

200931005A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

インフルエンザ (H5N1) の死因となる劇症型
ARDS の病態解析と治療法の開発に関する研究

(H19-新興-一般-005)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河内 正 治

平成22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

インフルエンザ (H5N1) の死因となる劇症型
ARDS の病態解析と治療法の開発に関する研究

(H19-新興-一般-005)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河内 正治

平成22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総括・分担研究報告書

インフルエンザ（H5N1）の死因となる劇症型ARDSの病態解析と
治療法の開発に関する研究

研究代表者：所属施設：国立国際医療センター 手術部 部長
氏 名：河内正治

研究分担者

所属施設：宮崎大学医学部生殖発達学講座 小児科学分野 教授

氏 名：布井博幸

所属施設：東邦大学医療センター大森病院 呼吸器内科 教授

氏 名：本間 栄

所属施設：国立国際医療センター麻酔科 医長

氏 名：前原康宏

所属施設：日本赤十字医療センター病理部 医長

氏 名：熊坂利夫

所属施設：熊本大学大学院生命科学研究部微生物学分野 助教

氏 名：岡本竜哉

所属施設：国立国際医療センター麻酔科 技官

氏 名：志賀由佳

所属施設：千葉大学大学院医学研究院 特任教授

氏 名：鈴木和男

所属施設：千葉大学大学院医学研究院 教授

氏 名：中山俊憲

所属施設：国立国際医療センター研究所 国際臨床研究センター長

氏 名：山本健二

所属施設：国立感染症研究所免疫部 室長

氏 名：大島正道

所属施設：東北大学大学院医学系研究科 教授

氏 名：川上和義

所属施設：熊本大学大学院生命科学研究部微生物学分野 教授

氏 名：赤池孝章

所属施設：国立感染症研究所感染病理部 室長

氏 名：永田典代

所属施設：国立感染症研究所感染病理部 主任研究官

氏 名：中島典子

所属施設：横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授

氏 名：荒谷康昭

目 次

I. 総括研究報告書	
インフルエンザ (H5N1) の死因となる劇症型 ARDS の病態解析と治療法の開発に 関する研究	
河内正治	1
II. 分担研究報告書	
1. 臨床班分科会	
1) ARDS 患者での病態解析 -喀痰中 cytochrome c 測定の意義について-	
布井博幸	15
2) ARDS における血清 KL-6、SP-D 値と肺組織内の局在・分布	
本間 栄	19
2. 基礎分科会	
1) インフルエンザ誘導の急性肺障害機構の解析	
鈴木和男	25
2) ARDS における Th1/Th2 バランスの異常	
中山俊憲	33
3) Ventilator-induced lung injury (VILI)モデルマウスの作製とその病態解析 サイトカイン、ケモカインの関与について	
前原康宏	41
4) 劇症型 ARDS の量子ドットによる microRNA 治療に向けて	
山本健二	45
5) インフルエンザウイルス感染に対する宿主側抵抗因子とその発現誘導の解析	
大島正道	49
6) FARDS マウスモデルの確立とその発症病態の解析 そして新たな治療法開発に関する研究	
川上和義	53
7) インフルエンザウイルス肺炎・ARDS における酸化ストレスバイオマーカー	
赤池孝章、岡本竜哉	59
8) ARDS の発症機構および病態モデルを用いた病理学的解析 —SARS-CoV 感染動物における宿主の Th1/Th2 バランスと重症化の関連—	
永田典代	67
9) 鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 感染症の病態解析	
中島典子	71
10) ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス好中球からのケモカイン産生	
荒谷康昭	77
III. 班会議プログラム等資料	81
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	87

インフルエンザ（H5N1）の死因となる劇症型 ARDS の病態解析と

治療法の開発に関する研究（H19-新興-一般-005）

研究代表者 河内正治 国立国際医療センター 手術部 部長

研究要旨：鳥インフルエンザ（H5N1）患者では発症初期から胸部 X 線像上両側浸潤影を呈し、肺全体の急速に進行する DAD（diffuse alveolar damage；びまん性肺胞損傷）が生じて劇症型 ARDS（H5N1-FARDS）が進行する。すなわち、発症初期から劇症型 ARDS が進行することが特徴であり、新型インフルエンザとして流行した場合にはその脅威は極めて大きい。しかし、わが国では、鳥インフルエンザ（H5N1）患者の発生はなく病態を直接解析できないため、1. H5N1-ARDS に特徴的な、多臓器不全を伴わない肺胞の広範囲な破壊を主とした劇症型 ARDS の動物モデルを作成する（感染モデル、非感染モデル）、2. 海外と連携して鳥インフルエンザ（H5N1）症例の臨床データ及び病理学的なデータを得て、ARDS 症例と比較検討する研究が必要である。本研究は日本国内研究機関とベトナム国立病院を連携して、1) 鳥インフルエンザ（H5N1）劇症型 ARDS（H5N1-FARDS）と重症 ARDS を同一施設患者にて比較検討し、鳥インフルエンザ（H5N1）患者病態解明を行う。そのために特に鳥インフルエンザ（H5N1）患者の、BALF、血液、病理標本などを採取し解析する。2) モデル動物と ARDS 患者（H5N1 症例含む）のサイトカインから特定マーカとなる因子を抽出する。3) ARDS（H5N1 症例含む）における好中球、マクロファージ浸潤にかかわるサイトカインと、その調節にかかわる分子の特定をモデルマウスおよび ARDS 患者の BALF および血清から解析する。4) 鳥インフルエンザ（H5N1）による脳症発症の有無を検証し、将来の治療薬開発研究などにつなげることを目的とし、21 年度は、劇症型 ARDS モデルマウスとして感染モデル、器械的損傷モデルに加え、化学的損傷モデルの DAD 作成実験も完了した。特定マーカ因子の推定、ベトナムとの共同研究計画の開始（retrospective study のデータ取得は 19 年度内に終了、Prospective study も 19 年 10 月より開始、20 年末までの解析結果を解析/公表（JID 2009; 200: 510-515）、国内 ARDS 患者研究の成果発表（JJSICM in print）、H5N1 を含むインフルエンザ脳症の病態解析を開始した。また、21 年度にはインフルエンザ A H1pdm によるパンデミックが発生したため、急遽インフルエンザ A H1pdm 重症例の臨床/病理学的解析も行ない報告した（JJID 2010; 63: 67-71）。

A. 研究目的

鳥インフルエンザ (H5N1) においては、重症の劇症型 ARDS による呼吸不全が生じ、非常に短い期間 (9-10 日) で高い死亡率 (約 61%) が特徴である (NEJM 358:3, 2008)。このため、劇症型 ARDS の病態解析と治療法の開発が緊急課題となり、我々も 18 年度特別研究で病態解析と治療法の開発準備をスタートした。

本研究チームは、以下の特色を持って臨床班と基礎班に分かれた研究集団を形成している。①ARDS 専門の臨床家集団、インフルエンザ脳症の専門家、②サイトカインストームを解析するサイトカインラボの基礎部門、③異常好中球および炎症細胞、細胞機能の機能解析の基礎部門、④モデル動物の開発における臨床と基礎とのコラボレーション、⑤ウイルス学の専門家、⑥肺病理学専門家。これらに加えて、ベトナム国ハノイの国立病院との共同研究により、鳥インフルエンザ (H5N1) 感染症に対して、臨床像の確立と新たな治療法の提案が可能になることが本研究班の最終目的である。具体的には研究目的は以下の 8 項目に集約できる。

- 1) 劇症型 ARDS 病態解析のための新たな劇症 ARDS モデル動物の開発。①器械的侵襲モデル、②インフルエンザ感染モデル、③化学的侵襲モデル。
- 2) 超急性期 ARDS 症例での BALF 採取とサイトカインなどの解析。
- 3) 変動するサイトカインの同定・定量を、少量 (15 μ L) 検体による多種サイトカイン同時測定を行うことで可能にする。
- 4) 上記 1) 2) 3) より、鳥インフルエンザ (H5N1) を含む劇症型 ARDS におけ

るマーカーとなる特定因子抽出への足がかりを得る。

- 5) 鳥インフルエンザ (H5N1) を含む劇症型 ARDS で好中球浸潤を誘発するサイトカイン群、関連する免疫細胞の特定。
- 6) インフルエンザ脳症の新たな知見と発生机序の解明への手がかりの獲得。
- 7) 鳥インフルエンザ (AH1 pdm) の重症化例の臨床像/肺病理の解析 (21 年度に追加緊急ミッション)。
- 8) 以上より鳥インフルエンザ (H5N1) の迅速診断法 (特定マーカーの同定) の確立と新たな治療法の提案。

B. 研究方法

各分担者の報告参照、主任者が行った研究については成果の各項に記載。

C. 研究成果

倫理規定について

患者の血液・血清の使用に当たっては、主任研究者の該当部分については、国立国際医療センターの倫理委員会 (以下「委員会」) 規定に従い実施した。患者の検体が派生することが予想される場合には、1) 研究計画を含む具体的な研究計画書、2) 主治医を含む共同研究者との合意文書、3) 患者とのインフォームドコンセントに関する実施計画概要を記載した書式を、予め「委員会」に提出し「委員会」の許可を得て実施した。患者個人情報情報はコード化し、ネットワークでの個人情報交換はしないなど、プライバシー情報の漏洩がないよう万事を期した。分担研究者において実施する場合も同様の手順により行い、所属機関の倫理規定により許可を得て実施した。動物実験に関して

は、動物実験計画書を所属機関の動物委員会（研究分担者においては当該機関の同等委員会）に提出し、その許可を得て動物愛護のもとに研究を実施した。

鳥インフルエンザ（H5N1）は、重症の肺急性呼吸障害（ARDS:急性呼吸窮迫症候群）を短時間で誘発し、短期間で高い死亡率をもたらすことが特徴である。本研究では、1) 鳥インフルエンザ（H5N1）感染を病因とする劇症型 ARDS（H5N1-FARDS）のベトナムでの調査と病態解析（ベトナム、ハノイ国立二病院：国立小児病院、国立熱帯感染研究所）2) ARDS の病態解析（超急性期 ARDS の気管支肺胞洗浄液採取と分析：研究計画）、3) 劇症型 ARDS モデル動物作製、4) サイトカインストーム解析、サイトカイン産生免疫細胞の解析法の確立、5) インフルエンザ（AH1 pdm）の重症化例の臨床像／肺病理の解析（21年度に追加緊急ミッション）をめざし、以下のような成果が得られた。以下に主任者が主たる研究者として行った部分の研究手法と研究成果、ならびに各研究分担者の研究成果の概要をまとめた。

1. 臨床班分科会：劇症型 ARDS の病態解析に関する臨床分科会

臨床班として、(1)ARDS 患者 BALF 液および血漿中のサイトカイン濃度測定（河内）（研究計画書；倫理委員会の承認済み）、(2) ベトナムにおけるインフルエンザ（H5N1）感染症例を含む ARDS 臨床例の解析（prospective study）（ベトナムハノイの国立小児病院、国立熱帯感染症研究所スタッフと共に）及び retrospective study の開始・終了（河内、布井、尾崎、佐藤、病理：熊坂、

中島）、(3)日本の臨床現場における ARDS の現状調査および ALI/ARDS に対する PMX-DHP の有用性（本間）、(4)日本、およびベトナムにおける H5N1 を含むインフルエンザ脳症について調査（布井）、(5) インフルエンザ（AH1 pdm）の重症化例の臨床像／肺病理の解析（21年度に追加緊急ミッション）以上4点を行なった。

1) ARDS 患者 BALF 液および血漿中のサイトカイン濃度測定

（河内正治：国立国際医療センター）

研究方法：国立国際医療センターICU に入室中 ARDS 患者の BALF および血漿中のサイトカイン測定部分について Bio-Plex を用いて測定し解析した。

研究成果：インフルエンザ（H5N1）は、河内は、倫理委員会の承認を得て、5名の ARDS 症例と2名の重症肺疾患患者において17種類サイトカイン同時測定を行った。結果、2例の ARDS ではない呼吸障害患者と比較すると、ARDS 患者5例においては、超急性期 BALF 中のサイトカインのうち GCSE, MCP-1 (MCAF), MIP-1b などの細胞遊走因子に関わるものおよび IL-6 が高値を示したことが特徴的であった。血漿サイトカイン値においてはそれほど顕著な差は認めなかった（図1）。

以上の研究成果は、*J Jap Soc Intensive Care Med* に発表した（Osaki Y, et al. Analysis of cytokine/chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluids from patients with acute respiratory distress syndrome. *J Jpn Soc Intensive Care Med* 2010; 17: 179-184.）。

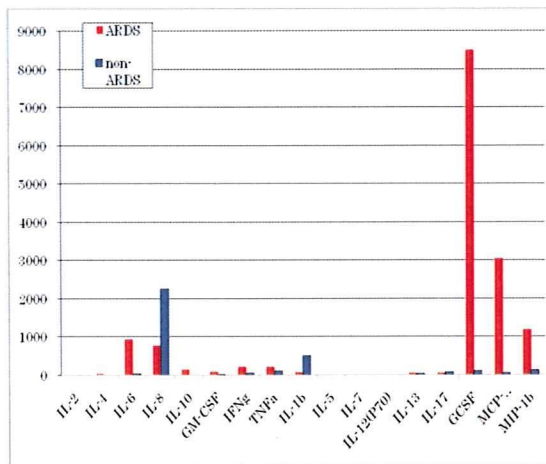


図1 BALF中の cytokine 値 (mean, n=5, 2)

2) ベトナムにおけるインフルエンザ (H5N1) を含む ARDS 臨床例の解析計画 (J-V FARDS)

(河内正治、松下竹次：国立国際医療センター、熊沢利夫：順天堂大学、中島典子：国立感染症研究所、布井博幸：宮崎大学医学部、鈴木和男：千葉大学大学院医学研究院)

研究方法：19年度に作成した、ハノイの国立小児病院 (NHP: National Hospital Pediatrics)、および国立熱帯感染症研究所 (NIITD: National Institute of Infectious Tropical Diseases) との ARDS 共同研究計画書に基づき 20-21 年度は先行的研究 (症例確保) を行った。内容は、①インフルエンザ (H5N1) 感染を病因とする劇症型 ARDS (H5N1-FARDS) の臨床病態の特徴の解明 (河内、松下、布井、鈴木)、②H5N1-FARDS を含む ARDS 症例検体の生体活性物質の測定 (鈴木、布井、岡本、河内)、③病理学的・組織学的解析 (熊坂、中島、鈴木) である。
研究成果：Retrospective study については 2007 年 10 月以前の全 H5N1 感染症例の臨床経過を得た (図 2)。2007 年 10 月以降の症例は Prospective study として症例解析を続

行中である。

2010/2 までに集積した症例データは 65 症例で、13 例の H5N1 症例を含んでいる (解析可能症例数 63 例、うち H5N1 症例 12 例)。2007 年 10 月以降 2008 年 10 月までのハノイの国立小児病院 (NHP: National Hospital Pediatrics) における成果をまとめた結果は以下のごとく集約できる。

1. ハノイ国立小児病院 PICU に入院した ARDS 症例 (H5N1 感染症例を含む) のうち、年齢が一月以上で経過中 P/F 値が 100 未満を呈した全重症 ARDS 症例を先行的に症例集積した。
2. 内訳は H5N1 感染 ARDS 症例 12 例と他病因 ARDS 27 例であった (total:39 例)。
3. 生存率は H5N1 非感染例と比較して H5N1 感染例で有意に低かった (13 日 vs. 32 日) (図 2)。
4. H5N1 感染例では受診時の換気能は正常であり、他の ARDS 症例とは異なる所見であった。
5. H5N1 感染症例で報告されている特徴的な血清検査値は同様であった。1) 白血球数の減少、2) 血小板数の減少、3) 肝トランスアミナーゼ値の上昇。
6. 以上より、H5N1 感染 ARDS の病理診断は ARDS であるが、通常の ARDS とは死亡率など明らかに異なった臨床経過を呈し、われわれはこの差を明らかにするために劇症型 ARDS (Fulminant ARDS) (H5N1-FARDS) と命名した。

ハノイ国立小児病院に受診した全 H5N1 症例は、2009 年 2 月までに 13 例で、平均年齢 6.5 ± 3.8 歳、男：女=9：3 であった。ほぼ半数の 6 例に鳥との直接接触歴が確認された。死亡は 9 例、生存 4 例 (死亡率 70%)

で、死亡までの期間7-16日であった(図3)。以上の研究成果は、*Journal of Infectious Diseases* に発表した (Kawachi S, et al. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome followed by avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children, *JID* 2009; 200: 510-515)。

治療法については、従来のタミフル、ステロイドの標準治療方法に加えた治療法で、ベトナムで使用可能な大量ガンマグロブリン療法 (2g/kg) を実際に鳥インフルエンザ (H5N1) 患者に現地医師団と協議の上開始したが、その後症例が得られなかったために有意差のある効果が得られなかった (図4)。今後さらに症例を集積する必要がある。

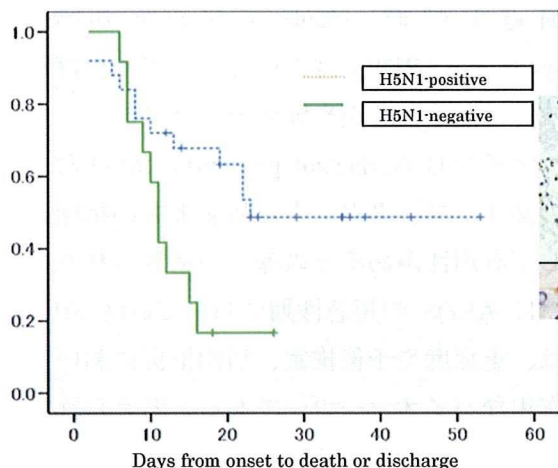


図2 H5N1-FARDS 症例と ARDS 症例の生存率曲線 (Kaplan-Meier) 2008/Mar.)

No.	Gender	Age	H5N1	Contact	Prognosis	P/F	BT onset	Days
1	F	12	Y	U	D	29	39.5	7
2	M	5	Y	U	D	70	39	16
3	M	4	Y	U	A	157	39.5	20
4	M	10	Y	U	D	84	39.5	11
5	F	5	Y	Y	D	29	39.5	7
6	M	4	Y	Y	D	41	39.5	15
7	F	1	Y	Y	D	190	38.5	6
8	M	1.3	Y	N	D	607	39	9
9	M	11	Y	N	D	34	39	11
p1	M	4	Y	Y	D	31	38.5	12
10	F	9	Y	N	A	43	39.5	26
p14	M	7	Y	Y	A	116	38.5	18
p19	M	11	Y	Y	A	52	39.5	10

図3 ハノイ国立小児病院における全 H5N1 症例 (2003/Dec. - 2008/Mar.)

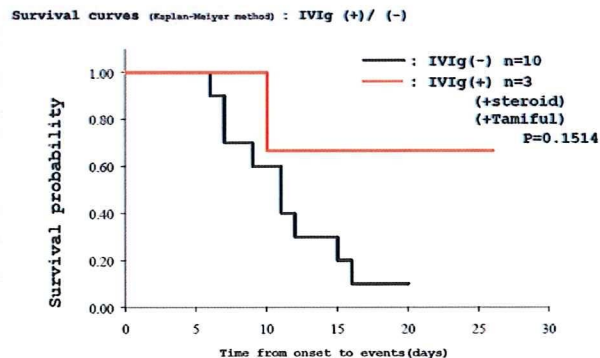


図4 IVIg 療法とその生存曲線

病理学的検索

病理標本: 症例 No.4 はすでに発表した(JJID, 2008, 図5)。

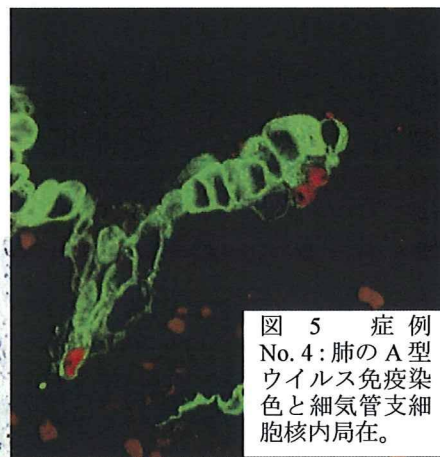


図5 症例 No. 4: 肺の A 型ウイルス免疫染色と細気管支細胞核内局在。

病理標本: 症例 p-1、p-19 は詳しい検索を現在行っている (図6, 7)。

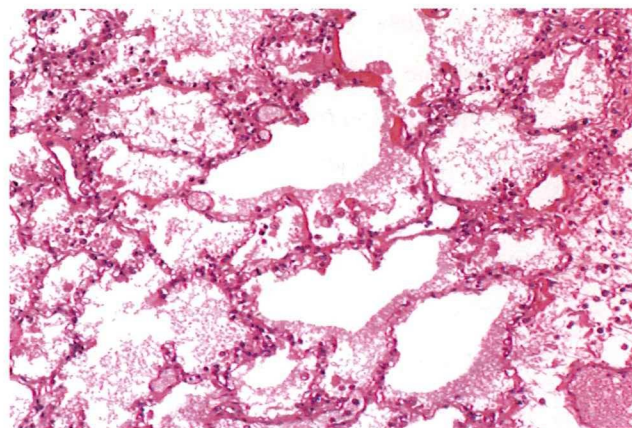


図6 症例 No. p1: 肺の HE 染色

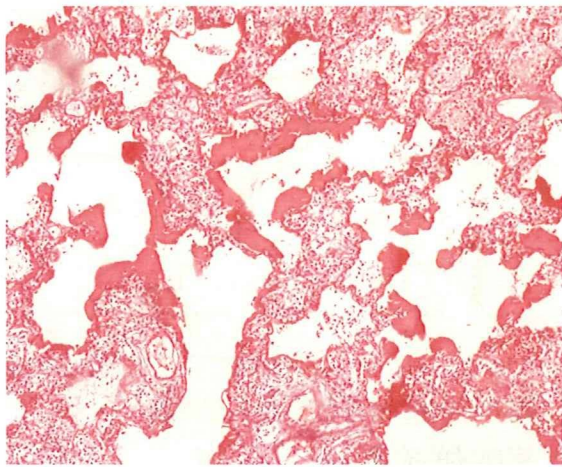


図 7 症例 No. p19 : 肺の HE 染色

3) ARDS 患者での病態解析 - 喀痰中 cytochrome c 測定の意義について -

(布井博幸：宮崎大学医学部、河内正治：国立国際医療センター、鈴木和男：千葉大学大学院医学研究院)

ハノイ国立小児病院で鳥 H5N1 インフルエンザ感染症患者 2 名を含む 50 名の ARDS を呈した患者血清中および喀痰中 cytochrome c 定性的測定を行った。結果：1) 33 名で血中 cytochrome c が測定でき、正常：中等：高値(0-35ng : 35-100 : 100-500/ml)のうち死亡された患者の割合は各々 29% (2/7) : 20% (3/15) : 45%(5/11)で、血中 cytochrome c 高値の患者では死亡率がやや高い傾向にあった。2) 血清 cytochrome c が正常：中等：高値の患者で 23 名の喀痰検査ができ、うち cytochrome c が陽性であった割合は、各々 0%(0/3) : 44% (4/9) : 45%(5/11)で、死亡された割合は 66%(2/3) : 22%(2/9) : 45%(5/11)であった。3) 個々の患者でみると、喀痰中 cytochrome c 高値の患者で死亡率が高い事もなく、むしろ重症の ARDS に関わらず喀痰中 cytochrome c 低値の患者も多かった。4) H5N1 感染による ARDS 合併

一例の血中 cytochrome c は高値であったが、喀痰中 cytochrome c は僅かしか認められず、10 日で死亡していた。結論：喀痰中の cytochrome c 測定については判定基準がない。今後、喀痰採取の際の希釈度合いや採取時期が一定にした詳細な検討が必要であるが、今回の ARDS 患者喀痰中の cytochrome c 測定では ARDS の重症度をあまり反映していなかった。

4) ARDS における血清 KL-6、SP-D 値と肺組織内の局在・分布

(本間 栄、菊地直、杉野 圭史：東邦大学医療センター)

近年、慢性間質性肺炎と同様に急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS)においても、シアル化糖鎖抗原 KL-6 (KL-6)や肺サーファクタントプロテイン D (surfactant protein-D; SP-D)などの肺サーファクタントが病態把握の指標として有用性があるとの報告が散見される。特に ARDS の超急性期において血清 SP-D は、重症度や予後推定、病態把握において有用なバイオマーカーであると考えられている。そこで、本間らを中心に肺炎および敗血症に続発した急性期 ARDS 症例を対象に、KL-6 や SP-D が急性期の臨床的意義を持ちうるか否かを確認するため、血清 KL-6/SP-D 値および肺組織における KL-6/SP-D の局在・分布を慢性安定期の特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)症例をコントロールとして比較検討した。ARDS 群では IPF 群に比べて血清 KL-6 値は低値で、血清 SP-D 値は 64%の例で高値を示し、特に生存例に比べ死亡例でその頻度は高い傾向があった。次に肺組織にお

ける KL-6/SP-D の局在・分布は、IPF 群と同様の局在を示していたが、SP-D 陽性細胞がやや多く分布する傾向にあった。さらに硝子膜では、KL-6 弱陽性、SP-D 陽性を示した。以上の事より、分子量や肺局所での移行性の違い、陽性細胞数の違いなどにより、急性期の病態をより反映するのは KL-6 より SP-D であることが示唆された。

5) インフルエンザ (AH1 pdm) の重症化例の臨床像／肺病理の解析

(河内正治、松下竹次：国立国際医療センター、中島典子：国立感染症研究所、布井博幸：宮崎大学医学部)

21 年度にパンデミックが発生したため、急遽その重症化因子、ウイルス血症の有無などを解析した。病理検査の詳細は分担研究者の中島典子の報告に詳しいが、AH1pdm 感染患者の重症例のうち肺が主に侵されるタイプでは、その病理像は鳥インフルエンザ H5N1 の肺病理像と似ており（報告済み：JJID, 2010）、インフルエンザを原因とする ARDS (FARDS) の治療方法や病態解析をする上で非常に大きな意味を持ち、また社会に貢献する意義が大きいと思われた。ウイルス血症を生じている例は、調べた範囲では一例も認めなかった。

2. 基礎分科会：劇症型 ARDS モデルマウスならびにサイトカイン、免疫機能、病理組織解析

1) インフルエンザ誘導の急性肺障害機構の解析

(鈴木和男、長尾朋和：千葉大学大学院医学研究院)

鈴木らは臨床班と共同で、高病原性鳥イ

ンフルエンザ(H5N1)によって短期間で誘発される劇症型の ARDS (急性呼吸窮迫症候群) の病態に関与する因子の解析システムをハノイに導入した。咽頭ぬぐい液では、H5N1 陽性 ARDS 患者の IL-6sR が、陰性 ARDS 患者のそれよりも有意に高く、逆に IL-8 は低下していた。また、血漿では IL-12p40 および TNFR2 が、陽性患者で陰性患者のそれよりも有意に高く、逆に陰性患者で高値を示した IL-8 は検出限界以下であった。さらに、血漿中の Myeloperoxidase (MPO) は、陽性患者で有意に高値を示した。これらの結果より、IL-6sR が咽頭あるいは気管で、IL-12p40 と TNFR2 が肺腔や血管内皮細胞で産生され、活性化好中球から分泌された MPO とともに肺傷害と関連し、血液中に分布されたものと推定される。

一方、鈴木らは劇症肺炎のマウスモデルを作製し、劇症肺炎に連動したサイトカイン・ケモカインの変動の網羅的解析を施行した。気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) 中の KC、RANTES、MCP-1、IL-6、G-CSF、IL-1 β が順番に経時的に上昇し、それと共に、BALF 中には多数の好中球浸潤が観察された。MPO 欠損マウスでは、サイトカイン・ケモカイン動態はほとんど差がなく、肺の傷害度は弱かった。これらの結果は、KC による好中球の浸潤とその活性化によって、MPO が BAL 中に放出されて傷害の度合いを惹起している可能性が示唆された。以上の結果を総合して、H5N1 陽性 ARDS 患者と劇症肺炎モデルマウスでのサイトカインおよび MPO の活性を比較すると、IL-6、IL-12p40 および TNFR2 と MPO が傷害惹起に関与し、劇症型になっていると推定される。

2) ARDS における Th1/Th2 バランスの異常

(中山俊憲：千葉大学大学院医学研究院、長谷川明洋：山口大学大学院医学系研究科)

ナイーブ CD4T 細胞は Th1 または Th2 タイプのメモリーT 細胞に分化する。Th1 細胞と Th2 細胞は生体防御機構における中心的な役割を担っており、感染症やアレルギーの病態と Th1 と Th2 のバランスには密接な関係があると考えられている。CD69 分子は c-type lectin ファミリーに属する II 型の膜分子で、早期活性化マーカー分子としてリンパ球の活性化の指標として広く用いられている。機能の詳細はこれまであまり明らかにされていないが、炎症局所に浸潤する炎症細胞はすべて CD69 分子を発現していることから、さまざまな炎症反応の誘導・維持に重要な役割を果たしていると考えられる。今年度は、ARDS の実験モデルを用いて ARDS の発症にともなう肺への免疫炎症細胞浸潤のイメージング解析を行うとともに CD69 分子の関与について検討した。また抗 CD69 抗体投与による肺への炎症細胞の浸潤抑制について検討し、急性免疫炎症細胞浸潤を抑制する新規治療法への可能性について検討した。

3) ARDS 病態モデルとしての VILI マウス作製

(前原康宏、河内正治、志賀由佳：国立国際医療センター；戸高玲子、大島正道：国立感染症研究所免疫部；荒谷康昭：横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科；鈴木和男、長尾朋和：千葉大学大学院医学研究院)

前原らは、ARDS の発症機序を解明するために、Ventilator-induced lung injury (VILI)

モデルマウスを作製し、そのモデルマウスによる解析を進めてきた。気管切開下の人工呼吸において、高換気量と低換気量を比較したところ、30 分以上の人工呼吸により肺胞洗浄液(BALF)中の TNF- α 、IL-6、KC、IL-1 β 、G-CSF、IFN- γ 、MCP-1、MIP-1 β など proinflammatory cytokines が高換気量では低換気量に比べ、上昇することを示した。血清中でも高換気量では、BALF での変化と同様に TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、KC が経時的に著明に増加することが認められた。

また、これらの VILI の進展に好中球が重要な役割を果たしていると考えられることから、ミエロペルオキシダーゼ欠損 (MPO-KO)マウスを用い、同様の測定を行ったところ、IL-9、RANTES、IFN- γ の上昇が認められなかった。さらに、好中球エラスターゼ阻害薬としてすでに臨床応用されている、sivelestat Na を投与し効果をみたところ、IL-9、IL-10、RANTES、IFN- γ の上昇が抑制された。

4) 劇症型 ARDS の量子ドットによる microRNA 治療に向けて

(山本健二、星野昭芳：国立国際医療センター研究所臨床研究センター)

山本らは、近年腹腔マクロファージを中心に研究した結果、ケモカインレセプターとそのライガンドが腹腔マクロファージの発生に極めて重要な役目を担っていた事をつきとめた。更にまた高濃度のライガンド暴露により腹腔マクロファージ凝集しは始め、更には腹腔膜上皮細胞を巻き込んで更に凝集し巨大な塊と成る事が認められている。本研究では、肺に於いても同様な現象が起こらないかと考え、マイクロ RNA

治療のターゲットとしての候補遺伝子を探索する可能性を検討した。本年度の研究に於いては、肺胞に存在する肺胞マクロファージについて検討し解析した。

5) インフルエンザウイルス感染に対する宿主側抵抗因子とその発現誘導の解析

(大島正道：国立感染症研究所)

外部からのウイルス感染に対して宿主側ではインターフェロン、MxA, OAS, Fas など感染防御に働く宿主遺伝子が誘導され感染に対抗する。一方インフルエンザウイルスはウイルス蛋白 NS1 を発現し宿主の抵抗因子発現を抑制し細胞を自らの複製の場に改変する。気管支系の細胞株 NCI-H292 はこの戦いに勝ちインフルエンザウイルスを排除できるが肺胞系の細胞株 A549 は排除できず死滅する。大島はジーンチップによる解析で、インフルエンザウイルス感受性の A549 細胞ではウイルス感染誘導遺伝子 (VSG) の発現は抵抗性の NCI-H292 細胞に比べて抑制されることを示し、このことは細胞のウイルス抵抗性因子の誘導発現の相違が一次防御における結果の相違をもたらしていると考えられた。VSG の誘導発現の系を作製してこのメカニズムを解析する。

6) 急性肺障害マウスモデルにおける自然免疫細胞の動態とその役割の解明に関する研究

(川上和義：東北大学医学部)

川上は Natural Killer T (NKT) 細胞の活性化剤である α -galactosylceramide (α -GalCer) でマウスを感作し、24 時間後に再び LPS を気管内投与することで、ARDS の臨床病態に類似した動物モデルを作成することに成

功した。本年度は、このモデルを用いて ARDS の詳細な発症機序の解明を目指して解析を行った。ARDS が誘発される過程で、肺内では interferon (IFN) γ や tumor necrosis factor (TNF) α の著明な産生増加が認められるとともに、これらのサイトカインに対する中和抗体投与によって肺の炎症軽減、死亡率の改善が観察された。さらに、 α -GalCer の代わりに IFN- γ や TNF- α を投与することで、肺の著明な炎症が誘導された。フローサイトメトリー解析では、肺内における IFN- γ 産生は NKT 細胞、Gr-1^{dull}/Ly-6C+ 単球で認められ、TNF- α 産生は Gr-1^{bright}/Ly-6G+ 細胞 (好中球) 及び Gr-1^{dull}/Ly-6C+ 単球で検出された。さらに、抗 Gr-1 抗体を投与することで Gr-1+細胞を除去すると、死亡率の改善、肺の炎症軽減、TNF- α 及び IFN- γ の産生減少が観察された。これらの結果から、このモデルでは、肺内の NKT 細胞、Gr-1^{dull}/Ly-6C+ 単球、Gr-1^{bright}/Ly-6G+ 好中球が炎症性サイトカインの過剰産生を引き起こすことで、ARDS の発症病態に深く関与することが示唆された。また、現在わが国で ARDS の治療薬として用いられているシベレスタットについて、本モデルでの治療効果について検証したところ、肺内での炎症反応の軽減とともに、生存期間の延長効果が認められた。今後はヒトの ARDS においても NKT 細胞を標的とした病態解析や治療法の開発が必要になるものと考えられた。

7) インフルエンザウイルス肺炎・ARDS における酸化ストレスバイオマーカー

(赤池孝章、岡本竜哉：熊本大学大学院生命科学研究部微生物学分野)

一酸化窒素 (NO) と活性酸素種 (ROS) は、感染、炎症、がんといった多彩な疾病に関わっている。赤池らはこれまで、マウスのインフルエンザウイルス肺炎モデルを用いて、NO・ROSによる蛋白質、核酸、脂質といった生体分子の酸化・ニトロ化修飾による酸化ストレスについて解析を行ってきた。特に、蛋白質チロシン残基や核酸塩基グアニンに着目した結果、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の誘導に伴う過剰な NO の産生に依存して、感染局所にて 3-ニトロチロシン (3-NT) や 8-ニトログアニン関連化合物が生成することを、免疫組織染色法や HPLC-電気化学検出 (ECD) 法により証明し、病態との関連性やバイオマーカーとしての有用性について報告してきた。

そこで本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 感染症を含む小児の劇症型 ARDS 症例における血漿蛋白質中の 3-NT の解析を試みた。2008-2009 年にベトナム・ハノイ国立小児病院にて入院加療を受けた ARDS 症例 (27 例・36 検体) を対象とし解析を行ったところ、6 検体において高いレベルの血漿蛋白質 3-NT の生成を認めた。3-NT のレベルは、死亡例に比べ生存例にてより高く、また呼吸不全が重度の例に比べ軽度の例にてより高い傾向がみられた。現在、症例数をさらに増やすとともに、気道洗浄液についても解析を加え、この傾向の検証を行っている。

これまで一般に用いられてきた 3-NT の検出法は、免疫染色法や ELISA 法といった抗体を用いる方法であるが、定量性や特異性に問題があることが指摘されている。HPLC-ECD 法は、抗体に依らない定量的かつ特異的な検出法で、3-NT のバイオマーカー

一としての臨床応用において、有用なツールになり得るものと期待される。

8) ARDS の発症機構および病態モデルを用いた病理学的解析

(永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐多徹太郎：国立感染症研究所)

Th1/Th2 バランスと重症急性肺炎の発症の関連性を解明することを目的とした。重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV) マウス馴化株を用いた感染実験の結果、半年齢、4 週齢の C57BL/6 マウスはいずれも SARS の発症を示さなかった。半年齢の C57BL/6 マウスの肺におけるウイルス量、サイトカイン解析の結果、ウイルス感染後 1-2 日目には炎症性、抑制性サイトカイン等がバランスよく発現していることが明らかとなった。一方で、半年齢の BALB/c マウスでは感染 3 日目までに IL-6、KC 等が持続的な発現を示し、炎症性反応が持続、亢進しており、感染 3 時間後の IFN- γ 投与による免疫調整は SARS 発症を阻止する。これらの結果から、マウスモデルにおいては、Th1 優位な反応は SARS-CoV の排除や感染後の免疫調整作用に重要であり、Th2 側へシフトした個体における感染後の免疫応答の Th1/Th2 バランス異常が SARS 発症の引き金になると結論された。

9) 鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 感染症の病態解析

(中島典子：国立感染症研究所、熊坂利夫：日赤医療センター)

鳥インフルエンザ H5N1 感染症の多くは、劇症型 ARDS を呈し、呼吸不全で死亡するが、その病態については明らかでない。ベ

トナムハノイ国立小児病院 (NHP) との共同研究により H5N1 感染症で死亡した 5 症例の肺組織について病理学的に解析した。2009 年にパンデミックとなったインフルエンザ A/H1N1pdm ウイルス感染症は季節性インフルエンザの場合と異なり、重症肺炎を併発し、ウイルス肺炎により死亡する例がある。我々は本邦で最初のインフルエンザ A/H1N1pdm ウイルス肺炎の剖検例を解析し、鳥インフルエンザ H5N1 感染症および季節性インフルエンザ感染症と比較検討した。

10) 好中球ミエロペルオキシダーゼ欠損による肺炎誘発機構の解析

(荒谷康昭：横浜市立大学)

荒谷は、酵母菌体膜成分であるザイモザンをミエロペルオキシダーゼのノックアウトマウス(MPO-KO マウス)の肺に投与すると、野生型マウスよりも重篤な好中球性肺炎を誘発することを示した。MPO-KO マウスでは、投与後 6 時間における肺中の KC 量と MIP-2 量が一過的に高値であった。これらのケモカインに対する抗体を投与すると、抗体非投与時の症状が著しく軽減した。このことから、ザイモザン投与後の MPO-KO マウスで一過的に産生される KC と MIP-2 が、MPO-KO マウス肺への好中球の集積に関与していることが示された。

D. 考察

インフルエンザ (H5N1) は、季節性のインフルエンザにはない病態を示し、病理解剖所見から肺にはウイルスは検出困難であったが、今回我々はハノイの症例についてウイルスを証明した報告を行った(JJID,

2008)。また、かなり初期段階での死亡例が多数報告されており (Human Pathol 2005, NEJM 2005/2008, CCM 2006)、その病態から ARDS の誘発が主要な病因となり死因となっていることがわかってきている。このことから、インフルエンザ (H5N1) の脅威は極めて大きく、パンデミックを見据えた緊急の行政対応が必至である。

わが国では、インフルエンザ (H5N1) 患者の発生はなく病態を直接解析できないため、1. H5N1-FARDS に特徴的な、多臓器不全を伴わない肺胞の広範囲な破壊を主とした劇症型 ARDS の動物モデルを作製する、2. 海外と連携してインフルエンザ (H5N1) 症例の臨床データ及び病理学的なデータを得て、ARDS 症例と比較検討する研究が必要である。われわれの研究班はこれらの研究を目的として平成 19 年度より結成された。

21 年度においては、劇症型 ARDS モデルマウスとして感染モデル、器械的損傷モデル、化学的損傷モデルの 3 種の作成実験を完了し、病理学的に確認された。特定マーカー因子の推定、ベトナムとの共同研究計画の開始 (retrospective study のデータ取得は 19 年度内に終了、Prospective study も 19 年 10 月より開始、20 年末までの解析結果を解析終了した (JID 2009; 200: 510-515)。国内 ARDS 患者研究の成果も終了し論文として発表した (JJSICM 2010; 17: 179-184)。これらの成果から、とくに鳥インフルエンザ (H5N1) の臨床病態が明確化され、一般的な ARDS との差異が明らかになった。特に、発症時から受診時までにはむしろ通常の ARDS のほうが呼吸機能の障害が大きいにも関わらず、H5N1-FARDS ではその後急速に悪化して死に至ることが証明できたこと

は大きな前進である。ただし、21年度中に鳥インフルエンザ（H5N1）の新規発生症例がハノイの国立病院でなかったため、治療法の検証は未だ不十分である。

この臨床上的新しい知見を踏まえて、21年度はハノイ国立小児病院においてのさらなる Bio-Markers（ニトロ化物質、チトクローム C など）の測定を行なった。また、完成した 3 タイプの動物モデルを用いて、臨床病態から推定されるインフルエンザ（H5N1）に効果あると考えられる治療法について、21年度は治療予備実験に取り掛かった。特に川上の LPS モデルと前原らの VILI モデルで抗炎症薬であるシベレスタットの有効性が検証されつつある。これらの結果から、臨床的には H5N1-FARDS の治療薬としては安全性がすでにある程度確立されている抗炎症薬などが候補に挙げられ、一定の治療効果も得られたが症例数の不足から有意な結果は得られていない。今後さらなる症例集積が必要と考えられる。

E. 結論

インフルエンザ（H5N1）感染による劇症型 ARDS 患者の病態解析とその原因を究明することは将来のパンデミック対策としても重要であり、その目的に向かっては、臨床・基礎医学両面からの緊密な提携をもった研究が不可欠である。本研究は、ベトナムにおけるヒト H5N1 症例とインフルエンザ（H5N1）感染による劇症型 ARDS 病態のモデル動物を使用してサイトカインストームと産生細胞の機能調節機構を明らかにし、インフルエンザ（H5N1）型 ARDS の迅速特異診断および治療法を提案することが最終目標であり、今後もこの目的に沿ったさら

なる研究展開を予定している。

研究協力者および研究アドバイザー

研究分担者以外に、本研究においては以下に述べる施設／研究者に研究協力者およびアドバイザーとして参加していただいた。

1) 臨床分科会

松下竹次（国立国際医療センター）

小林茂人（順天堂大学附属順天堂越谷病院）

Nguyen Duc Hien（NIITD Hanoi）

Nguyen Hong Ha（NIITD Hanoi）

Nguyen Quoc Thai（NIITD Hanoi）

Nguyen Thanh Liem（NHP Hanoi）

Luong Thi San（NHP Hanoi）

Phung Thi Thuy（NHP Hanoi）

2) 基礎分科会

高田正雄（英国 Imperial Collage）

赤川清子（北里研究所）

鳥羽 健（新潟大学）

平橋淳一（東京大学医学部附属病院）

長尾朋和（千葉大院医）

星野昭芳（国立国際医療センター研究所）

丸茂丈志（東京大学医学部附属病院）

富沢一夫（国立国際医療センター）

3) アドバイザー

小川道雄（貝塚市立貝塚病院）

藤倉敏夫（慶応義塾大学病院）

F. 健康危険情報

1. ベトナムでは 2010 年 3 月に入って 3 例のインフルエンザ（H5N1）感染例が報告されている（2 例死亡）。本年に入ってもベトナムにおけるヒトインフルエンザ（H5N1）症例の発症は継続しており、致死率は極めて高く注意が必要である。3 月末現在において、ベトナムの研

究ネットワークから、ヒト-ヒト感染などの従来と異なる新たな脅威となる情報は届いていない。

2. WHO が 2010 年 3 月 12 日に発表したヒトインフルエンザ (H5N1) 症例数は、2003 年以降 488 例となった (289 例死亡、死亡率 59.2%)。2010 年に入ってすでに 20 例 (7 例死亡) が報告されており、昨年より症例数は多い。昨年来エジプトでの発症件数が多いが、エジプトは死亡率が低い (2009 年以降 55 例発症、9 例死亡：死亡率：16.4%)。抗ウイルス薬の早期投与が死亡率引き下げに有効であったとする情報もある。引き続き発症報告はインドネシア、ベトナム、エジプトからで、発症地域の傾向は変わらない。

G. 研究発表

(研究代表者分のみ、研究分担者発表については各項参照)

1. 論文発表

- 1) Yuka Osaki, Yasuhiro Maehara, Atsuko Matsuya, Masaki Sato, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Tomokazu Nagao, Kazuo Suzuki, Shoji Kawachi. Analysis of cytokine/chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluids from patients with acute respiratory distress syndrome. *J Jpn Soc Intensive Care Med* 2010; 17: 179-184.
- 2) Shoji Kawachi, San Luong Thi, Mika Shigematsu, Hiroyuki Furuya, Thuy Phung Thi Bich, Phuc Phan Huu, Hiroyuki Nunoi, Liem Nguyen Thanh, Kazuo Suzuki. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome (FARDS) followed by H5N1 influenza infection in Vietnamese children. *J Infect Dis* 2009; 200: 510-515.
- 3) Takeshi Marumo, Keiichi Hishikawa, Masahiro Yoshikawa, Junichi Hirahashi, Shoji Kawachi, Toshiro Fujita. Histone deacetylase modulates the proinflammatory

and fibrotic changes in tubulointerstitial injury. *Am J Physiol Renal Physiol* (November 11, 2009). doi:10.1152/ajprenal.00400.2009.

- 4) 若菜宣明、本間和弘、田中関郎、秋葉正文、田中寛、日野原千速、河内正治：外科系栄養サポートチーム (NST) における NST 介入の評価項目としての栄養補給ルートの検討. 日本健康医学会雑誌 18(1):11-17, 2009.
 - 5) 河内正治：H5N1 鳥インフルエンザの人の感染最前線. LiSA 16 別冊:72-82, 2009.
 - 6) 河内正治：バイスタンダー CPR (今月の用語). 医療 63(7): 449, 2009.
 - 7) 佐藤正規、前原康宏、尾崎由佳、松谷厚子、志賀由佳、山崎京子、平尾亜衣、河内正治：国立国際医療センターにおけるヒト免疫不全ウイルス感染者手術の動向. 麻酔 58(12):1554-1559, 2009.
 - 8) JJN SPECIAL「治る力」を引き出す 実践！臨床栄養 (p194-199、4-2 心不全). 東口高志編, 2010/1/1, 医学書院, 東京.
 - 9) 重症患者と栄養管理 Q & A 改訂版 (p156-62、IV-29 呼吸障害患者の栄養管理は?). 東口高志編, 2010/2/24, 総合医学社, 東京.
- ##### 2. 学会発表
- 1) R. Sugamata, T. Nagao, H. Dobashi, K. Tomizawa, K. Yamamoto, N. Nakajima, Y. Sato, Y. Aratani, R. Todaka, M. Oshima, T. Sata, K. Kobayashi, S. Kawachi, T. Nakayama, K. Suzuki. Role of neutrophils and myeloperoxidase in lung injury induced by influenza A/H1N1 (PR-8) infection in mice. Annual scientific meeting of the European Society for Clinical Investigation, 24-27 February 2010, Bari, Italy
 - 2) Tomizawa Kazuo, NAGAO Tomokazu, SUGAMATA Ryuichi, ARATANI Yasuaki, KOBAYASHI Kazuo, KAWACHI Shoji, NAKAYAMA Toshinori, SUZUKI Kazuo. Role of neutrophils and myeloperoxidase in lung injury induced by influenza A/H1N1 (PR-8) infection in mice. 第

39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪市, 12月2-4日, 2009.

- 3) 志賀由佳、富澤一夫、長尾朋和、河内正治、中山俊憲、鈴木和男 急性呼吸窮迫症候群モデル-TNF α 、IL-6の先行投与VILIによるびまん性肺障害(DAD)の初期浸潤期の誘導/Early phase of diffuse alveolar damage induced by TNF- α , IL-6 prior to VILI in mice. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪市, 12月2-4日, 2009.
- 4) 河内正治、布井博幸、Phung Thi Bich Thuy、鈴木和男. NHP-ハノイにおけるインフルエンザ(H5N1)症例を含むFARDSにおける治療方針の検討. 第15回MPO研究会, 下野市(栃木県), 11月, 2009.
- 5) 河内正治. 人へ感染したインフルエンザ(H5N1)[鳥インフルエンザ]とパンデミックインフルエンザ(A-H1N1 pdm) -重症症例では肺病変がよく似ている-. 第三回アウトリーチシンポジウム(NIID)、東京都、11月、2009.
- 6) 河内正治. トリインフルエンザ(H5N1)ヒト感染の臨床-ベトナムハノイ国立小児病院の症例から. 緊急特別企画検討会「新型インフルエンザ(A/H1N1)による重症患者の治療体制」(厚生労働省、日本呼吸療法学会共同主催)、東京都、10月、2009.
- 7) 中島典子、佐藤由子、下ノ原望、片野晴隆、熊坂俊夫、Nguyen Thanh Liem、河内正治、鈴木和男、佐多徹太郎. 鳥インフルエンザウイルス(H5N1)感染症の病態の病理学的解析. 第57回日本ウイルス学会、東京都、10月、2009.
- 8) 河内正治. インフルエンザの話 新型インフルエンザと鳥インフルエンザ:ひと感染 update、葉山ハートセンター講演会、三浦郡葉山町(神奈川県)、9月、2009.
- 9) Yasuhiro Maehara, Shoji Kawachi, Tomokazu Nagao, Zou Jun, and Masamichi Oshima, Kazuo Suzuki. Cytokines and chemokines in the early phase of

ventilator-induced lung injury model in mice. 2009 International Anesthesia Research Society Annual Meeting, San Diego, CA, USA, March 14-17, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: 特になし

ARDS 患者での病態解析
-喀痰中 cytochrome c 測定の意義について-

研究分担者 布井博幸 宮崎大学医学部生殖発達学講座 小児科学分野教授
研究協力者：河内正治：国立国際医療センター、鈴木和男：千葉大学大学院医学研究院

研究要旨 ハノイ国立小児病院で H5N1 インフルエンザ感染症患者 2 名を含む 50 名の ARDS を呈した患者血清中および喀痰中 cytochrome c 定性的測定を行った。結果：1) 33 名で血中 cytochrome c が測定でき、正常:中等:高値(0-35ng : 35-100 : 100-500/ml)のうち死亡された患者の割合は各々 29% (2/7) : 20% (3/15) : 45%(5/11)で、血中 cytochrome c 高値の患者では死亡率がやや高い傾向にあった。2) 血清 cytochrome c が正常:中等:高値の患者で 23 名の喀痰検査ができ、うち cytochrome c が陽性であった割合は、各々 0%(0/3): 44% (4/9):45%(5/11)で、死亡された割合は 66%(2/3) : 22%(2/9) : 45%(5/11)であった。個々の患者さんで見ると、3) 喀痰中 cytochrome c 高値の患者で死亡率が高い事もなく、むしろ重症の ARDS に関わらず喀痰中 cytochrome c 低値の患者も多かった。4) H5N1 感染による ARDS 合併一例の血中 cytochrome c は高値であったが、喀痰中 cytochrome c は僅かしか認められず、10 日で死亡されていた。結論：喀痰中の cytochrome c 測定については判定基準がない。今後、喀痰採取の際の希釈度合いや採取時期が一定にした詳細な検討が必要であるが、今回の ARDS 患者喀痰中の cytochrome c 測定では ARDS の重症度をあまり反映していなかった。

A. 研究目的

今回ベトナムのハノイ国立小児病院にて、下記の急性呼吸窮迫症候群（ARDS ; acute respiratory distress syndrome）の定義を満たした患者と H5N1 インフルエンザ感染症で起こってくる劇症 ARDS（FARDS）の比較検討し、その病態解析を試みたので、報告する。ARDS とは、臨床的に重症の状態の患者に突然おこる呼吸不全の一種で、発症前後の状態を特に急性肺傷害（ALI ; acute Lung Injury）と呼んでいる。北米・ヨーロッパコンセンサス会議（NAECC）は、

PaO₂/FiO₂比が 300 以下のものを ALI、200 以下のものを ARDS と定めた。この定義で ALI の患者の 4 人に 1 人が、7 日以内に ARDS へと発展する[1]。臨床的には、頻呼吸と 1 回換気量の低下、肺水腫が起きる。胸部 X 線上は著明な滲出液を認める。病因としては(a)肺性（胃内容物誤嚥、重症肺炎、肺挫傷、刺激性ガス吸入、溺水）や(b)肺外性（敗血症、過剰な輸血・輸液、重症の外傷・火傷）などがあげられている。

この研究ではインフルエンザ脳症の病態解析で用いた cytochrome c を迅速定性でき

るものを準備し、血中および喀痰中 cytochrome c 定性を行い、apoptosis の関与について検討した。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

国立ハノイ小児病院の倫理指針に従い採取された血清および喀痰検体について検査を行った。血中 cytochrome c が測定出来た 33 名の ARDS 患者についてと、血清検査が出来て、さらに喀痰中 cytochrome c 測定出来た 23 名について表 1 に示した。各症例の詳細については河内班長の報告がなされるとことになっているが、今回測定出来た患者の年齢にばらつきが大きいく（平均/標準偏差は 2 歳 1 ヶ月 ± 3 歳 7 ヶ月で 2 ヶ月～14 歳に分布）、かつ病因も大部分が原因不明で、わかっているものでも、細菌感染症からウイルス感染症まで渡っていた。H5N1 および H1N1pdm 感染が確認されている症例が 2 例づつであった。

cytochrome c 測定はこれまでの報告に従って行った。

C. 研究結果

1) 血中 cytochrome c が正常:中等:高値 (0-35ng : 35-100 : 100-500/ml)を示した患者のうち死亡された割合は各々 29%(2/7):20%(3/15) : 45%(5/11)で、血中 cytochrome c 高値の患者では死亡率がやや高い傾向にあった。2) 血清と喀痰中 cytochrome c が測定出来た 23 名の患者で、喀痰 cytochrome c が陽性であった割合は、血中 cytochrome c が正常:中等:高値を示した患者の割合は 0%(0/3): 44%(4/9):45%(5/11)であったが、死亡された割合は 66%(2/3) : 22%(2/9) :

45%(5/11)と差が認められなかった。個々の患者さんで見ると、3) 喀痰中 cytochrome c 高値の患者で死亡率が高い事もなく、むしろ重症の ARDS に関わらず喀痰中 cytochrome c 低値の患者も多かった。4) H5N1 感染による ARDS 合併一例の血中 cytochrome c は高値であったが、喀痰中 cytochrome c は僅かしか認められず、10 日で死亡されていた。

D. 考案

ARDS を呈した患者の血中 cytochrome c は死亡率と比例する傾向にあったが、インフルエンザ脳症と比較すると、低値での呼吸不全による死亡患者がおられた事からも、ARDS を呈した患者血中 cytochrome c は肺局所の状態よりも、基礎疾患または呼吸不全による全身臓器不全に伴う重症度を示すものではないかと考えられた。

実際、血清と喀痰中の cytochrome c を同時に測定出来た 23 名の個々の患者で比較すると、喀痰 cytochrome c が陽性で死亡された割合は 33%(3/9)で、むしろ喀痰中 cytochrome c 低値で死亡された患者 66%(6/9)が多かった。また、H5N1 感染による ARDS 合併症例では、血中 cytochrome c は高値であったが、喀痰中 cytochrome c は僅かしか認められず、10 日で死亡されていた。

以上、今回測定できた範囲の結果では、喀痰中 cytochrome c 測定の意味は病勢および重症との関係を十分見いだせなかった。しかし、喀痰を採取出来た時期が一定出来ず、採取方法（希釈の度合いや採取場所の違いなど）や病因も違うという問題も残っており、今後も検討する必要があると考え