

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 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森島恒雄

平成 25 年 5 月

目 次

平成 2 4 年度 総括研究報告

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・研究に関する研究

森島 恒雄

平成 2 4 年度 分担研究報告

1 「パンデミック」インフルエンザなどの疫学・臨床像の早期解明（国際情報など）

高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1) およびブタインフルエンザ A(H3N2)の発生状況

岡部 信彦

2 感染症発生動向調査に基づいた 2012/2013 年シーズンのインフルエンザの発生動向と同
時期の入院サーベイランスおよびインフルエンザ脳症報告の解析結果について

多屋 馨子

3 重症例の治療効果および予後に関する検討

池松 秀之

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

5 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

6 インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析

蒔田 泰誠

7 サイトカインによる肺微小血管内皮細胞機能障害とその抑制

森島 恒雄

8 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

- 9 喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ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
- 10 Immunoblot による抗神経抗体検出の試み
奥村 彰久
- 11 小児期中枢神経感染症、特に急性脳症における脳由来神経栄養因子 (BDNF) の検討
河島 尚志
- 12 インフルエンザ脳症の患者血清を用いた代謝物プロファイリング
伊藤 嘉規
- 13 抗酸化ストレスの治療への応用
松川 昭博
- 14 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
- 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
- 16 Diagnosis Procedure Combination からみた日本の体外循環補助の実態
中川 聡
- 17 小児の中枢神経感染症の疫学
宮入 烈

研究成果の刊行に関する一覧

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：

インフルエンザの重症化はしばしば認められるにもかかわらずその発症機序は不明な点が多い。本研究はインフルエンザ脳症・重症肺炎（ARDS）・多臓器不全などについて小児・成人における病態解析を通じて治療法の確立を目指すものである。また、小児・成人それぞれに高病原性のパンデミックが生じた際の診療体制の構築も視野に入れて行く。今年度は上記の病態解析について検討が進んだ。また、基礎研究も含め新たな治療薬の開発につながる研究成果が得られた。一方ARDSなど重症インフルエンザ肺炎の諸外国における治療・診療体制を調査しわが国における体外循環を中心とした診療体制には改善すべき点が多いことがわかった。今後、病態解析をさらに進めながら治療法のオプション設定および全国の重症例の診療体制の構築に向けた検討が重要と思われた。

A. 研究目的

目的：

先年のパンデミックでは、脳症に加えて小児の重症肺炎が大きな問題となった。今後はH5N1など高病原性インフルエンザのpdmに備え、小児および成人の肺炎・脳症・多臓器不全など重症例の1.疫学2.臨床像、3.病態などを迅速に解明し、予防法・治療法、重症例の診療体制整備などに直結する基礎的・臨床的研究を包括的に実施する。

期待される成果：

- 1.肺炎・脳症の病態の解明と治療法の確立によりインフルエンザの重篤化を防ぐ。
- 2.重症化に繋がる宿主側因子を解明し、ハイリスクヒトを発症前に診断し重症化を防ぐ。
- 3.病態解析と治療法確立に基づき、ガイドラインを作成し重症例（肺炎・脳症など）の診療体制整備を行う。

4.これらは危惧される H5N1 高病原性鳥インフルエンザヒト感染の致命率低下などの予後の改善につながり、国民の不安の解消に寄与する。

B. 研究方法

本研究班の特徴として重症インフルエンザ（脳症・重症肺炎・多臓器不全）について世界的な動向を含めた疫学調査、病態解明、宿主側因子の解明、治療法の確立、以上に基づく診療体制の構築などの課題について、疫学・ウイルス学・免疫学・病理の基礎研究者及び救命救急の分野を含む内科医・小児科医が多面的な研究を行うものである。その研究方法については下の図の概要を参照にしていきたい。

(1)世界における新たなパンデミックウイルスの動向について迅速に情報収集した。：
現在、米国で報告されている豚由来 H3N2 ウイルスの拡大について情報を集めた。

アジア・アフリカで感染が続く H5N1 ウイ

ルスについて特にヒトへの感染現状について調べた。

(2)まず、2009pdm や季節インフルエンザによる重症例(肺炎・脳症・多臓器不全)について、臨床像の調査に加えて、

サイトカイン・ケモカイン・酸化ストレスマーカーなどの動態と重症度について検討した。また、肺障害のメカニズムを調べた。

重症例と軽症例における SNP 解析を実施し、脳症および重症肺炎に関与する宿主側因子を検討した。

(3)重症例の治療効果および予後に関する検討：

2009pdm ウイルスによる脳症・重症肺炎・多臓器不全の ICU・PICU 入院例について病

態・臨床的特徴・実施された治療(ECMO を含む)・予後について全国調査を実施した。

(4)動物を用いた感染実験：

マウス・フェレットなどを用いて各ウイルスの病原性および病理学的検討を行った。

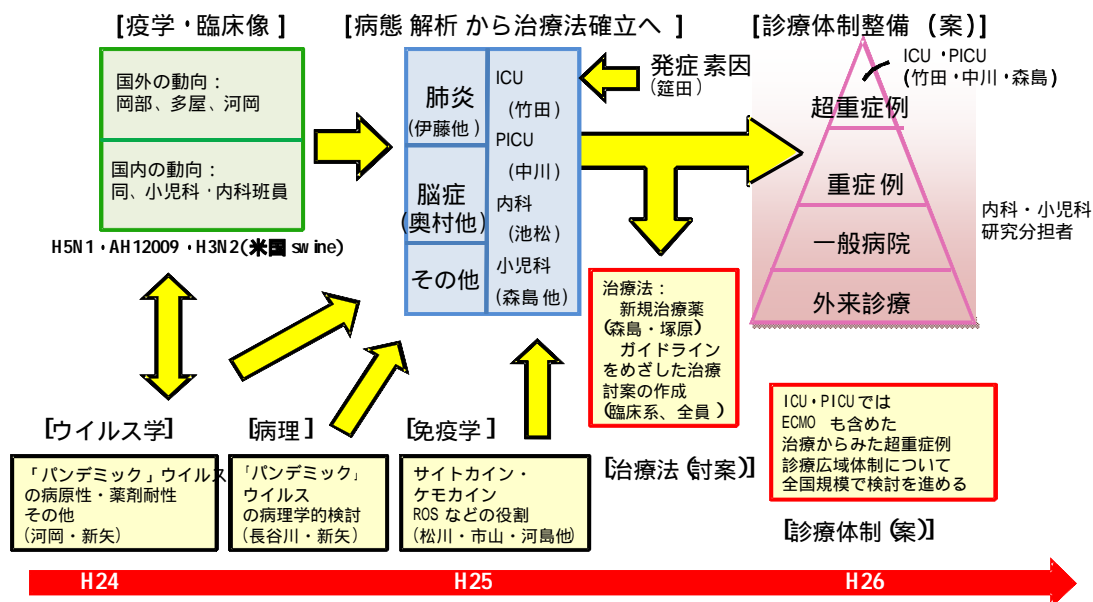
上記の感染動物とくに脳症モデルマウスについてにおける急性期遺伝子発現の検討をマイクロアレイ法を用いて実施した。

(5)インフルエンザ重症例の診療体制の研究：

スウェーデン・カロリンスカ病院 ICU の体制と比較した。また、ECMO 治療のわが国での現状を調べた。

(6)その他

図1 本研究の概要



C. 研究結果

1 疫学・臨床像

(1)2013年シーズンのインフルエンザの現況では、2013年第5週までの累積の推計受診患者数は726万人であり、昨シーズンと比較して成人の発症が多く、70歳以上は約44万人であり、昨シーズン同時期の累積推計値約27万人を大きく上回った(以上全て暫定値)。発症者から検出されているインフルエンザウイルスは、これまでのところ昨シーズンと同様にAH3亜型が89.6%と大半を占めた。インフルエンザ脳症の報告数は2013年第5週までに33例が報告されており、9歳以下が19例(57.6%)と全体の過半数を占めている。一方、成人では60~79歳の年齢群が6例(18.2%)であった(多屋)。

(2)インフルエンザの世界的動向；

2009年に発生した新型インフルエンザウイルス(pandemic influenza virus)は1998年頃から北米のブタの間で流行し、散発的にヒト感染例も報告されていたtriple reassortantのブタ由来変異型インフルエンザウイルス(variant influenza virus)を起源としたものであった。米国ではブタ由来変異型インフルエンザウイルスについてもサーベイランスを強化しており、2012年にはブタインフルエンザA(H3N2)vのヒトへの感染例が複数の週で多数報告され、ヒト-ヒト感染の可能性も懸念されている。

これまでのところA(H5N1)、A(H3N2)vともにヒトへの感染は患畜との濃厚接触による感染が主体であり、ヒトの間で効率的に感染伝播があったという確定的な調査結果は得られていない。今後もpandemic influenza virus発生の監視として、

A(H5N1)をはじめとする鳥インフルエンザウイルスや、ブタ由来変異型インフルエンザウイルスの発生状況や疫学的特徴は注視していく必要がある(岡部)。

(3)成人のインフルエンザ

日本臨床内科医会インフルエンザ研究班による肺炎例の情報を集めた。2011-12年流行期に登録されたインフルエンザ患者はA型が340例、B型が126例で、肺炎あるいは入院の報告は4例で全例H3N2型であった。肺炎は2例で全体における割合は0.4%であった。入院の報告は2例であった。70才以上における肺炎あるいは入院の割合は15%(3/20)と高率で、高齢者において発生頻度が高いことが確認された。福岡県におけるインフルエンザ入院サーベイランスの結果では、ICU入室や人工呼吸器の利用が70才以上と1~9才に集中していた。高齢者においてインフルエンザの発症頻度が低いのに肺炎や重症例が多かった。今回の調査結果では必ずしも糖尿病などの基礎疾患が重要な因子とはなっていなかった(池松)。

本年度の研究成果の概要と来年度に向けた取り組み

表1 インフルエンザの疫学及び臨床像

1. 2012/2013シーズンのインフルエンザ及びインフルエンザ脳症の特徴を明らかにした。
2. 世界におけるインフルエンザの動向、特に2009pdm、ブタインフルエンザA(H3N2)v及び高病原性鳥インフルエンザH5N1の動向を調べた。
3. タミフル耐性に関するウイルス側の因子を明らかにした。
4. 2011/2012シーズンの成人のインフルエ

ンザについて検討し、入院例は全例 AH3N2 であり、ICU 入室や人工呼吸器の利用は 70 歳以上と 1~9 歳に集中していたことを明らかにした。

2 病態解析

(4) インフルエンザウイルス A/H1N1 2009 pdm 感染では、ARDS や鑄型気管支炎を合併した症例報告の増加が特徴的であった。ARDS など肺血管透過性の亢進に対する効果的な薬物療法は確立されておらず、今回我々はサイトカインや種々の薬物が肺血管透過性に及ぼす影響について *in vitro* で検討した。結果: インフルエンザ感染時に産生されるサイトカインによって肺血管透過性は亢進した。ステロイドやエダラボン、NOS 阻害剤の前投与によって透過性の亢進は抑制された。免疫蛍光抗体法でステロイドやエダラボンによる細胞間接着の構成分子の強化作用が示唆された。結論: 脳症や ARDS などの重症インフルエンザ感染症では、血管透過性の亢進が病態に関与している。ステロイドやエダラボン投与により、血管透過性そのものを改善できる可能性が示唆された。高病原性トリインフルエンザなどの病態解析や治療開発にも応用可能と考えられた(森島)。

(5) 2000 年から 2012 年まで国立感染症研究所・感染病理部に病理学的検索を依頼されたインフルエンザ死亡例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を解析した。リアルタイム RT-PCR を用いた新しい解析法によりインフルエンザウイルスのゲノムは呼吸器官に限定して検出され、インフルエンザ脳症の剖検脳組織切片からは検出されないことが再確認された。季節性インフ

ルエンザで併発する肺炎の肺組織において、肺胞上皮細胞にウイルス抗原は検出されなかった。パンデミックインフルエンザの一部の剖検組織では病理組織学的にび慢性肺胞障害を呈し、肺胞上皮細胞にウイルス抗原が検出された。ウイルス側の重症化因子として肺胞上皮細胞に感染するクローンの場合にはウイルス性肺炎を併発し重症化すると考えられた。インフルエンザ脳症の発症機構の 1 つにサイトカインストームが関与していることが推測されているが、血液および髄液中の IL-6 値が非常に高かった脳症例では、パラフィン包埋肺組織と脳組織における IL-6 mRNA 量を比較すると脳組織で発現がより高いことがわかった(長谷川秀)。

(6) 脳由来神経栄養因子である BDNF は精神科領域、特にうつ病患者の反応性低下や治療薬に対する薬剤性反応との関連が報告されるなど、神経系細胞の存続および維持と密接に関係し高次脳機能と関連するとされる。特に小児科領域では、乳幼児期脳障害の neurotrophin としての作用が検討されている。今回、インフルエンザ脳症を含む小児中枢神経感染症での検討を行った。細菌性髄膜炎では早期に血清及び髄液 BDNF が上昇した。コントロール群での血清 BDNF は低年齢で高く、また髄液中ではほぼ感度以下であった。中枢神経感染症罹患時に、BDNF 値をモニタリングすることは診断あるいは疾患の鑑別の一助となる可能性があるが、その予後改善との関連は見いだせなかった。これらの結果より、BDNF は低濃度ではアポトーシスを誘導し、高濃度では神経可塑性に働くことと関連すると推測された(河島)。

(7) 急性脳炎・脳症における自己抗体(抗神

経抗体)の関与が注目されている。今回 premade membrane を使う immunoblot を用いる簡便な方法で、抗神経抗体の検出を試みた。ヒト対照脳を用いた免疫組織化学染色にて抗神経抗体の存在が推定されている4例について、Immunoblot を施行した。その結果、3例について過剰バンドを認め抗神経抗体の存在が示唆された。Immunoblot は感度には限界があるが、簡便で陽性反応的中率が高い可能性があり抗神経抗体の検出方法の一つとして使用できると考えた(奥村)。

(8)2009年世界的に流行した新型インフルエンザ(2009 pandemic H1N1, A(H1N1) pdm09)は季節性インフルエンザに比し呼吸器合併症が多く、喘息症例での重症化が多くみられた。その病態解明のため、新型インフルエンザ感染喘息マウスの気管支肺胞洗浄液(BAL)を解析した。感染群では非感染群に比しBAL中IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ の濃度が有意に高値だった。喘息感染群ではIL-6、IL-10、TNF- α 濃度が非喘息感染群に比し有意に高値だったが、IFN- γ 濃度は有意に低値だった。BAL中ウィルス力価は喘息感染群が非喘息感染群に比し有意に高値だった。新型インフルエンザ感染は喘息モデルマウスにおいてより高いサイトカイン産生およびウィルス増殖を示し、強い炎症を惹起して呼吸器症状を重篤化させる可能性が示唆された(長谷川俊)。

(9)インフルエンザ脳症を含む小児の中枢神経系感染症の病原体診断を核酸増幅法を用いて検証した。各病原体ごとに患者背景・症状・身体所見・検査所見・重症度の重症化にかかわる因子を解析し、病態にかかわる主要因子を抽出その相関関係を図式

化した。当研究期間中は62例で病原体が証明され、小児の非化膿性中枢神経系感染症の大多数はヒトパレコウイルス、エンテロウイルスでありインフルエンザは数例に留まった。多因子解析によりヒトパレコウイルス感染症においてウイルス量と病態との相関が認められた(宮入)。

(10)インフルエンザ脳症の新規バイオマーカーを探索する目的で、インフルエンザ脳症22例と神経合併症のないインフルエンザ22名の急性期・回復期の血清検体中の代謝物プロファイリングをメタボローム解析により行った。CE-TOFMS装置による測定結果から、174ピークに候補物質が付与され、49の物質で定量が可能であった。脳症群(急性期)では、コントロール群(急性期)と比較して4種類の代謝物質の平均値に有意な上昇がみられ、他方、3種類で有意な低下が認められ、これらの代謝物が早期診断の新規バイオマーカー候補と考えられた(伊藤)。

(11)インフルエンザ脳症(IAE)のメカニズムはまだ不明な点が多い。本研究では、IAV感染とリポ多糖(LPS)の重投与で、マウスのIAE様モデルを作成した。本マウスモデルでは、対照群に比べて約3倍の脳浮腫と血清中サイトカイン濃度が観察された。遺伝子発現プロファイリングでは、一部の主要なサイトカイン関連遺伝子は脳内で発現上昇しておらず、血液脳関門(BBB)の破壊に関与するとされている蛋白質分解酵素の関連遺伝子の発現上昇が顕著だったことが判明した。遺伝子オントロジー(GO)でイオンチャネル、カルシウム、および膜輸送活動関連に分類される機能群が多く抽出された。したがって、本研究におけるIAEモデルのBBB破壊は、サイトカインストーム

に加えて、神経組織の細胞内電解質の不均衡によって影響を受けている可能性がある」と考察した(新矢)。

(12)インフルエンザ脳症の発症に関連する遺伝子を、全ゲノム領域を対象とした一塩基多型 (SNP) 解析にて同定し、インフルエンザ脳症の発症リスクを事前に予測するツールを開発することを目的としている。本年度は、候補遺伝子解析として、インフルエンザ脳症や熱中症の発症リスクと関連することが報告されている carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) 上の SNP について関連解析を実施したが、有意な結果は得られていない(荇田)。

(13)ウイルス性肺炎の病態悪化に、酸化ストレスが関与することが示唆されている。マウス H1N1 インフルエンザ感染モデルを用いて、抗酸化物質チオレドキシン (TRX) による H1N1 インフルエンザ肺炎の治療効果を検討した。H1N1 によるマウス生存率は、TRX 投与によりマウス生存率は改善した。この時、肺でのウイルス量に変化はみられなかったが、肺での好中球浸潤は有意に減少し、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中や肺抽出液中の炎症性サイトカイン TNF やケモカイン CXCL1 産生量は低下した。肺で発現する酸化ストレスマーカー (hydroperoxide) は減少し、末梢血中の hydroperoxide も低下した。気管支上皮細胞株 MLE-12 に H1N1 を感染させた時に産生される TNF や CXCL1 は TRX-1 で濃度依存性に減少した。TRX-1 は、抗炎症作用と抗酸化作用によりインフルエンザ肺炎は軽減したものと考えられる(松川)。

(14)近年、インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性変異として、NA 蛋白質の

117 番目のアミノ酸のイソロイシンからバリンへの変異が明らかになった。そこで、このアミノ酸変異を H5N1 ウイルスに導入し、in vitro、in vivo、in silico で解析した。その結果、117 番目のアミノ酸変異はウイルスとオセルタミビルとの結合親和力を弱め、生体内でのオセルタミビル感受性を低下させていることが明らかとなった(河岡)。

表 2 重症インフルエンザの病態解析・治療法開発に向けた研究の進展

-
1. 重症インフルエンザ肺炎を想定した肺の血管内皮細胞の障害機序と治療薬の開発
 2. 重症インフルエンザ肺炎におけるチオレドキシンの治療効果及びそのメカニズム
 3. インフルエンザ剖検例の肺組織からのウイルスゲノムの検出と IL 6 mRNA の検出
 4. 急性脳炎・脳症における自己抗体の immunoblot 法による検出
 5. 喘息モデルマウスのインフルエンザ感染に伴う局所サイトカインプロファイルの解析
 6. インフルエンザ脳症における新規バイオマーカー(メタボローム解析による)の探索
 7. インフルエンザ脳症における Gwas を用いた宿主遺伝子の解析
 8. その他

3 診療体制整備

(15)インフルエンザによる重症呼吸不全症例は適切な管理ができる病院での治療が必要で、重症例には体外式膜型人工肺 (ECMO) による治療が必要である。しかし本邦では ECMO 治療の成績は海外と比べ半分以下の生存率であった。原因は世界標準の機材が整備されていない、医療従事者の ECMO 治療に

対する経験が少ない、などが挙げられた。また海外の優秀な施設への訪問・調査から、本邦の現状との違いが浮き彫りにされた。これらの結果から、本邦の現状では次のパンデミック時に H5N1 のような重症型インフルエンザが発症した場合、ECMO による治療はその効果を発揮できないであろうと推察される。そのためには適切な機材を使用し、適切な管理を提供できる専門スタッフの養成と体制作りが不可欠である(竹田)。

(16)Diagnosis Procedure Combination データベースを用い、2009 年 7 月～12 月の 6 ヶ月間に日本全国で体外循環補助の治療を受けた患者を抽出した。これらの患者で年齢、性別、DPC の主要診断群、体外循環の施行日数、転帰を調べた。その結果、1,042 症例の体外循環補助症例が抽出できた。性別は男性が 70% で年齢では 70 歳代が最も多く、60 歳代がそれに続いた。主要疾患群別では循環器疾患が最も多く、全体の 77% を占めた。呼吸器疾患は全体の 5% であった。体外循環補助を受けた患者の死亡率は 67% であった。呼吸補助としての体外循環補助症例は我が国では少ないことが分かった(中川)。

表 3 重症インフルエンザの診療体制整備に向けた研究の進展

1. 2009 pdm による小児重症例の解析を進めた
2. 海外における(スウェーデン)2009pdm における ARDS など重症肺障害の診療体制を調べ、我が国において体外式膜型人工肺(ECMO)などの診療体制の整備が遅れていることを示した
3. Diagnosis Procedure Combination データ

ベースを用いて 1,042 症例の体外循環補助症例が抽出・解析し、主要疾患群別では循環器疾患が最も多く、一方、呼吸補助としての体外循環補助症例は、我が国では少なくまた 7～10 日とされる ECMO 使用期間に耐えうる機種もわずかであることが判明した。

D. 考察

世界的なインフルエンザの動向については、H5N1 高病原性鳥インフルエンザの広がり米国におけるブタインフルエンザ A・H3N2v が注目されている。わが国においては 2009pdm は沈静化し、A・H3N2 香港型の流行が主体であり、高齢者や乳幼児で重篤化が目立った。病態解析から従来の高サイトカイン・ケモカイン血症による多臓器不全に加え、血管内皮細胞の障害による透過性の亢進が病態に関与することが明らかになりつつあり、治療の標的になりうると考えられた。剖検例の病理像の解析も進んだ。

その他、BDNF の役割や抗神経自己抗体検出及び 2009pdm で多発したインフルエンザ肺炎のマウスモデルの研究や重症インフルエンザのメタボローム解析など興味深い研究が進んだ。

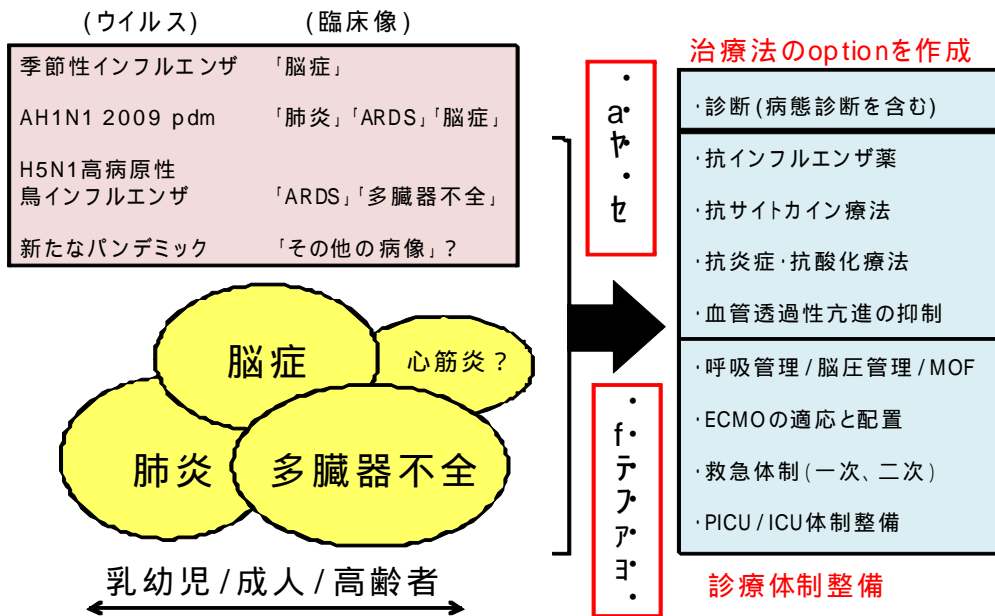
一方、重症インフルエンザの診療体制整備も研究班の目的であり、これについてはわが国と北欧(スウェーデン)との重症肺炎の診療体制の比較から、ECMOなどを配備とそれを支えるマンパワーに大きな差がみられ、病原性の高いインフルエンザのわが国への侵入において大きな問題となることが示された。今後研究班においては関連諸学会と連携して検討を進めていきたい。また、成人のインフルエンザ脳症の報告例は近年

増加しており、成人インフルエンザ脳症ガイドラインの作成が急務と思われる。次年度においては小児・成人の ARDS など重症肺障害の診療ガイドラインや多臓器不全の治療法の確立に向け検討を開始する予定である。

表 4 重症インフルエンザ治療法の確立及び診療体制整備に向けた今後の取り組み

-
1. 関連学会との連携、特に日本救急医学会との連携を強化し現在のわが国における重症インフルエンザ診療体制の問題点を明らかにし対策を立てる
 2. 研究班の臨床分野の研究者がそれぞれ
 - 小児における急性脳症の治療法
 - 成人における急性脳症の治療法
 - 小児における重症肺炎 (ARDS 含) の治療法
 - 成人における重症肺炎 (ARDS 含) の治療法
 - 小児における多臓器不全の治療法
 - 成人における多臓器不全の治療法
- などについて担当する分野について 2009 pd mにおける海外の知見、H5N1 高病原性鳥インフルエンザヒト感染例における海外の知見などに基づき、治療法のオプションを策定する
-

図2 研究計画の概要



E. 結論

本研究班の研究成果を以上のようにまとめた。多くの分野の研究者の参加する組織のため、短くまとめることは非常に難しく各先生方の発表を参考にさせていただきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 2012 Nov 23. [Epub ahead of print]

2. Aina 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.

Feb;84(2):336-44.

3. 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 Jan 13.

4. van Riet E, Aina 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.

5. Ishiwada N, Takada N, Okunishi T, Hishiki H, Katano H, Nakajima N, Kohno Y. Rhabdomyolysis associated with influenza A/H1N1 2009 infection in a pediatric patient Pediatr Int. 2012

Oct;54(5):703-5.

6 . Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Yamamoto K, Nakajima N, Sato Y, Aratani Y, Oshima M, Sata T, Kobayashi K, Kawachi S, Nakayama T, Suzuki K. Contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiol Immunol*. 2012 Mar;56(3):171-82.

7 . Ohnishi K, Takahashi Y, Kono N, Nakajima N, Mizukoshi F, Misawa S, Yamamoto T, Mitsuki YY, Fu S, Hirayama N, Ohshima M, Ato M, Kageyama T, Odagiri T, Tashiro M, Kobayashi K, Itamura S, Tsunetsugu-Yokota Y. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus *Jpn J Infect Dis*. 2012;65(1):19-27.

8 . 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.

9 . Ikematsu, H., N. Kawai, and S. Kashiwagi. In vitro neuraminidase inhibitory activities of four neuraminidase inhibitors against influenza viruses isolated in the 2010-2011 season in Japan. *J Infect Chemother*, 2012. 18(4): p. 529-33.

10 . 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): p. 211-7.

11 . 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): p. 180-6.

12 . 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*, 2012.

13 .Tokuhira N, Shime N, Inoue M, Kawasaki T, Sakurai Y, Kurosaka N, Ueta I, Nakagawa S. Mechanically ventilated children with 2009 pandemic influenza A/H1N1, Results from the national pediatric intensive care registry in Japan. *Pediatr Crit Care Med* 2012; 13: E294-98.

14 . Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, et al. Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respir Viruses* 2012; Nov5, epub ahead of print

15 . Takeda S, Kotani T, Nakagawa S, et al. Extracorporeal membrane oxygenation for 2009 influenza A(H1N1) severe respiratory failure in Japan. *J Anesth* 2012; 26: 650-57.

16 . Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, et al. National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children. *J Med Virol* 2012; 84: 1151-56.

17 . Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, et al. Treatment of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children. *Scand J Infect Dis* 2012; 44: 941-47.

18 . Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, et al. Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. *J Clin Virol* 2013; 56: 25-30.

19 . S Takeda, et al. Extracorporeal

- Membrane Oxygenation for 2009 Influenza A(H1N1) Severe Respiratory Failure in Japan. *Journal of Anesthesia* 2012; 26: 650-657.
- 20 . Morichi S, Kawashima H, Ioi H, Yamanaka G, Kashiwagi Y, Hoshika A. High production of interleukin-10 and interferon- in influenza-associated MERS in the early phase. *Pediatr Int.* 2012 ;54(4):536-8.31 .
- 21 . Okumura A, Tsuji T, Kubota T, Ando N, Kobayashi S, Kato T, Natsume J, Hayakawa F, Shimizu T. Acute encephalopathy with 2009 pandemic flu: Comparison with seasonal flu. *Brain Dev* 2012; 34(1): 13-19.
- 22 . Okumura A, Uematsu M, Imataka G, Tanaka M, Okanishi T, Kubota T, Sudo A, Tohyama J, Tsuji M, Ohmori I, Naiki M, Hiraiwa-Sofue A, Sato H, Saitoh S, Shimizu T. Acute encephalopathy in children with Dravet syndrome. *Epilepsia* 2012; 53(1): 79-86.
- 23 .Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi J, Nagata R, Okumura A, Kashii H, Tomita S, Kumada S, Kubota M. Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/ encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *Brain Dev* 2012; 34(2): 124-127
- 24 . Oikawa N, Okumura A, Oyama S, Baba H, Shimizu T, Kato A. A 15-month-old boy with reduced consciousness and convulsion. *J Clin Virol* 2012; 53(4): 276-279.
- 25 .Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis/ encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci* 2012; 320(1-2): 145-148.
- 26 . 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.
- 27 . Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; collaborating study group on influenza-associated encephalopathy in Japan. National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children. *J Med Virol* 2012; 84(8): 1151-1156.
- 28 . Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; The Collaborating Study Group On Influenza-Associated Encephalopathy In Japan. Treatment of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children. *Scand J Infect Dis* 2012; 44(12): 941-947.
- 29 . Kawatani M, Hiratani M, Kometani H, Nakai A, Tsukahara H, Tomoda A, Mayumi M, Ohshima Y. Focal EEG abnormalities might reflect neuropathological characteristics of pervasive developmental disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Brain Dev* 34 (9): 723-730, 2012.
- 30 . Nagasaka H, Miida T, Inui A, Inoue I, Tsukahara H, Komatsu H, Hiejima E, Fujisawa T, Yorifuji T, Hiranao K, Okajima H, Inomata Y. Fatty liver and anti-oxidant enzyme activities along with peroxisome proliferator-activated receptors and expressions in the liver of Wilson's disease. *Mol Genet Metab* 107 (3): 542-547, 2012.
- 31 . 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.
- 32 . 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.
- 33 . Nagasaka H, Okano Y, Kimura A, Mizuochi T, Sanayama Y, Takatani T, Nakagawa S, Hasegawa E, Hirano K, Mochizuki H, Ohura T, Ishige-Wada M, Usui H, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Ohtake A, Yamato S, Miida T. Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening. *Clin Chim Acta* 416: 54-59, 2013.
- 34 . Nagasaka H, Miida T, Yorifuji T, Hirano K, Inui A, Fujisawa T, Tsukahara H, Hayashi H, Inomata Y. Metabolic improvements in intrahepatic porto-systemic venous shunt presenting various metabolic abnormalities by 4-phenylacetate. *Clin Chim Acta* 2013 (in press).
- 35 . Oka M, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Ishikawa N, Isumi H, Ichiyama T. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of children with acute disseminated encephalomyelitis. *Brain Dev.* 2012, in press.
- 36 . Hasegawa S, Wakiguchi H, Hirano R, Okazaki F, Kudo K, Ichiyama T. Tau protein levels in children do not increase during severe asthma attack-induced hypoxic conditions. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012, in press.
- 37 . 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.* 2012, in press.
- 38 . Matsushige T, Inoue H, Fukunaga S, Hasegawa S, Okuda M, Ichiyama T. Serum neurofilament concentrations in children with prolonged febrile seizures. *J Neurol Sci.* 2012, in press.
- 39 . Kudo K, Hasegawa S, Suzuki Y, Hirano R, Wakiguchi H, Kittaka S, Ichiyama T. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits vascular cellular adhesion molecule-1 expression and interleukin-8 production in human coronary arterial endothelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012; 132:290-294.
- 40 . Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci.* 2012; 320: 145-8.
- 41 . Abe Y, Hashimoto K, Iinuma K, Ohtsuka Y, Ichiyama T, Kusuhara K, Nomura K, Mizuguchi M, Aiba H, Suzuki Y, Mizusawa H, Hosoya M. Survey of subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *J Child Neurol.* 2012; 27: 1529-33.
- 42 . Wakamoto H, Takahashi Y, Ebihara T, Okamoto K, Hayashi M, Ichiyama T, Ishii E. An immunologic case study of acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures. *Brain Dev.* 2012; 34: 763-7.
- 43 . Tanaka N, Emoto T, Suda H, Kunihiro Y, Matsunaga N, Hasegawa S, Ichiyama T. High-resolution computed tomography findings of influenza virus pneumonia: a comparative study between seasonal and novel (H1N1) influenza virus pneumonia. *Jpn J Radiol.* 2012; 30: 154-61.
- 44 . Shoji K, Komuro H, Miyata I, Miyairi I, Saitoh A: Dermatologic Manifestations of Human Parechovirus Type 3 Infection in Neonates and Infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 Nov 28. [Epub ahead of print]
- 45 . 宮田一平,宮入烈 : 中枢神経感染症における迅速診断 . 小児科臨床

2012;65(12):2489-2495

46 .Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T. Okumura A.

Pertussis-associated encephalitis / encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci*, 320:145-148, 2012.

47 .Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human Herpesvirus

6-Associated Encephalopathy in a Child with Dravet Syndrome. *Neuropediatrics*, published online: 03 October 2012

48. Kawada J, Kitagawa Y, Iwata N, Ito Y. Clinical characteristics of influenza virus infection in juvenile idiopathic arthritis patients treated with tocilizumab. *Mod Rheumatol*. published online: Oct 16. 2012

49 .Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le MQ, Sekijima M, Ito K, Takada A, Kawaoka Y. Molecular mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the neuraminidase of subtype H5N1 avian influenza A viruses. *J Infect Dis* 207:89-97, 2013.

50 . Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1. *J Infect Dis* 207:262-271, 2013.

51 . Shinya K, et al., Integrated clinical, pathologic, virologic, and transcriptomic analysis of H5N1 influenza virus-induced viral pneumonia in the rhesus macaque *J Virol*. 2012; 86(11): 6055-66.

52 .Tamie Sugawara, Yoko Ibuka, Yasushi Ohkusa, Hirokazu Kawanohara, Kiyosu Taniguchi, Nobuhiko Okabe : Real-time Prescription Surveillance and its Application to Monitoring Seasonal Influenza Activity in Japan, *J Med*

Interne tRes,14(1),1-9,2012.

53 .Yoshiaki Gu, Tomoe Shimada, Yoshinori Yasui, Yuki Tada, Mitsuo Kaku, Nobuhiko Okabe: National Surveillance of Influenza-Associated Encephalopathy in Japan over Six Years, before and during the 2009-2010 Influenza Pandemic. *PLoS ONE* 8(1): e54786.

doi:10.1371/journal.pone.0054786

2. 学会発表

・ 国際会議のみ記載

1 . Pathological study of formalin-fixed paraffin-embedded lung tissues with H5N1 influenza infection in Vietnam: Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutaka Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy, Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki and Tetsutaro Sata Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management (Second isirv Antiviral Group Conference) (ハノイ・ベトナム)2012年10月

2 . 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

3 . Akihisa Okumura. Neonatal EEG in determining risk to the preterm brain. Joint congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Brisbane, Australia, 2012.6.1.

4 . Akihisa Okumura, Keiko Shimojima, Tetsuo Kubota, Shinpei Abe, Shintaro Yamashita, Katsumi Imai, Tohru Okanishi, Hideo Enoki, Tatsuya Fukasawa, Takuya Tanabe, Shino Shimada, Leanne M Dibbens, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki Yamamoto.

PRRT2 Mutation in Japanese Children with Benign Infantile Epilepsy. The 16th Annual Meeting of American Epilepsy Society, San Diego, CA, USA, 2012.12.2.

5. Hasegawa S, Okada S, Hasegawa H, Ainai A, Shirabe K, Toda S, Ikemoto K, Sasaki K, Ichiyama T. Cytokine Profiles in Bronchoalveolar Lavage in a Mouse Model of Bronchial Asthma during H1N1 2009 Infection. 17th Asian Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiratory and Immunology. Taipei, 10月19-21日, 2012年

6. Komuro H, Shoji K, Kobayashi Y, Miyata I, Funaki T, Miyairi I, Takayama J, Saitoh A: Dermatologic manifestations of human parechovirus type 3 infection in neonates and infants. Pediatric Academic Societies Annual Meeting (PAS) 2012, Boston Massachusetts, 2012.4.28

7. MATSUKAWA A. Negative regulation of

cytokine signaling in inflammation. The 5th International symposium for future technology creating better human health and society. March 15-16, 2012, Okayama (Invited Speaker)

8. Ito T, Yoshimura A, Matsukawa A : Spred-2 negatively regulates influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia. 99th Annual Meeting, The American Association of Immunologists, May 4-8, 2012, Boston, USA

G. 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

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・研究に関する研究

（研究代表者：森島恒雄）

「パンデミック」インフルエンザなどの疫学・臨床像の早期解明（国際情報など）

高病原性鳥インフルエンザA(H5N1) およびブタインフルエンザA(H3N2)vの発生状況

研究分担者：岡部信彦 川崎市健康安全研究所・所長

研究協力者：島田智恵 国立感染症研究所感染症情報センター・主任研究官

研究要旨

高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)〔以下 A(H5N1)〕は、家禽類にとって致死率がきわめて高く「家禽ペスト」と呼ばれていたものの病原体であることが明らかになり警戒されていたが、ヒトへの感染は長く知られていなかった。1997年に香港及びその周辺で家禽の間で A(H5N1)感染の流行的発生があり、このとき6例の死亡を含む18例の初めての A(H5N1)ヒト感染事例が報告された。ヒトからヒトへの感染例はなかったが、World Health Organization(WHO:世界保健機関)および International Epizootic Office(OIE: 国際獣疫事務局)を中心に pandemic influenza としてのヒト型への変異への警戒から、鳥やヒトでの感染例に対するサーベイランス、検査診断法、公衆衛生対応についての強化や指針を示すなどの整備してきた。しかし、2009年に発生した新型インフルエンザウイルス (pandemic influenza virus) は1998年頃から北米のブタの間で流行し、散発的にヒト感染例も報告されていた triple reassortant のブタ由来変異型インフルエンザウイルス (variant influenza virus) を起源としたものであった。米国ではブタ由来変異型インフルエンザウイルスについてもサーベイランスを強化しており、2012年にはブタインフルエンザ A(H3N2)v のヒトへの感染例が複数の週で多数報告され、ヒト-ヒト感染の可能性も懸念された。

これまでのところ A(H5N1)、A(H3N2)v とともにヒトへの感染は患畜との濃厚接触による感染が主体であり、ヒトの間で効率的に感染伝播があったという確定的な調査結果は得られていない。今後も pandemic influenza virus 発生の監視として、A(H5N1)をはじめとする鳥インフルエンザウイルスや、ブタ由来変異型インフルエンザウイルスの発生状況や疫学的特徴は注視していく必要がある。

A. 研究目的

次のpandemic influenza virusとなる可能性があるとしてサーベイランスが強化されている A(H5N1)、およびブタ由来変異型インフルエンザウイルス (特にA(H3N2)v) について最近の発生状況や知見をまとめる。

報告数の動向についてはWHOおよび、ブタ由来変異型インフルエンザウイルスのサーベイランスを強化している米国のCenters for Disease Control and Prevention (CDC: 米国疾病管理予防センター) で公表されたサーベイランスデータに基づき情報をまとめる。疫学的情報については関連する文献をレビューする。

B. 研究方法

倫理面については本研究は公表資料に基づいているものであり、抵触するものはない

C. 結果

1. A(H5N1)のヒト感染例

(1) 発生状況

A(H5N1)のヒト感染例は、散発例を中心に1997年以降も毎年継続的に報告されている。WHOが収集した2003年以降のデータ(図1)によると、2013年2月の時点で15か国から計620例の症例が報告された¹⁾。死亡例はそのうち367例(case fatality rate =59%)であった。15か国のうち、東南アジアの国が8か国でその症例数の合計は422例であり全体の68%を占めていた。最も症例が多かった国はインドネシアで192例(192/620 = 31.0%)、以下順にエジプト170例(27.4%)、ベトナム123例(19.8%)、中国45例(7.3%)、カンボジア28例(4.5%)、タイ25例(4.0%)、トルコ12例(1.9%)であった(図2)。

エジプトにおける、家禽でのA(H5N1)の発生状況とヒト感染例の発生状況との関連を検証した研究²⁾では、家禽とヒトでの疫学曲線は統計学的に有意な関連があった。ヒトでの感染例が発生するリスクを多変量解析で分析した結果では、低い気温、低い都市化、家禽の密度、最近の家禽でのアウトブレイクの発生がリスク因子とされた。

(2) 疫学情報

WHOの公開資料では2011年単年の疫学情報しか入手できなかったため、Fiebigらの論文³⁾を参照した。彼らはドイツのRobert Koch Instituteが開発したツールにより、WHOなどに報告された鳥インフルエンザのヒト感染例のラインリストを作成し、2006年9月～2010年8月の

4年分のデータを用いて疫学的分析を行った。検査室診断でA(H5N1)感染が確定された症例は235例であった。以下に主な結果を抜粋する。

- ・全体の年齢中央値18歳(男性14歳、女性21歳)。ただし国によるばらつきが大きい。エジプトは中央値が6歳で、男女差も顕著だった(男性4歳、女性16.5歳)。

- ・最も多い年齢群はエジプトでは10歳未満(54%)だが、インドネシア、中国、ベトナムでは20-29歳の年齢群が最多である。

感染源

- ・96%の症例で鳥への曝露歴を認めた。

- ・Case fatality rate(CFR:累積死亡割合):全体としては56%(132/235)だが、国によって差があった。最も低いCFRはエジプトの28%(27/98)、高いCFRはインドネシアの87%(71/82)。CFRと19か月間のデータに基づいて算出されたrolling CFR は減少傾向であり特に2008-2009年に大きく減少した。

- ・発症から入院までの日数がわかった197例の、日数の中央値は4日(第1 - 第3四分位:2-6日)であり、生存例と死亡例の日数を比較したところ生存例での中央値は2日(同1-4日)、死亡例では5日(同3-7日)であり、有意な差があった。ただし、国別に比較するとエジプト以外の国では差はなかった。

- ・死亡例における発症から死亡までの日数は、中央値9日だった。性別や年齢での差はなかった。すべての死亡例が発症から8日以降に入院していた。

- ・多重ロジスティック回帰分析の結果では、発症から入院まで1日遅延する毎に死亡のリスクが33%上昇した。

タイにおいて季節性インフルエンザ252例とA(H5N1)感染例25例を比較した論文⁴⁾では、年齢・性別・職種に差は無く、病気の家禽との接触歴(特に2回以上の複数回の接触歴)に差を認めていた。ヒトのA(H5N1)感染例との接触歴には差がなかった。臨床像では季節性インフルエンザでの死亡例に比べて、A(H5N1)感染死亡例では、咽頭痛、嘔吐、入院時のレントゲン写真での肺炎像やARDS、ARDSによる呼吸不全が有意に頻度が高かった。

2. ブタ由来変異型インフルエンザウイルス (variant influenza virus)

(1) 発生状況⁵⁾

米国CDCのレポートによると、過去、1~2年に1例の頻度でブタ由来変異型インフルエンザウイルスによる症例の報告を受けていた。近年はもっと高い頻度で報告されるようになっていたがこれは、サーベイランスの制度が各州で整備されてきたことによる探知・報告の増加、2007年以降、あらゆる“新型”インフルエンザウイルスが米国内および国際的に報告対象となったこと、真の症例数の増加などが原因として考えられる、と考察されている。2005年以降、米国で報告されたブタ由来変異型インフルエンザウイルスは計348例である。ウイルス株毎の内訳はA(H1N2)vが2つの週から計5例(1%)、A(H1N1)vが8つの州から計14例(4%)、A(H3N2)vが14の州から計329例(95%)である。A(H3N2)vは2011年7月に初めて分離され、M遺伝子がA(H1N1)pdm09ウイルス由来であることが確認された。2011年は7-12月の間に12例の報告であったが、2012年は7月以降急激に増加し、9月までの間に307例の症例が報告された。ただしこれらの症例はブタとの接触が

あり軽症例が大半を占めていた。入院を必要とした症例は16例(5%)のみだった。大勢の客がブタと接触する機会がある各地の農業祭(County fair または State fair)⁶⁾が終わる2012年9月以降2013年2月現在、米国での新たなA(H3N2)v感染例は報告されていない。

(2) オハイオ州における入院例⁷⁾

2012年9月の時点で、オハイオ州におけるA(H3N2)v感染例は106例、そのうち入院例は11例であり、これは米国全体の入院例の69%を占めていた。Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) に報告された入院例の特徴によると、年齢中央値6歳(範囲0-61歳)で8例は女性だった。死亡例は1例のみで61歳、女性、基礎疾患として糖尿病、真菌症、高血圧症があり、リンパ腫の既往もあった。ブタとの接触歴については1例をのぞき、すべての症例でcounty fairなどでの直接・間接的な接触歴があった。感染機会と思われるブタとの接触から発症までの日数は0~8日であった。抗インフルエンザ薬は6例で投与され、発症から投与開始までの日数は2日が4例、3日が2例だった。入院前に投与されていた症例は1例のみだった。小児の10例のうち、基礎疾患は4例にあり、喘息2例(うち1例は先天性疾患ももっていた)、喘息の既往1例、急性リンパ性白血病1例であった。酸素投与が必要だったのは1例だけで基礎疾患に喘息と先天性疾患を持つ症例であった。11例の入院期間の中央値は1日(範囲1-3日)であった。

D. 考察

ヒトのA(H5N1)感染例はアジアを中心に継続的に報告され、累積のCFRはいまだに50%-60%であるが、おおむね減少傾向にある。各

国間のCFRには30～100%と差があるが、これにはサーベイランス体制(鑑別診断、確定診断、報告の体制)の質、軽症例の受診行動、医療機関へのアクセスなど、各国の背景が影響していると思われる。多くの場合において感染源となっている家禽・野鳥のサーベイランス体制もまた、ヒトへの感染に影響を与えている。家禽の間でH5N1が発生した場合、行政から農家への金銭的な保障が得られない場合、農家はその発生の報告を躊躇するため家禽の間でA(H5N1)が蔓延するまで予防対策が十分にとれないため結果的にヒトへの感染機会が増す。家禽・野鳥のA(H5N1)の早期探知はヒトへの感染対策の根本なので、各国とも家禽・野鳥でのサーベイランス体制を強化・整備しているが、発展途上国においてはその体制の維持などに問題が生じる可能性は十分にある。また不活化型鳥インフルエンザワクチンの家禽類への接種も流行状況に影響を与える可能性がある。今後も鳥、ヒトのA(H5N1)サーベイランスには今後も国際的な持続的支援が必要だろう。

ブタ由来変異型インフルエンザウイルスについては、ヨーロッパ諸国をはじめ、サーベイランス体制が整っていない国が大半であるなか、2005年以降サーベイランスを強化していた米国ではA(H3N2)vを中心にヒトへの感染例が報告されている。現在のところ、これらのインフルエンザウイルスにヒトが感染するのは患畜との濃厚な接触によるものであり、効率的にヒトヒト感染をおこしているとする調査結果はない。ただし、次のpandemic influenza virusの出現をいち早く探知できるよう、これらのウイルスの家禽・ブタの間での発生状況やヒトへの感染例の発生状況は常に注視しておくべきである。

E. 結論

次のpandemic influenza virusの出現をいち早く探知できるよう、鳥インフルエンザウイルスあるいはプタインフルエンザウイルスなどの発生状況やヒトへの感染例の発生状況は常に注視しておく必要がある。

参考文献

- 1) World Health Organization (2013). "Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO."
- 2) Rabinowitz, P. M., et al. (2012). "Comparison of human and animal surveillance data for H5N1 influenza A in Egypt 2006-2011." *PLoS One* 7(9): e43851.
- 3) Fiebig, L., et al. (2011). "Avian influenza A(H5N1) in humans: new insights from a line list of World Health Organization confirmed cases, September 2006 to August 2010." *Euro Surveill* 16(32).
- 4) Shinde, V., et al. (2011). "A comparison of clinical and epidemiological characteristics of fatal human infections with H5N1 and human influenza viruses in Thailand, 2004-2006." *PLoS One* 6(4): e14809.
- 5) CDC (2012). "Update: influenza activity - United States and worldwide, May 20-September 22, 2012." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 61(39): 785-789.
- 6) CDC (2012). "Notes from the field: Outbreak of influenza A (H3N2) virus among persons and swine at a county fair--Indiana, July 2012." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 61(29): 561.

7) CDC (2012). "Influenza A (H3N2) variant virus-related hospitalizations: Ohio, 2012." MMWR Morb Mortal Wkly Rep 61: 764-767.

F . 研究発表

- 1) 岡部信彦: 今後の新型インフルエンザ行動計画・ガイドライン策定の方向 Nursing Business 6(8):714-716, 2012.
- 2) Tamie Sugawara, Yoko Ibuka, Yasushi Ohkusa, Hirokazu Kawano, Kiyosu Taniguchi, Nobuhiko Okabe : Real-time Prescription Surveillance and its Application to Monitoring Seasonal Influenza Activity in Japan, J Med Intern Res, 14(1), 1-9, 2012.
- 3) Yoshiaki Gu, Tomoe Shimada, Yoshinori Yasui, Yuki Tada, Mitsuo Kaku, Nobuhiko Okabe: National Surveillance of Influenza-Associated Encephalopathy in Japan over Six Years, before and during the 2009–2010 Influenza Pandemic. PLoS ONE 8(1): e54786.
doi:10.1371/journal.pone.0054786

G . 知的所有権の取得状況

なし

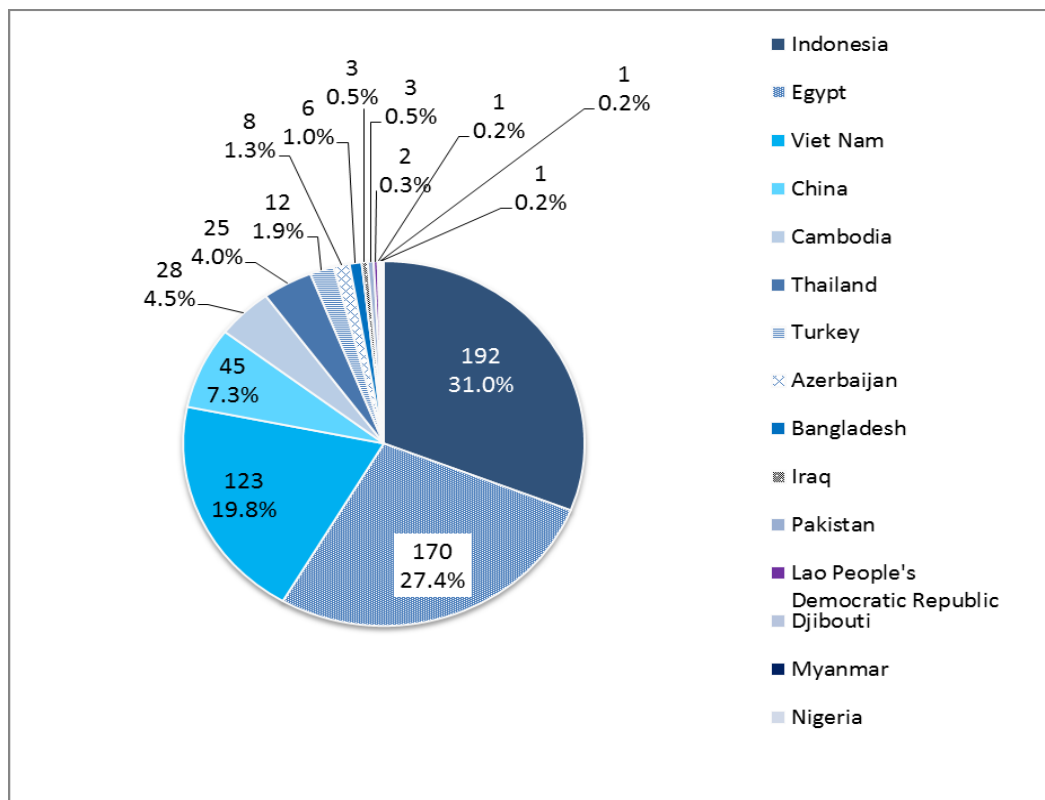
図1 . A(H5N1)のヒト感染例国別報告数

2003-2013

Country	2003-2009*		2010		2011		2012		2013		Total		CFR
	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	Cases	Death	
Azerbaijan	8	5	0	0	0	0	0	0	0	0	8	5	63%
Bangladesh	1	0	0	0	2	0	3	0	0	0	6	0	0%
Cambodia	9	7	1	1	8	8	3	3	7	6	28	25	89%
China	38	25	2	1	1	1	2	1	2	0	45	28	62%
Djibouti	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0%
Egypt	90	27	29	13	39	15	11	5	1	1	170	61	36%
Indonesia	162	134	9	7	12	10	9	9	0	0	192	160	83%
Iraq	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	67%
Lao People's Democratic Republic	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	100%
Myanmar	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0%
Nigeria	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	100%
Pakistan	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	33%
Thailand	25	17	0	0	0	0	0	0	0	0	25	17	68%
Turkey	12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	12	4	33%
Viet Nam	112	57	7	2	0	0	4	2	0	0	123	61	50%
Total	468	282	48	24	62	34	32	20	10	7	620	367	59%

引用文献1)より抜粋

図2 . A(H5N1)ヒト感染例国別報告数割合 2003-2013、n=620
(凡例は報告数の多い順に掲載)



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
分担研究報告書

**感染症発生動向調査に基づいた 2012/2013 年シーズンのインフルエンザの発生動向と
同時期の入院サーベイランスおよびインフルエンザ脳症報告の解析結果について**

分担研究者：多屋馨子（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究協力者：安井良則（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究要旨

感染症発生動向調査による 2012/2013 年シーズン（2013 年第 5 週まで）の日本国内における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、およびインフルエンザによる入院サーベイランスの結果とそれぞれの解析結果について示す。

2012/2013 年シーズンのインフルエンザの流行は、2013 年第 4 週にインフルエンザ定点当たり報告数が 36.44（患者報告数 180,085）と今シーズンの最高値となった。2013 年第 5 週までの累積の推計受診患者数は 726 万人（95%信頼区間：702～750 万人）であり、性別では男性 369 万人（95%信頼区間：356 万人～382 万人）であった。今シーズンは昨シーズンと比較して成人の発症が多く、70 歳以上は約 44 万人であり、昨シーズン同時期の累積推計値約 27 万人を大きく上回っている（以上全て暫定値）。

発症者から検出されているインフルエンザウイルスは、これまでのところ昨シーズンと同様に AH3 亜型が 89.6%と大半を占めている。

インフルエンザ脳症の報告数は 2013 年第 5 週までに 33 例が報告されており、9 歳以下が 19 例（57.6%）と全体の過半数を占めている。一方、成人では 60～79 歳の年齢群が 6 例（18.2%）であった。

全国約 500 か所の基幹定点病院からのインフルエンザによる入院累積報告数は、2013 年第 5 週までで 5,049 人であった。60 歳以上の割合が 57.6%と過半数を占め、9 歳以下の入院例と合わせると全体の 85.2%を占める。入院サーベイランスについては、約 500 か所の基幹定点病院を対象に行っていることによる制限、入院時の状況に関する調査項目の制限等、本調査の目的も含めて、再検討すべき課題があると考えられた。

A. 研究目的・背景

国立感染症研究所感染症情報センターでは、1999 年 4 月より全国約 5000 箇所（うち小児科定点医療機関約 3000 箇所）から都道府県、政令市を通じて週毎に報告されるインフルエンザの発生状況のデータ集計を行い、シーズン毎のインフ

ルエンザの発生動向の解析を行っている。

急性脳炎は 2003 年 11 月に 4 類感染症定点把握疾患から 5 類感染症全数把握疾患に変更となり、2004 年 3 月からインフルエンザ脳症も同疾患として全数届出対象となった。

また、2012 年 9 月からは、インフルエンザ発症に起因した入院症例について、全国約

500 か所の基幹定点病院からの報告（入院サーベイランス）が始まった。

2009/2010年シーズンは、2009年に発生した新型インフルエンザ《インフルエンザ A (H1N1) 2009》が世界的にも日本国内でも大きく流行したシーズンであり、翌 2010/2011年シーズンは日本では前シーズンと同様にインフルエンザ A (H1N1) 2009 が流行の主流を占めたが、AH3 亜型や B 型インフルエンザの流行もみられた。

2011/2012年シーズンは AH3 亜型が流行の中心であり、AH3 亜型が中心の流行は 2006/2007年シーズン以来であった。また、過去 2 シーズン多数を占めていたインフルエンザ A (H1N1) 2009 は大きく減少した。

本稿では、2012/2013年シーズン（2012年第 36 週～2013年第 35 週）のインフルエンザの流行状況とインフルエンザ脳症の報告（急性脳炎の報告例のうち原因がインフルエンザとされているもの）および 2011/2012年シーズンから始まったインフルエンザの入院サーベイランスについて、2013年第 5 週までの集計と解析結果の報告と考察を行う。

B. 方法

全国約 5000 箇所のインフルエンザ定点医療機関（小児科定点約 3000 箇所、内科定点約 2000 箇所）より都道府県、政令市を通じて週毎のインフルエンザの発生状況が報告されており、国立感染症研究所感染症情報センターでデータを集計している。そのデータを活用して、2012/2013年シーズン（2013年第 5 週まで）のインフルエンザの発生動向の分析を行った。

また、全国の地方衛生研究所及び検疫所から報告される病原体検出結果のうち、インフルエンザウイルスの分離・検出報告について集計・解析を行った。

感染症発生動向調査では、インフルエンザ脳症は、2004年 3 月から感染症法に基づく五類感染症の全数届出疾患である急性脳炎に含

まれるものとして、診断したすべての医師に診断から 7 日以内に届け出ることが義務づけられている。（急性脳炎の届出基準：<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekka-ku-kansenshou11/01-05-03.html>）

2012/2013年シーズン（2013年第 5 週まで）に全国の医療機関から 5 類感染症全数把握疾患として都道府県、政令市を通じて報告される急性脳炎の報告例のうち、インフルエンザ脳症と診断されたもののみを抽出して集計・解析を行った。

インフルエンザに関連する入院例については、2012/2013年シーズン（2013年第 5 週まで）に全国の基幹定点から報告されたデータを集計し解析を行った。

C. 結果

1) 2012/2013年シーズンのインフルエンザの発生動向（暫定値）について：

インフルエンザの定点当たり報告数は 2012年第 43 週以降継続的に増加し、第 50 週に全国的な流行開始の指標である 1.00 を上回って 1.17 となった。

2013 年に入るとインフルエンザの定点当たり報告数は急増し、第 4 週には 36.44（患者報告数 180,085）と今シーズンの最高値となった。2012年第 43 週以降連続して増加していた報告数は、2013年第 5 週に 15 週間ぶりに減少し、35.82（患者報告数 177,271）となった（図 1）。

2012年第 36 週～2013年第 5 週までの定点当たり累積報告数の全国平均値は 111.72（総患者累積報告数 547,975）であり、都道府県別では千葉県 160.94、埼玉県 155.09、福島県 149.60、茨城県 147.32、新潟県 146.78、群馬県 146.10、長崎県 145.90、愛知県 141.87 の順であった。インフルエンザの流行開始が早かった地域が高値を示しているが、インフルエンザの流行は続いており、今後まだ大きく

変化していくものと予想される。

2013年第4週の推計受診患者数は約214万人(95%信頼区間:200万人~228万人)第5週の推計受診患者数は約208万人(95%信頼区間:193万人~223万人)であった。2006年以降、推計受診患者数の統計を開始しているが、200万人を超えたのは2011/2012年シーズンの2012年第5週(約211万人、95%信頼区間:194万人~229万人)と第6週(約201万人、95%信頼区間:183万人~219万人)のみであったが、2012/2013年シーズンも200万人を超えた週が2週連続して認められた。2012年第36週~2013年第5週までの累積の推計受診患者数は726万人(95%信頼区間:702~750万人)であり、性別では男性369万人(95%信頼区間:356万人~382万人)、女性351万人(95%信頼区間:339万人~363万人)、年齢群別では5~9歳約103万人、30代約96万人、10~14歳約84万人、40代約83万人、0~4歳および20代共に約79万人、15~19歳および50代が共に約54万人の順であった。また70歳以上は約44万人であり、2011/2012年シーズンの同時期の累積の推計値約27万人を大きく上回っている(以上全て暫定値)(図2)。

2012年第36~2013年第4週までに、全国の地方衛生研究所から1,783検体のインフルエンザウイルスの分離・検出が報告された。AH1pdm09が49件(2.7%)、AH3亜型1,579件(89.6%)、B型137件(7.7%)であり、2011/2012年シーズンと同様に、これまでのところAH3亜型が大半を占めている(図3)。

2) 感染症発生動向調査による2012/2013年シーズンのインフルエンザ脳症の報告(暫定値)について:

2012年第36週~2013年第5週に急性脳炎として報告があったものの内、原因がインフルエンザによるものとされたのは33例(年齢

1~80歳、年齢中央値8歳)であった(2013年第5週現在集計値)(表1)。

2012年第36週に1例の報告があり、第51週以降はインフルエンザの報告数の増加に伴ってインフルエンザ脳症も継続的に報告され、2013年第3週に11例と最多の報告数となった。第4週、第5週については、今後更に報告数が増加することが予想される(図4)。

男性19例(57.6%)、女性14例(42.4%)であり、年齢別では小児では4歳児が4例、7歳児が3例報告されており、9歳以下が19例(57.6%)と全体の過半数を占めた。成人では60~79歳の年齢群が6例(18.2%)となっている(図5)。ウイルスの型別ではA型26例(78.8%、うちAH1pdm09が0例、AH3が3例)、B型3例(9.1%)、型別不明4例(12.1%)となっており、今シーズンの流行を反映してA型が多数を占めている(図6)。

3) インフルエンザの入院サーベイランスの解析結果について:

全国約500か所の基幹定点病院からのインフルエンザによる入院例の報告数は、2012年第5週が1,402例と最多で、2012年第36週以降第5週までの累積報告数は5,049人となった。

年齢群別内訳は、80歳以上1,556人(30.8%)、0~4歳965人(19.1%)、70代941人(18.6%)、60代465人(9.2%)、5~9歳374人(7.4%)の順であり、60歳以上の割合が57.6%と過半数を占めた。60歳以上と、9歳以下を合わせると全体の85.2%を占めている(図7)。

入院時の状況についてはICU入室197例、人工呼吸器装着125例、頭部CT検査502例(一部重複あり)となっているが、これらのいずれにも該当しない例が4,379例(86.7%)と大半を占めている(図8)。

D. 考察

2013年第5週までの発生動向調査結果が明らかになっているだけで途中経過ではあるものの、2012/2013年シーズンは2011/2012年シーズンに引き続いてAH3亜型を中心とした流行となっている。2012/2013年シーズンのインフルエンザの流行の特徴としては、小児より成人層の発病者の割合が高いことがあげられる。インフルエンザ定点は内科定点数が約2000、小児科定点数が約3000の計約5000定点であり、国内の医療機関の割合とは異なっており、小児科の割合が高いなっていることから、小児での発症者の割合が高いと、定点からの患者報告数が多くなる傾向にある。2012/2013年シーズンのインフルエンザの定点当たり報告数が2011/2012年シーズンのピーク時の値を下回っているにも関わらず、定点数や割合を補正して算出した推計受診患者数が第4週、第5週と2週連続して昨シーズンのピーク時とほぼ同数であるのは、成人の割合が高いためと考えられる。

2012/2013年シーズンのインフルエンザ脳症の報告数は2013年第5週現在、33例であるが、途中経過であり、今後更に増加する可能性がある。これまでのところ4歳児の報告数が最多であり、また9歳以下が過半数を占めていることは2011/2012年シーズンと同様であるが、60～79歳の年齢群からの報告割合が2011/2012年シーズンは2.2%であったのに対して、2012/2013年シーズンは18.2%と高く、今後の推移を注意深く観察していく必要がある。

入院サーベイランスは、全国約500か所の基幹定点病院という限られた病院からの報告数ではあるものの、これまで一貫して患者発生の中心とは異なる60歳以上の高齢者からの報告が60%前後を占めている。入院サーベイランスは2011/2012年シーズンから開始されたものであり、過去のシーズンのデータとの比較は不可能ではあるが、2012/2013年

シーズンの高齢者の入院割合は、高齢者の患者発生数の増加に伴って、高くなっている可能性が考えられる。

入院時の状況については、調査項目がICU入室、人工呼吸器装着、頭部検査の3項目のみであり、実際にはいずれにも該当しない例が大半を占めており、入院例の重症度や肺炎、意識障害等の有無の解析には適していない。入院サーベイランスについては、約500か所の基幹定点病院を対象に行っていることや、入院時の状況に関する調査項目について、本調査の目的を考慮して、再検討すべき課題があると思われる。

E. 結論

2012/2013年シーズンのインフルエンザの流行は、2013年第4週に今シーズンの最高値となり、2013年第5週までの累積の推計受診患者数は726万人（95%信頼区間：702～750万人）であった。2012/2013年シーズンは成人の発症が多く、70歳以上の推計受診患者数は約44万人であり、昨シーズン同時期の累積推計値約27万人を大きく上回っている（以上全て暫定値）。

発症者から検出されているインフルエンザウイルスは、昨シーズンと同様にAH3亜型が最も多い。

インフルエンザ脳症の報告数は2013年第5週までに33例が報告されており、9歳以下が19例（57.6%）、60～79歳が6例（18.2%）であった。

全国約500か所の基幹定点病院からのインフルエンザによる入院累積報告数は、2013年第5週までで5,049人であった。60歳以上の割合が57.6%と過半数を占め、9歳以下の入院例と合わせると全体の85.2%を占めている。入院サーベイランスについては、約500か所の基幹定点病院を対象に行っていることによる制限、入院時の状況に関する調査項目の変

更等、本調査の目的も含めて、再検討すべき課題があると考えられた。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

なし

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

3. その他

なし

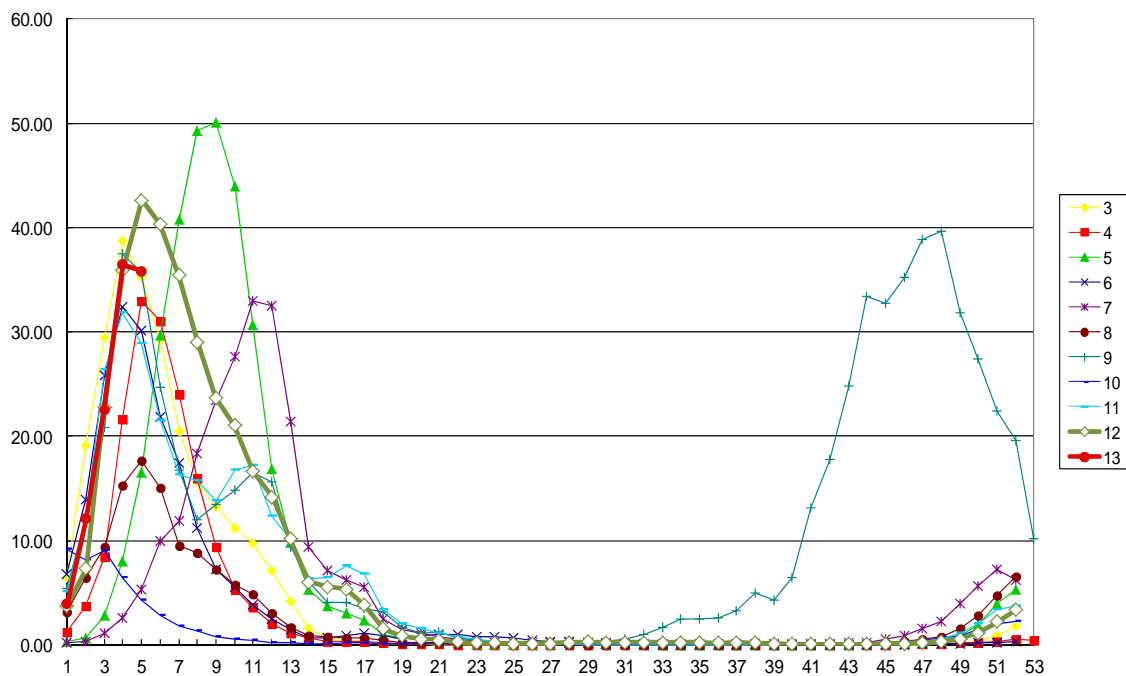


図 1 . 2003 年第 1 週 ~ 2013 年第 5 週インフルエンザ定点当たり報告数週別推移 (暫定値)

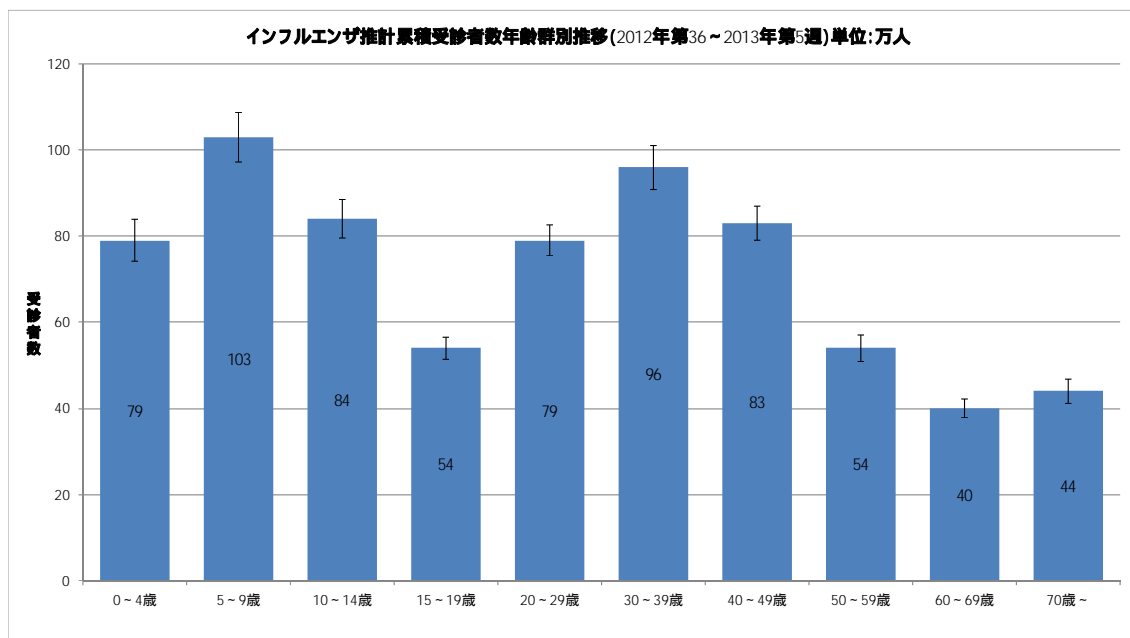


図 2 . インフルエンザ累積推計受診患者数年齢群別 (暫定値) (2012 年第 36 週 ~ 2013 年第 5 週 : 各年齢群の 95%信頼区間をグラフに示す)

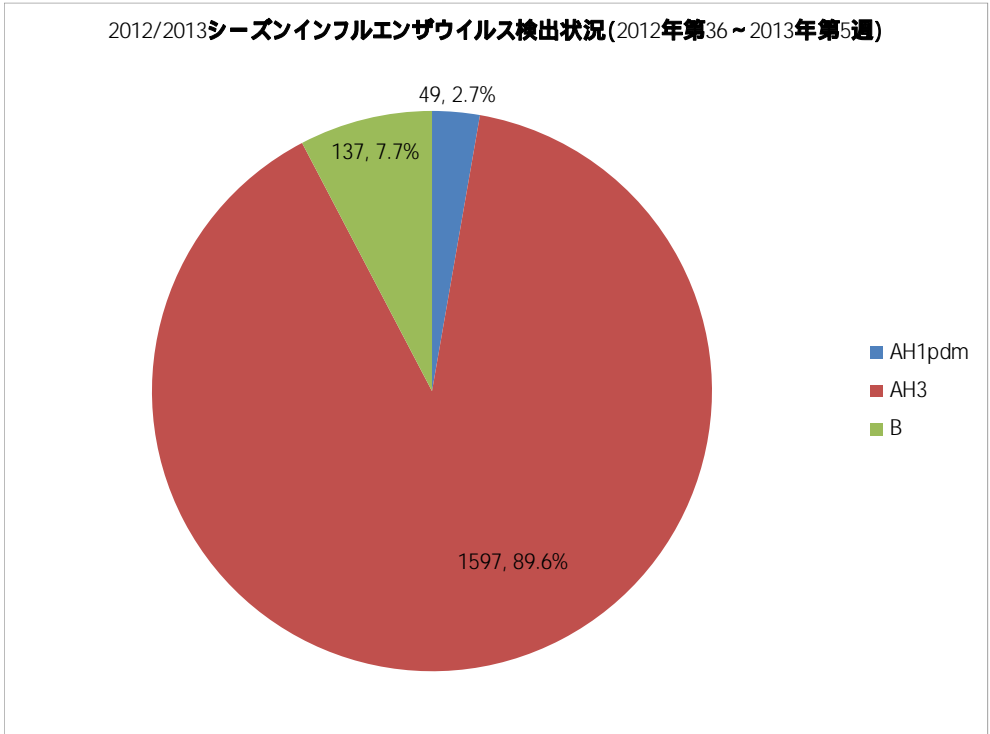


図3. 2012/2013年シーズンインフルエンザウイルス検出状況(2012年第36週～2013年第5週)

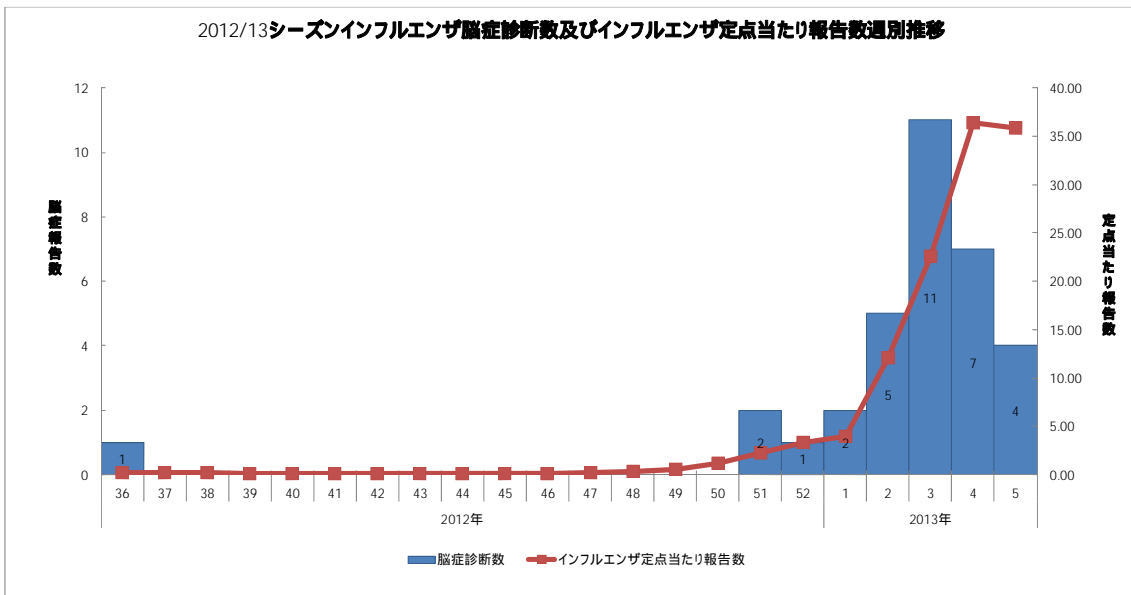


図4. 2012/2013年シーズンインフルエンザ脳症報告数およびインフルエンザ定点当たり報告数週別推移(暫定値)(インフルエンザ脳症累積報告数=33)

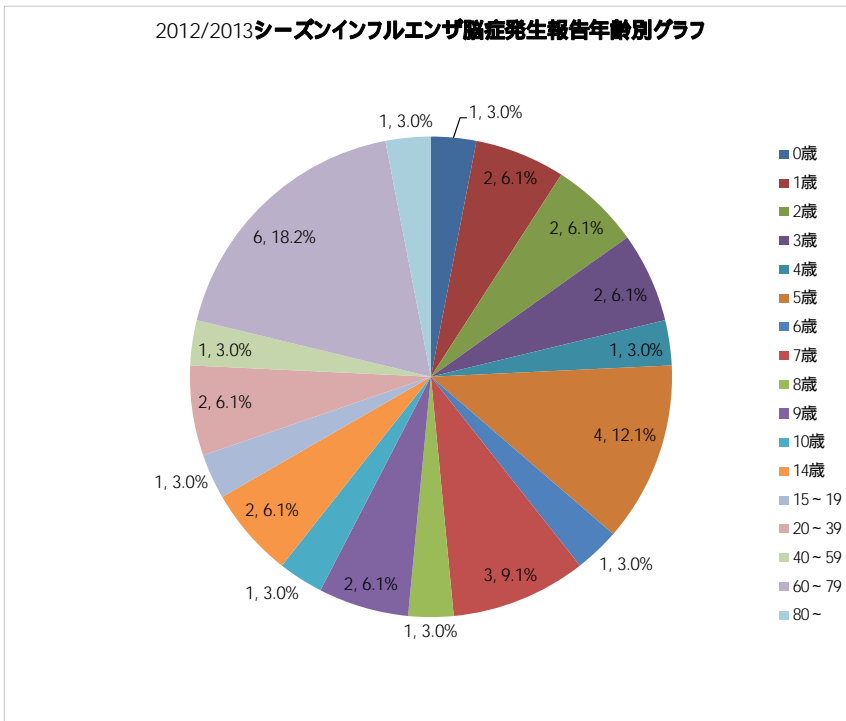


図 5 . 2012/2013 年シーズンインフルエンザ脳症発生報告年齢別グラフ (暫定値)

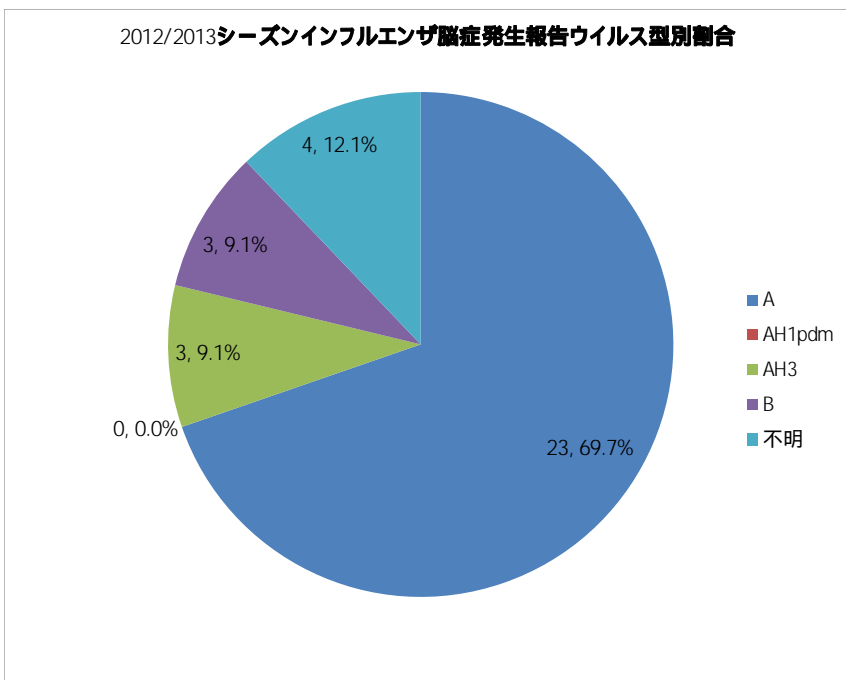


図 6 . 2012/2013 年シーズンインフルエンザ脳症発生報告数のウイルス型別割合 (暫定値)

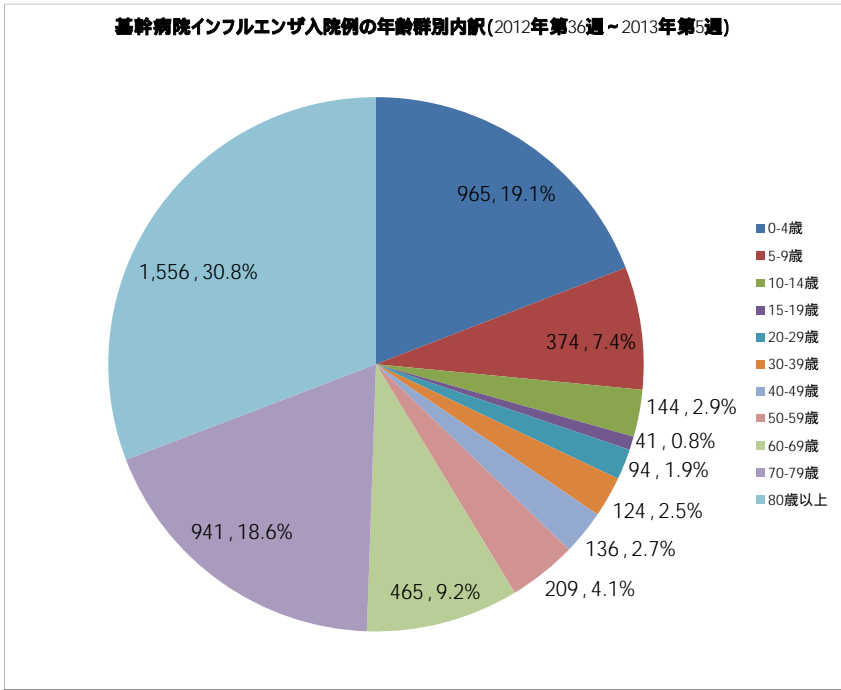


図7 .インフルエンザ入院患者の累積報告数の年齢群別割合(基幹定点からの報告)(2012年第36～2013年第5週、累積報告数5,049)

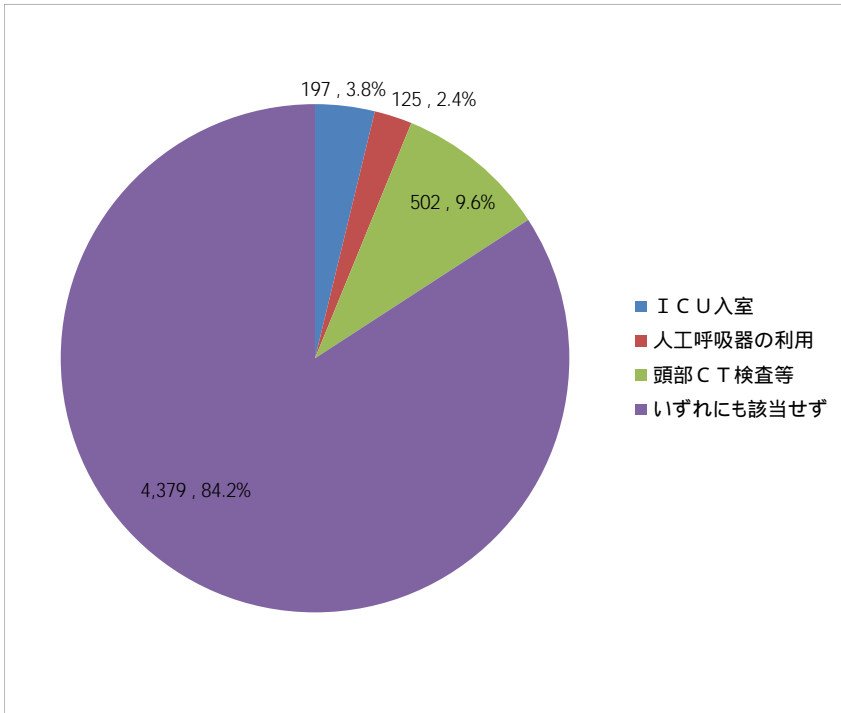


図8 .インフルエンザ入院患者の累積報告数の入院時の状況別割合(基幹定点からの報告、一部重複あり)(2012年第36～2013年第5週)

No.	年齢	性別	ウイルス	初診年月日	診断週	都道府県	症状、他	死亡報告
1	72	女	A	20120906	36	鹿児島県	発熱、痙攣、意識障害	
2	14	男	B	20121215	51	愛知県	発熱、痙攣、意識障害	
3	3	男	AH3	20121223	51	栃木県	発熱、痙攣、意識障害	
4	74	男	A	20121230	52	岩手県	発熱、意識障害	
5	3	男	A	20130101	1	埼玉県	発熱、痙攣、意識障害	
6	8	男	A	20130102	1	東京都	発熱、痙攣、意識障害	
7	2	女	A	20130107	2	東京都	発熱、痙攣、意識障害	
8	60	女	A	20130108	2	東京都	発熱、意識障害	
9	9	男	AH3	20130110	2	新潟県	発熱、痙攣、頭痛、嘔吐	
10	80	男	A	20130109	2	愛知県	発熱、痙攣、意識障害	
11	10	男	B	20130112	2	広島県	発熱、意識障害	
12	7	男	不明	20130109	3	千葉県	発熱、意識障害、頭痛、失語	
13	0	男	A	20130117	3	北海道	発熱、痙攣、意識障害	
14	6	男	A	20130117	3	埼玉県	不穏	
15	5	男	A	20130115	3	愛知県	発熱、痙攣、意識障害、頭痛、嘔吐	
16	4	男	A	20130117	3	福岡県	発熱、異常言動	
17	5	女	不明	20130114	3	東京都	発熱、意識障害	
18	9	女	A	20130119	3	栃木県	発熱、意識障害	
19	1	男	A	20130119	3	埼玉県	発熱、痙攣、意識障害	
20	7	女	A	20130118	3	千葉県	発熱、意識障害	
21	5	男	A	20130119	3	佐賀県	発熱、意識障害、嘔吐	
22	67	女	A	20130120	3	愛知県	発熱、意識障害、嘔吐、ショック	
23	39	男	A	20130121	4	茨城県	発熱、意識障害	
24	64	男	A	20130116	4	大阪府	発熱、意識障害	
25	1	女	A	20130120	4	福島県	意識障害	
26	39	女	A	20130123	4	茨城県	発熱、意識障害、頭痛、嘔吐	
27	59	女	不明	20130123	4	埼玉県	発熱、意識障害、頭痛	
28	71	女	A	20130126	4	茨城県	発熱、意識障害	
29	15	女	不明	20130126	4	栃木県	発熱、痙攣、意識障害	
30	7	男	B	20130127	5	愛知県	発熱、痙攣、意識障害、頭痛、嘔吐	
31	14	男	A	20130130	5	宮崎県	発熱、痙攣、意識障害	
32	2	女	A	20130130	5	千葉県	発熱、痙攣、意識障害	
33	5	女	AH3	20130202	5	北海道	発熱、痙攣、意識障害、嘔吐	

表1. 2012/2013年シーズンインフルエンザ脳症報告一覧(2012年第36週~2012年第5週現在)

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）
分担研究報告書

重症例の治療効果および予後に関する検討

研究分担者 池松 秀之 九州大学先端医療イノベーションセンター 臨床試験部門
研究協力者 日本臨床内科医会 インフルエンザ研究班

研究要旨

2009年に出現し新型インフルエンザとされたH1N1pdm09による被害は、世界において比較的少なかったが、次に新型インフルエンザが出現した際の備えを怠ると、今回の新型の経験とは異なった大きな被害が出ることも予測される。その際に重要なポイントの一つは「重症肺炎」であることは確実と思われる。

日本臨床内科医会インフルエンザ研究班が実施しているインフルエンザ研究における肺炎例の情報を集めた。2011-12年流行期に登録されたインフルエンザ患者はA型が340例、B型が126例で、肺炎あるいは入院の報告は4例で全員H3N2型であった。肺炎は2例で全体における割合は0.4%であった。入院の報告は2例であった。70才以上における肺炎あるいは入院の割合は15%（3/20）と高率で、高齢者において発生頻度が高いことが確認された。福岡県におけるインフルエンザ入院サーベイランスの結果では、ICU入室や人工呼吸器の利用が70才以上と1~9才に集中していた。高齢者においてインフルエンザの発症頻度が低いのに肺炎や重症例が多いのかについて、そのメカニズムは不明である。今回の調査結果では必ずしも糖尿病などの基礎疾患が重要な因子とはなっていなかった。高齢者人口が今後も増加することを考えると新型インフルエンザ発生時に高齢者にも多数の発症者が出る可能性があり、その対策については十分な検討が必要と思われた。

A. 研究目的

2009年4月に出現したブタ由来と考えられる新型インフルエンザウイルスH1N1pdm09は世界中に流行が拡大し、日本でも2009-2010年流行期はH1N1pdm09が流行の主体となった。新型インフルエンザの出現から1年経過した2010-2011年流行期は、H1N1pdm09と共にH3N2とB型の流行がみられ、従来の季節性インフルエンザの流行パターンに類似した流行となった。2011-2012年流行期は、H3N2とB型の流行がみられH1N1pdm09はほとんどみられなくなった。

今回の新型インフルエンザとされたH1N1pdm09の出現による被害は少なかったが、次に新型が出現した際の備えを怠ると、今回の新型の経験とは異なった大きな被害が出ることも予測される。その際に重要なポイントの一つは「重症肺炎」であることは確実と思われる。現在の毎年のインフルエンザ流行においても肺炎の合併は稀ではなく、重症肺炎による死亡もめずらしくない。しかしながらその疫学や病態についてのデータは少ない。

本研究では日本臨床内科医会インフルエンザ研究班が実施しているインフルエンザ研究における肺炎例の情報を集め、肺炎及び重症肺炎の発

生やリスクファクター、有効な治療、予後などについて検討を行う。また、九州地区における協力病院でのデータや、厚生労働省が行っているサーベイランス事業のデータを参照し、重症肺炎の治療法やガイドラインについて考えることを目的とする。

B. 研究方法

日本臨床内科医会インフルエンザ研究班の研究は、日本臨床内科医会に所属する全国の医療機関の中で研究への参加を希望した医療機関による研究である。その研究対象はインフルエンザを疑って迅速診断が実施された外来患者である。研究への協力について同意が得られた患者について、迅速診断の結果が陽性、陰性に関わらず原則としてウイルスの分離とPCR法によるインフルエンザウイルス検出が実施されている。検体としては鼻腔拭い液、咽頭拭い液、鼻腔吸引液、鼻汁・鼻かみ液を用い、ウイルス分離は標準的な方法でMDCK細胞を用いて実施している。PCRには、H1N1pdm09および季節性インフルエンザのAH1N1、AH3N2、B、それぞれのインフルエンザウイルスに特異的なプライマーを用いている。入院や肺炎に

関する情報は、主として患者本人及び家族よりの聞き取りによって行われている。

(倫理面への配慮)

被験者に対しては本研究の目的等を十分に説明し、文書または口頭で同意が得られた患者のみを対象とした。登録基本データは ID、イニシャル、性別、生年月日とし、個人名や住所などの個人の特定につながる情報は記載しなかった。また、臨床検体については別に ID 番号を設定し、第三者が個人の特定をできないように配慮を行った。

C. 研究結果

2011-12 年流行期に登録されたインフルエンザ患者は A 型が 340 例、B 型が 126 例であった。A 型は全例 H3N2 型で A (H1N1) pdm09 はみられなかった。肺炎あるいは入院の報告は 4 例で全員 H3N2 型であった(表 1)。肺炎は 2 例で全体における割合は 0.4%であった。患者の年齢は 6 才と 71 才であり男性 1 名女性 1 名であった。入院の報告は 2 例で 74 才の男性と 82 才の女性であった。70 才以上における肺炎あるいは入院の割合は 15%(3/20)と高率であった(図 1)。

福岡県におけるインフルエンザ入院サーベイランスでは 350 人の報告があった(表 2)。その中で ICU 入室が 8 例、人工呼吸器の利用は 3 例となっている。それらの年齢分布をみると 1 才から 9 才と 70 才以上に集中していた。

九州地区における病院の入院した肺炎患者の 2010 年 11 月から 2011 年 4 月までの調査からは 146 例の入院データが得られた(表 3)。この中でインフルエンザ迅速診断キットが陽性であるという事が確認されている。インフルエンザである事が確認された 6 例は 1 月から 4 月にみられており、流行がみられていた 1 月及び 2 月にそれぞれ 2 例と 3 例と多かった。

D. 考察

重症肺炎はインフルエンザにおける重要な合併症であり、その対策はインフルエンザ対策、特に新型インフルエンザ対策において重要な課題であるということはいままでのない。ノイラミニダーゼ阻害薬を用いた発症から 48 時間以内の治療により、肺炎の発症頻度は大幅に低下したと考えられているが、実際の肺炎や重症インフルエンザの発生についてのデータは少ない。日本臨床内科医会インフルエンザ研究班の調査では 466 例のウイルス分離による確定例において 2 例の肺炎と

2 例の入院が報告されている。年齢をみるとやはり 70 才以上が 3 例であり高齢者において発症頻度が高いことが確認された。

何故高齢者においてインフルエンザの発症頻度が低いのに肺炎や重症例が多いのかについて、そのメカニズムは不明である。今回の調査結果では必ずしも糖尿病などの基礎疾患が重要な因子とはなっていなかった。慢性疾患を持たない高齢者においても肺炎や入院が少なからず起こることを認識する必要があると思われる。高齢者人口が今後も増加することを考えると新型インフルエンザ発生時に高齢者にも多数の発症者が出る可能性があり、その対策については十分な検討が必要と思われた。

今回の研究の直接的な結果ではないが、福岡県におけるインフルエンザ入院サーベイランスの結果でも ICU 入室や人工呼吸器の利用が 70 才以上と 1~9 才に集中していることをみると、高齢者におけるインフルエンザ予防と肺炎の発症を予防するための治療が重要であると思われる。また、九州地区における入院肺炎の調査でインフルエンザと診断された肺炎入院患者がインフルエンザ流行と時期を同じくして増加している。新型インフルエンザ流行時にその流行の速度を低下させる対策やそのピークにおける発生患者数を低下させる対策は重症インフルエンザ患者の治療対策の一つとして重要な因子であると考えられる。

E. 結論

(1) インフルエンザ罹患時の肺炎や入院はノイラミニダーゼ阻害薬を用いた早期治療が普及した現在でもその頻度は低いが発生しており、特に 70 才以上ではその頻度が高い。

(2) ICU 入室や人工呼吸器が使用された重症例は 70 才以上で特に多く、重症化のメカニズムについては年齢という因子を考慮した研究が必要である。

(3) 重症例や肺炎例の発生はインフルエンザ自体の流行に関連しておりインフルエンザの流行対策は間接的に重症インフルエンザの治療体制を考える上で重要な点であると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ikematsu, H., N. Kawai, and S. Kashiwagi. In vitro neuraminidase inhibitory activities of four neuraminidase inhibitors against influenza viruses isolated in the 2010-2011 season in Japan. J Infect Chemother, 2012. 18(4): p. 529-33.

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): p. 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): p. 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, 2012.

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 2012-2013 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). 日本臨床内科医会誌 27 巻 2 号臨時付録, 2012

2. 学会発表

池松秀之. インフルエンザウイルス感染症. 第 109 回 日本内科学会講演会 (京都) 2012.4.15

池松秀之. インフルエンザ診療の進歩. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会 (長崎), 2012.4.25

池松秀之. 50 歳以上の急性呼吸器感染患者におけるインフルエンザの臨床症状および社会経済的影響の検討. 第 86 回日本感染症学会総会・学

術講演会 (長崎) 2012.4.25

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

池松秀之. インフルエンザにおける迅速診断キットと HI 抗体価測定の結果. 第 26 回日本臨床内科医学会 (徳島) 2012.10.7

池松秀之. 最近のインフルエンザの流行状況と抗インフルエンザ薬の有効性. 第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 / 第 59 回日本化学療法学会東日本支部総会 (東京) 2012.10.12

池松秀之. インフルエンザの診断と治療. 第 60 回日本化学療法学会西日本支部総会 / 第 55 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 / 第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 (福岡) 2012.11.05

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1 2011-12年流行期における肺炎合併例および入院例(A/H3 340例、B型 126例)

年齢 (yr)	性	型・ 亜型	体重 (kg)	合併症	転帰	治療薬	発症から 治療開始 まで	CRP	WBC	昨年 罹患	ワクチン		基礎疾患
											昨年	今年	
6	F	A/H3	23	肺炎	外来 治癒	L	27 hr	N/A	N/A	なし	なし	なし	なし
71	M	A/H3	50	肺炎	外来 治癒	P	1 hr	5.3	4800	なし	1回	1回	心疾患、脳卒中
74	M	A/H3		喘息 発作	入院 治癒	P	43 hr	6.8	8200	なし	1回	1回	気管支喘息、脳卒中、 糖尿病
82	F	A/H3	67.4		入院 治癒	P	2.5 hr	1.6	7000	なし	1回	2回	気管支喘息

L : laninamivir P : peramivir

図1 最近2シーズンの各年代におけるH3N2とBの患者数 (PCR確定例)

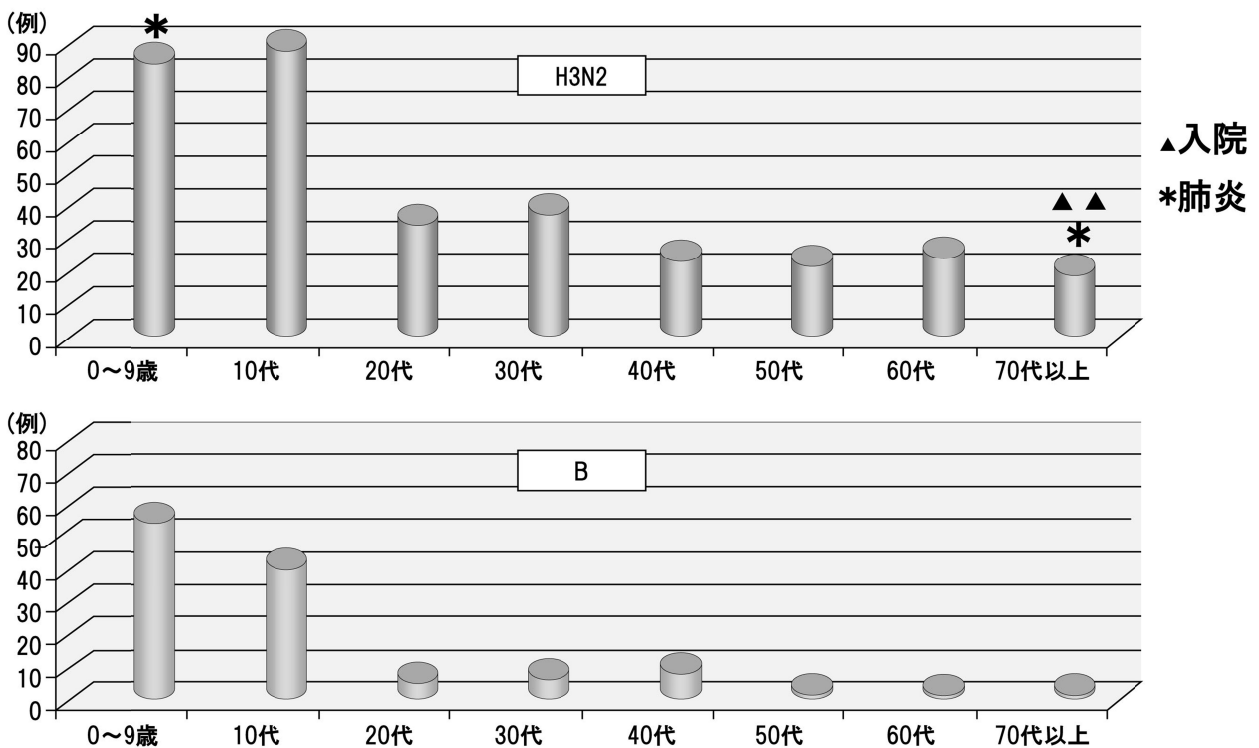


表2 福岡県におけるインフルエンザ入院サーベイランス2012年

年齢	1歳未満	1～4歳	5～9歳	10～14歳	15～19歳	20～29歳	30～39歳	40～49歳	50～59歳	60～69歳	70～79歳	80歳以上	計
ICU入室	0人	2人	3人	0人	0人	0人	0人	0人	0人	0人	1人	2人	8人
人工呼吸器の利用	0人	0人	1人	0人	0人	0人	0人	0人	0人	0人	0人	2人	3人
頭部CT検査、頭部MRI検査、脳波検査のいずれかの実施(予定含む)	2人	15人	14人	0人	0人	0人	0人	1人	0人	1人	4人	7人	44人
いずれにも該当せず	19人	66人	25人	16人	9人	4人	5人	5人	11人	20人	47人	68人	295人
計(一部重複あり)	21人	83人	43人	16人	9人	4人	5人	6人	11人	21人	52人	79人	350人

表3 九州地区における肺炎入院患者の月別解析

入院日	Flu+			Flu-			Unknown(2)			総数
	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total	
2010年11月	0	0	0	3	0	3	16	5	21	24
2010年12月	0	0	0	4	1	5	13	9	22	27
2011年1月	2	0	2	4	6	10	4	8	12	24
2011年2月	2	1	3	5	9	14	6	5	11	28
2011年3月	0	0	0	3	4	7	10	7	17	24
2011年4月	0	1	1	3	1	4	11	3	14	19
小計	4	2	6	22	21	43	60	37	97	146

H5N1 およびパンデミックウイルスの ウイルス学的解析

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨

近年、インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性変異として、NA 蛋白質の 117 番目のアミノ酸のイソロイシンからバリンへの変異が明らかになった。そこで、このアミノ酸変異を H5N1 ウイルスに導入し、in vitro、in vivo、in silico で解析した。その結果、117 番目のアミノ酸変異は、ウイルスとオセルタミビルとの結合親和力を弱め、生体内でのオセルタミビル感受性を低下させていることが明らかとなった。

A. 研究目的

抗インフルエンザ薬のオセルタミビルは、インフルエンザの治療に広く使われている。オセルタミビル耐性に関与するウイルス変異として、NA 蛋白質の 274 番目、292 番目のアミノ酸変異が知られているが、近年、117 番目のアミノ酸のイソロイシンからバリンへの変異もオセルタミビル耐性に関与することが明らかになってきた。しかし 117 番目のアミノ酸変異は、オセルタミビル治療中に出現したものではなく、家禽からの分離株で見つかったものであり、その耐性機序は不明な点が多い。そこで、117 番目のアミノ酸変異による耐性化のメカニズムを明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

B. 研究方法

本研究では、遺伝的背景の異なる H5N1

ウイルス 3 株を用いた。

- ・ A/Vietnam/1203/2004
(VN1203, クレード 1)
- ・ A/duck/Vietnam/TY114/2007
(TY114, クレード 2.3.4)
- ・ A/Vietnam/UT31412II/2008
(VN31412, クレード 2.3.4)

各ウイルスの NA 蛋白質の 117 番目のアミノ酸を、イソロイシンからバリンに変えたウイルス (NA-I117V) を作製した。これらのウイルスの NA 酵素活性やオセルタミビル感受性を、in vitro、in vivo および in silico で、それぞれの親株と比較解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、東京大学医科学研究所実験動物委員会の承認のもと、東京大学動物実験規則に従って実施した。

情報は有用となる。

C . 研究結果および考察

in vitro において、NA-I117V 変異による NA 酵素活性は 3 株とも親株と比べ大きな変化はなかったが、オセルタミビル感受性は 1.3-6.3 倍と、わずかであるが低下した。

in vivo では、マウスにおけるオセルタミビル感受性試験により、VN1203 NA-I117V ウイルスと VN31412 NA-I117V ウイルスの 2 株で、親株に比べ感受性が低下した。

さらに、in silico では、分子動力学シミュレーションにより、NA-I117V の変異が NA 蛋白質の 118 番目のアルギニンと、オセルタミビルのカルボキシル基との水素結合を弱め、ウイルスとオセルタミビルの結合親和力の低下をもたらすことが示唆された。

これらの結果から、NA の 117 番目のアミノ酸変異は、オセルタミビルとウイルスの結合親和性を弱めることにより、生体内でのタミフル感受性を低下させていることが明らかとなった。

D . 結論

本研究により、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの NA-I117V によるオセルタミビル耐性メカニズムの新たな知見が得られた。今後、H5N1 ウイルスに感染した患者を治療する際にも本研究で得られた

E . 研究発表

1 . 論文発表

Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le MQ, Sekijima M, Ito K, Takada A, Kawaoaka Y. Molecular mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the neuraminidase of subtype H5N1 avian influenza A viruses. J Infect Dis 207:89-97, 2013.

Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawoaka Y. Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1. J Infect Dis 207:262-271, 2013.

2 . 学会発表

該当なし

F . 知的所有権の取得状況

該当なし

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）
分担研究報告書

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に
関する研究（重症肺炎・脳症の実験病理学的研究）

研究分担者 新矢恭子 神戸大学・准教授

研究要旨

インフルエンザ脳症（IAE）のメカニズムはまだ不明な点が多い。本研究では、IAV 感染とリポ多糖（LPS）の重投与で、マウスの IAE 様モデルを作成した。本マウスモデルでは、対照群に比べて約 3 倍の脳浮腫と血清中サイトカイン濃度が観察された。遺伝子発現プロファイリングでは、一部の主要なサイトカイン関連遺伝子は脳内で発現上昇しておらず、血液脳関門（BBB）の破壊に関与するとされている蛋白質分解酵素の関連遺伝子の発現上昇が顕著だったことが判明した。遺伝子オントロジー（GO）でイオンチャネル、カルシウム、および膜輸送活動関連に分類される機能群が多く抽出された。したがって、本研究における IAE モデルの BBB 破壊は、サイトカインストームに加えて、神経組織の細胞内電解質の不均衡によって影響を受けている可能性があると考えた。

A . 研究目的

インフルエンザ脳症は、複数の症候群（亜型）の集合体であり、その原因も複数の要因が関わっていると考えられる。近年、マイクロバイオームという概念が提唱され、人体の生物学的恒常性維持における細菌叢の重要性が指摘されている。本研究では、細菌の LPS 暴露後のインフルエンザウイルス重感染を想定し、その脳浮腫発症における影響を調べ、脳内遺伝子発現プロファイリングを行った。

B . 研究方法

ウイルス： A/Puerto Rico/8/34; H1N1。 50% マウス致死量（MLD50）は、 6×10^2 pfu/50 μ l。
動物： Balb/c マウス、SPF、5 週令、雌。

実験計画：マウスを 4 グループに分類（ PBS、インフルエンザ（IAV）、 LPS、 LPS+IAV ）し、まず、PBS または LPS（ 1.25mg/kg, 100ul volume in PBS ）を経鼻投与し、12 時間後に、PBS または IAV（ 100 MLD50 in 50ul PBS ）を経鼻投与した。2 日後に、エバンスブルー（ EB ; 2% in PBS ）を腹腔内投与した後、安楽死させ詳細な検索を行った。

（倫理面への配慮）本実験は、学内の動物実験承認を得た（承認番号： P110910）。

脳浮腫の検証：マウスの脳 1.54g を、500 μ l ホルムアミド内で 2 日間 38 °C で EB を抽出した（ 630nm 波長フィルターで測定 ）。

免疫染色（ IHC ）：肺と脳組織を 10% 中性緩衝

ホルマリンで固定し、常法に従って、パラフィン包埋した。薄切片に対し、抗 H1 ウイルス抗体を用いた免疫染色を行った。

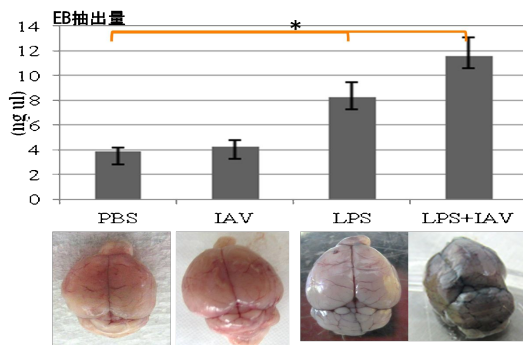
ウイルス学的検索：MDCK 細胞を用いたブラック法を行った。

血清サイトカイン濃度測定：血清 50 μ l を用いて ELISA 法により IL-6 および TNF- α 濃度を測定した (Quantikine Mouse Immunoassay; R&D Systems, USA)。

RNA 抽出とマイクロアレイ解析：脳幹部分を採取し、全 RNA 抽出キットにて RNA を抽出した (Agilent Technologies, USA)。タカラバイオにマイクロアレイ解析を委託した (Agilent Expression Array、SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray)。データマイニングは、Subioplatform (Subio Inc., Japan) を活用した。その後、Gene ontology (GO) 解析を行った (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)。

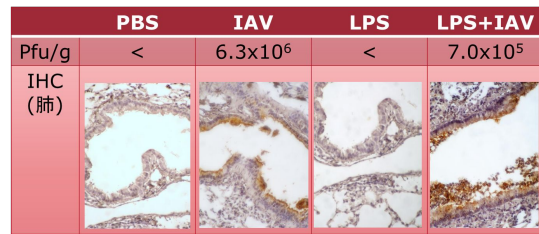
C . 研究結果

脳浮腫の評価：LPS + IAV 群において、他群と比較して強い脳浮腫が認められた (図 1)。



(図 1)

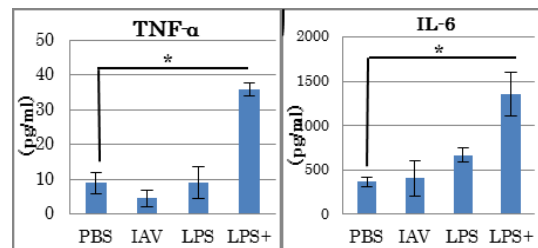
ウイルス学的/病理学的検索結果：ウイルス感染群では、LPS 処理の有無に関わらず肺へのウイルスの感染が確認された。脳ではウイルスが検出されなかった (図 2)。



<: 検出限界以下

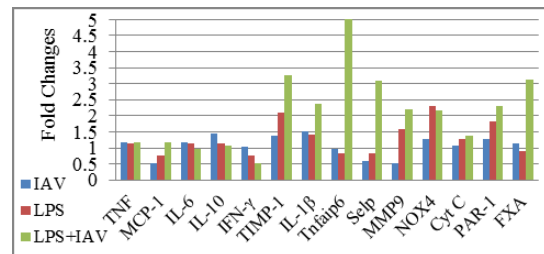
(図 2)

血清中サイトカイン濃度：LPS+IAV 群において、血清中、IL-6・TNF- α の著しい増加が見られた (図 3)。



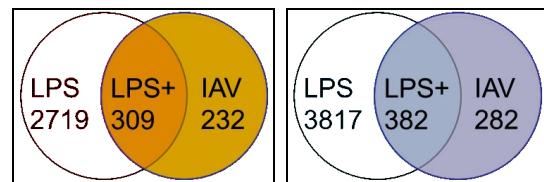
(図 3)

脳内遺伝子発現：TNF- α 、IL-6、IL-10 などの主要サイトカイン関連の遺伝子は変動がなかった (図 4)。上記結果より、本モデルでは、インフルエンザ感染を伴った脳症の病態が再現されていると判断した。



(図 4)

LPS+IAV 群に特異的な遺伝子動態として、309 個の発現上昇、382 個の発現減少が観察された (図 5)。



(図 5)

GO 解析によって、LPS+IAV 群に特異的に発現変動している遺伝子群は、主に、channel

activities、calcium、ion 等であることが判明した (表 1)。

表 1

- calcium ion binding
- passive transmembrane transporter activity
- substrate specific channel activity
- ion channel activity
- gated channel activity
- cation channel activity
- voltage-gated channel activity
- Voltage-gated ion channel activity
- SH3 domain binding
- calcium channel activity
- ion binding
- metal ion binding

Up-regulated Gene Expression

- calcium ion binding
- channel activity
- passive transmembrane transporter activity
- substrate specific channel activity
- ion channel activity
- calcium channel activity
- cation channel activity
- ion binding
- gated channel activity
- metal ion binding
- voltage-gated channel activity
- Voltage-gated ion channel activity
- SH3 domain binding

Down-regulated Gene Expression

D . 考察

本モデルでは、IAV または LPS の単独投与時よりも、重投与時において、強い脳浮腫が惹起されることが示された。この病態には血清サイトカイン量の増加も伴っていた。ただし、脳組織内での主要サイトカイン関連遺伝子にはあまり変化が見られなかった。脳浮腫病態発現において、高サイトカインの一次供給場所が末梢で、中枢は末梢の高サイトカイン発現に対する二次的な反応である可能性が示された。

また、本モデル解析により、主要な発現

変動遺伝子が、calcium、ion および channel の機能に分類されることが判明した。Ca²⁺ は、BBB における機能的恒常性維持に重要であると言われており、本 IAE モデルの BBB 破壊には、サイトカインに加えて、神経組織の細胞内電解質の不均衡が影響している可能性があると考えた。

E . 結論

本モデルは、ひとつの IAE 病態モデルとなり得ると考える。本モデルにおける BBB 破壊は、血中高サイトカイン濃度に加えカルシウム代謝の不均衡が関与している可能性がある。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Shinya K, et al., Integrated clinical, pathologic, virologic, and transcriptomic analysis of H5N1 influenza virus-induced viral pneumonia in the rhesus macaque J Virol. 2012; 86(11): 6055-66.

2 . 学会発表

該当なし。

G . 知的所有権の取得状況

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。

インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析

分担研究者 蒔田泰誠

所属・役職 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・チームリーダー

研究要旨

インフルエンザ脳症の発症に関連する遺伝子を、全ゲノム領域を対象とした一塩基多型 (SNP) 解析にて同定し、インフルエンザ脳症の発症リスクを事前に予測するツールを開発することを目的としている。本年度は、候補遺伝子解析として、インフルエンザ脳症や熱中症の発症リスクと関連することが報告されている carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) 上の SNP について関連解析を実施した。

A. 研究目的

日本においてインフルエンザの学童罹患数は、年間 50 万から 100 万人である。そのうち 100 から 300 人がインフルエンザ脳症を合併する。インフルエンザ脳症の死亡率は 30%前後と高く、生存例においても重篤な後遺症を残す症例が多いため社会的関心が高まっている。

インフルエンザ脳症の詳細な発症機序は不明であるが、日本人での報告が多いことから遺伝的因子が関与していると考えられる。本研究では、インフルエンザ脳症の発症リスクに関連する遺伝子を同定するため、一塩基多型 (SNP) を用いて、全ゲノム領域を対象とした関連解析 (genome-wide association study: GWAS) を行う。インフルエンザ脳症の発症における遺伝的背景を解明することができれば、ハイリスク群を事前に特定でき、ワクチン接種等の積極的な予防が可能となる。また、感受性遺伝子の同定は、インフルエンザ脳症の新たな治療法の開発にもつながることが期待される。

B. 研究方法

研究対象

インフルエンザ脳症を発症した 1 歳以上の日本人小児 85 症例。コントロール群には日本人一般集団 940 例を用いた。

SNP 解析

本年度は、日本人においてインフルエンザ脳症や熱中症の発症リスクと関連することが報告されている carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) (Chen *et al.* *FEBS Lett* 579:2040-4 (2005)) について、アミノ酸置換を伴う 3 SNP (F352C、I368V、M647V) のケース - コントロール関連解析を行った。また、国際 HapMap データベースの情報に基づいて CPT2 周辺領域の 17 箇所の TagSNP を抽出し、関連解析を行った。

(倫理面への配慮)

1. 研究等の対象とする個人の人権擁護

本研究に同意するか否かは本人 (対象が 16 歳未満の場合は、本人および代諾者) の全くの自由意志に委ねられ、同意しない場

合であってもいかなる不利益も被ることはないことを保証する。本研究は連結可能匿名化を行う。個人識別情報は、担当者が厳重に保管・管理し、外部へは決して提供しない。また、同意はいつでも撤回できることを保証する。同意が撤回された場合は、すみやかに検体をオートクレーブにかけ廃棄する。

II. 研究への参加者に理解を求め同意を得る方法

検体の提供を受ける際には、説明文書を用いて提供者（16歳未満の場合は、提供者および代諾者）との質疑応答を経て、本研究についてじゅうぶんに理解されたことを確認した後に同意を得る。これらの説明文書では、本研究の意義、目的、遺伝子解析などについて解説し、プライバシーの保護の方法、提供者の権利、研究に協力することの利益と不利益、本研究終了後の検体の取り扱い方針について説明する。同意をいただいた方には、同意書に自署をお願いする。同意書は、鍵のかかるロッカーにて厳重に保管・管理する。

III. 研究によって生じる個人への不利益ならびに危険性と科学的な貢献の予測

本研究成果により、インフルエンザ脳症の感受性遺伝子が同定されれば、ハイリスク群をスクリーニングすることが可能となる。インフルエンザの感染予防に対してはワクチンの接種という非常に有効な予防法が存在するため、ハイリスク群に対しては積極的にワクチン接種をすすめることにより、インフルエンザ脳症の罹患を予防することが可能となる。

また、感受性遺伝子の同定は、その遺伝子またはカスケードをターゲットとした新たな治療法の確立にも貢献すると確信する。個人情報の漏洩により人権の侵害を被る

可能性があるが、本研究では、担当者が個人情報と厳重に保管・管理し、個人情報・プライバシーの保護には万全をつくす。

インフルエンザ脳症は、ほとんどが10歳までの発症であり、遺伝的背景を研究することは、患者の健康に対して利益はあるものの、その後の社会的な不利益や危険性があるとは常識的に考えられない。

IV. 遺伝カウンセリング体制の整備

個人情報の管理に記したように、本研究の結果を提供者が知ることにより提供者や血縁者の生命の危機を回避できる可能性がある。この場合には、遺伝子情報を提供者や家族に報告する可能性がある。そのような遺伝情報を知ることが、生命危機を回避することを目的にしているため、患者および家族の利益となるが、そのことを正確に理解し、受け入れることを支援するために日本遺伝カウンセリング学会認定医が遺伝カウンセリングを行う体制を整備している。

V. 研究終了後の検体の取り扱い

提供者の承諾が得られた場合に限り将来の本研究以外のインフルエンザ脳症に関連した医学研究に用いることがある。ただし、その場合は連結不可能匿名化を行う。研究終了後の保管に関しては、説明文書を用いて提供者（16歳未満の場合は、提供者および代諾者）に十分説明する。

研究終了後の検体の保管を承諾されなかった場合には、すみやかに検体をオートクレーブにかけ破棄する。

C. 研究結果

CPT2上の3箇所のSNP (F352C、I368V、M647V)において、インフルエンザ脳症の発症リスクとの関連が報告されているType 9 (F/C、I/V、M/M)の遺伝子型頻度には、ケース群 (7.1%) とコントロール群 (10.9%)

との間で有意な差は見られなかった。また、*CPT2* 周辺領域の TagSNP 解析を実施したが、インフルエンザ脳症の発症リスクとの有意な関連は見られなかった。

D . 考察

今後は、以前実施した、日本人小児インフルエンザ脳症患者を対象とした GWAS における、新たな DNA サンプルを用いた replication study の継続、インフルエンザ脳症の発症メカニズムに関連すると考えられる候補遺伝子についての解析を実施する予定である。

E . 結論

日本人小児インフルエンザ脳症患者を対象とした、SNP を利用した *CPT2* の関連解析において、発症リスクとの有意な関連は見られなかった。

F . 研究発表

なし

G . 知的所有権の取得状況

なし

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）
分担研究報告書

サイトカインによる肺微小血管内皮細胞機能障害とその抑制

研究分担者 森島恒雄

研究協力者: 斎藤有希恵、山田睦子、藤井洋輔、八代将登、塚原宏一
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学)

研究要旨

インフルエンザウイルス A/H1N1 2009 pdm 感染では、ARDS や鑄型気管支炎を合併した症例報告の増加が特徴的であった。ARDS など肺血管透過性の亢進に対する効果的な薬物療法は確立されておらず、今回我々はサイトカインや種々の薬物が肺血管透過性に及ぼす影響について in vitro で検討した。

結果: インフルエンザ感染時に産生されるサイトカインによって、肺血管透過性は亢進した。ステロイドやエダラボン、NOS 阻害剤の前投与によって透過性の亢進は抑制された。免疫蛍光抗体法でステロイドやエダラボンによる細胞間接着の構成分子の強化作用が示唆された。

結論: 脳症や ARDS などの重症インフルエンザ感染症では、血管透過性の亢進が病態に関与している。ステロイドやエダラボン投与により、血管透過性そのものを改善できる可能性が示唆された。高病原性トリインフルエンザなどの病態解析や治療開発にも応用可能と考えられた。

A. 研究目的

2009 年に流行したインフルエンザウイルス A/H1N1 pdm 感染では、小児や基礎疾患を有する患者を中心に重症肺炎を呈する症例が多くみられた。また、ARDS や鑄型気管支炎を合併した症例報告の増加が特徴的であった。

ARDS など、肺血管透過性の亢進が関与していると考えられる病態の効果的な薬物療法は確立されておらず、今回我々はヒト肺由来微小血管内皮細胞を用いて、インフルエンザウイルスやサイトカイン、種々の薬剤が肺血管透過性に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

透過性はボイデンチャンバーを用いて評価した。2 層のウェルで、底面に 3 μm の pore があいた膜で構成される上室に肺微小血管内皮細胞を培養し、3 日後、コンフルエントの状態に達した。刺激物質を含む培地に交換した。24 時間後、上室に蛍光標識したデキストランを投与し、2 時間後に下室に漏れ出したデキストランの蛍光度を測定した。透過性の評価は Permeability Index = [experimental clearance]

- [spontaneous clearance] / [clearance of filter alone] - [spontaneous clearance] × 100 として計算し比較した。また、透過性の変化が起こる機序について、mRNA の発現変化や、細胞間接着の構成分子の変化を検討した。

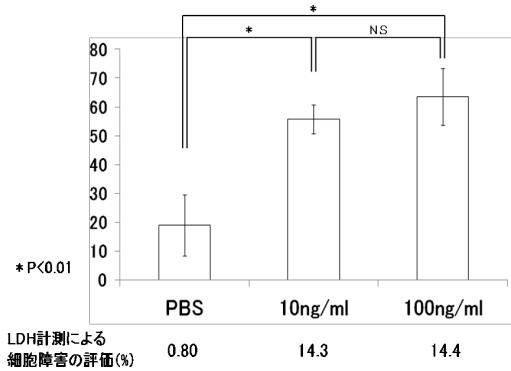
C. 研究結果

インフルエンザウイルスのヒト肺毛細血管内皮細胞での増殖は確認できなかった。TNF- α +IL-1 (各 10ng/ml) 投与によって血管透過性は亢進した(図 1)。デキサメサゾン(100 μM)やフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボン(100 μM)、NO 合成酵素阻害剤の L-NMMA(100 μM)を前投与することで、サイトカインによる透過性亢進は抑制された(図 2, 3, 4)。

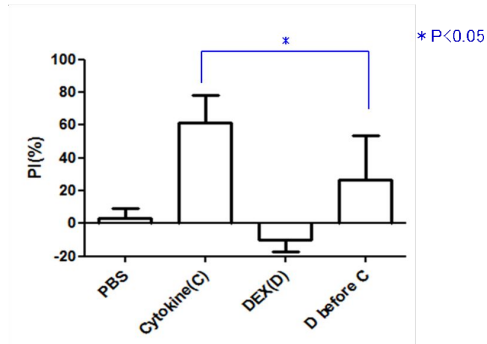
TNF- α +IL-1 投与後、経時的に mRNA の発現変化を検討した。MMP-9 は 24 時間後までに mRNA の発現変化は認められず、培養上清の蛋白も感度以下であった。一方、TNF- α +IL-1 投与後 1~3 時間後から、ICAM1、VCAM1、IL-8、MCP-1 といった接着分子やケモカインの mRNA 発現が増強し、培養上清中の蛋白濃度も上昇を認めた。

デキサメサゾンやエダラボンの前投与群では、サイトカインのみ投与した群と比較して、免疫蛍光抗体法で adherence junction の主要な構成分子である VE-Cadherin や tight junction の構成分子である ZO-1 が保持されていた(図 5, 6)。また、サイトカイン投与 3 時間後のリアルタイム PCR で、デキサメサゾンとエダラボンの前投与群ではサイトカインのみの群と比較して有意に ZO-1 発現の増強を認めた(図 7)。

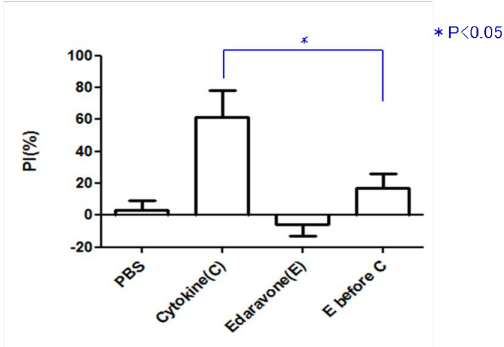
(図1) TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



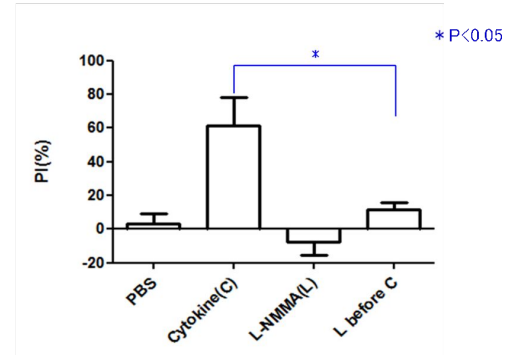
(図2) Dexamethasone(100 μ M) 前投与下での TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



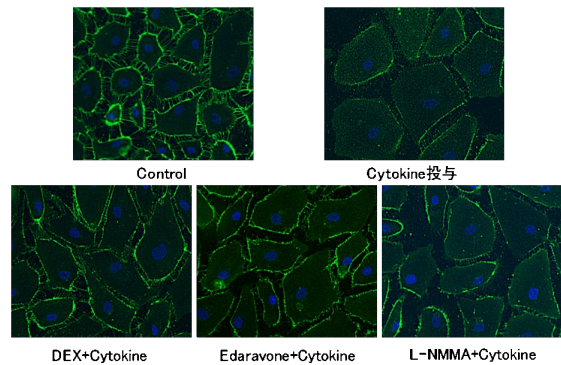
(図3) Edaravone(100 μ M) 前投与下での TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



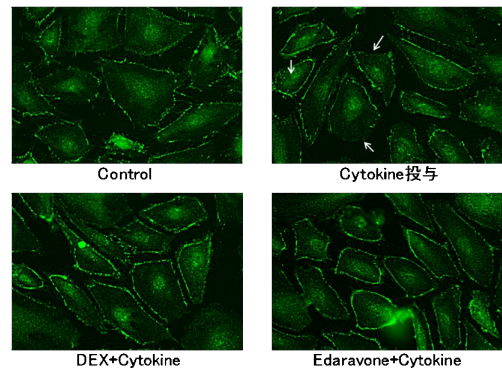
(図4) L-NMMA(1mM) 前投与下での TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



(図5) TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の VE-Cadherin の変化

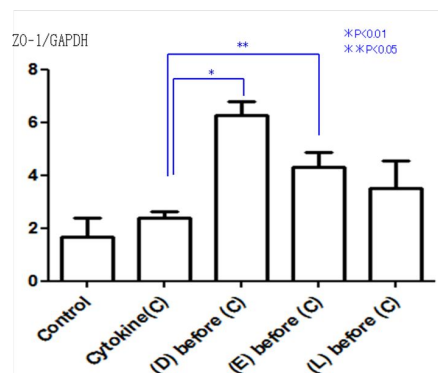


(図6) サイトカイン添加24時間後のZO-1 の変化



(図7) ZO-1 mRNA の変化

②薬剤+サイトカイン投与3h後のリアルタイムPCR



D. 考察

我々は以前の報告(Tsugeら)で、サイトカイン(特にTNF- α)によるMMP-9の高発現が脳血管関門の破壊につながることを示しているが、肺微小血管内皮細胞では、透過性亢進時にMMP-9のmRNA発現は誘導されず、脳血管とは異なる機序が推定された。

デキサメサゾンやエダラボンによる透過性の抑制の1つの機序として、VE-Cadherinの保持作用やZO-1発現増強を介した細胞間接着機能の回復促進作用が考えられた。ヒトの臍帯静脈血管内皮細胞において、エダラボン投与によりadherence junctionの構成分子の発現が増強し電気抵抗が上昇することが報告されており、今回の肺血管内皮細胞でも同様の結果が得られた。

E. 結論

インフルエンザウイルス感染時に産生されるTNF- α およびIL-1により肺血管透過性は亢進し、ステロイドやエダラボン、NOS阻害剤の前投与によって抑制された。透過性亢進には脳血管とは異なる機序が推定された。ステロイドやエダラボンによる透過性の抑制は、adherence junctionやtight junctionの構成分

子の強化によることが示唆された。これらの研究は、肺障害性の高い高病原性トリインフルエンザなどの病態解析や治療開発にも応用可能と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)

2. 学会発表

(1) 齊藤有希恵, 津下 充, 藤井洋輔, 長岡義晴, 八代将登, 塚原宏一, 森島恒雄. サイトカインによる肺血管内皮細胞機能障害のメカニズム. 第44回日本小児感染症学会, 小倉, 2012年(11月).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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

研究分担者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所・感染病理部 部長
研究協力者 中島 典子 国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官

研究要旨：

2000年から2012年まで国立感染症研究所・感染病理部に病理学的検索を依頼されたインフルエンザ死亡例のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）標本を解析した。近年、パラフィン包埋組織からも効率よく核酸が抽出できるようになり、リアルタイム RT-PCR 法による定量解析が可能となった。新しい解析法によりインフルエンザウイルスのゲノムは呼吸器官に限定して検出され、インフルエンザ脳症の剖検脳組織切片からは検出されないことが再確認された。季節性インフルエンザで併発する肺炎の肺組織において、肺胞上皮細胞にウイルス抗原は検出されない。パンデミックインフルエンザの一部の剖検組織では病理組織学的にび慢性肺胞障害を呈し、肺胞上皮細胞にウイルス抗原が検出された。ウイルス側の重症化因子として肺胞上皮細胞に感染するクローンの場合はウイルス性肺炎を併発し重症化すること挙げられる。インフルエンザ脳症の発症機構の1つにサイトカインストームが関与していることが推測されているが、血液および髄液中の IL-6 値が非常に高かった脳症例では、パラフィン包埋肺組織と脳組織における IL-6 mRNA 量を比較すると脳組織で発現がより高いことがわかった。

A. 研究目的

一般に、インフルエンザで死亡する例は高齢者に多く、二次性の細菌性肺炎の併発や基礎疾患の増悪が原因と考えられており、剖検組織の病理学的解析はほとんどされてこなかった。2000年以降は小児の脳症死亡例が増加し、脳症の病態の解析が急務となり、インフルエンザ剖検例の報告がみられるようになった。さらに致死率 50%以上の鳥インフルエンザや 2009 年のパンデミックインフルエンザによる死亡例の病理学的解析の報告が加わり、重症インフルエンザの病態の解明に助けとなる知見が集積しつ

つある。本研究班において我々の分担研究の目的は、集積されたインフルエンザ剖検組織の解析により重症インフルエンザの病態を解明することである。これまで国立感染症研究所に依頼され検査したインフルエンザ脳症、インフルエンザに併発する心筋炎、H5N1 インフルエンザ、パンデミックインフルエンザなどの剖検組織標本を新しい分子病理学的解析などにより再度解析し、新しい知見を得たいと考えている。

B. 研究方法

1. 材料：2000年から2012年まで国立感

染症研究所・感染病理部に病理学的検索を依頼されたインフルエンザウイルス感染症死亡例のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）病理標本。

2. 方法

ヘマトキシリンエオジン（HE）染色標本による組織所見。

免疫組織化学および *in situ* hybridization 法によるウイルス抗原・ウイルス核酸の体内および組織内分布の解析。

細胞マーカー蛋白抗体との二重染色による感染細胞同定。

FFPE 組織切片中のインフルエンザウイルスおよび IL-6 mRNA などサイトカイン・ケモカインの定量。

C. 研究結果

1. 51 例の発症年代別分布

2000 年から 2012 年まで計 51 例のインフルエンザ死亡例の病理学的検索が依頼された。2000-2002 年では小児脳症例が多く、2009-2011 年ではパンデミックインフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 感染症が 32 例であった(図)。

2. インフルエンザ脳症の病理

脳：19 例の脳症の脳組織において、炎症細胞の浸潤はなく、血管壁の硝子化、血漿成分の漏出と微小繊維素血栓がみられた。一部の神経細胞の変性とグリア細胞反応もみられた。免疫組織化学でウイルス抗原は検出されず、パラフィン切片中のウイルスゲノムも陰性であった。脳病理所見は季節性インフルエンザウイルスによる脳症でも A(H1N1)pdm09 ウイルスによる脳症でも同様であった。

気管・気管支・肺：気管・気管支には炎症所見があり、気管・気管支上皮細胞にインフルエンザウイルス抗原が検出された。肺野においては、肺胞病変は少なく、肺胞上皮細胞にウイルス抗原は検出されなかった。二次性細菌性肺炎の併発例が見られたものはあった。

3. 気管・気管支病変

インフルエンザ死亡例の全例で気管・気管支病変が見られた。上皮の剥離、軽度の炎症、うっ血、出血、浮腫がみられるものから壊死性出血性気管支炎像が見られた例もあった。死亡病日の早い例ではウイルス抗原が気管・気管支上皮細胞や気管支腺上皮細胞に検出された。A(H1N1)pdm09 インフルエンザでは好酸球の浸潤が目立つ例が多かった。

4. 肺病変

A(H1N1)pdm09 インフルエンザの一部の症例は H5N1 インフルエンザの肺胞病変のように、浮腫、硝子膜形成、出血、うっ血、炎症、線維化という一連のび慢性肺胞傷害（DAD）の所見が認められた。病日の早い例では DAD の滲出期病変が、10 病日以降の症例では DAD の増殖期病変が見られた。病日の早い例ではウイルス抗原が肺胞上皮細胞やマクロファージに検出され、インフルエンザウイルスが肺胞上皮細胞に感染し、一次性のウイルス性肺炎を呈していることがわかった。肺胞上皮細胞には 2,3-シアル酸に結合するインフルエンザウイルス亜型のみ感染し、A(H1N1)pdm09 ウイルス感染の一部のクローンと鳥インフルエンザウイルス（H5N1）がこれにあたる。

A(H1N1)pdm09 インフルエンザのその他の症例では季節性インフルエンザの肺病

変のように、DAD は呈さず好中球が浸潤する細菌性肺炎を呈するものや、壊死性出血性気管支炎はあっても肺うっ血、肺水種、肺出血などの非特異的な所見のみの例もあった。ウイルス抗原は気管支から細気管支上皮細胞に検出されても肺胞上皮細胞には検出されなかった。

A(H1N1)pdm09 インフルエンザの重症化因子として気管支ぜんそくが報告されているが、気管支喘息の所見のある肺で、インフルエンザ抗原が気管支上皮細胞の核に検出された症例があった。気道内にはがれおちた気管支上皮細胞、血球、タンパク成分、好酸球、炎症細胞が気道内を充満し、閉塞していた。

5. ウイルスの体内分布

季節性インフルエンザ、A(H1N1)pdm09 インフルエンザともにウイルス抗原は呼吸器官に限局して検出された。ウイルス血症もみとめられなかった。

6. 脳症剖検脳組織における IL-6mRNA の発現

脳症例でも脳組織において IL-6mRNA の発現が亢進しているものから検出されないものまでさまざまであった。血液・髄液中の IL-6 蛋白が高いものでは脳組織での IL-6 mRNA が高かった。

D. 考察

重症インフルエンザとして、肺炎、脳症、臨床的心筋炎(病理所見がない場合が多い)がある。インフルエンザ重症肺炎は原因としウイルスが肺胞上皮細胞に感染して起こる。H5N1 感染例では肺組織におけるサイトカイン・ケモカインの発現が亢進しており、サイトカインストームの関与が考えられた。脳症や心筋炎症状はウイルスの直接作用で

はない。発熱当日や翌日に痙攣や不整脈の症状が出ることも多く、上気道症状のようにすべての感染者に併発するものではないため、何らかの宿主因子が想定される。

E. 結論

パラフィン切片から効率よく核酸を抽出できるようになり、リアルタイム RT-PCR 法や次世代シーケンス法による解析で病理標本から追加情報が得られるようになった。重症インフルエンザの死因は呼吸不全だけではなく、脳症や心機能障害(臨床的には心筋炎の疑い)の場合も多い。ウイルス感染とこれらの症状がどのように関連するか、サイトカイン・ケモカインなどの関与など病理組織を用いて検索していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. [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. 2012 Nov 23. [Epub ahead of print]
2. Aina 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.
3. 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 Jan 13.
4. van Riet E, Aina 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.
5. Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. Blood. 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
6. Ishiwada N, Takada N, Okunishi T, Hishiki H, Katano H, Nakajima N, Kohno Y. Rhabdomyolysis associated with influenza A/H1N1 2009 infection in a pediatric patient Pediatr Int. 2012 Oct;54(5):703-5.
7. Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Yamamoto K, Nakajima N, Sato Y, Aratani Y, Oshima M, Sata T, Kobayashi K, Kawachi S, Nakayama T, Suzuki K. Contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. Microbiol Immunol. 2012 Mar;56(3):171-82.
8. Ohnishi K, Takahashi Y, Kono N, Nakajima N, Mizukoshi F, Misawa S, Yamamoto T, Mitsuki YY, Fu S, Hirayama N, Ohshima M, Ato M, Kageyama T, Odagiri T, Tashiro M, Kobayashi K, Itamura S, Tsunetsugu-Yokota Y. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus Jpn J Infect Dis. 2012;65(1):19-27.
9. 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.
10. 中島典子、長谷川秀樹：
インフルエンザウイルス感染症の病理医学のあゆみ 241 巻 1 号：4/7, 2012
2. 学会発表
- ・ 国際会議
1. Pathological study of formalin-fixed paraffin-embedded lung tissues with H5N1 influenza infection in Vietnam: Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutaka Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy, Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki and Tetsutaro Sata Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management(Second isirv Antiviral Group

Conference) (ハノイ・ベトナム)2012年10月

・国内会議

- 1) 長谷川秀樹: 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 2) 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、相内章、長谷川秀樹、田代真人: 細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 3) 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹: 喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 4) 池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹: 基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 5) 泉地恭輔、相内章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹: 経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 6) 鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹: インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型IgA抗体の性状解析。第16回日本ワクチン

学会学術総会(横浜)2012年11月

- 7) 相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹: 感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響。第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012年11月
- 8) Elly van Riet, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H: Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012年11月
- 9) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T: Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012年11月
- 10) 浅沼秀樹、相内章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代真人: 野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討。第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012年11月
- 11) 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内章、藤本陽、千葉丈: インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究~長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討~第16回日本ワクチン学会

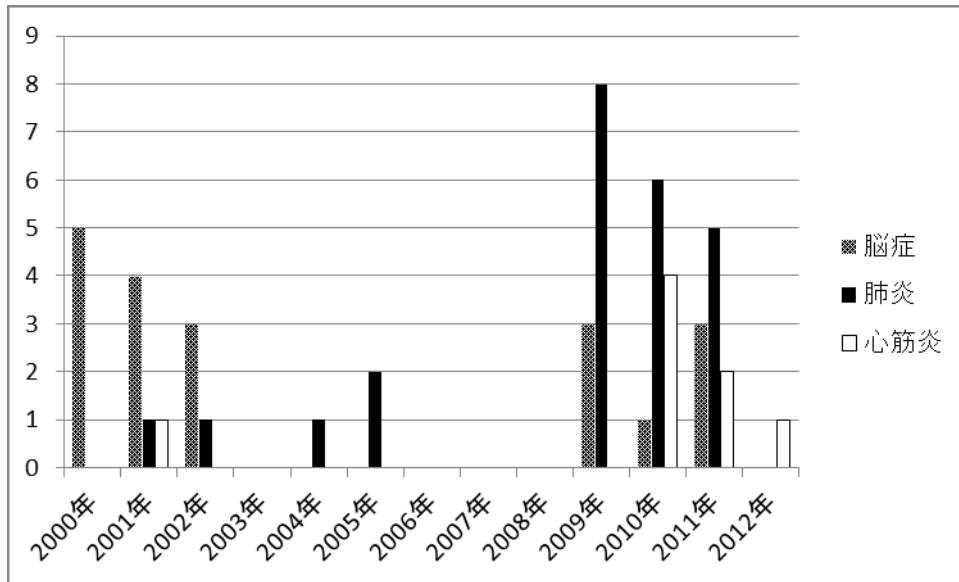
学術総会（横浜）2012年11月

- 12) 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡したベトナム小児例の病理学的解析：中島典子、佐藤由子、片野晴隆、熊坂利夫、佐多徹太郎、長谷川秀樹 第101回日本病理学会総会（東京）2012年4月

G. 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

図 . 2000 年から 2012 年に検索依頼のあったインフルエンザ剖検例



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）
分担研究報告書

喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染による
気管支喘息発作重症化の病態解析

研究分担者 長谷川俊史 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・准教授
研究協力者 市山高志 鼓ヶ浦こども医療福祉センター・副院長
岡田清吾 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・助教

研究要旨

【目的】 2009 年世界的に流行した新型インフルエンザ（2009 pandemic H1N1, A(H1N1) pdm09）は季節性インフルエンザに比し呼吸器合併症が多く、当科においても喘息症例での重症化が多くみられたが、その病態はいまだ明らかでない。本研究ではその病態解明のため、新型インフルエンザ感染喘息マウスの気管支肺胞洗浄液（BAL）を解析した。

【方法】 BALB/c マウスを卵白アルブミンの感作および吸入により喘息モデルマウスを作成し、新型インフルエンザを感染させ、感染後 7 日に BAL を回収した。サイトカイン濃度、ウィルス力価を測定し、喘息感染群、喘息非感染群、非喘息感染群、非喘息非感染群の 4 群間で比較検討した。

【結果】 感染群では非感染群に比し BAL 中 IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ の濃度が有意に高値だった。喘息感染群では IL-6, IL-10, TNF- α 濃度が非喘息感染群に比し有意に高値だったが、IFN- γ 濃度は有意に低値だった。BAL 中ウィルス力価は喘息感染群が非喘息感染群に比し有意に高値だった。

【結論】 新型インフルエンザ感染は喘息モデルマウスにおいてより高いサイトカイン産生およびウィルス増殖を示し、強い炎症を惹起し、呼吸器症状を重篤化させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

新型インフルエンザ（2009 pandemic H1N1, A(H1N1) pdm09）感染では呼吸器症状を主訴に受診する患者が多く、ときに致命的になる。気管支喘息がその増悪因子の一つと考えられているが、その病態の詳細に

については未だ不明である。申請者が当科に入院した新型インフルエンザ感染入院症例について後方視的に検討したところ、季節性インフルエンザに比し、有意に喘息発作、肺炎や無気肺などの肺合併症が多く、また通常の喘息発作症例に比し、高率に重

篤な気管支喘息発作を合併したことを報告した (Pediatr Allergy Immunol, 2011). 肺合併症を来した全例で血清総 IgE 値が上昇しており,このうち約 70%が気管支喘息と診断されていなかった症例や 1 年以上発作のなかった症例であった (Hasegawa S., et al. Pediatr Allergy Immunol, 2011). 以上のことから新型インフルエンザ感染においては季節性インフルエンザと異なり喘息発作の重症化は気管支喘息の重症度と関係なく一見基礎疾患のないようにみえる軽症の気管支喘息であっても重篤な肺合併症の危険因子である可能性が示唆された.しかしその病態は十分解明されておらず, 予防法もまだ確立されていない.

B . 研究方法

卵白アルブミン (OVA) で喘息モデルマウスを作製し, 新型インフルエンザウイルス(マウス馴化株, 国立感染症研究所から分与) を経鼻感染 (1×10^6 pfu/マウス) させ, 感染後 7 日めに気管支肺胞洗浄液を回収し, フローサイトメトリー, プラークアッセイ, サイトカイン測定を行い, 喘息マウスと非喘息マウスの差異について比較検討する.

(倫理面への配慮)

本研究では培養細胞およびマウスを使用する. マウスの感染実験に関しては敷地内に動物実験施設があり, 研究を行っていく上で同施設内の倫理的かつ技術的な講習を受講し, 研究計画審査を受け, 承認を得たあと本研究を遂行した.

C . 研究結果

分担者らは卵白アルブミンを用いて喘息モデルマウスを作製し (喘息モデルマウスの作製は気管支肺胞洗浄液中の細胞増多, 特に好酸球の増多により確認), 新型イン

フルエンザウイルスを感染させたところ非喘息マウスに比して気管支肺胞洗浄液において炎症性サイトカインの interleukin (IL)-6 が有意に高値であった. Tumor necrosis factor (TNF)- および抗炎症性サイトカインの IL-10 も同様の結果であった. 一方で Th1 タイプのサイトカインである interferon (IFN)- 濃度は感染喘息マウスで有意に低値であった. また感染喘息マウスでは非喘息マウスに比して気管支肺胞洗浄液中ウイルス力価が有意に高値であった.

D . 考察

以上の結果から分担者らが作製したモデルマウスは新型インフルエンザ感染喘息モデルマウスでは感染非喘息マウスに比し, 肺において Th1 細胞活性化低下により強いサイトカイン産生およびウイルス増殖を来し, より強い炎症が惹起されることが示唆され, このモデルマウスは小児気管支喘息患者における新型インフルエンザ感染症例のモデルとして矛盾はないと考える.

E . 結論

新型インフルエンザ感染は喘息モデルマウスにおいて非喘息マウスに比して, より強い細胞浸潤やより高いサイトカイン産生, ウイルス増殖を示し, 強い炎症を惹起し, 呼吸器症状を重篤化させている可能性が示唆された.

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Oka M, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Ishikawa N, Isumi H, Ichiyama T. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of children with acute disseminated encephalomyelitis.

- Brain Dev.2012, in press.
2. Hasegawa S, Wakiguchi H, Hirano R, Okazaki F, Kudo K, Ichiyama T. Tau protein levels in children do not increase during severe asthma attack-induced hypoxic conditions. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2012, in press.
 3. 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*. 2012, in press.
 4. Matsushige T, Inoue H, Fukunaga S, Hasegawa S, Okuda M, Ichiyama T. Serum neurofilament concentrations in children with prolonged febrile seizures. *J Neurol Sci*. 2012, in press.
 5. Kudo K, Hasegawa S, Suzuki Y, Hirano R, Wakiguchi H, Kittaka S, Ichiyama T. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits vascular cellular adhesion molecule-1 expression and interleukin-8 production in human coronary arterial endothelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012; 132:290-294.
 6. Inoue H, Matsushige T, Hasegawa S, Abe A, Iida Y, Inoue T, Ichiyama T. Elevation of tau protein levels in the cerebrospinal fluid of children with West syndrome. *Epilepsy Res*.2012, in press.
 7. Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci*. 2012; 320: 145-8.
 8. Haneda Y, Kando N, Yasui M, Kobayashi T, Maeda T, Hino A, Hasegawa S, Ichiyama T, Ito K. Ovomucoids IgE is a better marker than egg white-specific IgE to diagnose boiled egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129: 1681-2.
 9. Shimomura M, Hasegawa S, Seki Y, Fukano R, Hotta N, Ichiyama T. Intravenous immunoglobulin does not increase Fc RIIB expression levels on monocytes in children with immune thrombocytopenia. *Clin Exp Immunol*. 2012; 169: 33-7.
 10. Abe Y, Hashimoto K, Iinuma K, Ohtsuka Y, Ichiyama T, Kusuhara K, Nomura K, Mizuguchi M, Aiba H, Suzuki Y, Mizusawa H, Hosoya M. Survey of subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *J Child Neurol*. 2012; 27: 1529-33.
 11. Wakamoto H, Takahashi Y, Ebihara T, Okamoto K, Hayashi M, Ichiyama T, Ishii E. An immunologic case study of acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures. *Brain Dev*. 2012; 34: 763-7.
 12. Hasegawa S, Ichiyama T, Sonaka I, Ohsaki A, Okada S, Wakiguchi H, Kudo K, Kittaka S, Hara M, Furukawa S. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial

- endothelial cells. Clin Exp Immunol. 2012; 167: 269-74.
13. Tanaka N, Emoto T, Suda H, Kunihiro Y, Matsunaga N, Hasegawa S, Ichiyama T. High-resolution computed tomography findings of influenza virus pneumonia: a comparative study between seasonal and novel (H1N1) influenza virus pneumonia. Jpn J Radiol. 2012; 30: 154-61.
 14. Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. J Med Microbiol. 2012; 61(Pt 3): 410-9.
 15. Yüksel D, Ichiyama T, Yilmaz D, Anlar B. Cerebrospinal fluid apolipoprotein E levels in subacute sclerosing panencephalitis. Brain Dev. 2012; 34: 298-301.
 16. Inoue H, Orita T, Matsushige T, Hasegawa S, Ichiyama T. Klinefelter's syndrome complicated with West syndrome in a 4-month-old boy. Brain Dev. 2012; 34: 148-50.
 17. 原 正美, 松原知代, 長谷川俊史, 古川 漸. ダニアレルゲン簡易キット「ダニ検査用マイティチェッカー」の使用経験. 小児保健研究 2012; 71: 773-779.
 18. 荘司貴代, 鈴木 陽, 澤井俊宏, 松井亨, 長谷川俊史, 西尾寿乗, 岩田 敏, 尾内一信. 小児感染症専門医育成プログラム. 小児科臨床 2012; 65: 503-506.
 19. 長谷川俊史. 好酸球性肺炎, 過敏性肺炎. 大関武彦, 古川 漸, 横田俊一郎, 水口 雅. 今日の小児治療指針 第15版, 東京, 2012年; pp381-382.
 20. 長谷川俊史. 全身性炎症性症候群. 大関武彦, 古川 漸, 横田俊一郎, 水口 雅. 今日の小児治療指針 第15版, 東京, 2012年; pp285-286.
- ## 2 . 学会発表
- 1 Hasegawa S, Okada S, Hasegawa H, Ainai A, Shirabe K, Toda S, Ikemoto K, Sasaki K, Ichiyama T. Cytokine Profiles in Bronchoalveolar Lavage in a Mouse Model of Bronchial Asthma during H1N1 2009 Infection. 17th Asian Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiratory and Immunology. Taipei, 10月19-21日, 2012年
 - 2 長谷川俊史, 岡田清吾, 市山高志, 調恒明, 戸田昌一. 喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染による気管支喘息発作重症化の病態解析. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 11月29日-12月1日, 2012年.
 - 3 長谷川俊史, 松重武志, 梶本まどか, 井上裕文, 百中 宏, 市山高志. インフルエンザ脳症における血清可溶性CD163濃度の検討. 第44回日本小児感染症学会・学術集会, 小倉, 11月24-25日, 2012年.
 - 4 井上裕文, 長谷川俊史, 松重武志, 梶本まどか, 百中 宏, 高原みどり, 市山高志. インフルエンザ脳症における血清 soluble CD163の検討. 第17回日本神経感染症学会総会・学術集会. 京都, 10月19-20日, 2012年.
 - 5 平野玲史, 長谷川俊史, 脇口宏之, 市山高志, 戸田昌一, 岡本玲子, 調 恒

明. 当科における気管支喘息発作入院症例のウイルス学的検討. 第 49 回日本小児アレルギー学会, 大阪, 9 月 15-16 日, 2012 年.

- 6 長谷川俊史, 岡田清吾, 橘高節明, 平野玲史, 市山高志, 調恒明, 戸田昌一, 岡本玲子, 長谷川秀樹, 相内 章. ヒト気道上皮細胞におけるウイルス感染によるサイトカイン産生の検討 新型インフルエンザおよびエンテロウイルス 68 感染と小児気管支喘息発作増悪の関与について . 第 49 回日本小児アレルギー学会, 大阪, 9 月 15-16 日, 2012 年.
- 7 長谷川俊史, 平野玲史, 岡田清吾, 市山高志. アトピー性皮膚炎患者における末梢血 natural killer (NK) 細胞数の検討. 第 49 回日本小児アレルギー学会, 大阪, 9 月 15-16 日, 2012 年.
- 8 井上裕文, 松重武志, 梶本まどか, 原田紗和子, 長谷川俊史, 市山高志. West 症候群における髄液タウ蛋白の動態. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 4 月 20-22 日, 2012 年.
- 9 百中宏, 中司謙二, 岡田清吾, 井上裕文, 梶本まどか, 松重武志, 長谷川俊史, 市山高志. 新型インフルエンザ脳症における血清及び髄液 high mobility group box 1 (HMGB1) 濃度の検討. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 4 月 20-22 日, 2012 年.
- 10 橘高節明, 市山高志, 伊藤嘉規, 梶本まどか, 松重武志, 長谷川俊史, 大淵典子, 鈴木英太郎, 河野祥二. HHV-6 関連熱性けいれん患者における血清 MMP-9 および TIMP-1 の検討. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 4 月 20-22 日, 2012 年.

G . 知的所有権の取得状況

1 . 特許取得

特になし

2 . 実用新案登録

特になし

3 . その他

特になし

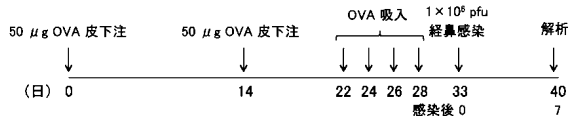


図1 本研究のプロトコール

新型インフルエンザ感染喘息マウスにおける
気管支肺胞洗浄液中 IL-6 濃度

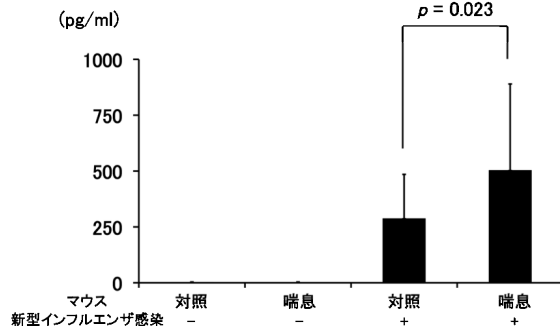


図2 新型インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IL-6 濃度

新型インフルエンザ感染喘息マウスにおける
気管支肺胞洗浄液中 IL-10 濃度

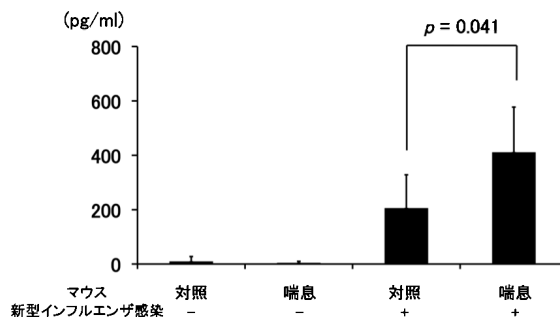


図3 新型インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IL-10 濃度

新型インフルエンザ感染喘息マウスにおける
気管支肺胞洗浄液中 TNF- α 濃度

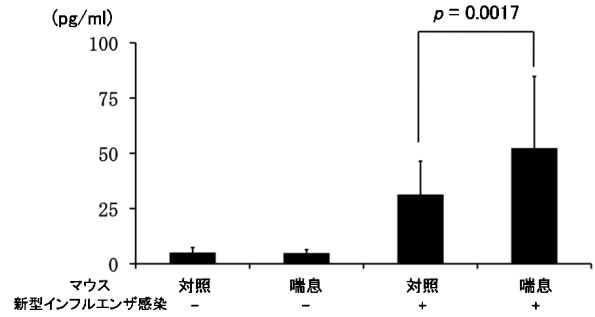


図4 新型インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 TNF- α 濃度

新型インフルエンザ感染喘息マウスにおける
気管支肺胞洗浄液中 IFN- γ 濃度

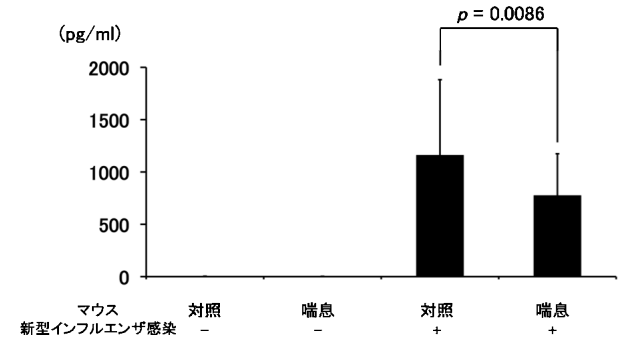


図5 新型インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IFN- γ 濃度

新型インフルエンザ感染喘息マウスにおける
気管支肺胞洗浄液中ウイルスカ価

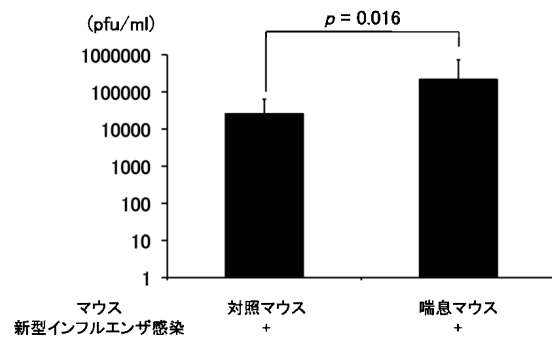


図6 新型インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中ウイルスカ価

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）
分担研究報告書

Immunoblot による抗神経抗体検出の試み

研究分担者 奥村彰久 順天堂大学医学部小児科・准教授

研究要旨

近年、急性脳炎・脳症における自己抗体（抗神経抗体）の関与が注目されている。しかし、精密な抗神経抗体の検出は容易でなく、実施できる施設に限られる。我々は premade membrane を使う immunoblot を用いる簡便な方法で、抗神経抗体の検出を試みた。ヒト対照脳を用いた免疫組織化学染色にて抗神経抗体の存在が推定されている 4 例について、Immunoblot を施行した。その結果、3 例について過剰バンドを認め抗神経抗体の存在が示唆された。Immunoblot は感度には限界があるが、簡便で陽性反応的中率が高い可能性があり、抗神経抗体の検出方法の一つとして使用できると考えた。

A . 研究目的

近年、急性脳炎・脳症における自己抗体（抗神経抗体）の関与が注目されている。特に精神症状が特徴的である辺縁系脳炎については、いくつかの異なる抗神経抗体が関与することが明らかになりつつある。これらの自己抗体の検出には、培養細胞に標的となる抗原分子を発現させてそれに対する抗体を検出する方法が一般的である。この方法は生体内に近い条件で抗体の関与を評価することができるが、その実施は容易でなく実施できる施設は限られている。一方、premade membrane を使う immunoblot は抗神経抗体の簡便な測定に有用である可能性がある。我々は、premade membrane を用いて Immunoblot による抗体検出を試みた。

B . 研究方法

以下の 3 症例の急性期および遠隔期の血清について、抗神経抗体の検出を試みた。

症例 1 : 5 歳女児。急速に進行する舞蹈病・バリスムを 3 回反復し、いずれもステロイドパルス療法が有効であった。抗核抗体、Lupus anticoagulant、抗 ds-DNA 抗体、抗 RNP 抗体、抗 sm 抗体、抗 CLβ2GPI 抗体、抗基底核抗体は全て陰性。

症例 2 : 13 歳男児。亜急性に増悪するけいれん・意識障害・異常行動で発症し、辺縁系脳炎と診断された。

症例 3 : 11 歳女児。SLE で入院中に舞蹈様運動・アカシジアが出現し、ステロイドパルス療法が有効であった。

症例 4 : 5 歳男児。1 か月前から行動異常・

性格異常が出現した。その後をけいれん発作が出現し、徐々に1日10回以上まで増加した。脳血流SPECTにて前頭葉優位の血流増加を認め、自己免疫性脳炎と診断した。

Immunoblotは、ヒト脳組織由来のタンパクを電気泳動したpremade membraneを用いた。被験血清を50倍に希釈してincubationした後、Biotin-Streptavidin法にて染色し判定した。

なお、4症例とも、ヒト対照脳を用いた免疫組織化学染色にて、抗神経抗体の存在が推定されている。

C . 研究結果

図に結果を示す。

症例1・3・4では急性期および遠隔期の血清で矢印に示すような過剰なバンドが染色され、抗神経抗体の存在が示唆された。

症例2では通常染色される以外の過剰バンドを認めなかった。

D . 考察

今回対象とした4例は、免疫組織化学染色の結果からは抗神経抗体を持っていた可能性がある。一方、Immunoblotでは3例に陽性と思われる所見を認めた。この結果は、Immunoblotは感度には限界があるが、陽性反応的中率は高い可能性があると思われた。抗神経抗体の証明には様々な測定法における再現性の確認が不可欠である。

Immunoblot単独による判定には限界があり、免疫組織化学染色などの複数の検出法を組み合わせる必要がある。

Immunoblotの利点としては、次のような点が考えられる。まず、特定のエピトープを標的としないため、未知のエピトープに対する抗体を検出し得る。また、抗体が単クローン性なのか、多クローン性なのか判別できる可能性がある。さらに、抗体が結合したタンパクの分子量をもとに、エピト

ープの同定ができる可能性がある。

E . 結論

抗神経抗体の存在が推定される症例において、Immunoblotによる検出を試みた。Immunoblotの陽性率はあまり高くないと思われたが、他の方法にはない利点もあり抗神経抗体の検出方法の一つになり得ると思われた。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Okumura A, Tsuji T, Kubota T, Ando N, Kobayashi S, Kato T, Natsume J, Hayakawa F, Shimizu T. Acute encephalopathy with 2009 pandemic flu: Comparison with seasonal flu. *Brain Dev* 2012; 34(1): 13-19.

Okumura A, Uematsu M, Imataka G, Tanaka M, Okanishi T, Kubota T, Sudo A, Tohyama J, Tsuji M, Ohmori I, Naiki M, Hiraiwa-Sofue A, Sato H, Saitoh S, Shimizu T. Acute encephalopathy in children with Dravet syndrome. *Epilepsia* 2012; 53(1): 79-86.

Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi J, Nagata R, Okumura A, Kashii H, Tomita S, Kumada S, Kubota M. Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *Brain Dev* 2012; 34(2): 124-127

Oikawa N, Okumura A, Oyama S, Baba H, Shimizu T, Kato A. A 15-month-old boy with reduced consciousness and convulsion. *J Clin Virol* 2012; 53(4): 276-279.

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.

Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci* 2012; 320(1-2): 145-148.

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.

Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Natsume J. Transient reduced diffusion in the cortex in a child with prolonged febrile seizures. *Brain Dev* 2012; 34(9): 773-775.

Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; collaborating study group on influenza-associated encephalopathy in Japan. National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children. *J Med Virol* 2012; 84(8): 1151-1156.

Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; The Collaborating Study Group On Influenza-Associated Encephalopathy In Japan. Treatment of pandemic influenza A

(H1N1) 2009-associated encephalopathy in children. *Scand J Infect Dis* 2012; 44(12): 941-947.

2 . 学会発表

Akihisa Okumura, Tetsuo Kubota, Motomasa Suzuki, Tatsuya Fukazawa, Shinpei Abe, Mitsuru Ikeno, Mariko Hosozawa, Toshiaki Shimizu, Masaharu Hayashi. Autoimmune Encephalitis Proven by Immunohistochemical Study. 第 54 回日本小児神経学会総会、札幌、2012.5.17

Akihisa Okumura. Neonatal EEG in determining risk to the preterm brain. Joint congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Brisbane, Australia, 2012.6.1.

奥村彰久、池野充、久田研、東海林宏道、清水俊明 . *TUBA1A* 変異による滑脳症・脳室拡大・小脳低形成の 1 剖検例 . 第 48 回日本周産期・新生児医学会学術集会、さいたま、2012.7.10.

奥村彰久 . 新生児および乳幼児の発作 - aEEG による評価 - . 第 46 回日本てんかん学会、東京、2012.10.10.

Akihisa Okumura, Keiko Shimojima, Tetsuo Kubota, Shinpei Abe, Shintaro Yamashita, Katsumi Imai, Tohru Okanishi, Hideo Enoki, Tatsuya Fukasawa, Takuya Tanabe, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki Yamamoto. PRRT2 Mutation in Japanese Children with Benign Infantile Epilepsy. 第 46 回日本てんかん学会、東京、2012.10.11.

奥村彰久 . Hemorrhagic shock
andencephalopathy . 第 595 回日本小児科
学会東京都地方会講話会、東京、
2012.10.13.

奥村彰久 . 新生児発作の神経画像所見 . 第
7 回小児神経放射線研究会、京都、
2012.10.27.

奥村彰久 . 小児急性脳症の脳波 . 第 17 回日
本神経感染症学会総会、京都、2012.10.19.

奥村彰久 . 新生児および小児における
amplitude-integrated EEG の臨床応用 . 第
42 回日本臨床神経生理学会・学術大会、東
京、2012.11.10.

Akihisa Okumura, Keiko Shimojima ,
Tetsuo Kubota , Shinpei Abe, Shintaro

Yamashita , Katsumi Imai, Tohru Okanishi,
Hideo Enoki, Tatsuya Fukasawa, Takuya
Tanabe, Shino Shimada, Leanne M
Dibbens, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki
Yamamoto. *PRRT2* Mutation in Japanese
Children with Benign Infantile Epilepsy.
The 16th Annual Meeting of American
Epilepsy Society, San Diego, CA, USA ,
2012.12.2.

G . 知的所有権の取得状況

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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

インフルエンザ脳症など重症インフルエンザの発症機序の解明とそれに基づく治療法・予防法の確立に関する研究

「小児期中枢神経感染症、特に急性脳症における脳由来神経栄養因子（BDNF）の検討」

研究分担者 河島尚志 東京医科大学小児科・准教授

研究要旨

脳由来神経栄養因子である BDNF は精神科領域、特にうつ病患者の反応性低下や治療薬に対する薬剤性反応との関連が報告されるなど、神経系細胞の存続および維持と密接に関係し、高次脳機能と関連するとされる。特に、小児科領域では、乳幼児期脳障害の neurotrophin としての作用が検討されている。今回、インフルエンザ脳症を含む小児中枢神経感染症での検討を行った。細菌性髄膜炎では早期に血清及び髄液 BDNF が上昇。コントロール群での血清 BDNF は低年齢で高く、また髄液中ではほぼ感度以下であった。中枢神経感染症罹患時に、BDNF 値をモニタリングすることは診断あるいは疾患の鑑別の一助となる可能性があるが、その予後改善との関連は見いだせなかった。これらの結果は、おそらくは BDNF は低濃度ではアポトーシスを誘導し、高濃度では神経可塑性に働くことと関連すると推測される。

A．研究目的

インフルエンザ脳症の予後改善のための治療法として、サイトカイン、フリーラジカルをターゲットとした各種の特殊治療が試みられ、死亡率は減少し一定の効果をあげ、死亡例は明らかに減少した。しかし、未だに後遺症を残す例は少なくない。今回インフルエンザ脳症を含めた中枢神経感染症における後遺症と、神経細胞の可塑性に関与する脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor、以下 BDNF と略）との関連について検討した。

B．研究方法

対象期間は 2006 年 1 月～2010 年 12 月までの 5 年間で、当院に入院した中枢神経感染症に罹患した患児 42 例の血清及び髄

液 BDNF を測定した。測定検体の採取は、入院初日に行った。コントロール群では、血清検体は非炎症性疾患にて入院もしくは定期外来に通院中の患児 108 例（ 45.1 ± 46.4 か月）また髄液検体は非中枢神経疾患にて入院した患児 38 例（ 34.9 ± 44.1 か月）とした。対象疾患の内訳は、髄膜炎群：18 例（細菌性：6 例、ウイルス性：12 例）、急性脳症群：24 例である。これら対象群の髄液および血清濃度を ELISA 法で用いて測定した。

（倫理面への配慮）

東京医科大学倫理委員会の承認を得て行った。

C．研究結果

コントロール群での血清 BDNF 値は 9299.5 ± 6413 ng/dl であった。次に髄液

検体でのコントロール群は、38 例中 31 例 (82%) が感度以下であり、 25.7 ± 34.2 ng/dl であった。髄膜炎群は、細菌性では 6 例中全例で髄液中 BDNF は上昇していた (270 ± 113 ng/dl)。ウイルス性は、髄液 BDNF は 39.7 ± 31.8 ng/dl で、12 例中 6 例 (50%) は感度以下であった。急性脳症群は、 57.9 ± 27.0 ng/dl で 24 例中 11 例 (46%) が感度以下であった。血清 BDNF はコントロール群と比較すると、細菌性髄膜炎群は 6 例全例で上昇しており (18268.3 ± 5313.2 ng/dl) またウイルス性髄膜炎群では 12 例中 10 例 (83%) で上昇していた (13700.9 ± 4989.3 ng/dl)。また急性脳症群では 24 例中 19 例 (81%) でコントロール群より上昇していた (13077.6 ± 4218.9 ng/dl)。髄膜炎群の 2 群を比較すると細菌性はウイルス性より有意に上昇していた。

一方、急性脳症において予後との検討を行ったが、BDNF 高値ほど予後不良であった。

D . 考察

BDNF は精神科領域、特にうつ病患者の反応性低下や治療薬に対する薬剤性反応との関連が報告されてきている。BDNF は神経系細胞の存続および維持と密接に関係し、高次脳機能と関連するとされ、小児科領域では、乳幼児期脳障害の neurotrophin としての作用 (特に自閉症、レット症候群および外傷性脳損傷等) が検討されている。

中枢神経感染症、特に細菌性髄膜炎では早期に血清及び髄液 BDNF が上昇していた。コントロール群での血清 BDNF は低年齢で高く、また髄液中ではほぼ感度以下であった。中枢神経感染症罹患時に、BDNF 値をモニタリングすることは診断あるいは疾患の鑑別の一助となる可能性があるが、その予後改善との関連は見いだせなかった。これらの結果は、おそらくは BDNF は低濃度ではアポトーシスを誘導し、高濃度では神経可

塑性に役立つことと関連すると推測された。

E . 結論

BDNF の予後との関連は明確でなかったが、中枢神経感染症、特に細菌性髄膜炎では早期に血清及び髄液 BDNF が上昇する。中枢神経感染症罹患時に、BDNF 値をモニタリングすることは診断あるいは疾患の鑑別の一助となる可能性がある。

F . 研究発表

1 . 論文発表

英文

Kawashima H, Morichi S, Okumara A, Nakagawa S, Morishima T; Collaborating study Group on Influenza-Associated Encephalopathy in Japan. Treatment of

andemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children. Scand J Infect Dis. 2012;44(12):941-7.

Kawashima H, Morichi S, Okumara A, Nakagawa S, Morishima T; collaborating study group on influenza-associated encephalopathy in Japan. National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children. J Med Virol. 2012;84(8):1151-6.

Kawashima H, Kashiwagi Y, Ioi H, Morichi S, Oana S, Yamanaka G, Takekuma K, Hoshika A, Sawai J, Kato Y. Production of chemokines in respiratory syncytial virus infection with central nervous system manifestations. J Infect Chemother. 2012;18(6):827-31.

Kawashima H, Ishii C, Ioi H, Nishimata S, Kashiwagi Y, Takekuma K. Transaminase in rotavirus gastroenteritis. Pediatr Int. 2012;54(1):86-8.

Morichi S, Kawashima H, Ioi H, Yamanaka G, Kashiwagi Y, Hoshika A. High production of interleukin-10 and interferon- in influenza-associated MERS in the early phase. *Pediatr Int.* 2012 ;54(4):536-8.

邦文

河島尚志, 森地振一郎, 呉宗憲 各ワクチンの現状と話題 インフルエンザワクチン脳症, ARDS を防げるか 小児科診療 75:671-676, 2012

河島尚志, 柏木保代, 森地振一郎【新薬展望 2012】(第 III 部)治療における最近の新薬の位置付け<薬効別> 新薬の広場 抗ウイルス薬 医薬ジャーナル 48: 325-332, 2012

河島尚志, 森地振一郎, 山中岳. 治療「インフルエンザ脳症の治療 インフルエンザ 13(3), 175-81, 2012

河島尚志, 呉宗憲, 鈴木慎二. 小児疾患の診断治療基準 第 4 版 インフルエンザ 小児内科 44 増刊号: 324-5, 2012

森地振一郎, 河島尚志, 土方妙恵 HHV-6 感染に関連した二相性けいれんと遅発性拡散能低下を呈する急性脳症(AESD)に対して脳

低温療法を施行した自験例の検討. 日本小児救急医学会雑誌 11(3):359-66, 2012

森地振一郎, 河島尚志, 奥村彰久, 百井寛明, 小穴信吾, 山中岳, 河島尚志, 星加明德. 発熱から神経症状発現までの時間からみた pandemic influenza A (H1N1) 2009 脳症の病型と予後との関連 *NEURO・INFECTION* 17(1):142-7, 2012

高野 智子, 田尻 仁, 柏木 保代, 河島尚志. 新型インフルエンザ肺炎における血清サイトカインの検討 日本小児救急医学会雑誌 11(1):63-67, 2012

2. 学会発表

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

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)

分担研究報告書

インフルエンザ脳症の患者血清を用いた代謝物プロファイリング

分担研究者 伊藤 嘉規 名古屋大学医学部小児科学・講師

研究要旨 インフルエンザ脳症の新規バイオマーカーを探索する目的で、インフルエンザ脳症22例と神経合併症のないインフルエンザ22名の急性期・回復期の血清検体中の代謝物プロファイリングをメタボローム解析により行った。CE-TOFMS装置による測定結果から、174ピークに候補物質が付与され、49の物質で定量が可能であった。脳症群(急性期)では、コントロール群(急性期)と比較して、4種類の代謝物質の平均値に有意な上昇がみられ、他方、3種類で有意な低下が認められ、これらの代謝物が早期診断の新規バイオマーカー候補と考えられた。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症では、感染に伴って惹起されるサイトカインなどの炎症性物質が病態に関与するとの報告があるが、なぜ脳症が起こるのか、どのようにして病態が進展するのかは明らかにされていない。病態に関連する新規のバイオマーカーの探索は臨床上的意義が大きい。メタボローム解析は、代謝物質の網羅的挙動を解析することにより、臓器障害の影響を評価できるため、疾患関連バイオマーカーの探索手法として注目されている。私共は、本症における中枢神経障害の早期診断・予後予測に関する新規バイオマーカーの探索を目的として、本症患者の血清検体を用いてメタボローム解析を行った。本症で血清中の低分子代謝物質の網羅的解析を行った報告はなく、新しい側面から本症の解析をすることが期待される。

B. 研究方法

1. インフルエンザ脳症と診断した患者 12 名と神経合併症のないインフルエンザ患者(コントロール群)22名の急性期および回復期血清を採取し、比較検討した(計 68 検体)。
2. CE-TOFMS 装置(キャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析, Agilent Technologies)を用いてカチオンモード、アニオンモードによる測定を行った。
3. 検出されたピークは自動積分ソフトウェアを用いて、ピーク情報を得た後、代謝物質データベースに登録された物質との照合・検索を行った。
4. 主成分分析、階層クラスター分析、代謝経路の描出を行った。
5. 定量系のあるものでは定量値を算出し同様

に比較を行った。

6. 解析結果を群間で比較し、バイオマーカー候補の検討を行った。

C. 研究結果

1. 血清 68 検体について、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行い、174 ピークに候補物質が付与された。
2. 検出されたピークを用いて主成分分析を行った(Data not shown)。階層クラスタリングを行い、HeatMap 表示させた結果を図 1 に示した。
3. 候補化合物について、解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、プリン代謝経路、ピリミジン代謝経路、ニコチン酸・ニコチンアミド代謝経路および各種アミノ酸代謝経路に描画した(Data not shown)。
4. 49 の物質で定量が可能であった。これらのうち、脳症群(急性期)では、コントロール群(急性期)と比較して、N⁸-Acetylspermidine など 4 種類の代謝物質の平均値に有意な上昇がみられ、他方、β-Ala を含む 3 種類で有意な低下が認められた(図 2)。

D. 考察

メタボローム解析により、コントロール群と比較して脳症群で有意に変動していた物質は、インフルエンザ脳症の早期診断のバイオマーカー候補と考えられた。バイオマーカー候補物質のなかで、代謝物質の経路図から、その意義が推定できるものについては、単独の定量系を構築し、検体数を増やすことにより、その意義を検証していくことが重要と考えられる。

E. 結論

インフルエンザ脳症の患者血清を用いた代謝物プロファイリングを行い、脳症群で有意な変動を示した代謝物は、新しいバイオマーカー候補と考えられた。今後、より詳細な解析を行い、その意義を確認する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected T-cells. *J Invest Dermatol* 132(5):1401-1408, 2012
- 2) Isobe Y, Aritaka N, Setoguchi Y, Ito Y, Kimura H, Hamano Y, Sugimoto K, Komatsu N. T/NK cell type chronic active Epstein-Barr virus disease in adults: an underlying condition for Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoma. *J Clin Pathol*, 6(3):278-282, 2012
- 3) Kawabe S, Ito Y, Gotoh K, Kojima S, Matsumoto K, Kinoshita T, Iwata S, Nishiyama Y, Kimura H. Application of flow cytometric in situ hybridization assay to Epstein-Barr virus-associated T/natural killer cell lymphoproliferative diseases. *Cancer science* 103(8):1481-1488, 2012
- 4) Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis / encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci*, 320:145-148, 2012.
- 5) Ito Y, Kimura H, Maeda Y, Hashimoto C, Ishida F, Izutsu K, Fukushima N, Isobe Y, Takizawa J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Okamura S, Kobayashi H, Yamaguchi M, Suzumiya J, Hyo R, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K, Suzuki R. Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Clin Cancer Res*, 18(15):4183-4190, 2012
- 6) Kawada J, Arai N, Nishimura N, Suzuki M, Ohta R, Ozaki T, Ito Y. Clinical

Characteristics of Norovirus Gastroenteritis among Hospitalized Children in Japan. *Microbiol Immunol*, 56(11):756-759, 2012

- 7) Ito Y, Kawamura Y, Iwata S, Kawada J, Yoshikawa T, Kimura H. Demonstration of type II latency in T lymphocytes of Epstein-Barr Virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatric blood & cancer*, published online: 7 September 2012
- 8) Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human Herpesvirus 6-Associated Encephalopathy in a Child with Dravet Syndrome. *Neuropediatrics*, published online: 03 October 2012
- 9) Kawada J, Ito Y, Torii Y, Kimura H, Iwata N. Remission of juvenile idiopathic arthritis with primary Epstein-Barr virus infection. *Rheumatology*, published online: October 30, 2012
- 10) Kato K, Otake H, Tagaya M, Takahashi Y, Ito Y, Hama A, Muramatsu H, Kojima S, Naganawa S, Nakashima T. Progressive hearing loss following acquired cytomegalovirus infection in an immunocompromised child. *Am J Otolaryngol*. 34(1):89-92, 2013
- 11) Kawada J, Kitagawa Y, Iwata N, Ito Y. Clinical characteristics of influenza virus infection in juvenile idiopathic arthritis patients treated with tocilizumab. *Mod Rheumatol*. published online: Oct 16, 2012

2. 学会発表

- 1) 伊藤嘉規、鳥居ゆか、森内浩幸、木村宏、先天性・周産期感染症 (TORCH) に関する全国アンケート調査、第 115 回日本小児科学会学術集会、福岡、2012.4.21-22
- 2) 河野好彦、木村宏、後藤研誠、鈴木道雄、鳥居ゆか、伊藤嘉規、患者血漿中 EB ウイルス由来 mRNA 定量を応用した EB ウイルス関連疾患バイオマーカーの探索、第 86 回日本感染症学会総会、長崎、2012.4.25-26
- 3) Kawano Y, Iwata S, Gotoh K, Suzuki M,

- Torii Y, Kawada J, Kimura H, Ito Y, Plasma viral microRNA profiles reveal potential biomarkers for chronic active EBV infection. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research, Seoul, Korea, 2012.5.17-19
- 4) Kawada J, Ito Y, Torii Y, Kimura H, Iwata N, Remission of juvenile idiopathic arthritis with primary Epstein-Barr virus infection. International Congress on Oncogenic Herpesvirus and Associated Disease, Philadelphia, USA, 2012.8.1-4
 - 5) Honma K, Imai K, Kanae C, Ishida H, Ito Y, Kojima S, Yokosuka T, Kanegane H, Morio T, Sasahara Y, Fujikawa T, Harigae H, Hayashi Y, Ohara O, Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in Japan, 15th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies, Florence, Italy, 2012.10.3-6
 - 6) Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Kimura H, Ito Y, Plasma viral microRNA profiles reveal potential biomarkers for chronic active Epstein-Barr virus infection. IDWeek 2012, San Diego, USA, 2012.10.17-22
 - 7) Horiuchi H, Torii Y, Ito Y, Kimura H, Clinicoepidemiological States of Congenital Cytomegalovirus Infections: A Nationwide Survey in Japan. CMV meeting 2012, San Francisco, USA, 2012.10.29-11.2
 - 8) 河野 好彦、岩田 誠子、川田 潤一、神谷 泰子、鈴木 道雄、鳥居 ゆか、木村 宏、伊藤 嘉規、慢性活動性 EB ウイルス感染症における EB ウイルス由来 miRNA 血漿中バイオマーカーとしての応用、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.11.13-15
 - 9) 伊藤嘉規、河村吉紀、岩田誠子、川田潤一、吉川哲史、木村宏、EB ウイルス関連血球貧食性リンパ組織球症例におけるウイルス感染細胞の性状を中心とした病態解析、第 44 回日本小児感染症学会総会学術集会、北九州、2012.11.24-25
 - 10) 鈴木道雄、鳥居ゆか、神谷泰子、河野好彦、川田潤一、木村宏、伊藤嘉規、肝移植後小児におけるインフルエンザワクチンの有効性・安全性の検討(成人例との比較)、第 44 回日本小児感染症学会総会学術集会、北九州、2012.11.24-25
 - 11) 河辺慎司、川田潤一、伊藤嘉規、木村宏、岩田直美、水痘罹患後に血球貧食性リンパ組織球症を続発した1例、第 44 回日本小児感染症学会総会学術集会、北九州、2012.11.24-25
 - 12) 加納友環、吉松豊、村上佳津美、森口直彦、内野清子、田中智之、伊藤嘉規、ヒトパルボウイルス B19 脳炎の1女児例、第 44 回日本小児感染症学会総会学術集会、北九州、2012.11.24-25
 - 13) Kato S, Miyata T, Ito Y, Tomita A, Kinoshita T, Nakamura S, A case of cytotoxic molecule-positive Epstein-Barr virus (EBV)-associated T-cell lymphoma followed by chronic active EBV infection-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder 14 years later, T-cell lymphoma forum, San Francisco, USA, 2013.1.24-26

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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）
分担研究報告書

抗酸化ストレスの治療への応用

研究分担者 松川昭博 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・病理学

研究要旨

レドックス制御蛋白チオレドキシン（TRX）によるマウス
インフルエンザ肺炎の治療効果

A．研究目的

ウイルス性肺炎の病態悪化に、酸化ストレスが関与することが示唆されている。マウス H1N1 インフルエンザ感染モデルを用いて、抗酸化物質チオレドキシン（TRX）による H1N1 インフルエンザ肺炎の治療効果を検討した。

B．研究方法

C57BL/6 マウスに A/PR8/34(H1N1)を経鼻的に感染させ、TRX 投与による生体変化を観察した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、岡山大学動物実験指針に基づき、3R の原則に従って実施した。

C．研究結果

H1N1 によるマウス生存率は、TRX 投与によりマウス生存率は改善した。この時、肺臓でのウイルス量に変化はみられなかったが、肺での好中球浸潤は有意に減少し、気管支肺胞洗浄液（BALF）中や肺抽出液中の炎症性サイトカイン TNF やケモカイン CXCL1 産生量は

低下した。肺で発現する酸化ストレスマーカー（d-ROMs）は減少し、抹消血中の hydroperoxide も低下した。気管支上皮細胞株 MLE-12 に H1N1 を感染させた時に産生される TNF や CXCL1 は TRX-1 で濃度依存性に減少した。

D．考察

TRX-1 は抗本抗炎症作用と抗酸化作用によりインフルエンザ肺炎は軽減したものと考えられる。

E．結論

TRX の補充療法は、インフルエンザ感染後の抗炎症治療戦略になる可能性がある。

F．研究発表

1．論文発表

Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Matsutani 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. 2013, 41(1):171-181.

2. 学会発表

- 1) 松川昭博：炎症の発現・制御におけるサイトカインシグナル伝達 第101回日本病理学会総会（企画招待講演） 2012年4月26－28日
- 2) 荻野哲也、平麻美、伏見聡一郎、松川昭博：酸化ストレスによる白血病細胞の分化とERKのリン酸化の修飾 第101回日本病理学会総会（企画招待講演） 2012年4月26－28日
- 3) MATSUKAWA A. Negative regulation of cytokine signaling in inflammation. The 5th International symposium for future technology creating better human health and society. March

15-16, 2012, Okayama (Invited Speaker)

- 4) Ito T, Yoshimura A, Matsukawa A : Spred-2 negatively regulates influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia. 99th Annual Meeting, The American Association of Immunologists, May 4-8, 2012, Boston, USA

G. 知的所有権の取得状況

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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

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 -

研究分担者 塚原宏一

研究協力者: 林 優子、山田睦子、野坂宣之、斎藤有希恵、吉本順子

藤井洋輔、八代将登、津下 充、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)

研究要旨

L型脂肪酸結合蛋白(L-type fatty acid binding protein; L-FABP)は2011年に保険収載された腎臓特異的のストレスマーカーである。今回、小児患者を対象にして、新規開発された尿中L-FABP迅速キットの有用性を検討した。

対象は13名、1か月～21歳、男/女は8/5であった。危急患者は3名、その他の重症患者は7名、病的意義の乏しい「対照」は3名であった。尿中L-FABP(迅速およびELISA)、尿中8-OHdG(迅速)、尿中NAG、血清Crを計測した。

結果: L-FABP検査(迅速)については、大体20 ng/mL以上(ELISA値)で陽性所見(1+以上)を呈した。異常値を呈した患者はL-FABP(迅速)で7名(1+が4名、2+が2名、3+が1名)、L-FABP(ELISA)で8名(Cr比でも同じ8名)、8-OHdGで4名、NAGで5名、血清Crで3名であった。L-FABP(迅速)にて陽性を呈したのは腎障害を含む重症疾患の児に限られた。腎障害患者では全身レベルの酸化ストレス指標である尿中8-OHdGは顕著な増加を示さなかった。

結論: L-FABP検査(迅速)の腎障害の検出感度は良好と思われた。生体応答的機序により腎臓特異的に発現する尿中マーカーを用いて腎機能を評価することの重要性が示唆された。

A. 研究目的

生体マーカー計測の長所は非～低侵襲、生体応答的な病態解析、患者容態の継続評価、動物実験との双方向性、迅速診断による緊急対応などである。

L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)は2011年に保険収載された腎臓特異的のストレスマーカーである(図1)。今回、小児患者を対象にして、新規開発された尿中L-FABP迅速キットの有用性を検討した。

B. 研究方法

尿中L-FABPの迅速キットは50μLを15分で解析できる小型スライドである(シミック社、東京)。陽性所見の程度を目視により1+～3+で表した(標準ラインと比べて薄ければ1+、同程度であれば2+、濃ければ3+)。尿中

L-FABPはELISA(シミック社)でも計測した。全身性酸化ストレスマーカーである尿中8-OHdGの迅速検査(ICR-001、テクノメデイカ社、横浜)、尿中NAG、血清Crも計測した。

尿中L-FABP、8-OHdG、NAG、血清Crの基準値をそれぞれ(-)、<10 ng/mL(<10 ng/mg Cr)、<30 ng/mg Cr、<10 U/L、<1.2 mg/dLとした。

対象は13名、1か月～21歳、男/女は8/5であった。危急患者は3名(表中では星印で示した)、その他の重症患者は7名、病的意義の乏しい「対照」は3名であった(表1)。

<倫理面への配慮>

被験者の保護者に研究の目的と内容を詳しく説明し、同意が得られた方のみを対象にした。検体はすべて暗号で表示しなおしてから検査を開始した。データ保存についても個人が特定されないように十分に配慮した。

C. 研究結果

結果を範囲で表す。L-FABP (迅速) は (-) ~ (3+)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ~ 1271 ng/mL (< 4.3 ~ 1686 ng/mg Cr)、8-OHdG は 5.7 ~ 108 ng/mg Cr、NAG は 1.7 ~ 30.2 U/L、血清 Cr は 0.16 ~ 2.30 mg/dL であった(表1)。

L-FABP (迅速) については、大体 20 ng/mL 以上(ELISA)で陽性所見(1+以上)を呈した。

異常値を呈した患者は L-FABP (迅速) で 7 名(1+が 4 名、2+が 2 名、3+が 1 名)、L-FABP (ELISA) で 8 名(Cr 比でも同じ 8 名)、8-OHdG で 4 名、NAG で 5 名、血清 Cr で 3 名であった。L-FABP (迅速) にて陽性を呈したのは腎障害を含む重症疾患の児に限られた。

L-FABP (迅速) で(1+)以上であった 7 名はすべて ELISA でも異常高値を示し、半定量値と ELISA 値は正相関した。その 7 名において 8-OHdG、NAG が異常高値を示したのは、それぞれ 3 名(43%)、4 名(57%)であった。

腎不全の 3 名の L-FABP (迅速、ELISA とも)は異常高値であったが、8-OHdG は高くなかった。新生児 Dent 病(疑)の乳児では L-FABP (迅速) は(1+)であったが、別に計測した健常の弟(双児)では(-)であった。

D. 考察

米国 NIH によれば、生体マーカーは「病態生理学的な裏づけのもとに測定され、治療介入による薬理的応答を評価しうる客観的指標」と定義される。

生体マーカーは疾患の危険度の評価、早期スクリーニング、患者の層別化と予後予測、治療介入に対する反応性評価などの領域で、臨床医の大きな手助けになると期待されている。侵襲性がほとんどなく、継続的に評価できることは小児には福音である。

2012 年 3 月、腎疾患に関する国際的ガイドライン策定を目指して設立された Kidney Disease: Improving Global Outcome (通称 KDIGO) により Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury (AKI) が発表された。AKI については 5 つの生体マーカーが推奨された。Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)、Cystatin C、Interleukin 18、Kidney injury molecule-1 (KIM-1)、および、L-FABP である。

我々は、とりわけ早期診断性に長けた L-FABP の尿中排泄を計測することで、小児患者の AKI を早期予測できるかどうか基礎的検討を進めている。さらに、最近開発された迅速キットを併用することで、診療の現場で重症度評価、患者層別化を行うことができるかどうか検討している。

L-FABP は脂肪酸負荷、内因性・外因性有害物負荷、酸化障害、虚血障害などによって腎近位尿細管細胞で誘導され、有害物や不要物をペロキシゾームに担送する蛋白質である。Dent 病は腎尿細管細胞ペロキシゾームの先天性機能障害を特徴とする。

ところで、L-FABP 誘導はペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor) 刺激でも起こる。そのリガンドであるフィブラート、チアゾリジン(ともに糖脂質代謝改善薬)によっても L-FABP 発現は増強する。L-FABP 誘導は、これらの薬剤の多方面作用(とくに抗酸化作用)の一翼をなすと推察される。

今回の研究では、L-FABP 検査(迅速)で(1+)以上であった(異常高値を示した)7 名はすべて、腎障害を含めた重症疾患児であった。その 7 名のうち代表的な酸化ストレスマーカーである 8-OHdG、腎近位尿細管傷害マーカーである NAG が異常高値を呈したものはそれぞれ 43%、57%にすぎなかった。L-FABP 検査(迅速)の腎障害の検出感度は良好と思われた。

慢性腎不全を含めた慢性病態では尿中 8-OHdG は顕著には増加しないことが多い。尿中 8-OHdG が全身レベルの酸化環境を反映して平均化されるのか、病的に健常細胞が少なくなった腎臓では 8-OHdG も少なくなるのか明らかでないが、生体応答的機序により腎臓特異的に発現する尿中マーカーを用いて腎機能を評価することの重要性が示唆された。

E. 結論

L-FABP 検査(迅速)は大体 20 ng/mL 以上(ELISA 値)で陽性所見を呈した。その半定量値と ELISA 値は正相関した。個々患者で検討すると、L-FABP 計測のターゲットは(8-OHdG とは異なり)腎臓特異的と推察された。L-FABP (迅速)は緊急を要する医療現場で(不便な環境でも)応用可能と期待された。

今後、L-FABP 検査(迅速)がその後の腎機能の推移を予知するのに有用であるかどうか検証する予定である(なお、本研究は菅谷 健博士(聖マリアンナ医科大学・腎臓高血圧内科)のご協力のもとになされた)。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kawatani M, Hiratani M, Kometani H, Nakai A, Tsukahara H, Tomoda A, Mayumi M, Ohshima Y. Focal EEG abnormalities might reflect neuropathological characteristics of pervasive developmental disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder. **Brain**

Dev 34 (9): 723-730, 2012.

(2) Nagasaka H, Miida T, Inui A, Inoue I, Tsukahara H, Komatsu H, Hiejima E, Fujisawa T, Yorifuji T, Hirano K, Okajima H, Inomata Y. Fatty liver and anti-oxidant enzyme activities along with peroxisome proliferator-activated receptors and expressions in the liver of Wilson's disease. **Mol Genet Metab** 107 (3): 542-547, 2012.

(3) 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.

(4) 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.

(5) Nagasaka H, Okano Y, Kimura A, Mizuochi T, Sanayama Y, Takatani T, Nakagawa S, Hasegawa E, Hirano K, Mochizuki H, Ohura T, Ishige-Wada M, Usui H, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Ohtake A, Yamato S, Miida T. Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening. **Clin Chim Acta** 416: 54-59, 2013.

(6) Nagasaka H, Miida T, Yorifuji T, Hirano K, Inui A, Fujisawa T, Tsukahara H, Hayashi H, Inomata Y. Metabolic improvements in intrahepatic porto-systemic venous shunt presenting various metabolic abnormalities by 4-phenylacetate. **Clin Chim Acta** 2013 (in press).

(7) 塚原宏一. 知っておきたい内科症候群 - 急性腎炎症候群 **内科** 109 (6): 1390-1392, 2012.

(8) 塚原宏一. 酸化ストレスの生体マーカー.

小児感染免疫 24 (2): 181-189, 2012.

(9) 塚原宏一, 吉本順子, 宮島悠子, 横内恵子, 長岡義晴, 森島恒雄. 早産新生児の循環動態変化とそれに基づいた輸液管理. **日本小児体液研究会誌** 4: 15-23, 2012.

2. 学会発表

(1) 塚原宏一. DW high/ADC low の可逆性脳梁膨大部病変の発見とその後の展開 - 先行感染の病原としてのロタウイルス/インフルエンザウイルス. 第17回広島県東部小児感染・免疫研究会, 福山, 2012年(6月).

(2) 塚原宏一. 小児科領域における酸化ストレス関連疾患とその評価法. 第8回中国・四国喘息研究フォーラム, 岡山, 2012年(9月).

(3) 齊藤有希恵, 津下 充, 藤井洋輔, 長岡義晴, 八代将登, 塚原宏一, 森島恒雄. サイトカインによる肺血管内皮細胞機能障害のメカニズム. 第44回日本小児感染症学会, 小倉, 2012年(11月).

(4) 中務陽子, 塚原宏一, 山田睦子, 藤井洋輔, 森島恒雄. Early third trimester における妊婦の血清 Thioredoxin (TRX) -1 および酸化ストレス環境の評価. 第44回日本小児感染症学会, 小倉, 2012年(11月).

(5) 中務陽子, 塚原宏一, 森島恒雄. 妊娠28週前後の妊婦における血清 thioredoxin-1 および酸化ストレス環境の評価. 第57回日本未熟児新生児学会, 熊本, 2012年(11月).

(6) 林 優子, 塚原宏一, 村岡倫子, 齊藤有希恵, 藤井洋輔, 八代将登, 鷲尾佳奈, 嶋田 明, 小田 慈, 森島恒雄. 血液・腫瘍疾患を有する小児における尿を用いた病態評価 - 酸化ストレスマーカーの計測. 第85回日本小児科学会岡山地方会, 岡山, 2012年(12月).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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）
分担研究報告書

インフルエンザ成人重症例の病態と診療体制整備

研究分担者

竹田晋浩

日本医科大学付属病院集中治療室・准教授

研究要旨

インフルエンザによる重症呼吸不全症例は適切な管理ができる病院での治療が必要で、重症例には体外式膜型人工肺（ECMO）による治療が必要である。しかし本邦では ECMO 治療の成績は海外と比べ半分以下の生存率であった。原因は世界標準の機材が整備されていない、医療従事者の ECMO 治療に対する経験が少ない、などが挙げられた。また海外の優秀な施設への訪問から、本邦の現状との違いが浮き彫りにされた。これらの結果から本邦の現状では次のパンデミック時に H5N1 のような重症型インフルエンザが発症した場合、ECMO による治療はその効果を発揮できないであろうと推察される。そのためには適切な機材を使用し、適切な管理を提供できる専門スタッフの養成と体制作りが不可欠である。

A．研究目的

インフルエンザによる重症呼吸不全症例は適切な管理ができる病院での治療が必要である。特に従来の人工呼吸管理では対応できないほどの重症例には体外式膜型人工肺（ECMO）による治療が必要である。しかし本邦では ECMO 治療の実態が把握されていない。よってパンデミック時の適切な診療体制を構築するために現状の把握と世界の進んだ治療施設の体制を把握する。

B．研究方法

2009H1N1 による重症呼吸不全症例への ECMO 治療の実態を調査。日本呼吸療法医学会と日本集中治療医学会からの症例

登録に参加した施設からのデータを解析する。

海外の優秀な施設を訪問し、責任者と会談を持ち、日本の現状との差を確認する。

（倫理面への配慮）

疫学調査であり、個人を特定する情報は無い。また海外施設への訪問も特に患者個人に関係するものではない。

C．研究結果

本邦での 2010 年度の ECMO を使用した重症インフルエンザ肺炎患者の生存率は 36%（14 例中 5 例）であった。しかもすべての症例で抗インフルエンザ薬が使われていた。

すべての症例で ECMO 治療に関した adverse events を起こした。

Directly related to the ECMO circuit	11 例(78.6%)
Oxygenator failure	7 例(50.0%)
Blood clots	4 例(28.6%)
Cannula-related problems	3 例(21.4%)
Pump head complications	1 例(7.1%)
Not directly related to the ECMO circuit	12 例(85.7%)
Massive bleeding	8 例(57.1%)
Hemolysis	2 例(14.3%)
DIC	10 例(71.4%)
Venous thrombus	2 例(14.3%)

そのために、1 回路の使用日数は僅か 4.0 日であった。

各施設の呼吸不全に対する ECMO 治療の経験は非常に少なく、5 施設は今回が初めての経験、6 施設は年間 1 または 2 例であった。

海外の優秀な施設への訪問

イギリス・グレンフィールド病院 ECMO センター

圧倒的な人員が配置されていた。ECMO スタッフは看護師、臨床工学技士で 70 名、医師も 10 名以上。治療に用いられている機材は日本では販売されていない最新型であった。非常に性能が高く、1 回路で 30 日間治療を行う事が可能である。

スウェーデン・カロリンスカ大学病院 ECMO センター

ECMO 治療を行うための専門のセンターすべてのスタッフが ECMO 治療を専門としており、非常にレベルの高い治療が行われている。

北ヨーロッパをカバーし、EU 圏内から患者の受入を行っている。小型ジェット機で

患者を ECMO を稼働した状態で搬送している。

D. 考察

2010 年度の ECMO を使用した重症インフルエンザ肺炎患者の生存率は 36%で、海外の報告と比較し明らかに悪く、欧米に比べて遅れていると言わざるを得ない(オーストラリア・ニュージーランド:生存率 79%、スウェーデン・カロリンスカ大学 ECMO センター:生存率 92%、ELSO registry database:生存率 60%以上)

本邦での ECMO 管理の問題点として、脱血カニューレのサイズが小さすぎるために十分な流量が確保できない点があげられる。カロリンスカ大学 ECMO センターで ECMO に使用された脱血カニューレのサイズは 23-29Fr であるのに対し、本邦で用いられた脱血カニューレサイズの 70%は 20Fr 未満であった。体格の違いを考慮しても、本邦で用いられた脱血カニューレのサイズは小さすぎると考えられる。このような細すぎる脱血カニューレを使用することにより、脱血不良から流量が不十分となったり、流量を得るのに高い回転数を要するため溶血を起こしたり、血小板消費増大による出血傾向をきたすなどの合併症を引き起こす可能性が高い。

近年 ECMO 治療における合併症は機器の性能および技術の向上により、明らかに減少してきている。しかし、日本でインフルエンザに対して行われた ECMO 治療では、全例で合併症が起こっており、過去の海外の報告と比較して著しく多かった。合併症のなかでも、大量出血、DIC、血栓形成などの凝固線溶系の異常が大半の患者でみられており、機材の問題や使用しているカニューレの径が細すぎることから生じている可能性が高い。これらの症例では 1 回路の寿命が平均 4 日間しかもって

らず、機材やカニューラの問題、そこから生じる凝固障害などが原因となっている可能性は否定できない。回路交換の度に500~600mlの血液が失われ、補充のための輸液や輸血は患者の負荷となる。ECMO治療の本質は、rest lungとして肺の回復を待つことであり、その間合併症を極力少なくするための安全管理こそが重要である。そのためには適切な機材を使用すること、適切な管理を提供できる専門スタッフの養成と体制作りが不可欠である。

E . 結論

本邦の現状では次のパンデミック時にH5N1のような重症型インフルエンザが発症した場合、ECMOによる治療はその効果を発揮できないであろう。そのためには適切な機材を使用し、適切な管理を提供できる専門スタッフの養成と体制作りが不可欠である。

F . 研究発表

論文発表

- 1)S Takeda, et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation for 2009 Influenza A(H1N1) Severe Respiratory Failure in Japan. Journal of Anesthesia 2012; 26: 650-657.
- 2)三井誠司、竹田晋浩。インフルエンザ。呼吸器ケア 2012; 10: 14-18.
- 3)青景聡之、竹田晋浩。体外式膜型人工肺

(ECMO)治療。呼吸器内科 2012; 21: 343-349.

- 4)竹田晋浩、青景聡之。再評価の経緯と本邦における臨床—適応症例とは。ECMO-up to date. ICU とCCU 2012; 36: 319-326.
- 5)竹田晋浩。呼吸不全の体外式膜型人工肺 (ECMO)治療。日本医事新報 2013; 4629 ;50-1.日本医事新報社

学会発表

- 1)竹田晋浩。シンポジウム：一般診療における急性呼吸不全の呼吸管理、ウィルス肺炎と急性呼吸不全。第52回日本呼吸器学会学術講演会。神戸4月22日
- 2)竹田晋浩。ARDS診断基準の問題点と新しい診断基準。教育講演。第26回東北救急医学会総会・学術集会。仙台6月30日
- 3)竹田晋浩。急性呼吸不全治療の流れ。教育講演。第21回日本集中治療医学会東北地方会。盛岡7月7日

G . 知的所有権の取得状況

- 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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

**Diagnosis Procedure Combination からみた
日本の体外循環補助の実態**

研究分担者 中川 聡 国立成育医療研究センター病院 集中治療科医長

研究要旨

Diagnosis Procedure Combination データベースを用い、2009年7月～12月の6ヶ月間に日本全国で体外循環補助の治療を受けた患者を抽出した。これらの患者で、年齢、性別、DPCの主要診断群、体外循環の施行日数、転帰を調べた。その結果、1,042症例の体外循環補助症例が抽出できた。性別は男性が70%。年齢では、70歳代が最も多く、60歳代がそれに続いた。主要疾患群別では、循環器疾患が最も多く、全体の77%を占めた。呼吸器疾患は全体の5%であった。体外循環補助を受けた患者の死亡率は67%であった。

呼吸補助としての体外循環補助症例は、我が国では少ないことが分かった。

A . 研究目的

我が国では、循環補助を主目的とした percutaneous cardiopulmonary support (PCPS) と称される体外循環補助法が多く用いられている。この手法は、extracorporeal life support (ECLS) の一種である。一方、呼吸補助として ECLS を用いる場合は、特に膜型人工肺による酸素化に重点を置き、extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) と呼ばれる。我が国では、循環補助と呼吸補助として用いられる ECLS の実態が把握されていない。その実態を把握するために、diagnosis procedure combination (DPC) データベースを用いて研究を行った。

B . 研究方法

DPC データベースから、治療手技として下記のコードを有する患者を抽出した；a. 人工心肺を2日以上連続、b. 経皮

的心肺補助法、c. 補助人工心臓。対象期間は2009年7月から12月までの6か月間とした。これらの患者で、年齢、性別、DPCの主要診断群（DPCでは18の主要診断群を有する）、体外循環の施行日数、転帰を調べた。これらのデータは匿名化されており、個人の同定はできない。

C . 研究結果

当該期間中に体外循環補助を受けた患者は1,042人であった。

10歳区分で示す年齢ごとの患者数は、0歳代45人、10歳代15人、20歳代38人、30歳代53人、40歳代84人、50歳代149人、60歳代256人、70歳代292人、80歳代104人、90歳代6人であった。性差は、男733人、女309人であった。

体外循環のコード別にみると、人工心肺18人、経皮的な心肺補助法1014人、補助人工心臓15人であった。補助人工心臓の

15 人のうち、5 人が経皮的心肺補助法から補助人工心臓へと移行していた。

主要診断群別にみると、循環器疾患 800 人、呼吸器疾患 55 人、その他 50 人、新生児・先天奇形 33 人、血液疾患 32 人、外傷 20 人、消化器疾患 19 人、神経疾患 13 人、内分泌疾患 8 人、筋骨格系 7 人、女性疾患 3 人、腎尿路 3 人、皮膚 1 人、乳房 1 人となっていた。最も多かった循環器疾患群での DPC の 6 桁の診断コード別の患者数は、表 1 に示すとおりであり、急性心筋梗塞での使用が最も多かった。

体外循環の施行期間別の患者数は、表 2 に示す通りで、1 日のみの使用が最も多かった。

死亡率は、全体では 67.3%であったが、80 歳以上の患者群に限定をすると 83.6%であり、79 歳以下の患者群のそれ(65.7%) よりも有意に高かった ($p<0.01$)。

次に、患者数の多かった呼吸器疾患と循環器疾患での死亡率を検討した。呼吸器疾患では、全体で 47%の死亡率であった。しかし、体外循環の補助期間が 2 日以上の患者(25 人) では、死亡率は 60%であった。循環器疾患全体での死亡率は 69%であった。循環器疾患の DPC6 桁の疾患別の死亡率は、表 1 に示すとおりであり、疾患ごとに死亡率の高低があった。

施行日数別の死亡率は、表 2 に示すとおりである。施行期間が 10 日以上患者では、施行期間 9 日以下の患者に比べて、有意に死亡率が高かった ($p<0.05$)。

調査期間中に体外循環を行った施設は 282 施設であった。施行症例数毎の施設数では、1 症例のみが 97 施設、2 症例が 49 施設、3 症例が 32 施設であった。この調査期間に 27 症例(最大) に体外循環を行った施設が 1 施設あった。

表 1 . 循環器疾患群の疾患別の患者数と死亡率

疾患名	患者数(人)	死亡率(%)
急性心筋梗塞	233	73
徐脈性不整脈	134	79
狭心症・慢性虚血性心疾患	74	28
心不全	54	69
心筋炎	46	52
肺塞栓症	44	73
頻脈性不整脈	42	69
解離性大動脈瘤	40	90

表 2 . 施行日数ごとの患者数と死亡率

施行日数	患者数(人)	死亡率(%)
1	682	65
2	128	70
3	55	78
4	38	58
5	34	65
6	17	65
7	14	64
8	11	64
9	12	67
10 日以上	51	90

D . 考察

DPC という手法で、日本全国の全ての体外循環補助の患者が抽出できているわけではないものの、6 か月間で 1,000 人以上の患者が、体外循環補助の治療を受けている実態が分かった。性差では、70%が男性患者だった。年齢では、70 歳代が最も多く、60 歳代がそれに続いた。疾患群別では、循環器疾患が大多数であった。死亡率は全体で 67%であった。

呼吸不全に対する ECMO という観点から、呼吸器疾患で体外循環を受けた患者に注目すると、患者数は 55 人と循環器疾患に比べて少なかった。さらに、この 55 人の患者のうち 20 人は 1 日のみの体外循環補助を受けていることから、この中には、手術中の補助手段として体外循環を用いた患者が含まれている可能性があると考えられる。呼吸器疾患全体での死亡率は 47% と低いものの、2 日以上体外循環補助を受けた患者に限定すると死亡率は 60% となった。通常、急性呼吸不全に対して ECMO を応用する時には、1 日のみの使用という状況は極めて限定されると考えられるため、我が国での呼吸の ECMO での死亡率は 60% 程度と推定された。今後は、我が国でも呼吸不全に対する ECMO の症例登録機構などを設立したうえで、より精度の高いデータの解析を行う必要がある。

2009-10 年シーズンの H1N1 インフルエンザをきっかけに、欧米豪では、成人の急性呼吸不全に対する ECMO 治療が注目された。最近の海外からの呼吸 ECMO の成人患者での成績は 70% 以上の生存率を示している。一方、我が国の呼吸に対する ECMO の生存率は、他の報告でも 30% 台と低い。

個々の施設での体外循環補助の施行症例数は、6 か月の調査期間では中央値が 2 症例であった。体外循環補助が、多くの施設で分散して管理をされている我が国の状況が認識できた。本研究で呼吸補助としての体外循環補助症例は、6 ヶ月間で 55 症例と少ない。これらも同様に、分散管理がされていた。

海外では、呼吸補助の ECMO 症例を集約化して管理をする方向性が示されている。我が国での呼吸補助としての ECMO

の成績を改善させるためには、こういった方策も検討される必要がある。

E . 結論

DPC を用いた当研究では、6 か月間で約 1,000 症例の体外循環補助症例があった。その多くは、循環器疾患に対する体外循環治療であった。死亡率は 67% であった。呼吸補助としての体外循環補助症例は、我が国では少ないことが分かった。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Tokuhira N, Shime N, Inoue M, Kawasaki T, Sakurai Y, Kurosaka N, Ueta I, Nakagawa S. Mechanically ventilated children with 2009 pandemic influenza A/H1N1, Results from the national pediatric intensive care registry in Japan. *Pediatr Crit Care Med* 2012; 13: E294-98.
2. Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, et al. Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respir Viruses* 2012; Nov5, epub ahead of print
3. Takeda S, Kotani T, Nakagawa S, et al. Extracorporeal membrane oxygenation for 2009 influenza A(H1N1) severe respiratory failure in Japan. *J Anesth* 2012; 26: 650-57.
4. Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, et al. National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated

- encephalopathy in Japanese children. J Med Virol 2012; 84: 1151-56.
5. Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, et al. Treatment of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children. Scand J Infect Dis 2012; 44: 941-47.
 6. Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, et al. Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. J Clin Virol 2013; 56: 25-30.

2 . 学会発表

1. 中川 聡 . 小児の ECMO の現状と課題 . 第 34 回日本呼吸療法医学会学術総会、沖縄県宜野湾市、2012 .
2. 中川 聡 . H1N1 インフルエンザから学んだこと、小児医療の領域から . 第 21 回日本集中治療医学会関東甲信越地方会、前橋市、2012 .

G . 知的所有権の取得状況

なし。

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）
分担研究報告書

小児の中枢神経感染症の疫学

研究分担者 氏名 宮入 烈
国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 感染症科医長

研究要旨

インフルエンザ脳症を含む小児の中枢神経系感染症の病原体診断を核酸増幅法を用いて検証した。各病原体ごとに患者背景・症状・身体所見・検査所見・重症度の重症化にかかわる因子を解析し病態にかかわる主要因子を抽出その相関関係を図式化した。当研究期間中は62例で病原体が証明され、小児の非化膿性中枢神経系感染症の大多数はヒトパレコウイルス、エンテロウイルスでありインフルエンザは数例に留まった。多因子解析によりヒトパレコウイルス感染症においてウイルス量と病態との相関が認められた。

A．研究目的

インフルエンザ脳症を含む小児の中枢神経系感染症の疫学を核酸増幅法を用いて検証し、重症化にかかわる主要因子を解析し、治療介入法の検討を行う。

B．研究方法

国内最大級の小児医療施設である国立成育医療研究センターに入院した非化膿性中枢神経系感染症（脳炎・無菌性髄膜炎）患者を対象に髄液 PCR、血清 PCR を行った。

病原体が確認された患者を対象に後方視的に電子カルテより以下の情報を抽出した。

- 性別、日齢、出生体重・週数
 - 症状：けいれん、無呼吸、嘔吐、
 - ウイルス量（血清、髄液）PCR の CT 法による
 - バイタルサイン： Temp BP BP HR RR
 - 血液・髄液検査所見
 - 合併症：MRI 所見、EEG 所見
- 各因子の相関係数の強弱を線で表し、

グラフ化した。

（倫理面への配慮）

同研究は後方視的な検討であり、直接の患者介入は行わない。抽出した情報は匿名化し個人情報保護を行う。

C．研究結果

対象とした2011年1月から2012年12月までの期間に62症例の非化膿性中枢神経感染症患者の病原体診断が得られた（図1）。ヒトパレコウイルス感染症とエンテロウイルス感染症が夏季を中心に最も多く認められた。ヒトパレコウイルス感染症は主に2011年に認められた。他にHHV6、インフルエンザ症例が散見された。

インフルエンザ脳炎・脳症症例は同期間内で数例の発症に留まったため、多因子解析の対象とならなかった。ヒトパレコウイルスとエンテロウイルス感染症症例を対象に多因子解析を行った。

ヒトパレコウイルス感染症の場合（図2）血清中のウイルス量が発熱期間・心拍数や

人工呼吸の必要性など全身状態と関連したのに対して、髄液中のウイルス量は MRI 所見・髄液糖・合併症の有無など中枢神経所見と関連する傾向が認められた。 エンテロウイルスで同様の傾向が認められたが、この2つの近縁ウイルスの比較では、パレコウイルスに紅斑の出現が有意に認められ、エンテロウイルスにおいて炎症所見が有意に高く認められた。

D . 考察

本解析により中枢神経系感染症の病態を客観的に評価することが可能であることが示唆され、特にヒトパレコウイルスウイルス量との相関が示された。本解析では、インフルエンザ症例が少なく多因子解析の対象とならなかったが、インフルエンザの非中枢神経系感染症との比較や他の原因との比較、治療介入との相関を検討する予定である。

E . 結論

小児の非化膿性中枢神経系感染症の多くをヒトパレコウイルス、エンテロウイルス感染症が占めた。多因子解析によりウイルス量と病態との相関が認められた。

F . 研究発表

1 . 論文発表

(発表誌名巻号、頁、発行年等も記入)

Shoji K, Komuro H, Miyata I, Miyairi I, Saitoh A: Dermatologic Manifestations of Human Parechovirus Type 3 Infection in Neonates and Infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2012 Nov 28. [Epub ahead of print]

宮田一平, 宮入烈: 中枢神経感染症における迅速診断. 小児科臨床

2012;65(12):2489-2495

2 . 学会発表

Komuro H, Shoji K, Kobayashi Y, Miyata I, Funaki T, Miyairi I, Takayama J, Saitoh A: Dermatologic manifestations of human parechovirus type 3 infection in neonates and infants. *Pediatric Academic Societies Annual Meeting (PAS) 2012*, Boston Massachusetts, 2012.4.28

Miyata I, Miyairi I: Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Program Committee. the 52ND Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco California, 2012.9.9

G . 知的所有権の取得状況

なし

図1 中枢神経感染症(脳炎・無菌性髄膜炎)の病原体診断の内訳

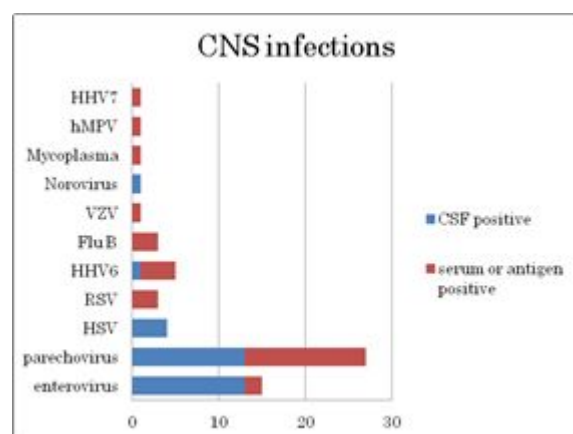
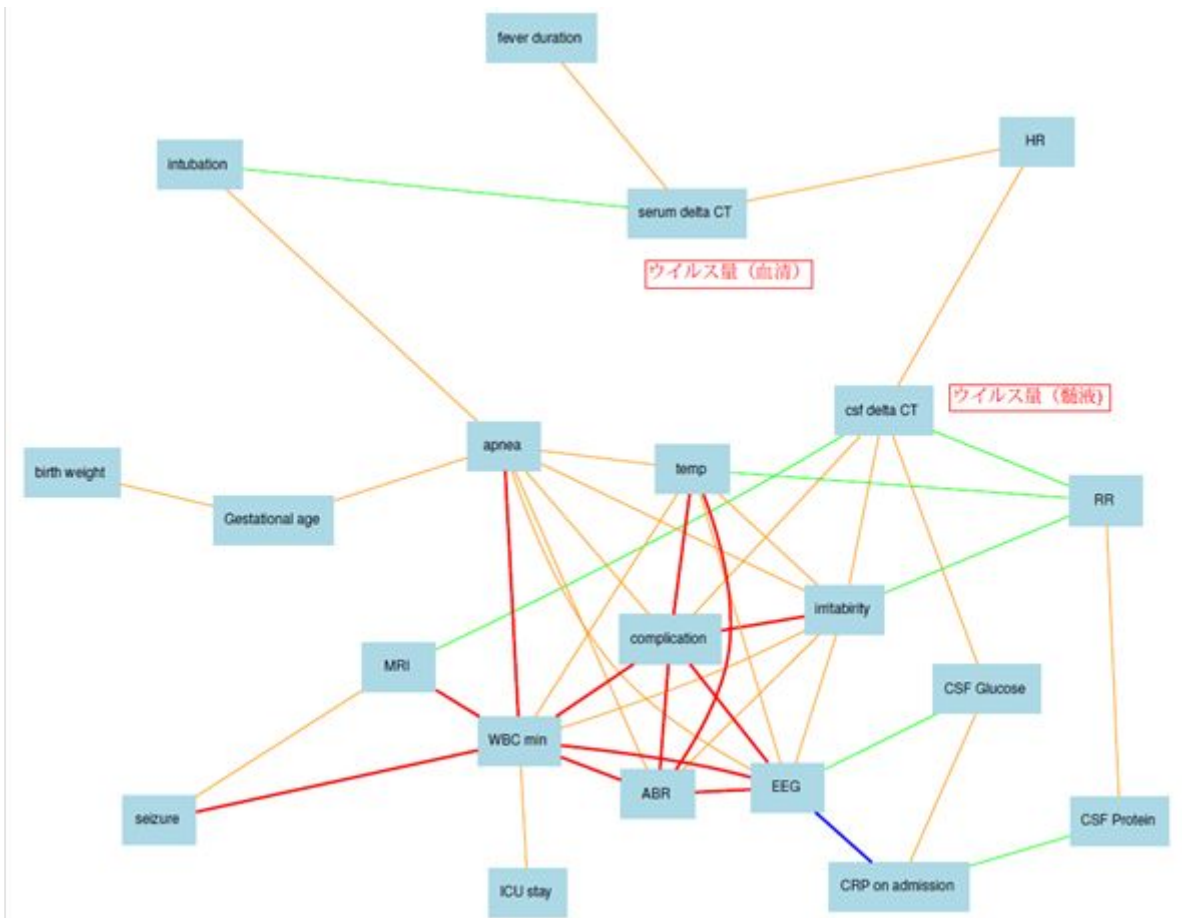


図2 ヒトパレコウイルス感染症における
多因子解析結果



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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2012-2013年シーズン版	柏木 征三郎	インフルエンザ診療マニュアル(2012-2013年版)	一般社団法人日本臨床内科医会	東京	2012	
青景聡之 竹田晋浩	急性呼吸不全におけるECMOの有用性、成績。編集	永井厚志、桑野和善、高橋和久	Annal review呼吸器2013	中外医学社	東京都	2013	250-256

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shinhiro Takeda, et al	Extracorporeal Membrane Oxygenation for 2009 Influenza A(H1N1) Severe Respiratory Failure in Japan	Journal of Anesthesia	26	650-657	2012
竹田晋浩	呼吸不全の体外式膜型人工肺（ECMO）治療	日本医事新報	4629	50-51	2013
竹田晋浩 青景聡之	再評価の経緯と本邦における臨床 適応症例とは。ECMO-up to date	ICU とCCU	36(5)	319-326	2012
Kawashima H, et al	Treatment of andemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children.	Scand J Infect Dis.	44	941-7.	2012
Kawashima H, et al	National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children.	J Med Virol	84(8)	1151-6.	2012
Kawashima H, et al	Production of chemokines in respiratory syncytial virus infection with central nervous system manifestations.	J Infect Chemother.	18	827-31.	2012

Morichi S, Kawashima H, et al.	High production of interleukin-10 and interferon- γ in influenza-associated MERS in the early phase.	Pediatr Int.	54	536-8.	2012
河島尚志 他	各ワクチンの現状と話題 インフルエンザワクチン 脳症,ARDSを防げるか	小児科診療	75	671-676	2012
河島尚志 他	【新薬展望2012】(第III部)治療における最近の新薬の位置付け 新薬の広場 抗ウイルス薬	医薬ジャーナル	48増刊	325-332	2012
河島尚志 他	治療「インフルエンザ脳症の治療	インフルエンザ	13	175-81	2012
河島尚志 他	小児疾患の診断治療基準 第4版 インフルエンザ	小児内科	44増刊号	324-5	2012
森地振一郎,河島尚志 他	HHV-6感染に関連した二相性けいれんと遅発性拡散能低下を呈する急性脳症(AESD)に対して脳低温療法を施行した自験例の検討	日本小児救急医学会雑誌	11	359-66	2012
森地振一郎,河島尚志 他	発熱から神経症状発現までの時間からみたpandemic influenza A (H1N1) 2009脳症の病型と予後との関連	NEURO・INFECT ION	17	142-7	2012
高野 智子, 田尻 仁, 柏木 保代, 河島 尚志	新型インフルエンザ肺炎における血清サイトカインの検討	日本小児救急医学会雑誌	11	63-67	2012
Okumura A, Tsuji T, Kubota T, Ando N, Kobayashi S, Kato T, Natsume J, Hayakawa F, Shimizu T.	Acute encephalopathy with 2009 pandemic flu: Comparison with seasonal flu.	Brain Dev	34 (1)	13-19	2012
Okumura A, Uematsu M, Imataka G, Tanaka M, Okanishi T, Kubota T, Sudo A, Tohyama J, Tsuji M, Ohmori I, Naiki M, Hiraiwa-Sofue A, Sato H, Saitoh S, Shimizu T.	Acute encephalopathy in children with Dravet syndrome.	Epilepsia	53 (1)	79-86	2012

Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi J, Nagata R, Okumura A, Kashii H, Tomita S, Kumada S, Kubota M.	Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS).	Brain Dev	34 (2)	124-127	2012
Oikawa N, Okumura A, Oyama S, Baba H, Shimizu T, Kato A.	A 15-month-old boy with reduced consciousness and convulsion.	J Clin Virol	53(4)	276-279	2012
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	34 (5)	337-343	2012
Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A.	Pertussis-associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child.	J Neurol Sci	320 (1-2)	145-148	2012
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	34 (8)	632-639	2012
Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Natsume J.	Transient reduced diffusion in the cortex in a child with prolonged febrile seizures.	Brain Dev	34 (9)	773-775	2012
Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T.	National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children.	J Med Virol	84 (8)	1151-1156	2012
Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T.	Treatment of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children.	Scand J Infect Dis	44 (12)	941-947	2012
Nagasaka H, Miida T, et al.	Fatty liver and anti-oxidant enzyme activities along with peroxisome proliferator-activated receptors and expressions in the liver of Wilson's disease	Mol Genet Metab	107 (3)	542-547	2012
塚原宏一	酸化ストレスの生体マーカー	小児感染免疫	24 (2)	181-189	2012
Yashiro M, Tsukahara H, et al.	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

Nakatsuka Y, Tsukahara H, et al.	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, Okano Y, et al.	Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening	Clin Chim Acta	416	54-59	2013
Hasegawa S, et al	Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy.	Brain Dev	in press		
Tanaka N, et al	High-resolution computed tomography findings of influenza virus pneumonia: a comparative study between seasonal and novel (H1N1) influenza virus pneumonia.	Jpn J Radiol.	30	154-61	2012
Shoji K, Komuro H, Miyata I, Miyairi I, Saitoh A	Dermatologic Manifestations of Human Parechovirus Type 3 Infection in Neonates and Infants.	Pediatr Infect Dis J	[Epub ahead of print]	10.1097/INF.0b013e31827b1fd0	2012
宮田 一平 宮入 烈	中枢神経感染症における迅速診断	小児科臨床	65	2553-2558	2012
Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le QM, Sekijima M, Ito K, Takada A, Kawaoka Y.	Molecular mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the NA of H5N1 avian influenza viruses.	J Infect Dis	207	89-97	2013
Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y.	Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1.	J Infect Dis	207	262-271	2013
Shinya K, Gao Y, Cilloniz C, Suzuki Y, Fujie M, Deng G, Zhu Q, Fan S, Makino A, Muramoto Y, Fukuyama S, Tamura D, Noda T, Eisefeld AJ, Katze MG, Chen H, Kawaoka Y.	Integrated clinical, pathologic, virologic, and transcriptomic analysis of H5N1 influenza virus-induced viral pneumonia in the rhesus macaque.	J Virol.	86(11)	6055-66	2012
Sugawara T, Ibuka Y, Ohkusa Y, Kawano H, Taniguchi K, Okabe N	Real-time Prescription Surveillance and its Application to Monitoring Seasonal Influenza Activity in Japan	J Med Internet Res	14(1)	1-9	2012

Gu Y, Shimada T, Yasui Y, Tada Y, Kaku M, Okabe N	National Surveillance of Influenza-Associated Encephalopathy in Japan over Six Years, before and during the 2009-2010 Influenza Pandemic.	PLoS ONE	Epub		2013
Oka M, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Ishikawa N, Isumi H, Ichiyama T.	Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of children with acute disseminated encephalomyelitis.	Brain Dev.	Epub		2013
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.	Epub		2012
Matsushige T, Inoue H, Fukunaga S, Hasegawa S, Okuda M, Ichiyama T.	Serum neurofilament concentrations in children with prolonged febrile seizures.	J Neurol Sci.	321(1-2)	39-42	2012
Tanaka N, Emoto T, Suda H, Kunihiro Y, Matsunaga N, Hasegawa S, Ichiyama T.	High-resolution computed tomography findings of influenza virus pneumonia: a comparative study between seasonal and novel (H1N1) influenza virus pneumonia.	Jpn J Radiol.	30	154-61	2012
Kawada J, Kitagawa Y, Iwata N, Ito Y.	Clinical characteristics of influenza virus infection in juvenile idiopathic arthritis patients treated with tocilizumab.	Mod Rheumatol.	Epub		2012