平成21年度北里柴三郎記念学術奨励賞　受賞記念論文

インフルエンザ関連肺炎の重症化機序の解析と治療法の検討

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座（第二内科）
関　雅文　田中　章貴　小佐井康介　河野　茂

Key words：influenza virus, bacteria, innate immunity, cytokine storm

背　景

2009年には新型インフルエンザのパンデミックが現実のものとなった．通常の季節性インフルエンザも特に高齢者や基礎疾患を有する患者にとってきわめて重要な疾患であるが，インフルエンザそのものによる死亡は少なく，肺炎を中心とした合併症によるものが主と考えられる[1)~3)]．

インフルエンザに関連する肺炎は，ウイルスそのものによる原発性ウイルス肺炎と，細菌感染が関与する二次性もしくは重複感染型に二分され，特に前者では宿主側の過剰な免疫反応（サイトカインストーム）の関与が指摘されている[4)5)]．

二次性細菌性肺炎に関しても，ウイルスと細菌の相乗作用（シナジー）の他，サイトカインストームの関与が示唆されている[6)~10)]．我々は実際のヒトの症例においても，インフルエンザウイルス感染が合併した場合に細菌性肺炎が著しく重篤化することや，これらがサイトカインなどを介した免疫学的機序による可能性を見出している[3)11)12)]．

本稿では，このインフルエンザに関連した二次性細菌性肺炎および原発性インフルエンザ肺炎におけるその重症化機序に関して，我々の自験データを中心に概説したい．

二次性細菌性肺炎の病態

マウスを用いた感染実験においても，インフルエンザウイルスを接種した後に肺炎球菌を感染した場合など，各々の単独感染群と比べて，きわめて重篤化することが確認される[6)]．これらの重複感染マウスにおいては，有意な生存率の低下や肺胞出血を伴った病理学的変化の他，これに一致した免疫関連分子，すなわちサイトカインやケモカイン，Toll-like receptorsの強い発現が見られる．

一方，緑膿菌を先行感染させた慢性気道感染マウスにインフルエンザウイルスを重複感染させた場合にも同様の重症化が見られるとともに，一過性の好中球機能の低下の後，過剰な好中球の活性化が見られ[7)]，免疫機構の過剰もしくは破綻がインフルエンザウイルスの重複感染によって惹起されていると考えられる．

重症肺炎の発症にウイルスや細菌側の因子のみならず，宿主側の何らかの免疫関連分子が強く関与していることが予想され，遺伝子レベルの他，蛋白レベルでの重要な重症化関連分子の検出を進めたところ，まずDNAマイクロアレイを用いた解析では，PAF（platelet-activating factor：血小板活性化因子）および関連するPAF-AH酵素の活性化が観察された（Table 1）[8)]．

一方，プロテインチップ（Fig. 1）および2次元電気泳動による解析では，好中球機能を制御するα-antitrpsinおよび攻撃因子である好中球エラスターゼ，ミエロペルオキシダーゼ（MPO）やlysozymeなどの酵素やプロテアーゼ，そしてMIP-2（ヒトではIL-8に相当）などのサイトカイン・ケモカインの活性化が重要な役割を担っている可能性を突き止めた[9)]．

実際，プロテアーゼ阻害剤（メシル酸ガベキセート：FOY）を用いた治療実験において，インフルエンザウイルス感染単独ではあるが，その病態を一定の範囲内で制御できる可能性を見出しており，今後，重症インフルエンザ肺炎症例に対する治療への応用を検討している[10)]．

原発性インフルエンザ肺炎の重症化機序の可能性

原発性インフルエンザ肺炎においては，サイトカインストームなど，宿主側の免疫反応による影響がさらに大きいものと考えられる．

Le Goffic Rらは，TLR3ノックアウトマウスを用いたインフルエンザウイルスの感染実験において，過剰な炎症反応の抑制が生存率の向上に寄与する可能性を示した[13)14)]．すなわち，本来，生体にとって有益なはずの免疫反応が，過剰な炎症反応としてかえって組織障害性に「両刃の剣」として機能する可能性である[15)]．膠原病やアレルギー性疾患の他，感染症でもセプシスなどでその可能性が示唆されている[16)]．

我々は，TLR関連シグナル伝達因子の遺伝子欠損を用いた感染実験から，サイトカインストームに代表される過剰な宿主側の免疫反応が，やはりインフルエ

別刷請求先：（〒852-8501）長崎市坂本1丁目7番1号
長崎大学病院第二内科　　関　雅文

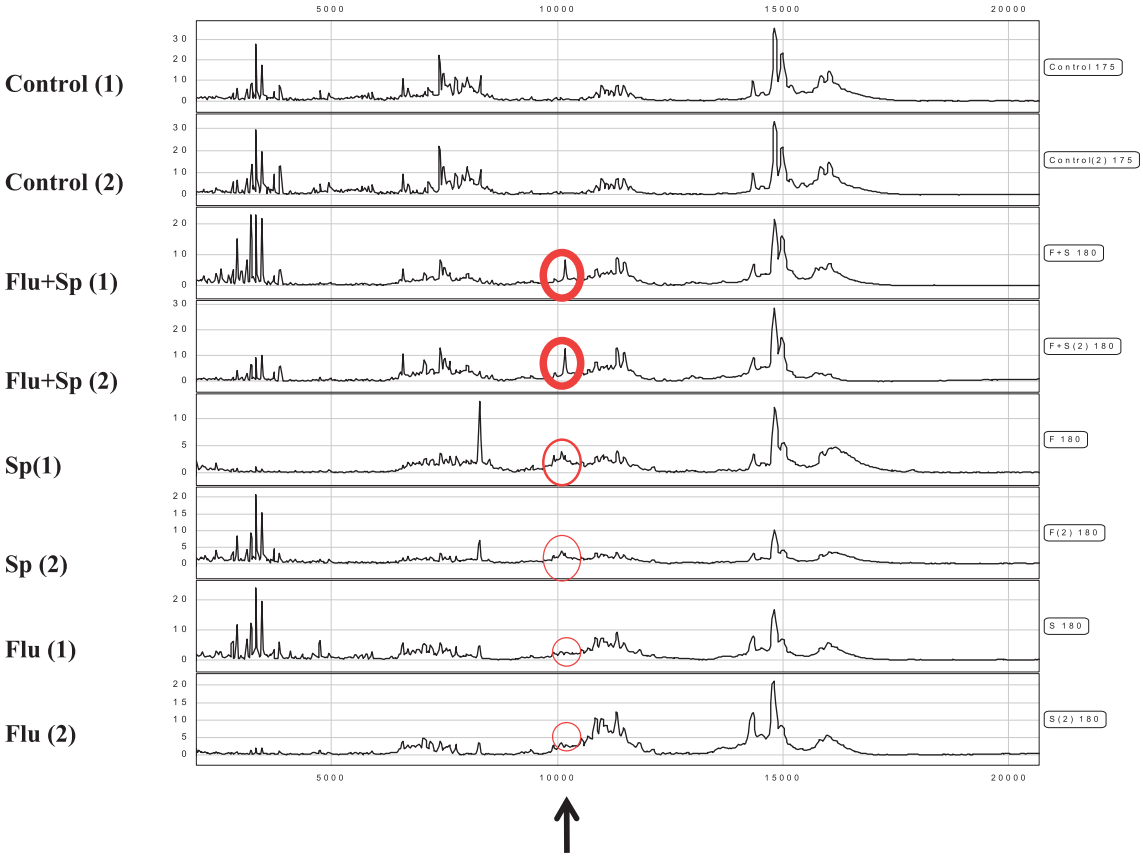
平成22年11月20日

Table 1　Induced genes in co-infected lungs analyzed by DNA microarray

Gene Name	Gene Bank Accession Number	Fold Differences*
TATA-box binding protein	U63933	6.1 (2.3)
G protein coupled receptor	NM 010336	5.8 (3.3)
Platelet activating factor (PAF) acetylhydrolase	U577747	5.3 (4.3)
Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	U12473	5.0 (2.0)
Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2)	U63337	3.5 (2.5)
CD19 antigen	NM 009844	3.4 (4.2)
Transforming growth factor beta (TGF-b) induced transcriptase	NM 009365	3.3 (1.1)
Ubiquitin activating enzyme, E1C	AF077330	3.2 (1.2)
UDP-glucuronosyltransferase 1 family member 1	U16816	3.2 (none)
Angiotesinogen	AF045887	2.8 (none)
Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein	U87814	2.8 (none)
E2F binding protein 1	AF015948	2.5 (1.2)
Nucleotide binding protein 1	NM 011955	2.4 (none)
Coagulation factor VII	U44795	2.1 (1.1)

*Fold differences indicated ratio of the genes expression in co-infected lungs, compared with those in single (bacteria or virus only) infected lungs; *left*; : bacteria only, and *right* (　): virus only infection.

Fig. 1　Induced signals in co-infected lungs analyzed by protein tip system. Common signals were found in both single and co-infected lungs (arrow).



ンザ感染症の重症化に大きな役割を果たしている可能性も改めて見出した[5]．

すなわち，TLR の細胞内シグナル伝達においてきわめて大きな役割を果たしている Myd88 の negative regulator である IRAK-M 遺伝子を欠損させたマウス（*IRAK-M*$^{-/-}$マウス）に比較的多量のインフルエンザウイルスを感染させたところ，通常の野生型マウス（WT マウス）に比べて，自然免疫系の反応がきわめて増強し，結果的にはサイトカインやケモカインの発現の増加が見られた．これらの反応は過剰であったと考えら

Fig. 2　'Cytokine storm' and lung injury in *IRAK-M*$^{-/-}$ mice.
A. Cytokines/chemokines in lungs of *IRAK-M*$^{-/-}$ mice infected with influenza virus. *p < 0.01; **p < 0.001; significant differences among groups. WT mice (open bars); *IRAK-M*$^{-/-}$ KO mice (closed bars). CTR, control (saline-infected)
B. Histopathological analysis of mouse lungs collected at 2 days or 6 days after inoculation with influenza virus. *IRAK-M*$^{-/-}$ mice and WT mice. H&E-stained tissue sections at magnifications of × 40 and × 100.

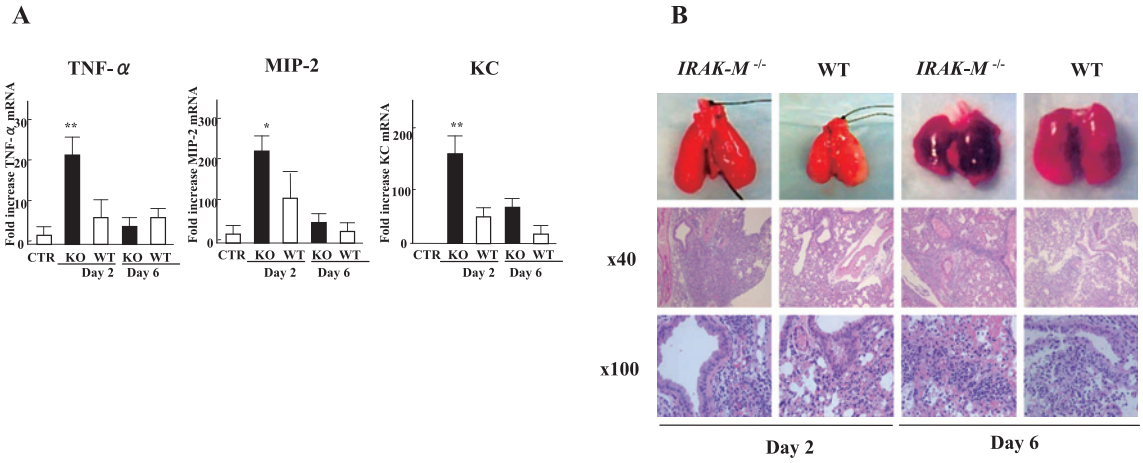
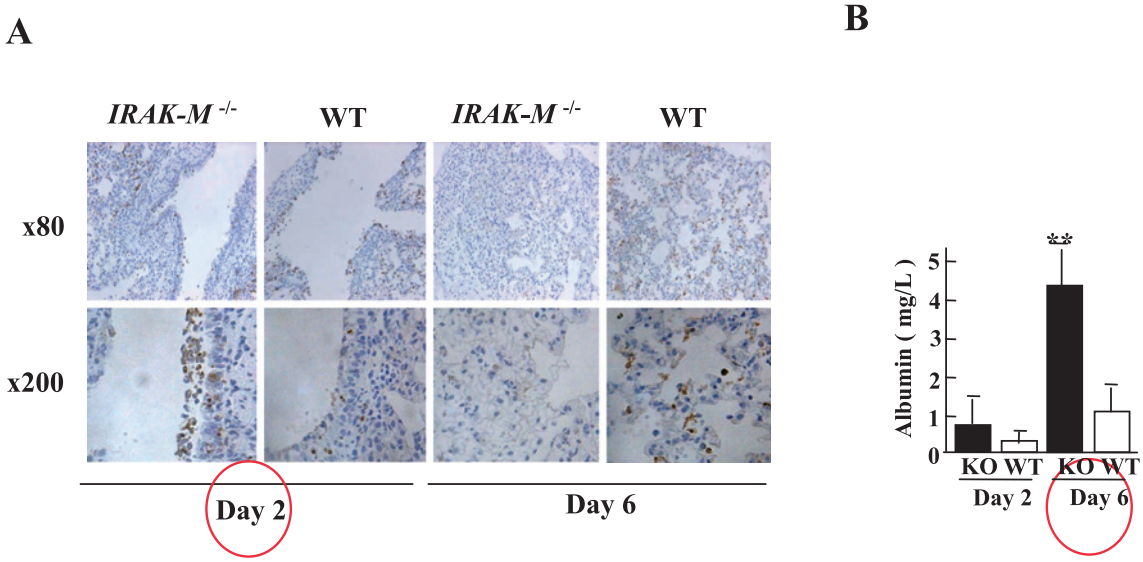


Fig. 3　Apoptosis in lungs of *IRAK-M*$^{-/-}$ mice infected with influenza virus.
A, TUNEL stains of lung tissue sections. Lungs were collected 2days or 6days after viral inoculation. *IRAK-M*$^{-/-}$ mice and WT mice H&E-stained tissue sections at magnifications of × 80 and × 200
B, Lung permeability of *IRAK-M*$^{-/-}$ mice infected with influenza virus (n = 4) assessed by quantitation of albumin concentrations in BALF from each mouse 2 and 6 days postinfection. Data are expressed as means ± SD. **p < 0.001 among groups. WT mice (open bars); *IRAK-M*$^{-/-}$ KO mice (closed bars).



れ（Fig. 2A），病理学には野生型のマウスより高度の炎症と強い組織障害が肺内に観察された（Fig. 2B）．

この遺伝子欠損マウスにおける肺炎の重症化の機序の一つとして，過剰かつ早期からのアポトーシスが肺内細胞に惹起されていることが考えられる（Fig. 3A）．本来，感染したウイルスを除去するために起こる正常な生体反応であるが，これが多量のウイルス感染に伴って，特に遺伝子欠損マウスでは過剰に生じ，ウイルスに感染した気道上皮細胞などの除去が過剰に進行し，かえって組織障害を強めている可能性が考えられる．

また，一方で，組織障害：肺透過性を示す指標として，肺胞洗浄液中のアルブミン量を測定したところ，病理像と一致して遺伝子欠損マウスでは肺透過性がき

Table 2　Characteristics of New Anti-influenza drugs in Japan

General Name	Peramivir hydrate	Laninamivir	Favipiravir
Code Name	S-021812	CS-8958	T-705
Administration	Intraveneous drip	Inhalation	Oral
Number of times	Once	Once	2 times x 5 days
Mechanisms	LANI *	LANI *	Viral RNA polymerase inhibitor
Situation	January 2010, On sale (RAPIACTA)	September 2010, Approved (INAVIR)	2009-10 season, On clinical trials (Phase Ⅲ)

* LANI: Long Acting Neuraminidase Inhibitors

わめて強く亢進しており，血管内皮細胞も強く障害を受け，結果的に高度の肺水腫が惹起されていることが示唆される．

このように，特殊な遺伝子的背景を持った宿主に多量のウイルス感染が生じた場合，過剰な免疫反応がかえって強い組織障害＝炎症：重症肺炎を生じ，かつ，組織障害に伴う高度の肺透過性の亢進＝肺水腫を引き起こすことが病気の本態と現在考えている．

すなわち，主に小児に代表されるインフルエンザの中枢神経系の合併症として脳炎（炎症）や脳症（浮腫）が挙げられるが，肺でも同様の病態が同時に生じている可能性が示唆される．本来無菌で，外界とは隔絶されている中枢神経系と，常に外界にさらされ，刺激を受けている呼吸器系臓器の違いも大きいのかもしれない．

いずれにせよ，これらは二次性細菌性肺炎の場合と同じく主に好中球の活性化が大きな役割を担っており，また，細胞内に感染し，強いサイトカイン誘導能を有するインフルエンザなどのウイルスが感染した場合と，細胞外で増殖する一般細菌が感染した場合では，その惹起する炎症反応の強さやアポトーシスをはじめとする肺内での免疫反応の意味合いが大きく異なっていることも考えられる[5]．将来的には感受性遺伝子の解析により，重症化するヒトを予測できる可能性も示唆される．

治療と予防

インフルエンザの臨床は，オセルタミビルなど抗インフルエンザ薬の登場により，従来の対症療法中心の時代とは比較にならないほど飛躍的な発展を遂げたのはいうまでもない．これらをベースに使用しながら，抗菌薬をはじめとする他の薬剤をいかに使用するかが課題である[1)2)]．

前述のように，通常のかぜ症候群であれば抗菌薬の投与は必要とせず，対症療法を基本とする．しかし，インフルエンザウイルス感染症の場合は細菌性肺炎の合併が多く，特に高齢者であれば，抗ウイルス薬のみならず，積極的な抗菌薬の併用も考慮すべきなのかもしれない[2]．但し，抗ウイルス薬と抗菌薬による治療効果を比較した場合，インフルエンザ関連細菌性肺炎では抗インフルエンザウイルス薬の投与の方がより重要性を持っている可能性もマウスを用いたデータから強く示唆されている[17]．

今後，筋注・静注が可能なペラミビルをはじめ，新規抗インフルエンザ薬が続々と登場し，二次性細菌性肺炎のような重症インフルエンザ肺炎にも多大な効果を示すことが期待される（Table 2）[18]．ワクチンに関しても，インフルエンザワクチンのみならず，肺炎球菌ワクチンの接種も進みつつあり[1]，インフルエンザおよび関連する重症細菌性肺炎の診療戦略は新たな段階に入ったと言えよう．

おわりに

近年はウイルスにおけるリバースジェネテイクスの技術も進歩し，スペイン風邪などにおける重症インフルエンザ感染症でのウイルス側遺伝子の役割も解明しつつある[19]．

今後，宿主側のみならず，ウイルスおよび細菌の遺伝子組み換え株なども用いて，インフルエンザウイルスに関連した二次性細菌性肺炎はもちろん，ウイルス性肺炎そのものの重症化機序も含めて解析を進める予定である．

文　献

1）呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会：市中肺炎診療ガイドライン．日本呼吸器学会，東京，2007.
2）呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会：成人気道感染症診療の基本的考え方．日本呼吸器学会，東京，2003.
3）Seki M, Kosai K, Yanagihara K, Higashiyama Y, Kurihara S, Izumikawa K, *et al.*：Disease severity in patients with simultaneous influenza and bacterial pneumonia. Intern Med 2007；46：953―8.
4）Seki M, Suyama N, Hashiguchi K, Hara A, Kosai K, Kurihara S, *et al.*：A patient with fulminant influenza-related bacterial pneumonia due to *Streptococcus pneumoniae* followed by *Mycobacterium tuberculosis* infection. Intern Med 2008；47：2043―7.
5）Seki M, Kohno S, Newstead MW, Zeng X, Bhan

U, Lukacs NW, *et al.*：Critical Role of IRAK-M in Regulating Chemokine-dependent Deleterious Inflammation in Murine Influenza Pneumonia. 2009. J Immunol 2010；184：1410—8.

6) Seki M, Yanagihara K, Higashiyama Y, Fukuda Y, Kaneko Y, Ohno H, *et al.*：Immunokinetics in severe pneumonia due to influenza virus and bacteria coinfection in mice. Eur Respir J 2004；24：143—9.

7) Seki M, Higashiyama Y, Tomono K, Yanagihara K, Ohno H, Kaneko Y, *et al.*：Acute infection with infuenza virus enhances susceptibility to fatal pneumonia following *Streptococcus pneumoniae* infection in mice with chronic pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Exp Immunol 2004；137：35—40.

8) Seki M, Kosai K, Hara A, Imamura Y, Nakamura S, Kurihara S, *et al.*：Expression and DNA microarray analysis of a platelet activating factor-related molecule in severe pneumonia in mice due to influenza virus and bacterial co-infection. Jpn J Infect Dis 2009；62：6—10.

9) Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, *et al.*：Two-dimensional gel electrophoresis analysis in simultaneous influenza pneumonia and bacterial infection in mice. Clin Exp Immunol 2008；152：364—71.

10) Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, *et al.*：Gabexate mesilate suppresses influenza pneumonia in mice through inhibition of cytokines. J Int Med Res 2008；36：322—8.

11) Seki M, Hashiguchi K, Kosai K, Higashiyama Y, Yanagihara K, Kurihara S, *et al.*：A patient with fulminant primary influenza pneumonia which developed into secondary bacterial pneumonia. Acta Medica Nagasakiensia 2006；51：121—4.

12) Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, *et al.*：Elevated levels of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in sera from patients with severe bacterial pneumonia coinfected with influenza virus. Scand J Infect Dis 2008；28：338—42.

13) Le Goffic R, Balloy V, Lagranderie M, Alexopoulou L, Escriou N, Flavell R, *et al.*：Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR) 3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. PLoS Pathog 2007；3：e187.

14) Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, *et al.*：Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. J Immunol 2007；178：3368—72.

15) Si-Tahar M, Touqui L, Chignard M：Innate immunity and inflammation--two facets of the same anti-infectious reaction. Clin Exp Immunol 2009；156：194—8.

16) Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, *et al.*：TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. J Exp Med 2008；205：2609—21.

17) Mc Cullers JA：Effect of antiviral treatment on the outcome of secondary bacterial pneumonia after influenza. J. Infect Dis 2004；190：519—26.

18) Kohno S, Kida H, Mizuguchi M, Shimada J：A double-blind, placebo controlled study of intravenous peramivir in acute influenza patients. Antimicrobial Agent Chemother 2010；54：4568—74.

19) Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y：Orthomyxovirus Field's Virology Fifth edition. 2007；p. 1691.

Mechanisms and Theraupeutic Analysis for Severe Influenza-related Pneumonia

Masafumi SEKI, Akitaka TANAKA, Kosuke KOSAI & Shigeru KOHNO
Department of Molecular Microbiology and Immunology (2nd Internal Medicine),
Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

〔J.J.A. Inf. D. 84：689～693, 2010〕

平成22年11月20日