

2013/8024A

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

「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」

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 島 恒 雄

平成26年5月

目 次

I 平成25年度 総括研究報告

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・研究に関する研究

森島 恒雄 1

II 平成25年度 分担研究報告

1 H5N1 およびパンデミックウイルスのウイルス学的解析

河岡 義裕 9

2 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
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―

長谷川 秀樹 12

3 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

長谷川 俊史 20

4 H1N1 感染モデルにおける Spred-2 による免疫制御機構

松川 昭博 27

5 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）

新矢 恭子 30

6 中枢神経症状を示したインフルエンザ A (H1N1) pdm09 とロタウイルス胃腸炎における宿
主遺伝子発現の解析

森島 恒雄 33

7 メタボローム解析を用いたインフルエンザ脳症患者血清中のバイオマーカー候補の検
討

伊藤 嘉規 37

8 小児の中枢神経感染症の疫学 ～多因子解析を通じた重症化メカニズムの予測～

宮入 烈 41

9 インフルエンザ脳症の遺伝子多型解析

蒔田 泰誠 45

10 感染症発生動向調査に基づいた 2013/2014 シーズンのインフルエンザの発生動向と同時期の入院サーベイランスおよびインフルエンザ脳症報告の解析結果について

多屋 馨子 48

11 川崎市における急性脳炎・脳症の届出状況 2009 年～2013 年

岡部 信彦 58

12 重症例の治療効果および予後に関する検討

池松 秀之 64

13 「病態及び解析結果からみた重症インフルエンザ肺炎・脳症治療ガイドライン作成のための根拠収集」

河島 尚志 70

14 急性脳炎・脳症に対するホスフェニトインの有効性と安全性

奥村 彰久 74

15 Diagnosis Procedure Combination からみた日本の小児患者に対する体外循環補助の実態

中川 聡 80

16 生体マーカーを用いた重症インフルエンザの病態解析と治療開発- 尿中バイオマーカーの迅速検査についての検討 -

塚原 宏一 84

17 インフルエンザ成人重症例の病態と診療体制整備

竹田 晋浩 88

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧

I 総括研究報告

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の病態解析・診断・研究に関する研究

研究代表者 岡山大学大学院教授 森島恒雄

研究要旨

平成 25 年度は、従来の重症インフルエンザの病態解析を中心とした研究に加えて、同年 2 月以降明らかになった中国における AH7N9 亜型によるヒトへの感染例（特に重症肺炎による高い致死率＝25～30%が特徴）の増加を受けて、この亜型のウイルス学的特徴を明らかにした。また、我が国への侵入の危惧が高まっていることを背景に、重症インフルエンザの診療体制、特に ECMO を用いた ARDS に対する治療法及び診療体制の整備を進めるべく全国調査を実施した。また、本研究班と厚生労働省大石班と協力し、関連学会の代表者の参加のもとに重症インフルエンザの診療の標準化を目指す組織を作る事ができた。これらは、AH7N9 など病原性の高いインフルエンザのパンデミックにおける重要な成果と思われる。

A. 研究目的

目的

2009 のパンデミックにおいて、小児で重症の肺炎が多発した。一方、成人での重症患者は全体では少なかったものの、ARDS を発症した症例での予後は欧米に比較し悪かった。平成 25 年 2 月、中国で鳥インフルエンザ AH7N9 亜型のヒトへの感染の報告が続き、致死率は 25～30%と報告されている。一旦終息していた流行が再び増加し、平成 26 年 1 月以降 200 例を超える発症があり、致死率も 20%を超えている。この AH7N9 亜型の疫学・ウイルス学・病理学・病態・臨床像・診断/治療法の開発などは、喫緊の課題と考えられ、本年度の研究は、従来の季節性インフルエンザに加え、この亜型の研究を緊急に設定した。

期待される成果

AH7N9 亜型の解析を通じて、本ウイルスが国内に侵入した時、重症例特に肺炎・脳症・多臓器不全などに対する治療法及び診

療体制を整備し、予後の改善に繋げる事ができる。

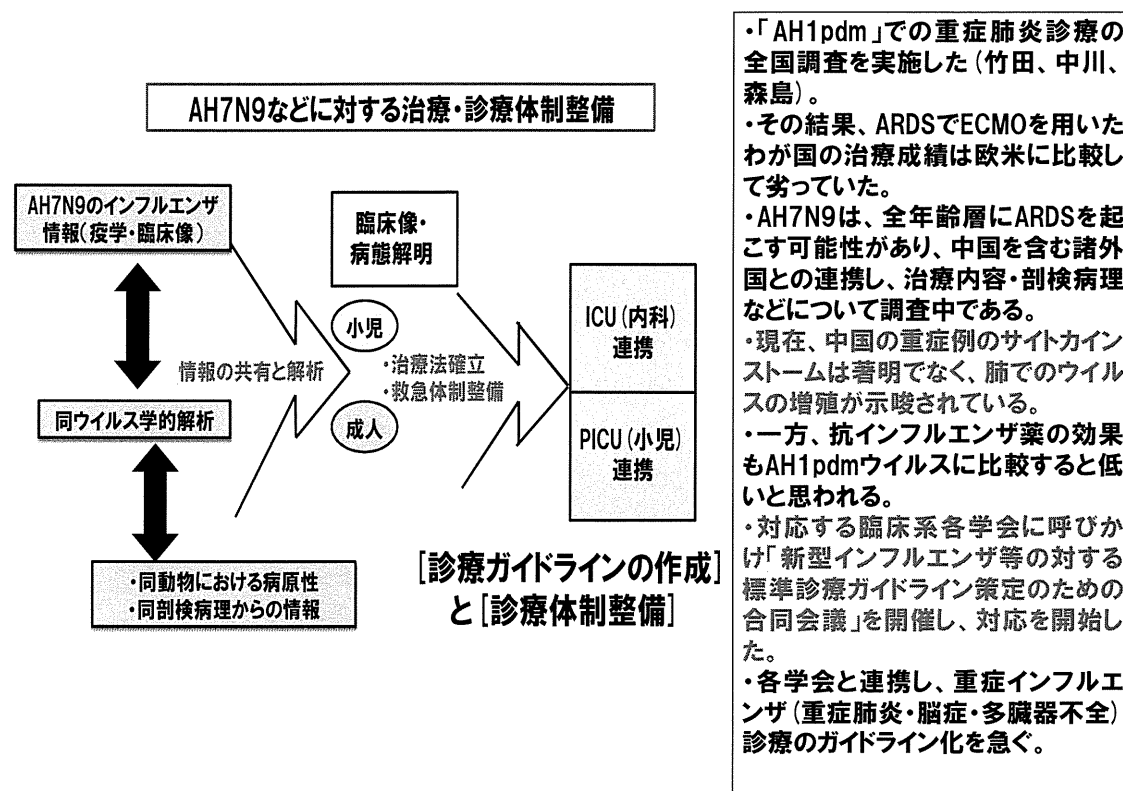
また、季節性インフルエンザ特に AH1N1pdm による肺炎発症の研究は、同様に下気道で増殖する新しいインフルエンザ亜型（AH7N9 含む）に対する治療法の確立に有用と考えられる。

B. 研究方法

本研究組織の特徴として、疫学・基礎ウイルス学・病理学・免疫学・小児及び成人の感染症学・小児神経学・小児及び成人の集中治療学の専門家が集まり、包括的な研究を進めることがあげられる。

従って、研究方法については各分担研究者の報告を参考にしていきたい。一方、重症例の診療体制整備は本研究班の重要な課題の一つである。これについては、本研究班と厚生労働省大石班で各関連学会に呼びかけ、診療の標準化と重症例の診療体制（特に ECMO）に向けた合同会議が平成 25 年からスタートした。

C. 研究結果



研究成果の詳細については、分担研究者の報告を参考にさせていただきたい。その概要は：

1. AH7N9 のウイルス学的特徴を明らかにすることができた。その中で、特にマウス・フェレットなどに対する病原性は H5N1>H7N9>H1N1pdm の順であり、また感染力は、H1N1pdm>H7N9>H5N1 の順であった。重要な点は、本ウイルスに対するマウスにおける抗インフルエンザ薬の効果についてであり、現時点ではノイラミニダーゼ阻害薬の効果は低かったことである。

2. 小児成人集中治療分野の研究分担者からの情報では、AH7N9 による ARDS などに対して ECMO の治療が行われ、効果を上げている。わが国侵入時において、重要な知見である。また、日本の小児及び成人患者に対する体外循環補助の実態調査が進み、重要な知見を得ることができた。また、これら

の成果を背景に ECMO プロジェクトの重要性が認識され、厚生労働省竹田班が作られた。また、関連学会に呼びかけインフルエンザ重症例に対する診療の標準化を目指した合同会議が開催され、平成 25 年度 3 回開かれた。この会議において、ガイドラインの作成を目指し、情報を共有していくことが確認されている。

3. また AH7N9 の剖検・病理所見の詳細な報告はないが、今までの報告された情報からは、H1N1pdm ウイルスと同様に、肺胞におけるウイルスの増殖は活発であると推測される。

4. H1N1pdm における重症肺炎の発症機序が明らかになった。すなわち、①宿主側の素因として喘息などアレルギー疾患を有すること、②肺炎患者は有意に高い IgE を示すこと、③喘息モデルマウスにおいて H1N1pdm ウイルスは、局所において炎症性

サイトカインを強く産生し、肺の病原性も高まることが示され、④これらは同ウイルスにより肺炎で入院した患児の急性期遺伝子発現（DNA マイクロアレイ解析）において、IgE 関連遺伝子および酸化ストレス関連遺伝子が高発現していることなどが示された。一方、H1N1 マウス感染モデルで Spred-2 が有意に上昇する事を見出した。H1N1 感染マウスモデルでの Ras-Raf-ERK/MAPK 経路は活性化していた。Spred2-KO マウスでは ERK/MAPK 活性は上昇し、WT マウスと比較して生存率は有意に低下し、肺炎病態の悪化、炎症性サイトカインの亢進ならびに肺内ウイルス量の増加を認めた。Spred2-KO マウスに ERK inhibitor (U0126) を投与する事により、生存率ならびに肺炎病態の有意な改善が見られた。また siRNA を用いて Spred-2 をノックダウンさせた気道上皮細胞株 (MLE-12) を用いたマイクロアレイ解析では、コントロールと比較して PI3 kinase の亢進 (p-AKT 亢進) を認め、共焦点レーザー顕微鏡下では、endocytosis の亢進に伴うウイルス価の亢進を認めた。

5. インフルエンザ脳症は、本研究班におけるガイドラインの作成・普及の後、予後が改善している（致死率 30%から 7%）。一方、痙攣重積型脳症（二相性脳症）においては、サイトカINSTORM は著明ではなく、従ってステロイドパルスや大量 γ グロブリン療法の治療効果は低かった。最近、市販されたホスフェニトインがこの二相性脳症に有効であることが示唆されたことは非常に重要な成果である。

6. 同じ急性脳症の中でも、病因ウイルスにより少しずつ臨床像が異なることを既に明らかにしてきたが、今回ロタウイルスによる痙攣重積とインフルエンザによる痙攣重積とは、急性期の遺伝子発現のプロファ

イルが異なることが DNA マイクロアレイの解析から明らかになった。このことは、インフルエンザ脳症以外の急性脳症の治療法を組み立てる上で非常に重要な知見である。

7. 小児の中枢神経感染症において、簡易な検査や患者の情報などの多因子の解析により重症化メカニズムの予測が可能となることが示唆された。

8. その他、インフルエンザの発生動向とインフルエンザ脳症の報告例の推移の調査が実施された。内科領域における各年度における季節性インフルエンザを含めた重症例は、70 歳以上の高齢者に集中していた。

D. 考察

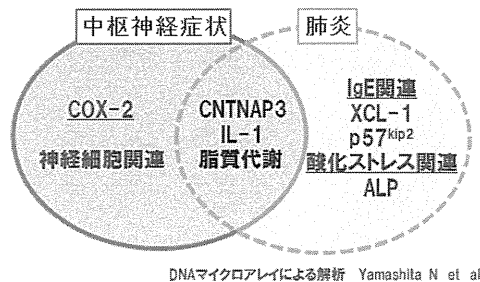
以上のように AH7N9 について、非常に重要な成果が得られた。また、H1N1pdm による肺炎の発症及び重症化について重要な知見が得られ、今後インフルエンザによる重症肺炎に対する治療に役立てることが出来る。また、診療体制の整備に向けた重要な方向性を示すことができたと思われる。これらは、本研究班の特色、すなわち多分野の専門家が集まり、包括的な研究を推進することによる成果と考えられる。

E. 結論

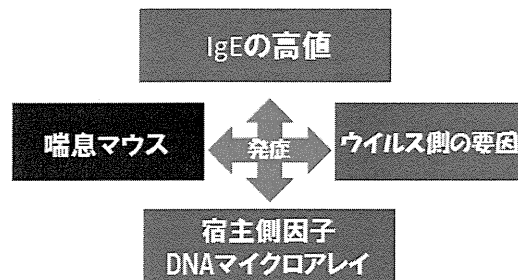
多くの分野で優れた研究業績を挙げることができた。詳細については、分担研究者の報告を参考にしていきたい。

平成 26 年度については、AH7N9 について引き続き研究を継続していく。また同時に、小児科内科・集中治療における診療の標準化を目指して、ガイドラインの整備を行っていく。AH7N9 の情報収集について国際間連携を深めていく。

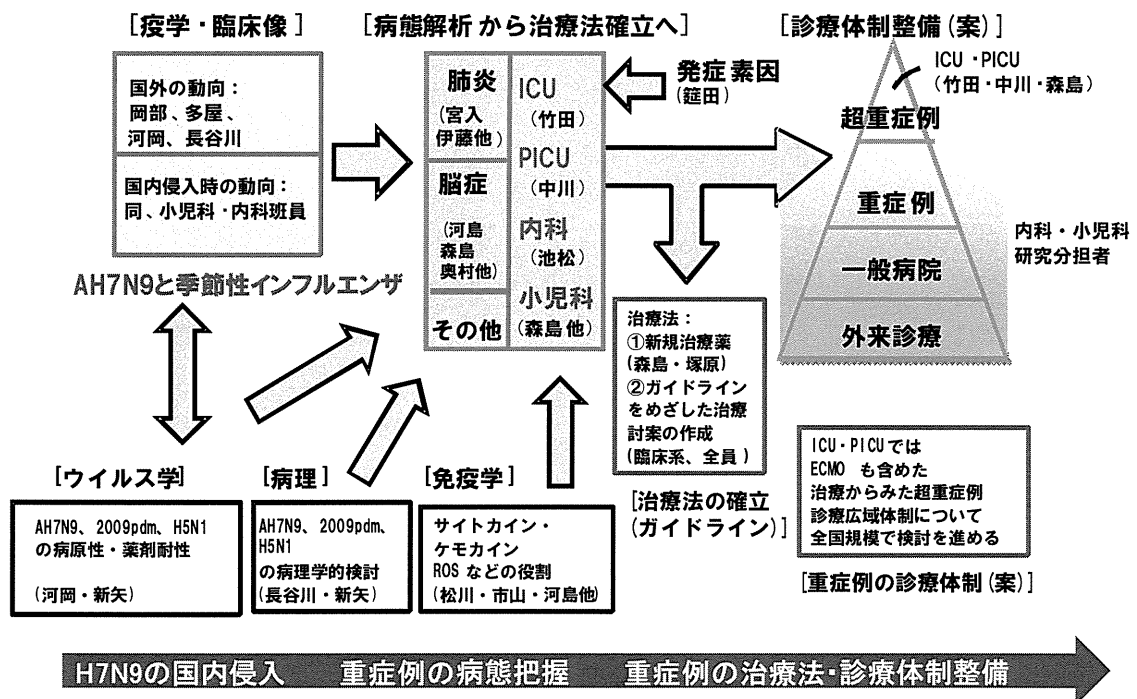
「新型インフルエンザ」の急性期に発現が上昇した遺伝子（小児）



何故AH1N1pdm肺炎はアレルギー素因を背景に？



平成26年度研究の概要（特にAH7N9を研究対象とする）



F. 研究発表

論文（英語論文）

- Yamashita N, Tsukahara H, Tsuge M, Nagaoka Y, Yashiro M, Saito Y, Fujii Y, Oka T, Morishima T. Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated on gene expression profiling. *Pediatr Int* 55 (5): 572-577, 2013.
- Tsuge M, Oka T, Yamashita N, Saito Y, Fujii Y, Nagaoka Y, Yashiro M, Tsukahara H, Morishima T. Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis. *J NeuroVirol* 20 (1): 73-84,

2014.

- Yashiro M, Tsukahara H, Matsukawa A, Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Masutani H, Yodoi J, Morishima T. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. *Crit Care Med* 41(1):166-176, 2013.
- Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S,

- Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 26:551-555, 2013.
- 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*.26, 357-369, 2013
 - Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T, Nakajima N, Hasegawa H, Kida Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. *PLoS One*. 9,8(7), 2013.
 - Miyazaki M, Nishihara H, Hasegawa H, Tashiro M, Wang L, Kimura T, Tanino M, Tsuda M, Tanaka S. NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 29;441(4):953-7.
 - Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Aina A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013 Aug;63(2):194-200.
 - Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Oka M, Isumi H, Emi S, Hayashi M, Ichiyama T. Serum and cerebrospinal fluid levels of visinin-like protein-1 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev*. 2013; in press.
 - Momonaka H, Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Kajimoto M, Okada S, Nakatsuka K, Morishima T, Ichiyama T. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; in press.
 - Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Aina A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013; 63: 194-200.
 - Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Takahara M, Kajimoto M, Momonaka H, Ishida C, Tanaka S, Morishima T, Ichiyama T. Serum soluble CD163 levels in patients with influenza-associated encephalopathy. *Brain Dev*. 2013; 35: 626-9.
 - Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human Herpesvirus 6-Associated Encephalopathy in a Child with Dravet Syndrome. *Neuropediatrics*, 44:155-158,2013
 - Shoji K, Komuro H, Miyata I, Miyairi I, Saitoh A: Dermatologic manifestations of human parechovirus type 3 infection in neonates and infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2013;32:233-236
 - Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *Influenza Other Respir Viruses*.2013;7(6):1390-9.
 - Ikematsu H, Kawai N, Iwaki N, Kashiwagi S. The duration of fever and other symptoms after the initiation of laninamivir octanoate hydrate in the

Japanese 2011-2012 influenza season. *J Infect Chemother*. 2013.

- Yamamoto T, Mizoguchi Y, Kaneno H, Yamamoto K, Inoue Y, Kawashima H, Kase T, Shimotsuji T. Serum immunoglobulin G subclass levels and estimated clinical severity caused by possible influenza A (H1N1) pdm 2009 infection. *J Infect Chemother*. 2013 Oct;19(5):833-42.

- Sakai E, Yamanaka G, Kawashima H, Morishima Y, Ishida Y, Oana S, Miyajima T, Shinohara M, Saitoh M, Mizuguchi M. A case of recurrent acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus with carnitine palmitoyltransferase II variation. *Neuropediatrics*. 2013;44(4):218-21

- Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(5):759-60.

- Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Morichi S, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T. Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan. *J Clin Virol*. 2013;56(1):25-30.

- Morichi S, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Kawashima H. Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebrospinal fluid and plasma of children with meningitis and encephalitis/encephalopathy. *Int J Neurosci*. 2013;123(1):17-23.

- Okumura A, Hayashi M, Tsurui H, Yamakawa Y, Abe S, Kudo T, Suzuki R, Shimizu T, Shimojima K, Yamamoto T. Lissencephaly with marked ventricular dilation, agenesis of corpus callosum, and cerebellar hypoplasia caused by TUBA1A mutation. *Brain Dev* 2013; 35(3): 274–279.

- Igarashi A, Okumura A, Kitamura Y, Jinbo K,

Akatsuka S, Tanuma N, Shimizu T, Hayashi M. Acute limbic encephalitis with focal hyperperfusion on single photon emission computed tomography. *Brain Dev* 2013; 35(2): 181-184.

- Nakagawa S, Shime N. Respiratory rate criteria for pediatric systemic inflammatory response syndrome. *Pediatr Crit Care Med* 2014; 15:182.

- Nakatsukasa Y, Tsukahara H, Tabuchi K, Tabuchi M, Magami T, Yamada M, Fujii Y, Yashiro M, Tsuge M, Morishima T. Thioredoxin-1 and oxidative stress status in pregnant women at early third trimester of pregnancy: Relation to maternal and neonatal characteristics. *J Clin Biochem Nutr* 52(1):27-31, 2013.

- Nagasaka H, Yorifuji T, Egawa H, Inui A, Fujisawa T, Komatsu H, Tsukahara H, Uemoto S, Inomata Y. Characteristics of NO cycle coupling with urea cycle in non-hyperammonemic carriers of ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol Genet Metab* 109 (3): 251-254, 2013.

国際会議発表

- Morishima T. Overview Acute encephalitis /encephalopathy in Japan. PAS (Pediatric Academic Societies Annual Meeting) 2013 meeting in Washington, DC (2013,5.3-5)

- Nakajima N, Sato Y, Katano H, Kawachi K, Suzuki K, Liem NT, Sata T, Hasegawa H. Pathological study of ARDS complicated by influenza virus infection. Option for the Control of Influenza VIII September 4-10, 2013. CapeTown

- Shoji Kawachi, Thuy Thi Bich Phung, San Thi Luong, Noriko Nakajima, Tatsuya Okamoto, Hiroyuki Nunoi, Aki Hata, Kikuko Takenouchi, Sae Hayashi, Fumiyo Nojiri, Kazuo Suzuki, and Liem Thanh. Nguyen Severe cases of influenza infection in Vietnamese children. - From the Prospective Study Cases in PICU of NHP-Hanoi -, Option for the Control of Influenza VIII September 4-10, 2013. CapeTown

- Seigo Okada, Shunji Hasegawa, Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Ryo Atsuta, Kenzo

Ikemoto, Kohsuke Sasaki, Shoichi Toda, Komei Shirabe, Midori Takahara, Sawako Harada, Tsuneo Morishima, Takashi Ichiyama. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. Kuching. 2013.5.9-12.

- ・ H. Ikematsu, N. Kawai, N. Iwaki, S. Kashiwagi. In vitro neuraminidase inhibitory activities of four neuraminidase inhibitors against influenza viruses isolated in the 2010-2011 influenza seasons in Japan. 15th International Congress on Infectious Diseases (Bangkok), June, 16th. 2012

- ・ Kawashima H. The present situation of influenza-associated encephalopathy. PAS (Pediatric Academic Societies Annual Meeting) 2013 meeting in Washington, DC (2013, 5.3-5)

- ・ Nakagawa S. High-frequency oscillation as a rescue therapy for refractory hypoxemia in the ICU. 13th Joint Congress of Korean Society of Critical Care Medicine and Japanese Society of Intensive Care Medicine, Seoul, Korea, April 2013.

- ・ Nakagawa S. Acute respiratory distress syndrome. 9th Congress of Asian Society of Pediatric Research, Kuching, Malaysia, May 2013.

- ・ Nakagawa S. Pediatric / Cardiac Case Discussion in the Pre-Congress Education / Simulation Session. 1st Congress of the Asia-Pacific Chapter of Extracorporeal Life Support Organization (APELSO), Beijing, China, October 2013.

- ・ Kyan et al., Transcriptome profiling of brain edemas caused by influenza infection and lipopolysaccharide treatment. J. Med. Virol. (2013 Nov 8. doi: 10.1002/jmv.23801. [Epub ahead of print])

G. 知的所有権の取得状況

なし

Ⅱ 分担研究報告

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

2013 年春、中国で H7N9 鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染した。このウイルスの哺乳類における病原性を明らかにするため、中国の患者から分離された H7N9 ウイルス（A/Anhui/1/2013(H7N9)；Anhui/1 および A/Shanghai/1/2013(H7N9)；Shanghai/1）のマウスにおける感染性・病原性を、2009 年のパンデミックウイルス（A/California/04/2009(pdmH1N1)；CA04）およびカモから分離された別系統の H7N9 ウイルス（A/duck/Gumma/466/2011(H7N9)；DK/GM466）と比較解析した。その結果、Anhui/1 および Shanghai/1 のマウスにおける致死率は DK/GM466 および CA04 より高いことが明らかとなった。また Anhui/1、Shanghai/1 および CA04 の感染後 3 日目の肺および鼻甲介のウイルス量は、DK/GM466 よりわずかであるが高かった。このことから、中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのマウスでの病原性が、通常の鳥のウイルスや 2009 年のパンデミックウイルスよりも強いことが明らかとなった。

A. 研究目的

2013 年 4 月、中国で H7N9 鳥インフルエンザウイルス感染者が発生した。この H7N9 ウイルスは、ヒトからヒトへの伝播はほとんど起こらなかったが、死亡例や重症化例が多数確認された。そこで、ヒトから分離された H7N9 ウイルスの哺乳類における病原性を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

- ・ A/Anhui/1/2013 (H7N9)；Anhui/1
中国の患者から分離された株
- ・ A/Shanghai/1/2013 (H7N9)；Shanghai/1
中国の患者から分離された株
- ・ A/California/04/2009 (H1N1pdm09)；CA04
2009 年のパンデミックウイルス株
- ・ A/duck/Gunma/466/2011 (H7N9)；DK/GM466
カモから分離された中国の H7N9 とは別系統の株

動物

- ・ BALB/c マウス、雌、6 週齢

B. 研究方法

ウイルス

方法

- ① 各ウイルス株を、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 PFU/匹ずつ（DK/GM466 のみ 10^7 PFU/匹まで）マウス（ $n=4$ ）へ経鼻投与し、14 日間生死を観察した。得られた結果から MLD_{50} (mouse lethal dose 50; マウスを 50%死亡させるウイルス量) を算出した。
- ② 各ウイルス株を、 10^4 、 10^6 PFU/匹ずつマウス（ $n=3$ ）へ経鼻投与し、感染後 3 日目および 6 日目に安楽殺した後、各種臓器を採材し、ウイルス量の測定と病理解析を行った。

（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。

C. 研究結果

- ① ヒトから分離された Anhui/1 および Shanghai/1 の BALB/c マウスにおける MLD_{50} は、いずれも $10^{3.5}$ PFU であった。一方、カモから分離された DK/GM466 および 2009 年のパンデミックウイルス CA04 の MLD_{50} は、それぞれ $10^{6.7}$ PFU および $10^{5.5}$ PFU であり、中国で分離された H7N9 ウイルスの病原性が、これらのウイルスよりも高いことが明らかとなった。
- ② Anhui/1、Shanghai/1 および CA04 の感染後 3 日目の肺および鼻甲介のウイルスカ価は、DK/GM466 よりわずかであるが高かった。感染後 6 日目では、Anhui/1 および CA04 を接種したマウスの肺組織の病変が DK/GM466 より重症化していた。さらに Anhui/1 および CA04 では、気管支炎、細気管支炎、肺泡中隔の肥厚、浮腫、炎症性細胞浸潤が認められた。感染後 3 日目のウイルス抗原を観察したところ、

Anhui/1 および CA04 接種マウスでは肺胞上皮細胞および気管支上皮細胞に抗原陽性細胞が多数認められたが、DK/GM466 を感染させたマウスでは、気管支上皮細胞にわずかに確認されただけであった。

D. 考察

中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのマウスでの病原性は、通常の鳥のウイルスや 2009 年のパンデミックウイルスよりも強いことが明らかとなった。

E. 結論

本研究で得られた結果から、今後も H7N9 ウイルスの監視が重要であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisfeldt AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 26:551-555, 2013.

2. 学会発表

該当なし

G. 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
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： 2013 年より中国で H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスヒト感染例が報告されているが、重症例は急性呼吸促進症候群（ARDS）を併発し、呼吸不全で死亡していると報告されている。ヒト剖検例の報告はなく、患者体内における H7N9 ウイルスの局在は不明である。我々がこれまで解析したインフルエンザ剖検例の中で、臨床的に ARDS を呈した例は、主に H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスヒト感染症と 2009 年パンデミックインフルエンザ発生初期の感染例である。多くは発症から 7-10 日に死亡しており肺病理像はび慢性肺障害の滲出期を呈し、肺胞上皮細胞にインフルエンザ抗原が検出された。H7N9 ウイルスは鳥型インフルエンザレセプターのみならずヒト型レセプターにも親和性があることが遺伝子配列上予測されており、ヒト気管の組織培養において気管上皮細胞に感染することが報告されてる。H7N9 インフルエンザウイルスヒト感染例の肺組織ではウイルスは気管～細気管支上皮細胞および肺胞上皮細胞に感染していることが予想される。また、ARDS の治療に ECMO を導入し軽快するも合併症で 21 病日に死亡した症例の剖検肺組織を解析し、扁平上皮化生様細胞集団が肺の再生像である可能性を示唆する解析結果を得た。

A. 研究目的

我々の分担研究の目的は、重症のインフルエンザによる肺炎・脳炎のヒト剖検組織標本を分子病理学的に解析し、病態解明のための新しい知見を得ることである。

2013 年 3 月中国で H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスヒト感染例が報告され、重症死亡例では急性呼吸促進症候群（ARDS）を併発し、呼吸不全で死亡した。ヒト剖検例の報告はなく、患者体内における H7N9 ウイルスの局在は不明である。ヒトから分離された H7N9 ウイルスをヒト気管および肺

の組織培養系に感染させた実験の報告と我々が行った ARDS を併発したインフルエンザヒト剖検例の病理学的解析結果とから H7N9 ウイルスのヒト体内での動態を推測した。また、2009 年パンデミックインフルエンザに併発した ARDS の治療に Extracorporeal membrane oxygenation（ECMO）を導入した症例の剖検肺組織について、ECMO 管理中に肺組織がどのように再生あるいは再構成されるかを病理学的に解析した。

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剖検例の中で重症 ARDS を呈し呼吸不全で死亡した症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の定量。

⑤文献的検索

C. 研究結果

1. H7N9 亜型鳥インフルエンザヒト感染に関する考察

(i) H7N9 亜型鳥インフルエンザヒト感染例の臨床学的特徴

2014 年 2 月現在、327 例の報告があり、85 人が死亡している。急な発熱と咳で発症し、4-5 日目から急速に悪化し入院し、発症 7 日目前後に ARDS を併発し呼吸器管理となる。発症前に鳥と接触している例はおおよそ 75%であり、患者の平均年齢は 62 歳で基礎疾患を有する者が 45%であった。論文に記載された死亡例では抗ウイルス薬は発症 1 週間後に投与開始されている。（NEJM、Gao et al、2013April）。一方、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスヒト感染例では患者の半数以上が 20 歳未満であることが異なるが、発症から ARDS の併発、死亡

に至るまでの経過は類似している。多くの場合、ノイラミダーゼ阻害剤は発症 1 週間後に投与開始されており有効でない。

(ii) ヒトから分離された H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスの特徴

Anhui 株と Shangha 株の HA 蛋白の 226 番目が Q(グルタミン)から L(ロイシン)に変異しており、ヒト型レセプターへの結合能が上がっていることが推測された。また PB2 蛋白の 627 番目が E(グルタミン酸)から K(リシン)に変異しており、より哺乳類に適応していることが推測された(低温条件でウイルス増殖が可能)。HA の 225 番目は G(グリシン)で鳥型レセプターへの結合能も有している点は H5N1 ウイルスと同様である（Eurosurveillance 18, 2013 April）。

(iii) H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス感染患者体内でのウイルスの感染部位の推定

ヒト患者由来の H7N9 ウイルスはヒトの気管と肺の ex-vivo 組織培養系において気管および肺胞上皮細胞に感染し、細胞障害をおこすことが報告されている（Natute VOL499 25 July 2013）。また上気道では H5N1 よりも効率よく増殖していると報告されている。H7N9 はヒトのサイトカイン・ケモカイン誘導は H5N1 よりも弱い、A/H1N1pdm09H1N1pdm よりも強い（The Lancet respiratory Medicine）。以上のことから H7N9 ウイルスのヒト体内での感染部位は気管～細気管支の上皮細胞および肺胞上皮細胞が考えられた。ヒト→ヒト感染が起こりパンデミックにならないことから、上気道よりも肺胞上皮細胞で増殖能

が高いと考えられる。パンデミック発生初期の A/H1N1pdm ウイルス感染剖検例で肺胞上皮細胞でウイルスが感染増殖しており、肺から HA225 がグリシンのウイルスが回収された例に類似するのではないかと推測された。この症例では上気道の上皮細胞にもウイルス抗原は検出されたが、量は少なく、実際発症初期の咽頭ぬぐい液の迅速診断でインフルエンザ抗原は陰性であった。

2. ECMO 治療後の肺組織像

症例は24歳の女性。6日目より呼吸困難が出現し入院呼吸器管理となる。7日目よりECMO管理追加。呼吸条件は次第に下げられ、ECMOは有効であったと考えられたが、15日目にくも膜下出血、脳ヘルニアを併発し、21日目に永眠され、剖検となった。肺のホルマリン固定パラフィン包埋切片を解析した。HE染色では肺胞内の器質性変化が目立ち大型のⅡ型肺胞上皮細胞の過形成がみられた。また腺様化生や扁平上皮化生など強い肺障害の修復過程と考えられる組織所見がみられたが、これらの細胞がどのように肺の修復・再生過程にかかわっているかは今後詳細に解析する予定である。ヒト下気道より採取した progenitor細胞をin vitroで培養すると角化せず、肺胞上皮細胞マーカーを発現するようになることが免疫組織化学と遺伝子発現プロファイリングによって明らかにされている (Cell 147, 525-538, 2011)。観察された化生細胞が肺胞上皮細胞に分化する可能性があるとする、これらの組織所見が肺再生過程の1つであるかもしれない。実際、ECMO 治療後肺CT像は正

常に近い状態まで回復することが報告されている。

D. 考察

H7N9 鳥インフルエンザウイルスヒト感染例は2013年末より再度患者数が増加し、2014年現在感染者327人(85人死亡)である。H5N1よりもヒトで増殖しやすいことが予想され、限局的にヒト-ヒト感染疑いの事例も出ている。しかしながらパンデミック(大流行)に至るまで変異するかどうかはまだ不明である。今後ヒト剖検例の報告ができれば細菌感染や真菌感染などの合併や、患者の基礎疾患とH7N9感染との関連性が明らかになると思われる。

重症インフルエンザ肺炎の治療の選択肢にECMO管理があるが、治療効果と治療過程について、肺CT像、肺機能検査に加え、肺の組織像の解析は非常に重要である。肺組織の解析により肺再生に必要な因子が解明されればECMO管理をしながら肺再生過程に有効な因子を与えることで肺再生を促進することができるかもしれない。

E. 結論

インフルエンザウイルス肺炎は重症ARDSを併発し呼吸不全で死亡する。特に肺胞上皮細胞に親和性のあるH5N1亜型およびH7N9亜型鳥インフルエンザウイルスや発症早期の(完全にヒト化していない)パンデミックインフルエンザウイルスは、直接的な肺胞障害をおこすので、より重症なARDSを併発すると考えられる。今後H7N9ウイルス感染剖検肺組織を解析する際には肺局所のサイトカインの発現などについても解析したいと考えてい

る。ECMO 治療したインフルエンザウイルス肺炎の剖検肺組織では肺再生過程と思われる組織像がみられた。ECMO 治療後の肺組織像の解析は重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neuman G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501, 551-555, 2013
- 2) 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*. 26, 357-369, 2013
- 3) Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T, Nakajima N, Hasegawa H, Kida T. Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. *PLoS One*. 9,8(7), 2013.
- 4) Miyazaki M, Nishihara H, Hasegawa H, Tashiro M, Wang L, Kimura T, Tanino M, Tsuda M, Tanaka S. NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 29;441(4):953-7.
- 5) Aina A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 Sep;9(9):1962-70.
- 6) Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Aina A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013 Aug;63(2):194-200.
- 7) Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T,

Nakajima N, Hasegawa H, Kida H. Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. PLoS One. 2013 Jul 9;8(7):e68375.

- 8) Dan K, Akiyoshi H, Munakata K, Hasegawa H, Watanabe K. A Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, Hochuekkito, pretreatment in mice prevented influenza virus replication accompanied with GM-CSF expression and increase in several defensin mRNA levels. Pharmacology. 2013;91(5-6):314-21.
- 9) Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijiro K, Sawa H. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. ACS Nano. 2013 May 28;7(5):3926-38.
- 10) 長谷川 秀樹, 田村 慎一 インフルエンザに立ち向かうインフルエンザワクチンの現状と展望 Mebio(0910-0474)30 巻 12 号 Page68-73 2013.12
- 11) 長谷川 秀樹 今、注目のワクチン次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン ファルマシア (0014-8601)49 巻 3 号 Page196-200 2013.03
- 12) 長谷川 秀樹 ワクチン対策の現状と課題 インフルエンザワクチン 化

学療法の領域(0913-2384)29 巻 2 号
Page230-234 2013.01

2. 学会発表

国内会議

- 1) 中島典子. ヒトにおける高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 感染症の病理:第 155 回日本獣医学会学術集会(東京)2013 年 3 月
- 2) 長谷川秀樹、中島典子. 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の検討 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
- 3) 渡辺登喜子、今井博貴、村上晋、中島典子、富田有里子、山吉誠也、浦木隆太、西藤岳彦、内田裕子、長谷川秀樹、田代真人、河岡義裕 中国でヒトから分離された H7N9 鳥インフルエンザウイルスのフェレットにおける飛沫伝播性 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013 年 11 月
- 4) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、佐多徹太郎、長谷川秀樹重症インフルエンザウイルス肺炎におけるサイトカイン・ケモカインの発現 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013 年 11 月
- 5) 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 (Intranasal Influenza Vaccine as a vaccine for next generation) 第 86 回日本細菌学会総会(幕張) 2013 年 3 月
- 6) 岡田 清吾, 長谷川 俊史, 長谷川 秀樹, 相内 章, 池本 健三, 佐々木 功