

H5N1 およびパンデミックウイルスの ウイルス学的解析

研究分担者 河岡義裕 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨

近年、インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性変異として、NA 蛋白質の 117 番目のアミノ酸のイソロイシンからバリンへの変異が明らかになった。そこで、このアミノ酸変異を H5N1 ウイルスに導入し、in vitro、in vivo、in silico で解析した。その結果、117 番目のアミノ酸変異は、ウイルスとオセルタミビルとの結合親和力を弱め、生体内でのオセルタミビル感受性を低下させていることが明らかとなった。

A. 研究目的

抗インフルエンザ薬のオセルタミビルは、インフルエンザの治療に広く使われている。オセルタミビル耐性に関与するウイルス変異として、NA 蛋白質の 274 番目、292 番目のアミノ酸変異が知られているが、近年、117 番目のアミノ酸のイソロイシンからバリンへの変異もオセルタミビル耐性に関与することが明らかになってきた。しかし 117 番目のアミノ酸変異は、オセルタミビル治療中に出現したものではなく、家禽からの分離株で見つかったものであり、その耐性機序は不明な点が多い。そこで、117 番目のアミノ酸変異による耐性化のメカニズムを明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

B. 研究方法

本研究では、遺伝的背景の異なる H5N1

ウイルス 3 株を用いた。

- ・ A/Vietnam/1203/2004
(VN1203, クレード 1)
- ・ A/duck/Vietnam/TY114/2007
(TY114, クレード 2.3.4)
- ・ A/Vietnam/UT31412II/2008
(VN31412, クレード 2.3.4)

各ウイルスの NA 蛋白質の 117 番目のアミノ酸を、イソロイシンからバリンに変えたウイルス (NA-I117V) を作製した。これらのウイルスの NA 酵素活性やオセルタミビル感受性を、in vitro、in vivo および in silico で、それぞれの親株と比較解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、東京大学医科学研究所実験動物委員会の承認のもと、東京大学動物実験規則に従って実施した。

情報は有用となる。

C. 研究結果および考察

in vitro において、NA-I117V 変異による NA 酵素活性は 3 株とも親株と比べ大きな変化はなかったが、オセルタミビル感受性は 1.3-6.3 倍と、わずかであるが低下した。

in vivo では、マウスにおけるオセルタミビル感受性試験により、VN1203 NA-I117V ウイルスと VN31412 NA-I117V ウイルスの 2 株で、親株に比べ感受性が低下した。

さらに、in silico では、分子動力学シミュレーションにより、NA-I117V の変異が NA 蛋白質の 118 番目のアルギニンと、オセルタミビルのカルボキシル基との水素結合を弱め、ウイルスとオセルタミビルの結合親和力の低下をもたらすことが示唆された。

これらの結果から、NA の 117 番目のアミノ酸変異は、オセルタミビルとウイルスの結合親和性を弱めることにより、生体内でのタミフル感受性を低下させていることが明らかとなった。

D. 結論

本研究により、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの NA-I117V によるオセルタミビル耐性メカニズムの新たな知見が得られた。今後、H5N1 ウイルスに感染した患者を治療する際にも本研究で得られた

E. 研究発表

1. 論文発表

Takano R, Kiso M, Igarashi M, Le MQ, Sekijima M, Ito K, Takada A, Kawaoka Y. Molecular mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the neuraminidase of subtype H5N1 avian influenza A viruses. J Infect Dis 207:89-97, 2013.

Sakabe S, Takano R, Nagamura-Inoue T, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1. J Infect Dis 207:262-271, 2013.

2. 学会発表

該当なし

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・治療に 関する研究（重症肺炎・脳症の実験病理学的研究）

研究分担者 新矢恭子 神戸大学・准教授

研究要旨

インフルエンザ脳症（IAE）のメカニズムはまだ不明な点が多い。本研究では、IAV 感染とリポ多糖（LPS）の重投与で、マウスの IAE 様モデルを作成した。本マウスモデルでは、対照群に比べて約 3 倍の脳浮腫と血清中サイトカイン濃度が観察された。遺伝子発現プロファイリングでは、一部の主要なサイトカイン関連遺伝子は脳内で発現上昇しておらず、血液脳関門（BBB）の破壊に関与するとされている蛋白質分解酵素の関連遺伝子の発現上昇が顕著だったことが判明した。遺伝子オントロジー（GO）でイオンチャネル、カルシウム、および膜輸送活動関連に分類される機能群が多く抽出された。したがって、本研究における IAE モデルの BBB 破壊は、サイトカインストームに加えて、神経組織の細胞内電解質の不均衡によって影響を受けている可能性があると考えた。

A. 研究目的

インフルエンザ脳症は、複数の症候群（亜型）の集合体であり、その原因も複数の要因が関わっていると考えられる。近年、マイクロバイオームという概念が提唱され、人体の生物学的恒常性維持における細菌叢の重要性が指摘されている。本研究では、細菌の LPS 暴露後のインフルエンザウイルス重感染を想定し、その脳浮腫発症における影響を調べ、脳内遺伝子発現プロファイリングを行った。

B. 研究方法

ウイルス：A/Puerto Rico/8/34; H1N1。50% マウス致死量（MLD50）は、 6×10^2 pfu/50 μ l。
動物：Balb/c マウス、SPF、5 週令、雌。

実験計画：マウスを 4 グループに分類（①PBS、②インフルエンザ（IAV）、③LPS、④LPS+IAV）し、先ず、PBS または LPS（1.25mg/kg, 100ul volume in PBS）を経鼻投与し、12 時間後に、PBS または IAV（100 MLD50 in 50ul PBS）を経鼻投与した。2 日後に、エバンスブルー（EB; 2% in PBS）を腹腔内投与した後、安楽死させ詳細な検索を行った。

（倫理面への配慮）本実験は、学内の動物実験承認を得た（承認番号：P110910）。

脳浮腫の検証：マウスの脳 1.54g を、500 μ l ホルムアミド内で 2 日間 38°C で EB を抽出した（630nm 波長フィルターで測定）。

免疫染色（IHC）：肺と脳組織を 10% 中性緩衝

ホルマリンで固定し、常法に従って、パラフィン包埋した。薄切片に対し、抗 H1 ウイルス抗体を用いた免疫染色を行った。

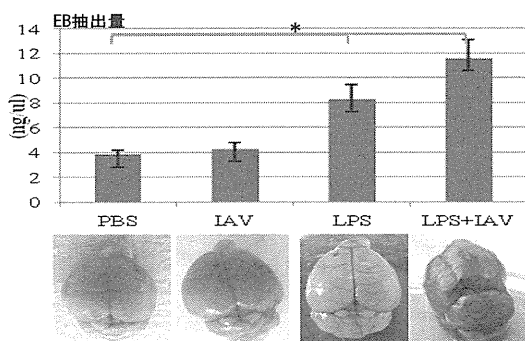
ウイルス学的検索：MDCK 細胞を用いたブラック法を行った。

血清サイトカイン濃度測定：血清 50 μ l を用いて ELISA 法により IL-6 および TNF- α 濃度を測定した (Quantikine Mouse Immunoassay; R&D Systems, USA)。

RNA 抽出とマイクロアレイ解析：脳幹部分を採取し、全 RNA 抽出キットにて RNA を抽出した (Agilent Technologies, USA)。タカラバイオにマイクロアレイ解析を委託した (Agilent Expression Array、SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray)。データマイニングは、Subioplatform (Subio Inc., Japan) を活用した。その後、Gene ontology (GO) 解析を行った (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)。

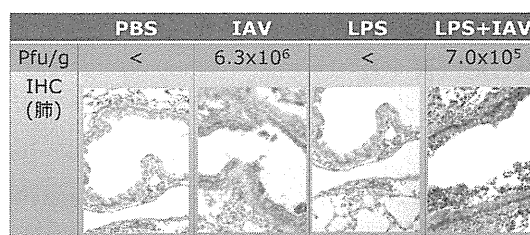
C. 研究結果

脳浮腫の評価：LPS+IAV 群において、他群と比較して強い脳浮腫が認められた (図 1)。



(図 1)

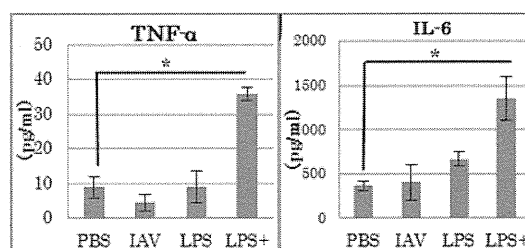
ウイルス学的/病理学的検索結果：ウイルス感染群では、LPS 処理の有無に関わらず肺へのウイルスの感染が確認された。脳ではウイルスが検出されなかった (図 2)。



<: 検出限界以下

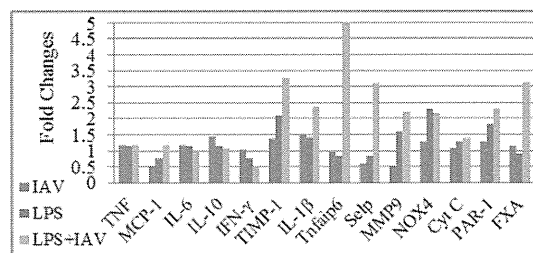
(図 2)

血清中サイトカイン濃度：LPS+IAV 群において、血清中、IL-6・TNF α の著しい増加が見られた (図 3)。



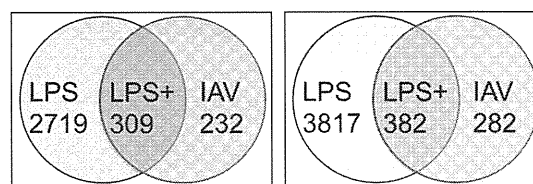
(図 3)

脳内遺伝子発現：TNF- α 、IL-6、IL-10 などの主要サイトカイン関連の遺伝子は変動がなかった (図 4)。上記結果より、本モデルでは、インフルエンザ感染を伴った脳症の病態が再現されていると判断した。



(図 4)

LPS+IAV 群に特異的な遺伝子動態として、309 個の発現上昇、382 個の発現減少が観察された (図 5)。



(図 5)

GO 解析によって、LPS+IAV 群に特異的に発現変動している遺伝子群は、主に、channel

activities、calcium、ion 等であることが判明した (表 1)。

表 1

- calcium ion binding
- passive transmembrane transporter activity
- substrate specific channel activity
- ion channel activity
- gated channel activity
- cation channel activity
- voltage-gated channel activity
- Voltage-gated ion channel activity
- SH3 domain binding
- calcium channel activity
- ion binding
- metal ion binding

Up-regulated Gene Expression

- calcium ion binding
- channel activity
- passive transmembrane transporter activity
- substrate specific channel activity
- ion channel activity
- calcium channel activity
- cation channel activity
- ion binding
- gated channel activity
- metal ion binding
- voltage-gated channel activity
- Voltage-gated ion channel activity
- SH3 domain binding

Down-regulated Gene Expression

D. 考察

本モデルでは、IAV または LPS の単独投与時よりも、重投与時において、強い脳浮腫が惹起されることが示された。この病態には血清サイトカイン量の増加も伴っていた。ただし、脳組織内での主要サイトカイン関連遺伝子にはあまり変化が見られなかった。脳浮腫病態発現において、高サイトカインの一次供給場所が末梢で、中枢は末梢の高サイトカイン発現に対する二次的な反応である可能性が示された。

また、本モデル解析により、主要な発現

変動遺伝子が、calcium、ion および channel の機能に分類されることが判明した。Ca²⁺ は、BBB における機能的恒常性維持に重要であると言われており、本 IAE モデルの BBB 破壊には、サイトカインに加えて、神経組織の細胞内電解質の不均衡が影響している可能性があると考えた。

E. 結論

本モデルは、ひとつの IAE 病態モデルとなり得ると考える。本モデルにおける BBB 破壊は、血中高サイトカイン濃度に加えカルシウム代謝の不均衡が関与している可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shinya K, et al., Integrated clinical, pathologic, virologic, and transcriptomic analysis of H5N1 influenza virus-induced viral pneumonia in the rhesus macaque J Virol. 2012; 86(11): 6055-66.

2. 学会発表

該当なし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析

分担研究者 荏田泰誠

所属・役職 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・チームリーダー

研究要旨

インフルエンザ脳症の発症に関連する遺伝子を、全ゲノム領域を対象とした一塩基多型（SNP）解析にて同定し、インフルエンザ脳症の発症リスクを事前に予測するツールを開発することを目的としている。本年度は、候補遺伝子解析として、インフルエンザ脳症や熱中症の発症リスクと関連することが報告されている carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) 上の SNP について関連解析を実施した。

A. 研究目的

日本においてインフルエンザの学童罹患数は、年間 50 万から 100 万人である。そのうち 100 から 300 人がインフルエンザ脳症を合併する。インフルエンザ脳症の死亡率は 30%前後と高く、生存例においても重篤な後遺症を残す症例が多いため社会的関心が高まっている。

インフルエンザ脳症の詳細な発症機序は不明であるが、日本人での報告が多いことから遺伝的因子が関与していると考えられる。本研究では、インフルエンザ脳症の発症リスクに関連する遺伝子を同定するため、一塩基多型（SNP）を用いて、全ゲノム領域を対象とした関連解析（genome-wide association study: GWAS）を行う。インフルエンザ脳症の発症における遺伝的背景を解明することができれば、ハイリスク群を事前に特定でき、ワクチン接種等の積極的な予防が可能となる。また、感受性遺伝子の同定は、インフルエンザ脳症の新たな治療法の開発にもつながることが期待される。

B. 研究方法

研究対象

インフルエンザ脳症を発症した 1 歳以上の日本人小児 85 症例。コントロール群には日本人一般集団 940 例を用いた。

SNP 解析

本年度は、日本人においてインフルエンザ脳症や熱中症の発症リスクと関連することが報告されている carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) (Chen *et al.* *FEBS Lett* 579:2040-4 (2005)) について、アミノ酸置換を伴う 3 SNP (F352C、I368V、M647V) のケース-コントロール関連解析を行った。また、国際 HapMap データベースの情報に基づいて CPT2 周辺領域の 17 箇所の TagSNP を抽出し、関連解析を行った。

（倫理面への配慮）

I. 研究等の対象とする個人の人権擁護

本研究に同意するか否かは本人（対象が 16 歳未満の場合は、本人および代諾者）の全くの自由意志に委ねられ、同意しない場

合であってもいかなる不利益も被ることはないことを保証する。本研究は連結可能匿名化を行う。個人識別情報は、担当者が厳重に保管・管理し、外部へは決して提供しない。また、同意はいつでも撤回できることを保証する。同意が撤回された場合は、すみやかに検体をオートクレーブにかけ廃棄する。

II. 研究への参加者に理解を求め同意を得る方法

検体の提供を受ける際には、説明文書を用いて提供者（16歳未満の場合は、提供者および代諾者）との質疑応答を経て、本研究についてじゅうぶんに理解されたことを確認した後、同意を得る。これらの説明文書では、本研究の意義、目的、遺伝子解析などについて解説し、プライバシーの保護の方法、提供者の権利、研究に協力することの利益と不利益、本研究終了後の検体の取り扱い方針について説明する。同意をいただいた方には、同意書に自署をお願いする。同意書は、鍵のかかるロッカーにて厳重に保管・管理する。

III. 研究によって生じる個人への不利益ならびに危険性と科学的な貢献の予測

本研究成果により、インフルエンザ脳症の感受性遺伝子が同定されれば、ハイリスク群をスクリーニングすることが可能となる。インフルエンザの感染予防に対してはワクチンの接種という非常に有効な予防法が存在するため、ハイリスク群に対しては積極的にワクチン接種をすすめることにより、インフルエンザ脳症の罹患を予防することが可能となる。

また、感受性遺伝子の同定は、その遺伝子またはカスケードをターゲットとした新たな治療法の確立にも貢献すると確信する。

個人情報の漏洩により人権の侵害を被る

可能性があるが、本研究では、担当者が個人情報に厳重に保管・管理し、個人情報・プライバシーの保護には万全をつくす。

インフルエンザ脳症は、ほとんどが10歳までの発症であり、遺伝的背景を研究することは、患者の健康に対して利益はあるものの、その後の社会的な不利益や危険性があるとは常識的に考えられない。

IV. 遺伝カウンセリング体制の整備

個人情報の管理に記したように、本研究の結果を提供者が知ることにより提供者や血縁者の生命の危機を回避できる可能性がある。この場合には、遺伝子情報を提供者や家族に報告する可能性がある。そのような遺伝情報を知ることは、生命危機を回避することを目的にしているため、患者および家族の利益となるが、そのことを正確に理解し、受け入れることを支援するために日本遺伝カウンセリング学会認定医が遺伝カウンセリングを行う体制を整備している。

V. 研究終了後の検体の取り扱い

提供者の承諾が得られた場合に限り将来の本研究以外のインフルエンザ脳症に関連した医学研究に用いることがある。ただし、その場合は連結不可能匿名化を行う。研究終了後の保管に関しては、説明文書を用いて提供者（16歳未満の場合は、提供者および代諾者）に十分説明する。

研究終了後の検体の保管を承諾されなかった場合には、すみやかに検体をオートクレーブにかけ破棄する。

C. 研究結果

GPT2 上の3箇所のSNP (F352C、I368V、M647V) において、インフルエンザ脳症の発症リスクとの関連が報告されている Type 9 (F/C、I/V、M/M) の遺伝子型頻度には、ケース群 (7.1%) とコントロール群 (10.9%)

との間で有意な差は見られなかった。また、*GPT2* 周辺領域の TagSNP 解析を実施したが、インフルエンザ脳症の発症リスクとの有意な関連は見られなかった。

D. 考察

今後は、以前実施した、日本人小児インフルエンザ脳症患者を対象とした GWAS における、新たな DNA サンプルを用いた replication study の継続、インフルエンザ脳症の発症メカニズムに関連すると考えられる候補遺伝子についての解析を実施する予定である。

E. 結論

日本人小児インフルエンザ脳症患者を対象とした、SNP を利用した *GPT2* の関連解析において、発症リスクとの有意な関連は見られなかった。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

サイトカインによる肺微小血管内皮細胞機能障害とその抑制

研究分担者 森島恒雄

研究協力者: 斎藤有希恵、山田睦子、藤井洋輔、八代将登、塚原宏一

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児医科学)

研究要旨

インフルエンザウイルス A/H1N1 2009 pdm 感染では、ARDS や鑄型気管支炎を合併した症例報告の増加が特徴的であった。ARDS など肺血管透過性の亢進に対する効果的な薬物療法は確立されておらず、今回我々はサイトカインや種々の薬物が肺血管透過性に及ぼす影響について *in vitro* で検討した。

結果: インフルエンザ感染時に産生されるサイトカインによって、肺血管透過性は亢進した。ステロイドやエダラボン、NOS 阻害剤の前投与によって透過性の亢進は抑制された。免疫蛍光抗体法でステロイドやエダラボンによる細胞間接着の構成分子の強化作用が示唆された。

結論: 脳症や ARDS などの重症インフルエンザ感染症では、血管透過性の亢進が病態に関与している。ステロイドやエダラボン投与により、血管透過性そのものを改善できる可能性が示唆された。高病原性トリインフルエンザなどの病態解析や治療開発にも応用可能と考えられた。

A. 研究目的

2009 年に流行したインフルエンザウイルス A/H1N1 pdm 感染では、小児や基礎疾患を有する患者を中心に重症肺炎を呈する症例が多くみられた。また、ARDS や鑄型気管支炎を合併した症例報告の増加が特徴的であった。

ARDS など、肺血管透過性の亢進が関与していると考えられる病態の効果的な薬物療法は確立されておらず、今回我々はヒト肺由来微小血管内皮細胞を用いて、インフルエンザウイルスやサイトカイン、種々の薬剤が肺血管透過性に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

透過性はポイデンチャンバーを用いて評価した。2 層のウェルで、底面に $3\mu\text{m}$ の pore があいた膜で構成される上室に肺微小血管内皮細胞を培養し、3 日後、コンフルエントの状態に刺激物質を含む培地に交換した。24 時間後、上室に蛍光標識したデキストランを投与し、2 時間後に下室に漏れ出したデキストランの蛍光度を測定した。透過性の評価は $\text{Permeability Index} = [\text{experimental clearance}]$

$-\text{[spontaneous clearance]} / [\text{clearance of filter alone}] - [\text{spontaneous clearance}] \times 100$ として計算し比較した。また、透過性の変化が起こる機序について、mRNA の発現変化や、細胞間接着の構成分子の変化を検討した。

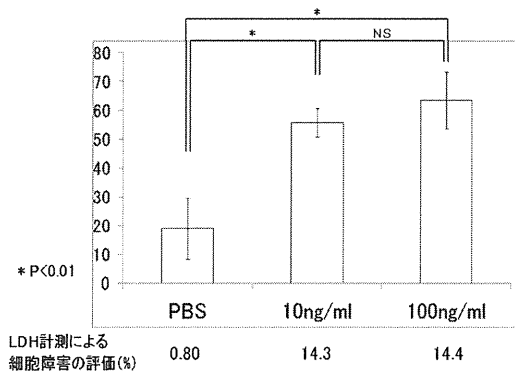
C. 研究結果

インフルエンザウイルスのヒト肺毛細血管内皮細胞での増殖は確認できなかった。TNF- α + IL-1 β (各 10ng/ml) 投与によって血管透過性は亢進した(図 1)。デキサメサゾン ($100\mu\text{M}$) やフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボン ($100\mu\text{M}$)、NO 合成酵素阻害剤の L-NMMA ($100\mu\text{M}$) を前投与することで、サイトカインによる透過性亢進は抑制された(図 2、3、4)。

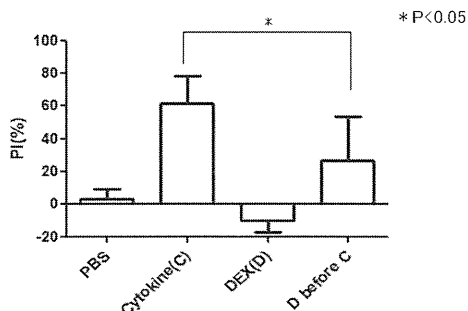
TNF- α + IL-1 β 投与後、経時的に mRNA の発現変化を検討した。MMP-9 は 24 時間後までに mRNA の発現変化は認められず、培養上清の蛋白も感度以下であった。一方、TNF- α + IL-1 β 投与後 1~3 時間後から、ICAM1、VCAM1、IL-8、MCP-1 といった接着分子やケモカインの mRNA 発現が増強し、培養上清中の蛋白濃度も上昇を認めた。

デキサメサゾンやエダラボンの前投与群では、サイトカインのみ投与した群と比較して、免疫蛍光抗体法で adherence junction の主要な構成分子である VE-Cadherin や tight junction の構成分子である ZO-1 が保持されていた(図 5、6)。また、サイトカイン投与 3 時間後のリアルタイム PCR で、デキサメサゾンとエダラボンの前投与群ではサイトカインのみの群と比較して有意に ZO-1 発現の増強を認めた(図 7)。

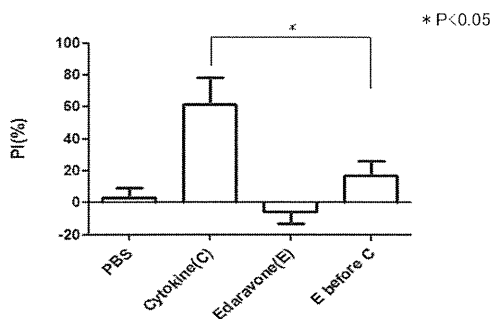
(図1) TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



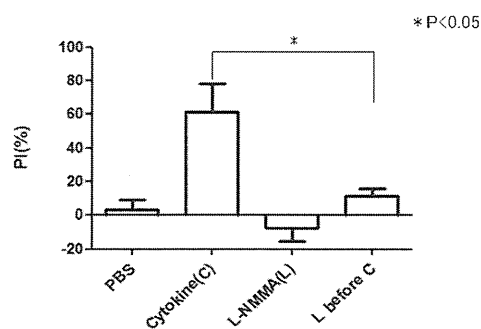
(図2) Dexamethasone(100 μ M) 前投与下での TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



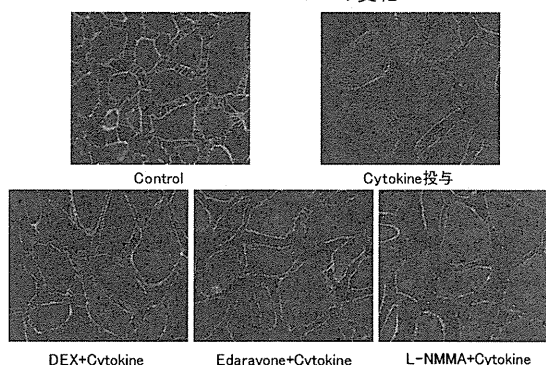
(図3) Edaravone(100 μ M) 前投与下での TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



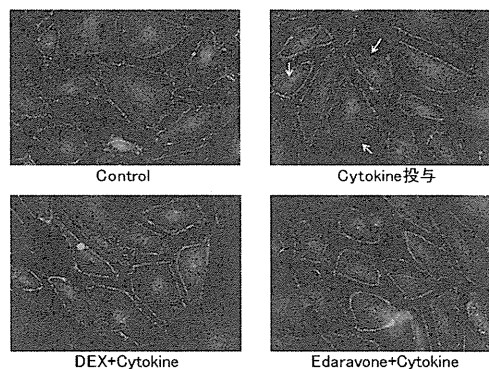
(図4) L-NMMA(1mM) 前投与下での TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の透過性の変化



(図5) TNF- α +IL-1 β 添加24時間後の VE-Cadherin の変化

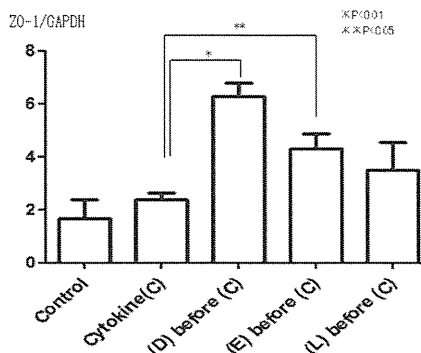


(図6) サイトカイン添加24時間後のZO-1 の変化



(図7) ZO-1 mRNA の変化

②薬剤+サイトカイン投与3h後のリアルタイムPCR



D. 考察

我々は以前の報告(Tsugeら)で、サイトカイン(特にTNF- α)によるMMP-9の高発現が脳血液関門の破壊につながることを示しているが、肺微小血管内皮細胞では、透過性亢進時にMMP-9のmRNA発現は誘導されず、脳血管とは異なる機序が推定された。

デキサメサゾンやエダラボンによる透過性の抑制の1つの機序として、VE-Cadherinの保持作用やZO-1発現増強を介した細胞間接着機能の回復促進作用が考えられた。ヒトの臍帯静脈血管内皮細胞において、エダラボン投与によりadherence junctionの構成分子の発現が増強し電気抵抗が上昇することが報告されており、今回の肺血管内皮細胞でも同様の結果が得られた。

E. 結論

インフルエンザウイルス感染時に産生されるTNF- α およびIL-1 β により肺血管透過性は亢進し、ステロイドやエダラボン、NOS阻害剤の前投与によって抑制された。透過性亢進には脳血管とは異なる機序が推定された。ステロイドやエダラボンによる透過性の抑制は、adherence junctionやtight junctionの構成成分

子の強化によることが示唆された。これらの研究は、肺障害性の高い高病原性トリインフルエンザなどの病態解析や治療開発にも応用可能と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)

2. 学会発表

(1) 齊藤有希恵, 津下 充, 藤井洋輔, 長岡義晴, 八代将登, 塚原宏一, 森島恒雄. サイトカインによる肺血管内皮細胞機能障害のメカニズム. 第44回日本小児感染症学会, 小倉, 2012年(11月).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ —剖検例からわかること—

研究分担者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所・感染病理部 部長
研究協力者 中島 典子 国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官

研究要旨：

2000年から2012年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されたインフルエンザ死亡例のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）標本を解析した。近年、パラフィン包埋組織からも効率よく核酸が抽出できるようになり、リアルタイム RT-PCR 法による定量解析が可能となった。新しい解析法によりインフルエンザウイルスのゲノムは呼吸器官に限定して検出され、インフルエンザ脳症の剖検脳組織切片からは検出されないことが再確認された。季節性インフルエンザで併発する肺炎の肺組織において、肺胞上皮細胞にウイルス抗原は検出されない。パンデミックインフルエンザの一部の剖検組織では病理組織学的にび慢性肺胞障害を呈し、肺胞上皮細胞にウイルス抗原が検出された。ウイルス側の重症化因子として肺胞上皮細胞に感染するクローン場合はウイルス性肺炎を併発し重症化すること挙げられる。インフルエンザ脳症の発症機構の1つにサイトカインストームが関与していることが推測されているが、血液および髄液中の IL-6 値が非常に高かった脳症例では、パラフィン包埋肺組織と脳組織における IL-6 mRNA 量を比較すると脳組織で発現がより高いことがわかった。

A. 研究目的

一般に、インフルエンザで死亡する例は高齢者に多く、二次性の細菌性肺炎の併発や基礎疾患の増悪が原因と考えられており、剖検組織の病理学的解析はほとんどされてこなかった。2000年以降は小児の脳症死亡例が増加し、脳症の病態の解析が急務となり、インフルエンザ剖検例の報告がみられるようになった。さらに致死率 50%以上の鳥インフルエンザや 2009 年のパンデミックインフルエンザによる死亡例の病理学的解析の報告が加わり、重症インフルエンザの病態の解明に助けとなる知見が集積し

つある。本研究班において我々の分担研究の目的は、集積されたインフルエンザ剖検組織の解析により重症インフルエンザの病態を解明することである。これまで国立感染症研究所に依頼され検査したインフルエンザ脳症、インフルエンザに併発する心筋炎、H5N1 インフルエンザ、パンデミックインフルエンザなどの剖検組織標本を新しい分子病理学的解析などにより再度解析し、新しい知見を得たいと考えている。

B. 研究方法

1. 材料：2000年から2012年まで国立感

感染症研究所・感染病理部に病理学的検索を依頼された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) 病理標本。

2. 方法

- ①ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色標本による組織所見。
- ②免疫組織化学および in situ hybridization 法によるウイルス抗原・ウイルス核酸の体内および組織内分布の解析。
- ③細胞マーカー蛋白抗体との二重染色による感染細胞同定。
- ④FFPE 組織切片中のインフルエンザウイルスおよび IL-6 mRNA などサイトカイン・ケモカインの定量。

C. 研究結果

1. 51 例の発症年代別分布

2000 年から 2012 年まで計 51 例のインフルエンザ死亡例の病理学的検索が依頼された。2000-2002 年では小児脳症例が多く、2009-2011 年ではパンデミックインフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 感染症が 32 例であった(図)。

2. インフルエンザ脳症の病理

脳：19 例の脳症の脳組織において、炎症細胞の浸潤はなく、血管壁の硝子化、血漿成分の漏出と微小繊維素血栓がみられた。一部の神経細胞の変性とグリア細胞反応もみられた。免疫組織化学でウイルス抗原は検出されず、パラフィン切片中のウイルスゲノムも陰性であった。脳病理所見は季節性インフルエンザウイルスによる脳症でも A(H1N1)pdm09 ウイルスによる脳症でも同様であった。

気管・気管支・肺：気管・気管支には炎症所見があり、気管・気管支上皮細胞にインフルエンザウイルス抗原が検出された。肺野においては、肺胞病変は少なく、肺胞上皮細胞にウイルス抗原は検出されなかった。二次性細菌性肺炎の併発例が見られたものはあった。

3. 気管・気管支病変

インフルエンザ死亡例の全例で気管・気管支病変が見られた。上皮の剥離、軽度の炎症、うっ血、出血、浮腫がみられるものから壊死性出血性気管支炎像が見られた例もあった。死亡病日の早い例ではウイルス抗原が気管・気管支上皮細胞や気管支腺上皮細胞に検出された。A(H1N1)pdm09 インフルエンザでは好酸球の浸潤が目立つ例が多かった。

4. 肺病変

A(H1N1)pdm09 インフルエンザの一部の症例は H5N1 インフルエンザの肺胞病変のように、浮腫、硝子膜形成、出血、うっ血、炎症、線維化という一連のび慢性肺胞傷害 (DAD) の所見が認められた。病日の早い例では DAD の滲出期病変が、10 病日以降の症例では DAD の増殖期病変が見られた。病日の早い例ではウイルス抗原が肺胞上皮細胞やマクロファージに検出され、インフルエンザウイルスが肺胞上皮細胞に感染し、一次性のウイルス性肺炎を呈していることがわかった。肺胞上皮細胞には $\alpha 2,3$ -シアル酸に結合するインフルエンザウイルス亜型のみ感染し、A(H1N1) pdm09 ウイルス感染の一部のクローンと鳥インフルエンザウイルス (H5N1) がこれにあたる。

A(H1N1)pdm09 インフルエンザのその他の症例では季節性インフルエンザの肺病

変のように、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。ウイルス抗原は気管支から細気管支上皮細胞に検出されても肺胞上皮細胞には検出されなかった。

A(H1N1)pdm09 インフルエンザの重症化因子として気管支ぜんそくが報告されているが、気管支喘息の所見のある肺で、インフルエンザ抗原が気管支上皮細胞の核に検出された症例があった。気道内にはがれおちた気管支上皮細胞、血球、タンパク成分、好酸球、炎症細胞が気道内を充満し、閉塞していた。

5. ウイルスの体内分布

季節性インフルエンザ、A(H1N1)pdm09 インフルエンザともにウイルス抗原は呼吸器官に限局して検出された。ウイルス血症もみとめられなかった。

6. 脳症剖検脳組織における IL-6mRNA の発現

脳症例でも脳組織において IL-6mRNA の発現が亢進しているものから検出されないものまでさまざまであった。血液・髄液中の IL-6 蛋白が高いものでは脳組織での IL-6 mRNA が高かった。

D. 考察

重症インフルエンザとして、肺炎、脳症、臨床的心筋炎(病理所見がない場合が多い)がある。インフルエンザ重症肺炎は原因としウイルスが肺胞上皮細胞に感染しておこる。H5N1 感染例では肺組織におけるサイトカイン・ケモカインの発現が亢進しており、サイトカインストームの関与が考えられた。脳症や心筋炎症状はウイルスの直接作用で

はない。発熱当日や翌日に痙攣や不整脈の症状が出ることが多く、上気道症状のようにすべての感染者に併発するものではないため、何らかの宿主因子が想定される。

E. 結論

パラフィン切片から効率よく核酸を抽出できるようになり、リアルタイム RT-PCR 法や次世代シーケンス法による解析で病理標本から追加情報が得られるようになった。重症インフルエンザの死因は呼吸不全だけではなく、脳症や心機能障害(臨床的には心筋炎の疑い)の場合も多い。ウイルス感染とこれらの症状がどのように関連するか、サイトカイン・ケモカインなどの関与など病理組織を用いて検索していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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]

2. Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. J Med Virol. 2012 Feb;84(2):336-44.

3. Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X,

- Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. ACS Chem Biol. 2012 Jan 13.
4. van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. Vaccine. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
5. Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. Blood. 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
6. Ishiwada N, Takada N, Okunishi 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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 : 4/7, 2012
2. 学会発表
・ 国際会議
1. Pathological study of formalin-fixed paraffin-embedded lung tissues with H5N1 influenza infection in Vietnam: Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutaka Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy, Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki and Tetsutaro Sata 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) 長谷川秀樹:次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 2) 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、相内章、長谷川秀樹、田代真人:細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 3) 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹:喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 4) 池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹:基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 5) 泉地恭輔、相内章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹:経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析。第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012年11月
- 6) 鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹:インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型IgA抗体の性状解析。第16回日本ワクチン

学会学術総会(横浜)2012年11月

- 7) 相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹:感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響。第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012年11月
- 8) Elly van Riet, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H: Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012年11月
- 9) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T: Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012年11月
- 10) 浅沼秀樹、相内章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代真人:野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討。第16回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012年11月
- 11) 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内章、藤本陽、千葉丈:インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究~長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討~第16回日本ワクチン学会

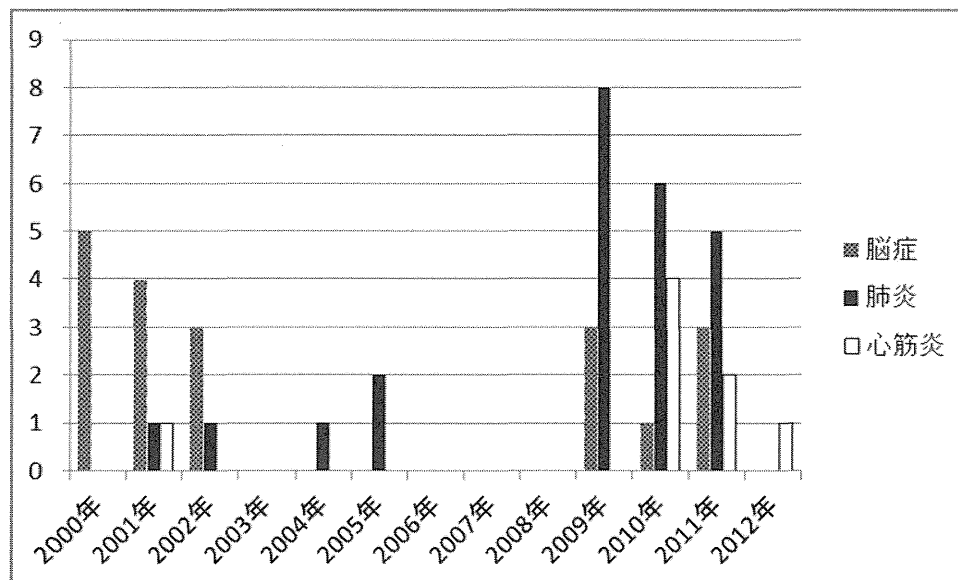
学術総会（横浜）2012年11月

- 12) 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：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 第101回日本病理学会総会（東京）2012年4月

G. 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

図. 2000年から2012年に検索依頼のあったインフルエンザ剖検例



喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染による 気管支喘息発作重症化の病態解析

研究分担者 長谷川俊史 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・准教授
研究協力者 市山高志 鼓ヶ浦こども医療福祉センター・副院長
岡田清吾 山口大学大学院医学系研究科小児科学分野・助教

研究要旨

【目的】 2009年世界的に流行した新型インフルエンザ（2009 pandemic H1N1, A(H1N1) pdm09）は季節性インフルエンザに比し呼吸器合併症が多く、当科においても喘息症例での重症化が多くみられたが、その病態はいまだ明らかでない。本研究ではその病態解明のため、新型インフルエンザ感染喘息マウスの気管支肺胞洗浄液（BAL）を解析した。

【方法】 BALB/c マウスを卵白アルブミンの感作および吸入により喘息モデルマウスを作成し、新型インフルエンザを感染させ、感染後7日にBALを回収した。サイトカイン濃度、ウィルスカ価を測定し、喘息感染群、喘息非感染群、非喘息感染群、非喘息非感染群の4群間で比較検討した。

【結果】 感染群では非感染群に比しBAL中IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ の濃度が有意に高値だった。喘息感染群ではIL-6, IL-10, TNF- α 濃度が非喘息感染群に比し有意に高値だったが、IFN- γ 濃度は有意に低値だった。BAL中ウィルスカ価は喘息感染群が非喘息感染群に比し有意に高値だった。

【結論】 新型インフルエンザ感染は喘息モデルマウスにおいてより高いサイトカイン産生およびウィルス増殖を示し、強い炎症を惹起し、呼吸器症状を重篤化させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

新型インフルエンザ（2009 pandemic H1N1, A(H1N1) pdm09）感染では呼吸器症状を主訴に受診する患者が多く、ときに致命的になる。気管支喘息がその増悪因子の一つと考えられているが、その病態の詳細に

については未だ不明である。申請者らが当科に入院した新型インフルエンザ感染入院症例について後方視的に検討したところ、季節性インフルエンザに比し、有意に喘息発作、肺炎や無気肺などの肺合併症が多く、また通常の喘息発作症例に比し、高率に重

篤な気管支喘息発作を合併したことを報告した (Pediatr Allergy Immunol, 2011). 肺合併症を来した全例で血清総 IgE 値が上昇しており, このうち約 70%が気管支喘息と診断されていなかった症例や 1 年以上発作のなかった症例であった (Hasegawa S., et al. Pediatr Allergy Immunol, 2011). 以上のことから新型インフルエンザ感染においては季節性インフルエンザと異なり喘息発作の重症化は気管支喘息の重症度と関係なく一見基礎疾患のないようにみえる軽症の気管支喘息であっても重篤な肺合併症の危険因子である可能性が示唆された. しかしその病態は十分解明されておらず, 予防法もまだ確立されていない.

B. 研究方法

卵白アルブミン (OVA) で喘息モデルマウスを作製し, 新型インフルエンザウイルス(マウス馴化株, 国立感染症研究所から分与) を経鼻感染 (1×10^6 pfu/マウス) させ, 感染後 7 日めに気管支肺胞洗浄液を回収し, フローサイトメトリー, プラークアッセイ, サイトカイン測定を行い, 喘息マウスと非喘息マウスの差異について比較検討する.

(倫理面への配慮)

本研究では培養細胞およびマウスを使用する. マウスの感染実験に関しては敷地内に動物実験施設があり, 研究を行っていく上で同施設内の倫理的かつ技術的な講習を受講し, 研究計画審査を受け, 承認を得たあと本研究を遂行した.

C. 研究結果

分担者らは卵白アルブミンを用いて喘息モデルマウスを作製し (喘息モデルマウスの作製は気管支肺胞洗浄液中の細胞増多, 特に好酸球の増多により確認), 新型イン

フルエンザウイルスを感染させたところ非喘息マウスに比して気管支肺胞洗浄液において炎症性サイトカインの interleukin (IL)-6 が有意に高値であった. Tumor necrosis factor (TNF)- α および抗炎症性サイトカインの IL-10 も同様の結果であった. 一方で Th1 タイプのサイトカインである interferon (IFN)- γ 濃度は感染喘息マウスで有意に低値であった. また感染喘息マウスでは非喘息マウスに比して気管支肺胞洗浄液中ウイルス力価が有意に高値であった.

D. 考察

以上の結果から分担者らが作製したモデルマウスは新型インフルエンザ感染喘息モデルマウスでは感染非喘息マウスに比し, 肺において Th1 細胞活性化低下により強いサイトカイン産生およびウイルス増殖を来し, より強い炎症が惹起されることが示唆され, このモデルマウスは小児気管支喘息患者における新型インフルエンザ感染症例のモデルとして矛盾はないと考える.

E. 結論

新型インフルエンザ感染は喘息モデルマウスにおいて非喘息マウスに比して, より強い細胞浸潤やより高いサイトカイン産生, ウイルス増殖を示し, 強い炎症を惹起し, 呼吸器症状を重篤化させている可能性が示唆された.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Oka M, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Ishikawa N, Isumi H, Ichiyama T. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of children with acute disseminated encephalomyelitis.