

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

2000 年から 2014 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死亡例のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）標本を解析した。主な重症インフルエンザには脳症、心筋症、肺炎があげられるが、どの病態においてもインフルエンザウイルスのゲノムは呼吸器官に限定して検出され、ウイルス血症はみとめられない。季節性インフルエンザに併発する肺炎の肺組織では、ウイルス抗原は気管・気管支・細気管支上皮細胞には検出されたが、肺胞上皮細胞には検出されない。一方、2009 年パンデミックインフルエンザの初期の剖検例では病理組織学的にび慢性肺胞障害を呈し、肺胞上皮細胞にウイルス抗原が検出された。パンデミック終息後にも A/H1N1pdm09 感染に ARDS が併発して死亡する例がみられたが、ウイルス性肺炎による ARDS ではなく、敗血症や DIC などの全身性の炎症反応による ARDS であると考えられた。2013 年に中国で H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が報告され、H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスヒト感染例のように重症肺炎で死亡している。ヒトから分離された H7N9 インフルエンザウイルスの特徴を感染動物の気管・気管支・肺組織の病理学的解析により明らかにした。ヒトから分離された H7N9 は鳥から分離された H7N9 はヒトから分離された H7N9 (Anhui) は、マウス、サルの気管・気管支・細気管支上皮細胞、気管支腺上皮細胞、および肺胞上皮細胞に感染した。

A. 研究目的

インフルエンザの病理が注目されるようになったのは、2000 年以降、小児の脳症死亡例が増加し、脳症の病態の解析が急務となってからである。さらに致死率 50%以上の鳥インフルエンザや 2009 年のパンデミックインフルエンザによる死亡例の病理学的解析の報告が加わり、重症インフルエンザ

の病態の解明に助けとなる知見が集積してきた。本研究班において我々の分担研究の目的は、集積されたインフルエンザ剖検組織の解析により重症インフルエンザの病態を解明することである。これまで国立感染症研究所に依頼され検査したインフルエンザ脳症、インフルエンザに併発する心筋炎、パンデミックインフルエンザなどの剖検組

織標本を新しい分子病理学的解析などにより再度解析し、新しい知見を得ることが研究目的である。

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。

C. 研究結果

1. インフルエンザ例

2000 年から 2014 年まで計 56 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。2000-2002 年では小児脳症例が多く、2009-2011 年ではパンデミックインフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 感染症が 32 例であった。

2. インフルエンザ脳症の病理

脳: 19 例の脳症の脳組織において、炎症細胞の浸潤はなく、血管壁の硝子化、血漿成分の漏出と微小繊維素血栓がみられた。一部の神経細胞の変性とグリア細胞反応もみられた。免疫組織化学でウイルス抗原は検出されず、パラフィン切片中のウイルスゲノムも陰性であった。脳症例でも脳組織において IL-6 mRNA の発現が亢進しているものから検出されないものまでさまざまであった。血液・髄液中の IL-6 蛋白が高い

ものでは脳組織での IL-6 mRNA が高かった。

気管・気管支・肺: 気管・気管支には炎症所見があり、気管・気管支上皮細胞にインフルエンザウイルス抗原が検出された。肺野においては、肺胞病変は少なく、肺胞上皮細胞にウイルス抗原は検出されなかった。二次性細菌性肺炎の併発例が見られたものはあった。

3. 気管・気管支病変

インフルエンザ死亡例の全例で気管・気管支病変が見られた。上皮の剥離、軽度の炎症、うっ血、出血、浮腫がみられるものから壊死性出血性気管支炎像が見られた例もあった。死亡病日の早い例ではウイルス抗原が気管・気管支上皮細胞や気管支腺上皮細胞に検出された。A(H1N1)pdm09 インフルエンザでは好酸球の浸潤が目立つ例が多かった。

4. 肺病変

ウイルス性肺炎 A/H1N1pdm09 ウイルス感染の一部の症例は、肺の場所により異なる進行度のびまん性肺胞傷害 (DAD) の像を呈し、浮腫、硝子膜形成、出血、うっ血、炎症、線維化という所見が認められた。肺切片ごとにウイルス抗原量も異なり、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 (2,3-シアル酸) 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。

びまん性肺障害 臨床的に ARDS を呈した剖検肺組織ではびまん性肺障害 (DAD) を呈する。パンデミック終息後の症例であるが、臨床的には全身炎症反応が強く、呼吸器装

着時にすでに DIC や MOF がみられていた。病理像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 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、DIC が引き起こした ARDS ではないかと考えられた。

二次性細菌性肺炎 DAD は呈さず好中球が浸潤する細菌性肺炎を呈するものや、壊死性出血性気管支炎はあっても肺うっ血、肺水腫、肺出血などの非特異的な所見のみの例もあった。ウイルス抗原は気管支から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かった。

5. 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

(東京大学医科学研究所河岡研究室との共同研究である)

2013 年 4 月に中国において H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス (以下 H7N9 ウイルス) のヒトへの感染例が報告された。ほとんどが重症の急性呼吸促迫症候群 (ARDS) を併発して死亡している。中国から報告されたネクロプシー組織の病理学的解析によると、肺病理像は DAD で H5N1 と類似している。H7N9 は肺胞上皮細胞に検出されている。我々はヒトから分離された H7N9 ウイルス感染動物モデルの病理学的解析を行い、その特徴を明らかにした。

H7N9 流行初期に中国の患者から分離された H7N9 ウイルス、A/Anhui/1/2013 を鳥から分離された H7N9 ウイルス A/duck/Gunma/466/2011、2009 年にパンデミックとなった H1N1pdm09 ウイルス A/California/4/2009 を対照としてマウス、カニクイザル、フェレット、ミニブタに接

種し、接種後 3 日目と 6 日目の鼻腔、リンパ節、気管、気管支、気管支腺、肺組織の病理学的解析 (HE 染色、免疫組織化学) を行った。ヒトから分離された H7N9 ウイルスはカニクイザルの上気道と下気道の両方で感染増殖することが分かった。マウス、フェレットでは、鳥から分離された H7N9 ウイルスよりも強い炎症を引き起こし、サル、フェレットでは気管上皮細胞や気管支腺上皮細胞において、より多くのウイルス抗原が検出された。

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であり、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。

D. 考察

重症インフルエンザとして、脳症、臨床的心筋炎 (病理所見がない場合が多い)、肺炎が挙げられる。ウイルスが肺胞上皮細胞に感染するウイルス性肺炎が要因となる ARDS とウイルス感染により全身炎症反応、DIC が併発し肺外要因によって引き起こされる ARDS がある。後者の方がより一般的な ARDS かもしれない。しかしながらインフルエンザ感染後 3 病日で重症の低酸素症、ARDS を発症する機構には、発熱間もなく発症する脳症や心筋炎症状と同様、何らかの宿主因子が関与しているのではないかとと思われる。

E. 結論

重症インフルエンザの剖検組織を病理学的解析することで、重症インフルエンザの死亡原因を明らかにできると同時にウイルスの分布や、ウイルスゲノムの解析などが可能となった。重症インフルエンザの死因は呼吸不全だけではなく、脳症や心機能障害 (臨床的には心筋炎の疑い) の場合も多い。

ウイルス感染とこれらの症状がどのように関連するか解明するために病理標本を集積し、解析していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol*. 2012 Feb;84(2):336-44.
- 2) Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol*. 2012 Mar 16;7(3):552-62.
- 3) van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine*. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
- 4) Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood*. 2012 Dec 6;120(24):4733-43. Epub 2012 Oct 11.
- 5) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol*. 2012 Jan;25(1):1-13.
- 6) 中島典子、長谷川秀樹 インフルエンザウイルス感染症の病理 医学のあゆみ 241巻1号 : 4/7, 2012
- 7) 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, Okamoto 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*. 2013 Sep 26;501(7468):551-5. Epub 2013 Jul 10.
- 8) 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(3):357-69, 2013
- 9) 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.
 - 10) Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Aina 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.
 - 11) 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.
 - 12) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Aina 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.
 - 13) 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
- ### 国際会議
- 1) Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutaka Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy, Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki and Tetsutaro Sata Severe Influenza: Burden, Pathogenesis and Management(Second isirv Antiviral Group Conference) (ハノイ・ベトナム)2012年10月
 - 2) 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
- ### 国内会議
- 1) 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 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2012年11月
 - 2) 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、相内章、長谷川秀樹、田代真人 細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応

- 答への影響 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月
- 3) 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹 喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月
 - 4) 池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹 基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月
 - 5) 泉地恭輔、相内章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹 経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪) 2012 年 11 月
 - 6) 鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹 インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体の性状解析 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
 - 7) 相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹 感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
 - 8) Elly van Riet, Aina A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
 - 9) Hasegawa H, Aina A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
 - 10) 浅沼秀樹、相内章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代真人 野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
 - 11) 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内章、藤本陽、千葉丈 インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究~長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討~ 第 16 回日本ワクチン学会学術総会 (横浜) 2012 年 11 月
 - 12) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、熊坂利夫、佐多徹太郎、長谷川秀樹 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡したベトナム小児例の病理学的解析 第 101 回日本病理学会総会 (東京) 2012 年 4 月
 - 13) 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
 - 14) 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

- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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 TMRSS2 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

- 19) 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

