例に比べ生存例にてより高く、また多臓器不全がない症例にてより高い傾向がみられた。プロテオミクス解析にて、ニトロ化の標的蛋

白質として、アルブミンやフィブリノーゲンといった血漿蛋白質が同定された。これまで一般に用いられてきた 3-NT の検出法は、免疫染色法や ELISA 法といった抗体を用いる方法であるが、定量性や特異性に問題があることが指摘されている。HPLC-ECD 法は、抗体に依らない定量的かつ特異的な検出法で、3-NT のバイオマーカーとしての応用において、有用なツールになり得るものと期待される。

6) Direct RT-LAMP 法による H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス遺伝子検査系の構築

(影山 努：国立感染研究所)

リアルタイム RT-PCR 法やコンベンショナル RT-PCR 法による遺伝子検査法は、以前に我々が構築した検査法を含め、インフルエンザウイルスの型・亜型を特異的かつ高感度に検出する事は可能であるが、検体からの RNA 精製が必要など、検査手技も煩雑で反応にも特殊機器を必要とするため、またラボコンタミネーションによる偽判定を防止するために検査設備の整った実験室でしか検査が行えない。現在、世界中に広がっている H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスによるヒトへの感染に対する診断や治療方針決定および感染拡大防止や地域の感染症対策を行うためにも、患者にできるだけ近い場所、いわゆる Point of care 診断による型(A 型および B 型)および亜型(H1pdm09、H3、H5 など)特異的な迅速・高感度なインフルエンザウイルス遺伝子検査系の構築が非常に重要である。

現在、世界中の家禽や野鳥で流行し、時折ヒトへの感染例も見られる H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスは、赤血球凝集素

(HA)の遺伝的系統から大きく分けて 4 つの Clade (1, 2.1, 2.2, 2.3)に分類(さらに 2.1 は 2.1.1 ~2.1.3、2.3 は 2.3.1~2.3.4 に分類)する事ができる。我々は以前に、栄研化学株式会社との共同研究によりこれら全ての Clade が検出できる H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス診断キットの構築を行っている。また、従来からあるコンベンショナル RT-LAMP 法を一部改良し、検体をバッファーに懸濁するだけで、検体からの核酸精製を必要とせずに、検体採取から診断まで約 40 分以内で新型インフルエンザウイルス(H1pdm09)および A 型インフルエンザウイルスを検出できる Direct RT-LAMP 法による遺伝子診断系の開発も行っている。本研究では H5 亜型遺伝子検査系にも Direct RT-LAMP 法を導入し、より簡便・迅速・高感度に、かつ高い特異性を有する H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子診断系の開発を行った。

D. 考察

インフルエンザ (H5N1) は、季節性のインフルエンザにはない病態を示し、病理解剖所見から肺にはウイルスは検出困難であったが、我々はハノイの症例についてウイルスを証明した報告を行った(JJID, 2008)。また、かなり初期段階での死亡例が多数報告されており(Human Pathol 2005, NEJM 2005/2008, CCM 2006)、その病態から ARDS の誘発が主要な病因となり死因となっていることがわかってきている。このことから、インフルエンザ (H5N1) の脅威は極めて大きく、昨年の AH1 パンデミックの教訓を生かして、高病原性パンデミックを見据えた緊急の行政対応が必要である。

わが国では、インフルエンザ (H5N1) 患者の発生はなく病態を直接解析できないため、海外と

連携してインフルエンザ (H5N1) 症例の臨床データ及び病理学的なデータを得て病態を解析すること、および、H5N1-FARDS に特徴的な、多臓器不全を伴わない肺胞の広範囲な破壊を主とした、劇症型 ARDS の動物モデルを用いた治療法の開発/検証、以上の根本的な研究が必要である。われわれの研究班では、これまでの研究成果をふまえて、これらの H5N1 に対する病態解析/治療法の開発・検証/疫学的解析を行なってきた。22 年度は、まず海外医療連携の強化を意図し、複数国との連携を試みた。特に、鳥インフルエンザ (H5N1) の新規発生症例がベトナムではなかったため、治療法の検証は未だ不十分であり、新規症例の開発が必要である。そこで、今までの研究成果を利用してベトナムとの連携を強化するとともに、インドネシアの中心的感染症病院と共同研究の申し出を行なった。インドネシアは、周知のように鳥インフルエンザヒト感染例は WHO への報告数においても、また潜在的感染者数も非常に多いと考えられている地域である。今回は、われわれが秋山を中心に開発した迅速検査キットを用いての共同研究の提案であったが、今後確定診断も迅速に可能な遺伝子診断法の開発も影山を中心に研究中である。

21 年度までに劇症型 ARDS モデルマウスとして感染モデル、器械的損傷モデル、化学的損傷モデルの 3 種の作成終了し、21 年度にベトナムとの共同研究計画の 20 年末までの臨床解析結果を報告 (JID 2009; 200: 510-515)、22 年度には H5N1 患者サイトカインの解析を終了し報告した (Phung *et al.*, J Infect 2011; 62: 104-108)。H5N1-FARDS ではサイトカインの動向が一般の ARDS とは異なること、また呼吸機能検査/臨床症状からは発症時から受診時までには一般の ARDS が呼吸機能の障害が酷いが、H5N1-FARDS ではその後急速に悪化して死に至ること (死亡率 48%vs.83%) が証明できたこ

とは大きな前進である。これらの成果から、とくに鳥インフルエンザ（H5N1）の臨床病態が明確化され、一般的な ARDS との差異が明らかになってきた。

これらの臨床上の新しい知見を踏まえて、22年度はハノイ国立小児病院においてのさらなる Bio-Markers（ニトロ化物質、チトクローム C など）の測定を行なった。また、完成した3タイプの動物モデルを用いて、臨床病態から推定されるインフルエンザ（H5N1）に効果あると考えられる治療法について、治療実験に取り掛かり、LPSモデルと VILI モデルで抗炎症薬であるシベレスタットの有効性が検証されつつある。これらの結果から、臨床的には安全性がすでにある程度確立されている抗炎症薬などが候補に挙げられ、また抗菌薬の治療効果についても治療実験を行なっている。H5N1-FARDS の治療薬としては一定の治療効果も得られたが症例数の不足から有意な結果は得られていない抗炎症薬など、臨床面からは今後さらなる鳥インフルエンザ臨床症例の集積が必要と考えられる。

E. 結論

インフルエンザ（H5N1）感染による劇症型 ARDS 患者の病態解析とその原因を究明することは将来のパンデミック対策としても重要であり、その目的に向かって、臨床・基礎医学両面からの緊密な提携をもった研究が不可欠である。本研究班では、海外発生地域（ベトナム／インドネシア）におけるヒト H5N1 症例と劇症型 ARDS 病態のモデル動物を使用して、インフルエンザ（H5N1）型 ARDS の迅速特異診断および治療法を提案し、「手引き」等を作成してその知識を広く人口に膾炙することが最終目標であり、今後もこの目的に沿ったさらなる研究展開を予定している。

研究協力者および研究アドバイザー

分担研究者以外に、本研究においては以下に述べる施設／研究者に研究協力者およびアドバイザーとして参加していただいた。

1) 臨床分科会

松下竹次（国立国際医療センター、医長）、
平橋淳一（東京大学病院腎臓内科、助教）、
丸茂丈史（東京大学医学部腎臓内分泌内科、助教）
前原康宏（国立国際医療研究センター、医長）
Nguyen Van Kinh（NHITD Hanoi）
Nguyen Hong Ha（NHITD Hanoi）
Nguyen Thanh Liem（NHP Hanoi）
Luong Thi San（NHP Hanoi）
Phung Thi Thuy（NHP Hanoi）

2) 基礎分科会

赤川清子（北里研究所、客員教授）
秋山透（国立国際医療研究センター、感染症制御研究部室長）
星野昭芳（国立国際医療研究センター研究所、流動研究員）
荒谷康昭（横浜市立大学大学院、教授）
永田典代（国立感染症研究所、主任研究官）
長谷川明洋（山口大学、講師）
古屋博行（東海大学医学部、准教授）

3) アドバイザー

小川道雄（市立貝塚病院、総長）
藤倉敏夫（慶応義塾大学医学部）

F. 健康危険情報

1. ベトナムでは2010年5月までに4例のインフルエンザ（H5N1）感染例が報告された（2例死亡）が、その後はヒトインフルエンザ（H5N1）発症の報告は無い。3月末現在において、ベトナムの研究ネットワークから、ヒト→ヒト感染などの従来と異なる新たな脅威となる情報は届いていない。

2. インドネシアにおいては、本年度末においても相変わらずインフルエンザ (H5N1) ヒト感染例、および疑い例の報告は引き続けている。インドネシア (人、スマトラ) : 疑い例 2 例がパダンで入院、患鳥との接触歴あり、インドネシア (人と鳥、西ジャワ) : 鳥の集団発生拡大、3 万羽以上に影響、41 人の人感染例、等の報告がインドネシア地方紙へ報道されているが、WHO からこの件についての新たなヒト感染例発症の報告は無い (3. 参照)。
3. WHO が 2011 年 3 月 7 日に発表したヒトインフルエンザ (H5N1) 症例数は、2003 年以降 528 例となった (311 例死亡、死亡率 58.9%)。2011 年に入ってすでに 12 例 (5 例死亡) が報告されている。昨年来エジプトでの発症件数が多いが、エジプトは死亡率が低い (2009-2011/3 : 76 例報告、18 例死亡 : 死亡率 : 23.7%)。抗ウイルス薬の早期投与と罹患年齢が比較的高いことが死亡率を下げているとする情報もある。本年に入って WHO からの発症報告はインドネシア (1/1 : 死亡数 / 症例数)、エジプト (8/1)、カンボジア (3/3) からである。
- G-CSF, MCP-1, MIP-1 β . *Jap J Intens Care Med* 17: 179-184, 2010.
- 2) Hiroyuki Furuya, Shoji Kawachi, Mika Shigematsu, Kazuo Suzuki, Tetsu Watanabe. Clinical factors associated with severity in hospitalized children infected with avian influenza (H5N1). *Environ Health Prev Med* May 2010. (DOI: 10.1007/s12199-010-0158-x)
- 3) Hidenori Yasuda, Nobuaki Yoshizawa, Masaaki Matsumoto, Shoji Kawachi, Kazuo Suzuki. Transmission of Pandemic H1N1 Influenza in Japan in 2009: Simulated Measures and Post-Analysis. *Proceedings of Applied Mathematics International Conference 2010 (AMIC2010) & The 6th EASIAM Conference* 110-116, 2010.
- 4) Thuy T.B.Phung, San T. Luong, Shoji Kawachi, Hiroyuki Nunoi, Liem T. Nguyen, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Interleukin 12 and myeloperoxidase (MPO) in Vietnamese children with acute respiratory distress syndrome due to Avian influenza (H5N1) infection. *J Infect* 62:104-108,2011
- 5) Shoji Kawachi, T. Matsushita, T. Sato, H. Nunoi, H. Noguchi, S. Ota, N. Kanemoto, K. Nakatani, T. Nishiguchi, A. Yuge, H. Imamura, H. Kitajima, K. Narahara, K. Suzuki, T. Miyoshi-Akiyama, T. Kirikae. Multicenter prospective evaluation of a novel rapid immunochromatographic diagnostic kit specifically detecting influenza A H1N1 2009 virus. *J Clin Virol*, in press, 2011.
- 6) 家研也、吉澤篤人、平野聡、泉信有、放生雅章、杉山温人、小林信行、工藤宏一郎、前原康宏、河内正治、宮越浩一 : 気管支喘息合併

G. 研究発表

(主任研究者分のみ、分担研究発表については各項参照)

1. 論文発表

- 1) Yuka Osaki, Yasuhiro Maehara, Masaki Sato, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Tomokazu Nagao, Kazuo Suzuki, Shoji Kawachi. Analysis of cytokine/chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluids from patients with acute respiratory distress syndrome: Increase in IL-6,

全身麻酔症例の周術期発作に関する検討. アレルギー 59(7): 831-838, 2010.

7) 河内正治: 新型インフルエンザ (今月の用語). 医療 64(10): 653-654, 2010.

8) 朝山京子、松谷厚子、佐々木立朗、伊藤倫子、前原康宏、河内正治: 自発呼吸下に全身麻酔をおこなった外傷性気管損傷の1例. 麻酔と蘇生 46 (4) : 73-75, 2010.

9) 河内正治、丸谷晶美: 人工呼吸中の栄養管理. 日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌 20(2): 120-124, 2010.

2. 学会発表

【国際学会】

1) Yasuhiro Maehara, Shoji Kawachi, Tomokazu Nagao, Yasuaki Aratani, Masamichi Ohshima, Kazuo Suzuki. Contribution of cytokines/chemokines to ventilator-induced lung injury associated with myeloperoxidase in mice. 13th Asian and Australasian Congress of Anaesthesiologists (Fukuoka, Japan), June, 2010.

2) Shoji Kawachi, Hiroyuki Nunoi, Kazuo Suzuki, San Luong Thi, Liem Nguyen Thanh. Human infection of Avian Influenza A(H5N1) induces severe ARDS. - From the Cases of National Hospital of Pediatrics in Hanoi, Viet Nam -. Scientific Meeting of HIV/AIDS (PERIL of HIV/AIDS) and the Annual Plenary Meeting on Infectious Disease IV (PLASMID IV)(Jakarta, Indonesia), November 5-6, 2010.

【国内学会】

1) 河内正治. インフルエンザウイルスの話 - 高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) を中心に -. 第9回島根ヘルペス研究会、出雲市、5月6日、2010.

2) 志賀由佳、花田 真毅、佐藤 正規、前原 康宏、河内 正治、鈴木 和男、鳥インフルエンザ (H5N1) 感染 ARDS における重症化要因の検討. 第57回日本麻酔科学会学術集会、福岡市、6月、2010.

3) 山下 陽子、青山 千賀子、松谷 厚子、伊藤 倫子、前原 康宏、河内 正治. 国立国際医療センターにおける活動性結核患者手術の集計. 第57回日本麻酔科学会学術集会、福岡市、6月、2010.

4) 朝山 京子、松谷 厚子、志賀 由佳、平尾 亜衣、佐藤 正規、河内 正治. 緊急手術症例での炎症と出血凝固機能検査連関. 第57回日本麻酔科学会学術集会、福岡市、6月、2010.

5) 河内正治. インフルエンザ (H5N1) 症例にIVIg 療法は効果があるか? 第16回MPO研究会 仙台市 1月 2011

6) 河内正治. 栄養と結核-病態の悪化は体の必要エネルギーを増加させる 第16回MPO研究会 仙台市 1月 2011 河内正治.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他 : 特になし

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

ハノイでの ARDS/FARDS 症例における血中 KL-6 と cytochrome c を用いた病態解析

研究分担者 布井博幸 宮崎大学医学部生殖発達学講座 小児科学分野教授

研究協力者 河内正治：国立国際医療センター

Thuy T.B. Phung, San T. Luong, Liem T. Nguyen：ハノイ国立小児病院、ベトナム

岡本竜哉：熊本大学

本間栄：東邦大学医療センター

鈴木和男：千葉大学

原田雅子、山田 愛、今村秀明、水上智之：宮崎大学小児科

研究要旨

ハノイ国立小児病院でのこれまでの調査研究から、H5N1 インフルエンザ感染では約1週間の高熱期をへて、急速に劇症呼吸促迫症候群(Fulminant Acute Respiratory Syndrome: FARDS)を呈することを明らかになった(1)。今回、肺胞上皮細胞の障害のバイオマーカーである血中 KL-6 をハノイの ARDS/FARDS 患者の解析を行った。その結果、血中 KL-6 は肺の重症度示す指標とはなっていたが、必ずしも生死を分ける指標とはなっていなかった。血中 KL-6 は ARDS 患者でも異常高値を示す症例が多かったが、H5N1 インフルエンザによる FARDS 患者3名の内2名ではむしろ低下していた。しかし、正常コントロールや麻疹肺炎、H1N1pdm 肺炎では日本での報告と同等であり、個人や人種的な遺伝子変異の可能性や、熱帯地方での感染症や生活背景まで含めた更なる考察が必要である。一方、血中 cytochrome c は重症 ARDS/FARDS 患者でも高値ではない症例が多く、インフルエンザ脳症のような全身の臓器不全というより、ARDS/FARDS の病態は肺局所での激しい炎症による呼吸不全が主体の病態と考えられた。この事から、ARDS/FARDS 症例では心肺補助療法が重要な治療法になると考えられた。

A. 研究目的

はじめに：我々はこれまでハノイ国立小児病院でH5N1インフルエンザ感染によりFARDS症状を呈する症例の臨床的な解析を後方および前方視的に行ってきた(1)。このプロジェクトでは、H5N1インフルエンザ感

染でFARDSの病態を示す3症例の対象としてARDSで一時的でも $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$ を満たす症例も同時に解析し、血中サイトカインの比較解析を報告している(2)。今回、肺胞上皮細胞の障害のバイオマーカーであるKL-6について検討し、日本ではあまり経験

しないような異常高値を示すARDS症例を多く経験した。今回、血中KL-6でARDS/FARDS患者の重症度判定が可能か、また何故ハノイで血中KL-6異常高値症例が多いのかについて解析を行った。合わせて、昨年報告した血中cytochrome c (3) とも比較検討し、病態解析を行った。

B. 研究方法

国立ハノイ小児病院とのプロジェクトに従い採取された血清および喀痰検体について、cytochrome c (cyto-c)測定およびサイトカインを含めた検査を行った (2)。KL-6測定はKL-6 海外用EIAキット(セティ株式会社)を用いて行った。国内でのH1N1pdmインフルエンザによるARDSに関しては通常の臨床検査として行った。

C. 研究結果

今回、ARDSを呈した患者65名中、血中KL-6が測定できた56名とH5N1インフルエンザ感染でFARDSを呈した3名の患者について検討した。ハノイでの健常者10名での血中KL-6は 37 ± 51 (0-140)U/mlであった。生存者30名の年齢は 33 ± 57 ヶ月、入院病日数は 25.4 ± 10.5 日で採血は入院後 6.9 ± 5.6 日(1-24日)に行われており、その時の血中KL-6値は $8,950 \pm 1429$ U/mlであった。一方死亡者27名の年齢は 15.7 ± 31 ヶ月、入院病日数は 16.5 ± 10.5 日で採血は 6.4 ± 4.9 日(1-20日)に行われ、KL-6値は $8,531 \pm 1665$ U/mlであった(図1)。またH5N1陰性と陽性症例でのKL-6は 8729 ± 1114 (n=54) vs 6212 ± 5023 (n=3)U/mlと有意差は認められなかった(図2)。

ハノイでの正常コントロール10名の血中KL-6は日本での正常域(<250 U/ml)であった。また、麻疹肺臓炎ではKL-6<10,000 U/ml、

H1N1pdmインフルエンザ感染症でのARDS患者でも低値(<10,000U/ml)を示している点は、日本と同じであった。しかし、ハノイでのARDS患者の血中KL-6値は、これまでの報告と比較すると、約2-6倍高かった(4,5)。宮崎大学入院中で間質性肺炎を呈しているDown症候群患者やH1N1pdm肺炎を呈した症例で血中KL-6異常高値を示したので、経過を(図3)に示した。

血中cyto-cは0-30/30-100/100-500 ng/mlを各々低値(L)、中等度(M)、高度(H)上昇群とし、生存症例を図4、死亡例を図5に血中KL-6と同時に示した。その結果、生存者でKL-6高値の症例で血中cyto-cが高値である症例はp39のみで、却ってKL-6が1000U/ml以下の症例でcyto-c高値者が3名と多かった(図4)。死亡者でもKL-6高値の症例で血中cyto-cが高値である症例はp2のみで、却ってKL-6が1000U/ml以下の症例でcyto-c高値者がp19,p34, p38の3名と多かった(図5)。この他、H5N1陽性症例ではKL-6が10000U/mlの比較的低値の2名の内1名がcyto-c高値で、KL-6が16000U/mlを示した症例ではcyto-cは中等度の上昇であった(図4,5)。

D. 考案

今回のハノイでのARDS/FARDS患者では生存または死亡された患者間での血中KL-6値の有意の差は認められなかった(図1)。血中KL-6は肺の重症度示す指標とはなるが、必ずしもこれまでの文献(4,5)のように生死をわける指標とはならなかった。

H5N1インフルエンザに罹患し、FARDS症状を示した3名とARDS症状を示した54患者についても有意なKL-6の違いは認められなかった(図2)。今回のインフルエンザ感染症のように、II型肺胞上皮細胞に感染し、

障害を与えるような重症感染症例では、むしろ、KL-6は低値を示す(図5)と考えられる。

ハノイでのARDS患者の血中KL-6値は、これまでの報告と比較すると、約2-5倍高値を示していた(4,5)。一方で、正常コントロールや麻疹肺炎、H1N1pdm肺炎では日本の症例と同等であった。間質性肺炎を呈しているDown症候群患者では血中KL-6異常高値を示した。抗KL-6抗体はNCU1蛋白の糖鎖部分を認識している。一方でMCU1遺伝子には糖鎖と蛋白の構造の違いとMUC1 pre-mRNAは9アミノ酸の違うスプライス変異体、20個のアミノ酸モチーフ内にタンデムリピート数の違う変異体(VNTR)なども報告されている(6)。さらに、遺伝子のSNPによって(MUC1 568 A/G変異)血中KL-6レベルに影響しており、個人差がある事が知られている(7)。ハノイで経験したARDS/FARDS患者での血中KL-6の異常高値については、個人的や人種的な遺伝子変異が関与しているのかもしれない。同時に、熱帯地方での感染症や生活背景まで含めた更なる考察が必要だと考えられた。

血中cyto-cを、KL-6と同時に測定できた症例では、生存例や死亡例でもKL-6高値が必ずしもcyto-c高値症例ではなく、ARDS/FARDSは肺局所での激しい炎症による呼吸不全が主体の病態であり、インフルエンザ脳症のように多臓器不全による死亡ではないと考えられた。

E. 結論

ハノイのARDS/FARDSを呈した患者での血中KL-6の異常高値については、個人や人種的な遺伝子変異の可能性や、熱帯地方で

の感染症や生活背景まで含めた更なる考察が必要だと考えられた。

また、血中KL-6やcyto-cの結果より、ARDS/FARDSは肺局所での激しい炎症による呼吸不全が主体の病態と考えられ、しかもARDS/FARDS患者とも回復された症例では十分な肺機能が回復する事から、一時的にも経皮的心肺補助(PCPS)治療を導入する事で、H5N1感染によるARDS/FARDS病態を脱する事ができると思われた。

図1。生存/死亡者間のKL-6比較

図2。H5N1陽性と陰性群でのKL-6比較

図3。我々の症例でのKL-6、SP-Dと他のマーカーの変化

図4。生存者(n=29)のKL-6値

図5。死亡症例(n=27)のKL-6値

参考文献

- 1) Kawachi S, et al., Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome and avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. *J Infect Dis.* 200(4): 510-5. 2009
- 2) Phung TT, et al., Interleukin 12 and myeloperoxidase (MPO) in Vietnamese children with acute respiratory distress syndrome due to Avian influenza (H5N1) infection. *J Infect.* 62(1): 104-6. 2011
- 3) 布井博幸ら、ARDS患者での病態解析、H21年度河内班分担報告書
- 4) Ishizaka A et al., Elevation of KL-6, a lung epithelial cell marker, in plasma and epithelial lining fluid in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L1088-L1094, 2004.