

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）

総括研究報告書

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・研究に関する研究

研究代表者 岡山大学大学院教授 森島恒雄

研究要旨

平成 25 年度は、従来の重症インフルエンザの病態解析を中心とした研究に加えて、同年 2 月以降明らかになった中国における AH7N9 亜型によるヒトへの感染例（特に重症肺炎による高い致死率 = 25 ~ 30% が特徴）の増加を受けて、この亜型のウイルス学的特徴を明らかにした。また、我が国への侵入の危惧が高まっていることを背景に、重症インフルエンザの診療体制、特に ECMO を用いた ARDS に対する治療法及び診療体制の整備を進めるべく全国調査を実施した。また、本研究班と厚生労働省大石班と協力し、関連学会の代表者の参加のもとに重症インフルエンザの診療の標準化を目指す組織を作る事ができた。

これらは、AH7N9 など病原性の高いインフルエンザのパンデミックにおける重要な成果と思われる。

A . 研究目的

目的

2009 のパンデミックにおいて、小児で重症の肺炎が多発した。一方、成人での重症患者は全体では少なかったものの、ARDS を発症した症例での予後は欧米に比較し悪かった。平成 25 年 2 月、中国で鳥インフルエンザ AH7N9 亜型のヒトへの感染の報告が続ぎ、致死率は 25 ~ 30% と報告されている。一旦終息していた流行が再び増加し、平成 26 年 1 月以降 200 例を超える発症があり、致死率も 20% を超えている。この AH7N9 亜型の疫学・ウイルス学・病理学・病態・臨床像・診断/治療法の開発などは、喫緊の課題と考えられ、本年度の研究は、従来の季節性インフルエンザに加え、この亜型の研究を緊急に設定した。

期待される成果

AH7N9 亜型の解析を通じて、本ウイルスが国内に侵入した時、重症例特に肺炎・脳症・多臓器不全などに対する治療法及び診

療体制を整備し、予後の改善に繋げる事ができる。

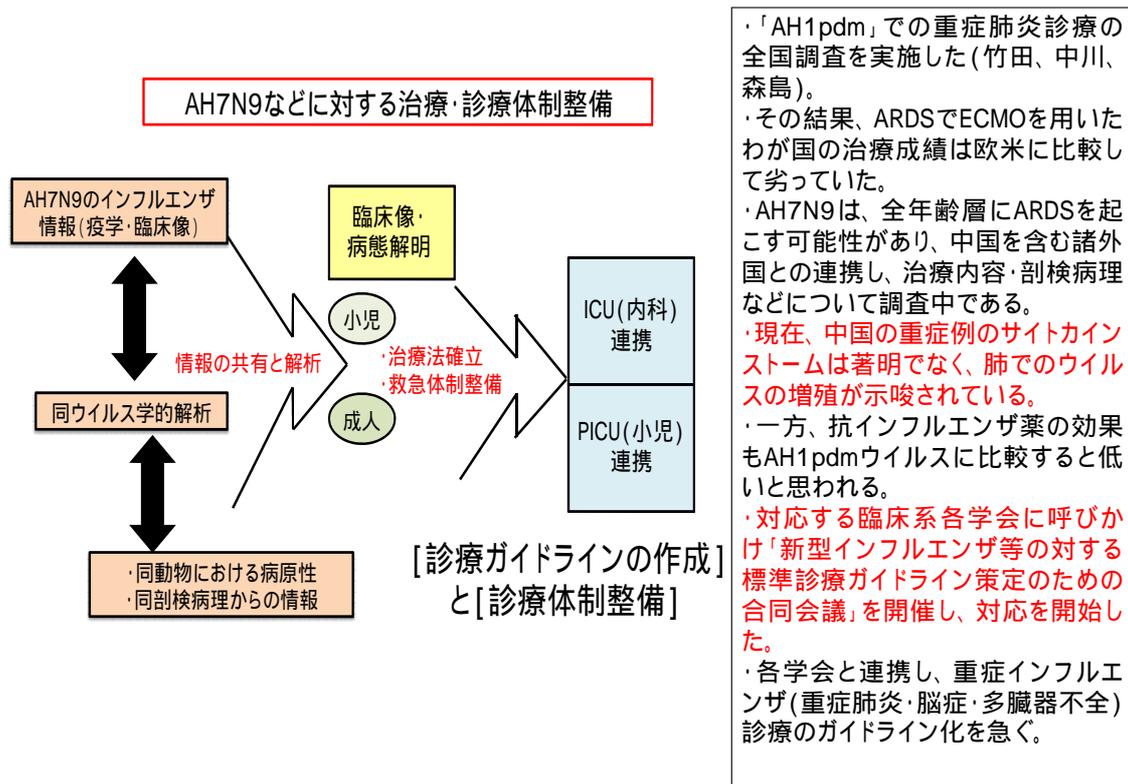
また、季節性インフルエンザ特に AH1N1pdm による肺炎発症の研究は、同様に下気道で増殖する新しいインフルエンザ亜型（AH7N9 含む）に対する治療法の確立に有用と考えられる。

B . 研究方法

本研究組織の特徴として、疫学・基礎ウイルス学・病理学・免疫学・小児及び成人の感染症学・小児神経学・小児及び成人の集中治療学の専門家が集まり、包括的な研究を進めることがあげられる。

従って、研究方法については各分担研究者の報告を参考にさせていただきたい。一方、重症例の診療体制整備は本研究班の重要な課題の一つである。これについては、本研究班と厚生労働省大石班で各関連学会に呼びかけ、診療の標準化と重症例の診療体制（特に ECMO）に向けた合同会議が平成 25 年からスタートした。

C . 研究結果



研究成果の詳細については、分担研究者の報告を参考にさせていただきたい。その概要は：

1. AH7N9 のウイルス学的特徴を明らかにすることができた。その中で、特にマウス・フェレットなどに対する病原性は H5N1 > H7N9 > H1N1pdm の順であり、また感染力は、H1N1pdm > H7N9 > H5N1 の順であった。重要な点は、本ウイルスに対するマウスにおける抗インフルエンザ薬の効果についてであり、現時点ではノイラミニダーゼ阻害薬の効果は低かったことである。

2. 小児成人集中治療分野の研究分担者からの情報では、AH7N9 による ARDS などに対して ECMO の治療が行われ、効果を上げている。わが国侵入時において、重要な知見である。また、日本の小児及び成人患者に対する体外循環補助の実態調査が進み、重要な知見を得ることができた。また、これら

の成果を背景に ECMO プロジェクトの重要性が認識され、厚生労働省竹田班が作られた。また、関連学会に呼びかけインフルエンザ重症例に対する診療の標準化を目指した合同会議が開催され、平成 25 年度 3 回開かれた。この会議において、ガイドラインの作成を目指し、情報を共有していくとが確認されている。

3. また AH7N9 の剖検・病理所見の詳細な報告はないが、今までの報告された情報からは、H1N1pdm ウイルスと同様に、肺胞におけるウイルスの増殖は活発であると推測される。

4. H1N1pdm における重症肺炎の発症機序が明らかになった。すなわち、宿主側の素因として喘息などアレルギー疾患を有すること、肺炎患者は有意に高い IgE を示すこと、喘息モデルマウスにおいて H1N1pdm ウイルスは、局所において炎症性

サイトカインを強く産生し、肺の病原性も高まることが示され、これらは同ウイルスにより肺炎で入院した患児の急性期遺伝子発現（DNA マイクロアレイ解析）において、IgE 関連遺伝子および酸化ストレス関連遺伝子が高発現していることなどが示された。一方、H1N1 マウス感染モデルで Spred-2 が有意に上昇する事を見出した。H1N1 感染マウスモデルでの Ras-Raf-ERK/MAPK 経路は活性化していた。Spred2-KO マウスでは ERK/MAPK 活性は上昇し、WT マウスと比較して生存率は有意に低下し、肺炎病態の悪化、炎症性サイトカインの亢進ならびに肺内ウイルス量の増加を認めた。Spred2-KO マウスに ERK inhibitor (U0126) を投与する事により、生存率ならびに肺炎病態の有意な改善が見られた。また siRNA を用いて Spred-2 をノックダウンさせた気道上皮細胞株 (MLE-12) を用いたマイクロアレイ解析では、コントロールと比較して PI3 kinase の亢進 (p-AKT 亢進) を認め、共焦点レーザー顕微鏡下では、endocytosis の亢進に伴うウイルス価の亢進を認めた。

5. インフルエンザ脳症は、本研究班におけるガイドラインの作成・普及の後、予後が改善している（致命率 30% から 7%）。一方、痙攣重積型脳症（二相性脳症）においては、サイトカインストームは著明ではなく、従ってステロイドパルスや大量 グロブリン療法の治療効果は低かった。最近、市販されたホスフェニトインがこの二相性脳症に有効であることが示唆されたことは非常に重要な成果である。

6. 同じ急性脳症の中でも、病因ウイルスにより少しずつ臨床像が異なることを既に明らかにしてきたが、今回口タウイルスによる痙攣重積とインフルエンザによる痙攣重積とは、急性期の遺伝子発現のプロファ

イルが異なることが DNA マイクロアレイの解析から明らかになった。このことは、インフルエンザ脳症以外の急性脳症の治療法を組み立てる上で非常に重要な知見である。

7. 小児の中枢神経感染症において、簡易な検査や患者の情報などの多因子の解析により重症化メカニズムの予測が可能となることが示唆された。

8. その他、インフルエンザの発生動向とインフルエンザ脳症の報告例の推移の調査が実施された。内科領域における各年度における季節性インフルエンザを含めた重症例は、70 歳以上の高齢者に集中していた。

D . 考察

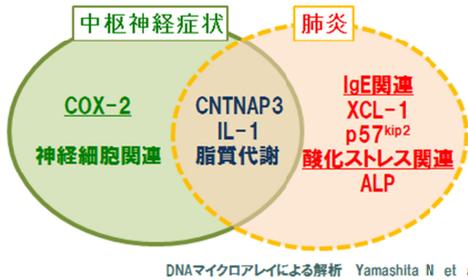
以上のように AH7N9 について、非常に重要な成果が得られた。また、H1N1pdm による肺炎の発症及び重症化について重要な知見が得られ、今後インフルエンザによる重症肺炎に対する治療に役立てることができると考えられる。また、診療体制の整備に向けた重要な方向性を示すことができたと思われる。これらは、本研究班の特色、すなわち多分野の専門家が集まり、包括的な研究を推進することによる成果と考えられる。

E . 結論

多くの分野で優れた研究業績を挙げることができた。詳細については、分担研究者の報告を参考にしていきたい。

平成 26 年度については、AH7N9 について引き続き研究を継続していく。また同時に、小児科内科・集中治療における診療の標準化を目指して、ガイドラインの整備を行っていく。AH7N9 の情報収集について国際間連携を深めていく。

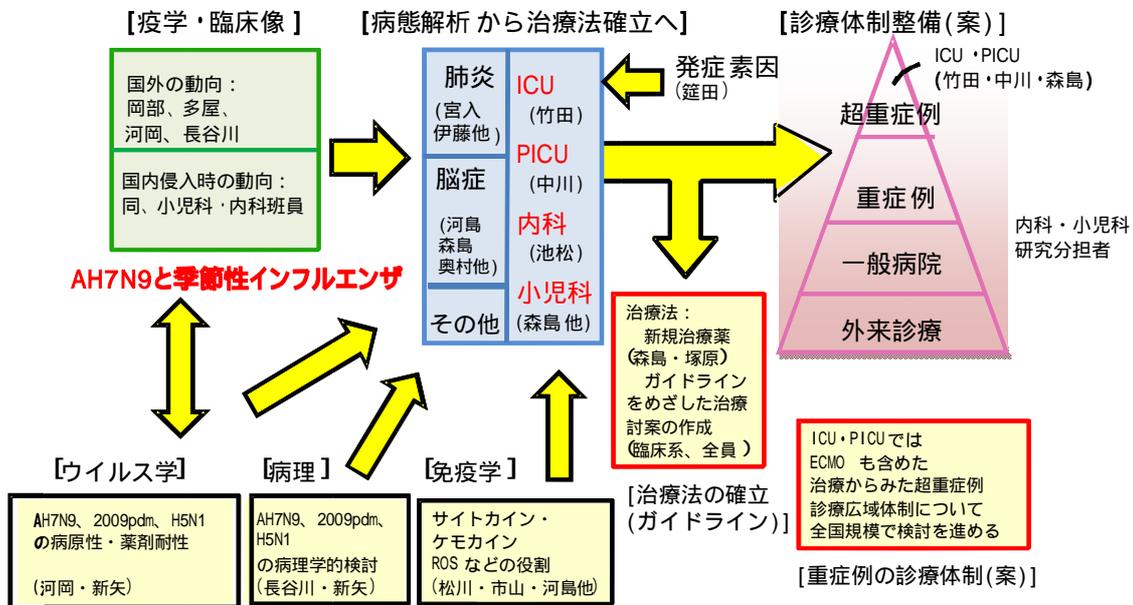
「新型インフルエンザ」の急性期に発現が上昇した遺伝子 (小児)



何故AH1N1pdm肺炎はアレルギー-素因を背景に？



平成26年度研究の概要 (特にAH7N9を研究対象とする)



H7N9の国内侵入 重症例の病態把握 重症例の治療法・診療体制整備

F. 研究発表

論文 (英語論文)

- Yamashita N, Tsukahara H, Tsuge M, Nagaoka Y, Yashiro M, Saito Y, Fujii Y, Oka T, Morishima T. Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated on gene expression profiling. *Pediatr Int* 55 (5): 572-577, 2013.
- Tsuge M, Oka T, Yamashita N, Saito Y, Fujii Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Tsukahara H, Morishima T. Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis. *J NeuroVirol* 20 (1): 73-84,

2014.

- Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Masutani H, Yodoi J, Morishima T. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. *Crit Care Med* 41(1):166-176, 2013.

- Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S,

- Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 26:551-555, 2013.
- Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.*26, 357-369, 2013
 - Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T, Nakajima N, Hasegawa H, Kida Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. *PLoS One.* 9,8(7), 2013.
 - Miyazaki M, Nishihara H, Hasegawa H, Tashiro M, Wang L, Kimura T, Tanino M, Tsuda M, Tanaka S. NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 29;441(4):953-7.
 - Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Aina A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine.* 2013 Aug;63(2):194-200.
 - Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Oka M, Isumi H, Emi S, Hayashi M, Ichiyama T. Serum and cerebrospinal fluid levels of visinin-like protein-1 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev.* 2013; in press.
 - Momonaka H, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Okada S, Nakatsuka K, Morishima T, Ichiyama T. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev.* 2013; in press.
 - Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Aina A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine.* 2013; 63: 194-200.
 - Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Ishida C, Tanaka S, Morishima T, Ichiyama T. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev.* 2013; 35: 626-9.
 - Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human Herpesvirus 6-Associated Encephalopathy in a Child with Dravet Syndrome. *Neuropediatrics,* 44:155-158,2013
 - Shoji K, Komuro H, Miyata I, Miyairi I, Saitoh A: Dermatologic manifestations of human parechovirus type 3 infection in neonates and infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2013;32:233-236
 - Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *Influenza Other Respir Viruses.*2013;7(6):1390-9.
 - Ikematsu H, Kawai N, Iwaki N, Kashiwagi S. The duration of fever and other symptoms after the initiation of laninamivir octanoate hydrate in the

Japanese 2011-2012 influenza season. *J Infect Chemother.* 2013.

· Yamamoto T, Mizoguchi Y, Kaneno H, Yamamoto K, Inoue Y, Kawashima H, Kase T, Shimotsuji T. Serum immunoglobulin G subclass levels and estimated clinical severity caused by possible influenza A (H1N1) pdm 2009 infection. *J Infect Chemother.* 2013 Oct;19(5):833-42.

· Sakai E, Yamanaka G, Kawashima H, Morishima Y, Ishida Y, Oana S, Miyajima T, Shinohara M, Saitoh M, Mizuguchi M. A case of recurrent acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus with carnitine palmitoyltransferase II variation. *Neuropediatrics.* 2013;44(4):218-21

· Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013;7(5):759-60.

· Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Morichi S, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. *J Clin Virol.* 2013;56(1):25-30.

· Morichi S, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Kawashima H. Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebrospinal fluid and plasma of children with meningitis and encephalitis/encephalopathy. *Int J Neurosci.* 2013;123(1):17-23.

· Okumura A, Hayashi M, Tsurui H, Yamakawa Y, Abe S, Kudo T, Suzuki R, Shimizu T, Shimojima K, Yamamoto T. Lissencephaly with marked ventricular dilation, agenesis of corpus callosum, and cerebellar hypoplasia caused by TUBA1A mutation. *Brain Dev* 2013; 35(3): 274–279.

· Igarashi A, Okumura A, Kitamura Y, Jinbo K,

Akatsuka S, Tanuma N, Shimizu T, Hayashi M. Acute limbic encephalitis with focal hyperperfusion on single photon emission computed tomography. *Brain Dev* 2013; 35(2): 181-184.

· Nakagawa S, Shime N. Respiratory rate criteria for pediatric systemic inflammatory response syndrome. *Pediatr Crit Care Med* 2014; 15:182.

· Nakatsukasa Y, Tsukahara H, Tabuchi K, Tabuchi M, Magami T, Yamada M, Fujii Y, Yashiro M, Tsuge M, Morishima T. Thioredoxin-1 and oxidative stress status in pregnant women at early third trimester of pregnancy: Relation to maternal and neonatal characteristics. *J Clin Biochem Nutr* 52(1):27-31, 2013.

· Nagasaka H, Yorifuji T, Egawa H, Inui A, Fujisawa T, Komatsu H, Tsukahara H, Uemoto S, Inomata Y. Characteristics of NO cycle coupling with urea cycle in non-hyperammonemic carriers of ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol Genet Metab* 109 (3): 251-254, 2013.

国際会議発表

· Morishima T. Overview Acute encephalitis /encephalopathy in Japan. PAS (Pediatric Academic Societies Annual Meeting) 2013 meeting in Washington, DC (2013,5.3-5)

· Nakajima N, Sato Y, Katano H, Kawachi K, Suzuki K, Liem NT, Sata T, Hasegawa H. Pathological study of ARDS complicated by influenza virus infection. Option for the Control of Influenza VIII September 4-10, 2013. CapeTown

· Shoji Kawachi, Thuy Thi Bich Phung, San Thi Luong, Noriko Nakajima, Tatsuya Okamoto, Hiroyuki Nunoi, Aki Hata, Kikuko Takenouchi, Sae Hayashi, Fumiyo Nojiri, Kazuo Suzuki, and Liem Thanh. Nguyen Severe cases of influenza infection in Vietnamese children. - From the Prospective Study Cases in PICU of NHP-Hanoi -, Option for the Control of Influenza VIII September 4-10, 2013. CapeTown

· Seigo Okada, Shunji Hasegawa, Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Ryo Atsuta, Kenzo

Ikemoto, Kohsuke Sasaki, Shoichi Toda, Komei Shirabe, Midori Takahara, Sawako Harada, Tsuneo Morishima, Takashi Ichiyama. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. Kuching. 2013.5.9-12.

・ H. Ikematsu, N. Kawai, N. Iwaki, S. Kashiwagi. In vitro neuraminidase inhibitory activities of four neuraminidase inhibitors against influenza viruses isolated in the 2010-2011 influenza seasons in Japan. 15th International Congress on Infectious Diseases (Bangkok), June, 16th. 2012

・ Kawashima H. The present situation of influenza-associated encephalopathy. PAS (Pediatric Academic Societies Annual Meeting) 2013 meeting in Washington, DC (2013, 5.3-5)

・ Nakagawa S. High-frequency oscillation as a rescue therapy for refractory hypoxemia in the ICU. 13th Joint Congress of Korean Society of Critical Care Medicine and Japanese Society of Intensive Care Medicine, Seoul, Korea, April 2013.

・ Nakagawa S. Acute respiratory distress syndrome. 9th Congress of Asian Society of Pediatric Research, Kuching, Malaysia, May 2013.

・ Nakagawa S. Pediatric / Cardiac Case Discussion in the Pre-Congress Education / Simulation Session. 1st Congress of the Asia-Pacific Chapter of Extracorporeal Life Support Organization (APELSO), Beijing, China, October 2013.

・ Kyan et al., Transcriptome profiling of brain edemas caused by influenza infection and lipopolysaccharide treatment. J. Med. Virol. (2013 Nov 8. doi: 10.1002/jmv.23801. [Epub ahead of print])

G . 知的所有権の取得状況

なし