

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

SARSの感染・発症・重症化の分子機構

平成18年度 総括・分担研究報告書

平成19（2007）年3月

主任研究者

笹 月 健 彦

目次

I. 総括研究報告書

SARS の感染・発症・重症化の分子機構 1

笹月 健彦

II. 分担研究報告

1. 抗原提示細胞における SARS RNA による炎症性サイトカインおよびNKG2D リガンド
の発現誘導 5

小笠原 康悦 他

2. ベトナムにおける SARS 回復者の臨床所見に関する後ろ向き調査 11

慶長 直人 他

3. ベトナムにおける HLA クラス I、クラス II 遺伝子の対立遺伝子型分布 21

慶長 直人 他

4. 重症急性呼吸器症候群 (SARS) 重症化に関連する MxA 遺伝子プロモーター領域の一塩基
多型と気管支上皮細胞における MxA mRNA 発現量の解析 29

濱野 栄美 他

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 35

I. 総括研究報告書

SARS の感染・発症・重症化の分子機構

主任研究者

笹月健彦 国立国際医療センター

研究要旨

2003 年の SARS アウトブレイクの際に、WHO によるグローバルアラートの最初のきっかけとなった、ベトナム国立バクマイ病院、フレンチ病院、ベトナム国立衛生疫学研究所との共同研究により、合計 150 人近い患者・接触者の参加協力を得、疫学情報、血液試料を得たが、平成 16 年度、17 年度と、これらの試料を用いて、SARS の感染・発症・重症化に関連する分子を同定するための分子遺伝学的研究を実施してきた。SARS の重症化に関連する候補遺伝子として、これまで検討した遺伝子は、ACE、ACE2、MxA、HLA-A、B、C、DRB1、DQB1、LSIGN、MBL、SP-B である。平成 18 年度は、この間に現地で集積された臨床データを解析し、主に、SARS 回復者のカルテ、アンケート用紙から集計された臨床情報に、患者構成、症状、所見、治療に関するデータを再抽出し、中高年の女性医療従事者で、上気道症状を伴わない、リンパ球数の低下の所見を確認した。また、SARS と関連する HLA アリルについては、ベトナム人一般集団の HLA-A、B、C、DRB1、DQB1 遺伝子に関して詳細に検討し、SARS 患者で高率に見られた DRB1*1202 が、DQB1*0301 とハプロタイプを組み、ベトナム人一般集団で高頻度であることを明らかにした。さらに疾患感受性に関連する宿主要因としては、I 型インターフェロン (IFN) 誘導性抗ウイルス蛋白のひとつであり、SARS 重症化と関連を示した、MxA 遺伝子プロモーター領域の一塩基多型 (SNP) -88G/T が、SARS ウイルス複製の場であるヒト気管支上皮細胞においてその mRNA 発現量と関連することを明らかにした。マウスモデルでは、SARS ウイルス由来の RNA には、TNF など炎症性サイトカインの分泌を促進し、NKG2D レセプターリガンドをマウス樹状細胞に誘導する GU に富む領域が見いだされ、重症化機序を考える上で、参考になるものと思われた。

A. 研究目的

2003 年以降、SARS は、実験室レベルの過誤を除き、自然発生していないが、近年、これまでになく、新型インフルエンザを中心とした、新興呼吸器ウイルス感染症のパンデミックの恐れが強まっており、近い将来、重篤な新興感染症がわが国に侵入する事態に備える必要がある。SARS は高齢者では、致死率が 50%を超えており、小児が軽症であるという特徴を有し、この機序は全く解明されていない。また台湾から報告された HLA のタイプによって重症化しやすいという仮説、また SARS レセプターとして同定された ACE2 の遺伝子変異によって、ウイ

ルスの感染を受けにくい場合が存在するのかどうかといった点は、これらの候補遺伝子の変異検索と、症例対照関連解析によって明らかになるものと予想される。

SARS の感染、発症の阻止には免疫系の果たす役割が大きいと考えられる。一般的にウイルス感染の防御には、初期感染時、自然免疫系が効率よく働くことが必須である。これらの点を踏まえて、分子遺伝学的、免疫学的な検討を行い、SARS の感染・発症・重症化の分子機構を明らかにすることを目的に検討を行った。

B. 研究方法

2003年のSARSの世界的流行時に、ベトナムにおいてWHOによる当時の認定基準によってSARSと診断された症例は62例であり、そのうち死亡した5例とベトナム人ではない3例を除いた54例のうち、書面による同意を得られた44例が本研究に参加した。SARS患者との接触があったと考えられるがSARSを発症しなかった病院スタッフ103例を接触非発症者として登録した。さらに、SARS患者との接触が全くなかったと考えられる50例も対象とした。全ての対象者からEDTA加末梢血を採取し、凍結、輸送し、血球からゲノムDNAを抽出し、多型解析を行った。

臨床情報については、カルテ、質問表等により、情報を得た。データ解析は、SPSS13.0を用いて、基準統計と、分散分析、カイ二乗分析を行った。

MxA遺伝子多型の機能解析のため、切除気管支残余部分より単離培養された気管支上皮細胞を培養に用いた。

また、SARS全塩基配列より、GU richの領域を選び出し、マウスの系で、TNFの産生、NKG2Dリガンドの発現を定量した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト検体を用いた遺伝子解析に関しては、いずれも三省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した当センターの遺伝子解析に係わる倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1) ベトナムにおけるSARS回復者の臨床所見に関する後ろ向き調査

SARSに関わる臨床疫学研究、WHOの診断基準に基づいた44名のSARS発症者の画像、呼吸機能検査を含む後遺症に関する追跡調査と、103名の濃厚接触非発症者を含む147名について、現地で得られた臨床データを解析し、主に、SARS

ウイルス感染者の臨床疫学情報を記述的に整理して、今後のために報告した。

2) ベトナムにおけるHLAクラスI、クラスII遺伝子の対立遺伝子型およびハプロタイプ分布

ベトナム人集団のHLAクラスI、クラスII遺伝子の対立遺伝子およびハプロタイプ頻度を解析した。クラスI遺伝子により構成されるハプロタイプでは、A*1101-B*1502-Cw*0801が最も高頻度で推定され、それに続いてA*3303-B*5801-Cw*0302とA*0207-B*4601-Cw*0102が比較的高頻度で見られた。上記3種のハプロタイプは中国南部で高頻度に見られるものであったが、A*2901-B*0705-Cw*1501は、ベトナム人集団で特徴的であった。一方、クラスII遺伝子により構成されるハプロタイプでは、DRB1*1202-DQB1*0301が全ハプロタイプ中の1/3を占め、インドネシアに見られるジャワ人との近縁性が示唆された。

3) MxA遺伝子プロモーター領域の一塩基多型と気管支上皮細胞における発現量の関連

これまでベトナム人SARS患者では重症者にMxA遺伝子プロモーター領域の一塩基多型(SNP) -88G/TのGG genotype、Gアリルを持つものが多く見られることを報告してきた。SARSコロナウイルス(SARS-CoV)の主な複製の場と考えられている気管支上皮細胞を用い、MxA -88G/T SNPとMxA mRNA発現量の関係を検討した。定量的RT/PCR法でMxA mRNA発現量を比較したところ、非刺激状態ではMxAの相対発現比は-88GG genotypeの群に比して、-88GT/TT genotypeの群で有意に高かった(p=0.0164)。

4) 抗原提示細胞におけるSARS RNAによる炎症性サイトカインおよびNKG2Dリガンドの発現誘導

細菌感染、ウイルス感染、真菌感染などにおいて、マクロファージや樹状細胞は、Toll-like receptor (TLR) familyを用いて、それら病

原体を認識していることが知られている。SARS ウイルスは RNA ウイルスであり、SARS RNA の刺激によって、マクロファージや樹状細胞が多量の炎症性サイトカイン TNF- α を発現誘導することが明らかとなった。さらに、NK 活性化レセプター NKG2D のリガンドである RAE-1 も SARS RNA によって樹状細胞上に発現誘導された。

D. 考案

ベトナムの全 SARS 症例のうち、87%は医療スタッフまたは入院患者かその病院を訪れたケースであった。ベトナムの症例は同一ウイルス株に感染したと考えられ、またウイルスの曝露状況も似ており、発症や重症化に与える病原体側の要素はかなり均一であると思われるが、これまでこのことを客観的に示す報告がなされていなかったため、本研究班の最終年度に、ベトナムの研究者と共同で、これまで集積された臨床疫学データの総括を行った。対照となった SARS44 例については、医療関係者、それも労働年齢の看護師を初めとする女性スタッフが主であり、A 病院に入院した SARS 患者より感染したものと推測された。B 病院では、一例も院内感染が生じなかった。このように一病院の院内感染という均一な環境下で、比較的そろった背景の患者集団であったことは、SARS の重症化に関するパラメータの解析に有利な点であった。

初発症状は、これまでも報告されているように、発熱、倦怠感などの全身症状で、鼻汁や咽頭痛などの上気道症状は比較的少なかった。重症者には、高齢者がみられたが、統計的な有意差は得られなかった。軽症者と中等症+重症者の間で、極期のリンパ球数、CPK、AST、ALT との間には統計的な有意差が認められ、特にリンパ球数の減少は重症例で顕著であり、重症化のよいマーカーと考えられた。CPK も重症例で軽症例の 7 倍ほど高く、マーカーとして有用と考えられた。胸部 X 線上、初診時の肺病変の局在

と重症化とは関係がなかった。

治療は一般抗生剤、抗ウイルス剤、ステロイドを中心に施行された。細菌性の二次感染の防止、抗生物質の抗炎症作用や免疫調節作用などを考えると、重症度と一部の抗生剤との間に関連が認められるかもしれないが、抗生剤の使用に係る要因は複雑であり、使用期間と複数の抗生剤の使用状況を勘案したさらに詳細な解析が必要と思われた。ステロイドは重症例に、抗ウイルス剤は、軽症例に多く使用されたが、この点についても、聞き取り調査など、さらなる検討が必要と思われた。

一般ベトナム人集団の HLA 遺伝子型頻度の検討の結果、クラス I 抗原は、南方中国に比較的近い分布をしており、多様性を有し、クラス II 遺伝子により構成されるハプロタイプでは、DRB1*1202-DQB1*0301 が全ハプロタイプ中の 1/3 を占め、インドネシアに見られるジャワ人との近縁性が示唆され、この間に、クラス I 抗原とクラス II 抗原の組み換えが頻繁に起こり、ベトナム人集団の独自性が形成されていったものと推測される。最近の技術的進歩により、クラス II 遺伝子座、次いで、クラス I 遺伝子座の遺伝子タイピングが可能になり、今後、新興感染症における疾患感受性遺伝子研究に有用な基礎データを得ることができた。

我々は SARS-CoV 感染・SARS 発症・重症化に関連する宿主要因として、ウイルス感染の初期に重要な役割を果たす自然免疫系分子に注目してきた。ウイルス感染に対し、I 型インターフェロン (IFN) が感染初期から誘導され、IFN は OAS1, PKR, MxA など細胞内抗ウイルス蛋白の産生を誘導する。国際共同研究によるベトナム人検体を用いた関連解析の結果、MxA 遺伝子プロモーター領域 -88G/T が SARS 重症化と関連していることをすでに報告した。本年度、SARS ウイルス複製の場である、ヒト気道上皮細胞において、この MxA -88G/T 遺伝子多型が MxA mRNA の発現量と関連することを明らかにした。

SARS RNA の刺激によって、マクロファージや

樹状細胞が多量の炎症性サイトカイン TNF-alpha を発現誘導することが明らかとなった。さらに、NK 活性化レセプター NKG2D のリガンドである RAE-1 も SARS RNA によって樹状細胞上に発現誘導された。このことは、SARS ウイルス感染時において、マクロファージが産生する多量の TNF-alpha が患者の炎症を増悪させている可能性がある。

E. 結論

数度のベトナム訪問を通じて、合計 150 人近い患者・接触者の参加協力を得、疫学情報、血液試料を得ることができた。この試料を用いて、SARS の感染・発症・重症化に関連する分子を同定するための、分子遺伝学的研究を実施してきた。SARS の重症化に関連する候補遺伝子として、血管内皮傷害に関連の深い ACE 遺伝子、インターフェロンにより誘導されて抗ウイルス作用を発揮する Mx の遺伝子変異が SARS との関連を示し、それらの遺伝子変異は機能的意義を有することを実験的に明らかにすることができた。HLA 関連研究のための一般ベトナム人集団のアリル、ハプロタイプ頻度のデータは、今後、新興感染症と HLA との関連を明らかにする上で、有用と思われた。総じて、これらの知見は、SARS に限らず、新興呼吸器ウイルス感染症のヒト肺における抗ウイルス応答を考える上で重要なものと考えられる。

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

研究課題：SARS の感染、発症、重症化の分子機構

抗原提示細胞における SARS RNA による炎症性サイトカイン
および NKG2D リガンドの発現誘導
SARS RNA induces inflammatory cytokines
and NKG2D ligands in antigen presenting cells

分担研究者 小笠原康悦 国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部臨床免疫研究室
協力研究者 浦野奈央子 国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部臨床免疫研究室
代表研究者 笹月健彦 国立国際医療センター

研究要旨

マクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞は、感染における自然免疫系に重要な役割を担っている。細菌感染、ウイルス感染、真菌感染などにおいて、マクロファージや樹状細胞は、Toll-like receptor (TLR) family を用いて、それら病原体を認識していることが知られている。SARS ウイルスは RNA ウイルスであり、細胞内で増殖することが知られている。我々は、SARS RNA の刺激によって、マクロファージや樹状細胞が多量の炎症性サイトカイン TNF- α を発現誘導することが明らかとなった。さらに、NK 活性化レセプター NKG2D のリガンドである RAE-1 も SARS RNA によって樹状細胞上に発現誘導された。このことは、SARS ウイルス感染時において、マクロファージが産生する多量の TNF- α が患者の炎症を増悪させている可能性がある。

Antigen presenting cells (APC) such as Macrophages and Dendritic cells which are poised to alert the innate immune systems to infection. Macrophages and Dendritic cells recognize the presence of infection using the Toll-like receptor (TLR) family of proteins that detect a variety of ligands on bacterial, viral and fungal pathogens. SARS virus is a RNA virus that proliferate in infected cells. APCs activated with pathogen products known to signal through TLRs express ligands. We found that SARS RNA stimulation induces a large amount of TNF- α in macrophages and dendritic cells. Furthermore, RAE-1 which is a ligand of NK activating receptor NKG2D is also induced by SARS RNA in APCs. These results suggest that TNF- α which is produced by SARS infected APCs induce severe inflammation in patients.

A. 研究目的

ウイルス感染防御には免疫系が深く関与していることが知られ、SARS ウイルスの感染、発症の阻止にも免疫系の関与が推測される。一般的にウイルス感染の防御には、自然免疫系が効率よく働くことが必須である。マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞は、自然免疫系で重要な役割を果たしており、ウイルス感染細胞の除去、獲得免疫系の活性化に重要である。しかしながらその分子機構はよくわかっていない。我々は、SARS 感染の重症化機構を解明する目的で、SARS 感染において、抗原提示細胞の果たす役割を解明するため研究を行ってきた。マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞は、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染などにおいて、Toll-like receptor (TLR) family を用いて、それら病原体を認識していることが知られている(1)。昨年我々は、ウイルス感染類似のモデルとして SARS RNA を用いて実験系を構築し、マクロファージ細胞株におけるサイトカインの発現を検討したところ、炎症性サイトカインである TNF-alpha の発現を認めた。本年度は、抗原提示細胞である樹状細胞をマウスより単離し、実際の感染により近い状況での SARS RNA による免疫応答を検討した。

B. 方法

1) SARS ウイルス感染類似のモデル

抗原提示細胞はウイルスの認識には TLR を用いていると考えられ、RNA ウイルスの GU 配列を認識していることが報告されている。我々は SARS RNA の配列の中で GU rich の領域を選び出し、20塩基を単位として oligo SARS RNA を合成した。oligo SARS RNA の SARS ウイルスの sequence position は表 1 に示す。また、positive control として、HIV ウイルス RNA 配列 (RNA40) :

5'-GCCCCGUCUGUUGUGUGACUC-3' (2)および、R837: Imiquimod (invivogen)を、negative

control として HIV ウイルス RNA 配列

(RNA41) :

5'-GCCCCGACAGAAGAGAGACAC-3' (2)を用いた。

マウスマクロファージ cell line である RAW 細胞およびマウス骨髄より樹状細胞を単離しこれらを抗原提示細胞として実験に供した。さらに、SARS 感染モデルとして、oligo SARS RNA (7.5 ug/ml) を遺伝子導入試薬 DOTAP (45 ug/ml) (Roche)を用いて細胞内へ導入した。oligo SARS RNA を導入して16時間後に培養上清を回収し、TNF-alpha の産生を ELISA (Pharmingen)により検出するとともに、NK 活性化レセプター、NKG2D のリガンドである Retinoic Acid Early transcript-1 の発現をフローサイトメトリーにて検出した。

2) マウス樹状細胞の単離

抗原提示細胞としてマウス樹状細胞を実験に供するため、マウス骨髄より樹状細胞を単離した。マウスは C57BL/6 マウスを用い、骨髄を摘出、200ゲージのナイロンメッシュにて骨髄から血球をとりだした。血球から赤血球を塩化アンモニウム溶液を用いて溶血し単核球とした。これら細胞を GM-CSF にて培養し、樹状細胞に分化誘導して実験に供した。

Sample number	sequence position	region	GU%
1	1474~1493	replicase 1AB	90%
2	11451~11470	replicase 1AB	90%
3	11453~11472	replicase 1AB	90%
4	11454~11473	replicase 1AB	90%
5	11455~11474	replicase 1AB	90%
6	11456~11475	replicase 1AB	90%
7	11457~11476	replicase 1AB	90%
8	14363~14382	replicase 1AB	90%
9	19088~19107	replicase 1AB	95%
10	19091~19110	replicase 1AB	95%
11	21772~21791	spike	95%
		glycoprotein	
12	23810~23829	spike	90%
		glycoprotein	
13	24694~24713	spike	90%
		glycoprotein	
14	24699~24718	spike	90%
		glycoprotein	

表 1 合成 oligo RNA の SARS ウイルス sequence position

C. 結果

1) マウス樹状細胞の CD11c の発現

マウス樹状細胞の前駆細胞を骨髄より採取し、GM-CSF で培養した後の CD11c の発現を示す (図 1)。CD11c を発現している細胞集団を確認できた。

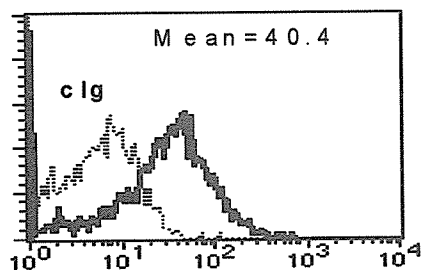


図 1. CD11c 発現細胞

2) oligo SARS RNA を用いた SARS 感染モデルにおけるサイトカイン産生
 in vitro での SARS 感染モデル利用し表 1 で示す oligo RNA を合成し、分化させた樹状細胞に oligo RNA を細胞内へ導入してウイルスが細胞内に侵入している状況を作り出した。oligo RNA を細胞内へ導入して、16 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法により TNF-alpha の産生を検出した。oligo RNA を加えないものでは (None)、TNF-alpha の産生はほとんど認められず、positive control (p. c) あるいは、R837 では TNF-alpha が多量に産生されることが観察され、実験系が確立していることが確認された (図 2)。また、SARS oligo RNA は、全て TNF-alpha の産生を誘導し、産生量も R837 や positive control の oligo RNA をしのぐほど多量であった。これら結果は、昨年 RAW 細胞を用いた実験結果とほぼ同じ傾向であった。特に RNA 2 番、9 番が高くこれらは複製酵素 replicase1AB からの配列であった。

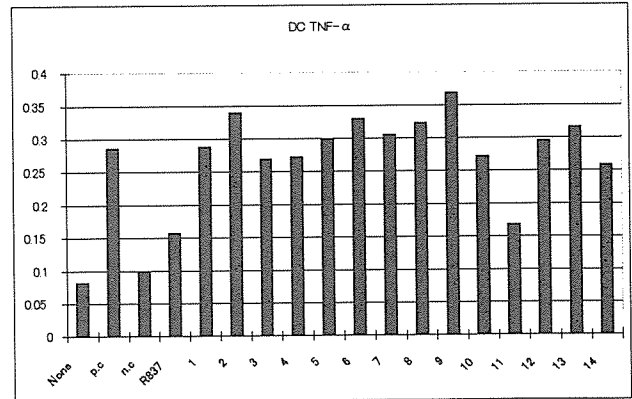


図 2 樹状細胞における TNF-alpha の産生 (単位 ng/ml)

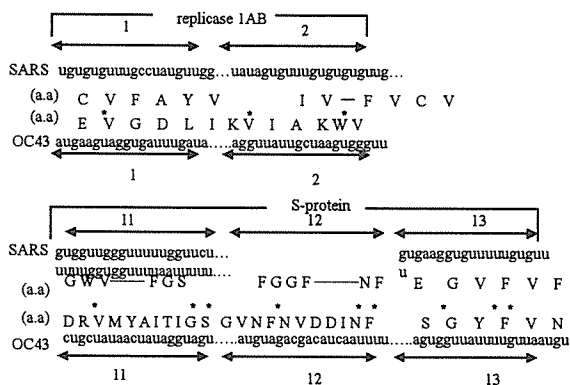


図3 SARS GU rich 配列に対応する OC43 の配列

アミノ酸配列をもとにアライメントし OC43 RNA 配列を決定した。

3) SARS RNA と OC43 RNA とのサイトカイン産生の比較

SARS-CoV と同属の CoV である OC43 は、感染しても SARS のように重篤な症状にはならない。SARS の重症化の 1 つにサイトカインの過剰産生であると仮定すると OC43RNA では、TNF の産生が SARS と比べて低いはずである。我々はこの仮説をもとに SARS GU rich 配列に相当する OC43 の配列をアミノ酸配列をもとにアライメントし決定した (図 3)。この配列から oligo RNA を合成し、SARS oligo RNA と OC43 oligo RNA によるサイトカイン産生能を比較した。図 4 のように SARS 由来 RNA は OC43 由来 RNA と比較し、全てのサンプルにおいて TNF 誘導能が高く、SARS 由来 RNA による炎症性サイトカインの過剰産生が SARS の重症化の一因になっていることが判明した。

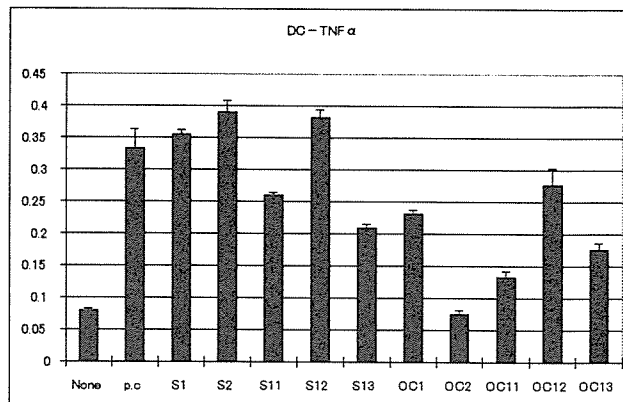


図4 SARS RNA と OC43 RNA による TNF 産生能の比較

4) SARS RNA による NKG2D リガンドの発現 NK 細胞はウイルス感染細胞の排除を担っており、生体防御の最前線で働いている。NK 細胞の活性化レセプターである NKG2D はウイルス感染細胞の認識に重要である

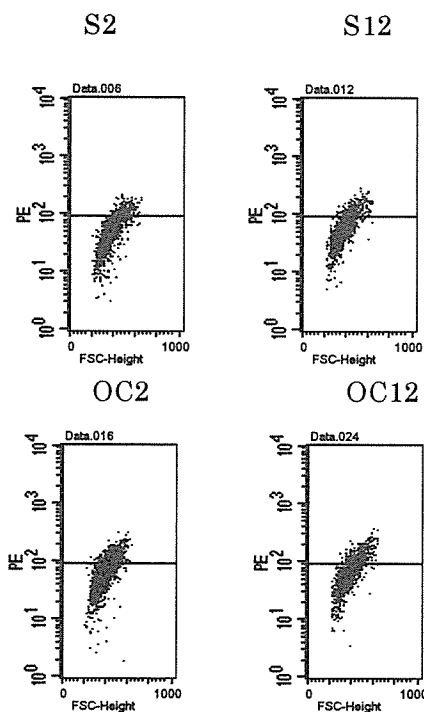


図5 SARS RNA および OC43 RNA による NKG2D リガンド (RAE-1) の発現誘導 代表的なサンプル (SARS RNA1, 12, OC43 RNA1, 12) を示す。

これまでの報告で細胞がサイトメガロウイルスに感染すると通常発現の認められない NKG2D リガンドが異常発現し、NK 細胞に異常を知らせることでウイルスの排除がおこなわれ、生体を守ることが明らかとなった。NKG2D リガンドは通常サイレントであり発現は認められない。しかしサイトメガロウイルス感染や熱、がん化などのストレスにより NKG2D リガンドが誘導されることが知られている。

我々は、SARS RNA においても NKG2D リガンドが異常発現するか否かを樹状細胞 (CD11c positive) を用いて検討した。NKG2D リガンドには代表的な RAE-1 の発現を指標にフローサイトメトリーを用いて HcoV-OC43(OC1-12)と比較検討した。図 5 で示すように、SARS RNA (S1-12) においても OC43 RNA (OC1-12) においても RAE-1 が発現するようになった。以上のことより、SARS RNA は NKG2D リガンドの発現を誘導することが判明した。

D. 考察

我々は *in vitro* で RNA ウイルス感染モデルを構築し、SARS ウイルスにおける免疫応答を検討することが可能となった。本実験モデルにおいて SARS ウイルス RNA は、抗原提示細胞であるマクロファージおよび樹状細胞を活性化して、炎症性サイトカインである TNF- α を多量に産生させることが明らかとなった。また、SARS ウイルス RNA は、NK 活性化レセプター NKG2D のリガンドである RAE-1 の発現を誘導することが判明した。このことは、NK 細胞にウイルス感染細胞であることを知らせる働きがあると考えられ、効果的に NK 細胞により感染細胞が排除される機構の 1 つと考えられた。しかしながら、抗原提示細胞があまりに速やかに排除されてしまうと、感染の後におこるべき免疫反応の進行をも妨げるおそれがあり、SARS が重症化してしまう可能性が考えられた。

これらの結果から、SARS RNA は、Toll like

receptor を関してシグナルを伝え、TNF- α の産生を誘導している可能性、および RAE-1 を誘導している可能性が示唆された。

以上の結果は、SARS ウイルス感染時、生体防御機構が働いて抗原提示細胞が SARS ウイルスを取り込んだ際に多量の炎症性サイトカインを放出することが、過剰な免疫反応、炎症を誘導して、病態を悪化させている可能性が考えられた。また、NKG2D リガンドの発現誘導は NK 細胞に異常を伝えるという点で効果的に感染細胞が排除される機構の 1 つであると思われる。

E. 結論

本研究において、SARS ウイルス感染モデルを細胞培養系で構築した。本実験モデルにおいて SARS ウイルス RNA は、マクロファージや樹状細胞という抗原提示細胞を活性化して、炎症性サイトカインである TNF- α を多量に産生させること、および NKG2D リガンドの 1 つ RAE-1 を異常発現させることが明らかとなった。本研究から、SARS 感染時に炎症性サイトカインが多量に産生されることで、過剰な炎症、免疫反応が引き起こされ、病態が悪化している可能性が示唆された。

参考文献

1. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.
2. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1526-9.
3. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA.

Science. 2004 Mar 5 ;303(5663):

1529-31.

4. The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus. 2003 ;30 :1399-404

F.研究発表

1.論文発表

1. なし。

ベトナムにおける SARS 回復者の臨床所見に関する後ろ向き調査

分担研究者	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
	Tran Quy	Bach Mai Hospital
	Nguyen Chi Phi	Bach Mai Hospital
	Hoang Thuy Long	National Institute of Hygiene and Epidemiology
	Le Dang Ha	Institute for Clinical Research in Tropical Medicine
	Vo Van Ban	Hanoi-French Hospital
	Nguyen Thi Le Hang	IMCJ-BMH 医学共同研究センター
主任研究者	笹月健彦	国立国際医療センター

研究要旨

SARS に関わる臨床疫学研究、WHO の診断基準に基づいた 44 名の SARS 発症者の画像、呼吸機能検査を含む後遺症に関する追跡調査と、103 名の濃厚接触非発症者を含む 147 名について、現地で得られた臨床データを解析し、主に、SARS ウイルス感染者の臨床疫学情報を記述的に整理して、今後のために報告した。

A. 研究目的

ベトナムは、2003 年初頭に SARS のアウトブレイクを経験した国の 1 つであり、62 名の発症確実例が登録され、5 名が死亡した。発端者は、2003 年 2 月 26 日に A 病院に入院した。そこで医療スタッフ 35 名が院内感染により、発熱、呼吸器症状などで発症した。その後、患者は B 病院に移送され、SARS の受け入れ病院としての機能を果たした。さらに 2 ヶ月あまり後に、全患者が退院し、ベトナムは SARS 制圧の最初の国となった。SARS の臨床データは、SARS を経験した国の多くの研究者によって報告されており 1-3)、ベトナムも例外ではない 4-6)。しかしながら、SARS のアウトブレイクの混乱時にとられた医療記録は必ずしも正確ではなく、事後記録の取り直し等で、不十分なところを補う必要があった。我々は、case record フォームと質問表を準備し、SARS 生還者から直接情報を得ることにより、より正確な記録を得て、解析を実施した。

B. 方法

SARS アウトブレイク半年後、我々は、SARS 回復者の follow up study を実施した。この研究の目的は血液試料の分析と臨床情報の解析に主眼がおかれた。SARS 回復者は、レントゲン、CT、呼吸機能検査などの健康診断が行われた。WHO の症例定義による 62 名の SARS 確実例の中で、5 名が死亡、3 名が外国人であり、残りの 54 名のうち、書面による同意の得られた 45 名が研究に参加した。45 名中 21 名が A 病院に入院、8 名は A 病院に入院後、B 病院へ、残りの 16 名が直接 B 病院に、移送された。カルテ、質問表等により、情報を得た。データ解析は、SPSS13.0 を用いて、基準統計と、分散分析、カイ二乗分析を行った。一例データ不十分のため解析から除外した。

C. 結果

1. 解析集団

平均年齢 39.0±13.3 歳、20 代から 50 代までの年齢層が約 80%を占めた。最年少は 17 歳、最高齢は、76 歳であった (表 1)。男女比は 1:2.4 (表 2)。44 例の確定例のうち、26 例が医療従事者で (表 3)、そのうち 85%は看護師、看護助手などの女性であった (表 4)。一人に結核症、COPD の既往があったが、おおむね皆健康であった (表 5)

2. 症状、所見

SARS 初発症状は、発熱が 84%、頭痛 57%、倦怠感 50%で、咳嗽は、主に乾性咳嗽で、39%、湿性咳嗽はわずかに 5%であった。鼻汁は、9.%にしか見られなかった。また咽頭痛、下痢もそれぞれ 21%、11%程度であった (表 6)。

初発から入院までの期間は、平均 3.7 日で (表 7)、半数以上が発症から 3 日以内に入院していた。入院期間の平均は、20.6 日で、最長 49 日であった (表 8)。

レントゲンは、経過中、平均 8.4 回撮影されていた (表 9)。肺野を右上、中、下肺、左上、中、下肺と分けて、初診時の所見を検討した。10 名の所見が散逸していたが、残りで検討したところ、右下肺から初発した症例が 27%、右下肺を含み、両側に広がっていたものが 32%にみられた。磨りガラス様陰影と記載されたものが 85%を占めた。

3. 検査所見

経過中の極期のリンパ球数は、平均 903 と減少、CPK 値は 229、AST100、ALT94 とそれぞれ上昇していた (表 10)。

4. 治療

ほぼ全例が 2 種類以上の抗生剤を使用していた (表 11)。82%は実に 3 剤以上の抗生剤による治療を受けていた。最も頻繁に使われていたのは、ドキシサイクリンで、ガチフロキサシン、シプロフロキサシンといったフルオロキノロン系がそれに続いた (表 12)。各抗生剤の平均投与日数は、5 から 10 日であった。抗ウイルス剤 (ribabirinn) が 62%に投与され、ステロイド剤が 23%に使用されていた (表 13)。

5. 重症度と各種パラメータの関連

経過中酸素投与が必要でなかった症例を「軽症」、酸素投与が必要であったが人工換気を必要としなかった例を「中等症」、人工呼吸器を必要とした症例を「重症」と分類した (表 14)。この分類により、55%が軽症、36%が中等症、9%が重症とされた。

入院期間は、軽症例で 17.5 日、中等症+重症で 24.4 日であった (表 15)。発症時平均年齢は軽症、37.5 歳、中等症 39.5 歳、重症 50.5 歳であった。4 例の重症例のうち二人が 60 歳以上であった (表 16)。初発から入院までの日数は、軽症例と重症例でそれぞれ、3.7 日、3.1 日、重症例では、6.5 日であった (表 17)。重症例のひとり、B 病院搬送前に、郡病院に受診していたため、入院までの期間が延長した。

初診時のレントゲンの陰影の局在位置は、重症度と関連が見られなかった。初診時の病院の両側肺への広がりは、軽症例で 33.1%、それ以外で 25.1%と変わりなかった (表 18)。

軽症者と中等症+重症者の間で、極期のリンパ球数、CPK、AST、ALT との間には統計的な有意差が認められた (それぞれ、 <0.01 , <0.001 , <0.05 , <0.05) (表 19)。

軽症例で用いられた抗生剤は、ドキシサイクリンが 75%、シプロフルオロキサシン 50%、アモキシリン/クラブラネート、ガチフロキサシンそれぞれ 29%と続いたが、軽症例と中等症例では、似たような傾向にあったが、重症例では、ガチフロキサシンが 75%に使用され、セフェピーム、イミペナム/シラスチンが半数に使われた (表 20)。病院間での抗生剤の使用は、病院 A ではドキシサイクリンとシプロフルオロキサシンが、病院 B では、ガチフロキサシン、アジスロマイシン、セフトラジジムが使われる傾向にあった (表 21)。

ステロイドと抗ウイルス剤の使用頻度は、重症度に応じた有意差を認めた (<0.01 , 0.05) (表 22)。

表 1. 年齢分布

年齢	n	%
<20	3	6.8
20-29	9	20.5
30-39	8	18.2
40-49	18	40.9
50-59	2	4.5
>=60	4	9.1
Total	44	100.0
Min	17	
Max	76	
平均	39.3 ± 13.3	

表 2. 性別

性別	n	%
男性	13	29.5
女性	31	70.5
合計	44	100.0

表 3. 職業

職業	n	%
医師	4	9.1
看護師	12	27.3
その他の医療従事者	10	22.7
医療従事者以外	18	40.9
合計	44	100.0

表 4: 性別と職業

職業	男性		女性	
	n	%	n	%
医師 n=4	2	50.0	2	50.0
看護師 n=12	0	0.0	12	100.0
その他の医療従事者 n=10	2	20.0	8	80.0
医療従事者以外 n=18	9	50.0	9	50.0

表 5. 既往歴

既往症	n	%
高血圧	1	2.3
その他 (癌, アレルギー, マラリア等.)	6	13.6
呼吸器疾患		
COPD	1	2.3
結核	1	2.3

表 6. 初発症状

初発症状	n/N	%
1 発熱	37/44	84.1
2 息切れ	6/44	13.6
3 咳	17/44	38.6
4 痰	2/44	4.5
5 鼻汁	4/44	9.1
6 筋痛	20/44	45.5
7 頭痛	25/44	56.8
8 咽頭痛	9/44	20.5
9 下痢	5/44	11.4
10 悪寒	16/44	36.4
11 倦怠感	22/44	50.0
12 その他	6/44	13.6

表 7. 発症から入院までの期間

期間 (日数)	n	%
0	8	18.2
1	6	13.6
2	6	13.6
3	5	11.4
4	4	9.1
5	4	9.1
6	1	2.3
7	1	2.3
8	2	4.5
9	4	9.1
10	3	6.8
合計	44	100.0
平均 (日数)	3.7 ± 3.3	

表 8. 入院期間

期間 (日数)	n	%
<=14 日 (2 週間)	5	11.4
15-21 日 (3 週間)	25	56.8
> =22 日 (4 週間)	14	31.8
合計	44	100.0
最短日数	9	
最長日数	49	
平均	20.6 ± 7.1	

表 9. レントゲン所見 (10 例の脱落あり)

レントゲン撮影回数 (回)	8.4 ± 4.0	最少: 2; 最多: 23
初診時の X 線写真における胸部陰影の局在		
一側肺		
右中肺野	4/34	11.8
右中肺 + 下肺	2/34	5.9
右下肺	9/34	26.5
左上肺	2/34	5.9
左中肺	4/34	11.8
左下肺	3/34	8.8
両側肺		
左中肺、右中肺	1/34	2.9
左下肺、右下肺	9/34	26.5
初診時胸部陰影の性状		
間質性陰影 (磨りガラス様)	29/34	85.3
肺胞性陰影	3/34	8.8
混合性	2/34	5.9

表 10. 検査所見 (全経過を通じての)

検査値	n	最小値	最大値	平均 ± SD
CRP の最高値	38	6	224	± 57.1 51.3
WBC の最低値	43	2.9	8900.0	± 3894.3 1605.7
リンパ球数絶対値の最低値	42	0.9	2269.0	902.9 ± 497.2
血小板数の最低値	44	33.0	312.0	± 124.0 49.3
CPK の最高値	34	26.0	1400.0	± 228.9 302.7
AST の最高値	38	22.0	550.0	± 100.1 109.5
ALT の最高値	37	8.0	346.0	± 90.4 93.6

表 11. 抗生剤の種類

抗生剤	n	%
1 種類のみ使用	1	2.3
2 種類使用	7	15.9
3 種類使用	36	81.8
合計	44	100.0

表 12. 抗生剤の内訳

抗生剤	n/N	%	使用期間 (日数)
Doxycyclin	25/44	56.8	7.6±2.5
Gatifloxacin (Tequin)	17/44	38.6	7.8±2.1
Ciprofloxacin (Ciprobay)	17/44	38.6	6.9±2.1
Amoxicillin/clavulanate (Augmentin)	15/44	34.1	5.0±2.5
Azithromycin, (Zithromax)	10/44	22.7	5.9±2.8
Ceftazidime (Fortum)	9/44	20.5	9.2±3.1
Ceftriaxone (Rocephin)	7/44	15.9	4.0±1.5
Oxacillin (Bristopen)	7/44	15.9	5.8±1.8
Amikacin	5/44	11.4	5.3±1.7
Cefepime (Axepim)	5/44	11.4	9.2±2.9
Imipenem/cilastatin (Tienam)	3/44	6.8	9.3±2.5
Spiramycin (Rovamycin)	1/44	2.3	-

表 15: 入院期間と重症度

	軽症	中等症+重症	p
n	24	20	
平均 (日 数)	17.5 ± 3.9	24.4 ± 8.2	<0.01

表 16. 年齢と重症度

	軽症	中等症	重症	p
N	24	16	4	
平均	37.5 ± 12.3	39.1 ± 13.2	50.5 ± 17.4	NS

表 17. 発症から入院までの期間と重症度

	軽症	中等症	重症	p
N	24	16	4	
平均	3.7 ± 2.9	3.1 ± 3.5	6.5 ± 3.7	NS

表 13. ステロイドと抗ウイルス剤による治療

治療法	n/N	%
ステロイド	10/44	22.7
抗ウイルス剤	27/44	61.4

表 14. 全経過における重症度分類

全経過	n	%
軽症	24	54.5
中等症	16	36.4
重症	4	9.1
合計	44	100.0

表 18. レントゲン所見と重症度 (10 例の脱落あり)

	軽症 n=18		中等症 + 重症 n=16		p
	n	%	n	%	
初診時の X 線写真における胸部陰影の局在					
一側肺					
右中肺野	1	5.6	3	18.8	NS
右中肺 + 下肺	1	5.6	1	6.3	NS
右下肺	4	22.2	5	31.3	NS
左上肺	2	11.1	0	0.0	NS
左中肺	1	5.6	3	18.8	NS
左下肺	3	16.7	0	0.0	NS
両側肺			0	0.0	NS
左中肺、右中肺	0	0.0	1	6.3	NS
左下肺、右下肺	6	33.3	3	18.8	NS
初診時胸部陰影の性状					
間質性陰影 (磨りガラス様)	16	88.9	13	81.3	NS
肺泡性陰影	1	5.6	2	12.5	NS
混合性	1	5.6	1	6.3	NS

表 19. 検査所見と重症度

検査値	軽症	中等症	重症	p
CRP の最高値	55.2±61.6	64.0±39.8	35.1±22.9	NS
N	20	15	3	
WBC の最低値	3468.8±1536.2	4348.1±1539.7	4525.0±1980.5	NS
N	23	16	4	
リンパ球数絶対値の最低値	1091.5±545.3	778.1±333.5	365.8±108.9	< 0.01
N	22	16	4	
血小板数の最低値	129.8±56.5	117.8±38.8	114.3±47.2	NS
N	24	16	4	
CPK の最高値	149.6±138.5	147.4±105.9	831.3±561.8	< 0.001
N	16	14	4	
AST の最高値	54.7±45.7	143.8±151.8	152.0±37.8	< 0.05
N	19	15	4	
ALT の最高値	42.2±44.3	145.5±97.0	125.8±148.7	< 0.05
N	19	14	4	