

## B. 研究方法

2010年3月末までに、厚生労働省のホームページに公開された pH1N1 による死亡例のうち、満20歳未満のものは41例であった。調査チームのうち1名以上が担当医の医療施設を訪問して面接を行うとともに、調査票を用いてデータの収集を行った。了解が得られた場合は一部の画像検査についてデータの提供を受けた。死因については臨床経過や検査所見などに基づいて総合的に考察し、調査チームのコンセンサスによって決定した。今回は死因を、予期せぬ心肺停止（突然死）、急性脳症、呼吸不全、心筋炎、ゼプシス、偶発に分類した。

臨床情報の収集に当たっては、個人を特定できる情報を除外して行い、倫理面に配慮した。

## C. 研究結果

### 1) 小児死亡例

死亡例の男女比は25:16で、死亡時の平均年齢は59か月であった。1つ以上の基礎疾患を14例に認め、そのうち神経系疾患を11例に、呼吸器系疾患を9例に認めた。インフルエンザの診断は、39例で発熱から2日以内に行われていた。34例でインフルエンザの診断当日または翌日に生命危急事態が起きていた。発熱から死亡までの期間は中央値2日で、28例が発熱から3日以内に死亡していた。

死亡例の推定死因は、予期せぬ心肺停止（突然死）15例、急性脳症15例、呼吸不全6例、心筋炎2例、ゼプシス2例、偶発1例であった。

突然死の15例と急性脳症の15例については後述する。呼吸不全の6例は年齢の中央値が78か月であった。5例で基礎疾患を有しており、4例が寝たきりであった。全例で胸部写真上肺炎像を呈しており、急速に低酸素血症に陥る経過を辿った。2例は

pH1N1に罹患する前に細菌性肺炎で入院していたが、pH1N1に罹患後に急速に呼吸不全に陥り死亡した。心筋炎の2例はどちらも12歳以上であり、突然の心停止で搬送されていた。搬送時からCK値が9000IU/l以上であった。ゼプシスの2例は発症時からショック状態で、急速に多臓器不全に陥っていた。偶発の1例は、頭蓋内出血で死亡した症例で、咽頭拭い液のPCR法でpH1N1が検出されたが死亡への関与は無かったと判断した。

### 2) 急性脳症による死亡例

男女比は10:5で、年齢の中央値は62か月であった。基礎疾患としては、呼吸器系疾患を3例に、神経系疾患を3例に認めた。

13例で発熱の当日または翌日に脳症が発症していた。脳症発症時の神経症状としては、けいれんを9例で認め、そのうち重積は2例であった。また、発症時に異常言動を7例で認めた。異常言動の持続は概ね30分未満であった。全例が脳症の発症後12時間以内に深昏睡に陥っており、発症後は急速な神経症状の増悪を認めた。

頭部CTは全例で施行され、14例で脳浮腫を認めた。その他に、10例に脳幹病変を、5例に両側視床病変を認めた。全例で早期からステロイド投与が、8例でガンマグロブリン投与が行われていたが、効果は認めなかった。9例が脳症発症後3日以内に死亡しており、残りの症例も急速に臨床的脳死に準じる状態に陥っていた。

### 3) 突然死による死亡例

突然死による死亡例の年齢は中央値43か月で、男女比は9:6であった。1例に先天性水頭症による重度重複障害を認めたが、他の14例は基礎疾患を有していなかった。

心肺停止は12例でインフルエンザ発症

の当日または翌日に起きていた。心肺停止の起きた場所は13例が自宅、1例が医療機関の外来、1例が入院中の病棟であった。心肺停止に気付かれた時間帯は11例で9時から18時の昼間時間帯であった。最後の生存の目撃から急変までの間隔は7例で30分以内であり、4例ではほとんど目を離していない状態で起きていた。

変死として医療機関に搬送されなかった1例と病棟内の突然死の1例を除いた13例について、救急搬送の実態を調査した。救急要請から救急隊の現場着までの時間は中央値7分(範囲4~11分)、救急隊の現場着から病院到着までの時間は中央値20分(範囲12~37分)であった。

10例で到着直後に血液ガス分析が施行された。pHは中央値6.71(範囲6.54~7.17)、pCO<sub>2</sub>は中央値98mmHg(範囲53~129mmHg)、BEは中央値-27mmol/l(範囲-9.9~-32mmol/l)とほとんどの症例で極めて高度な混合性アシドーシスを呈していた。施行された画像検査(死後の検査を含む)は、胸部写真12例・心エコー4例・胸部CT4例・腹部CT1例・頭部CT7例であった。肺野に軽度の浸潤影を認める症例はあったが死亡の原因とはならないと判断した。

#### D. 考察

諸外国からの報告では、小児・成人を問わずpH1N1に伴う死亡原因としては、重症肺炎を始めとする呼吸不全が圧倒的に多いことで一致している。それに対し、日本では呼吸不全による死亡はむしろ少数であり、突然死や急性脳症が死因としては多数を占めていた。このように、pH1N1による死因の内訳が大きく諸外国と異なっていることが、日本の特徴であると思われる。

呼吸不全による死亡の少なさは、日本のpH1N1小児死亡例の重要な特徴である。呼

吸不全による死亡例はほとんど何らかの基礎疾患を有していた児であり、pH1N1感染前に健常であった小児の呼吸不全による死亡は極めて少ない。この原因は現時点でははっきりしないが、迅速キットによる早期診断・抗ウイルス薬の早期からの使用や小児科学会を始めとした医療者間の情報交換などが、複合的に奏効した可能性があると思われる。

急性脳症は、突然死と並んで死亡原因として最多であった。pH1N1に伴う神経合併症としての急性脳炎の報告は諸外国にも散見される。しかし、死亡例の報告は限られている。急性脳症の小児死亡例が多いことは、日本の特徴であるとともに今後の対策、特により有効な治療法の究明が望まれる

pH1N1による急性脳症死亡例は急激な神経症状および全身状態の悪化が特徴的であった。過半数の症例で脳幹病変が確認され、脳幹病変が重篤な神経症状および全身状態の悪化と関連していた可能性が示唆された。これらの症例に対し、現在の標準的な治療であるステロイドパルス療法やガンマグロブリン療法は有効でなく、今後の治療法の開発が課題であると思われる。

pH1N1感染による突然死は、基礎疾患を持たない幼児に好発していた。突然死はインフルエンザ発症後早期に出現しており、極めて急速に起きることが推測される。直接の死亡原因は現時点では不明であり、今後は病理解剖などによる死因の究明が必要であると思われる。

pH1N1感染による突然死は、予想に反して昼間時間帯に多く、必ずしも長時間目を離していた時に起きていたとは限らなかった。また、救急隊の活動状況は2009年の消防白書から判断すると迅速に対応できており、救急体制の不備が関与したとは考えられない。さらに、病院到着直後の血液ガス分析値は極めて高度な異常であった。これ

らの事実は、このような症例を救命することが著しく困難であることを示す。したがって、インフルエンザに伴う突然死を減少させるには、ワクチンなどによるインフルエンザの予防が重要であると思われる。

## E. 結論

日本における pH1N1 による小児死亡例の死因は、予期せぬ心肺停止と急性脳症が多く、呼吸不全による死亡は少数であった。また、呼吸不全による死亡例は基礎疾患を持つ児がほとんどであった。

pH1N1 による急性脳症死亡例は急激な神経症状および全身状態の悪化が特徴的であった。過半数の症例で脳幹病変が確認され、重篤な神経症状および全身状態の悪化と関連していた可能性が示唆された。

pH1N1 感染による突然死例は、1 例を除き基礎疾患を持っておらず、Flu 発症の翌日までに急変する例が多かった。突然死の発症は日中に多く、約半数の例で生存確認から心肺停止までの間隔が 30 分以内であった。搬送直後の血液ガス分析値は著しい異常を呈していた。

全ての症例で救命の可能性はなかったと考えられ、インフルエンザに伴う小児の死亡を防ぐには、ワクチンなどによるインフルエンザの予防が重要であると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Okumura A, Hayakawa F, Kato T, Suzuki M, Tsuji T, Fukumoto Y, Nakata T, Watanabe K, Morishima T. Callosal lesions and delirious behavior during febrile illness. *Brain Dev* 2009; 31 (2): 158-162.

Okumura A, Mizuguchi M, Kidokoro H, Tanaka M, Abe S, Hosoya M, Aiba H, Maegaki Y, Yamamoto H, Tanabe T, Noda

E, Imataka G, Kurahashi H. Outcome of acute necrotizing encephalopathy in relation to treatment with corticosteroids and gammaglobulin. *Brain Dev* 2009; 31 (3): 221-227.

Okumura A, Suzuki M, Kidokoro H, Komatsu M, Shono T, Hayakawa F, Shimizu T. The spectrum of acute encephalopathy with reduced diffusion in the unilateral hemisphere. *Eur J Paediatr Neurol* 2009; 13 (2): 154-159.

Okumura A, Kidokoro H, Tsuji T, Suzuki M, Kubota T, Kato T, Komatsu M, Shono T, Hayakawa F, Shimizu T, Morishima T. Differences of clinical manifestations according to the patterns of brain lesions in acute encephalopathy with reduced diffusion in the bilateral hemispheres. *Am J Neuroradiol* 2009; 30 (4): 825-830.

Okumura A, Abe S, Kidokoro H, Mizuguchi M. Acute necrotizing encephalopathy: a comparison between influenza and non-influenza cases. *Microbiol Immunol*. 2009; 53 (85): 277-280.

Okumura A, Kidokoro H, Shoji H, Nakazawa T, Mimaki M, Fujii K, Oba H, Shimizu T. Kernicterus in preterm infants. *Pediatrics* 2009; 123: e1052-1058.

Okumura A, Mizuguchi M, Aiba H, Tanabe T, Tsuji T, Ohno A. Delirious behavior in children with acute necrotizing encephalopathy. *Brain Dev* 2009; 31 (6): 594-599.

Okumura A, Komatsu M, Kitamura T,

- Matsui K, Sato T, Shimizu T, Watanabe K. Usefulness of single-channel amplitude-integrated electroencephalography for continuous seizure monitoring in infancy: A case report. *Brain Dev* 2009; 31 (10): 766-770.
- Wada T, Morishima T, Okumura A, Tashiro M, Hosoya M, Shiomi M, Okuno Y. Differences in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy by age. *Microbiol Immunol.* 2009; 53 (2): 83-88.
- Hirabayashi Y, Okumura A, Kondo T, Magota M, Kawabe S, Kando N, Yamaguchi H, Natsume J, Negoro T, Watanabe K. Efficacy of a diazepam suppository at preventing febrile seizure recurrence during a single febrile illness. *Brain Dev.* 2009; 31 (6): 414-418.
- Sakai R, Okumura A, Shimizu T, Marui E. Current explanations regarding febrile seizures provided by pediatricians in Tokyo. *Dev Med Child Neurol.* 2009; 51 (8): 651-652.
- Kidokoro H, Okumura A, Hayakawa F, Kato T, Maruyama K, Kubota T, Suzuki M, Natsume J, Watanabe K, Kojima S. Chronologic Changes in Neonatal EEG Findings in Periventricular Leukomalacia. *Pediatrics* 2009; 124 (3): e477-e484.
- Kidokoro H, Okumura A, Suzuki M, Kubota T, Kato T, Hayakawa F, Watanabe K, Morishima T. Sudden unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza infection. *Pediatr Int* 2009; 51 (5): 742-744.
- Okumura A, Abe S, Hara S, Aoyagi Y, Shimizu T, Watanabe K. Transiently reduced water diffusion in the corpus callosum in infants with benign partial epilepsy in infancy. *Brain Dev* 2010; 32(7): 564–566.
- Okumura A, Yamamoto T, Kidokoro H, Kato T, Kubota T, Shoji H, Sato H, Shimojima K, Shimizu T. Altered gene expression in umbilical cord mononuclear cells in preterm infants with periventricular leukomalacia. *Early Hum Dev* 2010; 86(10): 665–667.
- Sekigawa M, Okumura A, Nijima S, Hayashi M, Tanaka K, Shimizu T. Autoimmune focal encephalitis shows marked hypermetabolism on positron emission tomography. *J Pediatr* 2010; 156(1): 158-60.
- Kato T, Hayakawa F, Tsuji T, Natsume J, Okumura A. Early diffusion-weighted images in infants with subcortical leukomalacia. *Pediatr Neurol* 2010; 42(5): 375-379.
- Komatsu M, Okumura A, Matsui K, Kitamura T, Sato T, Shimizu T, Watanabe K. Clustered subclinical seizures in a patient with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev* 2010; 32(6): 472–476.
- Tanuma N, Miyata R, Kumada S, Kubota M, Takanashi JI, Okumura A, Hamano SI, Hayashi M. The axonal damage marker tau

protein in the cerebrospinal fluid is increased in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev* 2010; 32(6): 435–439.

Tadokoro R, Okumura A, Nakazawa T, Hara S, Yamakawa Y, Kamata A, Kinoshita K, Obinata K, Shimizu T. Acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion associated with hemophagocytic syndrome. *Brain Dev* 2010; 32(6): 477–481.

Sakai R, Okumura A, Marui E, Shimizu T. Does the pediatricians' work setting or years of experience influence febrile seizure education? *Neuropediatrics* 2010; 41(3): 144-146.

Kobayashi K, Ouchida M, Okumura A, Maegaki Y, Nishiyama I, Matsui H, Ohtsuka Y, Ohmori I. Genetic seizure susceptibility underlying acute encephalopathies in childhood. *Epilepsy Res* 2010; 91(2-3): 143-152.

Obinata K, Okumura A, Nakazawa T, Kamata A, Niizuma T, Kinoshita K, Shimizu T. Norovirus encephalopathy in a previously healthy child. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29(11): 1057-1059.

Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Hayashi S, Kubota T, Fukasawa T, Suzuki M, Maruyama K, Oshiro M, Hattori T, Kidokoro H, Natsume J, Hayakawa M, Watanabe K. Prolonged EEG depression in term and near-term infants with hypoxic ischemic encephalopathy and later

development of West syndrome. *Epilepsia* 2010; 51(12): 2392-2396.

Okumura A, Komatsu M, Abe S, Kitamura T, Matsui K, Ikeno M, Shimizu T.

Amplitude-integrated electroencephalography in patients with acute encephalopathy with refractory, repetitive partial seizures. *Brain Dev* 2011; 33 (1): 77–82.

Okumura A, Morita M, Ikeno M, Abe S, Shimizu T. Acute encephalopathy in a child with secondary carnitine deficiency due to pivalate-conjugated antibiotics. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30 (1): 92.

Okumura A, Yamamoto T, Shimojima K, Honda Y, Abe S, Ikeno M, Shimizu T. Refractory neonatal epilepsy with a de novo duplication of chromosome 2q24.2q24.3. *Epilepsia* 2011; 52 (7): e66-e69.

Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Deaths associated with pandemic (H1N1) 2009 among children, Japan, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* 2011; 17 (11): 1993-2000.

Kubota T, Suzuki T, Kitase Y, Kidokoro H, Miyajima Y, Ogawa A, Natsume J, Okumura A. Chronological diffusion-weighted imaging changes and mutism in the course of rotavirus-associated acute cerebellitis/cerebellopathy concurrent with encephalitis/encephalopathy. *Brain Dev.*

2011; 33 (1): 21-27.

Abe S, Okumura A, Hamano S, Tanaka M, Shiihara T, Aizaki K, Tsuru T, Toribe Y, Arai H, Shimizu T. Early infantile manifestations of incontinentia pigmenti mimicking acute encephalopathy. *Brain Dev* 2011; 33 (1): 28-34.

Ikeno M, Okumura A, Ito Y, Abe S, Saito M, Shimizu T. Late-onset sensorineural hearing loss due to asymptomatic congenital cytomegalovirus infection retrospectively diagnosed by polymerase chain reaction using preserved umbilical cord. *Clin Pediatr (Phila)* 2011; 50 (7): 666-668.

Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Natsume J, Hayakawa M. Amplitude-integrated electroencephalography in preterm infants with cystic periventricular leukomalacia. *Early Hum Dev* 2011; 87 (3): 217-221.

Tsuji M, Mazaki E, Ogiwara I, Wada T, Iai M, Okumura A, Yamashita S, Yamakawa K, Osaka H. Acute encephalopathy in a patient with Dravet syndrome. *Neuropediatrics* 2011; 42 (2): 78-81.

Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Natsume J, Watanabe K. Evaluation of brain maturation in pre-term infants using conventional and amplitude-integrated electroencephalograms. *Clin Neurophysiol* 2011; 122 (10): 1967-1972.

Liang JS, Shimojima K, Takayama R, Natsume J, Shichiji M, Hirasawa K, Imai K,

Okanishi T, Mizuno S, Okumura A, Sugawara M, Ito T, Ikeda H, Takahashi Y, Oguni H, Imai K, Osawa M, Yamamoto T. CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders. *Epilepsia* 2011; 52 (10): 1835-1842.

Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Natsume J, Watanabe K. Transient and mild reduction of consciousness during febrile illness in children. *Neuropediatrics* 2011; 42 (5): 183-187.

## 2. 学会発表

奥村彰久. 急性脳症 わかっていること、いないこと. 第 384 回富士宮市医師会学術講演会、富士宮、2009.3.19.

奥村彰久、安部信平、斎藤雅子、小松充孝、北村知宏、松井こと子、佐藤俊彦、清水俊明. Amplitude-integrated EEG を用いた小児のてんかん発作のモニタリング. 第 112 回日本小児科学会総会、奈良、2009.4.19

奥村彰久、高梨潤一、山本俊至、下島圭子、安部信平、斎藤雅子、中澤友幸、清水俊明. Brainstem Disconnection の 1 例. 第 51 回日本小児神経学会総会、米子、2009.5.28.

奥村彰久、辻健史、鈴木基正、糸見世子、久保田哲夫、城所博之、早川文雄、安部信平、斎藤雅子、清水俊明. 両側半球に拡散能低下を来たす急性脳症の再検討. 第 51 回日本小児神経学会総会、米子、2009.5.28.

奥村彰久、安部信平、斎藤雅子、中澤友幸、新島新一、清水俊明. 頻回にけいれんを繰り返す急性脳症に対する amplitude-integrated EEG を用いた持続脳波モニタリング. 第 51 回日本小児神経学会

總會、米子、2009.5.28.

奥村彰久. 発達期の脳障害と脳波 一周産期脳障害と急性脳症を中心に—第40回記念日曜講習会、東京、2009.6.21.

奥村彰久、安部信平、小松充孝、斎藤雅子、清水俊明. 二相性のけいれんと遅発性拡散能低下を伴う急性脳症に対する amplitude-integrated EEG を用いた持続脳波モニタリング. 第43回日本てんかん学会總會、弘前、2009.10.23.

奥村彰久. 小児のけいれん～熱性けいれんから脳症まで～. 第22回栃木県のこどもの成長を考えるフォーラム、宇都宮、2009.10.29.

奥村彰久、安部信平、池野充、荒川千賀子、石井和嘉子、遠藤あゆみ、小平隆太郎、瀧上達夫、藤田之彦. パレコウイルス感染が証明された新生児脳炎の1例. 第39回胎児・新生児神経研究会、浜松、2009.11.7.

奥村彰久. 新生児発作と脳波モニタリング. 第66回東海てんかん集談会、静岡、2010.2.6.

奥村彰久. 新生児脳梗塞と新生児発作. 第572回日本小児科学会東京都地方会講話会、東京、2010.2.13

奥村彰久. 小児の急性脳症—最近の話題—. 2009年度日本神経学会北海道地区生涯教育講演会、札幌、2010.3.7.

奥村彰久. 急性脳炎・脳症の臨床症状と治療法. 第27回神経研都民講座、国分寺、2010.4.13.

奥村彰久、谷本愛子、安部信平、池野充、斎藤雅子、清水俊明. 早産児核黄疸の1例. 第113回日本小児神経学会總會、盛岡、2010.4.23.

奥村彰久、清水俊明、辻健史、久保田哲夫、山下進太郎、新島新一、平岩朋子. 新型インフルエンザ関連脳症の臨床像. 第52回日本小児神経学会總會、福岡、2010.5.21.

Akihisa Okumura, Tetsuo Kubota, Hiroyuki Kidokoro, Takeshi Tsuji, Fumio Hayakawa, Koichi Maruyama, Motomasa Suzuki, Kazuya Itomi, Toshiaki Shimizu. Clinical Features of Acute Encephalopathy in Children with Underlying Disorders. 第52回日本小児神経学会總會、福岡、2010.5.21.

奥村彰久. シンポジウム：急性脳症における脳波. 第52回日本小児神経学会總會、福岡、2010.5.22

奥村彰久、安部信平、池野充、斎藤雅子、清水俊明. 幼児期に epileptic spasms を認める多小脳回の1例. 第4回日本てんかん学会関東甲信越地方会、東京、2010.6.12.

Akihisa Okumura, Toshiyuki Yamamoto, Hiroyuki Kidokoro, Toru Kato, Tetsuo Kubota, Hiromichi Shoji, Hiroaki Sato, Keiko Shimojima, Toshiaki Shimizu. Altered Gene Expression in Umbilical Cord Mononuclear Cells in Preterm Infants with Periventricular Leukomalacia. 第46回日本周産期・新生児医学会学術集会、神戸、2010.7.12.

奥村彰久. 小児のけいれん —熱性けいれんからてんかんまで—. 亀田メディカルセンター小児科学術講演会、鴨川、2010.7.23.

奥村彰久. 小児の急性脳炎・脳症—Bright tree appearance を示す急性脳症の最近の知見から—. 第 17 回ヘルペス感染症フォーラム、札幌、2010.8.20.

奥村彰久、植松貢、今高城治、田中学、岡西徹、久保田哲夫、須藤章、遠山潤、辻恵、大守伊織、内木美佐子、平岩文子、佐藤仁志、斎藤伸治. Dravet 症候群における急性脳症. 第 44 回日本てんかん学会総会、岡山、2010.10.14.

Akihisa Okumura. Acute encephalopathy in children. Lecture at National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan, 2011.5.23.

奥村彰久. 教育セミナー：脳波検査. 第 53 回日本小児神経学会総会、横浜、2011.5.28.

奥村彰久、河島尚志、清水俊明、近藤直実、新型インフルエンザ死亡例調査グループ. 2009 Pandemic Flu A (H1N1)による急性脳症死亡例の臨床像. 第 53 回日本小児神経学会総会、横浜、2011.5.27.

奥村彰久、中川聡、河島尚志、六車崇、斎藤修、藤本潤一、問田千晶、久我修二、今村壽宏、清水俊明、近藤直実、森島恒雄. 2009 Pandemic Flu A (H1N1)小児死亡例の実態調査. 第 114 回日本小児科学会学術集

会、東京、2011.8.14.

Akihisa Okumura. Neonatal seizures and epilepsy. 29th International Epilepsy Congress, Rome, Italy, 2011.9.1.

奥村彰久、山本俊至、下島圭子、本田義信、安部信平、清水俊明. 2 番染色体長腕の微小重複を伴う難治性新生児てんかんの 1 例. 第 45 回日本てんかん学会総会、新潟、2011.10.6.

奥村彰久、早川昌弘、竹内章人、山本裕、岩田欧介、山本ひかる、伊藤美春、西田吉伸、鈴木俊彦、吉本順子、松沢麻衣子、神山寿成、寺澤大祐、清水俊明. 新生児発作・新生児発作様イベントの症状型分類の実証的検討. 第 56 回日本未熟児新生児学会学術集会、東京、2011.11.14.

#### 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

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）

平成 21-23 年度 分担研究報告書

インフルエンザ脳症など重症インフルエンザの発症機序の解明とそれに基づく治療法・予防法の確立に関する研究

—新型インフルエンザ（pdm influenza H1N1 2009）脳症に関する実態調査

分担研究者 河島尚志 東京医科大学小児科 講師

研究要旨

2009 年 6 月以降に世界的にウイルス学的性状を異にする新型インフルエンザ（pandemic influenza A(H1N1) 2009）が流行した。新型インフルエンザ脳症の臨床的特徴を明らかにするため、インフルエンザ脳症を診察する機会があると考えられる 845 施設にアンケート調査を行い、207 例の脳症患者に関して情報が収集できた。対象期間は、2009 年 8 月～2010 年 1 月の 6 カ月間である。結果、①男児に多い。②各年齢層で重症例がいる。③既往で熱性けいれんを起こしている患児が多い。④死亡例は、発熱より 24 時間頃で神経症状を発現する例がほとんどである（16 例中 15 例）。⑤ 2 相性痙攣を呈する例の内、後遺症を認める群では、発熱から神経症状発現が早い。⑥幻視などの視覚異常を呈する例は予後良好例に限定される。⑦異常行動を伴うのは、予後良好群に多い。⑧MR I 画像での異常所見のうち、後遺症なしの群で、脳梁膨大部病変が半数を占める。⑨脳波で、高振幅徐波は予後不良の指標とはいえない。こと等が知れた。

治療面では、①ワクチン接種では、ワクチン未接種者は予後不良であった。②特殊治療のステロイドパルス療法は、ほとんど全例の患者に施行され、予後への差は明らかではなかった。③脳症の病型毎の治療の予後への影響では、2 相性痙攣のタイプは 12 例で、死亡例はいないが、半数は予後不良であった。サイトカインストーム型とされた 14 例では 2 例が死亡。深昏睡（Glasgow Coma Scale 8 点以下）の限った各種治療の影響では、年齢、性別、基礎疾患の有無、熱性けいれん、ワクチン歴と予後とは関連しなかったが、AST 高値と高血糖は統計的に有意に予後不良因子で、抗ウイルス薬は有意に後遺症を減らしていた。

A. 研究目的

本研究班の仕事として、インフルエンザ脳症におけるサイトカイン、フリーラジカルなどの関与などその病態解明を試みてきた。また、脳症の予後改良のための治療法として、これらをターゲットとした各種の特殊治療を試み、一定の効果をあげてきた。しかしながら、未だに死亡例や後遺症を残す例はなくなり、さらなる病態解明と治療法の開発が望まれている。こういったなか、2009 年 6 月以降に世界的にウイルス学的性状を異にする新型インフルエンザ（pandemic influenza A(H1N1) 2009）が流行した。当初は呼吸器感染者

がほとんどであったが、流行が拡大するなかで、新型インフルエンザ感染に伴う脳症を認めるようになった。pdm 2009 はウイルス学的性状が異なることや、感染集団が異なることから、中枢神経感染（脳炎・脳症）に関して、季節型の脳症と病像がことなる可能性があり、緊急にその実態を明らかにする必要がある。

B. 研究方法

全国調査により新型インフルエンザ脳症の臨床的特徴、インフルエンザ脳症を診察する機会があると考えられる 845 施設にアンケート調査を行い、207 例の脳症患者に関して情報が収集できた。また、死亡症

例は施設を訪問し、画像を含めて、情報を収集した。対象期間は、2009年8月～2010年1月の6カ月間である。特に、発熱から神経症状発現までの時間からみた病型と予後との関連を検討した。予後との関連対象児は、予後・後遺症の詳細が判明した188例を対象とした。神経学的後遺症を残さなかった群を予後良好群、後遺症を残した例ならびに死亡例を予後不良群とし検討を行った。統計的手法は、統計処理にはStatcel 2 (Oms-publishing, Saitama, Japan) を用いて Student' s-t 及び Mann-Whitney 法を利用した。P<0.05を有意とした。

### C.研究結果

#### 1) 男女比と年齢像

男女比は明らかに6:4と男児に多かった。年齢分布は5～9歳を中心に各年齢層に分布していた。

#### 2) 予後

予後は死亡が16例(8.5%)で、後遺症があったのは、有23例(12.2%)であり、そのうちの重度後遺症が5例(2.7%)で、後遺症なしが149例(79.3%)であった。死亡症例も各年齢層にいた。脳症の型が判明した中では興奮毒性型に分類される2相性痙攣のタイプでは死亡例はいないが、半数は予後不良であった。

#### 3) 既往歴・家族歴

後遺症なしの例では、熱性けいれんが多く、また家族歴でも、9例で熱性けいれんの既往があった。また、喘息既往も2割弱いた。予防接種歴としては、新型を単発で接種している症例はかなり少なく、死亡例1例と後遺症なし群2例のみだった。接種率も12.8%と1割程度だった。

### 既往歴の検討

後遺症	例数	围産期異常	基礎疾患	熱性けいれん	てんかん	発達遅延	喘息	家族歴
死亡	16	2	2	2	1	2	3	1
重症	5	1	1	1	1	1	0	0
中等症軽症	18	0	3	1	1	2	2	1
なし	149	5	33	40 (27%)	1	5	28 (19%)	14

#### 4) 画像

後遺症なしの群で、MRI所見で異常所見を呈した例は、29例と3割弱であった。うち、半数の15例で脳梁膨大部病変、いわゆるMERSを呈していた。他の群で、脳梁膨大部病変を呈する例は、少なかった。また、脳幹病変が確認されたのは死亡例5例のみCT所見で呈していた。

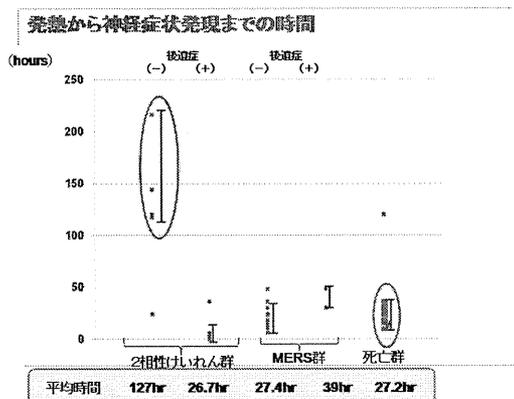
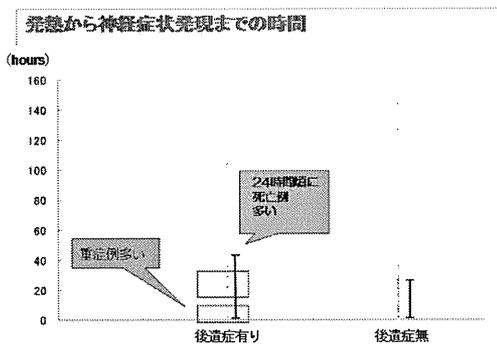
### 画像での比較検討

予後	例数	MRI異常所見	CT異常所見 (初回のみで比較)
死亡	16	3/3(100%) ・脳幹の出血壊死 ・DWIにて基底核にD、T2で白質、皮質の変化	12/12 ・脳幹の浮腫ないし慢性浮腫: 5例
後遺症重症	5	3/5(60%) ・大脳皮質・脳幹部の著明な浮腫 ・脳室不明瞭で脳組織が強い状態 ・両側脳室球主体にT2にて高信号 ・下垂体はT1強調像で後葉の高信号 ・両側前頭葉、右内側頭葉に異常信号	2/5 脳浮腫
中等症軽症	16	6/15(40%) ・脳梁膨大部病変 2例 ・頭頂葉側頭蓋縁位に高信号 3例	2/12 軽度の脳浮腫
後遺症なし	149	29/116(25%) ・脳梁膨大部病変 14例 ・posterior reversible encephalopathy syndrome(PRES) 1例 ・diffuse swelling of the cerebrum	45/129 脳浮腫が中心の所見としてある。 AVM・クモ膜のう膜が1例ずつ

#### 5) 時間軸からの検討

発熱から神経症状発現までの時間は、後遺症あり群では24時間頃に死亡例が集中していた。一方、後遺症なし群では30時間以内にほぼ全例が神経症状を認めていた。次に2相性けいれん群・脳梁膨大部病変(以下、MERS)群・死亡群を比較した。2相性けいれん群の後遺症あり・なし群では、

後遺症なし群の方が発現までの時間が長く、統計学的有意差も認めた。2相性けいれんの後遺症あり群では大半が6時間以内に症状が発現しており、後遺症なし群では100時間以上を経過している例が多かった。MERS群では、後遺症の有無にかかわらず50時間以内に発現していた。



#### 6) 異常言動・異常行動に関する検討

異常言動・行動の分類を横田ら発表した分類（1. 側頭葉局在症候群、2. 視覚異常、3. 情動障害、4. 大声で歌を歌う等の特徴のある、大脳基底核～辺縁系の障害、5. 辺縁系の異常群）で解析した。視覚に伴う幻視は、1例死亡例を除き、ほぼ後遺症なし例であった。重症群で、異常行動を呈した例は、1例のみでした。大脳辺縁群は、死亡例～後遺症なし例まで全群に分布しており、予後指標とは、なりえないと思われた。逆に、視覚に伴う異常言動は予後良好

と考えられた。

#### 異常言動・行動の検討

後遺症	例数	異常言動・行動の有無	Oral tendency	Visual Abnormal	Emotional	Musical	Limbic system
死亡	16	5	0	1	2	0	2
重症	5	①	0	0	0	0	1
中等症・軽症	18	7	1	0	0	0	4
なし	149	82	1	②3	20	4	23

#### 7) 脳波

脳波では、後遺症なし群で、HSV所見を呈するものが、6割以上を占めていた。後遺症なし例では、平坦脳波、低電位のもの1例も認めなかった。

#### 脳波所見の比較検討

後遺症	例数	高振幅徐波	平坦脳波	低電位
死亡	16 (記載あり9)	1	4	2
重症	5 (記載あり4)	1	3	0
中等症・軽症	16 (記載あり14)	5	0	1
なし	149 (記載あり141)	92 (65%) 59 (42%・HSVのみ記載)	0	0

#### 8) ワクチンと抗ウイルス薬（オセルタミビルないしザナビル）の効果

予後は死亡が16例(8.5%)で、後遺症があったのは、有23例(12.2%)であり、そのうちの重度後遺症が5例(2.7%)で、後遺症なしが149例(79.3%)であった。死亡症例も各年齢層にいた。脳症の型が判明した中では興奮毒性型に分類される2相性痙攣のタイプでは死亡例はいないが、半数は予後不良であった。予後良好と不良で、男女比、年齢差はなかった。ワクチン接種では、ワクチン未接種者は統計的に有意に予後不良であった。ワクチンの種類は季節

型接種で有意差はあり、pdm influenza A (H1N1) 2009 特異ワクチンを接種が 2 回行われていた症例は少なかった。

抗ウイルス薬（オセルタミビルないしザナビル）は予後良好と不良群では、差がなかった。

#### 9) 特殊治療の予後への影響

特殊治療の予後への影響を、予後を死亡、重症、中等症・軽症、後遺症なしでランク付けし、統計的検討を調べた。ステロイドパルス療法は、ほとんど全例の患者に施行され、ガンマグロブリンも 188 例中 72 例に初日に投与されていた。ステロイドパルス療法は、ほとんど全例の患者に施行されており、予後への差は明らかではなかった。ガンマグロブリン療法も重症例に主に施行されており、予後への差は明らかではなかった。

#### 10) 脳症の病型毎の治療の予後への影響

脳症の型が判明した中では興奮毒性型に分類される 2 相性痙攣のタイプは 12 例で、死亡例はいないが、半数は予後不良であった。サイトカインストーム型とされた 14 例では、2 例が死亡していた。また、MRI では、予後良好群 149 例中 29 例が脳梁膨大部病変を伴っており、MERS と考えられた。これらの 3 病型に分けての、各種治療の実態調査では、予後不良の患者に主に、特殊治療がなされており。治療ごとの予後の差はなかった。

#### 11) 深昏睡 (Glasgow Coma Scale 8 点以下) での各種治療の影響

188 中 63 例で、Glasgow Coma Scale (GCS) が記載されていた。年齢、性別、基礎疾患の有無、熱性けいれん、ワクチン歴と予後とは関連しなかった。しか

しながら、aspartate aminotransferase (AST) 高値と高血糖は統計的に有意に予後不良であった。乳酸と、フェリチンも予後不良患者では、測定してある患者は少なかったが、予後不良例で高かった。治療では、これらの深昏睡では、抗ウイルス薬は統計的に有意に死亡を減少させていた。

#### D. 考察

発熱から 24 時間頃にサイトカイン産生やウイルス増殖がピークをむかえるタイミングであり、その時点で大半の死亡例が神経症状を発現する可能性がある。MERS 群では、画像と臨床経過を合わせることで予後の推測に役立つと考えられる。一方 2 相性けいれん群では予後により神経症状の発現時期が異なるため、脳波・SPECT 等の追加検査を合わせて評価していく必要がある。

治療では、予後・後遺症の詳細が判明した 188 例を対象とし、各種治療の効果や施行実態を調べたが、ワクチン接種では、ワクチン未接種者は統計的に有意に予後不良であった。ワクチンの種類は季節型接種で有意差はあり、pdm influenza A (H1N1) 2009 特異ワクチンを接種が 2 回行われていた症例は少なかった。これは流行に pdm influenza A (H1N1) 2009 特異ワクチンが間に合わなかったと考えられる。また、型がワクチンと合致していなくても、脳症の予後改善に一定の効果を示すものと推察される。特異ワクチンの効果や、ワクチン接種は任意接種であるためのバイアスに関しては今後の課題である。

特殊治療の予後への影響を、予後を死亡、重症、中等症・軽症、後遺症なしでランク付けし、統計的検討を調べた。ステロイドパルス療法は、ほとんど全例の患者に施行

され、予後への差は明らかではなかった。ガンマグロブリン療法や他の特殊治療も重症例に主に施行されており、予後への差は明らかではなかった。今後は、特殊治療においてはコントロールスタディーの必要性が示唆された。

脳症の病型毎の治療の予後への影響では、2相性痙攣のタイプは12例で、死亡例はいないが、半数は予後不良であった。サイトカインストーム型とされた14例では、2例が死亡。また、MRIでは、予後良好群149例中29例が脳梁膨大部病変を伴っており、MERSと考えられ、これらが予後良好の脳症の主体であった。このことから、早期のMRIは治療方針を決定するために重要な検査となる。

深昏睡（Glasgow Coma Scale 8点以下）の限った各種治療の影響は、AST高値と高血糖は有意な予後不良因子であった。これは過去の季節型インフルエンザの脳症と一致した。また、治療では、これらの深昏睡患者では、抗ウイルス薬は統計的に有意に死亡を減少させていたことは、ウイルス量を早期に減らすことが治療面で有効であることを示唆する。

#### E. 結論

- 男児に多い。
- 各年齢層で重症例がいる。
- 既往で熱性けいれんを起こしている脳症が多い。
- 死亡症例は、発熱より24時間頃で神経症状を発現する例がほとんどであった（16例中15例）。
- 2相性痙攣を呈する例のうち、後遺症を認める群では、発熱から神経症状発現が早い例が多い。
- 幻視などの視覚異常を呈する例は予後

良好例に限定される。

- 異常行動を伴うのは、予後良好群に多かった。
- MRI画像での異常所見のうち、後遺症なしの群で、脳梁膨大部病変が半数を占めていた。
- 脳波で、高振幅徐波は予後不良の指標とはいえない。
- ワクチン接種では、ワクチン未接種者は統計的に有意に予後不良であった。
- 特殊治療のステロイドパルス療法は、ほとんど全例の患者に施行され、予後への差は明らかではなかった。
- ガンマグロブリン療法や他の特殊治療も重症例に主に施行されており、予後への差は明らかではなかった
- 脳症の病型毎の治療の予後への影響では、2相性痙攣のタイプは12例で、死亡例はいないが、半数は予後不良であった。
- サイトカインストーム型とされた14例では、2例が死亡。また、MRIでは、予後良好群149例中29例が脳梁膨大部病変を伴っており、MERSと考えられ、これらが予後良好の脳症の主体であった。
- 深昏睡（Glasgow Coma Scale 8点以下）の限った各種治療の影響では、年齢、性別、基礎疾患の有無、熱性けいれん、ワクチン歴と予後とは関連しなかったが、AST高値と高血糖は統計的に有意に予後不良因子であった。また、治療では、これらの深昏睡患者では、抗ウイルス薬は統計的に有意に死亡を減少させていた。

#### F. 研究発表

- (1) 論文発表

①著書

1. 河島尚志, 五百井寛明, 山中岳。急性脳炎・脳症「急性脳症とRSウイルス感染症」(五十嵐隆、塩見正司 編集) 小児科臨床ピクルス 中山書店200-203,2011

②学術論文

1. Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, et al. Deaths Associated with Pandemic (H1N1) 2009 among Children, Japan, 2009-2010. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1993-2000.
2. Kawashima H, Ishii C, Yamanaka G, et al A boy with non-herpes simplex acute limbic encephalitis and antiglutamate receptor antibodies. *Clin Med Insights Case Rep.* 2011;4:43-7.
3. Morichi S, Kawashima H, Ioi H, et al. Classification of acute encephalopathy in respiratory syncytial virus infection. *J Infect Chemother.* 2011;17:776-81.
4. Kashiwagi Y, Kawashima H, Suzuki S. [Rota virus encephalopathy] *Nihon Rinsyo* 69:429-34,2011
5. Kawashima H, Go S, Nara S, et al. Extreme efficiency of airway pressure release ventilation (APRV) in a patient suffering from acute lung injury with pandemic influenza A (H1N1) 2009. *Indian J Pediatr.* 2011;78:348-50.
6. Mori M, Kawashima H, Nakamura H, et al. Nationwide survey of severe respiratory syncytial virus infection in children who do not meet indications for palivizumab in Japan. *J Infect Chemother.* 2011;17:254-63.
7. Takano T, Tajiri H, Kashiwagi Y, Kimura S, Kawashima H. Cytokine and chemokine response in children with the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30:117-20.
8. Suzuki S, Kashiwagi Y, Kawashima H, et al. Cerebrospinal fluid cytokine in central nervous system involvement associated with rotavirus infection. *Tokyo Medical University* 69:227-233, 2011
9. Kawashima H, Go S, et al. Cytokine profiles of suction pulmonary secretions from children infected with pandemic influenza A(H1N1) 2009. *Crit Care.* 2010;14:411.
10. Kawashima H, Suzuki K, et al. Anti-glutamate receptor antibodies in pediatric enteroviral encephalitis. *Int J Neurosci.* 2010;120:99-103.
11. Kawashima H, Yamanaka et al. Nitrite and nitrate as a new target of treatments in influenza-associated encephalopathy *J Pediatr Infect Diseases* 2010;5:171-76
12. Morishima Y, O Kawashima H, et al A case of acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion on respiratory syncytial virus infection *J Tokyo Med Univ* 2010;68:231-234,
13. 河島尚志, 五百井寛明, 柏木保代他. 突然死を含む重症RSウイルス感染症.

- 臨床と研究2011, 88,105-109
- 14.河島尚志、五百井寛明.重症 RS ウイルス感染症の特徴と治療小児科診療 52:217-223:2011
  - 15.河島尚志、奈良昇乃助、森地振一郎.急性脳炎・脳症 ロタウイルス脳症.日本臨床 69: 429-434, 2011
  - 16.河島尚志 RSV 等ウイルス感染に伴う乳幼児の急性死亡.日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会雑誌 11:18-23: 2011
  - 17.河島尚志.急性脳症：サイトカインとフリーラジカル NEUROINFECTION 神経感染症 16: 105-116.2011
  - 18.千代反田雅子、河島尚志、呉宗憲 他. サイトカイン動態からみた pandemic H1N12009 肺炎の検討.臨床とウイルス 39: 257-262,2011
  - 19.河島尚志、柏木保代、山中岳、呉宗憲.インフルエンザと高サイトカイン血症小児内科 42:1509-13,2010
  - 20.河島尚志.乳幼児突然死 ウイルス感染を中心として 日本小児科医会会報 38:93-96,2009
  - 21.河島尚志.「重症ウイルス感染症」—新型インフルエンザ (pandemic influenza A(H1N1)2009 を含むその実態と対応 都耳鼻会報 133: 6-12, 2010
  - 22.河島尚志、柏木保代、山中岳.インフルエンザ感染症と母乳栄養小児内科 42:1707-9,2010
- (2) 学会発表
1. 河島尚志. 脳炎・脳症における急性死亡. 第 43 回日本小児感染症学会 (2011.10.29-30) 岡山
  2. 河島尚志. 重症ロタウイルス感染症の病態. 第 52 回日本臨床ウイルス学会 (2011.6.11-12) 三重
  3. 河島尚志. 乳幼児に急性死をきたす疾患とそのアプローチ. 第 6 回小児救急医療ワークショップ (2011.7.23-24) 北九州
  4. 河島尚志. RSV 等ウイルス感染にともなう乳幼児の急性死亡. 第 17 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会 (2011.3.4-5) 出雲
  5. 河島尚志.RS ウイルス脳症を含む小児急性脳症第 14 回日本脳低温療法学会 (2011.7.1-2) 鹿児島
  6. 河島尚志. RS ウイルス感染症を含む小児重症ウイルス感染症—基礎から臨床まで. 第 7 回近畿小児循環器パブリックマブ投与検討委員会 (2011.8.6) 大阪
  7. 河島尚志 RS ウイルス感染症と最新の話第 281 回所沢小児科医会学術集会 (2011.10.25) 所沢
  8. 河島尚志.急性脳症を考える—インフルエンザ、RS 脳症を中心に第 5 回都心臨床小児カンファレンス (2011,10.12) 新宿
  9. 三浦太郎,柏木保代,五百井寛明,河島尚志,武隈孝治,星加明德.RSV 感染症における胸部レントゲン像および鼻汁中サイトカインと重症度の比較検討第 25 回日本小児救急医学会 (2011.6.10-11) 東京
  10. 森地振一郎,河島尚志,山中岳,柏木保代,武隈孝治,星加明德.ウイルス感染に伴う急性脳症の髄液中サイトカインとフリーラジカルからみた病態解析第 167 回東京医科大学医学会総会 (2011.6.4) 東京
  11. 森地振一郎, 河島尚志, 森島恒雄, 奥村彰久 .pandemic influenza A(H1N1)2009 脳症における発熱か

- ら神経症状発現までの時間からみた病型と予後との関連第 52 回日本臨床ウイルス学会 (2011.6.11-12) 三重
12. 森地振一郎, 河島尚志, 奥村彰久, 中川聡, 森島恒雄\*全国調査による pandemic influenza A(H1N1)2009 脳症の予後からみた臨床的特徴の検討第 114 回日本小児科学会総会 (2011.8.12-14) 東京
  13. 森地振一郎, 河島尚志, 石田悠, 鈴木一徳, 佐藤智, 小穴信吾, 山中岳, 宮島祐, 武隈孝治, 星加明德. 脳低温療法を施行した HHV-6 によるけいれん重積型脳症の 2 例. 第 16 回日本神経感染症学会 (2011.11.4-5) 東京
  14. 鈴木慎二, 西亦繁雄, 山中岳, 柏木保代, 河島尚志, 星加明德. ウイルス排泄が長引いた低体温療法を施行したインフルエンザ脳症の一例. 第 14 回日本脳低温療法学会 (2011.7.1-2) 鹿児島
  15. 河島尚志, 柏木保代, 山中岳, 呉宗憲. インフルエンザと高サイトカイン血症. 小児内科 42:1509-13, 2010
  16. 河島尚志. 乳幼児突然死 ウイルス感染を中心として. 日本小児科医会会報 38:93-96, 2009
  17. 河島尚志. 「重症ウイルス感染症」—新型インフルエンザ (pandemic influenza A(H1N1)2009) を含むその実態と対応. 都耳鼻会報 133: 6-12, 2010
  18. 河島尚志, 柏木保代, 山中岳. インフルエンザ感染症と母乳栄養. 小児内科 42:1707-9, 2010
  19. 高野智子, 柏木保代, 木村貞美, 清水真理子, 野間治義, 植田仁, 楠本義雄, 河島尚志, 田尻仁. 新型インフルエンザ入院患者における血清サイトカインと臨床的特徴の検討. 第 113 回日本小児科学会学術集会 (4.23-25.2010) 岩手
  20. 河島尚志. 重症 RS ウイルス感染症の特徴—インフルエンザとの比較. 第 24 回日本小児救急医学会ランチョンセミナー (5.29.2010) 京都
  21. 呉宗憲, 河島尚志, 奈良昇之助, 牛尾方信, 五百井寛明, 武隈孝治, 星加明德. 2009 年 9 月から 12 月までのインフルエンザ肺炎入院 29 症例の検討. 第 24 回日本小児救急医学会 (5.29.2010) 京都
  22. 高野智子, 木村貞美, 清水真理子, 野間治義, 植田仁, 楠本義雄, 柏木保代, 河島尚志, 田尻仁. 新型インフルエンザウイルス肺炎における血清サイトカインの検討. 第 24 回日本小児救急医学会 (5.29.2010) 京都
  23. 千代反田雅子, 呉宗憲, 河島尚志, 柏木保代, 牛尾方信, 五百井寛明, 熊田篤, 西亦繁雄, 武隈孝治. サイトカイン動態から見た新型インフルエンザ (pandemic H1N12009) 肺炎の検討
  24. 牛尾方信, 奈良昇之助, 呉宗憲, 五百井寛明, 熊田篤, 柏木保代, 河島尚志, 武隈孝治, 星加明德. 2009、当院におけるインフルエンザ 2009/2010 シーズン入院症例のリスクファクターと呼吸機能の検討. 第 42 回日本小児感染症学会総会 (11.27-28.2010) 仙台

G.知的財産権の出願・登録状況

## インフルエンザ脳症の病理学的解析に関する研究

研究分担者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者：中島典子、片野晴隆、佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究要旨：インフルエンザ脳症はインフルエンザウイルス感染に伴い発症する脳症であり発症メカニズムはいまだ不明である。本研究ではパンデミック H1N1 インフルエンザウイルスにより発症したインフルエンザ脳症の解析と原因不明の脳症症例について病理組織を用いて原因ウイルスの同定を試みる方法について解析を行った。

### A. 研究目的

インフルエンザウイルス A/H1N1pdm の感染に伴って発症したインフルエンザ脳症について国内での死亡例の病理学的解析を行う事を目的とした。2009年～2010年にかけて国内で流行したインフルエンザウイルス A/H1N1pdm 感染による死亡者数は約 200 名である。そのうち約 10%にあたる 21 例の貴重な病理解剖検体が得られた。本研究においてそれらのうち特に脳症を発症していた 3 例についてその病態病理を理解するまた、国内発生の原因不明の脳炎脳症症例についてその原因病原体を同定することを目的とした。

### B. 研究方法

#### 材料と方法：

インフルエンザウイルス A/H1N1pdm 感染が確認され死亡した患者の剖検材料について作製した組織標本を病理学的、免疫組織化学的に検討した。

#### 病理学および免疫組織学的検索

剖検で得られた検体をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、ウイルス抗原を検出するために、

抗インフルエンザ NPモノクローナル抗体をもちいた免疫組織化学染色を行った。

#### 核酸の抽出

凍結組織を 2 分し、一つを RNA 用に、他の一つを DNA 用とした。RNA 用サンプルを ISOGEN (ニッポンジーン社)中に浸漬し、ポリトロン (キネマティカ社)を用いてホモジナイズ後、プロトコールに沿って RNA を抽出した。また、DNA 用サンプルからは通法のフェノールクロロホルム法にて DNA を抽出した。

#### 定量的 PCR 法によるウイルスの検出

ヒトに病原性を持つと考えられる 163 種類のウイルスを 96 穴プレート上で一度に検出できる real-time (RT-)PCR システムを本研究室で独自に開発し、これにより RNA および DNA サンプルからウイルスの検出を試みた。定量的 PCR は MX3005P (ストラタジーン社)、または ABI Prism 7900HT (アプライド・バイオシステムズ社)を用いて行った。

### C. 研究結果

インフルエンザ A/H1N1pdm 感染が確認され

て死亡した約 200 例のうち病理解剖が行われた 21 例を検索し臨床的にインフルエンザ脳症と診断された 3 例について解析を行った。脳症を発症した 3 症例の年齢は 16 歳（男性）、30 歳（男性）、30 歳（女性）といままで報告されているインフルエンザ脳症と比較して高い年齢であった。基礎疾患として気管支喘息（16 歳男性、30 歳女性）、慢性心不全、アルコール性肝障害、肥満（30 歳男性）があった。

#### 「組織所見」

インフルエンザウイルスの感染部位を調べる目的で肺の組織を用いインフルエンザウイルス抗原をインフルエンザウイルス NP 抗原のモノクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ 3 症例とも気管支上皮にウイルス抗原が認められた。いずれの症例においても剖検検体においては肺胞上皮へのインフルエンザウイルス感染は確認できなかった。

3 例中 2 例において剖検時脳組織を用いた検索が可能であったがいずれの脳組織においてもウイルス抗原は見られなかった。

詳細な検索が可能であった症例では脳は浮腫状で脳幹部から第四脳室にかけて出血が認められた。組織学的に血管周囲への血漿タンパク成分の漏出や血管周囲への出血が認められた。インフルエンザウイルスの NP 抗原に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色ではいずれの脳組織でも陰性であり脳の細胞へのインフルエンザウイルス感染は認められなかった。Real time RT-PCR 法を用いインフルエンザウイルス A (H1N1) pdm09 の特異的プライマープローブを用い脳組織 5 か所検索したが全て陰性であった。脳組織を用いた GFAP 染色ではアストログリアの突起の腫大と断裂像が認められた。

#### Multivirus real time PCR による不明脳炎・脳症の検索

国内で発生するウイルス性脳炎・脳症は発症時点でその原因を特定するのが困難である。そこで我々は生検で得られた組織や髄液及び血液検体より DNA, RNA を抽出し同時に 163 種類のウイルスの検出が可能な Multivirus Real-time PCR 法により原因の特定を試みた。原因不明脳炎・脳症とされた 16 症例について脳生検、髄液、血清をサンプルに用い multivirus real time PCR を行った。結果 HSV-1 (4 例)、parecovirus3 (1 例)、HHV-6 (1 例)、JCV (1 例) が最終診断として確定し 16 例中 7 例 (43%) で病原ウイルスの同定に成功した。HSV-1 脳炎と診断された症例の病理組織像を図 1 に示す。HE 染色検体では単純ヘルペス感染時の典型的な封入体像を示していないが免疫組織化学による確認では陽性を示しており今回の multivirus real time PCR 法による検索が有効であった。

#### 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。今回我々は新型インフルエンザ A/H1N1pdm 感染に伴ったインフルエンザ脳症での死亡例の剖検検体を用い病理学的、免疫組織化学的に解析を行った。症例は新型インフルエンザによる死亡例の剖検 21 症例の内脳症と診断された 3 症例を対象とした。今回の対象症例の年齢は通常インフルエンザ脳症で後発年齢とされている年齢層より高かった。全例において上気道へのインフルエンザウイルスの感染は確認されたが、肺胞上皮への感染および脳組織への感染は認められなかった。脳の所見としては血管周囲の血漿成分の漏出、マイクログリアの胞体の腫

大、アストログリアの突起崩壊等が認められウイルスの直接の感染を伴わない脳組織の障害が確認された。

インフルエンザ脳症の症例の病理検体において脳組織ではウイルス抗原は同定されてこなかった。更に感度の高い PCR 法をもちいて検索した結果やはり脳におけるウイルス RNA の検出はできなかった。一方原因不明の脳炎・脳症の原因ウイルス特定の為一度に 163 種類のウイルスを同定する multivirus real time PCR 法を開発し原因不明脳炎脳症例を解析した。本方法により病理学的には非典型例であった HSV-1 脳症や組織診断では診断できなかった原因ウイルスが同定できた。今後も原因不明脳炎・脳症の原因検索に本 multivirus realtime PCR 法が有効である事が示された。

#### E. 結論

新型インフルエンザウイルス H1N1pdm09 感染関連インフルエンザ脳症例の剖検例について病理学的、免疫組織化学染色を用いて解析を行った。インフルエンザウイルス感染が中枢神経では見られず、上気道の上皮にのみに認められた。インフルエンザウイルス H1N1pdm 感染関連インフルエンザ脳症例の剖検例では感度の高い PCR 法でもウイルスゲノムは同定されなかった。一方原因不明脳炎脳症例の原因同定の為、multivirus real time PCR は有効であった。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated

mucosal vaccine for H5N1 influenza virus.

**Ther Clin Risk Manag.** 2009

Feb;5(1):125-32.

2. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. **J Infect Dis.** 2009 Jun 1;199(11):1629-37.
3. Ichinohe T, Ainai A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H. PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. **Vaccine** 2009 Oct 23;27(45):6276-9.
4. Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. **J Med Virol.** 82:128-137, 2010.
5. Ainai A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M and Hasegawa H. Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine. **J Med Virol.** 2010 Mar;82(3):476-84.
6. Tamura S, Hasegawa H, Kurata T. Estimation of the effective doses of nasal-inactivated

- influenza vaccine in humans from mouse-model experiments. **Jpn J Infect Dis.** 2010 Jan;63(1):8-15.
7. Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Ainai A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T. The First Autopsy Case of Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection in Japan: Detection of a High Copy Number of the Virus in Type II Alveolar Epithelial Cells by Pathological and Virological Examination. **Jpn J Infect Dis.** 2010 Jan;63(1):67-71.
  8. Takiyama A, Wang L, Tanino M, Kimura T, Kawagishi N, Kunieda Y, Katano H, Nakajima N, Hasegawa H, Takagi T, Nishihara H, Sata T, Tanaka S. Sudden Death of a Patient with Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection by Acute Respiratory Distress Syndrome. **Jpn J Infect Dis.** 2010 Jan;63(1):72-4.
  9. Ichinohe T, Ainai 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.
  10. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai 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.
  11. Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Ainai 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.
  12. Ainai 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]
  13. Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. **ACS Chem Biol.** 2012 Jan 13.
  14. Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated