

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591493

研究課題名(和文) インフルエンザ心筋炎における血管内皮機能障害の意義と治療に関する研究

研究課題名(英文) Endothelial cell dysfunction in the pathogenesis of influenzavirus myocarditis, and treatment of influenzavirus myocarditis.

研究代表者

浮村 聡 (Ukimura, Akira)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：50257862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス心筋炎の機序は血管内皮機能障害であるという仮説がある。インフルエンザウイルスをマウスに接種し、インフルエンザウイルス心筋炎モデルを作成し、ノイラミニダーゼ阻害薬(ペラミビル)による効果を見た。組織学的に心外膜下及び血管周囲へのリンパ球浸潤と心筋細胞壊死を認め、心臓超音波検査にて収縮能低下を示し、ペラミビル投与により改善を見た。しかし心筋組織所見は軽度であり、心臓超音波検査にて急性期に明らかに心臓収縮能が低下することとは若干の乖離が見られた。治療群ではウイルスゲノム量の低下のみならず、各種炎症性サイトカイン、VCAM1の発現の低下がみられ仮説を支持する結果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Proinflammatory cytokines and endothelial cell dysfunction are thought to contribute to the pathogenesis of influenza myocarditis.

To analyze the effects of peramivir on influenza A virus myocarditis, we investigated cardiac function, histological findings and cytokine induction in murine influenza A virus-induced myocarditis. Fractional shortening of peramivir-treatment group was significantly higher than that of control group. Histological examinations revealed localized myocarditis with lymphocyte infiltration, and myocarditis lesions were found in perivascular areas or associated with pericarditis. Treatment with peramivir improved these findings. The expression of cytokine and adhesion molecule mRNA was suppressed in peramivir-treatment group. Peramivir may have potentiality to suppress pro-inflammatory cytokines and improve endothelial dysfunction.

研究分野：感染症内科学

キーワード：インフルエンザ 心筋炎 ノイラミニダーゼ阻害薬 血管内皮機能障害

## 1. 研究開始当初の背景

研究の背景：2009年春、新型インフルエンザ Pandemic2009 A (H1N1) が北米で発生、日本での総患者数は2000万人以上と推定された。今回のパンデミックは軽症型であったが、合併症のない小児での脳炎、脳症、ウイルス性肺炎さらに健康成人でのウイルス性肺炎や心筋炎の発症など従来の季節性 H1N1 とは異なる重症例を認めたのも事実であり、感染した宿主のインフルエンザウイルスに対する免疫的素因の相違が重症度に関与した可能性が推定される。

また今回のウイルスは肺で増殖しやすく、肺でのサイトカイン産生が剖検肺において証明され、サイトカインの過剰産生が脳症や心筋炎の発症に関与している可能性がある。新型インフルエンザの流行期には心筋炎の合併を疑い、心筋逸脱酵素の測定、心臓超音波検査を行うことが肝要である。

インフルエンザは心筋炎の原因ウイルスの一つであるが、決して心臓親和性の高いウイルスとは言えない。これまでにマウスのインフルエンザ心筋炎モデルの報告は数編あるが、いずれも心筋組織所見は軽度であり、急性期に明らかに心臓収縮能が低下することとは若干の乖離が見られた。木戸らは炎症性サイトカイン過剰産生に伴う血管内皮機能障害がインフルエンザ心筋炎の本質であるという仮説を提唱している (Cardiovascular Research, 89: 595-603)。またインフルエンザウイルス感染にはトリプシンが必要であるが、木戸らはトリプシンの抑制が治療に有効であるとしている。

パンデミックにおいて心筋炎は増加し、ほぼ全例において抗ノイラミニダーゼ阻害薬が投与されていた。抗ノイラミニダーゼ阻害薬が投与されたインフルエンザ劇症型心筋炎の予後は、以前行われた原因療法なしの後ろ向き臨床研究に比べ明らかに生存率が改善したわけではなかった。一方、臨床研究で

ヒトの心筋炎に対してヒトのインフルエンザ心筋炎に対する抗ノイラミニダーゼ阻害薬の効果を投与群と非投与群と比較検討する研究は倫理的に認容されるものではない。従って動物モデルにおける検討が必要と考えられる。

## 2. 研究の目的

感染宿主のインフルエンザウイルスに対する免疫的素因が重症度に関与した可能性が推察されるため異なる系のマウスを用いてインフルエンザ心筋炎の発症と宿主の先天的な免疫反応に関連があるかを検討する。さらに血管内皮機能障害がインフルエンザ心筋炎の本質であるという仮説を検証するため、各種薬剤でインフルエンザ心筋炎を治療しその効果と肺組織や心筋組織における炎症性サイトカインの発現や血管内皮機能障害についての検討を行う。

## 3. 研究の方法

### 実験 1

異なる系のマウス (A/J, C3H/He, Balb/c) にインフルエンザウイルスを経鼻接種しインフルエンザ肺炎、心筋炎を惹起させ系によりその発症率や重症度に差があるかどうかを検討する。

### 実験 2

インフルエンザウイルス性心筋炎を惹起しやすい系のマウスにインフルエンザウイルスを経鼻接種し、各種薬剤の効果を判定する。マウスは8週令の雄を使用し感染動物実験室で飼育し、その健康状態に問題がないことを確認し感染実験を開始する。

ウイルスは2009年のパンデミックにおいて重症化した症例からの分離株を使用した。

実験 1 では各種マウスを接種第 8 日目に麻酔下で心臓超音波検査を行い、心機能評価を行った後心臓と肺を摘出し、組織学的な検討および心臓及び肺の凍結保存を行った。これらの組織は後日ホモジネートを行い、インフルエンザウイルスゲノム、炎症性サイトカイン

(インターフェロン、IL-6)、接着因子 (VCAM1)、BNP の発現について定量的評価を行った。

実験 2 では 3 種の薬剤について検討を行った。薬剤名はペラミビル、ガベキサートメシル酸塩、オルメサルタンである。ウイルス接種第 3、5、8、14 日めに心臓超音波検査と心臓の組織学的検討ならびにインフルエンザウイルスゲノム、炎症性サイトカイン (インターフェロン、IL-6)、接着因子 (VCAM1)、BNP の発現について定量的評価を行った。心臓超音波では左心室の拡張終期径と収縮終期径を測定し Fractioning Shortening を測定した。

これらの実験は大阪医科大学の動物実験の指針に従い認可を受けて行った。動物実験は指定の感染動物実験室で適切な感染防護の実施下で行い、凍結組織の実験は内科学教室の P2 実験室で行った。すべての過程で感染性を有するものはオートクレーブ処理後に廃棄した。

#### 4. 研究成果

##### 実験 1

心臓親和性の高いコクサッキーウイルス心筋炎モデルで広範かつ心筋炎の組織所見が遷延する A/J や C3H/He マウスではあまり心筋炎は発症しなかった。一方で Balb/c マウスでは心外膜直下あるいは血管周囲にリンパ球浸潤と軽度の心筋壊死を伴う心筋炎病巣を認めた。しかしあくまでも心筋組織所見は軽度であり、心臓超音波検査にて急性期に明らかに心臓収縮能が低下することとは若干の乖離が見られた。

##### 実験 2

実験 1 の結果から治療に関する実験は Balb/c マウスを用いることとした。

8 週令の Balb/c マウス (雄) にインフルエンザウイルス A (H1N1pdm) を経鼻接種し無治療群とノイラミニダーゼ阻害薬であるペラミビル投与群に分けて検討を行った。ペラミビ

ルはウイルス接種日から 3 日間連続して筋肉注射にて投与した。無治療群は生理食塩水を投与した。

死亡率を求めるために各群 20 匹、各種検索のため各群 30 匹を用いた。

無治療群では組織学的にはリンパ球が心外膜下及び血管周囲に浸潤し心筋細胞壊死を伴う心筋炎を認めた。心臓超音波検査では心収縮能の低下を認めた。また心臓、肺でインフルエンザゲノムが認められ、心臓および肺にて炎症性サイトカインの発現量が増加した。また心臓における BNP の発現も増加した。またこの実験でのウイルス接種によりマウスの致死率は 40% であり、体重の増加が抑制され、心重量/体重比が非感染マウスよりも増加した。ペラミビル投与群では死亡はなく、体重も増加し、心重量/体重比も無治療群よりも有意に小さかった。無感染マウスに比べて感染マウスでは Fractioning Shortening は有意に低下したが、ペラミビル投与にて有意にその低下は抑制された。またペラミビル投与によりウイルスゲノムの量、炎症性サイトカイン (インターフェロン、IL-6)、接着因子 (VCAM1)、BNP の発現も有意に抑制された。以上の結果からノイラミニダーゼ阻害薬であるペラミビルはマウスの心筋炎モデルに対し有効と考えられた (論文 1)。

本モデルではこれまでの報告と同様に心筋炎病巣は限局的でかつ心外膜直下や血管周囲の炎症所見が主体であった。これらの部位は血管内皮機能が障害された結果、血管内からウイルスが侵入しやすい、あるいはリンパ球などが心筋組織に侵入した結果サイトカインが多く放出される可能性の高い部位と推定される。一方でノイラミニダーゼ阻害薬のオセルタミビルはその抗ウイルス効果以外に炎症性サイトカインの抑制などの多面的効果を発揮することが報告されている。またペラミビルもインフルエンザウイルスと肺炎球菌の混合感染モデルにて炎症性サイ

トカインを抑制した報告がある。これらを総合的に考えると我々の結果もやはりインフルエンザ心筋炎における血管内皮機能障害の重要性を支持するものと考えられる。

次にアンジオテンシン受容体拮抗薬であるオルメサルタンであるが、オルメサルタンには抗ウイルス効果はない。しかしオルメサルタン投与によりインフルエンザ感染マウスモデルにおける心機能低下を抑制する傾向と炎症性サイトカインの一部の抑制が認められた。従って本モデルにおいてもレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の関与が重要であることが推定される。またこの機序として血管内皮機能障害の改善により心機能が改善した可能性が高いと考えられる。また木戸らが提唱しているトリプシンの関与をみるために(Circulation Research, 89: 595-603) 蛋白分解酵素阻害薬であるガベキサートメシル酸塩の効果を検証した。本薬剤がインフルエンザ感染における抗炎症効果を示すという学会発表があったが、本モデルでは効果がみられなかった。この理由についてはトリプシンのみならず多くの蛋白分解酵素を阻害することが本モデルでは良い効果を及ぼさなかった可能性などが考えられる。

ヒトの劇症型心筋炎ではオセルタミビルのような経口薬の吸収は困難な状況が推定される。本研究の結果は注射剤であるペラミビルの心筋炎における積極的使用を支持するものと考えている。

また我々の行った疫学調査では成人においても小児においてもパンデミック時に心筋炎症例が増加したと考えられた(論文2、3)。心筋炎は肺炎や小児の脳症と比較して頻度は低く、主たる死因ではないが一旦発症するとその進行は急速でショックや致死的不整脈により死に至る。その救命のためには早期に診断し、対外補助循環の使用できる専門医療施設に搬送する必要があると考えられる。

研究代表者はこの研究期間に医療機関における新型インフルエンザ等対策ミニマム・エッセンシャルズに「心筋炎について」を執筆した(書籍1)。この章では新型インフルエンザ心筋炎の診断・治療に関する手引き(案)を示し早期診断の重要性について解説した。早期診断において重要なのはまず心筋炎の合併を疑い、心電図や心筋逸脱酵素の測定などでスクリーニングし心臓超音波検査で臨床診断することにある。心筋炎の治療においては1.原因に対する介入、2.自然軽快までの血行動態維持、3.炎症性物質による心機能抑制からの解放の3点が重要である(Circulation Journal, 75:734-743)。特に他の心筋炎と異なりインフルエンザ心筋炎においては迅速診断により急性期の原因診断が可能であり、ノイラミニダーゼ阻害薬による原因治療が可能であると考えられる。本研究におけるペラミビルのマウス心筋炎モデルにおける有効性の報告はこの面からも意義あるものと考えられる。また本研究でペラミビルは炎症性サイトカインの発現を抑制しており第3の効果も期待できる可能性がある。ステロイド療法はこの第3の観点からの治療であるが、その効果の評価は定まっておらず、ウイルス複製が活発な急性期には逆効果である可能性も否定できない。

実験1ではマウスの系により心筋炎の発症率やその重症度に差があることが示唆された。我々はインフルエンザに複数回罹患しそのたびに心筋炎を発症し体外循環を要した患者を経験し、本研究期間中に症例報告を行った(論文3)。この症例はやはり素因がヒトのインフルエンザ発症に強く関与していることを示唆していると考えられる。その素因の可能性としては、心臓は通常は糖を利用するが、危機に陥ると脂質を利用する。このことから心臓における脂質の代謝に障害があるヒトはリスクが高い可能性が推定される。木

戸らはマウスのインフルエンザ感染における高脂血症薬であるフィブラート製剤の有効性を報告しており (Mol Genet Metab. 2011;104:265-72.) この仮説は有力と考えられる。どのような脂質代謝異常の存在がインフルエンザ心筋炎発症のリスクとなるかについては今後検討すべき課題と考えられる。

以上の結果からマウスにおいてノイラミニダーゼ阻害薬であるペラミビルは心筋炎に有効と考えられた。また本研究の結果はインフルエンザ心筋炎における血管内皮機能障害の関与を支持するものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Ukimura A, Y Ooi, Y Kanzaki. The Neuraminidase Inhibitor Peramivir Ameliorates Myocarditis Induced by Influenza A (H1N1pdm) Virus in a Murine Model Clin Microbial 2015, 4:201 <http://dx.doi.org/10.4172/2327-5073.1000201> 査読 有
2. Yoshimizu N, Tominaga T, Ito T, Nishida Y, Wada Y, Sohmiya K, Tanaka S, Shibata K, Kanzaki Y, Ukimura A, Morita H, Hoshiga M, Ishizaka N. Repetitive fulminant influenza myocarditis requiring the use of circulatory assist devices. Intern Med. 2014;53(2):109-14. 査読 有
3. Ukimura A, K Kishi, T Yamada, Y Shibata, Y Ooi, Y Kanzaki, H Tamai. National Survey of Influenza Myocarditis in Japanese Children in Three Seasons. Clin Microbial 2014,

3:2http://dx.doi.org/10.4172/2327-5073.1000143 査読 有

4. Ukimura A, Ooi Y, Kanzaki Y, Inomata T, Izumi T. A national survey on myocarditis associated with influenza H1N1pdm2009 in the pandemic and postpandemic season in Japan. J Infect Chemother. 2013 査読 有  
Jun;19(3):426-31. 査読 有
5. Ukimura A, Satomi H, Ooi Y, Kanzaki Y. Myocarditis Associated with Influenza A H1N1pdm2009. Influenza Res Treat. 2012: 351979. 査読 有

[学会発表](計 3 件)

1. Peramivir (neuraminidase inhibitor) ameliorate influenza myocarditis associated with H1N1pdm. A.Ukimura: ESC Congress 2014, Barcelona, Spain, 2014 August
2. The need for increased awareness of influenza virus A-associated myocarditis in children during the pandemic season. Ukimura A, Ooi Y, Kanzaki . ESC Congress 2013, Amsterdam, Netherlands, 2013 August
3. Fulminant myocarditis associated with Influenza A pdmH1N1 in Japan, Ukimura A, Kanzaki Y, Izumi T. ESC Congress 2012, Munich, Germany, 2012 August

[図書](計 2 件)

1. 医療機関における新型インフルエンザ等対策ミニマム・エッセンシャルズ. 南江堂 岡部信彦監修、田辺正樹、大曲貴夫編集 第2章 4.C 心筋炎への対応について 浮村 聡 pp77-82、2014

2. 別冊日本臨床 新領域症候群シリーズ  
No25 感染症症候群(第2版)下 感染性  
心筋炎 浮村 聡 p p56-60,2013

〔その他〕

ホームページ等

[http://hospital.osaka-med.ac.jp/about/dept\\_list/related\\_section/kansen.html](http://hospital.osaka-med.ac.jp/about/dept_list/related_section/kansen.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

浮村 聡 (Ukimura Akira)  
大阪医科大学・医学部 教授  
研究者番号：50257862

(2)研究分担者

神崎 裕美子 (Kanzaki Yumiko)  
大阪医科大学・医学部 講師  
研究者番号：80445999