

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もあった。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

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 3 4 週 2 日 (病日 1) に発熱有り、2 日後 (病日 3、3 4 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 (3 4 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, Suzaki 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