

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 室長

研究要旨

2013-2014年のインフルエンザシーズンにはA/H1N1pdm09ウイルスが流行したが、臨床的にARDSを併発し、びまん性肺胞傷害(DAD)の肺病理像を呈した剖検例のウイルス検索依頼がみられた。すでにパンデミック終息後であり、多くのヒトが抗体を有しているため重症化する症例は少ないと考えられ、またウイルス側もすでに季節性インフルエンザウイルスとして扱われており、ヒト型レセプターと親和性の強いヘマグルチニン配列を有し、肺胞上皮細胞に感染しウイルス性肺炎を起こすことはないと考えられたのでパンデミック初期の例とARDSの発症機構が異なることが考えられた。そこでパンデミック時とパンデミック終息後のA/H1N1pdm09-ARDSの剖検例を病理学的に解析し、再評価した。その結果、パンデミック終息後のARDSはウイルス性肺炎によるものではなく、全身性の敗血症(Sepsis)やDICが誘因となったARDSであると推測された。以上のことからインフルエンザの重症化因子としてウイルス性肺炎によるARDS以外に、全身性の炎症反応が要因であるARDSも合わせて考えるべきだと思われた。

A. 研究目的

インフルエンザの重症化因子としては、1) 脳症 2) 心筋炎、心筋症、心機能障害 3) 肺炎（ウイルス性肺炎、細菌性肺炎）がある。鳥インフルエンザウイルスヒト感染死亡例では重症のウイルス性肺炎からARDSを併発し、呼吸不全で死亡する症例が多い。2009年のパンデミックインフルエンザにおいてもメキシコで発生した例のほとんどがウイルス性肺炎であった。本邦初の剖検例（2009年8月）でもA/H1N1pdm09ウイルスは肺胞上皮細胞に感染し、ウイルス性肺炎に

よるARDSを併発していた。パンデミック終息後の2013-2014年冬季にA/H1N1pdm09が流行したが、インフルエンザでARDSを呈した症例について肺組織中のウイルス検索の依頼が何件かあった。パンデミック時と終息後でA/H1N1pdm09感染に併発したARDSの発症機構について病理学的解析結果を比較検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 材料：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

- 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サイトカイン・ケモカイン mRNA の定量。

(倫理面への配慮) 検討材料は剖検組織であり、剖検時に使用の承諾が得られている。

C. 研究結果

1. インフルエンザ例

2013年1月から2014年12月まで計5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。肺炎が4例、心筋炎が1例であった。インフルエンザ疑い例は4例あったが、インフルエンザウイルスゲノムは検出されなかったため、確定診断に至らなかった。

2. 症例

(症例1; インフルエンザ疑い例) 母(39歳)、妊娠34週2日(病日1)に発熱有り、2日後(病日3、34週4日)に胎動が減弱したので救急外来受診。迅速検査でB型インフルエンザ抗原陽性であったためイナビル処方され帰宅。病日5(34週6日)に頻回の子宮収縮にて入院管理開始。陣痛発来出生前に徐脈を認めたため用手的誘導、人工破膜にて児を搬出した。児は出生後まもなく死亡したため、インフルエンザウイルス母子感染の疑いで児の血液、髄液、咽頭ぬぐい液を検索した。児の咽頭ぬぐい液、髄液、血清、肺組織・肝組織より核酸を抽出し、マルチウイルスリアルタイムPCR

法でウイルスゲノムを検出するもすべてのウイルスゲノムは検出限界以下であった。病理解剖の結果から肺の低形成がみとめられ、死亡原因の1つであると考えられた。インフルエンザウイルスの子宮内感染ならびに産道感染はみられないことが確認された。妊娠中であってもウイルス血症はみとめられなかった。また母と児の血液中のサイトカイン値をマルチプレックス法で網羅的に検索したところ、母体は病日3、5、6においてサイトカイン/ケモカインの異常高値はみられなかったが、児の血清でIL-6、interleukin-2R(IL-2R)、IL-12、human growth factor(HGF)、MCP-1、MIGが母の2倍以上の量であった。母体のインフルエンザ罹患が早産の原因として関与した可能性は考えられた。

(症例2: A/H1N1pdm09 陽性例、ウイルス性肺炎によるARDSの疑い)

59歳男性で既往歴は特になし。健康診断(平成15-19年)は異常なし。2/21は普通に外出。2/22は朝から咽頭痛あり、市販のルルなどを内服した。2/23午前頃の死亡と推定される。72時間後法医解剖。気管支からA/H1N1pdm09が遺伝子検査で陽性のためインフルエンザと診断された。インフルエンザウイルス性肺炎の疑いで肺組織中のウイルスゲノムの検索を依頼された。肺組織はびまん性肺胞傷害像(DAD)を呈していた。死後72時間経過していたため、ウイルスゲノム検出、免疫組織化学などによる解析はできなかった。病理像において死後変化を考慮してもARDSを併発して呼吸不全で亡くなった可能性は高いが、ARDSの要因に関しては臨床検査情報がなく、不明である。

3. A/H1N1pdm09 感染に重症ARDSを併発した2例の病理学的解析による比較検討

パンデミック初期の2009年8月の症例(33歳男性)とWHOが2010年8月に‘the

post-pandemic period' 宣言をした後の 2011 年 1 月の症例 (50 歳男性) を比較検討した。共通点は、患者は BMI 34.36 の超肥満で、A/H1N1pdm09 感染後、重症 ARDS を併発し 1 週間で死亡していることである。臨床的な相違として着目すべき点は、パンデミック期の症例は第 6 病日に呼吸器管理となった際、DIC や多臓器障害はみられなかったが、パンデミック終息後の ARDS 症例では、第 3 病日にすでに呼吸器管理となり、DIC や MODS もみられており、全身性炎症反応 (SIRS) が疑われた。この症例では ECMO とともに PMX も施行されているこの 2 剖検肺組織で、肺の組織像 (炎症像)、ウイルス抗原の分布・肺切片中のウイルスのコピー数を解析し、さらに肺組織から回収される A/H1N1pdm09 ゲノムの HA 領域の配列を調べ比較した。パンデミック初期の症例では肺の場所により異なる進行度のびまん性肺胞傷害の像を呈し、肺切片ごとにウイルス抗原量も異なった。肺の DAD の進行より先にウイルス抗原量の増加が認められたことから、肺組織の病理変化はウイルス感染によるものであると推測された。ウイルスは主に肺胞上皮細胞で感染増殖し、肺から鳥型レセプターに親和性の高い配列を有する A/H1N1pdm09 が検出された。鳥インフルエンザウイルス感染例と類似した病理所見であった。すなわちインフルエンザウイルス感染によるウイルス性肺炎による ARDS と考えられた。一方パンデミック終息後の A/H1N1pdm09 感染に併発した ARDS 症例では、肺全体にびまん性肺胞障害の滲出期像がみられ、肺局所で差がみられなかった。ウイルス抗原陽性細胞は少なく、ウイルスゲノム量は初期の症例 1 の 1/1000 であった。肺からヒト型レセプターに親和性の高い配列を有する A/H1N1pdm09 が検出された。臨床経過も併せて考えると、ウイルス性肺炎ではなく、敗血症 (Sepsis)、DIC が引き起こ

した全身性の炎症反応が要因の ARDS ではないかと考えられた。

D. 考察

インフルエンザの重症化因子として、脳症、臨床的心筋炎 (病理所見がない場合が多い)、肺炎の併発がある。インフルエンザに併発する重症肺炎は臨床的には、鑄型気管支炎、細気管支炎、気管支肺炎、肺炎、ARDS と診断されていることが多い。肺炎の原因については、細菌が検出されない場合はインフルエンザウイルス性肺炎を疑われるが、剖検肺組織を解析すると二次性の細菌性肺炎の病理像であったり、ウイルス抗原は気管支・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いことが多い。また ARDS を併発した場合もウイルス性肺炎を疑われるが、敗血症など全身性の炎症反応から惹起された ARDS の場合がある。インフルエンザウイルスは経気道的に呼吸器官に感染し、インフルエンザは呼吸器感染症である。しかしながら脳症や心機能障害なども併発する。季節性インフルエンザウイルスはヒト型レセプターが豊富な上気道の上皮細胞に感染し、宿主応答を引き起こすわけだが、宿主によっては非常に強い免疫応答を引き起こすために脳症や心筋症、全身性炎症症候群 (SIRS) のような重篤な症状を呈することがあるのではないかと考えられた。

E. 結論

インフルエンザの重症化因子として肺炎があるが、鳥インフルエンザウイルスヒト感染例ではほとんどの症例で ARDS を併発している。2009 年のパンデミックインフルエンザでも ARDS を併発する重症肺炎が見られた。2013-14 年インフルエンザシーズンは A/H1N1pdm09 が流行し、ARDS を呈し死亡した例もあったが、A/H1N1pdm09 はすでに

ヒトに馴化しており、容易にウイルス性肺炎を起こすことはない。A/H1N1pdm09-ARDSはウイルスが上気道に感染し、サイトカインストームなどの全身性炎症反応起こした結果、間接的要因により惹起されたのではないかと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Shirabe K, Toda S, Wakabayashi-Takahara M, Morishima T, Ichiyama T. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine*. 2014 Oct;69(2):206-10. Epub 2014 Jul 6.
- 2) Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe*. 2014 Jun 11;15(6):692-705.
- 3) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzuki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza

viruses. *J Virol*. 2014 May;88(10):5608-16. Epub 2014 Mar 5.

- 4) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 ウイルス性肺炎 病理と臨床 32(10): 1146-1153, 2014. 10

2. 学会発表

- 1) 鈴木 忠樹、川口 晶、相内 章、佐藤 由子、永田 典代、田代 真人、長谷川 秀樹 喘息発作によるインフルエンザ重症化動物モデルの作製 第 103 回日本病理学会総会 広島 2014 年 4 月
- 2) 中島 典子、渡辺 登喜子、佐藤 由子、高橋 健太、鈴木 忠樹、田代 真人、河岡 義裕、長谷川 秀樹 ヒトから分離された H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス感染動物モデルの病理学的解析 第 103 回日本病理学会総会 広島 2014 年 4 月
- 3) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠 II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は、HA 開裂部位に mono - basic なアミノ酸配列をもつ A 型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014 年 11 月
- 4) 渡辺登喜子、Gongxun Zhong、Colin Russell、中島典子、八田正人、Anthony Hanson、高橋健太、渡辺真治、今井正樹、長谷川秀樹、河岡義裕 スペイン風邪ウイルスに類似の鳥インフルエンザウイルスのパンデミックポテンシャル 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014 年 11 月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

重症例の治療効果および予後に関する検討

研究分担者 池松 秀之 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学・学術研究員
研究協力者 日本臨床内科医会 インフルエンザ研究班

研究要旨

2013-14 年流行期に流行のサーベイランスとして全国の診療所を中心とした日本臨床内科医会インフルエンザ研究班によりインフルエンザ症例および肺炎症例を集積し、流行状況、肺炎の実態とリスクファクターについて過去の成績を含めて検討を行なった。

各流行期における型・亜型の内訳は、2011-12 年流行期 A (H3N2) 型 72.9%、B 型 27.0%、2012-13 年流行期 A (H1N1)pdm09 型 0.8%、A (H3N2) 型 80.1%、B 型 19.2%、2013-14 年流行期 A (H1N1)pdm09 型 35.3%、A (H3N2) 型 19.1%、B 型 45.6% であり、それぞれ異なっていた。肺炎および入院の報告は、2011-12 年、2012-13 年、2013-14 年流行期でそれぞれ 0.9%、0.3%、0.3% であった。肺炎および入院患者は 6 歳の 1 例以外 7 例は全て 7 0 歳以上であった。肺炎あるいは入院の報告例 8 例中 7 例のウイルス型は A 型で、亜型が判別出来た 5 例は全て H3N2 型であった。福岡県におけるインフルエンザ入院サーベイランスの結果でも、ICU 入室や人工呼吸器の利用は 70 才以上に集中していた。

季節性インフルエンザの流行において、抗インフルエンザ薬による治療が開始されても、重症例が高齢者に少なからず、みられることが確認された。高齢者において肺炎や重症例が多いメカニズムは不明であるが、高齢者人口が今後も増加することを考えると新型インフルエンザが高齢者にも多数の感染を起こす場合、重症例が非常に多くなる可能性があり、その対策が必要と思われる。

A. 研究目的

2009年4月に出現したブタ由来と考えられる新型インフルエンザウイルスH1N1pdm09は世界中に流行が拡大し、日本でも2009-2010年流行期はH1N1pdm09が流行の主体となった。新型インフルエンザの出現から1年経過した2010-2011年流行期は、H1N1pdm09と共にH3N2とB型の流行がみられ、従来の季節性インフルエンザの流行パターンに類似した流行となった。2011-2012年流行期は、H3N2とB型の流行がみられH1N1pdm09はほとんどみられなくなった。

新型インフルエンザと呼ばれたH1N1pdm09の流行による被害は少なかったが、次に新型が出現した際への備えを怠ると、今回の経験とは異なった大きな被害が出ることも危惧される。その際に重要なポイントの一つは「重症肺炎」であることは確実と思われる。現在の毎年のインフルエンザ流行においても肺炎の合併は稀ではなく、重症肺炎による死亡もめずらしくない。しかしながらその疫学や病態についてのデータは少ない。

本研究では日本臨床内科医会インフルエンザ研究班が実施しているインフルエンザ研究における肺炎例の情報を集め、肺炎及び重症肺炎の発

生やリスクファクター、有効な治療、予後などについて検討を行う。また、九州地区における協力病院でのデータを参照し、重症化や肺炎について検討することを目的とする。

B. 研究方法

日本臨床内科医会インフルエンザ研究班の研究は、日本臨床内科医会に所属する全国の医療機関の中で研究への参加を希望した医療機関による研究である。その研究対象はインフルエンザを疑って迅速診断が実施された外来患者である。研究への協力について同意が得られた患者について、迅速診断の結果が陽性、陰性に関わらず原則としてウイルスの分離とPCR法によるインフルエンザウイルス検出が実施されている。検体としては鼻腔拭い液、咽頭拭い液、鼻腔吸引液、鼻汁・鼻かみ液を用い、ウイルス分離は標準的な方法でMDCK細胞を用いて実施している。PCRには、H1N1pdm09および季節性インフルエンザのAH1N1、AH3N2、B、それぞれのインフルエンザウイルスに特異的なプライマーを用いている。入院や肺炎に関する情報は、主として患者本人及び家族よりの聞き取りによって行われている。

(倫理面への配慮)

被験者に対しては本研究の目的等を十分に説明し、文書または口頭で同意が得られた患者のみを対象とした。登録基本データはID、イニシャル、性別、生年月日とし、個人名や住所などの個人の特定につながる情報は記載しなかった。また、臨床検体については別にID番号を設定し、第三者が個人の特定をできないように配慮を行った。

C. 研究結果

2011-12年流行期に登録されたインフルエンザ患者はA型が340例、B型が126例であった。A型は全例H3N2型でA(H1N1)pdm09はみられなかった。2012-13年流行期はA(H3N2)が340例、B型が126例で、A(H1N1)pdm09は5例であった。2013-14年流行期はA(H1N1)pdm09型218例、A(H3N2)型118例、B型282例であった。患者の年齢分布は(図1)、2011-12年流行期は20歳未満が多く、2012-13年流行期はA(H3N2)が30歳以上に比較的多数みられ、特に70歳以上の患者が多かった。2013-14年流行期はA(H1N1)pdm09で30歳以上の患者が多く、B型は20歳未満が多かった。この3つの流行期において流行するインフルエンザの型・亜型の割合やそれぞれの患者の年齢分布は毎年変化していた。

2011-12年流行期の肺炎あるいは入院の報告は4例で全員H3N2型であった。肺炎は2例で全体における割合は0.4%であった。患者の年齢は6才と71才であり男性1名女性1名であった。入院の報告は2例で74才の男性と82才の女性であった。2012-13年流行期の肺炎あるいは入院の報告は肺炎が2例で、70才と85才の男性で、全員A型であった。2013-14年流行期は肺炎の報告が2例あり、80歳以上の女性でA型とB型それぞれ1例であった。肺炎および入院の全体での割合は、2011-12年、2012-13年、2013-14年流行期でそれぞれ0.9%、0.3%、0.3%であったが、70歳以上の年齢層での発生率は高かった。

福岡県におけるインフルエンザ入院サーベイランスでは、ICU入室や人工呼吸器の利用は1才から9才と70才以上に集中していた。

D. 考察

重症肺炎はインフルエンザにおける重要な合併症であり、その対策はインフルエンザ対策、特に新型インフルエンザ対策において重要な課題

であるということはいままでのない。ノイラミニダーゼ阻害薬を用いた発症から48時間以内の治療により、肺炎の発症頻度は大幅に低下したと考えられる。しかし、日本臨床内科医会インフルエンザ研究班の調査で、肺炎や入院の報告は少数ながら毎年みられている。肺炎および入院の全体での割合は、2011-12年、2012-13年、2013-14年流行期でそれぞれ0.9%、0.3%、0.3%と高くはなかったが、年齢をみると6歳の小児例を除く全員が70才以上であり、肺炎は高齢者において発生頻度が決して低くないことが確認された。

何故高齢者においてインフルエンザの発症頻度が低いのに肺炎や重症例が多いのかについて、そのメカニズムは不明である。3年間の調査結果では、糖尿病や高血圧は基礎疾患としてみられなかったが、慢性呼吸器疾患、とくに気管支喘息が4名において基礎疾患であったことは興味深い。慢性呼吸器疾患が重要な因子となっているかについてはさらに検討する価値があると思われる。

福岡県におけるインフルエンザ入院サーベイランスの結果でもICU入室や人工呼吸器の利用が70才以上に集中していることをみると、高齢者におけるインフルエンザ予防と肺炎の発症を予防するための治療が重要であると思われる。

高齢者人口は今後も増加すると考えられる。新型インフルエンザ発生時に、高齢者に多数の患者が発生すると、そこから多数の肺炎発症者が出る可能性があり、その頻度は5%を越える可能性が高いと考えられる。その対策としての病床の確保とICU入室が必要な重症例への受け入れ態勢については事前に十分な検討が行われていることが必要と思われた。

E. 結論

(1) インフルエンザ罹患時の肺炎や入院はノイラミニダーゼ阻害薬を用いた早期治療が普及した現在でもその頻度は低いが発生しており、特に70才以上ではその頻度が高い。

(2) ICU入室や人工呼吸器が使用された重症例は70才以上で特に多く、重症化のメカニズムについては年齢という因子を考慮した研究が必要である。

(3) 重症例や肺炎例の発生はインフルエンザ自体の流行に関連しておりインフルエンザの流行対策が重症インフルエンザ対策上で最も重要な点であると思われる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
1. 論文発表

- ①Kawai, N. et al., Increased symptom severity but unchanged neuraminidase inhibitor effectiveness for A(H1N1)pdm09 in the 2010-2011 season: comparison with the previous season and with seasonal A(H3N2) and B. Influenza Other Respi Viruses, 2013; 7(3):448-55.
- ②河合直樹、廣津伸夫、池松秀之. インフルエンザ診療マニュアル 2014-2015 年シーズン版. 日本臨床内科医会会誌 29 巻 2 号臨時付録 1-49, 2014

2. 学会発表

- ①池松秀之. 第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会(岡山)、2014. 10. 23-24

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

図 1. 各年代における各型の患者数

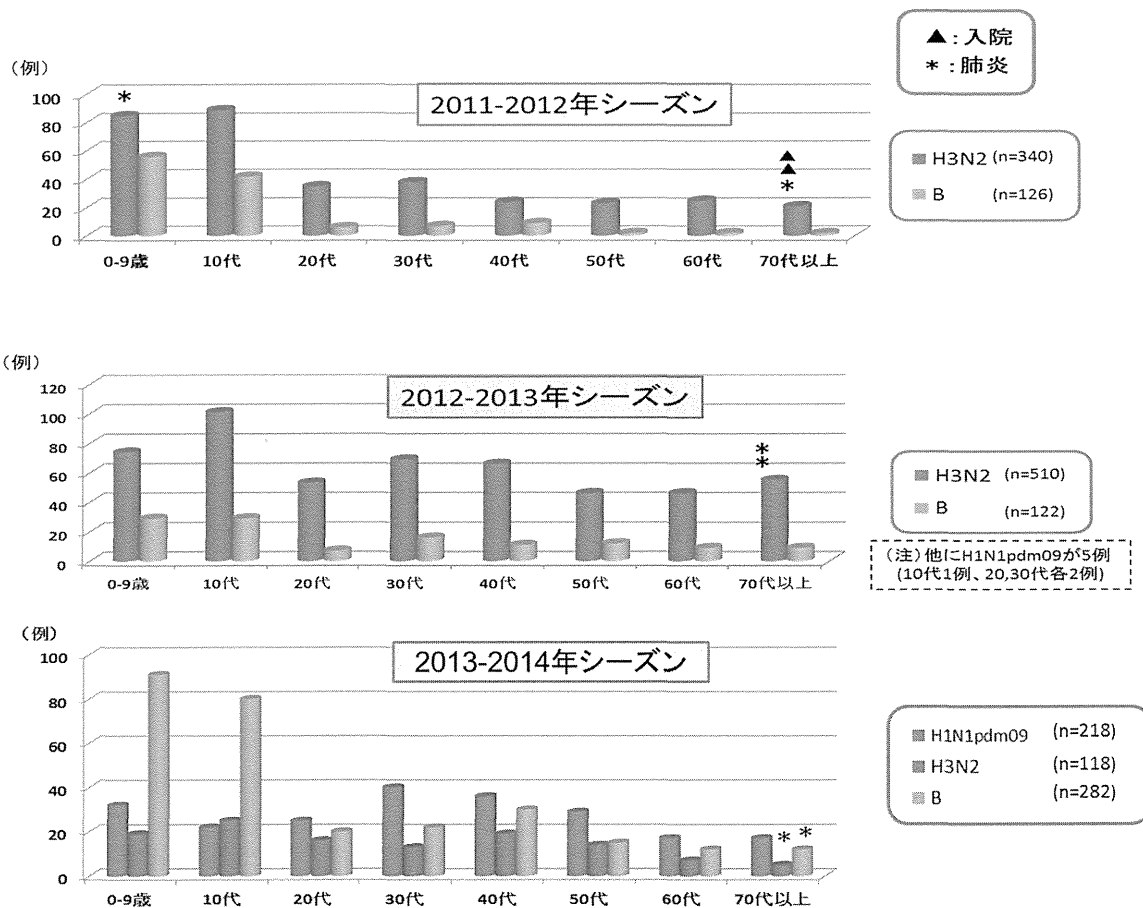


表1 各流行期における肺炎合併例および入院例

流行期	年齢	性	型・亜型	体重 (kg)	合併症	転帰	治療薬	発症から治療開始まで	CRP	WBC	昨年罹患	ワクチン		基礎疾患
												昨年	今年	
2011-12年	6	F	A/H3	23	肺炎	外来治癒	L	27hr			なし	なし	なし	なし
	71	M	A/H3	50	肺炎	外来治癒	P	1hr	5.3	4800	なし	1回	1回	心疾患、脳卒中
	74	M	A/H3		喘息発作	入院治癒	P	43hr	6.8	8200	なし	1回	1回	気管支喘息、脳卒中、糖尿病
	82	F	A/H3	67		入院治癒	P	2.5hr	1.6	7000	なし	1回	2回	気管支喘息
2012-13年	85	M	A/H3	40	肺炎	外来治癒	P	24hr	13.2	12100	なし	なし	なし	気管支喘息 COPD
	70	M	A	81	肺炎	外来治癒	O	22hr			なし	1回	なし	なし
2013-14年	85	F	A	43	肺炎	入院治癒	P	17hr			なし	なし	なし	気管支喘息
	84	F	B	32	肺炎	外来治癒	O	28hr	23	6700	なし	1回	1回	なし

L : laninamivir P : peramivir O : Oseltamivir

表2 福岡県におけるインフルエンザ入院サーベイランス2012-2013年

単位:人

年齢		1歳未満	1-4歳	5-9歳	10-14歳	15-19歳	20-29歳	30-39歳	40-49歳	50-59歳	60-69歳	70-79歳	80歳以上	計
ICU入室	2012年	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	8
	2013年	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	3	5	12
	2014年	0	6	4	0	0	0	1	0	2	0	2	3	18
人工呼吸器の利用	2012年	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3
	2013年	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	3
	2014年	0	1	0	0	0	0	1	0	1	2	1	2	8
インフルエンザ入院全体数	2012年	21	83	43	16	9	4	5	6	11	21	52	79	350
	2013年	19	52	14	8	1	1	4	4	11	12	20	40	186
	2014年	28	92	56	17	4	2	10	6	7	13	25	69	329

インフルエンザ肺炎モデルにおける抗 HMGB1 抗体の治療効果

主任研究者 森島恒雄（岡山大学大学院特命教授）

研究協力者 野坂宜之 八代将登 藤井洋輔 山田睦子 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

【背景】 今後発生しうるインフルエンザウイルスパンデミックへの対策は緊急の課題である。既存の抗ウイルス薬の効果が低い耐性株や新型ウイルスの出現が危；惧されており、新たな治療選択肢の可能性を探る必要がある。インフルエンザ感染における炎症惹起物質のひとつとして核内 DNA 結合タンパク質である HMGB-1 (High-Mobility Group Box-1) が注目されている。【目的】 インフルエンザ肺炎に対する抗 HMGB-1 抗体の治療効果を検証すること。【方法】 C57/BL6 マウスにインフルエンザウイルス A/Puerto Rico/8/34 株 (1.0×10^2 PFU) を経鼻接種し、1、24、48 時間後に抗 HMGB-1 単クローン抗体 (2mg/kg/回) を尾静脈投与した。【結果】 対照動物 (抗 *Keyhole Limpet Hemocyanin* 抗体投与群) と比較し抗 HMGB-1 抗体投与群では肺におけるウイルス増殖に差を認めない一方で、生存率の有意な改善を認めた ($p=0.004$)。また、感染後 3 日、7 日、10 日の時点で気管支肺胞洗浄液中の好中球数や酸化ストレスマーカー、各種炎症性サイトカインが抗 HMGB-1 抗体投与群で有意に抑制された。【考察】 抗 HMGB-1 抗体が、インフルエンザ肺炎に対し有望な追加治療選択肢になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

2009 シーズンの新型インフルエンザで多く認めた急性呼吸窮迫症候群は致死的な合併症であった。今後起こりうるパンデミックにむけ、重症合併症に対する対策は喫緊の課題である。既存の抗ウイルス薬の効果が低い耐性株や新型ウイルスの出現が危惧されており、新たな治療選択肢の可能性を探る必要がある。

HMGB-1 (High-mobility group box-1)

は炎症性サイトカイン様因子として振る舞う 25kDa の核内 DNA 結合タンパク質である。近年、HMGB-1 が様々な危急病態に関与し、さらに抗 HMGB-1 抗体が敗血症や頭部外傷などの病態改善に有効であることが示され、注目を集めている。

2009 A (H1N1) インフルエンザウイルスによる重症肺炎を呈した小児患者において、血清中 HMGB-1 の増加を認めその病態形成への関与が示された¹⁾。しかし、

インフルエンザ重症肺炎における抗 HMGB-1 抗体の治療薬としての可能性を検討した報告は存在しない。

そこで我々は抗 HMGB-1 抗体によるインフルエンザ肺炎の治療効果をマウスモデルを使用して検討した。

B. 研究方法

C57/BL6マウスにインフルエンザウイルスA/Puerto Rico/8/34株 (1.0×10^2 PFU) を $25 \mu\text{l}$ 経鼻接種した。感染後 1 時間後、24 時間後、48 時間後に抗 HMGB-1 抗体を $2\text{mg}/\text{kg}$ (0.1ml) 投与した。対照抗体には抗 *Keyhole Limpet Hemocyanin* 抗体を用い、 $2\text{mg}/\text{kg}$ (0.1ml) 投与した。抗体はいずれも岡山大学大学院薬理学講座 (西堀正洋教授、劉克約博士) より供与された。なお、抗 HMGB-1 抗体は HMGB-1 タンパク質にのみ存在する C 末端配列 (DEEEDDDDE) を認識し、HMGB1 活性を中和する単クローナル抗体である。

最初に、対照動物との生存率の相違を確認した。さらに、感染後 3・5・7・10 日にマウスを解剖し、血清・気管支肺胞洗浄液 (右肺)・肺組織 (左肺) を採取した。肺組織は HE 染色および Gr1 染色にて炎症細胞・好中球浸潤の評価を行った。採取した肺組織の一部から RNeasy Plus Mini を用いて総 RNA を抽出し、RETROscript を用いて cDNA に逆転写し、さらにリアルタイム PCR 法にて増幅しインフルエンザウイルス量を測定した。気管支肺胞洗浄液中の細胞数は日本光電社製セルタックにて測定した後、検鏡下 (ディフ・クイック染色) に細胞分画を確認して好中球数を算出した。採取した血清を用いて酸化ストレスマーカーである dROMs を FRAS4 機器を用いて測定した。

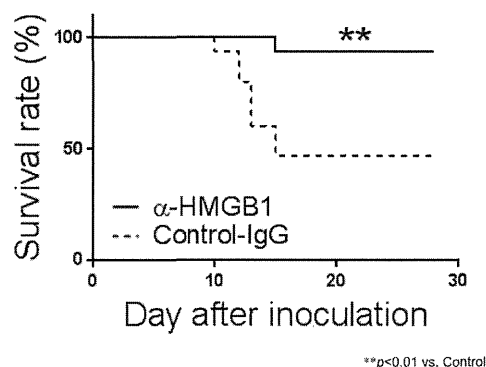
また、MILLIPLEX Kit (MILLIPORE 社) を用いて気管支肺胞洗浄液中の tumor

necrosis factor alpha (TNF- α)、interleukin 6 (IL-6)、chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL-1) を測定した。また、RAGE ELISA kit (R&D 社) を用いて気管支肺胞洗浄液中の receptor for advanced glycation end products (RAGE) を測定した。さらに RAGE と NF- κ B (p65)、GAPDH の mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法で増幅し測定した。

C. 研究結果

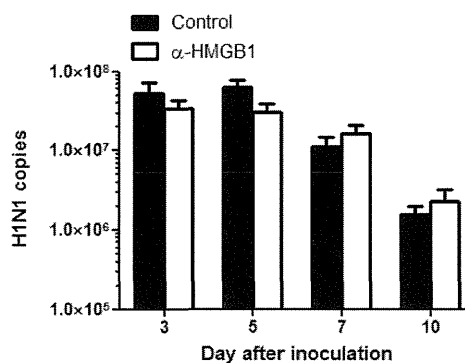
生存曲線

抗 HMGB1 抗体投与群で 93.3% のマウスが生存した一方で、対照群では 53.3% のマウスが死亡した。



ウイルス量

肺組織中のインフルエンザウイルス量は対照群と抗 HMGB1 抗体投与群で有意差は認めなかった。

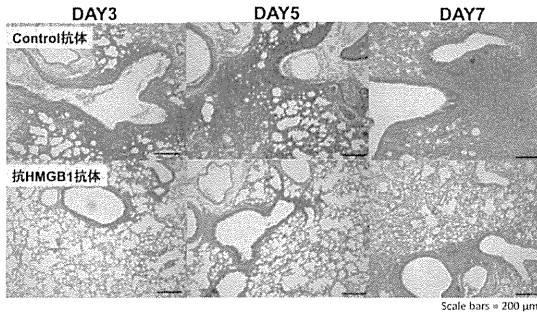


肺組織病理

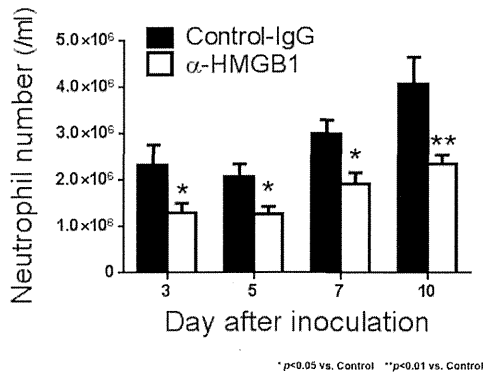
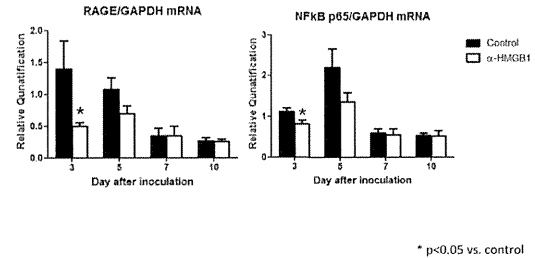
対照群と比較し、抗 HMGB1 抗体投与群の

肺組織炎症像の軽減を認めた。

また、気管支肺胞洗浄液中の好中球数についても、抗 HMGB1 抗体投与群で有意に抑制されていた。

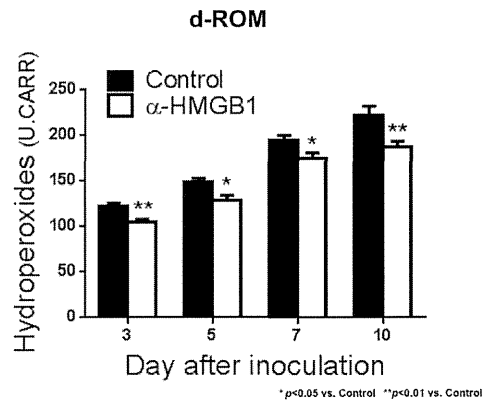


の肺組織中における発現が抗 HMGB1 抗体投与群で感染後3日目、5日目で抑制されていた。同様に NF-κB (p65) の発現も抑制されていた。



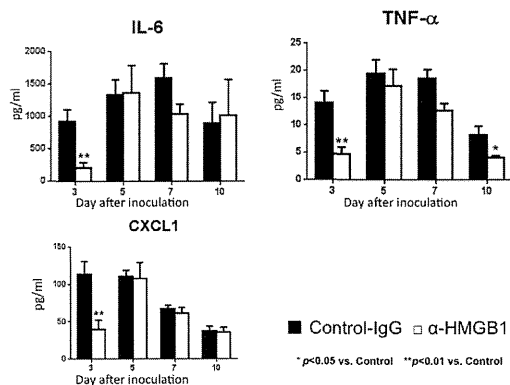
酸化ストレス

血清中の酸化ストレスマーカー (dROM) は抗 HMGB1 抗体投与群において感染後3日から10日目にかけて有意に抑制されていた。



サイトカイン

気管支肺胞洗浄液中のサイトカイン/ケモカイン (IL-6, TNF-α, CXCL-1) は感染後3日目に抗 HMGB1 抗体投与群において有意に抑制されていた。TNF-αについては抗 HMGB1 抗体投与群で感染10日目にも有意に抑制されていた。



D. 考察

本研究ではマウスインフルエンザ肺炎モデルを使用し、抗 HMGB1 抗体の治療効果を検証した。50%致死率のモデルを作成した後に2mg/kgの抗 HMGB1 抗体を感染後から1日1回3日間投与した。その結果、ほぼ完全な生存を得るに至った。

RAGE の発現

HMGB1 の代表的なレセプターである RAGE

抗 HMGB1 抗体の投与により、代表的レセプターである RAGE の発現抑制が起こり、そ

の結果インフルエンザ感染における key cytokine の抑制、酸化ストレスの軽減につながり、肺炎症像の改善が得られたものと考えた。一方で今回の実験では抗 HMGB1 抗体の抗ウイルス効果は確認されなかった。したがって、抗炎症・抗酸化作用の抗インフルエンザ治療における重要性が確認できた。

また、この結果は今後発生しうる鳥インフルエンザや SARS コロナウイルス、MERS コロナウイルスにおける急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) の脅威に対しても新たな治療法として期待できる可能性がある。

E. 結論

抗 HMGB1 モノクローナル抗体の静脈投与によりマウスインフルエンザ肺炎モデルの生存率の改善と肺組織病変の改善を得た。抗 HMGB1 モノクローナル抗体は新たな重症インフルエンザ感染に対する治療薬として期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nosaka N, Yashiro M, Yamada M, et al. Anti-High Mobility Group Box-1 Antibody Treatment Provides Protection against Influenza A Virus

(H1N1)-Induced Pneumonia in Mice. Crit Care Med (投稿中)

- Tsuge N, Oka T, Yamashita N, et al. Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis. J Neurovirol. 2014;20(1):73-84.

2. 学会発表

- 津下充 鶴丸靖子 野坂宜之 藤井洋輔 齋藤有希恵 八代将登 山下信子 塚原宏一 森島恒雄 痙攣重積を示したインフルエンザA (H1N1)pdm09及びロタウイルス胃腸炎の宿主遺伝子発現の解析 第46階日本小児感染症学会 東京 2014年(10月)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

インフルエンザ治療剤として特許出願中

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

メタボローム解析を用いたウイルス性脳症の 新規バイオマーカー候補の探索

分担研究者 伊藤 嘉規 名古屋大学医学部小児科学・講師

研究要旨 小児期に発症頻度の高いウイルス性脳症における新規バイオマーカーを探索する目的で、ヒトヘルペス6型 (HHV-6) 脳症9例と熱性けいれん20例、神経学的合併症のない対照例7名において、急性期血清検体中の代謝物プロファイリングをメタボローム解析にて検討した。検出された物質の中で、HHV-6脳症群では、熱性けいれん群と比較して、11種類の代謝物質の平均値に有意な上昇が認められた。これらの中で、トリプトファン-キヌレニン代謝経路の代謝産物であるキヌレニン・キノリン酸は、対照群と比較しても有意な上昇を示し神経毒性が報告されている物質であることから、病態に関与するバイオマーカー候補と考えられた。昨年インフルエンザ脳症を対照に同様の検討を行った結果と比較して、キヌレニン・キノリン酸は2つの脳症に共通の血清中バイオマーカー候補であった。

A. 研究目的

B. 研究方法

1. HHV-6 脳症と診断した患者 9 名、熱性けいれん例 20 名、および神経学的合併症のない急性発熱性疾患患者 7 名 (対照群) の急性期血清を採取し、比較検討した (計 36 検体)。
2. CE-TOFMS 装置 (キャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析、Agilent Technologies) を用いてカチオンモード、アニオンモードによる測定を行った。
3. 検出されたピークは自動積分ソフトウェアを用いて、ピーク情報を得た後、代謝物質データベースに登録された物質との照合・検索を行った。
4. 主成分分析、階層クラスター分析、代謝経路の描出を行った。
5. 定量系のあるものでは定量値を算出し同様に比較を行った。
6. 解析結果を群間で比較し、バイオマーカー候補の検討を行った。

C. 研究結果

1. 血清 36 検体について、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行い、159 ピークに候補物質が付与された。
2. 検出されたピークを用いて主成分分析を行った (Data not shown)。階層クラスターリングを行い、HeatMap 表示させた結果を得た。

3. 候補化合物について、解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、プリン代謝経路、ピリミジン代謝経路、ニコチン酸・ニコチンアミド代謝経路および各種アミノ酸代謝経路に描画した。
4. 56 の物質で定量が可能であった。これらのうち、HHV-6 脳症群では、熱性けいれん群と比較して、4 種類の代謝物質の平均値に有意な上昇がみられ、他方、7 種類で有意な低下が認められた (図 1)。
5. 上記の物質のなかで、キヌレニンおよびキノリン酸は、トリプトファン-キヌレニン代謝経路の代謝物質で、神経毒性が報告されており、この代謝経路における解析結果を図 2 に示す。

D. 考察

メタボローム解析の結果を検討したところ、トリプトファン-キヌレニン代謝経路の代謝物であるキヌレニン・キノリン酸が、病態に関係するバイオマーカー候補と考えられた。これらの代謝物は、私共が行ったインフルエンザ脳症を対象にした解析でもバイオマーカー候補として抽出されている。実験的に複数の作用機序による神経毒性も示されている。今後は、臨床的な応用の可能性についてさらに検討を加えていくことが重要と考えられる。

E. 結論

HHV-6 脳症の患者血清を用いた代謝物プロファイリングを行い、脳症群で有意な変動を示した代謝物は、新しいバイオマーカー候補と考えられた。今後、より詳細な解析を行い、その意義を確認する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato T, Nishida T, Ito Y, Murase M, Murata M, Naoe T. Correlations of programmed death 1 expression and serum IL-6 level with exhaustion of cytomegalovirus-specific T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cell Immunol*, 288(1-2):53-59, 2014.
 - 2) Hara S, Kawada J, Kawano Y, Yamashita T, Minagawa H, Okumura N, Ito Y. Hyperferritinemia in Neonatal and Infantile Human Parechovirus-3 Infection in Comparison with Other Infectious Diseases. *J Infect Chemother*, 20(1):15-9, 2014.
 - 3) Yamashita Y, Ito Y, Isomura H, Takemura N, Okamoto A, Motomura K, Tsujiuchi T, Natsume A, Wakabayashi T, Toyokuni S, Tsurumi T. Lack of presence of the human cytomegalovirus in human glioblastoma. *Modern Pathol*, 27(7):922-9, 2014.
 - 4) Kawano Y, Kawada J, Ito Y. Epstein-Barr Virus MicroRNAs in Plasma as Potential Biomarkers for Chronic Infections. *J Infect Dis* 209:1298-1300, 2014.
 - 5) Kanazawa T, Hiramatsu Y, Iwata S, Siddiquey M, Sato Y, Suzuki M, Ito Y, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-CCR4 Monoclonal Antibody Mogamulizumab for the Treatment of EBV-Associated T- and NK-Cell Lymphoproliferative Diseases. *Clin Cancer Res*, 20(19): 5075-84, 2014.
- ### 2. 学会発表
- 1) 伊藤嘉規、単純ヘルペスウイルスによる母子感染、第 117 回日本小児科学会学術集会、名古屋、2014. 4. 11-13.
 - 2) 伊藤嘉規、河野好彦、鳥居ゆか、安藤将太郎、神谷泰子、鈴木道雄、川田潤一、木村宏、国際標準物質を用いた Epstein-Barr ウイルス・サイトメガロウイルス定量 PCR 系の標準化、第 88 回日本感染症学会学術講演会、福岡、2014. 6. 18-20.
 - 3) Yoshinori Ito, Yoshihiko Kawano, Yuka Torii, Hajime Sato, Kazunori Sasaki, Tamaki Fujimori, Metabolome analysis reveals involvement of the tryptophan-kynurenine pathway in human herpesvirus 6 encephalopathy, IHW 2014, Kobe, 2014. 7. 19-23.
 - 4) Michio Suzuki, Tadashi Takeda, Hikaru Nakagawa, Seiko Iwata, Mohammed NA Siddiquey, Fumi Goshima, Yoshinori Ito, Takayuki Murata, Tatsuya Tsurumi, Hiroshi Kimura, Inhibitor B11B021 suppresses cell growth of EBV-associated T and natural killer cell lymphoma, IHW 2014, Kobe, 2014. 7. 19-23.
 - 5) Jun-ichi Kawada, Michio Suzuki, Yuka Torii, Yoshihiko Kawano, Tomomi Kotani, Fumitaka Kikkawa, Hiroshi Kimura, Yoshinori Ito, IHW 2014, Kobe, 2014. 7. 19-23.
 - 6) 鈴木道雄、河野好彦、鳥居ゆか、鈴木高子、安藤将太郎、神谷泰子、川田潤一、木村宏、伊藤嘉規、小児期生体肝移植例に対する移植後ワクチン接種の検討、第 46 回日本小児感染症学会総会・学術集会、東京、2014. 10. 18-19.
 - 7) 河野好彦、川田潤一、鈴木高子、安藤将太郎、神谷泰子、鈴木道雄、鳥居ゆか、伊藤嘉規、先天性サイトメガロウイルス感染症におけるバイオマーカーとしての血漿中ウイルス由来・ヒト由来 miRNA の解析、第 46 回日本小児感染症学会総会・学術集会、東京、2014. 10. 18-19
 - 8) 川田潤一、鈴木高子、安藤将太郎、神谷泰子、鈴木道雄、鳥居ゆか、木村宏、伊藤嘉規、バルガンシクロビルで治療した先天性サイトメガロウイルス感染症でのウイルス量の検討、第 46 回日本小児感染症学会総会・学術集会、東京、2014. 10. 18-19.
 - 9) 鳥居ゆか、川田潤一、村田貴之、吉山裕規、鈴木道雄、木村宏、伊藤嘉規、EB ウイルスの単球細胞における Inflammasome 活性化の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014. 11. 10-12.
 - 10) 鈴木道雄、岩田誠子、Mohammed NA Siddiquey、佐藤好隆、伊藤嘉規、五島典、村田貴之、木村宏、EBV 関連 T/NK リンパ腫・リンパ増殖性疾患に対するヒト化抗 CCR4 抗体の効果の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014. 11. 10-12.

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

小児重症ウイルス感染症における多因子解析

研究分担者 氏名 宮入 烈

所属・役職 国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 感染症科

研究要旨 インフルエンザを含む小児のウイルス感染症について、病原体ごとに患者背景・症状・身体所見・検査所見・重症度を含む多因子解析を行った。1) 2009 年パンデミックインフルエンザ (H1N1) 感染症症例 204 例のデータを基に多重回帰ロジスティック解析を行った結果、重症化予測因子として血清総蛋白低値と LDH 高値が挙げられた。重症化の予測式を作成し、2013-2014 年のデータを解析した結果予測的中率は 83%であった。2) 2009 年から 2014 年における集中治療室管理を要した重症例を対象とした多因子解析より主要関連因子を抽出しベイズ式ネットワークで各因子の主従関係を明らかにした。多因子解析は新たな感染症の重症化メカニズムを客観的に評価する有効な手段であると考えられた。

A. 研究目的

重症小児ウイルス感染症の重症化にかかわる多因子の解析を行い、重症化予測因子の解析および治療介入方法の検討を行う。本検討ではインフルエンザウイルスに対する検討を行った。

B. 研究方法

① 対象：2009 年パンデミック発生時に国立成育医療研究センターにインフルエンザ感染症を理由に入院した小児症例

後方視的に電子カルテから以下の検討項目抽出

- 年齢、性別、基礎疾患の有無、発熱から抗インフルエンザ薬投与までの時間、入院時バイタルサイン、入院時検査所見（末梢血、生化学）、胸部 XP 所見
- ICU 入室有無あるいは人工呼吸器管理の有無に寄与する因子の検討を多重

回帰ロジスティック解析で行う (SPSS22.1)

- 予測式を用いて、2013-2014 年症例の検討を行い、的中率を検討した。
- ② 対象：2009 年-2014 年の間に当院集中治療室で加療されたインフルエンザ症例について後方視的に電子カルテより以下の情報を抽出した。
 - 年齢、性別、基礎疾患の有無、発熱から抗インフルエンザ薬投与までの時間、入院時バイタルサイン、入院時検査所見（末梢血、生化学）
 - 各因子間の相関係数を pearson/spearman 解析で算出し、相関を線で表し図式化した。
 - 主要関連因子を抽出しベイズ式ネットワーク解析で各因子の主従関係を明らかにした。

(倫理面への配慮)

同研究は後方視的な検討であり、直接の患者介入は行わない。抽出した情報は匿名化し個人情報保護を行う。

C. 研究結果

- ① 2009年パンデミックインフルエンザ(H1N1)204症例のうちICU入室例は27例、人工呼吸器使用例は9例あった。中央値72か月(6歳)、発熱から抗インフルエンザ薬治療までの時間の中央値は15時間、基礎疾患を50%に有した。体温38.5°C、心拍数147/min、呼吸数40/min、SpO₂92%(RA)、AST29, ALT13, LDH260, TP6.7g/dL, BUN10mg/dL, CRTNNO.33mg/dL, Na137mEq/L, K4.1mEq/L, Cl103mEq/L, CPK104, WBC9730/uL, CRP1.9mg/dL, Hb12.8g/dL。人工呼吸器管理の有無により2群に分け、単変量解析を行ったところ、血清総蛋白、AST、ALT、LDH、Na、CRTNN値に有意差を認めた。上記項目をロジスティック回帰分析で解析しLDH(p=0.069)、TP(p=0.01)を用いた予測式を立てた。Mechanical ventilation=8.14+0.017xLDH-2.222xTP。同患者群における予測式的的中率は86.8%であった。同予測式を用いて2013-2014年の54症例の初期検査所見より人工呼吸器管理の必要の有無を検討したところ的中率は83.3%であった。
- ② 2009-2014年の間に当院ICUに入院した患者は70例で全体の17.2%の相当した。多因子の相関関係を図式化したところ、各因子の間接的な関係から病態に関する示唆が得られた。そのうち、関連が高い複数の因子につき、ベイズ式ネットワーク解析を行った結果、因子間の主従関係が示され、新たな予測モデルが構築された。同モデルを用いた予測も可能であり、その的中率について検討中である。

D. 考察

本解析により重症ウイルス感染症の病態を客観的に評価することが可能であることが示唆された。

インフルエンザ症例の解析においては、重症化の予測因子として入院時の血清総蛋白値、LDH値が有用である可能性が示された。血清アルブミン値が2009年パンデミックインフルエンザ感染症の重症化予測因子であることが報告されており、(Wi YM et al. Int J Clin Pract. 2014;68:222-9.)他に呼吸器感染症の重症化と血清総蛋白値の関連を示した先行研究は散見されるが病態や治療介入に関する意義は明確でない。本検討でも、治療介入に関わる明確な示唆は得られていない。ウイルスの亜型やウイルス量などより多くの因子を解析に含め、今後は治療介入との相関を検討することが必要である。

E. 結論

インフルエンザ呼吸器関連の重症化重症化予測因子として血清総蛋白低値とLDH高値が挙げられた。

F. 研究発表

1. 学会発表

Miyairi I, Miyata I: Viral Load Correlates With Infant Human Parechovirus Disease Severity. Pediatric Academic Societies (PAS) 2014, Vancouver, 2014. 5. 3

Miyairi I, Funaki T, Shoji K: Prediction and Validation of Severe Respiratory Distress due to

Influenza in Children. Accepted for Oral presentation. ASPR 2015. Osaka.

新庄正宜, 菅谷憲夫, 関口進一郎, 岩田敏, 高橋孝雄, 佐藤清二, 上牧務, 佐藤公則, 常松健一郎, 馬場哲聡, 藤野元子, 古市宗弘, 豊間博, 宮入烈, 明貝路子, 山口禎夫, 吉田菜穂子, 慶應小児インフルエンザ研究グループ: 迅速診断を用いた小児インフルエンザワクチンの効果 - test-negative case-control study -. 第46回日本小児感染症学会総会学術集会, 東京, 2014.10.19

2. 総説

宮入烈: インフルエンザ診療 - 日本と米国, 中国 -. インフルエンザ 2014;15(3):7-12

3. 著書

小村誠, 宮入烈: 8 小児科疾患 59 インフルエンザ (小児). 薬と検査 2014 薬物治療&服薬指導プラクティカルガイド, 南山堂, 2014;758-764

4. その他

森島恒雄, 細矢光亮, 岡部信彦, 庵原俊昭, 植田育也, 岡田賢司, 多屋馨子, 森岡一朗, 宮入烈: 2013/2014 シーズンのインフルエンザ治療指針. 日本小児科学会インフルエンザ対策ワーキンググループ, 日本小児科学会, 2014;5-8

G. 知的所有権の取得状況

なし