

## 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の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

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

ヘマトキシリンエオジン（HE）染色標本による組織所見。

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。

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。

FFPE 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 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、肺水種、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起こる。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も多く、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

