

201225014A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河内 正 治

平成25 (2013) 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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河内 正治

平成25 (2013) 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 総長特任補佐
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：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：国立国際医療研究センター ICU/CCU/HCU 管理室医長
氏 名：岡本竜哉

所属施設：国立感染症研究所感染病理部 部長
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

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) ハノイ小児病院での重症呼吸急迫症候群を起こす背景の検討

布井博幸・・・17

2) 特発性肺線維症急性増悪 (IPF-AE) における予後因子解析ならびに non-IPF-AE との臨床画像病理学的検討

本間 栄・・・23

3) ハノイ国立小児病院における H5N1 鳥インフルエンザを含む重症肺炎の病理学的解析

中島典子・・・27

2. 基礎分科会

1) インフルエンザウイルス感染抵抗性細胞の解析

大島正道・・・31

2) FARDS マウスモデルを用いた病態の解析と治療薬の開発

川上和義・・・35

3) 蛍光ナノ粒子解析に伴うケモカインレセプターの役割

ーインフルエンザ劇症化の解析と治療法を目指してー

山本健二・・・43

4) 生体内ポリスルフィド生成と酸化ストレス応答

赤池孝章・・・47

5) 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評価

影山 努・・・53

III. 班会議プログラム等資料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・59

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・65

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 国立国際医療研究センター 手術部部長

研究要旨：2009年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60-90%に達する高い死亡率が特徴であり、重症化の原因はウイルス性肺炎からのARDSである(Kawachi; JID, 2009)。この高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)を含むウイルス感染が引き起こす重症化因子としての劇症型ARDS(F-ARDS)の病態解明と診断/治療の研究は、インフルエンザパンデミックのみならず、他のウイルス感染症においても流行期があるため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。われわれは、平成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(JID 2009)、H5N1死亡例サイトカインの分析については成果を公表した(J Infect 2011)。さらに劇症型ARDS(FARDS)においてはきわめて初期からMPOが病態を形成している可能性を示し(Sugamata; MIM, 2012)、インフルエンザウイルスのNS-1遺伝子がMPOとともに関与している可能性を示した(Thuy; MIM, 2011)。また、今年度臨床班は、集積したFARDS症例を新たな観点から解析しFARDSの治療法について新たな知見を得ることができた。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、23年度は病理学者が研究プロトコルの再確認とFARDS全般についての病理学的検討を行ったが、24年度は現在まで得られた高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)病理症例の集大成となる研究成果を報告した(Nakajima; Modern Pathol, 2012)。インドネシア国については、23-4年度は外交ルートを通じた研究計画書を手渡すなどの申し入れを行ったが今年度も共同研究についての認可が相手方から出ない。引き続きアプローチは行いが、24年度はタイ王国に共同研究を提示した。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)は60-80%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。この高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)を含むウイルス感染が引き起こす重症化因子としての劇症型ARDS(F-ARDS)の病態解明と診断/治療の研究は、インフルエンザパンデミックのみならず、他のウイルス感染症においても流行期があるため緊急

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。さらに、ウイルス性肺炎からのARDSはきわめて重篤で、劇症型を呈し今後日本においても大きな問題となる可能性が高い。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) を含む症例を集積／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 の疫学的研究も行う。1-2. ハノイ国立小児病院と劇症型 ARDS に関する先行型共同研究 (ウイルス性肺炎に起因する FARDS を含む)。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行なう。1-4 診断法の開発／改良：24 年度はインドネシア、タイ、ベトナムにおいて共同研究計画を立案したが、ベトナムにおいてのみ実践可能であった。

2. 動物モデルによる治療法の検証。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. 各種サイトカイン／MPO／チトクローム C／ニトロ化合物などの症例における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. 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。患者個人情報にはコード化し、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。

本研究では以下の目的にて主として高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) が引き起こす劇症型肺急性呼吸障害 (ARDS: 急性呼吸窮迫症候群) について研究を行い、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. インドネシア国などの国際協力 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. 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。
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。

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 24 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、志賀、病理：佐多、中島)、(2) インフルエンザを含むウイルス感染を主体とした FARDS の解析 (河内、布井、岡本)、(3) ベトナムにおけるウイルス性肺炎の原因究明 (布井、河内、中島)、(4) インフルエンザを含むウイルス感染を主体とした FARDS の臨床像／肺病理の解析、(5) ベトナムなど感染地域における迅速診断キットの使用実践 (河内、布井、岡本、中島、秋山)、(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、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) を含む劇症型 ARDS (FARDS) 臨床例の解析計画 (J-V FARDS)

(河内正治、岡本竜哉、志賀由佳、松下竹次：国立国際医療研究センター、中島典子、佐多徹太郎：国立感染症研究所、布井博幸：宮崎大学医学部)

研究方法：ハノイの国立小児病院 (NHP-Hanoi: National Hospital Pediatrics) との ARDS 共同研究計画書に基づいて、24 年度は 23 年度に引き続き先行的研究を行った。内容は、

- ① インフルエンザ (H5N1) 感染を含むウイルス性肺炎を病因とする劇症型 ARDS (H5N1-FARDS) の臨床病態の解明 (河内、岡本、滋賀、松下、布井)、
- ② H5N1-FARDS を含む ARDS 症例検体の

生体活性物質の測定 (布井、岡本、河内)、
③ 病理学的・組織学的解析 (佐多、中島) である。

研究成果：2012/12 までに以下の criteria で先行的に劇症型 ARDS を集積し、この中には 3 例の H5N1 症例を含んでいる。NHO-Hanoi の PICU に入室した症例のうち、① AECC1984 の診断基準を満たす ARDS 症例で、かつ② PICU 入室中に $P/F_{ratio} \leq 100$ を呈し、③ 年齢が一ヶ月以上であるすべての症例を先行的に集め、同時に気管内挿管時に気管内分泌物 (または気管洗浄液) と血清を採取した。criteria に入って集積できたのは 94 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 8 例、内訳は高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1) 3 例、2009 A/H1N1-pdm 4 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 4/4 死亡、A(H3) は混合感染を来たし、別要因で死亡した。この重症 ARDS 症例 94 例のうち、31 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、内訳は、Influenza 8、Rhinovirus 9、Adenovirus 5、RSV 5、CMV 14、measles 1 であった。中には Rhinovirus のようにかなり非特異的な、日本では一般には肺炎 (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。しかしながら、特に Rhinovirus については近年東南アジアを中心に死亡例の肺炎が報告され、C 型が非常に重症化しやすいことが指摘されているところでもあり、日本においても普遍的なウイルスであるので大いに注意を喚起しておく必要がある。さらにこれら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 67% に達しており、ウイル

ス肺炎以外の症例死亡率が 32%であることを考えると、劇症型 ARDS (H5N1-ARDS) の病態生理/重症化要因/治療を追求するにあたって、ウイルス性肺炎であることに検討要因が存在すると考えられた。今回、この点に注目し、ウイルス陽性例について解析した。

No.	AH1N1	Virus in naso-pharyngeal or bronchial aspiration										Bacteria	Blood		
		Sulfonam AH1N1 2009	Seasonal (A or B)	Influenza	Adenovirus	CMV Cytomegalo- virus	RSV Respiratory syncytial virus	Measles	H5N1 Hemagglu- tinin virus	Mycoplasma	EBV Epstein-Barr virus				
p1	○														
p2				○		54100									
p3				○											
p4				○		62000									
p14	○														
p17	○														
p21						1300000									
p24						14500									
p27															
p28															
p31															
p41															
p42															
p43															
p44															
p45															
p46															
p47															
p48															
p49															
p50															
p51															
p52						111000									
p53															
p54															
p55															
p56						2510									
p57						565000									
p58						366000									
p59															
p60						1710000									
p61															
p62						43800									
p63															
p64						22500									
p65															
p66															
p67															
p68															
p69															
p70															
p71															
p72															
p73															
p74															
p75															
p76															
p77															
p78															
p79															
p80															
p81															
p82															
p83															
p84															
p85															
p86															
p87															
p88															
p89															
p90															
p91															
p92															
p93															
p94															
p95															
p96															
p97															
p98															
p99															
p100															

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の PCR 結果 (n=31, 2007/Oct. - 2012/Dec.)

一方、NHP においては 2009 年以降 H5N1 感染症例の入院は無かった。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。しかし、先行的研究で取得した血清/気管分泌物の解析を続行し、高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)症例における Bio-Marker について H5N1/インフルエンザ感染に特異的な点を 2011 年に引き続き (Phung; JI, 2011) 続報を発表した (Microbiol Immunol 55(12): 874-884, Phung TTB ら. Key role of RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted), nonstructural protein1 and myeloperoxidase in cytokine storm induced by influenza virus PR-8 (A/H1N1) infection in A549 bronchial epithelial cells.)。

上述のようにウイルス性肺炎を原因疾患とする FARDS の死亡率は非常に高く、われわれの先行的症例集積研究においても 67%と、高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)感染に匹敵するほどの高い死亡率である (図 3: 生存曲線)。生存期間も viral 群 24.85 日に対し non-viral 群 42.25 日とほぼ半分に近い。今回の症例は、全く同じ基準で先行的に集積した症例のみについての研究結果であるので、その意義は大きいと考える。特に、ウイルス陽性群と非陽性群では背景因子や検査データなどに差はなく、唯一生存期間のみに有意差が認められた事実は大きい。治療法については、従来の抗ウイルス薬、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) (以後 IVIg) を高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)感染症患者に行なったが有意差を得ることはできなかった。今後さらに症例を集積して検討する必要がある。

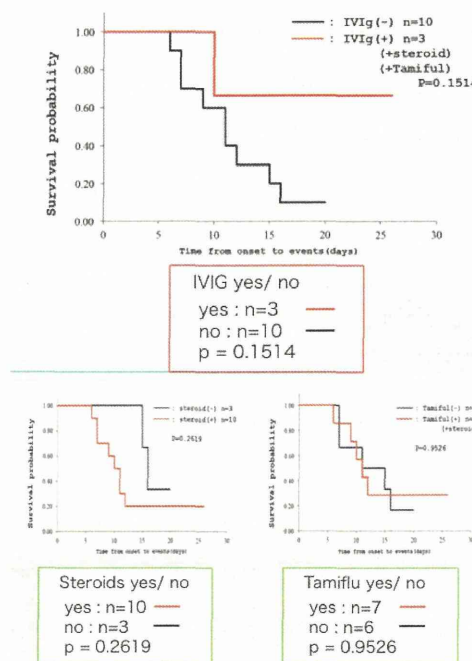


図2 H5N1 症例の治療方法についての統計学的検討 (Kaplan-Meier)

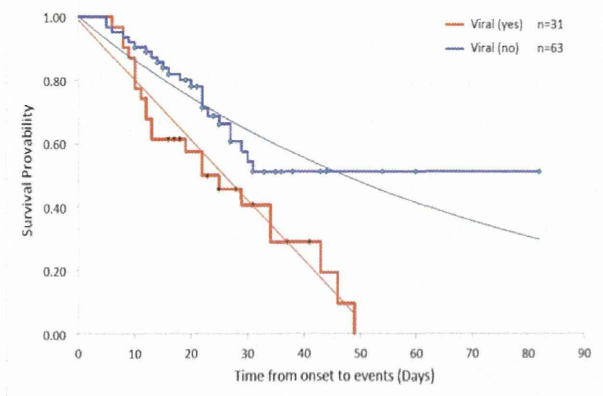


図3 先行研究にて得られた全 FARDS 症例。Viral, Non-viral 群における生存曲線 (Kaplan-Meier)

	Viral (yes) n=31		Viral (no) n=63		P value
	M or + or D	F or - or A	M or + or D	F or - or A	
Gender	11	20	24	39	
Age (year)	1.61±2.62		1.30±3.00		
Weight (kg)	7.30±5.85		7.58±7.77		
P/F < 100 on admission	27	4	48	14	
Prognosis	22 (67%)	9	23 (36%)	40	p = 0.0012*
MODS	19	12	38	25	
IVIG (2g/kg)	18	13	47	16	
BT onset	37.63±1.02		37.64±1.00		0.9515
Days onset	21.97±12.41		24.56±13.64		0.3362

図4 全 FARDS 症例における患者背景因子の検討 (Viral vs. non-Viral)

	Viral (yes) n=31	Viral (no) n=63	P value
pH	7.31±0.11	7.27±0.19	0.5435
PaO2	53.04±15.34	62.08±22.01	0.1285
PaCO2	52.89±17.41	53.29±21.00	0.5653
FiO2	0.90±0.20	0.87±0.23	0.4875
P/F	63.75±29.85	78.78±38.99	0.0802
P/F lowest	43.61±21.97	51.05±17.85	0.0176*
AST	571.24±1920.24	422.92±1303.63	0.1438
ALT	267.84±843.88	192.06±588.34	0.5131
LDH	1280.93±954.72	1382.10±1292.82	0.8551
WBC	12001±7760	14059±7777	0.2784
RBC	3800±1003	3872±1018	0.6628
PLT	298.16±126.13	332.39±175.91	0.3743
CRP	5.91±9.26	7.90±18.78	0.2422
PT	76.62±26.07	82.11±31.31	0.6238

図5 全 FARDS 症例における吸関係因子、血液検査値の検討 (Viral vs. non-Viral)

病理学的検索

病理標本：Rhinovirus による死亡例についてうち3例に Necropsy を施行し、病理学的な検索を行った (図 6, 7, 8)。今後、より詳

しい免疫学的な研究を推進して公表する予定である。以下の写真は NHP-Hanoi の病理部門が作成した。

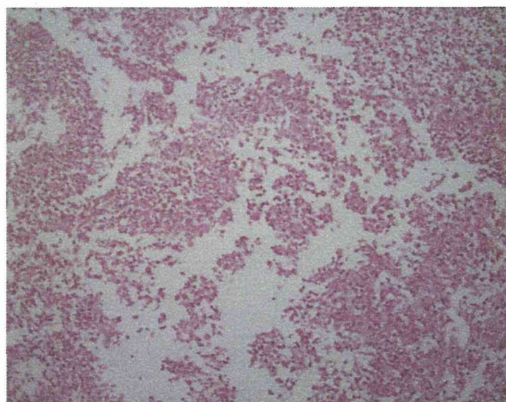


図6 Rhinovirus 症例：肺の HE 染色像

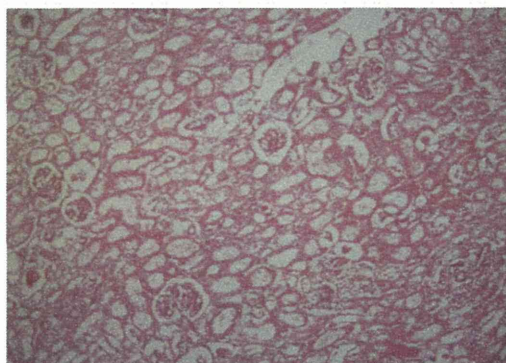


図7 Rhinovirus 症例：腎臓の HE 染色

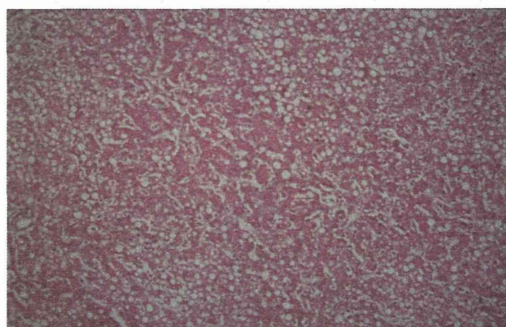


図8 Rhinovirus 症例：肝臓の HE 染色像

2) インドネシア・ベトナム国との国際協力- 迅速診断キットを使用した疫学的研究の試み

(河内正治、秋山徹、岡本竜哉：国立国際医療研究センター、布井博幸：宮崎大学医学部、影山努：国立感染研究所)

研究方法：ベトナム/ハノイの国立熱帯感染症病院 (National Institute of Infectious Tropical Diseases: NIITD) と国立小児病院 (National Hospital of Pediatrics : NHP-Hanoi) およびインドネシア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 22 年度に研究計画書を提案し、研究開始を提案しその後 23-24 年度にも研究計画を練り直して提案したが、インドネシア政府からの回答は得られていない。

研究成果：ハノイの二病院においては、鳥インフルエンザ(H5N1)について患者検体を用いて迅速キットや LAMP 法等の正確性について調べた (図 1)。また、臨床の ILI についても実際に多種類の迅速キットを用いた測定を行った (図 2)。

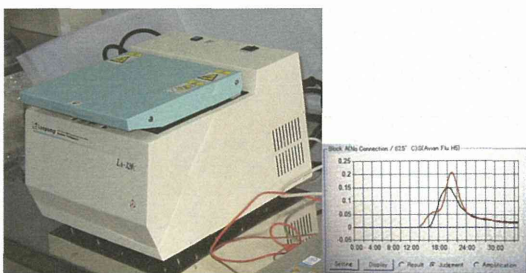


図 1. LAMP 法測定器と測定曲線 (Avian Influenza A(H5N1) 陽性の症例)

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。インドネシアにおいては、病院およびインドネシア政府からの研究開始許可が得られず、24 年度内も研究を開始できなかった。インドネシアからは 24 年度内も引き続き鳥インフルエンザ (H5N1) のヒト感染例が報告されている。

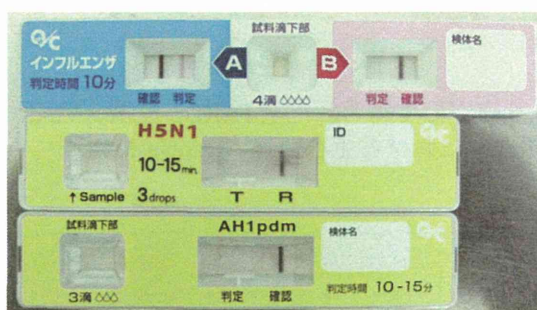


図 2. 三種の迅速キットを用いた現場での測定 (この症例では季節性 A 型陽性)

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)、2009 年 21 (19)、2010 年 9 (7)、2011 年 12 (10) であり、2012 年 9 (9) が報告されている (括弧内は死亡数)。発症推定患者数に比して報告患者数が少なく、インドネシアにおいては診断法の問題が大きいのではないかと考えられた。以上の他国における状況を考えると、日本においても鳥インフルエンザ (H5N1) のような重症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「新型感染症特別措置法」立法に合わせて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。

3) ハノイ小児病院での重症呼吸急迫症候群を起こす背景の検討

(布井博幸：宮崎大学医学部、河内正治、岡本竜哉：国立国際医療研究センター、Thuy T. B. Phung, Le T. M. Huong, San T. Luong, Liem T. Nguyen：ハノイ国立小児病院、ベトナム、中島典子：国立感染症研究所、小原収：かずさ DNA 研究所)

これまでハノイ小児病院で鳥インフルエンザによる劇症呼吸急迫症候群 (Fluminant Acute Respiratory Distress Syndrome: FARDS) を中心に、P/F 比が 100 を下る重症 ARDS の背景について検討してきた。この重症 ARDS 88 症例のうち、Rhinovirus 感染を 11 症例を経験した。Rhinovirus C 型は中国や東南アジアでの死亡者が多く報告されてきた新型の Rhinovirus で、ハノイ国立小児病院でもその流行が心配されたが、遺伝子解析の結果、保存された気道吸引物から 5 例で Rhinovirus A 型が確認された。また、重症化する背景として、免疫不全があるのではないかと考え、数名の BTK などの遺伝子解析し、病歴の解析も試みたが、同様の重症 ARDS 症状を示した患者はみられなかった。これらの結果から、重症 ARDS の背景として、環境因子 (孤児院などでの集団生活や栄養状態など) が強いのではないかと思われた。

4) 特発性肺線維症急性増悪 (IPF-AE) における予後因子解析ならびに non-IPF-AE との臨床画像病理学的検討

(本間栄、菊地直、杉野圭史：東邦大学医療センター)

特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) の急性増悪 (Acute

exacerbation; AE) は、IPF の慢性経過中に急速な呼吸不全を生じる極めて予後不良の病態である。一方で、近年、IPF 以外の特発性非特異性間質性肺炎 (Idiopathic non-specific interstitial pneumonia; I-NSIP) や膠原病肺 (Interstitial pneumonia associated with collagen vascular disease; CVD-IP) にも AE が合併することが知られてきている。病理組織学的には、いずれもびまん性肺胞障害 (diffuse alveolar damage; DAD) の像を呈し、IPF-AE と同様に予後不良である。そこで本間らは IPF-AE における予後不良因子を明らかにするべく non-IPF における AE 症例と臨床・画像・病理学的所見について比較検討した。IPF の AE 発症予測因子は、男性および CPI 高値であった。IPF-AE の予後予測因子として、入院時の P/F 比、第 3 病日の P/F 比、 Δ P/F 比 (Day 1-3)、入院時の diffuse type の ground glass opacity、AE 発症前の IPF 治療介入が挙げられた。IPF-AE 死亡群では、生存群に比べて有意に P/F 比が低値であった。次に慢性線維型間質性肺炎 (UIP、fibrotic NSIP) 症例の AE 症例検討では、画像上 NSIP パターンと判断された 5 例中 3 例で病理学的に UIP と診断、一方、画像上 UIP パターンと判断された 12 例中 2 例で病理学的に fibrotic NSIP と診断された。いずれも新旧の DAD 所見が混在し、DAD の質的・量的な病理学的相違点は認められなかった。以上のことから、AIP、CVD-IP ならびに fibrotic NSIP の AE に対しては、IPF-AE と同様に積極的な集学的治療を行う必要があるが、今後は AE 発症や予後不良例における共通した責任遺伝子などの検討、検索が期待される。

5) ハノイ国立小児病院における H5N1 鳥インフルエンザを含む

重症肺炎の病理学的解析

(中島典子、佐藤由子、長谷川秀樹：国立感染症研究所、河内正治：国立国際医療研究センター、布井博幸：宮崎大学医学部、佐多徹太郎：富山県衛生研究所)

中島らはハノイ国立小児病院との共同研究により H5N1 インフルエンザのネクロプシーあるいはオートプシー例を 5 症例解析してきた。肺局所での H5N1-RNA 量と炎症性サイトカイン・ケモカイン mRNA 量をリアルタイム定量 RT-PCR 法で定量したところ、ウイルス量とサイトカイン・ケモカインの発現量が相関していることが明らかになったことは、感染したウイルス量と病態の重症度が相関している可能性を示し、きわめて重要な知見である。さらに二重蛍光免疫組織化学により TNF- α 、IL-6、IL-8、IP-10 は肺泡マクロファージのみならず、肺泡上皮細胞や血管内皮細胞 (IL-6) でも陽性であることを示した (Nakajima et al, *Modern Pathology* 2012 e-pub)。H5N1 の肺泡上皮細胞への直接傷害と H5N1 感染によって誘導されたサイトカイン・ケモカインの作用により致死率 60%にも及ぶ劇症型の ARDS が引き起こされると考えられた。H5N1 非感染の重症肺炎 3 例(2008 年)の剖検組織を解析した。1 例はカリニ肺炎とサイトメガロウイルス(CMV)肺炎を併発していたことがわかり免疫不全状態にあったと予測された。残りの 2 例では、気管吸引物からはライノウイルス(A 型)が検出されたが、ホルマリン固定パラフィン組織切片から抽出した RNA/DNA をもちいてマルチウイルス定量 RT-PCR を行ったとこ

ろ、CMV-DNA が検出された。組織学的には肺、腎臓、肝臓に CMV 封入体がみとめられ、免疫組織化学で CMV 抗原が陽性であった。肺は DAD を呈していた。年齢は生後 2 か月と 3 か月であり、周産期の母子感染あるいは孤児院での水平感染が考えられ、低栄養状態による免疫低下が推測された。CMV の感染あるいは再活性化が肺炎の重症化因子あるいは病原体となりうることを考え、ARDS の病原ウイルス検索の際、呼吸器系疾患関連ウイルス以外に CMV も加え検索することを提案したい。

6) 鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染するとどうなるか-重症新型インフルエンザ診断・治療の手引き-

(河内正治、岡本竜哉：国立国際医療研究センター、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、ほか)

高病原性鳥インフルエンザに対するこの研究班のこれまでの研究結果のまとめと、これまで無かった重症の新型パンデミックが到来した際に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/治療の手引きを作成した。

執筆者は研究班の班員で、最新の治療からインフルエンザウイルス自体の解説まで幅広く対応した。ただし、専門的な部分はかなり難易度も高く分量も多いため、記載内容のインフルエンザの一般論、高病原性鳥インフルエンザのヒトへの感染症例、診断・治療マニュアルの部分のみを総合報告書の別冊として作成して配布する計画とした。専門的な部分を含む全体は 150-200 ページあまりの成書として出版される。各章の章立ては、以下の通り。

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 (Int. Immunol, 2011)。川上らは、このモデルを用いて、24 年度までに急性肺傷害と HMGB1 との関連性を示唆する結果を得ていることから、今年度は遺伝子組換えトロンボモジュリン (recombinant thrombomodulin: rTM) による FARDS マウスへの治療効果について検討を行った。FARDS マウスに rTM を投与すると、びまん性肺胞傷害が軽減され、生存期間の延長が観察された。rTM の作用機序を調べるために、近年 LPS 誘発肺傷害モデルの回復期に炎症反応を制御することが報告された regulatory T (Treg) 細胞に注目した。FARDS マウスでは、肺内での Treg 細胞の減少がみとめられたが、rTM 投与によって Treg 細胞が有意な増加を示すとともに、IL-10、TGF- β 産生が有意に増加した。これらの結果から、rTM が、肺内での Treg 細胞及び抗炎症性サイトカインである IL-10、TGF- β の産生を増加させることによって治療効果を発揮する可能性が示唆された。今回は、LPS 投与モデルに加えて、非致死量のインフルエンザウイルス A/H1N1 (PR8 株) を経気道感染させることによって惹起される急性肺障害の後に、肺の線維化を発症するモデルを作製することにも成功した。これは、臨床の場でもみられるインフルエンザウイルス感染による ARDS 後に発症し、その後の QOL にも大きな影響を及ぼす肺線維化の病態解析に有用と考えられ、今後さらなる検討が望まれる。

4) 新型インフルエンザ重症化におけるケモカイン・ケモカインレセプターの役割

(山本健二：国立国際医療研究センター研究所)

山本らは、新型インフルエンザにおける重症化についてケモカイン・ケモカインレセプターの役割について検討した。その結果 CCR5 レセプター及びそのライガンドの変化が顕著に多く測定された。また CCR1 レセプター及びそのライガンドも、CCR5 に比べればその変化量は少ないが、これもやはり顕著な変化を測定された観測できた。CCR5 および CCR1 が膜タンパクであることから、何かの細胞のメンブレインに存在していると考えられる。その細胞は、何であるかについては、不明である。またインフルエンザウイルス株 PR-8 に感染させる以前から肺臓器内いたのか、あるいは、どこか他の臓器から来たのか、さらにまた、その両方が起こっているのか、については現在のところ不明であり、今後更なる研究が必要である。

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中の 3-ニトロチロシンの解析

(赤池孝章：熊本大学大学院)

一酸化窒素 (NO) と活性酸素種 (ROS) は、感染、炎症、がんといった多彩な疾病に関わっている。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、免疫染色法や HPLC-電気化学検出 (ECD) 法に

より証明し、病態との関連性について報告してきた。NO・ROS に依存して生体内で生成する 8-ニトロ-cGMP は、蛋白質 S-グアニル化というユニークな翻訳後修飾を介して酸化ストレス応答における重要なシグナル分子として機能している。最近赤池らは、このような 8-ニトロ-cGMP によるシグナルの制御に、各種チオール化合物に硫黄原子が付加した化合物（ポリスルフィド； R-S-S_(n)H）が関与していることを見出した。そこで 24 年度は、酸化ストレス応答を制御する新規因子としてポリスルフィドに注目し、質量分析を用いたポリスルフィドの高感度測定システムを確立した。マウスの各種臓器ホモジネートやヒトの血漿中にシステインポリスルフィド、グルタチオンポリスルフィドなどが様々なレベルで存在していることが示された。さらに、マウスのインフルエンザ肺炎モデルでは、肺炎の進展に伴って、肺ホモジネートおよび血漿中の各種ポリスルフィドの減少が観察された。これらのことから、生体内ポリスルフィドはインフルエンザウイルス肺炎における酸化ストレスのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

6) 臨床検体を用いた 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評価

(影山努：国立感染症研究所)

海外における H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染は、WHO による 2003 年以降の集計でも、2013 年 2 月現在、世界 15 カ国で 620 人の感染例と 367 人の死亡例が確認されている。

2013 年に入ってからカンボジアでは 7 人の感染例が確認されるなど、未だ流行が収束する気配は無い。H5N1 感染の診断には H5 亜型の同定が必要であるが、現在、多くの国々ではコンベンショナル RT-PCR 法やリアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検査により H5 亜型の同定が行われている。しかしこれらの遺伝子検査は、検体からの核酸精製を必要とし、反応に必要な試薬調製等の作業も煩雑なため、ラボコンタミネーションや検体の取り違いといった偽判定が起こる可能性が常にある。このため遺伝子検査等の実験室診断に熟練した技術者を必要としなくても、病院やクリニックなどの最小限の施設で、簡便かつ迅速に H5 亜型を同定できる遺伝子検査系の導入が待たれている。Direct RT-LAMP 法は、検体からの核酸精製を必要とせずに、検体をバッファーに懸濁するだけで、RT-LAMP 反応を行う事ができる遺伝子診断系である。

24 年度は主に臨床検体を用いて A 型および H5 亜型同定ができる遺伝子診断系について LAMP 法を中心に評価検討を行った。

D. 考察

高病原性鳥インフルエンザ A (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、その病態から ARDS の誘発が主要な重症化因子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、2009 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。さらに、今回われわれが指摘したように（布井ら）、H5N1以外のウイルス性肺炎がその重篤化から最近注目されており、高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）ときわめて類似した重篤な劇症型 ARDS を生じることが判明してきた。ウイルス感染が認められた症例では死亡率が非常に高く重篤な病態を示し、今後の重要な研究テーマとなる可能性が大きい。

わが国では、高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）患者や、重篤なウイルス肺炎症例の発生はきわめて稀で、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）感染劇症型 ARDS 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／疫学的解析を行ってきた。23 年度は、鳥インフルエンザ（H5N1）感染症例のサイトカイン・ケモカインなどのバイオマーカの解析は一応の成果を得たが、まだ検討すべき項目は多く、特に病理免疫学的な検討や、種々のバイオマーカの検討がまだ不十分である。海外医療連携の強化を意図し、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継続したが、なかなか実現には至っていない。また 24 年度はタイ王国において共同研究の提示を行なった。確定診断も迅速に可能な遺伝子診断法の開発は影山を中

心に研究中であり、今後も引き続き接触を試みる予定である。

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 種の作成を終了し、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）。さらに劇症型 ARDS（FARDS）においてはきわめて初期から MPO が病態を形成している可能性を示し（Sugamata; *MIM*, 2012）、インフルエンザウイルスの NS-1 遺伝子が MPO とともに関与している可能性を示した（Thuy; *MIM*, 2011）。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、23 年度は病理学者が研究プロトコルの再確認と FARDS 全般についての病理学的検討を行ったが、24 年度は現在まで得られた高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）病理症例の集大成となる研究成果を報告した（Nakajima; *Modern Pathol*, 2012）。これには、感染ウイルス量とサイトカイン産生量が比例関係にある、というきわめて重要な新たな知見を報告した。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、またそのサイトカインがウイルス感染量に比例していること、H5N1-FARDS では呼吸機能の障害が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。また、これまでの H5N1 症例のまとめ 24 年度は、この劇症型 ARDS

がウイルス肺炎において高頻度で生じている可能性のあることや、死亡率の異常な高さを報告した。

これらの臨床上の新しい知見を踏まえて、24年度はハノイ国立小児病院において、背景因子となる原因疾患や遺伝疾患の探求も開始した。これらの成果は短時間で得られるものではなく、今後の更なる研究が必要である。また、ウイルス性肺炎において大量ガンマグロブリン療法を試みた成果も次第に証明されつつあり、これらについて完成した3タイプの動物モデルを用いて治療実験を行い、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。また、臨床的には安全性がすでにある程度確立されている抗菌薬、あるいはrTM(リコモジュリン®)などが候補に挙げられ、治療効果について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/抗凝固薬など、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)などのウイルス感染による劇症型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、これまでの知識を集大成して、24年度にはインフルエンザ(H5N1)型ARDSの迅速特異診断および

治療法を提案し、「手引き」を作成してその知識を広く人口に膾炙した。

本研究により最近ウイルス性肺炎の脅威が東南アジアを中心に報告されつつあり、今後はこの点も網羅して将来の日本への流行に備えていくことが新たな目標となる。

研究協力者および研究アドバイザー

研究分担者以外に、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(国立国際医療研究センター, 医長)
平橋淳一(東京大学病院腎臓内科、助教)、
丸茂丈史(東京大学先端科学技術研究センター、特任講師)

永田典代(国立感染症研究所, 主任研究官)
佐藤由子(国立感染症研究所, 主任研究官)

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)

秋山徹(国立国際医療研究センター研究所、感染症制御研究部室長)

荒谷康昭(横浜市立大学大学院、教授)

安田英典(城西大学、教授)

長谷川明洋(山口大学、准教授)

古屋博行(東海大学医学部、准教授)

石井恵子(東北大学大学院、准教授)

工藤大介(東北大学大学院)

高田正雄(英国 Imperial Collage、教授)

加藤有介(徳島文理大学 准教授)

3) アドバイザー

小川道雄（市立貝塚病院、総長）
佐多徹太郎（富山県衛生研究所、所長）

F. 健康危険情報

1. ベトナムでは2012年12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）。いずれも南ベトナム（ホーチミン市周辺）で、北部での発生報告は2010年の成人例以降は無い。また、2013年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、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2013年2月15日に発表したヒトインフルエンザ（H5N1）症例数は、2003年以降620例となった（367例死亡、死亡率59.2%）。2013年に入って10例（7例死亡）が報告されており、発症報告数は例年同様である。2013年の特徴としては、最近報告の無かったメコン川流域からの感染が7例（6例死亡）カンボジア側から出現したことで、2004-2006年のベトナムでの流行もメコンデルタから生じたことを考え

ると今年度はベトナムにおいて警戒する必要が有るように思われる。本年に入ってからWHOからの発症報告はカンボジア（7/6：死亡数/症例数）、中国（2/0）、エジプト（1/1）である。

G. 研究発表

（研究代表者分のみ、分担研究発表については各項参照）

1. 論文発表
 - 1) Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Yamamoto K, Nakajima N, Sato Y, Aratani Y, Oshima M, Sata T, Kobayashi K, Kawachi S, Nakayama T, Suzuki K. The contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiol Immunol.* Mar. 56(3): 171-82, 2012
 - 2) Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutaka Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy, Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki, Tetsutaro Sata Pathological study of archival lung tissues from 5 fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam *Modern Pathology.* Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]
 - 3) 河内正治：オートプシーイメージング（今月の用語）. *医療* 66(10): 570, 2012

2. 著書
 - 1) 経腸栄養マニュアル (p180-186、V-4 肺疾患) . 丸山道夫, 山東弥勒, 保木昌徳編集, 2012/2/14, 文光堂, 東京.
 - 2) レジデントのための呼吸器内科ポケットブック (p42-49、第1章 急性呼吸窮迫症候群、急性肺障害) 吉澤篤人、杉山温人編集、2012/3/23、中山書店、東京.
 - 3) 麻酔科学レビュー2012 (p63-69、11 吸入麻酔薬) . 天羽敬祐監修, 2012/3, 総合医学社, 東京.
 - 4) 重症患者と栄養管理 Q&A 第三版 (p157-62、IV-29 呼吸障害患者の栄養管理は?). 東口高志編, 2012/11/4, 総合医学社, 東京.
 - 5) 重症新型インフルエンザ診断・治療の手引き. -鳥インフルエンザは人に感染する-. 河内正治編著, 2013/3/26, メディカルサイエンス, 東京.
3. 学会発表

【国際学会】

 - 1) Shoji Kawachi, Noriko Nakajima, Tatsuya Okamoto, Hiroyuki Nunoi, Luong Thi San, Nguyen Trung Thuy, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki. The Higher Mortality Rate of ARDS Associated with Viral Infection-From the Prospective Study Cases of PICU in NHP-Hanoi. Sever Influenza: Burden, Pathogenesis and Management, October 29-31, 2012. Hanoi
 - 2) Okaomto T, Kawachi S, Thuy TB Phung, Sato Y, Nakajima N, Nunoi H, Sawa T, Fujii S, San T Luong, Liem T Nguyen, Suzuki K, Akaike T. Detetion of Protein-Bound 3-Nitrotyrosin in Plasma from Pediatric Patient with Fulminant ARDS and Avian Influenza Virus Infection. Sever Influenza: Burden, Pathogenesis and Management, October 29-31, 2012. Hanoi
 - 3) Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutake Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki, Tetsutaro Sata. Pathological study of formalin-fixed paraffin-embedded lung tissues with H5N1 influenza infection in Vietnam: Sever Influenza: Burden, Pathogenesis and Management, October 29-31, 2012. Hanoi

【国内学会】

 - 1) 野尻 記世, 豊永 庸佑, 青山 千賀子, 朝山 京子, 佐々木 立朗, 河内 正治. ハノイ国立小児病院PICUにおける肺内要因の ARDS(F-ARDS)症例(2006-2011)の検討 Cases of Fulminant-ARDS in PICU at National Hospital of Pediatrics, Hanoi. 第 59 回日本麻酔科学会学術集会 神戸市 6 月 2012
 - 2) 豊永 庸佑, 志賀 由佳, 大塚 弘晃, 花田 真毅, 林 早恵, 河内 正治. 緊急手術症例における周術期 AKI 発生と術後 CKD 発生に関する検討 Relationship between perioperative acute kidney injury and chronic kidney disease about patients undergoing emergency surgery. 第 59 回日本麻酔科学会学術集会 神戸市 6 月 2012
 - 3) 青山千賀子, 加藤 規弘, 小川 佳宏,

河内 正治. 当院における術前の抗血小板休薬と術後の動脈血栓性合併症発症の実態報告 第34回日本血栓止血学会学術集会 東京 6月 2012

- 4) 小林陽子, 志賀由佳, 大塚弘晃, 野尻記世, 篠原亜樹, 河内正治. 巨大褐色細胞腫に対し Vigileo モニターを用い適切に管理できた一例. 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部, 第52回合同学術集会, 長野, 9月, 2012.
- 5) 久良木ルーテ彩来, 林早恵, 篠原亜樹, 青山千賀子, 前原康宏, 河内正治. 修正型電気けいれん療法 (mECT) における全身麻酔導入中に心停止を来した一例. 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部, 第52回合同学術集会, 長野, 9月, 2012.
- 6) 志賀由佳, 野尻記世, 林早恵, 小林陽子, 青山千賀子, 竹内菊子, 河内正治. サリドマイド胎芽病患者の卵巣嚢腫摘出手術の麻酔経験. 日本臨床麻酔学会第32回学術集会 福島, 11月, 2012.
- 7) 岡本竜哉, 赤池孝章, Thuy TB Phung, Liem T Nguyen, 林早恵, 河内正治. 小児 ARDS 症例および鳥インフルエンザウィルス感染症例の血漿蛋白質 3-ニトロチロシンの解析. 日本集中治療学会第40回学術集会, 長野, 2月23-3月2日, 2013
- 8) 篠原亜樹, 豊永庸佑, 小林陽子, 篠原康介, 岡本竜哉, 河内正治. アーテスネート静注と血液透析による支持療法で救命しえた重症熱帯熱マラリア

の2例. 日本集中治療学会第40回学術集会, 長野, 2月23-3月2日, 2013

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