

200500673A

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

「高病原性鳥インフルエンザの疫学臨床研究」に関する研究

平成17年度研究報告書

平成18年3月

主任研究者 工藤 宏一郎

# 目 次

## I. 総括研究報告

高病原性トリインフルエンザの疫学研究 -----	1
工藤 宏一郎	

## II. 主任・分担研究報告

1. 総括及び臨床疫学研究 -----	3
工藤 宏一郎	
2. 鳥インフルエンザ・新型インフルエンザの病院感染対策に関する研究--	5
川名 明彦	
3. 医療連携システムの構築に関する研究 -----	7
稲葉 淳一	
4. 高病原性鳥インフルエンザの病理・免疫組織化学的研究 -----	9
佐多 徹太郎	
5. 高病原性鳥インフルエンザの病理研究 -----	12
岡 輝明	
6. 高病原性鳥インフルエンザによる発症機序に関する研究 -----	14
慶長 直人	
7. 鳥インフルエンザ重症化機構に関する研究 -----	17
反町 典子	

厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）  
総括研究報告書

高病原性鳥インフルエンザの疫学臨床研究

主任研究者	工藤宏一郎	国立国際医療センター国際疾病センター長
分担研究者	川名明彦	国立国際医療センター国際疾病センター
	稲葉淳一	国立国際医療センター国際疾病センター
	佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部
	岡 輝明	公立学校共済組合関東中央病院病理科
	慶長直人	国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部
	反町典子	国立国際医療センター研究所免疫学

研究要旨

近い将来に危惧される新興インフルエンザ等の新興感染症発生の事態に備えることを目的として、ベトナム国及びアジア諸国において、高病原性鳥インフルエンザ（HPAI）に罹患した患者の臨床像と病理像を現地医療スタッフとの共同研究ならびに、新興呼吸器感染対策に関する研究、海外で発生した新興感染症に対応できる人材養成に関する臨床研究の実施。

A. 研究目的

- ① 鳥インフルエンザ患者における解剖システムの構築。
- ② 遠隔診断支援システム（e-medicine）の有効利用及び発展。
- ③ 鳥インフルエンザの臨床に関わる専門家養成プログラムの開発
- ④ 海外渡航者および駐在者への鳥インフルエンザ発生時における医療連携システムの構築
- ⑤ 鳥インフルエンザ重症化に関わる宿主の免疫応答の解析
- ⑥ 肺病変からみた重症化機構の解明

B. 研究方法

- ① 鳥インフルエンザ患者における解剖システム構築

鳥インフルエンザ患者死亡例の肺組織標本からその病理を分析し、その臨床像を解明。

- ② 遠隔診断支援システム（e-medicine）の有効利用及び発展

国立国際医療センター（東京、日本）とバクマイ病院（ハノイ市、ベトナム）に遠隔診断支援システム（e-medicine）を設置し、両国を結んだ医療カンファレンスを実施する。

- ③ 鳥インフルエンザの臨床に関わる専門家育成プログラムの開発

日本人医師をベトナムバクマイ病院でのパイロットトレーニングコースに参加し、鳥インフルエンザ患者の臨床経過についての理解を

深めるとともに、ベトナム人医師との交流をはかる。

- ④医療連携システムの構築

海外赴任者および旅行者に対して渡航前後の健康管理を行う。鳥インフルエンザの流行が危惧されている地域への渡航者に対する情報提供なども併せておこなう。

- ⑤鳥インフルエンザ重症化に関わる宿主免疫応答の解析

重症化に関与する宿主免疫応答を解析し、新たな創薬のターゲットを見出す。

- ⑥肺病変からみた重症化機構の解明

NK細胞のインフルエンザウイルス感染細胞の認識機構の研究を通じて、ヒトNK細胞非感受性のウイルス亜型を同定し、ヒトにおける悪性度を推測する。

C. 研究結果

- ① 鳥インフルエンザ患者における解剖システムの構築

鳥インフルエンザ患者死亡例の肺組織標本からその病理を分析し、臨床像を解明。ベトナムとの共同で、プロトコール“Collaboration of pathological findings in avian influenza for autopsied cases in National Hospital of Pediatrics”を作成。共同研究をスタートさせた。現在、鳥インフルエンザの症例を見つけることが難しいとされ、鳥インフルエンザ患者の解剖システムの構築。

- ② 遠隔診断支援システム（e-medicine）の有

## 効利用及び発展

H17年12月13日、相互交換型の共同診療システムを可能とする遠隔診断支援システム（e-medicine）を構築。国立国際医療センター（東京、日本）とバクマイ病院（ハノイ、ベトナム）に設置し、両国を結んだ医療カンファレンスを実施。以降、カンファレンスを頻回に実施し、臨床共同研究および鳥インフルエンザ患者の診療の可能性が拡大。臨床カンファレンス（CPC, CC, 症例検討会など）を症例が出たときなどを含め頻回に実施。数回の実績経験より、有用性が高いことが判断された。

### ③ 鳥インフルエンザの臨床に関わる専門家庭教育プログラムの開発

国立国際医療センター国際疾病センターの医師二名がバクマイ病院でのパイロットトレーニングコースに参加し、鳥インフルエンザ患者の臨床経過について理解を深めると共にベトナム人医師との交流を深めることができた。

### ④ 医療連携システムの構築

在留邦人が利用する医療機関の現状を十分に把握した上で、新興感染症発生時の医療連携システム構築を促す。新興感染症の知識ならびに現地医療情報の提供を積極的に行い、流行が起こった場合、国内からもサポートできる体制の強化をはかる。

### ⑤ 鳥インフルエンザ重症化に関わる宿主免疫応答の解析

NSタンパク質の宿主細胞内機能における役割に着目し、種々の細胞におけるNS遺伝子の発現実験系の樹立を試みる。

### ⑥ 肺病変からみた重症化機構の解明

インターフェロン誘導性抗ウイルス分子として知られるOAS1の発現様式を、鳥インフルエンザウイルスの増殖の場と考えられるヒト気管支上皮細胞にて確認した。

## D. 考察

e-medicine を共同研究者となるベトナムハノイ市のバクマイ病院、国内では、国立国際医療センター、関東中央病院（簡易型）に設置した。e-medicine を利用してバクマイ病院との共同カンファレンスを3回実施、ケーススタディー、コンサルテーションなどを実施した。e-medicine を使用して収集した、臨床・病理・疫学情報を可能な限り多くの医療関係者と共有し、新興感染症のパンデミック発生時などに迅速対応出来る人材養成と即応体制の確立に貢献すべく、研修教材を作成。新興感染症の診断・新たな治療方法の確立には、病理データが重要な為、ベトナム（国立小児病院）から医師を日本に招聘し、確かな病理標

本を作り読み取る能力をつけるべく研修（国立国際医療センター、関東中央病院、国立生育医療センター、神奈川県立こども病院にて）を実施し、共同疫学臨床研究の基盤を構築。

## E. 結論

ベトナム側研究拠点のバクマイ病院、日本側拠点の国立国際医療センターと、関東中央病院に、e-medicine を設置したことで、頻回なるカンファレンス、病理コンサルテーションを実施することが可能となり、今後の共同研究活動に大きく貢献できる。

初年度での研究を基盤として、今後更なる疫学臨床研究活動を拡大したい。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

主任研究報告書

統括及び臨床疫学研究

主任研究者 工藤 宏一郎 国立国際医療センター国際疾病センター長

研究要旨 近い将来に危惧される新興インフルエンザ等の新興感染症発症の事態に備えるために、ベトナム国において高病原性インフルエンザ（HPAI）に罹患した患者の臨床像と病理像の現地医療スタッフとの共同研究、新興呼吸器ウイルス感染症の総合的な病院感染対策に関する研究、海外で発生した新興感染症に対応できる人材養成に関する臨床研究及び抗ウイルス薬開発研究を実施。1）ベトナムの研究者と共同でヒト鳥インフルエンザの臨床知見及び死亡例の病理を分析し、その臨床像を明らかにする。2）遠隔診断支援システム（e-medicine）を構築し、臨床経過、放射線画像、病理像をインターネットを利用し、二国間のCC、CPCを実施し、迅速な情報の共有化を図る。3）海外で発生した新興感染症に対応できる人材育成のためのシステム構築することにある。

A. 研究目的

アジア地域のみならず、今やほぼ全世界でヒトの鳥インフルエンザ（H5N1）などの新興感染症のアウトブレイクが続いており、新型インフルエンザが発生するリスクが高い。アジア地域にあり膨大なヒトの往来があるわが国は、常にこれらの新興感染症の危険にさらされており、日本の政策医療としてのヒト鳥インフルエンザ等の新興感染症の臨床研究を開始することは急務である。具体的には、1）ハノイ国立小児病院に蓄積されているヒト鳥インフルエンザの臨床知見及び死亡例の病理を分析し、その臨床像を明らかにする。2）遠隔診断支援システム（e-medicine）を構築し、臨床経過、放射線画像、病理像をインターネットを利用し、二国間のCC、CPCを実施し、迅速な情報の共有化を図る。3）海外で発生した新興感染症に対応できる人材育成のためのシステムを構築する。臨床医療従事者等に対して、海外で新興感染症の治

療に当たっている施設において対処方法についてのトレーニングを行う。4）鳥インフルエンザの感染、発症・重症化に関わる宿主側要因の探索としては、同一曝露環境下で、感染・発症者、非発症者群で、宿主側の抗ウイルス応答に才があるか、家系及び散発例についての疫学的研究が重要で、トリーヒト感染の可能性の有無を事前に知ることは意義がある。

B. 研究方法

1) 国立小児病院に保存されている鳥インフルエンザ症例の数少ない病理標本の病理像及びウイルス解析を行う。

2) e-medicine を構築し（国立国際医療センターとバクマイ病院間）ベトナム側からの鳥インフルエンザの臨床像の提示に基づき、病態、治療法の検討を合同で行う。3）人材の交流：日本側からベトナムへの臨床研修、ベトナム側からIMCJへの研究方法の研修、病理標本の作成法、臨床研修、

e-medicine 操作研修のために派遣を行う。

#### C. 研究結果

##### 1) 病理像

鳥インフルエンザ典型例の病理像は diffuse alveolar damage (DAD、びまん性肺障害) で、初期病態には肺胞上皮Ⅱ型細胞のみへのウイルス感染を認めた。

2) e-medicine を構築し、鳥インフルエンザに関連した医学カンファランスを計3回ベトナム側と行った。

3) 日本側から計6名の医師の派遣、ベトナム側から計8名の医師・研究者が派遣され、研修が行われた。

#### D. 考察

初年度において鳥インフルエンザの主テーマのもと各サブテーマ(e-medicine の構築、病理像の検討、人材交流など)において進歩が得られた。

#### E. 結論

初年度の成果としては完全ではないにしろ、成果を収めつつある。

#### G. 研究発表

以下の論文を作成中である

1) Clinical and pathological findings in fatal cases with avian influenza pneumonia

2) What is e-medicine?

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）

分担研究報告書

鳥インフルエンザ・新型インフルエンザの病院感染対策に関する研究

分担研究者 川名明彦 国立国際医療センター国際疾病センター医長

研究要旨 高病原性鳥インフルエンザならびに新型インフルエンザの院内感染対策を目的としたマニュアルを作成した。また、これらの院内感染を早期に発見するためのサーベイランスシステムを構築した。我が国ではこれらの感染症はまだ見られないため、現在すでに鳥インフルエンザが流行している東南アジア地域への導入も可能な方法を目指した。これらの方法は我が国に新型インフルエンザ対策にも貢献するものと考えられる。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザならびに新型インフルエンザ（以下新型インフルエンザと略）に対応できるマニュアルを作成する。また、新型インフルエンザの院内アウトブレイクの早期発見のための院内感染サーベイランスシステムを構築する。これらはいずれも発展途上国（ベトナムを想定）でも導入可能であることとする。

B. 研究方法

(1) マニュアル作成：WHO の新型インフルエンザ分類に従い、流行をフェーズ 1 から 6 までに分類した。フェーズ 1、2 は鳥からのみ新型インフルエンザが検出されている時期であるため、通常のインフルエンザ感染対策の方法を導入できる。フェーズ 3 から 5 が、いわゆる「封じ込め期」であるため、最も厳格な感染対策が求められる時期である。この時期は標準予防策に加え、空気・接触・飛沫の核感染経路別予防策を採用することとした。フェーズ 6 はパンデミック期であり、限られた資源でより効率のよい感染対策が求められる時期である。この時期には標準予防策と飛沫予防策を中心とし、診療エリアのゾーニングを合わせ

て採用することとした。作成したマニュアルは国立国際医療センターのウェブサイトで公開し、広く意見を求め、改訂・最終稿とした上で実際の運用へ移行することとした。

(2) 院内感染サーベイランスシステム作成：現時点でまだ新型インフルエンザの迅速診断キットが開発されていないため、迅速に患者を検出するためには臨床症状がきわめて重要である。また、インフルエンザのように感染性の強い疾患の場合、そのサーベイ対象は入院患者のみならず病院職員にも拡大する必要がある。この 2 点を同時に満たす方法として、職員も含めた「病院内症候群サーベイランス」を開発した。これは病院内で「38℃以上の発熱と呼吸器症状を呈したヒト」を対象とするもので、簡便かつ迅速である。この方法は、国立国際医療センター内で実験的に実施し、段階的にベトナム（ハノイ熱帯病研究所付属病院ならびにバックマイ病院を想定）に展開することを仮定した。

C. 研究結果

(1) マニュアル：「インフルエンザ対応マニュアル」として 1 年間改訂をくり返し第

6 版まで作成した。この間、国立国際医療センター内で新型インフルエンザ対応委員会を立ち上げ、各部門の意見を導入した。

(2) 院内感染サーベイランス：「急性呼吸器症状サーベイランス」として、国立国際医療センター内で実施した。この間、鳥インフルエンザや新型インフルエンザの発生はなかったが、通常のヒトインフルエンザの検出には有効性が確認できた。また、サーベイランスで得られた情報は感染対策に有用であった。

#### D. 考察

現在、トリの間では高病原性鳥インフルエンザ A/H5N1 亜型が広く世界に拡散し、それに伴って東南アジア、東ヨーロッパなどで合計 200 名を越す感染者とその半数以上の死者が報告されている。また、今後ヒトへの効率のよい感染性を獲得すると新型インフルエンザとして世界的大流行（パンデミック）を起こす事も現実的に懸念されている。新型インフルエンザの出現に対し、厚生労働省は平成 17 年 11 月、行動計画を発表した。その中には、重要な柱として患者サーベイランスと感染対策が言及されているが、具体的な実施方法はまだ確定していない。今回我々の行なった、新型インフルエンザ対策マニュアルの作成ならびに院内感染サーベイランスシステムの構築は、我が国の新型インフルエンザ対策に貢献するものと考えられる。

マニュアルに関しては厚生労働省の行動計画も WHO のフェーズ分類に依拠しており、フェーズ分類に従った感染対策が合理的である。その中でも、フェーズ 1、2 は「動物インフルエンザの時期」として通常のインフルエンザ対策、フェーズ 3～5 は「封じ

込め期」として full barrier precaution、フェーズ 6 は「社会機能維持期」として通常のインフルエンザ対策の徹底と、メリハリのある感染対策を提案できたと考える。このマニュアルをもとに翻訳版を作成し、鳥インフルエンザの発生地域で試用することを次の課題と考えている。

サーベイランスに関しては、院内の入院患者のみならず病院職員も対象とした点ならびに「症候群サーベイランス」の手法を導入した点が新しい提案である。症候群サーベイランスは、バイオテロなど原因不明の病原体によるアウトブレイクを早期発見する方法として用いられてきた。本法の利点は、未知の病原体であり診断方法が確定していない段階でもアウトブレイクを検出できること、安価で特別の技術を要しないこと、である。欠点は特異度がやや低いことである。今後の検証を重ね、実用性を高め、東南アジア地域の鳥インフルエンザ発生地域にも導入することが次の課題である。

#### E. 結論

高病原性鳥インフルエンザならびに新型インフルエンザの院内感染対策を目的としたマニュアルを作成した。また、これらの院内感染を早期に発見するためのサーベイランスシステムを構築した。これらは、今後の我が国の新型インフルエンザ対策に貢献するものと考えられる。我が国ではこれらの感染症は見られないため、現在鳥インフルエンザの流行地域である東南アジア地域への導入も可能な方法を目指した。

#### G. 研究発表

発表準備中

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



## 研究要旨

医療事情が異なる海外に在住する邦人にとって、現地における医療機関の情報はきわめて重要であり、渡航前の情報提供は言うまでも無く、現地における不慮の事故や慢性疾患の悪化に伴う緊急搬送が必要な場合の本国受け入れ体制の強化も望まれる。特に新興・再興感染症については、現地の医療機関と日本の医療機関との連携が今後特に必要となる。本研究では、e-medicine を利用した臨床疫学研究を実施し、現地の医療機関との協力体制を築きあげ、臨床医療支援体制を構築する。

### A. 研究目的

遠隔診断支援システム（e-medicine）を通じ海外で新興感染症の治療に当たっている施設と臨床医療連携をはかることで、臨床データなどの医療情報を収集・交換する。加えて、海外渡航者および駐在者への鳥インフルエンザをはじめとする新興感染症発生時における医療連携システムを構築する。

### B. 研究方法

特にベトナム及びアジア諸国の研究者、及び医療従事者と共に、遠隔診断支援システム(e-medicine)の構築を行い、それぞれの医療機関及び関係機関に設置する。加えて、現地の国々において、日本からの旅行者及び在留邦人が特に利用する医療機関と国立国際医療センター（IMCJ）とが連携を結び、e-medicine を有効的に利用したネットワークの構築をする。ネットワークを組んだ海外医療機関へ積極的に医療情報を提供し、常時連携が取れるシステム（e-medicine）の構築を目指す。

加えて、海外赴任者および旅行者に対して渡航前後の健康管理を行う。鳥インフル

エンザの流行が危惧されている地域への渡航者に対する情報提供なども併せておこなう。

### C. 研究結果

遠隔診断支援システム（e-medicine）の有用性の高さを、数回に渡る医療カンファランスを通じて評価できたことで、在留邦人がよく利用する医療機関の現状を十分に把握した上で、新興感染症の知識ならびに現地医療情報の交換を積極的に行える環境を整えることができた。

ベトナム ハノイ市のインターナショナル SOS ハノイクリニック、Family Medical Practice、ホーチミン市のインターナショナル SOS ホーチミンクリニック、Family Medical Practice、Columbia Asia Saigon International Clinic などと、今後の連携体制についての検討を実施し、今後、e-medicine システムを国内外の主要医療機関に設置して連携を図り、ネットワーク構築する足がかりとすることができた。

### D. 考察

連携可能な現地病院・クリニックとの折

衝を実施し、e・medicine を利用して国内外の臨床・病理・疫学情報を可能な限り多くの医療関係者と共有するシステム構築をはかる。

#### 結論

連携可能な現地病院・クリニックとの折衝を実施し、医療連携システムを構築することが今後の課題となる。海外在住者に対する通常の健康管理は現地医療機関においても十分可能であり、国内からも外務省による巡回診療等で専門家による健康相談が受けられるようになっている。しかし、仮に新興感染症が発生した場合には、在留邦人にとって最も期待されるのは国内からの医療情報や、帰国した場合の受け入れ体制の強化であると考えられ、国内での医療連携システムの強化も併せて必要と考えられる。

## 高病原性鳥インフルエンザの病理・免疫組織化学的研究

分担研究者 佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者 佐藤由子、長谷川秀樹（国立感染症研究所感染病理部）

研究要旨：高病原性鳥インフルエンザがヒトに感染した場合の病理・病態はいまだ不明で、通常のヒトインフルエンザの病理と比較することによりその違いを明らかにするため、まずマウスに鳥A型インフルエンザウイルス(H5N1)を感染させ、標本作製し、病理学および免疫組織化学的に検討した。またヒトA型インフルエンザウイルス感染例の剖検肺組織について免疫組織化学的に検討した。その結果、陽性対照標本が作製できたことがわかり、また鳥インフルエンザ感染剖検報告例の組織所見との対比し、鳥インフルエンザウイルス感染肺組織は通常のヒトインフルエンザ感染とは全く異なることが判明した。今後は鳥インフルエンザ肺炎剖検例を検討することにより、その病理・病態を明らかにする。

### A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザがヒトに感染した場合の病理・病態はいまだ不明である。通常のヒトインフルエンザの病理と比較することにより、その違いを明らかにする。とくに重症化の病理について検討し、診断・治療への示唆を与え、対応することを目的とする。

### B. 研究方法

Balb/CマウスにH5N1インフルエンザウイルス（香港株）およびマウス馴化インフルエンザH1N1(PR8株)を経鼻的に20 $\mu$ lを両側鼻腔内に感染させ、7日後に安楽死させた。鼻腔、気管、気管支そして肺組織を採取し、10%緩衝ホルマリンで固定した。切り出し後通常の方法でパラフィンに包埋し、組織

切片を作製した。

A型インフルエンザウイルスPR8をマウスに感染後、血清抗体の上昇を確認後、脾細胞を採取し、型のごとくマウスミエローマ細胞と細胞融合し、モノクローナル抗体を作製した。インフルエンザウイルスのヌクレオカプシド蛋白を認識し、かつホルマリン固定組織におけるインフルエンザウイルス抗原を検出できる抗体産生クローンを選択した。

インフルエンザウイルス抗原を組織切片上で検出するための免疫組織化学法は上記のモノクローナル抗体を反応させた後、LSABキット（Dako）を用い、ジアミノベンジンで発色した。組織切片はヘマトキシリンで核染後、検鏡した。

（倫理面への配慮）

動物実験は当研究所動物実験委員会に申請し、許可を得てから実施した。動物愛護の精神を遵守して実験を行った。

### C. 研究結果

1) マウス感染標本での病理・免疫組織化学所見：気管支から細気管支領域の気道系上皮細胞に変性像があり、細胞の配列が乱れていた。軽度の炎症性細胞浸潤があるが、細胞内には封入体はない。免疫組織化学ではインフルエンザウイルス抗原は肺内に巣状に分布し、気道系上皮細胞および肺胞内上皮細胞に陽性所見が認められた（図1）。ウイルス感染による気管支肺炎から肺胞性肺炎におよぶ感染があることがわかった。

2) ヒトインフルエンザウイルス感染剖検肺標本での病理・免疫組織化学所見：小児のインフルエンザ脳症例の肺組織所見では、気管から気管支、そして細気管支領域に上皮細胞の剥離と配列の不整があり、一部では移行上皮化生があつて細胞死もみられる。細胞内に封入体はない。一部の肺標本では好中球ほか炎症性細胞浸潤が気管支・細気管支領域にみられ、細菌性二次感染が考えられた。免疫組織化学では、ウイルス抗原は気道系上皮細胞にのみ認められた。上皮細胞の核内にのみみられるものと細胞質と核内の両者にみられる細胞が混在し、隣り合った上皮細胞に連続して感染細胞がみられることは少なかった（図2）。肺胞領域にはウイルス抗原はほとんど検出されなかった。

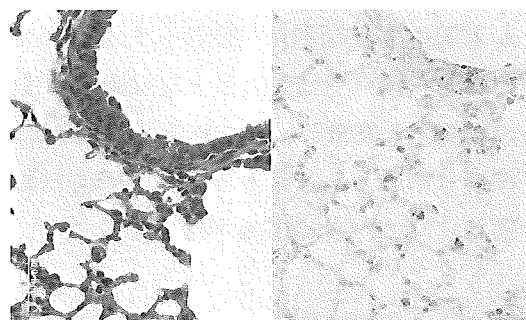


図1 H5N1感染マウス肺組織。左はHE染色で、右は同じ部位の免疫組織化学所見。ウイルス抗原は気管支上皮細胞から肺胞上皮細胞に認められた。

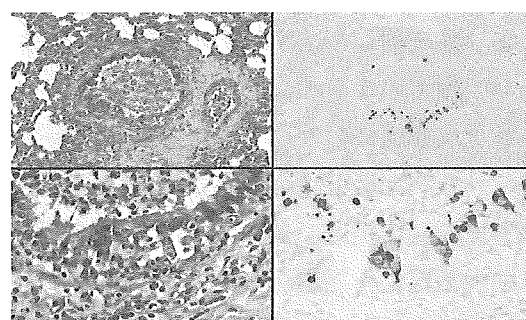


図2 ヒトインフルエンザの肺病変。左の上下2枚はHE染色で、細気管支病変を示す。右は同部の免疫組織化学所見。インフルエンザウイルス抗原は細気管支上皮細胞にあり、陽性所見は核内と核内と細胞質内の両者にみられるものが混在する。

### D. 考察

マウスにH5N1型の鳥インフルエンザウイルスを経鼻感染させたところ、気道系上皮細胞と呼吸細気管支から肺胞上皮細胞にもウイルス抗原が検出された。この標本はヒト鳥インフルエンザウイルス感染例の病理・免疫組織化学的検討を行う際の良い陽性対照標本として使えることがわかった。ヒトインフルエンザ肺炎例では、ウイルス抗原は気道系上皮細胞にのみ認められ、ほ

とんど肺胞上皮細胞には認められなかった。そのため、通常では気道系上皮細胞にウイルスが感染し増殖し、その結果、気管支肺炎様の分布をとると考えられた。経過の長い例では2次性の細菌性肺炎が合併していた。

1997年の香港での鳥インフルエンザのヒト感染報告例では臨床的にARDSを示した。肺胞領域には硝子膜の形成と肺胞内肉芽組織および器質化がみられている。この病理所見はdiffuse alveolar damage (DAD)に相当し、急性間質性肺炎の病理像と一致する。つまり臨床的なARDSの病理所見はDADであり、通常のヒトインフルエンザ肺炎で気道系上皮細胞にのみウイルス感染病変が認められる病理像とは全く異なっている。剖検までの臨床経過の長い例では、DADから肺胞内器質化へと進行している。これらの症例でインフルエンザウイルス抗原は検出できていない。タイの症例報告でも肺病変はDADであり、一部のⅡ型肺胞上皮細胞にインフルエンザウイルス抗原が検出できたという初めての報告であるが、写真で見限り、肺全体のごく一部にとどまっている。したがって、ウイルス感染後にDAD病変を起こすことは鳥インフルエンザのヒト感染では事実であるが、その病理組織学的経過については不明のまま、多数の症例の検討が必要である。

H5N1型の鳥インフルエンザ感染ヒト例での病態を明らかにすることは診断・治療について重要となる。今後当該症例の肺組織を病理学的に検索し、その病態について明らかにしていきたい。本年度はその準備がととのった。

## E. 結論

高病原性鳥インフルエンザウイルス感染ヒト肺組織を病理学および免疫組織化学的に検討するため、H5N1型インフルエンザ感染マウス標本を作製し対照標本とした。また通常のヒトインフルエンザウイルス感染組織ではウイルス抗原は気道系上皮細胞にのみ認められた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 研究要旨

ベトナムでのこれまでの HPAI 10 例の臨床像は発表されているが、全容、特に病理像や HPAF のヒトへの感染性、病原性や、致命的な肺炎像について未だ不明である。また、致命的な呼吸器ウイルス肺炎の病態については、これまではほとんど不明である。そのような機序が解明されるならば、感染・発症した患者への臨床的治療法の開発の途も開けると思われる。

### A. 研究目的

ヴェトナム国立小児病院（ハノイ市）における鳥インフルエンザ剖検症例の病理学的解析。

### B. 研究方法

小児病院に出張し、剖検症例の組織標本を観察し、所見を記載する。これに基づき、標本を選択し、肺の未染色切片を送っていただく。関東中央病院病理科で HE 染色および弾性線維染色（EMG 法）を実施し、組織反応を観察する。国立感染症研究所（NIID）感染病理部でインフルエンザウイルスの免疫組織化学的染色を行い、感染状況を観察する。

倫理面への配慮：国際間の共同研究であることに配慮し、ヴェトナム小児病院とは研究の分担をすることとし、相互に連絡をとりあって得られた情報を共有する。個人情報については、現在の日本の個人情報保護のあり方に照らして遺漏無きようつとめる。

### C. 研究結果

3 例の剖検症例肺組織をおのおの 3 ブロック選択し、それぞれにつき HE 染色および EMG 染色を実施した。3 例に共通して認められたのは硝子膜形成とそれにとまう末

梢肺の部分的虚脱であると判断された。臨床経過の短い 1 例は比較的純粋な硝子膜形成肺障害所見であったのに対し、経過のやや遷延していた 2 例にはそれに加えて肺胞腔内および肺胞中壁への好中球浸潤が多巢性・癒合性に認められた。ウイルス封入体などの特異的組織構造は観察されず、肺胞腔内出血、肺胞構造の破壊、壊死などは観察されなかった。

### D. 考察

3 例に共通していたのは、いわゆる“びまん性肺胞障害（diffuse alveolar damage, DAD）”に相当する組織反応であった。このことは、臨床経過や胸部レントゲン所見に合致するものと考えられた。ウイルスが肺胞上皮に感染しているのか気道上皮に感染しているのかについては、組織像のみからは判断できなかったため、ウイルス感染が直ちに DAD を惹起したのか否かについては明らかにできなかったが、臨床経過とあわせて判断すると、ウイルス感染が DAD を引き起こしていたことが推察された。好中球浸潤については、二次的な細菌感染であるのかウイルス感染に続発して生じた種々のサイトカイン放出などに関連してい

たのかの判断はできなかった。

#### E. 結論

肺の主な組織反応は DAD であり、これが患者を死に至らしめた急性呼吸不全の主因であると考えられた。

#### G. 研究発表

1. 論文発表：準備中
2. 学会発表：なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許：なし
2. 実用新案登録：ヴェトナム国立小児病院、バクマイ病院、DCC、関東中央病院病理科を結ぶ電話回線を用いた、顕微鏡組織像転送を含む遠隔医学会議システムの構築。

高病原性鳥インフルエンザによる発症機序に関する研究

分担研究者	松下育美	国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部
	慶長直人	国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部
	土方美奈子	国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部
	櫻田紳策	国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部
主任研究者	工藤宏一郎	国立国際医療センター

研究要旨

ウイルス感染の最初期のレセプターを介した標的細胞への吸着の段階に注目し、高病原性鳥インフルエンザヒト感染の発症機序を解析するため、 $\alpha$ 2-6 結合型シアル酸 (SA2-6Gal: Sialic acid  $\alpha$ 2-6Gal)、 $\alpha$ 2-3 結合型シアル酸 (SA2-3Gal: Sialic acid  $\alpha$ 2-3Gal) の in vitro における lectin 定量系を確立した。今後のヒト気管支上皮細胞を用いた培養実験において、このような方法論により、インフルエンザレセプターの発現局在、分化、炎症の場における発現制御機構を検討し、宿主側のレセプターの立場から、鳥インフルエンザヒト発症機構の一端を解明したい。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは、オクソミクソウイルス科に属する RNA ウイルスで、特に A 型インフルエンザウイルスは、病原性も高く、これまで、1918 年のスペイン型、1968 年の香港型、1977 年のソ連型インフルエンザのような大流行を引き起こしてきた。今後、再び、抗原性の異なるヒト新型インフルエンザが出現すると、既存の免疫を持たないために、重症で且つ世界的大流行を引き起こすことが懸念されている。鳥インフルエンザに関しては、1997 年香港で、高病原性トリインフルエンザが直接ヒトへ感染、18 人の感染者の内 6 人が死亡するという事例にはじまり、以降 2003 年のオランダ、2003-4 年の東南アジア、中国での高病原性トリインフルエンザの流行、感染及び死亡例と続き、新型インフルエンザの出現の可能性が、今までになく高まっている。

A 型インフルエンザウイルスは、その表面に 2 種類のスパイク糖蛋白質が存在する。赤血球凝集素であるヘマグルチニン (HA: hemagglutinin) 及びノイラミニダーゼ (NA: neuraminidase) であり、それぞれ 3 量体、4 量体でスパイクを形成している。抗原性の相違から、HA は 15 の亜型 (H1-15)、NA は 9 の亜型 (N1-N9) に分類されている。

インフルエンザウイルスは細胞表面の糖蛋白や糖脂質の糖鎖の末端に存在するシアル酸を受容体として認識し吸着する。トリインフルエンザウイルスの HA が認識するレセプターは、シアル酸と隣のガラクトースとの結合様式が  $\alpha$ 2-3 結合

のシアル酸であるのに対し、ヒトインフルエンザウイルスは  $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸をレセプターとして認識して吸着する。

ヒトの気道上皮には主に  $\alpha$ 2-6 結合型シアル酸 (SA2-6Gal: Sialic acid  $\alpha$ 2-6Gal)、トリの腸管上皮には、 $\alpha$ 2-3 結合型シアル酸 (SA2-3Gal: Sialic acid  $\alpha$ 2-3Gal) が存在する。ブタの気道上皮には SA2-6Gal、SA2-3Gal 双方のシアル酸が存在するため、ヒトとトリの両インフルエンザが感染することができるとされている。1997 年香港での H5N1 型高病原性トリインフルエンザウイルスのヒトへの感染例をはじめ、それ以降アジア諸国で見られた感染例では、トリインフルエンザウイルス HA の変異が起こっていないが、どのような機序でヒトに感染をきたしたのか注目されている。ヒト気道上皮では圧倒的に SA2-6Gal の発現量が多いが、最近、ヒトの呼吸器上皮細胞の局在の性質のちがいで SA2-3Gal が存在し、トリインフルエンザウイルスが感染しうるとの報告がみられるが、ヒトへの易感染性の違いは、この SA2-6Gal 及び SA2-3Gal の発現量の個人差に起因している可能性もあるため、これらのレセプターの発現制御、局在、及び定量を検討するための系を構築した。

B. 研究方法

① lectin 染色

ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B をスライド上に培養、digoxigenin (DIG) glycan differentiation kit (Boehringer, Mannheim, Germany) を用い、



免疫染色の条件を検討した。抗体は、SA2-6Gal を特異的に認識する SNA (Sambucus nigra agglutinin) 及び SA2-3Gal を認識する MAA (Maackia amurensis agglutinin) を用いた。ネガティブコントロールには、シアリダーゼで消化した細胞を用いた。免疫染色の条件としては、細胞の固定法、抗体濃度、シアリダーゼ処理条件については、シアリダーゼ濃度及び至適 buffer を検討した。

### ② lectin 定量

ヒト気道上皮細胞上での SA2-6Gal 及び SA2-3Gal の定量を行うため、上記 lectin 染色を応用した定量系を構築した。

マイクロタイタープレートにヒト気道上皮細胞株 BEAS2B 若しくはマウス繊維芽細胞株 L929 を培養、4% PFA 固定後、digoxigenin(DIG) glycan differentiation kit (Boehringer, Mannheim, Germany)を用い、1次抗体 MAA を結合させた。上記免疫染色では、検出系に NBT/X-phosphate を用いたが、今回、ELISA を用いた定量を行う目的で、基質を可溶性の pNPP を用い、発色はプレートリーダーにて波長 405nm での吸光度を測定することによって行った。パラメータとして、シアリダーゼ濃度を 0, 0.004, 0.02, 0.1 及び 0.5% の 5 段階で細胞を消化して、その濃度勾配に対する結合能をモニタリング測定することとした。

### ③ 刺激実験

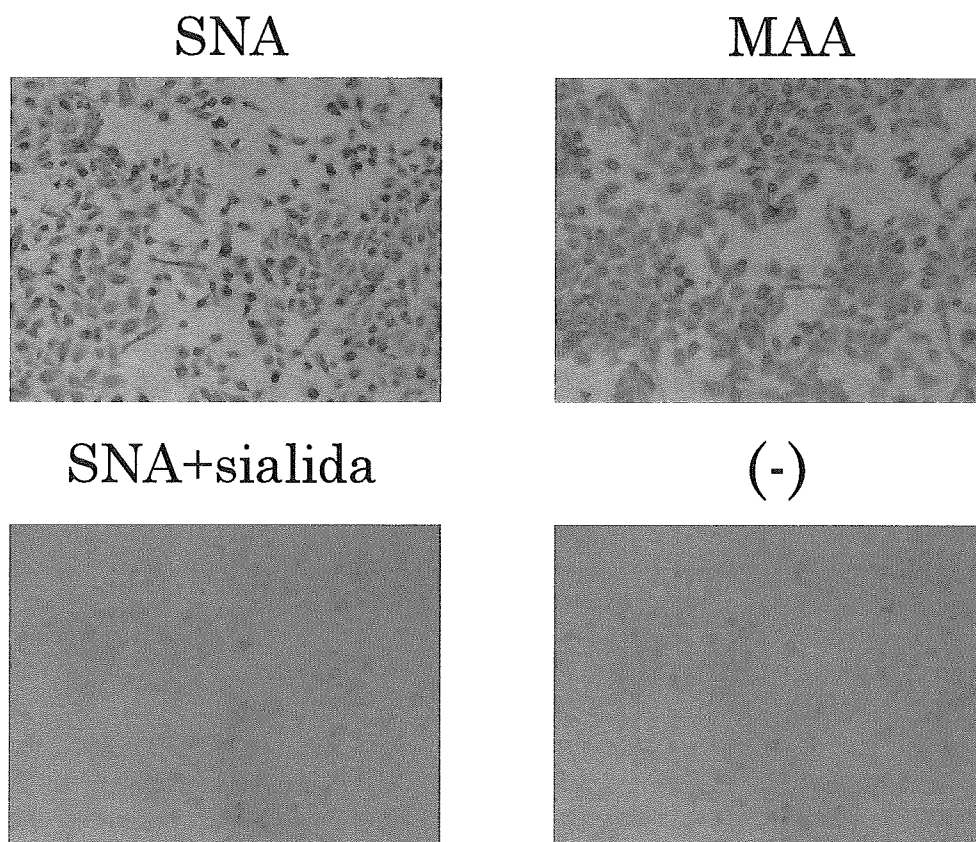
LPS、サイトカインなどの刺激により、SNA 及び MAA の局在、発現量に差異が生じるのかを比較検討するために、ヒト気道上皮ムチン産生細胞株 NCI-H292 を用い、種々の刺激条件下で培養、予備実験を行った。NCI-H292 を 6 穴プレート ( $5 \times 10^5$  cells/well) で培養し、90% confluent で IFN- $\gamma$  (0.1ng/ml, 10ng/ml), IFN- $\beta$  (100U/ml, 1000U/ml), TNF- $\alpha$  (0.1ng/ml, 50ng/ml), 好中球エラスターゼ ( $10^{-8}$ M,  $10^{-6}$ M), Lipopolysaccharide(LPS) (1 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml), Interleukin-13(IL-13) (1ng/ml, 200ng/ml), Poly I:C (10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml) の刺激を加え、24, 48 時間後に細胞を回収、サイトスピンを作製した。細胞をアセトン固定、上記の方法を用い、SNA 及び MAA の免疫染色を行った。本検討では、個人情報に伴うヒト検体を用いた解析は行っていない。

## C. 研究結果

### ① lectin 染色

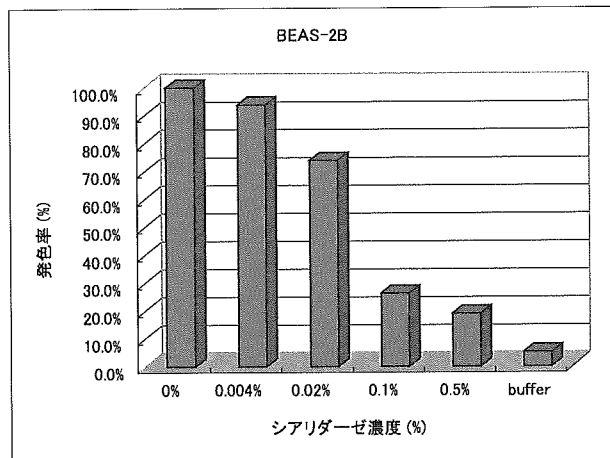
固定法は、4%パラホルムアルデヒド(PFA)及びアセトンのどちらでも可能であった。抗体濃度は、SNA : 1/1000、MAA : 1/200 で行うこととした。

sialidase 消化は、0.5% sialidase/20mM HEPES (pH7.0)、37°C over night の条件下で、十分な消化効果が得られた。結果を下記に示す。



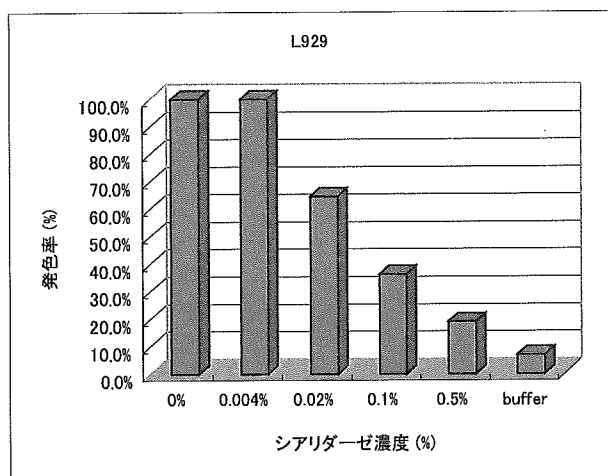
## ② lectin 定量

シアリダーゼの濃度依存的に、lectin の結合能は低下することが、今回行った定量法によって、下記の通りモニタリングすることができた。よって、本法を用いることにより、SNA, MAA の定量が可能であると思われる。



## ③ 刺激実験

現在までのところ、ヒト気道上皮ムチン産生細



胞株 NCI-H292 においては、LPS、サイトカインなどの刺激により、SNA 及び MAA の局在、発現量に差異は生じなかった。

## D. 考察

ウイルス感染の発症機序を考える上で、宿主側のウイルス受容体は、重要な因子であると考えられる。宿主側の糖鎖末端のシアリ酸の多様性は、ヒトへの易感染性の違いに何らかの影響を与えている可能性があり、また、最近、ヒトの呼吸器に SA2-3Gal が存在し、トリインフルエンザウイルスが感染しうるとの報告もあることから、この SA2-6Gal 及び SA2-3Gal の発現量の個人差などを

詳細に解析することが、感染の発症機序を考える上で重要であると思われる。

インフルエンザ宿主側レセプターを検討する目的では、古典的な lectin 染色が行われているが、繊細な手技であるため、標準化されておらず、また主要研究施設からもプロトコールも公開されていない場合が多く、研究の進展を妨げている。このような背景下でわれわれは、今後のヒト気管支上皮細胞を用いた培養実験において、インフルエンザレセプターの発現局在、分化、炎症の場における発現制御機構を検討するべく、lectin 定量を行うための系を確立した。このような方法論により、宿主側のレセプターの立場から、鳥インフルエンザヒト発症機構の一端が解明されることを期待している。

## E. 結論

インフルエンザ宿主側レセプターの局在、定量のための系を構築し、予備的検討を行った。lectin 染色を利用することにより、次年度以降、レセプターの発現局在、分化、炎症の場における発現制御機構を検討する予定である。

## 参考文献

Dimitrov DS. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:109- 122.

Smith and Helenius. How Viruses Enter Animal Cells. *Science* 9 April 2004: 237-242

Gagneux P, Cheriyan M, Hurtado-Ziola N, van der Linden EC, Anderson D, McClure H, Varki A, Varki NM. Human-specific regulation of alpha 2-6-linked sialic acids. *J Biol Chem.* 2003 Nov 28;278(48):48245-50. Epub 2003 Sep 18.

Feldmann A, Schafer MK, Garten W, Klenk HD. Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34 (H7N1) in chicken embryos. *J Virol.* 2000 Sep;74(17):8018-27.

Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature.* 2006 Mar 23;440(7083):435-6.

## 鳥インフルエンザ重症化機構に関する研究

（分担）研究者 反町 典子 国立国際医療センター（研究所）室長

研究要旨：本研究は、鳥インフルエンザに対する宿主の免疫応答を解析し、高病原性の要因となる宿主の免疫制御機構を明らかにすることにより、新たな創薬のターゲットを見出すことを目的とし、鳥インフルエンザの重症度と強い相関がある炎症性サイトカインやケモカインの昂進、好中球の浸潤機構の解析を行った。本年度は、①好中球の炎症部位への浸潤に新しい制御機構が存在することを見出し、②マクロファージおよび樹状細胞のインフルエンザウイルスに対する応答解析の実験系樹立の準備を行った。

### A. 研究目的

鳥インフルエンザのワクチンの改良・開発、治療薬の開発、感染拡大の予防は、鳥インフルエンザウイルスに対する宿主免疫応答の特性を理解し、重症化における病因の本質を理解することが必須である。本研究は、鳥インフルエンザに対する宿主の免疫応答を解析し、高病原性の要因となる宿主の免疫制御機構を明らかにすることにより、新たな創薬のターゲットを見出すことを目的とする。感染に伴う炎症性サイトカインやケモカインの産生昂進、好中球浸潤機構を明確にし、創薬の標的とする機能分子を同定することを目的として行った。

### B. 研究方法

好中球遊走実験；ケモタキセル（3 μm）を用いて、マウス骨髄より比重遠心法によって調整した好中球を用いてKCおよびfMLPに対する細胞遊走能を定量した。またin vivo炎症モデルとして空気嚢胞を用いた好中球遊走実験を用いた。

遺伝子発現用プラスミドの構築および遺伝子導入の条件検討；GFPをレポーター遺伝子として、リポフェクション、電気穿孔法等の方法を用いてマクロファージおよび樹状細胞株への遺伝子導入法を検討した。

### C. 研究結果

1. 炎症早期における好中球浸潤の分子機構の解析；私たちが近年作製した好中球機能昂進のモデルマウスにおいて、好中球の炎症性ケモカインに対する遊走能が昂進していることを見出した。このマウスは、MHCクラスIを認識する抑制性レセプターを強発現するマウスであり、このマウスを用いて好中球の炎症部位への遊走機構を解析した。その結果、TLR9を介する刺激または細菌感染によって炎症部位

へ好中球やマクロファージの遊走が昂進することが明らかとなった。このマウスでは、好中球およびマクロファージのβ2インテグリンの機能が抑制性レセプターによって制御されていること、この抑制性レセプターは好中球、マクロファージなどの炎症性細胞に優先して発現し、炎症性サイトカインおよびI型インターフェロンで発現が誘導されることから、感染炎症時には定常状態と異なるβ2インテグリンの制御機構が存在し、炎症性細胞の細胞動員を制御している可能性が示唆された。現在ヒトの抑制性レセプターのホモログを検索している。

2. マクロファージおよび樹状細胞のウイルス応答を解析するための実験系の構築；GFPレポーター遺伝子を用いて、マクロファージ、樹状細胞への効率のよい遺伝子導入法を検討し、マクロファージ細胞株については導入条件を決定した。樹状細胞株および骨髄由来初代培養細胞に関しては、さらに条件検討を進めている。

### D. 考察および結論

好中球の炎症巣への遊走を制御する新規分子機構の解明から、進行性呼吸器感染症に認められる肺への好中球浸潤の制御に有用な知見と治療標的の候補分子が得られることが期待される。

### G. 研究発表

1. Toyama-Sorimachi, N., Omatsu, Y., Onoda, A., Tsujimura, Y., Iyoda, T., Kikuchi-Maki, A., Sorimachi, H., Dohi, T., Taki, S., Inaba, K., Karasuyama, H.: Inhibitory NK receptor Ly49Q is expressed on subsets of dendritic cells in a cellular maturation- and cytokine stimulation-dependent manner. *J. Immunol.* 174: 4621-4629, 2005