

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胞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いる。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

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の定量。

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(Nature 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, Einfeld 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 H. 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) Ainai 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, Ainai 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, Ijio 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

- 典, 戸田 昌一, 調 恒明, 市山 高志
インフルエンザA/H1N1 2009感染による
気管支喘息モデルマウスの気管支
肺胞洗浄液解析 日本小児科学会学
術集会(広島)2013年4月
- 7) 長谷川 秀樹: ワクチン研究の最前線
次世代ワクチンとしての経鼻インフ
ルエンザワクチンの開発. 日本薬剤
学会 第28年会(名古屋) 2013年
5月
- 8) 宮崎 将也, 王 磊, 長谷川 秀樹, 津
田 真寿美, 西原 広史, 田中 伸哉:
ヒト細胞内蛋白質 NS1BP の機能解析.
第102回日本病理学会総会(札幌)
2013年6月
- 9) 中島 典子, 佐藤 由子, 片野 晴隆,
長谷川 秀樹: 感染病理学の新展開
新しい迅速 *in situ* ゲノム検出法の感
染病理への応用. 第102回日本病
理学会総会(札幌)2013年6月
- 10) 片野 晴隆, 佐藤 由子, 中島 典子,
福本 瞳, 鈴木 忠樹, 黒田 誠, 長谷
川 秀樹 感染病理学の新展開 病
理検体からの不明病原体検出法の最
先端 第102回日本病理学会総会
(札幌)2013年6月
- 11) 長谷川 秀樹, 中島 典子 炎症・免疫
機構の新基軸と疾病の病理 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
- 12) 長谷川 秀樹: 良く効くインフルエン
ザワクチンを目指して. 第54回日本
臨床ウイルス学会(倉敷)2013.年6
月
- 13) 長谷川 俊史, 岡田 清吾, 脇口 宏之,
市山 高志, 長谷川 秀樹, 相内 章,
調 恒明, 戸田 昌一, 熱田 了 喘息
モデルマウスを用いたインフルエン
ザ感染による気管支喘息発作重症化
の病態解析 新型と季節性インフル
エンザの比較 第45回日本小児感染
症学会総会・学術集会(札幌)2013
年10月
- 14) 脇口 宏之(山口大学 大学院医学系研
究科小児科学分野), 岡田 清吾, 長
谷川 秀樹, 相内 章, 戸田 昌一, 調
恒明, 長谷川 俊史 気管支喘息(病
態)・免疫不全 喘息モデルマウスを用
いた新型インフルエンザ感染におけ
る気管支肺胞洗浄液中ケモカインの
検討 第45回日本小児感染症学会総
会・学術集会(札幌)2013年10月
- 15) 長谷川 秀樹, 相内 章, 田村 慎一,
鈴木 忠樹, 浅沼 秀樹, 小田切 孝人,
田代 真人, 倉田 毅 高病原性鳥イン
フルエンザウイルス A(H5N1) 全粒子
不活化ワクチンを用いた経鼻インフ
ルエンザワクチンの効果 第17回日
本ワクチン学会学術集会(津)2013
年11月
- 16) 鈴木 忠樹, 川口 晶, 相内 章, 田村 慎
一, 小田切 孝人, 田代 真人, 長谷川
秀樹 経鼻インフルエンザワクチン
により鼻腔粘膜上に誘導される多量
体 IgA 抗体のウイルス感染防御にお
ける役割 第17回日本ワクチン学会
学術集会(津)2013年11月
- 17) 相内 章, 田村 慎一, 鈴木 忠樹, 小
田切 孝人, 田代 真人, 倉田 毅, 長
谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワク
チンにより誘導される抗体応答に年

齢、性別あるいは副反応が与える影響
第 17 回日本ワクチン学会学術集会
(津) 2013 年 11 月

- 18) 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
- 19) 泉地 恭輔、相内 章、鈴木 忠樹、浅
沼 秀樹、梁 明秀、長谷川 秀樹 母
子免疫によるインフルエンザウイル
ス感染防御効果の解析 第 61 回日本
ウイルス学会学術集会(神戸) 2013
年 11 月
- 20) 池田 千将、伊藤 良、相内 章、鈴木 忠
樹、田村 慎一、荒尾 雄二郎、田代 眞
人、浅沼 秀樹、長谷川 秀樹 経鼻イ
ンフルエンザワクチンで誘導される
抗体応答に基礎免疫が与える影響
第 61 回日本ウイルス学会学術集会
(神戸) 2013 年 11 月
- 21) 相内 章、浅沼 秀樹、鈴木 忠樹、
原田 勇一、田村 慎一、田代 眞人、
長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワ
クチンにおけるワクチンの組み合わ
せが抗体応答に与える影響 第 61 回
日本ウイルス学会学術集会(神戸)
2013 年 11 月
- 22) 川口 晶、鈴木 忠樹、相内 章、佐
藤 由子、永田 典代、田代 眞人、長
谷川 秀樹 Nc/Nga マウスを用いた
喘息発作によるインフルエンザ感染
症重症化モデルの炸裂 第 61 回日本
ウイルス学会学術集会(神戸) 2013
年 11 月

国際会議

- 1) 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
- 2) 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
- 3) Hideki Hasegawa, Akira Ainai,
Tadaki Suzuki, Elly van Riet,
Shi-ichi Tamura, Kazuyuki Ikeda,
Takato Odagiri, Masato Tashiro,
Takeshi Kurata. Antibody
responses in serum and nasal
mucus induced by the intranasal
vaccination with a whole-virion
inactivated vaccine of
A(H5N1)virus in healthy naïve
human adults. Keystone Symposia
on Molecular and Cellular Biology.
Keystone, Colorado USA, January
2014.
- 4) Kazuyuki Ikeda, Ryo Ito, Akira
Ainai, Tadaki Suzuki, Shin-ichi

Tamura, Yujiro Arao, Masato Tashiro, Hideki Asanuma, Hideki Hasegawa. Antibody responses induced by intranasal vaccination of a whole inactivated influenza virus in mice previously infected or vaccinated. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Keystone, Colorado USA, January 2014.

- 5) Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainai, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa. Impact of the quaternary structure of human Secretory-IgA on neutralization potency to Influenza A virus in upper respiratory tract. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Keystone, Colorado USA, January 2014.

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