

**厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)**

「重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究」

平成24 - 26年度 総合・分担研究報告書

研究代表者 森島恒雄

平成 27 年 5 月

目 次

(平成24 - 26年度 総合研究報告)

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究

森島 恒雄

(平成24 - 26年度 分担研究報告)

1 重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究

森島 恒雄

2 H5N1 およびパンデミックウイルスのウイルス学的解析

河岡 義裕

3 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ 剖検例からわかるこ

長谷川 秀樹

4 重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究

(重症肺炎・脳症の実験病理学的研究)

新矢 恵子

5 マウスインフルエンザウイルス(H1N1)感染モデルでの炎症基盤解析

松川 昭博

6 重症例の治療効果および予後に関する検討

池松 秀之

7 川崎市における急性脳炎・脳症の届出状況 2009年～2014年

岡部 信彦

8 感染症発生動向調査に基づいた 2012/2013、2013/2014、2014/2015

各シーズンのインフルエンザの発生動向と海外論文の検討

多屋 審子

9 インフルエンザ脳症の診断および治療に関する研究

奥村 彰久

10 喘息モデルマウスを用いた A(H1N1)pdm09 感染による気管支喘息重症化の病態解析

長谷川 俊史

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

河島 尚志

12 小児重症ウイルス感染症における多因子解析

宮入 烈

13 メタボローム解析を用いたウイルス性脳症患者血清中のバイオマーカー候補の検討

伊藤 審規

14 インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析

蓮田 泰誠

15 生体マーカーを用いた重症インフルエンザの病態解析と治療開発

- 尿中バイオマーカーの迅速検査についての検討 -

塙原 宏一

16 インフルエンザ成人重症例の病態と診療体制整備

竹田 晋浩

17 日本の体外循環補助療法の実態とウイルス性疾患による重症呼吸不全に対する

体外循環補助療法の可能性

中川 聰

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）
総合報告書

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
研究代表者 岡山大学大学院特命教授 森島恒雄

研究要旨

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

1. 侵入が危惧されるインフルエンザのウイルス学的検討：

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

2. インフルエンザ重症例の病理学的検討：

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

3. 重症肺炎およびインフルエンザ脳症の病態解明と治療：

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

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

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

4. 治療法の確立と診療体制整備：

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

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

研究代表者(所属)

森島恒雄(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

研究分担者(所属)

岡部信彦(川崎市健康安全研究所)

蓮田泰誠(理化学研究所)

河岡義祐(東京大学医科学研究所)

松川昭博(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

長谷川秀樹(国立感染研究所)

塚原宏一(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

池松秀之(九州大学先端医療イノベーションセンター)

伊藤嘉規(名古屋大学医学部付属病院)

河島尚志(東京医科大学)

竹田晋浩(日本医科大学付属病院)

奥村彰久(愛知医科大学)

中川聰(国立成育医療研究センター)

多屋馨子(国立感染研究所)

新矢恭子(神戸大学大学院医学研究科 平成24,25年)

長谷川俊史(山口大学大学院医学系研究科)

清水直樹(東京都立小児総合医療センター 平成26年)

A. 研究目的

目的

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

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

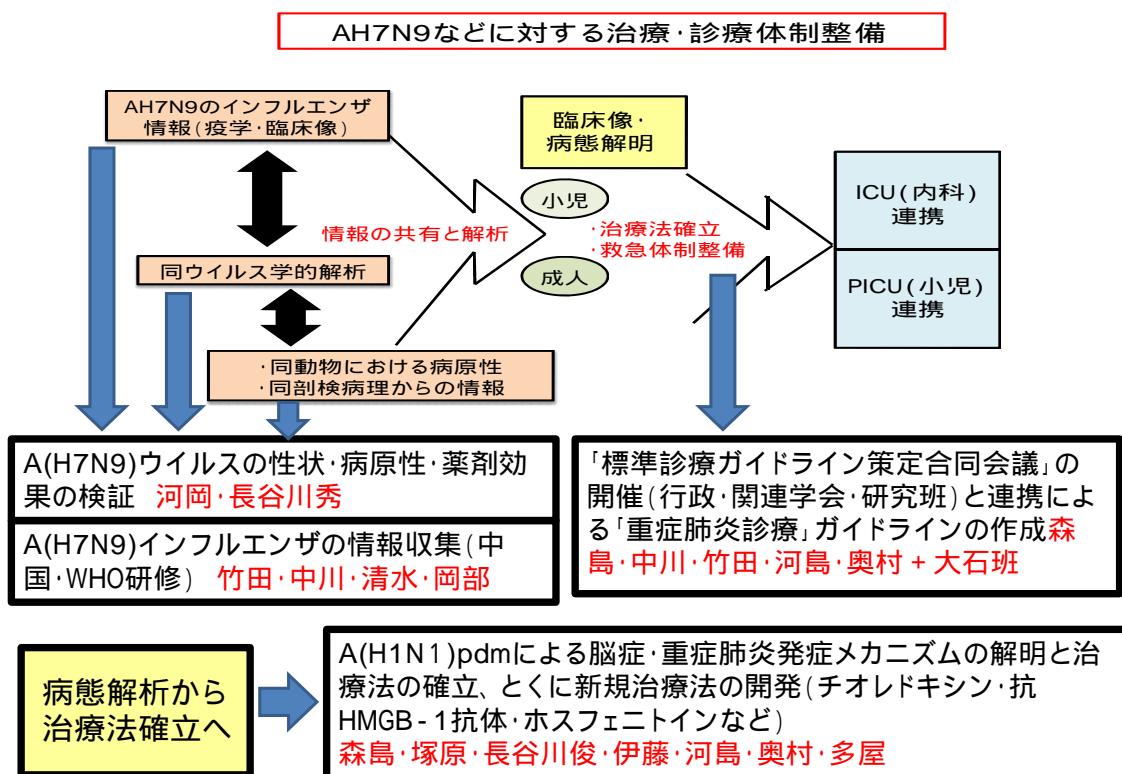
「診療ガイドライン」の作成・改訂・普及を円滑に進めるために厚労省関連学会・関連研究班による連携組織を作り、維持発展させた。特に、今後さらにAH7N9、AH5N1、AH1pdm薬剤耐性株などの蔓延を想定して治療法の確立と普及を進めていく。

B. 研究方法

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

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

図1.

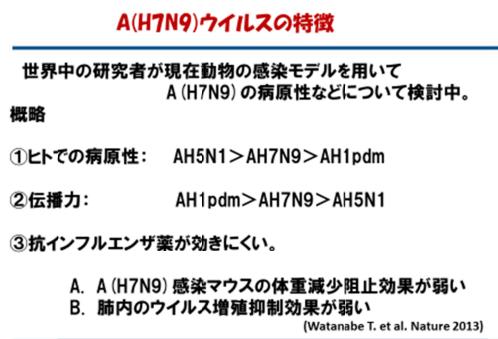


C. 結果

1. AH7N9などのウイルス学的解析：

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

図 2.



A(H7N9)の特徴

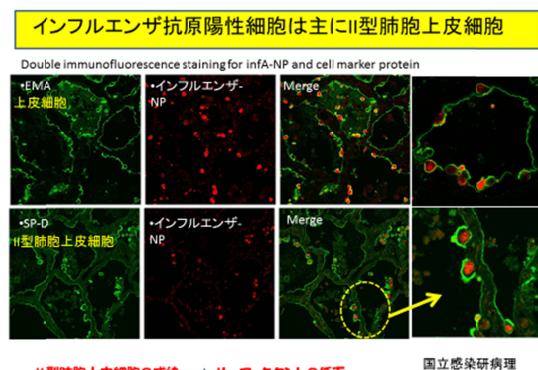
1. 感染者・重症者は成人例が多い。これは小児の救命救急体制に大きく影響。
2. 肺炎、特にARDSが多発。現時点で致命率約20-30%と非常に高い。
3. 重症例でサイトカインストームによる多臓器不全の頻度は比較的低い？
4. 重篤な肺障害はウイルスの増殖によるものと考えられる。
5. 増殖部位によっては、抗原検出キットによる早期診断が困難な可能性がある。
6. ARDSなど肺障害症例でウイルス量のコントロールが難しい症例が多い。
7. オセルタミビルに対する感受性が低い。
8. 本ウイルスに対しては、全年齢層が免疫を持たない。

2. インフルエンザ重症例の病理学的検討：

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

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

図 3.



3. インフルエンザ脳症及び肺炎の病態の解明と治療法の確立：

H1N1pdm における重症肺炎の発症機序が明らかになった。すなわち、図 4 に示す如く、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 ウィルスは、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、これらの結果は同ウイルスにより 2009 年肺炎で入院した患児の急性期遺伝子発現 (DNA マイクロアレイ解析) 解析で、SOD-2(ミトコンドリア膜の antioxidant) 関連遺伝子発現の増強が認められ、IgE 関連遺伝子および酸化ストレス関連遺伝子が高発現していることなどが示された(図 5)。この結果、AH1pdm ウィルスによる肺炎の重症化にウイルス側の要因と

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

図 4 .

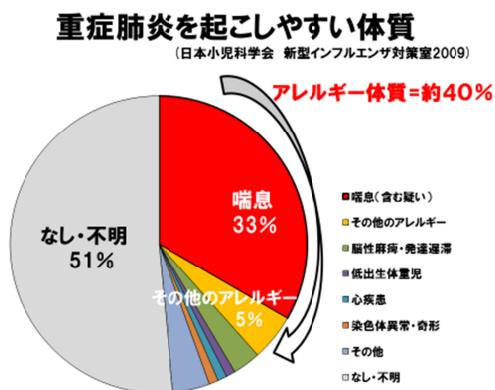
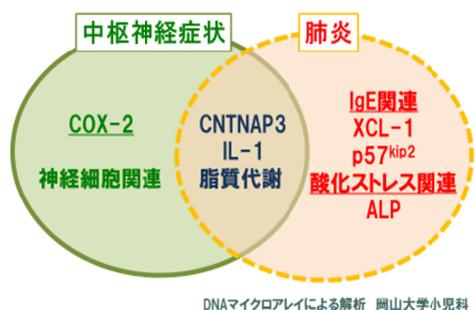


図 5 .

AH1・2009pdmの急性期に発現が上昇した遺伝子 (小児)



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

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

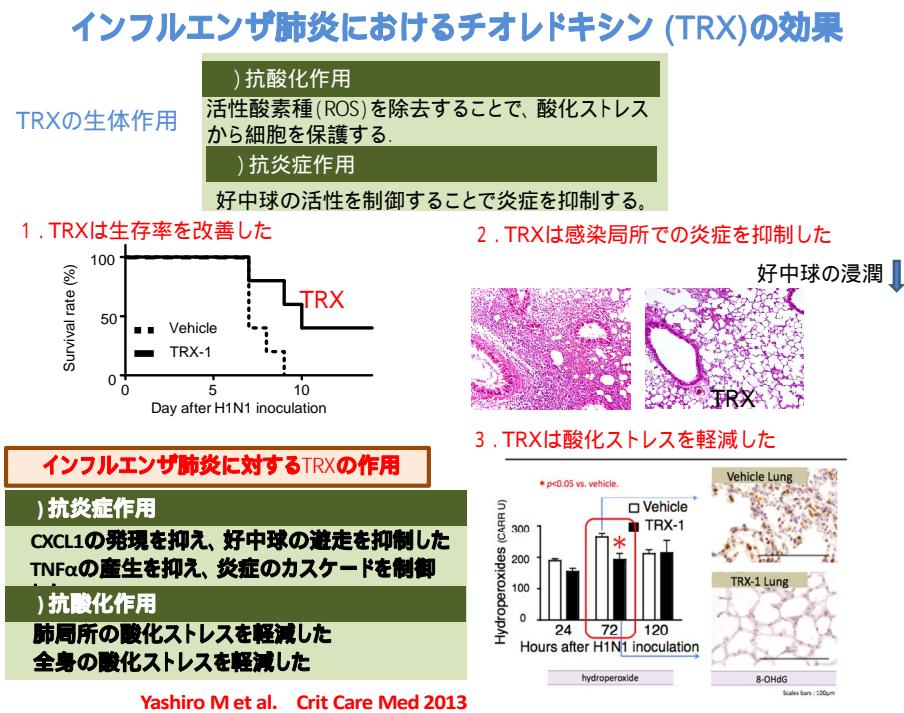
4 . 新規治療薬の開発：

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

チオレドキシン (TRX) は、ROS を除去す

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

図 6 .

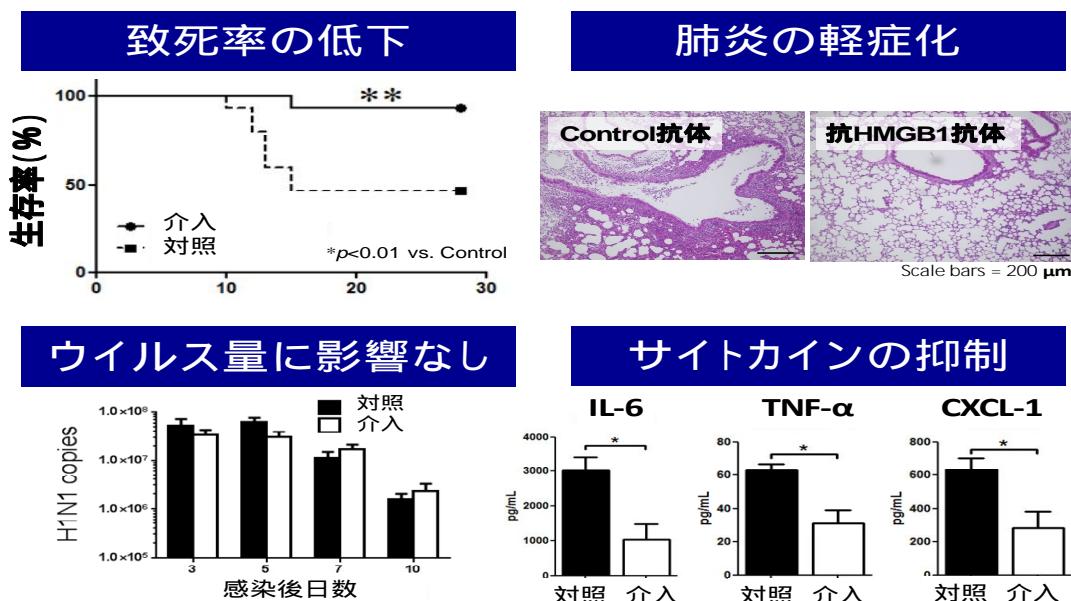


すなわち、TRX はインフルエンザ肺炎によるマウスの致死率を著明に改善させ、抗炎症(好中球の局所浸潤を抑えた。炎症性サイトカイン・ケモカインの抑制効果や抗酸化作用も有していた。

抗 HMGB1 抗体のインフルエンザ肺炎治療

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

図 7 .



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

5.重症インフルエンザの診療体制の整備とガイドラインの作成：

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

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

図8 「新型インフルエンザ」の診療体制整備

重要な事項

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

「新型インフルエンザ等に対する標準診療ガイドライン策定のための合同会議」

2013-2014

厚生労働省 + 対応研究班(森島班・大石班) + 関連学会

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

ガイドラインの作成・改訂とその普及

今後、この組織の維持・発展が「新型インフルエンザ」対応に極めて重要となる。

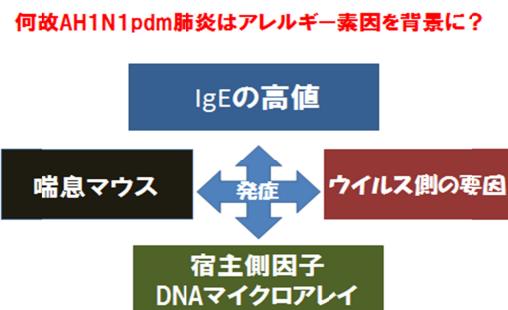
D. E. 考察とまとめ：

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

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

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

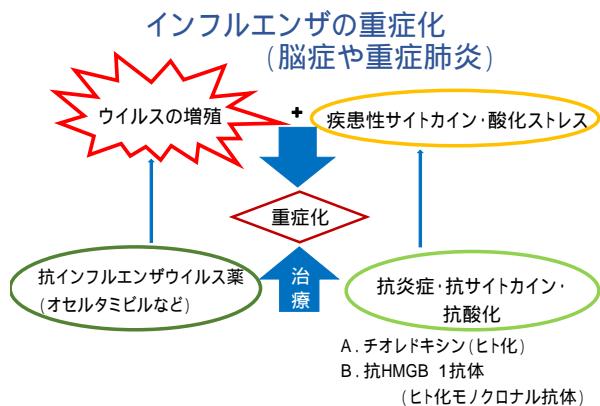
図 9 .



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

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

図 10 .



F . 研究発表

論文（主な英語論文のみ記載）

- Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shiraikura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 26:551-555, 2013.
- Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol.* 2012 Mar 16;7(3):552-62.
- Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol.* 2012 Jan;25(1):1-13.
- Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.* 26(3):357-69, 2013
- Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Shirabe K, Toda S, Wakabayashi-Takahara M, Morishima T, Ichiyama T. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine.* 2014 Oct;69(2):206-10. Epub 2014 Jul 6.
- Ikematsu, H. et al., The post-infection outcomes of influenza and acute respiratory infection in patients above 50 years of age in Japan: an observational study. *Influenza Other Respi Viruses*, 2012 ; 6(3):211-7.
- Kawai, N. et al., Persistence of pandemic influenza H1N1 virus in young patients after oseltamivir therapy in the 2009-2010 season: a comparison with seasonal H1N1 with or without H275Y mutation. *J Infect Chemother*, 2012 ; 18(2):180-6.
- Kawai, N. et al., Increased symptom severity but unchanged neuraminidase inhibitor effectiveness for A(H1N1)pdm09 in the 2010-2011 season: comparison with the previous season and with seasonal A(H3N2) and B. *Influenza Other Respi Viruses*, 2013 ; 7(3):448-55.
- Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *Influenza Other Respi Viruses*.2013;7(6):1390-9.
- Yamashita N, Tsukahara H, Tsuge M, Nagaoka Y, Yashiro M, Saito Y, Fujii Y, Oka T, Morishima T. Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated on gene expression profiling. *Pediatr Int* 55 (5): 572-577, 2013.
- Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi J, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on

- the association of viruses and syndromes. *Brain Dev* 2012; 34(5): 337-343.
- Hayashi N, Okumura A, Kubota T, Tsuji T, Kidokoro H, Fukasawa T, Hayakawa F, Ando N, Natsume J. Prognostic factors in acute encephalopathy with reduced subcortical diffusion. *Brain Dev* 2012; 34(8): 632-639.
 - Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respi Viruses* 2013; 7(5): 759-760.
 - Tsuge M, Oka T, Yamashita N, Saito Y, Fujii Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Tsukahara H, Morishima T. Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis. *J NeuroVirol* 20 (1): 73-84, 2014.
 - Hasegawa S, et al. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine*. 2014, 69; 206-210.
 - Hasegawa S, et al. Serum and cerebrospinal fluid levels of visinin-like protein-1 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev*. 2014,36: 608-12.
 - Okada S, Hasegawa S, et al. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013; 63: 194-200.
 - Hasegawa S, et al. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; 35: 626-9.
 - Yamamoto T, Mizoguchi Y, Kaneno H, Yamamoto K, Inoue Y, Kawashima H, Kase T, Shimotsuji T. Serum immunoglobulin G subclass levels and estimated clinical severity caused by possible influenza A (H1N1) pdm 2009 infection. *J Infect Chemother*. 2013 Oct;19(5):833-42.
 - Morichi S, Yamanaka G, Ishida Y, Oana S, Kashiwagi Y, Kawashima H. Brain-derived neurotrophic factor and interleukin-6 levels in the serum and cerebrospinal fluid of children with viral infection-induced encephalopathy. *Neurochem Res* 39(11):2143-2149, 2014
 - Ishida Y, Kawashima H, Morichi S, Yamanaka G, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T. Brain magnetic resonance imaging in acute phase of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children. *Neuropediatrics* 46(1):20-5. 2015
 - Tsukahara H, Fujii Y, Matsubara K, Yamada M, Nagaoka Y, Saito Y, Yashiro M, Tsuge M, Goto S, Kitamura T, Hata A, Ichiyama T, Morishima T. Prognostic value of brain injury biomarkers in acute encephalitis/encephalopathy. *Pediatr Int* 55 (4): 461-464, 2013.
 - S Takeda, et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation for 2009 Influenza A(H1N1) Severe Respiratory Failure in Japan. *Journal of Anesthesia* 2012; 26: 650-657.
 - Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Masutani H, Yodoi J, Morishima T. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. *Crit Care Med* 41(1):166-176, 2013.
 - Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol*.26, 357-369, 2013
 - Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T.

Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. Cytokine. 2013 Aug;63(2):194-200.

• Momonaka H, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Okada S, Nakatsuka K, Morishima T, Ichiyama T. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy. Brain Dev. 2013; in press.

• Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. Cytokine. 2013; 63: 194-200.

• Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Ishida C, Tanaka S, Morishima T, Ichiyama T. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. Brain Dev. 2013; 35: 626-9.

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

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

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

G . 知的所有権の取得状況

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

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）
平成 24～26 年度分担研究報告書

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
研究代表者 岡山大学大学院特命教授 森島恒雄
共同研究者 八代将登、野坂宣之

研究要旨

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

1. インフルエンザ脳症及び肺炎の発症機序の解明：宿主の急性期遺伝子発現について、中枢神経症状を伴う患児と肺炎罹患児において DNA マイクロアレイ解析を実施し、それぞれ急性期遺伝子発現のプロファイルが異なることを明らかにした。すなわち、前者では COX2 及び神経マーカー関連遺伝子が強く発現したのに比べ、後者では酸化ストレスマーカー及び IgE 関連遺伝子群の強発現を確認した。これは、治療法を考えるうえで重要な知見と考えられた。
 2. 新規治療薬の開発： 抗酸化の働きを持つチオレドキシン (TRX) のマウスにおけるインフルエンザ肺炎治療効果を検討し、TRX が肺炎による致死率を大幅に改善することを明らかにした。すなわち、好中球の肺局所への浸潤や局所におけるサイトカイン/ケモカインの産生を抑制し、また種々の酸化ストレスマーカーの抑制が認められた一方、ウイルスの肺内増殖には影響を与えたかった。TRX は、現在ヒト化精製物も作られており、今後臨床応用が期待できる。 HMGB1 は細胞外では炎症のメディエーターとして知られ、サイトカイン/ケモカインの誘導の引き金となり、重症インフルエンザにおいて病態悪化に関連することが知られている。抗 HMGB1 抗体は、マウスのインフルエンザ肺炎の治療薬として有用であることを明らかにした。すなわち、好中球の肺浸潤を抑制し、サイトカイン/ケモカインの産生を抑え、同時に ROS を抑制した。現在、脳血管障害や肺損傷などインフルエンザ以外でも本剤の有用性が推定されており、臨床応用に向けた重要な成果と考えられた。
 3. 重症インフルエンザの診療体制の整備とガイドラインの作成：「新型インフルエンザ」侵入時における治療法を含む迅速な診療体制整備にむけて、厚生労働省担当部局、関連学会（日本救急医学会、日本集中治療医学会、日本呼吸器学会、日本小児科学会、日本感染症学会など）、関連研究班（森島班、大石班、）による検討組織を立ち上げ、その中で重症インフルエンザ肺炎の診療ガイドラインを作成した。この組織の維持・発展は重篤なインフルエンザに対する治療法の確立・普及の上で、極めて重要と思われる。
- 以上、多くの点で重要な成果を上げることができた。

A . 研究目的

目的

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

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

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

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

B.C. 研究方法および研究結果

1. インフルエンザ脳症及び肺炎の発症機序

の解明： H1N1pdmにおける重症肺炎の発症機序が明らかになった。すなわち、図1に示す如く、宿主側の素因として喘息などアレルギー疾患有すること、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產生し、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儿の急性期遺伝子発現(DNAマイクロアレイ解析)において、2009pdmにおける小児の肺炎においてDNAマイクロアレイ解析によりSOD-2(ミトコンドリア膜のantioxidant)関連遺伝子発現の増強が認められ、IgE関連遺伝子および酸化ストレス関連遺伝子が高発現していることなどが示された(図2)。

図1.

重症肺炎を起こしやすい体质

(日本小児科学会 新型インフルエンザ対策室2009)

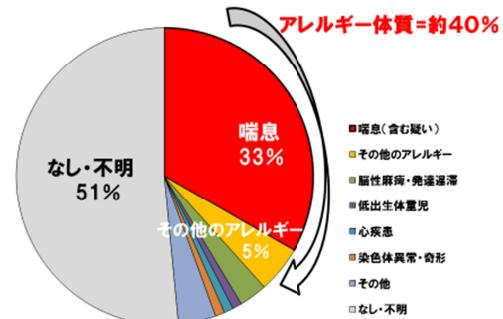
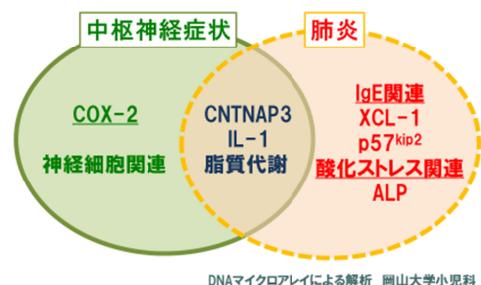


図2.

AH1・2009pdmの急性期に発現が上昇した遺伝子(小児)

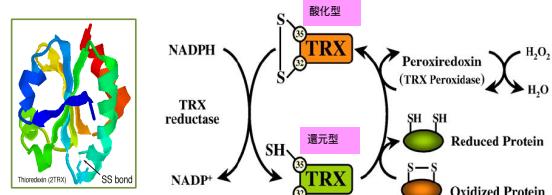


2. 新規治療薬の開発：

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

図3.

■ チオレドキシン(TRX)とは



生体作用

) 抗酸化作用

活性酸素種(ROS)を除去することで、酸化ストレスから細胞を保護する。

) 抗炎症作用

好中球の活性を制御することで炎症を抑制する。

この TRX についてインフルエンザ肺炎の治療効果について検討した。

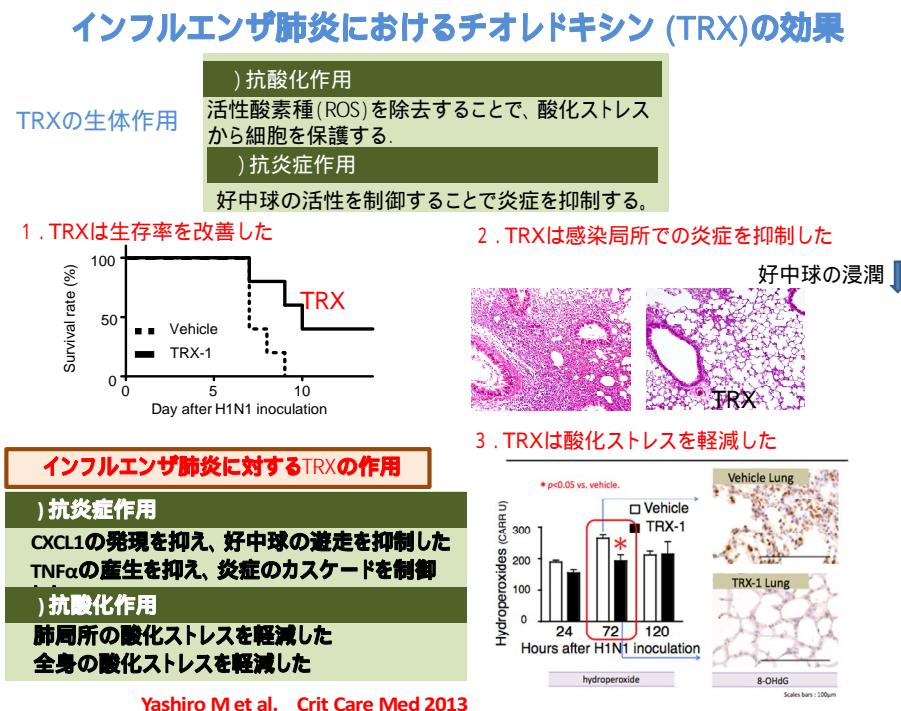
方法：

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

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

結果を図 4 に示す。

図 4 .



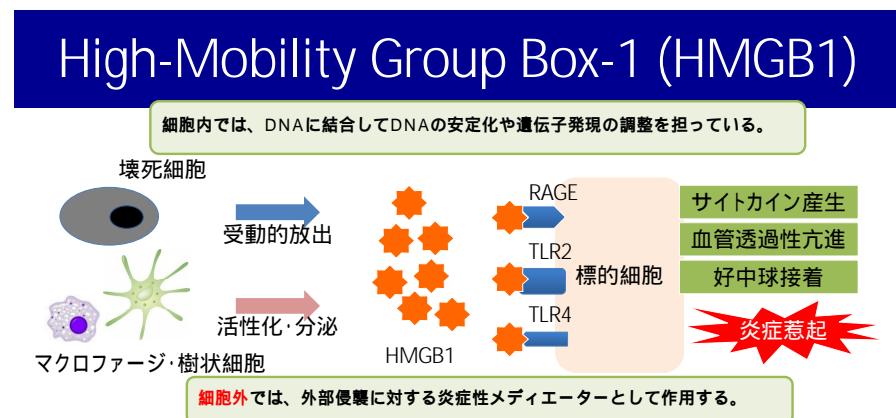
TRX はインフルエンザ肺炎によるマウスの致死率を著明に改善させた。これはウイルスの肺での増殖抑制効果によるものではなく、抗炎症(好中球の局所浸潤を抑え、また炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を抑制)効果および抗酸化作用によるものであった。

抗 HMGB1 抗体のインフルエンザ肺炎治療効果の検討

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

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

図 5 .



重症インフルエンザにHMGB1が関与

- ・重症インフルエンザ肺炎への関与
Ito Y et al. Cytokine 2011
- ・インフルエンザ脳症への関与
Momonaka H et al. Brain Dev. 2014

抗HMGB1抗体

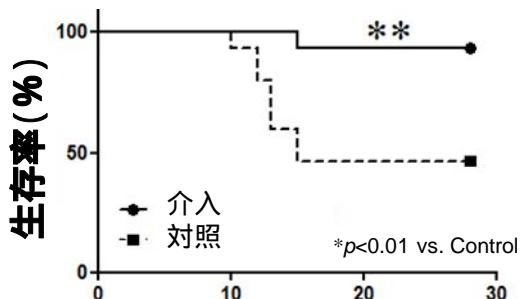
の治療への応用

方法：抗 HMGB1 モノクローナル抗体をインフルエンザウイルス PR8 感染マウスに静脈注射し、マウスの生存率、肺の病理像、気管支洗浄液中の好中球数、サイトカイン/

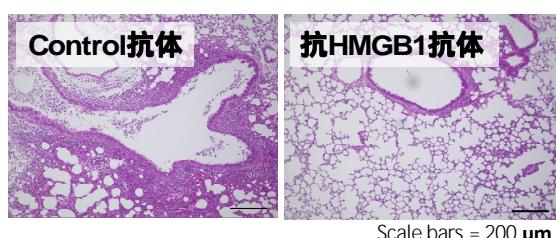
ケモカイン濃度、酸化ストレスマーカーなどの推移を検討した。結果を下の図 6 に示す。

図 6 .

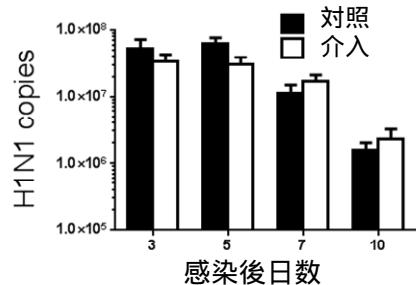
致死率の低下



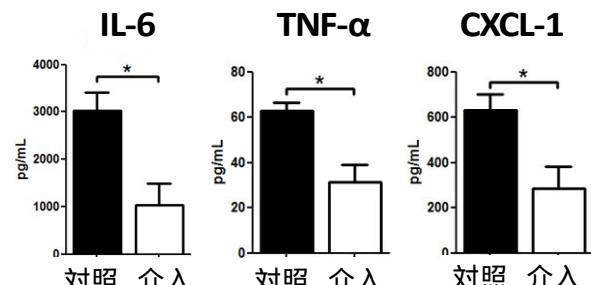
肺炎の軽症化



ウィルス量に影響なし



サイトカインの抑制



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

3.重症インフルエンザの診療体制の整備とガイドラインの作成：

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

石班)、 関連学会の参加により「新型インフルエンザ等に対する標準診療ガイドライン策定のための合同会議」を組織した。計 4 回の会議の中で AH7N9 などのウイルス学的特徴および臨床像と病態が討議され、国内侵入時の対策の必要性が協議された。またこの過程で、成人のインフルエンザ肺炎に対する診療ガイドラインが初めて作成された。また 2014 年 WHO の呼びかけによる講習会が中国で開催され、日本から 2 人の研究者(うち 1 人は清水分担研究者)を派遣し、帰国後成果を国内にフィードバックした。その概要について下の図 7 に示した。

図7 「新型インフルエンザ」の診療体制整備

重要な事項

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

「新型インフルエンザ等に対する標準診療ガイドライン策定のための合同会議」

2013-2014

厚生労働省 + 対応研究班(森島班・大石班) + 関連学会

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

ガイドラインの作成・改訂とその普及

今後、この組織の維持・発展が「新型インフルエンザ」対応に極めて重要となる。

D. E. 考察とまとめ：

2009年の「新型インフルエンザ」AH1pdmにおいて、小児の重症インフルエンザが多発した。また図1に示したようにアレルギー素因特に気管支喘息を有する児で重症肺炎がみられた。この機序について研究を進めたところ、DNAマイクロアレイ解析により宿主の急性期遺伝子発現において、IgE関連遺伝子群および酸化ストレスマークー関連遺伝子の高発現が認められ興味深い結果となった。一方、中枢神経症状を示す群においては、種々の神経疾患関連遺伝子群やCOX-2遺伝子の高発現を認め、すなわち、脳症と重症肺炎では異なる宿主の背景が存在することが示唆された。興味深いことに本稿では詳細は省いたが、同じ痙攣重積を示したロタウイルス胃腸炎とインフルエンザでは、それぞれ異なる急性期遺伝子の発現が認められ、ウイルスによっても宿主の反応が異なることが明らかになった。2013/14インフルエンザシーズンでは、久しぶりにAH1pdmの流行がみられ、その中小児および成人にパンデミックの時と同様に肺炎の多発がみられた。今後これら肺炎およびアレルギー素因と関連するAH1pdmウイルス学的要因を探ることが大きな課題である。

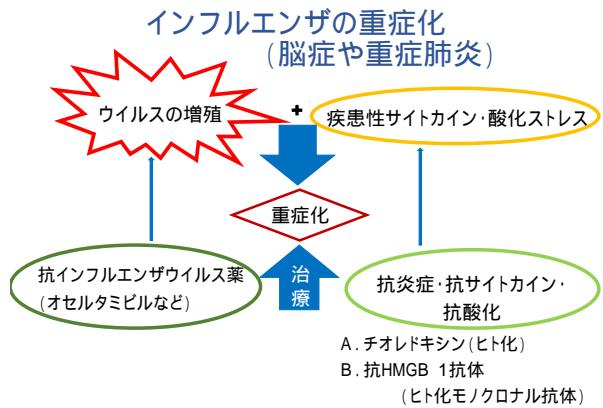
図8.

何故AH1N1pdm肺炎はアレルギー素因を背景に？



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

図9.



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.
- Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol*.26, 357-369, 2013
- Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013 Aug;63(2):194-200.
- Momonaka H, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Okada S, Nakatsuka K, Morishima T, Ichiyama T. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; in press.
- Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K,

- Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013; 63: 194-200.
- Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Ishida C, Tanaka S, Morishima T, Ichiyama T. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; 35: 626-9.
- Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(5):759-60.
- Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Morichi S, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. *J Clin Virol*. 2013;56(1):25-30.
- Nakatsukasa Y, Tsukahara H, Tabuchi K, Tabuchi M, Magami T, Yamada M, Fujii Y, Yashiro M, Tsuge M, Morishima T. Thioredoxin-1 and oxidative stress status in pregnant women at early third trimester of pregnancy: Relation to maternal and neonatal characteristics. *J Clin Biochem Nutr* 52(1):27-31, 2013.

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)

G . 知的所有権の取得状況

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

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）
平成 24 - 26 年度分担研究報告書

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

高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスがアジアの家禽で蔓延しておりヒトへの感染も続いている中、本研究二年度目初頭の平成 25 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。現在も感染者が増え続け、次のパンデミックに発展する危険性が懸念されている。本研究では、初年度に H5N1 ウィルスのオセルタミビル耐性獲得のメカニズムを、二、三年度目に H7N9 ウィルスの性状を解析した。H5N1 ウィルスの NA 蛋白質の 117 番目のアミノ酸変異がウィルスとオセルタミビルの結合親和力を弱め、生体内でのオセルタミビル感受性を低下させていることを明らかにした。また、H7N9 ウィルスのマウスを用いた病原性解析では、H7N9 ウィルスが通常の鳥の H7 ウィルスや 2009 年のパンデミックウイルスよりも病原性が強いことを明らかにした。さらに、H7N9 ウィルス感染者は高齢男性に多く、喫煙歴や慢性呼吸器疾患の合併が見られることが特徴であることから、喫煙マウスモデルを用いて喫煙と H7N9 ウィルス感染との関連を解析した。その結果、タバコ煙暴露群はコントロールの空気暴露群と比較して H7N9 ウィルス感染に対して抵抗性を示すことが分かった。

本研究で得られた成果は、H5N1 ウィルスおよび H7N9 ウィルスの監視をする上で重要なのみならず、感染者を治療する際にも有用な情報となる。

A . 研究目的

・H5N1 ウィルスのウイルス学的解析

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

・H7N9 ウィルスのウイルス学的解析

平成 25 年春、中国で H7N9 鳥インフルエンザウィルス感染者が発生した。この H7N9 ウィルスは、ヒトからヒトへの伝播はほとんど起こっていないが、死亡例や重症化例が多数確認された。さらに平成 27 年に入ってから感染者が急増しており、次のパンデミックに発展する危険性が懸念されている。H7N9 ウィルス感染例の疫学的な特徴として、高齢男性での感染例が多く、喫煙歴や慢性呼吸器疾患の合併が見られた。そこで、ヒトから分離された H7N9 ウィルスの哺乳類における病原性、および喫煙と H7N9 ウィルス感染との関連を検討した。

B . 研究方法

・H5N1 ウィルスのウイルス学的解析

本研究では、遺伝的背景の異なる H5N1 ウィルス 3 株 [A/Vietnam/1203/2004 (VN1203, クレード 1)、 A/duck/Vietnam/ TY114/2007 (TY114, クレード 2.3.4)、 A/Vietnam/UT31412II/2008 (VN31412, クレード 2.3.4)] を用いた。

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

・H7N9 ウィルスのウイルス学的解析

中国の患者から分離された H7N9 ウィルス (A/Anhui/1/2013(H7N9); Anhui/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ィルス (A/California/04/2009(H1N1pdm09); CA04) および中国の患者から分離された H7N9 ウィルスとは別系統の H7N9 ウィルス (A/duck/Gunma/466/ 2011(H7N9); DK/GM466) と比較解析した。

さらに、喫煙曝露システムを用いて 180 日間のタバコ煙暴露を C57BL/6 マウスにおこない、喫煙マウスマodelと、コントロールとして空気暴露群を作製した。 Anhui/1 株を経鼻感染し、 14 日間の体重モニタリングと、感染 2 日目と 5 日目に肺を採取しウイルス力価の測定、病理解析、マイクロアレイ解析をおこなった。

(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

・H5N1 ウィルスのウイルス学的解析

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

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

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

これらの結果から、 NA の 117 番目のアミノ酸変異は、オセルタミビルとウイルスの結合

親和性を弱めることにより、生体内でのタミフル感受性を低下させていることが明らかとなった。

・H7N9 ウィルスのウイルス学的解析

ヒトから分離された Anhui/1 のマウスにおける体重減少および致死率は、鳥から分離された GM466 並びに 2009 年のパンデミックウィルス CA04 よりも高いことが明らかとなつた。また、Anhui/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、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 ウィ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ィルスよりも強いことが明らかとなつた。

喫煙マウスモデルでの解析では、感染前のタバコ煙暴露群の肺には炎症細胞の浸潤がみられたが、慢性閉塞性肺疾患(COPD)に特徴的な肺胞壁の破壊は顯著ではなかつた。H7N9 ウィルス感染後は、タバコ煙暴露群に比較して空気暴露群の方が体重減少が大きく、生残率も低かつた。一方で、肺のウイルス力価は両群間に明らかな差は認められなかつた。組織学的解析では、両群ともに気管支上皮と肺胞にウイルス感染細胞が分布していたが、炎症細胞の分布を比較すると、空気暴露群のほうが、気管支周囲の炎症細胞の浸潤が強かつた。この組織学的な相違について検討するために、肺の遺伝子発現解析をおこなつた結果、空気暴露群では、感染 2 日目と 5 日目にウイルス感染によって多くの遺伝子発現の変動がみられたが、タバコ煙暴露群では少数の遺伝子だけが発現変動していた。さらに、細胞浸潤に関連するケモカイン CCL24 と CXCL3 は、空気暴露群では発現上昇していたが、タバコ煙暴露群では、ほとんど変化していなかつた。

D . 考察

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

また、中国でヒトから分離された H7N9 ウィルスのマウスにおける病原性が、2009 年にパンデミックをおこしたウイルスよりも強いことが明らかとなつた。

喫煙マウスは、我々の予想に反して、H7N9 ウィルスの攻撃に対して抵抗性を示した。H7N9 ウィルス感染による気管支の炎症に対して、タバコ煙暴露による抑制効果が示唆された。タバコ煙暴露は、H7N9 ウィルス感染によるケモカインの発現誘導を阻害する可能性が示唆された。

E . 結論

本研究で得られた成果は、H5N1 ウィルスおよび H7N9 ウィルスの監視をする上で重要なのみならず、感染者を治療する際にも有用な情報となる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le MQ, Sekijima M, Ito K, Takada A, kawaoka Y. Molecular

mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the neuraminidase of subtype H5N1 avian influenza A viruses. *J Infect Dis* 207:89-97, 2013.

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

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, Shiraikura 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* 526:551-555, 2013.

Yamayoshi S, Yamada S, Fukuyama S, Murakami S, Zhao D, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Macken C, Neumann G, Kawaoka Y. Virulence-affecting amino acid changes in the PA protein of H7N9 influenza A viruses. *J Virol* 88:3127-3134, 2014.

Neumann G, Macken CA, Kawaoka Y. Identification of amino acid changes that may have been critical for the genesis of A(H7N9) influenza viruses. *J Virol* 88:4877-4896, 2014.

Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Yamada S, Uchida Y, Saito T, Takahashi K, Sugaya N, Tashiro M, Kawaoka Y. Detection sensitivity of influenza rapid diagnostic tests. *Microbiol Immunol* 58:600-606, 2014.

2 . 学会発表

坂井（田川）優子、高山育代、影山勉、内田裕子、西藤岳彦、田代眞人、河岡義裕「鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスは迅速診断キットで判定可能か？」第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月、神戸

G . 知的所有権の取得状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
平成 24～26 年度分担研究報告書

**重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ
剖検例からわかること一**

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 室長

研究要旨

2000 年から 2014 年まで国立感染症研究所・感染病理部に病理学的検索を依頼されたインフルエンザ死亡例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を解析した。主な重症インフルエンザには脳症、心筋症、肺炎があげられるが、どの病態においてもインフルエンザウイルスのゲノムは呼吸器管に限定して検出され、ウイルス血症はみとめられない。季節性インフルエンザに併発する肺炎の肺組織では、ウイルス抗原は気管・気管支・細気管支上皮細胞には検出されたが、肺胞上皮細胞には検出されない。一方、2009 年パンデミックインフルエンザの初期の剖検例では病理組織学的にび慢性肺胞障害を呈し、肺胞上皮細胞にウイルス抗原が検出された。パンデミック終息後にも A/H1N1pdm09 感染に ARDS が併発して死亡する例がみられたが、ウイルス性肺炎による ARDS ではなく、敗血症や DIC などの全身性の炎症反応による ARDS であると考えられた。2013 年に中国で H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が報告され、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスヒト感染例のように重症肺炎で死亡している。ヒトから分離された H7N9 インフルエンザウイルスの特徴を感染動物の気管・気管支・肺組織の病理学的解析により明らかにした。ヒトから分離された H7N9 は鳥から分離された H7N9 はヒトから分離された H7N9(Anhui) は、マウス、サルの気管・気管支・細気管支上皮細胞、気管支腺上皮細胞、および肺胞上皮細胞に感染した。

A. 研究目的

インフルエンザの病理が注目されるようになったのは、2000 年以降、小児の脳症死亡例が増加し、脳症の病態の解析が急務となってからである。さらに致死率 50%以上の鳥インフルエンザや 2009 年のパンデミックインフルエンザによる死亡例の病理学的解析の報告が加わり、重症インフルエンザ

の病態の解明に助けとなる知見が集積してきた。本研究班において我々の分担研究の目的は、集積されたインフルエンザ剖検組織の解析により重症インフルエンザの病態を解明することである。これまで国立感染症研究所に依頼され検査したインフルエンザ脳症、インフルエンザに併発する心筋炎、パンデミックインフルエンザなどの剖検組

織標本を新しい分子病理学的解析などにより再度解析し、新しい知見を得ることが研究目的である。

B. 研究方法

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

2. 方法

ヘマトキシリンエオジン(HE)染色標本による組織所見。

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

細胞マーカー蛋白抗体との二重染色による感染細胞同定。

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

C. 研究結果

1. インフルエンザ例

2000年から2014年まで計56例のインフルエンザ死亡例の病理学的検索が依頼された。2000-2002年では小児脳症例が多く、2009-2011年ではパンデミックインフルエンザウイルスA(H1N1)pdm09感染症が32例であった。

2. インフルエンザ脳症の病理

脳：19例の脳症の脳組織において、炎症細胞の浸潤はなく、血管壁の硝子化、血漿成分の漏出と微小纖維素血栓がみられた。一部の神経細胞の変性とグリア細胞反応もみられた。免疫組織化学でウイルス抗原は検出されず、パラフィン切片中のウイルスゲノムも陰性であった。脳症例でも脳組織においてIL-6mRNAの発現が亢進しているものから検出されないものまでさまざまであった。血液・髄液中のIL-6蛋白が高い

ものでは脳組織でのIL-6 mRNAが高かった。

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

3. 気管・気管支病変

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

4. 肺病変

ウイルス性肺炎 A/H1N1pdm09ウイルス感染の一部の症例は、肺の場所により異なる進行度のびまん性肺胞傷害(DAD)の像を呈し、浮腫、硝子膜形成、出血、うっ血、炎症、線維化という所見が認められた。肺切片ごとにウイルス抗原量も異なり、肺のDADの進行より先にウイルス抗原量の増加が認められたことから、肺組織の病理変化はウイルス感染によるものであると推測された。ウイルスは主に肺胞上皮細胞で感染増殖し、肺から鳥型レセプター(2,3-シアアル酸)に親和性の高い配列を有するA/H1N1pdm09が検出された。鳥インフルエンザウイルス感染例と類似した病理所見であった。すなわちインフルエンザウイルス感染によるウイルス性肺炎によるARDSと考えられた。

びまん性肺障害 臨床的にARDSを呈した剖検肺組織ではびまん性肺障害(DAD)を呈する。パンデミック終息後の症例であるが、臨床的には全身炎症反応が強く、呼吸器装

着時にすでに DIC や MOF がみられていた。病理像では肺全体にびまん性肺胞障害の滲出期像がみられ、肺局所で差がみられなかった。ウイルス抗原陽性細胞は少なく、ウイルスゲノム量は初期の症例 1 の 1/1000 であった。肺からヒト型レセプターに親和性の高い配列を有す A/H1N1pdm09 が検出された。臨床経過も併せて考えると、ウイルス性肺炎ではなく、敗血症、DIC が引き起した ARDS ではないかと考えられた。

二次性細菌性肺炎 DAD は呈さず好中球が浸潤する細菌性肺炎を呈するものや、壊死性出血性気管支炎はあっても肺うっ血、肺水腫、肺出血などの非特異的な所見のみの例もあった。ウイルス抗原は気管支から細気管支上皮細胞に検出されても肺胞上皮細胞には検出されなかった。

5. 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

(東京大学医科学研究所河岡研究室との共同研究である)

2013 年 4 月に中国において H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス（以下 H7N9 ウィルス）のヒトへの感染例が報告された。ほとんどが重症の急性呼吸促迫症候群（ARDS）を併発して死亡している。中国から報告されたネクロプシー組織の病理学的解析によると、肺病理像は DAD で H5N1 と類似している。H7N9 は肺胞上皮細胞に検出されている。我々はヒトから分離された H7N9 ウィルス感染動物モデルの病理学的解析を行い、その特徴を明らかにした。

H7N9 流行初期に中国の患者から分離された H7N9 ウィルス、A/Anhui/1/2013 を鳥から分離された H7N9 ウィルス A/duck/Gunma/466/2011、2009 年にパンデミックとなった H1N1pdm09 ウィルス A/California/4/2009 を対照としてマウス、カニクイザル、フェレット、ミニブタに接

種し、接種後 3 日目と 6 日目の鼻腔、リンパ節、気管、気管支、気管支腺、肺組織の病理学的解析（HE 染色、免疫組織化学）を行った。ヒトから分離された H7N9 ウィルスはカニクイザルの上気道と下気道の両方で感染増殖することが分かった。マウス、フェレットでは、鳥から分離された H7N9 ウィルスよりも強い炎症を引き起こし、サル、フェレットでは気管上皮細胞や気管支腺上皮細胞において、より多くのウイルス抗原が検出された。

H7N9 ウィ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であり、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。

D. 考察

重症インフルエンザとして、脳症、臨床的心筋炎（病理所見がない場合が多い）、肺炎が挙げられる。ウイルスが肺胞上皮細胞に感染するウイルス性肺炎が要因となる ARDS とウイルス感染により全身炎性反応、DIC が併発し肺外要因によって引き起こされる ARDS がある。後者の方がより一般的な ARDS かもしれない。しかしながらインフルエンザ感染後 3 病日で重症の低酸素症、ARDS を発症する機構には、発熱間もなく発症する脳症や心筋炎症状と同様、何らかの宿主因子が関与しているのではないかと思われる。

E. 結論

重症インフルエンザの剖検組織を病理学的解析することで、重症インフルエンザの死亡原因を明らかにできると同時にウイルスの分布や、ウイルスゲノムの解析などが可能となった。重症インフルエンザの死因は呼吸不全だけではなく、脳症や心機能障害（臨床的には心筋炎の疑い）の場合も多い。

ウイルス感染とこれらの症状がどのように関連するか解明するために病理標本を集積し、解析していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol.* 2012 Feb;84(2):336-44.
- 2) Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol.* 2012 Mar 16;7(3):552-62.
- 3) van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine.* 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
- 4) Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood.* 2012 Dec 6;120(24):4733-43. Epub 2012 Oct 11.
- 5) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol.* 2012 Jan;25(1):1-13.
- 6) 中島典子、長谷川秀樹 インフルエンザウイルス感染症の病理 医学のあゆみ 241巻1号 : 4/7, 2012
- 7) 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, Neuman G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature.* 2013 Sep 26;501(7468):551-5. Epub 2013 Jul 10.
- 8) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of

- avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol.* 26(3):357-69, 2013
- 9) Kurabayashi 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.
- 10) Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Shirabe K, Toda S, Wakabayashi-Takahara M, Morishima T, Ichiyama T. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine.* 2014 Oct;69(2):206-10. Epub 2014 Jul 6.
- 11) Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe.* 2014 Jun 11;15(6):692-705.
- 12) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzuki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol.* 2014 May;88(10):5608-16. Epub 2014 Mar 5.
- 13) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 ウイルス性肺炎 病理と臨床 32(10): 1146-1153, 2014.10
- ## 2. 学会発表
- ### 国際会議
- 1) Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutaka Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumazaka, Nguyen Trung Thuy, Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki and Tetsutaro Sata Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management(Second isirv Antiviral Group Conference) (ハノイ・ベトナム)2012年10月
 - 2) 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
- ### 国内会議
- 1) 長谷川秀樹 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2012年11月
 - 2) 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、相内章、長谷川秀樹、田代眞人 細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応

- 答への影響 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月
- 3) 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代眞人、長谷川秀樹 喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月
- 4) 池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村慎一、田代眞人、浅沼秀樹、長谷川秀樹 基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月
- 5) 泉地恭輔、相内章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹 経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月
- 6) 鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代眞人、長谷川秀樹 インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体の性状解析 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
- 7) 相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代眞人、浅沼秀樹、長谷川秀樹 感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
- 8) Elly van Riet, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
- 9) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
- 10) 浅沼秀樹、相内章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代眞人 野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
- 11) 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亞、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内章、藤本陽、千葉丈 インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究～長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討～ 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
- 12) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、熊坂利夫、佐多徹太郎、長谷川秀樹 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡したベトナム小児例の病理学的解析 第 101 回日本病理学会総会 (東京) 2012 年 4 月
- 13) 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
- 14) 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、田代眞人、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

- 15) 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
- 16) 鈴木 忠樹、川口 晶、相内 章、佐藤 由子、永田 典代、田代 真人、長谷川 秀樹 喘息発作によるインフルエンザ重症化動物モデルの作製 第 103 回日本病理学会総会（広島）2014 年 4 月
- 17) 中島 典子、渡辺 登喜子、佐藤 由子、高橋 健太、鈴木 忠樹、田代 真人、河岡 義裕、長谷川 秀樹 ヒトから分離された H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス感染動物モデルの病理学的解析 第 103 回日本病理学会総会（広島）2014 年 4 月
- 18) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田

切孝人、前仲勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠 II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は、HA 開裂部位に mono basic なアミノ酸配列をもつ A 型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である 第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2014 年 11 月

- 19) 渡辺登喜子、Gongxun Zhong、Colin Russell、中島典子、八田正人、Anthony Hanson、高橋健太、渡辺真治、今井正樹、長谷川秀樹、河岡義裕 スペイン風邪ウイルスに類似の鳥インフルエンザウイルスのパンデミックポテンシャル 第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2014 年 11 月

6. 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

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

（現：滋慶医療科学大学院大学・客員教授）

研究要旨

病理学的アプローチにより、重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の原因・発症過程に関する理論的な根拠を得て治療に貢献することを目的とした。本研究では、マウスの脳浮腫モデルの解析で、カルシウムイオンの恒常性崩壊が脳症発症の一因となっている可能性を示した。

A. 研究目的

実験病理学的アプローチにより、重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の原因・発症過程に関する理論的な根拠を得て治療に貢献することを目的とした。

以前、インフルエンザ脳症死亡例の延・脊髄を病理学的に検査する機会を得たことで、脳症患者の中権神経系で起こっている病態には血管症が含まれていると判断した。獣医感染症領域では、脳脊髄血管症は、豚の大腸菌症の一病態として見られており、発症には志賀毒素もしくは志賀毒素と腸毒素の相乗作用が起因すると考えられている。脳血管の病理所見が酷似していたため、二つの疾患には、病因は異なれども、類似した病理発生機序が発動している可能性があると考えた。

最近、インフルエンザウイルスはウイルス株によって、動物の細胞表面にある自然免疫における病原体の認識タンパク質、

Toll 様受容体 2 と 4 を刺激するものがあることが判明した。そのため、ヒトの細胞表面にある Toll 様受容体もインフルエンザウイルス粒子表面の物質によって刺激される可能性があると考えられた。Toll 様受容体は、先行刺激があることにより、後の刺激によって引き起こされるサイトカイン反応が通常より増強される場合がある。そのため、インフルエンザウイルス感染を引き金として甚急性経過をとる小児の脳症の発生機序として、Toll 様受容体刺激の関与を考慮し、実験的に調べることは重要だと考えた。本研究では、細菌リポ多糖 (LPS) による Toll 様受容体先行刺激後に、インフルエンザウイルス重感染をし、その脳浮腫発症における影響を調べ、脳内遺伝子発現プロファイリングを行った。

B. 研究方法

ウイルス: A/Puerto Rico/8/34; H1N1。50%

マウス致死量 (MLD50) は 6×10^2 pfu/50 μl。
動物 : Balb/c マウス、SPF、5 週令、雌。

実験計画(承認番号:神大・P110910) : マウスを 4 グループに分類 (PBS、インフルエンザ (IAV)、LPS、LPS+IAV) し、先ず、PBS または LPS (1.25mg/kg, 100ul volume in PBS) を経鼻投与し、12 時間後に、PBS または IAV (100 MLD50 in 50ul PBS) を経鼻投与した。2 日後に、エバンスブルー (EB; 2% in PBS) を腹腔内投与した後、安樂死させ詳細な検索を行った。

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

免疫染色 (IHC) : 肺と脳組織を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定、パラフィン包埋切片にし、抗 H1 ウィルス抗体を用いた免疫染色を行った。

ウイルス学的検索 : 肺と脳組織に対し、MDCK 細胞を用いたブラック法で検査を行った。

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

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

C . 研究結果

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

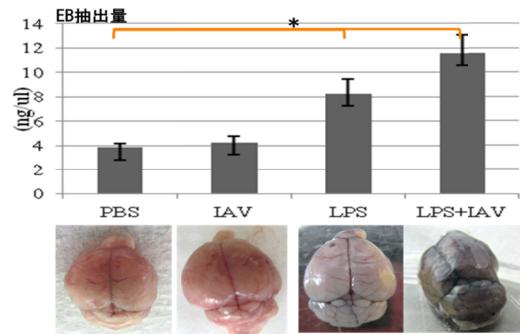


図 1

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

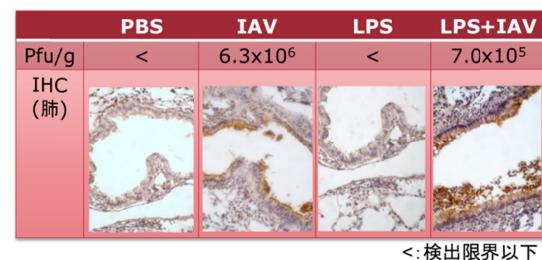


図 2

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

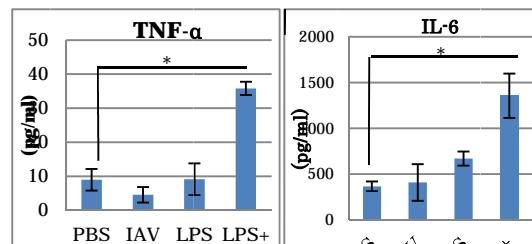


図 3

脳内遺伝子発現 : LPS+IAV 群に特異的な遺伝子動態として、309 個の発現上昇、382 個の発現減少が観察された (図 4)。

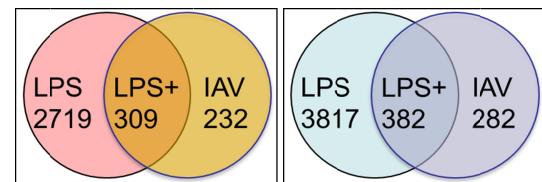


図 4

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

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

表1

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

Up-regulated Gene Expression

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

Down-regulated Gene Expression

D . 考察

本実験で、LPS 先行刺激後の IAV 感染があった場合には、IAV または LPS の単独投与時よりも、強い脳浮腫が惹起されることが示された。この 2 つの物質投与による生体でのアナジー効果は、Toll 様受容体の先行刺激と引き続く IAV 感染の時間的な間隔によってその程度が変化し、12 時間という時間間隔でそのアナジー効果が最大になり易いことが、先行研究に續いて再確認された。

本実験モデルにおいて、強い脳浮腫が起こっている個体の脳内では、calcium、ion および channel の機能に分類される遺伝子が大きく動いていることが判明した。したがって、カルシウムイオンの恒常性のバランス崩壊が脳症発症の一因となっている可能性がある。実際、近年になって糖尿病性脳症の病理発生機序にカルシウムイオンの

関与が報告され、また、急性脳炎または急性脳症の罹患リスク判定にカルシウムイオンチャネルのサブユニットの遺伝子多型を標的とした判定法が申請されている（特開 2009-112251）。したがって、カルシウムイオンチャネルの不均衡に陥る原因を探ることは脳症の病態解明の一助となる可能性がある。

E . 結論

脳症発症の一因に、血中高サイトカイン濃度に加えカルシウムイオンの不均衡が関与している可能性がある。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Shinya K, et al., J Virol. 2012; 86(11): 6055-66.

Kyan Y, et al., J Med Virol. 2014; 86(5):905-11.

2 . 学会発表

Shinya K, et al., Gene expression profiling in the brains of mice suffering from respiratory disease. 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

マウスインフルエンザウィルス(H1N1)感染モデルでの炎症基盤解析

研究分担者 松川昭博 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科免疫病理学・教授

研究要旨

マウスインフルエンザ(H1N1)肺炎モデルを用いて、炎症の分子基盤を解析した。H1N1肺炎は抗酸化物質チオレドキシン(TRX)で抑制できることを見いたした。H1N1肺炎はERK経路に依存し、その内因性物質であるSpred2により制御可能であること、さらに、H1N1感染により誘導されるtype-I Interferonにより発現するSETDB2は、H1N1感染後の二次性細菌性肺炎に関与することが明らかになった。

A . 研究目的

人類の死因は感染症によるものが最も多く(WHO: World Health Report 2012)、新興および再興感染症は人類の脅威であり続いている。新興感染症の多くは未知あるいは変異したウイルス感染である。これまで開発してきた薬剤は、ウイルスの複製・増殖をターゲットとしたものが多い。しかし新興感染症には無効である場合が多く、新しい治療法の開発が求められている。2009年の新型インフルエンザ(H1N1)パンデミックは記憶に新しい。H1N1インフルエンザウィルス感染の病理組織像は、広範な肺胞・気道上皮傷害と炎症細胞浸潤、および肺水腫を示す。このときの病態形成に、酸化ストレスやサイトカインが深く関わることが知られている。本研究では、マウスインフルエンザウィルス肺炎モデルの解析を通じて、1) 抗酸化物質チオレドキシン(TRX)によるH1N1インフルエンザ肺炎の治療効果、2) サイトカインシグナル伝達因子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。また、3) H1N1インフルエンザウィルス感染症は細菌性肺炎などの二次感染の危険性を高め、二次感染を併発すると死亡率は飛躍的に上昇する。そこで、二次性細菌性肺炎の感受性を規定する因子を明らかにする事も目的とした。

B . 研究方法

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

次に、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。

また、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、その5日後に肺炎球菌を経気管的に投与し、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 によるマウス生存率は、TRX 投与によりマウス生存率は改善した。この時、肺臓でのウイルス量に変化はみられなかったが、肺での好中球浸潤は有意に減少し、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中や肺抽出液中の炎症性サイトカイン TNF やケモカイン CXCL1 產生量は低下した。肺で発現する酸化ストレスマーカー (d-ROMs) は減少し、抹消血中の hydroperoxide も低下した。気管支上皮細胞株 MLE-12 に H1N1 を感染させた時に產生される TNF や CXCL1 は TRX-1 で濃度依存性に減少した。TRX-1 は抗本抗炎症作用と抗酸化作用によりインフルエンザ肺炎は軽減したものと考えられる。

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 PI3kinase の亢進 (p-AK 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。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ことが示唆された。

マイクロアレイシステムを用いた解析にて、type-I IFN (IFN-I) またはインフルエンザウィルスの刺激を受けた気道上皮細胞やマクロファージでは、H3K9 のメチル化 (転写抑制) を誘導する酵素の一つである SET domain, bifurcated 2 (SETDB2) の有意な上

昇を認めた。この SETDB2 はヒストン修飾に関わる酵素の中では H1N1 感染により唯一有意な発現上昇を認める酵素であった。H1N1 感染で死亡した患者の剖検肺の検討でも、気道上皮細胞やマクロファージに SETDB2 の発現が認められた。また、SETDB2 の上昇は type-I Interferon (IFN-I) 依存性で、IFN-I のレセプター欠損 (IFN- α R KO) マウスは、二次性細菌性肺炎の原因菌として最も頻度の高い肺炎球菌を用いて作成した二次性細菌性肺炎モデルでは、野生型 (WT) マウスと比較して有意な生存率の改善を認めた。H1N1 感染での SETDB2 の発現上昇は二次性細菌性肺炎に対する感受性のマーカーとなりうる事が示された。

D . 考察

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

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。

H1N1 感染での SETDB2 の発現上昇は二次性細菌性肺炎に対する感受性のマーカーとなりうる。

E . 結論

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

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

インフルエンザウィルス感染により產生される type-I Interferon によって誘導される SETDB2 は、インフルエンザウィルス感染後の二次性細菌性肺炎のターゲットと考えられた。

F . 研究発表

- 1 . 論文発表

- Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Matsutani H, Yodoi J, Morishima T. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. *Crit. care Med.* 2013; 41(1):171-181.
- Oshio T, Kawashima R, Kawamura YI, Hagiwara T, Mizutani N, Okada T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Matsukawa A, Haga T, Kakuta S, Iwakura Y, Hosokawa S, Dohi T. Chemokine receptor CCR8 is required for lipopolysaccharide-triggered cytokine production in mouse peritoneal macrophages. *PLoS One*. 2014 Apr 8;9(4):e94445
- Kuelling FA, Foley KT, Liu JJ, Liebenberg E, Sin AH, Matsukawa A, Lotz JC. The Anabolic Effect of Plasma-Mediated Ablation on the Intervertebral Disc: Stimulation of Proteoglycan and IL-8 Production. *Spine J.* 2014 Apr 18. pii: S1529-9430(14)00386-6.
- Xu Y, Ito T, Fushimi S, Takahashi S, Itakura J, Kimura R, Sato M, Mino M, Yoshimura A, Matsukawa A. Spred-2 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in mice. *PLoS One*. 2014 Oct 2;9(9):e108914
- MATSUKAWA A. Negative regulation of cytokine signaling in inflammation. The 5th International symposium for future technology creating better human health and society. March 15-16, 2012, Okayama (Invited Speaker)
- Ito T, Yoshimura A, Matsukawa A : Spred-2 negatively regulates influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia. 99th Annual Meeting, The American Association of Immunologists, May 4-8, 2012, Boston, USA
- 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）
- 板倉淳哉、伊藤利洋、佐藤美和、美野愛、伏見聰一郎、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）
- 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）
- 高橋索真、平岡佐規子、伏見聰一郎、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－ 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）

2. 学会発表

- 松川昭博：炎症の発現・制御におけるサイトカインシグナル伝達 第101回日本病理学会総会（企画招待講演） 2012年4月26-28日

- 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)
- 伊藤利洋、板倉淳哉、河原明奈、小田晋輔、伏見聰一郎、松川昭博：インフルエンザ(H1N1)感染症ならびに二次性細菌性肺炎のエピジェネティクス解析 第103回日本病理学会総会 2014.4.24-26. 広島
- 板倉淳哉、小田晋輔、河原明奈、佐藤美和、美野愛、伏見聰一郎、伊藤利洋，松川昭博:Spred2欠損マウスにおける敗血症抵抗性のメカニズム 第103回日本病理学会総会 2014.4.24-26. 広島

日本病理学会総会 2014.4.24-26.
広島

- 水田亮、伊藤利洋、板倉淳哉、伏見聰一郎、松川昭博：間質性肺炎モデルにおけるSpred-2の役割 第103回日本病理学会総会 2014.4.24-26. 広島

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 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学・学術研究員
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。インフルエンザの流行と肺炎のサーベイランスは非常に重要な課題である。

流行のサーベイランスとして全国の診療所を中心とした日本臨床内科医会インフルエンザ研究班によりインフルエンザ症例および肺炎症例を集積し、流行状況、肺炎の実態とリスクファクターについて検討を行なった。

各流行期における型・亜型の内訳は、2011-12年流行期A(H3N2)型72.9%、B型27.0%、2012-13年流行期A(H1N1)pdm09型0.8%、A(H3N2)型80.1%、B型19.2%、2013-14年流行期A(H1N1)pdm09型35.3%、A(H3N2)型19.1%、B型45.6%であり、それぞれ異なっていた。肺炎および入院の報告は、2011-12年、2012-13年、2013-14年流行期でそれぞれ0.9%、0.3%、0.3%であった。肺炎および入院患者は6歳の1例以外7例は全て70歳以上であった。肺炎あるいは入院の報告例8例中7例のウイルス型はA型で、亜型が判別出来た5例は全てH3N2型であった。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。

季節性インフルエンザの流行において、抗インフルエンザ薬による治療が開始されても、重症例が高齢者に少なからず、みられることが確認された。高齢者において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が高齢者にも多数の感染を起こす場合、重症例が非常に多くなる可能性があり、その対策が必要と思われる。

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つた。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つたが、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を参照し、重症化や肺炎について検討することを目的とする。

B. 研究方法

日本臨床内科医会インフルエンザ研究班の研究は、日本臨床内科医会に所属する全国の医療機関の中で研究への参加を希望した医療機関による研究である。その研究対象はインフルエンザを疑って迅速診断が実施された外来患者である。研究への協力について同意が得られた患者について、迅速診断の結果が陽性、陰性に関わらず原則としてウイルスの分離とPCR法によるインフルエンザウイルス検出が実施されている。検体として

は鼻腔拭い液、咽頭拭い液、鼻腔吸引液、鼻汁・鼻かみ液を用い、ウイルス分離は標準的な方法でMDCK 細胞を用いて実施している。PCR には、H1N1pdm09 および季節性インフルエンザの AH1N1、AH3N2、B、それぞれのインフルエンザウイルスに特異的なプライマーを用いている。入院や肺炎に関する情報は、主として患者本人及び家族よりの聞き取りによって行われている。

(倫理面への配慮)

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

C . 研究結果

2011-12 年流行期に登録されたインフルエンザ患者は A 型が 340 例、B 型が 126 例であった。A 型は全例 H3N2 型で A (H1N1) pdm09 はみられなかった。2012-13 年流行期は A (H3N2) が 340 例、B 型が 126 例で、A (H1N1) pdm09 は 5 例であった。2013-14 年流行期は A(H1N1)pdm09 型 218 例、A (H3N2) 型 118 例、B 型 282 例であった。患者の年齢分布は(図 1) 2011-12 年流行期は 20 歳未満が多く、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 歳以上の患者が多くかった。2013-14 年流行期は A (H1N1) pdm09 で 30 歳以上の患者が多く、B 型は 20 歳未満が多くかった。この 3 つの流行期において流行するインフルエンザの型・亜型の割合やそれぞれの患者の年齢分布は毎年変化していた。

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。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。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。2013-14 年流行期は肺炎の報告が 2 例あり、80 歳以上の女性で A 型と B 型それぞれ 1 例であった。肺炎および入院の全体での割合は、2011-12 年、2012-13 年、2013-14 年流行期でそれぞれ 0.9%、0.3%、0.3% であったが、70 歳以上の年齢層での発生率は高かった。

福岡県におけるインフルエンザ入院サーベランスでは、ICU 入室や人工呼吸器の利用は 1 才から 9 才と 70 才以上に集中していた。

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る。しかし、日本臨床内科医会インフルエンザ研究班の調査で、肺炎や入院の報告は少数ながら毎年みられている。肺炎および入院の全体での割合は、2011-12 年、2012-13 年、2013-14 年流行期でそれぞれ 0.9%、0.3%、0.3% と高くはなかったが、年齢をみると 6 歳の小児例を除く全員が 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くな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。3 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つたが、慢性呼吸器疾患、とくに気管支喘息が 4 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。

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。

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、高齢者に多数の患者が発生すると、そこから多数の肺炎発症者がいる可能性があり、その頻度は 5 % を越える可能性が高いと考えられる。その対策としての病床の確保と 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充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が重症インフルエンザ対策上で最も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. et al., The post-infection outcomes of influenza and acute respiratory infection in patients above 50 years of age in Japan: an observational study. *Influenza Other Respi Viruses*, 2012; 6(3):211-7.

Kawai, N. et al., Persistence of pandemic influenza H1N1 virus in young patients after oseltamivir therapy in the 2009-2010 season: a comparison with seasonal H1N1 with or without H275Y mutation. *J Infect Chemother*, 2012; 18(2):180-6.

Kawai, N. et al., Increased symptom severity but unchanged neuraminidase inhibitor effectiveness for A(H1N1)pdm09 in the 2010-2011 season: comparison with the previous season and with seasonal A(H3N2) and B. *Influenza Other Respi Viruses*, 2013; 7(3):448-55.

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 . 日本臨床内科医会会誌 27 卷 2 号臨時付録 1-49 , 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 . 日本臨床内科医会会誌 28 卷 2 号臨時付録 1-48 , 2013

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 2014-2015 年シーズン版 . 日本臨床内科医会会誌 29 卷 2 号臨時付録 1-49 , 2014

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 日本国学会講演会 (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

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 回日本化學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 回日本化學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

池松秀之. 第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 (岡山) 、 2014.10.23-24

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

図1. 各年代における各型の患者数

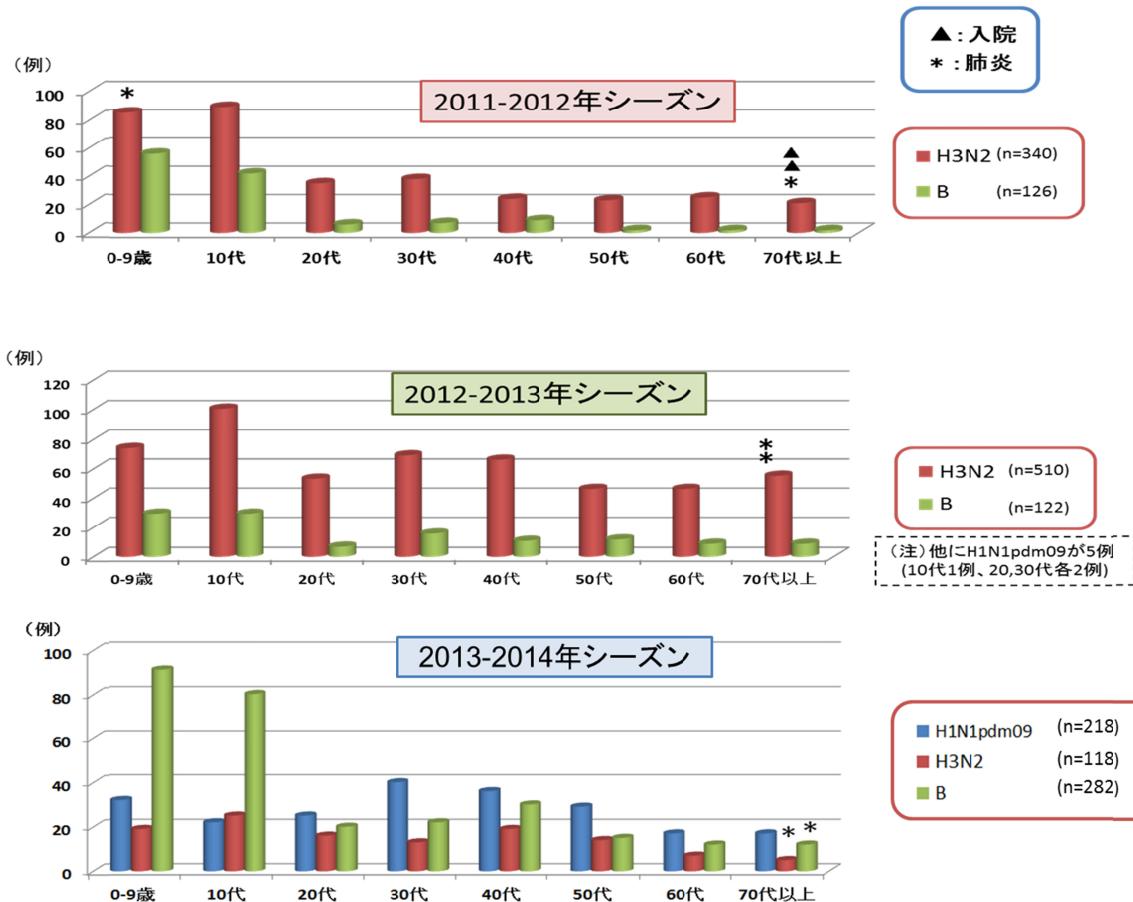


表1 各流行期における肺炎合併例および入院例

流行期	年齢	性	型・ 亜型	体重 (kg)	合併 症	転帰	発症 から 治療 開始 薬 まで		CRP	WBC	昨年 罹患	ワク チン		基礎疾患
							昨年	今年				なし	なし	
2011-12年	6	F	A/H3	23	肺炎	外来治癒	L	27hr				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
2012-13年	82	F	A/H3	67		入院治癒	P	2.5hr	1.6	7000	なし	1回	2回	気管支喘息
	85	M	A/H3	40	肺炎	外来治癒	P	24hr	13.2	12100	なし	なし	なし	気管支喘息 COPD
	70	M	A	81	肺炎	外来治癒	O	22hr			なし	1回	なし	なし
2013-14年	85	F	A	43	肺炎	入院治癒	P	17hr			なし	なし	なし	気管支喘息
	84	F	B	32	肺炎	外来治癒	O	28hr	23	6700	なし	1回	1回	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

単位:人

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	2	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	8
	2013年	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	3	5	12
	2014年	0	6	4	0	0	0	1	0	2	0	2	3	18
人工呼吸器 の利用	2012年	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3
	2013年	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	3
	2014年	0	1	0	0	0	0	1	0	1	2	1	2	8
インフルエンザ 入院全体数	2012年	21	83	43	16	9	4	5	6	11	21	52	79	350
	2013年	19	52	14	8	1	1	4	4	11	12	20	40	186
	2014年	28	92	56	17	4	2	10	6	7	13	25	69	329

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～2014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。

2014年1月から12月までに、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つ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は計19例で、2007年から2013年までの29例に加え、計48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。

対象48例中、35例(72.9%)は5類感染症法としての届出があり、うち60.0%は川崎市健康安全研究所で検査を実施されていた。とくに2014年は、全例に病原体検索を実施されていた。対象の男女比は1.3:1.0で、小児が37例(5歳未満20例)と成人(11例)の3.4倍であった。検査実施数は年々増加しているものの25例(50.0%)は病原体不明で、うち17例は病原体検索を試みたが原因を特定することができなかった。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7月と9月に多かった。病原体検索が未実施の例も含めると、推定原因としてはインフルエンザウイルスが7例と最も多かったが、このうち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7例中2例は死亡し、4例は転帰が不明であった。髄液を採取した34例(70.8%)のうち、PCR検査もしくは培養で陽性となつたのは剖検1例を含む6例(17.6%)のみであった。特殊な例として、コクサッキーウィルスA2型による脳炎の突然死1例(剖検例)とパルボウイルスB19型による基礎疾患(遺伝性球状赤血球症)のある脳炎発症例1例を認めた。川崎市における急性脳炎・脳症の届出数の対人口比は全国を上回って増加しており、これをもとに全国の届出数を推計すると、2014年は1653件と実際の届出数の3.6倍に上り、把握されていない多くの脳炎・脳症の症例が存在することが示唆される。

全体像の把握とともに、原因不明の病原体についてはさらに原因を特定するための検査を行い、病原体検索を含めた情報を収集することが重要である。また、届出疾患であるとの周知徹底とともに積極的に経過を調査して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が多い。

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 2014 年までの 8 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 48 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。また、川崎市内の急性脳炎届出数を全国の届出数と比較検討した。

（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 48 例中、35 例（72.9%）は 5 類感染症法として NESID に届出があり、うち 21 例（60.0%）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（図 1）。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 13

例(27.1%)あった。

年齢別、性別の内訳は、男27例、女21例(男女比1.3:1.0)で、年齢中央値は7歳(0カ月~83歳)であった(図2)。発症は小児が37例(男23例、女14例)と、成人11例(男4例、女7例)の3.4倍であり、主に5歳未満が20例(男9例、女11例)と多かった。

検査実施数は年々増加しているものの、25例(50.0%)は病原体が不明であった。うち17例(68.0%)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(表1)。

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7月と9月に多かった。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。病原体検索が未実施の例も含めると、推定原因としてはインフルエンザウイルスが7例と最も多かったが、このうち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)。インフルエンザの7例中2例は死亡し、4例は転帰が不明であった。

検体として髄液を採取されたのは34例(70.8%)で、このうちPCR検査もしくは培養で陽性となったのは6例(17.6%)のみであった(表3)。

特殊な例として、コクサッキーウィルスA2型による脳炎の突然死1例とパルボウイルスB19型による基礎疾患のある脳炎発症例1例を認めた。コクサッキーウィルスA2型による突然死例では、剖検時に髄液、血液、咽頭拭い液、鼻腔拭い液、便、尿を採取し、PCR検査を実施され、尿を除くすべての検体でコクサッキーウィルスA2型が陽性であった。本症例は、剖検を実施した医師から届出がなされたという稀な事例であった。パルボウイルスB19型による脳炎例は、基礎疾患に遺伝性球状赤血球症を持

ち、採取された髄液、血清、咽頭拭い液すべての検体で、PCR検査の結果パルボウイルスB19型が陽性であった。

川崎市における急性脳炎・脳症の届出数は、2010年以降年々増加しており、対人口比も同様に増加が見られる(図3)。川崎市の届出数の対人口比をもとに全国の届出数を推計すると、2014年は1653件と実際の459件の3.6倍となった。

D. 考察

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。しかしながら、国の発生動向調査として把握できていたのは全体の72.9%に留まり、検査は実施されたものの届出のなかった症例が27.1%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。NESIDに届出のあった症例のうち、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60.0%であったが、とくに2013年から2014年にかけては届出とともに積極的に病原体検出が試みられており、市内における届出の周知が徹底してきたと考えられる。

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3.4倍であり、5歳未満児が全体の41.7%を占めていた。全年齢層における男女差は1.3:1.0とやや男性が多かったが、小児では1.6:1.0と男児の割合が多く、急性脳炎・脳症が男児に多いとの報告と一致していた。

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7～9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。コクサッキーウィルスを原因とする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25例(50.0%)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7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。さらに原因不明の病原体については、原因を特定するための検査を実施し、今後の治療や予防に結びつけることが重要である。また、4例は転帰が不明であったため、予後の把握のためにも、経過に関する情報を収集するシステムも必要と考えられた。

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、髄液を採取した34例中わずか6例(17.6%)であった。急性脳炎や脳症の場合、必ずしも髄液中に病原体が存在するとは限らず、便検体など他の複数の部位からの検体の採取が重要であることが示された。

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る。基礎疾患を有する重症例の把握のためには、収集すべき情報の内容についても検討が必要である。

川崎市においては、急性脳炎・脳症の届出数は2010年以降年々増加しており、とくに2013年以降は飛躍的に増加している。さらに、2013年11月に厚生労働省健康局結核感染症課より事務連絡「日本脳炎及び予防接種後を含む急性脳炎・脳症等の実態把握について」が発出され、原因不明の急性脳炎・脳症の病因解明のための積極的な病原体検索の実施が市内の各保健所及び健康安全研究所に周知され、届出と病原体検索の双方を積極的にすすめているところである。川崎市の人口は全国のほぼ1.1%で、2007年より変化がみられないが、脳炎・脳症の届出数の対人口比は全国を上回って増加している。川崎市の届出数の対人口比をもとに全国の届出数を推計すると、2014年は1653件と実際の届出数の3倍以上となり、把握されていない多くの脳炎・脳症の症例が存在することが示唆される。全体像を把握し、今後の治療や予防に役立てるためには、さらに正確な発生数の把握と病原体検索の実施が必須と考えられる。

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をより積極的に収集する必要がある。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、さらに病原体を追求するため

の手段を検討し、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 . 岡部信彦: 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 immunochemical 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

- 1 . 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
- 2 . Takako Misaki, Takahiro Oshima, Aya Maruyama, and Nobuhiko Okabe. Acute Encephalitis and Encephalopathy surveillance in Kawasaki city. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 2015/5/14-17. Taipei (予定)

G . 知的所有権の取得状況

なし

	NESID	NESID/ 病原体検出	病原体検出	計
男	6	12	9	27
女	8	9	4	21
計	14	21	13	48

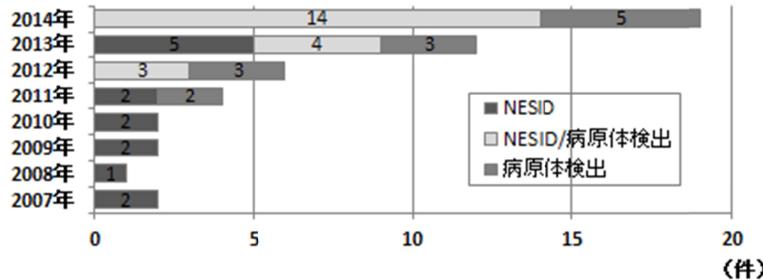


図1 2007年～2014年 急性脳炎・脳症届出方法別の発生数
NESID: 感染症サーベイランスシステム

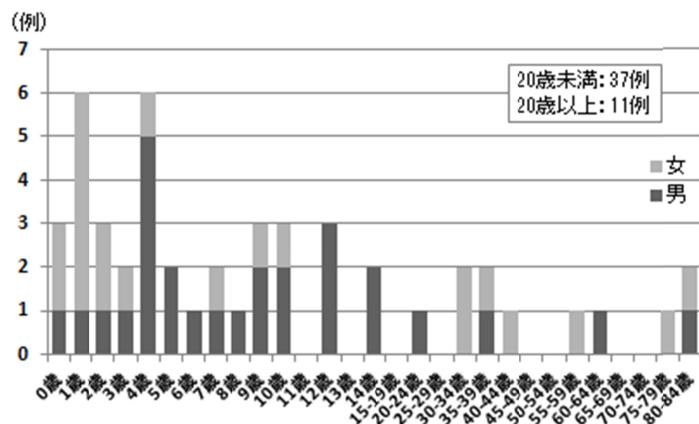


図2 2007年～2014年 急性脳炎・脳症 年齢別性別発生状況(n=48)
年齢中央値7歳(0ヶ月～83歳)

表1 2007年～2014年 急性脳炎・脳症月別推定原因の内訳(n=48)

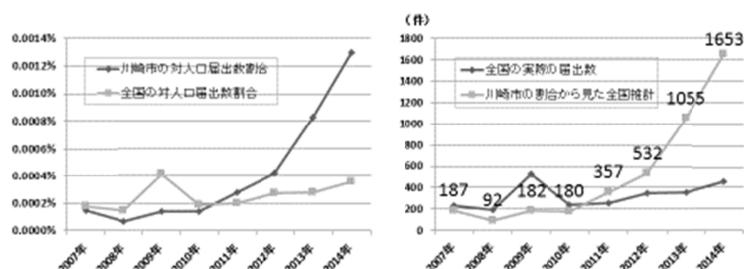
	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	総計
インフルエンザウイルスA型(A/H1 pdm)	1												1
インフルエンザウイルスB型(山形系統)	2												2
单纯ヘルペスウイルス		1					1						2
ヘルペスウイルス6型				1			1		2				4
ヘルペスウイルス7型					1						1	1	3
EBウイルス				1									1
サイトメガロウイルス	3		1					1					5
アデノウイルス56型								1					1
コクサッキーウイルスA2型						1							1
コクサッキーウイルスB3型											1	1	
パルボウイルスB19型							1						1
A群ロタウイルス			1										1
陰性	3	1	1	1	1	2	2	2	2	2			17
不明(検査未実施)	1	1	1				1	1		2	1	8	
総計	7	6	3	4	2	3	6	3	6	2	3	3	48

表2 2007年～2014年 急性脳炎・脳症 インフルエンザ推定例(n=7)

年	月	年齢	性別	原因	転帰	備考
2009	1	4	男	A型インフルエンザ	死亡	病原体診断なし 発病当日に死亡
2009	7	7	男	インフルエンザ (A/H1 pdm)	不明	病原体診断なし
2011	2	4	男	A型インフルエンザ	不明	病原体診断なし
2013	2	75	女	インフルエンザ	死亡	迅速診断キットでA型陽性 咽頭拭い液のPCR検査陰性 肺炎、肺膿瘍を合併(血液、痰、尿より ブドウ球菌検出) 糖尿病(未治療)
2014	1	5	男	A型(A/H1 pdm)	回復	咽頭拭い液PCR検査陽性
2014	1	6	男	B型(山形系統)	不明	膿液(陰性)、咽頭拭い液PCR検査陽性
2014	1	80	男	B型(山形系統)	不明	鼻汁PCR検査陽性

表3 2007年～2014年 急性脳炎・脳症 年別検体採取部位(n=48)

検体採取部位	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年	2013年	2014年	総計
膿液、咽頭拭い液、血液、糞便、尿、鼻腔拭い液							1		1
膿液、咽頭拭い液、血清、糞便						1	1		4 6
膿液、咽頭拭い液、血清、鼻汁									1 1
膿液、咽頭拭い液、血清									4 4
膿液、咽頭拭い液、便						1	5	2	8
膿液、咽頭拭い液					1				3 4
膿液、血清							1	3	4
膿液							5	1	6
咽頭拭い液、血清、直腸拭い液						1			1
咽頭拭い液、血清							1		1
咽頭拭い液							1	1	2
血清								1	1
鼻汁								1	1
不明	2	1	2	1	1		1		8
総計	2	1	2	2	4	6	12	19	48



	2007年	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年	2013年	2014年
川崎市急性脳炎・脳症届出数	2	1	2	2	4	6	12	19
全国急性脳炎・脳症届出数	228	192	526	242	258	349	358	459
川崎市人口	1369443	1390270	1400558	1425512	1430773	1439164	1448196	1461043
全国人口	128033000	128064000	128032000	128057000	127799000	127515000	127298000	127131800

図3 2007年～2014年 急性脳炎・脳症届出数と全国推計

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

**感染症発生動向調査に基づいた 2012/2013、2013/2014、2014/2015
各シーズンのインフルエンザの発生動向と海外論文の検討**

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・室長

研究協力者 安井良則 大阪府済生会中津病院臨床教育部・部長

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・室長

研究協力者 奥野英雄 国立感染症研究所感染症疫学センター・研究員

研究要旨

2012/2013、2013/2014、2014/2015 の 3 シーズンのインフルエンザの流行状況について、感染症発生動向調査(インフルエンザ定点サーベイランス、基幹定点からの入院サーベイランス、急性脳炎(脳症を含む)のサーベイランスのうちインフルエンザを原因として届けられたもの、病原体検出情報)に基づいた解析結果について記述した(2015 年第 8 週まで)。2012/2013 シーズンは定点当たり報告数が最多となったのは 2013 年第 4 週であり、累積の推計受診患者数は約 1,370 万人、AH3 亜型が流行の中心であり、入院サーベイランスからの報告数は 10,373 人であった。2013/2014 シーズンは定点当たり報告数が最多となったのは 2014 年第 4 週であり、AH1pdm が検出されたウイルスで最多を占め、累積の推計受診患者数は約 1,572 万人と 3 シーズン中では最多である一方で入院サーベイランスの報告数は 9,903 人と最少であった。2014/2015 シーズン(2015 年第 8 週まで)は 2015 年第 4 週の定点当たり報告数がこれまでのところ最多であり、検出ウイルスの大半が AH3 亜型、累積の推計受診患者数は約 1,344 万人、入院サーベイランスからの報告数は 10,828 人であった。2012/2013～2014/2015 シーズン(2015 年第 8 週まで)の期間中に感染症発生動向調査に急性脳炎(脳症を含む)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 253 人(2012/2013 64 人、2013/2014 96 人、2014/2015 93 人(暫定値))であり、男性 148 人、女性 105 人であった。年齢中央値は 8 歳(0～90 歳)であり、10 歳未満の報告が半数以上を占めていた。また、2014/15 シーズンは、米国の季節性インフルエンザワクチンならびに抗ウイルス薬の考え方について情報収集し、国内状況と比較した。インフルエンザの流行の規模と重症例の数は必ずしも一致していないが、これは年齢群別のインフルエンザの発生状況や、流行の中心となるインフルエンザウイルスの亜型等も重症例の増加に関連している可能性がある。入院サーベイランスによって、重症例の発生状況をより正確に把握できるようになることが望まれる。

A . 研究の背景と目的

1999年4月より全国約5,000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）から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ている。国立感染症研究所感染症疫学センターではデータ集計を行い、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きた。急性脳炎（脳症を含む）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箇所の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。

これらのこととふまえ、インフルエンザの流行状況と重症例の発生の関連の解明に資することを目的として、本稿では2012/2013、2013/2014および2014/2015シーズン（2015年第8週まで）のインフルエンザの流行状況、入院サーベイランスの集計と解析結果、インフルエンザ脳症（急性脳炎（脳症を含む）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）の発生動向について報告する。

B . 研究方法

全国約5,000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、国立感染症研究所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、2012/2013、2013/2014、

2014/2015（2015年第8週まで）の各シーズン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情報からインフルエンザウイルス分離・検出報告についての集計・解析を行った。

インフルエンザに関連する入院例については、2012/2013、2013/2014、2014/2015（2015年第8週まで）の各シーズン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。

インフルエンザ脳症に関しては、急性脳炎（脳症を含む）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。

米国の状況については、Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) – United States, 2014-15 Influenza Season . MMWR. Antiviral Drugs . Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP): Information for Health Care Professionals. Vaccine Effectiveness - How Well Does the Flu Vaccine Work? Questions & Answers を翻訳し情報収集を行った。

C . 研究結果

1) 2012/2013シーズンのインフルエンザの発生動向について：

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

2013 年第 4 週に定点当たり報告数は 36.44 (患者報告数 180,085) と最高値となり、1.0 を下回ったのは 2013 年第 22 週(定点当たり報告数 0.70)であった(図 1)。2012 年第 36 週～2013 年第 21 週までの累積の推計受診患者数は約 1,370 万人であった。

全国の地方衛生研究所より 2012/2013 シーズンに患者由来検体より検出されたインフルエンザウイルスの報告数は 6,583 件であり、そのうち AH3 亜型が 76%と最も多く、次いで B 型 21%、AH1pdm 2%であった。B 型では山形系統とピクトリア系統の比は 7:3 であった。

全国約 500 箇所の基幹定点医療機関にインフルエンザによる入院例の報告に基づく入院サーベイランスでは、10,373 人の入院報告があり、60 歳以上が約 57%を占めていた。

2) 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:

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。その後 2014 年第 5 週に定点当たり報告数は 34.44 (患者報告数 170,403) と 2013/2014 シーズンの最高値となった。定点当たり報告数が 1.0 を下回ったのは 2014 年第 20 週 (定点当たり報告数 0.83) であった(図 1)。2013 年第 36 週～2014 年第 21 週までの累積の推計受診患者数は約 1,572 万人であった。

全国の地方衛生研究所より 2013/2014 シーズンに患者由来検体より検出されたインフルエンザウイルスの報告数は 8,230 件で

あり、前シーズンはわずか 2%であった AH1pdm が 43%と最多となり、次いで B 型 36%、AH3 亜型 21%であった。B 型では山形系統とピクトリア系統の比は 7:3 であった。

インフルエンザの入院サーベイランスでは 9,903 人の入院報告があり、60 歳以上の割合は 40.6%と前シーズンより大幅に減少する一方で、14 歳以下の入院割合は 46.3%と前シーズンよりも 15%近い増加がみられた。

3) 2014/2015 シーズンのインフルエンザの発生動向(暫定値)について:

インフルエンザの定点当たり報告数は、2014 年第 43 週以降継続的に増加し、前シーズン (2013/2014 シーズン) より 3 週間早い 2014 年第 48 週に全国的な流行開始の指標である 1.00 を上回って 1.90 となった。その後定点当たり報告数は急増して第 52 週には 26.63 (患者報告数 130,971) と高い値となり、2015 年第 1 週は一旦減少がみられたもののその後再び増加して 2015 年第 4 週に 39.42 (患者報告数 195,025) と最高値となった (2015 年第 8 週現在)。2015 年第 8 週現在、インフルエンザの定点当たり報告数は 8.26 (患者報告数 40,817) となっている(図 1)。

2014 年第 36 週～2015 年第 8 週までの累積の推計受診患者数は約 1,344 万人であった。14 歳以下の年齢群の割合は 41.7%であり、2013/2014 シーズン (51.3%) よりも大幅に減少していた。

2014 年第 36 ～ 2015 年第 8 週までに国内では 3,767 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/H3N2 が 95.5%、B 型 3.8%、A/H1N1pdm 0.7%の順となってい

て、これまでのところ患者由来検体から検出されたウイルスの大半が A/H3N2 である。なお、検出されている B 型インフルエンザウイルスの 90%以上が山形系統である。

インフルエンザの入院サーベイランスでは 10,828 人と既に過去 2 シーズンを上回る入院報告数があり、60 歳以上の割合は 61.7% とこちらも過去 2 シーズンよりも高年齢者の入院割合が高くなっている。

4) 感染症発生動向調査による2012/2013～2014/2015シーズンのインフルエンザ脳症の報告について(暫定値)：

2012/2013～2014/2015シーズン(2015年第8週まで：暫定値)の期間中に感染症発生動向調査に急性脳炎(脳症を含む)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、253人(2012/2013 64人、2013/2014 96人、2014/2015 93人(暫定値))であった。性別は男性148人、女性105人であり男女比は1.4:1であった。年齢中央値は8歳(0～90歳)であり、シーズンごとの年齢分布を比較すると、各シーズンとともに、10歳未満の報告が半数以上を占めていた(図2)。また、60歳以上の報告の割合は、2012/2013シーズン23.4%、2013/2014シーズン15.6%、2014/2015シーズン17.2%であり、2012/2013シーズンでやや多かった(図3)。

型別割合は各シーズンに流行した型別割合と一致していた(図4)。

5) 基幹定点から報告されたインフルエンザ入院サーベイランスに基づく ICU 入室、人工呼吸器の使用、頭部の検査実施報告について：

2012/2013、2013/2014、2014/2015 シ

ーズンのいずれも 2 年目の第 8 週までの累積(暫定値)で比較した。ICU 入室報告数はそれぞれ、271 人、244 人、344 人であった。年齢別では、1～4 歳群は 2013/2014 シーズンに多く、80 歳以上は 2014/2015 シーズンに多かった(図5)。人工呼吸器の利用はそれぞれ 167 人、176 人、268 人であった。年齢別では、1～4 歳群は 2013/2014 シーズンに多く、60 歳以上は 2014/2015 シーズンに多かった(図6)。頭部検査(CT、MRI、脳波検査のいずれか)の実施はそれぞれ 746 人、618 人、1124 人であった。年齢別では、1～4 歳群と 80 歳以上に多いが 2013/2014 シーズンは最も少なかった(図7)。

6) 米国CDCの季節性インフルエンザワクチン、抗ウイルス薬に関する情報収集

2014/15シーズンのACIPの勧告についてワクチンと抗ウイルス薬についてホームページ等から情報収集した結果、今シーズンでの改訂点は1)米国の季節性インフルエンザワクチンの抗原組成；2)季節性インフルエンザワクチンについて、前シーズンとウイルス株が同じで前シーズンの季節性インフルエンザワクチンの接種を1回以上受けたことのある生後6ヶ月～8歳の小児では、1回接種が推奨されていた。3)弱毒化インフルエンザ生ワクチン(LAIV)が直ちに利用可能な場合、可能な限り2014/15シーズンに健康な2～8歳の小児に対する優先的な使用を実施すること。が記載されていた。季節性インフルエンザワクチンに対する一般の人向けのQ&Aで“efficacy”と“effectiveness”的違いや、疫学研究の結果の見方などについてわかりやすく解説がなされていた。抗ウイルス薬については、これまでオセルタ

ミビルとザナミビルだけが推奨されていたが、2014年12月19日に、米国FDAが成人での治療薬としてペラミビルを承認したことが報告された。抗ウイルス薬は、インフルエンザワクチンの重要な補助薬剤としての位置づけで記載されていた。

D . 考察

今シーズンを含めた過去 3 シーズン（2012/2013、2013/2014、2014/2015 シーズン：2015 年第 8 週まで）におけるインフルエンザの患者発生状況、インフルエンザウイルスの検出状況、入院サーベイランス、インフルエンザ脳症の発生動向についてまとめて記述した。

3 シーズン共に 12 月までにインフルエンザの定点当たり報告数が流行開始の指標となる 1.0 を超え、翌年の第 4 週もしくは第 5 週が流行のピークとなっていた。これは、A 型インフルエンザの流行のピークと一致していた。

累積の推計受診患者数は 2013/2014 シーズンが約 1,572 万人と 3 シーズンの中では最多（2014/2015 シーズンは 2015 年第 8 週までのデータ）であったが、入院サーベイランスによる報告数は 1 万人未満で最も少なく、インフルエンザの流行の規模と重症例の報告数は必ずしも一致していなかった。これは年齢群別のインフルエンザの発生状況や、同じ A 型であっても流行の中心となるインフルエンザウイルスの亜型がどちらであるか等も重症例の増加に関連していると考えられた。

なお、入院サーベイランスは全国約 500 箇所の基幹病院定点からの報告に基づいたデータを解析したものであり、この医療機

関数では各シーズンにおいてインフルエンザ患者のうち何人が入院を要し、またどの程度の重症患者が発生しているのかを推定することはできない。しかし、シーズン毎のトレンドを見たり、流行する亜型や規模の大きさにより、ICU 入室、人工呼吸器の使用、頭部検査の実施、年齢群の比較には有益な情報が得られた。

インフルエンザ脳症の報告数は、AH3亜型が流行の中心であった2012/2013シーズンと2014/2015シーズンに多く、AH1pdm09が流行の中心であった2013/2014シーズンは少なかった。2014/2015シーズンについては、ピークを過ぎていることから今後増加する可能性は少ないと考えられるが、まだシーズンは終わっていないため、B型を含めた今後の動向を観察する必要がある。

米国では、抗ウイルス薬はインフルエンザワクチンの重要な補助薬剤としての位置づけであること、生ワクチンも使用されていること、前シーズンとワクチン株が同じ場合の小児の接種回数に対する考え方がわが国とは異なっていた。

E . 結論

- ・2012/2013、2013/2014、2014/2015 の各 3 シーズンは全て A 型インフルエンザが流行の中心であり、12 月までに流行が開始となり、翌年の第 4 週または第 5 週がピークであった。
- ・累積の推計受診者数は 3 シーズン共に 1000 万人を上回り、2013/2014 が最多であった。
- ・入院サーベイランスによる報告数は 2014/2015 が最多であった。
- ・入院サーベイランスにより、流行した亜

型の違いや流行規模の違いにより、ICU 入室、人工呼吸器の使用、頭部検査の実施数や年齢分布に違いが認められた。

・人工呼吸器の使用が1~4歳群で多かった
2013/2014はAH1pdm09亜型が流行の中心であった。

・インフルエンザ脳症の報告数は2012/2013~2014/2015シーズン(2015年第8週)までに合計253人(暫定値)が報告されており、各シーズン共に10歳未満の報告が半数以上を占めた。

・インフルエンザ脳症はAH3亜型が流行の中であったシーズンはAH1pdm09が流行の中であったシーズンより多く報告された。

・米国の季節性インフルエンザワクチン、抗ウイルス薬についての考え方についてホ

ームページ等から情報収集した。

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

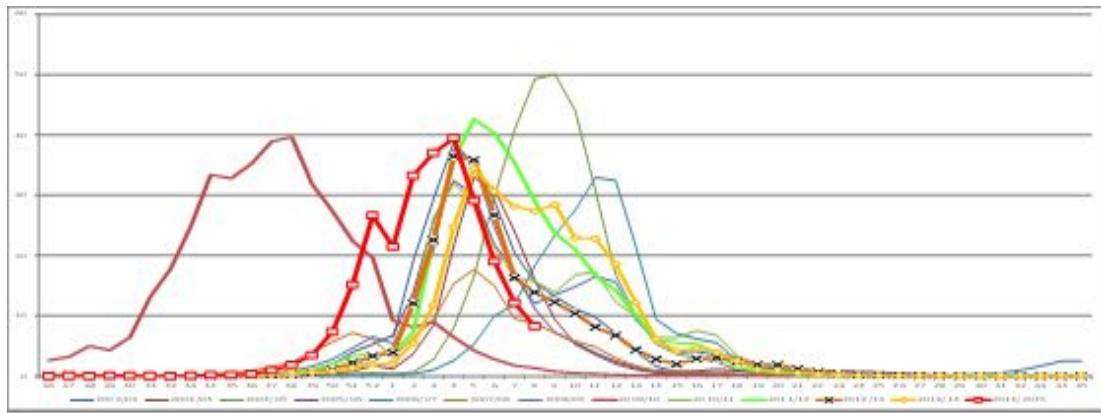


図1. 2002/2003シーズン～2014/2015シーズンインフルエンザ定点当たり報告数週別推移（2014/2015シーズンは2015年第8週まで；暫定値）

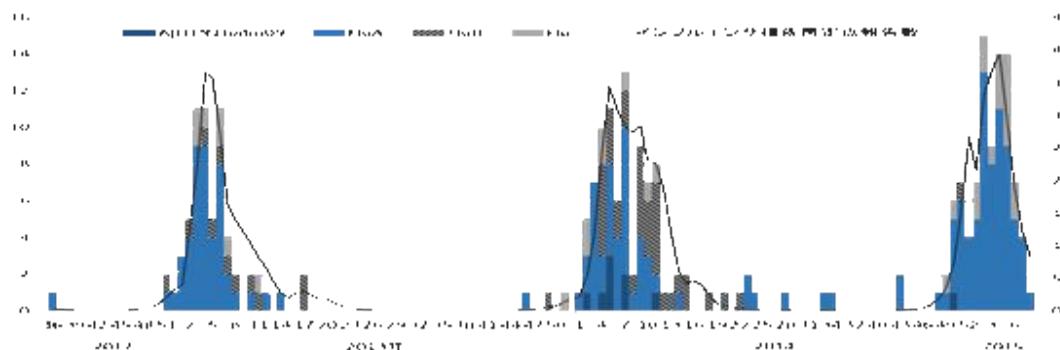


図2 2012/2013～2014/2015シーズンのインフルエンザ脳症報告数およびインフルエンザ定点あたり報告数週別推移（2012年第36週～2015年第8週まで；暫定値）

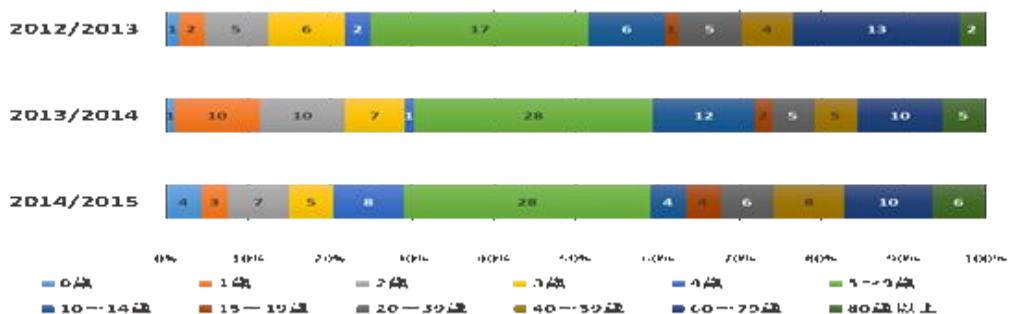


図3 インフルエンザ脳症発生報告年齢別割合グラフ(2012/2013～2014/2015シーズン:2015年第8週まで；暫定値)

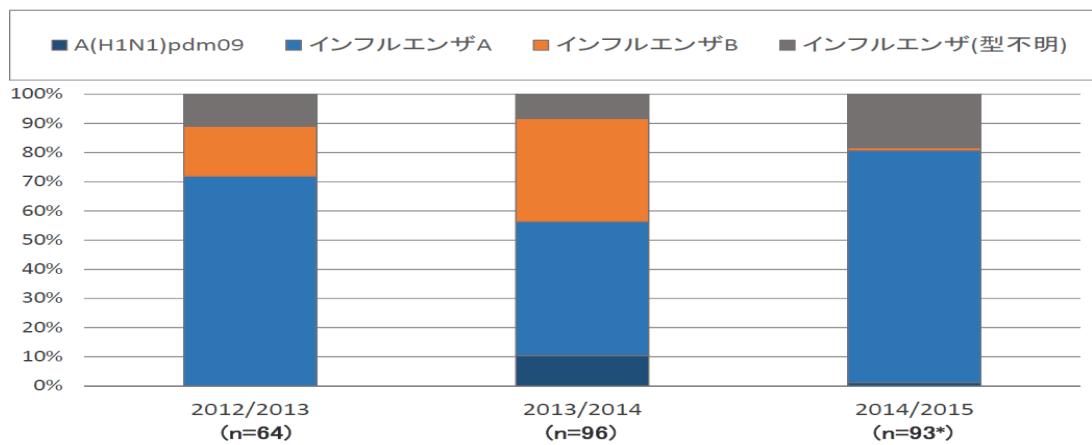


図 4 インフルエンザ脳症発生報告ウイルス型別割合(2012/2013 ~ 2014/2015 シーズン:2015 年第 8 週まで ; 暫定値)

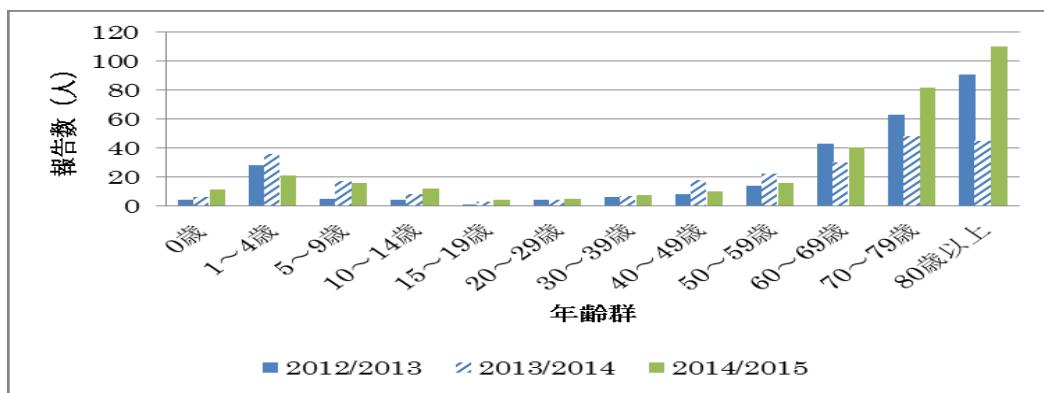


図.5 年齢群別 ICU 入室患者報告数 (2012/2013 ~ 2014/2015 シーズン:2015 年第 8 週まで ; 暫定値)

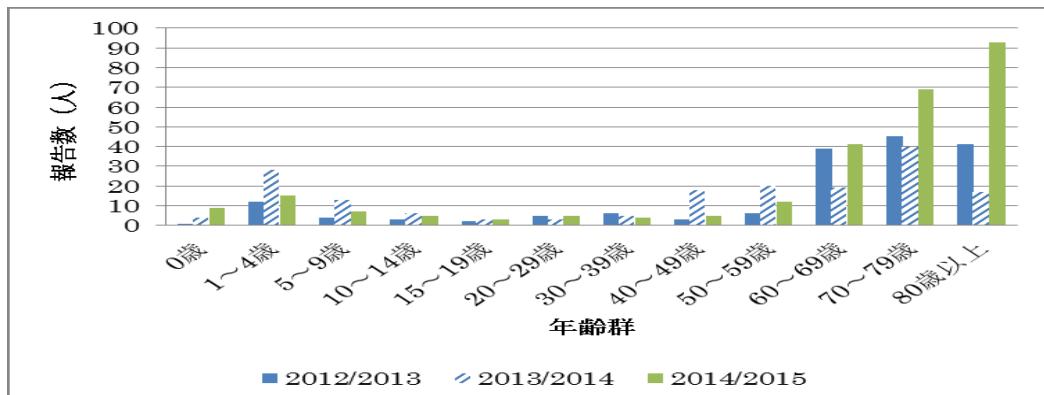


図.6 年齢群別人工呼吸器利用患者報告数 (2012/2013 ~ 2014/2015 シーズン:2015 年第 8 週まで ; 暫定値)

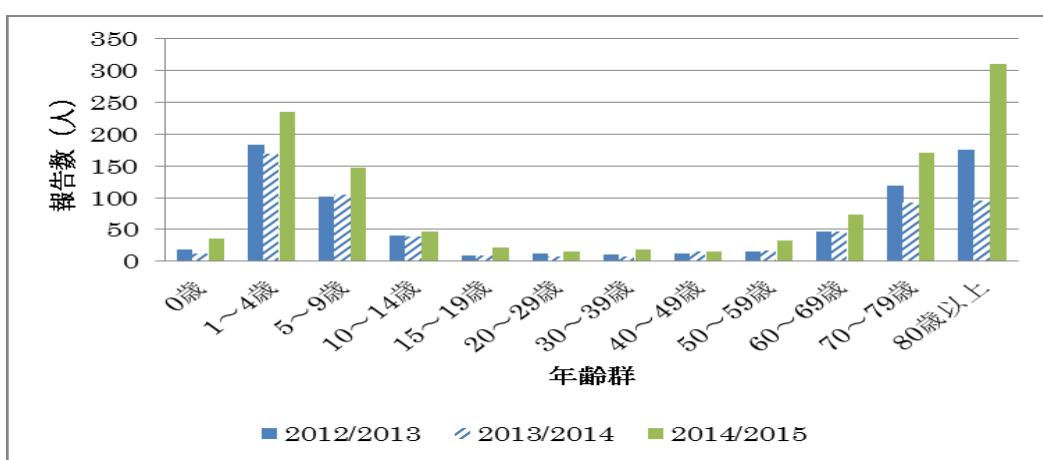


図.7 年齢群別頭部検査（CT、MRI、脳波）実施報告数（2012/2013～2014/2015 シーズン:2015年第8週まで；暫定値）

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

インフルエンザ脳症の診断および治療に関する研究

研究分担者 奥村彰久 愛知医科大学医学部小児科・教授

研究要旨

インフルエンザ脳症は軽症のものから重症のものまで幅広く、その病態は多様である。したがって、その診断・および治療についても多角的に検討する必要がある。我々は3つの研究を並行して行った。インフルエンザ脳症の実態調査では、過去5年間のインフルエンザ脳症の臨床像は従来と大きな変化がないことを確認できた。また、死亡例では急激な症状の悪化が共通していた。抗神経抗体の検出法の検討では、凍結ラット脳切片を用いた免疫染色と培養ラットニューロンを用いた免疫染色とが有用性が高いことが明らかになった。急性脳症のけいれんに対するホスフェニトインの効果の検討では、ホスフェニトインは有効率が高く有害事象が少ないことが明らかになり、急性脳症の治療の重要な選択肢になりえると思われた。

A . 研究目的

インフルエンザ脳症は軽症のものから重症のものまで幅広く、その病態は多様である。したがって、その診断・および治療についても多角的に検討する必要がある。

インフルエンザ脳症は流行したインフルエンザウイルスの株によって臨床像が変化することが経験的に知られている。2009年にいわゆる新型インフルエンザ（FluA 2009pdm）が大流行し、そのためインフルエンザ脳症の臨床像が影響を受けた可能性がある。我々は、東海小児神経研究会に集積したデータを用いて09/10シーズン以降のインフルエンザ脳症の実態を調査した。

近年、急性脳炎・脳症における抗神経抗体の関与が注目されている。特に精神症状

が特徴的である辺縁系脳炎については、抗神経抗体が関与することが明らかになりつつある。抗神経抗体の検出法のスタンダードは、培養細胞に標的となる抗原分子を発現させてそれに対する抗体を検出するcell-based assay (CBA) である。しかし、CBAを実施できる施設は限られている。我々は、より簡便な方法により抗神経抗体の検出を試み、検出法間の相関を解析した。

急性脳症の治療においてけいれんの効果的な抑制は、興奮毒性による二次的な神経細胞障害を防ぎ神経学的予後を改善するために重要である。フェニトイン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、小児に対して使用し難い。ホスフェニトイイン(fPHT)は、PHTのプロドラッグでこれらの問題が起きにくく、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

1 . インフルエンザ脳症の実態調査

本研究は、東海小児神経研究会のデータベースに登録されている患者情報から、09/10シーズンから 2013-14 シーズンまでの 5 シーズンに発生したインフルエンザ脳症のデータの提供を受けて検討した。東海小児神経研究会は、愛知県 4 大学小児科およびその関連病院が参加している急性脳炎・脳症の研究組織であり、毎年調査票を用いて急性脳炎・脳症の症例の登録を行っている。症例の妥当性については、毎年研究会を行って討論を行って検証している。

2 . 抗神経抗体の検出法の検討

82 例の自己免疫性脳炎の可能性があると診断した症例について検討した。自己免疫性脳炎は以下の条件を満たしたものとした。
1) 急性または亜急性の神経症状(精神症状、行動異常、けいれんなど) 2) 自己免疫反応の傍証(感染やワクチンが先行、免疫療法に反応が良好など) 3) 他の疾患の除外。
対象の年齢は、中央値 8.7 歳(範囲、5 か月 ~ 16 歳)で、男女比は 44 : 38 であった。
神経症状の発現から 6 か月以内の血清を用いて検討した。自己抗体は、premade membrane を用いた immunoblot (IB)、凍結ラット脳切片を用いた免疫染色 (IHC)、培養ラットニューロンを用いた免疫染色 (ICC) の 3 つの方法で検出を試みた。

3 . 急性脳症のけいれんに対するホストインの効果

小児神経科医のマーリングリストである蔵王セミナーマーリングリスト用いて、症例の収集を行った。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。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。

(倫理面への配慮)

臨床情報は匿名化されて個人が特定できない状態で収集し、個人情報の保護に努めた。全ての研究は倫理委員会の承認を得て施行した。

C . 研究結果

1 . インフルエンザ脳症の実態調査

5 シーズンでインフルエンザ脳症と診断された症例は 35 例であった。男女比は 20 : 15 で、発症時年齢は中央値 51 か月であった。基礎疾患を認めたのは 8 例であった。原因となったウイルスは、A 型 25 例、B 型 9 例、型不明 1 例であった。脳症のサブタイプは急性壊死性脳症 (ANE) 1 例、二相性脳症 (AESD) 5 例、膨大部病変を伴う脳症 (MERS) 11 例、出血性ショック脳症症候群 (HSES) 2 例、辺縁系脳炎 1 例、その他 15 例であった。転帰は、後障害なし 22 例、後障害あり 9 例、死亡 4 例であった。

シーズンごとの症例数は 4 ~ 9 例であり、シーズンによる差は少なかった。発症年齢、脳症のサブタイプ、および転帰についてもシーズンによる相違は明らかでなかった。これらのことから、過去 5 シーズンにおいては、インフルエンザ脳症の臨床像においてシーズンによる差は顕著でないと思われ

た。

調査期間中の死亡例は 4 例であり、男女比は 1 : 3 であった。原因ウイルスは A 型 3 例、B 型 1 例であった。3 例は脳症の発症から半日以内に昏睡に陥っており、3 日以内に 3 例が死亡したことから、急激に神経症状および全身状態の悪化が進んだことが窺われた。入院時の検査値では一部に逸脱酵素の上昇などを認めるがその程度は重篤ではなく、入院時にその後の急速な増悪を予想することは困難であると思われた。

2 . 抗神経抗体の検出法の検討

IB では、24 例で、正常対照では染色されないバンドが検出された。しかし、異なる患者において同じ位置に出現するバンドが、同一の標的分子に対応するかどうかは不明である。IHC では、46 例で陽性であった。核が染色されたのは 33 例で、ニューロンだけでなくグリアや血管内皮も染色され、非特異的な所見の可能性がある。細胞質が染色されたのは 13 例で、特に海馬のニューロンで著明であった。ニューロピルが染色されたのは 12 例で、分子層に特異的に染色された。このうち 5 例は、抗体検出のスタンダードである CBA で抗 NMDAR 抗体陽性であった。ICC では、51 例で陽性であった。染色された部位は、核 31 例、細胞質 21 例、樹状突起 8 例であった。樹状突起が染色された 5 例は、CBA で抗 NMDAR 抗体陽性であった。これらの 3 つの方法の間の相関を解析したところ IHC と ICC との相関は良好であったが、IB は他の方法との相関がなかった。

3 . 急性脳症のけいれんに対するホストインの効果

38 例 48 投与機会のデータを集積した。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 機会で最も多く、次いでジアゼパムが 17 機会に使用されていた。

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。二相性脳症における投与機会あたりの有効率は 81%、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つた。

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、投与経路にかかるルート閉塞をきたした症例は皆無であった。

D . 考察

1 . インフルエンザ脳症の実態調査

今回の研究では、愛知県を中心とする東海地方においては、過去 5 シーズンにおいては急性脳症の臨床像にはシーズンによる相違は明らかでなかった。この理由の一つは、09/10 シーズンの FluA 2009pdm の大流行以降は、インフルエンザ流行株に著しい変化がなかったことが挙げられる。また、FluA 2009pdm 流行時に発生した急性脳症も、他の型の流行に伴ったものと比べて重症であったという知見はない。したがって、過去 5 シーズンのインフルエンザ脳症の臨床像は、従来の報告と概ね一致していると思われる。

過去 5 シーズンにおけるインフルエンザ脳症の死亡例は 4 例であった。以前の報告と同様にこれらの症例は発症後に急激な神経症状や全身症状の増悪を認めているのが特徴的であった。一方、入院時の検査所見は異常を認めても高度なものではなく、その時点で重篤な予後を予測するのは困難で

あった。我々のFluA 2009pdm に伴う死亡例の調査でも、急性脳症の死亡例は極めて進行が速く治療の困難さが明らかであった。今後はこのような症例の予測と効果的な治療法の検討が必要であると思われる。

2 . 抗神経抗体の検出法の検討

我々の研究の結果から、抗神経抗体の検出頻度はその方法によって異なることが明らかになった。組織や細胞を用いた手法では細胞のどの部位が染色されるかが重要であり、非特異的な所見と有意な所見との区別が必要である。IHC におけるニューロピルの染色と ICC における樹状突起の染色とはよく相関があり、また CBA による抗 NMDAR 抗体との相関も認めたため、抗神経抗体を捕捉したと考えられる。このような知見の蓄積が今後必要である。

3 . 急性脳症のけいれんに対するホストインの効果

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。したがって、fPHT の有効性は高く急性脳症のけいれんに対し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。また、fPHT 投与に伴う有害事象は頻度が低く、軽症のものであつた。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

09/10 シーズン以降の 5 シーズンで 35 例のインフルエンザ脳症が発生した。年齢の中央値は 65 か月で、基礎疾患を持つ児が 23%であった。サブタイプの中では MERS が 11 例で最多であった。死亡は 4 例で、後障害を 9 例に認めた。死亡例は、サブタイプ分類が困難な例が多かった。急激に意識障害と多臓器不全が進行していた。

抗神経抗体の検出頻度はその方法によって異った。組織や細胞を用いた手法では細胞のどの部位が染色されるかが重要である。ニューロピルの染色と樹状突起の染色とはよく相関があり、また抗 NMDAR 抗体との相関も認めたため、抗神経抗体を捕捉したと考えられる。このような知見の蓄積が今後必要である。

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

- Okumura A, Uematsu M, Imataka G, Tanaka M, Okanishi T, Kubota T, Sudo A, Tohyama J, Tsuji M, Ohmori I, Naiki M, Hiraiwa-Sofue A, Sato H, Saitoh S, Shimizu T. Acute encephalopathy in children with Dravet syndrome. *Epilepsia* 2012; 53(1): 79-86.
- Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi J, Nagata R, Okumura A, Kashii H, Tomita S, Kumada S, Kubota M. Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *Brain Dev* 2012; 34(2): 124-127
- Oikawa N, Okumura A, Oyama S, Baba H, Shimizu T, Kato A. A 15-month-old boy with reduced consciousness and convulsion. *J Clin Virol* 2012; 53(4): 276-279.
- Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi J, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev* 2012; 34(5): 337-343.
- Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci* 2012; 320(1-2): 145-148.
- Hayashi N, Okumura A, Kubota T, Tsuji T, Kidokoro H, Fukasawa T, Hayakawa F, Ando N, Natsume J. Prognostic factors in acute encephalopathy with reduced subcortical diffusion. *Brain Dev* 2012; 34(8): 632-639.
- Kato T, Okumura A, Hayakawa F, Tsuji T, Natsume J. Transient reduced diffusion in the cortex in a child with prolonged febrile seizures. *Brain Dev* 2012; 34(9): 773-775.
- Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; collaborating study group on influenza-associated encephalopathy in Japan. National survey of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in Japanese children. *J Med Virol* 2012; 84(8): 1151-1156.
- Kawashima H, Morichi S, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T; The Collaborating Study Group On Influenza-Associated Encephalopathy In Japan. Treatment of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children. *Scand J Infect Dis* 2012; 44(12): 941-947.
- 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, 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.

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.

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.

Nakazawa M, Okumura A, Niijima 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.

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, Haginoya 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: 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.

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.

Niizuma T, Okumura A, Kinoshita K, Shimizu T. Acute encephalopathy associated with human metapneumovirus infection. *Jpn J Infect Dis* 2014; 67(3): 213-215.

Takanashi J, Taneichi H, Misaki T, Yahata Y, Okumura A, Ishida Y, Miyawaki T, Okabe N, Sata T, Mizuguchi M. Clinical and radiologic features of encephalopathy during 2011 *E coli* 0111 outbreak in Japan. *Neurology* 2014; 82(7): 564-572.

Kato T, Tsuji T, Hayakawa F, Kubota T, Kidokoro H, Natsume J, Watanabe K, Okumura A. A new electroencephalogram classification with reduced recording

- time in asphyxiated term infants. *Brain Dev* 2014; 36: 372-379.
- Kurahashi N, Tsuji T, Kato T, Ogaya S, Umemura A, Yamada K, Kurahashi H, Maruyama K, Takeuchi T, Kubota T, Saitoh S, Natsume J, Okumura A. Thalamic lesions in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Paediatr Neurol* 2014; 18(6): 806-810.
- Tsuji T, Okumura A, Kidokoro H, Hayakawa F, Kubota T, Maruyama K, Kato T, Oshiro M, Hayakawa M, Watanabe K. Differences between periventricular hemorrhagic infarction and periventricular leukomalacia. *Brain Dev* 2014; 36(7):555-562.
- Nakazawa M, Akasaka M, Hasegawa T, Suzuki T, Shima T, Takanashi JI, Yamamoto A, Ishidou Y, Kikuchi K, Niijima S, Shimizu T, Okumura A. Efficacy and safety of fosphenytoin for acute encephalopathy in children. *Brain Dev* 2014 in press.
- Ando N, Okumura A, Kobayashi S, Negishi Y, Hattori A, Okanishi T, Abe S, Ikeno M, Igarashi A, Saitoh S, Shimizu T. Fulminant encephalopathy with marked brain edema and bilateral thalamic lesions. *Neuropediatrics* 2014; 45(4): 256-260.
- Akihisa Okumura, Tetsuo Kubota, Motomasa Suzuki, Tatsuya Fukazawa, Shinpei Abe, Mitsuru Ikeno, Mariko Hosozawa, Toshiaki Shimizu, Masaharu Hayashi. Autoimmune Encephalitis Proven by Immunohistochemical Study. 第54回日本小児神経学会総会、札幌、2012.5.17
- Natsume J, Maeda N, Itomi K, Kidokoro H, Ishihara N, Takada H, Okumura A, Kubota T, Miura K, Aso K, Morikawa T, Kato K, Negoro T, Watanabe K. PET in Infancy Predicts Long-Term Outcome during Adolescence in Cryptogenic West Syndrome. *Am J Neuroradiol* 2014; 35(8):1580-1585.
- Akihisa Okumura. Neonatal EEG in determining risk to the preterm brain. Joint congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Brisbane, Australia, 2012.6.1.
- Tanuma N, Miyata R, Nakajima K, Okumura A, Kubota M, Hamano S, Hayashi M. Changes in Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Human Herpesvirus-6-Associated Acute Encephalopathy/Febrile Seizures. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 564091.
- Igarashi A, Okumura A, Komatsu M, Tomita O, Abe S, Ikeno M, Saito M, Nakazawa T, Shimizu T. Amplitude-integrated EEG revealed nonconvulsive status epilepticus in children with non-accidental head injury. *Eur J*
- 奥村彰久、池野充、久田研、東海林宏道、清水俊明 . TUBA1A 変異による滑脳症・脳室拡大・小脳低形成の 1 剖検例 . 第 48 回日本周産期・新生児医学会学術集会、さいたま、2012.7.10.

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

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

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

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

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

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

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

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、中川聰、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 20th 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 20th Malaysia Society of Pediatrics Annual Congress, Kuching. Malaysia, 2013.5.9.

Akihisa Okumura. Neonatal Seizures. Diagnosis and treatment based on EEG. Joint Scientific Meeting of 9th Asian Society of Pediatric Research Congress and 20th 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 回日本周産期・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 回日本臨床神経性理学会、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

五十嵐鮎子、奥村彰久、安部信平、池野充、山城雄一郎、清水俊明 . 抗アクリアポリン 4 抗体陽性であった急性散在性脳脊髄炎の一例 . 第 116 回日本小児科学会学術集会、名古屋、2014.4.13 .

城所博之、奥村彰久、辻健史、久保田哲夫、安藤直樹、伊藤祐史、小川千香子、山本啓之、石原尚子、加藤徹、早川文雄、齋藤伸治、夏目淳 . 新生児単純ヘルペス脳炎における脳病変の局在 . 第 56 回小児神経学会総会、浜松、2014.5.29.

大野敦子、鈴木基正、糸見和也、辻健史、久保田哲夫、奥村彰久、安藤直樹、齋藤伸治、夏目淳 . 病初期に後頭部皮質優位に病変を呈し、その後 Bright Tree Appearance を示した 3 症例 第 56 回小児神経学会総会、浜松、2014.5.29.

中澤美賀、奥村彰久、赤坂真奈美、長谷川毅、鈴木智典、嶋泰樹、高梨潤一、山本敦子、石堂雄毅、菊池健二郎、新島新一、清水俊明 . 急性脳炎・脳症の発作に対するホスフェニトインの有効性 . 第 56 回小児神経学会総会、浜松、2014.5.29.

星野愛、齋藤真木子、久保田雅也、高梨潤一、豊島光雄、宮本晶恵、奥村彰久、水口雅 . 急性壊死性脳症における遺伝的素因 HLA タイピング及びサイトカイン遺伝子多型解析(第 2 報) . 第 56 回小児神経学会総会、浜松、2014.5.29.

中原繪理, 佐久間啓, 林雅晴, 鈴木智典,
清水俊明, 奥村彰久 . 疫学的解析から推定
される基底核脳炎の多様性(第一報) . 第 56
回小児神経学会総会、浜松、2014.5.29.

堀いくみ, 根岸豊, 服部文子, 安藤直樹,
早川文雄, 辻健史, 久保田哲夫, 奥村彰久,
夏目淳, 斎藤伸治 . 重症・劇症型脳症の臨
床的検討 . 第 56 回小児神経学会総会、浜松、
2014.5.30.

石渡久子, 神山潤, 中島啓介, 奥村彰久 .
可逆性脳梁膨大部病変を伴う軽症脳炎・脳
症(MERS)に小脳炎を合併し、小脳症状が遷
延した 1 例 . 第 56 回小児神経学会総会、浜
松、2014.5.30.

奥村彰久 . 小児の脳炎・脳症 : 最近の話題 .
第 311 回日本小児科学会北陸地方会・第 9
回日本小児科学会福井地方会、福井、
2014.6.8.

Shioda, Hiroyuki Kidokoro, Masako
Sakauchi, Shino Shimada, Toshiaki
Shimizu, Makiko Osawa, Shinichi Hirose ,
Toshiyuki Yamamoto. A Recurrent KCNT1
Mutation in Two Sporadic Cases with
Migrating Partial Seizures. The joint
congress of the 16th annual meeting of
Infantile Seizure Society and the 16th
annual congress of the Turkish Child
Neurology Association, Cappadocia,
Turkey, 2014.6.24.

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

Akihisa Okumura, Atsushi Ishii, Mutsuki

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 A(H1N1)pdm09 感染による
気管支喘息重症化の病態解析**

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 大賀正一 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・教授
松重武志 山口大学医学部附属病院・講師
脇口宏之 山口大学医学部附属病院・診療助教
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
市山高志 鼓ヶ浦こども医療福祉センター・副院長

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) は季節性に比し呼吸器合併症が多く、当科においても喘息症例での重症化が多くみられたが、その病態はいまだ明らかでない。本研究ではその病態解明のため、A(H1N1)pdm09 感染喘息マウスの気管支肺胞洗浄液 (BAL) を解析した。

【方法】 Balb/c マウスを用いて喘息モデルマウスを作製し、A(H1N1)pdm09 および季節性インフルエンザを経鼻感染させ、感染後 3 日および 7 日に BAL を回収した。BAL 中炎症細胞浸潤、サイトカイン濃度およびウイルス力価について検討した。

【結果】 A(H1N1)pdm09 感染では季節性と異なって感染後 3 日および 7 日ともに非喘息マウスに比し、喘息マウスで BAL 中 IL-6 および TNF- α の濃度が有意に高値であった。IFN- β 濃度は 3 日では有意に高値であったが、7 日では有意に低値であった。BAL 中ウイルス力価は喘息マウスで非喘息マウスに比し有意に高値だった。

【結論】 A(H1N1)pdm09 感染は季節性と異なって喘息マウスの肺において感染後早期から、より高いサイトカイン産生および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

A . 研究目的

2009 年に世界的に大流行した新型インフルエンザ (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。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。

本研究では病態解明のため A(H1N1)pdm09 および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) を作製し, A(H1N1)pdm09 および季節性ウイルス (A/H1N1/Yamagata, A/H1N1/Puerto Rico) (いずれもマウス馴化株, 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 3 日および 7 日に BAL を回収した. BAL 中炎症細胞浸潤, サイトカイン濃度およびウイルス力値を測定し, 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

A(H1N1)pdm09 感染後 3 日および 7 日において季節性と異なって, 喘息マウスでは非喘息マウスに比して BAL 中 interleukin (IL)-6 が有意に高値であった(図 1, 2). Tumor necrosis factor (TNF)- α (感染後 3 日および 7 日) および IL-10 (感染後 7 日) も同様の結果であった. 一方感染後 3 日の interferon (IFN)- β 濃度は喘息マウスで有意に高値であったが (図 3), 感染後 7 日では有意に低値であった(図 4). またウイルス力値は喘息マウスで非喘息マウスに比して感染後 3 日, 7 日ともに有意に高値であった (図 5, 6). また A(H1N1)pdm09 感染喘息マウスでは季節性に比して, NK 細胞, CD8 $^{+}$ T 細胞の細胞性免疫の活性化誘導が弱く, 感染後早期から気管支喘息重症化の病態に関与している可能性も示唆された.

D . 考察

以上の結果から A(H1N1)pdm09 感染喘息マウスでは感染非喘息マウスに比し, 季節性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高く, 強い炎症が惹起されていることが示唆された. 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 感染後 3 日においては喘息マウスで非喘息マウスに比し, 有意に IFN- β 濃度が高値であることから感染後 7 日の IFN- β 濃度の低値は既に急性期をすぎた結果である可能性が示唆された. 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, 肺において感染後早期から, より高いサイトカイン産生および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. Kuroda M, Hasegawa S, et al. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep.* 2015; in press.
2. Wakiguchi H, Hasegawa S, et al. The relationship between T cell HLA-DR expression and intravenous immunoglobulin treatment response in Kawasaki disease. *Pediatr Res.* 2014; in press.
3. Hasegawa S, et al. A nationwide survey of opsoclonus-myoclonus syndrome in Japanese children. *Brain Dev.* 2014; in press.

4. Okada S, Hasegawa S, et al. Acute pericardial effusion representing the TNF- α -mediated severe inflammation but not the coronary artery outcome of Kawasaki disease. *Scand J Rheumatol.* 2014; 29:1-6.
5. Kittaka S, Hasegawa S, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in human herpesvirus-6-infected infants with or without febrile seizures. *J Infect Chemother.* 2014; 20: 716-21
6. Hasegawa S, et al. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine.* 2014, 69; 206-210.
7. Inamura N, Hasegawa S, et al. Management of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: Utility of measuring serum lactate dehydrogenase level. *J Infect Chemother.* 2014; 20: 270-3.
8. Takahashi K, Hasegawa S, et al. Serum tau protein level serves as a predictive factor for neurological prognosis in neonatal asphyxia. *Brain Dev.* 2014, 36: 670-5.
9. Hasegawa S, et al. Serum and cerebrospinal fluid levels of visinin-like protein-1 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev.* 2014, 36: 608-12.
10. Momonaka H, Hasegawa S, et al. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev.* 2014; 36: 484-8.
11. Okada S, Hasegawa S, et al. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine.* 2013; 63: 194-200.
12. Hasegawa S, et al. Tau protein levels in children do not increase during severe asthma attack-induced hypoxic conditions. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2014; 42: 83-5.
13. Oka M, Hasegawa S, et al. Tau protein concentrations in the cerebrospinal fluid of children with acute disseminated encephalomyelitis. *Brain Dev.* 2014; 36: 16-20.
14. Hasegawa S, et al. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev.* 2013; 35: 626-9.
15. Matsushige T, Hasegawa S, et al. Serum neurofilament concentrations in children with prolonged febrile seizures. *J Neurol Sci.* 2012; 132:290-4.
16. Kudo K, Hasegawa S, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits vascular cellular adhesion molecule-1 expression and interleukin-8 production in human coronary arterial endothelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012; 132:290-294.
17. Inoue H, Hasegawa S, et al. Elevation of tau protein levels in the cerebrospinal fluid of children with West syndrome. *Epilepsy Res.* 2012; 102:8-12.
18. Haneda Y, Hasegawa S, et al. Ovomucoids IgE is a better marker than egg white-specific IgE to diagnose boiled egg allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 129: 1681-2.
19. Shimomura M, Hasegawa S, et al. Intravenous immunoglobulin does not increase Fc RIIB expression levels

- on monocytes in children with immune thrombocytopenia. *Clin Exp Immunol.* 2012; 169: 33-7.
20. Hasegawa S, et al. Cysteine, histidine and glycine exhibit anti-inflammatory effects in human coronary arterial endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2012; 167: 269-74.
 21. Tanaka N, Hasegawa S, et al. High-resolution computed tomography findings of influenza virus pneumonia: a comparative study between seasonal and novel (H1N1) influenza virus pneumonia. *Jpn J Radiol.* 2012; 30: 154-61.
 22. Arakawa M, Hasegawa S, et al. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol.* 2012; 61: 410-9.

図 1 BAL 中 IL-6 濃度 (感染後 3 日)

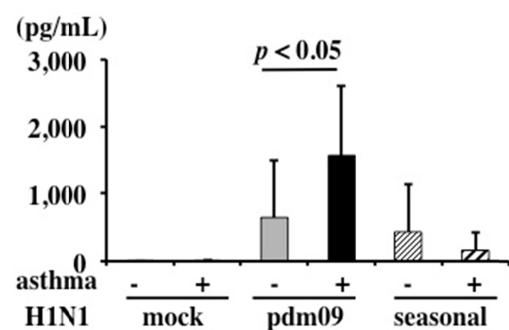


図 2 BAL 中 IL-6 濃度 (感染後 7 日)

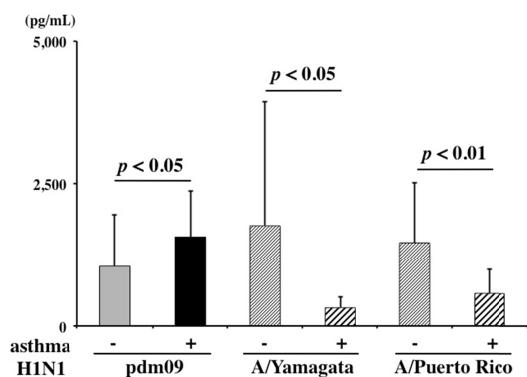


図 3 BAL 中 IFN- γ 濃度 (感染後 3 日)

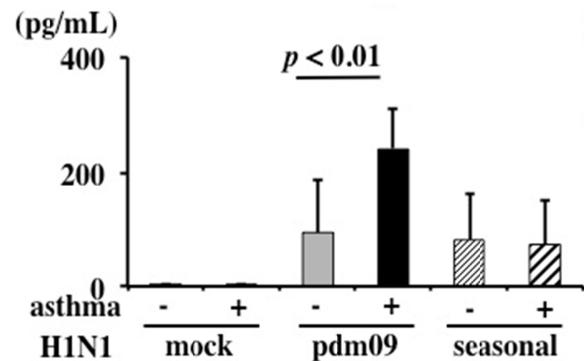


図 4 BAL 中 IFN- γ 濃度 (感染後 7 日)

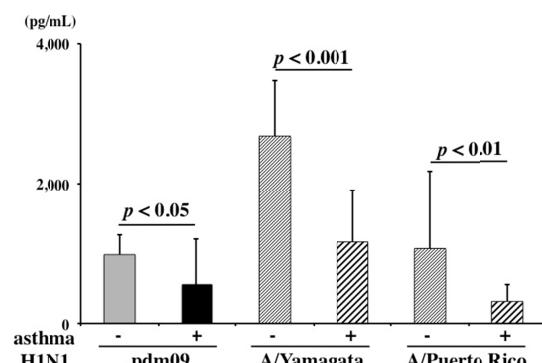


図 5 BAL 中ウイルス力値 (感染後 3 日)

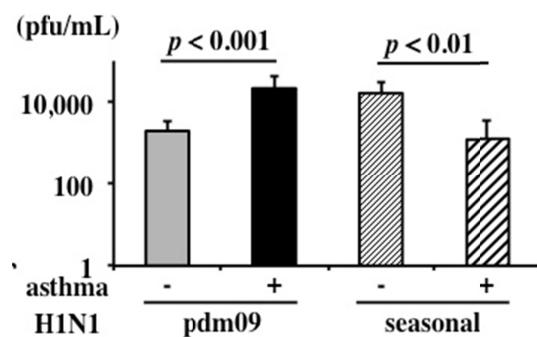
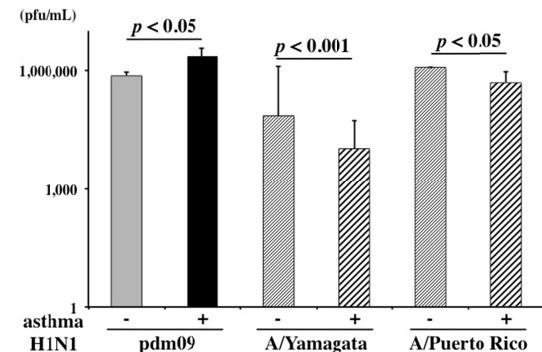


図 6 BAL 中ウイルス力値 (感染後 7 日)



厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
「重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に関する研究」
平成 24 ~ 26 年度分担研究報告書

「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 山中 岳 〔東京医科大学小児科講師〕

森地 振一郎〔東京医科大学小児科助教〕

研究要旨

インフルエンザ H1N1pdm09 脳症の全国調査の解析により深昏睡（GCS8 点以下）での抗ウイルス薬の有用性が確認された。また、急性期 MRI は死亡例を除き予後推測に役立たなかった。脳症を含む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 BDNF は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。また、一部の脳症の患者において HMGB1 の関与した病態を伴っていた。脳症の疑い例を含む入院例の解析では、脳症確定群と否定群間で、髄液 IL-6、AST、ALT、CPK において有意差を認めたが、脳症確定群と脳症非確定群間で有意差はなかった。回復期の SPECT と MRI の併用により予後予測が可能であった。電位依存性イオンチャネルに関連した遺伝子変異も、急性脳症の予後不良因子の一つとして考えられた。

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 H1N1 pdm 2009 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、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対応できるガイドラインや指針を作成することが必要である。特に、重症例の病態解析・診断・治療の blush up が求められる。特に、病態解析や診断上における熱性けいれん複合型との鑑別は臨床上大きな問題となっている。

B. 研究方法

以下の点についての検討を行いガイドライン改訂のための検討を行った。

H1N1pdm09 脳症における治療法の解析と急性期 MRI の検討

重症肺炎における APRV (airway pressure release ventilation) や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安全性や有効性の検討

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)・High-mobility group box 1 (HMGB1) からみた病態解析

熱性けいれん複雑型と急性脳症の鑑別法の検討

てんかん性脳症と感染性急性脳症の類似点の検討

C. 研究結果

H1N1pdm09 脳症脳症の全国調査をもとに解析を行い、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（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。時間軸を整理しての MRI 画像解析では、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、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。ペラミビル投与の有用性を示すエビデンスはないが、連日複数日重症例では投与が必要である。

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・髄液とともに両群で上昇していた。起因ウイルス別では、血清・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していた（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。

HMGB1 は血清中ではインフルエンザ脳症患児は一部の予後不良例で著増していた（図 3）。

127 例の脳症多疑い例を含む入院症例を、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 IL-6、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た（表 2）。急性期の SPECT により複雑型熱性けいれんなどの良性疾患と鑑別することは困難であった。回復期 SPECT は MRI と併用することで急性脳症の長期予後予測に有用であった。Dravet 症候群では、第 5 病日に拡散強調像で bright tree appearance が認められ、両側視床にも高信号が認めた。サイトカインプロファイリングは BHT 前後の髄液において、Dravet 脳症、感染性急性脳症例とともに BHT を開始してから炎症性サイトカインの IL-6 の速やかな低下が、ケモカインの代表である IL-8 は緩徐に低下した。ケモカインである MCP-1 が感染性急性脳症では上昇していたが、Dravet 脳症例では上昇していなかった（図 4）。

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標とした情報収集が必要である。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・HMGB1 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。回復期の SPECT と MRI の併用により急性脳症の長期予後予測が可能であったが、急性期の SPECT では急性脳症と複雑型熱性けいれんなどと鑑別することは困難であ

った。熱性けいれん（複合型）において急性期に SPECT の異常が認められるとの報告があり、急性期の脳血流評価の難しさを示唆していた。

ヒトてんかんで見出される遺伝子異常のうち、電位依存性イオンチャネルに関連した遺伝子変異は Dravet 症候群、熱性けいれんプラスなど多岐に報告されている。電位依存性ナトリウムチャネル α サブユニット 1 型蛋白をコードする *SCN1A* 遺伝子では、重篤度の大きく異なる複数種のてんかんで既に 200 を超える数の疾患変異が報告されており頻度が高く、薬剤による中毒が起りやすいとされ、*SCN1A* 遺伝子異常をもつ急性脳症に対し抗けいれん薬や鎮静薬剤の使用法に慎重な検討が必要である。

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, Mizuguchi 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.

6. Morichi S, Yamanaka G, Ishida Y, Oana S, Kashiwagi Y, Kawashima H. Brain-derived neurotrophic factor and interleukin-6 levels in the serum and cerebrospinal fluid of children with viral infection-induced encephalopathy. *Neurochem Res* 39(11):2143-2149, 2014

7. Kashiwagi Y, Kawashima H, Suzuki S, Nishimata S, Takekuma K, Hoshika A. Marked elevation of excitatory amino acids in cerebrospinal fluid obtained from patients with rotavirus-associated encephalopathy. *J Clin Lab Anal,* 2014 Aug 17.doi: 10.1002/jcla.21774, 2014

8. Ishida Y, Kawashima H, Morichi S, Yamanaka G, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T. Brain magnetic resonance imaging in acute phase of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children.

- Neuropediatrics 46(1):20-5. 2015
9. 岸宗憲, 河島尚志, 柏木保代, 武隈孝治インフルエンザ脳症における鼻汁中サイトカインプロファイル. 小児感染免疫 26 (1) 21-29, 2014
 10. 千田裕美, 村岡 正裕, 山宮麻里, 井上なつみ, 木場由希子, 篠崎絵里, 前田文恵, 水野和徳, 井上巳香, 前馬秀昭, 酒詰忍, 太田和秀, 谷内江昭宏, 河島尚志. 二相性けいれんとMRIでの拡散能低下を呈したRSウイルス脳症の1例. 小児感染免疫 26 (2) 241-246, 2014
 11. 河島尚志, 山中岳, 森地振一郎. インフルエンザ脳症の最近の話題 減少傾向にある、といふのは本当か. 小児内科 46(9):419-1420, 2014
 12. 河島尚志. ウィルス性脳炎・脳症の最近の知見 インフルエンザ、RS、ロタなど. 東京小児科医会報 32 (3): 36-43 ,2014

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 27nd 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. 河島尚志口タウイルス感染症－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. ウィルス性脳炎・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, 星加明徳. 2005-2010年当院における脳症疑いで入院した127例の臨床的検討- 第2報- 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 明徳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) 大分総会 (2013.5.30)
11. 河島尚志. ウィルス性疾患の重症化における免疫病態. 第 18 回小児免疫リウマチ研究会 2014
12. 山中岳、石田悠, 春日晃子, 森下那月美, 竹下美佳, 森地振一郎, 小穴信吾, 柏木保

- 代，宮島祐，河島尚志。99mTc-ECD SPECTにて集積像低下を伴った有熱時けいれんの検討 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014
- 13.山中岳、竹下美佳,小穴信吾,石田悠,森地振一郎,宮島祐,齋藤真木子,水口雅,廣瀬伸一, 河島尚志.重度後遺症を伴ったけいれん重積型急性脳症 5 例の脳症関連遺伝子の解析 第 56 回日本小児神経学会学術集会 2014
- 14.齋藤真木子、石井敦士,井原由紀子,星野愛,寺嶋宙,久保田雅也,山中岳,河島尚志,菊池健二郎,雨宮馨,亀井淳,廣瀬伸一,水口雅けいれん重積型急性脳症におけるナトリウムチャネル SCN1A および SCN2A 変異解析 第 56 回日本小児神経学会学術集会 2014
- 15 . Morichi S, Yamanaka G, Ishida Y, Oana S, Kawashima H. Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebrospinal fluid and plasma of children with acute meningitis and encephalopathy. 7th IGAKUKEN International Symposium on " Fever, Inflammation, and Epilepsy " 2014
- 16 . 森地振一郎, 志村優, 長尾竜兵, 佐藤智, 西亦繁雄, 柏木保代, 河島尚志, 村山圭予防接種を契機に肝不全が悪化したミトコンドリア DNA 枯渇症候群の 1 例 第 20 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会 2014
- 17 . 森地振一郎, 山中岳, 小穴信吾, 石田悠, 柏木保代, 河島尚志 RS ウィルス脳症における後遺症の検討 第 4 回小児呼吸器ウィルス感染症研究会 2014
- 18 . 森地振一郎, 森下那月美, 竹下美佳, 石田悠, 小穴信吾, 山中岳, 柏木保代, 河島尚志 急性脳症を含む中枢神経感染症の髄液サイトカインプロファイリングの検討 - Th17 系サイトカインとケモカインの変動を中心に - 第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会 第 26 回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会 2014

G . 知的所有権の取得状況

なし

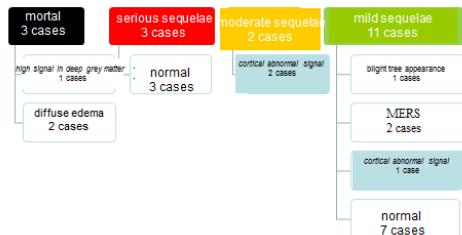
表 1

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.

MRI(<48hours) findings and outcome in pandemic flu (H1N1) 2009 associated encephalopathy



Department of Pediatrics, Tokyo Medical Univ.

図 2

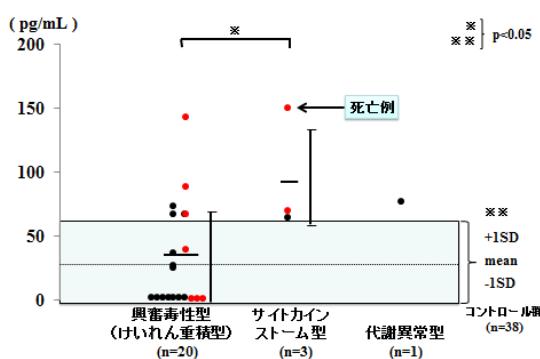
急性脳症タイプ毎の髄液BDNFの比較
(Morichi S et al Neurochemistry Research 2012)

表 2

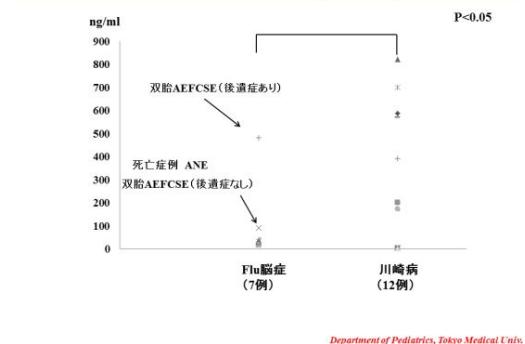
検定項目	
WBC	TP
PLT	Na
Hb	BUN
ALT	PT
	FDP
	pH
	Alb
	CPK
	Cr
	CRP
	APTT
	Ddimer
	HCO ₃ -
	Fe
	Glu
	IL-6
	Fib
	AT ₃
	-BE
	CSFIL-6

	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 3

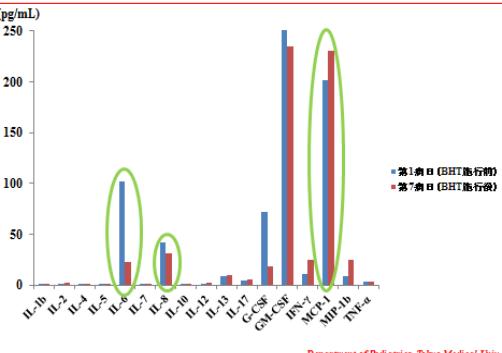
Serum HMGB1(ELISA)



Department of Pediatrics, Tokyo Medical Univ.

図 4

脳低温療法前後の髄液サイトカインプロファイリング



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（平成 24-26 年度総括）

小児重症ウイルス感染症における多因子解析

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った。1) 2009 年パンデミックインフルエンザ (H1N1) 感染症症例 204 例のデータを基に多重回帰ロジスティック解析を行った結果、重症化予測因子として血清総蛋白低値と LDH 高値が挙げられた。重症化の予測式を作成し、2013-2014 年のデータを解析した結果予測的中率は 83% であった。2) RSV ウィルス感染症で人工呼吸器管理をされた患者については、気管吸引物細菌培養の半定量解析で菌量の多さが、酸素化、発熱、炎症反応と相関していることが示された。3) 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により、ウイルス量と病態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る多因子の解析を行い、重症化予測因子の解析および治療介入方法の検討を行う。

(SPSS22.1)

- 予測式を用いて、2013-2014 年症例の検討を行い、的中率を検討した。

対象：2009 年-2014 年の間に当院集中治療室で加療されたインフルエンザ、RSV 感染症、ヒトパレコウイルス感染症症例について後方視的に電子カルテより以下の情報を抽出した。

- 年齢、性別、基礎疾患の有無、(発熱から抗インフルエンザ薬投与までの時間、入院時バイタルサイン、入院時検査所見(末梢血、生化学)、胸部 XP 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。
- 主要関連因子を抽出しベイズ式ネットワーク解析で各因子の主従関係を明らかにした。

B. 研究方法

対象：2009 年パンデミック発生時に国立成育医療研究センターにインフルエンザ感染症を理由に入院した小児症例

後方視的に電子カルテから以下の検討項目抽出

- 年齢、性別、基礎疾患の有無、発熱から抗インフルエンザ薬投与までの時間、入院時バイタルサイン、入院時検査所見(末梢血、生化学)、胸部 XP 所見
- ICU 入室有無あるいは人工呼吸器管理の有無に寄与する因子の検討を多重回帰ロジスティック解析で行う

かにした。

(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

2009 年パンデミックインフルエンザ (H1N1) 204 症例のうち ICU 入室例は 27 例、人工呼吸器使用例は 9 例あった。中央値 72 か月 (6 歳) 発熱から抗インフルエンザ薬治療までの時間の中央値は 15 時間、基礎疾患を 50% に有した。体温 38.5 ℃、心拍数 147/min、呼吸数 40/min、SpO₂ 92% (RA), AST29, ALT13, LDH260, TP6.7g/dL, BUN10mg/dL, CRTNN0.33mg/dL, Na137 mEq/L, K 4.1 mEq/L, Cl103mEq/L, CPK104, WBC9730/uL, CRP1.9mg/dL, Hb12.8g/dL. 人工呼吸器管理の有無により 2 群に分け、单变量解析を行ったところ、血清総蛋白、AST、ALT、LDH、Na、CRTNN 値に有意差を認めた。上記項目をロジスティック回帰分析で解析し LDH($p=0.069$)、TP($p=0.01$)を用いた予測式を立てた。Mechanical ventilation = $8.14+0.017 \times \text{LDH} - 2.222 \times \text{TP}$ 。同患者群における予測式の的中率は 86.8% であった。同予測式を用いて 2013-2014 年の 54 症例の初期検査所見より人工呼吸器管理の必要の有無を検討したところ的中率は 83.3% であった。

2009-2014 年の間に当院 ICU に入院した患者は 70 例で全入院症例の 17.2% に相当した。多因子の相関関係を図式化したところ、各因子の間接的な関係から病態に関する示唆が得られた。そのうち、関連が高い複数の因子につき、ベイズ式ネットワーク解析を行った結果、因子間の主従関係が示され、新たな予測モデルが構築された。(図 1)

RSV 感染症で入院し人工呼吸器管理を

うけた小児 46 症例について検討した結果、気管吸引物の分離細菌の半定量培養結果と重症度(酸素飽和度、発熱、炎症反応など)と相関することが示された(図 2)。最重症例において二次性の細菌感染症の合併が認められた。

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 3) 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關したのに対して、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關する傾向が認められた。

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、重症化の予測因子として入院時の血清総蛋白値、LDH 値が有用である可能性が示された。血清アルブミン値が 2009 年パンデミックインフルエンザ感染症の重症化予測因子であることが報告されており、(Wi YM et al. Int J Clin Pract. 2014;68:222-9.) 他に呼吸器感染症の重症化と血清総蛋白値の関連を示した先行研究は散見されるが病態や治療介入に関する意義は明確でない。本検討でも、治療介入に関わる明確な示唆は得られていない。

RS ウィルス感染症は一般的に自然軽快するが、約 3% の小児が入院に至り、そのうち 2-5% が重症化し人工呼吸器管理を要すると報告されている。重症化のメカニズムは明らかにされていないが、細菌感染症の合併が一部の症例で関連すると報告されている。本研究でも人工呼吸を要する患者にお

いては、呼吸障害の重症度の指標と細菌感染症の関与が確認された。臨床的には肺炎に対して抗菌薬投与が行われ軽快が認められており、現場における臨床判断が支持される結果となった。今後は経時的な解析により、抗菌薬が必要となる指標の抽出が必要である。

ヒトパレコウイルスはエンテロウイルス属に属し、主に夏から秋に流行し小児の感冒や胃腸炎をきたすことが知られている。一方で新生児では敗血症様の病態や脳炎・脳症をきたすことが近年報告されている。重症化に至るメカニズムは不明であるが、今回ウイルス量と重症度の相関が確認されたことから、抗ウイルス薬による治療が症状の軽減につながる可能性が示唆された。

E . 結論

多因子解析によりインフルエンザ、RSV、ヒトパレコウイルス感染症に対する呼吸器関連の重症化予測因子を抽出することが可能と考えられた。

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

Komuro H, Shoji K, Kobayashi Y, Miyata I, Funaki T, Miyairi I, Takayama J, Saitoh A: Dermatologic manifestations of human parechovirus type 3 infection in

neonates and infants. Pediatric Academic Societies Annual Meeting (PAS) 2012, Boston Massachusetts, 2012.4.28

Miyairi I, Miyata I: Viral Load Correlates With Infant Human Parechovirus Disease Severity. Pediatric Academic Societies (PAS) 2014, Vancouver, 2014.5.3

Miyairi I, Funaki T, Shoji K: Prediction and Validation of Severe Respiratory Distress due to Influenza in Children. Accepted for Oral presentation. ASPR 2015. Osaka.

新庄正宜，菅谷憲夫，関口進一郎，岩田敏，高橋孝雄，佐藤清二，上牧務，佐藤公則，常松健一郎，馬場哲聰，藤野元子，古市宗弘，豊間博，富入烈，明貝路子，山口禎夫，吉田菜穂子，慶應小児インフルエンザ研究グループ：迅速診断を用いた小児インフルエンザワクチンの効果 - test-negative case-control study - . 第46回日本小児感染症学会総会学術集会，東京，2014.10.19

3. 総説

富入烈：インフルエンザ診療 日本と米国，中国 . インフルエンザ 2014;15(3):7-12

4. 著書

小村誠，富入烈： 8 小児科疾患 59 インフルエンザ（小児）. 薬と検査 2014 薬物治療 & 服薬指導プラクティ

5. その他

森島恒雄, 細矢光亮, 岡部信彦, 麻原俊昭, 植田育也, 岡田賢司, 多屋馨子, 森岡一朗, 富入烈: 2013/2014 シーズンのインフルエンザ治療指針. 日本小児科学会インフルエンザ対策ワー

キンググループ, 日本小児科学会,
2014;5-8

G. 知的所有権の取得状況

なし

図1 集中管理を要したインフルエンザ症例データを用いたベイズ式ネットワーク図。入院時の腎機能・肝機能から重症化を予測する一助になることが示された。

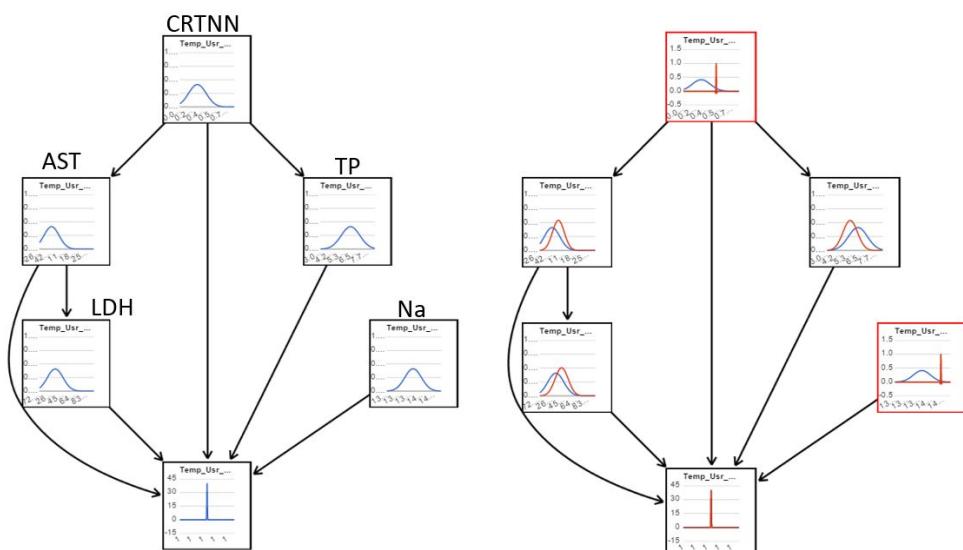


図2 RSウイルス感染症の多因子解析(人工呼吸器管理例)

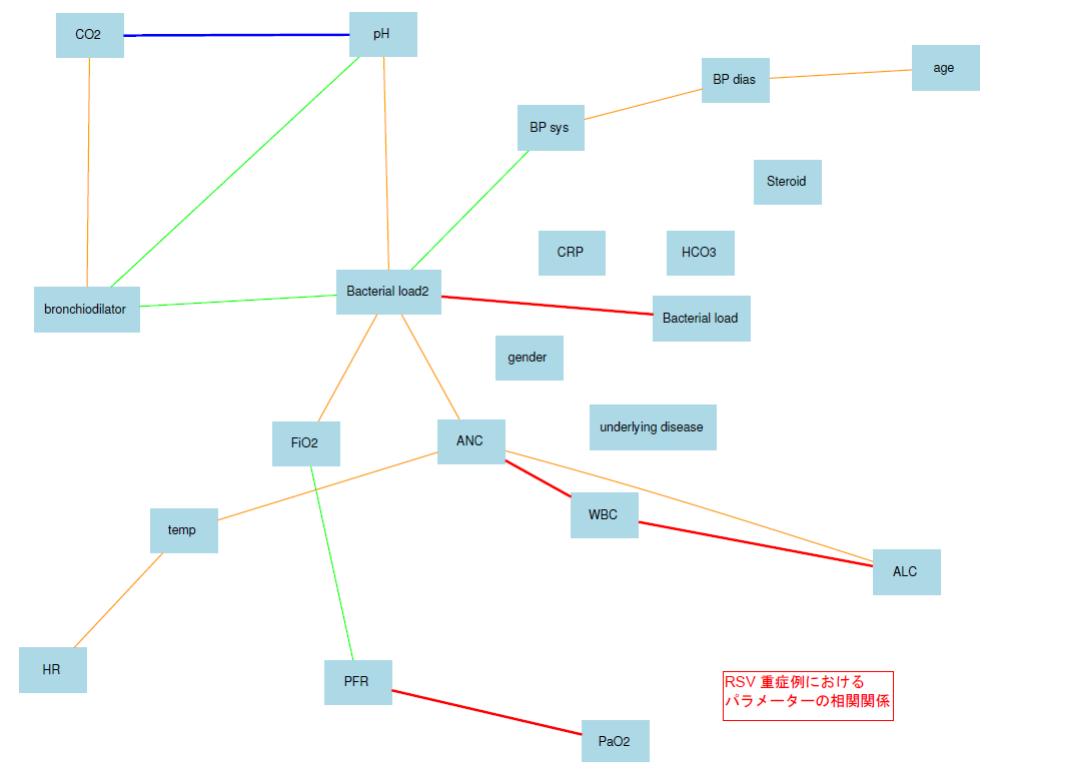
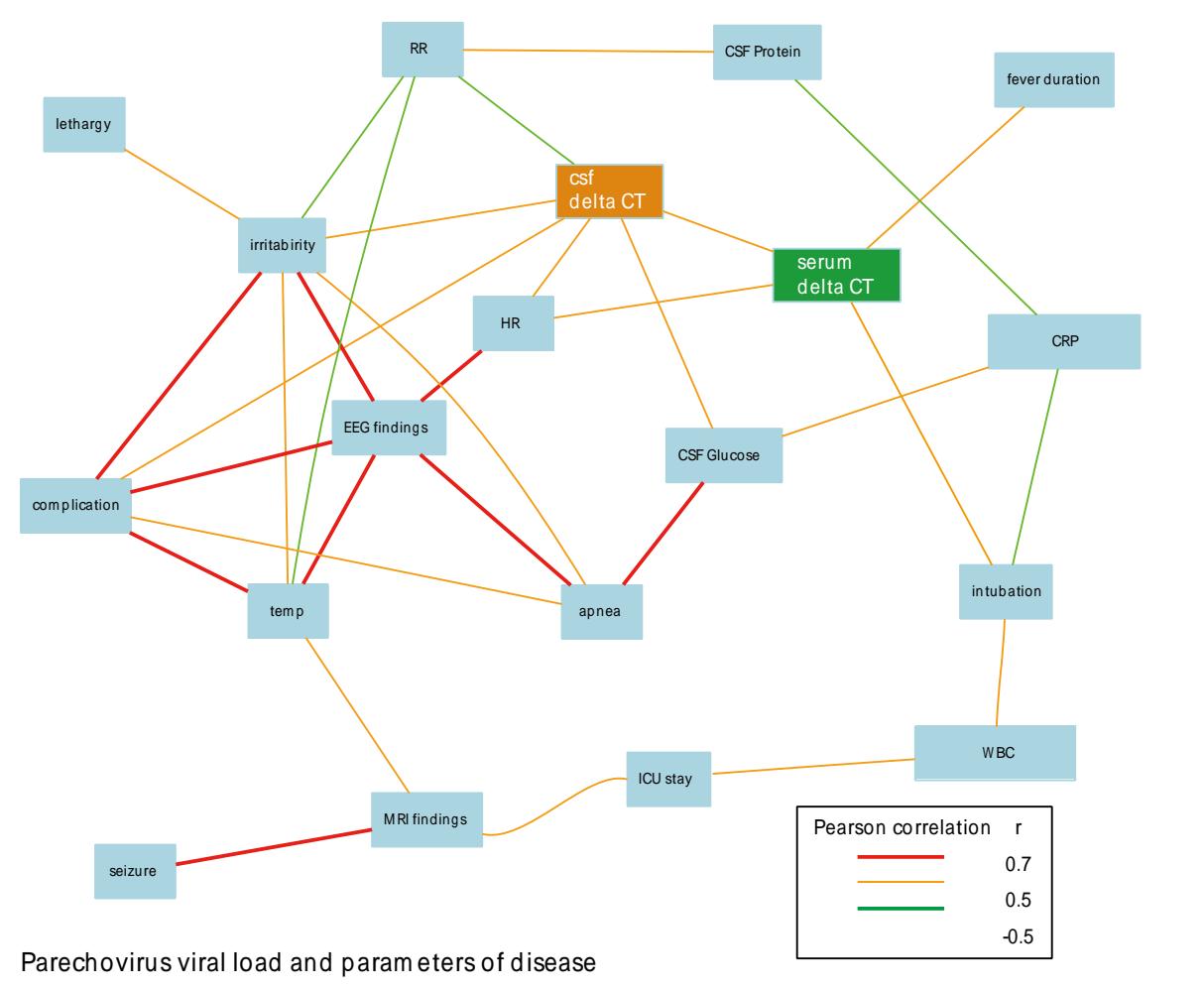


図3 ヒトパレコウイルス感染症における多因子解析結果



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ウイルス性脳症患者血清中のバイオマーカー候補の検討

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 小児期に発生頻度の高いウイルス性脳症における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およびヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)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。血清中に検出された物質の中で、インフルエンザ脳症では5種類、HHV-6脳症では11種類の代謝物質の平均値に対照群と比較して有意な変化が認められ、新規バイオマーカー候補と考えられた。これらの中で、tryptophan-kynurenone代謝経路の中間産物であるキヌレニンと下流代謝物であるquinolinic acidは、2種の脳症に共通で神経毒性が報告されている物質であり、脳症へ進展する病態に関与する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関与するとの報告があるが、なぜ脳症が起こるのか、どのようにして病態が進展するのかは十分に明らかにされていない。ヒトヘルペス6型(HHV-6)脳症は、日本の小児科領域において、インフルエンザ脳症に次いで発症数の多い急性脳炎/脳症である。インフルエンザ脳症と同様の病態が想定されるが、不明な部分が多い。そのため、病態に関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。インフルエンザ脳症とHHV-6脳症は共に、日本からの報告例が多い点が特徴的であり、共通の病態やバイオマーカーが存在する可能性も考えられる。近年、代謝プロファイルを解析する手法としての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・HHV-6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. HHV-6脳症と診断した患者 9名、熱性けいれん例 20名、および神経学的合併症のない急性発熱性疾患患者 7名(対照群)の急性期血清を採取し、比較検討した(計

36 検体)。

3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. インフルエンザ脳症については、quinolinic acid に関し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. インフルエンザ脳症では、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。HHV-6 脳症では、血清 36 検体について、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行い、159 ピークに候補物質が付与された。
2. 検出されたピークを用いて主成分分析を行った(Data not shown)。階層クラスタ

- リングを行い、HeatMap 表示させた結果を得た。
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・ニコチニ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。
 4. インフルエンザ脳症では 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)。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。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。
 5. HHV-6 脳症では、56 の物質で定量が可能であった。これらのうち、HHV-6 脳症群では、熱性けいれん群と比較して、4 種類の代謝物質の平均値に有意な上昇がみられ、他方、7 種類で有意な低下が認められた(図 1)。上記の物質のなかで、キヌレニンおよびキノリン酸は、トリプトファン-キヌレニン代謝経路の代謝物質で、神経毒性が報告されており、インフルエンザ脳症での解析と同様の結果が得られた。

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、インフルエンザ脳症・HHV-6 脳症の病態に共通して関係す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

メタボローム解析の結果を検討したところ、トリプトファン-キヌレニン代謝経路の代謝物であるキヌレニン・キノリン酸が、病態に関係するバイオマーカー候補と考えられた。これらの代謝物は、私共が行ったイン

フルエンザ脳症を対象にした解析でもバイオマーカー候補として抽出されている。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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A. Pertussis-associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child. *J Neurol Sci*, 320:145-148, 2012.
- 2) Ito Y, Kimura H, Maeda Y, Hashimoto C, Ishida F, Izutsu K, Fukushima N, Isobe Y, Takizawa J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Okamura S, Kobayashi H, Yamaguchi M, Suzumiya J, Hyo R, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K, Suzuki R. Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Clin Cancer Res* 18(15):4183-4190, 2012.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Yamashita Y, Ito Y, Isomura H, Takemura N, Okamoto A, Motomura K, Tsujiiuchi T, Natsume A, Wakabayashi T, Toyokuni S, Tsurumi T. Lack of presence of the human cytomegalovirus in human

glioblastoma. *Modern*

Pathol, 27(7):922-9, 2014.

- 7) Kawano Y, Kawada J, Ito Y. Epstein-Barr Virus MicroRNAs in Plasma as Potential Biomarkers for Chronic Infections. *J Infect Dis* 209:1298-1300, 2014.
- 8) Kanazawa T, Hiramatsu Y, Iwata S, Siddiquey M, Sato Y, Suzuki M, Ito Y, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-CCR4 Monoclonal Antibody Mogamulizumab for the Treatment of EBV-Associated T- and NK-Cell Lymphoproliferative Diseases. *Clin Cancer Res*, 20(19); 5075-84, 2014.

2. 学会発表

- 1) 伊藤嘉規、鳥居ゆか、森内浩幸、木村宏、先天性・周産期感染症(TORCH)に関する全国アンケート調査、第115回日本小児科学会学術集会、福岡、2012.4.21-22
- 2) 河野好彦、木村宏、後藤研誠、鈴木道雄、鳥居ゆか、伊藤嘉規、患者血漿中EBウイルス由来mRNA定量を応用したEBウイルス関連疾患バイオマーカーの探索、第86回日本感染症学会総会、長崎、2012.4.25-26
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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ーリング、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
- 6) 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

- 7) 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
- 8) 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
- 9) 伊藤嘉規、単純ヘルペスウイルスによる母子感染、第117回日本小児科学会学術集会、名古屋、2014.4.11-13.

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

(図1)バイオマーカー候補

同定された化合物 定量された物質

インフルエンザ脳症	174種	49種
HHV-6脳症	159種	56種

脳症で有意に上昇/低下していた代謝物質

インフルエンザ脳症 > 対照
Kynurenone

Succinic acid
Undecanoic acid

インフルエンザ脳症<対照

Cystine
Decanoic acid

HHV-6脳症 > 熱性けいれん

Kynurenone

Quinolinic acid

HHV-6脳症 <熱性けいれん

Tryptophan

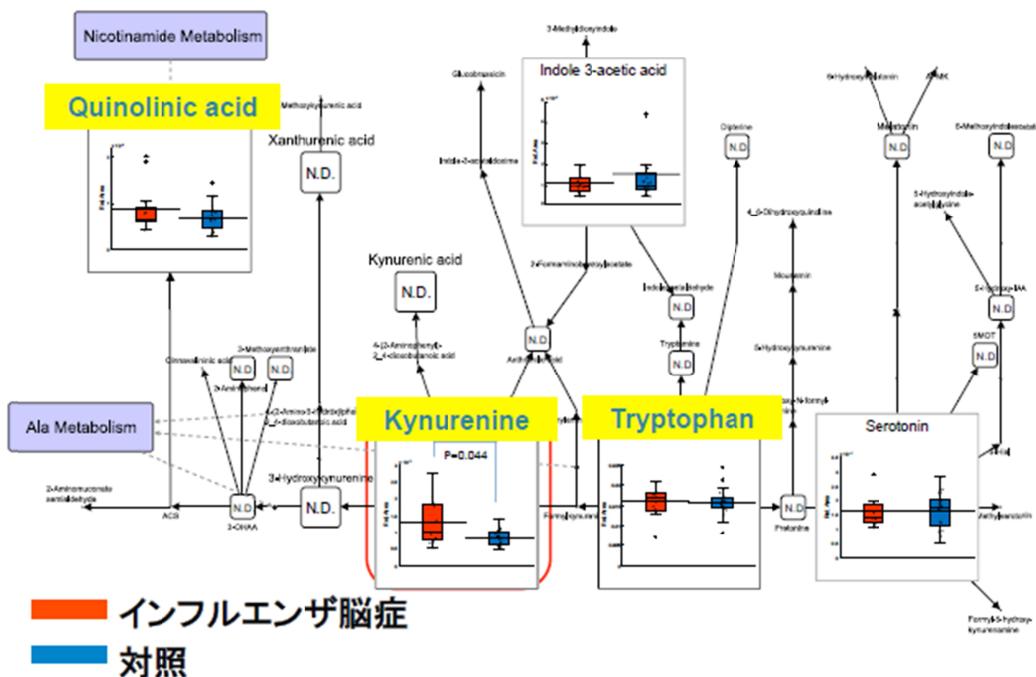
cis-Aconitic acid

Butyric acid

Isocitric acid

Hexanoic acid

(図2) Kynurenine代謝経路の代謝物の動態



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析

研究分担者 蓬田泰誠

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に関連する遺伝子を、全ゲノム領域を対象とした一塩基多型 (SNP) 解析にて同定し、インフルエンザ脳症の発症リスクを事前に予測するツールを開発することを目的としている。候補遺伝子解析として、インフルエンザ脳症や熱中症の発症リスクと関連することが報告されている carnitine palmitoyl transferase 2 (CPT2) 上の SNP について関連解析を実施したが、日本人小児インフルエンザ脳症患者 85 例（ケース群）と日本人一般集団 934 例（コントロール群）の遺伝子型頻度には有意な差は見られなかつた。また、ケース群 72 例とコントロール群 934 例の全ゲノム関連解析 (GWAS) で既に得られている SNP の遺伝子型情報に基づいて、「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。インピュテーションにより、解析対象の SNP を約 250 万箇所に増やすことができ、新たに得られた SNP (imputed SNP) の情報を用いた関連解析において、21 箇所の SNP が GWAS 有意水準 (5.0×10^{-8}) をクリアした。しかしながら、21 箇所全ての SNP において、インピュテーションで予測された遺伝子型と実際の遺伝子型との間に不一致が認められた。すなわち、GWAS 及び imputed SNP による GWAS では、インフルエンザ脳症の発症に関連する SNP を検出することはできなかった。

A . 研究目的

日本においてインフルエンザの学童罹患者数は、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することができ、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

国際 HapMap データベースの情報に基づいて抽出した約 50 万 SNP について、日本人

小児インフルエンザ脳症患者（ケース群）及び日本人一般集団（コントロール群）をジェノタイピングし、ケース・コントロール関連解析を行う。

（倫理面への配慮）

I. 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、本人及び代諾者）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DNA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、提供者及び代諾者）との質疑応答を経て、本研究について十分に理解されたことを確認した後に同意を得る。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

本研究の成果により、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。

個人識別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、担当者が個人識別情報を厳重に保管・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考えられない。

IV. 遺伝カウンセリング体制の整備

個人識別情報の管理に記したように、本研究の結果を提供者が知ることにより、提供者や血縁者の生命の危機を回避できる可能性がある。この場合には、遺伝子情報を提供者や家族に報告する可能性がある。そのような遺伝情報を知ることは、生命危機を回避することを目的にしているため、患者及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DNA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DNA検体の保管に関しては、説明文書を用いて提供者（16歳未満の場合は、提供者及び代諾者）に十分説明する。

研究終了後の DNA 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

日本人においてインフルエンザ脳症や熱中症の発症リスクと関連することが報告されている carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) (Chen et al. FEBS Lett 579:2040-4 (2005)) について、アミノ酸置換を伴う SNP についてのケース・コントロール関連解析を行った。また、国際 HapMap データベースの情報に基づいて CPT2 周辺領域の 17 箇所の TagSNP を抽出し、関連解析を行った。CPT2 上の 3 箇所の SNP (F352C、I368V、M647V) において、インフルエンザ脳症の発症リスクとの関連が報告されている Type 9 (F/C、I/V、M/M) の遺伝子型頻度には、ケース群 85 例 (7.1%) とコントロール群 934 例 (10.9%) との間で有意な差は見られなかった。また、TagSNP 解析においても、インフルエンザ脳症の発症リスクに関連する SNP は見られなかった。

ケース群 72 例及びコントロール群 934 例の 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（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。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遺伝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 を約 250 万箇所に増やすことができ、新たに得られた SNP (imputed SNP) の情報を用いた関連解析において、21 箇所の

SNP が GWAS 有意水準 (5.0×10^{-8}) をクリアした。しかしながら、21 箇所全ての SNP において、インピュテーションで予測された遺伝子型と実際の遺伝子型との間に不一致が認められた。すなわち、GWAS 及び imputed SNP による GWAS では、インフルエンザ脳症の発症リスクに関連する SNP を検出することはできなかった。

D . 考察

本研究では、症例数が少ない場合でも、遺伝子型の疾患発症に対する寄与が大きければ疾患関連遺伝子を同定することができるものと考え、高速・大量 SNP ジェノタイプングによる GWAS を実施したが、P 値が GWAS 有意水準を満たす SNP は同定されなかった。

E . 結論

候補遺伝子解析、GWAS 及び imputed SNP による GWAS では、インフルエンザ脳症の発症に関連する SNP を検出することはできなかった。

F . 研究発表

なし

G . 知的所有権の取得状況

なし

**厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書(平成 24 ~ 26 年度)**

**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, 吉川知伸, 斎藤有希恵, 藤井洋輔, 八代将登

津下 充, 野坂直之, 鶴尾洋介, 吉本順子, 森島恒雄

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医学科)

研究要旨

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、急性腎障害発症予測、慢性腎障害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 μLを15分で解析できる小型スライド)の基礎的および臨床的有用性を検討した。

今回の検討で得られた成果を以下に列挙する。(1)L-FABP(迅速計測)は20 ng/mL(または100 ng/mg Cr)前後で陽性を呈する(この値は急性腎障害発症予測のカットオフ値である)。(2)L-FABP(迅速計測)の半定量値とELISA値は有意に正相関する。(3)容態の安定した慢性腎疾患の児において、L-FABP(ELISA)は20 ng/mLを超えない。(4)急性脳症を呈した患者で入院時にL-FABP(迅速計測)が陰性の症例は急性腎障害を呈さない。

結語: 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 μL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、容態の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、テクノメデイカ社)、NAG、B2M、血清Crの計測も同時に行った。基準値はL-FABP < 10 ng/mL (< 10 ng/mg Cr)、8-OHdG < 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。<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検討した。

<研究3>

インフルエンザ脳症患者を対象にして、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。

Matsuiら(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となる。この値は L-FABP(迅速)の(1+)以上に相当する。今回、Matsui らの結果を AKI 発症の予測基準として採用した。

(倫理面への配慮)

検体はすべて暗号で表示しなおしてから検査を開始した。データ保存についても個人が特定されないように十分に配慮した。

C. 研究結果

<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)であった。尿中 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。

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。

<研究3>

1 例目は 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、不隨運動を呈した。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、エダラボンが使用された。

入院当日の L-FABP(迅速)は(-)、L-FABP(ELISA)は <3.0 ng/mL であった。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。

2 例目は 1 歳の男性である。インフルエンザ A の患者で、発熱、痙攣重積、呼吸不全を呈した。ペラミビル、マンニトール、メチルプレドニゾロン、

グロブリン エダラボンが使用された。

入院当日の L-FABP(迅速)は(-)、L-FABP(ELISA)は <3.0 ng/mL であった。患者の血清 Cr は入院当日が 0.24 mg/dL、翌日が 0.15 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 により Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury が発表された。AKI については 5 つの生体マーカーが推奨された。Neutrophil gelatinase-associated lipocalin、Cystatin C、Interleukin 18、Kidney injury molecule-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ソームに担送する蛋白質である。L-FABP 誘導はペルオキシソ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ラート、チアゾリジンによっても 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。

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 产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。

今回の検討で得られた成果を以下に列挙する。(1)L-FABP(迅速計測)は 20 ng/mL(または 100 ng/mg Cr)前後で陽性を呈する(この値は急性腎障害発症予測のカットオフ値である)。(2)L-FABP(迅速計測)の半定量値と ELISA 値は有意に正相関する。(3)容態の安定した慢性腎疾患の児において L-FABP(ELISA)は 20 ng/mL を超えない。(4)急性脳症を呈した患者で入院時に L-FABP(迅速計測)が陰性の症例は急性腎障害を呈さない。

E. 結論

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。今後は、急性脳症にこだわらず多くの最重症例での検討が必要であると考えられた(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)の協力のもとに行われた)。

F. 研究発表

<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) 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.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) Tsukahara H. Oxidative stress biomarkers: Current status and future perspective(分担). In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K.

Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K.

Springer, Berlin, Germany, 2014; 87-113.

(8) Yashiro M, Tsukahara H, Morishima T. Thioredoxin therapy: Challenges in translational research(分担). In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K.

Springer, Berlin, Germany, 2014; 233-252.

(9) Tsukahara H, Yashiro M, Nagaoka Y, Morishima T. Infectious and inflammatory disorders(分担).

In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K.

Springer, Berlin, Germany, 2014; 371-386.

(10) Nagasaka H, Tsukahara H, Miida T. Oxidative stress in inherited metabolic diseases(分担).

In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K.

Springer, Berlin, Germany, 2014; 387-404.

<学会発表>

(1) 塙原宏一.

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) 塙原宏一.

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) 塙原宏一.

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).

(4) 塙原宏一.

一酸化窒素(NO)と腎疾患. 第49回日本小児腎臓病学会学術集会, 秋田, 2014年(6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）
平成 24-26 年度 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外科系集中治療科・特任教授

研究要旨

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

A . 研究目的

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

に参加した施設からのデータを解析する。
海外の優秀な施設を訪問し、責任者と会談を持ち、日本の現状との差を確認する。

（倫理面への配慮）

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

C . 研究結果

（1）2010 年度の ECMO を使用した重症インフルエンザ肺炎患者の調査
生存率は 36%（14 例中 5 例）であった。
しかもすべての症例で抗インフルエンザ薬

B . 研究方法

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

が使われていた。すべての症例で ECMO 治療に關した adverse events を起こした。そのために、1 回路の使用日数は僅か 4.0 日であった。各施設の呼吸不全に対する ECMO 治療の経験は非常に少なく、5 施設は今回が初めての経験、6 施設は年間 1 または 2 例であった。

Adverse events

Directly related to the ECMO circuit 11 例 (78.6%)

Oxygenator failure

7 例(50.0%)

Blood clots

4 例(28.6%)

Cannula-related problems

3 例(21.4%)

Pump head complications

1 例(7.1%)

Not directly related to the ECMO circuit

12 例(85.7%)

Massive bleeding

8 例(57.1%)

Hemolysis

2 例(14.3%)

DIC

10 例(71.4%)

Venous thrombus 2 例

(14.3%)

そのために、1 回路の使用日数は僅か 4.0 日であった。

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

(2)重症の急性呼吸不全に対する ECMO 治療法に關するアンケート調査

1) 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

2) 全国救命救急センターに対するアンケート調査。265 施設 回答 45 施設 (17%) 心肺蘇生に対する V-A の経験はあるが、呼吸不全に対する ECMO の V-V の経験は少ない。現場の医師は、呼吸不全に対する ECMO 治療について、経験が無くても治療が行えると考えてあり、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。

(3)ECMO 患者空輸搬送のための自衛隊航空機動衛生隊合同訓練

約 2 時間の機上訓練を行った。気管挿管され人工呼吸および、ECMO が装着された患者シミュレーターを ECMO プロジェクト搬送コンソールにのせ、さらにコンソールをストレッチャーにのせた状態で機動衛生ユニット内にて訓練を行った。患者頭部は飛行機進行側とした。ECMO はクリアブームのみであった。参加者を 4 つの班に分け、ユニット内訓練は各班約 15 分ずつ 2 回行った。訓練内容は脱血不良、回路内血栓や空気のシナリオを行った。内部には通常 3 人の衛生機動隊員があり、3 人づつ参加者が入ることとなったが、ドクターカー内部での訓練よりも広く、必要時の膜交換や回路交換は行えることができるスペースがあると考えられた。

(4)シミュレーション・ラボ

東北大学クリニカル・スキルラボにて開催、57 名参加

第 41 回日本集中治療医学会学術集会にて開催、48 名参加

千葉大学医学部附属病院クリニカルスキルセンターにて開催、24 名参加

藤田保健衛生大学にて開催、30 名参加

(5) 日常診療における ECMO 症例登録 28 施設、171 症例

1) ECMO 離脱

死亡	57 (33%)
生存	113 (66%)
未登録	1 (データ漏れ)

2) 生存退院

死亡	85 (50%)
生存	76 (44%)
未登録	10 (これらは入院中など)

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、2009 年の新型インフルエンザに対する成績よりは改善しているものの、依然として治療におけるレベルが低くなっていることが疑われる。

(6) 海外の有名施設からの情報収集ならびに研修

○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。

日本も参考にすべき点が多くあるが、各施設で始めることは困難で、行政の指導の下に行われるべきであると思われる。

D . 考察

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

本邦での ECMO 管理の問題点として、脱血カニューレのサイズが小さすぎるために十分な流量が確保できない点があげられる。カロリンスカ大学 ECMO センターで ECMO に使用された脱血カニューレのサイズは 23-29Fr であるのに対し、本邦で用いられた脱血カニューレサイズの 70% は 20Fr 未満であった。体格の違いを考慮しても、本邦で用いられた脱血カニューレのサ

イズは小さすぎると考えられる。このような細すぎる脱血カニューレを使用することにより、脱血不良から流量が不十分となったり、流量を得るのに高い回転数を要するため溶血を起こしたり、血小板消費増大による出血傾向をきたすなどの合併症を引き起こす可能性が高い。

近年 ECMO 治療における合併症は機器の性能および技術の向上により、明らかに減少してきている。しかし、日本でインフルエンザに対して行われた ECMO 治療では、全例で合併症が起こっており、過去の海外の報告と比較して著しく多かった。合併症の中でも、大量出血、DIC、血栓形成などの凝固線溶系の異常が大半の患者でみられており、機材の問題や使用しているカニューラの径が細すぎることから生じている可能性が高い。これらの症例では1回路の寿命が平均 4 日間しかもっておらず、機材やカニューラの問題、そこから生じる凝固障害などが原因となっている可能性は否定できない。回路交換の度に 500~600ml の血液が失われ、補充のための輸液や輸血は患者の負荷となる。ECMO 治療の本質は、rest lung として肺の回復を待つことであり、その間合併症を極力少なくするための安全管理こそが重要である。そのためには適切な機材を使用すること、適切な管理を提供できる専門スタッフの養成と体制作りが不可欠である。

E . 結論

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

である。

F . 研究発表

論文発表

- S Takeda, et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation for 2009 Influenza A(H1N1) Severe Respiratory Failure in Japan. Journal of Anesthesia 2012; 26: 650-657.
三井誠司、竹田晋浩。インフルエンザ。呼吸器ケア 2012; 10: 14-18.
青景聰之、竹田晋浩。体外式膜型人工肺（ECMO）治療。呼吸器内科 2012; 21: 343-349.
竹田晋浩、青景聰之。再評価の経緯と本邦における臨床一適応症例とは。ECMO-up to date。ICU と CCU 2012; 36: 319-326.
竹田晋浩。呼吸不全の体外式膜型人工肺（ECMO）治療。日本医事新報 2013; 4629 ;50-1.日本医事新報社
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
市場晋吾、清水直樹、竹田晋浩. 重症呼吸不全に対する Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO). 日本集中治療医学会雑誌 2014; 21: 313-322
青景聰之、竹田晋浩. 重症インフルエンザ治療と extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). 日本集中治療医学会雑誌 2014; 21: 478-480
竹田晋浩、青景聰之. 進化した呼吸管理 ECMO. 日本呼吸器内科学会雑誌 2014; 3: 777-782.
青景聰之、竹田晋浩。重症呼吸不全に対する ECMO 治療について。医療機関における新型インフルエンザ等対策 ミニマム・エッセンシャルズ。監修：岡部信彦、編集：

田辺正樹、大曲貴夫。南山堂。

年 11 月 2 日～11 月 3 日

71-76,2014,10,1.

青景聰之、竹田晋浩。ECMO。実践シミュレーション教育。監修：志賀隆、編集：武田聰、万代康弘、池山貴也。メディカル・サイエンス・インターナショナル。
256-263,2014,7,7.
青景聰之、竹田晋浩。ARDS Berlin その後。ECMO ができる施設、するべきでない施設。INTENSIVIST 2015; 7: 101-4

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。

学会発表

竹田晋浩。シンポジウム：一般診療における急性呼吸不全の呼吸管理、ウィルス肺炎と急性呼吸不全。第 52 回日本呼吸器学会学術講演会。神戸 2012 年 4 月 22 日

竹田晋浩。ARDS 診断基準の問題点と新しい診断基準。教育講演。第 26 回東北救急医学会総会・学術集会。仙台 2012 年 6 月 30 日

竹田晋浩。急性呼吸不全治療の流れ。教育講演。第 21 回日本集中治療医学会東北地方会。盛岡 2012 年 7 月 7 日

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

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

日本の体外循環補助療法の実態と ウイルス性疾患による重症呼吸不全に対する体外循環補助療法の可能性

分担研究者 中川 聰 国立成育医療研究センター病院 集中治療科医長

研究要旨

Diagnosis Procedure Combination データベースを用いて、膜型人工肺を用いた体外循環補助療法 (extracorporeal membrane oxygenation; ECMO) の実態を調査した。対象年齢を規定せずに行った 6 か月間の調査では、1042 例の ECMO 患者を抽出した。60 歳～79 歳の年齢層が全体の半数以上を占めた。77% が循環器疾患に対して使用されていた。小児患者 (15 歳未満) では、12 か月間の調査期間で 92 症例の患者で ECMO が行われていた。小児患者でも成人患者でも、一施設ごとの ECMO 症例数は少なく、集約化が行われていない実態が確認できた。ここ数年で、海外では、H7N9 インフルエンザ、Middle East Respiratory Syndrome、エンテロウイルス D68 による重症呼吸不全に対しての ECMO 管理が報告されている。新興ウイルス感染症流行時の重症呼吸不全に対して、ECMO 管理を適切に供給できるためには、非パンデミック時からの体制整備が求められる。

A. 研究目的

2009 年の H1N1 インフルエンザの流行時に、海外から膜型人工肺を用いた体外循環補助療法 (extracorporeal membrane oxygenation; ECMO) の有用性の報告が相次いだ。一方で、日本では、呼吸補助としての ECMO は、限られた施設のみで行われているという現状がある。この現状に関して

1. 我が国の ECMO(ここで ECMO は、我が国で多く呼称される percutaneous cardiopulmonary support; PCPS を包括するものとする) の実態がどうであるか。
2. 我が国的小児患者に対する ECMO の実態がどうであるか。

さらに、この後の呼吸 ECMO の応用の可能性について、

3. また、H1N1 インフルエンザ以降に、ウイルス感染症による重症呼吸不全で ECMO 治療を必要とする病態にどのようなものがあるか

について、研究した。

B. 研究方法

1. 我が国の ECMO の実態

Diagnosis Procedure Combination (DPC) データベースを用いて、2009 年 7 月～12 月の 6 か月間に全国で ECMO 管理を受けた患者を抽出した。これらの患者で、年齢、性別、DPC の主要診断群、体外循環の施行日数、転帰を調べた。

2. 我が国的小児患者に対するECMOの実態

DPC データベースを用い 2008 年 7 月 ~ 12 月と 2009 年 7 月 ~ 12 月の合計 12 か月間に、全国で ECMO 管理を受けた 15 歳未満の小児患者を抽出した。これらの患者で、年齢、DPC の主要診断群、転帰を調べた。

3. H1N1 インフルエンザパンデミック以降のウイルス感染症による重症呼吸不全に対する ECMO 管理の海外からの報告

Medline を用いて、H7N9 インフルエンザ、Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS CoV)、エンテロウイルス D68 (EV-D68) による呼吸不全での ECMO の使用状況に関して調べた。

C. 研究結果

1. 我が国 ECMO の実態

当該期間中に 1042 症例の ECMO 症例を抽出した。性別は男性が 70%。年齢別では、70 歳代が最も多く (292 人 ; 28.0%) 60 歳代 (256 人 ; 24.6%) がそれに続いた。主要疾患別では循環器疾患が最も多く全体の 77% を占めた。呼吸器疾患は全体の 5% であった。生存率は 33% であった。当該期間中に ECMO を行った施設は 282 施設であった。この期間に 1 例のみを試行した施設が 97 施設、2 症例が 49 施設、3 症例が 32 施設だった (当該期間に 3 症例以下の施行施設が全体の 62%) 。

2. 我が国的小児患者に対するECMOの実態

当該期間中に 92 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。心臓外科の術後の循環補助として使用され

た症例が 49 症例だった。呼吸補助としては 15 例 (16%) に行われた。生存率は 35% で、呼吸補助群に限ると 53% であった。この治療法が行われた施設数は 43 であり、そのうち 26 施設では、当該期間に 1 例のみの症例数であった。

3. H1N1 インフルエンザパンデミック以降のウイルス感染症による重症呼吸不全に対する ECMO 管理の海外からの報告

H7N9 インフルエンザに対しては、2013 年の第一波の際に、上海で 3 例の ECMO が行われたことが報告された。しかし、報告された以上に、ECMO が行われているという情報を得た (personal communication) しかし、中国国内では、この H7N9 インフルエンザ以前には ECMO の経験の浅い施設で ECMO 管理が行われている点を懸念する声があった (personal communication) 。

MERS-CoV に対しては、イギリスから 1 例、フランスから 2 例の ECMO の症例が報告されている。しかし、MERS の流行の主体となっている中東諸国での ECMO に関する情報は得られなかった。

2014 年夏には、米国で、EV-D68 が流行した。イリノイ州では、小児患者が ECMO 管理を必要とした。

D. 考察

我が国においては、通称 PCPS とよばれる体外循環補助法で、循環補助を行っている症例が多いことが分かった。呼吸補助としての ECMO は、全体の 5% 程度に過ぎなかつた。6 か月間の調査期間に ECMO 管理が 3 症例以下の症例数の施設は、ECMO を

行っている施設全体の 62%を占めた。この調査から、日本では、呼吸補助の ECMO が少なく、循環補助としての ECMO が多いこと、多くの施設での ECMO の症例数が少ないことが分かった。

小児に限ると、呼吸補助としての ECMO は、ECMO 全体の 16%を占めた。小児では、12か月の調査期間に ECMO を行った施設は 43 施設だったが、そのうちの 26 施設では 1 例のみの施行だった。小児でも、循環補助として ECMO が用いられている傾向が認識できた。また、ECMO 施行施設での症例数が、少ないと分かった。

ウイルス感染症による呼吸不全に対しては、ここ数年において、海外では H7N9 インフルエンザ、MERS、EV-D98 に対して、ECMO が応用されている状況が認識できた。

ECMO 管理において集約化されていない我が国で、新興感染症による重症呼吸不全患者が多数発生しうるパンデミック時に対応するためには、非パンデミック時から、適正に ECMO 管理を供給できる医療体制の構築が必要であろう。

E. 結論

我が国では、成人でも小児でも、ECMO 管理が集約化されていない実態が認識できた。また、呼吸管理よりも循環管理目的で使用される傾向が著明であった。海外で流行している新興感染症による重症の呼吸不全は、ECMO の対象疾患と考えられ、これらの流行の可能性も踏まえ、我が国における ECMO の適切な供給体制の構築が必要である。

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
Tsukahara H.	Oxidative stress biomarkers: Current status and future perspective	Tsukahara H, Kaneko K	“Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders”	Springer	USA	2014	87-113
Yashiro, et al.	Thioredoxin therapy: Challenges in translational research	Tsukahara H, Kaneko K	“Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders”	Springer	USA	2014	233-252
Tsukahara, et al.	Infectious and inflammatory disorders	Tsukahara H, Kaneko K	“Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders”	Springer	USA	2014	371-386
Nagasaki, et al.	Oxidative stress in inherited metabolic diseases	Tsukahara H, Kaneko K	“Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders”	Springer	USA	2014	387-404
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	2014	151-168
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	2014	1-140
青景聰之、竹田晋浩	重症呼吸不全に対する ECMO 治療について	岡部信彦、田辺正樹、大曲貴夫	医療機関における新型インフルエンザ等対策ミニマム・エッセンシャルズ	南山堂	東京	2014	71-76
青景聰之、竹田晋浩	ECMO	武田聰、万代康弘、池山貴也	実践シミュレーション教育	メディカル・サイエンス・インターナショナル	東京都	2014	256-63
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 2014-2015 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 (2014 - 2015 年版)	一般社団法人日本臨床内科医会	東京	2014	1-49
松川昭博	炎症の分子機構	一瀬白帝 , 鈴木宏治	図説分子病態学 5 版	中外医学社	東京	2014	91-98

青景聰之 竹田晋浩	急性呼吸不全における ECMO の有用性、成績。編集	永井厚志、桑野和善、高橋和久	Annal review 呼吸器 2013	中外医学社	東京	2013	250-256
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	1-48
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	1-49

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
Ishida Y, Kawashima H, Morichi S, Yamanaka G, Okumura A, Nakagawa S, Morishima T	Brain magnetic resonance imaging in acute phase of pandemic influenza A (H1N1) 2009-associated encephalopathy in children.	Neuropediatrics	46(1)	20-25	2015
Morichi S, Yamanaka G, Ishida Y, Oana S, Kashiwagi Y, Kawashima H.	Brain-derived neurotrophic factor and interleukin-6 levels in the serum and cerebrospinal fluid of children with viral infection-induced encephalopathy	Neurochem Res	39(11)	2143-2149	2014
Kashiwagi Y, Kawashima H, Suzuki S, Nishimata S, Takekuma K, Hoshika A.	Marked elevation of excitatory amino acids in cerebrospinal fluid obtained from patients with rotavirus-associated encephalopathy	J Clin Lab Anal		doi: 10.1002/jcla.21774	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.	J Infect Chemothe	20	15-19	2014
Yamashita Y, Ito Y, Isomura H, Takemura N, Okamoto A, Motomura K, Tsujuchi T, Natsume A, Wakabayashi T, Toyokuni S, Tsurumi T.	Lack of presence of the human cytomegalovirus in human glioblastoma.	Modern Pathol	27	922-992	2014
Kawano Y, Kawada J, Ito Y.	Epstein-Barr Virus MicroRNAs in Plasma as Potential Biomarkers for Chronic Infections.	J Infect Dis	209	1298-1300	2014
Kanazawa T, Hiramatsu Y, Iwata S, Siddiquey M, Sato Y, Suzuki M, Ito Y, Goshima F, Murata T, Kimura H.	Anti-CCR4 Monoclonal Antibody Mogamulizumab for the Treatment of EBV-Associated T- and NK-Cell Lymphoproliferative Diseases.	Clin Cancer Res	20	5057-5084	2014
Yamayoshi S, Yamada S, Fukuyama S, Murakami S, Zhao D, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Macken C, Neumann G, Kawaoka Y	Virulence-affecting amino acid changes in the PA protein of H7N9 influenza A viruses.	Journal of Virology	88	3127-3134	2014
Neumann G, Macken CA, Kawaoka Y.	Identification of amino acid changes that may have been critical for the genesis of A(H7N9) influenza viruses.	Journal of Virology	88	4877-4896	2014

Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Yamada S, Uchida Y, Saito T, Takahashi K, Sugaya N, Tashiro M, Kawaoka Y.	Detection sensitivity of influenza rapid diagnostic tests.	Microbiology and Immunology	58	600-606	2014
Momonaka H, et al.	High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy.	Brain Dev.	36	484-8	2014
Hasegawa S, et al.	Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection.	Cytokine	69	206-10	2014
Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Shirabe K, Toda S, Wakabayashi-Takahara M, Morishima T, Ichiyama T.	Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection.	Cytokine.	69(2)	206-10	2014
Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y.	Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential.	Cell Host Microbe.	15(6)	692-705	2014
Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzuki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M.	The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.	J Virol.	88(10)	5608-16	2014
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	7(3)	448-55	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.	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, 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.	7(5)	759-60	2013

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.	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
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
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
Okada S, et al.	Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection.	Cytokine	63	194-200	2013
Hasegawa S, et al.	Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy.	Brain Dev.	35	626-9	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
Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaki T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T.	Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam.	Mod Pathol.	26(3)	357-69	2013

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.	8(7)	e68375	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, Shiraikura 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
Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le QM, Sekijima M, Ito K, Takada A, Kawaoka Y.	Molecular mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the NA of H5N1 avian influenza viruses.	Journal of Infectious Diseases	207	89-97	2013
Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y.	Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1.	Journal of Infectious Diseases	207	262-271	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
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	771-779	2013
Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Mori H, Ichiyama T, Okumura A.	Pertussis- associated encephalitis/encephalopathy with marked demyelination in an unimmunized child.	J Neurol Sci	320	145-148	2012
Ito Y, Kimura H, Maeda Y, Hashimoto C , Ishida F , Izutsu K , Fukushima N , Isobe Y , Takizawa J , Hasegawa Y , Kobayashi H , Okamura S, Kobayashi H, Yamaguchi M, Suzumiya J, Hyo R, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K, Suzuki R.	Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type.	Clin Cancer Res	18	4183-4190	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(2)	180-6	2012

Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H.	Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine.	J Med Virol.	84(2)	336-44	2012
Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T.	Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function.	ACS Chem Biol.	7(3)	552-62	2012
van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H.	Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design.	Vaccine.	30(40)	5893-900	2012
Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T.	Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development.	Blood.	120(24)	4733-43	2012
Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T.	Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection.	Mod Pathol.	25(1)	1-13	2012
Shinjiro Takeda, et al.	Extracorporeal Membrane Oxygenation for 2009 Influenza A(H1N1) Severe Respiratory Failure in Japan	Journal of Anesthesia	26	650-657	2012
中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹	ウイルス性肺炎	病理と臨床	32(10)	1146-53	2014
吳宗憲、河島尚志、柏木保代、武隈孝治	インフルエンザ脳症における鼻汁中サイトカインプロファイル	小児感染免疫	26巻1号	21-29	2014
千田裕美、村岡 正裕、山宮麻里、井上なつみ、木場由希子、篠崎絵里、前田文恵、水野和徳、井上巳香、前馬秀昭、酒詰忍、太田和秀、谷内江昭宏、河島尚志	二相性けいれんとMRIでの拡散能低下を呈したRSウイルス脳症の1例	小児感染免疫	26巻2号	241-246	2014
河島尚志、山中 岳、森地振一郎	インフルエンザ脳症の最近の話題減少傾向にある、というのは本当か	小児内科	46巻9号	1419-1420	2014
河島尚志	ウイルス性脳炎・脳症の最近の知見 インフルエンザ、RS、ロタなど	東京小児科医会報	32巻3号	36-43	2014
市場晋吾、清水直樹、竹田晋浩	重症呼吸不全に対する Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO)	日本集中治療医学 会雑誌	21	313-322	2014
青景聰之、竹田晋浩	重症インフルエンザ治療と extracorporeal membrane oxygenation (ECMO)	日本集中治療医学 会雑誌	21	478-480	2014
竹田晋浩、青景聰之	進化した呼吸管理 ECMO	日本呼吸器内科学 会雑誌	3	777-782	2014

青景聰之、竹田晋浩	ARDS Berlin その後。ECMO ができる施設、するべきでない施設	INTENSIVIST	7	101-4	2014
松川昭博,伊藤利洋	Ras-Raf-ERK 経路からみた A 型インフルエンザ (H1N1) 感染	NEUROINFECION	19	40-42	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
竹田晋浩 青景聰之	再評価の経緯と本邦における臨床一適応症例とは。ECMO-up to date	ICU と CCU	36(5)	319-326	2012
青景聰之 竹田晋浩	体外式膜型人工肺 (ECMO) 治療	呼吸器内科	21(4)	343-349	2012
中島典子、長谷川秀樹	インフルエンザウイルス感染症の病理	医学のあゆみ	241(1)	4-7	2012