

COPDは気腫優位型と気道病変優位型の二大表現型をもつ候群で、近年全身性炎症を基盤とする疾患と考えられている。米国のCOPD患者の約2/3はBMI 25kg/m²以上の肥満者であり⁶⁾、死因の第一位は心血管疾患である。しかし本邦では2/3はBMI20kg/m²以下の痩せを認め、呼吸不全死が大半を占めている⁷⁾⁸⁾。近年、心血管疾患も全身性炎症疾患として捉えられるようになった⁹⁾。APNが抗炎症作用や抗動脈硬化作用をもつことから、体重減少を認めるCOPD患者におけるAPNの上昇は、全身性炎症を抑制することで心血管疾患の合併を代償的に低下させている可能性が考えられた。

参考文献

- 1) Matsuzawa Y, et al. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:29-33.
- 2) de Godoy I, et al. Elevated TNF- α production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:633-637.
- 3) Eid AA, et al. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1414-1418.
- 4) Pitcher WD, et al. Oxygen cost of increasing tidal volume and diaphragm flattening in obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol* 1993;74:2750-2756.
- 5) Hara T, et al. Body composition is related to increase in plasma adiponectin levels rather than training in young obese men. *Eur J Appl Physiol* 2005;94:520-526.
- 6) Mannino DM, et al. Global Initiative on Obstructive Lung Disease (GOLD) classification of lung disease and mortality: findings from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Respir Med* 2006;100:115-122.
- 7) Miyamoto K, et al. Gender effect on prognosis of patients receiving long-term home oxygen therapy. The Respiratory Failure Research Group in Japan. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:972-976.
- 8) Kitaguchi Y, et al. Characteristics of COPD phenotypes classified according to the findings of HRCT. *Respir Med* 2006;100:1742-1752.
- 9) Danesh J, et al. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *Jama* 1998;279:1477-1482.

肺気腫の発症・進展における T細胞の役割についての検討

奈良県立医科大学内科学第二講座

須崎 康恵 濱田 薫 吉川 雅則 木村 弘

【はじめに】

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、有害粉塵やガス(主としてタバコ煙)の吸入により生じるマクロファージや好中球を主体とした慢性気道炎症が肺胞や末梢気道の形態学的変化を惹起し、その結果、非可逆性の気流障害を生じると考えられている。一方、最近の臨床研究では、COPD患者の肺や末梢気道に從來から報告されているマクロファージや好中球のみではなく、リンパ球も集積すると報告されている¹⁾。しかしながら、マクロファージや好中球と異なり、リンパ球がCOPDの発症・進展に如何に関与するかの詳細は不明である。昨年の本調査研究にてわれわれは、肺気腫形成におけるリンパ球の役割を明らかにするため、CD3⁺やT cell receptor(TCR)alpha-beta陽性細胞を持たない、すなわち成熟したT細胞やB細胞を持たないBALB/c-Rag1^{tm1Mom}(Rag1-KO)を用い、エラストラーゼ誘発肺気腫に対する感受性を検討した。結果、リンパ球の欠損するRag1-KOにてもエラストラーゼ注入による肺胞壁の破壊や肺胞腔の拡大等の肺気腫様変化が生じており、PPE誘発肺気腫形成がリンパ球非依存性であることを明らかとした。加えて、Wild-type BALB/c(WT)と比べRag1-KOでは、PPE投与後生じる肺気腫様変化が、病理組織学的にも生理学的にも明らかに増強されること、およびRag1-KOにWTの脾細胞を養子移入することでこれらの肺気腫様変化が抑制されることを報告した²⁾。以上の結果は、ある種のリンパ球が、肺気腫の発症に対して抑制的に働く可能性を示唆するものであった。本年度の研究では、これら抑制的に働くリンパ球のサブセットを明らかとするため、Rag1-KOにCD4+T細胞あるいはCD8+T細胞を養子移入する実験を行った。また、リンパ球がマクロファージと好中球いずれの炎症細胞の機能を調節することで肺気腫形成を抑制するのかを明らかとするため、Rag1-KOを用いて好中球除去実験を行った。

【方法】

1. エラストラーゼ誘発肺気腫モデルの作製

Wild-type BALB/c(WT)は日本SLC(Shizuoka, Japan), BALB/c-Rag1^{tm1Mom}(Rag1-KO)はThe Jackson Laboratory(MN, USA)から購入した。本実験で使用されたマウスは8週令で、22-24℃、12時間毎の明暗を保たれた奈良県立医科大学動物施設内で飼育された。全ての動物実験は、奈良県立医科大学動物実験管理規定に基づく承認を得て行われた。これら8週令のWTマウス、およびRag1-KOマウスに、Porcine Pancreas Elastase(PPE)25mgをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)0.1mlに溶解させ気管内に注入。コントロールとしては、PBSのみを気管内に注入した。

2. 肺気腫の病理組織学的評価および肺胞隔壁間隔の測定

PPE投与4週間後に腹腔内麻酔にて安楽死させた後、気管内にチューブを挿入し10%ホルマリンを25cm水柱の圧力で注入。肺を取り出し、10%ホルマリン内で肺を固定、その後パラフィン包埋を行い組織標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)及びCD4, CD8の免疫染色を施行した。肺胞腔の拡大は、HE染色を施行した組織標本から無作為に選択した20箇所部位にて、既報に準じた方法³⁾を用い、肺胞隔壁間隔(Mean Linear Intercept, Lm)を測定することにより数値化した。

3. リンパ球サブセット移入

WTより採取した脾臓から分離したリンパ球を磁気ビーズ(MACS system)を用いてCD4+およびCD8+T細胞に単離。単離した各CD4+T細胞、CD8+T細胞(2x10⁶ cells)をRag1-KOに経静脈的に投与。翌日PPE(25μg)を気管内注入し、4週間後に上記と同様の方法で組織学的に肺気腫の評価を行った。

4. 末梢血好中球除去

Rag1-KOに、末梢血好中球を除去する効果が確認されている好中球除去抗体 (a rat anti-mouse mAb against the neutrophil maturation antigen, Gr-1) 250 (μg) を腹腔内に投与⁴⁾。コントロールとしては、PBSのみを腹腔内に投与した。翌日PPE(25 μg)を気管内注入し、4週間後に上記と同様の方法で組織学的に肺気腫の評価を行った。

結果

1. Rag1-KOへのCD4+T細胞, CD8+T細胞移入による肺気腫抑制効果

WTのCD4+もしくはCD8+T細胞を養子移入し、PPEを投与したRag1-KOの4週間後の肺には、リンパ球非移入Rag1-KOでは認められないCD4+あるいはCD8+T細胞が存在することを免疫細胞染色にて確認した。また、CD4+もしくはCD8+T細胞を養子移入したRag1-KO群の肺では、WTにPPE投与を行った群と同程度の部分的な肺気腫変化は生じていたものの、T細胞非移入Rag1-KO群と比べ肺胞腔の拡大や肺胞壁の破壊が著明に抑制されており(図1)、肺胞隔壁間隔も有意な縮小を認めた(Lm(mm): CD4+T細胞移入Rag1-KO群 52.35 ± 3.46 , CD8+T細胞移入Rag1-KO群 52.75 ± 0.83 vs. T細胞非移入Rag1-KO群 116.82 ± 11.00 , $p < 0.001$, $n = 5$)。上記の結果は、CD4+およびCD8+両方のT細胞内に、肺気腫形成に抑制的な機能を有するサブセットが存在することを示唆した。

2. Rag1-KOへの好中球除去による肺気腫抑制効果

Rag1-KOに末梢血好中球除去抗体(Gr-1)を投与した群では、PPEを気管内注入した24時間後の末梢血中の好中球はほぼ完全に除去されていた。PPE投与後の肺胞洗浄液(BAL)中の好中球数は、WTおよびRag1-KOともに、PPE投与1日後が最大となり、その後徐々に減少し投与7日後には極少量となることをこれまでの実験で確認している。一方、Gr-1投与後にPPEを注入したRag1-KOでは、PPE投与1,4日

後のBALや末梢血中の好中球はほぼ完全に除去されていた。

しかし、Gr-1投与にてPPE投与初期の末梢血および肺組織内の好中球がほぼ完全に除去されていたにもかかわらず、4週間後のGr-1投与Rag1-KOの肺には、肺胞壁の破壊や肺胞腔の拡大等の肺気腫様変化がGr-1非投与Rag1-KOと同程度に生じており(図2)、肺胞隔壁間隔(Lm)も両者の間で差は認められなかった(Lm(mm): Gr-1投与Rag1-KO群 102.07 ± 15.86 vs. Gr-1非投与Rag1-KO群 116.82 ± 11.00 , $n = 5$)。すなわち、Gr-1投与による肺気腫の抑制効果は認めず、Rag1-KOにおけるPPE誘発肺気腫形成は、好中球非依存性であることが明らかとなった。これらの結果は、CD4+およびCD8+両方のT細胞内に存在するサブセットが、好中球ではなく他の炎症細胞の機能を調節することで肺気腫形成に抑制的な機能をもつ可能性を示唆した。

図 1

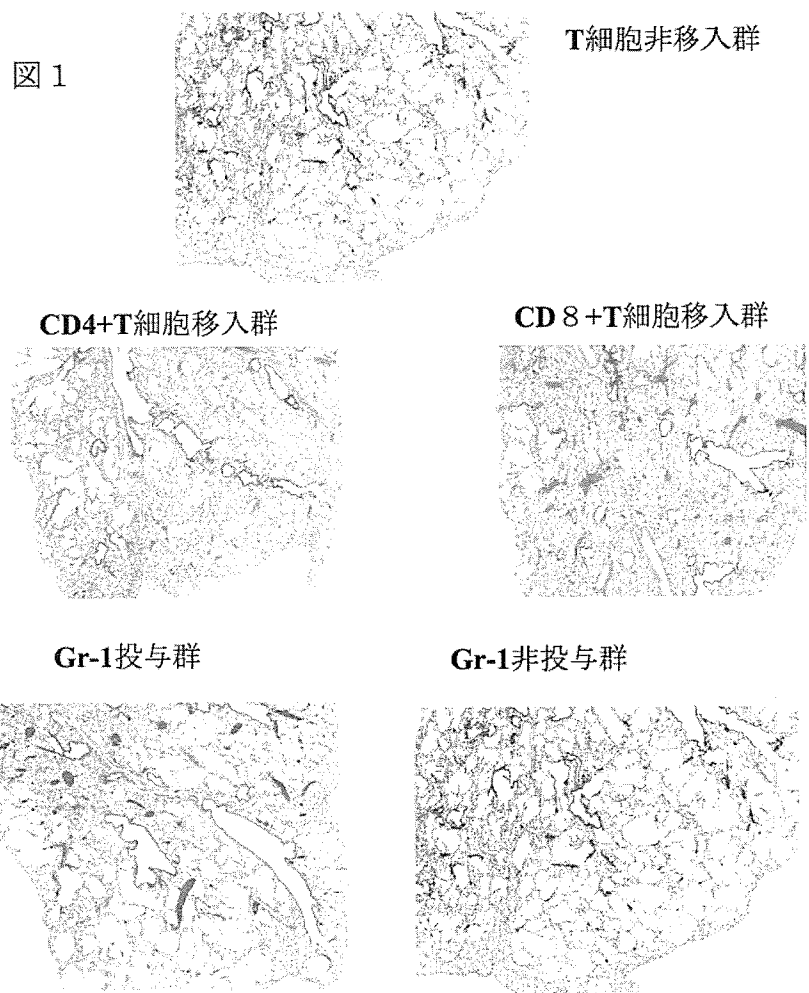


図 2

【考 察】

COPDの主要な組織学的変化である肺気腫の発症，進展に関与する免疫学的機序を明らかにすることは，喫煙者のなかでも限られた人のみがCOPDを発症すること，すなわちCOPD発症に対する感受性を解明することにもつながる重要な研究テーマと思われる。昨年の本調査研究にてわれわれは，成熟T細胞およびB細胞が欠損しているRag1-KOは，WTと比較しPPE投与後の肺組織およびBAL内のマクロファージや好中球の浸潤に差を認めないにもかかわらず，エラスターゼ誘発肺気腫に対し高い感受性を持つことを示した²⁾。本年度は昨年度の研究を更に発展させ，Rag1-KOにCD4+あるいはCD8+T細胞を養子移入することで肺気腫形成を抑制し得ることを明らかとし，CD4+およびCD8+両方のT細胞内に肺気腫形成に抑制的な機能を有するサブセットが存在することを示した。

近年，生体の各種免疫応答の抑制的制御の中心的役割を担う制御性T細胞が，CD4+およびCD8+両方のT細胞内に存在することが明らかとなっており，これら制御性T細胞の質的・量的異常が様々な自己免疫疾患や炎症性疾患の原因になることが報告されている⁵⁾⁻⁶⁾。今後われわれは，肺気腫形成に抑制的な機能を有するサブセットがこれら制御性T細胞(T reg)と同一サブセットであるのかを検討する予定である。また，これら制御性T細胞のサブセットの一つであるCD4+CD25+T細胞は，effector T細胞のみではなく，自然免疫を担うマクロファージの機能をも調節し，マクロファージが惹起する慢性腎疾患モデルの発症を抑制することが報告されている⁷⁾。

本エラスターゼ誘発肺気腫モデルにても，好中球やマクロファージが重要な役割をはたすことが報告されているが，本研究で示した末梢血好中球除去実験の結果は，ある種のT細胞が，好中球ではなくマクロファージの機能(活性化や各種炎症mediatorsの産生等)を調節することで，肺気腫形成に抑制的な働きをすることを示唆する。これまでの様々な研究にて，マクロファージや好中球等の自然免疫を担う炎症細胞が，COPDの主要な形態学的変化である肺気腫の形成に重要な役割をはたすことが明らかとなっているが，同時にこれらの炎症細胞は，獲得免疫の中心的役割をはたすT細胞とのクロストークにより肺気腫形成に対し防御的な機構も併せ持つと推測される。今後，T細胞に関連した様々な免疫学的知見を応用する本研究を発展させ，COPDの病態メカニズムに関する新しい概念を提起し，新たな治療法の開発につなげた

いと考える。

【参考文献】

- 1) Hogg, J. C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W. M., Buzatu, L., Cherniack, R. M., Rogers, R. M., Sciurba, F. C., Coxson, H. O., and Pare, P. D. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 350:2645-2653, 2004.
- 2) 須崎康恵, 濱田 薫, 伊藤利洋, 宮本謙一, 吉川雅則, 木村 弘. エラスターゼ注入肺気腫モデルにおけるリンパ球の関与. 呼吸不全に関する調査研究 平成18年度 研究報告書, 81-84.
- 3) Murakami, S., Nagaya, N., Itoh, T., Iwase, T., Fujisato, T., Nishioka, K., Kangawa, K., and Kimura, H. Adrenomedullin regenerates alveoli and vasculature in elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 172:581-589, 2005.
- 4) Looney, R. M., Suo, X., Van Ziffle, A. J., Lowell, A. C., and Matthay, A. M. Neutrophils and their Fc γ receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*, 116:1615-1623, 2006.
- 5) Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehevari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*, 212:8-27, 2006.
- 6) 須崎康恵, 濱田 薫, 伊藤利洋, 木村弘. CD40/CD154 経路阻害による喘息感受性母子間伝達の抑制: CD25+調節T細胞の役割. RMCB研究会研究助成論文2005.
- 7) Mahajan, D., Wang, Y., Qin, X., Wang Y., Zheng, G., Wang, Y.M., Alexander, S.I., and Harris DC. CD4+CD25+regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 17:2731-2741, 2006.

klotho 遺伝子欠損肺気腫モデルマウスの 肺機能に関する検討

京都大学医学部呼吸内科

佐藤 篤靖 平井 豊博 室 繁郎 陳 和夫
三嶋 理晃

京都大学医学研究科腫瘍生物学講座

伊村 明浩 鍋島 陽一

はじめに

klotho マウスは、*klotho* 蛋白の欠損により、ヒトの老化と類似した表現型を離乳後より呈する(1)。肺においては気腫性病変を有し、肺気腫モデルマウスとして期待される。私共は、*klotho* マウスにおける肺気腫病変およびその形成過程について形態学的アプローチにより検討し報告してきた。今回は、*klotho* マウス肺の機能解析を行い、*klotho* 蛋白の欠損による機能的変化を検討したので報告する。

対象と方法

実験に際しては、*klotho* 遺伝子ノックアウトマウス(KL)、野生型マウス(C57BL6/J, WT)を使用した。各群を普通食(D+)、ビタミンD欠乏食(D-) (各n=5)にて育成し、第7週齢における病理的变化と肺機能を比較した。

各マウスに対し、pentobarbital(70mg/kg)腹腔内投与にて麻酔を行い、気管切開後、22G polyethylene catheterで挿管した。肺機能測定のために挿管チューブを小動物人工呼吸器(small animal ventilator; flexiVent, Scireq, Montreal, Canada)に接続して換気を行い(呼吸数150回/分、一回換気量8ml/kg)、測定前にsuccinylcholine(0.8 mg/kg)を腹腔内投与した。

動的肺機能は、オシレーション法を用いて、周波数0.25Hz~20Hzの8秒間のoscillationシグナルを負荷することにより、respiratory impedance(Z)を得た。さらに、測定時のPEEP値を0.1kPaから0.7kPaまで4段階に設定することにより異なる肺気量位における肺機能を測定した。各周波数の測定結果を以下に示すConstant-phase model(式1)にフィッティングさせて、各指標

を求めた(2,3)。

$$Z=R+i2\pi f+(G-iH)/(2\pi f)^{\alpha}\dots(1)$$

($\alpha=(2/\pi)\arctan(H/G)$ 、R:airway resistance、I:airway gas inertance、G:tissue damping、H:tissue elastance)

静的肺機能は、最大吸気位から段階的に呼気を行ったときのpressure(P)とvolume(V)とを経時的に測定することにより、quasi-static pressure-volume curveを求めた。この曲線をSalazar-Knowles equation(式2)にフィットさせて、shape parameterであるk値を求めた(4,5)。

$$V=V_{\max}-(V_{\max}-V_0)e^{-kp}\dots(2)$$

(V_{\max} :最大吸気位、 V_0 :FRCレベルの吸気位)

結果

病理所見においては、これまでの報告どおり、KL(D+)は、WT(D+)に比し気腔の拡大や肺胞壁の破壊といった肺気腫病変を認めた。一方、KL(D-)の病理所見は野生型と有意な差無を認めず、*klotho* マウスの表現型が抑制されていることが確認された(図1)。

1) 静的肺機能

K値においては、KL(D+)では多群に比し有意に高値であった($p<0.05$, Tukey-Kramer)(図2)が、ビタミンD欠乏食を摂取したKL(D-)は、野生型と有意な差を認めなかった。

2) 動的肺機能

R値は、KL(D+)群においてWT(D+)に対しPEEP

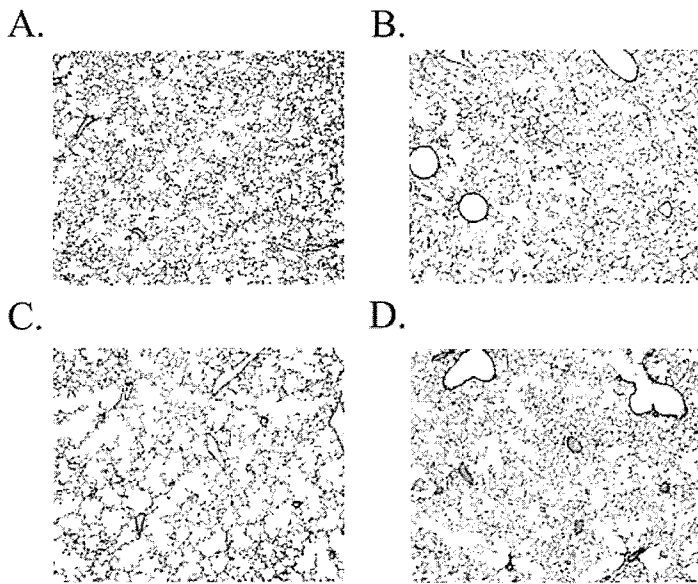


図1. *klotho*マウス野生型の肺病理組織像
 A. 野生型+普通食, B. 野生型+vitamin D欠損食,
 C. *klotho* マウス+普通食, D. *klotho* マウス+vitamin D欠損食
klotho マウスでは肺気腫を呈するが, vitamin D欠損食により救済された。

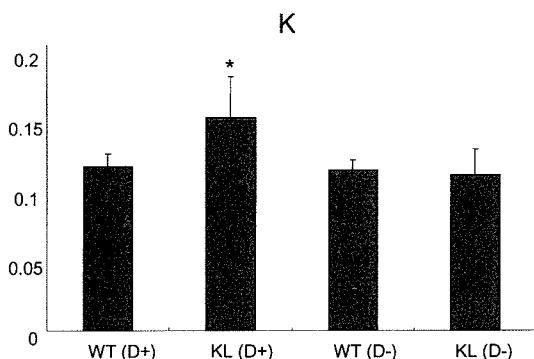


図2. K: exponential K. K値はKL(D+)群において, 多群に比し有意に高値であった。
 (誤差線: SD, *: $p < 0.05$)

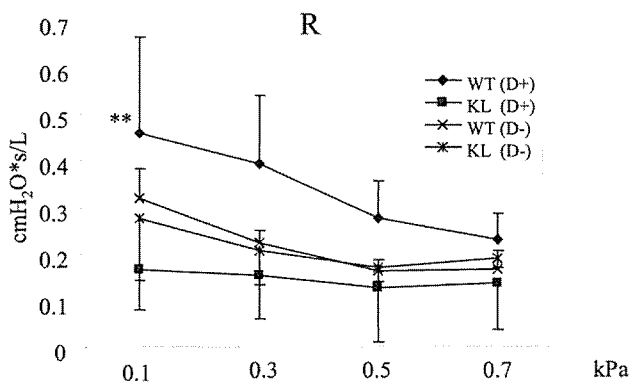


図3. R: Resistance. 0.1kPaにおいてのみ, WT (D+)のR値はKL (D+)に対して高値であった。他は有意差を認めなかった。
 (誤差線: SD, *: $p < 0.05$)

0.1kPaのみで有意に高値を示すのみであった(図3)。G値、H値は、測定したすべての肺気量位でKL(D+)群は有意に多群に比し高値($p < 0.05$, Tukey-Kramer)であったが、KL(D-)は、野生型と差を認めなかった。(図4)

考 察

*Klotho*マウスは、成長障害、早期死亡、動脈硬化、骨粗しょう症、神経細胞の脱落、軟部組織の石灰化、皮膚の萎縮など老化に類似した多彩な症状を呈し(1)、これら表現型は、vitamin D欠乏食を摂取させることで救済されることが報告されている(6)。また、このマウスの表現系の一つとして肺気腫があり、肺胞壁の破壊と気腔の拡大が4週齢より見られることが知られている(7)。私共の前回までの形態学的検討では、*Klotho*マウスは、対照マウスに比し、気腔の拡大、肺胞壁の破壊が有意にみられ、肺末梢気腔の形や大きさの分布形式が対照マウスと同様にフラクタル性をもつが、*Klotho*マウスでは末梢気腔の面積の分布に関するフラクタル次元が対照に比し有意に低値であることを報告した(8)。さらに肺実質破壊のプロセスに関してシミュレーションを行うことで、*Klotho*マウスにみられる肺胞壁破壊が、エラスターゼを経気道的に投与したときのような局所的な肺実質の破壊によるというより、全身的な要因によるランダムで均一な破壊によるものであるということを報告した(9)。

そこで今回は、*Klotho*マウスにおける肺メカニクスを測定し、形態だけでなく機能的にも気腫モデルマウスとしての性質をもつのか、またその表現型がvitamin D欠乏食の摂取により機能的にも抑制されるのかを検討した。

まず、静的な肺機能をquasi-static pressure-volume曲線から検討し、k値が*klotho*マウス(KL(D+))において有意に高値を示した。このことは、*klotho*マウスの肺が対照に比し低い弾性を有することを意味し、肺気腫モデルに矛盾しないものであることが示された。一方、vitamin D欠乏食を摂取させた*klotho*マウス(KL(D-))は、対照マウスと有意なK値の差を認めず、静的肺機能の変化が救済されたことが示された。

動的肺機能では、KL(D+)において組織の粘性抵抗、エラスタンスの増加を示した。これは、*Klotho*

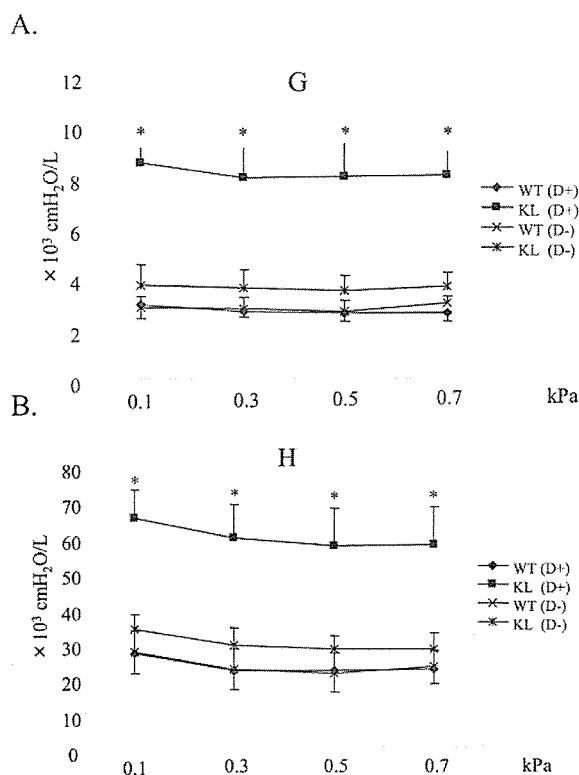


図4. A. G: Tissue Damping. B. H: Tissue Elastance.
G, H 共に KL(D+) (■)は多群に比し有意に高値を示した。
(誤差線: SD, * : P<0.05)

マウスのTLCが第7週齢でおよそ0.8mlと野生型に比し非常に小さく、野生型の第2から3週齢に匹敵することから、主にマウスの肺容量の相違が影響していると考えられた(3,10)。この方法における比較対象として、単純に同一週齢よりも、同一肺容量の個体を用いてさらに検証が必要であると思われた。一方、vitamin D欠乏食を摂取させた*klotho*マウス (KL(D-)) は、対照マウスと有意な組織粘性抵抗、エラスタンスの差を認めず、動的肺機能の変化も救済されたことが示された。

結 論

静的・動的肺機能検査の結果から、*Klotho*マウスにおける肺気腫は、Vitamin D欠損食を摂取させることにより形態だけでなく機能的にも救済されることが示された。

参考文献

1. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390(6655): 45-51.

2. Hantos, Z., Daroczy, B., Suki, B., and et al. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J. Appl. Physiol.* 72,168-178,1992.

3. Hirai, T., K. A. McKeown, R. F. M. Gomes, and J. H. T. Bates. Effects of lung volume on lung and chest wall mechanics in rats. *J. Appl. Physiol.* 86 (1):16-21,1999.

4. Salazar E, Knowles JH. An Analysis of Pressure - Volume Characteristics of the Lungs. *J Appl Physiol* 1964;19:97-104.

5. Colebatch, H. J. H., C. K. Y. NG and N. Nikov. Use of an exponential function for elastic recoil. *J. Appl. Physiol.* 46:387-393,1979.

6. Tsujikawa H., Kurotaki Y., Toshihiko Fujimori T., et al. *Klotho*, a Gene Related to a Syndrome Resembling Human Premature Aging, Functions in a Negative Regulatory Circuit of Vitamin D Endocrine System. *Mol Endocrinol* 2003;17,2393-403.

7. Suga, T., M. Kurabayashi, Y. Sando, Y. Ohyama, T. Maeno, Y. Maeno, H. Aizawa, Y. Matsumura, T. Kuwaki, O. M. Kuro, Y. Nabeshima, and R. Nagai. Disruption of the *klotho* gene causes pulmonary emphysema in mice. Defect in maintenance of pulmonary integrity during postnatal life. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22(1):26-33

8. 佐藤篤靖, 平井豊博, 室繁郎, 月野光博, 佐藤晋, 西岡慶善, 陳和夫, 三嶋理晃, 北直子, 伊村明浩, 鍋島陽一: *Klotho*マウスにおける肺気腫病変のフラクタル性についての検討 平成15年度呼吸不全に関する調査研究報告書 33-35,2004

9. 平井豊博, 佐藤篤靖, 佐藤晋, 室繁郎, 陳和夫, 三嶋理晃, 伊村明浩, 鍋島陽一: *Klotho*マウスにおける肺気腫形成に関する形態学的検討 平成17年度呼吸不全に関する調査研究報告書 94-396,2006

10. Sly PD, Collins RA, Thamrin C, Turner DJ, Hantos Z. Volume dependence of airway and tissue impedances in mice. *J Appl Physiol* 2003;94(4):1460-6.

シャトルウォーキングテストにおける minimal clinical important differenceの検討

大垣市民病院呼吸器科

安藤 守秀 進藤 丈 安部 崇 長谷 哲成

伸 健浩 山下 良

NHO近畿中央胸部疾患センター 内科

坂谷 光則

NHO近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター

井上 義一 鈴木 克洋

【はじめに】

シャトルウォーキングテスト (SWT) は英国のSinghらが開発した呼吸器疾患患者を対象としたfield walking testである[1]。SWTは6分間歩行試験と同様、特別な道具を必要とせず、安全で簡便な運動負荷試験として欧州を中心として今日広く用いられている。6分間歩行試験が自由歩行であるのに対してSWTは歩行速度がコントロールされた漸増負荷試験で方法も当初より標準化されており、6分間歩行試験と比べて再現性に優れ[2]、また結果をVO₂に換算して解釈できる点でも有用性が高い。しかしまだ歴史が浅いこともあって6分間歩行試験と比べて臨床的知見の蓄積が十分でなく、minimal clinical important difference (MCID) も確立されていない。

MCIDとは「有意義であると感知され、患者の医学的管理に変更をもたらすと考えられるoutcome measureにおける最小限の変化あるいは差異であり、過剰な副作用やコストをもたらさないと考えられるもの」[3]と定義される。MCIDの求め方には数学的あるいは統計学的方法、患者・医療従事者に意見に基づく方法、および外的標準を用いる方法があり、それぞれを対比しつつ状況に応じて妥当な値を求めることが必要である[4]。MCIDの概念は慢性呼吸器疾患においてもQOL評価において広く応用されているが[5]、6分間歩行試験においてもMCIDは37-71mと見積もられ[6]、特に50m前後の変化[7]をMCIDとすることが臨床的に広く受け入れられている。

SWTの臨床的有用性を高めるためには6分間

歩行試験と同様にMCIDを確立することが重要であると考えられるが、これまでまだMCIDを求める試みは行われていない[6]。

今回私たちはSWTのMCIDを各種の方法を用いて検討することとした。

【対象と方法】

平成14年7月から17年11月までに近畿中央胸部疾患センターおよび大垣市民病院にてSWTを行った安定期にある慢性呼吸器疾患患者300例 (COPD179例, 間質性肺炎43例, 肺結核後遺症25例, 肺癌13例, 気管支拡張症9例, その他31例) を対象とした。またこのうち2ヶ月以上の間隔をあけて反復してSWTを実施した73例については縦断的な検討にも組み入れた。歩行の妨げとなる運

表1. 患者背景

年齢 (才)	68 ± 10 (23 - 94)
男/女	243 / 57
身長 (cm)	160 ± 8 (140 - 183)
BMI	20.3 ± 3.5 (12.3 - 33.3)
PaO ₂ (Torr) *	75.4 ± 12.7 (50.6 - 105.7)
PaCO ₂ (Torr)	42.7 ± 7.6 (28.0 - 76.0)
VC (ml)	2320 ± 860 (540 - 5350)
%VC (%)	74.8 ± 24.4 (21.9 - 142.4)
FEV ₁ (ml)	1230 ± 610 (330 - 4440)
%FEV ₁ (%)	54.3 ± 24.7 (16.4 - 133.4)
FEV ₁ % (%)	58.3 ± 20.8 (17.5 - 100)
MRC scale	1-34, 2-55, 3-151, 4-58, 5-2
BDI focal score	6.9 ± 2.3 (2 - 12)

* : 47例は酸素吸入下 (流量1.4 ± 0.8 L/min, 0.5 - 4)

動器および平衡機能の障害のある患者や重篤な心循環系あるいは他の内臓疾患のあるもの、高度の認知症のあるものは除外した。また信号音で歩行速度をコントロールするため、高度の聴覚障害を有するものも検討対象からは除外した。

身体計測、肺機能、血液ガス、一般採血、臨床症状の評価（MRC scale[8]およびBaseline Dyspnea Index：BDI、反復測定においてはTransition Dyspnea Index：TDI[9]）の後に、標準法に基づきSWTを実施した。実施場所は院内のリハビリテーション室で、全例夕方3時から5時の間に検査を行った。歩行距離は同じ日に十分に時間をかけて実施した2回の検査の良い方の距離を用いた。

MCIDは外的標準による方法においてはMRC scaleおよびBDIを用いた横断的検討およびTDIを用いた縦断的検討を行った。また歩行距離の分布の正規性を確認した上で、数学的方法（SEMおよびstandard error of difference:SDD[10,11], Minimal Detectable Change:MDC[12], $1/2SD$ [13]）についても検討を行った。SEMは直説法および $SD \cdot \sqrt{(1-\alpha)}$ で、SDDは $\sqrt{2} \cdot SEM$ で、MDC (95% IC of SDD) は $1.96 \cdot SDD$ で計算し求めた。

本研究の計画は近畿中央胸部疾患センターの倫理委員会にて承認を得ており、また患者全例から研究参加について文書による同意を得た。

【結 果】

患者背景（表1）：

300例中男性が243例を占め、MRC scaleはgrade 3が半数を占めていた。BDIは平均6.9ポイントであった。

SWTの結果（表2）：

SWTの平均歩行距離は $370 \pm 180m$ であった。歩行距離の分布は図1のように正規性を示した。1回目と2回目の歩行の差は平均 $17 \pm 38m$ で、test-retestでの α 係数は0.9866であった。

MCIDの検討—外的標準による方法

SWTの歩行距離はMRC scaleと有意に相関し、MRCの1段階は歩行距離123mに相当した（図2）。また歩行距離はBDIとも有意に相関し、BDIの1ポイントは歩行距離50mに相当した（図3）、

表2. SWTの結果

歩行距離 (m)	370 ± 180 (10 - 1020)
1回目	350 ± 180 (10 - 1020)
2回目	360 ± 170 (10 - 910)
SpO ₂ (前) (%)	96.5 ± 1.6 (89 - 100)
SpO ₂ (後) (%)	87.6 ± 6.0 (70 - 99)
Desaturation (%)	8.8 ± 5.6 (0 - 29)
Borg scale	5.2 ± 1.7 (1 - 10)
HR max (/min)	119 ± 20 (66 - 190)
peakVO ₂ 計算値 (ml/kg/min)	13.4 ± 4.5 (4.2 - 29.7)
%peakVO ₂ (%)	60.4 ± 20.4 (18.7 - 163)

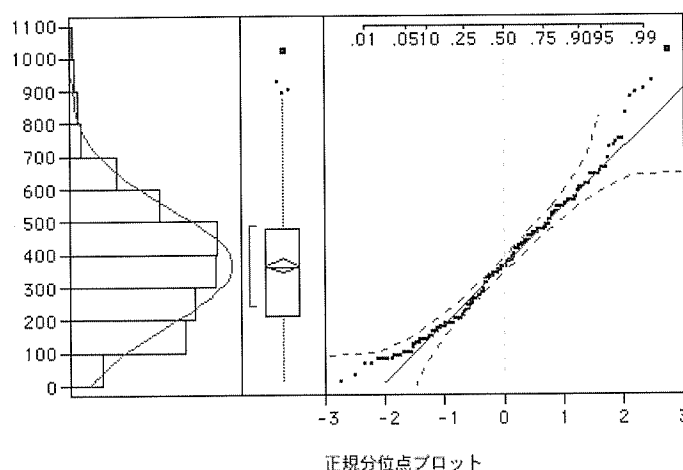
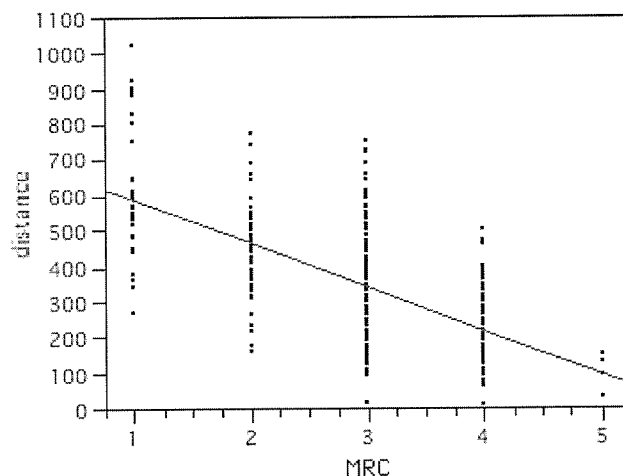


図1. 歩行距離の分布の正規分位点プロット。

対象例のSWTの歩行距離は正規分布を示しており、MCIDの数学的解析が可能と考えられた。

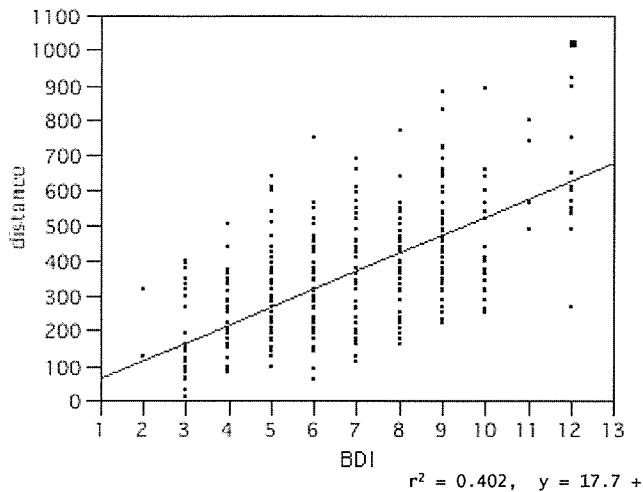


123*MRC

図2. MRC scaleとSWT歩行距離との関係

MRC scaleとSWT歩行距離とは有意に相関しMRCの1段階は歩行距離123mに相当した。

2ヶ月以上間をおいて反復測定した73例に対するTDIを用いた縦断的検討では、ばらつきが大きく、また悪化の方向と比べて、改善の方向では明らかな歩行距離の差



50.7*BDI
 図3. BDIとSWT歩行距離との関係
 BDIとSWTの歩行距離とは有意に相関しBDIの1pointは歩行距離50.7mに相当した。

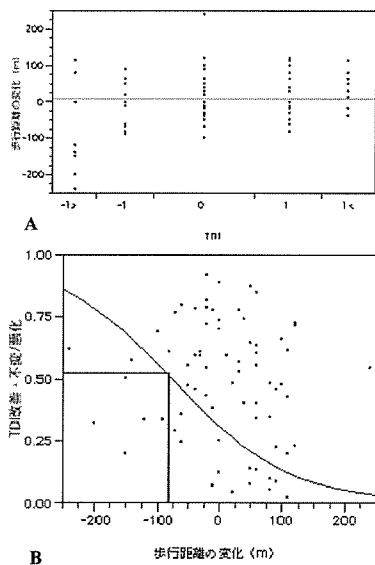


図4. TDIによる縦断的検討 (n=73)
 A: TDIとSWT歩行距離の変化量との関係。改善の方向では変化に乏しく、また全体にばらつきが大であった。
 B: TDIで1point以上の悪化に対する歩行距離のロジスティック回帰分析。TDIで1point以上の悪化が50%の確率で生じる歩行距離は約80mであった。

表3. 数学的方法によるMCID

方法	MCID (m)
SEM (直接法)	38.0
SEM (計算値)	$179.4\sqrt{(1-0.9866)} = 20.8$
SDD	$179.4\sqrt{2*SEM} = 29.4$
MDC	$1.96*SDD = 57.6$
1/2SD	$179.4/2 = 89.7$

を見いだせなかった(図4-A)。ロジスティック回帰でTDI1ポイント以上の悪化が50%の確率となる歩行距離の変化をみると約80mであった(図4-B)。

MCIDの検討—数学的方法(表3)

SEMは直接計算では変化量からの直接計算では38mであったが、 $\alpha = 0.9866$ より計算では20.8と求められた。SDDは29.4、MDCは57.6mと計算された。全体の歩行距離のSDは179.4mであり、1/2SDは89.7mであった。

[考案]

SWTは慢性呼吸器疾患患者の運動耐容能評価法として広く普及し、リハビリテーションの効果の判定などにも日常的に用いられている。MCIDは今日臨床においては統計学的有意差以上に重要であることが認識されつつあり、治療の評価などにおいてもMCIDに基づいた効果判定がしばしば求められているが、先に述べたようにSWTについてはまだ確立されていない[6]。

今回私たちは連続する300例のSWTの結果を用いて、外的標準および数学的方法を用いてSWTのMCIDを求めることを試みた。結果、外的標準からはMRC1段階に歩行距離では約120m。BDIの1ポイントに約50m、TDIの1ポイント以上の悪化に約80mが対応すると考えられた。これに対し数学的方法ではMCIDは1/2SDからは89.7m、MDCによる方法では57.6mと求められた。あとは患者・医療従事者の印象を確認する必要があり、今後議論を重ねる必要があるが、少なくとも私たちの臨床経験からはSWTのMCIDは50-100mにあると思われる。こうしたことからSWT (incremental SWT) のMCIDは、現状では30-120m、実用的には60m前後で考えるとよいと思われた。

SWTでの60mは計算上 VO_2 で約1.5ml/kg/minに相当し、これはWorkmanらの式[14]によると平地定常歩行において4km/h周辺では約0.6km/hの差に相当する。6分間歩行試験はほぼsubmaximalな定常歩行であると考えられる[15]ので、計算上SWTの60mの差は6分間歩行試験では約60mの差を反映すると思われる。6分間歩行試験のこれまでに求められているMCIDが37-71mである[6]ことから、それと対比してもSWTのMCID60mはほぼ妥当であると思われた。ただし、これについ

てはSWTと6分間歩行試験のさらなる対比が必要である。

SWTにおけるMCIDの確立は重要な課題である。今回の私たちの呈示した値はopinion basedな議論が十分でないことから最終的なものとは成り得ないが、今後の検討の基礎となるものと考えられる。

【結 論】

慢性呼吸器疾患患者300例を対象にSWTのMCIDを検討した。結果、SWTのMCIDは、現状では30-120m、実用的には60m前後で考えるとよいと思われた。

文献：

1. Singh SJ, Morgan MD, Scott S, et al. Development of a shuttle walking test of disability in patients with chronic airways obstruction. *Thorax* 1992;47:1019-1024.
2. Onorati P, Antonucci R, Valli G, et al. Non-invasive evaluation of gas exchange during a shuttle walking test vs. a 6-min walking test to assess exercise tolerance in COPD patients. *Eur J Appl Physiol* 2003;89:331-336.
3. Wells G, Beaton D, Shea B, et al. Minimal clinically important differences: review of methods. *J Rheumatol* 2001;28:406-412.
4. Lassere MN, van der Heide D, Johnson K, et al. Robustness and generalizability of smallest detectable difference in radiological progression. *J Rheumatol* 2001;28:911-913.
5. Jones PW. Interpreting thresholds for a clinically significant change in health status in asthma and COPD. *Eur Respir J* 2002;19:398-404.
6. Wise RA & Brown CD. Minimal clinically important differences in the six-minute walk test and the incremental shuttle walking test. *COPD* 2005;2:125-129.
7. Redelmeier DA, Bayoumi AM, Goldstein RS, et al. Interpreting small differences in functional status: the six minute walk test in chronic lung disease patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1278-1282.
8. Fletcher CM, Elmes PC, Wood CH. The significance of respiratory symptoms and the diagnosis of chronic bronchitis in a working population. *Br Med J* 1959;2:257-266.
9. Mahler DA, Weinberg DH, Wells CK, et al. The measurement of dyspnea: contents, interobserver agreement, and physiologic correlates of two new clinical indexes. *Chest* 1984;85:751-758.
10. Wyrwich KW, Nienaber MA, Tierney WM, et al. Linking clinical relevance and statistical significance in evaluating intra-individual changes in health-related quality of life. *Med Care* 1999;37:469-78.
11. Wyrwich KW, Tierney WM, Wolinsky FD, et al. Further evidence supporting standard error of measurement based criterion for identifying meaningful intra-individual change in health related quality of life. *J Clin Epidemiol* 1999;52:861-873.
12. Hevert R, Spiegelhalter DJ, Brayne C. Setting the minimal metrically detectable change on disability rating scales. *Arch Phys Med Rehabil* 1997;78:1305-1308.
13. Norman GR, Sloan JA, Wyrwich KW. Interpretation of changes in health-related quality of life: the remarkable universality of half a standard deviation. *Med Care* 2003;41:582-592.
14. Workman JM, Armstrong BW. Metabolic cost of walking: equation and model. *J Appl Physiol* 1986;61:1369-1374.
15. Rabinovich RA, Vilaro J, Roca J. Evaluation exercise tolerance in COPD patients: the 6-minute walking test. *Arch Bronchoneumol* 2004;40:80-85.

呼吸器ウイルス感染抑制薬の研究

東北大学病院老年科

山谷 睦雄 佐々木陽彦 井上 大輔 浅田 成紀
中山 勝敏

〔はじめに〕

1. 気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患(COPD)はウイルス感染が引き金になって急性増悪し、呼吸不全をきたすことが多い。ライノウイルス、インフルエンザウイルス、RS(Respiratory syncytial)ウイルスなどが同定され、二次性の細菌感染が更に症状を悪化させる。ウイルス感染は気道上皮の剝離脱落や気道壁の浮腫を介して気道内腔を狭窄し、また、炎症性サイトカイン、ヒスタミンやロイコトリエン、あるいはウイルス感染そのものが気道炎症や気管支平滑筋収縮、喀痰分泌を生じて気流障害を促す。ライノウイルスは血清型が100種類以上もあり、有効なワクチンは開発されていない。また、感染を抑制する抗ライノウイルス薬も実用化されていない。私たちはライノウイルス感染受容体であるICAM-1の発現抑制やライノウイルスRNA細胞内放出の場である酸性エンドゾーム減少を介したライノウイルス感染抑制薬を探求してきた。その結果、グルココルチコイドがICAM-1減少を介して、また、エリスロマイシン、プロトンポンプ阻害薬、および喀痰調整薬カルボシステインがICAM-1減少と酸性エンドゾーム減少を介してライノウイルス感染抑制効果を有すると報告してきた¹⁻⁴⁾。COPDの治療薬として広く用いられている β 2-刺激薬は急性増悪抑制効果が報告されている⁵⁾。昨年度は β 2-刺激薬が感染受容体であるICAM-1発現を減少して、ライノウイルス感染を抑制すると報告した。本年度はCOPD安定期管理に用いられる抗コリン薬に関連して、コリン作動薬のライノウイルス感染に及ぼす効果を検討した。

2. RSウイルスは乳幼児の細気管支炎の原因ウイルスであると同時に気管支喘息やCOPDの急性増悪の原因ウイルスである。RSウイルスは感染を抑制する医薬品が実用化されていない。RSウイルスの細胞側受容体としてsmall GTPase(RhoA)が細胞融合、ウイルス進入に関係すると報告されている⁶⁾。昨年度はパフィロマイシ

ンを中心にマクロライドのRSウイルス感染抑制作用を報告した。本年度はこれらの薬品のRhoA機能抑制効果を検討した。

3. インフルエンザ感染はライノウイルスと同様、特に冬季における気管支喘息やCOPDの急性増悪に関与する。インフルエンザワクチンはCOPDの急性増悪による死亡率を低下させる。また、ノイラミニダーゼ阻害薬やアマンタジンインフルエンザ治療薬として使用されている。他方で、インフルエンザウイルスの感染初期段階として、細胞接着とエンドゾームへのウイルス取り込みがある。インフルエンザウイルスはエンドゾームの酸性化によりRNAを細胞質に放出する⁷⁾。しかし、エンドゾームの機能を抑制するインフルエンザ治療医薬品は開発されていない。私たちはこれまで、マクロライドやL-カルボシステイン、プロトンポンプ阻害薬などのヒト気管上皮細胞のエンドゾーム内pH上昇を報告したが、今年度はこれらの医薬品のインフルエンザウイルス感染抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト気管上皮細胞培養について東北大学医学部倫理委員会の承認を得て行なった。

B. 研究方法

1. ヒト気管上皮細胞およびヒト気管上皮粘膜下腺細胞を試験管に培養し、ライノウイルス14型を感染させた。ライノウイルス感染3日前からメサコリン($10\mu\text{M}$)を上皮細胞に作用させた。ライノウイルス感染前、感染後24時間、および72時間の時点で培養液を回収し、ライノウイルス量および可溶性ICAM-1量を測定した。

2. ヒト臍帯静脈内皮細胞をシャーレに培養し、パフィロマイシン(10^{-8}M)、エリスロマイシン($10\mu\text{M}$)、クラリスロマイシン($10\mu\text{M}$)を24時間内皮細胞に作用させ

た。さらに、LPA(lysophosphatidic acid)を内皮細胞に24時間作用させ、活性化RhoAをRhoA-GTPアッセイ法で測定した⁸⁾。

3. インフルエンザに感受性のあるMDCK細胞、およびヒト気管上皮細胞を試験管に培養し、A香港型インフルエンザウイルス 10^4 TCID₅₀ units/ml(TCID₅₀; tissue culture infective dose 50)を感染させた。インフルエンザウイルス感染3日前からバフィロマイシン(10^{-8} M)、エリスロマイシン(10μ M)、クラリスロマイシン(10μ M)、アマンタジン(10μ M)をMDCK細胞およびヒト気管上皮細胞に作用させた。また、プロトンポンプ阻害薬ランソプラゾール(10μ M)、オメプラゾール(10μ M)をMDCK細胞に、L-カルボシステイン(10μ M)をヒト気管上皮細胞に作用させた。インフルエンザウイルス感染前、感染後24時間、72時間および144時間の時点で培養液を回収し、インフルエンザウイルス量を測定した。インフルエンザウイルス量の測定は、10倍希釈した培養液をMDCK細胞に感染させ、50%細胞変性効果を示す希釈倍率(TCID₅₀; tissue culture infective dose 50, units/ml)で求めた。また、ヒト気管上皮培養液インターロイキン-6(IL-6)放出量を測定した。

C. 研究結果

1. ライノウイルス感染後day 3におけるヒト気管上皮細胞およびヒト気管上皮粘膜下腺細胞の培養液ライノウイルス量はメサコリン(10μ M)刺激で変化しなかった(図1)。

さらに、細胞培養液中可溶性ICAM-1濃度もメサコリン(10μ M)刺激で変化しなかった(図1)。

2. バフィロマイシン、クラリスロマイシン、エリスロマイシンはLPA(lysophosphatidic acid)刺激によるヒト臍帯静脈内皮細胞の活性化RhoA(RhoA-GTP)の量を減少させた(図2)。

3. A香港型インフルエンザウイルス 10^4 TCID₅₀ units/mlを感染させた後、MDCK細胞およびヒト気管上皮細胞の培養液中のインフルエンザ放出量は時間とともに増加した(図3)。MDCK細胞をバフィロマイシン(10^{-8} M)で作用させた場合、培養液放出量は減少した(図3 A、図4 A)。さらに、MDCK細胞をエリスロマイシン(10μ M)、クラリスロマイシン(10μ M)、ランソプラゾール(10μ M)、オメプラゾール(10μ M)、アマンタジン(10μ M)で作用させた場合、培養液放出量は減少した。インフルエンザウイルス放出量減少の程度はアマンタジン

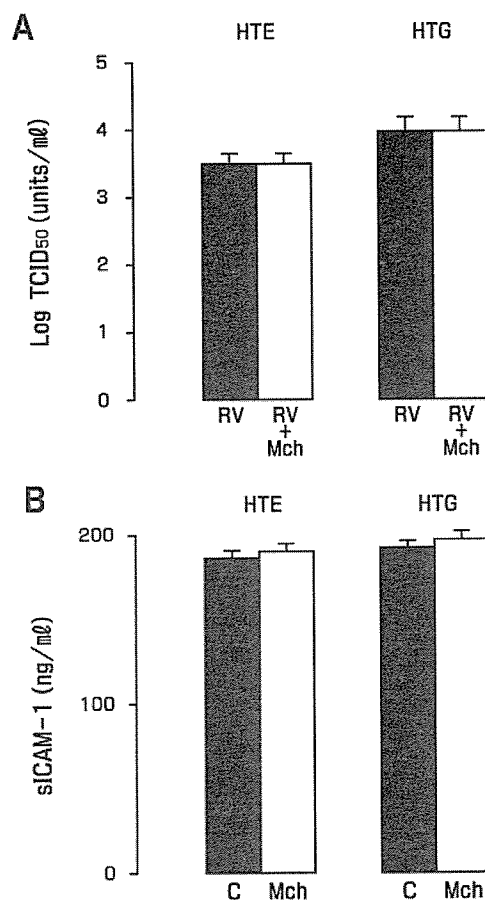


図1 メサコリンのライノウイルス感染および可溶性ICAM-1に及ぼす影響

ヒト気管上皮細胞(HTE)および粘膜下細胞(HTG)培養液に放出されるライノウイルス量(A)および可溶性ICAM-1(B)は、メサコリン刺激で変化しない。

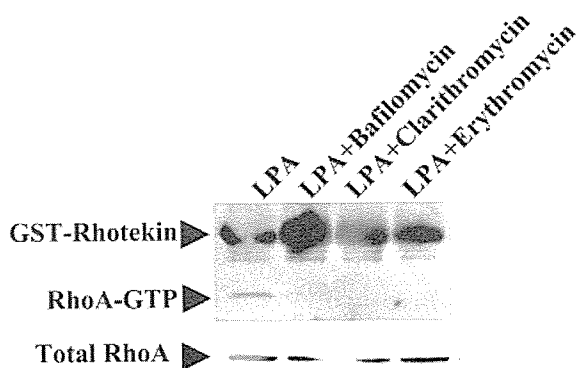


図2 ヒト臍帯静脈内皮細胞のRhoA活性化に及ぼすマクロライドの抑制効果

LPA(lysophosphatidic acid)刺激で増加した活性化RhoA(RhoA-GTP)はバフィロマイシン(bafilomycin)、クラリスロマイシン(clarithromycin)、エリスロマイシン(erythromycin)の前処理で減少する。

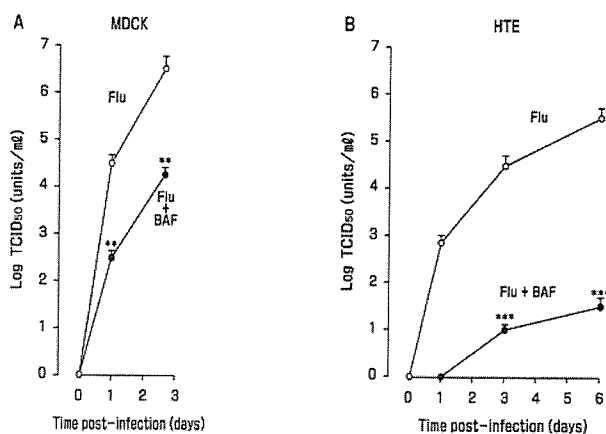


図3 パフィロマイシンの培養液インフルエンザウイルス放出抑制効果
MDCK細胞(A)およびヒト気管上皮細胞(HTE) (B) 培養液へのインフルエンザ放出量(Flu)は時間経過で増加する。パフィロマイシン(BAF)は培養液インフルエンザ放出量を減少する。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ ：インフルエンザウイルス感染に対する有意差。

が最も減少の程度が強く、ウイルス量は1/1000であった(図4A)。次がパフィロマイシンで、ウイルス量は1/100であった。エリスロマイシン、クラリスロマイシン、ランソプラゾール、オメプラゾールによる減少の程度は弱かったが、1/10に減少させた(図4A)。ヒト気管上皮細胞をパフィロマイシン(10^{-8} M)で作用させた場合も培養液放出量は減少した(図3B、図4B)。さらに、ヒト気管上皮細胞をエリスロマイシン($10 \mu\text{M}$)、クラリスロマイシン($10 \mu\text{M}$)、L-カルボシステイン($10 \mu\text{M}$)、アマンタジン($10 \mu\text{M}$)で作用させた場合、培養液放出量は減少した。インフルエンザウイルス放出量減少の程度はアマンタジンとパフィロマイシンが強く、ウイルス量は1/10000であった(図4B)。エリスロマイシン、クラリスロマイシン、L-カルボシステインによる減少の程度は弱かったが、1/10に減少させた(図4B)。

インフルエンザを感染させる前において、パフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシンはヒト気管上皮細胞の培養液IL-6放出量を減少させた(図5A)。しかし、アマンタジンは培養液IL-6放出量を変化させなかった(図5A)。インフルエンザウイルス感染24時間後、培養液IL-6放出量は増加した(図5B)。これに対して、パフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシンを処理したヒト気管上皮細胞ではウイルス感染のみの細胞に比較して、培養液IL-6放出量が減少した(図5B)。アマンタジンはインフルエンザウイルス感染後も、培養液IL-6放出量を減少させなかった(図5B)。

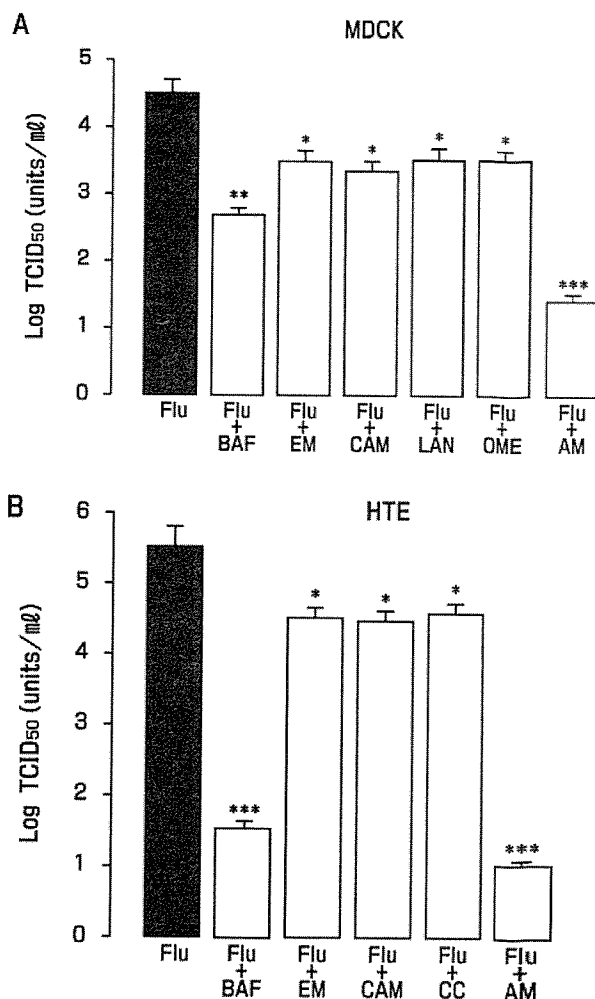


図4 各種薬品の培養液インフルエンザウイルス放出抑制効果
MDCK細胞(A, day 3)およびヒト気管上皮細胞(HTE) (B, day 6) 培養液へのインフルエンザ放出量(Flu)はパフィロマイシン(BAF)、エリスロマイシン(EM)、クラリスロマイシン(CAM)、ランソプラゾール(LAN)、オメプラゾール(OME)、アマンタジン(AM)、L-カルボシステイン(CC)で減少する。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ ：インフルエンザウイルス感染に対する有意差。

D. 考 察

1. ライノウイルスは風邪の主原因であり、かつ、COVID-19や気管支喘息の急性増悪を惹起すると広く知られているが、これまで、ライノウイルスワクチンや抗ライノウイルス薬は開発されていない。私たちはこれまで、グルココルチコイドやエリスロマイシン、プロトンポンプ阻害薬、喀痰調整薬など、いくつかの薬品がライノウイルス感染抑制効果を持つことを発表してきた¹⁻⁴⁾。また

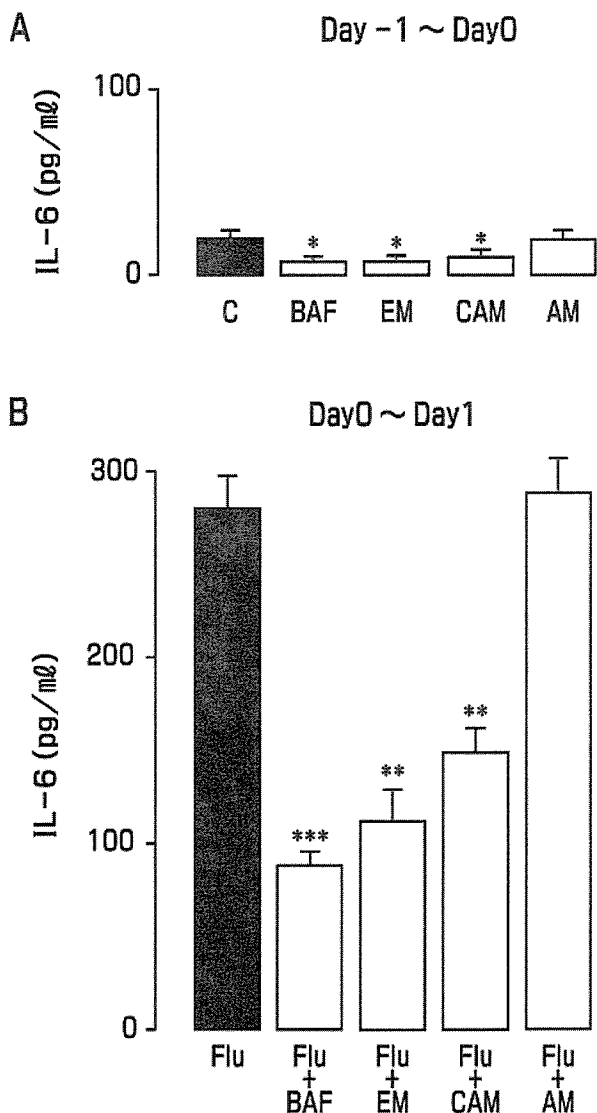


図5 マクロライドのインフルエンザウイルス感染誘発IL-6培養液放出抑制効果
 インフルエンザウイルス感染前(day 0, 5A)にヒト気管上皮細胞培養液に放出されるIL-6はパフィロマイシン(BAF)、エリスロマイシン(EM)、クラリスロマイシン(CAM)で減少する。インフルエンザウイルス感染(day 1)でIL-6は増加する(5B)。パフィロマイシン(BAF)、エリスロマイシン(EM)、クラリスロマイシン(CAM)でインフルエンザウイルス感染後の培養液IL-6増加を抑制する。*P<0.05: コントロールに対する有意差(A)。**P<0.01, ***P<0.001: インフルエンザウイルス感染(Flu)に対する有意差。(B)

エリスロマイシンおよび喀痰調整薬の風邪予防効果を発表した。ライノウイルスのMajor typeは細胞接着分子ICAM-1を感染受容体として気道上皮細胞に感染する。感染後、一部のライノウイルスRNAは細胞表面から細胞内に放出されるが、他のライノウイルスは細胞内の酸

性エンドゾームに取り込まれて、ここでRNAを放出する。私たちはICAM-1の発現抑制と酸性エンドゾームをアルカリにすることでライノウイルス感染抑制効果が出ることを報告してきた。前年度、私たちはCOPDの治療薬として広く用いられているβ2-刺激薬の急性増悪抑制効果に着目し、塩酸プロカテロールの抗ライノウイルス作用を期待して、ヒト気管上皮細胞初代培養細胞を用いたin vitro系で実験した。これらの結果から、塩酸プロカテロールが感染受容体であるICAM-1を減少することによって、ライノウイルス感染抑制効果をもたらすことを明らかにした。また、炎症性サイトカインやICAM-1の減少は、ライノウイルス感染でもたらされる気道炎症を抑制する作用を塩酸プロカテロールが有している可能性を示した。今回、COPD安定期管理に広く用いられている抗コリン薬に関連して、コリン作動薬であるメサコリンをヒト気管上皮細胞および粘膜下腺細胞に処理して、ライノウイルス感染に対する影響を調べた。その結果、メサコリンはライノウイルス感染に影響を与えなかった。また、ライノウイルス感染受容体のICAM-1の培養液可溶性成分である可溶性ICAM-1を測定したが、変化を認めなかった。従って、コリン作動薬それ自体ではライノウイルス感染に影響を与えないことが示唆された。抗コリン薬はCOPD急性増悪予防効果が報告されているが⁹⁻¹¹⁾、ライノウイルス感染とは別の機序が働いていると考えられる。

2. RSウイルスは乳幼児の急性細気管支炎の原因ウイルスとされていたが、最近になって高齢者の感冒¹²⁾あるいはCOPD急性増悪の原因ウイルス¹³⁾としての存在が報告されるようになった。RSウイルスの感染はウイルス蛋白として接着蛋白(attachment protein: G蛋白)および細胞融合蛋白(fusion protein: F蛋白)の存在が明らかになっている。また、感染する細胞側の受容体としてヘパラン硫酸およびsmall GTP aseが報告されている。Small GTP aseはsmall GTP-binding protein RhoAとも呼ばれ、細胞骨格を制御する蛋白としての研究がこれまでなされ、呼吸器・循環器領域では血管内皮細胞の透過性に関与する報告がなされてきた¹⁴⁾。RhoAはRSウイルスの細胞内進入やRSウイルスの細胞融合に関係する⁶⁾。RhoAの合成ペプチドは細胞実験においてRSウイルスの感染を抑制することが報告された。抗RSウイルスヒト化モノクローナル抗体(パリビスマブ、製品名シナジス)は発売されているが、RSウイルス感染を抑制する治療薬は開発されていない。前年度の研究で私たちはRhoAの機能抑制が報告されて

いるマクロライド抗生物質バフィロマイシン¹⁵⁾、臨床で使用されているマクロライドであるエリスロマイシンおよびクラリスロマイシンがRSウイルス感染を抑制することを明らかにした。本年度はこれらの薬品がRhoAの活性化を抑制していることを、血管内皮細胞を用いて明らかにした。気道上皮細胞で同様の機序が働くかどうか、さらに検討の予定である。

3. 本年度はこれまでの研究で検討してきたライノウイルスやRSウイルスのほかに、インフルエンザウイルスの感染抑制効果も検討した。インフルエンザウイルスのうち、これまで大流行してきたA香港型を用いた。インフルエンザ感染抑制薬としては、アマンタジンやノイラミニダーゼ阻害薬が臨床ですでに用いられている。アマンタジンはA型インフルエンザウイルスのM2蛋白で構成されるイオンチャネルの働きを阻害してウイルスの細胞進入、あるいは脱殻を阻害する。また、ノイラミニダーゼ阻害薬はウイルスの細胞外放出に際して必要なノイラミニダーゼを阻害する。他方で、インフルエンザウイルスの進入から複製、放出までの過程において、インフルエンザウイルスの感染初期段階として、細胞接着とエンドゾームへのウイルス取り込みがある。インフルエンザウイルスはエンドゾームの酸性化によりRNAを細胞質に放出する⁷⁾。しかし、エンドゾームの機能を抑制するインフルエンザ治療薬品は開発されていない。バフィロマイシンのエンドゾームの酸性化抑制を介したインフルエンザ感染抑制効果は、今回の研究でも使用したMDCK細胞で明らかにされていた¹⁶⁾。しかし、ヒト気道上皮細胞における検討はなされていなかった。私たちはバフィロマイシンのエンドゾームの酸性化抑制を介したライノウイルス感染抑制効果をすでに報告した¹⁷⁾。本研究では、それに加えて、MDCK細胞、ヒト気管上皮細胞いずれにおいてもバフィロマイシンのインフルエンザ感染抑制効果が認められた。さらに、これまで私たちがエンドゾーム内pH上昇を報告してきたエリスロマイシンやクラリスロマイシン、L-カルボシステイン、プロトンポンプ阻害薬などの医薬品においても、インフルエンザ感染抑制効果が認められた。これらの医薬品のインフルエンザウイルス放出抑制効果はバフィロマイシンやアマンタジンに比べて弱いものであった。しかし、インフルエンザ感染抑制に加えて、炎症性サイトカインであるIL-6の放出をバフィロマイシンと同じレベルに抑制した。したがって、インフルエンザ感染抑制効果に加えて、気道炎症抑制効果も期待できると考える。エリスロマイシンやクラリスロマイシン、L-カルボシステイン、

プロトンポンプ阻害薬などが感染受容体発現など、インフルエンザウイルス感染の他の経路で抑制効果を有するかどうか、今後の検討課題である。

コリン作動薬はヒト気管上皮細胞のライノウイルス感染

結 論

に影響を及ぼさないことが示唆された。マクロライドによるRhoA抑制効果が明らかにされ、RSウイルス感染抑制作用の機序が示唆された。A香港型インフルエンザのヒト気管上皮細胞およびMDCK細胞への感染は、バフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アマンタジン、プロトンポンプ阻害薬ランソプラゾール、オメプラゾール、L-カルボシステインで抑制された。バフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシンはヒト気管上皮細胞の培養液IL-6放出を減少させ、気道炎症効果が示唆された。

参考文献

1. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, et al: Effects of dexamethasone on rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am J Physiol* 2000; 278: L560-L571.
2. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, et al: Erythromycin inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1113-1118.
3. Sasaki T, Yamaya M, Yasuda H, et al: A proton pump inhibitor lansoprazole inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2005; 509: 201-210.
4. Yasuda H, Yamaya M, Sasaki T, et al: Carbocysteine inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial cells. *Eur Respir J* 2006; 28: 51-58.
5. Calverley P, Pauwels R, Vestbo J, et al: Combined salmeterol and fluticasone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 449-456.
6. Pastey MK, Gower TL, Spearman PW, et al: A RhoA-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. *Nat Med* 2000; 6: 35-40.
7. Outlaw MC, Dimmock NJ: Insights into neutralization of animal viruses gained from study of influenza

- virus. *Epidemiol Infect* 1991;106:205–220.
8. Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, et al: RhoA inhibits the nerve growth factor–induced Rac1 activation through Rho–associated kinase–dependent pathway. *J Biol Chem* 2001;276:18977–18983.
 9. Casaburi R, Mahler DA, Jones PW, et al: A long–term evaluation of once–daily inhaled tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2002;19:217–24.
 10. Vincken W, van Noord JA, Greefhorst AP, et al: Improved health outcomes in patients with COPD during 1 yr’s treatment with tiotropium. *Eur Respir J* 2002;19:209–216.
 11. Brusasco V, Hodder R, Miravittles M, et al: Health outcomes following treatment for six months with once daily tiotropium compared with twice daily salmeterol in patients with COPD. *Thorax* 2003;58:399–404.
 12. Zambon MC, Stockton JD, Clewley JP, et al: Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza–like illness: an observational study. *Lancet* 2001;358:1410–1416.
 13. Guidry GG, Black–Payne CA, Payne DK, et al: Respiratory syncytial virus infection among intubated adults in a university medical intensive care unit. *Chest* 1991;100:1377–1384.
 14. Ridley AJ, Hall A: The small GTP–binding protein RhoA regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992;70:389–399.
 15. Hampe W, Zimmermann P, Schulz I: GTP–induced fusion of isolated pancreatic microsomal vesicles is increased by acidification of the vesicle lumen. *FEBS Letters*. 1990;271:62–66.
 16. Ochiai H, Sakai S, Hirabayashi T, et al: Inhibitory effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar–type proton pump, on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells. *Antivir Res* 1995;27:425–430.
 17. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, et al: Bafilomycin A1 inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells: effects on endosomal pH and ICAM–1 production. *Am J Physiol* 2001;280:

L1115–L1127.

特許申請中

G. 知的所有権の取得状況

発明の名称：ライノウイルス感染予防剤
出願者：山谷睦雄、安田浩康、佐々木英忠
出願番号：特願2004–98995号

COPDに対するカルボシステインの臨床的 有用性の検討 —PEACE study—

千葉大学大学院医学研究院 加齢呼吸器病態制御学
異 浩一郎、栗山 喬之
東北大学大学院医学研究科 老年・呼吸器病態学分野
山谷 陸雄
信州大学医学部 内科学第一講座
久保 恵嗣
埼玉医科大学総合医療センター 第三内科
三上 正志
京都大学大学院医学研究科 呼吸器内科学
三嶋 理晃
和歌山県立医科大学 内科学第三講座
一ノ瀬正和
久留米大学医学部 第一内科学
相澤 久道
北海道大学大学院医学研究科 呼吸器内科学分野
西村 正治
東京大学大学院医学研究科 呼吸器内科学
長瀬 隆英
東京女子医科大学 第一内科学
永井 厚志
順天堂大学医学部 呼吸器内科学
福地 義之助

はじめに

COPDの治療戦略として、長時間作用型気管支拡張薬の有用性^{1,2)}、呼吸リハビリテーションの有用性³⁾に関しては近年特に強調されている。これらは、慢性安定期のCOPD症例の呼吸機能の改善、Quality of Life (QOL)の向上を目標としている。

一方、COPDの治療として、増悪を起こした時には、全身性のステロイド投与を含めて、安定期とは別の治療が必要になる⁴⁾。医療経済的にCOPDの治療費を考慮する時、安定期と比較して、増悪期にはより多くの医療費が必要となる。そこで、安定期の治療として、呼吸機能の改善/QOLの改善以外に、増悪をいかに抑制するかということも重要である。

増悪の抑制として、長時間作用型気管支拡張薬と吸入ステロイド薬は、その機序は必ずしも明らかではないが、臨床的な有用性が示唆されている⁵⁾。これらの薬剤は、

安定期に使用されるものであるが、さらに作用機序の異なる薬剤が増悪の抑制に役に立てば、COPDの治療に有用と考えられる。

PEACE (Preventive Effect on Acute Exacerbation of COPD with CarbocisteinE 1,500mg/day) study では、COPDに対するカルボシステイン (ムコダイン) の臨床的有用性を検討した。PEACE studyは、その命名の由来から考慮しても、第一の目的は、COPDにおけるカルボシステインによる増悪の抑制効果の検討である。

対象と方法

PEACE studyは、日本の11施設およびその関連施設を含めた、多施設共同研究である。参加した各施設においては、倫理委員会への申請/許可を経て試験を開始し、また本試験への参加を承諾したCOPD患者さんには、同意書を頂いた。実際には、74人の医師がこの研究に参加

した。本研究を企画した主な構成医師は11名である（表1）。

表1. PEACE studyの企画医師

福地 義之助（代表）	順天堂大学医学部 呼吸器内科学
栗山 喬之	千葉大学大学院医学研究院 加齢呼吸器病態制御学
山谷 陸雄	東北大学大学院医学研究科 老年・呼吸器病態学分野
久保 恵嗣	信州大学医学部 内科学第一講座
三上 正志	埼玉医科大学総合医療センター 第三内科
三嶋 理晃	京都大学大学院医学研究科 呼吸器内科学
一ノ瀬 正和	和歌山県立医科大学 内科学第三講座
相澤 久道	久留米大学医学部 第一内科学
西村 正治	北海道大学大学院医学研究科 呼吸器内科学分野
長瀬 隆英	東京大学大学院医学研究科 呼吸器内科学
永井 厚志	東京女子医科大学 第一内科学

4週間の観察期間（run-in period）で症例の適格性を把握し、その後、カルボシステイン（ムコダイン）投与群と非投与群の2群にわけて、1年間経過観察した前向き研究である。2005年夏から約1年間をかけた研究であるため、秋から冬・春のCOPD患者にとり急性増悪を起しやすい時期が必ず含まれている。

COPD症例の選択に関しては、日本呼吸器学会（JRS）のCOPDガイドラインに準拠し、呼吸機能検査にてFEV_{1.0}/FVC<70%であり、重症度がII（中等症）～IV（最重症）の症例を選択した。また、過去に増悪を経験している症例を選択した。試験の結果に影響を及ぼすような重篤な合併症（悪性腫瘍）を合併している患者さんは除外した。長時間作用型/短時間作用型気管支拡張薬、吸入ステロイドの併用、在宅酸素療法/呼吸リハビリテーションは、試験開始後も同様に継続することで許可した。全身的なステロイド/抗生物質/喀痰調節薬/鎮咳薬の継続投与は禁止とした。ただし、増悪時には、これらの薬剤の投与は許可した。

本試験に参加して頂いたCOPD患者さんには症状日誌の記載をお願いした。咳嗽の程度、喀痰の有無、喀痰の量、喀痰の性状、呼吸困難の程度、喘鳴の有無、呼吸促進の有無、動悸の有無、感冒症状の有無に関して毎日記載して頂き、その日誌と診察毎の問診結果を基に、感冒

の回数、増悪の回数を判断した。

増悪の定義/重症度分類に定説はないが、PEACE studyでは、古典的なAnthonisenの定義⁶⁾に準拠した。大項目は1. 息切れの増悪、2. 喀痰量の増加、3. 喀痰性状の変化（膿性喀痰）であり、小項目は、1. 急性上気道感染、2. 発熱、3. 咳嗽の増加、4. 喘鳴の増加、5. 呼吸数/心拍数の増加である。大項目の中の2つ以上、ないしは大項目1つと小項目の2つ以上として、Anthonisen分類で中等症以上を増悪とした。

PEACE studyの第一の目標は、カルボシステイン投与によりCOPDの増悪が抑制できるかどうかである。第二の目標は、カルボシステイン投与により1)COPDにおける疾患特異的QOLの評価指標であるSt. George's Respiratory Questionnaire (SGRQ) にてQOLの改善がみられるか、さらに、2)感冒の頻度が抑制できるかどうかである。

PEACE studyでは、4週間のrun-in periodにおいて適格性を判断した151症例を対象とした。そして、75例のStudy Group（カルボシステイン1,500mg/day投与群）と76例のControl Groupに分類した。プロトコールに準拠できなかったStudy Groupの3例、Control Groupの6例を除外したそれぞれ72例と70例に関して解析を施行した（図1）。カルボシステイン投与による副作用は認められなかった。

Study GroupとControl Groupでは、対象症例には性差、喫煙歴、年齢、% FEV_{1.0}で評価したCOPDの重症度に関して有意差は認められなかった（表2）。Control Groupの方がBody mass index (BMI) は低値であり、一秒量 (FEV_{1.0}) も低値であり、やせの程度が強く、閉塞性換気障害の程度が強い群であった。また、試験結果に特に影響を及ぼすと考えられる長時間作用型気管支拡張薬および吸入ステロイド薬の使用頻度に関して、

Fig.1

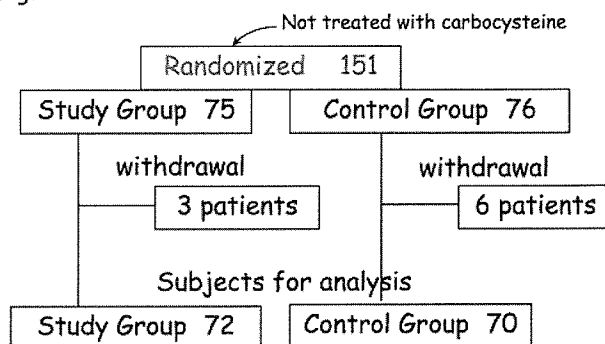


図1. 対象症例のフローチャート

表 2. 対象症例の臨床的特徴

	Study Group	Control Group	
No of subjects	72	70	
Gender(male / female)	65 / 7	65 / 5	NS
Smoking(yes / no)	69 / 3	68 / 2	NS
Age(yrs)	69.8 ± 0.9	70.5 ± 0.9	NS
BMI(kg / m ²)	21.7 ± 0.4	20.6 ± 0.4	P<0.05
FEV _{1.0} (L)	1.37 ± 0.07	1.20 ± 0.06	P<0.05
COPD severity			NS
Stage II	58%	43%	
Stage III	33%	43%	
Stage V	8%	14%	

Study GroupとControl Groupで有意差は認められなかった。長時間作用型気管支拡張薬の使用は、Study Groupで71%、Control Groupで67%であった。吸入ステロイド薬の使用は、Study Groupで31%、Control Groupで26%であった。

結 果

増悪の頻度 (frequency) (図 2)

Control Groupでは47%において、Study Groupでは81%において、1年間の経過観察で増悪が見られなかった。Control Groupでは23%で複数回の増悪が観察されたが、Study Groupでは6%しか複数回の増悪が観察されなかった。Wilcoxon testで検定をした結果、Study Groupにおいて有意に増悪が抑制されていた。

Fig.2

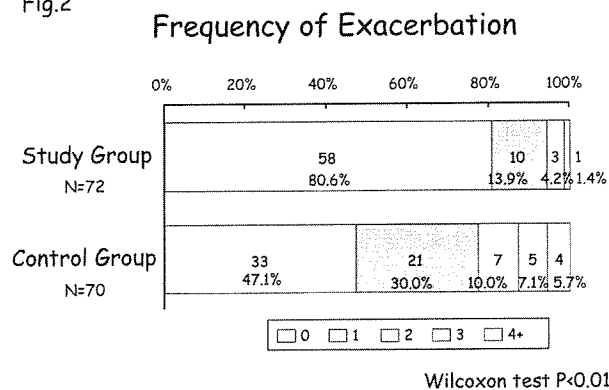


図 2. 増悪の頻度

表 3. 増悪の発生率

	Study Group	Control Group
No of subjects	72	70
Observed person-years	67.5	65.1
Number of events	19	66
Incidence rate(/year)	0.28	1.01
Permutation test		< 0.01

Fig.3

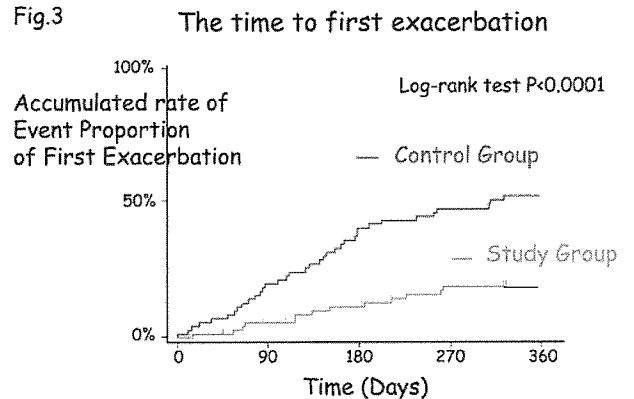


図 3. 最初の増悪イベントまでの累積頻度

Fig.4

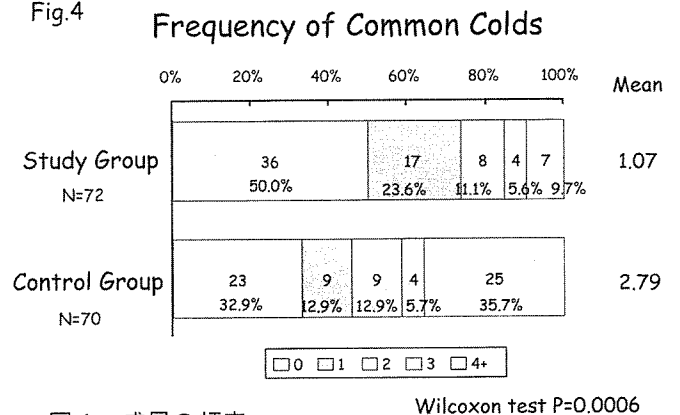


図 4. 感冒の頻度

増悪の発生率 (incidence rate) (表 3)

増悪の発生率を延べ数で計算した結果、1年の経過で、Control Groupでは66、Study Groupでは19であった。/年で発生率を計算すると、Control Groupでは1.01/年、Study Groupでは0.28/年であり、Permutation testで有意差を認め、Study Groupの増悪発生率は有意に低値であった。

最初の増悪を起こすまでの期間 (図 3)

最初に増悪を起こすまでの日数をLog-rank testにて