

**重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：  
検体収集とインフルエンザ重症化バイオマーカーの検索**

研究分担者 西村秀一  
国立病院機構仙台医療センター 臨床研究部ウイルス疾患研究室長

**研究要旨**

1) 肺炎・脳症・多臓器不全のきっかけとなる「血管内皮細胞障害」の発症因子の解明と早期診断マーカーの候補である Flu Alarmin を、実際の患者血清等を対象に検索するための下準備を行った。まずは、これまでの本研究班における重症化にかかわる遺伝子候補の検索において、脳症を含む多臓器不全にかかわる因子として検討されてきた CPT2 遺伝子や Toll-like Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の解析を行う目的で、小児科のインフルエンザの二峰性発熱研究グループや内科の成人・高齢者の肺炎研究グループ等との連携により、多方面で発症急性期の気道分泌液や血液検体等の検体収集を行った。

2) インフルエンザウイルスの最初の感染病巣のひとつとして重要な組織であり、細胞自らが産生する蛋白分解酵素がウイルスの感染に重要な働きを持つことが知られている実際のヒト呼吸器上皮細胞を実験系として得るために、病理解剖由来のヒト気管支細胞の初代培養を試み、3人のドナー由来の、気管支上皮細胞を凍結保存した。さらに、これらについて培養時にレンチウイルスベクターを用いて SV40 の Large T 抗原遺伝子の導入による不死化を試みている。

インフルエンザ脳症の重症化にかかわる因子としての異所性トリプシン産生にかかわるエンテロキナーゼを産生する細胞として知られるヒト十二指腸上皮細胞を得る目的で、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の初代培養を試み成功した。それらの細胞についても、凍結保存するとともに不死化を試みている

**研究協力者**

- ・ 山谷睦夫 東北大学大学院医学系研究科先進感染症予防学寄附講座 教授
- ・ 織田慶子 川崎医科大学附属川崎病院小児科医師
- ・ 高橋洋 宮城厚生協会坂総合病院呼吸器科部長
- ・ 武田和憲 国立病院機構仙台医療センター臨床研究部長
- ・ 手島伸 同上 外科医長

**A . 研究目的**

1) 新型インフルエンザや高病原性鳥インフルエンザの出現とその流行による肺炎・脳症・多臓器不全の多発が危惧され、健康危機管理としての対策が急がれている。本研究では、肺炎・脳症・多臓器不全のきっかけとなる「血管内皮細胞障害」の発症因子の解明と早期診断マーカーの候補である Flu Alarmin を実際の患者

血清等を対象に検索する。

それによって重症化の早期診断バイオマーカーが明らかになる。

また、これまでは小児科領域における脳症を対象に研究を行ってきたが、本研究では、成人の肺炎の重症化例について研究範囲を拡げた。

2) ヒト呼吸器上皮細胞は、インフルエンザウイルスの最初の感染病巣のひとつとして重要な組織と考えられる。そこでの増殖においては、細胞自らが産生する蛋白分解酵素がウイルスの感染に重要な働きを持つことが知られているが、さらに我々の研究で呼吸器組織以外の異所性産生の同酵素がインフルエンザの脳症において重要な働きをしていることが明らかになっている。

その一方で、膵臓以外のヒト組織細胞における同酵素の産生に関する研究は、ほとんど見あたらず、よって呼吸器上皮細胞が常に供給されるような状態にあれば極めて重要な解析実験系となりうると考えられる。また、そうした細胞がインフルエンザ感染の再産生する何らかの物質がサイトカイン等のFlu Alamin候補に何らかの影響を与える、あるいはその逆にサイトカイン等の物質が呼吸器系上皮にそのもの、あるいはそこでのインフルエンザ感染に何らかの影響を与える可能性についても検討の価値はあると考えられる

さらに、そうした細胞にウイルス感染や種々の外的刺激を与えることでインフルエンザ重症化の本体の理解につながる可能性のある何らかの新たな所見が得られる可能性もある。そうした細胞系を種々の実験に用いることのできる態勢を整えるためのいくつかの試みを開始する。

## B. 研究方法

1) 臨床検体としてのインフルエンザ罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液を収集：

1 - 1) 小児科のインフルエンザの二峰性発熱研究グループならびに

1 - 2) 内科の成人・高齢者の肺炎研究グループとの連携により発症急性期の気道分泌液や血液検体を収集する

1 - 3) さらに当ウイルスセンターには、ウイルス感染による重症肺炎や脳症についての検査目的で、仙台市内ならびに全国各地から臨床検体が寄せられているが、そうした症例の主治医に対して急性期ならびに回復期血清やFlu Alarmin 検索のための検体の確保とその後の送付を受ける。

2) これまでのインフルエンザ罹患者の凍結保存検体のピックアップ：

これまでに種々の呼吸器感染症患者や急性脳症患者から採取した急性期血清ならびにペア血清を当院血清ライブラリーからのピックアップし、Flu Alarmin の候補の検索対象とする。

3) 上記1) 2) で収集した検体について Toll-like Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定を行う。

また、これまでの本研究班における重症化にかかわる遺伝子候補の検索においては、脳症を含む多臓器不全の遺伝子解析は CPT2 のみを対象としていたが、重症肺炎症例医についても、インフォームドコンセントのもと CPT 検査を試みる。

4) ヒト、初代細胞の確保は、上記目的の項目で説明したとおり、インフル

エンザの重症化の機序解明の一手段として大きな可能性を秘めている。

4 - 1 ) まずは、協力研究者の山谷らによる病理解剖由来の気管支上皮細胞の培養系について、その一部凍結保存とライブラリーづくりとを行う。

また、そうした細胞の初代ではないが、その性質をある程度保ったまま長期継代が可能な系を作ることを目的に、上記細胞に対して SV40 の Large T 抗原遺伝子導入による不死化を試した。

4 - 2 ) インフルエンザ脳症の重症化にかかわる因子としての異所生産トリプシンがつくられるためには、トリプシノーゲンが PRSS3 と呼ばれるエンテロキナーゼの作用によってトリプシンに変わる必要がある。ヒト十二指腸上皮細胞は、このエンテロキナーゼがつくられる組織として知られている。エンテロキナーゼのヒト細胞での種々の動きに関して解析のためには、ヒト十二指腸上皮細胞の初代継代細胞がぜひとも必要である。そこで、本研究では、インフォームド Consent のもと、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の培養を試みた。

## C . 研究結果

1 ) 臨床検体としてのインフルエンザ罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液の収集 :

2013-2014 年インフルエンザシーズンは、それまで鳴りを潜めていた A/H1N1pdm09 亜型の再出現があり、このウイルス感染による成人の肺炎症例が全国で見られた。その中で、当院に寄せられたいくつかの症例について、ペア血清ならびに急性期全血を確保し、それらについての Toll-like

Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定ならびに、CPT2 についての遺伝子解析のため徳島に送付した。

そのほか、ヒトパラインフルエンザ 3 型による脳症についても数例分、ペア血清を確保しており、今後解析予定である。また、ヒト・メタニューモの施設内流行を捉えており、そこでも重症化例のペア血清を確保している。

4 - 1 ) 病理解剖由来のヒト気管支細胞の初代培養とその不死化の試み :

協力研究者の山谷がつくった 3 人のドナー由来の、気管支上皮細胞を凍結保存した。さらに、これらについて培養時にレンチウイルスベクターを用いて SV40 の Large T 抗原遺伝子の導入による不死化を試みており、現在継続中である。(図 1)

4 - 2 ) 消化器外科手術材料由来の十二指腸細胞の初代培養と、その不死化の試み :

外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の培養の試みを 3 度行い、うち 2 回で培養に成功し、十二指腸上皮細部の培養法を習得した。それらの細胞についても凍結保存をするとともに、レンチウイルスベクターを用いて SV40 の Large T 抗原遺伝子の導入による不死化を試みており、現在継続中である。(図 2)

## E . 結論

臨床検体としてのインフルエンザ等の急性感染症罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液等の収集を広く行い、解析を開始している。

ヒトの気管支上皮ならびに十二指腸上皮の初代培養細胞に成功し、今後の応用のために凍結保存を完了し、また、通常種々の実験に頻繁に使えるように不死化を試みている。

#### F . 健康危険情報

なし。

#### G . 研究発表（平成 25 年度）

##### 論文発表

- 1) Takashita E, Ejima M, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M. A community cluster of influenza A(H1N1)odm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. Euro Surveill. 19: pii=20666, 2014
- 2) Nguyen, Abe S, Sun G, Matsuoka A, Nishimura H, Ishihara M, Matsui. Rapid screening for influenza using a multivariable logistic regression model to save labor at a clinic in Iwaki, Fukushima, Japan. Am J Infection Control, 2014, in press.
- 3) Nishimura H, Sakata S, Kaga A: A New methodology for studying dynamics of aerosol particles in sneeze and cough using a digital high-vision, high-speed video system and vector analyses. PLoS ONE 8: e80244. doi:10.1371/journal.pone.0080244
- 4) Yamaya M, Nishimura H, Nadine LK, Ota C, Kubo H, Nagatomi R: Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial

cells Arch. Pharm. Res. Arch Pharm Res. [Epub ahead of print] 2013

- 5) Yamaya M, Nishimura H, Lusamba Nadine L, Kubo H, Nagatomi R: Tulobuterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. Physiological Reports 2013. 1: e00041.
- 6) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Hongo S, Itagaki T, Katsushima N, Ohmi A, Nishimura H, and Ahiko T: Molecular epidemiology of Coxsackievirus A16 strains isolated from children in Yamagata, Japan between 1988 and 2011. Microbiol. Immunol. 57: 400-405, 2013.
- 7) 山口育男、青山知枝、山本優、木下恵子、伊藤由美、西村秀一: イムノクロマト法インフルエンザウイルス抗原検出キット BD ベリターシステム Flu における機器判定の感度とその目視判定に対する優越性の検討. 日本臨床微生物学雑誌 23:39-44, 2013.

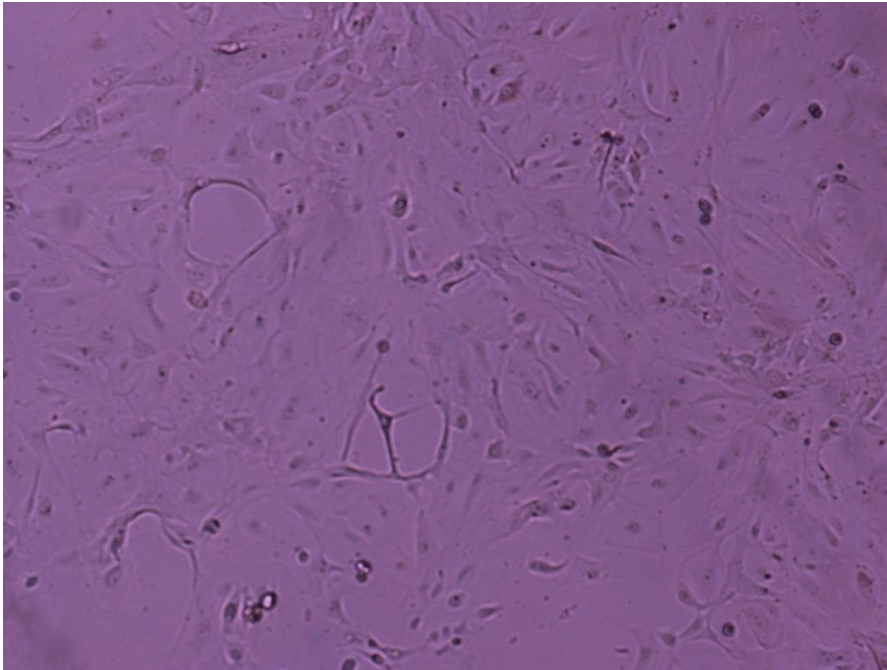
##### 学会発表

とくになし

#### H . 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

とくになし

**圖 1** 成人由来気管支上皮初代培養細胞



**圖 2** 成人由来十二指腸上皮初代培養細胞

