

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26460447
研究課題名(和文) インフルエンザの重症化の感染病理学的解析

研究課題名(英文) Pathological study of severe influenza

研究代表者

中島 典子 (Nakajima, Noriko)

国立感染症研究所・感染病理部・室長

研究者番号：60333358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザは自然治癒する疾患であるが、急性呼吸促迫症候群(ARDS)、脳症、心筋炎症状を併発し死亡する場合がある。本研究では、病理学的・分子生物学的手法によりインフルエンザ剖検組織を解析し、異なるARDSの発症機序があることを見出した。すなわち肺胞上皮細胞で増殖しやすいウイルスクローンが感染しウイルス性肺炎からARDSを併発し呼吸不全で死亡する機序とインフルエンザウイルス感染後に宿主の過剰な免疫応答により全身性炎症反応症候群(SIRS)が惹起され、ARDSを併発し多臓器不全で死亡する機序があることがわかった。インフルエンザ脳症では脳組織で炎症性メディエーターの発現が高いことが示された。

研究成果の概要(英文)：Although influenza is a self-limited disease, patients are complicated with acute respiratory distress syndrome (ARDS), encephalopathy, myocarditis symptoms and may die in some cases. Using pathological and molecular biological methods, we have examined autopsied tissues with influenza virus to find two pathological mechanisms of ARDS. One mechanism involves influenza virus clone that replicates well in alveolar epithelial cells. The patients develop viral pneumonia complicated with ARDS of pulmonary origin, which then leads to respiratory failure and the death of patients. The other mechanism involves infection-induced excessive immune responses. This then develops systemic inflammatory response syndrome (SIRS) concurrently with ARDS, and causes multiple organ failures. Furthermore, higher expression levels of inflammatory mediators were observed in brain tissues with influenza encephalopathy.

研究分野：感染症病理学

キーワード：重症インフルエンザ インフルエンザ脳症 ARDS サイトカインストーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 季節性インフルエンザは、一般に self-limited に治癒する疾患であるが、重症化し致死経過をとることがある。一方 H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス (以下 H5N1) ヒト感染症の致死率は 53% と高いが、ヒトからヒトへの感染例はほとんどない。2009 年のパンデミックインフルエンザウイルス (以下 A/H1N1pdm09) 感染症では、H5N1 感染症の場合と同様にウイルス性肺炎となり、急性呼吸促進症候群 (ARDS) を併発し、呼吸不全で死亡する例がみられた。小児では季節性インフルエンザ流行時にインフルエンザ脳症で死亡する例が毎年報告されている。重症化のメカニズムを解明し、重症化を予防することが求められている。

(2) インフルエンザの重症化因子としてウイルス因子、宿主因子、共感染因子が挙げられる。我々は A/H1N1pdm09 感染患者の剖検肺組織から回収されたウイルスが肺胞上皮細胞に感染しやすい配列であることを見出し、重症肺炎を併発するに至ったウイルス側の要因 (ウイルス因子) の 1 つを解明した。

(3) インフルエンザ脳症の脳病理像は脳浮腫であり、組織所見では血管外への蛋白漏出像が顕著であることが多い。インフルエンザウイルスが上気道の上皮細胞に感染することによって患者体内で過剰な免疫応答 (宿主因子) が引き起こされると、脳組織の毛細血管内皮細胞およびグリア細胞が障害され、脳血液関門 (グリア血管複合体) が破綻することが発症の一因と考えられている。

2. 研究の目的

(1) インフルエンザ重症化のウイルス側の要因の検索

一般に、各シーズンに流行しているインフルエンザウイルスゲノム解析は鼻咽頭ぬぐい液から分離されたウイルスの塩基配列をシーケンスして結果を得ている。よって肺胞領域に感染しているウイルスゲノムとは異なる可能性がある。また鶏卵等でウイルスを分離する場合は分離されるウイルスの主要なクローンが患者体内で主要であったものと異なる可能性がある。よって、インフルエンザ死亡例の上気道から肺組織に至る各組織から回収されるウイルスゲノムの解析は重要であり、特異的な特徴があるから明らかにする必要がある。

(2) 重症インフルエンザ病理組織切片局所における炎症性サイトカイン等の発現の解明
インフルエンザ死亡例で血中の炎症性メディエーター値が高い症例があることが報告されている。病理組織中の“局所における”炎症性メディエーターの発現レベルを解析する。

(3) インフルエンザ脳症における脳浮腫発症機序の解明

インフルエンザ脳症剖検肺組織、脳組織における炎症性メディエーターの発現、グリア血管複合体部位の病理所見等について解析し、脳浮腫の発症機構について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザ重症化のウイルス側の要因の検索

(材料) A/H1N1pdm09 感染 16 剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 肺組織、H5N1 感染小児のホルマリン固定パラフィン包埋肺組織。

(方法) FFPE 組織から回収された アクチン RNA 量を内因性 RNA 量として、A/H1N1pdm09 ゲノムのコピー数を real-time RT-PCR 法で調べた。ウイルスゲノムのヘマグルチニン (HA) 塩基配列をクローニング (2 例) あるいはダイレクトシーケンス (4 例) によって解析した。2003 年の H5N1 感染ベトナム小児例の FFPE 肺組織から回収されたウイルスゲノムの HA、NS1、PB2 領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法で調べ、GenBank (HM006759.1, HM006763.1, HM006756.1) に報告されている塩基配列と比較した。

(2) 重症インフルエンザ病理組織切片局所における炎症性サイトカイン等の発現の解明

(材料) A/H1N1pdm09 感染に ARDS を併発し死亡した 2 剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 肺組織、インフルエンザ脳症剖検例 (3 例) の FFPE 脳組織並びに肺組織

(方法) A/H1N1pdm09 感染に ARDS を併発し死亡した剖検例の肺組織から RNA を抽出し、IL-8、IP-10、MCP-1、IFN γ 、IL1b、IL-6、TNF α 、RANTES の mRNA コピー数を解析した。インフルエンザ脳症で死亡した 3 例の脳および肺組織において IL-6 mRNA コピー数を解析した。IL-6 mRNA を *in situ* hybridization 法を検出することを試みた。ARDS 併発例の FFPE 肺組織、脳症例の脳組織・心筋組織における後期炎症性メディエーターである HMGB-1 の発現を免疫組織化学で解析した。

(3) インフルエンザ脳症における脳浮腫発症機序の解明

(材料) インフルエンザ脳症剖検 FFPE 脳組織

(方法) グリア血管複合体における GFAP、アクアポリン 4 の発現を免疫組織化学で解析した。グリア血管複合体の構成要素であるアストログリアの突起崩壊 (Clasmatodendrosis) が脳症例でみられることが多いが、clasmatodendrosis とオートファジーとの関与を免疫組織化学の手法で解析した。またアポトーシスの過程で生じる断片化 DNA を TUNEL 法により検出した。

4. 研究成果

(1) インフルエンザ重症化のウイルス側の要因の検索

A/H1N1pdm09 感染に ARDS を併発し死亡した症例のうち、パンデミックシーズン初期の症例 A とパンデミック終焉後の 2011 年の症例 B の 2 例について比較検討した。両症例とも発症からおよそ 1 週間で死亡しており、症例 B のほうがより早く重症 ARDS を併発し、DIC も発症している(表)。両症例とも肺病理像はびまん性肺胞障害 (Diffuse alveolar damage : DAD) を呈していたが、症例 A では肺切片ごとに進行度の異なる DAD を呈し、症例 B ではすべての肺切片で同様な DAD 像を呈していた(図 1)。剖検肺組織中のインフルエンザウイルス量は症例 A は症例 B と比較して非常に多く、肺組織から回収されたウイルスにおいて、レセプター親和性を決定する HA 領域の塩基配列も異なっていた。ヒトの肺胞上皮細胞はヒト型レセプター (2,6 シアル酸) よりも鳥型レセプター (2,3 シアル酸) を主に発現している。症例 A の肺組織から回収されるウイルスは鳥型レセプターに親和性の高い HA を有し、肺胞上皮細胞で増殖しやすく、ウイルスコピー数が多いが、症例 B からは回収されたウイルスはヒト型レセプターに親和性が高いため、肺胞上皮細胞には感染しにくく、ウイルスコピー数が少ないことが分かった。

A/H1N1pdm09 はパンデミック終焉後も季節性インフルエンザウイルスとして流行しているが、2009 年から 2015/16 シーズンに A/H1N1pdm09 感染で死亡した 14 剖検例のうち、4 例で FFPE 肺組織から回収した HA 配列のダイレクトシーエンスが可能であったが、結果はすべてヒト型レセプターと親和性の高い配列であった。興味深いことに A/H1N1pdm09 剖検例ではほかの季節性インフルエンザ剖検肺組織と異なり、免疫組織化学でわずかであるが、肺胞上皮細胞にウイルス抗原が検出された。以上のことから、A/H1N1pdm09 はパンデミックシーズン後も ARDS を併発し重症化する例があること、その ARDS の要因としてはウイルス性肺炎というよりは sepsis などの全身性炎症反応の可能性があること、また肺胞上皮細胞にもわずかであるがウイルス抗原が検出されることがわかった。症例 A の重症化因子の 1 つは肺胞上皮細胞で増殖しやすい性質を有するウイルスクローンに感染したことであり、症例 B においてはウイルス因子よりも宿主因子を検索する必要があると考えられた。

H5N1 感染 FFPE 肺組織中の H5N1 ウイルスの HA、NP、PB2 塩基配列 (ダイレクトシーエンス法) は、上気道分泌液から分離したウイルスの塩基配列 (GenBank) と比較して変異はなかった。すなわちヒトの肺の中で、この領域において変異は見つからなかった。鳥から感染した鳥インフルエンザウイルスが

ヒトの肺胞領域まで到達し、そこで増殖したと考えられた。(患者の上気道組織のウイルスについてはサンプルがないため不明。)

	Case A	Case B
発症日	2009年8月	2011年1月
年齢/性	33歳 / 男性	50歳 / 男性
基礎疾患	肥満 (*BMI=38) 糖尿病 (HbA1c=6.8%) 拡張型心臓症 気管支喘息	肥満 (BMI=36) 糖尿病 (HbA1c=6.4%)
挿管病日	day 6	day 4
DIC	(-)	day 5~
死亡病日	day 8	day 7
肺区域の病理所見	進度が異なるDAD像	同様なDAD像
ウイルス抗原陽性細胞	(-) ~ (+++)	(-) ~ (+/-)
ウイルスコピー数/細胞	UDL~16262	0.2~ 20.8
HA遺伝子変異 (D222G/N)	あり	なし
ARDSの誘因	ウイルス性肺炎	全身性炎症反応?

表 : A/H1N1pdm09 感染に ARDS を併発し死亡した 2 症例の比較

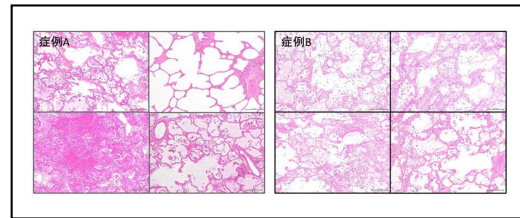


図 1 : 左右上下の肺葉のびまん性肺胞傷害 (DAD) 進行度 症例 A(左)、症例 B(右)

(2) 重症インフルエンザ病理組織切片局所における炎症性サイトカイン等の発現の解明

上述の症例 A と症例 B で、各肺切片ごとのサイトカイン・ケモカイン mRNA コピー数とウイルス RNA コピー数を real-time RT-PCR 法で調べたところ、症例 A ではウイルスコピー数に相関して IL-8、IP-10、MCP-1 の mRNA レベルが高かった。症例 B ではウイルスコピー数が少なく、相関は見られなかったが、IL-8 mRNA は症例 A と同等に高く、IP-10 mRNA、MCP-1 mRNA も局所で検出された。一方、IFN γ 、IL1b、IL-6、TNF α 、RANTES の発現はほとんどの切片で検出感度以下であった。

インフルエンザ脳症剖検脳および肺組織において IL-6 mRNA コピー数を解析した。血中及び髄液で高 IL-6 値を示した 1 例において、脳組織 (特に延髄と中脳) のほうが肺組織よりも IL-6 mRNA コピー数が高かった。IL-6 mRNA を *in situ* hybridization 法で検出することを試みたが、最も高かった脳切片でも検出感度以下であった。

後期炎症性メディエーターである HMGB-1 の発現を ARDS の FFPE 肺組織 (症例 A)、インフルエンザ脳症の脳組織・心筋組織で解析した。いくつかの肺胞上皮細胞では HMGB-1 は核よりも細胞質でシグナルが強かった。また脳症例の脳組織・心筋組織では血管内細胞の細胞質に強いシグナルが検出された。今後、解析する症例サンプル数を集積し、また正常

組織と合わせて結果を評価する予定である。

(3) インフルエンザ脳症における脳浮腫発症機序の解明

インフルエンザ脳症剖検 FFPE 脳組織のグリア血管複合体における GFAP、アクアポリン 4 の発現を免疫組織化学で解析した。GFAP はアストログリアのマーカータンパク質である。脳においては、グリア細胞が水バランスの役割を担っていると考えられているが、アクアポリン 4 は、グリア細胞に発現しており、脳浮腫の病態生理に関与していると報告されている。血漿タンパク漏出部位では血管周囲で GFAP、アクアポリン 4 のシグナルが減弱している傾向がみられた。しかしながらシグナルの強弱の評価をするには症例数の集積が必要である。グリア血管複合体の構成要素であるアストログリアの突起崩壊 (Clasmatodendrosis) が脳症例でみられることが多いが、clasmatodendrosis とオートファジーとの関与を免疫組織化学で解析した。オートファジー関連たんぱくである Beclin-1、LC3、LAMP-1、Atg5、Atg2 の検出を試みた。GFAP 陽性細胞で、Beclin-1、LC3、LAMP-1 が検出された。病態との関連は不明である。また、いくつかのグリア細胞の核は TUNEL 陽性であった。

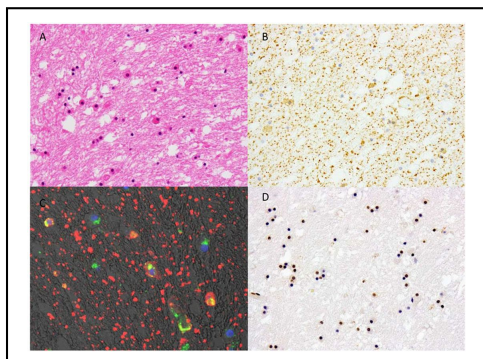


図 2 : A ヘマトキシリンエオジン染色、B GFAP 染色、C GFAP(赤)と LAMP-1(緑)の二重染色、D Tunnel(アポトーシスの検出)

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 9 件)

Hayashi K, Yoshida H, Sato Y, Tobiume M, Suzuki Y, Ariyoshi K, Hasegawa H, Nakajima N. Histopathological Findings of Lung with A/H1N1pdm09 Infection-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome in the Post-Pandemic Season. *Jpn J Infect Dis*. 査読有、2017, 70(2):197-200.
DOI: 10.7883/yoken.JJID.2016.120.

Iwatsuki-Horimoto K, Nakajima N, Shibata M, Takahashi K, Sato Y, Kiso M,

Yamayoshi S, Ito M, Enya S, Otake M, Kangawa A, da Silva Lopes TJ, Ito H, Hasegawa H, Kawaoka Y. The Microminipig as an Animal Model for Influenza A Virus Infection. *J Virol*. 査読有、2017,91(2):1-9
DOI: 10.1128/JVI.01716-16.

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*. 査読有、2014,15(6):692-705.
DOI: 10.1016/j.chom.2014.05.006.

中島典子、季節性および鳥インフルエンザウイルス感染症の病理 病理と臨床 査読無、2015,33 : 1146-1153.

中島典子、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの臨床、病理およびウイルス学的知見 化学療法の領域 査読無、2014,30:40-48.

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 査読無 2014,32 : 1146-1153.

中島典子 オリゴヌクレオチドプローブを用いた新しい *in situ* ハイブリダイゼーション法 呼吸 査読無 2014, 33: 152-159.

高橋健太、鈴木忠樹、中島典子、飛梅実、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 脳炎・脳症の病理 *Neuroinfection* 神経感染症 査読無 2014,19:32-39.

中島典子 インフルエンザ感染症の病理 小児内科 査読無 2014, 45:1935-1941.

〔学会発表〕(計 7 件)

Noriko Nakajima, Akihiko Hamamatsu, Kino Hayashi, Yuko Sato, Toshio Kumasaka, Minoru Tobiume, Hideki Hasegawa. Severe lung injury associated with A/H1N1pdm09 infection in the post-pandemic season. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 年 10 月 23-25 日、北海道・札幌市.

岩附研子、中島典子、長谷川秀樹、河岡義裕 近年のヒト分離 H3N2 インフルエンザウイルスに対するハムスターの感受性 第 159 回日本獣医学会学術集会 2016 年 9 月 6-8 日 神奈川県・藤沢市.

岩附研子、中島典子、柴田昌利、高橋健太、佐藤由子、木曾真紀、山吉誠也、伊藤睦美、塩谷聡子、大竹正剛、寒川彰久、伊東祐孝、長谷川秀樹、河岡義裕 マイクロミニピッグのインフルエンザ感染モデル動物としての有用性. 第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 7-9 日、青森県・十和田市

Noriko Nakajima, Yuko Sato, Osamu Kotani, Tadaki Suzuki, Toshiaki Kamei, Toru Takahashi, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa Modified In situ Hybridization AT-tailing to Visualize the Gene Expression in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. 2015 USCAP Annual Meeting 2015 年 3 月 21-27 日、ポストン (アメリカ合衆国)

Kentaro Hayashi, Noriko Nakajima, Yuko Sato, Harutaka Katano, Noriyo Nagata, Tadaki Suzuki, Minoru Tobiume, Hiroshi Yoshida, Yoshio Suzuki, Toshio Kumasaka, Tetsutaro Sata, Kota Ariyoshi, Hideki Hasegawa Correlations among Histopathological Characteristics, Viral distribution, and Cytokine/Chemokine Expression level within an Individual with A/H1N1pdm09 induced ARDS. 2015 USCAP Annual Meeting, 2015 年 3 月 21-27 日、ポストン (アメリカ合衆国)

渡辺登喜子 Gongxun Zhong Colin Russell 中島典子 八田正人 Anthony Handson 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 2014 年 11 月 10-12 日、神奈川県・横浜市.

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 2014 年 4 月 24-26 日、広島県・広島市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 典子 (NAKAJIMA NORIKO)

国立感染症研究所・感染病理部・室長

研究者番号：60333358