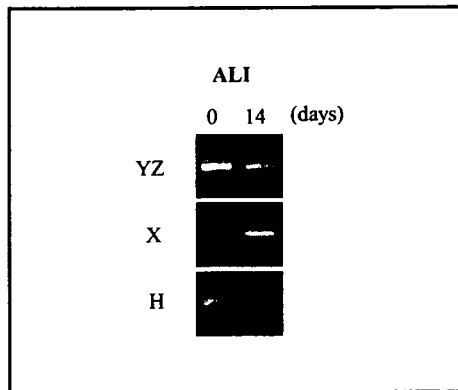


② ヒト気道上皮細胞の気相液相培養系における発現検討

図 3 に示すように、気道上皮細胞の再分化に伴い、X 型の transcript が発現してくることがわかった。

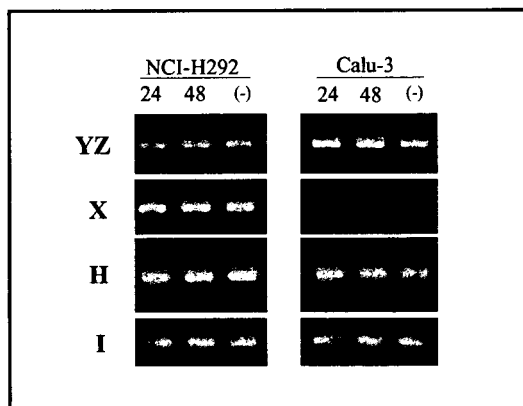


(図 3)

気相液相培養系における *ST6GAL1* の transcripts

③ NCI-H292 と Calu-3 細胞における発現検討

NCI-H292 と Calu-3 細胞の *ST6GAL1* の transcripts を検討したところ、図 4 に示すように、NCI-H292 細胞では 3 種類の transcripts がすべて発現していたが、Calu-3 細胞では X が発現していないことがわかった。



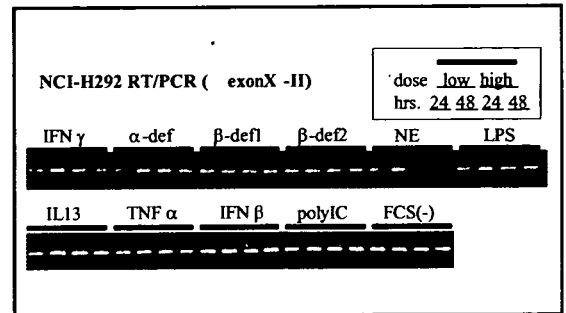
(図 4) NCI-H292 と

Calu-3 細胞における *ST6GAL1* の transcripts

④ 各種サイトカインなどの刺激を加えた NCI-H292 細胞における発現検討

②の実験の結果から、ヒト気道上皮の再分化に伴い X 型の transcript が増加すると思われたが、③の実験の結果から、Calu-3 細胞では exon X が発現していないことがわかり、炎症場における発現制御機構を調べる目的の実験には NCI-H292 細胞を選択した。

各種サイトカインなどの刺激を加えた NCI-H292 細胞から RT/PCR にて exon X を有する transcript を検出したが、図 5 に示すように、特に大きな変化は認められなかった。



(図 5) 各種サイトカインなどの刺激を加えた NCI-H292 細胞における *ST6GAL1* の transcripts

D. 考察

宿主側のウイルス受容体は、ウイルス感染の発症機序を考える上で、重要な因子であると考えられる。インフルエンザでは、宿主側の糖鎖末端のシアル酸の多様性が、ヒトへの易感染性の違いに何らかの影響を与えている可能性がある。また、最近、ヒト気道上皮に SA2-3Gal が発現し、トリインフルエンザウイルスが感染しうるとの報告がいくつか見られるが、気道上皮細胞の種類とその分布の特性については結論が得られていない。また炎症時には、正常時と異なる糖鎖発現が NCI-H292, Calu-3 細胞などのヒト気道上皮細胞株での発現を検討したところ、SNA・MAA とともに結合性を有することが明らかになった。細胞が未分化な状態では、これらの細胞株では、SA2-6Gal 及び SA2-3Gal がともに発現しているが、分化の方向性によりどちらかの染色性が増強あるいは減弱して行く可能性、あるいは、炎症の場では発現量が変化する可能性を考え、今年度は、気相液相培養を用いた分化の系や各種サイトカインなどの刺激を加えた NCI-H292 細胞を用いて、シアル酸転移酵素遺伝子発現の制御を検討することを試み、ヒトの気道上皮細胞においてシアル酸転移に大きな役割を担う *ST6GAL1* に注目してみた。

その結果、気道上皮細胞の再分化に伴う X 型の transcript の増加が認められたが、Calu-3 細胞においては X 型は発現しておらず、NCI-H292 細胞においては各種サイトカインなどの刺激によっても X 型の発現の発現に大きな違いが認められなかった。これらのヒ

ト気道上皮細胞株はがん細胞由来の細胞株であるので、その糖鎖構成はがん細胞に特異的な制御が加わっている可能性があり、より正常に近い細胞での検討が必要と思われた。また、今回は α 2-6にシアル酸を付加する酵素の遺伝子を調べたが、 α 2-3にシアル酸を付加する酵素の遺伝子群の検討も必要である。

E. 結論

我々はインフルエンザ宿主側レセプターの局在、定量のための系を構築した。SNA および MAA により認識される、SA2-6Gal 及び SA2-3Gal はヒト気道上皮細胞株においてともに強く発現しており、これはヒトの正常気道上皮細胞における分布とは異なる。また、シアル酸転移酵素遺伝子の mRNA 発現の解析も加えたが、今回用いたヒト気道上皮細胞株においては、がん細胞由来のためか、細胞株により発現様式に違いがあり、炎症刺激による発現の大きな変化は特に求められなかった。今後、より生体に近い系を確立する必要があると考えられる。しかし、このような細胞表面でのレセプターの局在解析や定量を行う実験系や、その発現を担う遺伝子の発現を調べる実験系を組み合わせる方法により、宿主側のレセプターの立場から、トリインフルエンザウイルスに対するヒトの易感染性因子を明らかにされることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

H5N1 感染患者の臨床疫学研究及び臨床的特徴の検討

分担研究者 工藤 宏一郎 国立国際医療センター 国際疾病センター長
分担研究者 新保卓郎 国立国際医療センター研究所 医療情報解析研究部 部長

研究要旨 ベトナムにおけるヒト鳥インフルエンザの臨床疫学調査の為、平成 16 年と 17 年及び平成 19 年度にベトナム北部の病院に入院した患者の臨床データの調査を行い、今後の臨床治療への考察を行った。

A. 研究目的

ベトナムで発生しているヒト H5N1 症例の疫学・臨床的検討を行うことによって、ヒト H5N1 例の治療法・予防法を探索し、国内発生時での臨床的対応に備え、同時に将来発生が危惧される新型インフルエンザの肺炎治療法・予防策を講ずる。

B. 研究方法

ハノイの国立感染症熱帯病病院に 2004-2005 年に入院した 29 例について、及びバクマイ病院に 2008 年に入院した 3 例の H5N1 症例の臨床経過の実態を調査した。日本側からは、H5N1 の肺病理像、ウイルス解析の結果などの情報を提供し、日越の研究者で検討を行った。

（倫理面への配慮）

患者の個人情報の保護に流出に注意を払い研究を進行する。

C. 研究結果

2003 年に起きた高病原性鳥インフルエンザパンデミックから、2008 年までの H5N1 患者の症例数と死亡数の合計は、下記の通りである。

年	症例	ベトナム	インドネシア	エジプト	中国	タイ	合計
2003	症例数	3	0	0	1	0	4
	死亡数	3	0	0	1	0	4

2004	症例数	29	0	0	0	17	46
	死亡数	20	0	0	0	12	32
2005	症例数	61	20	0	8	5	98
	死亡数	19	13	0	5	2	43
2006	症例数	0	55	18	13	3	115
	死亡数	0	45	10	8	3	79
2007	症例数	8	42	25	5	0	86
	死亡数	5	37	9	3	0	59
2008	症例数	5	12	4	3	0	24
	死亡数	5	10	1	3	0	19
合計	症例数	106	129	47	30	25	373
	死亡数	52	105	20	20	17	236

Total number of cases includes number of deaths.
WHO reports only laboratory-confirmed cases.
All dates refer to onset of illness.

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_04_30/en/index.html

1. 2004 年-2005 年発生の 29 例について

まず、2004 年から 2005 年にベトナム北部のハノイ市内の国立感染症熱帯病研究所病院(NIITD)に入院した 29 例について、その臨床像を調査した所、次のとおりであった。

年齢	35.1±14.2 (歳) (14~67 歳)
性別	男：女=14:15
発症から入院までの日数	6.9±4.4 (日)
家禽または病気で死亡との家禽との接触	62%

家族内有症者	21%
--------	-----

発熱 (38℃以上)	50	100(%)
悪寒	48%	83%
頭痛	35%	
筋肉痛	21%	
下痢	7%	
吐気	7%	

白血球数	平均 $6.4 \times 10^3 \pm 4.29 \times 10^3$
減少	(3.3×10^3 以下) 8/29 例
増加	(10×10^3 以上) 7/29 例
血小板	$21.3 \times 10^4 \pm 12.5 \times 10^4$ ($1.4 \times 10^4 \sim 57.8 \times 10^4$)
減少	(10 万以下) 6/29 例
増加	(30 万以上) 4/29 例
総ビリルビン異常高値	17/29 例
GOT,GP 異常高値	9/29 例
肺炎像 軽	10/29 例
中	8/29 例
重	11/29 例
プレドニン使用	15/29 例
タミフル使用	15/29 例
病日	平均 19.3 日
予後	生:死=7:22
予後	生:死=7:22

<臨床的特長>

- ・ 発症年齢は概して若年層が多いが、60 歳台が 2 名おり、必ずしも若年者とは限らない
- ・ 家禽との濃厚接触は 29 例中 20 例と多く認められた。しかし、不明者は 9 例あった。家禽 (病的・死亡) との接触の有無が診断に重要な keyword となるだろう。またこのことは、このような事情を有すれば高齢でも感染・発病することを意味していると思われる。
- ・ 発症後入院までに経過している日数は、平均 6.9

日である。これは、本疾患が一般的に急速に進行する特長を持つものとするれば、やや時間が経過しすぎているきらいがあるが、ベトナムの社会・医療事情を反映していると考えられる。

- ・ 発熱 (しかも 38.5℃以上の高熱がほとんど) は必発の症状である。
- ・ 他に悪寒(48.3%)、筋肉痛(6%)、呼吸困難(72.4%)と消化器症状の吐気(6.9%)、下痢(6.9%)と続く。呼吸困難は肺炎の重症度と関連しているようであり、肺炎の進行と呼吸困難が出現してくると思われる。
- ・ 臨床データとして、白血球減少～増加、血小板減少～増加と一定しないが二次性細菌感染が関与するかどうかは不明であった。
- ・ GOT、GPT、ビリルビン値上昇と肝機能障害を呈するのが 31%あった。
- ・ 全症例で肺炎をていしていた。
- ・ 死亡はARDSによる呼吸不全、または腎不全、肝不全を併発し、いわゆる多臓器不全を呈するものが認められた。

以上が 2004 年～2005 年の NIITD に入院した 29 例の臨床的特徴である。

これまで報告されている本疾患の予後 (致死率 60～70%) に比べると、本集団は 20～30%と低い。考えられる理由は、発症から治療導入 (抗ウイルス剤も含めて) までの期間が 6.9 日と、他の報告と比して比較的短いことが認められた。これは、肺炎の軽症例が多いことが反映していると思われ、全症例が重症になるとは限らないということを意味している。つまり、自然経過で重症になるとは限らない例、早期治療が影響していると考えられる例があるようだ。しかし、新保らの研究 (前述) では Oseltamivir の効果は決定的でなく、理由は現時点では同定できない。

一般的臨床像として、感染・発症すると全身の症状(発熱、咳、筋肉痛など)、呼吸困難、肺炎、特に消化器症状、肝機能異常を呈し、急速に進行する例が多く、現時点では予後不良な疾患といえる。

2. 2008 年発生の 3 例について

バクマイ病院(ハノイ市)に 2007 年度末及び 2008 年 3

月までに入院した 3 例の重要な疫学・臨床データを抽出し、下記のようにまとめられた。

発症患者はいずれも 20～30 歳の若年者、従事職種はトリとの接触が濃厚(Case3 を除く)と思われる。トリとの接触から発症までの期間(incubation time)については、入院時に重症・重篤であったため、本人からの聴取は不可であった。しかし、発症から治療期間について救命できた Case1 は 3 日で比較的短期であり、死亡した Case2, 3 は、7～12 日と長期であった。

入院時、Case1 は発症してからの期間が短かったためか、重症であったが他の例に比べると重症性は少し弱い。Case2, 3 は重篤で ARDS で、集中的な治療を開始するも、治療に反応する間もなく死亡という経過であった。このことから、臨床的観点から早期診断・早期治療が重要であること、また重症肺炎に対しても何らかの集中的治療を要することが強く示唆される。

Case	年齢	性別	職業	発症から治療開始までの期間	肺炎の重症度	治療内容	予後
Case 1	30	男	屠殺業	3 日	重症肺炎 気胸	タミフル 300mg/日 腎透析 人工呼吸器	回復
Case 2	22	女	農業	12 日	ARDS	タミフル 300mg/日 抗生物質 低用量ステロイド 腎透析 人工呼吸器	死亡
Case 3	27	男		7-8 日	ARDS	タミフル 300mg/日 抗生物質 低用量ステロイド PMX 血液浄化 人工呼吸器	死亡

※PMX: immobilized polymyxin B

D. 考察

WHO に報告された症例数から、ベトナムでは 2003 年から 2005 年までの H5N1 患者の発生を第一 wave、2007 年 2008 年を第二 wave と呼ぶことが出来、それぞれの症例数は第一 wave が 90 例、第二 wave が 13 例となる。本疫学調査はその内の 29 例、3 例となり、

かなりの症例数を把握することが出来たといえる。

H5N1 患者の治療は、早期診断と抗ウイルス薬投与、肺炎に対する早期治療が非常に重要なポイントであることが推察される。

E. 結論

国民への H5N1 に対する教育を徹底し、早期診断・早期治療を促す包括的治療の構築が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

ヒト高病原性トリインフルエンザ肺炎の治療ガイドラインの策定

分担研究者 工藤 宏一郎 国立国際医療センター 国際疾病センター長

研究要旨 ヒト高病原性鳥インフルエンザ治療について、有効な治療法は確立していないものの、これまで多くの治療に関しての、治療・経験がそれなりに蓄積されている。これらを検索し、適宜 up-to-date し、国立国際医療センター・国際疾病センター（DCC）から情報を発信してゆくこととする。

A. 研究目的

これまでに行われた研究・知見・経験についての情報を収集し、それらの情報を臨床的な立場で、重症呼吸器疾患、呼吸器感染症、ウイルス感染症などの専門的な見地から精査することで、国民、医療従事者にとって有益な up dated 治療法のガイドラインを策定していき、ホームページなどで医療従事者や一般の方々に参照できるような形で発信していく。

B. 研究方法

国内外のインフルエンザおよび高病原性トリインフルエンザの治療法に関する研究の情報を、PUBMED, OVID, EMBASE, SCoup などのデータベースでの英文文献検索で収集し、さらに国内情報についても文献検索や学会等にて情報の収集を行う。これらの情報を臨床的な視点から精査すると共に、メタ解析などの統計学的手法を適用して有用と思われる治療法を検出する。必要に応じて日本呼吸器学会、日本感染症学会、日本アレルギー学会など関連学会、および関係公共機関の医療従事者や専門家などとの討議を加えて、治療法の妥当性を検討したうえで、ガイドラインとなる治療法について国立国際医療センター（国際疾病センター）のホームページで情報提供を行う。
(http://www.dcc.jp/dis_center/aboutdcc.html)

をまとめると以下の如くなる。

* World Health Organization. Clinical management of human infection with avian influenza A(H5N1)virus.

<http://www.who.int/csr/resources/publications/en/index.html>

推奨方法	内 容
抗ウイルス剤	タミフルが第一選択 モディファイされた治療内容あり ²⁾
抗生物質	CAP(community-acquired pneumonia 市中肺炎)に対するエンペリック治療（経験的治療法）を微生物学検査結果を参考にしして開始し 2-3 日続行する。予防的投与は不要。
酸素療法	酸素飽和度をモニターしながら 90%を維持する鼻カニューラあるいは顔マスクで酸素投与
IPPV (Invasive positive pressure ventilation) 浸襲的抑圧補助呼吸	ARDS に対し、早期導入すべきである。 が加圧による肺障害を防ぐため、低一回換気量、低圧とする輸液管理も補助的に行う。 NPPV(Non-invasive positive pressure ventilation)は避けた方がよい ³⁾
低用量ステロイド療法	ARDS 合併の敗血症に対する治療と同等のもの 例) 成人の場合、ハイドロコチゾン 200mg/日、50mg ずつ 6 時間毎
解熱、抗炎症薬 (NSAIDs)	パラセタモール（アンフェタミン）を経口あるいは坐薬として解熱用に使用

C. 研究結果

多くの治療は断片的に報告がなされているが、現時点で包括的なものとして WHO で推奨しているヒト H5N1 治療法*¹⁾ が最良のものとして考えられ、それら

感染コントロール	感染エアゾール発生する場合、N95、FFP2のマスク、アイプロテクション、ガウン、手袋を使用すること。治療病室は空気感染防止用病室あるいは陰圧室を使用のこと。
----------	---

1) 診断法

ヒト H5N1 の理学所見、症状として特徴的なものはない。通常型インフルエンザに類似した症状と、病的トリ、あるいは死亡したトリとの濃厚な接触、あるいは H5N1 に感染したと思われる症例との無防備状態での濃厚な接触ありということが、悪い例の基準となる。確診は、患者からの呼吸器系からの多種の検体（鼻、咽頭、気管支ぬぐい液、気管からの吸引液等）からのウイルスの証明、PCR での証明である。

2) オセタミビルの通常量 150mg/日 が標準的療法であるが、倍量 300mg/日 の治験も続行中である。アマンタジンは耐性菌株の出現の報告あり。他の抗ウイルス薬との併用療法も可能であるが、有効性は証明されていない。

3) NPPV (Non-invasive positive pressure ventilation)

エアゾール生成するため、感染拡大のために推奨されない。完全な防止策をとりながら使用するならば可とするが、呼吸不全が現状では急速に進行するので、最大 2 時間以内を限度と、呼吸不全の徴候が出現したら IPPV に移行する。

D. 考察

ヒト H5N1 の予後は悪く、必然として死亡率が高く、現時点で約 60% である。その理由は、

- (1) 社会的な医療体制やインフラがまだ整っていない地域での発生が多いこと
- (2) 疾患そのものが比較的新しく、ヒトでの病態の全容が明らかにされていないこと
- (3) したがって、未だ有効な治療法が確立されておらず、手探り状態であると言って良い
- (4) また、免疫力のない生体に、肺包系、末梢気道系へのウイルス感染症は、本来このような重症・重篤な経過をたどり、予後が不良の性質かもしれない。これらの現状と将来発生するかもしれない新型インフルエンザの病態を推測するならば、早急

な有効な治療法を確立することが強く望まれる。しかしながら極めて不満足なものであるが、詳細は、文献1)を参考とする。これまで多くの断片的な記述を包括的に手際よくまとめられたものとして、現時点で up-to-date の最良の治療薬として、WHO の推奨法をあげるといふ結論に達した。

E. 結論

ヒト H5N1 に対する現時点での保存的療法であるが、WHO の推奨法が最良と思われる。今後、根治を目指した有効治療の開発、確率が強く望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし。

2. 学会発表
特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし。

2. 実用新案登録
特になし。

3. その他
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

動物モデルにおける鳥インフルエンザの治療方法の検討

分担研究者 切替照雄 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部 部長

研究要旨 新型インフルエンザウイルスの出現は時間の問題であり、その治療法および治療薬の開発は急務である。急性及び慢性感染呼吸器疾患の治療にも携わってきた臨床的経験からみて、インフルエンザ感染症の防止、治療についても既存の治療法が応用できるのではないかと感触を得ている。慢性喘息に対する吸入ステロイド療法を中心とした局所療法の有用性は顕著なものである。そのメカニズムの全容は明らかでないが、ウイルス気道感染を防止あるいは減少させ、急性増悪を防止させている推測は充分現実性を帯びる。そこで、既存の喘息治療薬に抗インフルエンザ効果を有するものが有るか否かを基礎研究レベルで検討する。この研究によりインフルエンザに対する効果が発見されれば、流行が懸念される新型インフルエンザの治療法を提供することが可能となる。

A. 研究目的

近年新型インフルエンザの出現が懸念されている。この新型インフルエンザの出現は、「出現するかも知れない」という段階ではなく、既に「いつ出現するか？」という時期に来ている。もし仮に現在、新型インフルエンザが大流行(パンデミック)した場合、社会機能が麻痺、大混乱を起こし、過去のスペイン風邪や香港風邪をはるかにしのぐ被害が予想されている。この為 WHO を中心とした世界規模での監視が強められている。新型インフルエンザは鳥インフルエンザが変異してヒトに感染し易くなると考えられている。過去に発生したインフルエンザパンデミックでの重症・死亡例のほとんどは、重症肺炎と急性呼吸不全が原因とされる。現在、新型インフルエンザが発生した場合のモデルともいべき状況が、その規模は小さいもののアジアを中心に発生しているヒト鳥インフルエンザである。一方これらの重症肺炎を対象にした疫学調査では、タミフルの有効性については懐疑的である。ヒト鳥インフルエンザ肺炎(病理解析より、Diffuse alveolar damage/DAD・びまん性肺障害によって、ARDS/ALL の病態になる^{*1)})に対しては、WHO の推奨する逼近の治療法が、国際的にみて標準的なものとみなされるが、ここでも述べられているように

決定的な有効性は期待出来ない。

鳥インフルエンザや新型インフルエンザによる重症・劇症肺炎に至るまでの病態に対する治療戦略は、1) ウイルスの感染予防、2) 感染成立から肺炎発症への初期防止(気道系での感染レベルに留める)、3) 肺炎(肺胞レベルでの感染発症)の治療、4) 全身感染の阻止、と病期を区分して想定すべきと考える。

現在の我々が手にしている抗インフルエンザウイルス薬は、オセルタミビル(商品名：タミフル)、ザナミビル(商品名：リレンザ)、アマンタジン(商品名：シンメトレル)等、極めて限られたものであり、通常型インフルエンザウイルスに対して有効性を期待できるものは、前二者に過ぎない。更に、アジアを中心に発生している重症ヒト鳥インフルエンザ肺炎に対するタミフルの有効性には先述のとおり総じて否定的なのが国際的な常識である。つまり、上記の 3), 4) レベルでのタミフルの有効性はあまり期待出来ない。

臨床現場において、薬剤でコントロールされている喘息患者では呼吸器感染症が少ない傾向にある。また同様の印象を受けている臨床医も複数いる(新薬と臨床、2005)。この為我々は既に医療現場で広く使われている薬剤、特に喘息などの呼吸器疾患に対する既存薬剤に

抗インフルエンザ効果が無いかスクリーニングすることを目的とする。もしこのような薬剤は見つけることが出来れば、新規の薬剤を一から作るより、はるかに安価により安全に社会に供給できるものと考えている。

B. 研究方法

培養細胞を用いた *in vitro* 実験とマウスを用いた *in vivo* 実験を行う。使用するインフルエンザウイルス株は、広く使われている実験株インフルエンザ A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8/34, H1N1)を用いる。この株はマウスに馴化させており、感染によりマウスを殺すことが出来る。またイヌ腎細胞株 MDCK 細胞株にも感染し細胞変性を起こす。この *in vivo* と *in vitro* の感染実験系を中心として薬剤スクリーニングを行う。まず *in vivo* 系でインフルエンザウイルス接種前、接種後、接種前～後において、スクリーニング薬剤を投与し、14 日間観察を行いマウスの生死を検討する。コントロールとして薬剤を投与しない群と比較して、死亡マウス数に有意差が認められた薬剤についてさらに詳細な検討を行う。具体的には、経時的なマウスの体重の変化、感染臓器からのウイルス分離とそのタイトルの確認を予定している。薬剤投与及びウイルス接種は、吸入麻酔薬による全身麻酔下で経鼻投与する。用いる薬剤は、気管支喘息で広く用いられている気管支喘息治療薬(吸入ステロイド budesonide)、抗アレルギー薬(クロモグリク酸ナトリウム)、気管支拡張薬(β刺激薬)などを予定している。

i) 気管支喘息治療薬(吸入ステロイド budesonide)投与について(図 1)

Budesonide 濃度 ; 0.5microG、5microG/50microL PBS/day

ウイルス量 ; LD50 の 5 倍量

投与期間 ; ①ウイルス接種 2 週間(あるいは 3 日前)

～ウイルス接種前日

②ウイルス接種 2 週間(あるいは 3 日前)

～ウイルス接種後 14 日まで

③ウイルス接種翌日

～ウイルス接種後 14 日まで

いずれもウイルス接種当日には薬剤投与を行わない。

ii) 抗アレルギー薬(クロモグリク酸ナトリウム)と気管支拡張薬(β刺激薬)については現在検討中である。

(倫理面への配慮)

本研究は国立国際医療センター研究所動物実験倫理委員会の承認を得て実施された。

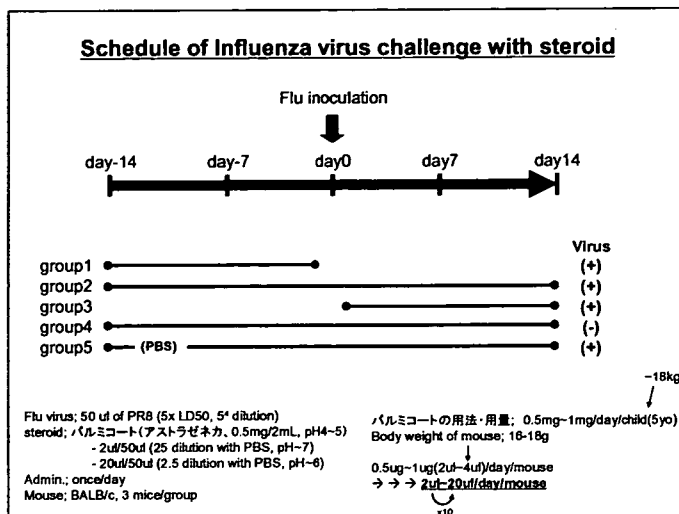


図 1

C. 研究結果

培養細胞を用いた *in vitro* 実験とマウスを用いた *in vivo* 実験を立ち上げた。インフルエンザ A/PR/8/34 株を入手し、この株が培養細胞 MDCK において細胞変性を起こすこと、また培養細胞を用いたウイルスタイトルの測定をブランクアッセイで行った。また A/PR/8/34 株をマウス(BALB/c)に経鼻感染させ、マウスでの 50% 致死率を決定した。気管支喘息治療薬(吸入ステロイド budesonide)については、薬剤投与量及び投与期間に関わらずウイルス接種 10 日後までに全てのマウスが死亡した(図 2)。この際、薬剤を投与していないコントロールと有意差は見られなかった。

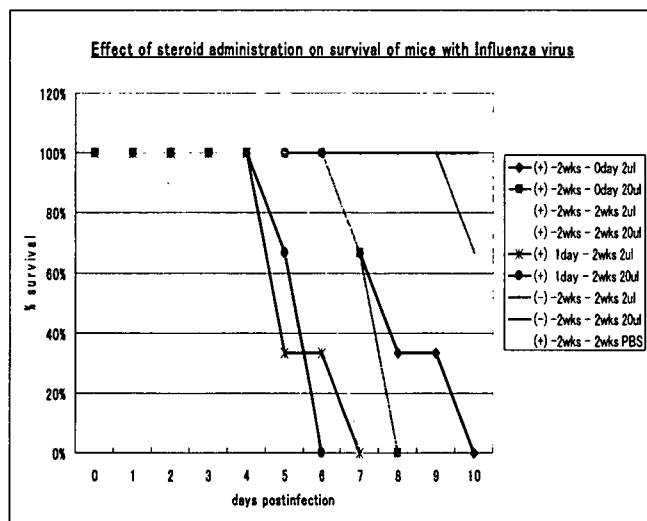


図 2

D. 考察

スクリーニング薬剤の一つである気管支喘息治療薬(吸入ステロイド **budenoside**)については、今までのところ抗インフルエンザ効果は無いようである。しかし今回は接種ウイルス量が過剰だった可能性が考えられる。この為接種ウイルス量を減らして再度行う必要がある。今回はコントロールとして **PBS** のみであったため、このウイルス量が適切か否か不明確であった。この為、抗インフルエンザ効果の実証されている

Oseltamivir(商品名タミフル)などをコントロールにするなどして、適切なウイルス接種量を検討しなくてはならない。

E. 結論

これまでに実験結果から、少なくとも大量のウイルス接種の場合には、気管支喘息治療薬(吸入ステロイド **budenoside**)の抗インフルエンザ作用は確認できなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
新保卓郎	「治る」と「治す」 —風邪の抗菌薬問題	尾藤誠司	医師アタマ	医学書院	東京	2007	46-51

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Goto M, Shimbo T, et al.	Influence of loxoprofen use on recovery from naturally acquired upper respiratory tract infections: a randomized controlled trial	Intern Med.	46	1179-1186	2007
Liem NT, Nakajima N, Phat LP, Sato Y, Thach HN, Hung PV, San LT, Katano H, Kumasaka T, Oka T, Kawachi S, Matsushita T, Sata T, Kudo K, Suzuki K.	H5N1-infected cells in lung with diffuse alveolar damage in exudative phase from a fatal case in Vietnam	Jpn J Infect Dis	61	157-160	2008
川名明彦	ヒトの鳥インフルエンザ感染症の臨床的諸問題	臨床とウイルス (日本臨床ウイルス学会)	35巻5号	439-446	2007年
川名明彦	新型インフルエンザ対策医療機関の立場から	臨床検査 (医学書院)	52巻1号	64-68	2008年

Influence of Loxoprofen Use on Recovery from Naturally Acquired Upper Respiratory Tract Infections: A Randomized Controlled Trial

Masashi Goto¹, Takashi Kawamura¹, Takuro Shimbo², Osamu Takahashi³, Masahiko Ando¹, Koichi Miyaki⁴, Takahiko Nohara⁵, Hidetsuna Watanabe⁶, Isamu Suzuki⁷, Mitsuru Aono¹ and for the Great Cold Investigators-II

Abstract

Objective: To investigate whether loxoprofen, one of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs, prolongs the recovery process of naturally acquired upper respiratory tract infections (URTIs) in the clinical setting.

Methods: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial was conducted in 23 outpatient facilities in Japan. Patients aged 18 through 65 years suffering from URTIs were randomly assigned to receive loxoprofen or its placebo. The primary outcome was duration of illness in days.

Results: A total of 174 patients were available for the analyses. Duration of illness was 8.94 ± 3.20 days in the loxoprofen group compared to 8.39 ± 3.39 days in the placebo group ($P=.19$). The number of days with limited daily activities was fewer in the loxoprofen group than in the placebo group (2.12 ± 2.05 days vs. 2.68 ± 2.54 days, $P=.17$). Although severe symptoms were less frequent on days 1, 2, and 3 in the loxoprofen group (27%, 33%, and 29%, respectively) than in the placebo group (32%, 39%, and 37%, respectively), symptoms were more frequent on days 6 through 12 in the loxoprofen group (difference, 5-13%). Adverse events were more common in the loxoprofen group (9.5% vs. 1.1%, $P=.051$).

Conclusion: Loxoprofen did not significantly modify the recovery process of URTIs except for a slight tendency to delay.

Key words: common cold, non-steroidal anti-inflammatory agents, loxoprofen

(DOI: 10.2169/internalmedicine.46.6334)

Introduction

Upper respiratory tract infections (URTIs) are the most frequent acute illness throughout the industrialized world. (1) Although it is associated with an enormous economic burden both in lost productivity and in expenditures for treatment (2), the most appropriate means of management has not yet been thoroughly established. Usage of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) remains controversial. Although NSAIDs would improve acute URTI symp-

oms such as fever and various types of pain, they could adversely affect the healing stage because they suppress the inflammatory reaction which serves to repair infection-induced acute tissue injury (3).

There have been two types of study populations used to evaluate the effectiveness of NSAID treatments for URTIs. One is experimentally infected subjects and the other is naturally infected ones. Studies of the former type yielded conflicting results. Stanley et al (4) and Graham et al (3) reported that the period of viral shedding increased and immune responses were suppressed by use of NSAIDs.

¹ Kyoto University Health Service, Kyoto, ² Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, ³ Department of General Medicine and Clinical Epidemiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, ⁴ Department of Preventive Medicine and Public Health, Keio University School of Medicine, Tokyo, ⁵ Shimane University Health Administration Center Izumo, Izumo, ⁶ Fukushima University Healthcare Center, Fukushima and ⁷ Muroran Institute of Technology Center for Health Administration, Muroran

Received for publication October 26, 2006; Accepted for publication February 4, 2007

Correspondence to Dr. Takashi Kawamura, kawax@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Mogabgab and Pollock (5), Hsia et al (6) and Sperber et al (7, 8) meanwhile, denied influences of NSAIDs on viral shedding. Studies of naturally occurring URTIs (9-12), however, have uniformly focused on the severity of acute symptoms such as nasal discharge, fever, and headache, and little attention has been paid to the duration of illness. Only one study using acetaminophen which has poor anti-inflammatory activity (13) evaluated the duration of symptoms among young children with fever of presumed viral origin (14).

Loxoprofen is a 2-arylpropionic acid anti-inflammatory agent with analgesic and antipyretic properties. It is a pro-drug which hardly causes any gastrointestinal problems, and is widely used in Japan. This randomized controlled trial (RCT) was aimed to investigate whether or not loxoprofen prolongs the recovery process of naturally acquired URTIs.

Methods

A double-blind, randomized, placebo-controlled trial was conducted in 23 outpatient facilities including 11 university student health centers, outpatient departments of five university hospitals and two community hospitals, and five private practices during two consecutive winter seasons: from December 1 through March 31, in both 2002-2003 and 2003-2004.

Study participants

Patients aged 18 through 65 years who exhibited symptoms or signs in both nose (rhinorrhea, nasal congestion, sneezing, or snuffling) and pharynx (sore throat or pharyngeal redness), and visited physicians within 48 hours after symptom onset were enrolled in the study.

Patients who were clinically thought to suffer from influenza, pneumonia of any cause, β -streptococcus tonsillitis, and other bacterial infections were excluded. Patients with serious or confusing underlying diseases including bronchial asthma, peptic ulcer, diabetes mellitus, and allergic rhinitis were also excluded from the study as well as immunocompromised or pregnant persons. Patients who were currently using antibiotics, systemic corticosteroids, immunosuppressants, or anticoagulants, and those who had taken NSAIDs or Chinese herbal medicines as cold remedies within 12 hours were ineligible for the study. Written informed consent was obtained from all participants.

Intervention

Each participant was randomly assigned to one of the two treatment arms, intervention and control, by self-drawing a sealed opaque envelope in the physician's sight. Randomization was based on simple computer-generated random digits and the correspondence between the digits and the group assignment was held in the central, secured location by a third party independent of the investigators until data collection was completed. Thus, allocation was concealed and masked from both patients and physicians.

Patients in the intervention group were to take loxoprofen sodium (60 mg/tablet) and those in the control group were to take a placebo which was quite similar to active loxoprofen in shape and taste. In addition to loxoprofen or its placebo, an antihistamine, mequitazine (3 mg/tablet), were also prescribed for both group members. As a rule, participants were to take one tablet of each drug twice a day for at most seven days. They were allowed to increase the daily dose of drugs up to three tablets per day for each drug or decrease and even discontinue them depending on their symptoms. Participants were forbidden to take any other drugs during the study period. However, when they revisited the doctor due to persistence or progression of symptoms, they were allowed to be prescribed other drugs depending on their complaints.

Follow-up

All subjects were requested to fill in the prescribed form (URTI diary) every day from the onset of illness. This form included various URTI complaints such as nasal symptoms (rhinorrhea and sneezing), pharyngeal symptoms (soreness and scratchiness), bronchial symptoms (cough and phlegm) and general symptoms (feverishness, arthralgia, and malaise). Each symptom was classified into four grades, i.e., "none," "mild," "moderate," and "severe," according to the Jackson method (15). "Mild" was defined as when a subject was unaware of the symptom when he/she was busy with something; "moderate" as when one always felt discomfort; and "severe" as when one experienced difficulties in daily life. When a patient felt feverish, he/she was to measure body temperature and record the highest value of the day. Restriction of daily activities was also graded as "none," "partly restricted," "considerably restricted," and "absent from duty." General physical condition was rated on a one-to-ten scale: from 1 (extremely bad) through 10 (extremely good). Adverse events were asked in an open-ended manner. When remedies other than the study drugs were given to the study patients, physicians were to describe the prescription in the URTI diary.

Participants were required to revisit physicians one week later or after recovery to return the URTI diary and unused drugs. If a patient did not make the second office-visit, his/her physician telephoned to remind him/her.

Statistical analysis

Baseline (at the initial office visit and randomization) characteristics and outcome measures were compared between two groups using Student's *t*-test for continuous variables, and Pearson's chi-square test for categorical variables. When the severity of symptoms was evaluated, each symptom grade was replaced by numerical scores, i.e., "none" as 0, "mild" as 1, "moderate" as 2, and "severe" as 3, and Wilcoxon rank sum test was applied. Proportions of rare events were assessed by Fisher's exact test. Daily changes in illness were compared by fitting repeated binary responses to a generalized linear model (16), where treatment group, day

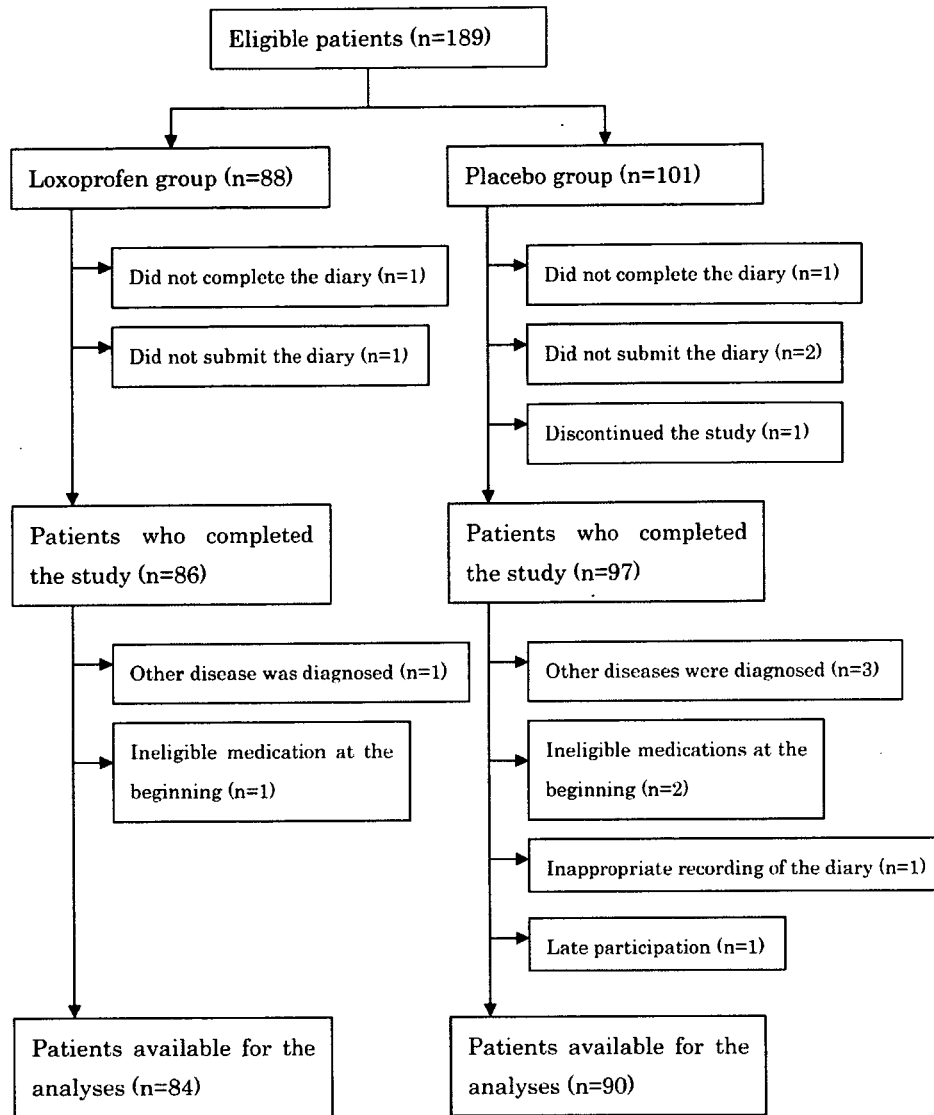


Figure 1. Flowchart of the study.

of illness, and interaction between group and day of illness were included.

The primary outcome measure of this study was the interval in days from the onset of any URTI symptom to the disappearance of all URTI symptoms. The secondary outcomes were severity of URTI symptoms, including general physical condition and performance in daily activities. A power calculation indicated that a sample of 85 per group was necessary to detect a difference in duration of illness between 7 and 8.5 days (7), where power was set at 90%; 2-sided P-value, .05; and standard deviation, 3.0.

Statistical analyses were performed using Stata8.0 (Stata Corporation, College Station, TX, 2003) for univariate analysis and linear regression analysis, and SAS9.1 (SAS Institute, Cary, NC, 2004) for multivariate longitudinal analysis. P values were calculated controlling for possible confounding factors when needed, and the threshold level of .05 was considered statistically significant. All analyses were

on an intention-to-treat basis. This study protocol was approved by the Ethics Committee of Kyoto University Faculty of Medicine (No. 404, October 29, 2002).

Results

Figure 1 is the flow chart of this study. A total of 189 patients were randomly assigned to loxoprofen (n=88) and placebo (n=101) groups. Of the 189 participants, six (two in loxoprofen group and four in placebo group) withdrew from the study, because two patients (one in loxoprofen and another in placebo) did not complete the diary, three patients (one in loxoprofen and the others in placebo) did not return the diary, and one patient (placebo) decided not to continue the study after the allocation. We excluded nine more participants (two in loxoprofen and seven in placebo) from analyses, because influenza or acute sinusitis were diagnosed after allocation (one in loxoprofen and three in pla-

Table 1. Baseline Characteristics of Participants in Loxoprofen and Placebo Groups

	Loxoprofen	Placebo
No. of patients	84	90
Age (years)	29.3 ± 12.5	27.6 ± 11.4
Sex (proportion of men, %)	65.5	65.6
Proportion of smokers (%)	32.8	26.1
Severity of symptoms (scored 0 to 3) *		
Headache	0.71 ± 0.83	0.78 ± 0.89
Rhinorrhea	1.50 ± 0.88	1.67 ± 0.94
Nasal congestion	1.19 ± 0.94	1.35 ± 0.98
Sneezing	0.70 ± 0.72	0.73 ± 0.79
Sore throat	1.51 ± 0.84	1.52 ± 0.95
Scratchiness	1.42 ± 0.91	1.38 ± 0.91
Hoarseness	0.86 ± 0.92	0.82 ± 0.90
Cough	1.15 ± 0.95	1.02 ± 1.00
Phlegm	0.86 ± 0.93	0.73 ± 0.86
Arthralgia/myalgia	0.61 ± 0.86	0.57 ± 0.88
Chilliness	0.65 ± 0.86	0.87 ± 0.89
Feverishness	0.93 ± 0.80	1.12 ± 0.90
General malaise	1.07 ± 0.90	1.20 ± 0.99
Restriction of daily activities (scored 0 to 3) †	0.67 ± 0.84	0.85 ± 0.92
General physical condition (1-to-10 scale)	4.70 ± 1.84	4.99 ± 1.85
Body temperature (°C)	36.9 ± 0.59	36.8 ± 0.70

* "None" was replaced by 0, "mild" by 1, "moderate" by 2, and "severe" by 3.

† "None" was replaced by 0, "partly restricted" by 1, "considerably restricted" by 2, and "absent from one's duty" by 3.

Table 2. Symptoms, Use of Drugs, and Adverse Events in Loxoprofen and Placebo Groups

	Loxoprofen	Placebo	P-values	
			Univariate analysis	Multivariate analysis*
No. of patients	84	90		
Duration of illness (days)	8.94 ± 3.20	8.39 ± 3.39	0.18	0.19
Duration of symptoms (days)				
Headache	2.65 ± 2.92	2.77 ± 3.08	0.93	0.63
Rhinorrhea	6.73 ± 3.78	6.78 ± 3.66	0.93	0.55
Nasal congestion	5.71 ± 3.70	5.89 ± 4.04	0.83	0.86
Sneezing	3.37 ± 3.12	2.56 ± 2.71	0.072	0.096
Sore throat	5.46 ± 3.27	5.00 ± 3.12	0.28	0.28
Scratchiness	5.39 ± 3.42	5.11 ± 3.39	0.64	0.77
Hoarseness	3.89 ± 3.37	3.54 ± 3.31	0.47	0.35
Cough	5.61 ± 4.10	4.99 ± 4.03	0.28	0.31
Phlegm	4.80 ± 3.76	4.02 ± 3.73	0.14	0.16
Arthralgia/myalgia	1.76 ± 2.41	1.97 ± 2.67	0.88	0.34
Chilliness	2.12 ± 2.59	2.40 ± 2.50	0.34	0.37
Feverishness	2.92 ± 2.70	2.96 ± 2.30	0.59	0.70
General malaise	3.58 ± 2.93	3.56 ± 2.89	0.94	0.92
Total symptom score during diseased period	76.4 ± 45.6	75.1 ± 48.0	0.85	0.78
Duration of restriction of daily activities (days)	2.12 ± 2.05	2.68 ± 2.54	0.17	0.17
Average score of general physical condition (1-to-10 scale)	6.35 ± 1.38	6.55 ± 1.32	0.26	0.39
Maximum body temperature (°C)	37.2 ± 0.79	37.2 ± 0.75	0.37	0.68
Consumption of study drugs: Loxoprofen / Placebo (tablets)	11.0 ± 5.01	9.85 ± 4.87	0.12	0.14
Consumption of mequitazine (tablets)	10.1 ± 5.85	9.99 ± 5.01	0.79	0.71
Proportion of patients to whom other drugs were prescribed (%)	10.7	18.9	0.14	0.11
Proportion of patients with adverse events (%)	9.5	1.1	0.015	0.051

* Adjusted for age, sex, smoking, type of the facilities, region, and the year when the patient was included.

cebo), antibiotics or Chinese herbs were used just before the initial visit (one in loxoprofen and two in placebo), recording of the diary was inappropriate (one patient in placebo), and the initial visit was 6 days after the onset (one patient in placebo). Therefore, the remaining 174 patients (84 in loxoprofen and 90 in placebo) were available for the analyses. Table 1 shows the baseline characteristics of the study

patients. There was no significant difference in age, sex, and severity in symptoms at randomization between the groups.

Table 2 summarizes the symptoms. Duration of illness, the number of days from the onset to the complete disappearance of URTI symptoms, was 8.94 ± 3.20 days in the loxoprofen group compared with 8.39 ± 3.39 days in the placebo group (P=.19). While sneezing and productive

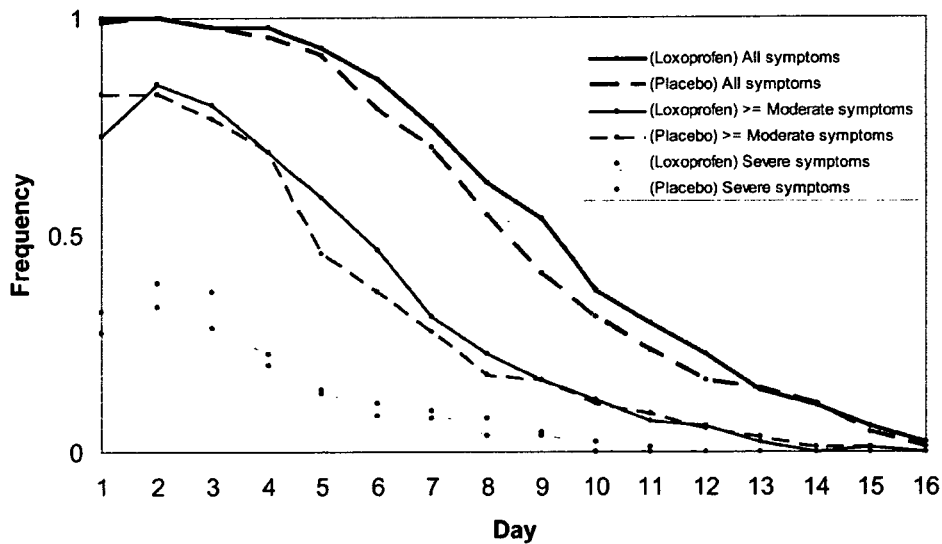


Figure 2. Changes in frequency of overall symptoms according to severity and day of illness.

cough tended to continue longer, days with limited daily activities were fewer in the loxoprofen group than in the placebo group (2.12 ± 2.05 days vs. 2.68 ± 2.54 days, $P=.17$). Total symptom scores during the diseased period were then almost identical between the two treatment groups (76.4 ± 45.6 in the loxoprofen group vs. 75.1 ± 48.0 in the placebo group, $P=.78$).

Figure 2 demonstrates the changes in frequency of overall symptoms according to severity and day of illness. Severe symptoms of any kind were less frequent on days 1, 2, and 3 in the loxoprofen group (27%, 33%, and 29%, respectively) than in the placebo group (32%, 39%, and 37%, respectively) even though statistically insignificant ($P=.49$, $.45$, and $.26$, respectively). Symptoms regardless of grade were, however, more frequent on days 6 through 12 in the loxoprofen group than in the placebo group (difference, 5-13%; $P=.10$ -.46).

Change in frequency of each symptom with the day of illness was examined by the generalized linear model. Moderate or severe sneezing was more frequent in the recovery phase of illness, after day 3, in the loxoprofen group than in the placebo group ($P=.011$), whereas moderate or severe headache, severe arthralgia, and severe chills were less frequent ($P=.001$, $.006$, and $.018$, respectively) in the acute phase of illness, days 1 through day 3.

The number of loxoprofen tablets taken during illness was greater than that of placebo tablets (11.0 ± 5.0 tablets vs. 9.9 ± 4.9 tablets, $P=.14$; Table 2), although the consumption of mequitazine was similar in both groups (10.1 ± 5.9 tablets vs. 10.0 ± 5.0 tablets, $P=.71$). However, other drugs were less likely to be prescribed in the loxoprofen group than in the placebo group (10.7% vs. 18.9%, $P=.11$). Drugs additionally prescribed included acetaminophen (five in loxoprofen and six in placebo), other antihistamines (six in loxoprofen and 10 in placebo), and antitussives (two in loxoprofen and six in placebo). Some NSAIDs were prescribed for two cases of the placebo group. Most of those

drugs were taken after day 8; otherwise, they were used within 2 days of the first visit.

Eight patients in the loxoprofen group (9.5%) complained of several kinds of adverse events including drowsiness (in three) and thirst (in two) during the follow-up period, which was higher than the one patient in the placebo group (1.1%) with drowsiness ($P=.051$, Table 2).

Discussion

This randomized placebo-controlled trial suggested that use of loxoprofen may slow down the recovery from URTIs (by approximately 13 hours) instead of providing some alleviation for severe symptoms and improved performance in daily activities, even though most of the effects were statistically insignificant. It also demonstrated that loxoprofen could increase adverse events.

Several studies on experimentally infected subjects suggested that the period of viral shedding increased by use of NSAIDs (3, 4). These findings are consistent with the theoretical inference from the fact that NSAIDs suppress biological responses essential to eradicate pathogens (13). Studies of naturally occurring URTIs (9-12), however, did not examine the duration of URTI symptoms. An RCT showed that acetaminophen which has little anti-inflammatory activity (13) did not change the duration of fever and other symptoms (14). Thus, this is the first RCT that examined how an NSAID would affect the recovery process of naturally acquired URTIs in clinical settings. Although loxoprofen is not available in most western countries, these findings are still worthwhile due to the frequent use of similar NSAIDs for uncomplicated URTI patients throughout the world.

The loxoprofen-induced clinical effects were smaller than expected. We performed the sample size calculation based on a study of an experimental infection model. In naturally acquired URTIs, there might be a wide variation in their na-

ture and clinical profiles. Another presumable reason is the relatively low dose of loxoprofen used in this study. Although three tablets of loxoprofen had been used daily in the phase-III clinical trial for the Government approval (17), we set the standard dose at two tablets daily in this study to reduce adverse events. This restriction could attenuate the difference of the effects. A study with larger sample size and heavier dosing might yield definite results. However, the present findings should help clinicians and patients make clinical decisions. Then, further studies are not necessarily required from the ethical point of view.

Several patients in the loxoprofen group complained of adverse events during the follow-up period as compared with only one in the placebo group. Most complaints, however, were deemed to be mequitazine induced. There may be some synergistic effects between mequitazine with loxoprofen, although to our knowledge, no report has been made on the pharmacokinetic or pharmacodynamic interaction between co-administered loxoprofen and mequitazine. In any case, clinicians should pay attention to the negative side of the drugs.

Other drugs such as antihistamines and antitussives were prescribed more frequently among the placebo patients than the loxoprofen patients. This fact may be attributed to a lower frequency of symptoms on day 6 through day 12 in the placebo group. However, most of the drugs additionally prescribed were taken after day 8 or just after the initial visit. Therefore, the influence of additional medications would be minimal on day 6 through day 8.

The present study has some admitted limitations. First, all of the outcomes measured were solely based on the patients' self-report, and no objective markers were used except for body temperature. However, their uncertainty was equal in both treatment groups because of the blindness, and comparability was ensured. Second, other diseases such as influenza and some bacterial infections were not completely ruled out, because diagnosis of URTIs was made only by subjective symptoms and physical findings. Since complete diagnosis is costly and even influenza and β -hemolytic streptococcus infections are self-limited in healthy people, symptom/sign-based diagnosis would be acceptable in community healthcare settings. Third, generalizability of our re-

sults was somewhat limited by the strict inclusion/exclusion criteria. Drug effects on patients who develop URTIs two days before or earlier and those with underlying diseases are unknown. In addition, our results are not applicable to children and elderly patients.

In conclusion, loxoprofen, one of the NSAIDs, did not significantly modify the recovery process from URTIs among naturally infected patients except for a slight tendency to delay complete recovery.

The authors thank Ms. Emiko Imanishi, Ms. Hirono Takeda, Ms. Eri Watanabe, and Ms. Yoko Mitsuda for their generous assistance with the study and Sanwa Kagaku Kenkyusho Co., Ltd. who helped the authors manufacture the placebo tablets.

This study was carried out by the Great Cold Investigators-II. Their organizational makeup is as follows. Chairperson: Takashi Kawamura (Kyoto University); Trial coordinator and statistical analyst: Masashi Goto (Kyoto University); Efficacy and safety observer: Takuro Shimbo (International Medical Center of Japan); Consultants: Masahiko Ando (Kyoto University), Kunihiko Matsui (Kumamoto University), Kaoru Shimokata (Nagoya University), and Tsuguya Fukui (St. Luke's International Hospital); Local administrators: Koichi Miyaki (Keio University), Takahiko Nohara (Shimane University), Mitsuru Aono (Kyoto University), Hidetsuna Watanabe (Fukushima University), Isamu Suzuki (Murooran Institute of Technology), Shuichi Saeki (Ehime University), Jun Nagano (Kyushu University), Shuji Miyake (Tokyo Medical and Dental University), Isao Ohsawa (Nagoya University), Hirokazu Sakamoto (Hyogo Prefectural Kakogawa Hospital), Norihiko Iida (Kansai University), Shigeaki Mabuchi (Hongo Clinic), Hideki Nomura (Kanazawa University), Osamu Takahashi (Kyoto University), Yoshikazu Tasaka (Tasaka Clinic), Yoshimitsu Suzuki (Suzuki Clinic), Mitsuhiro Kamei (Kamei Clinic), Kazuhiko Kikawa (Kumamoto University), Hidetoshi Matsubara (Shiga University of Medical Science), Yuko Takahashi (Nara Women's University), Yukihiro Yamaguchi (Kengewakai Ohtemachi Hospital), Takuji Yamada (Sakae Clinic), and Yohei Fukumoto (Yamaguchi University).

Funding: This study was supported in part by Grant-in-aids from Suzuken Memorial Foundation (2002) and Uehara Memorial Foundation (2003), as well as by a Grant for frontier medicine from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (2002-2004).

References

1. Turner RB. Epidemiology, pathogenesis, and treatment of the common cold. *Ann Allergy Asthma Immunol* 78: 531-540, 1997.
2. Kirkpatrick GL. The common cold. *Prim Care* 23: 657-675, 1996.
3. Graham NMH, Burrell CJ, Douglas RM, Debelle P, Davies L. Adverse effects of aspirin, acetaminophen, and ibuprofen on immune function, viral shedding, and clinical status in rhinovirus-infected volunteers. *J Infect Dis* 162: 1277-1282, 1990.
4. Stanley ED, Jackson GG, Panusarn C, Rubenis M, Dirda V. Increased virus shedding with aspirin treatment of rhinovirus infection. *JAMA* 231: 1248-1251, 1975.
5. Mogabgab WJ, Pollock B. Letter: increased virus shedding with aspirin treatment of rhinovirus infection. *JAMA* 235: 801, 1976.
6. Hsia J, Simon GL, Higgins N, Goldstein AL, Hayden FG. Immune modulation by aspirin during experimental rhinovirus colds. *Bull N Y Acad Med* 65: 45-56, 1989.
7. Sperber SJ, Sorrentino JV, Riker DK, Hayden FG. Evaluation of an alpha agonist alone and in combination with a nonsteroidal anti-inflammatory agent in the treatment of experimental rhinovirus colds. *Bull N Y Acad Med* 65: 145-160, 1989.
8. Sperber SJ, Hendley JO, Hayden FG, Riker DK, Sorrentino JV, Gwaltney JM Jr. Effects of naproxen on experimental rhinovirus colds: a randomized, double-blind, controlled trial. *Ann Intern Med* 117: 37-41, 1992.
9. Ebel DL, Shih WJ, Rhymer AR. A multi-center, double-blind randomized study to assess the efficacy and tolerance of sulindac versus placebo in the symptomatic treatment of patients with upper

- respiratory tract infection. *Curr Med Res Opin* 9: 666-675, 1985.
10. Martinez Gallardo F, Lopez Fiesco A, Zamora G. Symptomatic treatment of common cold in children with a new combination of naproxen sodium plus pseudoephedrine hydrochloride: a comparative trial against pseudoephedrine syrup. *Proc West Pharmacol Soc* 37: 157-158, 1994.
 11. Winther B, Mygind N. The therapeutic effectiveness of ibuprofen on the symptoms of naturally acquired common colds. *Am J Rhinol* 15: 239-242, 2001.
 12. Eccles R, Loose I, Jawad M, Nyman L. Effects of acetylsalicylic acid on sore throat pain and other pain symptoms associated with acute upper respiratory tract infection. *Pain Med* 4: 118-124, 2003.
 13. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, Goodman LS, Gilman AG. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. McGraw-Hill, New York, 671-706, 2005.
 14. Kramer MS, Naimark LE, Roberts-Brauer R, McDougall A, Leduc DG. Risks and benefits of paracetamol antipyresis in young children with fever of presumed viral origin. *Lancet* 337: 591-594, 1991.
 15. Jackson GG, Dowling HF, Spiesman IG, Boand AV. Transmission of the common cold to volunteers under controlled conditions: the common cold as a clinical entity. *Arch Intern Med* 101: 267-278, 1958.
 16. Ware JH, Fitzmaurice GM, Laird NM. *Applied longitudinal analysis*. Wiley-Interscience, NJ 2004.
 17. Katsu M, Matsuoka Y, Irimajiri S, et al. Clinical evaluation of loxoprofen sodium (CS-600E) on upper respiratory tract inflammation: a double-blind controlled study in comparison with ibuprofen. *Rinsho Iyaku* 9: 2299-2320, 1993 (in Japanese).

Short Communication

H5N1-Infected Cells in Lung with Diffuse Alveolar Damage in Exudative Phase from a Fatal Case in Vietnam

Nguyen Thanh Liem, Noriko Nakajima¹, Le Phuc Phat^{**}, Yuko Sato¹, Hoang Ngoc Thach, Pham Viet Hung, Luong Thi San, Harutaka Katano¹, Toshio Kumasaka^{1,2}, Teruaki Oka³, Shoji Kawachi⁴, Takeji Matsushita⁴, Tetsutaro Sata¹, Koichiro Kudo⁴ and Kazuo Suzuki^{1,5*}

The National Hospital of Pediatrics, Hanoi, Vietnam; ¹National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640; ²Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113-8421; ³Kanto Central Hospital, Tokyo 158-8531; ⁴International Medical Center of Japan, Tokyo 162-8655; and ⁵Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba 260-8670, Japan

(Received October 23, 2007. Accepted February 4, 2008)

SUMMARY: Necropsied lung tissues of three fatal cases with avian influenza A virus (H5N1) infection in Vietnam were analyzed to detect H5N1 virus-infected cells. Formalin-fixed and paraffin-embedded lung tissue sections showed typical histological features of diffuse alveolar damage (DAD) in all cases. Immunohistochemistry for the influenza A virus nucleoprotein antigen revealed positive signals of bronchiolar and alveolar epithelial cells in only one patient, who exhibited DAD with an exudative phase and died on the 6th day after onset. However, no signal was detected in the other two cases of DAD with a proliferative phase. These patients died on day 16 and day 17 after onset, respectively. H5N1 virus antigens were detected predominantly in epithelial cells in terminal bronchioles and in alveoli, i.e., type I and type II alveolar pneumocytes, and in alveolar macrophages. The pathogenesis of exudative DAD caused by H5N1 infection is discussed.

Highly pathogenic avian influenza A H5N1 virus (H5N1) infection has been reported to cause severe respiratory disease. In 1997, H5N1 was first isolated in Hong Kong from tracheal aspirates of a 3-year-old boy with a fatal respiratory illness (1-3). In 2003, human disease associated with H5N1 re-emerged (4). Since then, the number of confirmed fatal human H5N1-infected cases has increased and now totals approximately 200 cases. These cases occurred, predominantly, in Vietnam, Thailand, and Indonesia (5-9). The histopathological data for H5N1 virus infection in humans were, however, limited (3,4,6,8,10-12), and the pathogenesis of the disease remains unclear. Examination of *ex vivo* infected lung tissues showed that influenza A virus nucleoprotein (InfA-NP) was detected in pneumocytes and in alveolar macrophages (13). Also the pattern of viral attachment in human respiratory tract sections showed that H5N1 attached to the apical cell membrane of bronchiolar cells, type II pneumocytes and alveolar macrophages (14,15). The post-mortem study of H5N1-infected patients has recently been published for the first time (16).

In the present study, we describe the histopathological findings from three fatal cases of H5N1 infection from the National Hospital of Pediatrics in Hanoi, Vietnam. The detailed clinical findings of Case 1 and Case 2 have been described previously (5). On admission, all patients presented with fever, cough, and dyspnea, and H5N1 virus was detected in tracheal fluids by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) before death occurred. The duration of the disease in Case 1, 6 days, was much shorter than in the other two cases (Table 1). Small pieces of lung tissues in the

lower respiratory tract were necropsied and histological and immunohistochemical examinations were carried out on formalin-fixed and paraffin-embedded lung tissues.

The hematoxylin and eosin-stained lung sections of Case 1 demonstrated typical histological features of diffuse alveolar damage (DAD) with an exudative phase (Fig. 1a). Eosinophilic hyaline membrane was found on alveolar ducts and on alveoli. The alveolar space was filled with proteinaceous exudates containing erythrocytes, macrophages, and cell debris. The alveolar septa were thickened by edema with mild inflammatory infiltration, consisting of lymphocytes and macrophages. In Cases 2 and 3, hyaline membrane formation was focally found, and the proliferation of fibroblasts in the interstitial space was marked in comparison to Case 1. Mild interstitial inflammation and proliferation of type II pneumocytes with bizarre and cuboidal features were observed (Fig. 1c), indicating that Cases 2 and 3 were in the proliferative (repair) phase of DAD. Squamous cell metaplasia in the bronchiolar epithelium was also observed (Fig. 1d). Focal accumulation of neutrophils in the alveolar space was found in Case 3, suggesting pulmonary bacterial infection. These histological features were similar to those reported previously in fatal human H5N1 influenza A virus-infected cases (4,8,10,11).

To detect the influenza A virus antigen, the sections were immunostained with an avidin-biotin complex immunoperoxidase method (LSAB2 kit/HRP/DAB; Dako Cytomation, Copenhagen, Denmark) using a mouse monoclonal antibody against InfA-NP (17). Positive signals for InfA-NP were detected in 6 of 6 blocks of lung tissue from Case 1, whereas they were not found in those from Case 2 or 3. The signals were found mainly in alveolar epithelial cells and in interstitial cells (Fig. 1b). The many positive cells were interpreted as type II pneumocytes and/or alveolar macrophages, but the positive cell presented in the inset in Fig. 1b was considered to be a type I pneumocyte based on its histological location and morphology. H5N1-RNA was also detected by real-time RT-

*Corresponding author: Mailing address: Chiba University Graduate School of Medicine, Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan. Tel: +81-43-221-0831, Fax: +81-43-221-0832, E-mail: ksuzuki@faculty.chiba-u.jp

**Deceased after the contribution of this study.

Table 1. Histopathological findings in the lung of H5N1 fatal cases in Vietnam

Case	Age (y)/ Sex	Days from onset to death	Histology in lung sections	RT-PCR for H5N1 (tracheal fluids)	RT-PCR for H5N1 (paraffin-embedded sections of lung)	Immunohistochemistry for InfA-NP antigen and co-localization with cell marker proteins
1 ¹⁾	12/F	6	DAD with an exudative phase, Hyaline membrane formation Hemorrhagic necrosis	Positive	Positive	Positive for InfA-NP antigen, and colocalized with AE1/AE3, EMA, SPA, SPD, CD68, CD34
2 ²⁾	5/M	17	DAD with a proliferative (repair) phase Hyaline membrane formation	Positive	Negative	Negative for InfA-NP antigen
3	4/M	16	DAD with a proliferative (repair) phase Hyaline membrane formation Microabscess	Positive	Negative	Negative for InfA-NP antigen

¹⁾: Patient 1 in Ref (5).

²⁾: Patient 2 in Ref (5).

M, male; F, female; DAD, diffuse alveolar damage; InfA-NP, influenza virus A nucleoprotein; EMA, epithelial membrane antigen; SPA, surfactant protein A; SPD, surfactant protein D.

Table 2. Antibodies used for double immunofluorescence staining

Antigen	Antibody type	Stained cells	Source
cytokeratin (AE1/AE3)	mouse monoclonal	epithelial cell of bronchiole	Dako
epithelial membrane antigen (EMA)	mouse monoclonal	epithelial cell	Dako
surfactant apoprotein A (SPA)	mouse monoclonal	type II alveolar pneumocyte	Dako
surfactant apoprotein D (SPD)	rabbit polyclonal	type II alveolar pneumocyte	Chemicon ¹⁾
CD68 (KP1)	mouse monoclonal	alveolar macrophage	Dako
CD68 (PG-M1)	mouse monoclonal	alveolar macrophage	Dako
CD34	mouse monoclonal	endothelial cell	Immunotech ²⁾
influenza A virus nucleoprotein	mouse monoclonal	influenza A virus infected cell	in-house Ref. (17)
influenza A virus nucleoprotein	rabbit polyclonal	influenza A virus infected cell	in-house Ref. (17)

¹⁾: Chemicon, Temecula, Calif., USA.

²⁾: Immunotech, Marseille, France.

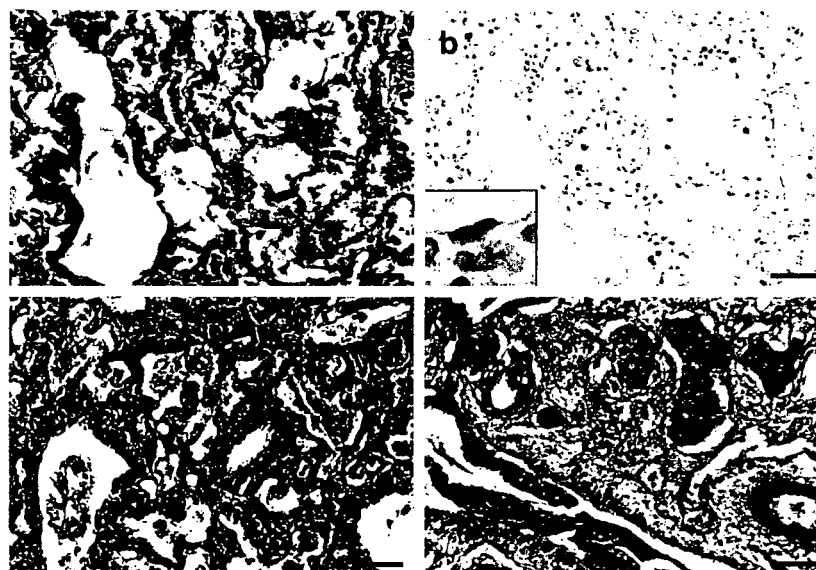


Fig. 1. Hematoxylin and eosin stainings and immunohistochemistry for influenza virus A nucleoprotein (InfA-NP) in Case 1. (a) Hyaline membrane formation is observed on the alveolar walls. In the interstitial space, edema and mild inflammatory cell infiltrates are observed (Case 1). (b) InfA-NP antigens are detected in alveolar epithelial cells and in the interstitial space. InfA-NP-positive, type I pneumocyte is indicated in the inset. (c) Mild interstitial inflammation and proliferation of type II pneumocytes with bizarre and cuboidal features were observed (Case 3). (d) Squamous cell metaplasia in the bronchiolar epithelium was also observed (Case 2). Scale bar = 100 μ m.

PCR in paraffin-embedded lung sections from Case 1 only (18). In DAD with a proliferative phase, as in Cases 2 and 3, viral antigens and nucleic acids were not detected.

To characterize virus-infected cells, confocal laser scanning microscopy was used to visualize double immunofluorescence staining for InfA-NP and for cell-type specific marker pro-

teins of epithelial cells, macrophages, and endothelial cells. The antibodies used are shown in Table 2. Alexa Fluor 568-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, Oreg., USA) and Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (Molecular Probes) were used as secondary antibodies. InfA-NP signals were detected most