

Ⅲ. 3年間の研究成果

・ 研究代表者 (信澤枝里)

ワクチン接種者の接種後血清が特異的に結合する pdmHA の抗原領域(Sa, Sb, Ca1, Ca2, Cb)を同定した結果、約7割が Sa+Sb 及び Ca2 領域に結合し、約 3 割が Ca1 領域に結合した。また、大半の血清が複数の抗原領域に結合した。これは、pdmHA で、特定の 1 アミノ酸残基が異なる抗原領域のエピトープ構成残基となる例があり、このような抗原構造を反映した結果と考えられる。さらに、松寄らが分離した単クローン抗体(mAb)エスケープ変異株を用いた HI 試験の結果、147 位及び 158 位のアミノ酸変異に対し、約 5 割の血清で反応性が低下し、このうち、158 位は一部の流行株で変異が確認されている。今後、多くの血清の反応性に影響する 147 位に変異が生じると流行規模が大きくなる可能性が示唆された。本研究で、ヒト血清が認識する pdmHA エピトープ構造を明らかにし、pdm ウイルス変異株がヒト血清により選択された可能性を示し、また、今後変異が起きた際、流行規模に大きな影響を及ぼす部位を予測した。

・ 研究分担者 (長谷川秀樹)

(1) アレルギーモデルマウスに pdm ウイルスを感染後、喘息発作を誘導することで、喘息発作が悪化する病態モデルの作製に成功した。(2) ウイルス感染後の喘息発作誘導で、BALF 中の好中球数、好酸球数、ケモカインの産生が高くなり、逆に喘息発作後にウイルス感染した場合は、発作を誘導するとケモカインの産生は減少した。pdm ウイルス感染後に喘息発作が起きると増悪化が認められ、その原因はケモカインの産生量の増加によることが明らかとなった。

・ 研究分担者 (高橋宜聖)

(1) ヒト抗体の比較対象として使用するマウス mAb の作製を完了した。(2) ウイルス抗原に特異的な B リンパ球を単一化し、mAb を作製する技術開発に成功した。(3) ワクチン接種者から mAb を作製し、交叉反応性を明らかにした。

・ 研究分担者 (西村秀一)

(1) 健常成人を対象に pdm ワクチン接種後の免疫応答を HI 試験にて確認した結果、低/無応答者が約 2 割存在した。また、50 歳以上では低/無応答者が多いことを確認した。(2) 20 代健康成人感染者では、HI 試験で低/無応答者 3 例全てで中和抗体価の優位な上昇が確認されたが、ワクチン接種に対する低/無応答者は、11 例中 2 例は中和抗体価の上昇は確認されず、残り 5 例も上昇の割合は低かった。

・ 研究分担者 (田中成典)

(1) pdmHA とヒト型・トリ型レセプターの複合体構造で、HA の 190, 225, 226 番目のアミノ酸変異レセプターとの結合に及ぼす影響及び重要性を計算機実験により定量化した。(2) pdmHA とレセプターとの相互作用解析を FM0 法により行い、ヒト型レセプターとの結合における Lys145 の重要性を解明した。(3) 1918 年のスペイン風邪ウイルスに体するヒト mAb と過去の HA サブタイプ (1918, 1930, 1934, 2009 など) の複合体構造を作成し、結合特異性に関する計算値と実験値との整合性を確認。シミュレーションによりアミノ酸ごとの相互作用解析を行い、実験だけからは判断できない各アミノ酸間の結合の生成・消失情報を得た。

・ 研究分担者 (松寄葉子)

(1) A/Narita/1/2009 株 HA に対する 16 種類のマウス mAb を用いて、計 800 株のエスケープ変異株を分離し解析した。その結果、変異アミノ酸と変異箇所異なる 50 種類のエスケープ変異株を同定し、このうち 38 株と 16 種の mAb の組み合わせで赤血球凝集抑制(HI)試験を行い、抗原領域地図を完成させた。(2) pdmHA の抗原領域の特徴として(i)旧 H1HA の 5 つの領域のうち Sa, Sb に相当す

る領域が重なっている(ii)旧H1HAで1997年以降に欠失した147位のアミノ酸残基はpdmHAで新たな中和エピトープを構成し、この残基を認識するmAbは、異なる3つの抗原領域内に1アミノ酸変異を有するエスケープ変異株との反応性が低下した。この結果から、pdmHAのエピトープ構造には、複数の抗原領域にまたがる複雑なものが存在することが示された。(3)HI試験によるpdm分離株とmAbとの反応性から、遺伝子解析を待たずに抗原変異株の同定が可能な事を示した。

・ 研究分担者(安武義晃)

(1)抗原-抗体結合部位の詳細解析のため、中和活性のある2つのmAbの結晶化を試み、このうち1抗体の結晶化に成功した。しかし結晶が微細なため構造解析に用いる質の回折データ取得には至っていない。(2)精製量が不十分で結晶化に用いることができなかつたmAbとpdmHAを用いて、高速原子間力顕微鏡による相互作用観察を試みた。部分的に抗原抗体複合体の構造と思われる像を捉えることに成功したが、相互作用領域の詳細を議論する高品質のイメージを得る事はできなかった。(3)インフルエンザHA-単一抗体複合体結晶化のためのモデル実験として、A/Aichi/2/68由来のHAおよびmAb β 121d Fabフラグメントの複合体を用いて結晶化を行った結果、HAのみの結晶が生成し、その結晶構造解析に成功した。これまでの結晶解析で観察されることがない複合型糖鎖の構造が明瞭に観察された。本データはProtein Data Bankに登録を行った (Accession code: 3vun)。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 作製した動物モデルを用いた重症化症例の予防法、治療法の開発。
- (2) インフルエンザ罹患者とワクチン接種者で誘導される抗体の差異を明らかにする。
- (3) ヒトmAbを用いてエスケープ変異株を分離し、ヒトのエピトープ構造を詳細に解析する。
- (4) 本研究での手法を用いたヒト血清抗体の解析によるA/H3, B型の抗原変異の予測、流行規模の予測。
- (5) 交叉反応性中和抗体のウイルス感染予防と治療効果の検証。
- (6) ワクチン接種及び感染に対する低/無免疫応答者の割合をpdm及び季節性ウイルスで比較。
- (7) HI価のない中和抗体のエピトープ構造の解析。
- (8) HAに対する計算機シミュレーションを、古典力場を用いたMD計算と量子力学的なFMO計算を組み合わせ実行し、アミノ酸変異による相互作用エネルギーの変化を予測し、変異しやすさを提示する基本プロトコルを確立する。
- (9) HA複合体の結晶構造解析を行うため、HAをウイルス膜あるいは細胞膜表面から切り出す技術的手法の一般化。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) pdmウイルス感染重症例の治療法、ガイドラインの作成、重症化予防策への貢献。
- (2) pdmウイルスの抗原変異による流行規模の予測、対応策に貢献。
- (3) 有効なpdmワクチン製造種株の選択に重要な情報の提供。
- (4) ワクチン接種に対する低/無免疫応答者の情報は、免疫賦与の施策に資する。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

信澤枝里 (研究代表者)

• Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, and Nobusawa E. The HA and NA affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses. JJID , 2012 (in press).

• Nobusawa E, Omagari K, Nakajima S, Nakajima K. Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A. Microbiol. Immunol. (2012) 56:99-106.

長谷川秀樹 (研究分担者)

• van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. Vaccine. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.

• 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 Influenza Vaccine. J Med Virol 2012 Feb;84(2):336-44.

高橋宜聖(研究分担者)

• Onodera, T., Takahashi, Y.*, Yokoi, Y., Ato, M., Kodama, Y., Hachimura, S., Kurosaki, T., Kobayashi, K. (*Corresponding author) Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2012)

• Takahashi, Y.*, Onodera, T., Kobayashi, K., Kurosaki, T. (*Corresponding author). Primary and secondary B-cell responses to pulmonary virus infection. Infect. Disord. Drug Targets (2012)

田中成典 (研究分担者)

• Yoshioka A, Fukuzawa K, Mochizuki Y, Yamashita K, Nakano T, Okiyama Y, Nobusawa E, Nakajima K, and Tanaka S. "Prediction of Probable Mutations in Influenza Virus Hemagglutinin Protein Based on Large-Scale Ab Initio Fragment Molecular Orbital Calculations", J. Mol. Graph. Model. (2011) 30 : 110-119.

• Yoshioka A, Takematsu K, Kurisaki I, Fukuzawa K, Mochizuki Y, Nakano T, Nobusawa E, Nakajima K, and Tanaka S. "Antigen-Antibody Interactions of Influenza Virus Hemagglutinin Revealed by the Fragment Molecular Orbital Calculation", Theor. Chem. Acc. (2011) 130:1197-1202.

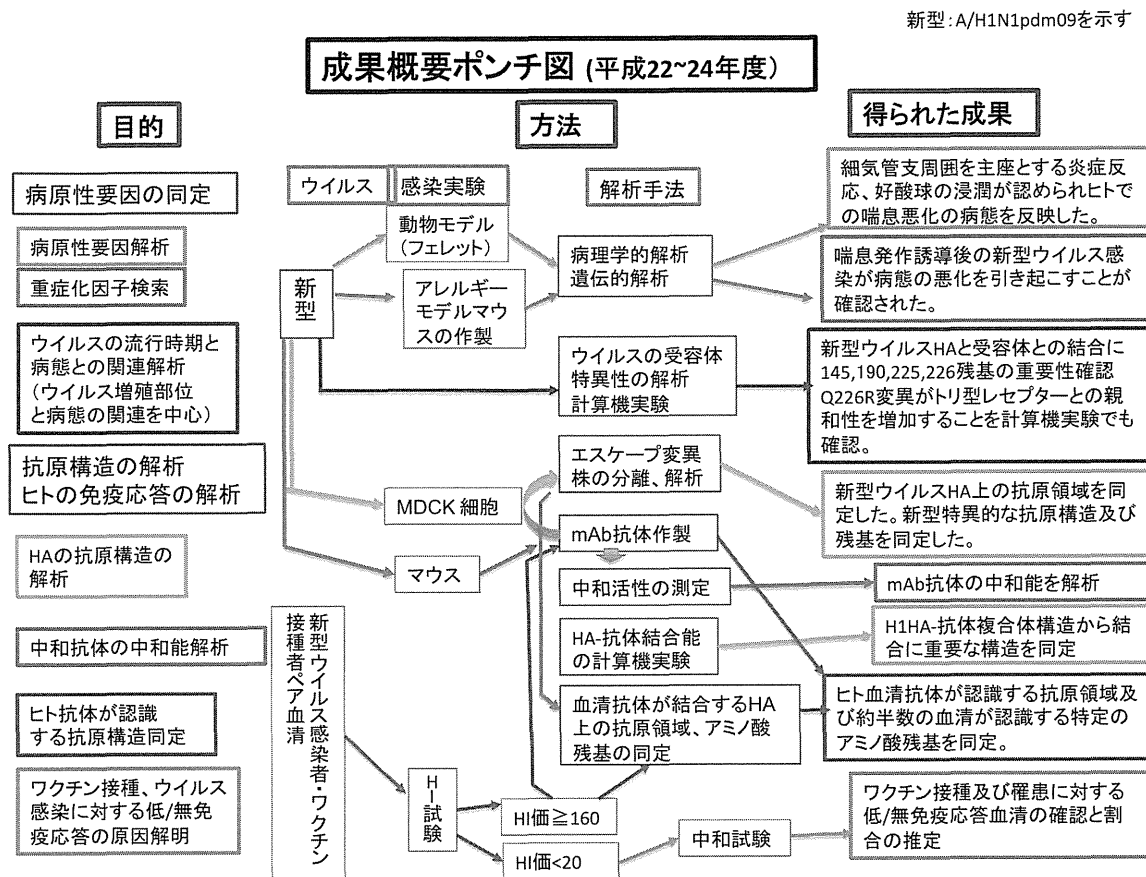
• Fukuzawa K, Omagari K., Nakajima K, Nobusawa E, and Tanaka S. "Sialic Acid Recognition of the Pandemic Influenza 2009 H1N1 Virus: Binding Mechanism Between Human Receptor and Influenza Hemagglutinin", Protein Peptide Lett. (2011) 18:530-539.

安武義晃 (研究分担者)

Yasutake, Y., Suzuki, T., Kawaguchi, A., Nobusawa, E. Crystal structure of a influenza A virus (A/Aichi/2/1968 H3N2) hemagglutinin in C2 space group. Deposited in Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) under accession code 3VUN.

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。



●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

1983年～1989年：東京大学医科学研究所・ウイルス学
 1989年～1990年：東京都臨床医学総合研究所・微生物学
 1990年～1991年：国立公衆衛生院・微生物学
 1991年～2009年：名古屋市立大学大学院・医学研究科・ウイルス学
 1992年～1993年：St. Jude Children's Research Hospital Dept. of Virology

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

中島捷久(当時、東京大学医科学研究所、名古屋市立大学大学院)
 中島節子(当時、国立公衆衛生院)
 野本明男(当時、東京都臨床医学総合研究所)
 河岡義裕(当時、St. Jude Children's Research Hospital)
 田代真人(国立感染症研究所)

・主な研究課題

インフルエンザウイルスの遺伝子進化系統解析
 インフルエンザウイルスHAの亜型系統解析
 インフルエンザウイルスのHAのエピトープ解析
 インフルエンザウイルスの受容体結合能の解析
 インフルエンザウイルスの宿主特異性の解析
 インフルエンザウイルスHAの膜融合能の解析
 インフルエンザウイルスの分子疫学
 インフルエンザウイルスの抗原変異解析
 インフルエンザウイルスの変異率の解析
 インフルエンザウイルスワクチン株開発

・これまでの研究実績

※研究代表者の本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、**太字・斜体文字**で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

・ *Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, and Nobusawa E. The HA and NA affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses. JJID, 2012 (in press).*

・ Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T. Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010-11. *Virus Res.* (2012) Sep 19. doi:pii: S0168-1702(12)00322-X. 10.1016/j.virusres.2012.09.004.

・ *Nobusawa E, Omagari K, Nakajima S, Nakajima K. Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A. *Microbiol. Immunol.* (2012) 56:99-106.*

・ *K. Fukuzawa, K. Omagari, K. Nakajima, E. Nobusawa, and S. Tanaka, "Sialic Acid Recognition of the Pandemic Influenza 2009 H1N1 Virus: Binding Mechanism Between Human Receptor and Influenza Hemagglutinin", *Protein Peptide Lett.* 18 (2011) pp. 530-539.*

・ *A. Yoshioka, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, E. Nobusawa, K.*

Nakajima and S. Tanaka, "Prediction of Probable Mutations in Influenza Virus Hemagglutinin Protein Based on Large-Scale Ab Initio Fragment Molecular Orbital Calculations", J. Mol. Graph. Model. 30 (2011) pp. 110-119.

• *A. Yoshioka, K. Takematsu, I. Kurisaki, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, T. Nakano, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Antigen-Antibody Interactions of Influenza Virus Hemagglutinin Revealed by the Fragment Molecular Orbital Calculation", Theor. Chem. Acc. 130 (2011) pp. 1197-1202.*

• Yano T, Nobusawa E, Nagy A, Nakajima S, Nakajima K. Effects of single-point amino acid substitutions on the structure and function neuraminidase proteins in influenza A virus. *Microbiol Immunol.* 2008 Apr;52(4):216-23.

• Isaka M, Zhao Y, Nobusawa E, Nakajima S, Nakajima K, Yasuda Y, Matsui H, Hasegawa T, Maeyama J, Morokuma K, Ohkuma K, Tochikubo K. Protective effect of nasal immunization of influenza virus hemagglutinin with recombinant cholera toxin B subunit as a mucosal adjuvant in mice. *Microbiol Immunol.* 2008 Feb;52(2):55-63.

• Nakajima S, Nakajima K, Nobusawa E, Zhao J, Tanaka S, Fukuzawa K. Comparison of epitope structures of H3HAs through protein modeling of influenza A virus hemagglutinin: mechanism for selection of antigenic variants in the presence of a monoclonal antibody. *Microbiol Immunol.* 2007;51(12):1179-87. 8. Ujike M, Nakajima K, Nobusawa E. A point mutation at the C terminus of the cytoplasmic domain of influenza B virus haemagglutinin inhibits syncytium formation. *J Gen Virol.* 2006 Jun;87(Pt 6):1669-76.

• Nakajima K, Nobusawa E, Nakajima S. [Accumulation of amino acid substitutions promotes irreversible structural changes in the hemagglutinin of human influenza AH3 virus during evolution]. *Uirusu.* 2006 Jun;56(1):91-8. Review. Japanese.

• Nobusawa E, Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol.* 2006 Apr;80(7):3675-8. PubMed PMID: 16537638

• Nakajima K, Nobusawa E, Nagy A, Nakajima S. Accumulation of amino acid substitutions promotes irreversible structural changes in the hemagglutinin of human influenza AH3 virus during evolution. *J Virol.* 2005 May;79(10):6472-7.

• Ujike M, Nakajima K, Nobusawa E. Influence of additional acylation site(s) of influenza B virus hemagglutinin on syncytium formation. *Microbiol Immunol.* 2005;49(4):355-9.

• Ujike M, Nakajima K, Nobusawa E. Influence of acylation sites of influenza B virus hemagglutinin on fusion pore formation and dilation. *J Virol.* 2004 Nov;78(21):11536-43.

• Sato K, Morishita T, Nobusawa E, Tonegawa K, Sakae K, Nakajima S, Nakajima K. Amino-acid change on the antigenic region B1 of H3 haemagglutinin may be a trigger for the emergence of drift strain of influenza A virus. *Epidemiol Infect.* 2004 Jun;132(3):399-406.

• Nakajima K, Nobusawa E, Tonegawa K, Nakajima S. Restriction of amino acid change in influenza A virus H3HA: comparison of amino acid changes observed in nature and in vitro. *J Virol.* 2003 Sep;77(18):10088-98.

• Tonegawa K, Nobusawa E, Nakajima K, Kato T, Kutsuna T, Kuroda K, Shibata T, Harada Y, Nakamura A, Itoh M. Analysis of epitope recognition of antibodies induced by DNA immunization against hemagglutinin protein of influenza A virus. *Vaccine.* 2003 Jul 4;21(23):3118-25.

• Luo C, Nobusawa E, Nakajima K. Analysis of the desialidation process of the haemagglutinin protein of influenza

B virus: the host-dependent desialidation step. *J Gen Virol.* 2002 Jul;83(Pt 7):1729-34.

- Nobusawa E, Ishihara H, Morishita T, Sato K, Nakajima K. Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): a single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides. *Virology.* 2000 Dec 20;278(2):587-96.
- Sato K, Morishita T, Nobusawa E, Suzuki Y, Miyazaki Y, Fukui Y, Suzuki S, Nakajima K. Surveillance of influenza viruses isolated from travellers at Nagoya International Airport. *Epidemiol Infect.* 2000 Jun;124(3):507-14.
- Luo C, Nobusawa E, Nakajima K. An analysis of the role of neuraminidase in the receptor-binding activity of influenza B virus: the inhibitory effect of Zanamivir on haemadsorption. *J Gen Virol.* 1999 Nov;80 (Pt 11):2969-76.
- Luo C, Morishita T, Satou K, Tateno Y, Nakajima K, Nobusawa E. Evolutionary pattern of influenza B viruses based on the HA and NS genes during 1940 to 1999: origin of the NS genes after 1997. *Arch Virol.* 1999;144(10):1881-91.
- Blaney JE Jr, Nobusawa E, Brehm MA, Bonneau RH, Mylin LM, Fu TM, Kawaoka Y, Tevethia SS. Immunization with a single major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte recognition epitope of herpes simplex virus type 2 confers protective immunity. *J Virol.* 1998 Dec;72(12):9567-74.
- Tong N, Nobusawa E, Morishita M, Nakajima S, Nakajima K. M protein correlates with the receptor-binding specificity of haemagglutinin protein of reassortant influenza A (H1N1) virus. *J Gen Virol.* 1998 Oct;79 (Pt 10):2425-34.
- Morishita T, Nobusawa E, Luo S, Sato K, Nakajima S, Nakajima K. Analysis of the host-specific haemagglutination of influenza A(H1N1) viruses isolated in the 1995/6 season. *Epidemiol Infect.* 1997 Dec;119(3):327-34.
- Takahashi M, Yamada T, Nakanishi K, Fujita K, Nakajima K, Nobusawa E, Yamamoto T, Kato T, Okada H. Influenza a virus infection of primary cultured cells from rat fetal brain. *Parkinsonism Relat Disord.* 1997 Apr;3(2):97-102.
- Morishita T, Nobusawa E, Nakajima K, Nakajima S. Studies on the molecular basis for loss of the ability of recent influenza A (H1N1) virus strains to agglutinate chicken erythrocytes. *J Gen Virol.* 1996 Oct;77 (Pt 10):2499-506.
- Nobusawa E, Hishida R, Murata M, Kawasaki K, Ohnishi S, Nakajima K. The role of acidic residues in the "fusion segment" of influenza A virus hemagglutinin in low-pH-dependent membrane fusion. *Arch Virol.* 1995;140(5):865-75.
- Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology.* 1991 Jun;182(2):475-85.
- Nakajima K, Nobusawa E, Ogawa T, Nakajima S. Evolution of the NS genes of the influenza A viruses. I. The genetic relatedness of the NS genes of animal influenza viruses. *Virus Genes.* 1990 Jun;4(1):5-13.
- Nobusawa E, Nakajima K. Amino acid substitution at position 226 of the hemagglutinin molecule of influenza (H1N1) virus affects receptor binding activity but not fusion activity. *Virology.* 1988 Nov;167(1):8-14.
- Nakajima K, Nobusawa E, Nakajima S. Evolution of the NS genes of the influenza A viruses. II. Characteristics of the amino acid changes in the NS1 proteins of the influenza A viruses. *Virus Genes.* 1990 Jun;4(1):15-26.
- Nobusawa E, Nakajima K, Nakajima S. Determination of the epitope 264 on the hemagglutinin molecule of influenza H1N1 virus by site-specific mutagenesis. *Virology.* 1987 Jul;159(1):10-9.
- Nakajima K, Nobusawa E, Ogawa T, Nakajima S. Genetic divergence of the NS genes of avian influenza viruses. *Virology.* 1987 Jun;158(2):465-8.

・ Suzuki Y, Nagao Y, Kato H, Matsumoto M, Nerome K, Nakajima K, Nobusawa E. Human influenza A virus hemagglutinin distinguishes sialyloligosaccharides in membrane-associated gangliosides as its receptor which mediates the adsorption and fusion processes of virus infection. Specificity for oligosaccharides and sialic acids and the sequence to which sialic acid is attached. J Biol Chem. 1986 Dec 25;261(36):17057-61. PubMed PMID: 3782153.

・ 平成 25 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規公募課題の応募状況

※申請している場合は、申請課題名を記載して下さい。

「インフルエンザワクチン製造種株及び品質管理手法の開発に関する研究」

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22～24年度

「新型インフルエンザH1N1のウイルスの病原性等の
 解析に関する研究」

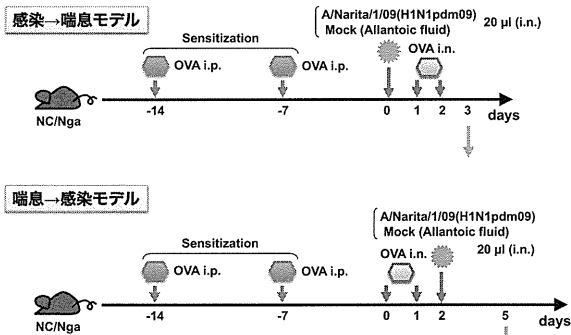
研究代表者
 信澤枝里 (国立感染症研究所)

研究分担者
 長谷川秀樹 (国立感染症研究所)
 高橋宜聖 (国立感染症研究所)
 西村秀一 (国立病院機構仙台医療センター)
 田中成典 (神戸大学)
 松崎葉子 (山形大学)
 安武義晃 (独立行政法人 産業技術総合研究所)

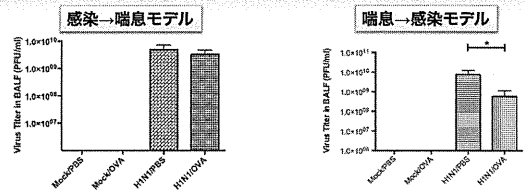
研究班の目的

新型インフルエンザウイルスA(H1N1)pdm09の病原性、抗原性、免疫原性等を解析し、国民の健康被害を最小限に留めるために必要な情報を提供する。

喘息発作誘発モデルを用いた感染実験



感染3日目の肺洗浄液中のウイルス量



感染3日目の肺の病理学的検索

	感染→喘息モデル		喘息→感染モデル	
	PBS	OVA	PBS	OVA
Mock		細気管支周囲に軽度の好酸球浸潤		炎症細胞浸潤は軽度 明らかな好酸球浸潤なし
H1N1	細気管支周囲に軽度の炎症性細胞浸潤 好中球を主体	細気管支内腔と周囲に高度の好酸球浸潤		
抗原の分布	違いなし		OVA負荷群において気管支上皮細胞における著大な減少	

新型HAの抗原構造の解析

HA分子上の抗原地図の完成

H1HA上の抗原領域 (HAを上から見た図)

レセプター結合部位

新型ウイルス(A/Narita/01/2009)に対して、中和能を持つモノクローナル抗体(mAb)を用いて、800株のエスケープ変異株を分離解析した。

- 本研究で得たエスケープ変異株のアミノ酸置換49種類→Sa: 22変異/8部位, Sb: 11変異/7部位, Ca2: 14変異/8部位, その他(147位): 2変異
- 新型HAは、旧H1HAとほぼ同様の領域が抗原領域になっている。
- mAbと変異株の反応性から、SaとSb領域は3か所のアミノ酸(170, 173, 211位)で重なり合っていることが判明した。
- 最近の旧H1HAでは欠失している147位が中和エピートプになっており、147位が172(Sa)、170(Sb)、159(Ca2)とともに新たな抗原領域を形成している可能性が示唆された。

ヒト血清抗体が認識するpdmHA上の抗原構造の解析

目的: ヒトの中和抗体が結合する抗原領域を同定し、抗原変異部位、流行規模の予測に資する。

対象: pdmワクチン(一価)接種者のペア血清(19~60歳)

方法: キメラHAとの結合能測定、mAbエスケープ変異株(EM)に対するHI価測定

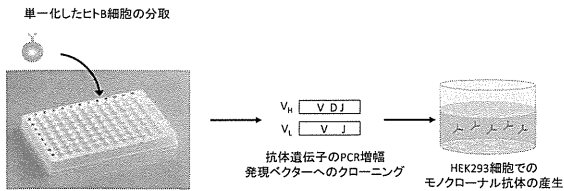
- 血清の結合する領域: 7割の血清がSa+SbあるいはCa2領域, 3割の血清がCa1領域に結合した。
- 試験の結果に基づき、血清抗体は下記3グループに分類された。
 - どの領域の変異の影響も受けないグループ
 - 複数の抗原領域の変異の影響をうけるグループ
 - 特定の抗原領域の変異の影響をうけるグループ
- 147, 158, 159位の変異で約4~5割の血清で反応性の低下が確認された。

変異部位、流行規模の予測

レセプター結合領域

Ca1 site 27.5%
 Sa site
 Sb site 65.0%
 Ca2 site 70.0%
 ヒト血清が結合する抗原領域とその割合

ヒト末梢血B細胞からモノクローナル抗体を製作する方法の開発



従来の抗体産生細胞を用いた方法に加え
記憶B細胞を用いた方法を開発した

↓

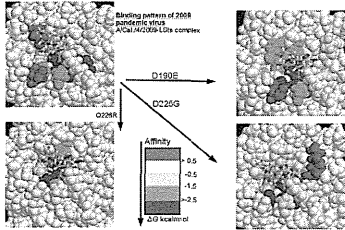
広範囲のドナーからモノクローナル抗体の作製が可能

↓

15種類のヒトモノクローナル抗体の作製を完了
(交差反応性抗体を含む)

ヘマグルチニン(HA)の変異とトリ型レセプターとの相互作用変化

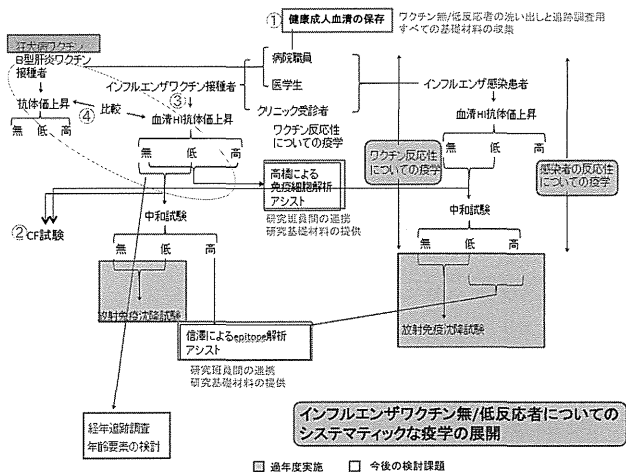
The Effect of Amino acid substitutions



HA: A/California/4/2009

分子動力学シミュレーションによって、3ヶ所のアミノ酸変異による自由エネルギー変化を算出

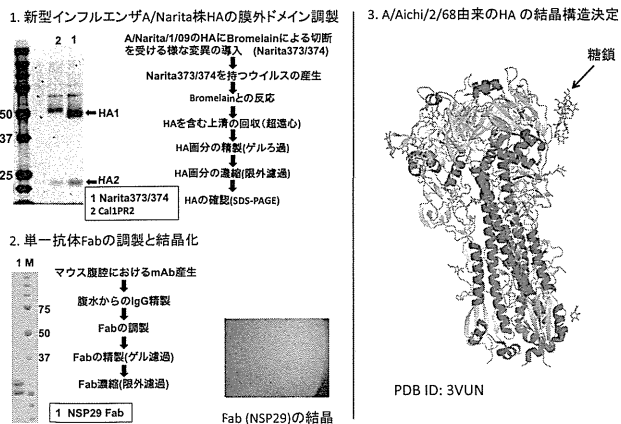
赤: 糖鎖レセプターとの斥力相互作用
青: 糖鎖レセプターとの引力相互作用



インフルエンザワクチン無/低反応者についてのシステマティックな疫学の展開 (続)

- ① 健康成人血清の確保・保存
 - 健康成人血清1850検体、重症心身障害者病棟入院患者血清733検体
- ② CF試験
 - ワクチン接種後HI試験無/低反応性の健康成人検体28例: 試みたものの、検体の抗補体性が高く不成功
 - 感染者血清でのHI抗体無/低反応血清69例に試み4例でCF抗体価の有意上昇
 - 2例は中和抗体価も上がらないもののCF抗体価有意上昇例
- ③ 健康成人H1pdmワクチンH抗体高反応46例と無/低反応28例の2010/11シーズンのH3とB型ワクチンに対する反応性
 - 高反応者 H3に對し1例を除きすべて1:40以上を獲得
 - 低反応者 1:40以上獲得者は約3割のみ
 - B型については両者とも反応性が悪く、どちらも1:40以上の獲得者約2割のみ
- ④ B型肝炎ワクチンへの反応性との比較
 - 健康成人67例で不活化ワクチンであるB型肝炎とインフルエンザワクチンへの反応性を同一人物で調べた
 - ワクチン間で反応性が相関する集団15例としない集団50例にきれいに分かれた
 - 双方に対する無/低反応例8例(12%)確認

抗原抗体複合体の結晶構造解析



平成 24 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 『成果概要』

研究課題：新型インフルエンザ H1N1 の病態把握と重症化の要因の解明に関する研究

課題番号：H22-新興-一般-002

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：小林 信之

所属研究機関：国立国際医療研究センター病院

所属部局：呼吸器内科

職名：医長

年次別研究費(交付決定額)：

1 年目 20,800,000 円 2 年目 15,488,000 円 3 年目 13,768,000 円 計 50,056,000 円

I. 研究の意義

- (1) 新型インフルエンザ肺炎の重症化因子や有効な治療法については明らかにされていない。
- (2) インフルエンザの遺伝子解析、薬剤耐性、重症化率についての正確な情報が把握されていない。
- (3) 2009-2010 年シーズン以降のインフルエンザウイルス流行状況を把握する必要がある。
- (4) 新たに使用可能となった薬剤を含めた 4 種類の薬剤の有効性に関する検討は十分でない。
- (5) 新型インフルエンザ心筋炎の発症率、病態、危険因子、治療法は確立されていない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 新型インフルエンザ (H1N1)pdm2009 の臨床的、疫学的な特徴を明らかにする。
- (2) 新型インフルエンザ肺炎の重症化要因を解明し、有用な治療法について検討する。
- (3) 市中株での薬剤耐性インフルエンザ頻度をモニターし、耐性株が大流行する兆候を検証する。
- (4) 各(亜)型における NA 阻害薬の有効性を把握し、NA 阻害薬の使い分けの指針作成を目指す。
- (5) 新型インフルエンザ心筋炎の病態、合併率、重症度、致死率を明らかにし、治療法を確立する。
- (6) パンデミックシーズン以降のウイルス流行状況および臨床症状の変遷について明らかにする。

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者(小林信之)

- (1) 全身性ステロイドは約 8 割に投与されたが、解熱時間および入院期間には悪影響を及ぼさず。
- (2) 日本の成人インフルエンザウイルス肺炎において、ARDS の合併が死亡要因の 1 つ。

・研究分担者(工藤宏一郎)

- (1) インフルエンザ A(H1N1)pdm09 による入院・挿管例の死亡予測因子は Lung Injury Score。
- (2) インフルエンザ感染によりメキシコ INER に入院した 19 歳以下の患者では、日本の NCGM と比べて肺炎の重症度が高く、発症から治療開始までの日数が長いことと関連していた。

・研究分担者(斎藤玲子)

- (1) A/H1N1pdm09 は Clade 1 と 2 のウイルスが検出されたが、抗原性に変化なくワクチン株と一致。
- (2) A/H1N1pdm09 の初診時株では 2009/2010 年にはみられなかった NA 蛋白 H275Y 変異株が、2010/2011 年では 0.48% に検出。A/H3N2 と B 型については耐性株の出現はみられず。

・研究分担者(池松秀之)

- (1) 各シーズン亜型について、2009-10 年は H1N1pdm09 がほぼ 100% を占め、2010-11 年は H1N1pdm、H3N2 と B の混合流行、2011-12 年は H1N1pdm09 がほぼ消失して H3N2 と B の混合流行。

(2) A/H1N1pdm09 は 2009-10 年では 10 代、2010-11 年では 20 代が最多、H3N2 は 10 歳未満が最多。

・研究分担者(河合直樹)

(1) インフルエンザ(H1N1)pdm09 の症状は、2009-10 年では大部分は軽症。

(2) 解熱までに要する時間を薬剤の有効性の指標とすると、H1N1pdm09 ではオセルタミビル、ザナミビルのほか、ラニナミビル、ペラミビルともに有効性が高かった。

・研究分担者(浮村 聡)

(1) 2009/10 の新型インフルエンザ心筋炎は 27 例(小児は 8 例)、2010/11 は 4 例(いずれも小児、B 型が 3 例)のみであった。パンデミックシーズンの次のシーズン以降では大きく減少。

(2) 体外補助循環により重症患者 13 例中 9 例が救命され、循環器専門病院への迅速な紹介が重要。

IV. 今後考えられる新たな課題

(1) A/H1N1pdm 09 が流行することにより、再び薬剤耐性株が流行する可能性があるため監視が必要。A/H3N2 や B 型においても毎シーズン、薬剤耐性をモニターする必要がある。

(2) 4 種類の NA 阻害剤が使用されているのは日本のみであるため、将来の新型インフルエンザ流行にそなえ、薬剤効果の詳細な検討を続けることが必要。

(3) インフルエンザ重症肺炎に対する薬剤効果の評価を基に、治療ガイドラインとして整備。

(4) 劇症型心筋炎の救命のため、集中治療の可能な施設との地域医療連携の強化が重要。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) インフルエンザ重症肺炎の診療ガイドラインを作成することにより、将来、インフルエンザパンデミックが発生した場合の重症化に至る患者の減少に寄与。

(2) インフルエンザ心筋炎の診断・治療マニュアルの作成。

(3) 薬剤耐性モニタリングにより、臨床医に対して薬剤の処方ガイドラインをリアルタイムに示す。

(4) 実地医家向けのインフルエンザ診療指針としてインフルエンザ診療マニュアルを作成発行。

(5) インフルエンザ重症化因子の解明、効果的な治療法の開発・確立により医療費を節減。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

・研究代表者(小林信之)、研究分担者(工藤宏一郎)

(1) Kudo K, Takasaki J, Manabe T, Uryu H, Yamada R, Kuroda E, Kobayashi N, Matsushita T. Systemic corticosteroids and early administration of antiviral agents for pneumonia with acute wheezing due to influenza A(H1N1)pdm09 in Japan. PLoS One 2012 7(2):e32280.

・研究分担者(工藤宏一郎)、研究協力者(高崎 仁、間辺利江)

(1) Higuera Iglesias AL, Kudo K, Manabe T, Corcho Berdugo AE, Baeza AC, Ramos LA, Gutierrez RG, Manjarrez Zavala ME, Takasaki J, Izumi S, Bautista E, Perez Padilla JR. Reducing occurrence and severity of pneumonia due to pandemic H1N1 2009 by early oseltamivir administration: a retrospective study in Mexico. PLoS One 2011;6(7): e21838.

(2) Manabe T, Higuera Iglesias AL, Vazquez Manriquez ME, Martinez Valadez EL, Ramos LA, Izumi S, Takasaki J, Kudo K. Socioeconomic factors influencing hospitalized patients with pneumonia due to influenza A(H1N1)pdm09 in Mexico. PLoS One 2012;7(7): e40529.

(3) Kudo K, Higuera Iglesias AL, Manabe T, et al. Systemic corticosteroid and factors to mortality in patients with ARDS due to influenza A(H1N1)pdm09 in Mexico. Submitted.

・研究分担者(斎藤玲子)

- (1) Suzuki Y, Saito R, Sato I, Zaraket H, Nishikawa M, Tamura T, Dapat C, Caperig-Dapat I, Baranovich T, Suzuki T, Suzuki H. Identification of oseltamivir resistance among pandemic and seasonal influenza A (H1N1) viruses by an His275Tyr genotyping assay using the cycling probe method. *J Clin Microbiol* 49(1):125-30, 2011.
- (2) Dapat IC, Dapat C, Baranovich T, Suzuki Y, Kondo H, Shobugawa Y, Saito R, Suzuki H; The Japanese Influenza Collaborative Study Group. Genetic characterization of human influenza viruses in the pandemic (2009-2010) and post-pandemic (2010-2011) periods in Japan. *PLoS One*.7(6):e36455, 2012.
- (3) Shobugawa Y, Saito R, Sato I, Kawashima T, Dapat C, Dapat IC, Kondo H, Suzuki Y, Saito K, Suzuki H. Clinical effectiveness of neuraminidase inhibitors-oseltamivir, zanamivir, laninamivir, and peramivir-for treatment of influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 infection: an observational study in the 2010-2011 influenza season in Japan. *J Infect Chemother*. 2012 [Epub ahead of print]

・研究分担者(河合直樹)、研究分担者(池松秀之)

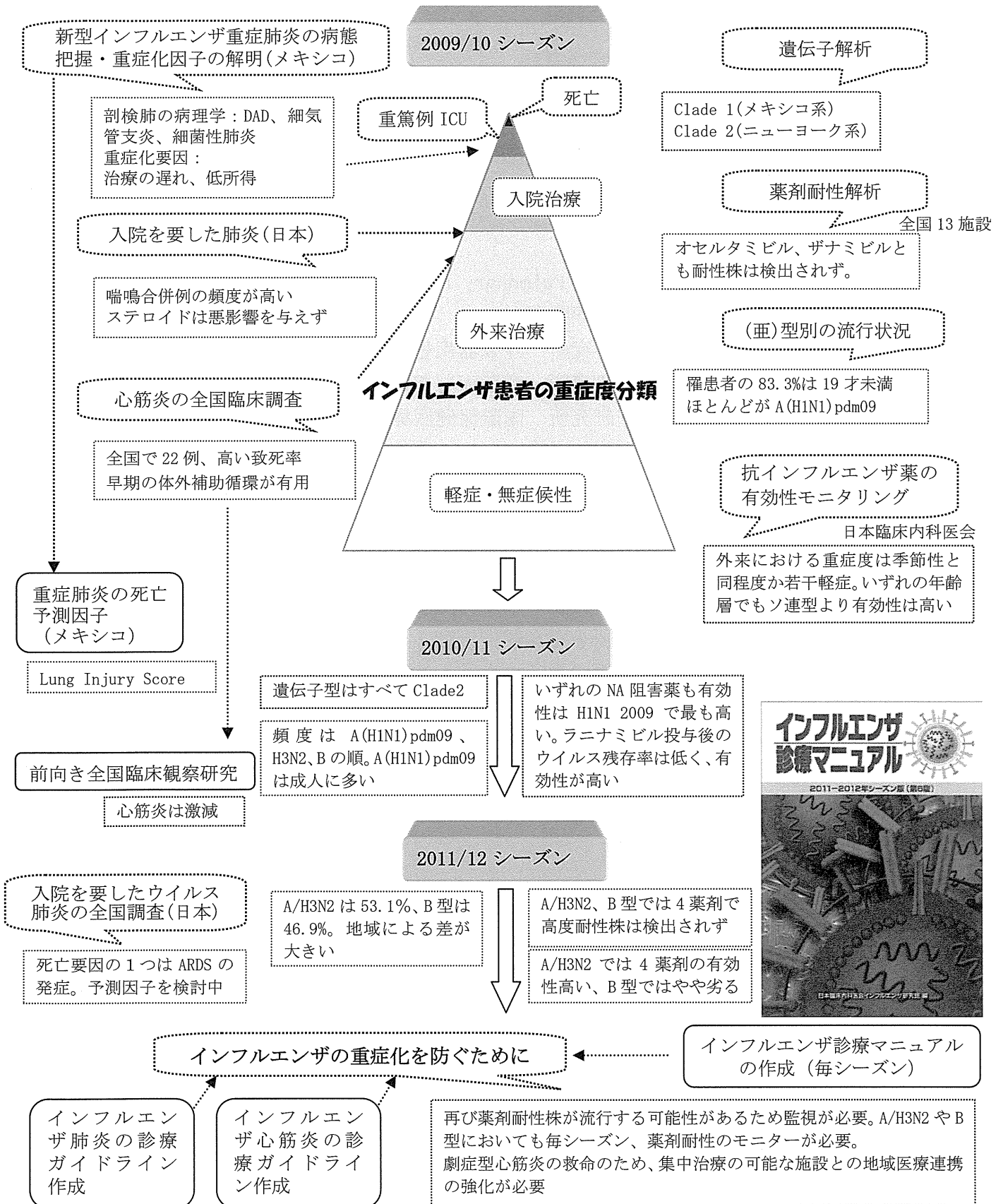
- (1) Kawai N, Ikematsu H, Tanaka O, Matsuura S, Maeda T, Yamauchi S, Hirotsu N, Nishimura M, Iwaki N, Kashiwagi S. Comparison of the clinical symptoms and the effectiveness of neuraminidase inhibitors for patients with pandemic influenza H1N1 2009 or seasonal H1N1 influenza in the 2007-2008 and 2008-2009 seasons. *J Infect Chemother* 17(3):375-81, 2011.
- (2) 河合直樹, 廣津伸夫, 池松秀之, 柏木征三郎, 岩城紀男監修. インフルエンザ診療マニュアル (2010-2011年版). 一般社団法人日本臨床内科医会・インフルエンザ研究班編, 2010.
- (3) 河合直樹, 廣津伸夫, 池松秀之. インフルエンザ診療マニュアル 2011-2012年シーズン版. インフルエンザ研究班編集 (柏木征三郎、岩城紀男監修). 日本臨床内科医会会誌 26(2), 臨時付録, 2011. 同 2012-2013年シーズン版. 日本臨床内科医会会誌 27(2), 臨時付録, 2012.
- (4) Kawai N, Ikematsu H, Kawashima T, Maeda T, Ukai H, Hirotsu N, Iwaki N, Kashiwagi S. Increased symptom severity but unchanged neuraminidase inhibitor effectiveness for A(H1N1)pdm09 in the 2010-2011 season: comparison with the previous season and with seasonal A(H3N2) and B. *Influenza Other Respi Viruses*. 2012 Aug 16. doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00421.x. [Epub ahead of print]

・研究分担者(浮村 聡)、研究協力者(和泉 徹、猪俣孝之、河上千尋)

- (1) Ukimura A, Ooi Y, Kanzaki Y, Inomata T, Izumi T. A national survey on myocarditis associated with influenza H1N1pdm2009 in the pandemic and post-pandemic season in Japan. *J Infect Chemother*. Published online: 23 Oct. 2012.
- (2) Ukimura A, Satomi H, Ooi Y, Kanzaki Y. Myocarditis associated with influenza A H1N1pdm2009. (Review) *Influenza Research and Treatment*. (in press)
- (3) Ukimura A, Izumi T, Matsumori A. A national survey on myocarditis associated with the 2009 influenza A (H1N1) pandemic in Japan. Clinical Research Committee on Myocarditis Associated with 2009 Influenza A (H1N1) Pandemic in Japan organized by Japanese Circulation Society. *Circ J* 74(10):2193-9, 2010.

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

新型インフルエンザ H1N1 の病態把握、重症化の要因の解明に関する研究



●研究代表者の研究歴等

▪ 過去に所属した研究機関の履歴

- 1983-1984 国立相模原病院リウマチ科
- 1985-1989 東京大学医学部物療内科
- 1989-1993 米国 NIH、NHLBI、Pulmonary Branch
- 1994-2010 国立国際医療センター呼吸器科
- 2010- 国立国際医療研究センター病院呼吸器内科（改称）
- 2012- 国立国際医療研究センター臨床研究センター治験管理室長（兼任）

▪ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- 宮本昭正（東京大学医学部物療内科）
- 吉澤久嘉（国立相模原病院リウマチ科）
- Ronald G Crystal（米国 NIH、NHLBI、Pulmonary Branch）
- 工藤宏一郎（国立国際医療センター呼吸器科）
- 慶長直人（国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部）
- 切替照雄（国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部）
- 溝上哲也（国立国際医療センター研究所 国際保健医療研究部）
- 岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター）
- 大田 健（帝京大学医学部内科）

▪ 主な研究課題

- ベトナムの医療従事者における結核感染リスクに関する研究
- 成人喘息の寛解を目指した治療薬の減量・中止に関する研究（厚労科研 研究代表者）
- 気道上皮の傷害と修復に関わる遺伝子変異解析研究
- 気管支喘息の発症や喘息症状の増悪に及ぼすウイルス感染の影響と治療の効果に関する研究
- アレルギー疾患の発症および悪化に影響する因子の解析（厚労科研 研究分担者）
- 外国人結核の臨床像および外国人結核患者由来株の分子疫学解析（厚労科研 研究分担者）
- 合併症・基礎疾患のある結核に対する適切な治療法および医療従事者の費用効果的な結核感染管理に関する研究（国際医療研究開発費 主任研究者）

▪ これまでの研究実績

- 1) *Kudo K, Takasaki J, Manabe T, Uryu H, Yamada R, Kuroda E, Kobayashi N, Matsushita T. Systemic Corticosteroids and Early Administration of Antiviral Agents for Pneumonia with Acute Wheezing due to Influenza A(H1N1)pdm09 in Japan. PLoS One 2012 7(2):e32280.*
- 2) Sakurada S, Hang NT, Ishizuka N, Toyota E, Hung le D, Chuc PT, Lien LT, Thuong PH, Bich PT, Keicho N, Kobayashi N. Inter-rater agreement in the assessment of abnormal chest X-ray findings for tuberculosis between two Asian countries. *BMC Infect Dis* 2012 Feb 1; 12:31.
- 3) Iriki T, Ishii S, Takeda Y, Nishijima T, Teruya K, Oka S, Mochizuki M, Sugiyama H, Kobayashi N. Chemotherapy for thymic carcinoma in an adult patient with HIV infection. *Int Canc Conf J* 2012, 1:142-146.
- 4) Fujita Y, Ishii S, Hirano S, Izumi S, Takeda Y, Kobayashi N. Response of paraneoplastic nephrotic syndrome to corticosteroids combined with chemotherapy for advanced lung

- cancer: a case report and literature review. *Int Canc Cof J* 2012, 1:88-92.
- 5) Sapkota BR, Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Ieki R, Kobayashi N, Toyota E, Nagai H, Kurashima A, Tokunaga K, Keicho N. Association of SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms with pulmonary Mycobacterium avium complex infection. *Hum Immunol.* 2012 May;73(5):529-36.
 - 6) Fujita Y, Iikura M, Horio Y, Ohkusu K, Kobayashi N. Pulmonary Actinomyces graevenitzi infection presenting as organizing pneumonia diagnosed by PCR analysis. *J Med Microbiol.* 2012, 61:1156-8.
 - 7) Watanabe A, Yanagihara K, Matsumoto T, Kohno S, Aoki N, Oguri T, Sato J, Muratani T, Yagisawa M, Ogasawara K, Koashi N, Kozuki T, Komoto A, Takahashi Y, Tsuji T, Terada M, Nakanishi K, Hattori R, Hirako Y, Maruo A, Minamitani S, Morita K, Wakamura T, Sunakawa K, Hanaki H, Ohsaki Y, Honda Y, Sasaoka S, Takeda H, Ikeda H, Sugai A, Miki M, Nakanowatari S, Takahashi H, Utagawa M, Kobayashi N, Takasaki J, Konosaki H, Aoki Y, Shoji M, Goto H, Saraya T, Kurai D, Okazaki M, Kobayashi Y, Katono Y, Kawana A, Saionji K, Miyazawa N, Sato Y, Watanuki Y, Kudo M, Ehara S, Tsukada H, Imai Y, Watabe N, Aso S, Honma Y, Mikamo H, Yamagishi Y, Takesue Y, Wada Y, Nakamura T, Mitsuno N, Mikasa K, Kasahara K, Uno K, Sano R, Miyashita N, Kurokawa Y, Takaya M, Kuwabara M, Watanabe Y, Doi M, Shimizu S, Negayama K, Kadota J, Hiramatsu K, Morinaga Y, Honda J, Fujita M, Iwata S, Iwamoto A, Ezaki T, Onodera S, Kusachi S, Tateda K, Tanaka M, Totsuka K, Niki Y, Matsumoto T. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the Surveillance Committee of Japanese Society of Chemotherapy, Japanese Association for Infectious Diseases, and Japanese Society for Clinical Microbiology in 2009: general view of the pathogens' antibacterial susceptibility. *J Infect Chemother.* 2012;18:609-20.
 - 8) Kamimura M, Izumi S, Hamamoto Y, Morita A, Toyota E, Kobayashi N, Kudo K. Superiority of Nebulized Corticosteroids over Dry Powder Inhalers in Certain Patients with Cough Variant Asthma or Cough-Predominant Asthma. *Allergol Int.* 2012 Sep;61(3):411-7.
 - 9) Keicho N, Matsushita I, Tanaka T, Shimbo T, Hang NT, Sakurada S, Kobayashi N, Hijikata M, Thuong PH, Lien LT. Circulating levels of adiponectin, leptin, fetuin-A and retinol-binding protein in patients with tuberculosis: markers of metabolism and inflammation. *PLoS One.* 2012;7(6):e38703.
 - 10) Hirano S, Sano K, Takeda Y, Ishii S, Naka G, Iikura M, Izumi S, Hojo M, Sugiyama H, Kobayashi N, Kudo K. The pharmacokinetics and long-term therapeutic effects of gefitinib in patients with lung adenocarcinoma harboring the epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation. *Jpn J Cancer Chemother* 2012, 39(10):1501-6.
 - 11) Kudo K, Arioka H, Takeda Y, Shimbo T, Handa S, Kawana A, Kamimura M, Yamauchi Y, Nagase H, Kobayashi N, Manabe T, Kabe J. An early intensive intervention for inducing inactive asthma in adults. A one-year follow-up observation study. *Allergol Internat* 60:433-41, 2011.
 - 12) Hang NT, Lien LT, Kobayashi N, Shimbo T, Sakurada S, Thuong PH, Hong le T, Tam do B, Hijikata M, Matsushita I, Hung NV, Higuchi K, Harada N, Keicho N. Analysis of factors lowering sensitivity of interferon- γ release assay for tuberculosis. *PLoS One* 2011;6(8):e23806.

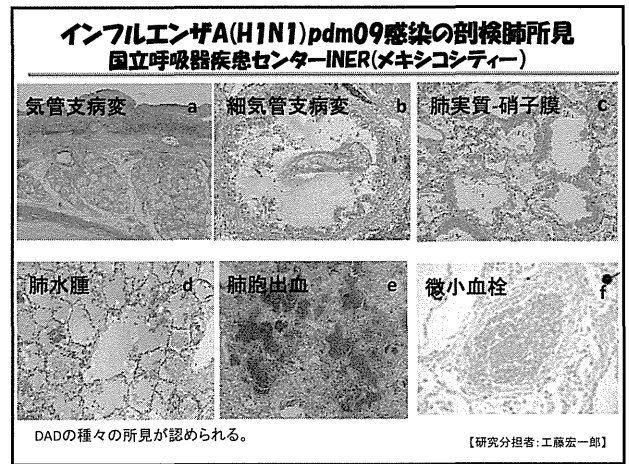
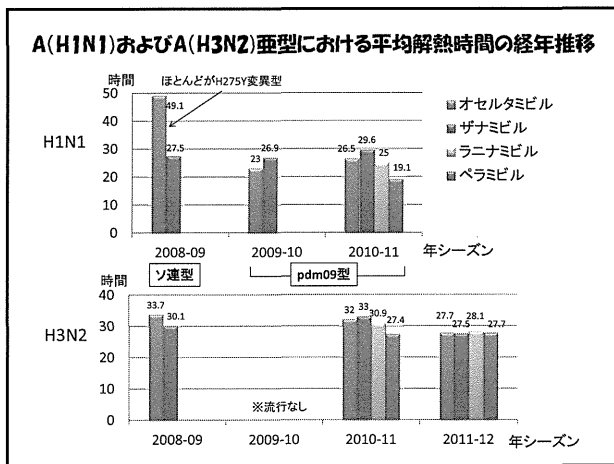
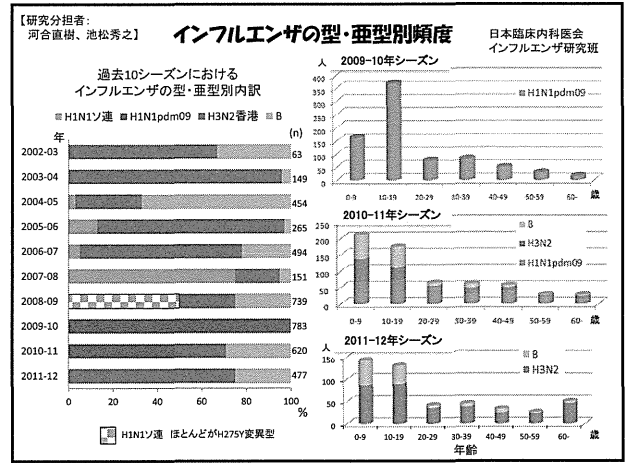
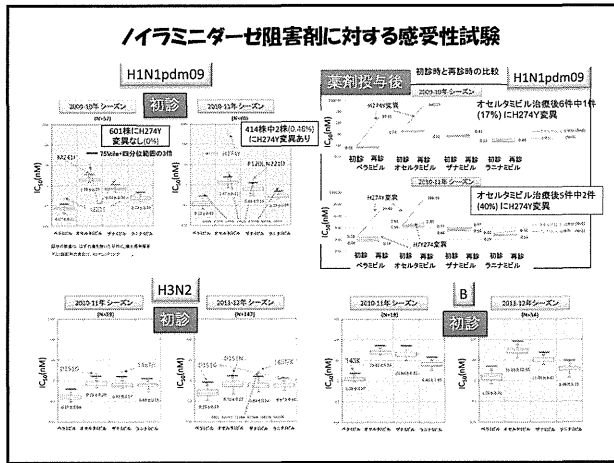
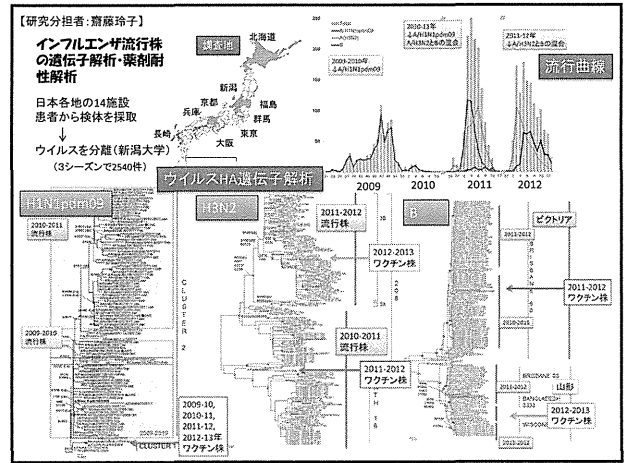
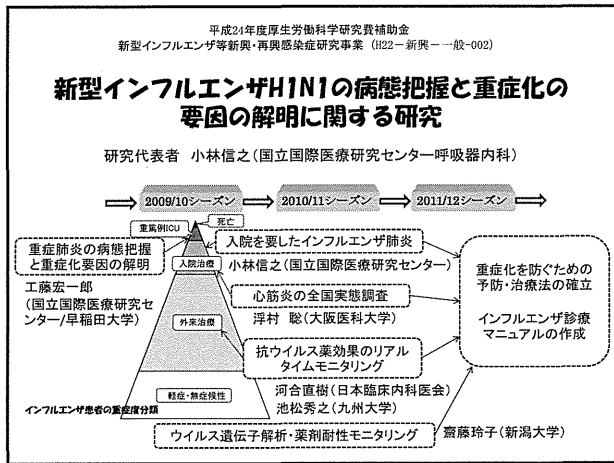
Epub 2011 Aug 19.

- 13) Tanaka T, Sakurada S, Kano K, Takahashi E, Yasuda K, Hirano H, Kaburagi Y, Kobayashi N, Hang NT, Lien LT, Matsushita I, Hijikata M, Uchida T, Keicho N. Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant. *BMC Infect Dis* 11:71, 2011.
- 14) Miyoshi-Akiyama T, Matsumura K, Kobayashi N, Maeda S, Kirikae T. Genome sequence of clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* NCGM2209. *J Bacteriol* 193(23):6792, 2011.
- 15) Suzuki M, Yoshizawa A, Sugiyama H, Ichimura Y, Morita A, Takasaki J, Naka G, Hirano S, Izumi S, Takeda Y, Hojo M, Kobayashi N, Kudo K. A case of yellow nail syndrome with dramatically improved nail discoloration by oral clarithromycin. *Case Rep Dermatol* 2011 3(3):251-8.
- 16) Hojo M, Iikura M, Hirano S, Sugiyama H, Kobayashi N, Kudo K. Increased risk of nontuberculous mycobacterial infection in asthmatic patients using long-term inhaled corticosteroid therapy. *Respirology* 2012 Jan 17(1):185-90. doi:10.1111/j.1440-1843.2011.02076.x.
- 17) Goto Y, Hojo M, Takeda Y, Kobayashi N, Kudo K. Gefitinib-induced interstitial lung disease-addition of intravenous cyclophosphamide to corticosteroids is a valuable treatment option: A case report. *Med Oncol* 27(3):753-755, 2010.
- 18) Lien LT, Hang NT, Kobayashi N, Yanai H, Toyota E, Sakurada S, HuuThuong P, Cuong VC, Nanri A, Mizoue T, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Tuan le A, Keicho N. Prevalence and risk factors for tuberculosis infection among hospital workers in Hanoi, Viet Nam. *PLoS One* 4(8):e6798, 2009.
- 19) Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection. *J Infect Dis* 199(11):1707-15, 2009.
- 20) Fuse ET, Kamimura M, Takeda Y, Kawaishi M, Kimura S, Niino H, Saito K, Kobayashi N, Kudo K. Response of a thymic mucoepidermoid carcinoma to combination chemotherapy with cisplatin and irinotecan: A case report. *Lung Cancer* 59(3):403-406, 2008.
- 21) Suzuki M, Hirano S, Ito H, Matsubara D, Kubota K, Takeda Y, Sugiyama H, Kobayashi N, Kudo K. Pulmonary lymphoma developed during long-term methotrexate therapy for psoriasis. *Respirology* 12(5):774-6, 2007.
- 22) Mai HN, Hijikata M, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kimura K, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Nagai H, Kurashima A, Kajiki A, Oketani N, Hayakawa H, Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Sakurada S, Tokunaga K, Keicho N. Pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the CFTR gene. *Int J Tuberc Lung Dis* 11(7):808-13, 2007.
- 23) Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Nagai H, Kurashima A, Nakata K, Toyota E, Kobayashi N, Kudo K, Keicho N. Pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection: association with NRAMP1 polymorphisms. *Eur Respir J* 30(1):90-6, 2007.

- 24) Miyano S, Izumi S, Takeda Y, Tokuhara M, Mochizuki M, Matsubara O, Kuwata H, Kobayashi N, Kudo K. Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy. *J Clin Oncol* 25(5):597-599, 2007.
- 25) Hirano S, Nakajima Y, Morino E, Fujikura Y, Mochizuki M, Takeda Y, Sugiyama H, Kobayashi N, Tanaka K, Kudo K. A case of spontaneous regression of small cell lung cancer with progression of paraneoplastic sensory neuropathy. *Lung Cancer* 58(2):291-295, 2007.
- 26) Kobayashi N, Rosenthal ER, Yoshimura K, Crystal RG. Transfer of a constitutive viral promoter-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to human epithelial cells conveys resistance to down-regulation of cAMP-regulated Cl-secretion in the presence of inflammatory stimuli. *Nucleic Acids Res* 22(21): 4470-4476, 1994.
- 27) Abe T, Kobayashi N, Yoshimura K, Trapnell BC, Kim H, Hubbard RC, Brewer MT, Thompson RC, Crystal RG. Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J Clin Invest* 87:2207-2215, 1991.
- 28) Takizawa H, Ohta K, Hirai K, Misaki Y, Horiuchi T, Kobayashi N, Shiga J, Miyamoto T. Mast cells are important in the development of hypersensitivity pneumonitis. A study with mast cell-deficient mice. *J Immunol* 143 :1982-1988, 1989.
- 29) Kobayashi N, Miyamoto T. Immunological approach to IPF : Emphasis upon viral and collagen-specific antibodies. In *Interstitial Pneumonia of Unknown Etiology* (ed. by Harasawa M, et al.) University of Tokyo Press 213-224, 1989.
- 30) Kobayashi N, Okudaira K, Miyamoto Y, Yamada Y, Yamada T, Doroshita H, Nozawa A, Yoshizawa H, Takahashi K. Plasma cleaning using Immunoabsorbent IM-P for patients with rheumatoid arthritis. In *Therapeutic Plasmapheresis (IV)* (Oda T, ed.) Stuttgart-New York Schattauer 153-157, 1984.

・平成25年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規公募課題の応募状況

なし



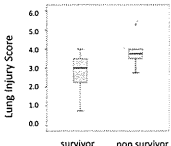
インフルエンザA(H1N1)pdm09 生死への影響因子 - ロジスティック回帰分析

	係数	標準誤差	F値	オッズ比	95%信頼区間
Lung Injury Score	1.825	0.682	0.007	6.200	1.630-23.579
定数	-6.808	2.409	0.005	0.001	

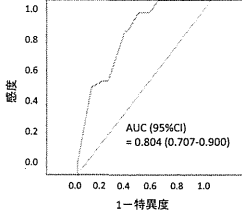
Lung Injury Score

(肺損傷の程度を示す指標)

- ✓ 胸部レントゲン像における浸潤陰影の拡がり度
- ✓ 低酸素度
- ✓ PEEP
- ✓ 肺コンプライアンス



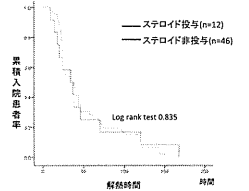
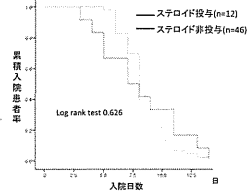
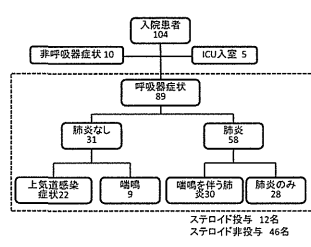
ROC曲線



全身性コルチステロイド薬の検討 インフルエンザA(H1N1)pdm09感染による入院症例について

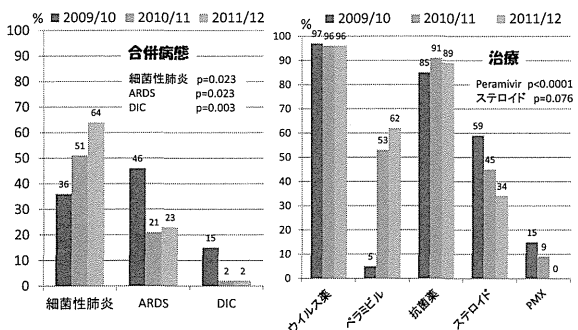
2009年8月～2010年3月に入院治療を要し、軽症・中等症の肺炎例についての調査 (NCGM)
ステロイド薬の投与は、入院期間、解熱時間には影響を与えなかった

Kudo K, Takasaki J, Manabe T, Uchiy H, Yamada R, et al. PLoS ONE 7(12): e33280. doi:10.1371/journal.pone.0033280

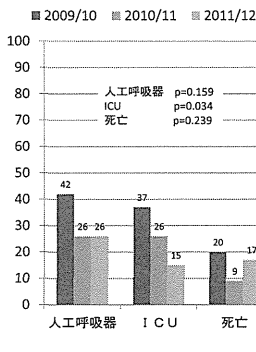


成人のインフルエンザウイルス肺炎全国調査

- ・ パンデミックおよびそれ以降のシーズンにおける成人インフルエンザウイルス肺炎の診療実態を全国レベルで把握
- ・ 全国の日本呼吸器学会認定施設よりインターネットによる回答、症例調査票の登録
- ・ 登録数 2009/10(59例:平均48歳、男性35例)、2010/11(47例:平均68歳、男性32例) 2011/12(47例:平均74歳、男性34例)



成人のインフルエンザウイルス肺炎 シーズン別、生死別の比較



- 2009/10シーズンでは
- 細菌性肺炎の合併率が低い
 - ARDSの合併率が高い
 - ペラミビルの使用率が低い
 - 発症から投薬までの日数に差はなし
- 死亡例は生存例と比較して
- 基礎疾患としての慢性心不全が多い
 - ARDS, DICの頻度が高い
 - BUN/Cr, AST, LDHが高値
 - SpO2が低値
 - ステロイド、カテコラミン、利尿薬の使用率が高い
 - 人工呼吸器使用率が高い
 - 抗ウイルス薬投与までの時間、解熱時間には有意差なし

インフルエンザ心筋炎全国臨床調査(H22-24)

新型インフルエンザ心筋炎の後ろ向き全国臨床観察研究(H22研究)
心筋炎は15例(男性10例、女性5例)、平均年齢は44歳、7例は基礎疾患なし
劇症型心筋炎は12例で、10例は体外補助循環を要し、8例で救命。劇症型でも組織所見は軽度。

新型インフルエンザ心筋炎(H23研究)	2009/10シーズン	2010/11シーズン
症例数	25	4
性別(男/女)	17/8	1/3
年齢	39±21	45±15
予後(生存/死亡)	19/6	2/2
成人/未成年	20/5	4/0
劇症型心筋炎(成人/未成年)	15(10/5)	2(2/0)
心筋生検/剖検	10/3	0/1
IABP/PCPS使用(生存/死亡)	13(9/4)	2(0/2)
人工呼吸器使用(生存/死亡)	17(11/6)	4(0/2)

小児インフルエンザ心筋炎(H24研究)	2009/10シーズン	2010/11シーズン	2011/12シーズン
症例数	8 (H1N1:7, B:1)	4 (A:1, B:3)	3 (B:3)
性別(男/女)	5/3	1/3	1/2
予後(生存/死亡)	5/3	3/1(B)	2/1
劇症型心筋炎	6	3(A:1, B:2)	3
IABP/PCPS使用(生存/死亡)	2(2/0)	1(1/0)	1(0/1)

Circ J 74: 2193-2199, 2010 J Infect Chemother. Published online: 23 Oct. 2012 [研究分担者: 浮村 聡]

インフルエンザ心筋炎の診断・治療に関するガイドライン(案)

- 症状と診断
- ・ インフルエンザ症状発現1-3日後に、心症状(胸痛、失神、呼吸困難、動悸、チアノーゼ)で発症。
 - ・ 大流行時には心筋炎発症の頻度は増加。基礎疾患のない子供や20代、30代の成人でも発症。
 - ・ 鼻腔ぬぐい液などを用いた迅速キットあるいはRT-PCRによりインフルエンザの病因診断が可能。
 - ・ 身体所見では、頻脈、徐脈、不整脈、心音微弱、奔馬調律、肺音聴取、浮腫などがみられる。
 - ・ 心電図はスクリーニングに有用であり、所見としてはST-T変化が非特異的だが頻度が高い。I～II度の房室ブロック、室内伝導障害、R波減高、異常Q波、低電位差、期外収縮の多発、上室頻拍、心房細動、洞停止、心室頻拍、心室細動、心静止など多彩な所見を示す。
 - ・ 心エコー図では、局所的あるいはびまん性に壁肥厚や壁運動低下がみられ、心臓液貯留を伴う。
 - ・ 血清中に心筋構成蛋白(心筋トロポニンTやCK-MB)を検出できる。CRPの上昇、白血球の増多も認める。トロポニン定性的感度は十分でなく高感度トロポニン定量が望ましい。
 - ・ 心内膜心筋生検による組織像(心筋壊死あるいは変性、リンパ球中心の細胞浸潤、間質の浮腫)の検出は診断を確定するが、組織所見は比較的軽度である。
 - ・ MRIのT2強調画像での高信号は心筋の炎症を反映し有用。
 - ・ インフルエンザ心筋炎の証明にはRT-PCR法を用いた心筋からのウイルスゲノム検出が用いられるが、LVAD装着時の切除心筋など一定量の組織が必要。
- 治療
- ・ 抗ノイラミニダーゼ薬による原因療法を行う。
 - ・ 高率で劇症型心筋炎を発症し、劇症型では救命のため体外式補助循環による集中治療を要する。集中治療可能な施設への円滑な患者搬送のための施設間連携体制を確立する必要がある。
 - ・ ワクチンによる抗体獲得により心筋炎発症を抑制できる可能性が高い。