

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590449

研究課題名（和文） 高病原性新型インフルエンザウイルス感染症の比較病理および感染モデル動物の開発

研究課題名（英文） Comparative pathological study on H5N1 infection between humans and animals

研究代表者

阿部 賢治（Kenji Abe）

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：60130415

研究成果の概要（和文）：

タイで発生した H5N1 自然感染トラとネコの剖検例を病理学的に観察した。本症例は、H5N1 に感染した生鶏肉と鳩を食べて感染したものであることが推察されている。感染動物では、高熱と高度の呼吸障害をきたし、死亡している。剖検により、全身臓器に重度の出血性病変が観察された他、免疫染色にてインフルエンザ A ウイルス抗原が検出できた。更に、肺組織からはウイルス遺伝子が分離され、タイでヒト患者から分離された H5N1 と同じ遺伝子構造を示した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated autopsy cases of tigers and cats infected with H5N1. The animals had eaten fresh chicken or dead pigeon carcass infected with H5N1 and died caused by high fever and severe respiratory disorder. At necropsy, infected animals showed severe hemorrhagic lesion in a systemic organ. H5N1 related antigens was also detected in brain, lung and liver by an immunohistochemical method. Furthermore, a viral gene was isolated from lung tissue in infected animals and its showed high similarity to H5N1 isolated from a human patient in Thailand.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	0	1,500,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：医歯薬学 A・実験病理学

キーワード：インフルエンザ、H5N1、比較病理、感染動物、国際協力

1. 研究開始当初の背景

近年、新興・再興感染症が出現し、国境を越えて社会問題化している。とりわけ、重症急性呼吸器症候群（SARS）や高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）の出現は、人類の生存に警告を発しており、地球規模での対策推進が緊急課題として迫られている。これ

らの重要な新興感染症の多くは、アジア地域が発生源となっているから、日本としても国際協力の観点から、その予防対策確立は緊急性を要する重要課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、東南アジア各国の協力を

得て、ヒトおよび動物における H5N1 ウイルスの感染病理学的特徴を比較検討した上で、その発症機構および感染モデル動物の開発を試みることである。本研究を展開するには、H5N1 ウイルスの high endemic 地域との共同研究が不可欠である。更には、本研究を通じてアジア各国との交流を図り、感染症および病理学的研究のためのネットワーク網を根付かせて問題意識を共有し、将来に向けた国際共同研究体制を構築・維持することも大きな目標である。

3. 研究の方法

- 1) H5N1 ウイルスのアウトブレイクが発生しているタイとベトナムを中心に現地関係者の協力を得て、疫学の最新情報収集を含めた国際研究を進める。
- 2) タイで報告されている H5N1 動物感染例を病理組織学的に観察する。特に猫、虎、犬での重症例を中心に検討し、ヒトとの共通点、相違点を見出す。
- 3) 組織内の H5N1 関連抗原を免疫染色あるいは関連 RNA を in situ hybridization により検出し、ウイルスの体内分布を検索する。
- 4) ヒトおよび動物検体からのウイルスゲノム検出を試みる。
- 5) 分離されたウイルスゲノムの塩基配列を決定した後、分子系統樹解析によりゲノタイプを同定する。またホットスポット領域の遺伝子変異を見出して、病原性との関連を検討する。

4. 研究成果

- 1) 研究期間中のタイ、ベトナムでの H5N1 発生疫学調査結果：

タイでは 2006 年を最後にヒト、動物を含めた H5N1 感染が発生しておらず、このため、タイでの新たな症例を集めることは困難であった。一方ベトナムでは、最近でもヒトで発生しており、2007 年 8 例 (5 例死亡)、2008 年 6 例 (5 例死亡)、2009 年 5 例 (5 例死亡)、2010~2012 年にかけては計 3 例の H5N1 感染ヒト患者の発生を認めた。2010~2012 年にかけて認めた 3 例の内訳は、症例 1：22 歳男性 (2010 年 3 月発生)、症例 2：2 歳少女 (2010 年 4 月発生)、症例 3：26 歳の妊婦 (2012 年 1 月発生) である。症例 3 の新生児での H5N1 は陰性であった。いずれの症例でもヒトからヒトへの感染は観察されていなかった。症例 3 の場合感染経路として、患者が病鶏を調理したことが疑われている。WHO が統計を取り始めてから、ベトナムでのヒトにおける H5N1 感染例は今回の 3 例を含めて 121 例目となり、うち死亡例は 61 件となった。ベトナムでの人体剖検例を検討することで現地関係者と打ち合わせていたが、いずれの症例も剖検はできなかった。

- 2) 動物での自然感染例の病理学的所見：

タイ・チュラロンコン大学の協力で、トラの H5N1 感染による死亡例 2 例について、病理学的に観察することができた。本症例は、2003~2004 年にかけてタイで H5N1 が集団発生した時、H5N1 に感染した生鶏肉を食べて感染したものである。感染トラは、高熱と呼吸障害をきたし、死亡している。剖検により、全身性臓器に重度の出血性病変が観察された。病理組織学的には、肺病変が主体で、肺胞上皮の脱落消失、細気管支の消失、肺胞壁の肥厚、肺胞内への好中球・マクロファージなどを含む炎症性浸出物の析出、フィブリン析出などが観察された。1 例では、脳炎の病変も観察された。免疫染色にて、インフルエンザ A ウイルスの関連抗原が肺胞上皮、細気管支上皮、大脳神経細胞に局在を示した。

タイ・カセサート大学の協力で、ネコの H5N1 自然感染死亡例を病理学的に観察することができた。ネコ症例は、2003~2004 年にかけてタイで H5N1 が集団発生した時、H5N1 に感染した鳩を食べて感染したものである。41℃の熱発後、食欲不振、痙攣、運動失調をきたし、発病後 2 日で死の転帰をとった。剖検所見は、CNS では、大脳・小脳のうっ血、結膜炎、肺浮腫、重度の肺炎、腎うっ血、腸管出血を認めた。組織病理学的には、非化膿性脳炎、神経膠症、血管周囲炎を示した。他臓器では、肺の重度浮腫、うっ血を伴った間質性肺炎、肝細胞の多発性带状壊死、腎の尿細管壊死、脾の白脾髄減少が観察された。免疫染色にて、大脳神経細胞、心筋細胞、肺胞上皮、腎尿細管細胞、肝細胞、白脾髄細胞に H5N1 抗原陽性を示した。

- 3) ウイルス遺伝子の解析：

タイで 2004 年の流行時に発生した、H5N1 感染ネコ剖検例の肺組織から分離されたウイルス遺伝子を詳細に解析した。PCR 法にて HA 遺伝子、NA 遺伝子、PB2 遺伝子を各々増幅し、塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、同年にタイで発生したヒト由来 H5N1 と高い相同性を示し、分子系統樹解析からゲノタイプ Z に分類された。各領域では、HA 基の開裂部 (cleavage site) の基本的アミノ酸配列は SPQRERRRKKRR であった。NA 基には 20 個のアミノ酸 (49-68 番目) の欠如が認められた他、274 番目はヒスチジンを示したことから、薬剤耐性株では無いことが推察された。また PB2 基には、一アミノ酸置換 (E627K) が観察された。これらの三徴候は、いずれも高病原性新型インフルエンザウイルスとして特徴づけられている遺伝子配列であった。

- 4) アジアにおける感染症ネットワークの確立：

本国際研究を通じて、タイ、ベトナム、カンボジア、ミャンマー、中国との主要大学・医療機関との間で、緊密な関係を構築することができた。特にタイとベトナムと間では、現地での感染症の病理、血清、遺伝子診断の技術・研究指導を行うことが出来て、強い相互信頼関係を築くことができた。今後新たなエマージング感染症が現地で発生した場合、より迅速な国際連携作業が可能となる。

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9件)

1. Kenji Abe, Swan N. Thung, Han-Chieh Wu, Tung Thanh Tran, Phuc Le Hoang, Khai Dinh Truong, Ayano Inui, Ja June Jang, Ih-Jen Su: Pre-S2 deletion mutants of hepatitis B virus could have an important role in hepatocarcinogenesis in Asian children. *Cancer Science* 100: 2249-2254, 2009
2. Kenji Abe: Review: Pathology of hepadna virus infection in humans and animals. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 39: 453-455, 2009
3. Stephen C. Ward, Swan N. Thung, Kiat Hon Lim, Tung Thanh Tran, Thi Khang Bui Hong, Phuc Le Hoang, Ja June Jang, Young Nyun Park, Kenji Abe: Hepatic progenitor cells in liver cancers from Asian children. *Liver International* 30: 102-111, 2010
4. Moh Moh Htun, Khin Pyone Kyi, Khin May Oo, Myo Khin, Win Maw Tun, San San Oo, Khin Ohnmar Lwin, Kenji Abe: Presence of hepatitis C virus RNA by nested polymerase chain reaction in plasma-derived hepatitis B vaccine non-responders. *Myanmar Health Sciences Research Journal* 22: 101-104, 2010
5. David T. Chao, Kenji Abe, Mindie H. Nguyen: Systematic review: Epidemiology of hepatitis C genotype 6 and its management. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 34: 286-296, 2011
6. Van H. Pham, Huyen D.P. Nguyen, Phat T. Ho, Dien V. Banh, Hoa L.T. Pham, Phiet H. Pham, Ling Lu, Kenji Abe: Very high prevalence of hepatitis C virus genotype 6 variants in Southern Vietnam: Large-scale survey based on sequence determination. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 64: 537-539, 2011
7. Yiqi Wu, Tianzhen Wang, Shengqian Ye, Ran Zhao, Xiaohui Bai, Yingying Wu, Kenji Abe, Xiaoming Jin: Detection of hepatitis B virus DNA in paraffin-embedded intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma tissue in the northern Chinese population. *Human Pathology* 43: 56-61, 2012
8. Apiradee Theamboonlers, Kenji Abe, Chittima Thongmee, Yong Poovorawan: Complete coding sequence and molecular analysis of hepatitis A virus from a chimpanzee with fulminant hepatitis. *Journal of Medical Primatology* 41: 11-17, 2012
9. Yongshui Fu, Weibing Qin, Hong Cao, Ru Xu, Yi Tan, Teng Lu, Hongren Wang, Wangxia Tong, Xia Rong, Gang Li, Manqiong Yuan, Chunhua Li, Kenji Abe, Ling Lu: HCV 6a prevalence in guangdong province had the origin from Vietnam and recent dissemination to other regions of China: Phylogeographic analyses. *PLoS One* 7: 2012 (*epub ahead of print*)

[学会発表] (計7件)

1. Swan N. Thung, Tung Thanh Tran, Phuc Le Hoang, Ja June Jang, Young Nyun Park, Kenji Abe: Stem cell origin of liver cancers in Asian children. United States and Canadian Academy of Pathology, March 2009, Boston, U.S.A.
2. Kenji Abe: Invited lecture: Pathogenesis of hepatitis B virus infection and its related hepatocellular carcinoma. The 7th Pathology Conference of Vietnam, September 2009, Ho Chi Minh City, Vietnam
3. Kenji Abe: Invited lecture: Pathology of hepadna virus infection in humans and animals. The 4th Asian Society of Veterinary Pathologists (ASVP) Conference, November 2009, Bangkok, Thailand.
4. Kenji Abe, Swan N. Thung, Han-Chieh Wu, Tung Thanh Tran, Phuc Le Hoang, Ayano Inui, Ja June Jang, Ih-Jen Su: Hot spot mutation of hepatitis B virus pre-S2 gene related to hepatocellular carcinoma in Asian children. The Excellence in Pediatrics

International Conference, December 2009, Firenze, Italy.

5. Kenji Abe: Invited lecture: Hepatitis C in experimentally infected chimpanzees: comparison with hepatitis B. 4th Ditan International Conference on Infectious Diseases, July 2010, Beijing, China
6. Kenji Abe: Invited lecture: Molecular-based epidemiology and pathology of hepatitis B virus infection. The National Conference on Medical Molecular Biology and Biochemistry, September 2010, Hanoi, Vietnam
7. Kenji Abe: Invited lecture: Hepatitis B and C in Asia. National Conference of Vietnamese Association for Hepatology, August 2011, Dalat, Vietnam

[図書] (計1 件)

1. Kenji Abe: Chapter 76: Hepatitis B virus. In: Don Liu eds. Molecular detection of human viral pathogens. Florida, U.S.A.: Taylor & Francis CRC Press, 2010, p847-859

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

該当なし

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 賢治 (ABE KENJI)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：60130415

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：