

TABLE 1. Primers for quantitative PCR<sup>a</sup>

Target	Sequences
TLR3	
Forward.....	CCC AGC TCG ATG TTT CCT ACA
Reverse.....	CAG GCT TGG GAG ATA GGA GAA G
Probe.....	CAA CCT CCA TGA TGT CGG CAA CGG
TLR4	
Forward.....	CAT GGA ACA CAT GGC TGC TAA
Reverse.....	GTA ATT CAT ACC CCT GGA AAG GAA
Probe.....	CTA TAG CAT GGA CCT TAC CGG GCA GAA GG
IFN- $\alpha$	
Forward.....	CTG CTA GTG ATG AGC TAC TGG TCA A
Reverse.....	GGG TCA AGG CTC TCT TGT TCC T
Probe.....	CTG CTC CCT AGG ATG TGA CCT GCC TCA
IFN- $\beta$	
Forward.....	GCT CCT GGA GCA GCT GAA TG
Reverse.....	TCC GTC ATC TCC ATA GGG ATC T
Probe.....	TCA ACC TCA CCT ACA GGG CGG ACT TC
IFN- $\gamma$	
Forward.....	AGC CAG ATT ATC TCT TTC TAC CTC AGA
Reverse.....	GCA ATA CTC ATG AAT GCA TCC TTT
Probe.....	CAG GCC ATC AGC AAC AAC ATA AGG GTC
IL-4	
Forward.....	CGC CAT GCA CGG AGA TG
Reverse.....	CGA GCT CAC TCT CTG TGG TGT T
Probe.....	TGC CAA ACG TCC TCA CAG CAA CGA
IL-6	
Forward.....	CCA GAA ACC GCT ATG AAG TTC CT
Reverse.....	CAC CAG CAT CAG TCC CAA GA
Probe.....	TCT GCA AGA GAC TTC CAT CCA GTT GCC
IL-12p40	
Forward.....	AGC TCG CAG CAA AGC AAG AT
Reverse.....	TGG AGA CAC CAG CAA AAC GA
Probe.....	TGT CCT CAG AAG CTA ACC ATC TCC TG
$\beta$ -Actin	
Forward.....	CAC CGA TCC ACA CAG AGT ACT TG
Reverse.....	CAG TGC TGT CTG GTG GTA CCA
Probe.....	CAG TAA TCT CCT TCT GCA TCC TGT CAG CAA

<sup>a</sup> Probes labeled with FAM (5') and TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) (3').

**Histopathological examination.** Excised lung, brain, and nasal tissues were fixed with 10% neutral-buffered formalin, and nasal tissue was decalcified in the EDTA solution. After fixation, tissues were embedded in paraffin by conventional methods and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

**Statistics.** Comparisons between the groups were made with the *t* test for paired observations, and a *P* of <0.05 was considered significant.

## RESULTS

**Intranasal immunization of HA vaccine with poly(I:C) protects against influenza virus infection.** To estimate the mucosal adjuvant efficacy of poly(I:C) for influenza virus HA vaccine, the antibody response against PR8 HA molecules was examined in mice immunized intranasally with 1  $\mu$ g of PR8 vaccine with different amounts (0 to 10  $\mu$ g) of poly(I:C). The mice received the primary immunization with vaccine and poly(I:C) at 6 weeks before infection, and secondary immunization was performed with either vaccine with poly(I:C) or vaccine alone at 2 weeks prior to infection (Fig. 1). The highest concentration of anti-HA IgA Ab in the nasal wash fluid was

observed in animals given repeated immunization with 1  $\mu$ g of vaccine and 10  $\mu$ g of poly(I:C). The concentration of anti-HA IgA Ab of mice immunized with vaccine and 1  $\mu$ g of poly(I:C) twice was similar to that of mice that received primary immunization with vaccine and 3  $\mu$ g of poly(I:C) followed by secondary immunization with vaccine alone.

The concentration of anti-HA IgG in the serum was also measured in the same experimental groups. The highest level of anti-HA IgG was also observed in mice that were inoculated twice with vaccine and 10  $\mu$ g of poly(I:C). The serum IgG responses seemed to parallel the IgA response in the nasal wash. Nasal IgA and serum IgG levels were markedly low in mice immunized with 1  $\mu$ g of denatured poly(I:C) (Fig. 1). The antibody titers of IgG1 and IgG2a in mice immunized with HA vaccine and poly(I:C) were comparable to those in mice inoculated with CTB\* combined with HA vaccine (data not shown).

Next, we examined the protective effect of intranasal administration of HA vaccine with poly(I:C) against influenza virus infection. In control mice, virus titers were  $10^{3.1}$  PFU/ml in the nasal wash fluid at 3 days after infection with 1,000 PFU of influenza virus (Fig. 1). Mice immunized with HA vaccine alone showed no protective effect in the nasal wash compared with controls (Fig. 1). On the other hand, mice immunized with vaccine with either 1  $\mu$ g of poly(I:C) twice or 3  $\mu$ g of poly(I:C) once at the first immunization showed complete protection against viral infection (Fig. 1). In mice immunized with vaccine with either 0.1 or 1  $\mu$ g of poly(I:C), significant reductions in virus titers in the nasal wash fluid were observed compared with mice immunized with vaccine alone. Thus, intranasal administration of HA vaccine with poly(I:C) adjuvant protected mice against influenza virus infection, and the protective effect of poly(I:C) was not observed after denaturation. The results were consistent with production of IgA and IgG antibodies.

We next investigated whether poly(I:C) is effective for protection against influenza virus-induced lethal pneumonia in mice. At 2 weeks after lethal virus challenge (40 50% lethal doses [ $LD_{50}$ ] of the A/PR8 virus), no mice survived in the nonimmunized group or the groups immunized by various influenza B virus with poly(I:C), which showed marked body weight reduction (Fig. 2A and B). In contrast, no death occurred in the group of mice immunized with various amounts of poly(I:C) without body weight loss (Fig. 2A and B). The viral titer of the lung wash fluid of the nonimmunized group and the groups immunized by various influenza B virus with poly(I:C) was around  $10^{6.2}$  PFU/ml, while those of the mice vaccinated with either poly(I:C) or CTB\* were below the level of detection (Fig. 2A). We next examined the pathological findings of the lungs in the group immunized with A/PR8 (Fig. 2C) and B/Aichi (Fig. 2D). The lung specimens of mice immunized with A/PR8 vaccine followed by 40  $LD_{50}$  A/PR8 virus infection demonstrated bronchi and alveoli without any inflammatory change at 8 days after the virus challenge. In the mice immunized with B/Aichi vaccine followed by the same amount of A/PR8 virus, marked pneumonia with destruction of bronchial mucosa and interstitial infiltration of inflammatory cells was recognized in the lung specimen at 8 days after the challenge. A similar pathological change was observed in the group immunized by various influenza B virus with poly(I:C) (data not shown). Thus, it seems that the lung virus titer and the

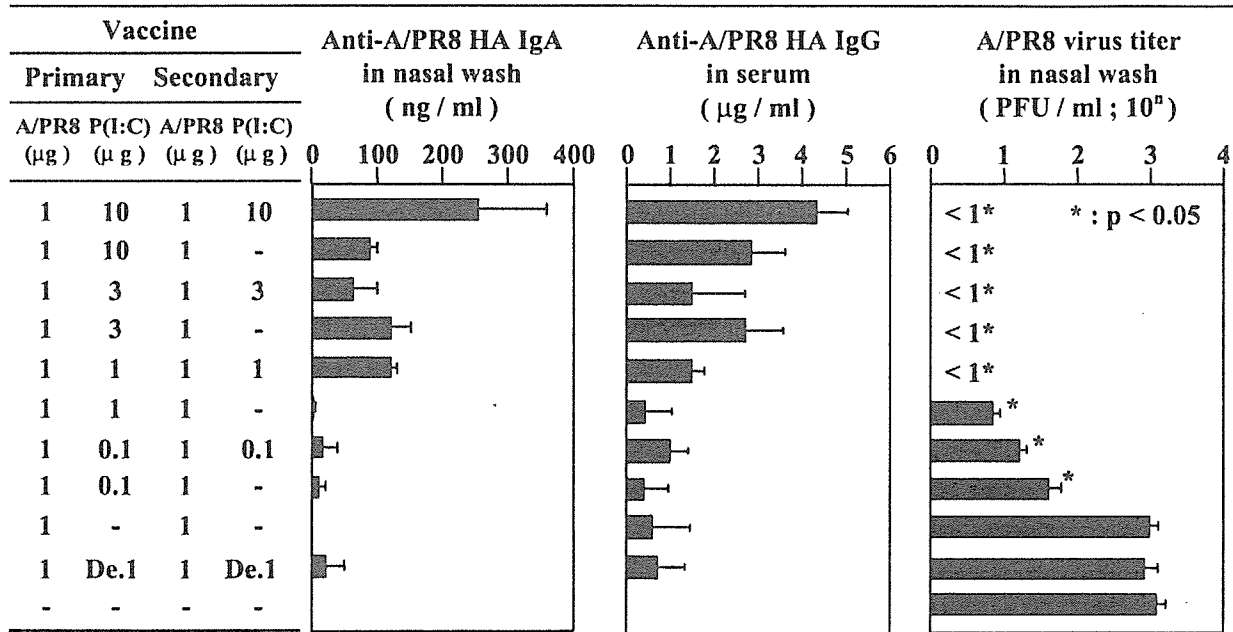


FIG. 1. Anti-PR8 HA-specific antibody titer and PR8 virus titer. Anti-PR8 HA-specific IgA and IgG responses in BALB/c mice that received primary intranasal immunization with 0.1 to 10 µg of poly(I:C) as an adjuvant. Secondary immunization was performed 4 weeks after primary immunization with or without the adjuvant. The nasal wash and serum samples were collected 2 weeks after the second immunization. The antibody titers of five mice from each group were measured by ELISA. The same groups of mice were infected intranasally with 1,000 PFU of PR8 influenza virus at 2 weeks after the second immunization. Nasal wash fluids were collected 3 days after virus challenge. The virus titers were measured by plaque assay. De, heat-denatured poly(I:C). Each column represents the mean ± SD. The virus titers were statistically compared to those of nonimmunized mice.

pathological change were well correlated, suggesting that the complete inhibition of lung virus titer by intranasal vaccination with poly(I:C) reflects complete protection against lethal influenza virus pneumonia.

**Cross-protective effect of influenza virus HA vaccine with poly(I:C).** We next characterized the cross-protective effect of intranasal vaccination with poly(I:C) against various influenza virus subtypes. Mice received primary immunization with 1 µg of various vaccines with 3 µg of poly(I:C) and secondary immunization with vaccine alone. Both the IgA antibody titer (>200 ng/ml) in the nasal wash fluid and IgG antibody (>1 µg/ml) in the serum were markedly high in mice immunized with A/PR8 virus vaccine, resulting in the disappearance of PR8 virus in the nasal wash fluid (Fig. 3A). Immunization with A/Beijing (H1N1) and A/Yamagata (H1N1) vaccines induced relatively high levels of nasal IgA and serum IgG against A/PR8 HA and also conferred complete protection against A/PR8 virus (Fig. 3A). Mice immunized with A/Guizhou (H3N2) virus vaccine showed low responses of A/PR8 HA-reactive IgA in the nasal wash fluid and IgG in the serum (Fig. 3A), resulting in low protective efficiency against A/PR8 virus challenge (Fig. 3A). Next, the neutralization activity to A/PR8 virus was examined in vitro by using the sera from the same group of the mice. The mice immunized by A/PR8 vaccine had neutralized antibody against A/PR8 (1:256); however, no neutralizing activity was recognized in the sera from the mice vaccinated by A/Beijing (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N2), and B influenza viruses (Fig. 3A). To examine the cross-protective effects of poly(I:C) combined influenza virus vaccine to lethal influenza virus challenge, the

mice immunized with vaccine from various strains including A/PR8 (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N2), and B/Ibaraki were challenged by a lethal dose (40 LD<sub>50</sub>) of A/PR8 (H1N1) virus. All the mice immunized with poly(I:C) combined with A/PR8 (H1N1) and A/Yamagata (H1N1) vaccine survived, while the survival rate of mice immunized with poly(I:C) combined with A/Guizhou (H3N2) was 40% at 10 days after the challenge. No mouse survived in the groups of unimmunized or B/Ibaraki vaccine-immunized mice at 8 days after the challenge (Fig. 3B). Taken together, these observations indicate that intranasal vaccine with poly(I:C) results in the cross-protective immune responses against homologous or heterologous viruses infection in the upper RT and against lethal influenza virus challenge.

**Induction of antigen-specific T-cell response by intranasal administration of vaccine with poly(I:C).** To examine whether intranasally administered influenza virus vaccine induces T-cell response against homologous or heterologous influenza viruses, mice were immunized by A/PR8 (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N2), or B/Ibaraki vaccine with poly(I:C). T cells collected from the spleens of these mice 1 week after the booster immunization were enriched and cultured with irradiated antigen-presenting cells in the presence or absence of A/PR8 vaccine at 0.1, 1, or 10 µg/ml. The T cells from the mice immunized with A/PR8 and A/Yamagata viruses proliferated in an antigen dose-dependent manner; however, no proliferative effect was recognized in the mice vaccinated with A/Guizhou and B/Ibaraki virus (Fig. 4A). These results suggest that the intranasally administered influenza virus vaccine with poly(I:C) does induce T-cell activation with homologous antigen.

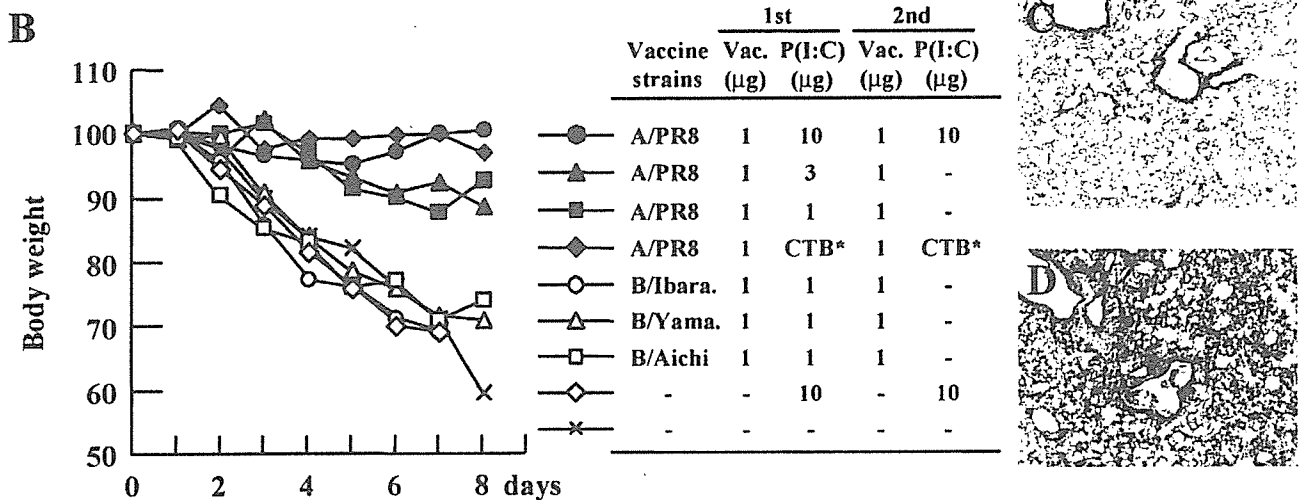
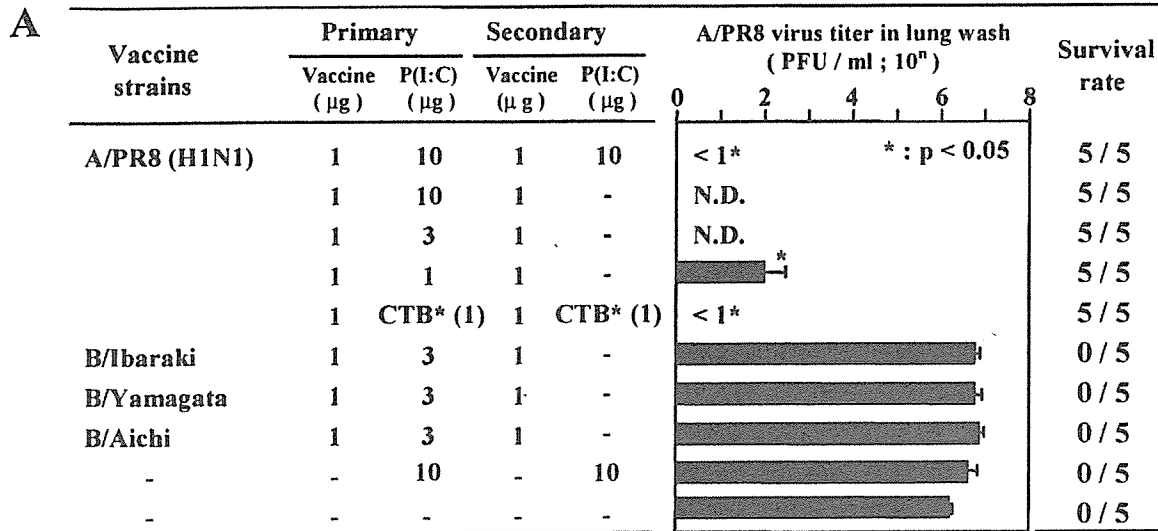


FIG. 2. (A) Virus titers in the lung wash fluids from the mice that received primary intranasal immunization with 1 to 10 μg of poly(I:C) as an adjuvant. Secondary immunization was performed 4 weeks after primary immunization with or without the adjuvant. The mice were infected intranasally with 1,000 PFU (40 LD<sub>50</sub>) of PR8 influenza virus 2 weeks after the second immunization. The survival rate of each experimental group is shown on the right side of the bar graph. Each column represents the mean ± SD. N.D., not determined. (B) Body weight change after virus challenge. Each point represents the relative ratio for initial body weight (mean) of 5 mice for each day after the challenge. (C) Histopathological finding of a lung immunized intranasally with A/PR8 vaccine with poly(I:C) followed by 1,000 PFU (40 LD<sub>50</sub>) of A/PR8 virus at 8 days after the challenge (×40; H&E). (D) Histopathological finding of a lung immunized intranasally with B/Aichi vaccine with poly(I:C) followed by 1,000 PFU (40 LD<sub>50</sub>) of A/PR8 virus at 8 days after the challenge (×40; H&E).

We also examined the IFN-γ production in the supernatant of T cells derived from the spleens of the mice immunized with A/PR8 vaccine in vitro (Fig. 4B). We found that the A/PR8 (H1N1) vaccine induced IFN-γ production from the T cells derived from the mice immunized with A/PR8 (H1N1) and A/Yamagata (H1N1) virus in an antigen dose-dependent manner (Fig. 4B); however, the T cells from the mice immunized with A/Guizhou (H3N2) and B/Ibaraki viruses did not produce a significant amount of IFN-γ in response to A/PR8 (H1N1). These results suggest that T-cell responses against heterologous influenza viruses were weak and intranasal administration of influenza virus vaccine with poly(I:C) induces systemic antigen-specific T-cell responses.

**Induction of TLR3 expression by intranasal administration of vaccine with poly(I:C).** To define the mechanism by which

intranasal administration of poly(I:C) with influenza virus HA vaccine functions as a mucosal adjuvant, we examined mRNA expression levels of Toll-like receptors 3 and 4, receptors for double-stranded RNA, and lipopolysaccharide, respectively. The expression of TLR3 in the NALT was up-regulated 30-fold in influenza virus-infected mice (Fig. 5A) and sixfold in mice vaccinated with poly(I:C) (Fig. 5B). The up-regulation of TLR3 in the vaccinated mice persisted for at least 72 h (Fig. 5B); meanwhile, TLR4 was not changed in these animals. The TLR responses were not detected in the mice treated with vaccine alone (Fig. 5C). These results suggested that up-regulation of TLR3 in the NALTs could enhance the adjuvant effect of poly(I:C).

**Induction of IFN and Th1- and Th2-related cytokines by intranasal administration of vaccine with poly(I:C).** We next

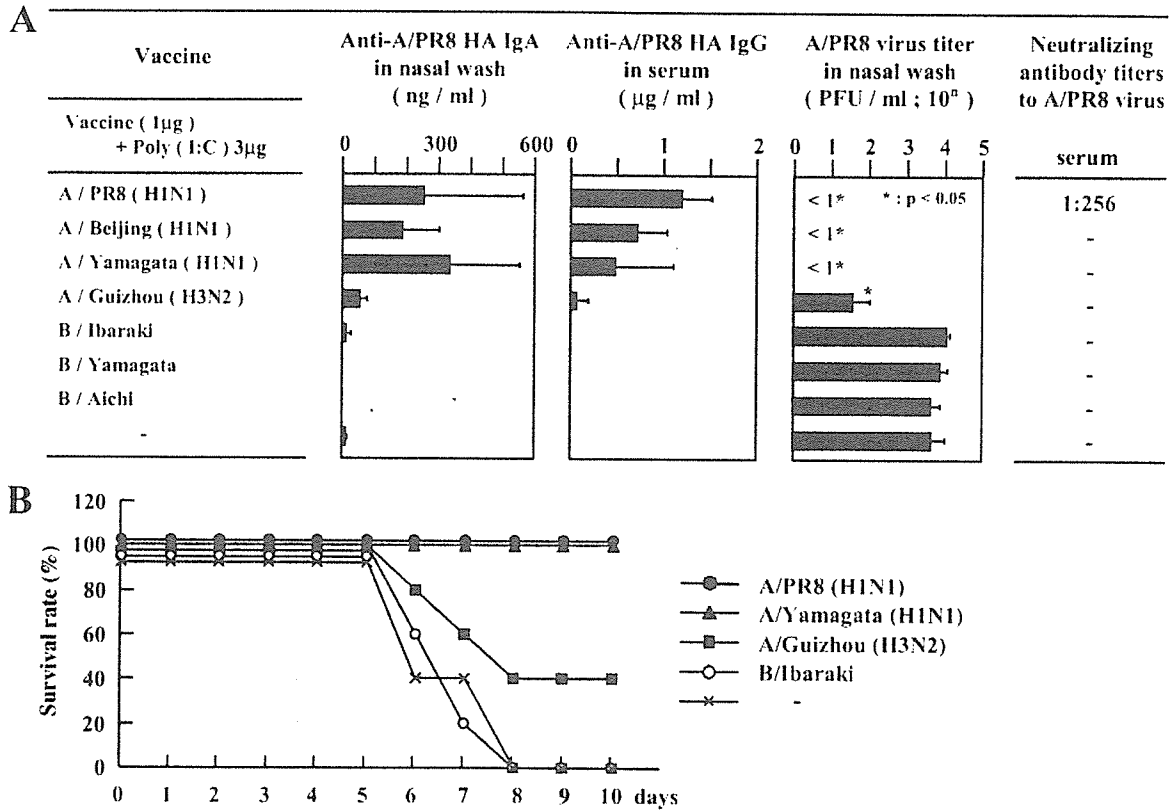


FIG. 3. (A) Cross-protective antibody responses against PR8 HA in the mice immunized intranasally with A/PR8 (H1N1), A/Beijing (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N2), B/Ibaraki, B/Yamagata, and B/Aichi vaccine with poly(I:C) as an adjuvant. Secondary immunization was performed 4 weeks after primary immunization without the adjuvant. The same groups of mice were infected with 1,000 PFU in 2 μl of PR8 influenza virus 2 weeks after the second immunization. The nasal wash fluid was collected 3 days after virus challenge. The virus titer was measured by plaque assay. Each column represents the mean ± SD. The serum collected at 2 weeks after the booster was analyzed for the presence of neutralizing antibodies against homologous or heterologous influenza virus. Inhibition of the virus was assessed by the additional reduction in infectivity beyond the background of naive mice. Samples were run in duplicate, and data are presented per group, where the ability to inhibit 50% of infection at the indicated dilution is shown. The dash indicates lack of reduction of infectivity. (B) The survival curve of the mice immunized with poly(I:C) and the various vaccines after the lethal A/PR8 (H1N1) challenge. Mice were immunized with 3 μg of A/PR8 (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N2), and B/Ibaraki vaccine with 10 μg of poly(I:C) as an adjuvant. Secondary immunization was performed 4 weeks after primary immunization with the same amount of vaccine with the adjuvant. The survival rates of the mice until 10 days after the virus challenge are presented in a line graph.

investigated the expression of interferons and cytokines in the NALTs after administration of influenza virus vaccine with poly(I:C). Rapid induction of IFN-α, IFN-β, and IFN-γ (at 6 h after vaccination) and return to the basal levels at 24 h were observed. However, vaccine without poly(I:C) did not induce expression of these interferons (Fig. 6A to C). The mRNA expression levels of cytokines in the NALTs were also examined. IL-4 mRNA expression was increased at 72 h after vaccination with poly(I:C). In addition, IL-12 p40 was up-regulated from 6 to 24 h following vaccination with poly(I:C) (Fig. 6D to F). These observations suggested that up-regulation of IL-4 and IL-12 p40 results in production of anti-HA-specific immunoglobulins.

**Safety of intranasal and intracerebral injection of poly(I:C).** To examine the safety of poly(I:C) in intranasal administration, an excess amount of poly(I:C) and bacteria-derived adjuvant CTB\* were intranasally given to mice daily for 9 days. The body weight of the mice administered 10 μg of poly(I:C) was not significantly changed, while that of the mice administered 10 μg of CTB\* was relatively decreased (Fig. 7A). His-

topathological examination revealed that the nasal areas of the mice administered poly(I:C) had no pathological changes, as well as those of the PBS-treated mice (Fig. 7B and D). Meanwhile, mucus exudation with inflammatory cells was recognized in the nasal areas of the mice treated with CTB\* (Fig. 7C).

As the nasal cavity is anatomically connected to the brain via the olfactory nerves, we also examined the effects of intracerebral administration of poly(I:C) and CTB\*. One mouse administered 10 μg of CTB\* and 2 mice administered 25 μg of CTB\* died with marked reduction of body weight (<15%) on day 4 after intracerebral injection. On the other hand, all the mice intracerebrally injected various doses (0.25 to 25 μg) of poly(I:C) survived for 7 days without body weight change (Fig. 8A). Histological examination of the brains demonstrated that cerebral hemorrhage was detected in the mice injected with 10 μg of CTB\* (Fig. 8C); however, no significant change was recognized in the poly(I:C)-treated group (Fig. 8B) and PBS-treated group (Fig. 8D). This suggests that intranasal and intracerebral administrations of poly(I:C) are harmless to mice.

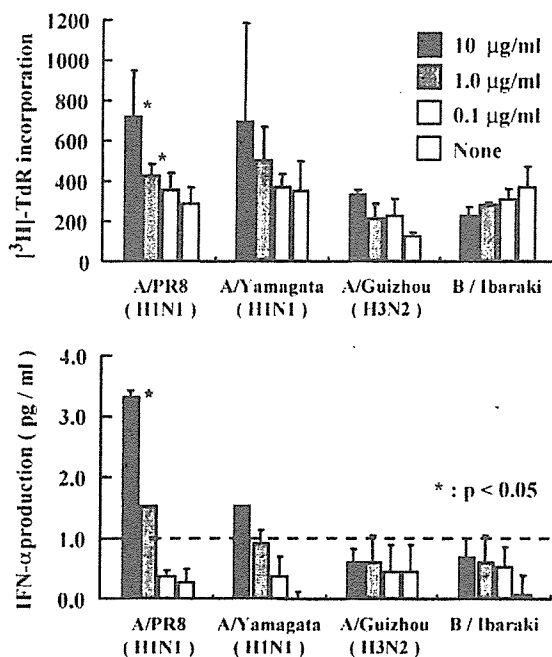


FIG. 4. In vitro responses of A/PR8 (H1N1) influenza virus-specific T cells derived from mice vaccinated with A/PR8 (H1N1), A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N2), and B/Ibaraki viruses. The mice were intranasally administered 1  $\mu\text{g}$  of each vaccine with 10  $\mu\text{g}$  of poly(I:C) and then boosted with the same dose of the reagents at 3 weeks after priming. Spleens were isolated at 1 week after the boost and stimulated with T-cell-depleted splenocytes that had been pulsed with the indicated concentration of A/PR8 vaccine. These cells were cultured for 4 days and [ $^3\text{H}$ ]thymidine was added 8 h prior to the harvest. (B) Production of IFN- $\gamma$  in the culture supernatant of the cells prepared in the same manner as the cells shown in Fig. 4A. The results are represented as a means of two independent experiments.

## DISCUSSION

In the present study, we clearly demonstrated that poly(I:C) is an effective mucosal adjuvant when administered intranasally with influenza virus vaccine. It has been reported that effective immunization strategies to protect against influenza virus infection involve induction of mucosal immune responses at the nasal mucosal epithelium, which is the initial target of virus infection (9, 28). For effective protection against influenza virus infection at the mucosa, bacterial toxin-derived adjuvants, such as CTB or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT), have been administered in conjunction with immunization (28, 30, 33). To reduce the toxicity of bacterial toxin-derived adjuvants, mutant toxins (7, 8) or low doses of CTB with trace amounts (0.1%) of holotoxin (25) were applied, and the bacterial toxins became harmless for experimental animal models. However, there are still problems associated with application of bacterial toxin-derived adjuvants to human vaccines. An effective prophylactic method against influenza virus infection in humans must be both safe and effective. We have demonstrated that a synthetic dsRNA adjuvant could induce high titers of anti-HA antibodies comparable to those seen after inoculation of CTB\*, when administered intranasally once with the vaccine at the first immunization followed by a booster inoculation of vaccine alone. The immune response

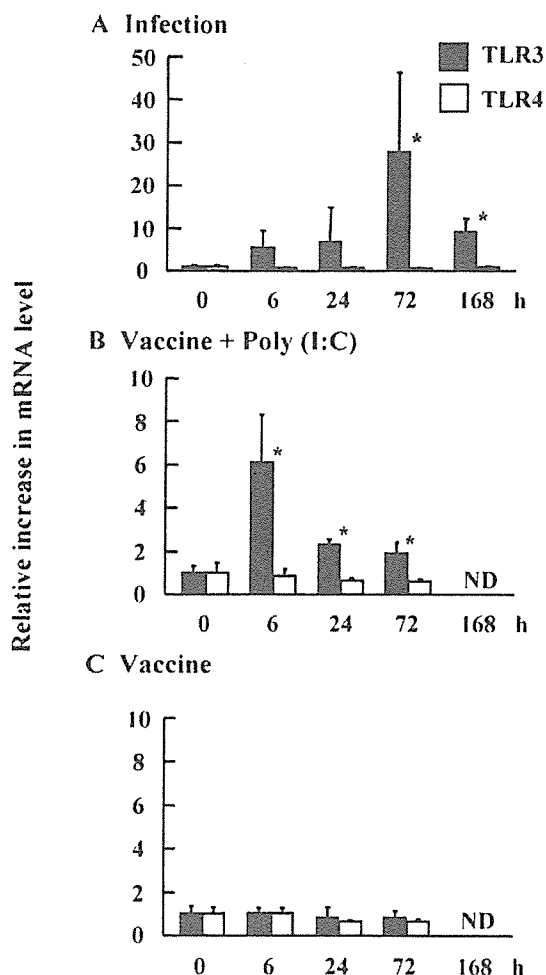


FIG. 5. Expression of TLR3 and TLR4 mRNAs in the NALTs. Total RNAs were extracted from the NALTs of mice infected with 1,000 PFU of A/PR8 (A) and intranasally immunized with the HA vaccine with poly(I:C) (B) and the HA vaccine alone (C). To determine the mRNA expression levels of TLR3 or TLR4 in the NALTs, real-time quantitative RT-PCR was performed ( $n = 3$ ). \*,  $P < 0.05$  versus the pretreated group (0 h). ND, not determined.

was detected in both nasal wash fluid and serum, which resulted in complete protection against influenza viral challenge in both the upper RT-restricted influenza model and the lung infection pneumonia model. In the two-dose immunization regimen, PR8 HA vaccine combined with 1  $\mu\text{g}$  of poly(I:C) at the first immunization conferred complete protection against lethal lung infection (40  $\text{LD}_{50}$ ) of PR8 influenza virus.

The advantage of nasal vaccination against influenza virus infection is the induction of secretory IgA at the mucosal epithelium, resulting in efficient production of cross-protective immunity compared with serum IgG (26). In fact, we observed the cross-protective effect of nasal vaccination of poly(I:C)-combined vaccination. In the present study, we used HA vaccines from various strains of influenza virus, including A/PR8 (H1N1), A/Beijing (H1N1), A/Yamagata (H1N1), and A/Guizhou (H3N2), with 3  $\mu\text{g}$  of poly(I:C) at the first immunization in the two-dose regimen. Among these vaccines, anti-PR8 HA secretory IgA in the nasal wash fluid and anti-PR8

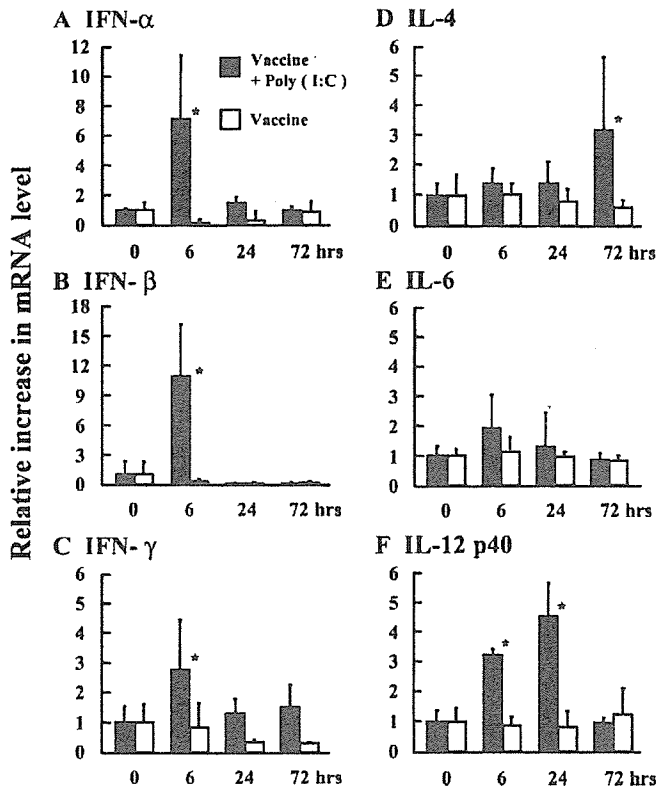


FIG. 6. Expression of cytokine mRNAs in the NALTs. Total RNA was extracted from the NALTs of mice intranasally treated with 1  $\mu$ g of PR8 vaccine with or without poly(I:C). The mRNA levels of IFN- $\alpha$  (A), IFN- $\beta$  (B), IFN- $\gamma$  (C), IL-4 (D), IL-6 (E), and IL-12 p40 (F) in the NALTs were determined with real time RT-PCR ( $n = 3$ ). \*,  $P < 0.05$  versus the pretreated group (0 h).

HA IgG in the serum were detected in the mice immunized with the same H1N1 virus strains. However, the neutralizing activity of the serum against A/PR8 virus was exclusively recognized in the mice immunized with homologous virus (Fig. 3). Although we have examined the neutralizing activity in the nasal wash fluid, no neutralizing activity in the nasal wash fluid was detected in any group. The concentration of anti-A/PR8 HA IgA in the nasal wash fluid is much lower than that of anti-A/PR8 HA IgG in the serum, because the nasal wash fluid was diluted by PBS for collection from the nasal mucosa. It seems that the concentration of anti-A/PR8 HA IgA is much lower than the physiological concentration in the nasal mucosa; therefore, the neutralizing activity in the nasal wash fluid is not detected. However, mice that have the cross-reactive IgA to A/PR8 virus in the nasal wash fluid were completely protected against viral challenge from not only homologous but also heterologous viruses. Even mice immunized with influenza virus vaccine against the H3N2 strain produced low doses of secretory IgA and serum IgG, which represented a  $10^2$ -fold reduction of viral titer after A/PR8 influenza virus challenge. We observed the antigen-specific T-cell responses and their weak cross-reactivity in the mice treated with heterologous viruses (Fig. 4). Thus, both homologous and heterologous protection against A/PR8 influenza virus challenge may be achieved by production of cross-reactive IgA.

The mechanism of the adjuvant effect of dsRNA is still

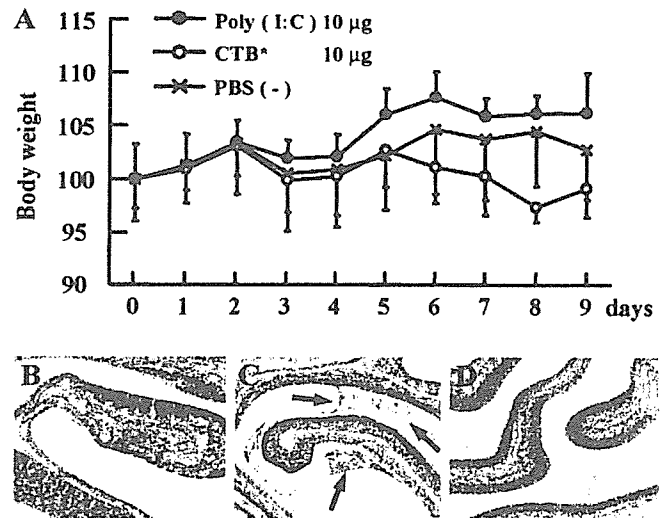


FIG. 7. (A) Body weight of mice with intranasal administration of 10  $\mu$ g of poly(I:C) or 10  $\mu$ g of CTB\* daily for 9 days. Each point represents the mean relative ratio to initial body weight (mean  $\pm$  SD [%]) of 5 mice in each day. (B to D) Histopathological findings of the nasal cavities of the mice intranasally administered 10  $\mu$ g of poly(I:C) (B), 10  $\mu$ g of CTB\* (C), and PBS (D) daily for 9 days ( $\times 100$ ; H&E). Black arrows indicate the mucus exudation with inflammatory cells.

unclear. As denatured poly(I:C) did not cause any adjuvant effect, the double-stranded structure of poly(I:C) seemed to play a pivotal role in production of IgA and IgG following intranasal immunization with influenza virus HA vaccine. It is known that dsRNA is recognized by TLR3 and RNA helicase, retinoic acid-inducible gene I, and induces activation of NF- $\kappa$ B and production of IFN- $\alpha/\beta$  (1, 39). Early administration of IFN- $\alpha/\beta$  during an immune response markedly increases primary antibody response against soluble antigens (14). We demonstrated up-regulation of TLR3 expression but not of TLR4 in the NALTs following influenza virus infection or intranasal administration of vaccine with poly(I:C) (Fig. 5). The peak of up-regulation of TLR3 at 72 h after infection corresponded to that of influenza virus replication in the nasal area at 72 h postinfection. Because the up-regulated TLR3 is the receptor for the poly(I:C) adjuvant, we presume that the up-regulation of TLR3 enhances the signals transduced from poly(I:C). As the influenza virus itself up-regulates the expression of TLR3, we expect the vaccine with poly(I:C) mimics the state of viral infection so that the protective immune response can be elicited. Moreover, administration of poly(I:C) induced expression of IFN- $\alpha/\beta$  and Th1- and Th2-related cytokines, such as IFN- $\gamma$ , IL-12 p40, and IL-4. It has recently been reported that the exposure of naive B cells to the cytokine IL-4 and/or antigen leads to a state of "priming," in which subsequent aggregation of major histocompatibility complex class II molecules induces the mobilization of calcium ions and cell proliferation (12). A significant production of IL-4 in the NALTs immunized intranasally with vaccine with poly(I:C) may contribute to the priming of naive B cells together with the antigen. Thus, poly(I:C) might act to bridge the gap between innate and adaptive immunity.

Prophylactic agents, including vaccines, should be sufficiently safe. As the nasal cavity and the forebrain have direct

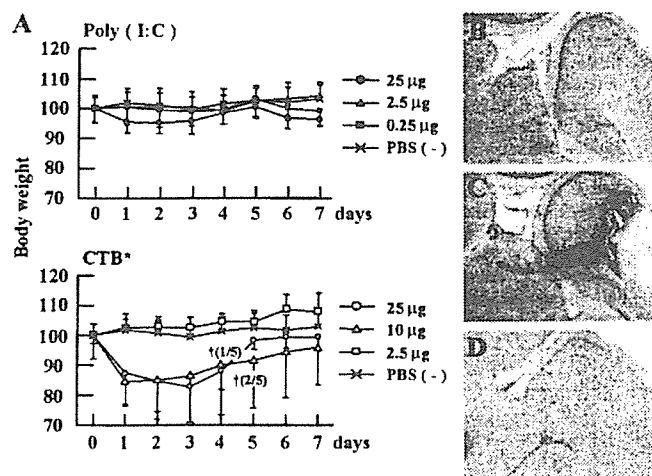


FIG. 8. (A) Body weight of mice after intracerebral injection of various doses [poly(I:C), 0.25, 2.5, and 25 µg; CTB\*, 2.5, 10, and 25 µg] of poly(I:C) and CTB\*. Each point represents the relative ratio to initial body weight (mean  $\pm$  SD [%]) of 5 mice in each day. Histopathological findings of the brains injected with 10 µg of poly(I:C) (B), 10 µg of CTB\* (C), and PBS (D) at day 4 after injection ( $\times 100$ ; H&E).

communication via the olfactory nerve, the safety of nasal administration of the vaccine with adjuvant for the central nervous system should be confirmed. We demonstrated the safety of poly(I:C) to the central nervous system by direct intracerebral injection. Here, we propose that intranasal administration of influenza virus HA vaccine with poly(I:C) by the two-dose regimen is an effective and safe vaccination method.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to U. Suzuki (Kitasato Institute) and T. Tanaka (Toray Industries, Inc.) for providing us the materials. We are grateful to A. Harashima for technical assistance.

#### REFERENCES

- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732–738.
- Asahi, Y., T. Yoshikawa, I. Watanabe, T. Iwasaki, H. Hasegawa, Y. Sato, S. Shimada, M. Nanno, Y. Matsuoka, M. Ohwaki, Y. Iwakura, Y. Suzuki, C. Aizawa, T. Sata, T. Kurata, and S. Tamura. 2002. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J. Immunol.* 168:2930–2938.
- Bower, J. F., X. Yang, J. Sodroski, and T. M. Ross. 2004. Elicitation of neutralizing antibodies with DNA vaccines expressing soluble stabilized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers conjugated to C3d. *J. Virol.* 78:4710–4719.
- Clements, M. L., S. O'Donnell, M. M. Levine, R. M. Chanock, and B. R. Murphy. 1983. Dose response of A/Alaska/6/77 (H3N2) cold-adapted reassortant vaccine virus in adult volunteers: role of local antibody in resistance to infection with vaccine virus. *Infect. Immun.* 40:1044–1051.
- Couch, R. B., and J. A. Kasel. 1983. Immunity to influenza in man. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:529–549.
- Davenport, F. M., A. V. Hennessy, F. M. Brandon, R. G. Webster, C. D. Barrett, Jr., and G. O. Lease. 1964. Comparisons of serologic and febrile responses in humans to vaccination with influenza A viruses or their hemagglutinins. *J. Lab. Clin. Med.* 63:5–13.
- Hagiwara, Y., T. Iwasaki, H. Asanuma, Y. Sato, T. Sata, C. Aizawa, T. Kurata, and S. Tamura. 2001. Effects of intranasal administration of cholera toxin (or Escherichia coli heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. *Vaccine* 19:1652–1660.
- Hagiwara, Y., K. Komase, Z. Chen, K. Matsuo, Y. Suzuki, C. Aizawa, T. Kurata, and S. Tamura. 1999. Mutants of cholera toxin as an effective and safe adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 17:2918–2926.
- Hasegawa, H., S. Kadowaki, H. Takahashi, T. Iwasaki, S. Tamura, and T.

- Kurata. 2000. Protection against influenza virus infection by nasal vaccination in advance of sublethal irradiation. *Vaccine* 18:2560–2565.
- Jacobs, B. L., and J. O. Langland. 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* 219:339–349.
- Johnson, P. R., S. Feldman, J. M. Thompson, J. D. Mahoney, and P. F. Wright. 1986. Immunity to influenza A virus infection in young children: a comparison of natural infection, live cold-adapted vaccine, and inactivated vaccine. *J. Infect. Dis.* 154:121–127.
- Jordan, M. B., D. M. Mills, J. Kappler, P. Marrack, and J. C. Cambier. 2004. Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. *Science* 304:1808–1810.
- Kris, R. M., R. Asofsky, C. B. Evans, and P. A. Small, Jr. 1985. Protection and recovery in influenza virus-infected mice immunosuppressed with anti-IgM. *J. Immunol.* 134:1230–1235.
- Le Bon, A., G. Schiavoni, G. D'Agostino, I. Gresser, F. Belardelli, and D. F. Tough. 2001. Type I interferons potentially enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14:461–470.
- Liew, F. Y., S. M. Russell, G. Appleyard, C. M. Brand, and J. Beale. 1984. Cross-protection in mice infected with influenza A virus by the respiratory route is correlated with local IgA antibody rather than serum antibody or cytotoxic T cell reactivity. *Eur. J. Immunol.* 14:350–356.
- Mestecky, J., and J. R. McGhee. 1987. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* 40:153–245.
- Murphy, B. R. 1994. Mucosal immunity to viruses, p. 333. *In* P. L. Ogra, M. E. Lamm, J. R. McGhee, J. Mestecky, W. Strober, and J. Biendstock (ed.), *Handbook of mucosal immunology*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Murphy, B. R., and M. L. Clements. 1989. The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 146:107–116.
- Murphy, B. R., and R. G. Webster. 1996. Orthomyxoviruses, p. 1397–1445. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, M. S. Hirsch, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
- Nedrud, J. G., X. P. Liang, N. Hague, and M. E. Lamm. 1987. Combined oral/nasal immunization protects mice from Sendai virus infection. *J. Immunol.* 139:3484–3492.
- Phelan, M. A., R. E. Mayner, D. J. Bucher, and F. A. Ennis. 1980. Purification of influenza virus glycoproteins for the preparation and standardization of immunological potency testing reagents. *J. Biol. Stand.* 8:233–242.
- Ramphal, R., R. C. Cogliano, J. W. Shands, Jr., and P. A. Small, Jr. 1979. Serum antibody prevents lethal murine influenza pneumonitis but not tracheitis. *Infect. Immun.* 25:992–997.
- Renegar, K. B., and P. A. Small, Jr. 1994. Passive immunization: systemic and mucosal, p. 347. *In* P. L. Ogra, M. E. Lamm, J. R. McGhee, J. Mestecky, W. Strober, and J. Biendstock (ed.), *Handbook of mucosal immunology*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Takasuka, N., H. Fujii, Y. Takahashi, M. Kasai, S. Morikawa, S. Itamura, K. Ishii, M. Sakaguchi, K. Ohnishi, M. Ohshima, S. Hashimoto, T. Odagiri, M. Tashiro, H. Yoshikura, T. Takemori, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2004. A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *Int. Immunol.* 16:1423–1430.
- Tamura, S., K. Ishihara, K. Miyata, C. Aizawa, and T. Kurata. 1995. Mechanism of enhancement of the immune responses to influenza vaccine with cholera toxin B subunit and a trace amount of holotoxin. *Vaccine* 13:339–341.
- Tamura, S., Y. Ito, H. Asanuma, Y. Hirabayashi, Y. Suzuki, T. Nagamine, C. Aizawa, and T. Kurata. 1992. Cross-protection against influenza virus infection afforded by trivalent inactivated vaccines inoculated intranasally with cholera toxin B subunit. *J. Immunol.* 149:981–988.
- Tamura, S., T. Iwasaki, A. H. Thompson, H. Asanuma, Z. Chen, Y. Suzuki, C. Aizawa, and T. Kurata. 1998. Antibody-forming cells in the nasal-associated lymphoid tissue during primary influenza virus infection. *J. Gen. Virol.* 79(Pt. 2):291–299.
- Tamura, S., H. Kurata, H. Funato, T. Nagamine, C. Aizawa, and T. Kurata. 1989. Protection against influenza virus infection by a two-dose regimen of nasal vaccination using vaccines combined with cholera toxin B subunit. *Vaccine* 7:314–320.
- Tamura, S., K. Miyata, K. Matsuo, H. Asanuma, H. Takahashi, K. Nakajima, Y. Suzuki, C. Aizawa, and T. Kurata. 1996. Acceleration of influenza virus clearance by Th1 cells in the nasal site of mice immunized intranasally with adjuvant-combined recombinant nucleoprotein. *J. Immunol.* 156:3892–3900.
- Tamura, S., Y. Samegai, H. Kurata, T. Nagamine, C. Aizawa, and T. Kurata. 1988. Protection against influenza virus infection by a two-dose regimen of intranasally with cholera toxin B subunit. *Vaccine* 6:409–413.
- Tamura, S., A. Yamanaka, M. Shimohara, T. Tomita, K. Komase, Y. Tsuda, Y. Suzuki, T. Nagamine, K. Kawahara, H. Danbara, et al. 1994. Synergistic action of cholera toxin B subunit (and Escherichia coli heat-labile toxin B

- subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 12:419–426.
32. Tamura, S. I., H. Asanuma, Y. Ito, Y. Hirabayashi, Y. Suzuki, T. Nagamine, C. Aizawa, T. Kurata, and A. Oya. 1992. Superior cross-protective effect of nasal vaccination to subcutaneous inoculation with influenza hemagglutinin vaccine. *Eur. J. Immunol.* 22:477–481.
  33. Tamura, S. I., Y. Samegai, H. Kurata, K. Kikuta, T. Nagamine, C. Aizawa, and T. Kurata. 1989. Enhancement of protective antibody responses by cholera toxin B subunit inoculated intranasally with influenza vaccine. *Vaccine* 7:257–262.
  34. Tobita, K. 1975. Permanent canine kidney (MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses. *Med Microbiol. Immunol. (Berlin)* 162:23–27.
  35. Tobita, K., A. Sugiura, C. Enomote, and M. Furuyama. 1975. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med. Microbiol. Immunol. (Berlin)* 162:9–14.
  36. Underdown, B. J., and J. M. Schiff. 1986. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu. Rev. Immunol.* 4:389–417.
  37. Watanabe, I., T. M. Ross, S. Tamura, T. Ichinohe, S. Ito, H. Takahashi, H. Sawa, J. Chiba, T. Kurata, T. Sata, and H. Hasegawa. 2003. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. *Vaccine* 21:4532–4538.
  38. Yetter, R. A., S. Lehrer, R. Ramphal, and P. A. Small, Jr. 1980. Outcome of influenza infection: effect of site of initial infection and heterotypic immunity. *Infect. Immun.* 29:654–662.
  39. Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5:730–737.



## Ⅲ. 各論

Severe Acute Respiratory Syndrome  
(SARS)おおいし かずのり  
大石 和徳 長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野

## 要旨

SARSは新種の SARS coronavirus によるウイルス感染症で、感染症法では1類感染症である。主要な感染様式は飛沫および接触感染で、その臨床像の特徴は重症肺炎である。2002年11月～2003年7月にかけて国際的な感染連鎖に発展した。全世界で8,422人の患者を数え、致命率は11%に及んだ。ウイルス学的迅速診断としてRT-LAMP法がある。院内感染対策が重要で、確立された予防・治療法は未だない。

## はじめに

Severe Acute Respiratory Syndrome (以下、SARSと略す)は、新種のコロナウイルスによる新興ウイルス感染症である。2002年11月16日に中国・広東省、佛山市で第1例目が確認され、2003年2月には広東省におけるアウトブレイクへと発展した。さらに、2月下旬には広東省の医師が香港のホテル9階で12人の宿泊客に感染させ、ここから国際的な感染拡散に発展した。WHOは3月12日にベトナムにおける異型肺炎の報告を受けて、異型肺炎に関するGlobal Alertを発令するに至った。2003年7月に入って全世界における SARS corona virus (SARS Co V) 感染の連鎖は一応終息した。その後、SARSは感染症法においては1類感染症に位置づけられた。

本稿では SARS の臨床ウイルス学について記述する。

## Key Words

SARS coronavirus

重症肺炎

致命率

院内感染対策

## 病原体

SARS患者から新種のコロナウイルス、SARS corona virus (以下、SARS Co Vと略す)がその原因ウイルスとして同定された<sup>1)</sup>。この SARS Co V のゲノムは29,727塩基からなる一本鎖 RNA からなっている<sup>2)</sup>。これまでに、①感染患

者からの本ウイルスの分離，②宿主細胞におけるウイルス培養，③病原体のフィルター通過性が確認された．さらにはサルへの感染実験において，④同ウイルスの再分離，⑤同ウイルスに対する特異免疫応答，⑥ヒトに相当する病態が確認された<sup>3)</sup>．これらの所見は，ウイルス疾患のために改訂されたコッホの6原則を満たしている．Guanらによると，広東省の動物市場における調査において，ハクビシンをはじめとする野生動物から SARS Co V 類似のウイルスが分離された<sup>4)</sup>．これらの分離ウイルスは，ヒト由来の SARS Co V の ORF10 にヒトコロナウイルスには認められない 29 塩基の挿入が確認されていた．さらに，CDC は広東省の動物取り扱い業者において，一般人に比較してより高率に SARS Co V に対する IgG 抗体が検出されたことを報告した<sup>5)</sup>．これらの調査結果は，SARS Co V が動物由来である可能性を示唆している．しかしながら，自然界における宿主については未だ結論が出ておらず，今後の重要な検討課題である．

## 疫学的事項

前述のとおり，2003年7月5日に総数8,422人の感染連鎖は終息し，916名の死者を数えた．中国本土における感染者の総数は5,327名，死者は349名に及んだ．図1には，全世界にお

ける2002年11月から2003年7月にかけての可能性例の推移について示した．その後，シンガポール，台湾，中国における散発的な実験室感染事例の報告があった．注目すべきは，このような実験室感染事例以外に，2003年末から2004年1月にかけて，再び広東省において発生源の不明な4例のSARS患者の発生が確認されている事実である．このことは，SARSが冬期にこの地域の特異的に発生するウイルス性疾患であることを示唆している．しかしながら，2004-05年シーズンは1例の報告もなかった．

SARS患者に曝露後から発症までの潜伏期間は一般に2～10日とされている．例外的に潜伏期1日の症例も報告されており，平均潜伏期は4～5日とされている<sup>6)</sup>．潜伏期および発病初期におけるウイルスの感染性は一般に低いとされる．発病4日以降に下気道症状が加わると，その感染性は高まるとされている．さらに，発病後2週目にその感染力はもっとも高いとされている<sup>7)</sup>．解熱して10日以降に，感染伝播した事例は報告されていない．この事実から，WHOは患者の隔離期間を解熱後10日間としている．

SARSのリスク因子について，エロゾルを発生する操作に関与した医療従事者ではその感染率が3～43%に及んでいる<sup>8)</sup>．その他の可能性例と接触した人でのリスク要因として，加齢，男性，合併症の存在があげられている．多数の

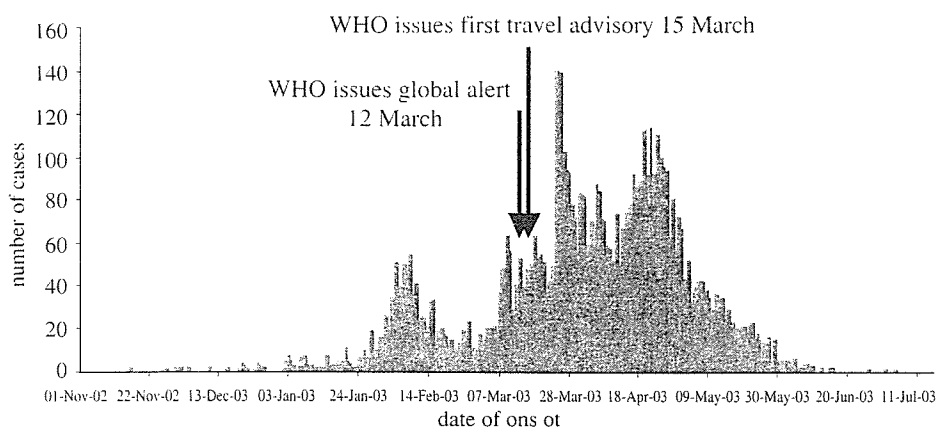


図1 全世界における2002年11月～2003年7月のSARS症例数の推移

感染伝播へ発展した superspreader event の事例においても、index case には腎不全や慢性呼吸器疾患などの基礎疾患が認められている。一方、小児から成人への感染伝播はほとんど知られておらず、成人における二次感染の発生と対照的である<sup>6)</sup>。

SARS Co V の主要な感染伝播様式は飛沫感染と接触感染とされている<sup>7)</sup>。最近になって、香港のアモイガーデンにおけるアウトブレイクは空気感染がであったとする証拠が明らかになった<sup>8)</sup>。しかしながら、空気感染は特殊な状況下における SARS Co V の感染様式と考えられる。

## 臨床症状

患者は高熱（ほぼ 100%）と全身倦怠感（19～70%）、筋肉痛（45～68%）などの症状で発症する<sup>9) 10)</sup>。上気道の症状の頻度は 20～25% 以下と比較的低く、咳嗽は高率（29～75%）に認められる。一方、入院時における呼吸困難の頻度は低い（4%）。また、下痢の頻度は 25～73% と報告によりかなり異なる。初発症状からは SARS とインフルエンザとの鑑別は困難である。

図 2 に示すように、病初期の 38℃ を超える高熱は一端解熱し、第 14 病日頃まで 37℃ 台の微熱となる<sup>9)</sup>。この解熱傾向は、ほとんどの症例で投与されている副腎皮質ステロイドの影響も考えられる。胸部 X 線上の肺炎陰影は、入院時には大半の症例（78.3%）において認められる<sup>11)</sup>。入院時に肺炎陰影が認められない場合にも、その後、平均 3.1 日に胸部 X 線上に浸潤影が出現するとされる。図 3-A には、発病直後の SARS 可能性例の胸部 X 線所見を示した。Wong らが指摘しているように<sup>11)</sup>、右下肺野に辺縁不鮮明なスリガラス状陰影を認めている。網状陰影、空洞陰影、胸水貯留は認められない。マイ

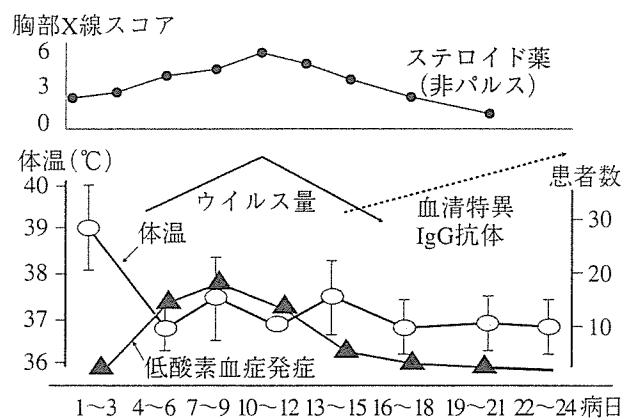


図 2 SARS 患者の臨床病態の時間的経過

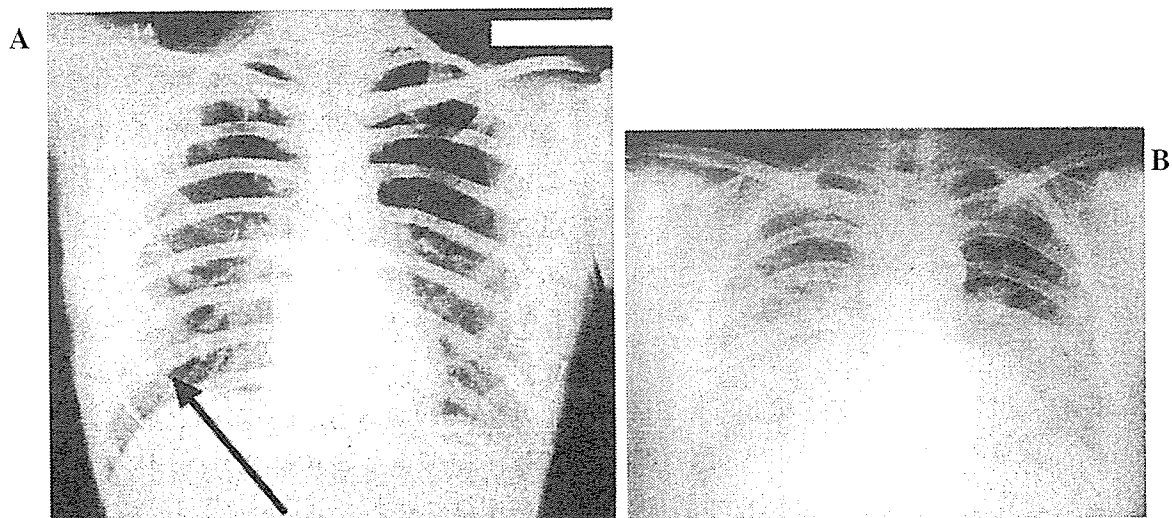


図 3 SARS 可能性例の胸部 X 線所見

A: 発病直後の 20 歳女性の胸部 X 線所見、←: 淡いスリガラス陰影  
 B: 発病 10 日後に ARDS 様所見を呈した 28 歳男性

コブラズマ肺炎などの非定型肺炎との画像上の鑑別は困難である。

病初期には低酸素血症の頻度は低いが、その1週間後には低酸素血症が高率に認められ(図2)<sup>9)</sup>、肺炎の広がりも第10日病日前後にピークがある<sup>12)</sup>。この肺炎陰影のピークは、前述の気道におけるウイルス量のピーク時期とほぼ一致していると考えられる。その後急性呼吸不全が進展し、10～20%の患者は急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を合併する。図3-Bには、発病10日後にARDSを合併したSARS可能性例(28歳男性)の胸部X線所見を示している。また、このようなARDS患者の剖検肺の組織所見では、肺胞・間質にマクロファージ、リンパ球浸潤、肺胞における硝子膜形成が認められたとされる。所見はdiffuse alveolar damage(DAD)を示し、ARDSに矛盾しない所見である。さらに、Wongらは胸部X所見の経過として、四つのパターンが認められることを報告している<sup>11)</sup>。

発熱期に一致して20～70%の頻度で1～6日続く水様性下痢が認められ、第7病日以降は5%以下の頻度となる<sup>13)</sup>。下痢は血性、粘液性となることはないとしている。また、下痢症状を有したSARS患者の大腸粘膜生検、剖検時の組織学的検討では、大腸粘膜下のマクロファージの浸潤、電子顕微鏡所見では大腸の微絨毛表層に多数のウイルス粒子と考えられる所見が認められている<sup>13)</sup>。また、大腸粘膜下にもウイルス粒子を入れた小胞が存在することを示している。これらの所見は、下痢症状が大腸粘膜、粘膜下へのSARS CoV感染によるものであることを示唆しており、分泌性(非炎症性)下痢症と考えられる。

SARS患者の急性期における末梢血所見では、一般にリンパ球減少が認められる<sup>14)</sup>。1,000/ $\mu$ l以下のリンパ球減少が病初期には約60%程度に認められ、第10～14病日ころには80～90%に達するとしている。感染4～5週後でも30%

程度にリンパ球減少が認められている。リンパ球分画ではCD4細胞(平均286/ $\mu$ l)とCD8細胞(平均242/ $\mu$ l)の双方が第5～14病日に減少し、B細胞の変化は認められていない。したがって、SARS CoV感染の急性期には細胞性免疫が一過性に低下することが考えられる。さらに、軽度の血小板減少(14万/ $\mu$ l以下)も55%に認められている。

SARS症例の致命率は年齢層により0～50%に及び、全体では約10%程度とされている。Choiらは香港における267例のSARS患者における臨床経過、予後に関して報告している<sup>15)</sup>。32名の死亡例の検討では、急性呼吸不全(100%)、急性腎不全(44%)、院内感染、敗血症(25%)がその予後に関与したと考えられる。また、予後予測因子の解析では、60歳以上の年齢と発症時の血清LDH値の高値が有意であった。またHonらは、小児におけるSARSが成人に比較すると重症化が少ないことを報告している<sup>16)</sup>。

## 診 断

WHOの診断基準によれば、SARS疑い例は発熱、咳嗽、呼吸困難などを呈する患者で、発症から10日前までにSARS可能性例(疑い例も)との明らかな接触歴がある、もしくはSARSの流行地域を訪問、あるいは流行地に居住していたものとされる。これらの事項に加えて、胸部X線所見で肺炎陰影、もしくは呼吸窮迫症候群(RDS)を呈する症例、もしくは1～2検体でSARS CoV陽性の所見の患者をSARS可能性例としている。

SARS CoV遺伝子診断としてのRT-PCR法は、簡便さや迅速性には有用な検査であるが、感度は必ずしも高くない。さらに高感度、かつより迅速な遺伝子検出方法として、RT-LAMP法が開発されている。RT-LAMP法はRT-PCR

法に比較して約100倍感度が高いとされる。

一方、血清学的診断系としては中和試験およびSARS CoVを抗原としたIFA法、ELISA法が利用できる。これらの血清学的検査により発症後15日から血清中特異IgG抗体が検出されるが、発症20日後においても感染者の抗体陽性率は95%にとどまっている<sup>9)</sup>。したがって、IFA法、ELISA法は迅速診断としての有用性は低い。

## 治療

### 1. 抗ウイルス薬

リバビリンは、DNAウイルスやRNAウイルスに広範な抗ウイルス活性を有する薬剤である。2003年3月には香港やトロントでSARS患者にリバビリンが頻繁に使用された。トロントにおいては4g/日の投与にもかかわらず、明らかな臨床的な効果は得られなかった<sup>17)</sup>。むしろ、溶血性貧血や肝機能障害などの副作用が認められた。香港のグループは抗HIVプロテアーゼ阻害薬であるLopinavir/ritonavir (Kaletra<sup>®</sup>)のSARSに対する有効性を報告している<sup>18)</sup>。本研究において、Lopinavirの試験管内の抗SARSウイルス活性(4 $\mu$ g/ml)はリバリピン(50 $\mu$ g/ml)のそれより優れていた。今後、Kaletra<sup>®</sup>の臨床応用が期待される。

### 2. ステロイド療法

香港におけるSARSアウトブレイクの初期において、メチルプレドニソロン投与を3mg/kg/日から始めて、21日間かけて減量する方法が推奨された。その後、HoらはSARS患者に対するメチルプレドニソロンのパルス療法(500mg/日の5~7日間)が、非パルス療法(500mg/日以下)と比較して、患者の酸素吸入期間を短縮し、14~21病日における胸部X線所見上の浸潤陰影の広がりを軽減することを報告している<sup>12)</sup>。さらに筆者らは、パルス療法では非パルスに比較して副作用としての過血糖の頻度も少なかっ

たとしている。

## ワクチン開発

現在、SARSワクチンは多くの研究者によって開発が進められている。Gaoらは、アデノウイルスベクターにSARS CoVのスパイク蛋白質、膜蛋白質、ヌクレオカプシドを発現させ、三つアデノウイルスベースワクチンを作製した<sup>19)</sup>。これらのアデノウイルスワクチンをサルに筋肉注射し、ヌクレオカプシド特異的T細胞応答と、ウイルス中和活性が誘導されることを報告している。さらに、Bukreyevらも、スパイク蛋白質を弱毒化パラインフルエンザウイルスベクターに発現させ、リコンビナントウイルスを作製し、これをアフリカミドリザルに経気道的に接種した<sup>20)</sup>。接種後には血清中に中和抗体誘導能が確認された。接種28日後にSARS CoVを経気道接種したところ、コントロール群ではSARS CoVの気道中排出が認められるのに対し、気道免疫群では、SARS CoV排出はまったく検出されなかった。ベクターウイルスによるSARS CoV粘膜ワクチンの高い有効性が示された。今後は、SARS CoVワクチンのヒトにおける実用化が急務である。

## 感染対策

SARSは、そのアウトブレイクの初期には院内感染として感染が拡大した。飛沫感染を最小限にするため、SARS患者は、可能な限りサージカルマスクの装着が望ましい。患者を早期に検出し、一般患者や家族から確実にトリアージし、SARS専用病院(施設)の陰圧室に隔離することが二次感染を防止するうえで大切である。医療従事者には手袋、ガウン、N95マスク、ゴーグルなどのPPEを正しく装着することが必須である。とりわけ、医療従事者の汚染区域入

室前・後のPPEの着脱には十分な訓練が必要である。陰圧室がない場合は、個室病室の入り口のドアを閉め、窓も閉めた状態で、窓型換気扇を使用し病室内から外側への一定の換気を保つことで、SARS患者の対応が可能と考えられる。

#### ●文献

- 1) Doresten C et al.: Identification of a novel corona virus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Eng J Med* 348:1967-1976, 2003
- 2) Rota PA et al.: Characterization of a novel coconavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300:1394-1399, 2003
- 3) Fouchier RM et al.: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423:240, 2003
- 4) Guan Y et al.: Isolation and characterization of virus related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science* 302:276-278, 2003
- 5) CDC: Prevalence of IgG antibody to SARS — associated coronavirus in animal traders — Guangdong Province, China, 2003. *MMWR* 52:986-987, 2003
- 6) Department of communicable disease surveillance and response, WHO: Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS). 16-17, May 2003
- 7) Seto WH et al.: Effectiveness of precautions against droplets and contact in prevention of nosocomial transmission of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Lancet* 361:1519-1520, 2003
- 8) Yu ITS et al.: Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus. *N Eng J Med* 359:1731-1719, 2004
- 9) Peiris JSM et al.: Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361:1767-1772, 2003
- 10) Tsang KW et al.: A cluster of severe respiratory syndrome in Hong Kong. *N Eng J Med* 348:1977-1985, 2003
- 11) Wong KT et al.: Severe acute respiratory syndrome: Radiographic appearances and pattern of progression in 138 patients. *Radiology* 228:401-406, 2003
- 12) Ho J C et al.: High dose pulse versus non-pulse corticosteroid regimens in severe acute respiratory syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 168:1449-1456, 2003
- 13) Leung WK et al.: Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology* 125:1011-1017, 2003
- 14) Wong RSM et al.: Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome: retrospective analysis. *BMJ* 326:1358-1362, 2003
- 15) Choi KW et al.: Outcomes and prognostic factors in 267 patients with severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Ann Intern Med* 139:715-723, 2003
- 16) Hon KLE et al.: Clinical presentation and outcome of severe acute respiratory syndrome in children. *Lancet* 361:1701-1703, 2003
- 17) Booth CM et al.: Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the Great Toronto area. *JAMA* 289:2801-2809, 2003
- 18) Chu CM et al.: Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: initial virological and clinical findings. *Thorax* 59:252-256, 2004
- 19) Gao W et al.: Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet* 362:1895-1896, 2003
- 20) Bukreyev A et al.: Mucosal immunization of African green monkey with an attenuated parainfluenzae virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS. *Lancet* 363:2122-2127, 2004

#### 著者連絡先

〒852-8523 長崎市坂本 1-12-4  
長崎大学熱帯医学研究所  
感染症予防治療分野  
大石和徳

## 肺炎球菌性肺炎とその対策

大 石 和 徳

## はじめに

肺炎球菌はグラム陽性双球菌であり、小児や成人に肺炎、髄膜炎、敗血症、中耳炎、副鼻腔炎などの全身性、上気道および下気道感染症を惹起する。とりわけ、成人における市中肺炎の原因菌の約20~40%を占める最も重要な呼吸器病原性菌である。本稿では本邦における成人の肺炎球菌性肺炎の臨床像、起炎菌の薬剤耐性、ワクチンによる予防戦略について記載する。

## I. 成人における肺炎球菌性肺炎

今回、我々は2001~2003年の期間に全国20施設において肺炎球菌性市中肺炎の臨床像、起炎菌の薬剤耐性、血清型の実態を調査した。各診療施設で肺炎を診断し、細菌学的には喀痰および血液培養を実施して起炎菌を決定した。114例において、肺炎球菌は109例が喀痰、3例が血液、1例が胸水、1例が気管支肺胞洗浄液から分離され、菌血症を伴う肺炎球菌性肺炎の頻度は2.6%であった。この菌血症を伴う肺炎の頻度はこれまでの本邦や欧米の成績に比較して低かった<sup>1)</sup>。また、114例中89例(78.1%)は入院し、残りの25例は外来で治療された。患者の平均年齢は67.4歳(20~99歳)で、男性が59.6%を占めていた。全症例の71.9%に基礎疾患が認められ、その内訳は慢性呼吸器疾患(39.5%)、糖尿病(12.3%)、脳血管障害(8.8%)などであった。日本呼吸器学会のガイドラインに従った重症度分類では、重症33.3%、中等症42.1%、軽症24.6%であった。入院患者の平均在院日数は軽症でも15.9日、中等症24.1日、重症34.3日と、欧米に比較して明らかに在院日数は長かった。これらの114症例中、109例(95.6%)は治療により軽快したものの、5例(4.4%)が死亡した。この致命率も欧米の成績に比較すると低率

長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野

であり、菌血症を伴う肺炎の頻度が低いことが起因していると推察された<sup>2)</sup>。

## II. 肺炎球菌の薬剤感受性と耐性遺伝子

肺炎球菌114株のペニシリン感受性成績では、26株(22.8%)がペニシリン耐性であり(MIC 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ が25株、4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ が1株)、ペニシリン非感受性(MIC > 0.12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )以上は66株(57.9%)であった。肺炎球菌の $\beta$ ラクタム耐性を担っている *pbp* 遺伝子変異の検討では、42株(36.8%)が *pbp1a+2x+2b* 遺伝子変異を有し(ゲノタイプ PRSP)、28.1%が *pbp2x* 遺伝子変異を有していた。*pbp1a+2x+2b* 遺伝子変異株のMICは0.25~4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、MIC<sub>50</sub>が2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ とペニシリン耐性を示すのに対し、*pbp2x* 遺伝子変異株はMIC範囲0.03~0.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、MIC<sub>50</sub>が0.03  $\mu\text{g}/\text{ml}$ とペニシリン感受性であった。*pbp* 遺伝子変異を認めなかったのは13株(11.4%)に過ぎなかった。

一方、肺炎球菌114株のマクロライド耐性に関与する *erm B* 遺伝子、*mef A* 遺伝子の頻度についても検討した。*erm B* 遺伝子は23S rRNA methylase の methylation をコードし、*mef A* 遺伝子はマクロライドの排出に関与するとされている。結果として、114株中 *erm B* 遺伝子保有株(50株: 56.1%)が最も多く、続いて *mef A* 遺伝子保有株(26株: 22.8%)、遺伝子非保有株(24株: 21.1%)、*mef A+erm B* 遺伝子保有株(7株: 6.1%)の順であった。*erm B* 遺伝子保有株は *mef A* 遺伝子保有株に比較してエリスロマイシン耐性が顕著(MIC: 0.5~128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、MIC<sub>50</sub>=128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )であった。

## III. 血清型分布

これまでに全国的な肺炎球菌感染症の血清型

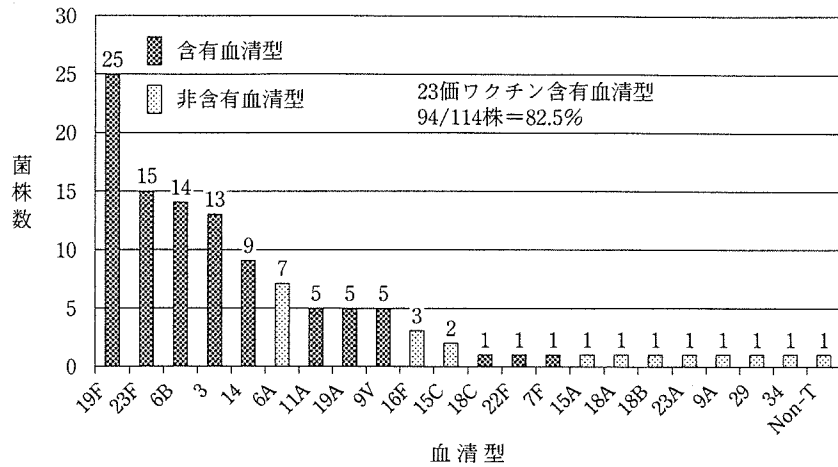


図 1 肺炎球菌114株の血清型分布

分布としては、福見らが1980～84年に590症例の肺炎球菌感染症を対象として報告している<sup>3)</sup>。この報告では、血清型分布は、頻度の高い順に3 (12.7%)、19F (9.3%)、23F (6.8%)、6B (5.9%)であり、これら590株における23価ワクチンカバー率は72.9%であった。一方、今回の研究において市中肺炎球菌性肺炎114症例から分離された起炎菌の血清型分布は、頻度の高い順に19F (29.1%)、23F (13.2%)、6B (12.3%)、3 (11.4%)であった (図1)。114株中の94株 (82.5%)は23価ワクチンに含有される血清型を有していた。ワクチン非含有血清型としては6A、16F、15Cなどが認められた。

#### IV. 肺炎球菌ワクチンによる予防戦略

本邦の国民衛生動向によれば肺炎は第4位の死因であり、2003年には94,900人が肺炎で死亡している。今回の肺炎球菌性肺炎における成績に基づき、肺炎の死亡率を4.4%とし、肺炎のうち肺炎球菌が起炎菌として占める割合を30%とすると、647,045人 (94,900×0.3/0.044) が毎年肺炎球菌性肺炎に罹患していると推定できる。また、今回の検討では成人の肺炎球菌性肺炎114症例の平均年齢は67.4歳、また71.9%に慢性呼吸器疾患、糖尿病、脳血管障害などの基礎疾患が認められた。このような結果から、基礎疾患を有する65歳以上の高齢者が肺炎球菌性肺炎のハイリスク患者と考えられた。さらには、本邦における成人の市中肺炎起炎菌としての肺炎球菌の大半は *pbp* 遺伝子変異やマクロライド耐性遺伝子を獲得し、その薬

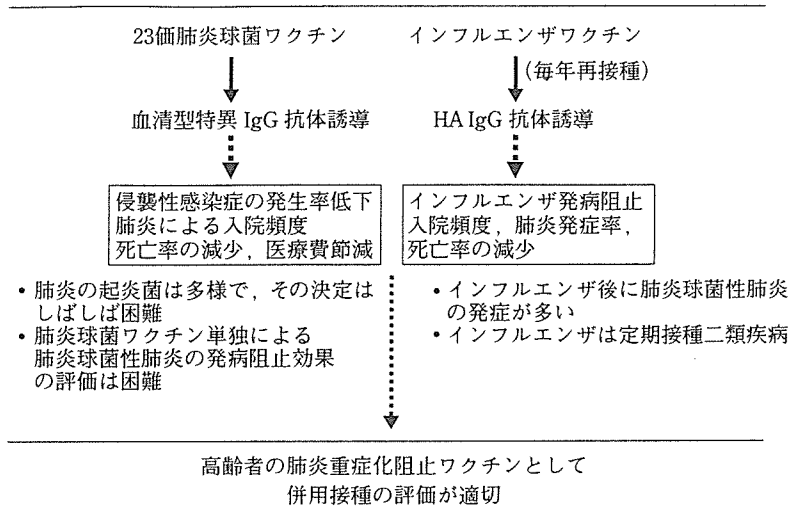
剤耐性は顕著であることも明確になった。このような背景から、肺炎球菌ワクチンによるハイリスク患者に対する予防戦略は重要な課題と考えられる。

本邦において23価肺炎球菌ワクチンは1988年に承認された。欧米においては、これまでに多くの23価肺炎球菌ワクチンによる免疫能正常者における菌血症を伴う肺炎、髄膜炎などの侵襲性肺炎球菌性感染症に対する予防効果に関する報告がある<sup>3)</sup>。このような、研究結果を受けて米国の Advisory Committee for Immunization Practice (ACIP) は肺炎球菌感染症の予防が推奨される対象について示している。免疫能正常者では65歳以上の高齢者、2～64歳で慢性心疾患、慢性肺疾患、糖尿病の患者、無脾状態の患者に対して明らかな証拠に基づく A ランクの推奨をしている。免疫正常者でも2～64歳で慢性肝疾患、アルコール中毒、脳脊髄液漏の患者には B ランク (中等度の証拠)、HIV 感染者を含む免疫不全患者には C ランク (明らかな有効性の証明が無い) の推奨をしている。一方、本邦の成人における肺炎球菌感染症の大半は菌血症を伴わない肺炎であり、肺炎球菌ワクチンの菌血症を伴わない肺炎に対する有効性は重要な問題である。Nichol らは、retrospective cohort study において、慢性肺疾患患者における菌血症を伴わない肺炎球菌性肺炎を有意に予防したと報告している<sup>5)</sup>。しかしながら、これまでの prospective study においては、肺炎球菌ワクチン単独による菌血症を伴わない肺炎球菌性肺炎に対する予防効果は明らかになっていない。

一方、肺炎球菌性肺炎はしばしばインフルエン



表 1 肺炎球菌ワクチンの位置付け



ザ後肺炎として発症することが知られている。最近, このような臨床的経験を支持する肺炎球菌感染の分子機構が明らかになりつつある。肺炎球菌の菌体表面のフォスホリルコリンは血管内皮細胞上の血小板活性化因子 (PAF) リセプターを介して結合し, 肺炎球菌は細胞内に侵入することが知られている。その後, ライノウイルスを *in vitro* で感染させた気道上皮細胞には PAF レセプター発現が増強し, 肺炎球菌付着も亢進することが報告された<sup>6)</sup>。また, インフルエンザウイルスを *in vitro* で肺上皮細胞に感染させた場合にも肺炎球菌の付着能が亢進する。この系にノイラミニダーゼ阻害剤である oseltamivir を添加すると菌付着が低下することから, インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼは気道傷害を介して肺炎球菌付着に関与すると考えられる<sup>7)</sup>。さらに, マウス肺炎実験モデルにおいてはインフルエンザウイルス先行感染により肺炎球菌性肺炎が重症化することも明らかになっている。

本邦において2001年から65歳以上の高齢者に対するインフルエンザワクチンの定期接種 (二類疾病) が実施されるようになり, この年齢のインフルエンザワクチンの予防接種率は50%を超えたとされている。本邦におけるこのような背景から, 肺炎球菌ワクチンを単独で評価するより, 65歳以上の高齢者に対するインフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンの併用効果を評価することがより有意義と考えられる (表1)。欧米では, これまでにインフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンによる259,627人の65歳以上の高齢者を対象とした

大規模な前向き研究が実施されている<sup>8)</sup>。本研究において両ワクチン接種群は, 非接種群に対して, インフルエンザ感染, 肺炎球菌性肺炎の発症率, および死亡率の有意な減少が認められている。このように, 肺炎球菌ワクチンの高齢者肺炎に対する効果がインフルエンザワクチンとの併用で明らかとなっている。Nichol は同様の効果について慢性肺疾患を有する高齢者において検討している。この研究では, 肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用により, いずれのワクチン接種も受けなかった場合に比較して肺炎による入院のリスクは63%低下し, 死亡のリスクは81%低下したとされている<sup>9)</sup>。従って, 本邦においても65歳以上の高齢者に対する肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用効果が期待され, 今後の日本独自のエビデンスの提示が求められている。米国では65歳以上の高齢者に対する肺炎球菌ワクチン接種率は65%に及び, さらに2010年までにカバー率を90%に引き上げたいとしている<sup>10)</sup>。一方, 本邦における65歳以上の高齢者 (約2,200万人) のワクチン接種率は2.2%と未だ低率である。今後, 本邦における肺炎球菌ワクチン接種率の一層の向上が必要である。

文 献

- 1) Ishida, T., Hashimoto, T., Arita, M. et al.: Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients. *Chest*, 114: 1588-1593, 1999.
- 2) Bartlett, J. G., Mundy, L. M.: Community-acquired pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 333: 1618-1624, 1995.
- 3) Fukumi, H., Kaneko, Y., Agata, T. et al.: Studies on clinical application of pneumococcal vaccine: dis-

- tribution of *Streptococcus pneumoniae* in Japan. Kansensho Gakkai Zasshi, 58: 39-52, 1984.
- 4) Shapiro, E. D., Berg, A. T., Austrian, R. et al.: The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. N Eng J Med, 325: 1453-1460, 1991.
  - 5) Nichol, K.L., Baken, L., Wuorenma, J. et al.: The health and economic benefits associated with pneumococcal vaccination of elderly persons with chronic lung disease. Arch Intern Med, 159: 2437-2442, 1999.
  - 6) Ishizaka, S., Yamaya, M., Suzuki, T. et al.: Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells. J Infect Dis, 188: 1928-1939, 2003.
  - 7) Peltola, V. T., Mcculers, J. A.: Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. Pediatr Infect Dis, 23: S87-97, 2004.
  - 8) Christenson, B., Lundbergh, P., Hedlund, J. et al.: Effects of a large-scale intervention with influenza and 23-valent pneumococcal vaccines in adult aged 65 years or older: a prospective study. Lancet, 357: 1008-1011, 2001.
  - 9) Nichol, K. L.: The additive benefits of influenza and pneumococcal vaccinations during influenza seasons among elderly persons with chronic lung disease. Vaccine, 17: S91-S93, 1999.
  - 10) CDC: Influenza and pneumococcal vaccination coverage among persons aged > 65 years and persons aged 18-64 years with diabetes or asthma-United States. M. M. W. R., 53: 1007-1012, 2003.
-

# WHO 主導の国際感染症危機管理

## 海外感染対策 事情 (2)

大石和徳 (Kazunori Oishi)

長崎大学熱帯医学研究所 感染症予防治療分野

### ◆はじめに

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), 高病原性鳥インフルエンザがアジアを火元として世界を脅かす国際感染症へ発展し, これらに対する早急な対応が望まれている. 本稿では, 中国における SARS アウトブレイクに対する対応の問題点を挙げ, 今後の WHO 主導とした国際感染症への対応について述べる.

#### 1) 中国本土における SARS アウトブレイクの実態<sup>1)</sup>

2002 年 11 月に始まった広東省における SARS の流行は 2003 年の 1 月にはさらに拡大傾向を示し, 2 月 3 日になって中国衛生部は 305 例の異型肺炎の発生として WHO に公式報告した. 一方, 2 月下旬にはこの異型肺炎を診療していた広東省の医師が香港のホテル 9 階で 12 人の宿泊客に感染させ, ここから国際的な感染拡散に発展した. WHO はベトナムでの異型肺炎の報告を受けて, 3 月 12 日には異型肺炎に関する Global Alert を発令するに至った.

一方, 山西省から広東省へ旅行した女性が SARS を発症し, 山西省の病院に入院した. 重症化したこの患者は 3 月 1 日に北京市内の病院へ移送され, その後に北京市内の院内感染が拡大しはじめた. しかしながら, 4 月の中旬まで北京市内における SARS の実態は公表されていなかった. 4 月 20 日以降, 北京市内のみならず中国本土の患者数は急激に増加し, 北京市内のアウトブレイクは本格化していった. 4 月 15 日に北京市内の感

染拡大の事実が明らかになり, 4 月 20 日以降に中国衛生部は SARS 対策を国家最優先課題として取り組むことを発表した.

入院患者のマネージメントには手袋, ガウン, N95 マスク, ゴグルなどの個人防御装具 (Personal protective equipment: PPE) を装着し, 標準予防策に加えて飛沫感染予防策が必要となる<sup>2)</sup>. しかしながら, 中国のアウトブレイクの初期 (3~4 月) には SARS 患者が近隣地域に発生しているという疫学的情報がありながら, 院内感染対策の基本的知識が医療従事者に十分に浸透していなかった. 図 1 には T 市における 175 症例におよぶ SARS アウトブレイクの推移について示している. インデックス症例 X が事前情報なしに市中病院 A に入院し 125 例におよぶ院内感染および市中感染へと進展した. この症例は SARS 指定病院 B, さらに C 病院と移送された.

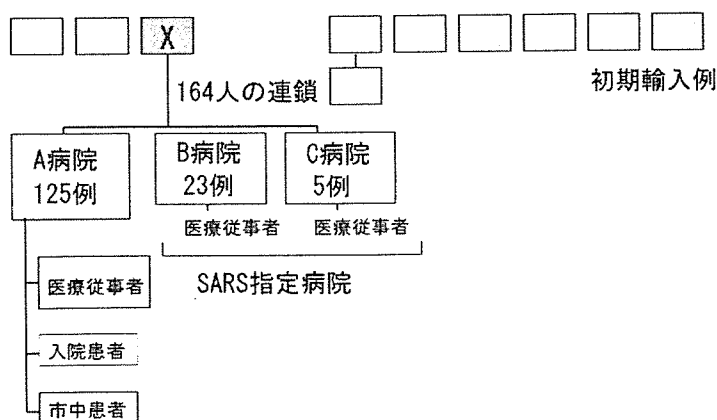


図 1 2003 年 4 月の中国 T 市における SARS 感染連鎖の実態  
スーパースプレダー X の市中病院への入院を契機に, 164 人の感染連鎖が認められた.



図2 北京市におけるWHO プレスカンファランス風景  
中国、河北省におけるWHO/ 衛生部の調査結果について、  
プレスからの質疑が殺到した。

その結果、B 病院と C 病院では入院患者や市中への感染拡大はなかったものの、やはり医療従事者の感染が発生した。この事実から、SARS 患者は一般病院に収容すべきではなく、SARS 専用病院に収容すべきであることが明白である。このように、中国本土における 2003 年 3～4 月のアウトブレイク初期段階での市中病院、SARS 指定病院における院内感染対策が不十分であった点が指摘できる。その後、中国衛生部の院内感染対策ガイドラインに従った厳重な院内感染対策が実施され、6 月上旬には新規発生 の報告は急速に減少した。

## 2) 中国本土の SARS アウトブレイクに対する WHO の対応

2003 年 5 月、WHO 北京オフィスには中国本土全域への SARS 拡散防止のために、各国から多数の短期専門家が派遣された。専門家の業務は疫学担当、感染コントロール・臨床担当（医師、看護婦）、検査担当、メディア担当等であった。また、WHO 中国オフィス全体の任務としては、WHO 西太平洋事務局 (WPRO) との連携、中国衛生部や北京市衛生部との対応策の調整、中国各地への衛生部-WHO の合同視察団、北京市の疫学調査、北京市内の院内感染対策など広範な内容であった。筆者は日本から

の短期専門家として 5 月上旬に北京入りした。図 2 には 2003 年 5 月の北京市における WHO プレスカンファランス風景を示した。この時期には、北京オフィスには約 20 名の短期専門家が投入されており、毎朝新しい疫学情報をもとに、中国オフィス全体の行動方針について議論が続いた。インフルエンザの専門家が米国 CDC から派遣されているが、どの専門家にとっても SARS は新たな問題であった。実質的なリーダーが不在のチームもあり、それぞれのチームの活動は必ずしも円滑ではなかった。その中で北京市内の疫学調査と中国各地への衛生部-WHO の合同視察は順調に遂行されていた。5 月下旬になり、感染コントロールチームにも展開があった。

英国、オーストラリアから感染対策としての病院内換気の専門家が招聘され、北京市内の院内換気についての問題点が検討評価された。

2003 年 7 月 5 日には世界 32 カ国 8,422 人の感染者と 916 人の死者を数えた SARS の世界的感染連鎖は終息した。症例の 95.5% は西太平洋地域に集中していた。その後、2003 年 12 月～2004 年 12 月に再び中国広東省において、4 例の SARS 症例が報告された。このことは、SARS がこの地に発生する風土病的ウイルス性疾患であることを示唆している。これ以外には、台湾、シンガポール（2003 年 9 月）、中国（2004 年 3～4 月）における実験室感染が報告されている。2004～2005 年シーズンには SARS の再来は認められていない。

## 3) WHO を中心とした国際感染症に対する危機管理

中国広東省における SARS アウトブレイク初期の事例からも理解できるように、国際感染症のアウトブレイクの発生を速やかに察知し、原因究明をする国際的な情報ネットワークが必要である。現在、WHO はグローバル感染症警報・対応ネットワーク (GOARN; Global outbreak alert & response network) を、技術や人材を支援できる既存の研究施設を中心