

- 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, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neuman G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501, 551-555, 2013
- 2) 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
- 3) 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.
2. 学会発表
- 【国際会議】
- 1) 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
- 2) 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
- 【国内会議】
- 1) 中島典子. ヒトにおける高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 感染症の病理: 第 155 回日本獣医学会学術集会 (東京)2013 年 3 月
- 2) 長谷川秀樹、中島典子. 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ剖検例からの検討 第 102 回日本病理学会総会 (札幌)2013 年 6 月
- 3) 渡辺登喜子、今井博貴、村上晋、中島典子、富田有里子、山吉誠也、浦木隆太、西藤岳彦、内田裕子、長谷川秀樹、田代真人、河岡義裕 中国でヒトから分離された H7N9 鳥インフルエンザウイルスのフェレットにおける飛沫伝播性 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013 年 11 月
- 4) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、佐多徹太郎、長谷川秀樹重症インフルエンザウイルス肺炎におけるサイトカイン・ケモカインの発現 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013 年 11 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

(表) 患者臨床経過シート

Clinical Records of the Patients with ARDS							Physician's name:		
Study ID	Sex	Age	BW	Height	Date of birth	Date of onset of the disease			
Medical record ID	Past history				Family history	Date of admission in PICU			
Immunodepression	<input type="checkbox"/> LT-Steroid	<input type="checkbox"/> CTx/RTx	<input type="checkbox"/> HIV/AIDS	<input type="checkbox"/> Hematology/Malignancy	<input type="checkbox"/> Congenita	Preterm (<32 week)	<input type="checkbox"/> yes	Date of intubation	
Chronic organ failure	<input type="checkbox"/> Respirator	<input type="checkbox"/> Renal	<input type="checkbox"/> Hepatic	<input type="checkbox"/> Hematolog	<input type="checkbox"/> CVS	<input type="checkbox"/> Neurology	Biopsy	Date of extubation	
Congenital malformation	<input type="checkbox"/> Respirator	<input type="checkbox"/> Renal	<input type="checkbox"/> CVD	<input type="checkbox"/> GI	<input type="checkbox"/> Others	<input type="checkbox"/> None	Autopsy	Date of discharge from PICU	
Present illness						PRISM III on admission	<input type="checkbox"/> yes	Date of discharge from NHP	
							Final outcome		
							Hospital acquired infection		
							<input type="checkbox"/> VAP	<input type="checkbox"/> BSI	
							<input type="checkbox"/> Others	<input type="checkbox"/> None	
DATE (clinical course)	date								
	time	onset <sup>1)</sup>	admission						
Clinical Signs	cough	anamnesis							
	sputum								
	GCS								
	pupillary reflex								
	diarrhea								
Vital Signs	Body Temperature								
	Respiratory Rate								
	Blood pressure								
	HR								
Respiration	Ventilation/Oxygenation	Mode							
		Prone position							
		PIP							
		PEEP							
		TV (ml/kg)							
		Rate (f)							
	Blood Gas Analysis	MAP							
		FiO <sub>2</sub>							
		pH							
		PaO <sub>2</sub>							
		PaCO <sub>2</sub>							
		HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>							
		BE							
		P/F ratio							
		Oxygenation index							
Chest X-ray									
Laboratory Data	Blood chemistry	Albumin							
		Total bilirubin							
		AST							
		ALT							
		LDH							
		Na							
		K							
		BUN							
		Creatinine							
		CRP							
	DIC	Glucose							
		PT (sec)							
		PT-INR							
		Fibrinogen							
		AT-III							
	Blood cell counts	D-dimer/FDP							
		WBC							
		Neutrophil							
		Lymphocyte							
		Hb							
Rapid test for Flu (NPA or TLF)									
PCR/ RT-PCR	TLF	FluA/FluB							
		Synergistic Legionella Chlamydia							
	Blood	Multiplex PCR							
Serum/TLF collection for future analysis <sup>2)</sup>									
Culture	Blood <sup>3)</sup>								
	TLF								
	Urine								
	Others:								
Treatment	Tamiflu								
	Ganciclovir/Acyclovir								
	Steroids	Hydrocortisone							
		Methylprednisolone							
	Antibiotics								
	Neuromuscular blockade								
	Fluid balance 24h								
	Surfactant/NO								
	CRRT/ECMO								
	IVIg								
	Others ( )								

<sup>1)</sup> Onset: record the anamnesis of the day of disease onset. <sup>2)</sup> necessary for day 1 post admission and following doctor's decision. <sup>3)</sup> On admission: take samples for culture

## 高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)剖検試料からの NS1 遺伝子の回収とその解析

研究分担者 大島正道 国立感染症研究所免疫部 室長

### 研究要旨：

1997年に香港で高病原性鳥インフルエンザウイルスの人への感染が発生して以来、高病原性鳥インフルエンザによるパンデミックが危惧されている。感染者の死因は急速に進行する呼吸不全であり、その原因はウイルス感染により急速に生じるサイトカインストームや肺胞細胞のアポトーシスによる脱落等が考えられる。ウイルス側攻撃因子のNS1は多機能性蛋白で、インターフェロンの産生抑制、抗ウイルス遺伝子の活性化の抑制を行っている。

H5N1ウイルスのNS1が肺胞や気管支の細胞にサイトカインストームやアポトーシスを惹起するか確認することを目的とし、ベトナム国立小児病院からH5N1感染により死亡した剖検標本の貸与を受けた。標本からtotal RNAを抽出し、剖検例のウイルスがコードするNS1遺伝子を増幅し配列を決定した。塩基配列は山東省のマガモから取られた塩基配列に最も相同性が高かった。NS1遺伝子を解析する為に肺胞細胞株(A549)、および気管支細胞株(NCI-H292)を用いNS1を薬剤添加により誘導発現できる系を作製した。これを用いてNS1の発現が肺胞細胞や気管支細胞に及ぼす影響の解析を行った。NS1を誘導発現可能なA549細胞において、培養上清のIFN-gamma、IL-beta、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、TNF、TNF-betaを、FlowCytomixを用いて測定した。A549細胞ではNS1の誘導発現によりIL-6の産生上昇、IFN-alphaの産生低下が観察された。IL-8の産生は変化を認めなかった。測定したその他のサイトカインは検出されなかった。NS1の誘導発現に加えてMPO、H2O2の刺激を加えたが、サイトカイン産生に関するMPO、H2O2の影響は認めなかった。

### A. 研究目的

1997年に香港で高病原性鳥インフルエンザウイルスの人への感染が発生して以来、高病原性鳥インフルエンザによるパンデミックの発生が危惧されている。感染者の多くは急速に進行する呼吸不全により死の転帰をとる。この呼吸不全の原因はウイルス感染によるサイトカインストームや肺胞細胞のアポトーシスによる脱落による呼吸不全等が考えられる。ウイルス側攻撃因子のNS1は多機能性蛋白で、それだけでインター

フェロンの産生抑制、抗ウイルス遺伝子の活性化の抑制を行っている。H5N1ウイルスのNS1は季節性インフルエンザと異なり、肺胞や気管支の細胞にサイトカインストームやアポトーシス誘導を起こすのか確認する。

### B. 研究方法

ベトナム国立小児病院からH5N1感染により死亡した剖検標本の貸与を受けRNAを回収した。剖検例からウイルスがコードするNS1遺伝子をRT-PCRにより増幅し配列を

決定した。得られたNS1遺伝子を解析する為に肺胞細胞株(A549)、および気管支細胞株(NCI-H292)を用いNS1を薬剤添加により誘導発現できる安定発現系を作製した。これを用いてNS1の発現が肺胞細胞や気管支細胞に及ぼす影響を解析する。

(NS1安定発現系の作製) Rheoswitch Mammalian Inducible Expression System (NEB)を改変し、遺伝子誘導発現系を作製した。(図1) NS1として、H1N1 influenza PR8株のNS1遺伝子、H3N2 influenza Udorn株のNS1遺伝子、ベトナム国立小児病院剖検例から回収したH5N1 influenza virusのNS1遺伝子を用いた。また対象として空ベクターを用いた。

(NS1誘導発現細胞の選択) RheoSwitch システムのActivator遺伝子(blasticidine耐性により選択)、Receptor遺伝子(puromycin耐性により選択)を共に構成的に発現するA549細胞、およびH292細胞に上記NS1誘導発現プラスミドを導入しG418薬剤耐性クローンを得た。さらにそれらクローンより誘導薬剤RSL1添加によりGluc活性が上昇するクローンを選択した。(図2)

(定量PCRによる遺伝子誘導発現)

RSL1添加によってNS1のmRNAが誘導されるか定量PCRにより確認した。(図3)

(FlowCytomixによるサイトカイン測定) 24-well プレート上に誘導発現細胞を培養し、RSL1の添加によりNS1の誘導を行った。さらにMPOとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加により細胞に刺激を与え、48時間後に上清を回収し、FlowCytoMixにてサイトカイン量を測定した。

### C. 研究結果

①ベトナム国立小児病院における確定鳥インフルエンザ感染死亡剖検例の病理標本から全RNAを回収しPCRにて鳥インフルエンザH5N1のNS1遺伝子領域を増幅し配列を決定した。

②2007年の病理標本であったがベトナムで報告されたH5ウイルスの遺伝子配列と一致はしなかった。2005年に山東省のマガモで報告された配列に高い相同性が認められた。

③肺胞由来細胞株(A549細胞)及び気管支由来細胞株(NCI-H292細胞)においてインフルエンザウイルスNS1遺伝子の誘導発現系(図1)を作製した。

④選択されたクローンでは、薬剤による発現誘導により、NS1遺伝子のmRNAは非誘導時の数百倍〜千倍に上昇した。NS1遺伝子と直列して発現する分泌型ルシフェラーゼも誘導により数百倍に上昇した。

⑤RSL1による誘導によるサイトカイン産生をReal-Time PCRにより測定した。Real-time PCRにおいてIL-6,IL-8,IFN-alphaのmRNAが検出された。

RANTES,TNF-alpha,TNF-beta,IL12A,IL-4,IL-5,IFN-beta,MIP1-betaは検出できなかった。IL-6はNS1の誘導発現により産生が上昇したが、IL-8はNS1の誘導による変化は見られなかった。IFN-alphaはNS1の誘導により発現が低下した。サイトカイン産生に対するMPO-H2O2の影響はいずれの場合も見られなかった。

⑥H5N1鳥インフルエンザウイルスのNS1を誘導発現させたA549細胞においてサイトカイン産生をFlowCytoMix Human Th1/Th2 11plex Kitにより測定した(IFN-gamma,IL-beta,IL-2,IL-4,IL-5,IL-6,IL-8,IL-10,IL-12p70,TNF,TNF-beta)。IF-gamma,IL-1beta,IL-2,IL-4,IL-5,IL-10,IL-12 p70,TNF-alpha,TNF-betaは検出できなかった。IL-6はNS1の誘導により産生が上昇したが、IL-8は産生の低下が見られた。(図4)

### D. 考案

遺伝子を全ての細胞に導入し、発現誘導することで、遺伝子の機能を正確に解析できるシステムが構築できた。目的遺伝子の発現はメッセージレベルで約1000倍の発現

が達成された。

ベトナム国立小児病院の高病原性鳥インフルエンザウイルス感染死亡例剖検標本からRNAを回収した。全長の配列の増幅がプライマーを設定を工夫する事で可能であった。決定した配列は2007年当時報告されている配列よりも中国山東省のマガモの配列に相同性が認められた。

薬剤RSL1によるNS1の誘導発現により肺胞上皮細胞A549でIL-6,IL-8,IFN-alphaの発現が確認された。NS1の発現によってIL-6は産生が亢進したがIFN-alphaの発現は低下した。IFNの低下はNS1がRIG-Iの働きを抑制し起ると考えられる。IL-8の産生はNS1の発現に依存しなかった。空ベクターにおいてもRSL1の添加によってIL-8は低下する事からRSL1による影響も考えられるため更なる検討が必要である。NS1の発現の他にMPOとH2O2による刺激も追加したがMPOとH2O2はサイトカイン産生レベルには影響を及ぼさなかった。

## E. 結論

- ① Rheoswitch Mammalian Inducible Expression System (NEB)を改変し、遺伝子誘導発現系を作製した。
- ②ベトナム国立小児病院から確定鳥インフルエンザ感染死亡剖検病理標本からウイルスRNAを抽出しNS1を回収し、配列決定した。配列は中国山東省のマガモから回収された遺伝子と最も相同性が高かった。
- ③誘導発現系にNS1遺伝子を組み込み、A549細胞、NCI-H292細胞に導入し、NS1の誘導発現細胞を作製した。誘導薬剤RSL1の添加によりNS1のメッセージは約1000倍の発現が見られた。またIFNの発現が押さえられる事からNS1は機能していると考えられた。
- ④NS1を誘導発現すると、A549細胞の培養上清へのIL-6産生が上昇した。IL-8の産生は変化しなかった。IFN-alphaの産生は低下し

た。MPO,H2O2の追加刺激によるサイトカイン産生の変化は見られなかった。IF-gamma,IL-1beta,IL-2,IL-4,IL-5,IL-10,IL-12 p70,TNF-alpha,TNF-betaは検出できなかった。この事より肺胞細胞においてウイルス感染後にNS1が発現しIL-6の産生が亢進し、IFNが抑制されて炎症反応が進行して行く可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Sugamata R, Sugawara A, Nagao T, Suzuki K, Hirose T, Yamamoto K, Oshima M, Kobayashi K, Sunazuka T, Akagawa KS, Omura S, Nakayama T, Suzuki. Leucomycin A3 (LM-A3), a 16-membered macrolide antibiotic, inhibits Influenza A virus infection and disease progression. J. Antibiotics 2003; in press
  - 2) Yohko K. Shimizu, Minako Hijikata, Masamichi Oshima, Kazufumi Shimizu, Harvey J. Alter, Robert H. Purcell, Hiroshi Yoshikura, Hak Hotta Isolation of Human Monoclonal Antibodies to the Envelope E2 Protein of Hepatitis C Virus and Their Characterization plos one. 07Feb,2013

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### I.

1. 特許取得  
2010-122480  
インフルエンザH5亜型検出用抗体及び検出用キット  
横田恭子、大西和夫、阿戸学、高橋宣聖、大島正道、平山中己、小林和夫、板村繁之、曾家義博、三沢修平、西村研吾、高橋和郎

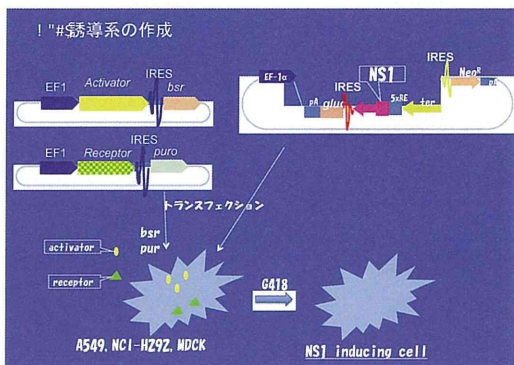
実用新案登録

なし

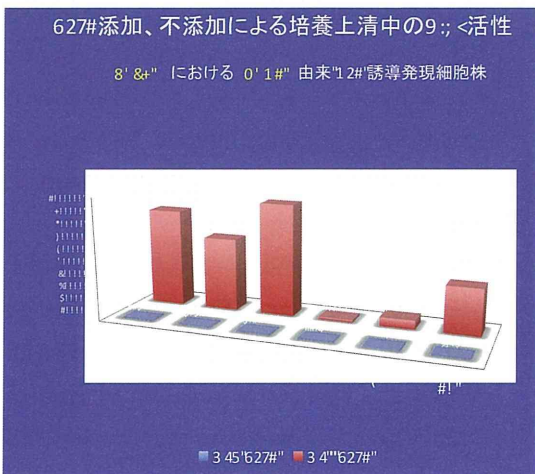
2. その他

なし

(図 1)

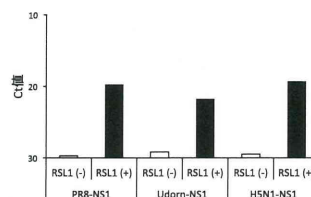


(図 2)



(図 3)

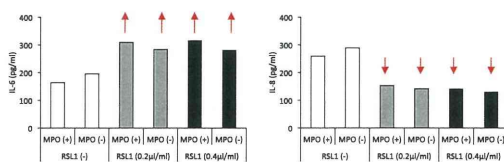
RSL1添加によるNS1 メッセージの誘導 (Real-Time PCR)



(図 4)

H5N1-NS1 誘導発現A549細胞におけるサイトカイン産生

Human Th1/Th2 11 plex Kit FlowCytomix  
IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$



IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p40, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ は検出不可

## 全ての Clade を検出可能な H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの Direct RT-LAMP 法を用いた検出法の検討

研究分担者 影山 努

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第二室 室長

**研究要旨：** 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 年以降の集計では、2014 年 1 月現在、世界 16 カ国で 650 人の感染例と 386 人の死亡例が確認されている。2013 年はカンボジアで 26 例、カナダでは北京からの輸入感染例が 1 例、2014 年の初めには、ベトナムで 2 例、中国で 1 例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、検体からの核酸精製が必要で操作も煩雑なため、病院やクリニックなどの施設では検査を行う事ができない。特に、感染例が多い東南アジアの国々では、地方でも簡便に検査が行える診断方法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。H5 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスは現在、非常に多くの Clade に分類され、遺伝的多様性を獲得しており、従来の H5 亜型同定用 RT-LAMP 法ではベトナム南部やカンボジアで流行している Clade 1.1 との反応性が低いため、検出できない場合がある。全ての Clade に反応するように、H5 亜型同定用 RT-LAMP 用のプライマーを再設計する必要があり、今回はその検討を行った。

### A. 研究目的

H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1-HPAI)は、2003 年以降、東南アジア地域から中国、ロシア、中東、アフリカ、ヨーロッパ諸国へと流行が広がり、現在でもわが国も含めて、野鳥および家禽を中心とした流行が続いている。このウイルスに感染した鳥との濃厚接触により、ヒトへの感染例も多数報告され、2003 年以降

2014 年 1 月までに 16 カ国 650 人の感染者および 386 人の死者が確認されている。現在、家禽および野鳥で流行している H5N1-HPAI は、赤血球凝集素 (HA) の遺伝的系統から Clade 0 から 10 のグループに大きく分類され、各 Clade はさらに細かく細分化されている。

これまでヒトへの感染例のほとんどは Clade 1(2004 年以降、主にベトナムで流行し

た株)または Clade 2 のウイルスにより起きており、2006 年以降、Clade 2 の sub-clade である、Clade 2.1 は、主にインドネシアで Clade 2.2 は中国青海湖、中東、アフリカ、ヨーロッパ等で、Clade 2.3 は中国南部や東南アジアで広まった。現在これらの Clade はさらに細分化され、例えば Clade 2.1 は Clade 2.1.1～2.1.3、Clade 2.3 は 2.3.1～2.3.4、Clade 2.3.2 は Clade 2.3.2.1、Clade 2.3.4 は Clade 2.3.4.1～2.3.4.3 へと Clade 数が増えており、H5N1-HPAI の遺伝的多様性が大きくなっている。H5N1-HPAI の分布は Clade 毎に異なり、例えばこれまでは、ベトナムの北部や中国では、Clade 2.3.2.1 が流行、ベトナムの南部やカンボジアでは Clade 1.1 が流行していた。しかし、最近ではベトナムの南部やカンボジアでヒト感染例から分離されたウイルスが、Clade 1.1 と 2.3.2.1 の遺伝子交雑(リアソータント)(HA と NA は Clade 1.1、その他遺伝子は Clade 2.3.2.1 由来)を起こしていることが判明し、リアソータントによりさらなる遺伝的多様性が大きくなっている。このようなリアソータントおよびウイルス遺伝子の変異により、従来の RT-LAMP 法で使用していたプライマーは、各 Clade 間で反応性が異なる事となり、検出感度が低くなったり、全く検出できなくなる恐れがあった。そのため Clade に関係なくどの H5 も検出できるプライマーの改良が必要である。

## B. 研究方法

RT-LAMP 用のプライマーを再設計し、ベトナム国立衛生疫学研究所(ハノイ)およびホーチミンパスツール研究所で保管されている臨床検体を用いて、Direct RT-LAMP 法

を用いた 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を行った。

## C. 研究結果

病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)はベトナム南部で新たな Clade 1.1 が流行しているが、再設計を行った RT-LAMP 用のプライマーを用いた場合でも、この Clade との反応性が低く、検出できない場合もある事が判明した。現在、この Clade だけに反応するように、従来のプライマーとは別のプライマーを設計しその反応性について検討を行っている

## D. 考案

今回、改良中の RT-LAMP 法では、ベトナムの北部で流行している Clade 2.3.2.1 とカンボジアおよびベトナムの南部出流行している Clade 1.1(HA と NA 以外は Clade 2.3.2.1 由来)の両方を、別々のプライマーを用いて検出できるようになる事が期待されまた、ウイルス核酸抽出過程におけるウイルス核酸濃度の希釈度合いが低くなるように抽出試薬を改良しているところであり、これにより高感度に H5 を検出できるようになる事も期待される。

## E. 結論

インフルエンザ検査に必要な検体は、通常はスワブを用いて鼻腔拭い液、咽頭拭い液、あるいは鼻腔吸引液等を患者より採取して用いる。日本においてはウイルス分離や RT-PCR 検査を行うためには、病院等で採取した検体をウイルス輸送培地に懸濁して地方衛生研究所や国立感染症研究所に送付して検査を行う事になっている。ベトナムでも同様に、病院からベトナム国立



衛生疫学研究所やホーチミンパスツール研究所に検体を送付し、そこで検査が行われている。リアルタイム RT-PCR 法など従来の遺伝子診断法では、検体由来の夾雑物による反応阻害の影響を少なくするために、検体からの核酸抽出を別に行う必要があるが、RT-LAMP 法では、これら反応阻害物に対して RT-PCR 法に比べると使用している DNA 合成酵素が寛容であるため、必ずしも核酸精製を行わなくても、RT-LAMP 反応を行う事が可能となっている。また、ウイルス輸送培地に懸濁された検体は、ウイルスや検体由来物の濃度が薄まっているため、反応阻害の影響も少なく、核酸抽出試薬量を従来の 1/10 というごく少量(検体量の 1/2 から 1/10 量程)の使用で RT-LAMP 反応を行う事ができるようになると考えられ、抽出時における検体の希釈度合いを少なくする事で、RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断が従来よりも高感度に行える事が期待される。従来はラボに検体を輸送し、核酸精製を行ってから RT-PCR 等により HA 亜型同定検査が行われるため、診断に少なくとも半日以上時間を要しており、核酸精製が不要な Direct RT-LAMP 法が、病院等の臨床現場で使用されるようになれば H5 の診断に対するメリットは大きい。

一方、Direct RT-LAMP 法は、従来の RT-PCR 法などの遺伝子検査に比べると、操作性や迅速性に優れてはいるが、遺伝子診断を行うクリーンな環境が整っていない病院やクリニックなどでこの検査を行うには、ピペットターを用いた分注作業が必要なため、陽性コントロールやサンプル同士の混入などによるコンタミネーションのリスクも高く、臨床現場で行う遺伝子検査として

まだ課題が多い。臨床現場でイムノクロマト法並に簡便で、コンタミネーションが起これない遺伝子検査系の開発が必須である。

H5N1-HPAI 発生国において、臨床現場あるいは研究所などで高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)の流行状況やその性状を正確に把握できるようになれば、患者の診断のみならず不顕性感染も含めた流行状況の調査も可能となり、我が国の感染症対策にも大いに寄与できると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nobuhiro Takemae, Tung Nguyen, Long Thanh Ngo, Yasuaki Hiromoto, Yuko Uchida, Vu Phong Pham, Tsutomu Kageyama, Shizuko Kasuo, Shinichi Shimada, Yasutaka Yamashita, Kaoru Goto, Hung Vo Van, Do Thi Hoa, Tsuyoshi Hayashi, Aya Matsuu, Takehiko Saito. Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam. *Archives of Virology* 158(4):859-876, 2013
- 2) Tsutomu Kageyama, Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Hong Xu, Shinya Yamada, Yuko Uchida, Gabriele Neumann, Takehiko Saito, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Euro Surveill.* 18(15). 20453-20468, 2013.

Erratum in: Euro Surveill. 18(16):20459, 2013.

- 3) Miho Kobayashi, Ikuyo Takayama, Tsutomu Kageyama, Hiroyuki Tsukagoshi, Mika Saitoh, Taisei Ishioka, Yoko Yokota, Hirokazu Kimura, Masato Tashiro, Kunihisa Kozawa. Novel Reassortant Influenza A(H1N2) Virus Derived from A(H1N1)pdm09 Virus Isolated from Swine, Japan, 2012. *Emerg Infect Dis.* 19(12):1972-1974, 2013

## 2. 学会発表

### 【国際会議】

- 1) Atsushi Kaida, Hideyuki Kubo, Nobuhiro Iritani, Koh-ichi Takakura, Jun-ichiro Sekiguchi, Minori Ohyama, Urara Kohdera, Masao Togawa, Kiyoko Amo, Masashi Shiomi, Seiji P Yamamoto, Kaoru Goto, Atsushi Hase, Tsutomu Kageyama. High Proportion of Multiple Infections with Respiratory Viruses in Young Children with Acute Respiratory Tract Infections. *European Congress of Virology 2013.* Lyon. September. 2013
- 2) Hitoshi Takahashi, Kazuo Ohnishi, Kengo Nishimura, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Shiho Nagata, Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Development of monoclonal antibodies specific for H5 HA and their application to rapid detection of influenza A/H5N1 virus. *Options for the Control of Influenza VIII,* Cape Town, 5-10 September 2013.
- 3) 大場邦弘, 高橋 仁, 高山郁代, 中内

美名, 影山 努. 新規マイクロ流路チップを用いたポイント・オブ・ケア遺伝子検査法によるインフルエンザウイルス型・亜型同定の臨床的有用性. 第 27 回インフルエンザ研究者交流会シンポジウム. 札幌 2013 年 6 月

### 【国内会議】

- 1) 大場邦弘, 田中智子, 小田智三, 高山郁代, 中内美名, 影山 努. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザおよび RS ウイルス感染症診断の臨床的検討. 第 62 回日本感染症学会東日本地方会学術東京. 2013 年 10 月
- 2) 林 健太, 加藤昭生, 大場邦弘, 小鍛治雅之, 高橋 仁, 高山郁代, 中内美名, 影山 努. インフルエンザ A/H3N2 感染を契機に発症した横断性脊髄炎の 4 歳男児. 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌. 2013 年 10 月
- 3) 影山 努, 高橋 仁, 高山郁代, 中内美名, 田代真人, 大場邦弘, 改田厚, 久保英幸. Direct RT-LAMP 法によるマイクロ流路チップを用いたインフルエンザおよび呼吸器感染症ウイルスの同定について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
- 4) 改田 厚, 久保英幸, 山元誠司, 入谷展弘, 天羽清子, 影山 努. 乳幼児呼吸器感染症からのコロナウイルス検出. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
- 5) 高橋 仁, 田中仁喜, 西村研吾, 高山

郁代、中内美名、永田志保、小林美栄、藤博幸、大西和夫、横田(恒次)恭子、田代真人、影山 努. H5 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製と H5N1 インフルエンザ迅速診断法構築の検討. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月

- 6) 高山郁代、中内美名、高橋 仁、田代真人、影山 努. 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出系の構築および喀痰検体の前処理についての検討. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
- 7) 小林(石原)美栄、高橋 仁、西村研吾、高山郁代、大西和夫、板村繁之、影山努、横田(恒次)恭子. H5N1 インフルエンザウイルス高感度検出系開発に向けた H5HA 特異的抗体のエピトープ解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月
- 8) 中内美名、高山郁代、高橋 仁、大場邦弘、田代真人、影山 努. B 型インフルエンザウイルス Victoria 系統・Yamagata 系統の real-time RT-PCR 法を用いた識別検出法の構築. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸. 2013 年 11 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

病院における院内感染は、入院患者数により  
アウトブレイクになる可能性が高くなる

研究分担者 山本健二  
国立国際医療研究センター 総長特任補佐

### 研究要旨

病院における院内感染について少なからずアウトブレイクを起こす。本研究は、計算機シミュレーションを用いベッド数が多いほど感染性疾患のアウトブレイクが起りやすい事を示した。

#### A. 研究目的

病院に入院患者がその病気を治療している間に感染し重症になり、ともしれば死に至ることもある。

インフルエンザやMRSAなどが原因となり多くの入院患者が死に至ることは、非常に問題である。

本研究は、このメカニズムを明らかにし、その予防法を開発する方法を開発することを研究目的としている。

#### B. 研究方法

本研究においては、計算機シミュレーションを用いて（DEL社；OPTIEX 620）行った。

横は時間軸であり、縦軸は、病原体の量である。

時間経過を100回行いその結果を集めた。

#### C. 研究結果

Table 1. Number of beds, discharges, and MRSA/MSSA carriers in Hospitals A and B

	Hospital A	Hospital B
Number of beds (B)	984	245
Number of discharges/year (D)	11925	2304
Area/bed (m <sup>2</sup> )	35.8	19.5
MRSA carriers/year (M)	410	31
MSSA carriers/year (S)	823	300
M/B	0.42	0.12
M/D	0.034	0.013
M/S	0.50	0.10

Table 1 に置いて結果を示した。

実際存在する二つの総合病院について計算機シミュレーションを行った。

ベッド数は、A病院は984bedでB病は245ベッドであり約4倍の差がある、またA病院とB病院の距離は4Km程で、医師や学生も交流も多々おこなれている。この様な状態の中でMRSAはA病院で410有り、B病院でわずか31件であった。

このように病院の違いは病床の数だけであったように思われる。そこで実際存在する二つの総合病院について計算機シミュレー

シオンを行ったところベッド数が多くなれば院内感染が多くなるという結果と成った。

#### **D. 考案**

ベット数の大きな病院ほど院内感染が多くなるならば、インフルエンザなど感染症疾患を大病院にて治療することに対し今後検討する必要があるかもしれないと考える。

#### **E. 結論**

本研究では感染性疾患において計算機シミュレーションを用いて大病院と小病院との院内感染の差を検討した。その結果大病院の方がパンデミックを起こし易いことが判明した。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

1. なし
2. 学会発表 なし

国際会議 なし

国内会議 なし

#### **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  
なし

## 鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルス感染症の発生状況

研究分担者 松井珠乃 国立感染症研究所感染症疫学センター第一室室長  
研究協力者 山岸拓也 国立感染症研究所感染症疫学センター主任研究官

研究要旨：WHO 西太平洋地域事務局のウェブサイトで提供されている症例情報をもとに、直近 3 年間のアジア地域のヒトの鳥インフルエンザ A(H5N1)の発生状況をまとめた。カンボジアにおける 2013 年の報告症例増加が最も顕著な所見であったが、ヒトの間で容易に伝播する所見は認められていない。

### A. 研究目的

ヒトの鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルス感染症（以下、鳥インフルエンザ A(H5N1)）は、2003 年以降 2014 年 1 月 24 日時点で、16 か国から 650 例の報告があり、うち 386 例が死亡している（症例死亡率 59.5%）。我が国においてこれまで発生はないが、近隣諸国などにおいて発生が継続している。

鳥インフルエンザ A(H5N1)については、現状の人獣共通感染症としての側面はもちろん、ヒト-ヒト感染が効率よく起こる変異を有するようになるパンデミックの脅威への監視という 2 つの異なる面から、日本としても継続的に評価を行っていく必要がある。

さて、WHO 西太平洋地域事務局と WHO 南東アジア地域事務局は、2005 年の国際保健規則（IHR）の改正を受け、同年以降 APSED (Asia Pacific Strategy for Emerging Diseases)の枠組みを作り、サーベイランス強化、Field Epidemiology Training Program を

通じた実地疫学調査の人材育成、公衆衛生セクターと動物セクターの協調、ラボネットワークの充実などにより、域内国の鳥インフルエンザ A(H5N1)を含む新興感染症への対応能力を上げる支援を継続してきた。

ヒトの鳥インフルエンザ A (H5N1)については、IHR(2005)に規定された枠組みにより、各国は発生症例を WHO に届け出ることが義務となっていることから、WHO の情報に基づきアジア地域における鳥インフルエンザ A(H5N1)の直近の発生状況を以下にまとめ、今後の監視のポイントを明らかにしたい。

### B. 研究方法

WHO 西太平洋地域事務局のウェブサイトで提供されている症例情報をもとに、直近 3 年間（2011-2013 年）のアジア地域のヒトの鳥インフルエンザ A(H5N1)の発生状況をまとめる。

### C. 研究結果

- 報告症例数：2011年はカンボジア8例（うち8例死亡）、中国1例（うち1例死亡）、2012年はカンボジア3例（うち3例死亡）、中国2例（うち1例死亡）、ベトナム4例（うち2例死亡）、2013年はカンボジア26例（うち14例死亡）、中国2例（うち2例死亡）、ベトナム2例（うち1例死亡）であった。
- 年齢/性別：2011年のカンボジア症例は、8例のうち7例について年齢・性別情報が得られ年齢範囲は4歳から19歳（中央値6歳）、女性7例、中国症例は39歳男性であった。2012年のカンボジア症例は6歳女兒と10歳女兒2名、中国症例は39歳男性と2歳男児、ベトナム症例は18歳男性、26歳女性、22歳男性、31歳男性であった。2013年のカンボジア症例の年齢範囲は8か月—58歳（中央値5歳）（男女13例ずつ）、中国症例は、21歳女性と31歳男性、ベトナム症例は4歳男児と20歳女性であった。

### D. 考案

ここ3年の経過を見ると、2013年においてカンボジアの報告数が急増したのが、もっとも顕著な所見であった。ちなみにカンボジアの2003年以降2010年までの報告症例数は、2005年が4例、2006年が2例、2007年から2010年は毎年1例ずつであった。この増加については、WHOは、サーベイランスの改善、医師の認知度の向上、家禽におけるウイルス循環の増加などの要因を推測している。

2013年のカンボジアの省別の報告数は、多い順に、Kampot 7例、Kampong Speu 4例、

Takeo 3例、Phnom Penh 3例、Battambang 2例、Kandal 2例、その他1例ずつの省が5つであった。クラスターと思われる事例はなかった。

カンボジアの症例死亡率は、2005年から2012年までの報告症例では、21例中19例が死亡（90%）と高い割合であったのに対し、2013年は26例中14例が死亡（症例死亡率54%）と低下傾向を認めていることから、サーベイランスの改善による報告症例数増加の可能性もあるかもしれない。

カンボジアは、女兒に報告例が多い傾向があったが、2013年は年齢の傾向は変わらないものの男児症例が増加している。この要因については情報が無い。

WHOによると、以前はカンボジアのヒトおよびトリからとれるウイルスはクレード1.1が優位であったが、2013年初めからヒトとトリからクレード1.1と2.3.2.1のreassortant株が見つかってきている。これとヒト症例増加の関係はわかっていない。

各国政府は、症例発生時には、家族など濃厚接触者において積極的症例探索を行っているが、WHOによると依然ヒトの間で容易に伝播する傾向は認めていないとのことである。

現状においては、鳥インフルエンザA(H5N1)については、報告されている症例が高い死亡率を呈することが公衆衛生の観点からは一つの注意点である。ただし、症例の探知力は、発生国のサーベイランス能力に大きく依存しており、現在われわれが見ているものが鳥インフルエンザA(H5N1)の真の姿であるかどうかはわからない。

また、人獣共通感染症であることから、疾病のコントロールには、公衆衛生セクタ

一と動物セクター（家畜・野生動物）との協力が必須であるが、これも各国により現状は様々である。

3. その他 なし

#### E. 結論

今後も WHO や各国政府が発表するヒトの鳥インフルエンザ A(H5N1)に関する情報収集を継続し、疫学状況の変化に注意を払っておく必要がある。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) H Ushizawa, A Foxwell, S Bice, T Matsui, Y Ueki, N Tosaka, T Shoko, J Aiboshia and Y Otomo: Needs for disaster medicine: lessons from the field of the Great East Japan Earthquake. Western Pacific Surveillance and Response 2013
- 2) N Prasith,O Keosavanh,M Phengxay, S Stone,H Lewis,R Tsuyuoka,T Matsui,P Phongmanay,B Khamphaphongphaneb and Y Arima: Assessment of gender distribution in dengue surveillance data,the Lao People's Democratic Republic. Western Pacific Surveillance and Response 2013

##### 2. 学会発表 なし

#### 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



平成 25 年度  
班会議プログラム

## 平成 25 (2013) 年度 第 1 回班会議

### プログラム

日時：平成 25 年 7 月 26 日(金)

10 : 00-受付 10 : 30~16 : 30

会場：国立国際医療研究センター  
研究所 AB 会議室

10 : 30-10 : 40 **開会の辞** (河内正治：国立国際医療研究センター手術部麻酔科)

10 : 40-11 : 00

#### 0-1 『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 (H25-新興-一般-011) Overview -新たな研究の方向性-』

河内正治 (研究代表者/ 国立国際医療研究センター手術部麻酔科)

#### 今年度より新しく研究分担者になられた先生のご紹介

松井珠乃 (国立感染症研究所感染症疫学センター)

鈴木忠樹 (国立感染症研究所感染病理部)

11 : 00-12 : 00

座長： 中島典子

#### 1-1 『Influenza A(H5N1)の治療法についての検討-新たな治療法の開発に向けて-』

河内正治<sup>1,2</sup>、布井博幸<sup>3</sup>、中島典子<sup>4</sup>、岡本竜哉<sup>1,2</sup>

Thuy Thi Bich Phung<sup>5</sup>, Phan Huu Phuc<sup>5</sup>, Liem Thanh Nguyen<sup>5</sup>

<sup>1</sup>国立国際医療研究センター NCGM : National Center for Global Health and Medicine、

<sup>2</sup>国立感染症研究所免疫部、<sup>3</sup>宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野、

<sup>4</sup>国立感染症研究所感染病理部、<sup>5</sup>NHP-Hanoi : National Hospital of Pediatrics, Hanoi, Vietnam

#### 1-2 『ARDS 治療におけるトロンボモジュリン製剤の可能性』

岡本竜哉<sup>1,2</sup>、河内正治<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>国立国際医療研究センター、<sup>2</sup>国立感染症研究所免疫部

#### 1-3 『WHO における鳥インフルエンザ A (H5N1) ウイルス感染症情報の収集』

松井珠乃 (国立感染症研究所感染症疫学センター)

12 : 00 – 13 : 00

昼食

13 : 00 – 14 : 20

座長 : 本間 栄

**2-1 『ハノイ国立小児病院において呼吸不全で死亡した4ヵ月男児の肺組織の病理学的解析』**

中島典子<sup>1</sup>、佐藤由子<sup>1</sup>、鈴木忠樹<sup>1</sup>、長谷川秀樹<sup>1</sup>、佐多徹太郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>国立感染症研究所・感染病理部、<sup>2</sup>富山県衛生研究所

**2-2 『インフルエンザ感染症を含む発熱疾患での血中サイトカインの読み方について』**

布井博幸、西村豊樹 (宮崎大学生殖発達医学講座小児科学分野)

**2-3 『特発性肺線維症急性増悪(IPF-AE : びまん性肺胞障害)に対するPMX-DHP吸着療法の有用性』**

菊池 直、本間 栄 (東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科)

14 : 20 – 14 : 35

総括 小川道雄 先生 (市立貝塚病院・総長)

14 : 35 – 15 : 10

休憩

15 : 10 – 16 : 15

座長 : 布井博幸

**3-1 『骨におけるCCR5の細菌に対する影響』**

星野昭芳<sup>1</sup>、花田三四郎<sup>2</sup>、山本健二<sup>3</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学大学院医学系研究科 腫瘍病理学分野、<sup>2</sup>国立国際医療研究センター 研究所

<sup>3</sup>国立国際医療研究センター 総長特任補佐

**3-2 『中国で発生しているインフルエンザA(H7N9)について』**

影山努 (国立感染症研究所)

**3-3 『高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)剖検試料からのNS1遺伝子の回収とその解析にむけて』**

大島正道、池尻藍 (国立感染症研究所)

16 : 15 – 16 : 30

POの先生より

今後の方針、閉会の辞 (研究代表者 河内正治)

MPO研究会のご案内

## 平成 25 (2013) 年度 第 2 回班会議

### プログラム

日時：平成 26 年 1 月 17 日(金)

14 : 00～17 : 00(予定)

平成 26 年 1 月 18 日(土)

09 : 45～12 : 30(予定)

会場：宮崎観光ホテル プリリアントホール

### 第 1 日目 1 月 17 日(金)

13 : 30 - 受付

14 : 00 - 14 : 10 **開会の辞** (河内正治：国立国際医療研究センター手術部麻酔科)

14 : 10 - 14 : 35

0-1 『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 (H25-新興-一般-011)  
Overview -新たな研究計画の策定-』

河内正治 (国立国際医療研究センター 手術部麻酔科/ICU)

14 : 35 - 15 : 25

座長：松井 珠乃 (国立感染症研究所)

1-1 『ハノイ国立小児病-PICUに入院した重症 ARDS 症例の病原体の検索』

中島典子<sup>1</sup>、鈴木忠樹<sup>1</sup>、松井珠乃<sup>2</sup>、布井博幸<sup>3</sup>、河内正治<sup>4</sup> Phan Huu Phuc<sup>5</sup>、Le Thanh Hai<sup>5</sup>

<sup>1</sup>国立感染症研究所・感染病理部、<sup>2</sup>国立感染症研究所・感染症疫学センター

<sup>3</sup>宮崎大学医学部・小児科、<sup>4</sup>国立国際医療研究センター、

<sup>5</sup>National Hospital of Pediatrics, Hanoi, Vietnam

1-2 『ベトナムの小児の医療状況と感染症情報』

布井博幸<sup>1</sup>、河内正治<sup>2</sup>、岡本竜哉<sup>2</sup>、

Pham Nhat An<sup>3</sup>、Thuy T.B. Phan Huu Phuc<sup>3</sup>、Le Thanh Hai<sup>3</sup>、中島典子<sup>4</sup>

<sup>1</sup>宮崎大学医学部小児科、<sup>2</sup>国立国際医療センター、