

201420034A

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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

高病原性鳥インフルエンザの 診断・治療に関する国際連携研究

(H25-新興-一般-011)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 島 典 子

平成27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

高病原性鳥インフルエンザの 診断・治療に関する国際連携研究

(H25-新興-一般-011)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 島 典 子

平成27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
総括・分担研究報告書

高病原性鳥インフルエンザの診断・治療に関する国際連携研究

研究代表者

所属施設：国立感染症研究所感染病理部 室長
氏 名：中島典子

研究分担者

所属施設：国立国際医療研究センター（苫小牧市立病院 副院長）
氏 名：河内正治

所属施設：東邦大学医療センター大森病院 呼吸器内科 教授
氏 名：本間 栄

所属施設：国立国際医療研究センター 医師
氏 名：高崎 仁

所属施設：国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 室長
氏 名：影山 努

所属施設：国立感染症研究所感染症疫学センター第一室 室長
氏 名：松井珠乃

所属施設：国立感染症研究所感染病理部 部長
氏 名：長谷川秀樹

所属施設：国立感染症研究所感染病理部 室長
氏 名：鈴木忠樹

目 次

I. 総括研究報告書

高病原性鳥インフルエンザの診断・治療に関する国際連携研究

中島典子・・・1

II. 分担研究報告書

1. ベトナムにおけるインフルエンザ A(H5N1)を含む重症 ARDS 臨床例の解析計画 (J-V FARDS) -Second Stage- インフルエンザウイルス感染と他のウイルス感染の比較検討
河内正治・・17

2. 次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子検出方法を用いた ARDS 症例の基礎疾患検索
本間 栄・・23

3. インフルエンザ等呼吸器感染症に起因する重症 ARDS の治療研究
高崎 仁・・29

4. RT-LAMP 法を利用した迅速・簡便なインフルエンザ診断法の利用とリアルタイム RT-PCR 法を用いたウイルス性呼吸器感染症の診断法について
影山 努・・33

5. 重症急性呼吸促迫症候群の症例情報解釈における年齢・性別情報の重要性
松井珠乃・・37

6. ハノイ国立小児病院 PICU における重症 ARDS 症例の病原体およびバイオマーカー探索のためのオンサイト解析系の確立
鈴木忠樹・・41

III. 班会議プログラム等資料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・49

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
総括研究報告書

高病原性鳥インフルエンザの診断・治療に関する国際連携研究
(H25-新興-一般-011)

研究代表者 中島 典子 国立感染症研究所感染病理部 室長

研究要旨：鳥インフルエンザウイルス（H5N1、H7N9）ヒト感染症ならびに、その死因である重症 ARDS の病態解明と治療の研究は、インフルエンザパンデミックのみならず、中東呼吸器症候群（MERS）など他のウイルス感染症においても緊急を要する重大な社会的要請である。国内では H5N1、H7N9 ヒト感染症の症例はなく、肺内要因の重症 ARDS の症例も少ないため、H5N1、H7N9 ヒト感染症の発生国との国際連携研究を推進・発展させる必要がある。今年度は、近年ヒト鳥インフルエンザ発生数が増加したカンボジアのパスツール研究所と国立カルメット病院を訪問し、連携研究の提案をした。2006 年度から連携研究を行っているベトナム、ハノイの国立小児病院には、今年度から網羅的な病原体検出系とサイトカインマルチプレックス定量解析系を導入し、院内で検体解析が実施可能な体制を構築し運用を開始した。昨年度から開始した肺内要因の重症 ARDS の臨床研究においては 51 例（内 28 例死亡）の臨床情報が集積した。重症 ARDS 症例の気管洗浄液中の病原体を 19 種類の呼吸器感染ウイルスを検出する xTAG® RVP FAST v2 RUO 呼吸器感染ウイルス検出キット（luminex 法）と 8 種類の呼吸器感染ウイルスゲノムを検出するマルチウイルス RT-PCR/PCR 法によりスクリーニングし、陽性のウイルスゲノムはそれぞれのリアルタイム RT-PCR/PCR 法により定量した。その結果、重症 ARDS の責任病原体のほとんどがウイルスであることが明らかになった。また核酸抽出なしでインフルエンザウイルスの型・亜型を決定する Direct 蛍光 RT-LAMP 法を用いた検査キットを導入し、臨床検体を用いて、迅速にこれらを診断できることを確認した。国内では、次世代シーケンス法による ARDS 患者気管洗浄液中の病原体検索を施行した。病原体と重症 ARDS の予後との関連を解析した結果、インフルエンザに併発する重症 ARDS のほうがインフルエンザウイルス感染が関与しない重症 ARDS と比較して、より重篤であることが示唆された。治療に関しては後ろ向き調査で大量γグロブリン療法の重症 ARDS に対する有効性が認められた。DIC を合併した肺内要因の重症 ARDS に対して rhTM 投与の効果を検証する国際共同臨床研究についてハノイ国立小病院と繰り返し討議し合意を得た。重症化のバイオマーカーの検索では、18 例の結果からは、PICU 入室時の血中 IFN-γ と IL-6 値が予後と相関する可能性が示された。インフルエンザによる重症 ARDS の特徴として、他の重症 ARDS 症例と比べ、男児、一歳以上の群にインフルエンザ症例が多く分布していた。病理学的解析により重症肺炎—ARDS を呈した麻疹後肺炎の死亡原因がア

デノウイルス7型であったことが明らかにされ、病理学的解析の重要性が認識された。

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) ヒト感染は、1997年に鳥からヒトへの感染例が香港で初めて報告された。その後2003年以降現在まで毎年一定数の症例が報告され、2015年1月までに16カ国694人の感染者および402人の死者が確認されている。ヒト鳥インフルエンザの発生国と発生数は予測不可能であり、我が国でいつ発生してもおかしくない。一方、H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス (H7N9) ヒト感染例は2013年に中国で初めて報告され、2015年2月までに、マレーシア、台湾、カナダでの輸入感染例を含めて489の感染例が報告されている。我が国では鳥インフルエンザウイルスのヒト感染事例はない。国内発生に備え、発生諸外国の医療機関とのつながりを構築し、患者の臨床情報を得て、より効率的な診断・治療・予防を連携して確立することが本研究班の目的であり、課題である。

高病原性鳥インフルエンザウイルス感染者の死亡率はおよそ60%と高く、死因の大部分が重症の急性呼吸促迫症候群 (ARDS) である (Kawachi et al, JID, 2009)。病理学的解析により肺病理像はびまん性肺胞傷害を呈し、H5N1がヒト肺胞上皮細胞へ感染し、これを直接傷害することがわかった (Liem et al, JJID, 2009, Nakajima et al, Modern Pathol, 2013)。すなわちH5N1感染によるARDSの発症要因はウイルス性肺炎によるものであることが解明された。H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス感染者のネクロプシー肺組織の病理像もびまん性肺胞

傷害であり、H7N9ウイルスが肺胞上皮細胞に感染していることが中国から報告されている。鳥インフルエンザウイルス (H5N1、H7N9) ヒト感染症の発生は限られているため、本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症の主たる病態である重症ARDSに着眼し、インフルエンザ症例に加えて肺内要因の重症ARDS症例を解析対象とした。重症ARDS患者の気管支洗浄液から核酸を抽出し、インフルエンザウイルスを含む呼吸器感染症の原因となるウイルスのゲノムの有無を全症例で検索した。病原体により臨床経過、検査データ、予後、死亡率に相違があるか検討し、インフルエンザに併発するARDSの特徴ならびに重症化の特異的要因を明らかにすることを試みた。

本研究班が目的とする研究課題を以下に示す。

1. 海外連携医療機関：ベトナム、ハノイの国立小児病院 (NHP) 以外の海外医療機関にも、引き続き連携研究の提案を行う。
2. 鳥インフルエンザ並びに重症ARDSの病態解明：NHPの重症ARDS患者の気管洗浄液中の病原体ゲノムを同定し、臨床経過、治療への反応、重症化に関連するバイオマーカーの検索、疫学的解析ならびに病理学的解析を行う。症例数を集積／解析して現在の研究を継続発展させる。
3. 新しい治療法の開発：NHPにおいて、本研究班が導入した大量γグロブリン療法の重症ARDSに対する治療効果について症例対照研究を行う。また、昨年度より討議してきたDICを合併した肺内要因の重症ARDSに

対してrhTM投与を開始する。同時に国内医療機関で治療法の検証をする。

4. 診断法の開発： Direct RT-LAMP法をベースとした、蛍光核酸検査法によるインフルエンザウイルスの型・亜型同定が可能なキットを医療現場に導入し臨床検体で有効性を検証する。

5. 海外ラボへの解析法の導入：当初は患者検体を日本で解析する予定であったが、今年度からは、現地で解析できる体制を整え始めた。現地に赴かずに検体解析を指示でき、結果を共有できることは、国際的パンデミック時に強力な情報源になる。

6. 臨床医師団の結成：病理専門医師らが、H5N1症例において剖検承諾が取れた際は、直ちに現地に入る。病理学的解析により、発症機序ならびに病態解明に有効な知見を得る。国際連携研究において病理学的解析を行うことは当該研究班の大きな特徴である。

7. 海外の感染症情報の収集：WHOと連携して研究班の疫学的な研究基盤を構築する。インフルエンザ等感染症の疫学、国際情報収集(軽症・中等症も)を行う。

B. 研究方法

各分担者の報告を参照。主任者が行った研究については成果の各項に記載。

(倫理面からの配慮について)

重症 ARDS 症例の臨床研究は、ベトナム、ハノイ国立小児病院の倫理審査委員会の承認を得ている (NHP-RICH-14-001)。病理学的解析については、国立感染症研究所倫理委員会の承認を得ている (受付番号 528)。

C. 研究結果

1) 海外医療機関との連携研究

(河内正治、高崎仁：国立国際医療研究センター、中島典子、影山努、鈴木忠樹、松井珠乃、有馬雄三：国立感染症研究所)

海外との連携研究には以下の step がある。

Step1：海外の病院へのアプローチ

Step2：連携研究の提案—各国での倫理委員会(各医療機関、保健省)の承認

Step3：患者情報・診断・治療・検体採取・検査・データ解析

Step4：得られた知見を論文にまとめ海外に発信し、国内発生時の基礎データとする。

1-1. ベトナムハノイ国立小児病院との連携研究

ハノイ国立小児病院(NHP)との連携研究は既に Step4 の段階であり、H5N1 の臨床(JID, 2009)、病理(JJID, 2008)、サイトカイン分析(JI, 2011、MI, 2011、MI, 2012)、5 例の H5N1 剖検例の分子病理学的解析(Modern Pathol, 2013)を報告してきた。今年度に大きく方針を変更したことは、患者検体から核酸の抽出・ウイルスゲノムの検索・バイオマーカーの検索などすべての実験操作を現地のラボで行うことにしたことである。理由としてはたとえ非感染物質であってもヒト由来検体を輸送することが困難になった場合、研究が遂行できなくなってしまう危険性があること、現地スタッフと共同で行うことでパンデミック時、我々が赴くことが不可能であっても口頭あるいは文書指示によりすべての実験操作が可能となることが挙げられる。



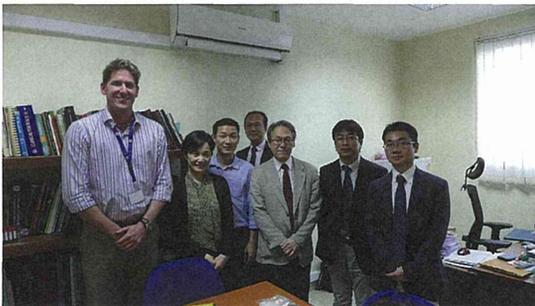
ハノイ国立小児病院 PICU (2014年11月)



新病棟建設中

1-2. カンボジア王国、プノンペン、パスツール研究所への連携研究の提案

鳥インフルエンザが増加しているカンボジア王国のパスツール研究所を訪問し、本研究班の研究内容を発表し、意見交換をした。パスツール研究所の病原体検索のシステムとその精度は非常にハイレベルであった。しかしながら影山分担研究者が提示したインフルエンザウイルスの型・亜型を同定する Direct RT-LAMP 法をベースとした、迅速キットについては非常に興味を示した。



プノンペン・パスツール研究所 左端: Dr. Horwood

病理組織の採取に関しては死後バイオプシーは可能かもしれないが、剖検（オートプシー）は宗教上不可能とのことであった。パスツール研究所はカンタボパ小児病院（Kantha Bopha Children Hospital）とつながりがあることが分かった。

1-3. カンボジア王国、プノンペン、国立カルメット病院

カルメット病院はカンボジアの最高位に位置する国立病院であり、カンボジア政府とフランス政府の資金により運営されている。1958年に設立され、250床の病床数で運営されている。ER・ICUの診療部長、呼吸器部長、ICU部長と連携研究の可能性について討議した後、施設視察を行い、病理・検査部門も訪問した。医療機器は全般に古い機種で、臨床検査法も非常に古典的な方法（末梢血の分画数は目視）で行われていた。リアルタイム PCR も古い機種が1台置かれていたが、主に HIV, HBV 検出に使用しているとのことだった。病理部門も主に癌の診断が主で、感染症の病理は全くおこなわれていない。鳥インフルエンザウイルスの診断はすべて隣接するパスツール研究所で行うことが取り決められており、インフルエンザの迅速診断キットなどは使用したことがなく、必要もないようだった。年間のICU患者数2,737人のうち、重症呼吸器障害患者数は268人で、平均年齢50歳、インフルエンザの患者はほとんどいないとのことだった。大量γグロブリン療法に興味を持たれたので、連携研究の研究計画書（プロトコル）を作成し送付した。診断治療の医療レベルは遅れており、提案する研究計画の内容に工夫が必要だと思われた。

Step2の段階である。



国立カルメット病院

2) 重症 ARDS 臨床例の解析

(河内正治、高崎仁：国立国際医療研究センター，中島典子、影山努、鈴木忠樹：国立感染症研究所)

ハノイ国立小児病院の PICU に入室した症例のうち、①Berlin Definition 2012 の診断基準を満たす ARDS 症例で、かつ②PICU 入室中に $P/Fratio \leq 100$ を呈し、③年齢が一ヶ月以上であるすべての症例を先行的に集め、同時に気管内挿管時に気管内分泌物（または気管洗浄液）と血清を採取した。臨床経過は発症日を病日 1 として PICU 入室から PICU 退室（あるいは入室 28 日まで）を記録した。

2013 年 11 月から 2014 年 10 月に NHP の PICU に入院した肺内要因による重症 ARDS の症例数は 51 例であり、28 人が死亡している（死亡率 55%）。そのうち 34 例で Luminex x TAG 法、リアルタイム RT-PCR/PCR 法による気管洗浄液中のウイルスゲノム検査が施行され、うち 4 例から A 型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm09 および B 型インフルエンザウイルスのゲノムが検出され、29 例から何らかの呼吸器感染にかかわるウイルスゲノムが検出された（V 群, n=33）（表 1）。24 症例では、複数

のウイルスゲノムが同時に検出されており、重複感染の可能性が考えられた。不明あるいは細菌感染が疑われたのは 1 症例のみであった（NV 群, n=1）。河内らは 2010-2012 年度の同様な臨床研究で得られたインフルエンザによる重症 ARDS 症例 17 例と合わせて、21 例のインフルエンザ症例について他のウイルス感染 ARDS と比較検討し、インフルエンザ群（I 群）とインフルエンザ以外のウイルス感染群（NI 群）で生存曲線を比較検討したところ、生存日数は NI 群で I 群の倍以上であった（31.4 vs. 15.0 日）ことを明らかにした（図 1）。

Virus	Number of examined cases
A型インフルエンザ	2
B型インフルエンザ	2
ライノウイルス A, B	1
アデノウイルス(ADV)	16
RSウイルス A, B	4
麻疹ウイルス	23
サイトメガロウイルス	13
パラインフルエンザウイルス(1,2,3)	2
MetaPV	0
Corona virus (229E,NL63,43)	0
Pan-EV	0
Others	BoCa virus: 2,HBV:1,EBV:1

表 1 気管洗浄液中のウイルスゲノム

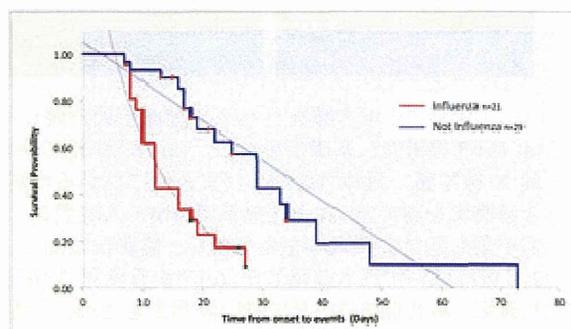


図 1 インフルエンザ群（n=21）とインフルエンザ以外のウイルス群（n=29）における生存曲線（Kaplan-Meier 法）

3) 重症 ARDS の症例検討

(河内正治、高崎仁：国立国際医療研究センター)

河内、高崎らが PICU の Phuc 医師から提供された重症ウイルス性肺炎の胸部 X 線写真 (図 2) は、いずれも進行が速く、入院時に既に肺野に両側・広範に浸潤影が拡大しており、一般的な細菌性肺炎とは異なる画像所見を呈していた。画像的には非定型肺炎像に類似するが、患者の主訴は高熱、呼吸困難、咳嗽、喘鳴であり粘稠痰を呈しており、気道の浮腫と痰づまりによる気道閉塞・無気肺が多発している。(c)と(d)は、2名の重症麻疹肺炎の入院時 X 線である。(c)は重症・生存例で、(d)は最重症・死亡例である。

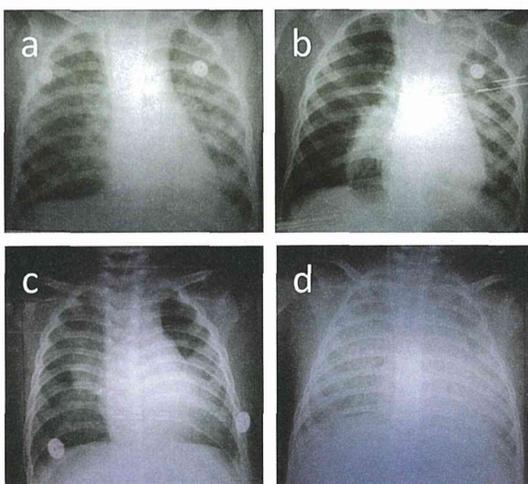


図2 重症ウイルス肺炎 (ハノイ国立小児病院)。(a) (b) 3歳男児、基礎疾患なし。(a) 入院時胸部単純 X 線写真。両肺門部からびまん性に広がる均質な浸潤影を認める。左上区無気肺。(b) 入院翌日。右中葉も新たに無気肺を生じたが、陰影は限局し、2日後にはいずれも改善した。(c) 7か月女児、麻疹。左舌区、右背側(S6)などに強い浸潤影を認め、大葉性肺炎像を呈する。(d) 9か月女児、麻疹。最重症(死亡例)であり、入院時に既に全肺野にびまん性に浸潤影が出現している。

4) 重症 ARDS の治療法

(河内正治、高崎仁：国立国際医療研究センター)

4-1. 大量γグロブリン法 (IVIg)

重症 ARDS に対する治療法としてわれわれが従来から試みている IVIG 療法についてはインフルエンザ群内で IVIG 投与症例 (8例) と IVIG 非投与症例 (13例) の生存率に有意差が見られた (図3)。さらに症例を集積させ、再評価する予定である。

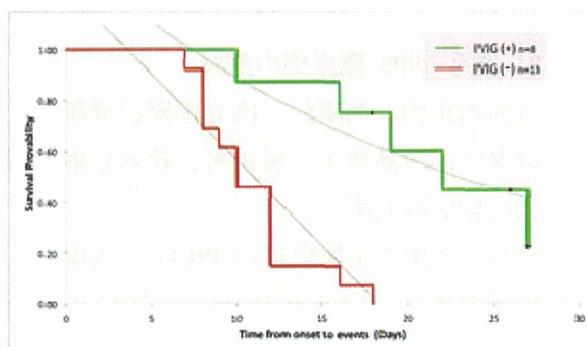


図3 I群内でIVIg(+)症例n=8とIVIg(-)症例n=13の生存率比較検討 (Kaplan-Meier 法)

4-2. 抗インフルエンザ薬とヒト型遺伝子組み換えトロンボモジュリン (rTM ; リコモジュリン®点滴静注用 12800) の併用療法に関する検討

インフルエンザに起因する重症 ARDS の治療研究として、本邦で播種性血管内凝固症候群 (DIC) 治療薬として開発されたヒト型遺伝子組み換えトロンボモジュリン (rTM; リコモジュリン®点滴静注用 12800) の抗炎症、免疫調整作用に着目し、NHP 側と、臨床試験を開始することに合意し、プロトコール作成に着手した。概要は高崎研究分担者の項を参照。

5) 次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子検出方法を用いた ARDS 症例の基礎疾患検索

(本間 栄、卜部尚久、杉野圭史：東邦大学医療センター)

本間らは ARDS の基礎疾患の大部分を占めるとされる感染症の病原体遺伝子の検出を次世代シーケンス法で試みた。東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科または、救命救急センターに入院し、ARDS と診断された症例の気管支肺胞洗浄液から核酸を抽出し、次世代シーケンサー (illumina 社 Miseq) を使用して、7 例の ARDS 症例の病原体検索を行った。その内の 1 症例にて、解析された細菌遺伝子 read のうち 97% で *Haemophilus influenza* を検出した。この症例は気管支肺胞洗浄液の培養にて、同種の細菌を検出しており臨床的にも同種が原因の肺炎 ARDS と診断された。それ以外の症例では、臨床的に起因菌と考えられる病原微生物の検出はできなかった。

6) 呼吸器感染ウイルス検出キットによる網羅的解析

(鈴木忠樹：国立感染症研究所)

NHP では、対外診断薬として認可されている xTAG RVP FAST v2 RUO キット(19 種類の呼吸器関連ウイルスゲノムを検出：インフルエンザウイルス A 型・B 型、H1pdm09、H3、H1、non-specific Flu A、RSV-A、Parainfluenza virus 1・2・3・4、Human Metapneumovirus、Human Bocavirus、Enterovirus/Rhinovirus、Coronavirus NL63・229E・OC43・HKU1、Adenovirus)をすでに使用しており、測定システム (luminex) が稼働していた。各症例 200 μ L の気管支洗浄液から MinElute Virus Spin キットを用いて RNA/DNA を抽出し、抽出核酸を xTAG RVP FAST v2 RUO キット説明書に従い処理

し Luminex 100 システムにて計測した。

7) マルチウイルス RT-PCR/PCR による 8 種類の呼吸器ウイルスゲノムの検出

(中島典子、影山努：国立感染症研究所)

xTAG® RVP FAST v2 RUO 呼吸器感染ウイルス検出キットでは検出できない、Measles、ADV-B、CMV、VZV、HRV-A、HHV6、RSV-B、EBV について LC-nano(小型 PCR 機)を用いた monoplex もしくは duplex リアルタイム RT-PCR 検出系を構築し、その臨床的有用性について検討を行った。コピー数の少ないゲノムについては monoplex リアルタイムで確認した。

8) RT-LAMP 法による迅速診断法の確立

(影山努：国立感染症研究所)

影山らが開発したインフルエンザウイルスの A 型、B 型、C 型、季節性インフルエンザウイルスの H1pdm09 亜型、H3 亜型、鳥インフルエンザウイルスの H5N1 亜型、H7N9 亜型を検出可能な、Direct 蛍光 RT-LAMP 法をベースとした検査キットを国立ハノイ小児病院に導入し、重症呼吸器疾患を呈した患者から採取した検体を用いて同キットの評価を行った。季節性インフルエンザについて、臨床検体を用いて、キットの検証を行った結果、xTAG® RVP FAST v2 RUO 呼吸器感染ウイルス検出キットでは検出できなかった検体にて、B 型インフルエンザウイルスを検出する事ができた。また、当時、流行の主流であった A/H1N1pdm09 も同様に検出可能であった。なお、H3 亜型、C 型および H7N9 亜型は今回検討した臨床検体からは検出されなかった。

9) 重症 ARDS のバイオマーカーの検索

(鈴木忠樹：国立感染症研究所)

2013年11月から2014年10月までに登録された51例のうち18例においてバイオマーカー探索のためのサイトカイン/ケモカインの定量を Human Cytokine Magnetic 10-Plex Panel (Invitrogen)と Luminex100 システムで行った。血清および気管洗浄液中の IL-1 β 、IL-10、TNF α 、IL-6、IL-4、IFN γ 、IL-8、IL-5 の定量を実施した。その結果、いくつかの症例において、血清および気管洗浄液中でこれらのサイトカインの著明な上昇を認めた。血清サイトカインについては、致死経過をたどった症例において、PICU 入院時に血清 IL-6 と血清 IFN γ が高値を示した。特に血清 IL-6 と血清 IFN γ の双方が高値を示す症例の予後が悪く、PICU 入院時に血清 IL-6>100 pg/mL、血清 IFN γ >10pg/mL となった症例の致死率は100%であった。

10) 重症 ARDS の症例情報解釈における年齢・性別情報の重要性

(松井珠乃、有馬雄三：国立感染症研究所)

2007年10月から2014年11月までNHPのPICUに重症ARDSで入室した重症ARDSの症例情報を、疫学的に解釈し、性差・年齢層に注目しまとめた。容易に収集できる年齢・性別は、起因病原体や曝露歴のインデクータでもあり、疫学的に解析・評価することが重要である。157例の重症ARDS症例のうち、24例はインフルエンザ(12例はH5N1)、42例はインフルエンザ以外のウイルス感染症、81例は細菌感染症もしくは病原体不明であった(その他10例は混合感染)(暫定)。71例(45%)が男児であった

が、それぞれの起因病原体の群の性の分布を比較すると、インフルエンザは男児に多い傾向であった。年齢は、インフルエンザでは中央値が2歳(範囲:4カ月~8歳)であり、その他の群と比較して年齢が高かった。また、インフルエンザのみの症例に絞ると、16例中11例が男児、中央値が5歳(範囲:1~8歳)であり、インフルエンザの性別と年齢分布の特徴がより顕著に見られた。致命率を見ると、男女ともにインフルエンザ症例は致命率が同様に高く、24例のインフルエンザ中21例が1歳以上であった。インフルエンザが占める重症ARDSは15%だが死亡例(n=82)の22%はインフルエンザであった。多変量ロジスティック回帰分析でも、年齢と性の調整後、インフルエンザはその他の重症ARDSと比較すると致命率が高いことがみられた。

なお、2013年末期から2014年上半期には、麻しんの大流行により重症ARDS症例の発生率が大きく上昇し、性別と年齢分布でも大きな変化が認められた。すなわち2013年12月から2014年6月まで、37例の重症ARDSが登録され、うち20例(54%)が男児で29例(78%)は1歳未満であった。

11) 重症致死的肺炎の分子病理学的解析

(中島典子、鈴木忠樹：国立感染症研究所)

病理解析の国際連携を行っていることは本研究班の特徴の1つである。ベトナムをはじめ、東南アジア諸国では、いわゆるフルオートプシーは施行されておらず、施行されてもネクロプシーあるいは死後針生検である。概して医師側に遺族に解剖許可をとり、死因を解明しなければならないという習慣はない。我々はNHPとの連携研究に

よってヒト H5N1 鳥インフルエンザの肺組織の病理学的解析を行い、多くの知見を得た。それ以降も NHP の感染症の病理標本に関しては、海外からのレファレンス検体として連携して病理学的解析を行ってきた。また NHP で今後鳥インフルエンザ例が発生した場合は、我々も現地に駆けつけ解剖を行うことになっている。

今年度は 2013 年から 2014 年にかけてベトナムで麻疹が大流行し、麻疹に併発した肺炎で亡くなった症例の肺組織を分子病理学的に解析した。麻疹に併発した肺炎で死亡した 19 例のうち、重症 ARDS 研究の登録症例は 2 例含まれていた。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 肺組織切片の HE 染色、エラスティカ・マッソン染色を行い、FFPE 切片中のウイルスゲノムを、マルチウイルス PCR 法で網羅的に検索し、陽性ウイルスについてはリアルタイム PCR 法で定量した(図 4)。また免疫組織化学でウイルス抗原を検出した。解析した症例は平均 9.5 カ月の男児 10 例、女児 9 例で、発症から PICU 入院までは平均 11 日、死亡までは平均 19 日であった。CD4 陽性 T 細胞数は 7 例で低下していた。組織病変は間質病変が主で、硝子膜の形成、間質の浮腫・水腫、肺腔内及び間質への細胞浸潤、線維化、出血、壊死像がみられた(図 5)。リアルタイム PCR 法を行った 11 例中 7 例でアデノウイルスゲノムが検出された。組織像では 12 例でアデノウイルスの封入体が見られ、免疫組織化学でアデノウイルス抗原が陽性であった(図 5)。塩基配列解析によりアデノウイルス 7 型であることがわかった(国立感染症研究所感染症情報センター 藤本先生)。細菌感染の併発は 3 例で見られた。麻疹ウ

イルス感染により細胞性免疫が低下し、アデノウイルス 7 型が重感染したことが麻疹ウイルス感染の死亡原因となったことが推測された。なお麻疹ウイルス性肺炎は 1 例のみであった。

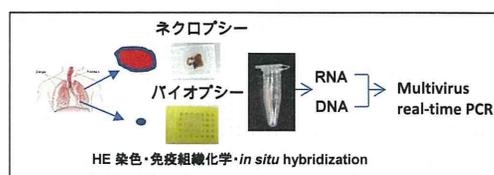


図 4. 病理検体からのウイルスゲノム検索方法

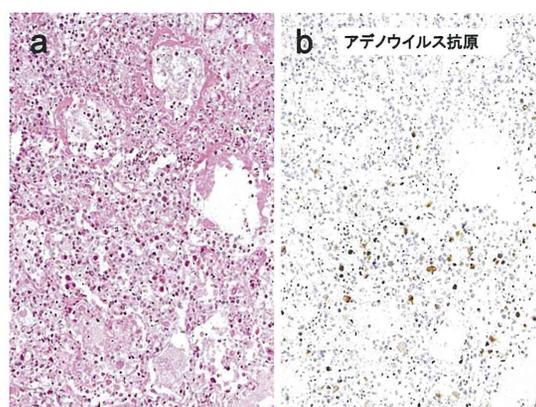


図 5. 麻疹後肺炎で死亡した児の肺組織像。a. HE 染色。硝子膜を伴うび慢性肺胞傷害(DAD)像に多数の封入体が見られる。b. アデノウイルス抗原の免疫組織化学。茶色：ウイルス抗原

D. 考察

H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスや H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスはヒトの肺胞上皮細胞に多く発現している α 2,3-Gal-シアル酸(鳥型レセプター)と親和性が高く、肺胞上皮細胞に感染してウイルス性肺炎をおこし、重症 ARDS を引き起こす。本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症の重症化要因の一つである重症 ARDS に着眼し、「高病原性鳥インフルエンザウイルス感染のない重症

ARDS 症例」と「高病原性鳥インフルエンザウイルス感染に伴う重症 ARDS 症例」との比較検討を行うために、解析対象を重症 ARDS 症例とし、臨床経過情報、病原体の検索、病態と相関するバイオマーカー探索を試みている。登録症例の気管洗浄液中の病原体検索の結果、ほぼすべての症例で何らかのウイルスゲノムが検出され、しかも半数以上が複数のウイルスゲノムが検出され、細菌感染症や真菌感染のみの例はなかった。今回の調査期間に麻疹の流行期が重なり、麻疹ウイルス感染症例が多かったことや麻疹ウイルス感染により細胞性免疫が低下し、ウイルスの重複感染の原因となっていたかもしれない。

なお 2010-2012 年度の重症 ARDS 症例において示唆されたことであるが、インフルエンザウイルス感染に伴う重症 ARDS が他のウイルス感染に伴う ARDS に比較して死亡率が高いことが示された。国内で本間分担研究者らが試みた次世代シーケンスによる ARDS の病原体の網羅的検索は、未知の病原体も検出できる可能性もあり、大変強力な方法と考えられた。今回、6 例で検出同定が困難であった理由の 1 つとして、すでに患者に抗生物質等の治療が開始されている場合や感染してから ARDS 併発までの病日が長い場合は、すでに病原体ゲノム量が少なくなっていたのかもしれない。また一般に 300 万 read 読むことが必要だといわれているため read 数が足りなかったのかもしれない。次世代シーケンサーの適応疾患や運用などにさらなる検討が必要であると思われる。

病原体スクリーニングに用いている、

xTAG® RVP FAST v2 RUO 呼吸器感染ウイルス検出キットでは検出できない、Measles、ADV-B、CMV が重症 ARDS 登録症例から検出されており、我々がアレンジしたリアルタイム RT-PCR 検出系と合わせて使用する必要があると考えられた。

Direct 蛍光 RT-LAMP 法を用いたインフルエンザウイルス(A・B・C 型、H1pdm09・H3・H5・H7 亜型)検査キットを実際の臨床検体で試行したところ A・B 型、H1pdm09 亜型が特異的に検出できた。本キットを病院等の臨床現場で用いる事ができれば、迅速な亜型同定が可能となり、季節性インフルエンザウイルスと H5N1、H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスを区別する事が可能となり、診断や治療だけでなく、感染拡大の防止などインフルエンザ対策への活用にも応用可能と考えられる。

今年度より病原体検索に加えて、病態と相関するバイオマーカーの検索を血清・気管支洗浄液中のサイトカインマルチプレックス定量解析により行った結果、PICU 入院時の血清 IL-6 および INF- γ 値が予後と相関していることを見出した。今後もこの系を用いてハノイ国立小児病院 PICU に入院した重症 ARDS 症例について前向き観察研究を継続していく予定である。また HMGB1 などのバイオマーカーの定量も併せて行う予定である。

重症 ARDS の治療法に関しては原因病原体のコントロールのみでは不十分であり、宿主の免疫応答の制御、血管内皮障害・肺胞上皮障害の克服、適切な全身管理（人工呼吸器、ECMO など）、が重要であり、高度な技術を要する集中治療体制のもと、最先端の薬物療法を駆使して治療にあたらなけ

れば重症例の救命は難しい。我々は、すでにベトナムでは認可されている抗炎症薬としての大量γグロブリン療法 (IVIG) と抗凝固作用のみならず、多彩な抗炎症作用を有する DIC 治療薬 rTM が肺内要因の ARDS 治療薬として期待できる薬物であると考えている。

IVIG 療法の効果に関して後ろ向きに調べたところ、IVIG を施行した症例は有意に死亡率が低かった。この研究の限界は、第一点は IVIG 投与が無作為割り付けできないことであり、第二点はインフルエンザ ARDS 症例の初期には、まだ NHP では IVIG の治療選択枝が考えられていなかったことである。従って、この結果を持って IVIG はインフルエンザ ARDS に対して有効であるとは言えないが、少なくとも有効である可能性はあり、来年度の症例集積を待って、再評価する予定である。

年齢・性別の切り口からみた鳥インフルエンザを含むインフルエンザによる重症 ARDS の特徴として、他の重症 ARDS 症例と比べ、男児、一歳以上の群にインフルエンザ症例が多く分布していることが示された。スペイン、カナダ、デンマーク、日本等から、季節性・パンデミックインフルエンザの罹患率や死亡率が男児での方が高いと報告されており免疫・生理的な理由が挙げられている。近年、性差と感染症の関係に関心が高まっており、年齢・性別を疫学的に解析・評価することによって、重症化要因の解析など、今後の研究につながる可能性が有る。

今年度は 19 例の致死性の麻疹後肺炎の病理学的解析を行ったが、麻疹肺炎は 1 例のみで 12 例はアデノウイルス肺炎 7 型であ

ったことが明らかになった。針生検で採取されたごく微量な組織切片であってもアデノウイルスを検出することは可能であった。PICU 入室時の検査でアデノウイルスが検出されても、重症肺炎の原因となる 7 型であるとは考えず、院内感染が広がった可能性もある。麻疹感染児は細胞性免疫の低下により重複感染となりやすい。麻疹後にアデノウイルス感染による肺炎となることすでに 1985 年に報告されている (SAMJ 68:858-863, 1985)。ワクチン接種国ではすでに麻疹は制圧されつつある疾患であるため現役の医師らの経験が足りない。今回のベトナムのパンデミックは前年にワクチン接種率が低下したためであると考えられている。ハノイ (北ベトナム) で死亡者が多く、ホーチミン (南ベトナム) で少なかったのはハノイでアデノウイルス 7 型が流行していたからかもしれない。

E. 結論

鳥インフルエンザウイルスヒト感染症の発生国や発生数を予測するのは困難であるが、現時点ではウイルスは感染した鳥からヒトへ感染するので、鳥の鳥インフルエンザの発生に注意することは重要である。H7N9 は H5N1 と異なり、H7N9 に感染した鳥を診断することは非常に難しく、鳥での発生を見極められない。既にベトナムと国境を接している中国広西壮族自治区でこのウイルスが検出されていることから、ベトナム国内への流行が懸念されている。両ウイルスとも人に感染すると重症 ARDS を併発する。病理学的解析により、ウイルス性肺炎が要因の ARDS であることがわかっている。肺内

要因による重症 ARDS の症例は国内では多くはないが、ハノイ国立小児病院 NHP-PICUにおいて重症 ARDS の症例は年間 20-30 例みられる。鳥インフルエンザウイルス感染症による重症 ARDS の重症化機構を解明するために、重症 ARDS 症例を解析対象とし、その病原体を検索したところ大部分がウイルス感染を生じていたことが分かった。インフルエンザに併発する ARDS のほうがインフルエンザが関与しない ARDS 症例と比較して重症であることがわかった。この理由を解明するためにも今年度から開始した重症化のバイオマーカーの検索は重要である。PICU 入室時の測定したバイオマーカーの検査値によって重症度が予想できればその後の利用法の選択の根拠となる。治療に関しては、インフルエンザに併発する ARDS に対しては大量ガンマグロブリン療法が有効な可能性が示され、引き続き症例数を集積して解析する予定である。またハノイ国立小児病院にて、DIC を合併したインフルエンザ等の小児の重症肺感染症・ARDS に対する rTM 併用療法の効果に関する治療研究を早期にスタートさせることになった。早期の診断・治療が重要であるが、そのためにも Direct 蛍光 RT-LAMP 法を用いたインフルエンザウイルス型・亜型を同定する検査キットの臨床現場への導入は意義がある。また市販の呼吸器感染ウイルス検出キットでは検出できないウイルスを Multiplex に検査できる高感度なリアルタイム RT-PCR 検出系の拡充が必要であり、将来はベッドサイドで検査が行えるように、Direct 蛍光 RT-LAMP 法の導入などの検討が必要であると考えられた。

インフルエンザは他の重症 ARDS 症例とは異なる性差・年齢層を示し、性差・年齢層が起因病原体ごとの疫学を端的に表現するインディケータであることが示された。今後も重症 ARDS 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。重症肺炎の死因は気管支洗浄液や血液などの病原体検索ではわからず、病理組織の解析によってはじめて解明されることが示された。今後できるだけネクロプシーを行い連携研究により重症 ARDS の死因を究明していく必要があることがわかった。

研究協力者および研究アドバイザー

研究分担者以外に、本研究においては以下に述べる施設／研究者に研究協力者およびアドバイザーとして参加していただいた。

【研究協力者】

青柳哲史（東北大学大学院 助教）

秋山徹（国立国際医療研究センター研究所 感染症制御研究部 室長）

有馬雄三（国立感染症研究所 感染症疫学センター 主任研究官）

長谷川明洋（山口大学大学院医学系研究科 准教授）

長谷川秀樹（国立感染症研究所 感染病理部 部長）

古屋博行（東海大学医学部 准教授）

安田英典（城西大学理学部 教授）

【研究アドバイザー】

小川道雄（市立貝塚病院 総長）

佐多徹太郎（富山県衛生研究所 所長）

布井博幸（宮崎大学医学部 教授）

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*. Sep 28. 2014 [Epub ahead of print]
- 2) Moritake H, Kamimura S, Nunoi H, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, Shinkoda Y, Shimomura M, Itonaga N, Hotta N, Hidaka Y, Ohara O, Yanagimachi M, Nakajima N, Okamura J, Kawano Y. Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group. *Int J Hematol*. 100(1):70-8, 2014
- 3) Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe*. 15(6):692-705, 2014
- 4) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol*. 88(10):5608-16, 2014
- 5) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The first identification and retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis*. 209(6):816-27, 2014
- 6) 中島典子 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの臨床、病理およびウイルス学的知見 化学療

- 法の領域 30:40-48, 2014
- 7) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 ウイルス性肺炎 病理と臨床 32 : 1146-1153, 2014
 - 8) 中島典子 (単) オリゴヌクレオチドプローブを用いた新しいin situ ハイブリダイゼーション法 呼吸 33: 152-159, 2014
 - 9) 高橋健太、鈴木忠樹、中島典子、飛梅実、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 (他) 脳炎脳症の病理 Neuroinfection 神経感染症 19:32-39, 2014
2. 学会発表
- 【国内会議】
- 1) 酒井宏治 網康至 田原舞乃 久保田耐 安楽正輝 中島典子 高下恵美 関塚剛史 駒瀬勝啓 信澤枝里 小田切孝人 前仲勝実 黒田誠 長谷川秀樹 河岡義裕 田代真人 竹田誠 II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は、HA 開裂部位に mono-basic なアミノ酸配列をもつ A 型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月
 - 2) 渡辺登喜子 Gongxun Zhong Colin Russell 中島典子 八田正人 Anthony Handson 高橋健太 渡辺真治 今井正樹 長谷川秀樹 河岡義裕 スペイン風邪ウイルスに類似の鳥インフルエンザウイルスのパンデミックポテンシャル 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月
 - 3) 朴ウンシル 佐藤由子 中島典子 古屋哲也 水谷哲也 今岡浩一 森川茂 日本国内ネコにおける新規モルビリウイルス (feline morbillivirus, FMV) の疫学調査 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月
 - 4) 福本瞳 高橋健太 佐藤由子 峰宗太郎 保科しほ 中島典子 佐伯秀久 長谷川秀樹 黒田誠 片野晴隆 網羅的ウイルス検出法 multivirus real-time PCR の改良と臨床検体への応用 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014 年 11 月
 - 5) 竹田誠 中島典子 河岡義裕 (他)TMPRSS2 は、インフルエンザの病原性発現に必須の宿主プロテアーゼである 第 88 回日本感染症学会学術講演会 (福岡) 2014
 - 6) 竹田誠、中島典子、水田克巳 宿主プロテアーゼ TMPRSS2 は、急性呼吸器感染症ウイルスの生体内活性化酵素である 第 55 回日本臨床ウイルス学会 (札幌) 2014
 - 7) 仲里巖、喜舎場由香、新垣和也、加藤誠也、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹 新生児心筋炎の 3 剖検例 第 103 回日本病理学会総会 (広島) 2014
 - 8) 秋田英貴、鄭子文、中島典子、星本和種、笹島ゆう子、瀧本雅文 風疹感染胎盤の一例 第 103 回日本病理学会総会 (広島) 2014
 - 9) 中島典子、渡辺登喜子、佐藤由子、高橋健太、鈴木忠樹、田代真人、河岡義裕、長谷川秀樹 ヒトから分離

された H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス感染動物モデルの病理学的解析 第 103 回日本病理学会総会(広島) 2014

- 10) 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋徹、鈴木忠樹、片野晴隆、中島典子、森川茂、西條政幸、倉田毅 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の病理解析 第 103 回日本病理学会総会(広島) 2014

【国際会議】

- 1) Kouji Sakai, Yasushi Ami, Maino Tahara, Noriko Nakajima, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro, Makoto Takeda The host protease TMPRSS2 play a major role for influenza virus replication in vivo. International Union of Microbiological Societies(IUMS 2014)-XIVth International congress of Bacteriology and Applied Microbiology, XIVth International Congress of Mycology, XVIth International Congress of Virology (カナダ) 2014
- 2) Osamu Kotani、Naeem Asif、Tadaki Suzuki、Naoko Iwata、Noriko Nakajima、Harutaka Katano、Takushi Hosomi、Hiroyuki Tsukagoshi、Hideki Hasegawa、Fumihiro Taguchi、Hiroyuki Shimizu、Noriyo Nagata Comparative analyses of the pathogenicity of two isolates of Saffold virus in neonatal mouse International Picornavirus meeting (Europic2014) (ベルギー) 2014
- 3) Noriko Nakajima, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Hoang Ngoc Thach, Nguyen

Trung Thuy , Tran Minh Dien, Nguyen Thanh Liem, Shoji Kawachi, Kazuo Suzuki Pathological study of Severe ARDS cases in NHP-Hanoi International symposium and Teikyo-Harvard program (東京) 2014

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

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
分担研究報告書

ベトナムにおけるインフルエンザ A(H5N1)を含む重症 ARDS 臨床例の解析計画
(J-V FARDS) -Second Stage-
インフルエンザウイルス感染と他のウイルス感染の比較検討

研究分担者 河内正治 苫小牧市立病院、副院長
国立国際医療研究センター、麻酔科非常勤医師
国立感染症研究所 客員研究員

研究協力者 中島典子 国立感染症研究所 感染病理部室長
鈴木忠樹 国立感染症研究所 感染病理部室長
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
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室長
高崎 仁 国立国際医療センター 国際感染症センター医師

Thuy Trung Phung, Tran Minh Dien, Phan Huu Phuc, Le Thanh Hai: ハノイ国立小児病院

研究要旨：インフルエンザ（H5N1）による ARDS は、死亡率が 70%近くと非常に高く重症 ARDS を生じることが特徴である（*Kawachi et al, JID 2009*）。肺の最終病理像は肺胞の広範囲な障害（Diffuse Alveolar Damage ; DAD）であり、通常の重症 ARDS とほぼおなじ病理像を呈する（*Liem et al, JJID 2008*）が、一般的な ARDS と異なり、多くの症例で肺胞上皮細胞にウイルスが感染して直接 DAD を引き起こされることによる呼吸死である（*Nakajima et al, Modern Pathol 2012*）。今回は、それまでの先行的研究を引き継ぐ形で、原因病原体解明に焦点を当てて 2013 年 11 月より新たに開始した JV-FARDS 2nd stage、ハノイ国立小児病院 PICU における重症 ARDS の先行的研究について、その内容を報告するとともに臨床的検討を報告する。また、1st stage で得られた Influenza-ARDS 症例 17 例と新たにインフルエンザ感染が確定した 4 症例をあわせて、検討した結果についても報告する。

A. 研究目的

HPAI-A(H5N1)を含むウイルス感染が引き起こす重症化因子としての重症ARDSの

病態解明と診断／治療の研究は、インフルエンザパンデミックのみならず、他のウイルス感染症においても流行期があるため緊