

200829020A

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

インフルエンザ (H5N1) の死因となる劇症型  
ARDS の病態解析と治療法の開発に関する研究

(H19-新興-一般-005)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河内 正 治

平成21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

インフルエンザ (H5N1) の死因となる劇症型  
ARDS の病態解析と治療法の開発に関する研究

(H19-新興-一般-005)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河内 正 治

平成21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告

インフルエンザ（H5N1）の死因となる劇症型ARDSの病態解析と  
治療法の開発に関する研究

研究代表者：所属施設：国立国際医療センター 手術部 部長  
氏 名：河内正治

研究分担者

所属施設：宮崎大学医学部生殖発達学講座 小児科学分野 教授

氏 名：布井博幸

所属施設：東邦大学医療センター大森病院 呼吸器内科 教授

氏 名：本間 栄

所属施設：国立国際医療センター麻酔科 医長

氏 名：前原康宏

所属施設：国立国際医療センター麻酔科 医師

氏 名：尾崎由佳

所属施設：国立国際医療センター麻酔科 医師

氏 名：佐藤正規

所属施設：国立感染症研究所感染病理部 主任研究官

氏 名：中島典子

所属施設：順天堂大学医学部 講師

氏 名：熊坂利夫

所属施設：千葉大学大学院医学研究院 特任教授

氏 名：鈴木和男

所属施設：千葉大学大学院医学研究院 教授

氏 名：中山俊憲

所属施設：国立国際医療センター研究所 国際臨床研究センター長

氏 名：山本健二

所属施設：国立感染症研究所免疫部 室長

氏 名：大島正道

所属施設：東北大学大学院医学系研究科 教授

氏 名：川上和義

所属施設：熊本大学大学院医学薬学研究部微生物学分野 教授

氏 名：赤池孝章

所属施設：国立感染症研究所感染病理部 主任研究官

氏 名：永田典代

所属施設：横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授

氏 名：荒谷康昭

## 目 次

I.	総括研究報告	
	インフルエンザ (H5N1) の死因となる劇症型 (ARDS) の病態解析と治療法の開発に関する研究	
	河内正治	1
II.	分担研究報告	
1.	臨床班分科会	
1)	臨床から見た H5N1 インフルエンザウイルスの病原性についての考察	
	布井博幸	15
2)	当院救命センターでの ARDS 症例における HFOV の有用性	
	本間 栄	19
2.	基礎分科会	
1)	インフルエンザ誘導の急性肺障害機構の解析	
	鈴木和男	25
2)	ARDS における Th1/Th2 バランスの異常	
	中山俊典	33
3)	Ventilator-induced lung injury (VILI)モデルマウスにおけるサイトカイン、ケモカインの関与についての研究	
	前原康宏	41
4)	劇症型 ARDS の量子ドットによる microRNA 治療に向けて	
	山本健二	43
5)	インフルエンザウイルス感染に対する宿主側抵抗因子とその発現誘導の解析	
	大島正道	47
6)	インフルエンザウイルス肺炎・ARDS における酸化ストレスバイオマーカー	
	赤池孝章	51
7)	急性肺障害マウスモデルにおける自然免疫細胞の動態とその役割の解明に関する研究	
	川上和義	57
8)	ARDS の発症機構および病態モデルを用いた病理学的解析	
	永田典代	61
9)	好中球ミエロペルオキシダーゼ欠損による肺炎誘発機構の解析	
	荒谷康昭	65
III.	班会議プログラム等資料	69
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	73

## インフルエンザ（H5N1）の死因となる劇症型 ARDS の病態解析と 治療法の開発に関する研究（H19-新興-一般-005）

研究代表者 河内正治 国立国際医療センター 手術部部長

研究要旨：インフルエンザ（H5N1）患者では発症初期から胸部X線像上両側浸潤影を呈し、肺全体の急速に進行する DAD（diffuse alveolar damage；びまん性肺泡損傷）とそれに引き続く爆発的なサイトカインストーム、および好中球・マクロファージ浸潤が生じて劇症型 ARDS（H5N1-FARDS）が進行すると類推される。すなわち、発症初期から劇症型 ARDS が進行することが特徴であり、新型インフルエンザとして流行した場合にはその脅威は極めて大きい。しかし、わが国では、インフルエンザ（H5N1）患者の発生はなく病態を直接解析できないため、1. H5N1-ARDS に特徴的な、多臓器不全を伴わない肺泡の広範囲な破壊を主とした劇症型 ARDS の動物モデルを作成する（感染モデル、非感染モデル）、2. 海外と連携してインフルエンザ（H5N1）症例の臨床データ及び病理学的なデータを得て、ARDS 症例と比較検討する研究が必要である。本研究は日本国内研究機関とベトナム国立病院を連携して、1) インフルエンザ（H5N1）劇症型 ARDS（H5N1-FARDS）と重症 ARDS を同一施設患者にて比較検討し、インフルエンザ（H5N1）患者病態解明を行う。そのために特にインフルエンザ（H5N1）患者の、BALF、血液、病理標本などを採取し解析する。2) モデル動物と ARDS 患者（H5N1 症例含む）のサイトカインから特定マーカーとなる因子を抽出する。3) ARDS（H5N1 症例含む）における好中球、マクロファージ浸潤にかかわるサイトカインと、その調節にかかわる分子の特定をモデルマウスおよび ARDS 患者の BALF および血清から解析する。4) インフルエンザ（H5N1）による脳症発症の有無を検証し、将来の治療薬開発研究などにつなげることを目的とし、20 年度には、劇症型 ARDS モデルマウスとして感染モデル、器械的損傷モデル、化学的損傷モデルの 3 種の作成実験を完了した。特定マーカー因子の推定、ベトナムとの共同研究計画の開始（retrospective study のデータ取得は 19 年度内に終了、Prospective study も 19 年 10 月より開始、20 年末までの解析結果を解析（Lancet 投稿中）、国内 ARDS 患者研究の成果発表（JJSICM、および CCM 投稿中）、H5N1 を含むインフルエンザ脳症の病態解析の開始、などほぼ計画通りの成果が得られた。

### A. 研究目的

インフルエンザ（H5N1）においては、重症の劇症型 ARDS による呼吸不全が生じ、非常に短い期間（9-10 日）で高い死亡率（約 61%）が特徴である（NEJM 358:3, 2008）。こ

のため、劇症型 ARDS の病態解析と治療法の開発が緊急課題となり、我々も 18 年度特別研究で病態解析と治療法の開発準備をスタートした。

本研究チームは、以下の特色を持って臨床

班と基礎班に分かれた研究集団を形成している。①ARDS 専門の臨床家集団、インフルエンザ脳症の専門家、②サイトカインストームを解析するサイトカインラボの基礎部門、③異常好中球および炎症細胞、細胞機能の機能解析の基礎部門、④モデル動物の開発における臨床と基礎とのコラボレーション、⑤ウイルス学の専門家、⑥肺病理学専門家。これらに加えて、ベトナム国ハノイの国立病院との共同研究により、ヒトインフルエンザ (H5N1) 感染症に対して、迅速診断法の確立と新たな治療法の提案が可能になることが本研究班の最終目的である。具体的には研究目的は以下の 7 項目に集約できる。

- 1) 劇症型 ARDS 病態解析のための新たな劇症 ARDS モデル動物の開発。①器械的侵襲モデル、②インフルエンザ感染モデル、③化学的侵襲モデル。
- 2) 超急性期 ARDS 症例での BALF 採取とサイトカインなどの解析。
- 3) 変動するサイトカインの同定・定量を、少量(15 $\mu$ L)検体による多種サイトカイン同時測定を行うことで可能にする。
- 4) 上記 1) 2) 3) より、インフルエンザ (H5N1) を含む劇症型 ARDS におけるマーカーとなる特定因子抽出への足がかりを得る。
- 5) インフルエンザ (H5N1) を含む劇症型 ARDS で好中球浸潤を誘発するサイトカイン群、関連する免疫細胞の特定。
- 6) インフルエンザ脳症の新たな知見と発生機序の解明への手がかりの獲得。
- 7) 以上よりインフルエンザ (H5N1) の迅速診断法 (特定マーカーの同定) の確立と新たな治療法の提案。

## B. 研究方法

各分担者の報告参照、主任者が行った研究については成果の各項に記載。

## C. 研究成果

### 倫理規定について

患者の血液・血清の使用に当たっては、主任研究者の該当部分については、国立国際医療センターの倫理委員会 (以下「委員会」) 規定に従い実施した。患者の検体が派生することが予想される場合には、1) 研究計画を含む具体的な研究計画書、2) 主治医を含む共同研究者との合意文書、3) 患者とのインフォームドコンセントに関する実施計画概要を記載した書式を、予め「委員会」に提出し「委員会」の許可を得て実施した。患者個人情報とはコード化し、ネットワークでの個人情報交換はしないなど、プラベート情報の漏洩がないよう万事を期した。分担研究者において実施する場合も同様の手順により行い、所属機関の倫理規定により許可を得て実施した。動物実験に関しては、動物実験計画書を所属機関の動物委員会 (分担研究者においては当該機関の同等委員会) に提出し、その許可を得て動物愛護のもとに研究を実施した。

インフルエンザ (H5N1) は、重症の肺急性呼吸障害 (ARDS:急性呼吸窮迫症候群) を短時間で誘発し、短期間で高い死亡率をもたらすことが特徴である。本研究では、1) インフルエンザ (H5N1) 感染を病因とする劇症型 ARDS (H5N1-FARDS) のベトナムでの調査と病態解析 (ベトナム、ハノイ国立二病院: 国立小児病院、国立熱帯感染症研究所) 2) ARDS の病態解析 (超急性期 ARDS の気管支肺泡洗浄液採取と分析: 研究計画)、

3) 劇症型 ARDS モデル動物作製、4) サイトカインストーム解析、サイトカイン産生免疫細胞の解析法の確立をめざし、以下のような成果が得られた。以下に主任者が主たる研究者として行った部分の研究手法と研究成果、ならびに各分担研究者の研究成果の概要をまとめた。

### 1. 臨床班分科会：劇症型 ARDS の病態解析に関する臨床分科会

臨床班として、(1)ARDS 患者 BALF 液および血漿中のサイトカイン濃度測定(河内)(研究計画書;倫理委員会の承認済み)、(2)ベトナムにおけるインフルエンザ(H5N1)感染症例を含む ARDS 臨床例の解析(prospective study)(ベトナムハノイの国立小児病院、国立熱帯感染症研究所スタッフと共に)及び retrospective study の開始・終了(河内、布井、尾崎、佐藤、病理:熊坂、中島)、(3)日本の臨床現場における ARDS の現状調査および ALI/ARDS に対する PMX-DHP の有用性(本間)、(4)日本、およびベトナムにおける H5N1 を含むインフルエンザ脳症について調査(布井)、以上4点を行なった。

### 1) ARDS 患者 BALF 液および血漿中のサイトカイン濃度測定

(河内正治:国立国際医療センター)

研究方法:国立国際医療センターICU に入室中の患者で、当該患者の治療上肺胞気管洗浄液(BALF)の解析を必要とすると担当医師が判断しBALFを採取した検体について、そのBALFおよび血漿中のサイトカイン測定部分についてBio-Plexを用いて測定し解析した。

研究成果:インフルエンザ(H5N1)は、重症の肺急性呼吸障害(ARDS:急性呼吸窮迫症候群)を短時間で誘発し、急速に進展して呼吸不全から死にいたると考えられる。そのため、ARDSの病態解析とその治療法の開発が必須である。そこで河内は、倫理委員会の承認を得て、5名のARDS症例と2名の重症肺炎患者において17種類サイトカイン同時測定を行った。結果、2例のARDSではない呼吸障害患者と比較すると、ARDS患者5例においては、超急性期BALF中のサイトカインのうちG-CSF, MCP-1(MCAF), MIP-1bなどの細胞遊走因子に関わるものおよびIL-6が高値を示したことが特徴的であった。血漿サイトカイン値においてはそれほど顕著な差は認めなかった(図1)。

以上の研究成果は、現在英文にて *J Jap Soc Intensive Care Med* に投稿中である (Osaki Y, et al. Analysis of cytokines in bronchoalveolar lavage fluid from patients with ARDS: Increase in IL-6, G-CSF, MCP-1, and MIP-1 $\beta$ ).

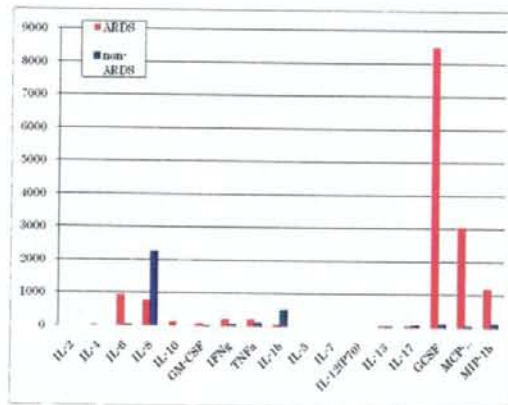


図1 BALF中のcytokine値(mean, n=5, 2)

2) ベトナムにおけるインフルエンザ (H5N1) を含む ARDS 臨床例の解析計画 (J-V FARDS)

(河内正治、尾崎由佳：国立国際医療センター、熊沢利夫：順天堂大学、中島典子：国立感染症研究所、布井博幸：宮崎大学医学部、鈴木和男：千葉大学大学院医学研究院)

研究方法：昨年度作成した、ハノイの国立小児病院 (NHP: National Hospital Pediatrics)、および国立熱帯感染症研究所 (NIITD: National Institute of Infectious Tropical Diseases) との ARDS 共同研究計画書に基づき 20 年度は先行的研究 (症例確保) を行った。内容は、①インフルエンザ (H5N1) 感染を病因とする劇症型 ARDS (H5N1-FARDS) の臨床病態の特徴の解明 (河内、尾崎、布井、鈴木)、②H5N1-FARDS を含む ARDS 症例検体の生体活性物質の測定 (鈴木、布井、河内)、③病理学的・組織学的解析 (熊坂、中島、鈴木) である。

研究成果：研究計画書は①Prospective study と ②Retrospective study からなり、①Prospective Study は  $P/F < 100$  の重症 ARDS 症例について、1) の研究方法とほぼ同様の方法で BALF および血漿中サイトカインなどの Bio-markers を現地で測定/解析し、組織病理標本の病理学的・免疫学的解析も行ない、ARDS と H5N1-FARDS との差異の検討を行っている。②Retrospective study については 2007 年 10 月以前の全 H5N1 感染症例の臨床経過を得た (図 2)。2007 年 10 月以降の症例は Prospective study として症例解析を続行中である。2007 年 10 月以降 2008 年 10 月までの成果をまとめた結果は以下のごとく集約できる。

1. ハノイ国立小児病院 PICU に入院した ARDS 症例 (H5N1 感染症例を含む) で、年齢が一月以上で経過中  $P/F$  値が 100 未満を呈した全重症 ARDS 症例を先行的に症例集積した。
  2. 内訳は H5N1 感染 ARDS 症例 12 例と他病因 ARDS 27 例であった。
  3. 生存率は H5N1 非感染例と比較して H5N1 感染例で有意に低かった (13 日 vs. 32 日) (図 2)。
  4. H5N1 感染例では、受診時の呼吸機能のうち換気能は正常範囲であり、通常の ARDS 症例とは異なった所見であった。
  5. H5N1 感染症例で報告されている特徴的な血清検査値は同様であった。1) 白血球数の減少、2) 血小板数の減少、3) 肝トランスアミナーゼ値の上昇。
  6. 以上より、H5N1 感染 ARDS の病理診断は ARDS であるが、通常の ARDS とは死亡率など明らかに異なった臨床経過を呈し、われわれはこの差を明らかにするために劇症型 ARDS (Fulminant ARDS) (H5N1-FARDS) と命名した。
- ハノイ国立小児病院に受診した全 H5N1 症例は、2009 年 2 月までに 13 例で、平均年齢  $6.5 \pm 3.8$  歳、男：女 = 9：3 であった。ほぼ半数の 6 例に鳥との直接接触歴が確認された。死亡は 9 例、生存 4 例 (死亡率 70%) で、死亡までの期間 7-16 日であった。そのほかの患者背景については、図 3 に示した。以上の研究成果は、現在 *The Lancet* に投稿中である (Kawachi S, et al. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome followed by avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children)。



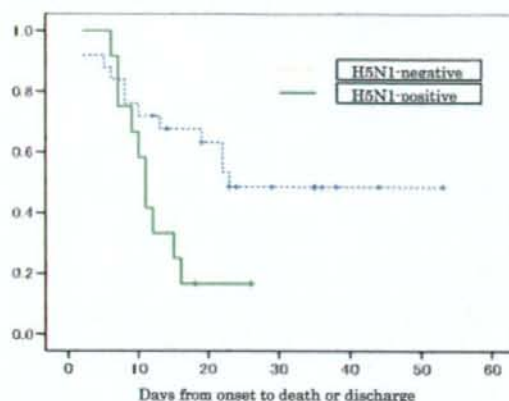


図2 H5N1-FARDS 症例と ARDS 症例の生存率曲線 (Kaplan-Meier)

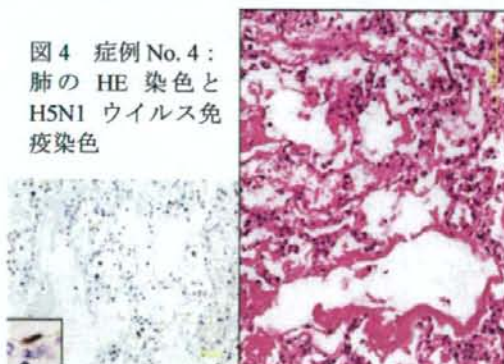
No	Gender	Age	H5N1	Contact	Prognosis	P/F	BT onset	Days
1	F	12	Y	U	D	29	39.5	7
2	M	5	Y	U	D	70	39	16
3	M	4	Y	U	A	157	39.5	20
4	M	10	Y	U	D	84	39.5	11
5	F	5	Y	Y	D	29	39.5	7
6	M	4	Y	Y	D	41	39.5	15
7	F	1	Y	Y	D	190	38.5	6
8	M	1.3	Y	N	D	607	39	9
9	M	11	Y	N	D	34	39	11
p1	M	4	Y	Y	D	31	38.5	12
10	F	9	Y	N	A	43	39.5	26
p14	M	7	Y	Y	A	116	38.5	18
p19	M	11	Y	Y	A	52	39.5	10

図3 ハノイ国立小児病院における全 H5N1 症例 (2003/Dec. - 2008/Mar.)

#### 病理学的検索

病理標本: 症例 No.4 はすでに発表した(JJID, 2008, 図4)。

図4 症例 No.4: 肺の HE 染色と H5N1 ウイルス免疫染色



病理標本: 症例 p-1、p-19 は詳しい検索を現在行っているところである (図5, 6)。

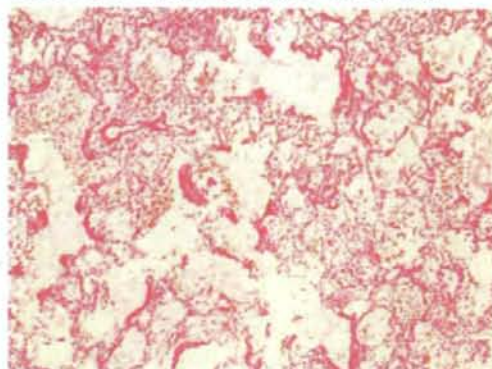


図5 症例 No. p1: 肺の HE 染色

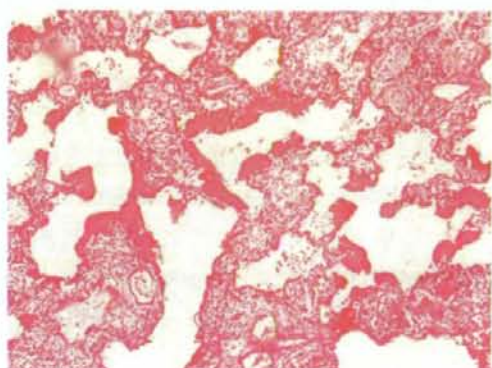


図6 症例 No. p19: 肺の HE 染色

#### 3) 当院救命センターでの ARDS 症例における HFOV の有用性

(本間 栄、菊地直: 東邦大学医療センター)

インフルエンザ (H5N1) の死因となる劇症型 ARDS に対する臨床的治療として薬物療法はもちろんのこと、それ以外に人工呼吸管理が重要となってくる。

ARDS (DAD) の病態が重症化するほど呼吸器の設定条件も厳しくなり、Ventilator-associated lung injury の合併を含め DAD からの改善に難渋する。ARDS/ALI に

おいては、生存率の改善をエンドポイントとした RCT によって有用性が明らかになっている治療法は低容量換気による呼吸管理法のみである。今回、従来の低容量換気による肺保護戦略の理想と考えられている high-frequency oscillatory ventilation を ARDS 数例に使用し効果が認められたので、症例を呈示すると共に症例数を増やしその有用性を検討する。今回 HFO にて救命しえた ARDS 症例は、誤嚥性肺炎、薬剤、胃酸による化学性肺炎の合併を伴う直接肺障害により ARDS が発症したと考えられた症例であった。また高度肥満もあり両側肺下葉背底部の著明な無気肺を合併し、換気容量の減少も起こっていた。著明な呼吸不全が主病態であり従来の呼吸器での管理が限界であった。酸素化の改善や高濃度酸素障害、VALI の回避を考え HFOV を導入し、改善しえた症例であった。このことから ALI/ARDS 症例に対する HFO の有用性について前向きな更なる検討が必要と考えられた。

#### 4) 臨床から見た H5N1 インフルエンザウイルスの病原性についての考察

(布井博幸：宮崎大学医学部)

最近 H5N1 インフルエンザウイルスが持つ病原性に関して HA, PB2, PB1-F2, NS1 の点突然変異などが報告されている。一方、生体側については、インフルエンザ感染の関わる初期免疫機構が明らかになってきている。前回までの調査で H5N1 インフルエンザ感染症患者は、発熱後約 1 週間で入院され、短時間で ARDS を誘発し、1-2 週間で死に至っていることから後期免疫反応の異常と考えられた。他方、インフルエンザ

脳症は発熱より 1-2 日という極短時間で重症化することから、初期免疫反応異常により発症していると考えている。

これまでの現地での河内らの調査臨床結果から、H5N1 ウイルスが小児期の他の原因による ARDS と違い、かなり急速で、生命予後が悪いことが明らかとなり、H5N1 感染症特有の病態が有るのではないかと考えるに至った。1) ウイルス側の病原性に関して、H5N1 ウイルスがコードする 8 遺伝子とその翻訳物である 10 蛋白に加え、最近 PB1 遺伝子のフレームがずれて翻訳されている第 11 番目の PB1-F2 蛋白がある。各々の蛋白について病因となる遺伝子と、その塩基配列を持った Reversegenetic な方法で作成されたウイルスを用いて、動物実実験が繰り返されており、その結果に注目が集まっている。2) 一方生体反応としては、インフルエンザ感染ではプラズモイド DC では TLR3 が、非プラズモイド DC では RIG-I がその初期免疫を司っていることが知られていた。H5N1 インフルエンザ感染は 1-3 週間の経過で増悪化していること、各種の初期免疫分子欠損でも増悪化が認められないことから (当研究班からの報告)、感染防御には、NKT 細胞を中心とした中期から CD4/CD8 細胞を中心とした後期免疫反応に H5N1 ウイルスによる何らかの障害が起こっている可能性がある。

H5N1 インフルエンザ感染防御において、上記の初期免疫機構の TLR3 や RIG-I の意義が薄れた反面、後期免疫の何らかの破綻が H5N1 感染症での重症化に関与している可能性があり、患者血球解析による病態解析が重要ではないかと考えている。

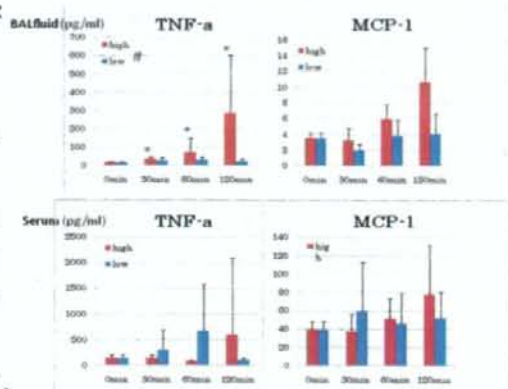
2. 基礎分科会：劇症型 ARDS モデルマウスならびにサイトカインストームおよび免疫機能解析

1) ARDS 病態モデルとしての VILI マウス作製

(前原康宏、河内正治、鄒 軍：国立国際医療センター；戸高玲子、大島正道：国立感染症研究所免疫部；鈴木和男、長尾朋和：千葉大学大学院医学研究院)

ARDS の発症機序を解明する端緒として、Ventilator-induced lung injury (VILI)モデルマウスを用いて血清・肺胞洗浄液(BALF)中の化学伝達物質解析と肺組織学的検索を行い、劇症型 ARDS モデルマウス作成を進めてきた。これまで Balb/c マウスを用い、高換気量による 30 分以上の人工呼吸により BALF 中の IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  が上昇し、60 分以上の人工呼吸では BALF 中の IL-1 $\alpha$ , G-CSF, KC, MIP-1 $\beta$  が有意に増加することを確認した。血清中では、IL-6, KC が 60 分以上で、IL-1 $\alpha$ , IL-2, G-CSF, MCP-1 が 240 分で有意に増加していた(図)。組織学的にも 60 分以上の人工呼吸で炎症の進展が認められ、240 分の人工呼吸では、肺傷害が生じていることが観察/推察された。また、TNF- $\alpha$  鼻腔内に投与により、IL-6, IL-15, KC, MIP-2, MCP-1 の産生が増加し、IL-6(low-doses)鼻腔内に投与により、TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-15, IL-18, KC, MIP-2 の産生が増加することが確認された。以上より BALF 中のサイトカイン変動が観測され、病情的変化も観測されたことから器械的モデルとしての劇症型 ARDS モデルマウスの原型は確立したと考えられた。

図 BALF および血清中 TNF- $\alpha$ , MCP-1 濃度



2) ARDS における Th1/Th2 バランスの異常

(中山俊憲、長谷川明洋：千葉大学大学院医学研究院)

ナイーブ CD4T 細胞は、外来抗原の刺激により末梢リンパ組織でそれぞれ異なったリンホカインを産生する Th1 または Th2 タイプのメモリーT細胞に分化する。Th1 細胞と Th2 細胞は互いにバランスをとりながら生体防御機構における中心的な役割を担っており、感染症やアレルギーの病態と Th1 と Th2 のバランスには密接な関係があると考えられている。CD69 分子は c-type lectin ファミリーに属する II 型の膜分子で、早期活性化マーカー分子としてリンパ球の活性化の指標として広く用いられている。機能の詳細はこれまであまり明らかにされていないが、炎症局所に浸潤する炎症細胞はすべて CD69 分子を発現していることから、さまざまな炎症反応の誘導・維持に重要な役割を果たしていると考えられる。これまでに CD69 ノックアウトマウスを作製し、疾患との関わりの解析を進め、CD69 ノックアウトマウスではアレルギー性喘息が起き

ないことを見出した。また抗 CD69 抗体の投与で炎症反応が抑制され、治療効果が認められた。さらにイメージング技術を駆使した解析により、特に T 細胞上の CD69 分子がアレルギー性喘息の発症に重要であることを明らかにしてきた。今後、ARDS の実験モデルを用いて ARDS の発症にともなう肺への免疫炎症細胞浸潤のイメージング解析を行うとともに CD69 分子の関与について検討する。また抗 CD69 抗体投与による肺への炎症細胞の浸潤抑制について検討し、Th1/Th2 バランスの解析とともに急性免疫炎症細胞浸潤を抑制する至適条件の検討を行う。

### 3) インフルエンザウイルス感染に対する宿主側抵抗因子とその発現誘導の解析

(大島正道：国立感染症研究所)

外部からのウイルス感染に対して宿主側ではインターフェロン、MxA, OAS, Fas など感染防御に働く宿主遺伝子が誘導され感染に対抗する。一方インフルエンザウイルスはウイルス蛋白 NS1 を発現し宿主の抵抗因子発現を抑制し細胞を自らの複製の場に改変する。気管支系の細胞株 NCI-H292 はこの戦いに勝ちインフルエンザウイルスを排除できるが肺胞系の細胞株 A549 は排除できず死滅する。ジーンチップによる解析の結果インフルエンザウイルス感受性の A549 細胞ではウイルス感染誘導遺伝子 (VSG) の発現は抵抗性の NCI-H292 細胞に比べて抑制されている。細胞のウイルス抵抗性因子の誘導発現の相違が一次防御における結果の相違をもたらしていることが示唆される。VSG の誘導発現の系を作製してこのメカニズムを解析する。

### 4) 急性肺障害マウスモデルにおける自然免疫細胞の動態とその役割の解明に関する研究

(川上和義：東北大学医学部)

ARDS モデルとして従来から LPS 誘発マウス肺炎モデルが用いられてきたが、これは一時的な肺の炎症性病変を呈するとどまり、劇症型 ARDS (FARDS) でみられるような激しい肺の炎症を来すことはない。本研究では、FARDS により近い動物モデルを作成する目的で、LPS の投与前に NKT 細胞の活性化剤である  $\alpha$ -galactosylceramide を気管内投与することで、激しい肺の炎症性変化とともに、2 日の経過で急激に死亡するマウスモデルの作成に成功した。病理学的には肺胞腔内の強い炎症細胞浸潤と一部硝子膜形成もみられ、肺内では TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、IL-17、IFN- $\gamma$ 、KC、MCP-1 などのサイトカイン、ケモカイン産生が著明に亢進していたことから FARDS のよい動物モデルになると考えられた。このモデルに抗 TNF- $\alpha$  中和抗体を投与すると、肺の炎症性変化が消失し、全てのマウスが生存することから、本サイトカインが極めて重要な役割を担うものと考えられた。フローサイトメトリーによる解析では、Gr-1 陽性細胞が TNF- $\alpha$  を発現しており、抗 Gr-1 抗体の投与によって炎症性変化の減弱がみられた。一方、LPS の代わりに H1N1 インフルエンザウイルスの加熱死菌を用いて同様な解析を行ったところ、FARDS は誘導できなかった。

これらの結果から、FARDS の発症に Gr-1 陽性細胞から産生される TNF- $\alpha$  が重要な役割を担っている可能性が考えられ、またウイルス死菌を用いた検討から FARDS の発

症にウイルスの増殖が重要なことが推察された。

#### 5) ARDSの発症機構および病態モデルを用いた病理学的解析

(永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐多徹太郎：国立感染症研究所)

BALB/cマウスを用いたSARS-CoV感染後のARDS発症モデルにおいて、感染3時間目のIFN- $\alpha$ 腹腔内投与による発症防御が確認された。この防御機構について明らかにする目的で、感染—薬剤投与早期のウイルス量、サイトカイン、ケモカイン解析を行った。IFN- $\alpha$ 投与群と非投与群の感染1, 3日目の肺におけるウイルス量の有意差は無かった。一方で、IFN- $\alpha$ 投与群では感染一日目の血中のTh1分化誘導関連サイトカイン・ケモカインが発現し、2日目以降には炎症性サイトカイン・ケモカインの発現が抑えられた。本モデルにおいてはIFN- $\alpha$ 腹腔内投与による免疫調整作用が、感染後のサイトカインストームを抑制しARDS発症を防御したと考えられた。

これらの現象は、サイトカインストームが関わりと考えられている呼吸器ウイルス感染後のARDS発症機序を解明する上で重要な知見である。

#### 6) 好中球ミエロペルオキシダーゼ欠損による肺炎誘発機構の解析

(荒谷康昭：横浜市立大学)

酵母菌体膜成分であるザイモザンをミエロペルオキシダーゼのノックアウトマウス(MPO-KOマウス)の肺に投与すると、野生型マウスよりも重篤な好中球性肺炎を誘発した。MPO-KOマウスでは、投与後6時間にお

ける肺中のKC量とMIP-2量が一過的に高値を示した。これらのケモカインに対する抗体を投与すると、抗体非投与時の症状が著しく軽減した。このことから、ザイモザン投与後のMPO-KOマウスで一過的に産生されるKCとMIP-2が、MPO-KOマウス肺への好中球の集積に関与していることが示された。

#### 7) インフルエンザウイルス肺炎・ARDSにおける酸化ストレスバイオマーカー

(赤池孝章、岡本竜哉：熊本大学大学院医学薬学研究部)

一酸化窒素(NO)と活性酸素種(ROS)は、感染、炎症、がんといった多彩な疾病に関わっている。我々は、インフルエンザウイルス肺炎において、NO・ROSによる蛋白質チロシン残基や核酸塩基といった生体分子の酸化・ニトロ化修飾(酸化ストレス)の感染病態に対する影響について解析を行ってきた。最近、cGMPが誘導型NO合成酵素(iNOS)由来のNOによりニトロ化され、新しい環状ヌクレオチド8-ニトロ-cGMPが生成することを見出した。そこで今回、インフルエンザウイルス肺炎における3-ニトロチロシンと8-ニトロ-cGMPの生成とそのバイオマーカーとしての有用性について検討した。野生型マウスにおいては、炎症細胞、気道上皮、肺胞浸出液などに強い3-ニトロチロシンの染色像が得られた。また8-ニトロ-cGMPに関しては、特にウイルス増殖の場である気道上皮にて特に強い陽性像が得られた。一方iNOS欠損マウスにおいては共に陽性所見を認めなかった。次に肺胞洗浄液中の3-ニトロチロシンの生成をHPLC-電気化学検出器法により解析したところ、iNOSの誘導と肺炎の時間経

過に一致した生成を認めた。さらに酸化ストレス応答因子であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現を Western blot にて解析したところ、8-ニトロ-cGMP の生成に依存して誘導されること、さらにその発現量は反応産物である一酸化炭素の定量にて簡便に評価できることがわかった。以上、インフルエンザウイルス感染病態において生成する3-ニトロチロシンや、8-ニトロ-cGMP、そして一酸化炭素は、インフルエンザウイルス肺炎病態における酸化ストレスのバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

#### 8) インフルエンザ誘導の急性肺障害機構の解析

(鈴木和男、長尾朋和：千葉大学大学院医学研究院)

高毒性鳥インフルエンザ(H5N1)によって短期間で誘発される重症の急性呼吸障害 (ARDS:急性呼吸窮迫症候群) の病態解析はほとんど進んでいない。本研究において、マウス馴化インフルエンザウイルス(IFV, PR8 株)によって誘導される劇症肺炎のモデル作製について検討した。また、PR8 誘発のサイトカイン誘導と肺炎の病態を調べた。その結果、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) の Bio-Plex による網羅的解析から、サイトカイン、ケモカインの内、KC、RANTES、MCP-1、IL-6、G-CSF、IL-1 $\beta$  が経時的に上昇し、それとともに、BALF 中には多数の好中球浸潤が観察された。感染 4 日後には上皮細胞の剥離、好中球と肺胞マクロファージの形態変化を伴う貪食像が確かめられた。また、肺組織は、好中球を主体とする多数の浸潤

細胞と細気管支破壊像が観察された。これらの結果は、KC による好中球の浸潤と、RANTES や MCP-1 によるマクロファージ、リンパ球の浸潤誘導と IL-6、G-CSF、IL-1 $\beta$  による炎症惹起が、劇症型肺障害を誘発していると考えられる。

#### D. 考察

インフルエンザ (H5N1) は、季節性のインフルエンザにはない病態を示し、病理解剖所見から肺にはウイルスは検出困難であったが、今回我々はハノイの症例についてウイルスを証明した報告を行った (JJID, 2008)。また、かなり初期段階の病態での死亡例があり (Human Pathol 2005, NEJM 2005/2008, CCM 2006)、その病態から ARDS の誘発が主要な病因となり死因となっていることがわかってきている。インフルエンザ (H5N1) においては病初期に急速に ARDS が進行し、爆発的なサイトカインストームに続く好中球・マクロファージ浸潤を類推させていることから、その脅威は極めて大きく、緊急の行政対応が必至である。

しかし、わが国では、インフルエンザ (H5N1) 患者の発生はなく病態を直接解析できないため、1. H5N1-FARDS に特徴的な、多臓器不全を伴わない肺胞の広範囲な破壊を主とした劇症型 ARDS の動物モデルを作製する、2. 海外と連携してインフルエンザ (H5N1) 症例の臨床データ及び病理学的なデータを得て、ARDS 症例と比較検討する研究が必要である。

20 年度においては、劇症型 ARDS モデルマウスとして感染モデル、器械的損傷モデル、化学的損傷モデルの 3 種の作成実験を完了した。特定マーカー因子の推定、ベトナム

ムとの共同研究計画の開始 (retrospective study) のデータ取得は 19 年度内に終了、Prospective study も 19 年 10 月より開始、20 年末までの解析結果を解析 (Lancet 投稿中)、国内 ARDS 患者研究の成果発表 (JJSICM、および CCM 投稿中)、H5N1 を含むインフルエンザ脳症の病態解析の開始、などほぼ計画通りの成果が得られた。これらの成果から、とくにインフルエンザ (H5N1) の臨床病態が明確化され、一般的な ARDS との差異が明らかになってきつつある。特に、発症時から受診時まではむしろ通常の ARDS のほうが呼吸機能の障害が大きいのにも関わらず、H5N1-FARDS ではその後急速に悪化して死に至ることが証明できたことは大きな前進である。

この臨床上の新しい知見を踏まえて、21 年度はハノイ国立小児病院においてのさらなる Bio-Markers (ニトロ化物質、チトクロームなど) の解析や、病理学的解析を進める。また、完成した 3 タイプの動物モデルを用いて、臨床病態から推定されるインフルエンザ (H5N1) に効果あると考えられる治療法について、今後治療予備実験に取り掛かる予定である。臨床的には H5N1-FARDS の治療と考えてよく、治療薬としては安全性がすでにある程度確立されている抗炎症薬などが候補に挙げられる、と考えられる。

#### E. 結論

インフルエンザ (H5N1) 感染による劇症型 ARDS 患者の病態解析とその原因を究明することは将来のパンデミック対策としても重要であり、その目的に向かっては、臨床・基礎医学両面からの緊密な提携をもつ

た研究が不可欠である。本研究は、ベトナムにおけるヒト H5N1 症例とインフルエンザ (H5N1) 感染による劇症型 ARDS 病態のモデル動物を使用してサイトカインストームと産生細胞の機能調節機構を明らかにし、インフルエンザ (H5N1) 型 ARDS の迅速特異診断および治療法を提案することが最終目標であり、今後もこの目的に沿ったさらなる研究展開を予定している。

#### 研究協力者および研究アドバイザー

分担研究者以外に、本研究においては以下に述べる施設/研究者に研究協力者およびアドバイザーとして参加していただいた。

##### 1) 臨床分科会

小林茂人(順天堂大学附属順天堂越谷病院)

斉藤玲子(新潟大学大学院)

豊田恵美子(国立病院機構東京病院)

Nquyen Duc Hien (NIITD Hanoi)

Nguyen Hong Ha (NIITD Hanoi)

Nguyen Quoc Thai (NIITD Hanoi)

Nguyen Thanh Liem (NHP Hanoi)

Luong Thi San (NHP Hanoi)

Phung Thi Thuy (NHP Hanoi)

##### 2) 基礎分科会

赤川清子(北里研究所)

鳥羽健(新潟大学)

平橋淳一(東京大学医学部付属病院)

長尾朋和(千葉大院医)

星野昭芳(国立国際医療センター研究所)

鄒 軍(中国厦門大学医学院)

丸茂丈志(東京大学医学部付属病院)

##### 3) アドバイザー

小川道雄(熊本労災病院)

藤倉敏夫(慶応義塾大学病院)

## F. 健康危険情報

1. 2009年に入ってベトナムでは2例のインフルエンザ(H5N1)を発症例が報告されている(1例死亡)。本年に入ってもベトナムにおけるヒトインフルエンザ(H5N1)症例の発症は継続しており、致死率は極めて高く注意が必要である。
2. WHOが2月24日に発表したヒトインフルエンザ(H5N1)症例数は、2003年以降408例となった(253例死亡、死亡率62.0%)。2009年に入ってすでに13例(5例死亡)が報告されており、昨年同様の症例数、死亡率である。引き続き発症報告はインドネシア、ベトナム、エジプト、中国からが多く、発症地域の傾向は変わらない。

## G. 研究発表

(研究代表者分のみ、分担研究発表については各項参照)

### 1. 論文発表

- 1) Yuka Osaki, Yasuhiro Maehara, Atsuko Matsuya, Masaki Sato, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Tomokazu Nagao, Kazuo Suzuki, Shoji Kawachi. Analysis of cytokines in bronchoalveolar lavage fluid from patients with ARDS: Increase in IL-6, G-CSF, MCP-1, and MIP-1 $\beta$ . *J Jap Soc Intensive Care Med* 投稿中
- 2) Mariko Baba, Yasuhiro Maehara, Atsuko Matsuya, Tomokazu Nagao, Kazuo Suzuki, Shoji Kawachi. Levels of seventeen different cytokines in bronchoalveolar lavage fluid samples from two patients with connective tissue diseases and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 投稿中
- 3) Shoji Kawachi, San Luong Thi, Mika Shigematsu, Hiroyuki Furuya, Thuy Phung Thi Bich, Phuc Phan Huu, Hiroyuki Nunoi, Liem Nguyen Thanh, Kazuo Suzuki. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome (FARDS) followed by

H5N1 influenza infection in Vietnamese children. *Lancet* 投稿中

- 4) 河内正治: 吸入麻酔薬. 麻酔科学レビュー-2009 (p57-62, 11). 天羽敬祐監修, 総合医学社, 東京. 2009/2.
  - 5) Hidenori Yasuda, Nobuaki Yoshizawa, Mikio Kimura, Mika Shigematsu, Shoji Kawachi, Masamichi Oshima, Kenji Yamamoto, Kazuo Suzuki. Preparedness for the Spread of Influenza: Prohibition of Traffic, School Closure, and Vaccination of Children in the Commuter Towns of Tokyo. *J Urban Health*, 85: 619-635.2008.
  - 6) Nguyen Thanh Liem, Teruaki Oka, Late Le Phuc Phat, Hoang Ngoc Thach, Pham Viet Hung, Luong Thi San, Yuko Sato, Noriko Nakajima, Harutaka Katano, Toshio Kumasaka, Shoji Kawachi, Takeji Matsushita, Tetsutaro Sata, Koichiro Kudo, Kazuo Suzuki. The characterization for H5N1-infected cells in lung tissue sections of a fatal case in Vietnam. *Jpn J Infect Dis*; 61: 157-160.2008.
  - 7) 河内正治: クリティカルな状態にある患者の栄養療法. ナースが取り組む栄養療法 (p86-91, part2-8). 丸山道生監修, アンファミエ, 東京. 2008/7.
  - 8) 鈴木和男, 河内正治: はじめに. 特集「ARDSとインフルエンザ(H5N1)」。医学の歩み; 224(11): 813-814.2008.
  - 9) 河内正治: インフルエンザ(H5N1)によるARDSの病態と治療. 特集「ARDSとインフルエンザ(H5N1)」。医学の歩み; 224(11): 815-819.2008.
  - 10) 河内正治: とりインフルエンザとベトナム(編集余滴). 医療 61(12): 831-832, 2007.
- ### 2. 学会発表
- 1) Yasuhiro Maehara, Shoji Kawachi, Tomokazu Nagao, Zou Jun, and Masamichi Oshima, Kazuo Suzuki. Cytokines and chemokines in the early phase of ventilator-induced lung injury model in mice. 2009 International Anesthesia Research Society Annual Meeting, San Diego, CA, USA, March 14-17, 2009
  - 2) 鄒軍, 前原康宏, 長尾朋和, 戸高玲子, 大島正道, 小林和夫, 志賀由佳, 河内正治, 中山俊憲, 鈴木和男 ARDS病態モデルの肺組織変化に連動するサイトカインストームの意義/The pathological findings of Lung involved in cytokine storm from an animal model of ARDS.



- 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 12月1-3日, 2008.
- 3) 河内正治. トリインフルエンザ: ヒト感染最前線. 宮崎大学病院医師会講演会, 宮崎市, 11月, 2008.
  - 4) 河内正治, 布井博幸, 鈴木和男. NHP-ハノイにおけるインフルエンザ(H5N1)症例 H5N1-ARDS(FARDS) と nonH5N1-ARDS の差異の検討. 第14回MPO研究会, 東京都, 10月, 2008.
  - 5) 鄒軍, 長尾朋和, 前原康宏, 土橋英紀, 志賀由佳, 河内正治, 中山俊憲, 鈴木和男. ARDS病態モデルの肺組織障害に連動するサイトカインストーム開始時のTNF- $\alpha$ の解析. 第14回MPO研究会, 東京都, 10月, 2008.
  - 6) 河内正治. H5N1鳥インフルエンザのヒト感染アップデート. 成育医療センターセミナー, 東京都, 9月, 2008.
  - 7) 河内正治. H5N1鳥インフルエンザのヒト感染最前線. 東京麻酔専門医会 Annual Refresher Course Lecture 2008, 東京都, 7月, 2008.
  - 8) 前原康宏, 河内正治, 鈴木和男, 長尾朋和, 戸高玲子, 大島正道. Ventilator-induced lung injury モデルマウス作製の試み. 日本麻酔学会第55回学術集会, 横浜市, 6月, 2008.
  - 9) 尾崎由佳, 河内正治, 前原康弘, 松谷厚子, 鈴木洋平, 佐藤正規, 鈴木和男. ARDS患者におけるBALF中Cytokines値測定. 第35回日本集中治療医学会. 東京都, 2月, 2008.
  - 10) Shoji KAWACHI, Kazuo SUZUKI. Is Treatment of FARDS (H5N1 Flu) with IVIg Effective? -From the Cases of NHP-Hanoi-. International Conference Regulation of Inflammatory Diseases - Vasculitis and Asthma-2008 in Chiba. (Chiba, JAPAN), January 18-19, 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得: なし
  2. 実用新案登録: なし
  3. その他: 特になし

## 臨床から見た H5N1 インフルエンザウイルスの病原性についての考察

研究分担者 布井博幸 宮崎大学医学部生殖発達学講座 小児科学分野教授

### 研究要旨

最近 H5N1 インフルエンザウイルスが持つ病原性に関して HA, PB2, PB1-F2, NS1 の点突然変異などが報告されている。一方、生体側については、インフルエンザ感染の関わる初期免疫機構が明らかになり、その分子およびその下流のノックアウトマウスの実験が報告されてきている。前回までの調査で H5N1 インフルエンザ感染症患者は、発熱後約 1 週間で入院され、短時間で重症の肺急性呼吸障害（ARDS:急性呼吸窮迫症候群）を誘発し、1-2 週間で死に至っていることから、後期免疫反応の異常で、一方インフルエンザ脳症は発熱より 1-2 日という極短時間で重症化することから、初期免疫反応異常で、起こっているのではないかと考えている。今後種々の病態にウイルス側または生体側のどの遺伝子が担うのか明らかになれば、治療の対策もたえられるのではないかと期待している。現地での調査臨床結果と文献的資料から、詳しい考察を行った。

### A. 研究目的

これまでの現地での河内らの調査臨床結果から、H5N1 ウイルスが小児期の他の原因による ARDS と違い、かなり急速で、生命予後が悪いことが明らかとなり、H5N1 感染症特有の病態が有るのではないかと考えるに至った。今後種々のサイトカインの結果が発表されると思われるが、今後の治療研究の方向性を決めるために、現段階で H5N1 ウイルス側と Host 側からの病原性の研究をまとめた。

### B. 研究方法

これまでの現地での調査臨床結果から、H5N1 インフルエンザ感染症の実態が、河内班長の報告する様に明らかになってきた。

この結果から予測されるウイルス側の病原性と生体側の免疫応答の可能性について、文献的な考察を行った。

### （倫理面への配慮）

文献的考察なので特に問題はない

### C. D. 研究結果 考案

ウイルス側の病原性に関して、これまで報告されている H5N1 ウイルスの対象物として、H5N1 ウイルスがコードする 8 遺伝子とその翻訳物である 10 蛋白に加え、最近 PB1 遺伝子のフレームがずれて翻訳されている第 11 番目の PB1-F2 蛋白がある。各々の蛋白について病因となる遺伝子と、その塩基配列を持った Reversegenetic な方法で作成されたウイルスを用いて、動物実実験

が繰り返されており、その結果に注目が集まっている。以下に、それらをまとめた(図1)。

Haemagglutinin(HA)はHost側の細胞との結合をシアル酸 SA2,6/2,3Gal とで区別している(1)。現在ベトナムや中国のヒトから分離された H5N1 インフルエンザウイルスにはそのどちらにも結合出来る変異が報告されているが、現在のところまだヒトヒト感染を繰り返している報告は無く、この結合能だけでは大規模な感染は起こらないのかもしれないと考察されている。また細胞への感染に関係する HA 蛋白のクララ酵素などの酵素感受性も病原性と関連している(2)。

PB2 タンパク質の627番目のアミノ酸が Lysへ置換したウイルスが高病原性をもっていることが、1997年の香港でヒトから分離されたH5N1で明らかにされている。前者がマウスの全身感染を起こすのに比べ、従来のアミノ酸を持つH5N1は呼吸器のみで分離されることから、PB2の627アミノ酸変異がウイルスの増殖のために重要で、病原性に関わっていると考えられている(2)。

NS1(73アミノ酸、18kDa)は塩基性アミノ酸(19-38aa)が広い範囲をしめ、sNt や dsNt に強く結合する陽性荷電領域を持っているため、1) the poly A tails of cellular (not viral) pre-mRNAs に結合して核から細胞質への移行を阻害、2) U6 small nuclear RNA (snRNA)に結合し、U6-U2 or U6-U4 相互作用を阻害することで、pre-mRNA splicing を阻害、3) double-stranded RNA (dsRNA) に緩く結合し、PKR kinase を阻害など感染細胞にだけ見られ、多くの細胞側の機能を制御したり、細胞のアポトーシスにも関わっている(3,4,5)。

PB1-F2 は第11番目の蛋白として確認

されミトコンドリア外膜に穴を形成し細胞をアポトーシスに至らせる機能など病原性に関わる蛋白として注目されている。(6,7)

このように H5N1 インフルエンザウイルスが持つ病原性に関して多くの解析が行われてきており、今後肺に限局化した H5N1 インフルエンザ感染症の病原性をどの遺伝子または塩基が担うのか明らかになれば、治療の対策もたてられるのではないかと期待している。

一方生体反応としては、インフルエンザ感染ではプラズモイド DC では TLR3 が、非プラズモイド DC では RIG-I がその初期免疫を司っていることが知られていた。これまで RIG-I は dsRNA を認識するものだと考えられていたが、インフルエンザウイルスは dsRNA ではなく、5'phosphate ssRNA を主に認識しており、生体側の RNA とウイルスがコードする RNA を区別する機構となっていることが明らかにされた(8)。RIG-I ノックアウトマウスは胎生致死であったため、研究が期待されたが、結果が出ていない。代わって、RIG-I の下流の IPS-1 ノックアウトマウス(9)や TLR3 ノックアウトマウスが作成され(10)、インフルエンザなどのウイルス感染実験がなされたが(IPS-1 ノックアウトでは RS ウイルス感染モデル)、いずれも重症感染は起こらず、wild type のマウスよりもウイルスを早く排除している。このことは、TLR3 や RIG-I を主体とした初期免疫機構は初期炎症反応をむしろ増悪させる様に働いている可能性がある。インフルエンザ脳症の様に1-2日の範囲での重症化と違い、H5N1 インフルエンザ感染は1-3週間の経過で増悪化していること、各種の初期免疫分子欠損でも増悪化が認められ

ないことから(当研究班からの報告)、感染防御には、NKT細胞を中心とした中期からCD4/CD8細胞を中心とした後期免疫反応にH5N1ウイルスによる何らかの障害が起こっている可能性がある。実際ヒト末梢血単細胞にH5N1ウイルスを感染させると、H1N1ウイルスよりもCD4,CD8陽性細胞の数が減少しており(11)、またTUMPEYらはinfluenza A/Hong Kong/483/97(HK/483)株を用いたマウスの感染実験で末梢血でのリンパ球減少と脾臓リンパ節でのCD4およびCD8リンパ球のアポトーシスが起きていることを証明している(12)。

#### E. 結論

H5N1インフルエンザ感染防御において、上記の結果および、文献検索から初期免疫機構のTLR3やRIG-Iの意義が薄れた反面、後期免疫の何らかの破綻がH5N1感染症での重症化に関与している可能性があり、患者血球解析による病態解析が重要ではないかと考えている。

#### 参考文献

1. Nature 440(23): 435-436,2006
2. Science 293(5536): 1840-1842,2001
3. J Virol. 75(17): 7875-7881,2001
4. J Virol. 74(24): 11566-73,2007
5. J Virol. 81(2): 514-524,2007
6. J Virol. 82(3): 1146-1154,2008
7. J Virol. 78(12): 6304-6312,2004
8. Science 314(5801): 997-1001,2008
9. PNAS. 105(37): 14046-14051,2008
10. PLoS Pathog. 2(6): 526-535,2006
11. BBRC. 371: 484-489,2008
12. J. Virol. 71(13): 6105-6116,2000

添付図の説明:

図1: インフルエンザウイルスと生体反応における病態惹起因子: ウイルス側の因子としてHAの結合部位、HA蛋白の切断部位、PB2の転写活性、PB1-F2のアポトーシス活性、NS1の細胞内mRNA形成阻害部位に関わるアミノ酸の変異が病原性に関わっている。一方、生体側のTLR3やRIG-Iに代わってIPS-1,Myd88ノックアウトマウスではインフルエンザ感染で軽症化しており、インフルエンザに対する初期免疫の役割はあるものの、その重要性が疑問視されている。

#### G. 研究発表

1. 布井博幸 ヒト(H1, H3)と鳥(H5N1)インフルエンザウイルスによる重症感染症の病態と発症機序の違い 医学のあゆみ 224(11):832-833,2008.
2. 石井茂樹ら 急性呼吸窮迫症候群を合併したインフルエンザ脳症の1女児例、日本消化学会雑誌(印刷中) 2009

#### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし