

氏 名	PHAM VAN LOI
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第707号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年 3月10日
学位論文題目	Pathogenicity of Pandemic H1N1 Influenza A Virus in immunocompromised Cynomolgus Macaques (免疫低下カニクイザルにおけるパンデミック H1N1 亜型インフルエンザ ウイルスの病原性)
審査委員	主査 教授 後藤 敏 副査 教授 依馬 正次 副査 教授 大路 正人

論文内容要旨

*整理番号	713	(ふりがな) 氏名	ふあん ばん ろい PHAM VAN LOI
学位論文題目	Pathogenicity of Pandemic H1N1 Influenza A Virus in immunocompromised Cynomolgus Macaques (免疫低下カニクイザルにおけるパンデミック H1N1 亜型インフルエンザウイルスの病原性)		
<p>【目的】 Pandemic (H1N1) 2009 influenza virus spread throughout the world since most people did not have immunity against the virus. In the post pandemic phase when many humans might possess immunity against the pandemic virus, one of the concerns is infection in immunocompromised people. Therefore, we used an immunosuppressed macaque model to examine pathogenicity of the pandemic (H1N1) 2009 virus under an immunocompromised condition.</p> <p>【方法】 Five- to seven-year-old female cynomolgus macaques were used. The seasonal influenza virus A/Yokohama/91/2007 (H1N1) or the pandemic influenza virus A/Narita/1/2009 (H1N1) pdm was inoculated into the nostrils, oral cavity, and trachea of each macaque. For immunosuppression, cyclophosphamide was injected intravenously and cyclosporine A was administered into stomach using catheters. Virus titers in swab samples and tissue samples were determined using MDCK cells. The numbers of leukocytes in blood were counted using a hemocytometer and a microscope. For flow cytometry, whole blood cells were stained with fluorescence-conjugated antibodies. The concentrations of cytokines and chemokines were measured using commercial ELISA and bead array kits. After autopsy, lung tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Influenza A virus nucleoprotein (NP) was stained with anti-NP antibody for histological analysis. Experiments using live virus were performed in the biosafety level 3 facility of the Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical Science.</p> <p>【結果】 Firstly, we determined a regimen to suppress immunity in cynomolgus macaques using cyclophosphamide (CP) and cyclosporine A (CA). In the blood of a macaque treated with CP (40mg/kg) and CA (50mg/ml), the white blood cell count was decreased 7 days after the beginning of suppressive treatment, especially the percentages of CD4+ and CD8+ cells were decreased. The decrease in number of white blood cells continued until day 14 (7 days after the end of treatment).</p>			

In lung tissues collected 7 days after virus infection, virus was under the detection limit in all of the immunocompetent macaques infected with seasonal influenza virus, whereas the virus was detected in the upper and lower respiratory organs of immunosuppressed macaques. Pandemic virus was detected in tissues from upper and lower respiratory organs of immunocompetent macaques inoculated with pandemic 2009 virus. High titers of pandemic virus were detected in upper and lower respiratory organs in three immunosuppressed macaques.

Average levels of IL-18, IL-6, and MCP-1 production in lungs of the immunosuppressed macaques infected with pandemic virus were higher than those in immunocompetent macaques infected with pandemic virus. TGF- β production in lungs of the immunocompetent macaques infected with pandemic virus was greater than that in immunosuppressed macaques.

Without immunosuppression, both pandemic and seasonal virus induced severe lymphoid infiltration congestion in lungs of the macaques. In the immunosuppressed macaques infected with pandemic and seasonal virus, mild lymphoid infiltration in the lungs was microscopically observed.

【考察】 High levels of virus propagation inducing cytokine production was related to severe morbidity in immunosuppressed macaques. Especially in pandemic virus infection in immunosuppressed macaques, low production of immunosuppressive TGF- β might enhance inflammation.

Under the immunosuppressive condition, since lymphoid infiltration in lungs of infected macaques were mild, it is thought that inflammatory cytokines were produced by alveolar epithelial cells and stromal cells rather than leukocytes. This suggests anti-inflammatory drugs do not necessarily suppress inflammation.

【結論】 Under an immunosuppressive condition, the pandemic influenza (H1N1) 2009 virus might cause more severe morbidity with high cytokine/chemokine production by the host innate immune system than that seen in macaques under the immunocompetent condition. Therefore, development of other types of anti-hypercytokinemia treatment rather than anti-inflammatory drugs is required for immunocompromised patients with influenza virus infection.

【目的】2009年に登場したパンデミックインフルエンザウイルスは世界中に感染が拡大した後、季節性インフルエンザに移行した。しかし、現在まで大幅な変異は報告されておらず、ウイルスの基本特性に変化はないと考えられる。これまでの季節性インフルエンザウイルス感染で重症となりやすい人は、高齢者、低年齢小児、免疫抑制療法中の患者、免疫が低下するような基礎疾患を有する人である。今後はこれらの免疫の不十分な人たちにおけるインフルエンザウイルス対策が必要となる。そのために免疫が低下した状態での2009年パンデミックインフルエンザウイルスが引き起こす病原性の解明が必要である。そこで、カニクイザルに免疫低下状態を誘導し、インフルエンザウイルスを感染させ、宿主反応を解析した。

【方法】5歳から7歳のメスのカニクイザルを用いた。季節性インフルエンザウイルス A/Yokohama/91/2007 (H1N1)あるいはパンデミックウイルス A/Narita/1/2009 (H1N1) はカニクイザルの鼻腔、口腔、気管に接種された。免疫抑制のためにシクロフォスファミドを静脈に注射し、シクロスポリンAを胃内にカテーテルで投与した。気道拭い液と組織中のウイルス量はMDCK細胞を用いて定量した。白血球数は計算盤と顕微鏡を用いて算出した。蛍光色素標識抗体により白血球を染色し、フローサイトメーターを用いて分画を解析した。解剖後、肺組織切片をHE染色し、炎症の程度を評価した。免疫組織化学染色でインフルエンザAウイルス核タンパク質の存在を解析した。サイトカイン及びケモカイン濃度はELISA及びビーズアレイキットを用いて測定した。生ウイルスを用いる実験は滋賀医科大学動物生命科学センターBSL3室内で行われた。

【結果】カニクイザルの免疫低下モデルの樹立のために、人で使用されているシクロフォスファミドとシクロスポリンAをカニクイザルに投与し、免疫抑制の条件を決定した。シクロフォスファミド40mg/kgを一日おきに4回、シクロスポリンA50mg/kgを8日間毎日投与すると末梢白血球が減少、特にCD4陽性細胞とCD8陽性細胞の割合が減少し、投与終了後1週間この状態が持続することが判明し、以下の感染実験に使用した。

免疫抑制状態のカニクイザルにインフルエンザウイルスを感染させた。免疫抑制状態でも感染後発熱が見られた。季節性インフルエンザウイルスは免疫抑制がない場合、感染7日後の肺組織では検出されないが、免疫抑制を施したサルでは鼻咽頭及び肺組織に検出された。また、パンデミックインフルエンザウイルスを感染させた場合、免疫抑制がなくともウイルスは上気道及び下気道から検出されたが、免疫抑制下ではより広範囲の組織から高濃度のウイルスが検出された。

ウイルス感染7日後の肺組織中のサイトカイン、ケモカイン量を測定した。季節性とパンデミックウイルスのいずれでも炎症性サイトカイン、ケモカイン量は免疫抑制状態のサルでは免疫抑制のないサルより上昇していた。パンデミックウイルスに感染したサルでは、免疫抑制状態の方が免疫抑制性サイトカインTGF- β の量が免疫抑制のない場合より低下していた。

ウイルス感染7日後の肺を組織学的に解析した。季節性とパンデミックインフルエンザウイルスに感染したサルのいずれでも免疫抑制のない場合は肺に高度のリンパ球浸潤が見られ、肺胞壁が肥厚し、含気量が低下していた。免疫抑制下では、肺胞内、肺胞壁に軽度の炎症細胞浸潤がみられたが、肺胞壁の肥厚、含気量の低下は見られず、炎症は軽度であった。免疫抑制状態のサルの肺では、ウイルス抗原陽性の肺胞上皮細胞が見られた。

【考察】免疫の低下した人を想定して樹立した免疫抑制カニクイザルモデルでは、免疫抑制のない場合よりウイルスの検出時間、範囲、複製量が上昇した。この結果、免疫抑制状態にあっても、ウイルスに感染した肺では炎症性サイトカイン反応が亢進したと考えられた。また、パンデミックウイルス感染では免疫抑制性サイトカインTGF- β 産生が免疫抑制を施さないときより低値であるので、一層炎症が増強されたと考えられた。

今回用いた免疫抑制法では、白血球数が低下し、免疫を抑制したサルでは組織学的に肺炎は軽度に見えた。しかし、炎症性サイトカイン産生は上昇していることから、サイトカイン産生細胞は白血球以外の肺胞上皮細胞、間質細胞等と考えられた。従って、リンパ球等の白血球機能を抑制することは必ずしも炎症反応を抑制せず、ウイルス複製も抑制しないと考えられた。

【結論】免疫機能が低下している人がインフルエンザウイルスに感染した場合、抗炎症療法は必ずしも、症状を緩和しない可能性がある。その場合、抗サイトカイン療法やウイルス量を抑制する療法を考慮すべきである。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	713	氏名	Pham Van Loi
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>免疫低下カニクイザルにおけるパンデミック H1N1 インフルエンザウイルスの病原性について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 免疫抑制状態のカニクイザルでは、呼吸器でのウイルス検出時間が延長し、より広範囲の組織からウイルスが検出されるようになる。 2) 免疫抑制状態のカニクイザルでは、ウイルス感染後、より高い炎症性サイトカイン、ケモカインの産生が生じる。その一方、免疫抑制性サイトカイン TFG-β の産生は低下する。 3) サイトカインの反応とは異なり、免疫抑制状態のカニクイザルでは、肺の組織学的な炎症所見は軽度である。 <p>本論文は、免疫低下カニクイザルにおけるインフルエンザウイルスの病原性について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数356字)</p>			
<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 40px; margin: 0 auto;"></div> <p>(平成25年1月28日)</p> <p style="text-align: center;">26</p>			