

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森島恒雄

平成 26 年 5 月

目 次

平成 2 5 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 5 年度 分担研究報告

1 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

2 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
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

3 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

4 H1N1 感染モデルにおける Spred-2 による免疫制御機構

松川 昭博

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 中枢神経症状を示したインフルエンザ A(H1N1)pdm09 とロタウイルス胃腸炎における宿主遺伝子発現の解析

森島 恒雄

7 メタボローム解析を用いたインフルエンザ脳症患者血清中のバイオマーカー候補の検討

伊藤 嘉規

8 小児の中枢神経感染症の疫学 ～多因子解析を通じた重症化メカニズムの予測～

宮入 烈

9 インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析

蒔田 泰誠

10 感染症発生動向調査に基づいた 2013/2014 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

11 川崎市における急性脳炎・脳症の届出状況 2009 年～2013 年

岡部 信彦

12 重症例の治療効果および予後に関する検討

池松 秀之

13 「病態及び解析結果からみた重症インフルエンザ肺炎・脳症治療ガイドライン作成の
ための根拠収集」

河島 尚志

14 急性脳炎・脳症に対するホスフェニトインの有効性と安全性

奥村 彰久

15 Diagnosis Procedure Combination からみた日本の小児患者に対する体外循環補助の
実態

中川 聡

16 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

17 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

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

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

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

A . 研究目的

目的

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

期待される成果

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

療体制を整備し、予後の改善に繋げる事ができる。

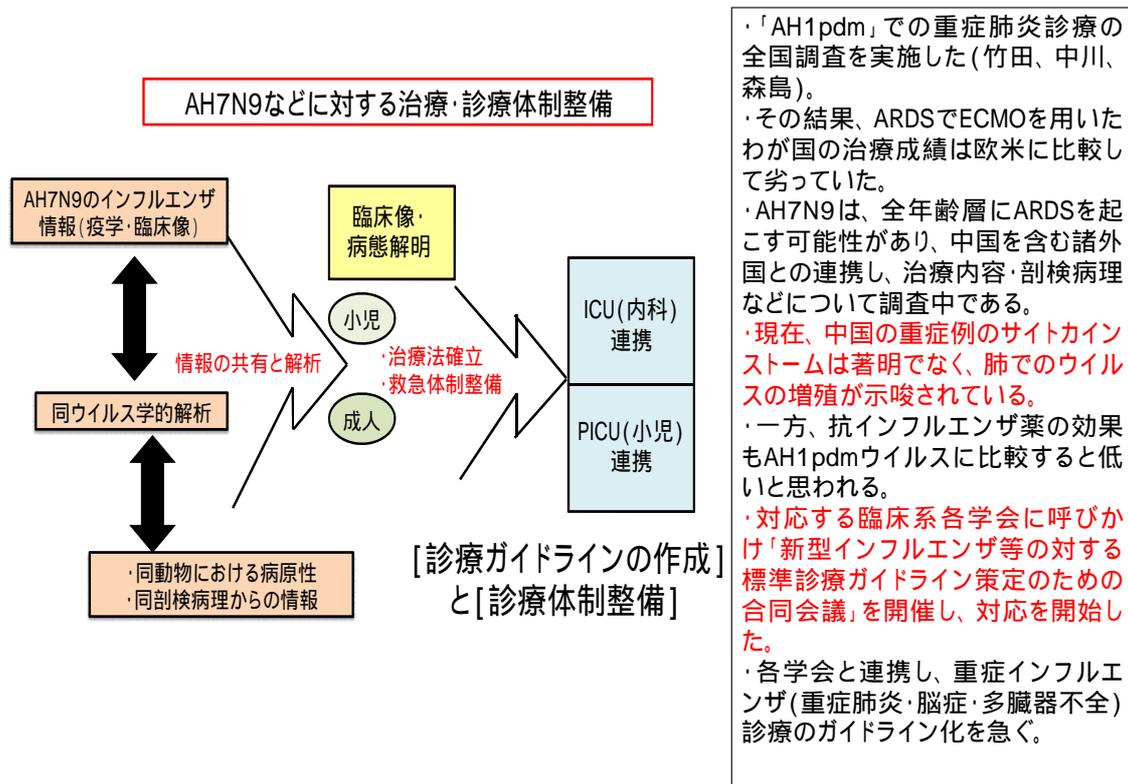
また、季節性インフルエンザ特に AH1N1pdm による肺炎発症の研究は、同様に下気道で増殖する新しいインフルエンザ亜型（AH7N9 含む）に対する治療法の確立に有用と考えられる。

B . 研究方法

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

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

C . 研究結果



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

D . 考察

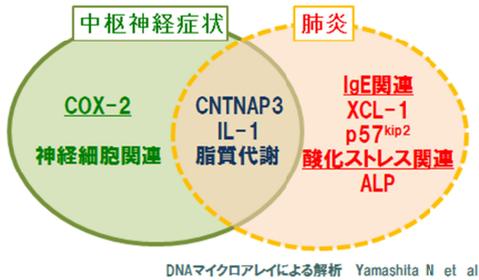
以上のように AH7N9 について、非常に重要な成果が得られた。また、H1N1pdm による肺炎の発症及び重症化について重要な知見が得られ、今後インフルエンザによる重症肺炎に対する治療に役立てることができると期待される。また、診療体制の整備に向けた重要な方向性を示すことができたと思われる。これらは、本研究班の特色、すなわち多分野の専門家が集まり、包括的な研究を推進することによる成果と考えられる。

E . 結論

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

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

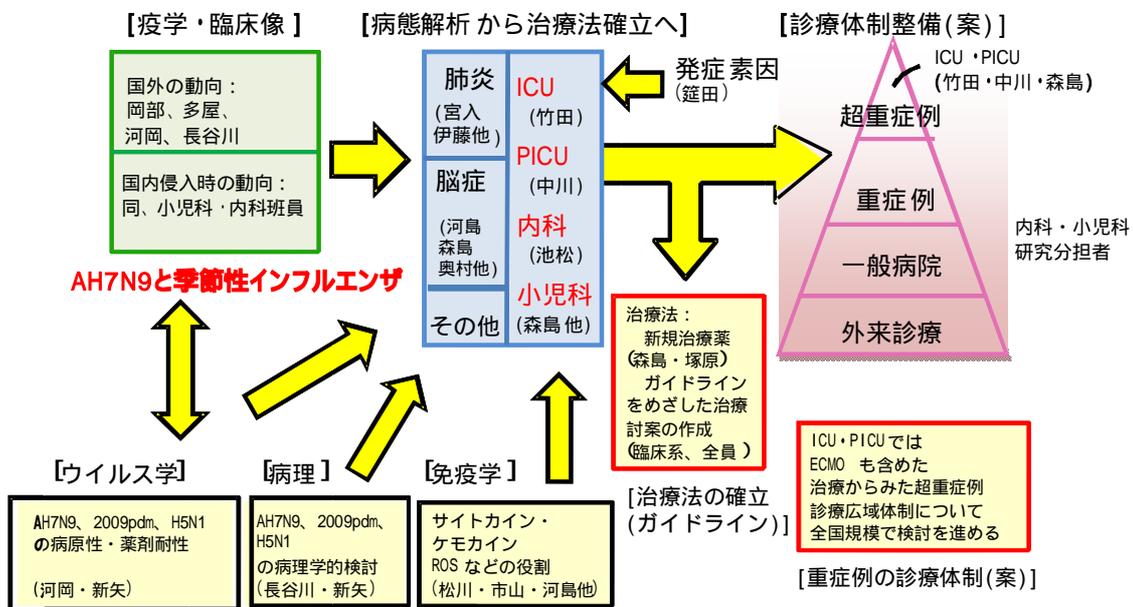
「新型インフルエンザ」の急性期に発現が上昇した遺伝子 (小児)



何故AH1N1pdm肺炎はアレルギー-素因を背景に？



平成26年度研究の概要 (特にAH7N9を研究対象とする)



H7N9の国内侵入 重症例の病態把握 重症例の治療法・診療体制整備

F. 研究発表

論文 (英語論文)

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

2014.

- ・Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Masutani H, Yodoi J, Morishima T. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. *Crit Care Med* 41(1):166-176, 2013.
- ・Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

国際会議発表

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

G . 知的所有権の取得状況

なし

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

2013 年春、中国で H7N9 鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染した。このウイルスの哺乳類における病原性を明らかにするため、中国の患者から分離された H7N9 ウイルス(A/Anhui/1/2013(H7N9) ; Anhui/1 および A/Shanghai/1/2013(H7N9) ; Shanghai/1) のマウスにおける感染性・病原性を、2009 年のパンデミックウイルス (A/California/04/2009(pdmH1N1) ; CA04) およびカモから分離された別系統の H7N9 ウイルス (A/duck/Gumma/466/2011(H7N9) ; DK/GM466) と比較解析した。その結果、Anhui/1 および Shanghai/1 のマウスにおける致死率は DK/GM466 および CA04 より高いことが明らかとなった。また Anhui/1、Shanghai/1 および CA04 の感染後 3 日目の肺および鼻甲介のウイルス量は、DK/GM466 よりわずかであるが高かった。このことから、中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのマウスでの病原性が、通常の鳥のウイルスや 2009 年のパンデミックウイルスよりも強いことが明らかとなった。

A . 研究目的

2013 年 4 月、中国で H7N9 鳥インフルエンザウイルス感染者が発生した。この H7N9 ウイルスは、ヒトからヒトへの伝播はほとんど起こらなかったが、死亡例や重症化例が多数確認された。そこで、ヒトから分離された H7N9 ウイルスの哺乳類における病原性を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

- A/Anhui/1/2013(H7N9) ; Anhui/1
中国の患者から分離された株
- A/Shanghai/1/2013(H7N9) ; Shanghai/1
中国の患者から分離された株
- A/California/04/2009(H1N1pdm09) ; CA04
2009 年のパンデミックウイルス株
- A/duck/Gunma/466/2011(H7N9) ; DK/GM466
カモから分離された中国の H7N9 とは別系統の株

動物

- BALB/c マウス、雌、6 週齢

B . 研究方法

ウイルス

方法

各ウイルス株を、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 PFU/匹ずつ (DK/GM466 のみ 10^7 PFU/匹まで) マウス ($n=4$) へ経鼻投与し、14 日間生死を観察した。得られた結果から MLD_{50} (mouse lethal dose 50; マウスを 50% 死亡させるウイルス量) を算出した。

各ウイルス株を、 10^4 、 10^6 PFU/匹ずつ マウス ($n=3$) へ経鼻投与し、感染後 3 日目および 6 日目に安楽殺した後、各種臓器を採材し、ウイルス量の測定と病理解析を行った。

(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。

C . 研究結果

ヒトから分離された Anhui /1 および Shanghai /1 の BALB/c マウスにおける MLD_{50} は、いずれも $10^{3.5}$ PFU であった。一方、カモから分離された DK/GM466 および 2009 年のパンデミックウイルス CA04 の MLD_{50} は、それぞれ $10^{6.7}$ PFU および $10^{5.5}$ PFU であり、中国で分離された H7N9 ウイルスの病原性が、これらのウイルスよりも高いことが明らかとなった。Anhui /1、Shanghai /1 および CA04 の感染後 3 日目の肺および鼻甲介のウイルス力価は、DK/GM466 よりわずかであるが高かった。感染後 6 日目では、Anhui /1 および CA04 を接種したマウスの肺組織の病変が DK/GM466 より重症化していた。さらに Anhui /1 および CA04 では、気管支炎、細気管支炎、肺胞中隔の肥厚、浮腫、炎症性細胞浸潤が認められた。感染後 3 日目のウイルス抗原を観察したところ、

Anhui /1 および CA04 接種マウスでは肺胞上皮細胞および気管支上皮細胞に抗原陽性細胞が多数認められたが、DK/GM466 を感染させたマウスでは、気管支上皮細胞にわずかに確認されただけであった。

D . 考察

中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのマウスでの病原性は、通常の鳥のウイルスや 2009 年のパンデミックウイルスよりも強いことが明らかとなった。

E . 結論

本研究で得られた結果から、今後も H7N9 ウイルスの監視が重要であることが示唆された。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 26:551-555, 2013.

2. 学会発表
該当なし

G. 知的所有権の取得状況
該当なし

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 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： 2013 年より中国で H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスヒト感染例が報告されているが、重症例は急性呼吸促進症候群（ARDS）を併発し、呼吸不全で死亡していると報告されている。ヒト剖検例の報告はなく、患者体内における H7N9 ウイルスの局在は不明である。我々がこれまで解析したインフルエンザ剖検例の中で、臨床的に ARDS を呈した例は、主に H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスヒト感染症と 2009 年パンデミックインフルエンザ発生初期の感染例である。多くは発症から 7-10 日に死亡しており肺病理像はび慢性肺胞障害の滲出期を呈し、肺胞上皮細胞にインフルエンザ抗原が検出された。H7N9 ウイルスは鳥型インフルエンザレセプターのみならずヒト型レセプターにも親和性があることが遺伝子配列上予測されており、ヒト気管の組織培養において気管上皮細胞に感染することが報告されている。H7N9 インフルエンザウイルスヒト感染例の肺組織ではウイルスは気管～細気管支上皮細胞および肺胞上皮細胞に感染していることが予想される。また、ARDS の治療に ECMO を導入し軽快するも合併症で 21 病日に死亡した症例の剖検肺組織を解析し、扁平上皮化生様細胞集団が肺の再生像である可能性を示唆する解析結果を得た。

A. 研究目的

我々の分担研究の目的は、重症のインフルエンザによる肺炎・脳炎のヒト剖検組織標本を分子病理学的に解析し、病態解明のための新しい知見を得ることである。

2013 年 3 月中国で H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスヒト感染例が報告され、重症死亡例では急性呼吸促進症候群（ARDS）を併発し、呼吸不全で死亡した。ヒト剖検例の報告はなく、患者体内における H7N9 ウイルスの局在は不明である。ヒトから分離された H7N9 ウイルスをヒト気管および肺

の組織培養系に感染させた実験の報告と我々が行った ARDS を併発したインフルエンザヒト剖検例の病理学的解析結果とから H7N9 ウイルスのヒト体内での動態を推測した。また、2009 年パンデミックインフルエンザに併発した ARDS の治療に Extracorporeal membrane oxygenation（ECMO）を導入した症例の剖検肺組織について、ECMO 管理中に肺組織がどのように再生あるいは再構成されるかを病理学的に解析した。

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剖検例の中で重症 ARDS を呈し呼吸不全で死亡した症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の定量。

文献的検索

C. 研究結果

1. H7N9 亜型鳥インフルエンザヒト感染に関する考察

(i) H7N9 亜型鳥インフルエンザヒト感染例の臨床学的特徴

2014 年 2 月現在、327 例の報告があり、85 人が死亡している。急な発熱と咳で発症し、4-5 日目から急速に悪化し入院し、発症 7 日目前後に ARDS を併発し呼吸器管理となる。発症前に鳥と接触している例はおよそ 75% であり、患者の平均年齢は 62 歳で基礎疾患を有する者が 45% であった。論文に記載された死亡例では抗ウイルス薬は発症 1 週間後に投与開始されている。(NEJM、Gao et al、2013 April)。一方、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスヒト感染例では患者の半数以上が 20 歳未満であることが異なるが、発症から ARDS の併発、死亡

に至るまでの経過は類似している。多くの場合、ノイラミダーゼ阻害剤は発症 1 週間後に投与開始されており有効でない。

(ii) ヒトから分離された H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスの特徴

Anhui 株と Shanga 株の HA 蛋白の 226 番目が Q(グルタミン)から L(ロイシン)に変異しており、ヒト型レセプターへの結合能が上がっていることが推測された。また PB2 蛋白の 627 番目が E(グルタミン酸)から K(リシン)に変異しており、より哺乳類に適応していることが推測された(低温条件でウイルス増殖が可能)。HA の 225 番目は G(グリシン)で鳥型レセプターへの結合能も有している点は H5N1 ウイルスと同様である (Eurosurveillance 18, 2013 April)。

(iii) H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス感染患者体内でのウイルスの感染部位の推定

ヒト患者由来の H7N9 ウイルスはヒトの気管と肺の ex-vivo 組織培養系において気管および肺胞上皮細胞に感染し、細胞障害をおこすことが報告されている (Nature VOL499 25 July 2013)。また上気道では H5N1 よりも効率よく増殖していると報告されている。H7N9 はヒトのサイトカイン・ケモカイン誘導は H5N1 よりも弱い、A/H1N1pdm09H1N1pdm よりも強い (The Lancet respiratory Medicine)。以上のことから H7N9 ウイルスのヒト体内での感染部位は気管～細気管支の上皮細胞および肺胞上皮細胞が考えられた。ヒト→ヒト感染が起こりパンデミックにならないことから、上気道よりも肺胞上皮細胞で増殖能

が高いと考えられる。パンデミック発生初期の A/H1N1pdm ウイルス感染剖検例で肺胞上皮細胞でウイルスが感染増殖しており、肺から HA225 がグリシンのウイルスが回収された例に類似するのではないかと推測された。この症例では上気道の上皮細胞にもウイルス抗原は検出されたが、量は少なく、実際発症初期の咽頭ぬぐい液の迅速診断でインフルエンザ抗原は陰性であった。

2. ECMO 治療後の肺組織像

症例は24歳の女性。6日目より呼吸困難が出現し入院呼吸器管理となる。7日目よりECMO管理追加。呼吸条件は次第に下げられ、ECMOは有効であったと考えられたが、15日目にくも膜下出血、脳ヘルニアを併発し、21日目に永眠され、剖検となった。肺のホルマリン固定パラフィン包埋切片を解析した。HE染色では肺胞内の器質性変化が目立ち大型の型肺胞上皮細胞の過形成がみられた。また腺様化生や扁平上皮化生など強い肺障害の修復過程と考えられる組織所見がみられたが、これらの細胞がどのように肺の修復・再生過程にかかわっているかは今後詳細に解析する予定である。ヒト下気道より採取した progenitor細胞を *in vitro* で培養すると角化せず、肺胞上皮細胞マーカーを発現するようになることが免疫組織化学と遺伝子発現プロファイリングによって明らかにされている (Cell 147, 525-538, 2011)。観察された化生細胞が肺胞上皮細胞に分化する可能性があるとする、これらの組織所見が肺再生過程の1つであるかもしれない。実際、ECMO 治療後肺CT像は正

常に近い状態まで回復することが報告されている。

D. 考察

H7N9 鳥インフルエンザウイルスヒト感染例は2013年末より再度患者数が増加し、2014年現在感染者327人(85人死亡)である。H5N1よりもヒトで増殖しやすいことが予想され、限局的にヒト-ヒト感染疑いの事例も出ている。しかしながらパンデミック(大流行)に至るまで変異するかどうかはまだ不明である。今後ヒト剖検例の報告ができれば細菌感染や真菌感染などの合併や、患者の基礎疾患とH7N9感染との関連性が明らかになるとと思われる。

重症インフルエンザ肺炎の治療の選択肢にECMO管理があるが、治療効果と治療過程について、肺CT像、肺機能検査に加え、肺の組織像の解析は非常に重要である。肺組織の解析により肺再生に必要な因子が解明されればECMO管理をしながら肺再生過程に有効な因子を与えることで肺再生を促進することができるかもしれない。

E. 結論

インフルエンザウイルス肺炎は重症ARDSを併発し呼吸不全で死亡する。特に肺胞上皮細胞に親和性のあるH5N1亜型およびH7N9亜型鳥インフルエンザウイルスや発症早期の(完全にヒト化していない)パンデミックインフルエンザウイルスは、直接的な肺胞障害をおこすので、より重症なARDSを併発すると考えられる。今後H7N9ウイルス感染剖検肺組織を解析する際には肺局所のサイトカインの発現などについても解析したいと考えてい

る。ECMO 治療したインフルエンザウイルス肺炎の剖検肺組織では肺再生過程と思われる組織像がみられた。ECMO 治療後の肺組織像の解析は重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neuman G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501, 551-555, 2013
- 2) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.* 26, 357-369, 2013
- 3) Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T, Nakajima N, Hasegawa H, Kida H. Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. *PLoS One.* 9,8(7), 2013.
- 4) Miyazaki M, Nishihara H, Hasegawa H, Tashiro M, Wang L, Kimura T, Tanino M, Tsuda M, Tanaka S. NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 29;441(4):953-7.
- 5) Aina A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 Sep;9(9):1962-70.
- 6) Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Aina A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine.* 2013 Aug;63(2):194-200.
- 7) Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T,

Nakajima N, Hasegawa H, Kida H. Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. PLoS One. 2013 Jul 9;8(7):e68375.

- 8) Dan K, Akiyoshi H, Munakata K, Hasegawa H, Watanabe K. A Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, Hochuekkito, pretreatment in mice prevented influenza virus replication accompanied with GM-CSF expression and increase in several defensin mRNA levels. *Pharmacology*. 2013;91(5-6):314-21.
- 9) Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijiro K, Sawa H. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano*. 2013 May 28;7(5):3926-38.
- 10) 長谷川 秀樹, 田村 慎一 インフルエンザに立ち向かうインフルエンザワクチンの現状と展望 *Mebio*(0910-0474)30 巻 12 号 Page68-73 2013.12
- 11) 長谷川 秀樹 今、注目のワクチン次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン *ファルマシア* (0014-8601)49 巻 3 号 Page196-200 2013.03
- 12) 長谷川 秀樹 ワクチン対策の現状と課題 インフルエンザワクチン 化

学療法の領域(0913-2384)29 巻 2 号
Page230-234 2013.01

2. 学会発表

国内会議

- 1) 中島典子. ヒトにおける高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 感染症の病理:第 155 回日本獣医学会学術集会(東京)2013 年 3 月
- 2) 長谷川秀樹、中島典子. 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ剖検例からの検討 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
- 3) 渡辺登喜子、今井博貴、村上晋、中島典子、富田有里子、山吉誠也、浦木隆太、西藤岳彦、内田裕子、長谷川秀樹、田代真人、河岡義裕 中国でヒトから分離された H7N9 鳥インフルエンザウイルスのフェレットにおける飛沫伝播性 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 4) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、佐多徹太郎、長谷川秀樹重症インフルエンザウイルス肺炎におけるサイトカイン・ケモカインの発現 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
- 5) 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 (Intranasal Influenza Vaccine as a vaccine for next generation) 第 86 回日本細菌学会総会(幕張)2013 年 3 月
- 6) 岡田 清吾, 長谷川 俊史, 長谷川 秀樹, 相内 章, 池本 健三, 佐々木 功

- 典, 戸田 昌一, 調 恒明, 市山 高志
インフルエンザA/H1N1 2009感染による
気管支喘息モデルマウスの気管支
肺胞洗浄液解析 日本小児科学会学
術集会(広島)2013年4月
- 7) 長谷川 秀樹: ワクチン研究の最前線
次世代ワクチンとしての経鼻インフ
ルエンザワクチンの開発. 日本薬剤
学会 第28年会(名古屋) 2013年
5月
- 8) 宮崎 将也, 王 磊, 長谷川 秀樹, 津
田 真寿美, 西原 広史, 田中 伸哉:
ヒト細胞内蛋白質 NS1BP の機能解析.
第102回日本病理学会総会(札幌)
2013年6月
- 9) 中島 典子, 佐藤 由子, 片野 晴隆,
長谷川 秀樹: 感染病理学の新展開
新しい迅速 *in situ* ゲノム検出法の感
染病理への応用. 第102回日本病
理学会総会(札幌)2013年6月
- 10) 片野 晴隆, 佐藤 由子, 中島 典子,
福本 瞳, 鈴木 忠樹, 黒田 誠, 長谷
川 秀樹 感染病理学の新展開 病
理検体からの不明病原体検出法の最
先端 第102回日本病理学会総会
(札幌)2013年6月
- 11) 長谷川 秀樹, 中島 典子 炎症・免疫
機構の新基軸と疾病の病理 重症イン
フルエンザ病態解明へのアプローチ
剖検例からの検討 第102回日本病
理学会総会(札幌)2013年6月
- 12) 長谷川 秀樹: 良く効くインフルエン
ザワクチンを目指して. 第54回日本
臨床ウイルス学会(倉敷)2013.年6
月
- 13) 長谷川 俊史, 岡田 清吾, 脇口 宏之,
市山 高志, 長谷川 秀樹, 相内 章,
調 恒明, 戸田 昌一, 熱田 了 喘息
モデルマウスを用いたインフルエン
ザ感染による気管支喘息発作重症化
の病態解析 新型と季節性インフル
エンザの比較 第45回日本小児感染
症学会総会・学術集会(札幌)2013
年10月
- 14) 脇口 宏之(山口大学 大学院医学系研
究科小児科学分野), 岡田 清吾, 長
谷川 秀樹, 相内 章, 戸田 昌一, 調
恒明, 長谷川 俊史 気管支喘息(病
態)・免疫不全 喘息モデルマウスを用
いた新型インフルエンザ感染におけ
る気管支肺胞洗浄液中ケモカインの
検討 第45回日本小児感染症学会総
会・学術集会(札幌)2013年10月
- 15) 長谷川 秀樹, 相内 章, 田村 慎一,
鈴木 忠樹, 浅沼 秀樹, 小田切 孝人,
田代 真人, 倉田 毅 高病原性鳥イン
フルエンザウイルス A(H5N1) 全粒子
不活化ワクチンを用いた経鼻インフ
ルエンザワクチンの効果 第17回日
本ワクチン学会学術集会(津)2013
年11月
- 16) 鈴木 忠樹, 川口 晶, 相内 章, 田村 慎
一, 小田切 孝人, 田代 真人, 長谷川
秀樹 経鼻インフルエンザワクチン
により鼻腔粘膜上に誘導される多量
体 IgA 抗体のウイルス感染防御にお
ける役割 第17回日本ワクチン学会
学術集会(津)2013年11月
- 17) 相内 章, 田村 慎一, 鈴木 忠樹, 小
田切 孝人, 田代 真人, 倉田 毅, 長
谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワク
チンにより誘導される抗体応答に年

齢、性別あるいは副反応が与える影響
第 17 回日本ワクチン学会学術集会
(津) 2013 年 11 月

- 18) 中島 典子、佐藤 由子、片野 晴隆、
佐多 徹太郎、長谷川 秀樹 重症イン
フルエンザウイルス肺炎におけるサ
イトカイン・ケモカインの発現 第
61 回日本ウイルス学会学術集会(神
戸)2013 年 11 月
- 19) 泉地 恭輔、相内 章、鈴木 忠樹、浅
沼 秀樹、梁 明秀、長谷川 秀樹 母
子免疫によるインフルエンザウイル
ス感染防御効果の解析 第 61 回日本
ウイルス学会学術集会(神戸) 2013
年 11 月
- 20) 池田 千将、伊藤 良、相内 章、鈴木 忠
樹、田村 慎一、荒尾 雄二郎、田代 眞
人、浅沼 秀樹、長谷川 秀樹 経鼻イ
ンフルエンザワクチンで誘導される
抗体応答に基礎免疫が与える影響
第 61 回日本ウイルス学会学術集会
(神戸)2013 年 11 月
- 21) 相内 章、浅沼 秀樹、鈴木 忠樹、
原田 勇一、田村 慎一、田代 眞人、
長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワ
クチンにおけるワクチンの組み合わ
せが抗体応答に与える影響 第 61 回
日本ウイルス学会学術集会(神戸)
2013 年 11 月
- 22) 川口 晶、鈴木 忠樹、相内 章、佐
藤 由子、永田 典代、田代 眞人、長
谷川 秀樹 Nc/Nga マウスを用いた
喘息発作によるインフルエンザ感染
症重症化モデルの炸裂 第 61 回日本
ウイルス学会学術集会(神戸)2013
年 11 月

国際会議

- 1) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Kawachi
K, Suzuki K, Liem NT, Sata T,
Hasegawa H Pathological study of
ARDS complicated by influenza virus
infection Option for the Control of
Influenza VIII September 4-10, 2013.
CapeTown
- 2) Shoji Kawachi, Thuy Thi Bich Phung,
San Thi Luong, Noriko Nakajima,
Tatsuya Okamoto, Hiroyuki Nunoi, Aki
Hata, Kikuko Takenouchi, Sae Hayashi,
Fumiyo Nojiri, Kazuo Suzuki , and
Liem Thanh. Nguyen Severe cases of
influenza infection in Vietnamese
children. - From the Prospective Study
Cases in PICU of NHP-Hanoi -, Option
for the Control of Influenza VIII
September 4-10, 2013. CapeTown
- 3) Hideki Hasegawa, Akira Ainai,
Tadaki Suzuki, Elly van Riet,
Shi-ichi Tamura, Kazuyuki Ikeda,
Takato Odagiri, Masato Tashiro,
Takeshi Kurata. Antibody
responses in serum and nasal
mucus induced by the intranasal
vaccination with a whole-virion
inactivated vaccine of
A(H5N1)virus in healthy naïve
human adults. Keystone Symposia
on Molecular and Cellular Biology.
Keystone, Colorado USA, January
2014.
- 4) Kazuyuki Ikeda, Ryo Ito, Akira
Ainai, Tadaki Suzuki, Shin-ichi

Tamura, Yujiro Arao, Masato Tashiro, Hideki Asanuma, Hideki Hasegawa. Antibody responses induced by intranasal vaccination of a whole inactivated influenza virus in mice previously infected or vaccinated. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Keystone, Colorado USA, January 2014.

- 5) Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainai, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa. Impact of the quaternary structure of human Secretory-IgA on neutralization potency to Influenza A virus in upper respiratory tract. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Keystone, Colorado USA, January 2014.

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

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
松重武志 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・講師
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
脇口宏之 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（A(H1N1)pdm09）感染では喘息発作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。分担者らはこれまでにA(H1N1)pdm09感染は喘息マウスにおいて非喘息マウスに比し、肺において有意に高いサイトカイン産生およびウイルス増殖を示し、より強い炎症を惹起し、呼吸器症状を重篤化させている可能性を報告した。本研究では更なる病態解明のため季節性インフルエンザ感染における喘息マウスの気管支肺胞洗浄液（BAL）を解析した。

【方法】BALB/cマウスを用いて卵白アルブミンにより喘息モデルマウスを作製し、季節性インフルエンザウイルスを感染させ、感染後7日にBAL中のサイトカイン濃度、ウイルス力価を測定し、非喘息マウスと比較検討した。

【結果】季節性インフルエンザ感染ではA(H1N1)pdm09感染と異なり、喘息マウスにおいてBAL中interleukin (IL)-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ 濃度が非喘息マウスに比し有意に低値で、またBAL中ウイルス力価も有意に低値だった。

【結論】A(H1N1)pdm09感染では季節性と異なって小児気管支喘息発作を重症化させてい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

ついては未だ不明である。分担者らが当科に入院したA(H1N1)pdm09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 (Hasegawa S, et al. *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 **A(H1N1)pdm09 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。

分担者らはこれまでに A(H1N1)pdm09 感染は喘息マウスにおいて非喘息マウスに比し, 肺において有意に高いサイトカイン産生およびウイルス増殖を示し, より強い炎症を惹起し, 呼吸器症状を重篤化させている可能性を報告した (Okada S, et al. *Cytokine*, 2013). 本研究では更なる病態解明のため季節性インフルエンザ感染における喘息マウスの気管支肺胞洗浄液 (BAL) を解析した。

B . 研究方法

卵白アルブミン (OVA) で喘息モデルマウス (BALB/c マウス) を作製し (図 1), 季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1/Yamagata, A/H1N1/Puerto Rico, マウス馴化株, 国立感染症研究所から分与) を経鼻感染 (1×10^5 pfu/マウス) させ, 感染後 7 日に BAL を回収し, サイトカイン測定, プラークアッセイを行い, 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 OVA を用いて作製した喘息モデルマウスに **季節性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 BAL 中炎症性サイトカインの interleukin (IL)-6 が有意に低値であった (図 2)**。Tumor necrosis factor (TNF)- (図 3) および抗炎症性サイトカインの IL-10 (図 4) も同様の結果であった。さらに Th1 タイプのサイトカインである **interferon (IFN)- 濃度も感染喘息マウスで有意に低値であった (図 5)**。また感染喘息マウスでは非喘息マウスに比して **BAL 中ウイルス力価が有意に低値であった (図 6)** (論文投稿中)。

D . 考察

以上の結果から季節性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, A(H1N1)pdm09 とは異なって肺においてサイトカイン産生およびウイルス増殖が低く, 炎症が惹起されにくいことが示唆された。当初は A(H1N1)pdm09 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炎症が惹起されることを推測していたが, A(H1N1)pdm09 および季節性インフルエンザ感染いずれにおいても喘息マウスでは非喘息マウスに比し, 有意に IFN- 濃度が低値であることから単に Th1/Th2 バランスだけでは説明できない複雑な病態であることが示唆された。今後更なる病態解明が必要である。

E . 結論

A(H1N1)pdm09 感染は季節性と異なって喘息モデルマウスでは非喘息マウスに比して、肺におい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 . Takahashi K, Hasegawa S, Maeba S, Fukunaga S, Motoyama M, Hamano H, Ichiyama T. Serum tau protein level serves as a predictive factor for neurological prognosis in neonatal asphyxia. Brain Dev. 2013; in press.
- 2 . Kajimoto M, Hasegawa S, Nomura S, Inoue H, Matsushige T, Ichiyama T. An 11-year-old girl with recurrent bacterial meningitis due to liquorrhea caused by bone malformation of the skull base. Brain Dev. 2013; in press.
- 3 . Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Oka M, Isumi H, Emi S, Hayashi M, Ichiyama T. Serum and cerebrospinal fluid levels of visinin-like protein-1 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. Brain Dev. 2013; in press.
- 4 . Momonaka H, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Okada S, Nakatsuka K, Morishima T, Ichiyama T. High mobility group box 1 in influenza-associated encephalopathy. Brain Dev. 2013; in press.
- 5 . Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. Cytokine. 2013; 63: 194-200.
- 6 . 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). 2013; in press.
- 7 . Oka M, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Ishikawa N, Isumi H, Ichiyama T. Tau protein concentrations in the cerebrospinal fluid of children with acute disseminated encephalomyelitis. Brain Dev. 2014; 36: 16-20.
- 8 . Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Ishida C, Tanaka S, Morishima T, Ichiyama T. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. Brain Dev. 2013; 35: 626-9.
- 9 . 長谷川俊史, 岡田清吾, 市山高志. 【感染と喘息】感染と小児喘息の臨床. アレルギーの臨床2013; 33巻11号: 1012-1016.

- 1 0 . 長谷川俊史, 市山高志. 【ワンランク上の小児の臨床検査-病態生理に基づく選び方・考え方-】感染症の臨床検査 敗血症 (Q&A/特集). 小児科学レクチャー. 2013; 3巻2号: 316-322.
- 1 1 . 福島慎二, 阿部克昭, 河合泰宏, 新田雅彦, 長谷川俊史, 弓削昭彦. 脳症の診療をさらに改善するためには? 小児科臨床 2013; 66巻3号: 510-514.
- 1 2 . 原正美, 長谷川俊史, 松原知代, 山口公一, 百瀬希美, 古川漸. 母乳中のアレルゲン濃度と食事との関連(続報) 母乳中のオボアルブミン濃度とラクトフェリンについて. 日本食育学会誌. 2013; 7巻2号: 155-160.
- 1 3 . 原正美, 松原知代, 山口公一, 長谷川俊史, 大山昇一, 加藤重城, 古川漸. 母乳中のアレルゲン濃度と食事との関連 ELISA法による検討. 日本食育学会誌. 2013; 7巻1号: 13-20.
- 2 . 学会発表
- 1 . 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 116 回日本小児科学会学術集会. 広島. 2013.4.19-21.
- 2 . 長谷川俊史. 気管支喘息とウイルス感染. 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会. 横浜. 2013.5.11-12.
- 3 . Shunji Hasegawa, Reiji Hirano, Hiroyuki Wakiguchi, Reiko Okamoto-Nakagawa, Shoichi Toda, Shuji Hamaoka, Hiroyuki Tsukagoshi, Kunihisa Kozawa, Hirokazu Kimura, Masahiro Noda, Takashi Ichiyama, Komei Shirabe. Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: virus-induced asthma in Japanese children. APAPARI2013. Bangkok. 2013.10.2-4.
- 4 . 長谷川俊史, 岡田清吾, 脇口宏之, 市山高志, 長谷川秀樹, 相内章, 調恒明, 戸田昌一, 熱田了. 喘息モデルマウスを用いた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～新型と季節性インフルエンザの比較～. 第 50 回日本小児アレルギー学会. 横浜. 2013.10.19-20.
- 5 . 長谷川俊史, 脇口宏之, 岡田清吾, 市山高志, 長谷川秀樹, 相内章, 調恒明, 戸田昌一, 熱田了. 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肺胞洗浄液中ケモカイン濃度の検討. 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌. 2013.10.26-27.
- 6 . 長谷川俊史, 岡田清吾, 脇口宏之, 市山高志, 調恒明, 戸田昌一, 熱田了. モデルマウスを用いた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～新型と季節性の比較～. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京. 2013.11.28-30.
- 7 . 梶本まどか, 井上裕文, 松重武志, 岡桃子, 百中宏, 長谷川俊史. Suppression-burst pattern を呈した新生児期発症のてんかん症候群の双子例. 第 47 回日本てんかん学会学術集会. 福岡. 2013.10.11-12.
- 8 . 鈴木康夫, 岡田清吾, 岡山直子, 末広 寛, 梶本まどか, 下村麻衣子, 長谷川俊史. 新生児 Marfan 症候群の 1 例. 第 49 回日本小児循環器学会. 東京. 2013.7.13
- 9 . 鈴木康夫, 岡田清吾, 中家希, 長谷川俊史. 心機能低下を合併し血漿交換療法施行後、デルタ波の出現を認めた川崎病 1 男児例. 第 33 回日本川崎病学会・学術集会. 富山. 2013.9.27-28.
- 1 0 . 松重武志, 井上裕文, 梶本まどか, 百中宏, 長谷川俊史, 市山高志. ケント食療法が著効した GLUT1 異常症

- の1例. 第55回日本小児神経学会学術集会. 大分. 2013.5.30-6.1.
- 1 1 . 松重武志, 井上裕文, 脇口宏之, 岡桃子, 梶本まどか, 百中宏, 長谷川俊史. 3年以上発作コントロール良好な14番環状染色体の1例. 第47回日本てんかん学会学術集会. 福岡. 2013.10.11-12.
- 1 2 . 松重武志, 有吉平, 井上裕文, 岡桃子, 梶本まどか, 脇和之, 百中宏, 尾内一信, 長谷川俊史. 帯状疱疹経過中に無菌性髄膜炎を合併した14歳男児例. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌. 2013.10.26-27.
- 1 3 . 工藤敬子, 木村献, 前場進治, 長谷川俊史. 羊水と出生後児の染色体検査の結果が異なった2症例. 第58回日本未熟児新生児学会・学術集会. 石川. 2013.11.30-12.2.
- 1 4 . 脇口宏之, 岡田清吾, 長谷川秀樹, 相内章, 戸田昌一, 調恒明, 長谷川俊史. 喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染における気管支肺胞洗浄液中ケモカインの検討. 第50回日本小児アレルギー学会. 横浜. 2013.10.19-20.
- 1 5 . 脇口宏之, 長谷川俊史, 岡田清吾, 脇口宏之, 市山高志, 長谷川秀樹, 相内章, 調恒明, 戸田昌一, 熱田了. 喘息モデルマウスを用いた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～新型と季節性インフルエンザの比較～. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会. 札幌. 2013.10.26-27.
- 1 6 . 井上裕文, 梶本まどか, 松重武志, 百中宏, 片野晴隆, 高橋幸利, 長谷川俊史. 抗GluR抗体陽性非ヘルペス性急性辺縁系脳炎におけるサイトカインの経時的変化. 第18回日本神経感染症学会総会・学術集会. 宮崎. 2013.10.11-12.
- 1 7 . 岡桃子, 長谷川俊史, 松重武志, 井上裕文, 梶本まどか, 石川尚子, 伊住浩史, 市山高志. 急性散在性脳脊髄炎における髄液中タウ蛋白値の検討. 第116回日本小児科学会学術集会. 広島. 2013.4.19-21.
- 1 8 . 岡田清吾, 長谷川俊史, 長谷川秀樹, 相内章, 池本健三, 佐々木功典, 戸田昌一, 調恒明, 市山高志. インフルエンザ A/H1N12009 感染による気管支喘息モデルマウスの気管支肺胞洗浄液解析. 第116回日本小児科学会学術集会. 広島. 2013.4.19-21.
- 1 9 . Seigo Okada, Shunji Hasegawa, Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Ryo Atsuta, Kenzo Ikemoto, Kohsuke Sasaki, Shoichi Toda, Komei Shirabe, Midori Takahara, Sawako Harada, Tsuneo Morishima, Takashi Ichiyama. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. Kuching. 2013.5.9-12.
- 2 0 . 岡田清吾, 鈴木康夫, 有村卓朗, 木村彰方, 鳴海宏子, 長谷川俊史. -Cardiac Myosin Heavy Chain (MYH7) 遺伝子の新規点変異をみとめた肥大型心筋症の12歳男児例. 第49回日本小児循環器学会総会・学術集会. 東京. 2013.7.11-13.
- 2 1 . 岡田清吾, 鈴木康夫, 東良紘, 井上裕文, 高原みどり, 長谷川俊史. 急性期川崎病患児の末梢血単球/マクロファージにおけるCD163発現に関する検討. 第33回日本川崎病学会・学術集会. 富山. 2013.9.27-28.
- 2 2 . 岡田清吾, 中家希, 戸田昌一, 調恒明, 岡本玲子, 尾内一信, 長谷川俊史. 当科における気管支喘息入院患児のウイルス感染関与の検討. 第46回日本小児呼吸器学会. 佐賀. 2013.11.22-23.
- 2 3 . 市村卓也, 前場進治, 長谷川俊史. 出生後に肝内腫瘍が自然消退した超低出生体重児の一例. 第49回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会. 横浜. 2013.7.14-16.
- 2 4 . 木村献, 工藤敬子, 前場進治, 長谷川俊史. 結紮術により呼吸状態の改善を認めた動脈管閉存症(PDA)を合併したsevere bronchopulmonary dysplasia(BPD)の1例. 第58回日本

未熟児新生児学会・学術集会. 石川.
2013.11.30-12.2.

25 . 中家希, 岡田清吾, 戸田昌一, 調
恒明, 岡本玲子, 尾内一信, 長谷川
俊史. 当科における気管支喘息入院
患児のウイルス感染関与の検討. 第
45 回日本小児感染症学会総会・学術
集会. 札幌. 2013.10.26-27.

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

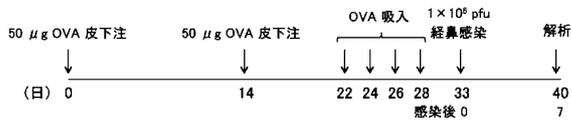


図1 本研究のプロトコール

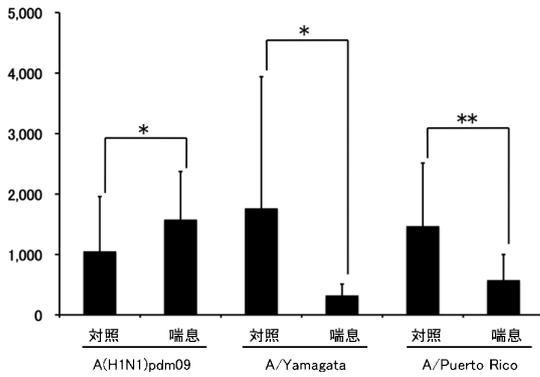


図2 新型および季節性インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IL-6 濃度

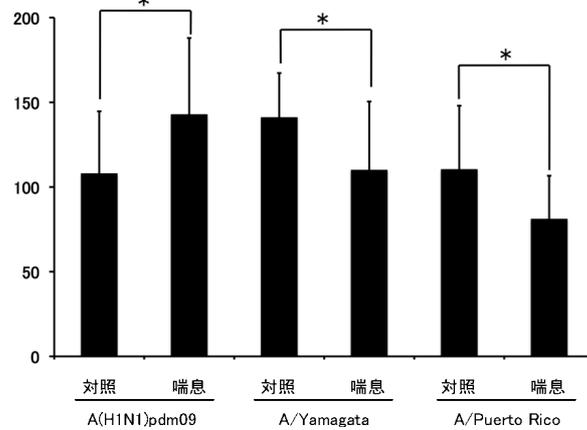


図3 新型および季節性インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 TNF- α 濃度

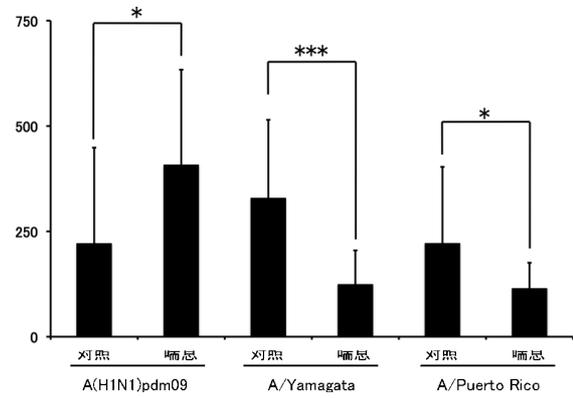


図4 新型および季節性インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IL-10 濃度

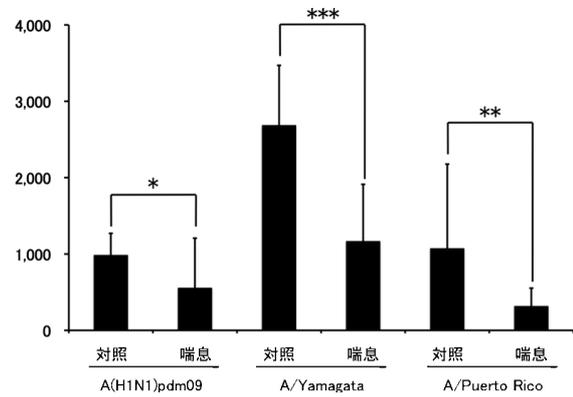


図5 新型および季節性インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中 IFN- γ 濃度

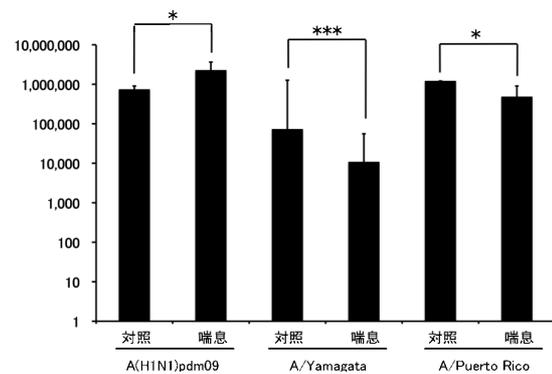


図6 新型および季節性インフルエンザ感染後肺胞洗浄液中ウイルス力価

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

H1N1 感染モデルにおける Spred-2 による免疫制御機構

研究分担者 松川昭博 岡山大学医歯薬学総合研究科病理学（免疫）・教授

研究要旨

インフルエンザ H1N1 感染における ERK/MAPK 経路の内因性抑制因子
Spred-2 による免疫制御機構の解明

A．研究目的

インフルエンザウイルス感染症をはじめとした炎症反応における代表的な細胞内シグナル伝達経路の1つに Ras-Raf-ERK/MAPK 経路が挙げられる。本研究では、ERK/MAPK の内因性抑制因子 Spred-2 によるウイルス感染時の免疫制御機構を明らかにする事を目的とした。

B．研究方法

野生型および Spred-2 欠損マウスに A/PR8/34(H1N1) を経鼻的に感染させ、H1N1 感染後の生体反応を比較検討した。

（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 マウス感染モデルで Spred-2 が有意に上昇する事を見出した。H1N1 感染マウスモデルでの Ras-Raf-ERK/MAPK 経路は活性化していた。Spred2-KO マウスでは ERK/MAPK 活性は上昇し、WT マウスと比較し

て生存率は有意に低下し、肺炎病態の悪化、炎症性サイトカインの亢進ならびに肺内ウイルス量の増加を認めた。Spred2-KO マウスに ERK inhibitor (U0126) を投与する事により、生存率ならびに肺炎病態の有意な改善が見られた。また siRNA を用いて Spred-2 をノックダウンさせた気道上皮細胞株 (MLE-12) を用いたマイクロアレイ解析では、コントロールと比較して PI3 kinase の亢進 (p-AKT 亢進) を認め、共焦点レーザー顕微鏡下では、endocytosis の亢進に伴うウイルス価の亢進を認めた。

D．考察

H1N1 感染での ERK/MAPK の活性化上昇は肺炎の増強と体内ウイルス増殖に関わる。

E．結論

Spred2 を介した ERK 経路の制御はインフルエンザウイルス感染症のターゲットと考えられた。

F．研究発表

1．論文発表

- 1) Shiozaki Y, Kitajima T, Mazaki T, Yoshida A, Tanaka M, Umezawa A, Nakamura M, Yoshida Y, Ito Y, Ozaki T, Matsukawa A. Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused bone morphogenetic protein-4. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:1349-60. Apr
 - 2) Uchino K, Fujisawa M, Watanabe T, Endo Y, Nobuhisa T, Matsumoto Y, Kai K, Sato S, Notohara K, Matsukawa A. Oxaliplatin-induced Liver Injury Mimicking Metastatic Tumor on Images: A Case Report. *Jpn J Clin Oncol*. *Jpn J Clin Oncol*. 2013 Oct;43(10):1034-8
 - 3) Nishida K, Hashizume H, Matsukawa A, Hashizume K, Shimamura Y, Torigoe Y, Ozaki T. Occult Compression Fracture of Metacarpal Head without Evidence of Avascular Necrosis. *Acta Med Okayama*. 2013 Oct;67(5):311-7.
 - 4) Kadowaki T, Morishita A, Niki T, Hara, Sato M, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, Masaki T, Hattori T, Matsukawa A and Hirashima H. Galectin-9 prolongs the survival of septic mice by expanding Tim-3-expressing NKT cells and PDCA-1+ CD11c+ macrophages. *Crit Care Med*. *Crit Care*. 2013 Dec 9;17(6):R284
 - 5) Ogino T, Kobushi H, Fujita H, Matsukawa A, Utsumi K. Erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 erythroleukemic cells by monochloramine. *Free Radic Res*. 2014 Mar;48(3):292-302
 - 6) Mazaki T, Kitajima T, Shiozaki Y, Sato M, Mino M, Yoshida A, Nakamura M, Yoshida Y, Tanaka M, Ozaki T, Matsuka A and Ito Y. In Vitro and in vivo enhanced osteogenesis by kaempferol found by a high-throughput assay using human mesenchymal stromal cells. *Journal of Functional Foods*, Jan;6:241-247, 2014
2. 学会発表
- 1) Mazaki T, Ito Y, Matsukawa A, Ozaki T. Articular Cartilage Repair Using A Photo-crosslinkable Gelatin With BMP4 Fusion Protein With Collagen Binding Domain (CBD-BMP4) In Rabbits. ORS 60th annual meeting, March 15-18, 2014, New Orleans, USA.
 - 2) 馬崎 哲朗, 塩崎泰之, 吉田晶, 松川 昭博, 中村真理子, 吉田靖弘, 北嶋 隆, 伊藤嘉浩, 尾崎敏敏文: 家兎骨軟骨欠損モデルにおける可視光硬化ゼラチンの組織修復の効果 第120回中部日本整形外科災害外科学会 2013年4月5-6日 和歌山
 - 3) 板倉淳哉, 伏見聡一郎, 伊藤利洋, 松川昭博, 塩見達志: 皮膚腫瘍 第52回山陰病理集談会 2013年4月13日 鳥取
 - 4) 松川昭博、伊藤利洋: A型インフルエンザウイルス(H1N1)感染とMAPK経路 第102回日本病理学会総会 シンポジウム 2013年6月6-8日 ロイトン札幌(北海道)
 - 5) 伊藤利洋, 板倉淳哉, 佐藤美和, 美野愛, 伏見聡一郎, 松川昭博: T細胞Suppressor of Cytokine Signaling 5 (SOCS5)の過剰発現はLPSトレランス効果を増強する 第102回日本病理学会総会 2013年6月6-8日 ロイトン札幌(北海道)
 - 6) 板倉淳哉, 伊藤利洋, 佐藤美和, 美野愛, 伏見聡一郎, 松川昭博: Spred2

- 欠損マウスは敗血症抵抗性を示す
第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6-8 日 ロイトン札幌（北海道）
- 7) 大森昌子，豊田博，柳井広之，高田尚良，松川昭博，吉野正：多彩な組織像を示す乳腺腺様嚢胞癌の 3 例 第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6-8 日 ロイトン札幌（北海道）
- 8) 内野かおり，能登原憲司，藤澤真義，和仁洋治，松川昭博：1 型自己免疫性膵炎におけるマクロファージの分布の検討 第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6-8 日 ロイトン札幌（北海道）
- 9) 篠倉美理，木村亮二郎，伊藤利洋，松川昭博：Spred2 発現ベクターの作製とその応用 第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6-8 日 ロイトン札幌（北海道）
- 10) 板倉淳哉，内野かおり，藤澤真義，井上道雄，柄川剛，能登原憲司，松川昭博：皮膚腫瘍 第 111 回中四国スライドカンファレンス 2013 年 6 月 22 日 松江テルサ（島根）
- 11) 伏見聡一郎，井上博文，小田晋輔，河原明奈，板倉淳哉，平麻美，伊藤利洋，松川昭博，加藤博也，市村浩一，柳井広之：十二指腸乳頭部に発生した gangliocytic paraganglioma の細胞像と組織像の検討 第 33 回日本臨床細胞学会岡山県支部会 2013 年 7 月 6 日 倉敷中央病院
- 12) 高橋索真，平岡佐規子，伏見聡一郎，伊藤利洋，板倉淳哉，木村亮治郎，楊旭，篠倉美理，中川裕貴，住居優一，竹井大介，井口俊博，半井明日香，森藤油記，秋田光洋，原田馨太，岡田裕之，松川昭博，山本和秀：Ras/ERK 系と大腸粘膜治癒-Ras/ERK 系の阻害因子 Spred-2 の解析を通じてー 第 50 回日本消化器免疫学会総会 2013.8.1-2. ホテルグランドヒル市ヶ谷（所沢）
- 13) 松川昭博：Ras-Raf-ERK 経路からみた A 型インフルエンザ(H1N1)感染 第 18 回日本神経感染症学会総会 2013.10.11-12 シーガイアコンベンションセンター（招待教育講演）

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

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

インフルエンザ感染症では一般的に全身症状を伴う。しかしながらこれまでに、呼吸器への重篤なウイルス感染時に、脳の遺伝子発現状態がどの程度影響されるのかについては、あまり研究されていない。本研究では、ウイルスを致死量投与したマウスの脳内遺伝子発現状態を、薬剤治療をした生残群の脳と比較した。マウス脳における遺伝子発現量は、呼吸器疾患の進行に応じて大きく変動した。本データに基づいて、呼吸器疾患による生死および脳の遺伝子発現レベルの間の相互関係を調べる。つまり、生死に応じた脳の遺伝子発現のパターンを解析し、生死に大きく関与して動いていると考えられる分子機構群を浮き彫りにする。この研究は、進行性の呼吸器疾患モデルのマウス脳内遺伝子発現に関する包括的な経時的データを提供するとともに、致死に連動している脳内遺伝子群の把握を可能にする。

A . 研究目的

以前の研究で、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たマウスの脳浮腫発症における脳内遺伝子発現プロファイリングを行った。その際、正常な状態や致死的なウイルス感染状態の脳内遺伝子発現の変動についての経時的データが不足していた。本研究では、マウスモデルにて致死量のウイルス感染を行い、薬剤治療をした生残群の脳を対照として経時的な

検索を行った。

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、6 週令、雌。

実験計画：マウスを 3 グループに分類(グループ 1：ウイルス、グループ 2：ウイルス + 治療、グループ 3：無処置)し、ウイ

ウイルス感染群には、10 倍量の 50% マウス致死量/ 50 μ l を経鼻投与、薬剤投与群にはラニナビル:CS-compound, 13.3 μ g/50 μ l/匹)をウイルス接種後 2 時間目に経鼻投与した。

ウイルス学的検索：MDCK 細胞を用いたブラック法を行った。

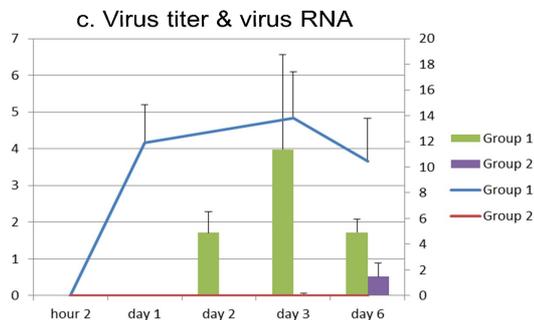
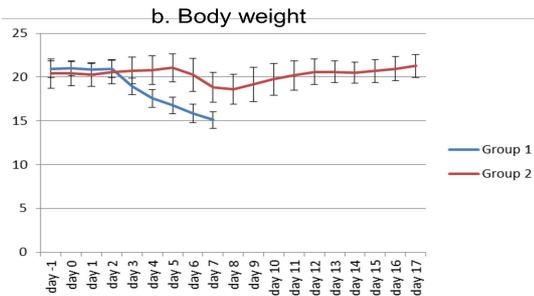
RNA 抽出とマイクロアレイ解析：脳組織全体を凍結粉碎し、全 RNA を採取した (Absolutely RNA miRNA kit; Agilent Technologies, CA, USA)。抽出した RNA は Takara Dragon Genomics Center (Takara Bio, Shiga, Japan) にて Agilent Expression Array, SurePrint G3 Mouse GE 8x60K を用いて解析した。Gene Ontology 検索には、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いた。

(倫理面への配慮)

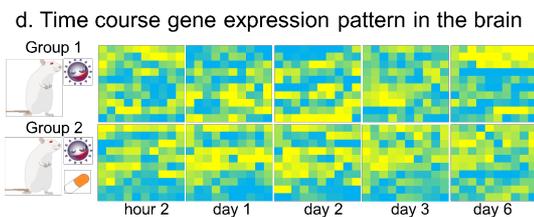
第一三株式会社での動物実験の一環として行われた。

C . 研究結果

実験モデルは、ウイルス感染群では完全致死、ウイルス感染 + 薬剤治療群では完全生存の条件下にあることが確認された (Fig.a)。マウスの臨床症状は体重変動に比例していた (Fig.b)。観察期間中の肺内ウイルス量は、通常感染群では顕著に増加し、薬剤治療群ではほぼ抑制されていた (Fig.c)。



脳内での遺伝子発現パターンは、致死感染群にて、接種後 1 日目から大きく変動していた (Fig.d)。



Gene ontology による解析では development, morphogenesis, alpha-beta T cell activation, RNA metabolic process, transcription, antigen processing via MHC class II, nitrogen compound metabolic process 等が発現減少、amine/ketone metabolic process, immune response, antigen processing via MHC

class Ib, heterocycle metabolic process, negative regulation of cell death 等が発現上昇していた。

D . 考察

G0 解析による、更なる詳しい解析は、現在進行中である。また、本研究で得られた複数条件の大規模時系列データを用いて、生残・致死の結果決定に大きく関与している因子を探索する予定である。

E . 結論

本研究は、進行性の呼吸器疾患モデルのマウス脳内遺伝子発現に関する包括的な経時的データを提供するとともに、致死に連動している遺伝子群の把握を可能にする。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Kyan et al., Transcriptome profiling

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

2 . 学会発表

ByoDynamics2013: Sep11-13,2013, Bristol, UK

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

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

中枢神経症状を示したインフルエンザ A(H1N1)pdm09 と
ロタウイルス胃腸炎における宿主遺伝子発現の解析

研究分担者 森島恒雄

研究協力者: 津下 充、齋藤有希恵、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 A/H1N1 2009 pdm09 感染では重症肺炎や ARDS だけでなく、痙攣・意識障害等の中枢神経症状も合併することが報告されている。一方、ロタウイルス胃腸炎もまた痙攣重積等の中枢神経症状を合併することが知られている。痙攣重積を伴うインフルエンザ A/H1N1 pdm09 と痙攣重積を伴うロタウイルス胃腸炎の病態の違いを検討するために、患者末梢血を用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

痙攣重積を示したインフルエンザ A/H1N1pdm09 では、immune response に関連した遺伝子群、特に IL1R/TLR といった自然免疫や T 細胞受容体シグナルに関与する遺伝子が発現変化していた。一方、痙攣重積を示したロタウイルス胃腸炎では、細胞内酸化ストレスに対する防御反応に関連する遺伝子群が発現変化していた。

これらの宿主遺伝子発現の違いから、インフルエンザ A/H1N1pdm09 とロタウイルス胃腸炎における痙攣重積の病態が必ずしも同一ではないことが示唆された。

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 pdm09 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、ARDS を呈する症例が多くみられた。また、呼吸器合併症だけでなく、痙攣や意識障害等の神経合併症を示す症例が多く報告された。

一方、ロタウイルス胃腸炎はしばしば痙攣重積を合併することが知られており、多くの症例で無熱性・群発性を示すことが知られている。

痙攣重積を伴うインフルエンザウイルス A/H1N1 pdm09 感染症と痙攣重積を伴うロタウイルス胃腸炎の病態の違いを明らかにするために、患者末梢血を用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

B. 研究方法

対象は、インフルエンザ A/H1N1 pdm09 に罹患し痙攣重積を認めた 5 例 (Flu-seizure group)、痙攣重積を認めなかった 5 例

(Flu-control group)、ロタウイルス胃腸炎に罹患し痙攣重積を認めた 3 例 (Rota-seizure group)、痙攣重積を認めなかった 3 例 (Rota-control group) とした。全例で予後は良好で後遺症は認めなかった。急性期および回復期に末梢血を採取し、全血より RNA を抽出し cDNA・cRNA 合成、ラベリングを行なった。使用したアレイは Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affimetrix)を用いた。遺伝子発現の変化は急性期と回復期のシグナル比を算出し解析に用いた。

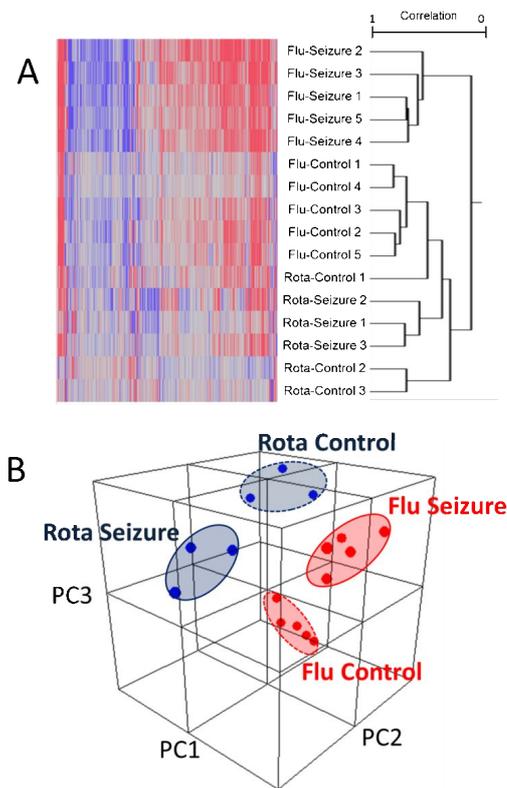
C. 研究結果

各症例の遺伝子発現パターンを、クラスター解析・主成分分析を用いて樹状図または三次元分布図で表した(図1)。その結果、4 つの group (Flu-seizure, Flu-control, Rota-seizure, Rota-control) は、樹状図および三次元分布図で明らかなクラスターを形成した。この結果から各 group はそれぞれ異なる遺伝子発現プロファイルを示すことを確認した。

(図 1) 各症例の遺伝子発現プロファイル

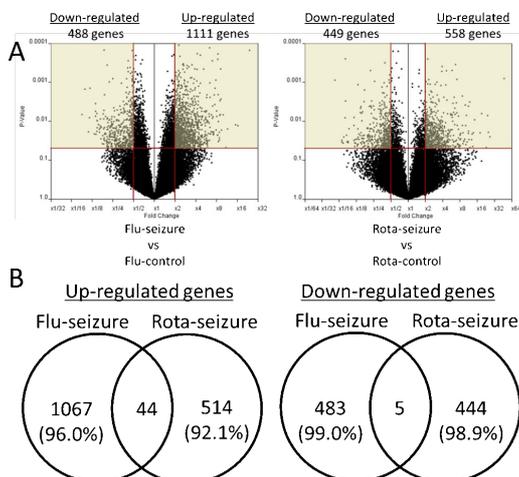
(A) クラスタ解析による樹状図

(B) 主成分解析による三次元散布図



さらに、痙攣重積を認めた群で発現が有意に増加もしくは減少した遺伝子の数を検討した(図2)。Flu-seizure group で発現が増加したのは 1111 遺伝子、減少したのは 488 遺伝子であった。Rota-seizure group で発現が増加したのは 558 遺伝子、減少したのは 449 遺伝子であった。Flu-seizure group と Rota-seizure group の両者に共通して発現変化した遺伝子は合わせて 49 遺伝子であり、少数であった。

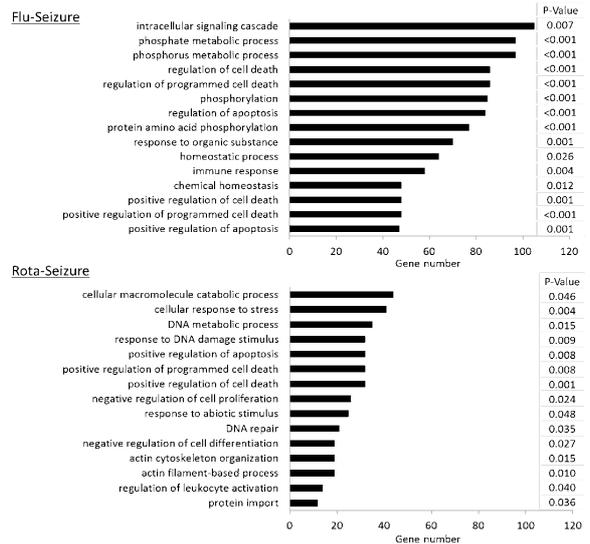
(図 2) (A) 痙攣重積群における各遺伝子の発現変化とp値
(B) 痙攣重積群で発現増加・減少を認めた遺伝子数



この結果より、痙攣重積発症に関わる遺伝子発現プロファイルはインフルエンザ AH1N1pdm09 とロタウイルス胃腸炎でそれぞれ異なっている可能性が示唆された。

次に遺伝子機能(gene ontology)解析を行った。その immune response に関連する遺伝子群の発現変化は、Flu-seizure group で有意に認められた(図3)。

(図 3) 痙攣重積を示したインフルエンザおよびロタウイルス胃腸炎で発現変化した遺伝子群の遺伝子機能(Gene Ontology)



Flu-seizure group で発現変化が強かった immune response 関連遺伝子には、IL18R1, IL1R1, IL1R2, IL1RAP, TLR4, TLR8 が含まれており、これらは自然免疫で重要な役割を果たす interleukin-1 receptor/Toll like receptor (IL1R/TLR) superfamily に属する。痙攣重積を伴うインフルエンザ AH1N1pdm09 の病態に IL1R/TLR の強い関与が示唆された(表1)。また、パスウェイ解析では、T 細胞受容体シグナリングに関連する遺伝子群が Flu-seizure group で有意に発現変化していた(図4)。

(図 4) 痙攣重積を示したインフルエンザおよびロタウイルス胃腸炎で発現変化した遺伝子群の関連パスウェイ

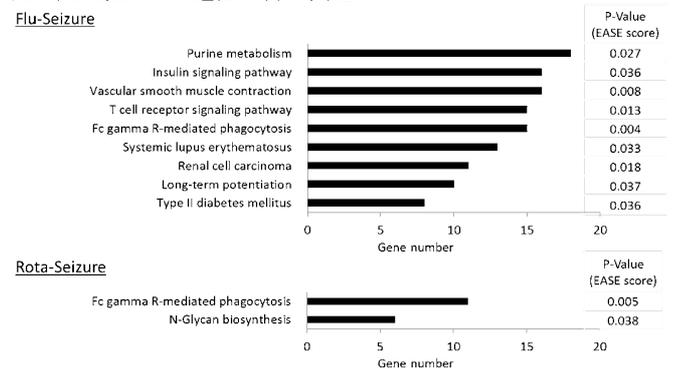


表1 痙攣重積を示したインフルエンザ AH1N1pdm09 で発現変化した immune response 関連遺伝子

Up-regulated genes

Probe ID	Gene Symbol	Gene Title	Fold Change	P-Value
206618_at	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	7.562	0.004
220813_at	CYSLTR2	cysteinyl leukotriene receptor 2	4.949	0.023
206871_at	ELANE	elastase, neutrophil expressed	4.663	0.008
202948_at	IL1R1	interleukin 1 receptor, type I	4.557	0.011
1552773_at	CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D	4.349	0.016
205844_at	VNN1	vanin 1	4.183	0.012
205227_at	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	3.902	0.016
208250_s_at	DMBT1	deleted in malignant brain tumors 1	3.782	0.007
202018_s_at	LTF	Lactotransferrin	3.728	0.021
215990_s_at	BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6	3.621	0.017
228938_at	MBP	Myelin basic protein	3.423	0.016
244313_at	CR1	complement component receptor 1	3.344	0.019
205403_at	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	3.255	0.029
213817_at	IRAK3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	3.250	0.005
221085_at	TNFSF15	tumor necrosis factor superfamily, member 15	2.929	0.003
219434_at	TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	2.845	0.028
211574_s_at	CD46	CD46 molecule, complement regulatory protein	2.790	0.034
1555116_s_at	SLC11A1	solute carrier family 11 , member 1	2.731	0.037
221060_s_at	TLR4	toll-like receptor 4	2.623	0.021
205557_at	BPI	bactericidal/permeability-increasing protein	2.573	0.005
225330_at	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	2.546	0.008
211305_x_at	FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for	2.504	0.007
208451_s_at	C4A	complement component 4A	2.485	0.009
201925_s_at	CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement	2.425	0.011
1555214_a_at	CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A	2.371	0.038
220832_at	TLR8	toll-like receptor 8	2.314	0.021
1569830_at	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	2.201	0.010
211395_x_at	FCGR2C	Fc fragment of IgG, low affinity Iic	2.159	0.042
228891_at	SEMA4D	sema domain, immunoglobulin domain, transmembrane domain and short cytoplasmic domain, 4D	2.150	0.007
217236_x_at	IGHA1	immunoglobulin heavy constant alpha 1	2.143	0.003

Down-regulated genes

Probe ID	Gene Symbol	Gene Title	Fold Change	P-Value
214214_s_at	IL23R	interleukin 23 receptor	0.089	0.007
231763_at	IL1RAPL2	interleukin 1 receptor accessory protein-like 2	0.207	0.047
1552912_a_at	EDA	ectodysplasin A	0.207	0.034
211005_at	SPN	Sialophorin	0.211	0.028
216207_x_at	CNGA1	cyclic nucleotide gated channel alpha 1	0.387	0.037
206057_x_at	FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II	0.403	0.048
206653_at	IGKC	immunoglobulin kappa constant	0.419	0.023
217063_x_at	CD28	CD28 molecule	0.420	0.049
204203_at	POLR3A	polymeraseIII polypeptide A	0.424	0.003
211127_x_at	TRD	T cell receptor delta locus	0.433	0.032
211583_x_at	NCR3	natural cytotoxicity triggering receptor 3	0.434	0.035
206417_at	POLR3G	polymeraseIII polypeptide G	0.446	0.030
221112_at	C1QBP	complement component 1, q subcomponent binding protein	0.468	0.002
206759_at	CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein, gamma	0.487	0.032
211856_x_at	LAT	linker for activation of T cells	0.488	0.019

一方、Rota-seizure group では、response to stress 関連遺伝子群が有意に発現変化しており、superoxide dismutase 2, oxidation resistance 1, hypoxia-inducible domain family, member 1Aといった、細胞内ミトコンドリアにおける酸化ストレス・低酸素への防御機構に関連する遺伝子が有意に発現変化していた。

E. 結論

痙攣重積を示したインフルエンザ AH1N1pdm09 と痙攣重積を示したロタウイルス胃腸炎では、宿主遺伝子発現のプロファイルが異なることを明らかにした。

痙攣重積を示したインフルエンザ AH1N1pdm09 では immune response、特に IL1R/TLR といった自然免疫や T 細胞受容体シグナルに参与する遺伝子群が変化していた。痙攣重積を示したロタウイルス胃腸炎では、細胞内酸化ストレスに対する防御反応に関連する遺伝子群が変化していた。

これらの宿主遺伝子発現の違いは、インフルエンザ AH1N1pdm09 とロタウイルス胃腸炎

における痙攣重積の病態が必ずしも同一ではないことが考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tsuge M, Oka T, Yamashita N, Saito Y, Fujii Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Tsukahara H, Morishima T. Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis J Neurovirol. 2014 in press

2. 学会発表

(1)

.

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

メタボローム解析を用いたインフルエンザ脳症患者血清中の バイオマーカー候補の検討

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における血清中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12例と神経合併症のないインフルエンザ22名において、急性期・回復期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て検討した。検出された物質の中で、脳症群(急性期)では、コントロール群(急性期)と比較して、3種類の代謝物質の平均値に有意な上昇が認められた。これらの中で、tryptophan-kynurenine代謝経路の中間産物であるキヌレニンは、神経毒性が報告されている物質であり、病態に關与するバイオマーカー候補と考えられた。さらにkynurenineの下流代謝物であるquinolinic acidも、検体を追加して検討した結果、バイオマーカーの可能性が示唆された。

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關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十分に明らかにされていない。さらに、病態に關連する新規のバイオマーカーの探索は臨床上の意義が大きい。インフルエンザに關連するライ症候群では、病態として代謝異常が存在するため、インフルエンザ脳症で代謝プロファイル調べることが、病態に關連する新規バイオマーカーの発見につながる可能性がある。最近、代謝プロファイルを解析する手法としては、メタボローム解析が注目されていることから、私共は、臨床検体として使用しやすい血清検体を用いて、インフルエンザ脳症のメタボローム解析を試みた。

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。
7. quinolinic acid について、さらに検討するため、インフルエンザ脳症 18例、熱性けいれん例 12例、神経合併症のない対照群 25例で、血清中のquinolinic acid濃度を測定し、比較検討した。

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)。階層クラスターリングを行い、HeatMap 表示させた結果を得た。
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(以上は、昨年度の報告書に詳細を記載した)。
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、3 種類の代謝物質の平均値に有意な上昇がみられ、

- 他方、2種類で有意な低下が認められた(図1)。(検出ピークの情報詳細に分析し、代謝物が付与できた物質を絞り込んだため、昨年の報告より修正・更新した)。
5. 上記の物質のなかで、kynurenineは、tryptophan-kynurenine代謝経路の中間代謝物質で、神経毒性が報告されており、この代謝経路における解析結果を図2に示す。
 6. kynurenineの下流の代謝物であるquinolinic acidについて、症例数を増やして検討した結果、脳症群の血清で有意な上昇を認めた(図3)。

D. 考察

メタボローム解析の結果を検討したところ、tryptophan-kynurenine経路の代謝物であるkynurenineとquinolinic acidが、病態に係るバイオマーカー候補と考えられた。これらの代謝物は、中枢神経感染症、HIV関連脳症、筋萎縮性側索萎縮症等で血清/髄液中の濃度上昇が報告されている。また、実験的に複数の作用機序による神経毒性も示されている。今後は、臨床的な応用の可能性についてさらに検討を加え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) Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human Herpesvirus 6-Associated Encephalopathy in a Child with Dravet Syndrome. *Neuropediatrics*, 44:155-158, 2013
- 2) Kimura H, Kawada J, Ito Y. Epstein Barr-viruses-associated lymphoid malignancies: the expanding spectrum of hematopoietic neoplasms. *Nagoya J Med Sci*, 75:169-179, 2013.
- 3) Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kojima S, Kimura H, Ito Y. Plasma Viral MicroRNA Profiles Reveal Potential Biomarkers for Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *J Infect Dis*. 208(5):771-779. 2013
- 4) Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M,

Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H, Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan. *Pediatr Int* 55(5):566-571, 2013

- 5) Suzuki M, Torii Y, Kawada J, Kimura H, Kamei H, Onishi Y, Kaneko K, Ando H, Kiuchi T, Ito Y. Immunogenicity of inactivated seasonal influenza vaccine in adult and pediatric liver transplant recipients over two seasons. *Microbiol Immunol*, 57(10):715-722, 2013.
- 6) Imahashi N, Nishida T, Ito Y, Kawada J, Nakazawa Y, Toji S, Suzuki S, Terakura S, Kato T, Murata M, Naoe T. Identification of a novel HLA-A*24:02-restricted adenovirus serotype 11-specific CD8+ T-cell epitope for adoptive immunotherapy. *Mol Immunol* 56(4):399-405, 2013
- 7) Kato S, Miyata T, Takata K, Shimada S, Ito Y, Tomita A, Elsayed A, Takahashi E, Asano N, Kinoshita T, Kimura H, Nakamura S. Epstein-Barr virus-positive cytotoxic T-cell lymphoma followed by chronic active Epstein-Barr virus infection-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder: a case report *Human Pathology* 44(12):2849-2852, 2013
- 8) Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H, Kojima S. Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia. *J Ped Hematol Onc*, 36(1):e65-68, 2014
- 9) Hara S, Kawada J, Kawano Y, Yamashita T, Minagawa H, Okumura N, Ito Y. Hyperferritinemia in Neonatal and Infantile Human Parechovirus-3 Infection in Comparison with Other Infectious Diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(1):15-19, 2014

2. 学会発表

- 1) 伊藤嘉規、小児科病棟での迅速診断とその応用-入院児のウイルス感染症早期診

- 断と院内感染対策-、分野別シンポジウム 9、第 116 回日本小児科学会学術集会、広島、2013.4.19-21、日本小児科学会雑誌 117(2):S48,2013
- 2) 鳥居ゆか、河野好彦、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、伊藤嘉規、メタボローム解析を用いたインフルエンザ脳症の新規バイオマーカーの探索、第 116 回日本小児科学会学術集会、広島、2013.4.19-21、日本小児科学会雑誌 117(2):158,2013
- 3) 鳥居ゆか、河野好彦、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、伊藤嘉規、メタボローム解析によるインフルエンザ脳症患者血清中の代謝物プロファイリング、第 87 回日本感染症学会学術講演会、横浜、2013.6.5-6、感染症学雑誌 87(臨時増刊号):330,2013
- 4) Yuka Torii, Yoshihiko Kawano, Hajime Sato, Tamaki Fujimori, Kazunori Sasaki, Jun-ichi Kawada, Yoshiaki Ohashi, Yoshinori Ito, Quantitative metabolome profiling reveals novel potential biomarkers in influenza-associated encephalopathy, IDWeek 2013, San Francisco, USA, October 2-6, 2013
- 5) Yoshihiko Kawano, Yuka Torii, Hajime Sato, Tamaki Fujimori, Kazunori Sasaki, Jun-ichi Kawada, Yoshiaki Ohashi, Yoshinori Ito, Quantitative metabolome profiling reveals novel potential biomarkers in human herpesvirus 6 encephalopathy, IDWeek 2013, San Francisco, USA, October 2-6, 2013
- 6) 鳥居ゆか、河野好彦、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、伊藤嘉規、メタボローム解析を用いたインフルエンザ脳症・HHV-6 脳症における新規バイオマーカーの探索、第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会、札幌、2013.10.26
- 7) 伊藤嘉規、河野好彦、鳥居ゆか、安藤将太郎、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、木村宏、国際標準物質を用いた EBV・CMV 定量 PCR 系の標準化、第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会、札幌、2013.10.26
- 8) 川本愛里、岩澤賢太郎、近藤健夫、角野知之、十河剛、小松陽樹、乾あやの、伊藤嘉規、森雅亮、横田俊平、藤沢知雄、全身型若年性突発性関節炎に伴う肝機能異常の検討、第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会、札幌、2013.10.26
- 9) 鈴木道雄、中川光、岩田誠子、五島典、伊藤嘉規、村田貴之、鶴見達也、木村宏、EBV 関連 T/NK 腫瘍に対する Hsp90 阻害剤の効果、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、2013.11.10-12
- 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

小児の中枢神経感染症の疫学

～多因子解析を通じた重症化メカニズムの予測～

研究分担者 氏名 宮入 烈

所属・役職 国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 感染症科

研究要旨 インフルエンザを含む小児のウイルス性中枢神経感染症について、病原体ごとに患者背景・症状・身体所見・検査所見・重症度を含む多因子解析を行い、各因子の相関関係を無作為に図式化した。インフルエンザ入院症例についての解析により患者は呼吸器型、熱性けいれん型、全身型に分類された。呼吸器型と熱性けいれん型の比較では、熱性けいれん患者で有意に男児が多く年齢が低いことが示されたが、インフルエンザの型や基礎疾患の有無についての有意差は認められなかった。またヒトパレコウイルス感染症 29 例を対象とした多因子解析では、ウイルス量と重症度の相関が認められた。多因子解析は新たな感染症の重症化メカニズムを客観的に評価する有効な手段であると考えられた。

A . 研究目的

重症小児ウイルス感染症の重症化にかかわる多因子の解析を行い、病型分類、リスクファクターの評価および治療介入方法の検討を行う。今回は特に新興・再興感染症として注目されるインフルエンザウイルスとヒトパレコウイルスに対する検討を行った。

B . 研究方法

原因不明の重症感染症患者を対象に各種検体を用いて、迅速抗原検査による診断あるいはリアルタイム PCR を国立成育医療研究センターで行った。

インフルエンザ、ヒトパレコウイルスが確認された重症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、
- ヒトパレコウイルスについてはリアルタイム PCR を用いたウイルス量（血清、髄液）解析を CT 法で行った。
- バイタルサイン
- 血液・髄液検査所見
- 合併症：MRI 所見、EEG 所見

各因子間の相関係数を pearson/spearman 解析で算出し、相関を線で表し図式化した。

病型や重症度に寄与する要因についての統計的な解析は SPSS を用いて検討した。

（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

2012年10月-2013年2月の間にインフルエンザにて入院した症例は30例であった。多因子解析の結果(図1)入院症例は呼吸器症状を主体とする患者、熱性けいれん

んで入院した患者、全身状態不良(敗血症様、心筋炎など)で入院した病型に分類された。2009年シーズンにおける197例はほぼA(H1N1)pdm09型と考えられるが、呼吸器型患者が大勢を占め、一方で熱性けいれん

図1 インフルエンザ感染症における多因子解析結果(2012-13年シーズン)

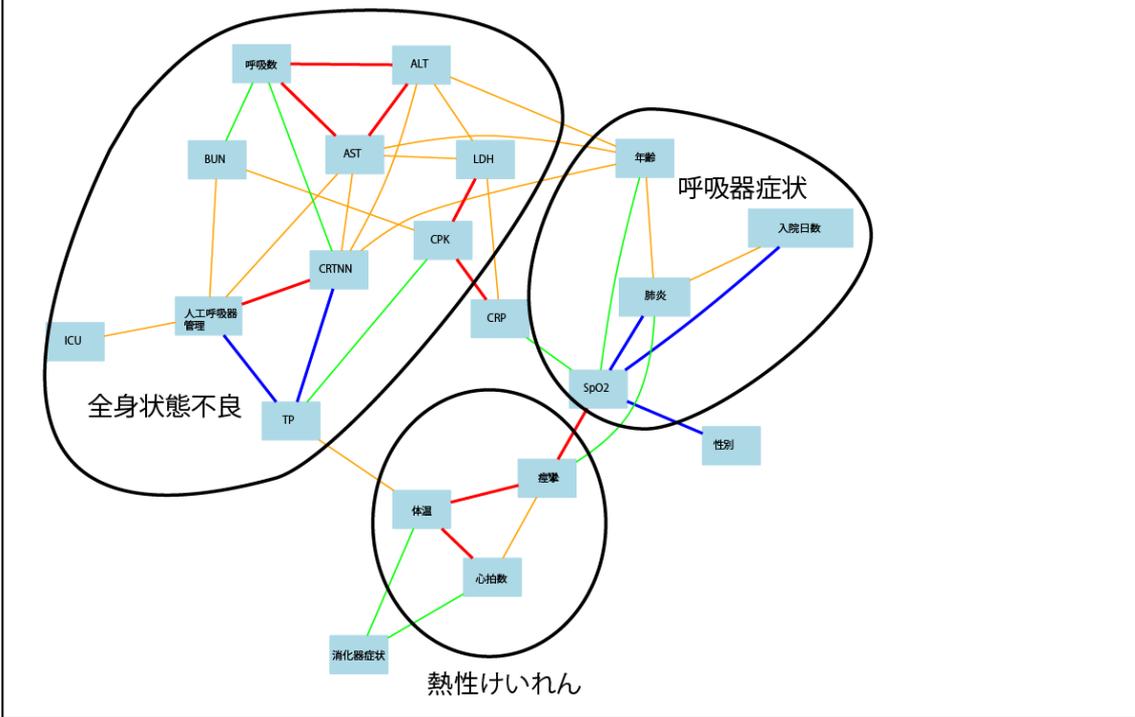
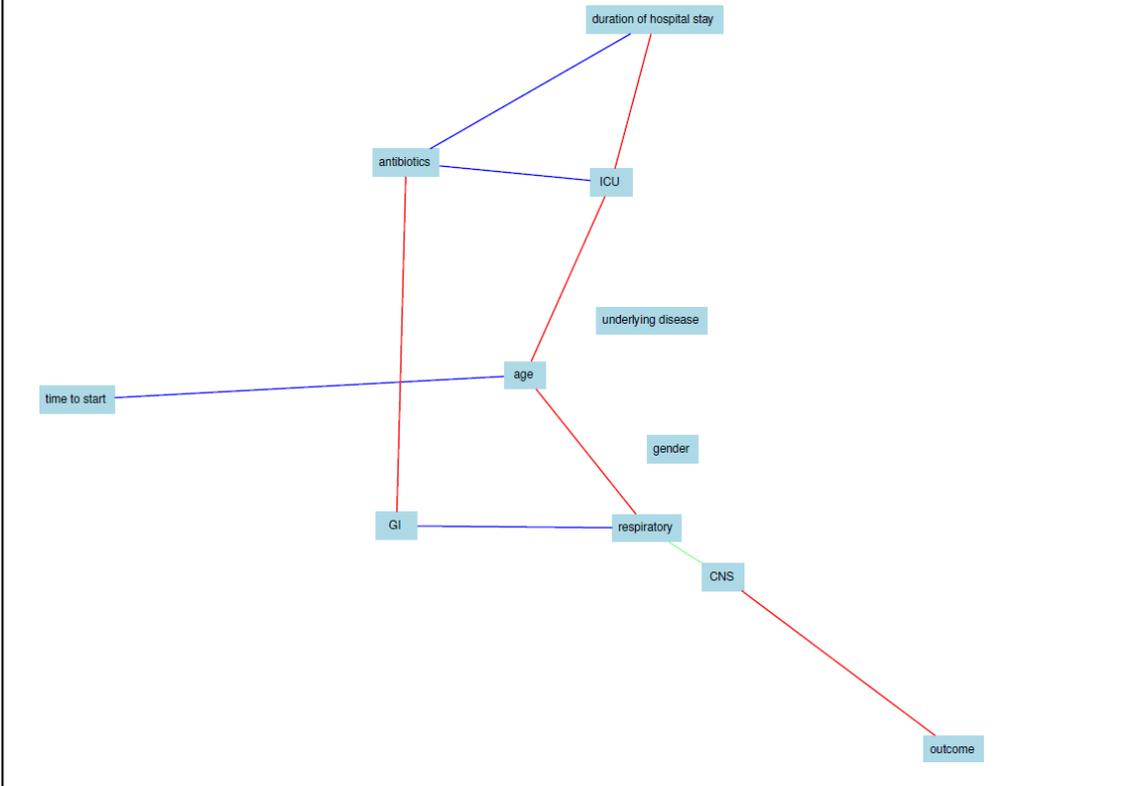


図2 インフルエンザ感染症の多因子解析(2009年シーズン)



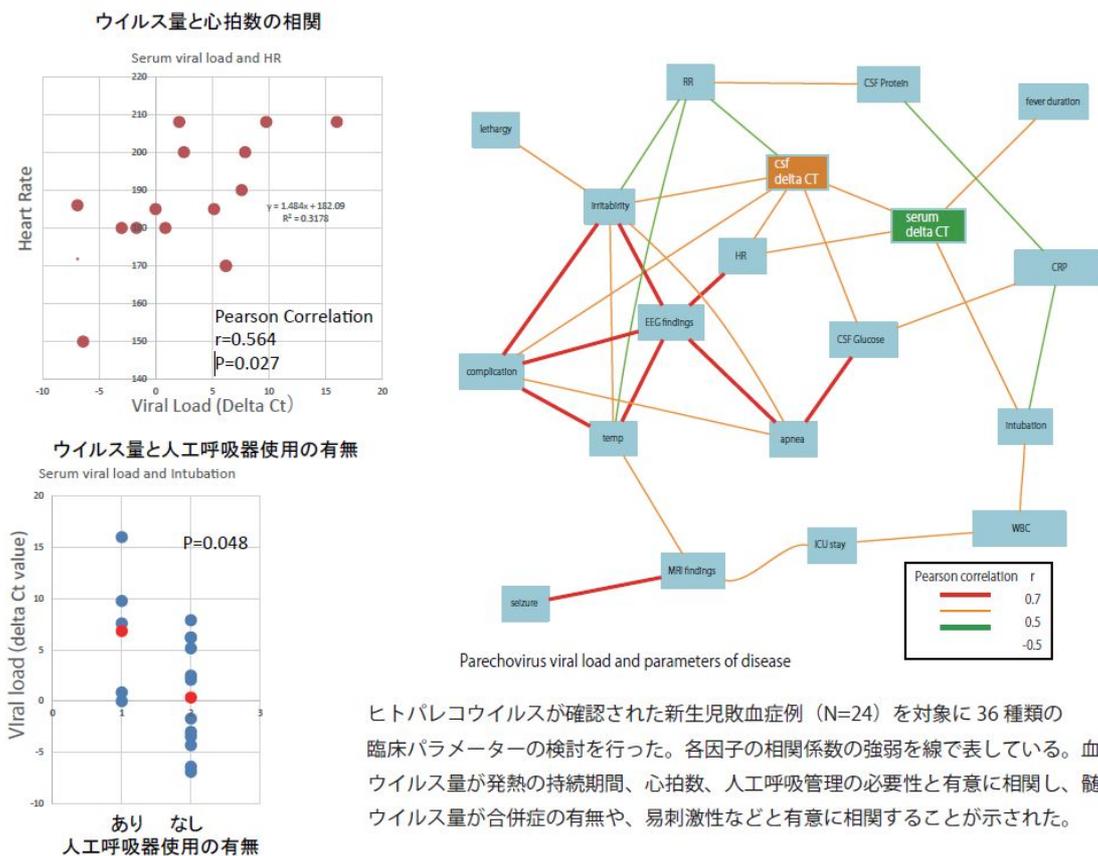
型の患者群の多くは目立った呼吸器症状を呈さず病型が異なることが示唆された。2013年12月から2014年2月8日までに入院した49症例についても同様の結果が得られた。明らかな脳炎症例は同期間にはなく、解析の対照にはならなかった。呼吸器型の病型を呈した中には、人工呼吸器管理を要する患者が2名、うち1名は鋳型気管支炎がありECMO管理を要した。

2013-2014シーズンにおけるインフルエンザ感染症を呼吸器型とけいれん型に分類し、背景因子を分析したところ、けいれん型で男児が多く(78.5% vs 53.5%: $p=0.03$)、年齢が低かった(2.5歳 vs 5.4歳: $p=0.02$)。他の背景因子である型別、ワ

クチンの有無、基礎疾患の有無、投薬までの時間には差を認めなかった。それぞれ、軽症から重症の患者を認め、最終的な入院日数や予後にも統計学的な有意差は認めなかった。

2011年1月から2013年10月までの期間に29症例のヒトパレコウイルス感染症患者を診断した。ヒトパレコウイルスを対象に多因子解析を行った。(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相関したのに対して、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相関する傾向が認められた。

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



ヒトパレコウイルスが確認された新生児敗血症例(N=24)を対象に36種類の臨床パラメーターの検討を行った。各因子の相関係数の強弱を線で表している。血清中のウイルス量が発熱の持続期間、心拍数、人工呼吸管理の必要性と有意に相関し、髄液中のウイルス量が合併症の有無や、易刺激性などと有意に相関することが示された。

D . 考察

本解析により重症ウイルス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た。

インフルエンザ症例の解析においては、従来の報告同様に、呼吸器症状を主体とする患者群、中枢神経型の病型を呈するものに分かれ、その例数や構成はシーズンにより異なり、流行株のもつ病原性を反映するものと思われた。一方で本検討は入院例のみを対象としており、軽症例を反映しておらず全体像を反映するものではない可能性がある。また、最重症例の検討数は数例に限られるため、統計的な手法ではこれら症例の特徴が反映されないという限界がある。過去数年の症例の情報を集積し、亜型やウイルス量などより多くの因子を解析に含め、今後は治療介入との相関を検討することが必要である。

ヒトパレコウイルスは近年その存在が明らかとなり、新生児の敗血症の原因ウイルスとして注目されているが、その病態や治療はほとんど知られていない。本検討では、血清中のウイルス量が心拍数や有熱期間など全身性の所見に影響を与え、髄液中のウイルス量が痙攣など中枢神経系の所見と関連していたことから、同疾患においてはウイルス量が重症度と関連していると考えられた。

また当院で新生児の重症敗血症例としてガンマグロブリンが投与された一例でパレコウイルスが同定されたため、保存検体を用いてウイルス量を経時的にフォローした。結果、投与後 24 時間以内にウイルス量が 1000 分の 1 に低下し、症状の軽快が認めら

れ同疾患に対する治療介入方法についての示唆が得られ、多因子解析の結果を裏付ける結果となった。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Shoji K, Komuro H, Miyata I, Miyairi I, Saitoh A:
Dermatologic manifestations of human parechovirus type 3 infection in neonates and infants. The Pediatric Infectious Disease Journal 2013;32:233-236

2 . 学会発表

Funaki T, Miyata I, Shoji K, Matsumoto S, Muguruma T, Sakamoto S, Kasahara M, Miyairi I: Therapeutic Drug Monitoring and Viral Load Monitoring in a Case of Disseminated Neonatal Herpes Simplex Virus Infections. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection (ICC 2013), Yokohama, 2013.6.6

手塚 宜行、宮田 一平、庄司 健介、問田 千晶、六車 崇、宮入 烈
免疫グロブリン静注療法を受けた重症 Human parechovirus 感染症の一例
第 45 回日本小児感染症学会学術集会。2013 年 10 月。

G . 知的所有権の取得状況

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 理化学研究所統合生命医科学研究センター・グループディレクター

研究要旨

インフルエンザ脳症の発症リスク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できるシステムを開発することを目的としている。本年度は、日本人小児インフルエンザ脳症患者 72 名 (ケース群) 及び日本人一般集団 934 名 (コントロール群) の全ゲノム関連解析 (GWAS) で既に得られている SNP の遺伝子型の情報を基にして、「ジェノタイプ・インピュテーション (遺伝子型予測)」の手法を用いて関連遺伝子領域を探索した。

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。

SNP 解析

本年度は、日本人小児インフルエンザ脳症患者 72 名 (ケース群) 及び日本人一般集団 934 名 (コントロール群) の GWAS で既に得られている約 50 万箇所の SNP の遺伝子型の情報を基にして、「ジェノタイプ・インピュテーション (遺伝子型予測)」の手法を用いて関連遺伝子領域を探索した。

(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、担当者が個人情報を厳重に保管・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とは、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

ジェノタイプ・インピュテーションにより、解析対象のSNPを約250万箇所を増やすことができた。関連解析において、21箇所SNPがGWAS有意水準 (5.0×10^{-8}) をクリアした。最もP値が小さいSNPでは、 $P = 3.59 \times 10^{-20}$ 、オッズ比 = 12.6 (95%信頼区間、6.36-24.9) であった。

D . 考察

ジェノタイプ・インピュテーションとは、実際のゲノム解析で得られた約 50 万箇所の SNP の遺伝子型情報と、公共データベース 1000 Genomes に登録されている全ゲノム上の数百万箇所の SNP 情報を基に、専用の遺伝子型予測ソフト MaCH-Admix を用いて、実際に解析した SNP の近傍にある SNP の症例毎の遺伝子型を統計学的に推定する方法である。インピュテーションにより、解析対象の SNP を大幅に増やすことができ、現在、GWAS 有意水準 (5.0×10^{-8}) をクリアした SNP の関連性を検証中である。

E . 結論

日本人小児インフルエンザ脳症患者の GWAS で既に得られている SNP の遺伝子型の情報を基にして、ジェノタイプ・インピュテーションの手法を用いて関連遺伝子領域を探索した。

F . 研究発表

なし

G . 知的所有権の取得状況

なし

感染症発生動向調査に基づいた 2013/2014 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

研究分担者：多屋馨子（国立感染症研究所感染症疫学センター）

研究協力者：安井良則（大阪府済生会中津病院）

研究協力者：砂川富正（国立感染症研究所感染症疫学センター）

研究要旨

感染症発生動向調査による 2013/2014 シーズン（2014 年第 6 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。2013/2014 シーズンのインフルエンザの流行は、2014 年第 5 週にインフルエンザの定点当たり報告数が 34.44（患者報告数 170,403）と今シーズンの最高値となった。2014 年第 5 週までの累積の推計受診患者数は 462 万人（95%信頼区間：442～482 万人）であり、過去 2 シーズンの同時期の累積の推計受診患者数よりも少なかった。累積の推計受診者数に占める小児の割合は 2011/2012 シーズンよりも低かったものの、2012/2013 シーズンよりは高かった。また、60 歳以上の高齢者の占める割合は 2011/2012 シーズンとほぼ同等であり、2012/2013 シーズンよりも大幅に低かった。2013/2014 シーズンは 2014 年第 5 週までに国内では 1,482 検体のインフルエンザウイルスの検出が報告された。A/H1N1pdm が 591 件（39.9%）、A/H3N2 が 538 件（36.3%）、B 型 353 件（23.8%）であり、本格的な流行となった 1 月以降は A/H1N1pdm が最多となっている。インフルエンザ脳症の報告数は 2014 年第 6 週までに 33 人（暫定値）が報告されており、60 歳以上の割合は 12.1%（4 人）と 2012/2013 シーズンよりも大きく減少している一方で、13 歳以下の小児が 25 人（75.8%）と大半を占めている。全国約 500 箇所の基幹定点となっている病院からのインフルエンザによる 2013 年第 5 週までの累積入院報告数は 3,166 人であった。60 歳以上の入院割合は 42.9%であり、2012/2013 シーズンの同時期の報告割合（58.7%）を大きく下回っているのは、高齢者の受診者数の割合の減少と一致している。入院サーベイランスについては、約 500 箇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検討、同調査の目的等、検討すべき課題があると思われる。

A . 研究目的

国立感染症研究所感染症疫学センターでは、1999 年 4 月より全国約 5000 箇所のインフルエンザ定点医療機関（小児科定点約 3,000、内科定点約 2,000）より週毎のインフルエンザの発

生状況が都道府県、政令市を通じて報告され、そ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 類定点把握疾患から 5 類全数把握疾患に変更となり、2004 年 3 月からは

インフルエンザ脳症も同疾患による届出対象となった。また、2012年9月からは、インフルエンザに起因した入院症例数について、全国約500箇所、基幹定点となっている病院からの報告（入院サーベイランス）が始まっている。

2009/2010シーズン、2010/2011シーズンの2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)pdm2009、以下A/H1N1pdmという。》が日本国内ではインフルエンザの流行の中心となった。次いで2011/2012シーズン、2012/2013シーズンの2シーズンはインフルエンザA/H3N2亜型（以下、A/H3N2という。）が流行の中心となった。

本稿では、2013/2014シーズン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2012/2013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、主に2014年第6週までの集計と解析結果の報告と考察を行う。

B . 研究方法

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3,000、内科定点約2,000）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、感染症疫学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、2013/2014シーズン（2014年第6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送られてくる病原体検出結果の中のインフルエンザウイルス分離報告についての集計・解析を行った。

インフルエンザ脳症に関しては、2013/2014シーズン（2014年第6週まで）に全国の医療機関から5類全数把握疾患として都道府県、政令市を通じて送られてくる急性脳炎の報告例のうち、インフルエンザを原因として届けら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、2013/2014シーズン（2014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 . 研究結果

1)2013/2014シーズンのインフルエンザの発生動向（暫定値）について：

感染症発生動向調査では、全国約5,000箇所（小児科定点約3,000、内科定点約2,000）のインフルエンザ定点からの報告に基づいてインフルエンザの発生動向を分析している。インフルエンザの定点当たり報告数は2013年第43週以降継続的に増加し、第51週に全国的な流行開始の指標である1.00を上回って1.39となった。2014年になるとインフルエンザの定点当たり報告数は急増し、2014年第5週には34.44（患者報告数170,403）と今シーズンの最高値となり、翌第6週には2013年第43週以降16週間ぶりに減少して30.72（患者報告数151,829）となった（1）。

2013/2014シーズンのインフルエンザの流行のピークであった2014年第5週の都道府県別の定点当たり報告数は、沖縄県（68.98）、大分県（60.03）、宮崎県（56.08）、神奈川県（47.96）、埼玉県（47.87）、福岡県（45.57）、佐賀県（45.05）、長野県（44.66）、滋賀県（44.53）、千葉県（42.47）の順となっており、九州地方や首都圏で高い地域が多かった。インフルエンザの流行のピーク（第5週）は過ぎたが、まだしばらく流行は継続するものと思われる。

2014年第5週の推計患者数は約187万人（95%信頼区間：172万人～202万人）であり、2013年第36週～2014年第5週までの累積の推計受診患者数は462万人（95%信頼区間：442～482万人）であった。性別では男性236万人（95%信頼区間：225万人～246万人）、女性226万人（95%信頼区間：217万人～234万人）、年齢群別では5～9歳約95万人、30代約62万人、0～4

歳約 60 万人、10～14 歳約 56 万人、40 代約 51 万人、20 代約 44 万人、50 代約 30 万人の順であった(図 2)。第 5 週までの推計受診患者数の累積のうち、14 歳以下の年齢群の割合を過去 2 シーズンと比べてみると、2011/2012 シーズンは 58.2%、2012/2013 シーズンは 37.1%、2013/2014 シーズンでは 46.2%であった。また、60 歳以上の高齢者の割合は 2011/2012 シーズンは 7.8%、2012/2013 シーズンは 11.7%、2013/2014 シーズンでは 7.8%であった。

2013 年第 36～2014 年第 5 週までに国内では 1,482 検体のインフルエンザウイルスの検出が報告されており、A/H1N1pdm が 591 件(39.9%)、A/H3N2 が 538 件(36.3%)、B 型 353 件(23.8%)となっており(図 3)。12 月までは A/H3N2 が多かったが、本格的な流行となった 1 月以降は A/H1N1pdm が最多となっている。

2) 感染症発生動向調査による 2013/2014 シーズンのインフルエンザ脳症の報告について(暫定値):

感染症発生動向調査では、インフルエンザ脳症は、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/kekkaku-kansenshou11/01-05-03.html>)。この報告は、2004 年 3 月から開始されている。

2014 年第 6 週現在、2013 年第 36 週～2014 年第 6 週の期間中に感染症発生動向調査に急性脳炎として報告があり、その原因がインフルエンザによるものとされたのは 33 人(年齢 1～84 歳、年齢中央値 7 歳)であった(表 1)。2013 年第 46 週に 1 例の報告があり、その後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ており、2014 年第 4 週に 9 人と最多の報告数となったが、第 5 週、

第 6 週の報告数は今後さらに増加するものと予想される(図 4)。

男性 20 人(60.6%)、女性 13 人(39.4%)であり、年齢別では小児では 3 歳児、5 歳児、7 歳児がともに 5 人(15.2%)で最多であり、次いで 1 歳児 3 人(9.1%)、13 歳 2 人(6.1%)の順であり、13 歳以下が 25 人(75.8%)と多くを占めている一方で、60 歳以上が 4 人(12.1%)であった(図 5)。ウイルスの型別では A 型 21 人(63.6%、うち AH1pdm09 が 4 人、AH3N2 が 1 人、亜型不明 16 人)、B 型 10 人(30.3%)、型別不明 2 人(6.1%)となっており、2013/2014 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(暫定値):

全国約 500 箇所の基幹定点となっている病院からのインフルエンザによる入院例の報告数は、2014 年第 5 週が 1,016 人と 2013/2014 シーズンでは最も多く、2013 年第 36 週以降第 5 週までの累積報告数は 3,166 人となった。累積報告数の年齢群別内訳は、0～4 歳 835 人(26.4%)、80 歳以上 606 人(19.1%)、70 代 466 人(14.7%)、5～9 歳 388 人(12.3%)、60 代 286 人(9.0%)の順であった。2012/2013 シーズンの同時期では 60 歳以上の割合が 58.6%と過半数を占めていたが、2013/2014 シーズンは 42.9%と半数以下であり、9 歳以下の割合が 38.6%と 2012/2013 シーズンの同時期の 26.5%を大きく上回っている(図 7)。

入院時の状況については ICU 入室 148 人、人工呼吸器装着 105 人、頭部の検査(CT 検査、脳波、MRI 検査)348 人(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 2,688 人(81.7%)と大半を占めている(図 8)。

D. 考察

本報告は 2013/2014 シーズンのインフルエンザの流行のピーク(2013 年第 5 週)に近い 2013

年第 6 週までの発生動向調査結果を 2014 年 2 月 10 日現在の集計値をもとにまとめたものであり、遅れ報告も含めて今後さらに報告数が増加することが予想されることから、数についてはあくまでも暫定値である。

2013/2014 シーズンは、A/H3N2 亜型が流行の中心であった過去 2 シーズンとは異なって、A/H1N1pdm が最多となる可能性が高い。今シーズンの流行の特徴としては、流行のピーク時の定点当たり報告数の値が過去 2 シーズンを下回っており、同時期までの累積の推計受診者数（2011/2012 シーズンは約 609 万人、2012/2013 シーズンは 726 万人）を大きく下回っている。累積の推計受診者数に占める小児の割合は 2011/2012 シーズンよりも低かったものの、2012/2013 シーズンよりは高かった。一方でその前の A/H1N1pdm が流行の中心となった 2010/2011 シーズンとほぼ同等であった。また、60 歳以上の高齢者の占める割合は 2011/2012 シーズンとほぼ同等であり、2012/2013 シーズンよりも大幅に少なかった。各流行シーズンにおいて、インフルエンザの発症者数が最も多いのは 5～9 歳の年齢群であり、小児が流行の中心であることには変わりはないが、各年齢群の推計患者数の割合がシーズンごとに変化するの、流行ウイルスの抗原に対する各年齢群の抗体保有率や、そのシーズンの流行規模等にも関連している可能性があるが、今後も検討を重ねていく必要がある。

2013/2014 シーズンのインフルエンザ脳症の報告数は 2014 年第 6 週までに 33 人であるが、これも途中経過で集計した暫定値であり、遅れ報告も含めて今後さらに増加していくものと思われる。2012/2013 シーズンは、高齢者での患者発生割合が高かったことを反映して、インフルエンザ脳症の割合も 60 歳以上の割合が 21.2%（7 人）と高かったが、2013/2014 シーズンは 12.1%（4 人）と大きく減少し、13 歳以下の小児の割合が大半を占めている。ただし、今後 B 型

インフルエンザの患者発生割合が増加していくに伴い、インフルエンザ脳症の年齢構成も変化していく可能性があるため、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 箇所の基幹定点となっている限られた入院医療機関からの報告ではあるものの、60 歳以上の入院割合は 42.9%であり、2012/2013 シーズンの同時期の報告割合（58.7%）を大きく下回っているのは、高齢者の推計受診者数の割合の減少を反映しているものと思われる。なお、推計受診患者数の中に占める 60 歳以上の割合に比して、入院患者数に占める同年齢群の割合が大幅に高い傾向については変わりなかった。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（CT 検査、脳波、MRI 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、残念ながら入院例の重症度や肺炎、意識障害等の有無等の有用な解析には不十分と考えざるを得ない。入院サーベイランスについては、約 500 箇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、あるいは本調査の目的等、今一度再検討すべき課題があると思われる。これについては、サーベイランスの研究班で検討が行われる予定である。

E . 結論

- ・2013/2014 シーズンのインフルエンザの流行は、2014 年第 5 週にインフルエンザの定点当たり報告数が 34.44 となり、今シーズンの最高値となった

- ・累積の推計受診患者数は 462 万人（95%信頼区間：442～482 万人）であり、過去 2 シーズンの同時期の累積の推計受診患者数よりも少なかった

- ・2013/2014 シーズンは 2014 年第 5 週までに国内では 1,482 検体のインフルエンザウイルスの検出が報告されており、本格的な流行となった

1月以降はA/H1N1pdm が最多となっている

・インフルエンザ脳症の報告数は 2014 年第 6 週までに 33 人(暫定値)が報告されており、13 歳以下の小児が 25 人(75.8%)と大半を占めている

・全国約 500 箇所の基幹定点となっている病院からのインフルエンザによる入院例の報告は、2013 年第 5 週までの累積で 3,166 人(暫定値)であった

・60 歳以上の入院割合は 42.9%であり、2012/2013 シーズンの同時期の報告割合(58.7%)を大きく下回っていた

・入院サーベイランスについては、入院時の状況に関する調査項目、あるいは同調査の目的等、今一度再検討すべき課題があると思われる

F．研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

なし

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

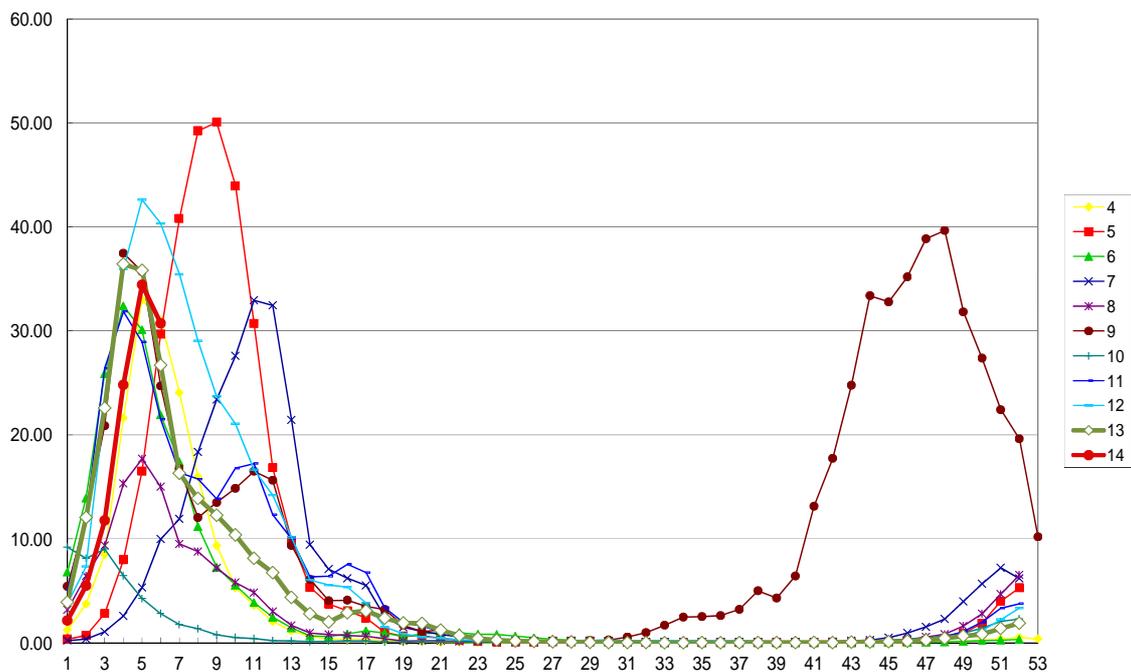


図 1 . 2004 ~ 2014 年第 6 週インフルエンザ定点あたり報告数週別推移 (暫定値)

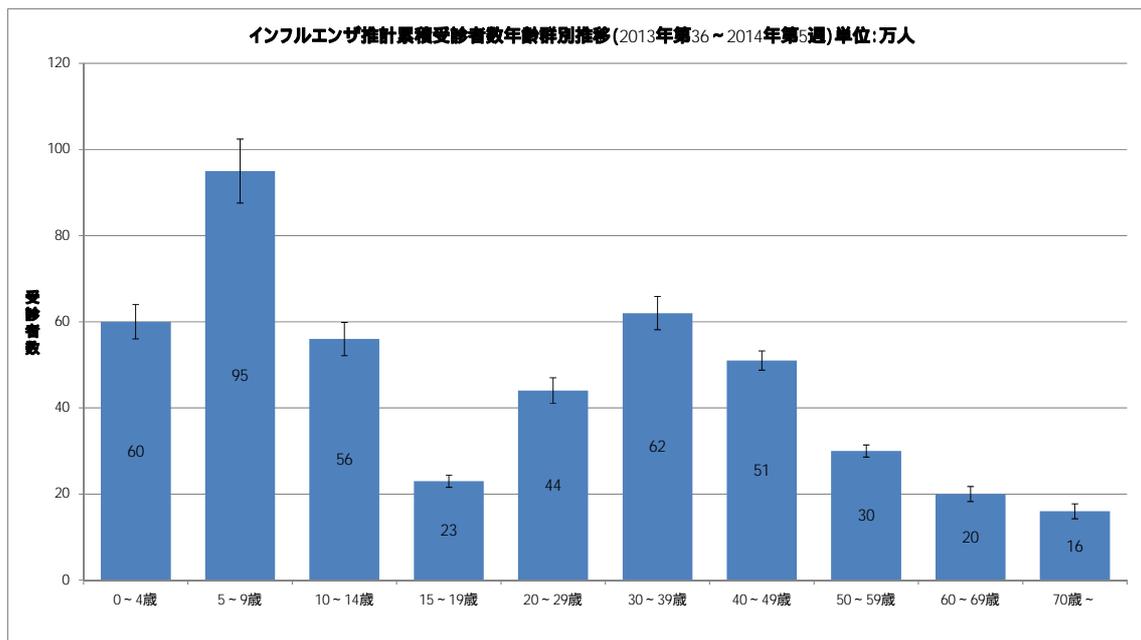


図 2 . 年齢群別インフルエンザ累積推計受診患者数 (暫定値) (2013 年第 36 週 ~ 2014 年第 5 週 : 各年齢群の 95% 信頼区間をグラフに示す)

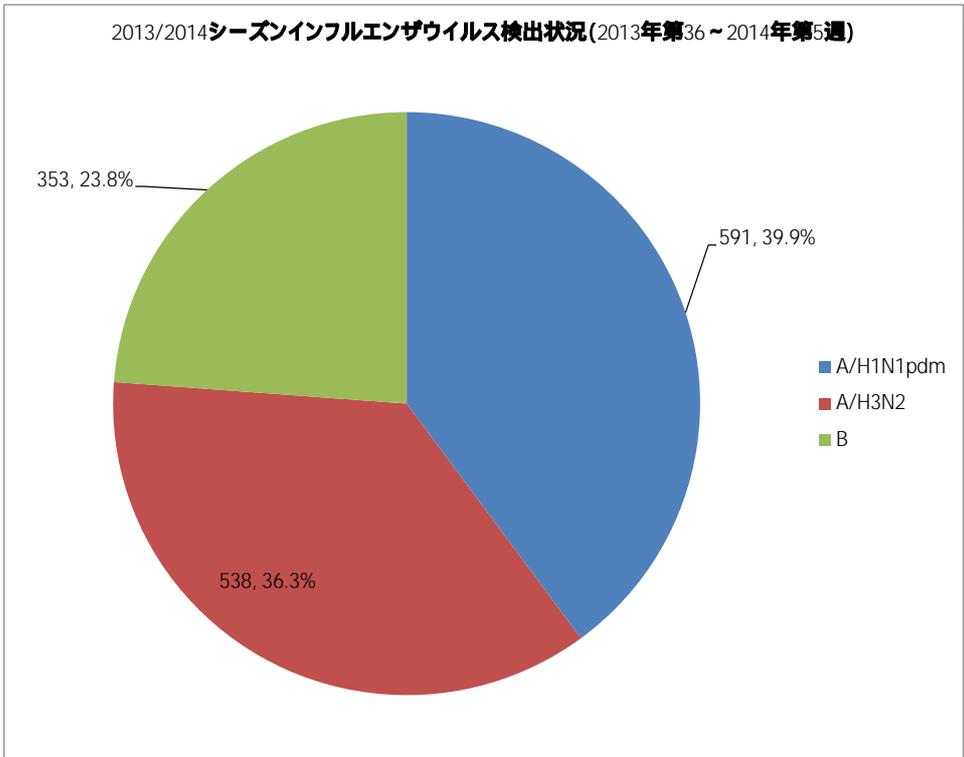


図3 . 2013/2014 シーズンインフルエンザウイルス検出状況 (2013 年第 36 週 ~ 2014 年第 5 週 ; 総検出数-1,482)(暫定値)

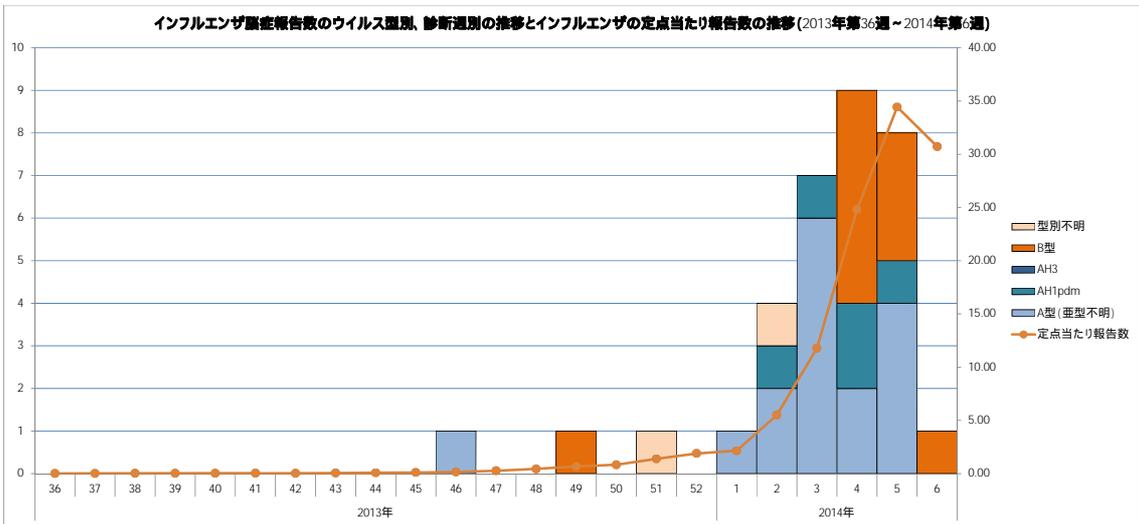


図4 . 2013/2014 シーズンインフルエンザ脳症報告数およびインフルエンザ定点あたり報告数週別推移 (インフルエンザ脳症累積報告数=33)(暫定値)

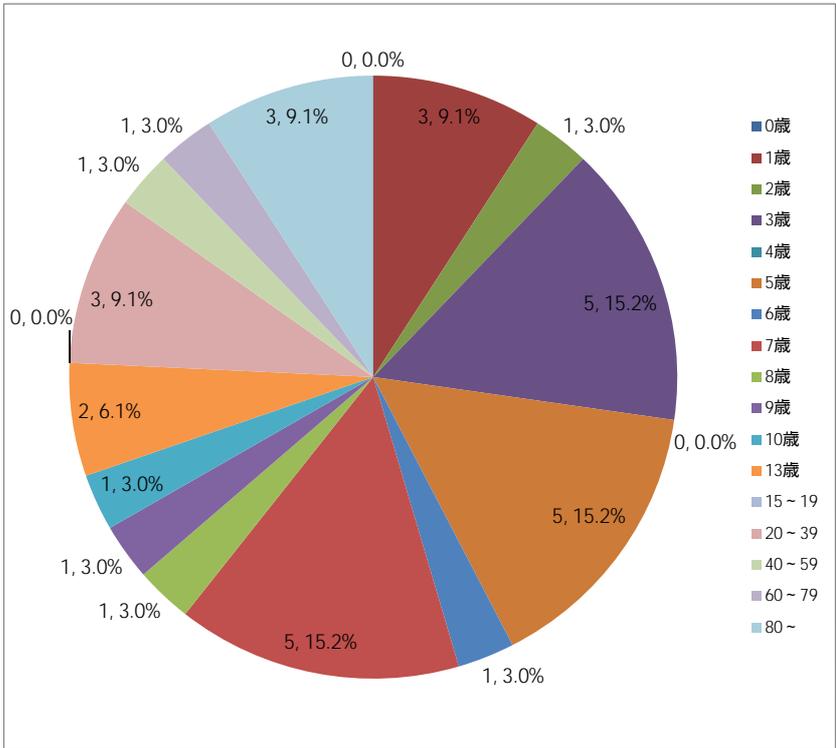


図 5 . 2013/2014 シーズンインフルエンザ脳症発生報告年齢別グラフ (暫定値)

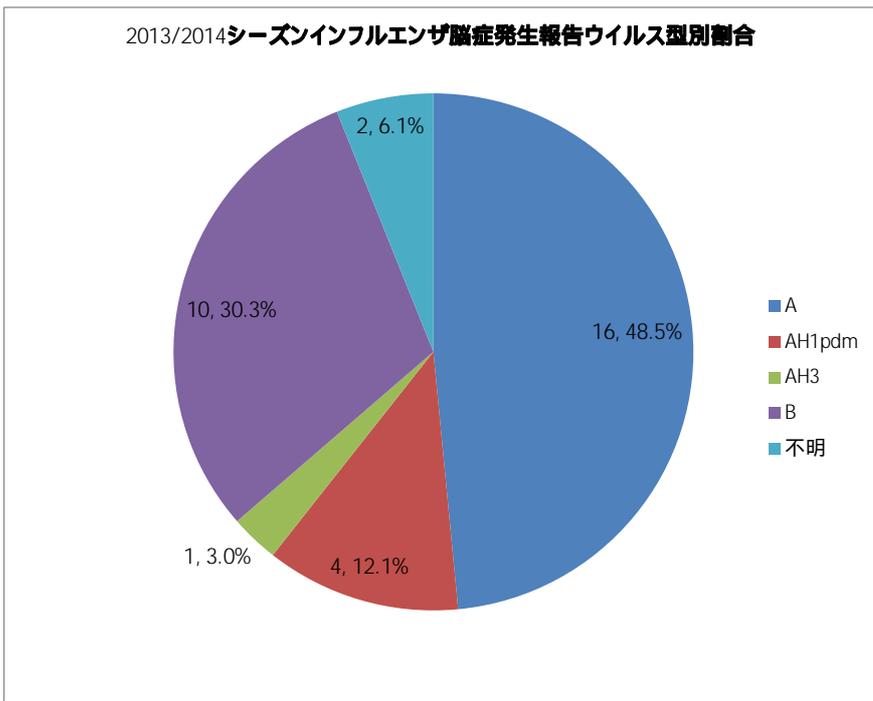


図 6 . 2013/2014 シーズンインフルエンザ脳症発生報告数のウイルス型別割合 (暫定値)

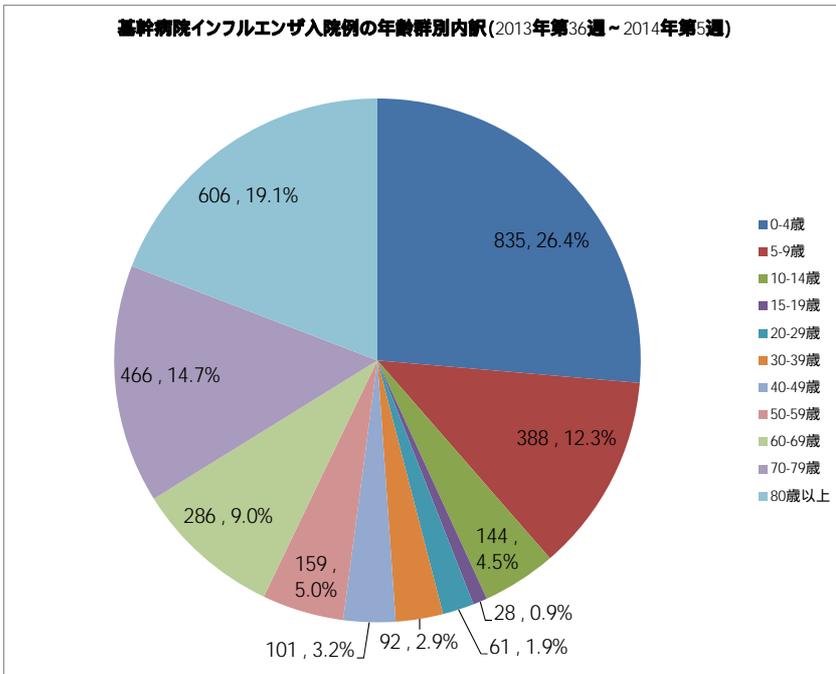


図 7 . インフルエンザ入院患者の累積報告数の年齢群別割合 (基幹定点からの報告)
(2013年第36~2014年第5週、累積報告数3,166)(暫定値)

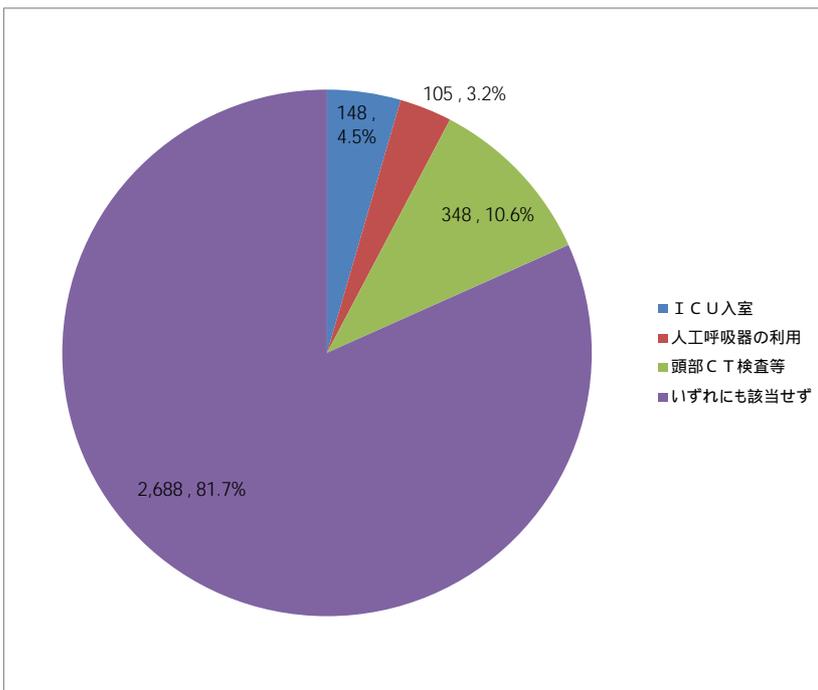


図 8 . インフルエンザ入院患者の累積報告数の入院時の状況別割合 (基幹定点からの報告、一部重複あり)(2013年第36~2014年第5週)(暫定値)

No.	年齢	性別	ウイルス	診断年月日	診断週	都道府県	症状・他	死亡報告
1	5	男	A	20131117	46	東京都	発熱、意識障害	
2	7	男	B	20131204	49	神奈川県	発熱、痙攣、意識障害	
3	3	男	型不明	20131219	51	北海道	発熱、頭痛	
4	36	男	A	20140101	1	宮崎県	発熱、痙攣、意識障害	
5	7	男	A	20140107	2	奈良県	発熱、痙攣、意識障害	
6	24	男	型不明	20140109	2	千葉県	発熱、頂部硬直、意識障害	
7	9	男	AH1pdm	20140111	2	長野県	発熱、痙攣、意識障害	
8	2	女	A	20140111	2	滋賀県	発熱、痙攣、意識障害	
9	28	女	A	20140113	3	兵庫県	発熱、頭痛、痙攣	
10	5	男	A	20140114	3	大阪府	発熱、意識障害	
11	8	女	A	20140115	3	千葉県	痙攣、意識障害	
12	1	女	A	20140115	3	大阪府	発熱、痙攣、意識障害	
13	84	女	A	20140116	3	岩手県	発熱、意識障害	
14	3	男	AH1pdm	20140117	3	埼玉県	発熱、痙攣、意識障害	
15	1	男	A	20140117	3	大阪府	発熱、痙攣、意識障害	
16	7	男	B	20140121	4	東京都	発熱、意識障害	
17	7	女	AH1pdm	20140121	4	神奈川県	痙攣、意識障害	
18	6	男	AH1pdm	20140121	4	新潟県	発熱、嘔吐、呼吸障害、発疹、浮腫、意識障害	
19	13	女	B	20140122	4	三重県	発熱、嘔吐、意識障害	
20	7	女	A	20140122	4	広島県	発熱、意識障害	
21	10	女	B	20140123	4	長崎県	発熱、意識障害	
22	43	男	B	20140124	4	青森県	意識障害	
23	86	女	A	20140126	4	青森県	発熱、意識障害	
24	61	女	B	20140126	4	大分県	発熱、頂部硬直、意識障害	
25	5	男	A	20140127	5	神奈川県	発熱、痙攣、意識障害	
26	13	女	B	20140127	5	奈良県	発熱、意識障害	
27	3	女	B	20140128	5	埼玉県	発熱、痙攣、意識障害	
28	1	男	A	20140129	5	宮崎県	発熱、嘔吐、痙攣、意識障害	
29	3	男	A	20140130	5	茨城県	発熱、痙攣、意識障害	
30	80	男	B	20140130	5	神奈川県	発熱、振戦、歩行障害、意識障害	
31	5	男	A	20140130	5	大阪府	発熱、痙攣、意識障害	
32	5	男	AH3	20140131	5	千葉県	発熱、意識障害	
33	3	男	B	20140204	6	宮城県	発熱、意識障害	

表1.2013/2014 シーズンインフルエンザ脳症報告一覧(2013年第36週~2014年第6週)(暫定値)

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

川崎市における急性脳炎・脳症の届出状況 2009年～2013年

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 三崎貴子 清水英明 川崎市健康安全研究所

研究要旨

川崎市において感染症法により届けられた急性脳炎・脳症の発生状況を把握し、検出された病原体情報と合わせて検討した。

2007年から2013年までに、川崎市において感染症法による急性脳炎として届出のあった例および定点医療機関その他から急性脳炎・脳症として検体が搬入された例の計29例を対象とし、発症年月別、性別、年齢別、病原体別の検査結果を解析した。

男女比は1.1:1.0で、小児が22例（5歳未満16例）であった。72.4%は5類感染症法としての届出があったが、27.6%は定点等からの依頼により検査を実施したものであった。検査実施数は年々増加しているものの、48.3%は病原体不明であった。発生時期は様々であるが、インフルエンザによるものは1～2月が多く、他の病原体によるものは6～10月に多かった。推定原因はインフルエンザウイルスが4例、次いでヒトヘルペスウイルス6型が3例と多かった。インフルエンザが原因とされる4例中3例は検体の搬入がなく、医療機関における病原体診断の実施の有無も不明であった。インフルエンザの4例中2例は死亡し、2例は転帰が不明であった。剖検例の届出が1例あったが、髄液、血液、便、咽頭拭い液、鼻腔拭い液で陽性であった。髄液を採取した18例のうち、PCR検査もしくは培養で陽性となったのは剖検例を含む5例のみであった。便検体で確定した症例が2例みられた。

全体像の把握するためには、積極的に経過を調査し病原体診断を実施し、病原体情報と疫学情報を結びつけることで原因究明そして治療や予防に役立てることが重要である。

A. 研究目的

我が国の感染症発生動向調査事業は昭和56年（1981年）7月から18疾病を対象に開始され、昭和62年（1987年）1月からはコンピュータを用いたオンラインシステムにおいて27疾病を対象に拡大した。平成10年（1998年）9月に「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」が成立（平成11年（1999年）4月から施行開始）し、感染症発生動向調査は同法第三章（第12条～第16条）による施策として

位置づけられた。その後複数回の一部改正を経て、平成25年（2013年）10月14日からは、一類から五類の全数および定点把握疾患の他に、厚生労働省令で定める疑似症を含めて対象疾患は全109疾患に拡大している。

我が国における急性脳炎は、2003年の感染症法一部改正（2003年11月5日施行）によって基幹定点からの報告による定点把握疾患から5類感染症全数把握疾患に変更され、診断したすべての医師は、法第12条

第1項の規定により診断から7日以内に管轄の保健所に届け出ることが義務づけられている。急性脳炎の届出対象疾患には、炎症所見が明らかでなくとも、同様の症状を呈する脳症も含まれ(熱性痙攣、代謝疾患、脳血管障害、脳腫瘍、外傷など、明らかに感染性とは異なるものは除外する)届出の時点で病原体不明なものについては、可能な限り病原体診断を行い、明らかになった場合には追加で報告することが求められている。しかしながら、必ずしも病原体サーベイランスの情報が十分に反映されているとは言えず、発生状況が正確に把握されていないことも多い。

川崎市における急性脳炎・脳症の発生状況を把握し、検出された病原体の情報と合わせて解析し、とくに原因がインフルエンザウイルスによると考えられる症例について疫学的な詳細を明らかにする。

B. 研究方法

2007年から2013年までの7年間に、川崎市において感染症法による急性脳炎として届出のあった者については国の感染症サーベイランスシステム(NESID)より情報を収集し、定点医療機関その他から急性脳炎・脳症として検体が搬入された者については健康安全研究所の検査担当者より病原体サーベイランス及び検査に関する情報を収集し、重複する症例を除いた計28例を対象として、発症年月別、性別、年齢別、病原体別の検査結果を解析した。

(倫理面への配慮)

国が実施している感染症発生動向調査事業により収集した情報を利用した調査であり、個人に係る情報は年齢、性別、居住区のみであるため、個人が特定されることはない。

研究計画の内容等は企業又は団体と直接

の関係はなく、開示すべき利益相反はない。

C. 研究結果

対象期間内の届出数は、男女比1.1:1.0(男15例、女14例)で、年齢中央値は4歳(0カ月~75歳)であった。発症は小児が22例(男13例、女9例)と、成人7例(男2例、女5例)の3.1倍であり、主に5歳未満が16例(男8例、女8例)と多かった(図1)。

全29例中、21例(72.4%)は5類感染症法としてNESIDに届出があり、うち7例(33.3%)は健康安全研究所に検体が搬入され病原体検索が試みられていた。検体を収集し検査を実施したもののNESID上に届出のなかったもの、すなわち定点等からの依頼により検査を実施したものが8例(27.6%)あった。

発生時期は様々であるが、インフルエンザによるものは1~2月が多く、他の病原体によるものは6~10月に多かった(図2)。コクサッキーB3ウイルスを原因とする1例が、12月に発生していた(表1)。

検査実施数は年々増加しているものの、半数に近い14例(48.3%)は病原体が不明として届け出られていた(図3)。このうち10例は、病原体検索を試みたにもかかわらず、原因を特定することができなかった。

推定原因が報告されている15例では、インフルエンザウイルスが4例、次いでヒトヘルペスウイルス6型が3例と多かった。

インフルエンザが原因とされる4例中1例は咽頭拭い液のPCR検査を実施しており陰性であったが、3例は検体の搬入がなく、医療機関における病原体診断の実施の有無も不明であった(表2)。インフルエンザが原因として届け出られた急性脳症の4例中2例が死亡、2例は転帰不明であった。

剖検例1例では尿を除く髄液、血液、便、咽頭拭い液、鼻腔拭い液で陽性であった。

髄液を採取された症例は 18 例であったが、PCR 検査もしくは培養で陽性となったのは剖検例を含む 5 例のみであった。

便検体により診断が確定した 2 症例は、ヒトヘルペスウイルス 6 型およびアデノウイルス 56 型が原因であった。

D . 考察

急性脳炎は、種々の病原体により引き起こされた脳組織の炎症を主な病態とする疾患群の総称である。また、急性脳症は、各種のウイルス感染症を契機として急激に発症し、意識障害など急性脳炎と類似の臨床症状を呈するが、脳組織における炎症や病原体が確認できないことがあり、診断に苦慮する場合も少なくない。いずれも小児期に多いとされており、今回の調査においても小児例が成人例のほぼ3倍であった。全年齢層における男女差は認めなかったが、小児では男児の割合が多く、急性脳炎・脳症が男児に多いとの報告と一致していた。

急性脳炎・脳症は、診断したすべての医師に届出が義務づけられているにもかかわらず、国の発生動向調査として把握できていたのは全体の72.4%に留まり、このうち健康安全研究所に検体が搬入され、病原体検索が試みられていたのはわずか33.3%であった。逆に、検査は実施されたものの届出のなかった症例も27.6%に上り、5類感染症全数把握疾患としての把握が十分になされていないことが示された。

発生時期は、インフルエンザの流行する1～2月の冬季と、アデノウイルスやエンテロウイルス感染症の流行する6～10月の夏季に多く、一般的な感染症の流行時期に一致していたが、ヒトヘルペスウイルス6型（HHV-6）や単純ヘルペスウイルスなどヘルペスウイルス科のウイルスによるものは、いずれの時期にも発生がみられた。コクサッキーウイルスを原因とする1例が12月に

発生しており、かつて夏と秋に見られたエンテロウイルス属による感染症の流行が、近年は冬まで継続することと関連している可能性も示唆された。

病原体検索を試みたにもかかわらず、原因を特定できなかった症例が10例（34.5%）にも上り、病原体の検出が困難であることが推察される。しかしながら、インフルエンザに関しては4例中3例で検体が搬入されておらず、迅速診断キット等を用いた簡易検査のみで診断されている可能性が高いことが示された。インフルエンザによる脳症は重症例が多く、全体像を把握するためにも病原体検索は非常に重要であり、合併症による重症化との鑑別は必須であると考えられる。

急性の転帰を辿り、剖検により脳症と判明した1例については、剖検を実施した医師からの届出という稀な事例であり、原因究明のためには届出のシステムも含めた検討が必要と考えられた。

中枢神経症状を呈する場合、検体として髄液を採取されることが多いが、髄液から病原体が検出されたのはわずか5例（27.8%）に留まり、便検体など他の部位からの検体の採取も重要であることが示された。

E . 結論

現時点において、感染症発生動向調査の届出のみでは正確な発生数や転帰の把握、原因の究明は未だ難しく、病原体検索を含めた情報の収集が重要と考えられた。突然死の場合など剖検時の病原体検索が原因解明の唯一の手段となることもあるため、届出疾患であることの周知徹底とともに積極的に経過を調査・報告するシステムを構築し、医療機関と行政機関の協力によって病原体情報と疫学情報を結びつけることで全体像を把握し、治療や予防に役立てることが重要と考える。

(謝辞)

発生動向調査にご協力いただきました各医療機関および市内の各区役所保健福祉センターの皆様に深謝いたします。

F . 研究発表

1 . 論文発表

- 1 . パンデミックインフルエンザ H1N1 2009 の総括 小児内科 45(11):1965-1970, 2013 .
- 2 . Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. Influenza Other Respir Viruses. 2013;7(6):1390-9 .
- 3 . Mitamura K, Shimizu H, Yamazaki M, Ichikawa M, Nagai K, Katada J, Wada A, Kawakami C, Sugaya N. Clinical evaluation of highly sensitive silver amplification immunochromatography systems for rapid diagnosis of influenza. J Virol Methods . 2013;194(1-2):123-8 .
- 4 . Mitamura K, Kawakami C, Shimizu H, Abe T, Konomi Y, Yasumi Y, Yamazaki M, Ichikawa M, Sugaya N. Evaluation of a new immunochromatographic assay for rapid identification of influenza A, B and A(H1N1)2009 viruses. J Infect Chemother. 2013; 19(4):633-8 .

2 . 学会発表

三崎貴子、岡部信彦 川崎市における急性脳炎・脳症の届出状況 第56回日本小児神経学会総会.2014年5月.浜松市(予定)

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

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、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への備えを怠ると、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「重症肺炎」は大きな問題とな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登録された症例で、肺炎例の情報を収集した。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。2012-13年流行期に登録されたインフルエンザ患者はA(H3N2)が340例、B型が126例で、A(H1N1)pdm09は5例で、A型であった。肺炎は、2011-12年流行期は2例、2012-13年流行期も2例で、全体における割合はそれぞれ0.4%、0.3%であった。70才以上での肺炎あるいは入院の割合はそれぞれ15%、4%と高率で、高齢者において重症例の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も、ICU入室や人工呼吸器の利用は70才以上に集中していた。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メカニズムは不明であるが、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重症例が出る可能性は高く、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。

新型インフルエンザと呼ばれたH1N1pdm09の流行による被害は少なかったが、次に新型が出現した際への備えを怠ると、今回の経験とは異なった大きな被害が出ることも危惧される。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から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。2012-13 年流行期に登録されたインフルエンザ患者は A (H3N2) が 340 例、B 型が 126 例で、A (H1N1) pdm09 は 5 例であった。患者の年齢分布においては、2012-13 年流行期は A (H3N2) が 30 歳以上に比較的多数みられ、特に 70 歳以上の患者が多かった (図 1)。

2011-12 年流行期の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、上段)。2012-13 年流行期の肺炎あるいは入院の報告は肺炎が 2 例で、70 才と 85 才の男性で、全員 A 型であった (表 1)。肺炎の全体における割合は 0.3% であった。

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、基幹病院における入院患者の総数は 2012 年が 350 人、2013 年が 186 人であった (表 2)。その中で 2012 年は ICU 入室が 8 例、人工呼吸器の利用は 3 例となっている。2013 年は ICU 入室が 12 例、人工呼吸器の利用は 3 例となっている。年齢分布をみると、2012 年は 1 才から 9 才と 70 才以上に集中していた。2013 年は 70 才以上の占める割合が 75% (8/12) と高率であった。

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うまでもない。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る。2011 年 9 月より国がインフルエンザ入院に関するサーベイランスを基幹病院にて実施し、入院や肺炎症例のデータが蓄積され始めたが、まだまだ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、2011-12 年流行期は 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。2012-13 年流行期は 532 例中 2 例の肺炎が報告されている。ノイラミニダーゼ阻害薬により肺炎合併は減少していると考えられるが、肺炎例の年齢をみると 6 歳の小児例を除くと 5 例全員が 70 才以上であり、肺炎は高齢者において発生頻度が決して低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。2 年間の調査結果では、糖尿病や高血圧は基礎疾患としてみられなかったが、慢性呼吸器疾患、とくに気管支喘息が 3 名において基礎疾患であったことは興味深い。慢性呼吸器疾患が重要な因子となっているかについてはさらに検討する価値があると思われる。しかし、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ことが重要であることには変わりはないと思われる。

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。

また昨年度実施された、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とともに重要な問題であると考えられる。

高齢者人口は今後も増加すると考えられる。新型インフルエンザ発生時に高齢者に多数の肺炎発症者が出る可能性があり、その頻度が 1% を越

える可能性が高いことを考えると、その対策として病床の確保とICU入室が必要な重症例への受け入れ態勢については事前に十分な検討が行われていることが必要と思われた。

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). *日本臨床内科医会会誌* 27 巻2号臨時付録, 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2013-2014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). *日本臨床内科医会会誌* 28 巻2号臨時付録, 2013

7 Ikematsu H, Kawai N, Iwaki N, Kashiwagi S. The duration of fever and other symptoms after the initiation of laninamivir octanoate hydrate in the Japanese 2011-2012 influenza season. *J Infect Chemother*. 2013.

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抗体価測定の成績. 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 各流行期における肺炎合併例および入院例

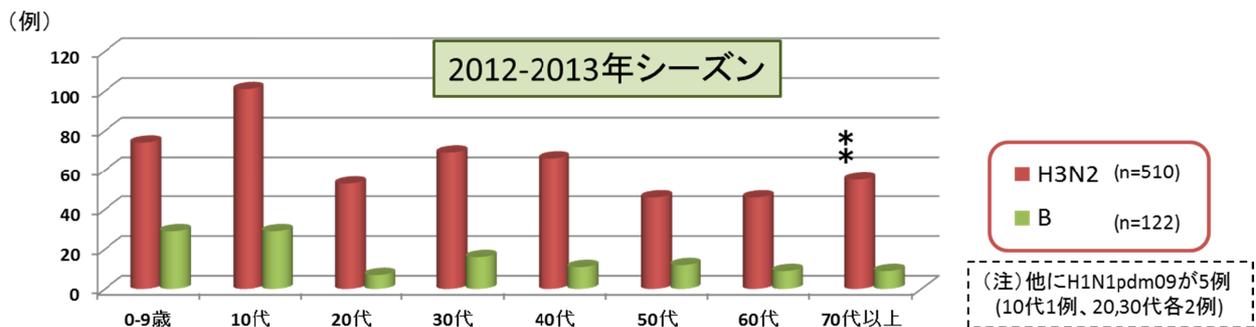
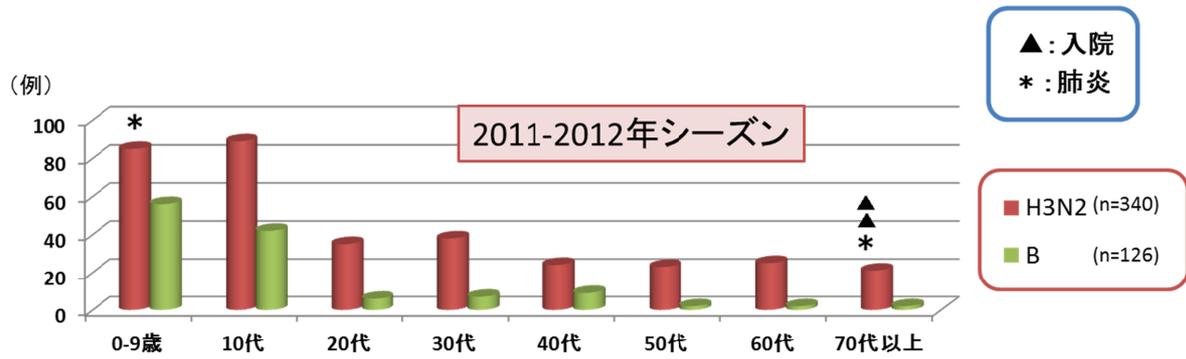
流行期	年齢 (yr)	性	型・ 亜型	体重 (kg)	合併 症	転帰	治療 薬	発症 から 治療 開始 まで	CRP	WBC	昨年 罹患	ワク チン		基礎疾患
												昨 年	今 年	
2011-12年	6	F	A/H3	23	肺炎	外来 治癒	L	27hr			なし	なし	なし	なし
	71	M	A/H3	50	肺炎	外来 治癒	P	1hr	5.3	4800	なし	1回	1回	心疾患、脳卒中
	74	M	A/H3		喘息 発作	入院 治癒	P	43hr	6.8	8200	なし	1回	1回	気管支喘息、 脳卒中、糖尿病
	82	F	A/H3	67.4		入院 治癒	P	2.5hr	1.6	7000	なし	1回	2回	気管支喘息
2012-13年	85	M	A/H3	40	肺炎	外来 治癒	P	24hr	13.2	1210 0	なし	なし	なし	気管支喘息 COPD
	70	M	A	80.7	肺炎	外来 治癒	O	22hr			なし	1回	なし	なし

L : laninamivir P : peramivir O : Oseltamivir

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2012～2013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	2012 年	0人	2人	3人	0人	1人	2人	8人						
	2013 年	0人	3人	0人	1人	0人	3人	5人						
人工呼吸器の 利用	2012 年	0人	0人	1人	0人	2人	3人							
	2013 年	0人	0人	0人	1人	0人	0人	0人	0人	0人	0人	1人	1人	3人
インフルエンザ 入院全数	2012 年	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
	2013 年	19人	52人	14人	8人	1人	1人	4人	4人	11人	12人	20人	40人	186人

図1. 各年代における各型の患者数



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

題目

「病態及び解析結果からみた重症インフルエンザ肺炎・脳症治療ガイドライン作成のための根拠収集」

研究分担者 河島 尚志〔東京医科大学小児科主任教授〕

協力研究者 森地 振一郎〔東京医科大学小児科助教〕

研究要旨

本年度の研究から主に以下の結果が得られた。2009 pdm fluA(H1N1)脳症の全国調査をおこなったアンケート結果をもとに、治療法などの解析を行い、深昏睡(GCS8点以下)では抗ウイルス薬の有用性が確認された。時間軸を整理してのMRI画像の解析では、48時間以内のMRIは死亡例を除き予後推測に役立たなかった。重症例におけるペラミビル投与・重症肺炎におけるAPRVは治療に試すべき治療と考えられた。神経栄養因子のBDNFは髄膜炎群と急性脳症群ではコントロール群と比較して血清・髄液ともに両群で上昇していた。脳症の疑い例を含む入院例を解析では、脳症確定群と否定群間で、髄液IL6、AST、ALT、CPKにおいて有意差を認めたと、脳症確定群と脳症非確定群間で有意差はなかった。髄液IL-6、AST、ALT、CPKにおいて、統計学的な有意差はないが、予後不良群が高値の傾向がみられた。

重症肺炎におけるAPRV (airway

pressure release ventilation) の有用性の検討

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

熱性けいれん複雑型と鑑別困難な軽症急性脳症の検討

インフルエンザ脳症を含むインフルエンザ感染症におけるペラミビル投与の検討

A. 研究目的

インフルエンザ脳症治療ガイドライン改訂版が作成され、すでに5年以上が経過し、この間に2009 pdm flu Aの流行や各種薬剤の開発、特殊治療、画像解析など多くの変化があった。これらの結果を踏まえ、よりよいガイドラインを作成すると同時に、鳥インフルエンザを含めての新たなインフルエンザのパンデミックにも対応できるガイドラインあるいは体制作りとなる指針を作成する。

B. 研究方法

2009 pdm fluA(H1N1)脳症における治療法の解析と急性期MRIの検討

C. 研究結果

2009 pdm fluA(H1N1)脳症の全国調査をおこなったアンケート結果をもとに、治療法などの解析を行った。深昏睡(GCS8点以下)では抗ウイルス薬の有用性が確認された(表1)。特殊治療は重症例に多く施行されていたため、解析不能であった。また、82%にステロイドパ

ルス療法がおこなわれていた。また、時間軸を整理しての MRI 画像に解析では、48 時間以内の MRI は死亡例を除き予後推測に役立たなかった (図 1)。

重症肺炎における APRV の有用性を自験例と文献的調査を行い、多数例の報告はないため、治療指針に試すべき治療として入れるべきと考えられた。

BDNF)は髄膜炎(細菌性・ウイルス性)群と急性脳症群ではコントロール群と比較して血清・髄液ともに両群で上昇し、髄液では特に細菌性髄膜炎群が上昇していた。急性脳症群の起因ウイルス別では、血清 BDNF はインフルエンザ脳症群が RS 脳症群より有意に上昇。髄液 BDNF はインフルエンザ脳症群が他の群より有意に上昇していた。脳症のタイプ別で BDNF を比較すると血清、特に髄液検体ではサイトカインストーム型が有意に上昇(図 2)。神経学的後遺症を呈した例は、BDNF が高値例に集中。興奮毒性型の神経学的後遺症の程度(PCPC)と髄液 BDNF は正の相関性を示した。IL-6 と BDNF の相関性は、血清・髄液検体ともに正の関係を示した。

127 例の脳症多疑い例を含む入院症例を解析し、脳症確定群、脳症非確定群、脳症否定群とわけて解析し、確定群と否定群間で、髄液 IL6、AST、ALT、CPK において有意差を認めたが、非確定群と脳症否定群間、脳症確定群と脳症非確定群間で有意差はなかった。また、けいれん重責型において、予後不良群と、良好群を比較すると、性別、平均年齢、けいれんの持続時間に差はなかつたが、髄液 IL-6、AST、ALT、CPK において、統計学的な有

意差はないが、予後不良群が高値の傾向がみられる(表 2,3)。

重症例におけるペラミビル投与の有用性を示すエビデンスはないが、静注薬であること、解熱までの日数が短いことなどから使用すべきであるが、連日複数日重症例では投与が必要である。

D. 考案

治療法では、抗ウイルス薬を早期に使用することが推奨される。また、新規採用薬剤であるペラミビル投与は、重症例では複数日投与が必要であるが、今後のエビデンスを目的に今後も情報収集が必要である。また、特殊治療は重症例に多く施行されていたため、さらなる症例検討が必要である。また、MRI 画像を含めて早期の予後を推測する指標として、BDNF 測定や、脳症確定群、脳症非確定群、脳症否定群との鑑別に MRI 以外の他の検査の解析がまたれる。

治療法では、重症肺炎における APRV は治療指針に試すべき治療として入れるべきと考えた。

E. 研究発表

論文発表

- 1: Yamamoto T, Mizoguchi Y, Kaneno H, Yamamoto K, Inoue Y, Kawashima H, Kase T, Shimotsuji T. Serum immunoglobulin G subclass levels and estimated clinical severity caused by possible influenza A (H1N1) pdm 2009 infection. J Infect Chemother. 2013 Oct;19(5):833-42.
- 2: Sakai E, Yamanaka G, Kawashima H, Morishima Y, Ishida Y, Oana S, Miyajima T, Shinohara M, Saitoh M, Mizoguchi M. A case

of recurrent acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus with carnitine palmitoyltransferase II variation. *Neuropediatrics*.

2013;44(4):218-21

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

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

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

学会発表

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

2. Yamanaka G, Kawashima H, Morishita N, Oana S, Ishida Y, Morichi S, Miyajima T, Hoshika A. Clinical analysis of Japanese patients with acute encephalopathy including suspected cases for 5 years. 27th

International Pediatric Association Congress of Pediatrics (2013.8) Melbourne

3. Morichi S, Kawashima H, Yamanaka G, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A.

Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebrospinal fluid and plasma of children with meningitis and encephalitis/encephalopathy 27th International Congress of Pediatrics 2013 (2013.8.24-29) Melbourne, Australia

4. 河島 尚志.インフルエンザ脳症の現状 第116回日本小児科学会学術集会 {2013.4.19 - 21} 東京

5. 河島尚志.ロタウイルス感染症ー重症化の病態 杉並区小児科医会セミナー(2013.5.22)

6. 河島尚志.ウイルス性脳炎・脳症の最近の知見 第94回東京小児科医会学術集会 (2013.10.20)

7. 河島尚志.インフルエンザを含む重症ウイルス感染症の病態 仙台医師会講演会 (2013.8.25)

8. 河島尚志.インフルエンザ脳症を中心とした急性脳症の現況 日本小児神経学会関東地方会 (2013.3.9)

9. 山中岳,河島 尚志, 森下那月美, 藤野美佳, 森地振一郎, 石田悠, 小穴信吾, 柏木保代, 宮島祐, 星加明德. 2005-2010年当院における脳症疑いにて入院した127例の臨床的検討ー第2報ー 第115回日本小児科学会総会 (2013.4.20) 広島

10. 山中岳, 森地振一郎, 石田悠, 小穴信吾, 森島靖行, 鈴木一徳, 河島尚志, 宮島祐, 星加 明德. 重度の後遺症を伴ったけいれん重積型脳症の長期予後 第56回日本小児神経学会総会(2013,5.30) 大分

G. 知的所有権の取得状況

なし

図 1

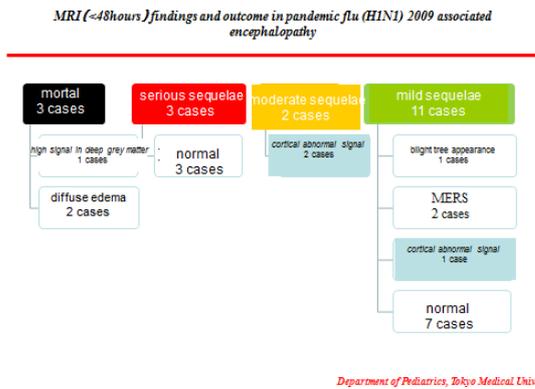


表 2

検定項目

- WBC, TP, Na, BUN, NH₃, PT, FDP, pH, HCO₃⁻, PLT, Alb, CPK, Cr, CRP, APTT, Ddimer, -BE, Hb, AST, Fe, Glu, IL-6, Fib, AT₃, CSFIL-6, ALT

	確定群	非確定群	否定群	
CSF IL-6 (pg/ml)	124.9 ± 60.4	192.6 ± 145.7	20.7 ± 6.6	**
AST (U/L)	372.7 ± 319.5	49.4 ± 6.9	39.4 ± 2.5	**
ALT (U/L)	74.6 ± 56.5	18.7 ± 3.9	12.8 ± 1.2	**
CPK (U/L)	743.5 ± 374.2	166.2 ± 31.5	210.7 ± 51.3	**
Cr (mg/dl)	0.56 ± 0.05	0.39 ± 0.04	0.31 ± 0.01	*

*確定群VS非確定群 **確定群VS否定群

図 2

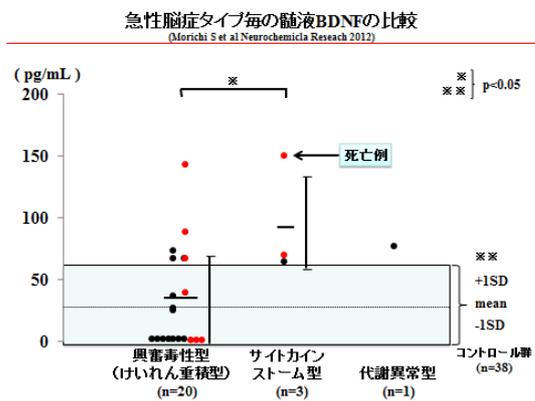


表 3

検定項目

- WBC, TP, Na, BUN, NH₃, PT, FDP, pH, HCO₃⁻, PLT, Alb, CPK, Cr, CRP, APTT, Ddimer, -BE, Hb, AST, Fe, Glu, IL-6, Fib, AT₃, CSFIL-6, ALT

	確定群	非確定群	否定群	
CSF IL-6 (pg/ml)	124.9 ± 60.4	192.6 ± 145.7	20.7 ± 6.6	**
AST (U/L)	372.7 ± 319.5	49.4 ± 6.9	39.4 ± 2.5	**
ALT (U/L)	74.6 ± 56.5	18.7 ± 3.9	12.8 ± 1.2	**
CPK (U/L)	743.5 ± 374.2	166.2 ± 31.5	210.7 ± 51.3	**
Cr (mg/dl)	0.56 ± 0.05	0.39 ± 0.04	0.31 ± 0.01	*

*確定群VS非確定群 **確定群VS否定群

表 1

深昏睡(GCS < 8)患者のプロフィール

神経学的後遺症	死亡/後遺症あり (10例)	後遺症なし (20例)	統計処理
性別 (平均 ± 標準偏差)	5.7 ± 4.36	7.1 ± 2.50	NS
性別(男:女)	5:5	15:5	NS
Plt × 10 ⁴ (/mL)	24.1 ± 8.98	24.5 ± 7.43	NS
AST (IU/L)	116.5 ± 157.6	37.8 ± 13.1	P < 0.05
CK (IU/L)	167.7 ± 108.8	103.2 ± 64.3	NS
glucose (mg/dL)	197 ± 66.2	142 ± 41.6	P < 0.05
PT-INR	1.37 ± 0.29	1.23 ± 0.18	NS

Department of Pediatrics, Tokyo Medical Univ.

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

急性脳炎・脳症に対するホスフェニトインの有効性と安全性

研究分担者 奥村彰久 愛知医科大学小児科・教授

研究要旨

急性脳症の治療において、けいれんの抑制は神経学的予後の改善に重要である。しかし、現在までのところ、急性脳症のけいれんに対する抗てんかん薬の使用法には明確なエビデンスが乏しい。近年日本で発売されたホスフェニトイン（fPHT）は急性脳症における発作抑制に適した薬剤である可能性があるため、症例を集積しその有効性と安全性とを検討した。今回は、小児神経科医のメーリングリストを利用して38例48投与機会のデータを集積した。二相性脳症が17例26機会、その他の脳炎・脳症が21例22機会であった。fPHTの効果は、著効が29機会、有効が11機会、無効が8機会であり、投与機会あたりの有効率は83%であった。fPHTの有効性は脳症のタイプによる差を認めなかった。有害事象は、3例に軽度のものを認めたのみで、ルート閉塞をきたした症例は皆無であった。fPHTは高い有効性と安全性を備えており、急性脳症のけいれんの治療に選択すべき薬剤であると思われる。

A. 研究目的

急性脳症の治療において、けいれんの抑制は神経学的予後の改善に重要であるといわれている。その理由は、けいれんが長時間持続すると興奮毒性のため二次的な神経細胞障害が起きるためである。しかし、現在までのところ、急性脳症のけいれんに対する抗てんかん薬の使用法には明確なエビデンスが乏しく、それぞれの施設で経験に基づいた薬剤投与が行われているのが現状である。

フェニトイン（PHT）は発作抑制効果が強力である上に意識状態への影響が少なく、

急性脳症における発作抑制に適した薬剤である。しかし、血管外漏出による壊死・静注時の血管痛/血管炎・結晶析出によるルート閉塞などのため、小児に対して使用するのが容易でなく敬遠されている。近年日本でも発売されたホスフェニトイン（fPHT）は、PHTのプロドラッグで、血管痛・血管炎や血管外漏出による壊死が少ない。また、他の輸液と同じルートで投与しても析出によるルート閉塞が起きにくい。このような特徴があるため、fPHTは急性脳症のけいれんコントロールに有用と予想される。

我々は、急性脳症に対しfPHTを使用し

た症例を集積し、その有効性と安全性とを
検討した。

B . 研究方法

小児神経科医のメーリングリストである
蔵王セミナーメーリングリスト用いて、症
例の収集を行った。まず、メーリングリス
トに急性脳症に対し fPHT を使用した症例
について、研究への報告を呼びかけた。研
究に協力を申し出た医師に、連結不可能匿
名化を施した調査票を配布しその回答を依
頼した。この研究については、順天堂大学
医学部の倫理委員会の承認を得た。

調査票の内容は、症例の臨床情報と fPHT
投与前後のけいれんの経過などである。
fPHT の有効性は、著効：発作の消失、有効：
発作回数・持続時間の減少、無効：これら
に該当しない場合、として判定した。

C . 研究結果

38 例 48 投与機会のデータを集積した(表
1)。男女比は 23 : 15 で、年齢の中央値は
22 か月であった。二相性脳症が 17 例 26 機
会、その他の脳炎・脳症が 21 例 22 機会
であった。fPHT の前に使用した薬剤は、ミダ
ゾラムが 22 機会でも多く、次いでジアゼ
パムが 17 機会に使用されていた(表 2)。

fPHT の効果は、著効が 29 機会、有効が
11 機会、無効が 8 機会であり、投与機会
あたりの有効率は 83%であった(表 3)。二相
性脳症における投与機会あたりの有効率は
81%、その他の脳炎・脳症では 86%であり、
fPHT の有効性は脳症のタイプによる差を
認めなかった。

有害事象は、口部ジスキネジア 1 例、意
識レベル低下 1 例、血圧低下および不整脈
1 例であり、ほとんどの症例で問題なく使
用することができた。また、投与経路にか
かわらずルート閉塞をきたした症例は皆無
であった。

D . 考察

急性脳症の急性期にはけいれんが高率に
出現し、しかもその抑制は困難であること
は稀でない。今回の調査では、fPHT の有効
率は 80%以上と極めて高い有効性を示した。
さらに、脳症のタイプによる有効性の差を
認めなかった点も注目される。ミダゾラム
やフェノバルビタールの急性脳症のけいれ
んに対する有効率についてはまとまった報
告がなく不明であるが、我々の調査では
fPHT の有効性は高く、効果の観点で fPHT
は選択すべき薬剤であるといえる。

ミダゾラムやフェノバルビタールはある
程度以上の投与量で使用すれば意識レベル
に影響が出ることが多く、意識状態をモニ
タリングする必要がある急性脳症の治療に
おいては不都合である。これに対し、fPHT
は意識状態への影響が小さい。我々の調査
では fPHT による過鎮静や意識レベルの低
下を認めた症例はほとんどなく、この点も
fPHT の重要な利点であると考えられる。

今回の調査では、fPHT 投与に伴う有害事
象は頻度が低く、軽症のものであった。し
たがって、急性脳症の治療において fPHT
は安全性が高い薬剤であるといえる。さら
に、PHT ではしばしば治療の障壁となっ
ていたルート閉塞が fPHT では皆無であっ
たことも注目される。これらの事から fPHT
は安全性や利便性も高い薬剤であると思わ
れた。

E . 結論

急性脳症のけいれんに対し、fPHT は脳症
のタイプにかかわらず高い有効性を示した。
また、有害事象も低頻度で軽症であり、ル
ート閉塞を起こさず利便性も高い。これら
のことから fPHT は急性脳症のけいれんの
治療に選択すべき薬剤であると思われる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

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

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

Okumura A, Nakazawa M, Abe S, Shimizu T. Attitude toward epilepsy after media coverage of car accidents related to persons with epilepsy in Japan. *Epilepsy Behav* 2013; 27(1): 264-266.

Okumura A, Shimojima K, Kubota T, Abe S, Yamashita S, Imai K, Okanishi T, Enoki H, Fukasawa T, Tanabe T, Dibbens LM, Shimizu T, Yamamoto T. PRRT2 mutation in Japanese children with benign infantile epilepsy. *Brain Dev* 2013; 35(7): 641-646.

Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respi Viruses* 2013; 7(5): 759-760.

Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takashi JI, Okamoto N, Hisata K, Shoji H, Saito A, Furukawa T, Kishida T, Shimizu T, Yamamoto T. Whole-exome sequencing of a unique brain malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria and midbrain tectal hyperplasia. *Neuropathology*. 2013; 33(5): 553-560.

Saito M, Okumura A, Kidokoro H, Kubota T, Abe S, Ikeno M, Hayakawa F, Shimizu T, Watanabe K. Amplitude spectral analyses of disorganized patterns on electroencephalograms in preterm infants. *Brain Dev* 2013; 35(1): 38-44.

Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Hayashi S, Natsume J. Amplitude-integrated electroencephalogram 1h after birth in a preterm infant with cystic periventricular leukomalacia. *Brain Dev* 2013; 35(1): 75-78.

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

Suganuma H, Okumura A, Kitamura Y, Shoji H, Shimizu T. Effect of Hypoxic-Ischemic Insults on the Composition of Fatty Acids in the Brain of Neonatal Rats. *Ann Nutr Metab* 2013; 62(2): 123-128.

Yoneda Y, Hagino Y, Kato M, Osaka H,

Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori A, Yamasaki M, Kumakura A, Sugo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saito H. Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 2013; 73(1): 48-57.

Kubota T, Fukasawa T, Kitamura E, Magota M, Kato Y, Natsume J, Okumura A. Epileptic seizures induced by dexmedetomidine in a neonate. *Brain Dev* 2013; 35(4):360-362.

Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human herpesvirus 6-associated encephalopathy in a child with Dravet syndrome. *Neuropediatrics* 2013; 44(3): 155-158.

Kidokoro H, Kubota T, Hayakawa M, Kato Y, Okumura A. Neonatal seizure identification on reduced channel EEG. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013; 98(4): F359-361.

Nakazawa M, Okumura A, Nijima S, Yamashita S, Shimono K, Hirose S, Shimizu T. Oral mexiletine for lidocaine-responsive neonatal epilepsy. *Brain Dev.* 2013; 35(7): 667-669.

Nakano T, Okumura A, Tanabe T, Niwa S, Fukushima M, Yonemochi R, Eda H, Tsutsumi H. Safety evaluation of laninamivir octanoate hydrate through analysis of adverse events reported during

early post-marketing phase vigilance. *Scand J Infect Dis.* 2013; 45(6): 469-477.

Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K. Mutations in the C-Terminal Domain of ColQ in Endplate Acetylcholinesterase Deficiency Compromise ColQ-MuSK Interaction. *Hum Mutat* 2013; 34(7): 997-1004.

Ishii A, Shioda M, Okumura A, Kidokoro H, Sakauchi M, Shimada S, Shimizu T, Osawa M, Hirose S, Yamamoto T. A recurrent KCNT1 mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy. *Gene.* 2013; 531(2): 467-471.

2 . 学会発表

Akihisa Okumura. Invited lecture: Proposal of semiological categorization of neonatal seizures. The 15th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, Tokyo, Japan, 2013.4.13.

奥村彰久、中川聡、河島尚志、清水俊明、近藤直実、森島恒雄、新型インフルエンザ死亡例調査グループ . インフルエンザに伴う予期せぬ心肺停止：パンデミック 2009 小児死亡例の実態調査から . 第 116 回日本小児科学会学術集会、広島、2013.4.20

Akihisa Okumura. Current Clinical Approach to Neonatal Seizures. Pediatric Academic Societies 2013 Annual Meeting, Washington DC, USA, 2013.5.4.

Akihisa Okumura. EEG in term babies. Joint Scientific Meeting of 9th Asian

Society of Pediatric Research Congress and 20thh Malaysia Society of Pediatrics Annual Congress, Kuching. Malaysia, 2013.5.9.

Akihisa Okumura. EEG in preterm babies. Joint Scientific Meeting of 9th Asian Society of Pediatric Research Congress and 20thh Malaysia Society of Pediatrics Annual Congress, Kuching. Malaysia, 2013.5.9.

Akihisa Okumura. Neonatal Seizures. Diagonosis and treatment based on EEG. Joint Scientific Meeting of 9th Asian Society of Pediatric Research Congress and 20thh Malaysia Society of Pediatrics Annual Congress, Kuching. Malaysia, 2013.5.11.

Akihisa Okumura, Masaharu Hayashi, Keiko Shimojima, Mitsuru Ikeno, Shinpei Abe, Jun-ichi Takanashi, Nobuhiko Okamoto, Toshiaki Shimizu, Toshiyuki Yamamoto. Whole-exome sequencing identifies FLNB variant in a unique brain malformation. 第 55 回小児神経学会総会、大分、2013.5.30.

奥村彰久．新生児脳障害と中枢神経モニタリング．第 55 回小児神経学会総会、大分、2013.5.31.

奥村彰久．急性脳症をいかに理解するか：今後の研究アプローチ 2. 脳波・aEEG 第 55 回小児神経学会総会、大分、2013.6.1.

Akihisa Okumura, Mika Nakazawa, Shinpei Abe, Toshiaki Shimizu. Attitude toward

Epilepsy after Media Coverage of Car Accidents Related to Persons with Epilepsy in Japan. 30th International Epilepsy Congress, Montreal, Canada, 2013.6.24.

奥村彰久、池野充、久田研、東海林宏道、清水俊明．新生児発作に対するホスフェニトインの使用経験．第 49 回日本産期・新生児医学会学術集会、横浜、2013.7.15.

Akihisa Okumura, Mika Nakazawa, Shinpei Abe, Toshiaki Shimizu. Attitude toward Epilepsy after Media Coverage of Car Accidents Related to Persons with Epilepsy in Japan. 第 47 回日本てんかん学会学術集会、北九州、2013.10.11.

奥村彰久．新生児の脳機能研究 第 43 回日本臨床神経生理学会、高知、2013.11.8.

奥村彰久、池野充、北村知宏、森真理、久田研、東海林宏道、清水俊明．母体 IgM 抗体陰性であった先天性サイトメガロウイルス感染症．第 58 回日本未熟児新生児学会、金沢、2013.12.1

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

表 1 . 症例の背景

	二相性脳症 17 例	その他の脳症 21 例
月齢	中央値 19 (範囲 9-37)	中央値 38 (範囲 0.5-163)
男女比	12 : 5	11 : 10
けいれんの型		
群発	16	13
重積	9	8

表 2 . fPHT の前に使用された抗てんかん薬

	二相性脳症	その他の脳症
ジアゼパム	8 機会	9 機会
ミダゾラム	15 機会	7 機会
フェノバルビタール	3 機会	3 機会
チオペンタール	2 機会	2 機会
バルプロ酸	1 機会	0
カルバマゼピン	0	1 機会
ビタミン B6	3 機会	0

表 3 . fPHT の効果

	二相性脳症	その他の脳症
けいれん群発		
著効	13 機会	7 機会
有効	2 機会	5 機会
無効	2 機会	2 機会
けいれん重積		
著効	4 機会	5 機会
有効	2 機会	2 機会
無効	3 機会	1 機会

Diagnosis Procedure Combination からみた

日本の小児患者に対する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
研究協力者 伏見清秀 東京医科歯科大学大学院 医療政策情報学分野教授

研究要旨

Diagnosis Procedure Combination データベースを用い、2008年と2009年の合計12か月間（それぞれの年の7～12月）で、日本全国で体外循環補助療法の治療を受けた小児患者（15歳未満）を抽出した。これらの患者で、年齢、DPCの疾患名、転帰を調べた。その結果、当該期間中に92例の症例を抽出した。年齢別では0歳の症例が60症例と最も多かった。全体の半数以上で心臓外科の術後の循環補助として、この治療法が行われた。呼吸補助としては15例に用いられた。生存率は全体で35%、呼吸補助として用いられた群では53%だった。この治療法が行われた施設数は43であり、そのうちの26施設ではこの調査期間に1例のみの症例数であった。

A．研究目的

新型インフルエンザを含む新興感染症に罹患した場合、最重症の呼吸不全や急性の心不全に対しては、extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) と呼ばれる体外循環補助療法が用いられる。しかし、この治療法は、本邦のどの施設でも行えるわけではない。ことに小児患者においては、この治療法が行える施設は限定されていると予想される。こ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小児患者（15歳未満）

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、2008年7月から12月までと2009年7月から12か月までの合計12か月間とした。2008年と2009年の調査期間では、それぞれ858と818の急性期病院が、このDPC データベースに参加していた。抽出した患者で、年齢、DPCの主要診断群および6桁の疾患名、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。

また、体外循環を施行した施設での、この調査期間での施行症例数も調べた。

C．研究結果

当該期間に体外循環補助療法を受けた患者数は92例であった(2008年41例、2009年51例)。年齢別では、0歳60例、1歳9例、2歳1例、3歳4例、5歳4例、6歳1例、7歳1例、9歳1例、11歳3例、12歳4例、14歳4例であった。

DPCの6桁の疾患名別の患者の内訳は、表のとおりである。92例中、半数以上の49症例が心臓手術の術後に体外循環補助療法がおこなわれたと判断された。それ以外では、非術後の循環補助(急性心筋炎など)

21例、呼吸補助(先天性横隔膜ヘルニア、肺水腫、新生児の呼吸障害など)15例、その他7例だった。生存退院した患者数は、全体で32人(35%)だった。呼吸補助として用いた群での生存率は53%であった。

これらの体外循環補助用法は全国43の施設で行われていた。調査期間の施設ごとの症例数は1~10だった。26施設では、この調査期間に1症例のみの経験であった。

表 疾患別の小児の体外循環補助療法症例数

DPC6桁疾患名	症例数	生存退院者数
心臓術後の補助と判断される群	49	16 (33%)
新生児乳児の先天性心疾患	32	9
その他の複雑心奇形	8	4
ファロー四徴症	4	2
房室中隔欠損症	3	0
その他の循環器系の先天性奇形	2	1
循環不全(術後以外)の補助と判断される群	21	8 (43%)
心筋炎	9	3
弁膜症	4	2
心不全	3	1
徐脈性不整脈	2	1
頻拍性不整脈	2	1
拡張型心筋症	1	0
呼吸不全の補助と判断される群	15	8 (53%)
横隔膜腫瘍・横隔膜疾患(新生児を含む)	5	2
妊娠期間短縮・低出産体重に関連する障害	3	3
肺循環疾患(肺水腫など)	3	1
外傷 肺・胸部気管・気管支損傷	1	1
呼吸器疾患その他(肺炎・急性気管支炎・急性細気管支炎、その他の呼吸器の障害、肺の先天異常)	3	0
その他 (凝固異常その他、非ホジキンリンパ腫、血液疾患その他、腸管の先天異常、外傷・詳細不明の損傷等、敗血症)	7	0
合計	92	32 (35%)

D . 考察

DPC データベースからの症例の抽出では、日本全国のすべての小児の体外循環補助症例を抽出できるわけではないが、2008年と2009年のうちの12か月の調査期間では92症例の小児患者が体外循環補助療法を受けていることが分かった。また、半数以上の症例が心臓外科手術の後の補助療法として、この治療法が行われたと判断された。インフルエンザ感染症で重篤化する場合は、心筋炎などによる心原性ショックや呼吸不全でECMO治療が必要となる。今回の調査では、急性呼吸不全でECMO治療を受けた患者が少ないことが分かった（DPCの疾患名では、肺循環疾患、肺炎・急性気管支炎・急性細気管支炎、その他の呼吸器の障害がそれに相当すると考えられる）。また、心筋炎は9症例で、術後以外の循環不全としてはECMOの最も多い適用がある疾患であった。

調査期間中に小児患者にこの治療を行った施設は43施設に上った。施設ごとの症例数は、当該期間で1~10症例とばらつきがあった。26施設では、この検討の対象となった12か月間に1症例のみの経験であった。

小児のECMO治療は、施設ごとの症例数が増加すると、その施設の成績が向上することが、海外のいくつかの報告により示されている。年間20症例以上のECMO症例がある施設では、それよりも症例数が少ない施設よりも、生命予後が改善される可能性が示唆されている。我が国においても、症例の集約化、拠点化を推進することにより、インフルエンザなどによる小児の重篤な呼吸不全や循環不全の患者の予後が改善される可能性がある。本邦では、この件に関しては、今後の検討が必要である。

E . 結論

DPC データベース用い、我が国の小児の

体外循環補助療法の実態を調査した。小児患者では、ECMOが循環補助として用いられていることが多く、しかも心臓外科の術後管理として用いられることが多いことが分かった。当該期間に小児患者にECMOをおこなった施設数は43施設で、そのうち26施設は1症例のみの経験であった。

F . 研究発表

1 . 論文発表

(発表誌名巻号、頁、発行年等も記入)

- 1 . 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 . Nakagawa S, Shime N. Respiratory rate criteria for pediatric systemic inflammatory response syndrome. Pediat Crit Care Med 2014; 15:182.
- 3 . 中川 聡. HFO、ARDSにおける可能性 . Clinical Engineering 2013; 24: 47-51.
- 4 . 中川 聡. 小児におけるECMO . 小児内科 2013; 45: 121-123.
- 5 . 中川 聡. 新生児・小児領域のECMO、歴史的背景と今後の課題 . INTENSIVIST 2013; 5:315-20.
- 6 . 柏井洋文、久保田雅也、師田信人、中川 聡. 脳炎・脳症・髄膜炎の診断と治療、頭蓋内圧モニタリングと頭蓋内圧降下療法 . 小児内科 2013; 45:224-28.

2 . 学会発表

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

2. Nakagawa S. Acute respiratory distress syndrome. 9th Congress of Asian Society of Pediatric Research, Kuching, Malaysia, May 2013.
3. Nakagawa S. High-frequency oscillation. 2nd Congress of Central American and Caribbean Intensive Therapy Consortium (COCECATTI II). San Jose, Costa Rica, June 2013.
4. Nakagawa S. Myocarditis and ECMO. 1st Congress of the Asia-Pacific Chapter of Extracorporeal Life Support Organization (APELSO), Beijing, China, October 2013.
5. Nakagawa S. Pediatric / Cardiac Case Discussion in the Pre-Congress Education / Simulation Session. 1st Congress of the Asia-Pacific Chapter of Extracorporeal Life Support Organization (APELSO), Beijing, China, October 2013.
6. Nakagawa S. H1N1 influenza experiences in Japan. 1st Mongolian Pediatric Critical Care Workshop. UlaanBaatar, Mongolia, October 2013.
7. 中川 聡 . 日本の呼吸不全に対する ECMO、小児医療の現状と課題 . 第 40 回日本集中治療医学会学術集会 . 長野県松本市、2013 年 2 月 .
8. 中川 聡 . Diagnosis Procedure Combination (DPC) からみた我が国の体外循環補助の実態 . 第 40 回日本集中治療医学会学術集会 . 長野県松本市、2013 年 2 月 .
9. 中川 聡 . 小児の呼吸不全に対する ECMO 治療の現状 . 日本医工学治療学会第 29 回学術大会 . 横浜市、2013 年 4 月 .
10. 中川 聡 . 小児の人工呼吸管理 . 第 35 回日本呼吸療法医学会 . 東京都新宿区、2013 年 7 月 .
11. 中川 聡 . 敗血症と肺障害 . 第 21 回小児集中治療ワークショップ . 東京都渋谷区、2013 年 11 月 .
12. 中川 聡 . 小児インフルエンザ重症呼吸不全に対する診療戦略 . 第 21 回小児集中治療ワークショップ . 東京都渋谷区、2013 年 11 月 .

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: 山田睦子, 斎藤有希恵, 藤井洋輔
八代将登, 野坂宜之, 吉本順子, 鷲尾洋介, 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

今回、新規開発された尿中 L-type fatty acid binding protein (L-FABP) 迅速計測スライド (シミック社、50 μ L を 15 分で解析できる) の基礎的および臨床的有用性を検討した。

対象は 22 例、生後 5 日 ~ 21 歳; 容態の不安定な患者は 5 例、比較的安定な患者は 11 例、病的意義の乏しい患者 (対照) は 5 例であった。スポット尿中の L-FABP を迅速スライド (陽性を 1+ ~ 3+ に分けた)、ELISA (シミック社) にて計測して両者の相関を調べた。尿中 8-OHdG の迅速計測 (ICR-001、テクノメデイカ社)、NAG、B2M、血清 Cr の計測も同時に行った。L-FABP (迅速) は (-) ~ (3+) (1+ が 6 例、2+ が 3 例、3+ が 1 例)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ~ 1,271 ng/mL (< 0.9 ~ 1,686 ng/mg Cr) であった。L-FABP (迅速) は L-FABP (ELISA) と有意に正相関した ($r = 0.74$, $p < 0.001$)。L-FABP (迅速) は ELISA での計測値 20 ng/mL (あるいは 100 ng/mg Cr) で (1+)、100 ng/mL で (2+) を示した。L-FABP (ELISA) は 8-OHdG、NAG、B2M、血清 Cr と有意相関を示さなかった。

追加の研究として、24 例 (生後 10 月 ~ 18 歳、男/女は 13/11) の容態安定 (外来フォロー中) の CKD 患者を対象に尿 L-FABP (ELISA) を計測したが、ネフローゼを再発した 2 例 (141、246 ng/mL)、重症心疾患の 1 例 (45 ng/mL) 以外は < 20 ng/mL であった。もし L-FABP (迅速) を施行した場合、この 3 例以外は (-) になると推定された。加えて、インフルエンザ脳症を呈した 1 例 (2 歳女性) では入院時 L-FABP (迅速) は (-)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ng/mL (< 11.8 ng/mg Cr) であったが、その後は初期予測どおりに急性腎障害を呈さなかった。

結論: L-FABP (迅速) は 20 ng/mL (あるいは 100 ng/mg Cr) 前後で陽性を呈した (この値は急性腎障害発症予測のカットオフ値である)。その半定量値と ELISA 値は有意に正相関した。L-FABP 迅速計測スライド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。

A. 研究目的

生体マーカー計測の長所は非 ~ 低侵襲性、生体応答的な病態解析、患者容態の迅速評価、緊急対応などである。L-type fatty acid binding protein (L-FABP) は 2011 年に保険収載された腎臓特異的酸化ストレスマーカーであり、急性腎障害 (AKI) 発症予測、慢性腎障害 (CKD) 予後予測のマーカーとして知られている。

今回、我々は新規開発された尿中 L-FABP 迅速計測スライド (シミック社、50 μ L を 15 分で解析できる小型スライド; Immunochromatography を原理にしている) の基礎的および臨床的有用性を検討した。

B. 研究方法

< 研究 1 >

対象は 22 例、生後 5 日 ~ 21 歳、男/女は 15/7 であった。容態の不安定な (入院での集中治療が必要な) 患者は 5 例 (重症心疾患、末期悪性疾患、移植後合併症、血球貪食症候群、重症新生児)、容態の比較的安定な患者は 11 例 (悪性疾患、膠原病、慢性腎障害、ネフローゼ症候群、Lowe 症候群、Dent 病など)、病的意義の乏しい患者 (対照) は 5 例であった。

スポット尿中の L-FABP を迅速計測スライド (陽性を 1+ ~ 3+ に分けた)、ELISA (シミック社) にて計測して両者の相関を調べた。全身性酸化

ストレスマーカーとして知られる尿中 8-OHdG の迅速計測(ICR-001、テクノメディカ社)、NAG、B2M、血清 Cr の計測も同時に行った。基準値は L-FABP で < 10 ng/mL (< 10 ng/mg Cr)、8-OHdG で < 25 ng/mg Cr とした。

< 研究 2 >

対象は 24 例、生後 10 月 ~ 18 歳、男/女は 13/11 の容態安定(外来フォロー中)の CKD 児であった。CKD は Stage 1 ~ Stage 2 (eGFR が 60 mL/min/1.73 m² 以上)であった。

スポット尿中の L-FABP を ELISA (シミック社) にて計測した(迅速計測スライドでの計測は行われなかった)。< 研究 1 > の結果より L-FABP (ELISA) での 20 ng/mL (あるいは 100 ng/mg Cr) が L-FABP (迅速) (1+) に相当することが示されたが(後述)、< 研究 2 > では基礎に CKD のあることが L-FABP (迅速) の結果に影響するのかが検討した。

< 研究 3 (前方視的検討) >

対象は 2 歳の女性である。インフルエンザ A の患者で発熱、意識障害、不随運動を呈した。脳 MRI (拡散強調画像) では両側小脳半球に高信号域 (ADC 低値) が見られた。オセルタミビル、マンニトール、メチルプレドニゾロン、グロブリン、エダラボンなどの薬物療法が施行された。

ここでは入院当日の L-FABP (迅速) および L-FABP (ELISA) とその後の血清 Cr 変化との関連を検討した。

C. 研究結果

< 研究 1 >

L-FABP (迅速) は (-) ~ (3+) (1+ が 6 例、2+ が 3 例、3+ が 1 例; 陽性を示したのは不安定な患者で 5 例 (5/5 = 100%)、比較的安定な患者で 5 例 (5/11 = 45%)、対照で 0 例 (0/11 = 0%)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ~ 1,271 ng/ml (< 0.9 ~ 1,686 ng/mg Cr)、8-OHdG は 5.7 ~ 643 ng/mg Cr、NAG は 1.4 ~ 30.2 U/L、B2M は 84 ~ 107,000 μg/L、血清 Cr は 0.16 ~ 2.30 mg/dL であった。

基準値を超えた患者は L-FABP (迅速) で 10 例 (10/22 = 45%)、L-FABP (ELISA) は 11 例 (11/22 = 50%)、8-OHdG は 10 例 (10/22 = 45%)、NAG は 8 例 (8/22 = 36%)、B2M は 10 例 (10/20 = 50%)、血清 Cr は 3 (3/22 = 14%) であった。Lowe 症候群の 2 例、Dent 病の 1 例は(容態安定群ながら)尿 L-FABP、B2M は著明な高値を示した。

L-FABP (迅速) は L-FABP (ELISA) と有意に正相関した ($r = 0.74$, $p < 0.001$) (図 1)。L-FABP (迅速) は大体 ELISA での計測値 20 ng/mL (あるいは 100 ng/mg Cr) で (1+)、100 ng/mL で (2

+) を示した。なお、L-FABP (ELISA) は尿中 8-OHdG、NAG、B2M、血清 Cr と有意相関を示さなかった。

< 研究 2 >

L-FABP (ELISA) は、再発のネフローゼ患者 2 名 (ともに Stage 1) で 141、246 ng/mL と高値を呈した(寛解時はともに < 10 ng/mL であった)。重症心疾患 (Stage 2) で 45 ng/mL、シスチン尿症 (Stage 1) で 17 ng/mL であった。それら以外の 20 例は < 10 ng/mL であった (図 2)。

< 研究 3 (前方視的検討) >

患者の入院当日の L-FABP (迅速) は (-)、L-FABP (ELISA) は < 3.0 ng/mL (< 11.8 ng/mg Cr) であった。尿 Cr は 25.5 mg/dL、NAG 1.2 U/L、B2M 112 μg/L であった。

Matsui らの報告 (Circ J 2012) によれば、L-FABP が 100 ng/mg Cr 以上ならばその後の AKI 発症のハイリスク群になる。この値は L-FABP (迅速) の (1+) 以上に相当する。患者の血清 Cr は入院当日が 0.23 mg/dL、翌日が 0.22 mg/dL、その後も Cr は上昇せず、初期予測どおり AKI を発症しなかった。

D. 考察

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 (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が、Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)、Cystatin C、Interleukin 18、Kidney injury molecule-1 (KIM-1)、および、L-FABP である。

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。加えて、L-FABP 誘導はペロキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) 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 (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) の一翼を担うと推察される。

我々は、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および臨床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検討している。

今回の研究では、容態の不安定な (入院での集中治療が必要な) 患者 (5 例) は全員 L-FABP

検査(迅速)が(1+)以上を示した。(1+)は大
体 ELISA での計測値 20 ng/mL あるいは 100
ng/mg Cr に相当し、これ以上が AKI 発症のハイ
リスク群に当たる。

一方、CKD では尿中 8-OHdG は顕著に増加
することが少なかった。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、
健常細胞が少なくなった腎臓では 8-OHdG 産生
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 L-FABP にて
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(迅速)は 20 ng/mL (あるいは 100
ng/mg Cr)前後で陽性を呈した(この値は急性
腎障害発症予測のカットオフ値である)。その半
定量値と ELISA 値は有意に正相関した。よって、
L-FABP 迅速計測スライドは緊急を要する医療
現場で(不慣れた環境でも)応用可能と期待された
(本研究は菅谷 健教授(聖マリアンナ医科大学
・腎臓高血圧内科)の協力のもとになされた)。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.

(2) 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.

(3) 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.

(4) 藤井洋輔, **塚原宏一**, 森島恒雄. 脳炎・脳症・髄
膜炎の病態 - 脳炎・脳症とバイオマーカー. **小児内
科** 45 (2): 187-190, 2013.

(5) Nagasaka H, Yorifuji T, Egawa H, Inui A, Fujisawa
T, Komatsu H, **Tsukahara H**, Uemoto S, Inomata Y.
Characteristics of NO cycle coupling with urea cycle
in non-hyperammonemic carriers of ornithine

transcarbonylase deficiency. **Mol Genet Metab** 109
(3): 251-254, 2013.

(6) **塚原宏一**, 中務陽子, 山田睦子, 重安良恵, 吉本
順子, 喜多村哲朗, 長坂博範, 森島恒雄. Early third
trimester の妊婦における血清中 NOx, ADMA (内因性
NO 合成酵素阻害因子)および酸化ストレスマーカー.
日本小児高血圧研究会誌 10 (1): 8-15, 2013.

(7) **Tsukahara H**, Fujii Y, Matsubara K, Yamada M,
Nagaoka Y, Saito Y, Yashiro M, Tsuge M, Goto S,
Kitamura T, Hata A, Ichiyama T, Morishima T.
Prognostic value of brain injury biomarkers in acute
encephalitis/encephalopathy. **Pediatr Int** 55 (4):
461-464, 2013.

(8) Yamashita N, **Tsukahara H**, Tsuge M, Nagaoka Y,
Yashiro M, Saito Y, Fujii Y, Oka T, Morishima T.
Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09
infection elucidated on gene expression profiling.
Pediatr Int 55 (5): 572-577, 2013.

(9) **塚原宏一**. 気道炎症と酸化ストレス. **Respiratory
Trends** 3 (2): 14-19, 2013.

(10) Tsuge M, Oka T, Yamashita N, Saito Y, Fujii Y,
Nagaoka Y, Yashiro M, **Tsukahara H**, Morishima T.
Gene expression analysis in children with complex
seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus
gastroenteritis. **J NeuroVirol** 20 (1): 73-84, 2014.

2. 学会発表

(1) **塚原宏一**.

The Kidney in Multi-Organ Systemic Disease in
Japanese Children - 新生児 AKI の特徴・評価・管理.
第 56 回日本腎臓学会学術集会, 東京, 2013 年(5月).

(2) **塚原宏一**.

小児 CKD とバイオマーカー: 最近の進歩 - CKD とバ
イオマーカー. 第 48 回日本小児腎臓病学会学術集会,
徳島, 2013 年(6月).

(3) **塚原宏一**.

酸化ストレスと新生児疾患. 第 58 回日本未熟児新生
児学会・学術集会, 金沢, 2013 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。特に従来的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の評議員に対し、重症呼吸不全に対する ECMO 治療に関するアンケート調査を行い、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

(1) 重症の急性呼吸不全に対する ECMO 療法に関するアンケート調査

【1 回目アンケート】

日本呼吸療法医学会 (96 人)

日本集中治療医学会 (227 人)

評議員に対するアンケート調査

回答施設 184 施設

【Q01】重症呼吸不全に対し ECMO 治療が行えますか

はい 87%

いいえ 13%

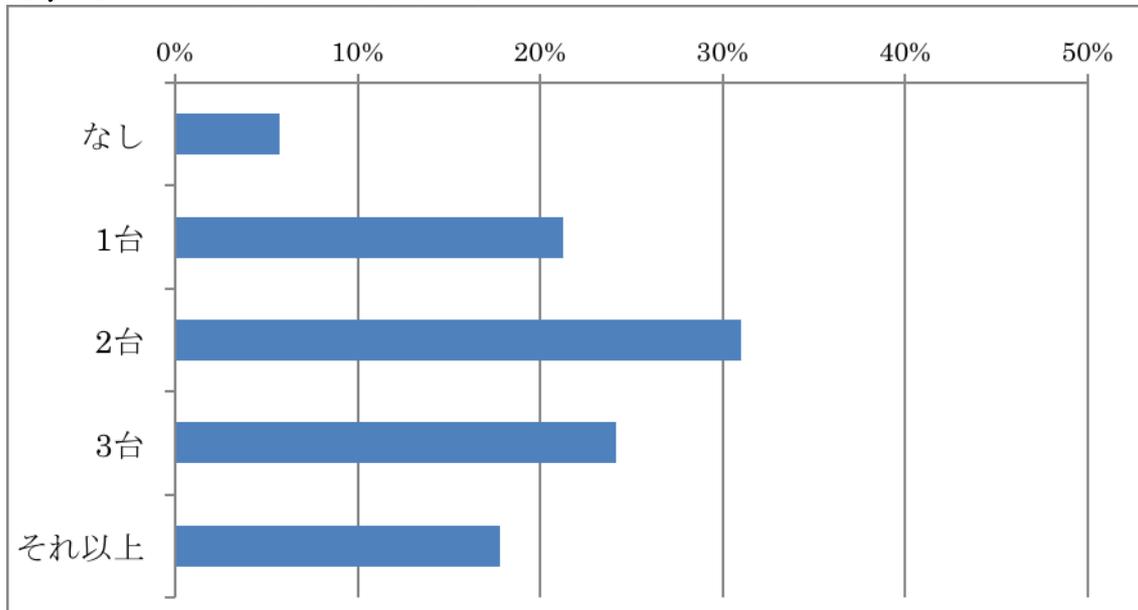
(コメント)

V-A の経験はあるが ECMO の V-V の経験は少ない

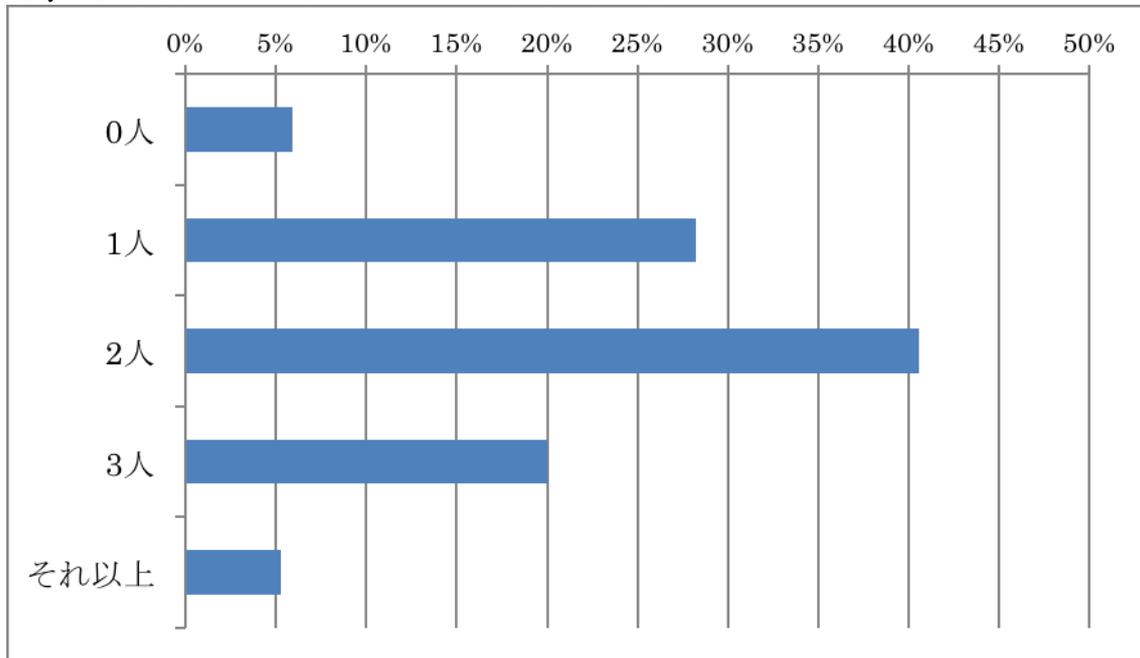
循環器専門施設、PCPS での循環不全に対する治療は頻繁に行っているが、呼吸不全の患者さんは当院の疾患対象外。が、同等の能力は保持している

循環器を中心に PCPS を行っています。呼吸不全に対する ECMO 経験はありませんが、施行は可能と思います

【Q02】ECMO 機材は何台ありますか



【Q03】同時に何人に対し ECMO 治療が行えますか



(コメント)

2台で2名可能です

【Q04】小児症例への対応は可能ですか

はい 49%

いいえ 51%

(コメント)

ただし 10歳以下の小児に対しては、他院から器材・回路を借りる

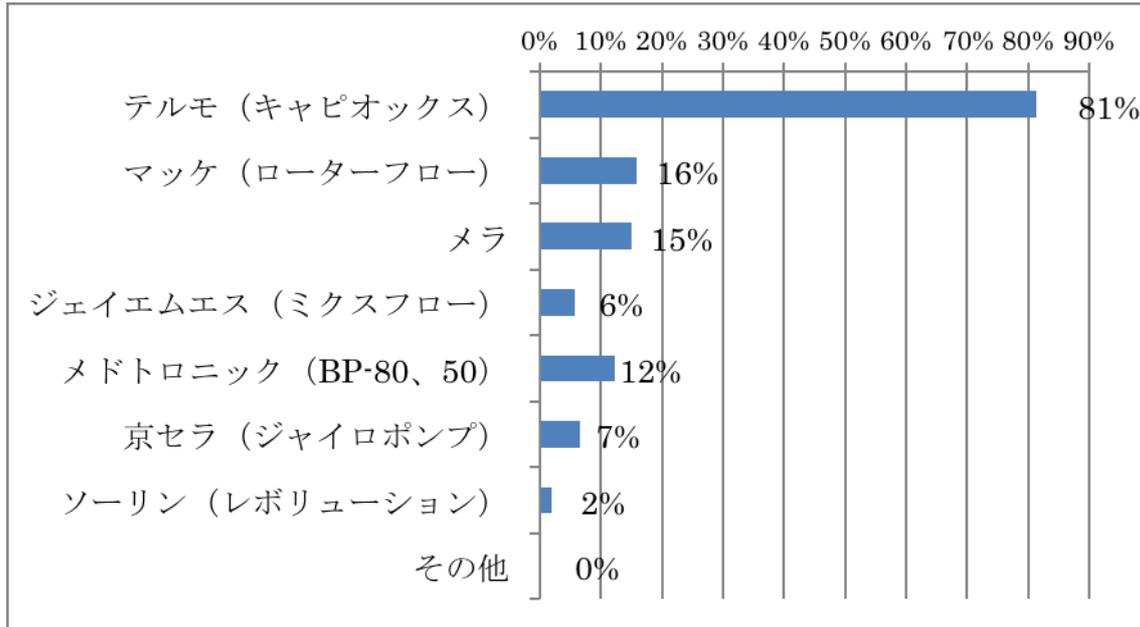
【2回目アンケート】

1回目に回答があった184施設が対象

詳細な内容調査

回答施設 107 施設

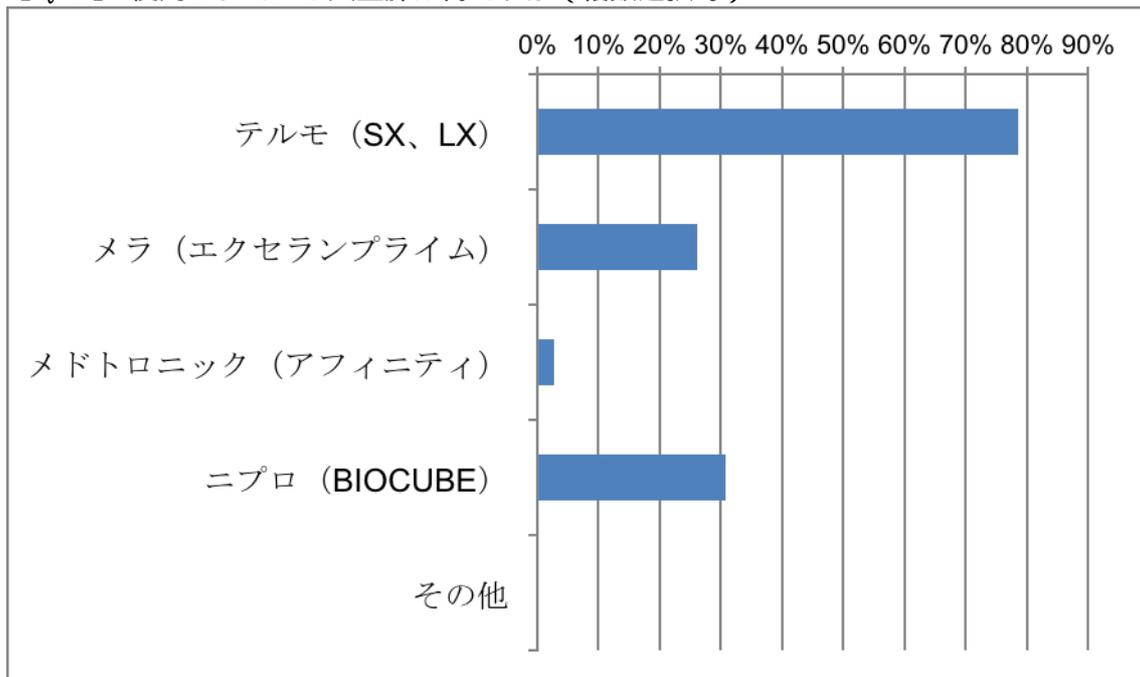
【Q01】 使用されている ECMO 機材は何ですか（複数選択可）



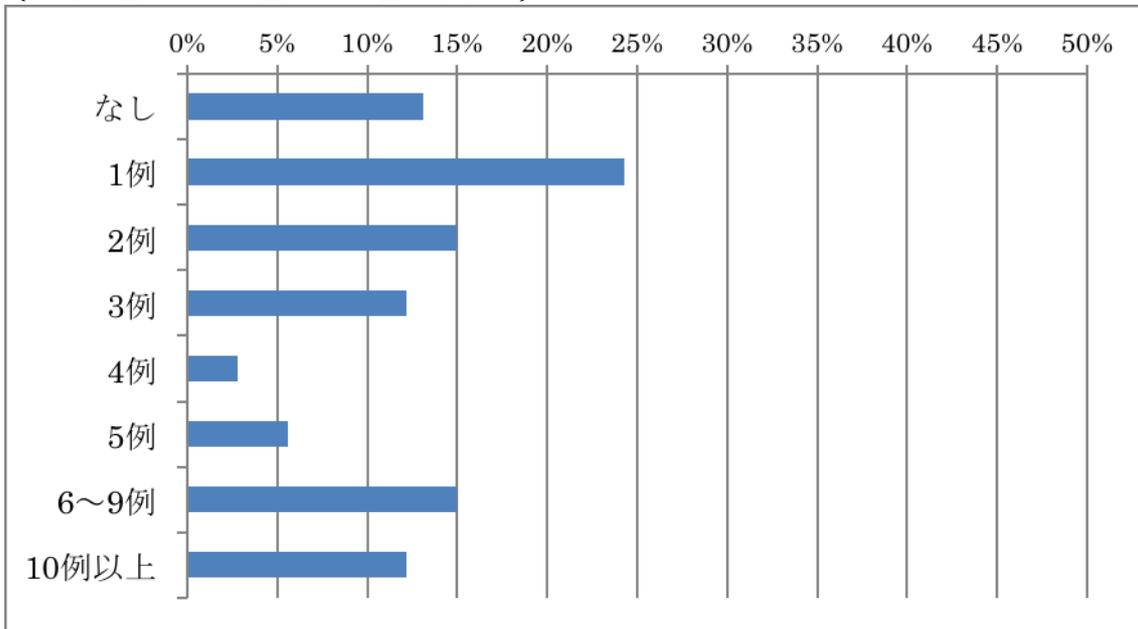
(コメント)

呼吸不全に適した器材の納入待ち

【Q02】 使用されている人工肺は何ですか（複数選択可）*



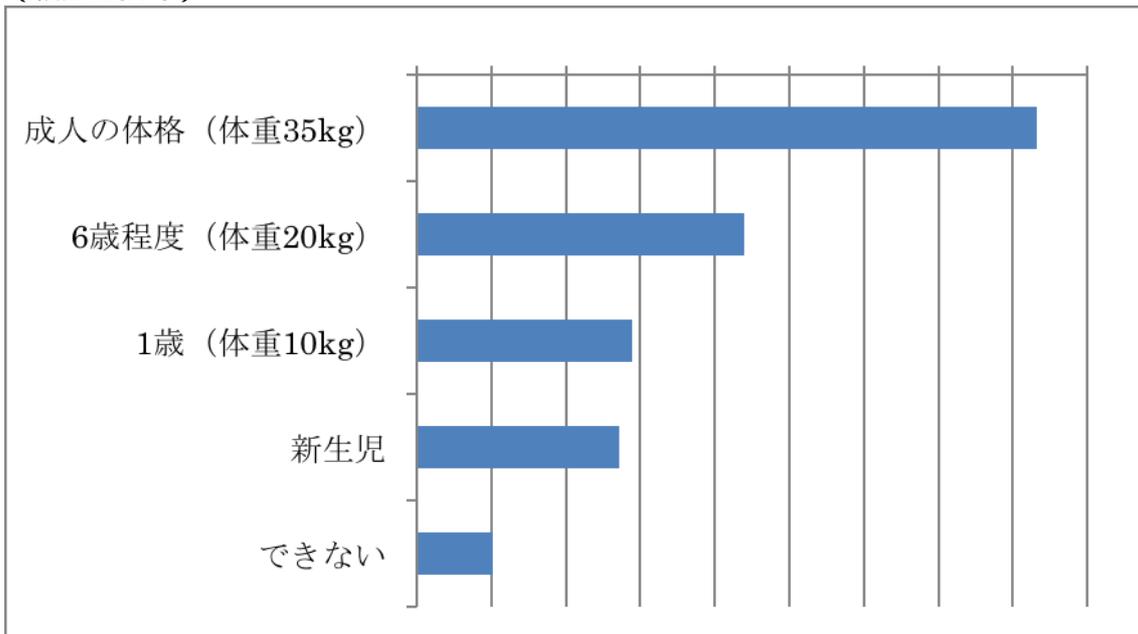
【Q03】 呼吸不全に対する ECMO の年間症例数をお答え下さい
 (循環不全・呼吸不全の合併症例も含め)



(コメント)

1例としたが数年に1例 / 10例以上ただし PCPS

【Q04】 小児への対応は可能ですか
 (複数選択可)



(コメント)

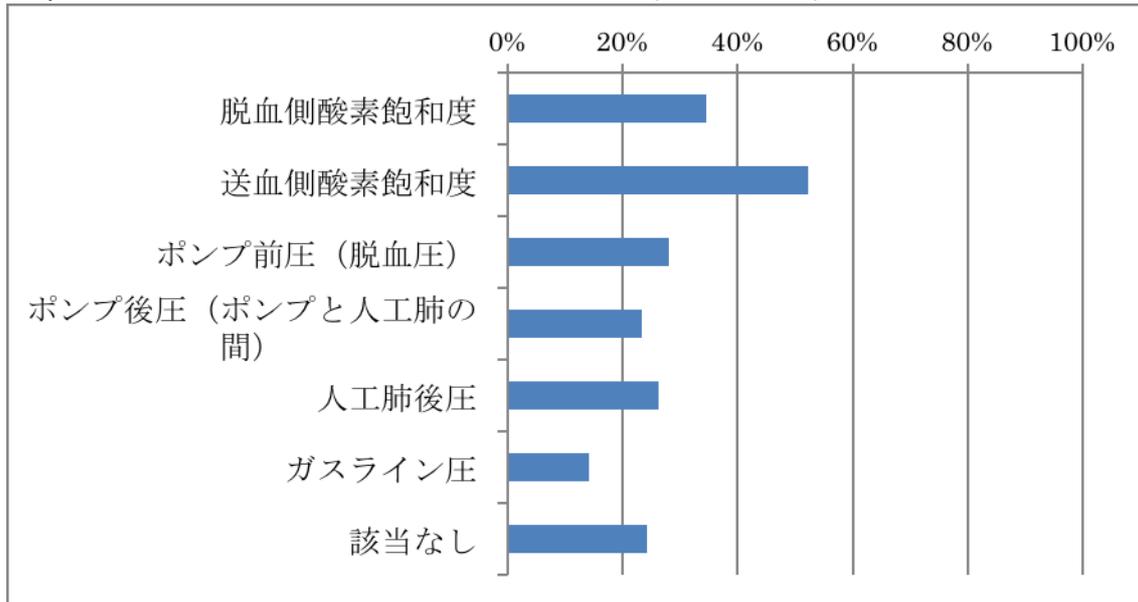
小児心臓外科があり新生児にも対応可能、ただし小児も成人も V-V ECMO の経験ない

【Q05】 ECMO 専用の記録用紙はありますか

はい 51%

いいえ 49%

【Q06】 モニタリングされている項目は何ですか（複数選択可）



(コメント)

モニタリングは可能と思われる、でもほとんどやっていない

【Q07】 今後の新型インフルエンザ症例の ECMO 依頼を受け入れられますか

可能 69%

不可能 2%

今は分からない 29%

(2) 海外の優秀な施設および行政機関への訪問

○イギリス・NHS (national health service) ・Department of Health

イギリスにおいて ECMO 治療を行う、ECMO センターを構築した。その方法と内容を享受した。日本とは医療体制ならびに医療保険制度が異なるため、すべてを同等に行う事は不可能であるが、患者予後の改善のための進め方は参考になる。

○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。

○イギリス・ガイズ&セントトーマス病院 ECMO センター

ロンドンを対象とした ECMO センターで、最も多くの患者を治療している。2010 年に新たに ECMO センターに指定され、急速な発展と治療成績の向上が行われた。

○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)。

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。最大の問題点は ECMO センターが本邦には存在しないため、海外施設と比較し各病院での患者症例数が少ないために、医療関係者の経験値が低いことにある。このため、治療におけるレベルが低くなっていることが疑われる。一方で現場の医師は、アンケート調査から判明したように、経験が無くても治療が行えると考えており、世界標準の治療レベルを理解していないことが判明した。

今後、治療成績の向上を行うためには、このような状況を改善させる必要がある。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。学会を通じた ECMO 治療の啓蒙、臨床現場でのシミュレーションラボなどを行い、全ての病院の底上げを行う必要があると思われる。

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) 杉田慎二、小林克也、竹田晋浩。重症肺炎に対する体外式膜型人工肺 (ECMO) 療法。Medicina 2013; 50 (12);2028-31.医学書院

学会発表

竹田晋浩。ECMO の up to date。教育講演。第 40 回日本集中治療医学会学術集会。松本 2013 年 2 月 28 日～3 月 2 日

竹田晋浩。ARDS の病態解明と治療戦略。シンポジウム。第 60 回日本麻酔科学会第 60 回学術集会。札幌 2013 年 5 月 23 日～25 日

Shinhiro Takeda. ECMO for respiratory failure in Japan. Work shop. 5th congress of the international federation for artificial organs. 横浜 2013 年 9 月 27 日～9 月 29 日

竹田晋浩。ECMO。教育講演。日本体外循環技術医学会第 39 回大会。熊本 2013 年 11 月 2 日～11 月 3 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。

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 岩城 紀男	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	
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2013-2014年シーズン版	柏木 征三 郎 岩城 紀男	インフルエンザ診療マニュアル(2013-2014年版)	一般社団法人日本臨床内科医会	東京	2013	
竹田晋浩	呼吸ECMOマニュアル	竹田晋浩、 市場晋吾	呼吸ECMOマニュアル	克誠堂出版	東京都	2014	1~140
杉田慎二、 小林克也、 竹田晋浩	ECMO	氏家良人	呼吸療法・呼吸管理における5 years 文献レビュー	克誠堂出版	東京都	2014	151- 168

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
Okumura A, Hayashi M, Tsurui H, Yamakawa Y, Abe S, Kudo T, Suzuki R, Shimizu T, Shimojima K, Yamamoto T.	Lissencephaly with marked ventricular dilation, agenesis of corpus callosum, and cerebellar hypoplasia caused by TUBA1A mutation.	Brain Dev	35(3)	274-279	2013
Okumura A, Nakazawa M, Abe S, Shimizu T.	Attitude toward epilepsy after media coverage of car accidents related to persons with epilepsy in Japan.	Epilepsy Behavior	27(1)	264-266	2013

Okumura A, Shimojima K, Kubota T, Abe S, Yamashita S, Imai K, Okanishi T, Enoki H, Fukasawa T, Tanabe T, Dibbens LM, Shimizu T, Yamamoto T.	PRRT2 mutation in Japanese children with benign infantile epilepsy.	Brain Dev	35(7)	641-646	2013
Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takahashi JI, Okamoto N, Hisata K, Shoji H, Saito A, Furukawa T, Kishida T, Shimizu T, Yamamoto T.	Whole-exome sequencing of a unique brain malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria and midbrain tectal hyperplasia.	Neuropathology	33(5)	553-560.	2013
Saito M, Okumura A, Kidokoro H, Kubota T, Abe S, Ikeno M, Hayakawa F, Shimizu T, Watanaabe K.	Amplitude spectral analyses of disorganized patterns on electroencephalograms in preterm infants.	Brain Dev	35(1)	38-44.	2013
Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Hayashi S, Natsume J.	Amplitude-integrated electroencephalogram 1h after birth in a preterm infant with cystic periventricular leukomalacia. 2013; 35(1):.	Brain Dev	35(1)	75-78	2013
Igarashi A, Okumura A, Kitamura Y, Jinbo K, Akatsuka S, Tanuma N, Shimizu T, Hayashi M.	Acute limbic encephalitis with focal hyperperfusion on single photon emission computed tomography.	Brain Dev	35 (2)	181-184	2013
Suganuma H, Okumura A, Kitamura Y, Shoji H, Shimizu T.	Effect of Hypoxic-Ischemic Insults on the Composition of Fatty Acids in the Brain of Neonatal Rats.	Ann Nutr Metab	62(2)	123-128	2013

Ishii A, Shioda M, Okumura A, Kidokoro H, Sakouchi M, Shimada S, Shimizu T, Osawa M, Hirose S, Yamamoto T.	A recurrent KCNT1 mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy.	Gene	531 (2)	467-471	2013
Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraiishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K.	Mutations in the C-Terminal Domain of ColQ in Endplate Acetylcholinesterase Deficiency Compromise ColQ-MuSK Interaction.	Hum Mutat	34(7)	997-1004	2013
Yoneda Y, Hagi noya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori A, Yamasaki M, Kumakura A, Sugo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H.	Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: from microcephaly to schizencephaly.	Ann Neurol	73(1)	48-57	2013
Kubota T, Fukasawa T, Kitamura E, Magota M, Kato Y, Natsume J, Okumura A.	Epileptic seizures induced by dexmedetomidine in a neonate.	Brain Dev	35 (4)	360-362	2013
Kidokoro H, Kubota T, Hayakawa M, Kato Y, Okumura A.	Neonatal seizure identification on reduced channel EEG.	Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed	98(4)	F359-361	2013
Nakazawa M, Okumura A, Nijima S, Yamashita S, Shimono K, Hirose S, Shimizu T.	Oral mexiletine for lidocaine-responsive neonatal epilepsy.	Brain Dev	35 (7)	667-669	2013

Nakano T, Okumura A, Tanabe T, Niwa S, Fukushima M, Yonemochi R, Eda H, Tsutsumi H.	Safety evaluation of laninamivir octanoate hydrate through analysis of adverse events reported during early post-marketing phase vigilance.	Scand J Infect Dis	45 (6)	469-477	2013
Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A.	Human Herpesvirus 6-Associated Encephalopathy in a Child with Dravet Syndrome.	Neuropediatrics	44	155-158	2013
Kimura H, Kawada J, Ito Y	Epstein Barr-viruses-associated lymphoid malignancies: the expanding spectrum of hematopoietic neoplasms.	Nagoya J Med Sci	75	169-179	2013
Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kojima S, Kimura H, Ito Y.	Plasma Viral MicroRNA Profiles Reveal Potential Biomarkers for Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection	J Infect Dis	208(5)	771-779	2013
Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H	Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan	Pediatr Int	55(5)	566-571	2013
Suzuki M, Torii Y, Kawada J, Kimura H, Kamei H, Onishi Y, Kaneko K, Ando H, Kiuchi T, Ito Y	Immunogenicity of inactivated seasonal influenza vaccine in adult and pediatric liver transplant recipients over two seasons	Microbiol Immunol	57(10)	715-722	2013
Imahashi N, Nishida T, Ito Y, Kawada J, Nakazawa Y, Toji S, Suzuki S, Terakura S, Kato T, Murata M, Naoe T.	Identification of a novel HLA-A*24:02-restricted adenovirus serotype 11-specific CD8+ T-cell epitope for adoptive immunotherapy	Mol Immunol	56(4)	399-405	2013
Kato S, Miyata T, Takata K, Shimada S, Ito Y, Tomita A, Elsayed A, Takahashi E, Asano N, Kinoshita T, Kimura H, Nakamura S.	Epstein-Barr virus-positive cytotoxic T-cell lymphoma followed by chronic active Epstein-Barr virus infection-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder: a case report	Human Pathology	44(12)	2849-2852	2013

Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H, Kojima S.	Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia	J Ped Hematol Onc	36(1)	e65-68	2014
Hara S, Kawada J, Kawano Y, Yamashita T, Minagawa H, Okumura N, Ito Y.	Hyperferritinemia in Neonatal and Infantile Human Parechovirus-3 Infection in Comparison with Other Infectious Diseases	Journal of Infection and Chemotherapy	20(1)	15-19	2014
Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y.	Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans.	Nature	26	551-555	2013
Yamamoto T, Mizoguchi Y, Kaneko H, Yamamoto K, Inoue Y, Kawashima H, Kaise T, Shimotsuji T.	Serum immunoglobulin G subclass levels and estimated clinical severity caused by possible influenza A (H1N1) pdm2009 infection.	J Infect Chemother.	19(5)	833-42.	2013

Sakai E, Yamanaka G, Kawashima H, Morishima Y, Ishida Y, Oana S, Miyajima T, Shinohara M, Saitoh M, Mizuguchi M.	A case of recurrent acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus with carnitine palmitoyltransferase II variation.	Neuropediatrics.	44(4)	218-21	2013
Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Iimamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T.	Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan.	Influenza Other Respir Viruses.	7(5)	759-60.	2013;
Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Morichi S, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Iimamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T.	Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan	J Clin Virol.	56(1)	25-30	2013;
Morichi S, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Kawashima H.	Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebrospinal fluid and plasma of children with meningitis and encephalitis/encephalopathy.	Int J Neurosci.	123(1):	17-23	2013;.
河島尚志、森地振一郎。山中岳、柏木保代	ウイルス感染とサイトカインストーム 急性脳症を中心に	臨床とウイルス	41 (4)	229-238	2013
Shoji K, Komuro H, Miyata I, MiyairA	Dermatologic manifestations of human parechovirus type 3 infection in neonates and infants.	The Pediatric Infectious Disease Journal	32	233-236	2013
Kyan Y, Ueda Y, Yoshida M, Sasahara K, Shinya K.	Transcriptome profiling of brain edemas caused by influenza infection and lipopolysaccharide treatment.	J. Med. Virol.			2013
Kawai N, Ikematsu H, Kawashima T, Maeda T, Ukai H, Hirotsu N, Iwaki N, Kashiwagi S.	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 Respiri Viruses.	7 (3)	448-455	2012

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	18	529-33	2012
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 Respir Viruses	6	211-7	2012
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	18	180-6	2012
Nakagawa S, Shimizu N.	Respiratory rate criteria for pediatric systemic inflammatory response syndrome.	Pediatr Crit Care Med	15	182	2014
中川 聡 .	HFO、ARDSにおける可能性 .	Clinical Engineering	24	47-51	2013
中川 聡 .	小児におけるECMO .	小児内科	45	121-123	2013
中川 聡 .	新生児・小児領域のECMO、歴史的背景と今後の課題 .	INTENSIVIST	5	315-20	2013
柏井洋文、久保田雅也、師田信人、中川 聡 .	脳炎・脳症・髄膜炎の診断と治療、頭蓋内圧モニタリングと頭蓋内圧降下療法 .	小児内科	45	224-28	2013
Momonaka H, et al	<u>High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy.</u>	Brain Dev	in press		2013
Okada S, et al	<u>Analysis of broncho-alveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection.</u>	Cytokine	63	194-200	2013
Hasegawa S, et al	<u>Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy.</u>	Brain Dev	35	626-9	2013

長谷川俊史ら	【感染と喘息】感染と小児喘息の臨床	アレルギーの臨床	33巻	1012-6	2013
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
Nakatsukasa 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
藤井洋輔, 塚原宏一, 森島恒雄	脳炎・脳症・髄膜炎の病態 - 脳炎・脳症とバイオマーカー	小児内科	45 (2)	187-190	2013
Nagasaka H, Yorifuji T, et al.	Characteristics of NO cycle coupling with urea cycle in non-hyperammonemic carriers of ornithine transcarbamylase deficiency	Mol Genet Metab	109 (3)	251-254	2013
塚原宏一, 中務陽子, 他.	Early third trimesterの妊婦における血清中NOx、ADMA(内因性NO合成酵素阻害因子)および酸化ストレスマーカー	日本小児高血圧研究会誌	10 (1)	8-15	2013
Tsukahara H, Fujii Y, et al.	Prognostic value of brain injury biomarkers in acute encephalitis/encephalopathy	Pediatr Int	55 (4)	461-464	2013
Yamashita N, Tsukahara H, et al.	Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated on gene expression profiling	Pediatr Int	55 (5)	572-577	2013
塚原宏一	気道炎症と酸化ストレス	Respiratory Trends	3 (2)	14-19	2013
Tsuge M, Oka T, et al.	Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis	J NeuroVirol	20 (1)	73-84	2014

杉田慎二、小林克也、竹田晋浩	重症肺炎に対する体外式膜型人工肺（ECMO）療法	Medicina	50	2028-31	2013
----------------	--------------------------	----------	----	---------	------