

201420011A・B

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)

「重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究」

平成24～26年度 総合研究報告書
及び
平成26年度 総括・研究分担報告書

平成27年3月

研究代表者 森 島 恒 雄

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学 特命教授)

目 次

I 平成24－26年度 総合研究報告

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究	森島 恒雄	1
-------------------------------------	-------	---

平成24－26年度 分担研究報告

1 重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究	森島 恒雄	12
2 H5N1 およびパンデミックウイルスのウイルス学的解析	河岡 義裕	19
3 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ ―剖検例からわかること―	長谷川 秀樹	23
4 重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究 (重症肺炎・脳症の実験病理学的研究)	新矢 恭子	30
5 マウスインフルエンザウイルス(H1N1)感染モデルでの炎症基盤解析	松川 昭博	33
6 重症例の治療効果および予後に関する検討	池松 秀之	37
7 川崎市における急性脳炎・脳症の届出状況 2009年～2014年	岡部 信彦	42
8 感染症発生動向調査に基づいた2012/2013、2013/2014、2014/2015 各シーズンのインフルエンザの発生動向と海外論文の検討	多屋 馨子	49

9	インフルエンザ脳症の診断および治療に関する研究	奥村 彰久	58
10	喘息モデルマウスを用いた A(H1N1)pdm09 感染による気管支喘息重症化の病態解析	長谷川 俊史	68
11	病態及び解析結果からみた重症インフルエンザ肺炎・脳症治療ガイドライン作成のための根拠収集	河島 尚志	72
12	小児重症ウイルス感染症における多因子解析	宮入 烈	78
13	メタボローム解析を用いたウイルス性脳症患者血清中のバイオマーカー候補の検討	伊藤 嘉規	83
14	インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析	蒔田 泰誠	87
15	生体マーカーを用いた重症インフルエンザの病態解析と治療開発 —尿中バイオマーカーの迅速検査についての検討—	塚原 宏一	90
16	インフルエンザ成人重症例の病態と診療体制整備	竹田 晋浩	93
17	日本の体外循環補助療法の実態とウイルス性疾患による重症呼吸不全に対する 体外循環補助療法の可能性	中川 聡	98

II 平成26年度 総括研究報告

重症インフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究

森島 恒雄 101

平成26年度 分担研究報告

1 川崎市における急性脳炎・脳症の届出状況 2009年～2014年

岡部 信彦 112

2 09/10シーズン以降のインフルエンザ脳症の実態

奥村 彰久 119

3 感染症発生動向調査に基づいた2014/2015シーズンのインフルエンザの発生動向と海外論文の検討

多屋 馨子 126

4 H5N1およびパンデミックウイルスのウイルス学的解析

河岡 義裕 132

5 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ ―剖検例からわかること―

長谷川 秀樹 135

6 重症例の治療効果および予後に関する検討

池松 秀之 140

7 インフルエンザ肺炎モデルにおける抗HMGB1抗体の治療効果

森島 恒雄 144

8 メタボローム解析を用いたウイルス性脳症の新規バイオマーカー候補の探索

伊藤 嘉規 148

9 小児重症ウイルス感染症における多因子解析

宮入 烈 152

- 10 生体マーカーを用いた重症インフルエンザの病態解析と治療開発
ー尿中バイオマーカーの迅速検査についての検討ー
塚原 宏一 156
- 11 喘息モデルマウスを用いた A(H1N1)pdm09 感染による気管支喘息発作重症化の
病態解析
長谷川 俊史 158
- 12 インフルエンザウイルス (H1N1) 及び二次性細菌性肺炎のエピジェネティクス解析
松川 昭博 162
- 13 インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析
蒔田 泰誠 164
- 14 病態及び解析結果からみた重症インフルエンザ肺炎・脳症治療ガイドライン作成の
ための根拠収集
河島 尚志 167
- 15 インフルエンザ成人重症例の病態と診療体制整備
竹田 晋浩 171
- 16 新型インフルエンザ等に対する診療体制整備 WHO はじめ国外との連携体制
清水 直樹 174
- 17 ウイルス性疾患による重症呼吸不全に対する膜型人工肺を用いた体外循環補助療
法 (extracorporeal membrane oxygenation; ECMO) の可能性
中川 聡 183

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧

I 平成 24 - 26 年度 総合研究報告

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究

研究代表者 岡山大学大学院特命教授 森島恒雄

研究要旨

重症インフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析を通じて診断・治療法を確立することを目的として本研究を実施した。本研究班の特徴として、基礎ウイルス学・疫学・病理学・臨床ウイルス学(小児および成人)・小児神経学・免疫学・集中治療学(小児および成人)の幅広い分野から研究者が集まり多面的な研究を推進したことである。2009年のパンデミックのように、ウイルス学や病理学、世界の動向を把握することなく国内のインフルエンザ診療を進めることは不可能であり、目標を侵入が危惧される高病原性インフルエンザへの対策を進めるにはこうした包括的な組織が重要であった。以下にその成果の概要を示す。

1. 侵入が危惧されるインフルエンザのウイルス学的検討：

先ず2013年中国において大きな問題となったAH7N9のウイルス学的解析をAH1pdmウイルスやAH5N1ウイルスと比較しながら解析を行った。その結果、AH7N9ウイルスは感染力と実験動物への病原性においてAH1pdmウイルスとAH5N1ウイルスとの中間であった。重要な点は本ウイルスはノイラミニダーゼ阻害剤の効果が極めて低いことであり、国内侵入時の診療に大きな影響を与えうる。そのため今後も引き続き検討が必要である。

2. インフルエンザ重症例の病理学的検討：

2009年パンデミックを起こしたAH1pdmは小児および成人で重症の肺炎を惹起した。その理由としてAH1pdmウイルスが下気道で増殖しウイルス性肺炎による重篤な肺障害(ARDSなど)を起こしたためと推定された。成人の肺炎死亡例では二次性の細菌性肺炎の合併も認められた。また肺局所におけるサイトカイン/ケモカインの産生も病態の悪化に関連していた。一方、侵入が危惧されるAH7N9の病理像などは不明であり、今後情報の収集に努める必要がある。

3. 重症肺炎およびインフルエンザ脳症の病態解明と治療：

先ず国立感染症研究所を中心に「急性脳炎」としてインフルエンザ脳症の届け出が義務化されていたが、それが徐々に機能するようになり、この研究期間では多くの報告がなされるようになった。脳症の予後は届け出例では致命率約10%であり、未だ重篤な疾患であることに変わりはない。インフルエンザ脳症の病態として、近年サイトカインストームによる脳障害を示す型(ステロイドパルスや大量ガンマグロブリンが著効)が減少し、サイトカインストームを示さない痙れん重積型(二相性)脳症が増加している。痙れん重積型は致命率は高くないが高率に後遺症を残す。近年ホスフェニトインが有効性を示し、また安全性も確認され、今後この型の治療上重要となることを明らかにできた。

小児の重症肺炎については、AH1pdmにおける肺炎重症化の機序が明らかになってきた。すなわち、パンデミック時、小児重症肺炎患者の約40%にアレルギー素因、特に気管支喘息が認められた。喘息マウスを作製しAH1pdmウイルスを感染させたところ、それ以外の季節

性インフルエンザウイルスに比較して重篤な肺炎を起こし、肺内でのウイルス量も増加していた。これはウイルス側と宿主側の要因の両者が肺炎の重篤化に関連することを示す重要な研究成果と思われた。

4. 治療法の確立と診療体制整備：

先ず大きな進展として高病原性インフルエンザ国内侵入時における治療法を含む迅速な診療体制整備にむけて、厚生労働省担当部局、関連学会（日本救急医学会、日本集中治療医学会、日本呼吸器学会、日本小児科学会、日本感染症学会など）、関連研究班（森島班、大石班、）による検討組織「新型インフルエンザ等に対する標準診療ガイドライン策定のための合同会議」を2012年度に立ち上げ、その中で重症インフルエンザ肺炎の診療ガイドラインを作成した。この組織の維持・発展は重篤なインフルエンザに対する治療法の確立・普及の上で、極めて重要と思われる。また昨年 WHO 主催により中国で開催された AH7N9 を想定したセミナーに分担研究者を派遣し、情報収集とその公開を行った。一方、重症インフルエンザの集中治療分野では欧米に比べ、パンデミックにおける肺炎治療の成績は必ずしも良いものではなかった。その理由として集中治療拠点への患者搬送や ECMO 治療に熟練した施設数の少なさなどが挙げられた。現在その整備に向けて検討が進んでいる。

5. 新規治療薬の開発：① 抗酸化の働きを持つチオレドキシシン (TRX) のマウスにおけるインフルエンザ肺炎治療効果を検討し、TRX が肺炎による致命率を大幅に改善することを明らかにした。すなわち、好中球の肺局所への浸潤や局所におけるサイトカイン/ケモカインの産生を抑制し、また種々の酸化ストレスマーカーの抑制が認められた一方、ウイルスの肺内増殖には影響を与えなかった。TRX は、現在ヒト化精製物も作られており、今後臨床応用が期待できる。② HMGB1 は細胞外では炎症のメディエーターとして知られ、サイトカイン/ケモカインの誘導の引き金となり、重症インフルエンザにおいて病態悪化に関連することが知られている。抗 HMGB1 抗体は、マウスのインフルエンザ肺炎の治療薬として有用であることを明らかにした。すなわち、好中球の肺浸潤を抑制し、サイトカイン/ケモカインの産生を抑え、同時に ROS を抑制した。現在、脳血管障害や肺損傷などインフルエンザ以外でも本剤の有用性が推定されており、臨床応用に向けた重要な成果と考えられた。ここで示した内容の他にも興味深い研究成果が示されており、分担報告を参照していただきたい。

研究代表者(所属)

森島恒雄(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

研究分担者(所属)

岡部信彦(川崎市健康安全研究所)

蕙田泰誠(理化学研究所)

河岡義祐(東京大学医科学研究所)

松川昭博(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

長谷川秀樹(国立感染研究所)

塚原宏一(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

池松秀之(九州大学先端医療イノベーションセンター)

伊藤嘉規(名古屋大学医学部附属病院)

河島尚志(東京医科大学)

竹田晋浩(日本医科大学付属病院)

奥村彰久(愛知医科大学)

中川聡(国立成育医療研究センター)

多屋馨子(国立感染研究所)

新矢恭子(神戸大学大学院医学研究科 平成 24, 25 年)

長谷川俊史(山口大学大学院医学系研究科)

清水直樹(東京都立小児総合医療センター 平成 26 年)

A. 研究目的

目的

1. 「新型インフルエンザ」の侵入に備えて、肺炎・脳症・多臓器不全など重症例の海外動向・病理・ウイルス学的特徴・臨床像・病態などを解析し、重症化に備えた「診療ガイドライン」を作成することを目的とした。これは「既存の治療薬」及びその認可された適応の範囲で進めると同時に病態解析に基づく重症インフルエンザに対する新規治療薬の開発も実施した。具体的には、

病態の悪化につながる「炎症」「高サイトカイン血症」「酸化ストレス」などを抑制する効果のある①抗HMGB1抗体、②チオレドキシンについて重症化予防の検証を進め、臨床応用への道を開いた。

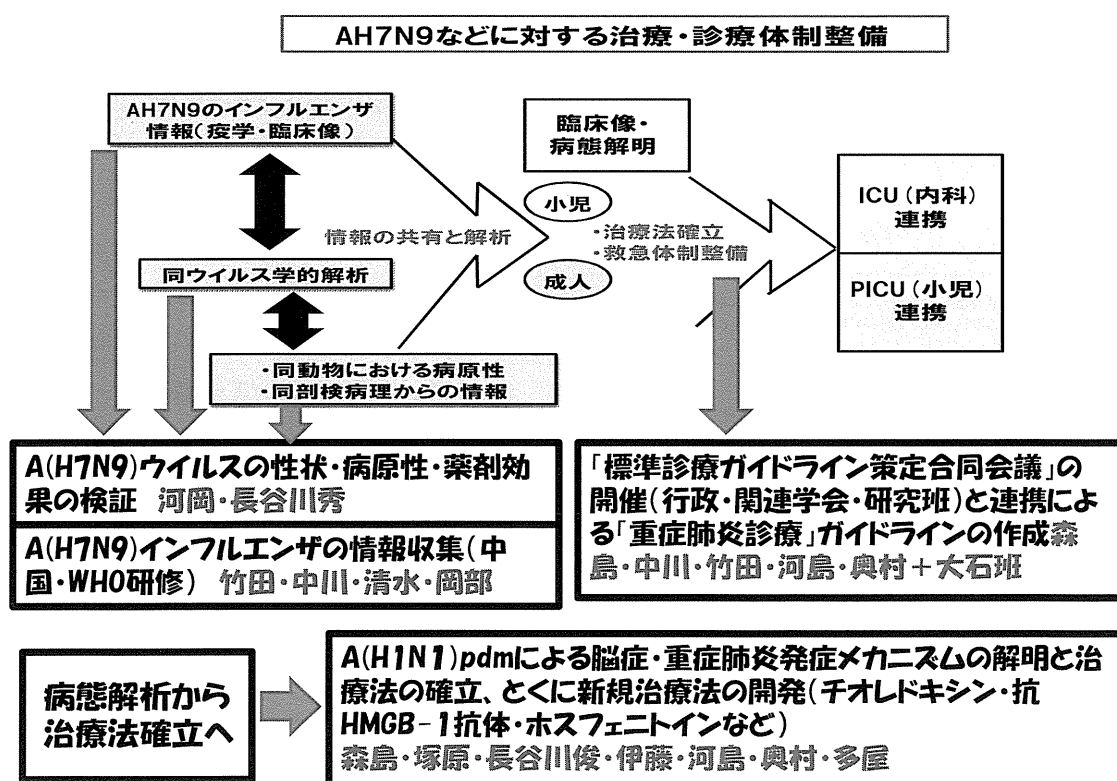
「診療ガイドライン」の作成・改訂・普及を円滑に進めるために厚労省関連学会・関連研究班による連携組織を作り、維持発展させた。特に、今後さらにAH7N9、AH5N1、AH1pdm薬剤耐性株などの蔓延を想定して治療法の確立と普及を進めていく。

B. 研究方法

研究組織：疫学・基礎ウイルス学・病理学・免疫学・小児および成人感染症学・小児神経学・小児尾および成人集中治療学の専門家が集まり、包括的な研究を進

めることにある。主な役割について図1に示した。研究方法の詳細については各分担研究者の報告を参考にしていきたい。

図1.



C. 結果

1. AH7N9 などのウイルス学的解析：

先ず 2013 年中国において大きな問題となった AH7N9 のウイルス学的解析を AH1pdm ウイルスや AH5N1 ウイルスと比較しながら解析を行った。その結果、AH7N9 ウイルスは感染力と実験動物への病原性において AH1pdm ウイルスと AH5N1 ウイルスとの中間であった。重要な点として AH7N9 ウイルスはノイラミニダーゼ阻害剤の効果が極めて低いことであり、国内侵入時の診療に大きな影響を与えうる。そのため今後も引き続き検討が必要である。

図 2.

A(H7N9)ウイルスの特徴	
世界中の研究者が現在動物の感染モデルを用いて A(H7N9) の病原性などについて検討中。	
概略	
①ヒトでの病原性：	AH5N1>AH7N9>AH1pdm
②伝播力：	AH1pdm>AH7N9>AH5N1
③抗インフルエンザ薬が効きにくい。	
A. A(H7N9) 感染マウスの体重減少阻止効果が弱い	
B. 肺内のウイルス増殖抑制効果が弱い	
	[Watanabe T. et al. Nature 2013]

A(H7N9)の特徴

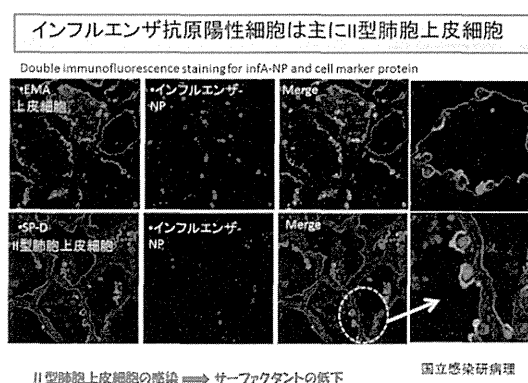
1. 感染者・重症者は成人例が多い、これは小児の救命救急体制に大きく影響。
2. 肺炎、特にARDSが多発。現時点で死亡率約20-30%と非常に高い。
3. 重症例でサイトカインストームによる多臓器不全の頻度は比較的低い？
4. 重篤な肺障害はウイルスの増殖によるものと考えられる。
5. 増殖部位によっては、抗原検出キットによる早期診断が困難な可能性がある。
6. ARDSなど肺障害重症例でウイルス量のコントロールが難しい症例が多い。
7. オセルタミビルに対する感受性が低い。
8. 本ウイルスに対しては、全年齢層が免疫を持たない。

2. インフルエンザ重症例の病理学的検討：

AH1pdm は小児および成人で重症の肺炎を惹起した。その理由として AH1pdm ウイルスは下気道で増殖し(図 3 参照)ウイルス性肺炎による重篤な肺障害(ARDS など)を起こしたためと推定された。成人の肺炎死亡例では

二次性の細菌性肺炎の合併も認められた。また肺局所におけるサイトカイン/ケモカインの産生も病態の悪化に関連していた。一方、侵入が危惧される AH7N9 の病理像などは不明であり、今後流行国などからの情報の収集に努める必要がある。福岡を中心とした北九州地区のサーベイランスでは季節性インフルエンザでは肺炎による入院は高齢者を中心にしており、AH3N2 香港型が多かった。

図 3.

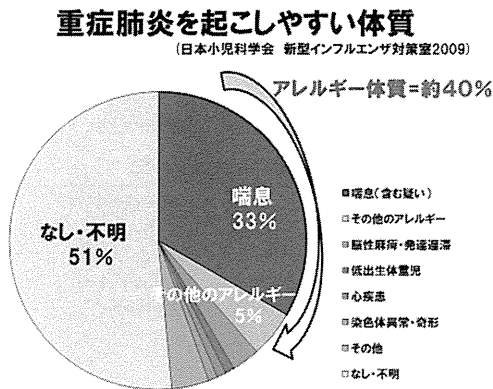


3. インフルエンザ脳症及び肺炎の病態の解明と治療法の確立：

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、図 4 に示す如く、①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、②肺炎患者は有意に高い IgE を示すこと、③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、④これらの結果は同ウイルスにより 2009 年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) 解析で、SOD-2(ミトコンドリア膜の antioxidant) 関連遺伝子発現の増強が認められ、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(図 5)。この結果、AH1pdm ウイルスによる肺炎の重症化にウイルス側の要因と

宿主側要因との相互の因子が関連することが明らかになった。その他小児重症ウイルス感染症の重症度に関連する種々の多因子解析を行った結果、重症化予測因子として血清総蛋白低値と LDH 高値が挙げられた。

図 4.



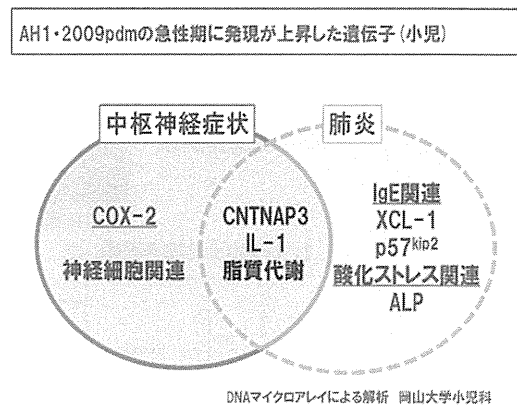
インフルエンザ脳症：先ず国立感染症研究所を中心に「急性脳炎」としてインフルエンザ脳症の届け出が義務化されていたが、それが徐々に機能するようになり、この研究期間では多くの報告がなされるようになった。脳症の予後は届け出例では致命率約10%であり、未だ重篤な疾患であることに変わりはない。インフルエンザ脳症の病態として、近年サイトカインストームによる脳障害を示す型(ステロイドパルスや大量ガンマグロブリンが著効)が減少し、サイト

4. 新規治療薬の開発：

抗インフルエンザ薬ではなく、薬剤不応例やウイルス増殖がなく悪化していく病態を想定した抗炎症・抗サイトカイン・抗酸化ストレス作用を持つ薬剤の開発に取り組んだ。ここではチオレドキシシンと抗 HMGB1 抗体の2つの成績を示す。

①チオレドキシシン (TRX) は、ROS を除去す

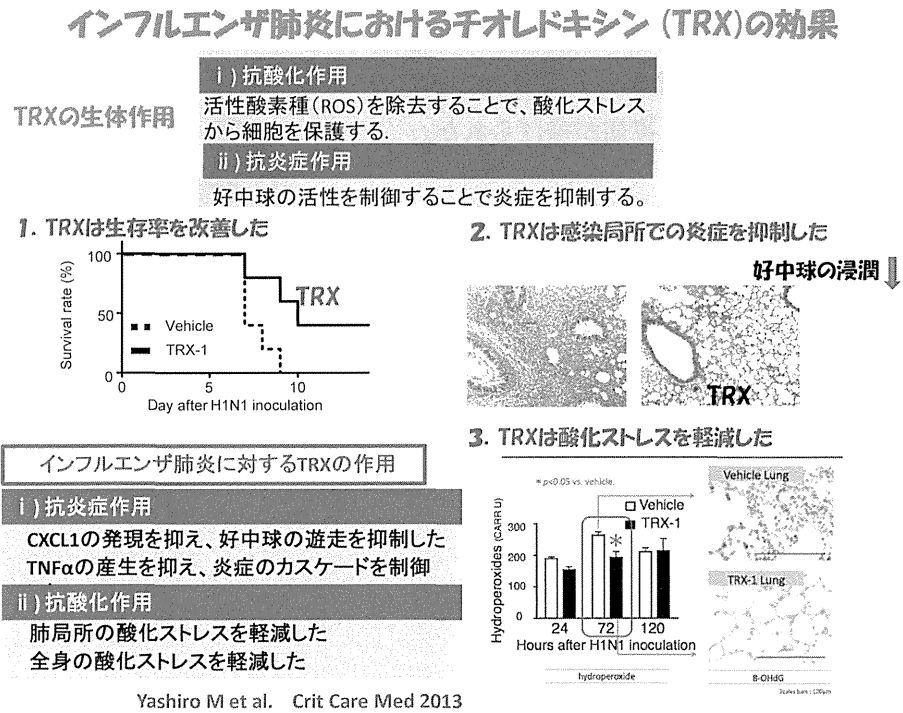
図 5.



カインストームを示さない痙れん重積型(二相性)脳症が増加している。痙れん重積型は致命率は高くないが高率に後遺症を残す。近年ホスフェニトインが有効性を示し、また安全性も確認され、今後この型の治療上重要となることを明らかにできた。一方、インフルエンザ脳症の発症に関連する宿主側因子解明のため SNP 解析を全ゲノム関連解析(GWAS)として実施したが、有意な関連 SNP は検出されなかった。

ることで細胞を酸化ストレスから保護する役割を持つ。また抗炎症作用として好中球の活性を抑制することで炎症を制御することが知られている。この TRX についてインフルエンザ肺炎(マウスに PR8 を感染)の治療効果について検討し、以下の結果(図 6)を得た。

図 6.

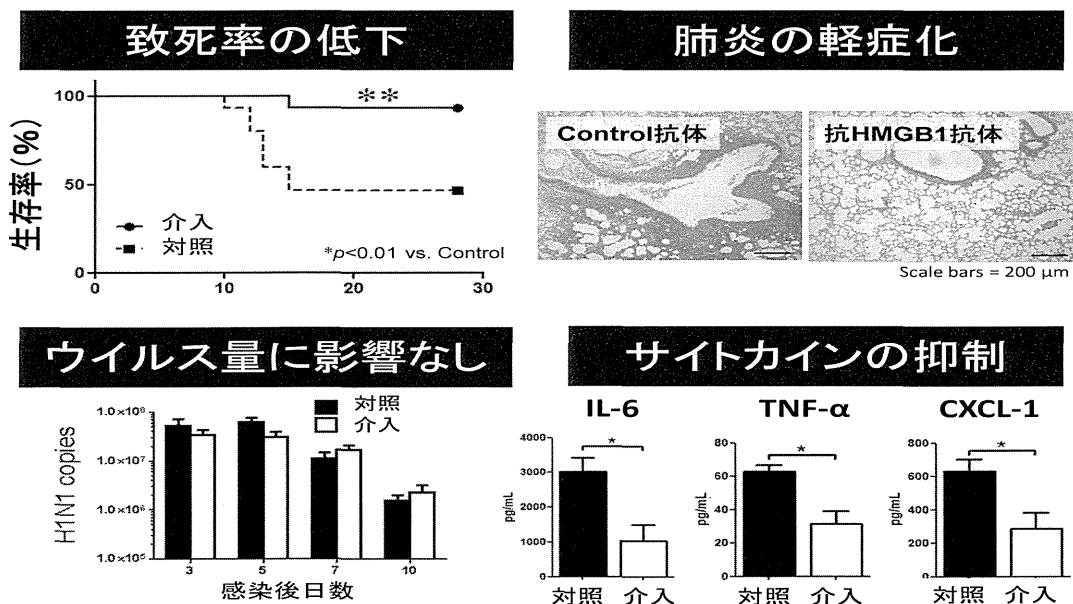


すなわち、TRX はインフルエンザ肺炎によるマウスの致死率を著明に改善させ、抗炎症 (好中球の局所浸潤を抑えた。炎症性サイトカイン・ケモカインの抑制効果や抗酸化作用も有していた。

効果 HMGB1 は細胞内では DNA に結合して DNA の安定化や遺伝子発現の調整を行っているが、細胞外では外部刺激に対する炎症性メディエーターとして作用する。HMGB1 は現在インフルエンザ重症肺炎を含む様々な病態で悪化に関与することが示されている。結果を下の図 7 に示す。

②抗 HMGB1 抗体のインフルエンザ肺炎治療

図 7.



抗 HMGB1 抗体はマウスの肺炎による致命率を著明に改善させた。その効果は TRX と同様ウイルスの肺での増殖抑制によるものではなかった。肺では好中球の浸潤を抑制しまた、IL-6、TNF α 、CXCL-1 などのサイトカイン・ケモカインを抑制し、酸化ストレスマーカーも低値を示した。

5. 重症インフルエンザの診療体制の整備とガイドラインの作成：

重症インフルエンザの診療体制整備は重要な課題であり、我々の研究班では厚生労働省大石班と連携をとり、①厚生労働省担当部局、②厚生労働省関連研究班(森島班・大

石班)、③関連学会の参加により「新型インフルエンザ等に対する標準診療ガイドライン策定のための合同班会議」を組織した。計4回の会議の中で AH7N9 などのウイルス学的特徴および臨床像と病態が討議され、国内侵入時の対策の必要性が協議された。またこの過程で、成人のインフルエンザ肺炎に対する診療ガイドラインが初めて作成された。また2014年WHOの呼びかけによる講習会が中国で開催され、日本から2人の研究者(うち1人は清水分担研究者)を派遣し、帰国後成果を国内にフィードバックした。その概要について下の図8に示した。

図8 「新型インフルエンザ」の診療体制整備

重要な事項

- ・国内侵入前から、病態解明を実施し、
- ・「既存薬」によるガイドライン策定(想定)
- ・新規治療薬の開発
- ・速やかな連携組織を構築していく。※

※「新型インフルエンザ等に対する標準診療ガイドライン策定のための合同会議」

2013-2014

厚生労働省+対応研究班(森島班・大石班)+関連学会

(日本感染症学会、日本小児科学会、
日本呼吸器学会、日本集中治療学会、その他)

ガイドラインの作成・改訂とその普及

今後、この組織の維持・発展が「新型インフルエンザ」対応に極めて重要となる。

D. E. 考察とまとめ：

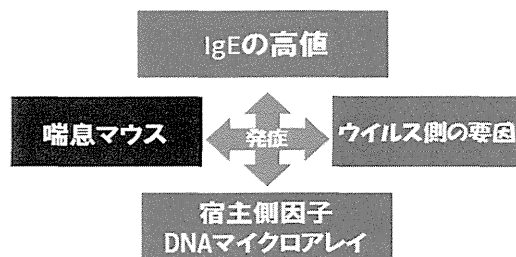
2009年の「新型インフルエンザ」AH1pdmにおいて、小児の重症インフルエンザが多発した。またアレルギー素因特に気管支喘息を有する児で重症肺炎がみられた。

この機序について研究を進めたところ、DNAマイクロアレイ解析により宿主の急性期遺伝子発現において、IgE関連遺伝子群および酸化ストレスマーカー関連遺伝子の高発

現が認められ興味深い結果となった。一方、中枢神経症状を示す群においては、種々の神経疾患関連遺伝子群や COX-2 遺伝子の高発現を認め、すなわち、脳症と重症肺炎では異なる宿主の背景が存在することが示唆された。ここでは詳細は省いたが、興味深いことに同じ痙攣重積を示したロタウイルス胃腸炎とインフルエンザでは、それぞれ異なる急性期遺伝子の発現が認められ、ウイルスによっても宿主の反応が異なることが明らかになった。2013/14 インフルエンザシーズンでは、久しぶりに AH1pdm の流行がみられ、その中で小児および成人にパンデミックの時と同様に肺炎の多発がみられた。今後これら肺炎およびアレルギー素因と関連する AH1pdm ウイルス学的要因を探ることが大きな課題である(図 9)。

図 9.

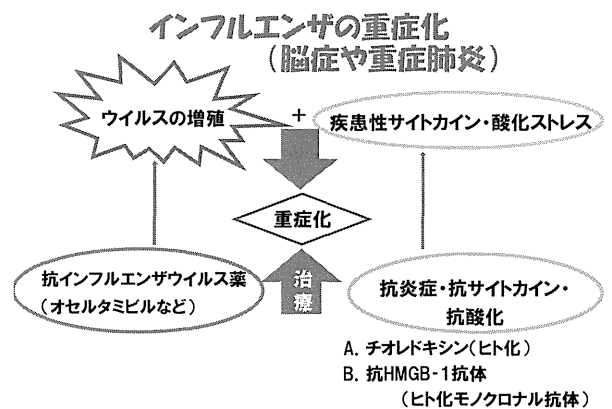
何故AH1N1pdm肺炎はアレルギー素因を背景に？



一方、新規治療薬の開発は重要である。今回特にインフルエンザウイルス増殖抑制効果を示さず、抗炎症・抗サイトカイン・抗酸化ストレス効果を示し、結果としてマウ

スの致命率を著明に改善する2つの薬剤が確認された。今後 AH7N9 や AH1pdm 薬剤耐性株など抗インフルエンザ薬の効果が低い可能性が示唆されているため、これらの効果を示す薬剤の開発は急務である(図 10)。従来はインフルエンザ脳症においてステロイドがパルス療法として用いられてきた。これは脳内でインフルエンザウイルスの増殖は認められないため使用が可能となった側面もある。一方、肺内でウイルスが増殖する場合、ステロイドが使いにくい状況が考えられる。その時この2剤は極めて重要となろう。特に抗 HMGB1 抗体についてはヒト化モノクローナル抗体がすでに完成しており、現在岡山大学においてインフルエンザ肺炎に対する治療薬として特許申請中である。

図 10.



F. 研究発表

論文（主な英語論文のみ記載）

- 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.
- Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol*. 2012 Mar 16;7(3):552-62.
- Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol*. 2012 Jan;25(1):1-13.
- 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(3):357-69, 2013
- Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Aina A, Atsuta R, Shirabe K, Toda S, Wakabayashi-Takahara M, Morishima T, Ichiyama T. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine*. 2014 Oct;69(2):206-10. Epub 2014 Jul 6.
- Ikematsu, H. et al., The post-infection outcomes of influenza and acute respiratory infection in patients above 50 years of age in Japan: an observational study. *Influenza Other Respi Viruses*, 2012 ; 6(3):211-7.
- Kawai, N. et al., Persistence of pandemic influenza H1N1 virus in young patients after oseltamivir therapy in the 2009-2010 season: a comparison with seasonal H1N1 with or without H275Y mutation. *J Infect Chemother*, 2012 ; 18(2):180-6.
- Kawai, N. et al., 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*, 2013 ; 7(3):448-55.
- 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.
- 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.
- Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi J, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on

- the association of viruses and syndromes. *Brain Dev* 2012; 34(5): 337-343.
- Hayashi N, Okumura A, Kubota T, Tsuji T, Kidokoro H, Fukasawa T, Hayakawa F, Ando N, Natsume J. Prognostic factors in acute encephalopathy with reduced subcortical diffusion. *Brain Dev* 2012; 34(8): 632-639.
 - 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 Respi Viruses* 2013; 7(5): 759-760.
 - 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.
 - Hasegawa S, et al. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine*. 2014, 69; 206-210.
 - Hasegawa S, et al. Serum and cerebrospinal fluid levels of visinin-like protein-1 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev*. 2014,36: 608-12.
 - Okada S, Hasegawa S, et al. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013; 63: 194-200.
 - Hasegawa S, et al. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; 35: 626-9.
 - 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.
 - Morichi S, Yamanaka G, Ishida Y, Oana S, Kashiwagi Y, Kawashima H. Brain-derived neurotrophic factor and interleukin-6 levels in the serum and cerebrospinal fluid of children with viral infection-induced encephalopathy. *Neurochem Res* 39(11):2143-2149, 2014
 - Ishida Y, Kawashima H, Morichi S, Yamanaka G, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T. Brain magnetic resonance imaging in acute phase of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children. *Neuropediatrics* 46(1):20-5. 2015
 - Tsukahara H, Fujii Y, Matsubara K, Yamada M, Nagaoka Y, Saito Y, Yashiro M, Tsuge M, Goto S, Kitamura T, Hata A, Ichiyama T, Morishima T. Prognostic value of brain injury biomarkers in acute encephalitis/encephalopathy. *Pediatr Int* 55 (4): 461-464, 2013.
 - S Takeda, et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation for 2009 Influenza A(H1N1) Severe Respiratory Failure in Japan. *Journal of Anesthesia* 2012; 26: 650-657.
 - 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.
 - 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
 - Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai 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.

・ 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, Ainai 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.

・ 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.

・ 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.

G. 知的所有権の取得状況

抗 HMGB1 抗体によるインフルエンザ肺炎の
治療 岡山大学において特許出願中

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究

研究代表者 岡山大学大学院特命教授 森島恒雄

共同研究者 八代将登、野坂宜之

研究要旨

平成 24～26 年度の 3 年間で主に以下の 3 点について研究を実施し、結果を得た。

1. インフルエンザ脳症及び肺炎の発症機序の解明：宿主の急性期遺伝子発現について、中枢神経症状を伴う患児と肺炎罹患児において DNA マイクロアレイ解析を実施し、それぞれ急性期遺伝子発現のプロファイルが異なることを明らかにした。すなわち、前者では COX2 及び神経マーカー関連遺伝子が強く発現したのに比べ、後者では酸化ストレスマーカー及び IgE 関連遺伝子群の強発現を確認した。これは、治療法を考えるうえで重要な知見と考えられた。

2. 新規治療薬の開発：① 抗酸化の働きを持つチオレドキシシン (TRX) のマウスにおけるインフルエンザ肺炎治療効果を検討し、TRX が肺炎による致命率を大幅に改善することを明らかにした。すなわち、好中球の肺局所への浸潤や局所におけるサイトカイン/ケモカインの産生を抑制し、また種々の酸化ストレスマーカーの抑制が認められた一方、ウイルスの肺内増殖には影響を与えなかった。TRX は、現在ヒト化精製物も作られており、今後臨床応用が期待できる。② HMGB1 は細胞外では炎症のメディエーターとして知られ、サイトカイン/ケモカインの誘導の引き金となり、重症インフルエンザにおいて病態悪化に関連することが知られている。抗 HMGB1 抗体は、マウスのインフルエンザ肺炎の治療薬として有用であることを明らかにした。すなわち、好中球の肺浸潤を抑制し、サイトカイン/ケモカインの産生を抑え、同時に ROS を抑制した。現在、脳血管障害や肺損傷などインフルエンザ以外にも本剤の有用性が推定されており、臨床応用に向けた重要な成果と考えられた。

3. 重症インフルエンザの診療体制の整備とガイドラインの作成：「新型インフルエンザ」侵入時における治療法を含む迅速な診療体制整備にむけて、厚生労働省担当部局、関連学会（日本救急医学会、日本集中治療医学会、日本呼吸器学会、日本小児科学会、日本感染症学会など）、関連研究班（森島班、大石班、）による検討組織を立ち上げ、その中で重症インフルエンザ肺炎の診療ガイドラインを作成した。この組織の維持・発展は重篤なインフルエンザに対する治療法の確立・普及の上で、極めて重要と思われる。

以上、多くの点で重要な成果を上げることができた。

A. 研究目的

目的

1. 新型インフルエンザの侵入に備えて、肺炎・脳症・多臓器不全など重症例の海外動向・病理・ウイルス学的特徴・臨床像・

病態などを解析し、重症化に備えた「診療ガイドライン」を作成することを目的とした。これは「既存の治療薬」及びその認可された適応の範囲で進めた。同時に病態解析に基づく重症インフルエンザに対する新

規治療薬を開発する。具体的には、病態の悪化につながる「炎症」「高サイトカイン血症」「酸化ストレス」などを抑制する効果のある①抗HMGB1抗体、②チオレドキシニンについて重症化予防の検証を進め、臨床応用への道を開いた。

「診療ガイドライン」の作成・改訂・普及を円滑に進めるために厚労省関連学会・関連研究班による連携組織を維持発展させた。特に、今後さらにAH7N9、AH5N1、AH1pdm薬剤耐性株などの蔓延を想定して治療法の確立と普及を進めていく。

B. C. 研究方法および研究結果

1. インフルエンザ脳症及び肺炎の発症機序の解明：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、図1に示す如く、①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、②肺炎患者は有意に高いIgEを示すこと、③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、④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、2009pdmにおける小児の肺炎においてDNA マイクロアレイ解析によりSOD-2(ミトコンドリア膜のantioxidant)関連遺伝子発現の増強が認められ、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(図2)。

図 1.

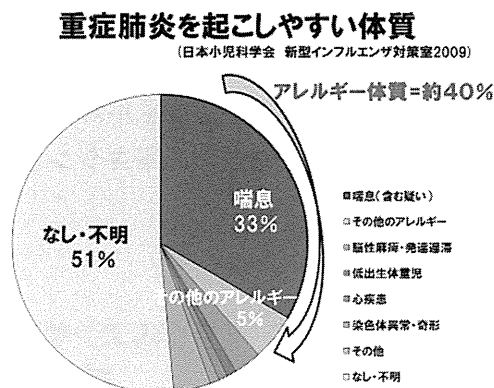
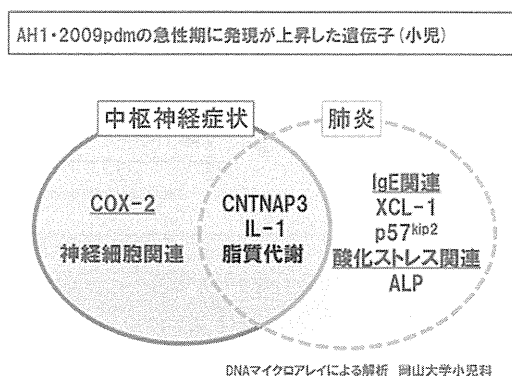


図 2.

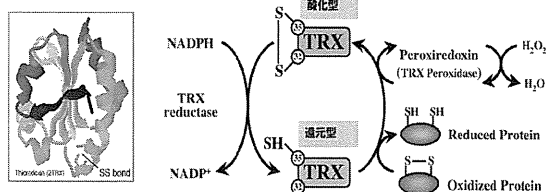


2. 新規治療薬の開発：

①チオレドキシニン (TRX) の概要については、図3に示すようにROSを除去することで細胞を酸化ストレスから保護する役割を持つ。

図 3.

■ チオレドキシニン (TRX)とは



生体作用

i) 抗酸化作用

活性酸素種 (ROS) を除去することで、酸化ストレスから細胞を保護する。

ii) 抗炎症作用

好中球の活性を制御することで炎症を抑制する。

この TRX についてインフルエンザ肺炎の治療効果について検討した。

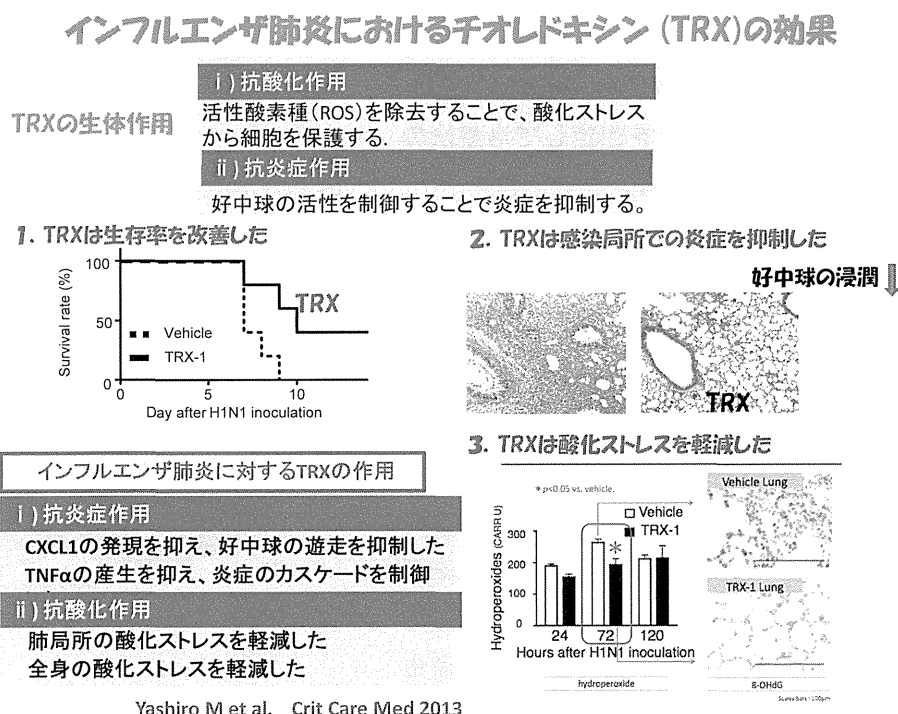
方法：

マウスにインフルエンザウイルス PR8 を経口感染させ、その後チオレドキシンを腹腔

内投与し、生存率・肺内ウイルス量・肺胞洗浄液中の好中球数、サイトカイン/ケモカイン濃度、肺組織中の酸化ストレスマーカーなどを継時的に測定した。

結果を図 4 に示す。

図 4.



TRX はインフルエンザ肺炎によるマウスの致死率を著明に改善させた。これはウイルスの肺での増殖抑制効果によるものではなく、抗炎症(好中球の局所浸潤を抑え、また炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を抑制)効果および抗酸化作用によるものであった。

②抗 HMGB1 抗体のインフルエンザ肺炎治療効果の検討

HMGB1 は図 5 に示す如く、細胞内では DNA に結合して DNA の安定化や遺伝子発現の調

整を行っているが、細胞外では外部刺激に対する炎症性メディエーターとして作用する。HMGB1 は現在様々な病態で悪化に関与することが示されている(脳血管障害、外傷性肺障害など)。また本研究班の研究成果では、インフルエンザ肺炎などで HMGB1 の高値が確認されており、サイトカインストームおよび局所におけるサイトカイン・ケモカインの抑制に抗 HMGB1 抗体が有用かどうかの検討は極めて重要である。