

contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiol Immunol. Mar.* 56(3): 171-82, 2012

- 21) 河内正治 : オートプシーイメージング (今月の用語). *医療* 66(10): 570, 2012

2. 学会発表

【国際学会】

- 1) Yasuhiro Maehara, Shoji Kawachi, Tomokazu Nagao, Yasuaki Aratani, Masamichi Ohshima, Kazuo Suzuki. Contribution of cytokines/chemokines to ventilator-induced lung injury associated with myeloperoxidase in mice. 13th Asian and Australasian Congress of Anaesthesiologists (Fukuoka, Japan), June, 2010.
- 2) Shoji Kawachi, Hiroyuki Nunoi, Kazuo Suzuki, San Luong Thi, Liem Nguyen Thanh. Human infection of Avian Influenza A(H5N1) induces severe ARDS. - From the Cases of National Hospital of Pediatrics in Hanoi, Viet Nam -. Scientific Meeting of HIV/AIDS (PERIL of HIV/AIDS) and the Annual Plenary Meeting on Infectious Disease IV (PLASMID IV)(Jakarta, Indonesia), November 5-6, 2010.
- 3) Shoji Kawachi, Mariko Baba, Kyoko Asayama, Fumiyo Nojiri, Sae Hayashi, Yuka Shiga, Yasuhiro Maehara, Kazuo Suzuki. Levels of seventeen different cytokines in BALF from two ARDS patient with connective tissue diseases. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop, March 28-31, 2012 . Tokyo
- 4) Yuka Shiga, Ryuichi Sugamata, Chiaki Iwamura, Tomokazu Nagao, Noriko Tasaka, Jun Zao, Kazuyoshi Kawakami, Shoji Kawachi, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Contribution of Invariant NKT Cells to Ventilator-induced Lung Injury Through IL-5 and IL-6 Receptor in Mice. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop, March 28-31, 2012. Tokyo
- 5) Thuy Phung, Ryuichi Sugamata, Kazuko Uno, Yasuaki Aratani, Keiko Ozato, Shoji Kawachi, Liem Thanh Nguyen, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Key Role of RANTEWS, NS1 and MPO in Cytokine Storm Induced by Influenza Virus Infection in A549 Bronchial Epithelial Cells. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop, March 28-31, 2012. Tokyo
- 6) Shoji Kawachi, Noriko Nakajima, Tatsuya Okamoto, Hiroyuki Nuoi, Luong Thi San, Nguyen Trung Thuy, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki. The Higher Mortality Rate of ARDS Associated with Viral Infection-From the Prospective Study Cases of PICU in NHP-Hanoi. Sever Influenza: Burden, Pathogenesis and Management, October 29-31, 2012. Hanoi
- 7) Okaomto T, Kawachi S, Thuy TB Phung, Sato Y, Nakajima N, Nunoi H, Sawa T, Fujii S, San T Luong, Liem T Nguyen, Suzuki K, Akaike T. Detention of Protein-Bound 3-Nitrotyrosin in Plasma from Pediatric Patient with Fulminant ARDS and Avian Influenza Virus Infection. Sever Influenza: Burden, Pathogenesis and Management, October 29-31, 2012. Hanoi

- 8) Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutake Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki, Tetsutaro Sata. Pathological study of formalin-fixed paraffin-embedded lung tissues with H5N1 influenza infection in Vietnam: Sever Influenza: Burden, Pathogenesis and Management, October 29-31, 2012. Hanoi

【国内学会】

- 1) 河内正治. インフルエンザウイルスの話 - 高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) を中心に -. 第9回島根ヘルペス研究会、出雲市、5月6日、2010.
- 2) 志賀由佳、花田 真毅、佐藤 正規、前原 康宏、河内 正治、鈴木 和男. 鳥インフルエンザ (H5N1) 感染 ARDS における重症化要因の検討. 第57回日本麻酔科学会学術集会、福岡市、6月、2010.
- 3) 山下 陽子、青山 千賀子、松谷 厚子、伊藤 倫子、前原 康宏、河内 正治. 国立国際医療センターにおける活動性結核患者手術の集計. 第57回日本麻酔科学会学術集会、福岡市、6月、2010.
- 4) 朝山 京子、松谷 厚子、志賀 由佳、平尾 亜衣、佐藤 正規、河内 正治. 緊急手術症例での炎症と出血凝固機能検査連関. 第57回日本麻酔科学会学術集会、福岡市、6月、2010.
- 5) 花田真毅、山下陽子、大塚弘晃、佐藤正規、志賀由佳、河内正治. 甲状腺クリーゼに対する麻酔管理 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部 第50回合同学術集会、東京都、9月、2010
- 6) 青山千賀子、佐藤正規、豊永庸佑、平尾亜衣、志賀由佳、佐々木立朗、河内正治 脳出血後の抗凝固療法再開時期の検討 日本臨床麻酔学会第30回大会 徳島市 11月 2010
- 7) 河内正治. シンポジウム 各国の医療事情 日本臨床麻酔学会第30回大会 徳島市 11月 2010
- 8) 河内正治. インフルエンザ (H5N1) 症例にIVIg療法は効果があるか? 第16回MPO研究会 仙台市 1月 2011
- 9) 河内正治. 栄養と結核-病態の悪化は体の必要エネルギーを増加させる 第16回MPO研究会 仙台市 1月 2011 河内正治.
- 10) 豊永庸佑、山下陽子、朝山京子、松谷厚子、佐々木立朗、河内正治. 一般腹部外科・脳神経外科緊急手術症例における周術期 AKI 発症に関する検討 第58回日本麻酔科学会学術集会 神戸市 5月 2011
- 11) 大塚弘晃、歯牙損傷の術前リスク評価 第58回日本麻酔科学会学術集会 神戸市 5月 2011
- 12) 野尻記世、山下陽子、青山千賀子、朝山京子、志賀由佳、前原康宏 右側大動脈弓の急性大動脈解離術後に巨大気管食道瘻を生じた1例 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部 第51回合同学術集会 千葉市、9月、2011.
- 13) 林早恵、豊永庸佑、花田真毅、大塚弘晃、石川嘉昭、河内正治 血友病、HIV感染者の肝硬変に対する自己骨髄細胞投与療法の麻酔経験 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部 第51回合同学術集会 千葉市、9月、2011.
- 14) 河内正治, 布井 博幸, 鈴木和男, 中島典子, 岡本 竜哉, Nguyen Thanh Liem, Luong Thi San, Phung Thi Thuy. ウイル

- ス性肺炎に起因する ARDS (FARDS) について-ベトナムハノイ国立小児病院 PICU における Survey : 2005-2011 より- 第 17 回 MPO 研究会 熊本市 10 月 2011
- 15) 山下陽子、朝山京子、豊永庸佑、野尻記世、林 早恵、河内正治. 持続硬膜外注入法と単回大腿神経ブロック法による、脊髄くも膜下麻酔下人工膝関節手術術後痛の検討. 日本臨床麻酔学会第 31 回大会 宜野湾市 11 月 2011
- 16) 青山千賀子、加藤規弘、小川佳宏、志賀由佳、河内正治. 当院での術前の抗血小板薬休薬と術後血栓性合併症の実態報告. 日本臨床麻酔学会第 31 回大会 宜野湾市 11 月 2011
- 17) 野尻 記世、豊永 庸佑、青山 千賀子、朝山 京子、佐々木 立朗、河内 正治. ハノイ国立小児病院 PICU における肺内要因の ARDS(F-ARDS) 症例 (2006-2011)の検討. 第 59 回日本麻酔科学会学術集会 神戸市 6 月 2012
- 18) 豊永 庸佑、志賀 由佳、大塚 弘晃、花田 真毅、林 早恵、河内 正治. 緊急手術症例における周術期 AKI 発生と術後 CKD 発生に関する検討. 第 59 回日本麻酔科学会学術集会 神戸市 6 月 2012
- 19) 青山千賀子、加藤 規弘、小川 佳宏、河内 正治. 当院における術前の抗血小板薬と術後の動脈血栓性合併症発症の実態報告 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 東京 6 月 2012
- 20) 小林陽子、志賀由佳、大塚弘晃、野尻記世、篠原亜樹、河内正治. 巨大褐色細胞腫に対し Vigileo モニターを用い適切に管理できた一例. 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部, 第 52 回合同学術集会, 長野, 9 月, 2012.
- 21) 久良木ルーテ彩来, 林早恵, 篠原亜樹, 青山千賀子, 前原康宏, 河内正治. 修正型電気けいれん療法 (mECT) における全身麻酔導入中に心停止を来した一例. 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部, 第 52 回合同学術集会, 長野, 9 月, 2012.
- 22) 志賀由佳、野尻記世、林早恵、小林陽子、青山千賀子、竹内菊子、河内正治. サリドマイド胎芽病患者の卵巣囊腫摘出手術の麻酔経験. 日本臨床麻酔学会第 32 回学術集会 福島, 11 月, 2012.
- 23) 岡本竜哉、赤池孝章、Thuy TB Phung, Liem T Nguyen, 林早恵、河内正治. 小児 ARDS 症例および鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質 3-ニトロチロシンの解析. 日本集中治療学会第 40 回学術集会、長野、2 月 23-3 月 2 日、2013
- 24) 篠原亜樹、豊永庸佑、小林陽子、篠原康介、岡本竜哉、河内正治. アーテスネート静注と血液透析による支持療法で救命しえた重症熱帯熱マラリアの 2 例. 日本集中治療学会第 40 回学術集会、長野、2 月 23-3 月 2 日、2013
- 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

国立ハノイ小児病院での重症 ARDS を示した rhinovirus 感染症例の解析

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

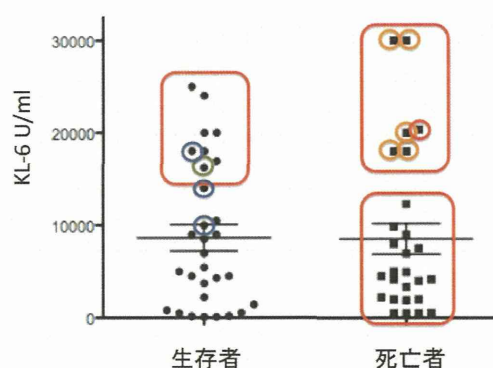
研究要旨： これまでのベトナムのハノイ国立小児病院の重症呼吸促迫症候群 (Acute Respiratory Syndrome: FARDS) 調査から、今期は、human Rhinovirus (HRV) 感染による ARDS 患者は、インフルエンザ感染に比べ、血中 KL-6 が異常高値を呈することから、以下の可能性について検討した。1) KL-6 が異常高値を示した日本国内の ARDS 症例で、肺胞蛋白症の原因遺伝子である ABCB3 遺伝子と GM-CSF および GM-CSF receptor の塩基配列決定を行い、KL-6 異常高値と個人や人種的な遺伝子変異の可能性は少ないこと、また、2) 気管吸引物から RA 遺伝子解析を行い、HRV A 型であり、熱帯地方で流行している新型 HRV C 型感染症ではないこと、更に、3) 生活背景として、共通の先天性免疫不全がないのか4名の BTK 遺伝子解析を行った結果、いずれも、新規の遺伝子変異であり、Founder effect は考えづらかったことを確認した。これらのことから、病原体や患者の免疫状態というよりも、HRV 感染による ARDS 患者では、何らかの環境が（低栄養や乳児院など）重症化に関わっているのではないかと考えられた。

A. 研究目的

これまでのベトナムのハノイ国立小児病院の調査で、H5N1 や H1N1pdm インフルエンザ感染症による重症 ARDS 合併例では、約1週間の高熱期をへて、急速に劇症呼吸促迫症候群 (Fuluminant Acute Respiratory Syndrome: FARDS) を呈することが明らかとなった。この経過はインフルエンザ脳症がインフルエンザ感染後1-3日で発症すること、大きな違いがあった。H5N1 インフルエンザによる FARDS の臨床検査から、血中 Cytochrome C 上昇が少なく、肺局所での激しい炎症による呼吸不全が主体であること、血中 KL-6 が低値で、肺胞上皮 II 型細胞の障害が主体であることを明らかになった。

しかし、インフルエンザ感染に比べ、HRV 感染による重症 ARDS 患者では、血中 KL-6 が異常高値を呈する (図1) ことから、以下の可能性について検討した。HRV 感染症症例のほとんどは図1の右上 (KL-6 異常高値の死亡者: オレンジ色、赤は adnovirus, 左上は RSV が多い) の様であった。

図1: KL-6 と生存死亡例



B. 研究方法

国立ハノイ小児病院とのプロジェクトに従い採取された血清および喀痰検体について、cytochrome c (cyto-c) 測定およびサイトカイン、KL-6 測定と HRV の遺伝子検索による型分類を行った (H22, 23 年度報告)。同施設で低ガンマーグロブリン血症を示した 4 名の患者の BTK 遺伝子検査を行った (H24 年度報告)。また宮崎大学で経験した KL-6 異常高値を示した重症 ARDS 患者で、肺胞蛋白症関連遺伝子 (ABCB3 遺伝子、GM-CSF、GM-CSF receptor) の塩基配列決定を行った。

C. 研究結果

1) 血中 KL-6 が異常高値を示した日本の症例で、肺胞蛋白症関連遺伝子 (ABCB3 遺伝子、GM-CSF、GM-CSF receptor) の塩基配列決定を行い、いずれに遺伝子異常も検出できなかった (Moritake H, et al., Am J Hematol. 2012 Apr;87(4):447-50.)。

2) ハノイ国立小児病院で HRV 感染による重症 ARDS 患者 4 名で、気管吸引物から HRV 遺伝子解析を行い、HRV A 型であることを確認した (図 2)。

図 2: HRV RT-PCR 産物の Direct sequence と RT-PCR data base とのアラインメント比較

```
>[gb|JF316785.1] Human rhinovirus A isolate LZT90 polyprotein gene, partial cds
Length=420

Score = 513 bits (568), Expect = 7e-142
Identities = 351/376 (93%), Gaps = 16/376 (4%)
Strand=Plus/Plus

Query 24 GAATTCAGTTTCTTATGCGGATCTAGGTTTAAACTATTTTAAACAATTAATTCAAA 83
Sbjct 48 GAATTCAGTTT-CTAATGG-ATCTAG--TTTAAACTATTTT-AAACATCAATTAATTCAAA 102

Query 84 GATGCTGATCAAGCGGGGATCAAGCTTGGAGTTCTCACAAGATCCAAGCAATTTAC 143
Sbjct 103 GATGCTGATCAAGCGGGGATCAAGCTTGGAGTTCTCACAAGATCCAAGCAATTTAC 161

Query 144 TGATCCAGTCAAGATGTTCTAGAGAAAGAAATTCACACTTTCACATCTCCACAGTAGA 203
Sbjct 162 TGATCCAGTCAAGATGTTCTAGAGAAAGAAATTCACACTTTCACATCTCCACAGTAGA 221

Query 204 GGCTTGTGTTATTTCAGACAGGATTATACAAATCACCAGAGGGGATTCACCAATACATC 263
Sbjct 222 GGCTTGTGTTATTTCAGACAGGATTATACAAATCACCAGAGGATTCACCAATACATC 281

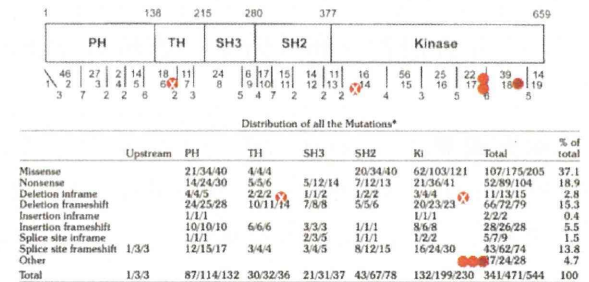
Query 264 TCAAGATGTAGCAAAATGCTGTGG-TGGGTATGGAGGATGG-CTCCCTATTCGAC-CCCCA 320
Sbjct 282 TCAAGATGTAGCAAAATGCTGTGGTGGGTATGGAGTATGGCTCACTATTTCAGACACACA 341

Query 321 AGATGCCAC-GCAATCGAC-AAACCAGCC-ACCTGA-ACATCATCAAGCAGG-TTATATAC 375
Sbjct 342 AGATGCCACAGCAATTCACAACCAGCCACCTGATACATCATCAAGCAGGTTTATATAC 401

Query 376 CC-AGAAAG-AAAGAA 389
Sbjct 402 CCTGGAAAGTAAGAA 417
```

3) 低ガンマーグロブリン血症を呈した 6 名の患者のうちで男性患者について、BTK

図 3: 患者 BTK 遺伝子変異の比較



遺伝子解析を行い、一例は既存の変異で 3 例の新規変異を検出した (図 3)。同患者でも HRV による重症感染症は認められなかった。

D. 考案

肺胞蛋白症では KL-6 異常高値を示すことが知られているが、関連遺伝子 (ABCB3 遺伝子、GM-CSF、GM-CSF receptor) 変異患者と発症年齢や臨床経過などでも臨床症状が異なっており、ハノイの HRV 感染症患者での KL-6 異常高値の原因とは考えられなかった。また、東南アジアで流行が報告された HRV C 型との鑑別を、HRV 遺伝子解析により試みたが、A 型であり、重症肺炎の原因ウイルスとも同定できなかった。同時に BTK 欠損症による低ガンマーグロブリン血症患者の既往歴を確認したが、HRV による重症肺炎の既往が認められないことから、ホストの背景としての原因とは考えづらかった。

以上のことより、病原体や患者の免疫状態というよりも、HRV 感染による ARDS 患者では、何らかの環境が (低栄養や乳児院など) 重症化に関わっているのではないかと考えられた。

E. 結論

重篤な ARDS 症例では早期診断と抗ウイルス剤投与など早急に重症化を予防すると同時に、また HRV 感染で治療が遅れて重篤な状態になった場合、経皮的心肺補助装置 (percutaneous cardiopulmonary support:PCPS) による治療が有効と考えられ、重篤な ARDS になった場合に備えて、PCPS ネットワークの整備が必要になるのではないかと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara . A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins. Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, O. *Curr Chem Genomics*. 2012;6:27-37.
- 2) Yamada A, Moritake H, Shimonodan H, Yokogami K, Takeshima H, Marutsuka K, Nunoi H. Efficacy of temozolomide in a central nervous system relapse of neuroblastoma with O 6 -methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013 Jan;35(1):e38-41.
- 3) Moritake H, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Harada M, Sugimoto T, Nao-I N, Nunoi H. Cytomegalovirus retinitis as an adverse immunological effect of pulses of vincristine and dexamethasone in maintenance therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Feb;60(2):329-31.
- 4) Matsunaga T, Yamashita K, Kubuki Y, Toyama T, Imataki O, Maeda K, Kawano N, Satou S, Kawano H, Ishizaki J, Yoshida S, Kameda T, Sasaki T, Sekine M, Kamiunten A, Taniguchi Y, Hidaka T, Katayose K, K-Shimoda H, Shide K, Yamamoto S, Moritake H, Nunoi H, Makino S, Kitanaka A, Matsuoka H, Shimoda K. Acute myeloid leukemia in clinical practice: a retrospective population-based cohort study in Miyazaki Prefecture, Japan. *Int J Hematol*. 2012 Sep;96(3):342-9.
- 5) Hosoki K, Fujisawa T, Hashiguchi A, Nagao M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Nakano T, Nunoi H, Ihara T. Aberrant cytokine responses to influenza A virus in a child with severe influenza A infections. *Allergol Int*. 2012 Sep;61(3):507-9.
- 6) Nakamura H, Fang J, Mizukami T, Nunoi H, Maeda H. PEGylated D-amino acid oxidase restores bactericidal activity of neutrophils in chronic granulomatous disease via hypochlorite. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012 Jun;237(6):703-8.
- 7) Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Blood*. 2012 Jun 7;119(23):5458-66.
- 8) Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T,

- Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Acute megakaryoblastic leukemia and severe pulmonary fibrosis in a child with Down syndrome: successful treatment with ultra low-dose cytarabine using GATA1 mutation to monitor minimal residual disease. Moritake H, Yamada A, Kimoto Y, Sawa D, Shimonodan H, **Nunoi H**. *Am J Hematol*. 2012 Apr;87(4):447-50.
- 9) Arai T, Oh-ishi T, Yamamoto H, Nunoi H, Kamizono J, Uehara M, Kubota T, Sakurai T, Kizaki T, Ohno H. Copy number variations due to large genomic deletion in X-linked chronic granulomatous disease. *PLoS One*. 2012;7(2):e27782.
- 10) Moritake H, Hidaka F, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Nunoi H. Concomitant transient erythroblastopenia of childhood with neonatal hepatitis. *Pediatr Int*. 2012 Feb;54(1):147-50.
- 11) Mizukami T, Obara M, Nishikomori R, Kawai T, Tahara Y, Sameshima N, Marutsuka K, Nakase H, Kimura N, Heike T, Nunoi H. Successful treatment with infliximab for inflammatory colitis in a patient with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2012 Feb;32(1):39-49.
- 12) 中原 彰彦(宮崎大学 医学部生殖医学講座小児科学分野), 布井 博幸【クローズアップ感染症】 <感染症治療の進歩> 急性脳症と臓器障害 インフルエンザ脳症を中心に(解説/特集) 小児内科 (0385-6305)44 巻 7 号 Page1104-1108(2012.07)
- 13) 布井 博幸(宮崎大学 医学部生殖発達医学講座小児科学分野). インフルエンザ脳症 アポトーシスを伴う多臓器不全?(解説) *LiSA(1340-8836)19巻別冊'12* Page92-100(2012.05)
- 14) 田中 悦子, 此元 隆雄, 織田 真悠子, 中原 彰彦, 池田 俊郎, 布井 博幸. 重症心身障害児に透析を導入した2例日本小児腎不全学会雑誌.32 58-60
- 15) 原田 雅子, 高木 純一, 近藤 恭平, 久保 尚美, 布井 博幸. 小児心疾患における迅速測定系BNP値の有用性. *新薬と臨床 (0559-8672)61 巻 11 号* Page2329-2332(2012.11)
- 16) 山中 龍宏(日本小児科学会), 溝口 史剛, 市川 光太郎, 木崎 善郎, 滝沢 琢己, 平岩 敬一, 森 臨太郎, 渡辺 博, 清沢 伸幸, 布井 博幸, 竹内 宗之, 青木 康博, 渡辺 とよ子, 箕輪 良行, 松平 隆光,. 子どもの死に関する我が国の情報収集システムの確立に向けた提言(解説). *日本小児科学会雑誌 (0001-6543)116 巻 6 号* Page1027-1035(2012.06)
- 17) Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, Suzuki K, Jayne DR, Scott DG, Hashimoto H, Nunoi H. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U.K. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Oct;50(10):1916-20.

- 18) Kawachi S, Matsushita T, Sato T, Nunoi H, Noguchi H, Ota S, Kanemoto N, Nakatani K, Nishiguchi T, Yuge A, Imamura H, Kitajima H, Narahara K, Suzuki K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Multicenter prospective evaluation of a novel rapid immunochromatographic diagnostic kit specifically detecting influenza A H1N1 2009 virus. *J Clin Virol*. 2011 May;51(1):68-72.
- 19) Phung TT, Luong ST, Kawachi S, Nunoi H, Nguyen LT, Nakayama T, Suzuki K. Interleukin 12 and myeloperoxidase (MPO) in Vietnamese children with acute respiratory distress syndrome due to Avian influenza (H5N1) infection. *J Infect*. 2011 Jan;62(1):104-6.
- 20) Moritake H, Shimonodan H, Marutsuka K, Kamimura S, Kojima H, Nunoi H. C-MYC rearrangement may induce an aggressive phenotype in anaplastic lymphoma kinase positive anaplastic large cell lymphoma: Identification of a novel fusion gene ALO17/C-MYC. *Am J Hematol*. 2011 Jan;86(1):75-8.
- 21) Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T, Avcin T, de Boer M, Bustamante J, Condino-Neto A, Di Matteo G, He J, Hill HR, Holland SM, Kannengiesser C, Köker MY, Kondratenko I, van Leeuwen K, Malech HL, Marodi L, Nunoi H, Stasia MJ, Ventura AM, Witwer CT, Wolach B, Gallin JI. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Oct 15;45(3):246-65.
- 22) Kato I, Umeda K, Awaya T, Yui Y, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Watanabe K, Heike T, Adachi N, Endo F, Mizukami T, Nunoi H, Nakahata T, Adachi S. Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia with rituximab. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Feb;54(2):329-31.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他

びまん性肺胞傷害における予後因子解析ならびに 血中レドックスバランス・サイトカインの動向

研究分担者 本間 栄 東邦大学医療センター大森病院 教授
研究協力者 菊池 直, 杉野圭史 東邦大学医療センター大森病院

研究要旨

びまん性肺胞傷害 (DAD)における予後予測因子として各種メディエーター測定の有用性を検討する。

A. 研究目的

特発性肺線維症 (IPF)の急性増悪 (AE)は、呼吸困難の増強、胸部 CT 所見上の蜂巢肺所見+新たに生じたすりガラス陰影・浸潤影、動脈血酸素分圧の有意な低下と定義される。病理学的には通常型間質性肺炎 (UIP)所見に加え、びまん性肺胞傷害 (DAD)所見が認められる。予後は極めて不良であるが、薬物療法としてステロイド薬および免疫抑制薬、抗線維化薬、好中球エラスターゼ阻害薬などが試みられており、最近では各種炎症性メディエーターの除去を目的にポリミキシン B 固定線維カラムを用いた直接血液灌流法 (PMX-DHP) の有用性が注目されている。IPF-AE における予後不良因子を明らかにし、DAD における血中レドックスバランス・炎症メディエーターの推移を検討する。

B. 研究方法

初めに過去 8 年間に当科で IPF と診断した 113 例中 AE を発症した 31 例を対象に、臨床的特徴、予後不良因子を検討した。さらに最近経験した IPF-AE の 4 例 (内術後 AE

2 例) について、PMX-DHP 前後の血中レドックスバランス (総グルタチオン(tGSH)、還元型グルタチオン(GSH)、酸化型グルタチオン(GSSG)、GSH/GSSG 比)、炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8, TIMP-1, MCP-1, HMGB-1)ならびに好中球エラスターゼ (NE)の経時的変化を検討した。

C. 研究結果

IPF-AE に対する集学的治療により、1 回目の AE を 31 例中 17 例 (54.8%)が乗り越えた。予後不良因子として胸部 CT 上、diffuse type の GGO 分布と PaO₂/FiO₂ の著明な低下が挙げられた。術後 AE 2 例の予後は生存/死亡 = 1/1 例で、PMX-DHP 施行により共に血中レドックスバランスは改善したが、死亡例では NE の持続高値を認めた。また、炎症性サイトカインを測定した 3 例はいずれも 1 回目の AE を乗り越え、IL-6, HMGB-1 が全例で低下、TIMP-1, MCP-1 が 3 例中 2 例で低下、IL-8 が 1 例で低下しており、すべての炎症性サイトカインが低下した症例は 1 例のみであった。

D. 考案

IPF-AE の予後予測には、各種臨床データならびに血中炎症メディエーターの推移を総合的に捉えて判断する必要がある。

E. 結論

今後、H5N1 感染による DAD における予後予測因子として各種メディエーター測定の有用性を検討する。

F. 健康危険情報

因果関係のある有害事象なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Homma S, Azuma A, Taniguchi H, Ogura T, Mochiduki Y, Sugiyama Y, Nakata K, Yoshimura K, Takeuchi M, Kudoh S, the Japan NAC clinical study group: Efficacy of inhaled N-acetylcysteine monotherapy in patients with early stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 17 : 467-477, 2012
- 2) Yujiro TAKAI, Yoshihiro YAMASHIRO, Daisuke SATOH, Kazutoshi ISOBE, Susumu SAKAMOTO, Sakae HOMMA: Cephalometric assessment of craniofacial morphology in Japanese male patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Sleep and Biological Rhythms* 10: 162-168, 2012
- 3) Isobe K, Hata Y, Kobayashi K, Hirota N, Sato K, Sano G, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Takagi K, Homma S: Clinical significance of circulating tumor

cells and free DNA in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 32: 3339-3344, 2012

- 4) Sakamoto S, Kikuchi N, Ichikawa A, Sano G, Satoh K, Sugino K, Takai Y, Shibuya K, Homma S: Everolimus-induced pneumonitis after drug-eluting stent implantation: a case report. *Cardiovasc Intervent Radiol* DOI 10.1007/s00270-012-0477-y, 2012
- 5) Isobe K, Hata Y, Sakaguchi S, Sato F, Takahashi S, Sato K, Sano G, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Mitsuda A, Terahara A, Shibuya K, Takagi K, Homma S: Pathological response and prognosis of stage III non-small cell lung cancer patients treated with induction chemoradiation. *Asia-Pac J Clin Oncol* 8: 260-266, 2012
- 6) Keishi Sugino, Masahiro Kobayashi, Fumiaki Ishida, Naoshi Kikuchi, Nao Hirota, Keita Sato, Go Sano, Kazutoshi Isobe, Susumu Sakamoto, Yujiro Takai, Nobuyuki Shiraga, Sakae Homma: Xenon Ventilation Imaging Using Dual-Energy Computed Tomography in Combined Pulmonary Fibrosis and Emphysema. *SOMATOM Sessions (SIEMENS)*, 30: 50-51, 2012
- 7) Sugino K, Gocho K, Ishida F, Kikuchi N, Hirota N, Sato K, Sano G, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Hata Y, Shibuya K, Uekusa T, Kurosaki A, Homma S: Acquired hemophilia A associated with IgG4-related lung disease in a patient with autoimmune pancreatitis. *Intern Med* 51:

- 3151-3154, 2012
- 8) Homma S, Suzuki A, Sato K: Pulmonary involvement in ANCA-associated vasculitis from the view of pulmonologist. Clin Exp Nephrol, DOI 10.1007/s10157-012-0710-7, 2012
- 9) 伊藤貴文、杉野圭史、坂本晋、黒崎敦子、植草利公、本間栄：気腫合併特発性肺線維症の臨床病理学的特徴。日呼吸会誌 1:182-189,2012
- 10) 太田宏樹、佐藤敬太、磯部和順、秦美暢、渋谷和俊、本間栄：肝転移を契機に診断された線維形成型悪性胸膜中皮腫の1例。日呼吸会誌 1:251-255,2012
- 11) 高井雄二郎、阪口真之、杉野圭史、佐藤敬太、磯部和順、坂本晋、高木啓吾、本間栄：看護学科2年生の3年間における喫煙、社会的ニコチン依存度および受動喫煙の推移。日本禁煙会誌 7: 76-82, 2012.
- 12) 磯部和順、秦美暢、佐藤敬太、佐野剛、杉野圭史、坂本晋、高井雄二郎、渋谷和俊、高木啓吾、本間栄：上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者における耐性獲得時のT790M変異検索の有用性。肺癌 52:279-283,2012
- 13) 仲村泰彦、佐藤敬太、磯部和順、杉野圭史、羽鳥努、本間栄：pulmonary tumor thrombotic microangiopathy (PTTM)を合併した肺扁平上皮癌の1剖検例。肺癌 52:402-408,2012
- 14) 杉野圭史、本間栄：呼吸器疾患に伴う肺高血圧症のマネジメント-3)特発性間質性肺炎に伴う肺高血圧症-. 呼吸器内科,21:193-200,2012
- 15) 本間栄：論評-肺線維症研究の歩み-.東邦医会誌, 59 : 220,2012
- 16) 杉野圭史、本間栄：気腫合併肺線維症：古い概念、新たな理解 THE LUNG perspectives,20:266-269,2012
- 17) 佐野剛、杉野圭史、岩田基秀、関谷宗之、石井真由美、根本哲生、黒崎敦子、植草利公、渋谷和俊、本間栄：EM, CAMの長期投与が無効であった難治性DPBのVATS例. Therapeutic Research,33:15-18,2012
- 18) 佐藤敬太、本間栄：膠原病に伴う気道病変 1) 関節リウマチ.日胸 71 : S221-S225,2012
- 19) 病原性インフルエンザの診断・治療に関する国際連携研究」班平成23年度総括・分担研究報告書, p25-29,2012
- 書籍
- 1) 杉野圭史、本間栄（分担）：Stevens-Johnson症候群発症後に高度の閉塞性換気障害を認めた27歳女性. New 専門医を目指すケース・メソッド・アプローチ 呼吸器疾患 第2版(永井厚志編) p245-251. 日本医事新報社, 東京, 2012
- 2) 村松陽子、本間栄（分担）：薬物治療(治療と薬理メカニズム)：N-アセチルシステイン. 間質性肺炎を究める(滝澤 始編) p150-155. メジカルビュー社, 東京, 2012
2. 学会発表
- 【国際会議】
- 1) Sakae Homma: Pulmonary Involvement in AAV. The Asia Pacific Meeting of

- Vasculitis and ANCA Workshop 2012. Tokyo Japan, 2012.3 (Educational lecture)
- 2) Keita Sato, Aika Suzuki, Emiko Kusano, Keishi Sugino, Susumu Sakamoto, Yujiro Takai, Sakae Homma: Pulmonary manifestations in microscopic polyangiitis. The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012. Tokyo Japan, 2012.3 (AP-VAS 2012 poster Award)
- 3) K. Sugino, T. Ito, Y. Muramatsu, J. Tatebe, T. Morita, K. Matsuda, A. Azuma, S. Homma: Xenon Ventilation Imaging Using Dual-Energy Computed Tomography In Combined Pulmonary Fibrosis And Emphysema. 2012 American Thoracic Society International Conference San Francisco USA, 2012.5
- 4) Y. Muramatsu, K. Sugino, N. Kikuchi, S. Sakaguchi, K. Sato, G. Sano, K. Isobe, S. Sakamoto, Y. Takai, J. Tatebe, T. Morita, S. Homma: Efficacy Of Inhaled N-Acetylcysteine Monotherapy On Lung Function And Redox Balance In Idiopathic Pulmonary Fibrosis. 2012 American Thoracic Society International Conference San Francisco USA, 2012.5
- 管炎の肺病変-. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会, シンポジウム, 神戸, 2012.4
- 4) 村松陽子、杉野圭史、鈴木亜衣香、佐藤敬太、坂本晋、高井雄二郎、建部順子、盛田俊介、本間栄: IPF における NAC 単独吸入療法の効果とレドックス制御. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 2012.4

Ⅱ. 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

【国内会議】

- 1) 本間栄: 難治性呼吸器疾患と感染症. 第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 (教育講演), 東京, 2012.10
- 2) 本間栄、佐藤敬太: リウマチ性疾患の肺病変-血管炎に伴う肺病変-. 第 56 回日本リウマチ学会総会学術集会, シンポジウム, 東京, 2012.4
- 3) 本間栄、佐藤敬太: 膠原病肺とその周辺: 診断と治療の新展開-ANCA 関連血

H5N1 鳥インフルエンザウイルスならびに
A(H1N1)pdm09 インフルエンザウイルス感染症の病理学的解析

研究分担者 中島 典子 国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官
研究協力者 佐藤 由子 国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官

研究要旨：H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症の病態を解明すべく、ベトナムハノイ国立小児病院で 2003-2008 年に H5N1 インフルエンザで死亡した 5 症例のホルマリン固定パラフィン包埋肺組織を解析した。肺病理像では硝子膜形成を伴う慢性肺胞障害が認められた。肺から検出された H5N1-RNA 量は病日が早い例ほど多く、H5N1-RNA 量の多い肺切片では *in situ hybridization* 法および免疫組織化学でウイルス核酸ならびにウイルス抗原が検出できた。インフルエンザ抗原は主に II 型肺胞上皮細胞およびマクロファージ、細気管支上皮細胞、また血管内皮細胞に検出された。肺切片中の TNF α 、IL-6、IL-8、IP-10、RANTES の mRNA をリアルタイム定量 RT-PCR で測定した結果、肺の局所のサイトカイン・ケモカインの発現は H5N1-RNA 量に相関することがわかった。2009H1N1 パンデミックインフルエンザで死亡した剖検例の中で、H5N1 インフルエンザと同様の慢性肺胞障害（DAD）を呈し、ウイルス抗原が肺胞上皮細胞に検出される例が数例あった。発症 8 日目に死亡し、肺胞領域から多量のウイルスゲノムが回収された例において肺で増殖しているウイルスの塩基配列を解析した結果、鳥型レセプターに親和性の高いクローンが major であることがわかった。

A. 研究目的

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの鳥-ヒト感染は今なお続いており、ヒト感染例では鳥-鳥感染でみられるような脳炎や全身感染症は顕著でなく、肺中心にウイルスが増殖することがわかってきた。H5N1 鳥インフルエンザウイルスの病原性や感染動態は宿主動物によってことなるため、ヒト感染の病態を明らかにするためにはヒト剖検組織の病理学的解析が非常に重要である。本研究班で解析している 5 例以外で報

告されている剖検例は香港、中国、タイから報告されている十数例のみである。我々はベトナムハノイ国立小児病院との共同研究で 2003-2008 年に H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡した 5 症例（それぞれ 8、10、13、16、18 病日で死亡）のホルマリン固定パラフィン包埋剖検肺ブロック（2 症例では肝臓、心臓、腎臓、脾臓、腸管、膵臓も）を解析してきた。ベトナムの 5 例のパラフィン包埋組織を病理学的、分子生物学的に解析した結果を報告す

る。2009年にパンデミックになった新型インフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 はヒト、ブタ、トリ由来のインフルエンザウイルスのリアソータントであった。20剖検例の病理学的解析の結果を H5N1 インフルエンザや季節性インフルエンザの病理と比較して報告する。

B. 研究方法

(材料)

・ベトナムハノイ国立小児病院で 2003-2008 年に H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡した 5 症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 肺組織ブロック。

・2009年8月から2010年6月まで国立感染症研究所・感染病理部に病理学的検索を依頼してきた 15 医療機関からの 2009H1N1 インフルエンザウイルス感染症死亡例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織。
倫理委員会承認番号：247

(方法)

①組織病理所見：ヘマトキシリン・エオジン染色およびエラストイカ・マッソン染色により組織所見を観察した。

②免疫組織化学：インフルエンザウイルス NP 抗原、細胞マーカー蛋白および TNF α 、IL-6、IL-8、IP10、RANTES を検出した。

③in situ hybridization A 法:インフルエンザウイルスが増殖しているか確認するために mRNA とゲノム RNA をそれぞれに特異的なオリゴプローブを用いて検出した。

④二重染色：ウイルス抗原陽性細胞を同定するために細胞マーカー蛋白との二重免疫組織化学を施行し共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

⑤パラフィン包埋組織から核酸を抽出し定

量 RT-PCR 法によりウイルス核酸やサイトカイン・ケモカインの mRNA をリアルタイム定量 RT-PCR で解析した。

⑥A(H1N1)pdm 09 剖検肺においてウイルス抗原陽性例に対して、HA のレセプター結合部位のアミノ酸配列の解析をした。

C. 研究結果

①肺病理像:H5N1 剖検例では 5 症例ともに硝子膜形成を伴うび慢性肺障害 (DAD) が認められた。肺の間質に浸潤している細胞の多くは MPO 陽性であり、エラスターゼ陽性の好中球と CD68 陽性の単球系細胞の両方が認められた。A(H1N1)pdm09 剖検例の組織所見としては上気道では炎症と浮腫、上皮の壊死、出血がみられた。必ずしもすべての剖検例の肺組織が DAD を呈しているわけではなく、一部の症例のみで H5N1 同様の DAD が認められた。DAD は呈さず好中球が浸潤する細菌性肺炎を呈するものや、壊死性出血性気管支炎はあっても肺病変としては肺うっ血、肺水腫、肺出血などの非特異的な所見のみの例もあった。

②インフルエンザ NP 抗原の免疫組織化学：病日の早い 3 症例で免疫組織化学でウイルス NP 抗原が検出できた。インフルエンザ抗原は主に II 型肺胞上皮細胞およびマクロファージ、細気管支上皮細胞、また血管内皮細胞に検出された。2 症例では肺以外の組織も解析できたが、ウイルス抗原やウイルス核酸は検出されなかった。A(H1N1)pdm09 例でも A 型インフルエンザウイルス NP 抗原は呼吸器官に限局して検出され、20 例中 10 例で陽性であった。検出部位により H5N1 鳥インフルエンザのように肺胞上皮細胞中心に検出された例、季

節性インフルエンザのように上気道（気管、気管支、気管支腺上皮、細気管支）にのみウイルス抗原が検出された例、両方に検出された例の3つの群に分けられた。硝子膜を形成する急性の DAD を呈した4例ではすべてウイルス抗原が肺胞上皮細胞から検出された

③定量 RT-PCR による組織切片中のウイルス-RNA

5-10 μ m のパラフィン包埋組織切片 3-5 枚から抽出した RNA 中のウイルスコピー数を β アクチンのコピー数とともにリアルタイム RT-PCR 法で解析した。H5N1 例において

は、ウイルス量は病日が早い例ほど多かった。

④定量 RT-PCR による組織切片中のサイトカイン・ケモカイン mRNA 量

1 症例につき、4-5 か所の肺切片中のサイトカイン・ケモカイン（TNF α 、IL-6、IL-8、RANTES、IP10）の発現を解析した。肺の部位によって発現量は異なっていた。病日の早い例で IL-6 と TNF- α の発現量が高かった。同一切片中の各サイトカイン・ケモカイン量と H5N1-RNA 量は相関することが分かった。

| Case | Date of admission (month, year) | Age(year) /sex | Duration of illness (days) | Day of admission | Sample examined | Lung Histology | Laboratory data (upon admission) | | | Treatment | | | Detection of viral-RNA or antigen | | | |
|------|---------------------------------|----------------|----------------------------|------------------|---|---------------------------|----------------------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|-----|-----------------------------------|-----------------------|-----|-----|
| | | | | | | | WBC (/mm ³) | Plt (mm ³) | CRP (mg/dl) | antibiotics | oseltamivir | MSL | qRT-PCR | | IHC | ISH |
| | | | | | | | | | | | | | Bronchial aspirate | FFPE lung copies/cell | | |
| 1 | Dec,2003 | 12/F | 8 | day 6 | lung | DAD (exudative phase) | 2100 | 45 000 | 3.1 | Yes | No | Yes | + | 256 | + | + |
| 2 | Mar,2008 | 11/M | 10 | day 7 | lung, liver, heart, kidney, spleen, intestine, pancreas | DAD (exudative phase) | 1700 | 207 000 | 6.8 | Yes | Yes | Yes | + | 4.89 | + | + |
| 3 | Dec,2007 | 4/M | 13 | day 11 | lung, liver, heart, kidney | DAD (exudative phase) | 2300 | 154 000 | 2.4 | Yes | Yes | Yes | + | 23.1 | + | + |
| 4 | Jul,2004 | 4/M | 16 | day 8 | lung | DAD (proliferation phase) | 2300 | 150 000 | 0.59 | Yes | Yes | Yes | + | 1.05 | - | - |
| 5 | Dec,2003 | 5/M | 18 | day 8 | lung | DAD (proliferation phase) | 3400 | 174 000 | 0.59 | Yes | No | Yes | + | UDL | - | - |

WBC, white blood cell; Plt, Platelet; CRP, C-reactive protein; MSL, methylprednisolone(10mg/kg/day); qRT-PCR, quantitative real-time RT-PCR; IHC, immunohistochemistry ISH, *in situ* hybridization; FFPE, formaline-fixed paraffin-embedded; DAD, diffuse alveolar damage; UDL, under detection limit; and +, positive; -, negative.

表 解析した H5N1 剖検例

⑤サイトカイン・ケモカインの免疫組織化学：サイトカイン・ケモカインを発現する細胞は単球・マクロファージ以外に肺胞上皮細胞、細気管支上皮細胞、血管内皮細胞であった。

⑥2009H1N1 インフルエンザウイルスのレセプター結合部位の解析

気管と肺から HA 部分の塩基配列が異なるクローンが回収された症例があった。気管では 222D が優位であったが、肺では鳥型レセプターに親和性が強い配列の 222G が優位であった。この症例は ARDS を併発し、重症肺炎による呼吸不全で亡くなっている。

D. 考案

ヒトにおいて H5N1 は A(H1N1)pdm09 のように呼吸器に限局して感染するのか、ウイルス血症となり全身感染症となりうるのだろうか。我々の解析した 5 例においては臨床的には致死的な劇症型 ARDS を呈しながら多臓器不全は軽度であり、肺以外の組織に特記すべき病理所見はなかった。H5N1 鳥インフルエンザウイルスに感染し、致死的な感染症を発症する患者の特異性が解明されていない現在、剖検症例を 1 つ 1 つ詳細に解析し、得られた結果を集積していくことが重要である。H5N1 鳥インフルエンザウイルスはより強いサイトカインストームを起こすと報告されているが、解析した肺組織において H5N1-RNA 量に相関してサイトカイン・ケモカインの発現が高いことが分かった。A(H1N1)pdm09 感染剖検例の中に H5N1 例と同様な DAD を呈した症例があった。肺から回収されたインフルエンザウイルスは鳥型レセプターに結合するものであったことは発生初期の新型インフルエンザウイルスはポリクローナルに存在し、その中には鳥インフルエンザウイルスの性質を持つウイルスクローンが含まれていたと考えられた。

E. 結論

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトからヒトに感染したという報告はないが、ヒト→ヒト感染が可能となるウイルスに変異しパンデミックとなる場合を想定して対策が練られている。A(H1N1)pdm09 インフルエンザは肺胞上皮細胞にウイルス抗原が検出された例がみられた点で季節性インフルエンザと異なる。さらに

A(H1N1)pdm09 感染の死亡例は、H5N1 感染の場合のようにすべて肺炎を経発しているわけではなかったことが剖検例の病理学的解析により明らかにされた。今後さらに剖検報告数が増えることにより H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例における病態が解明されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. PLoS One. 23;5(4): p1-9, 2010
- 2) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. Mod Pathol. 2012 Jan;25(1):1-13.

- 3) Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Yamamoto K, Nakajima N, Sato Y, Aratani Y, Oshima M, Sata T, Kobayashi K, Kawachi S, Nakayama T, Suzuki K. Contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiol Immunol.* 2012 Mar;56(3):171-82.
- 4) Ohnishi K, Takahashi Y, Kono N, Nakajima N, Mizukoshi F, Misawa S, Yamamoto T, Mitsuki YY, Fu S, Hirayama N, Ohshima M, Ato M, Kageyama T, Odagiri T, Tashiro M, Kobayashi K, Itamura S, Tsunetsugu-Yokota Y. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus *Jpn J Infect Dis.* 2012;65(1):19-27.
- 5) Ishiwada N, Takada N, Okunushi T, Hishiki H, Katano H, Nakajima N, Kohno Y. Rhabdomyolysis associated with influenza A/H1N1 2009 infection in a pediatric patient *Pediatr Int.* 2012 Oct;54(5):703-5.
- 6) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam *Mod Pathol.* 2012 Nov 23. [Epub ahead of print]
- 7) 中島典子、佐多徹太郎、羽田悟：新型インフルエンザウイルスの病理組織像 *Medical Technology* 2010, 38 巻 6 号 535-536.
- 8) 中島典子、佐藤由子、佐多徹太郎：2009年 H1N1 新型インフルエンザウイルス感染症の病理学的特徴 *医学と薬学* 2010, 63 巻 6 号 845-851.
- 9) 中島典子、佐藤由子、佐多徹太郎：インフルエンザの病理 *臨床と微生物学* 2010,37 巻増刊号 577-583.
- 10) 中島典子、佐多徹太郎：鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染とその病態 *鶏病研究会会報* 2011, 47 巻 2 号 71-77.
- 11) 中島典子、長谷川秀樹：インフルエンザウイルス感染症の病理 *医学のあゆみ* 241 巻 1 号 :37-43, 2012
2. 学会発表
- 【国際会議】
- 1) N Nakajima, Y Sato, H Katano, H Hasagawa and T Sata. Pathological findings of autopsy cases infected with 2009 pandemic influenza A virus in Japan. Options for the control of influenza VII in Hong Kong SAR, China, September 3-7, 2010
- 2) N Nakajima, Ngo Van Tin, Y Sato, Hoang Ngoc Thach, H Katano, Pho Hong Diep, T Kumasaka, Nguyen Trung Thuy, H Hasegawa, Luong Thi San, S Kawachi, Nguyen Thanh Liem, K Suzuki and T Sata. Pathological study of formalin-fixed paraffin-embedded lung tissues with H5N1 influenza infection in Vietnam: Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management(Second isirv Antiviral

Group Conference) (ハノイ・ベトナム)2012年10月

【国内会議】

- 1) 中島典子、羽田悟、飛梅実、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、岩田奈織子、辻隆裕、渡辺正秀、佐多徹太郎。本邦初の新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm) 肺炎の剖検例 第 99 回日本病理学会総会 東京都、4 月 27-29 日 2010
- 2) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、佐多徹太郎。日本の 2009 年新 型インフルエンザウイルス感染症剖検 例の病理
- 3) 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳 島県、11 月 7-9 日、2010
- 4) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷 川秀樹、熊坂利夫、羽田悟、田中伸哉、 笠井孝彦、鄭子文、飯塚利彦、仲里巖、 樋野陽子、濱松晶彦、堀内尚、田中智 之、長谷川章雄、尾矢剛志、佐多徹太 郎。2009H1N1 パンデミックインフル エンザウイルス感染症 20 剖検例の臨 床病理学的解。第 100 回日本病理学会 総会。横浜、4 月、2011。
- 5) 長谷川秀樹、中島典子、佐多徹太郎。イ ンフルエンザウイルス A/H1N1pdm 感 染症の病理学的解析。衛生微生物技 術協議会第 32 回研究会 東京、6 月、 2011
- 6) 長谷川秀樹、中島典子。パンデミックイ ンフルエンザウイルス H1N1/09 感染症 の病理学的解析。第 43 回日本小児感 染症学会総会・学術集会 岡山、10 月、2011
- 7) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、熊坂

利夫、佐多徹太郎、長谷川秀樹。高病 原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス 感染症で死亡したベトナム小児例の病 理学的解析：第 101 回日本病理学会総 会 (東京) 2012 年 4 月

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

インフルエンザウイルス感染抵抗性細胞の解析

研究分担者 大島正道 国立感染症研究所 室長

研究要旨：

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。肺胞由来の細胞株 A549 はインフルエンザウイルスを排除できず死滅するが、一部に死滅を免れる細胞(A549-3S)を見いだした。その細胞をクローン化してウイルス感染の抵抗性メカニズムを解析している。ウイルスの細胞への吸着には差が見られなかったが A549-3S 細胞ではウイルス mRNA の出現過程が遅れる。A549-3S 細胞はウイルス RNA の核移行までの間にウイルス抵抗性を示すことが示唆される。このメカニズムを解析している。

A. 研究目的

現在のインフルエンザウイルスに対する治療薬は主にウイルス蛋白をターゲットとするが、ウイルスは容易に変異を獲得し薬剤耐性を生じる。これに対し、宿主側の蛋白に対する薬剤は薬剤耐性の問題は生じにくい、副作用が問題となる。我々は、肺胞由来細胞株の中に、細胞自体の増殖は親株細胞と同等で、インフルエンザ感染は成立するが死滅は免れる細胞を得ている。この変異細胞のインフルエンザウイルス抑制機構を解明することで、変異を生じやすいウイルス側をターゲットとするのではなく、変異の生じにくい宿主側因子を標的とした治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

(A549-3S細胞の樹立)肺胞由来の細胞株A549細胞はインフルエンザUdorn株 (H3N2) 感染によりほぼ死滅するが、トリプシン存

在下でマルチラウンド感染が可能な状態でも死滅しない細胞集団を得た。その細胞に同様の方法でマルチラウンド感染を繰り返し、限界希釈により細胞クローンをえた。得られた細胞クローンA549-3S株にUdorn株をトリプシン非存在下で感染し、18時間～24時間に蛍光抗体法で染色し感染細胞を観察した。(図1) またウイルス感染後、経時的に培養上清を取り上清に放出されたウイルスのゲノム量及びウイルスタイターを定量PCR及びプラークアッセイにより決定した。(図2)

(ウイルス吸着量測定) A549,A549-3S細胞においてウイルス吸着に違いがあるか調べるために、細胞にウイルスを感染後氷上に一時間静置後に非吸着粒子を除き定量PCRによってゲノム量を測定する。

(ウイルスmRNAの測定) A549,A549-3S細胞にインフルエンザウイルスUdorn株を感染し、継時的にRNAを回収後、定量PCRにてのインフルエンザウイルスmRNA量を測定した。

(抵抗性遺伝子の探索) A549,A549-3S細胞のmRNAの発現の違いをsubtraction法およ

びこれまで多くのsiRNAの実験により報告されている遺伝子を個別に定量的PCRによって探索する。

(誘導発現系による再構成実験)探索によって得られた遺伝子を、プラスミドベクターpA^{bsr},pR^{puro}を遺伝子導入して作製した誘導発現細胞にECIベクターを用いて遺伝子導入しウイルス抵抗性を解析する。

C. 研究結果

①A549細胞にトリプシン存在下でインフルエンザウイルスを感染させインフルエンザウイルス抵抗性細胞クローン(A549-3S#14)を得た。②その細胞クローンにMOI=1,10,20,40でインフルエンザウイルスをチャレンジした。蛍光抗体による感染細胞におけるウイルスタンパクの発現はA549-3Sでは著しく低く、ウイルスの複製が障害されていることが示唆された。(図1)また時系列的に採取した培養上清中のウイルス量をreal-time PCRで測定した。ウイルスゲノム量はA549細胞の1/1000 レベルであった。(図2)

③A549,A549-3S細胞間で細胞表面へのウイルス吸着に違いがあるか調べた。細胞にウイルスを感染後氷上に一時間静置後に非吸着粒子を除き定量PCRによってゲノム量を測定した。両細胞間でウイルスの細胞表面への吸着は同等であった。

④A549-3S細胞においてウイルスに対する抵抗性が発揮されるのが核移行以前か以後か確認する為に、ウイルス感染後継時的に感染細胞からtotal RNAを抽出し定量PCRにて比較した。A549細胞に比べてA549-3S細胞ではウイルスmRNAの出現が数時間遅れることが示された。

⑤A549細胞とA549-3S細胞の違いを調べる為にインフルエンザウイルス感染に必要なと報告されている遺伝子を定量PCRにより定量した。小胞輸送 (ARCN1)、プロトンポンプ(ATP6AP1)、プロテアソーム(PSMA1)、ユビキチン用蛋白(FAU、スプライシング関連蛋白(SF3A1)、タンパク質の核外移行(NU P98)に関する遺伝子発現において両者に違いを認めている。

D. 考案

A549細胞はインフルエンザウイルス許容細胞であるが、われわれはウイルス感染に著しく抵抗性を示すA549-3S細胞を得た。A549,A549-3S間に明らかな表現系の相違は見られず、増殖も同等であることから、両者の違いは細胞増殖に重大な悪影響をおよぼさない遺伝子であると思われる。また両者のこの形質は安定している。この両者を解析することで、一時的に機能を抑制しても宿主に重大な影響を及ぼさずにウイルス感染に対して抵抗性を付与でき、また宿主因子を標的とする為、変異や耐性の生じる可能性が低い宿主因子の解明につながると考えられる。

E. 結論

- ①インフルエンザウイルスUdorn株に著しい抵抗性を示す細胞株A549-3Sが得られた。培養上清のウイルスタイトーは約1/10であった。
- ②一年以上に渡りこの性質は安定である。
- ③A549-3S細胞におけるUdorn株ウイルス抵抗性はウイルス吸着から核移行までの間に示されることが示唆された。
- ④インフルエンザウイルスの生活環前半に一時的に機能を抑制しても宿主に対する影響は軽微であるがインフルエンザ感染を強く抑制可能な宿主因子の存在が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yohko K. Shimizu, Minako Hijikata, Masamichi Oshima, Kazufumi Shimizu, Harvey J. Alter, Robert H. Purcell, Hiroshi Yoshikura, Hak Hotta. Isolation of Human Monoclonal Antibodies to the Envelope E2 Protein of Hepatitis C Virus and Their Characterization. plos one. 07Feb,2013