

令和元年6月27日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05844

研究課題名(和文) Effects and Safety of Oral Mast Cells Stabilization Therapy in Early Dengue Patients: A Randomized, Placebo-Controlled Trial

研究課題名(英文) Effects and Safety of Oral Mast Cells Stabilization Therapy in Early Dengue Patients: A Randomized, Placebo-Controlled Trial

研究代表者

グエン フイティエン (NGUYEN, Huytien)

長崎大学・熱帯医学・グローバルヘルス研究科・准教授

研究者番号：20457526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：超音波検査は、デング熱重症度の主要な指標である血漿漏出を検出するための主要手法である。我々は、本手法を最適化するために、標準化された超音波検査について系統的なレビューを行った。超音波検査結果の再現性を評価するために、我々はデング熱患児の胆嚢壁肥厚及び血漿漏出による胸水、腹水量の超音波臨床検査を行った。その結果、超音波検査を行う測定者の単独測定結果、測定者間の検査結果のいずれにも高い再現性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、デング熱の診断とその重症度を予測する超音波検査の標準化手法を確立した。本手法は臨床医師の診断に役立つことが期待される。我々は既に本手法のパイロット試験を行った。臨床応用のためには更に臨床試験を繰り返す必要がある。

研究成果の概要(英文)：We have already finished a systematic review to optimize a standardized ultrasound to measure the plasma leakage in dengue patients that is the main indicator of dengue severity. A clinical study has been conducted to assess the reproducibility of US in the assessment of gallbladder-wall thickness in addition to the volume of pleural effusion and ascites as a consequence of plasma leakage in dengue children. Our results showed that ultrasound values of plasma leakage were highly reproducible and showed a good intra- and inter-observer agreement between ultrasonic doctors.

研究分野：感染症内科学

キーワード：デング 血漿漏出 超音波 診断 アレルギー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

デングウイルス感染は熱帯および亜熱帯地域で保健上の最大の脅威の一つである[1]。デングウイルス感染は、単純な無症候性のものから重症のものまで様々な病態を示す[2]。軽症型デング熱は発熱、吐き気、嘔吐、頭痛、関節痛、筋肉痛及び発疹の症状が特徴であり、自然治癒する疾患である[3]。一方デング出血熱は、急性の発熱とともに様々な程度の出血や血小板減少（ $\leq 10^5 \text{ml}^{-1}$ ）、血液濃縮、滲出液（胸水、腹水など）または低アルブミン血症を伴う血漿漏出によって検出される。

デングウイルスは内皮細胞に感染することが知られている[5]。そのメカニズムは完全には理解されていないが、活性酸素、酵素、および炎症誘発性分子が内皮グリコカリックス層を破壊し、血漿がその下にある細胞間接合部に到達することで血管外へ漏出することが分かっている[6]。通常、内皮グリコカリックスは、血漿から負に帯電したもしくは大きな分子の動きを制限しており、それらの血管外への漏出を防いでいる。グリコカリックスの変化は一時的なもので漏出は自然に治まる[6]。

血漿漏出は、デング出血熱（DHF）とデングショック症候群（DSS）の主な特徴であり血管内容量の減少や循環機能不全を招く可能性がある[7]。血漿漏出の程度は、輸液を要するような血管内容量の減少など、患者それぞれの重症度に影響を与える。また、長期にわたるショックに続発して、肝不全および脳症が発症する可能性がある。デング感染症による死亡は、血漿漏出を伴う患者の診断及び治療が遅れた場合に起こる。解熱前後に、約 24～48 時間持続する臨床的に明らかな血漿漏出を認めることが示されている。漏出は主に胸膜腔、腹膜腔および心膜腔に影響を及ぼす。

血漿漏出は、現在の臨床において標準的に用いられる方法（血液濃縮、触診、胸部 X 線、または超音波検査）のいずれかによって評価される。血液濃縮（血漿漏出の指標として広く使用されている）は、ヘマトクリット値（Hct）の 20% の増加として定義されている。しかし、Hct の測定値は必ずしも正確ではなく、脱水、発熱、または出血などの他の要因、特に水分摂取量の影響を受ける可能性がある[8]。さらに、血液濃縮度を計算するために必要とされる複数回の Hct 測定は、患者の状態によっては実施困難であり、そのことがデング熱症例の誤分類につながっている。

触診は主観的な方法であり、評価者の経験に左右される。例として胸水の診断では、体温、触覚振盪音、胸郭の拡張は触知しやすく、気管偏位などは見逃しやすい。胸部 X 線写真には（特に大量の漏出液において）体液の検出および診断が容易で費用対効果が高い検査であるという利点があるが、超音波検査法とは異なり、少量の体液を検出することは感度の鈍さから難しく、また放射線への被曝がある。他方、超音波検査では少量の漏出液の位置および胸膜肥厚の検出において優れている。超音波検査は、迅速かつ容易に実施できるため、胸腔穿刺術に好ましい画像診断法である。

以上の理由から超音波検査がデング熱の管理において現在の臨床標準法に代わる有望な選択肢である。超音波検査の利点には、非侵襲的であること、（類似の技術と比較して）低コストであること、および X 線と比較して機械の携帯性が高いことが含まれる。超音波検査は、肝腫大や脾腫大、胆嚢浮腫と同様に、デング熱患者に胸水や腹水の形であらわれる毛細血管漏出を検出することを可能にする[9-13]。しかしながら、デング熱患者・非デング熱患者に関わらず、血漿漏出診断における超音波検査の再現性を調査した研究はない。

超音波検査法には診断的価値に加えて予後的価値もある。予後予測指標として、超音波検査は、どの患者が重症期に入る危険性が高いかを評価するために使用され得る。これらの患者を早期

に特定することで、危険性の高い患者に病院の医療用具を確保し、そうでない患者を退院させることができる。

2. 研究の目的

デング熱小児における胆嚢壁肥厚及び血漿漏出に由来する胸水、腹水量の超音波検査による測定を行い、その再現性を評価することが、本件の研究目的である。デング熱と非デング熱の小児の両方で検査を行い、超音波検査における単独測定者内及び複数の測定者間での検査結果の変化を調査する。また、デング熱の重症化に対する肥満細胞の安定化剤（ケトチフェン）とヒスタミン拮抗薬（セチリジン）の効果を検証する。

3. 研究の方法

本研究では、2つの患者グループをリクルートした。McAlinden et al [14]に従って、サンプルサイズは20%の精度で計算した。第1群は、ベトナム・ホーチミン市内の小児科に受診中で、危険な兆候がない（72時間以内に37.5℃以上の発熱がある、NS1タンパク質迅速診断テスト陽性）デング熱疑いの患児120名（5～18歳）とした。

第2群は、第1群と年齢と性別が合うように調整した非デング熱の入院小児30名とした。重症デング熱の臨床的徴候および症状を有する小児は除外した。この研究はヘルシンキ宣言に従って行われ、3つの病院の倫理委員会によって承認された。すべての参加者またはその両親から、研究の前に書面によるインフォームドコンセント／アセントを得ている。

デング熱臨床試験の治療効果を定量化するには、デング熱の重症度の標準的な測定が必要である。我々は実験的な臨床試験を行い、血漿漏出の標準測定を設定した。これは、血管内容積の減少および循環機能不全を招き得るデング熱の重症度の主な際立った特徴である。

血漿漏出を測定するための現在の方法は、信頼性の低さ、煩雑さ、そして侵襲性の高さのようないくつかの問題を有する。超音波検査は、デング熱患者における肝腫大、脾腫大、胆嚢壁肥厚と同様に胸水および腹水という形で臨床医に毛細血管漏出を検出することを可能にする。しかしながら、デング熱患者でも非デング熱患者でも、血漿漏出診断における超音波検査の再現性を調査した研究はない。標準化された超音波検査法を設定するために系統的レビューを行った。デング熱患児における血漿漏出に由来する胸水および腹水の量の測定に加えて、胆嚢壁肥厚の測定における超音波検査の再現性を評価するために臨床研究を行った。研究代表者らの結果は、デング熱および非デング熱の両小児における超音波検査測定の良好な一致を示している。

4. 研究成果

研究代表者らの系統的レビューにより、デング熱の重症度の主な指標であるデング熱患者における血漿漏出を測定するための標準化された超音波検査法を提供できた。血漿漏出の主な徴候である胸水、腹水および胆嚢壁浮腫の存在を評価した。さらに、肝腫大、脾腫大、肝被膜下液、腎周囲浮腫および後腹膜浮腫など、他の一般的なデング熱の徴候も測定した[15-17]。3.5～5MHzの周波数範囲を有する凸面超音波トランスデューサおよび8～10MHzの周波数範囲を有する直線超音波トランスデューサを測定に使用した。周波数を肥満体型では最小に、痩せ型では最大になるように、子供の体重に応じて調整し、腹部および胸部の超音波検査を行った。距離は超音波検査技師によって3回測定され、3回の測定の平均を最終分析に使用した。

通常の胆嚢は、高エコー性の薄い壁を持ち、無エコー性の胆汁を含むべくキャリパーを壁自体に垂直にして、胆嚢の縦断面における壁の厚さを測定する（横断面では壁に垂直ではないかもしれないし、厚さを過大評価する可能性がある）。前壁の厚さは最も薄い部分で測定される

[17]. 胆嚢壁浮腫は、胆嚢壁の厚さが $> 3.0 \text{ mm}$ の場合に考慮する。隣接する管腔内腸内ガスの存在によって引き起こされるサイドローブアーチファクトを回避することで、縦断面の前部副肝壁でより正確な測定値を得ることができる[15]。

腹膜内の遊離液を検出するために、我々はこれらのスペース：左右の結腸傍溝、肝臓周囲のスペース、脾臓周囲のスペース、そしてダグラス窩をスキャンした。腹骨盤腔内腹の水は、腹水が1つの空間にのみ存在する場合は軽度、2~3個の場合は中程度、4~5個の場合は大規模に分類した。肝腫大は、肝臓の下端が患者の臍まで来ていることが、脾腫大は、脾臓の下端が左腎臓の下端を超えると考えられた。

胸水の評価するために、胸部スキャンを仰臥位で行った。両方の胸膜腔は、両側性肋骨横隔膜角を視覚化することによって肋間アプローチを通して評価した。6つの徴候のうちの1つは胸水を決定するために使用した。これらの6つの兆候は、(1) 胸膜の臓側と壁側の層の空間の存在、(2) 呼吸中に変化する空間の存在、(3) エコー源性粒子の移動および浮遊、(4) 胸膜腔内を移動する隔膜、(5) 液内を移動する肺、(6) ドップラー超音波検査による「液の色」である。胸水は隣接する肺の圧縮性無気肺を引き起こし、無気肺の程度は、漏出液の大きさに比例する。大規模な漏出液では、圧縮された無気肺が漏出液内で動的な動きで浮遊する[18-20]。

胸水がある場合は、右、左、両側、最小、小、中、大にさらに分類される。無エコー空間が肋骨横隔膜角に限定されている場合、胸水は最小である。スペースがコストフレニックよりも大きい、それでも 3.5 MHz の曲線プローブでカバーされる領域の範囲内にある場合は小とし、スペースが1プローブ範囲より大きい、2プローブ範囲内の場合には中程度、同側肺全体の無気肺がある場合は大とした[18-20]。

Dengue熱患児における血漿漏出に由来する胸水および腹水の量の測定に加えて、胆嚢壁肥厚の測定における超音波検査の再現性を評価するために臨床研究を行った。我々の結果は、血漿漏出の超音波検査の結果は再現性が高く、測定者間で良好な一致を示した。

<引用文献>

- [1] *Dengue/dengue haemorrhagic fever*. Wkly Epidemiol Rec, 2000. 75(24): p. 193-6.
- [2] Kurane, I. and T. Takasaki, *Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large*. Rev Med Virol, 2001. 11(5): p. 301-11.
- [3] Gibbons, R.V. and D.W. Vaughn, *Dengue: an escalating problem*. Bmj, 2002. 324(7353): p. 1563-6.
- [4] Riu-Perez, J.G., et al., *Dengue and dengue haemorrhagic fever*. Lancet, 1998. 352(9132): p. 971-7.
- [5] Dalrymple, N. and E.R. Mackow, *Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors*. J Virol, 2011. 85(18): p. 9478-85.
- [6] *Centers for Disease Control and Prevention. Pathophysiology-Plasma Leakage*.
- [7] WHO, *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. 2 ed. 1997, Geneva: WHO.
- [8] Srikiatkachorn, A., *Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever*. Thromb Haemost, 2009. 102(6): p. 1042-9.
- [9] Thulkar, S., et al., *Sonographic findings in grade III dengue hemorrhagic fever in adults*. J Clin Ultrasound, 2000. 28(1): p. 34-7.

- [10] Setiawan, M.W., et al., *Epigastric pain and sonographic assessment of the pancreas in dengue hemorrhagic fever*. J Clin Ultrasound, 1998. 26(5): p. 257-9.
- [11] Setiawan, M.W., et al., *Dengue haemorrhagic fever: ultrasound as an aid to predict the severity of the disease*. Pediatr Radiol, 1998. 28(1): p. 1-4.
- [12] Setiawan, M.W., et al., *Gallbladder wall thickening in dengue hemorrhagic fever: an ultrasonographic study*. J Clin Ultrasound, 1995. 23(6): p. 357-62.
- [13] Pramuljo, H.S. and S.R. Harun, *Ultrasound findings in dengue haemorrhagic fever*. Pediatr Radiol, 1991. 21(2): p. 100-2.
- [14] McAlinden, C., J. Khadka, and K. Pesudovs, *Precision (repeatability and reproducibility) studies and sample-size calculation*. J Cataract Refract Surg, 2015. 41(12): p. 2598-604.
- [15] Oliveira, R.V.B.d., et al., *Valor da ultrassonografia em crianças com suspeita de febre hemorrágica do dengue: revisão da literatura*. Radiologia Brasileira, 2010. 43: p. 401-407.
- [16] NG, B., et al., *Role of sonography in the assessment of dengue fever with serological correlation*. 2017, 2017. 3(11): p. 6.
- [17] Bates, J., *Abdominal ultrasound: How, Why and When*. 3rd ed. 2010: Churchill Livingstone.
- [18] Koenig SJ, Narasimhan M, and M. PH, *Thoracic ultrasonography for the pulmonary specialist*. Chest, 2011 Nov. 140(5): p. 1332-41.
- [19] Prina E, et al., *Lung ultrasound in the evaluation of pleural effusion*. J Bras Pneumol, 2014 Jan-Feb. 40(1): p. 1-5
- [20] Vorster MJ, Allwood BW, and Koegelenberg CF, *Transthoracic Ultrasonography for Clinicians*. Eurasian J Pulmonol, 2015. 17(1): p. 1-9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 件）

- ① Phuong NTN, Manh DH, Dumre SP, Mizukami S, Weiss LN, Van Thuong N, Ha TTN, Phuc LH, Van An T, Tieu TM, Kamel MG, Morra ME, Huong VTQ, Huy NT*, Hirayama K*. (2019) Plasma cell-free DNA: a potential biomarker for early prediction of severe dengue. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 査読有、13;18(1):1 (Impact Factor: 3.155)
- ② Giang HTN, Banno K, Minh LHN, Trinh LT, Loc LT, Eltobgy A, Tai LLT, Khan A, Tuan NH, Reda Y, Samsom M, Nam NT, Huy NT*, Hirayama K. (2018) Dengue hemophagocytic syndrome: A systematic review and meta-analysis on epidemiology, clinical signs, outcomes, and risk factors. *Rev Med Virol*. 査読有、e2005. doi: 10.1002/rmv.2005. (Impact Factor: 5.034)
- ③ Inokuchi M, Dumre SP, Mizukami S, Tun MMN, Kamel MG, Manh DH, Phuc LH, Van Thuong N, Van An T, Weiss LN, Turk T, Dang TN, Huong VTQ, Morita K, Huy NT*, Hirayama K*. (2018) Association between dengue severity and plasma levels of dengue-specific IgE and chymase. *Arch Virol*. 査読有、163(9):2337-2347. (Impact Factor: 2.06)
- ④ Morra ME, Altibi AM, Iqtadar S, Minh LHN, Elawady SS, Hallab A, Elshafay A, Omer OA, Iraqi A, Adhikari P, Labib JH, Elhousseiny KM, Elgebaly A, Yacoub S, Huong LTM,

Hirayama K, Huy NT†. (2018) Definitions for Warning Signs and Signs of Severe Dengue According to The WHO 2009 Classification: Systematic Review of Literature. *Reviews in Medical Virology* 査読有、 e1979 (Impact Factor: 5.44)

- ⑤ Kamel MG, Nam NT, Han NHB, El-Shabouny AE, Makram AM, Abd-Elhay FA, Dang TN, Hieu NLT, Huong VTQ, Tung TH, Hirayama K, Huy NT†. (2017) Post-dengue acute disseminated encephalomyelitis: A case report and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 査読有、 11(6):e0005715 (Impact Factor: 3.83)

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① Nguyen Tien Huy and Kenji Hirayama. Novel biomarkers discovery of dengue. Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases (J-GRID) seminar for the collaborative study on emerging and re-emerging infectious diseases in Viet Nam. Ninh Binh Province, Vietnam. Dec 10th, 2017 (Oral presentation).
- ② Giang HN, Alabd S, Ghozy S, Linh LK, Nguyen DPN, Anh TM, Dang NP, Turk T, Hassan M, AbdElsalam ES, Onyeudo O, Nasef S, Sassy A, Hadad HE, Aly S, Hirayama K, Nguyen Tien Huy. Epidemiology, clinical characteristics, and sequelae of Zika infection. A systematic review and meta-analysis. Australasian Society for Infectious Diseases (ASID) Annual Scientific Meeting. Mar 29th-April 1st, 2017. Blue Mountain, Sydney, Australia.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：ローサボーン チャントラ

ローマ字氏名：LAOTHAVORN, Juntra

所属研究機関名：長崎大学

部局名：熱帯医学研究所

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：10640196

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。