

られた。

E. 結論

血中 cytochrome c 測定は全身の臓器不全を反映していると考えられるが、ARDS という肺局所の重症度とは言えないようである。また喀痰中 cytochrome c 測定については ARDS という特殊な病態で apoptosis が喀痰に反映されるかももう少し詳細な検討が必要である。

表 1 : 血清および喀痰中 cytochrome c 測定結果

P/F 値は経過中記載された最低の値をしまった。FiO₂ と呼吸管理法は記載した P/F 値を示した時に与えられていた酸素濃度と呼吸管理法を記載した

参考文献

- 1) Rubenfeld, GD, Caldwell, E, Peabody, E, et al "Incidence and outcomes

of acute lung injury." *NEJM*. 2005;353,1685-1693

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome and avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. Kawachi S, Luong ST, Shigematsu M, Furuya H, Phung TT, Phan PH, Nunoi H, Nguyen LT, Suzuki K. *J Infect Dis*. 2009; 200 (4) :510-5.

2. 学会発表 なし

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 なし

表 1 症例	血中 cyto-c	咯痰	年齢	入院					
	ng/ml	検査	(ヶ月)	生死	日数	FiO2	P/F	呼吸管理法	病因
1	0-	-	4	A	14	1	43	AC	HIV
2	30	-	2	A	12	1	95	AC	?
3		N	2	D	22	1	30	SIMV	Adeno virus
4		N	2	D	29	1	168	HFO	Enterobactor C
5		N	3	A	43	1	31	HFO	?
6		-	132	A	27	0.5	90	NIPPV	Stap aure
7		-	2	A	12	1	43	HFO	?
8	30-	N	2	D	13	1	54	HFO	Rhinovirus
9	100	-	2.5	D	5	1	76	AC	?
10		N	3	A	38	1	21	SIMV	?
11		-	3	A	32	1	49	AC	?
12		-	84	A	18	0.5	116	mask	H5N1
13		N	2	A	35	0.8	66	SIMV	?
14		N	2	A	22	1	47	AC	?
15		-	3	A	17	1	64	HFO	RS
16		P	60	A	33	1	57	AC	?
17		-	3	A	21	1	73	AC	?
18		-	2	A	21	1	47	AC	?
19		PN	54	A	14	1	22	intubate	?
20		pN	2	A	27	0.9	64	intubate	K.Pneumonia
21		pN	42	A	16	1	65	intuate	?
22		N	36	D	86	1	58	intuate	H1N1
23	100-	N	4	D	6	1	38	HFO	?
24	500	N	168	A	30	1	95	intuated	?
25		pN	132	D	10	1	38	intuated	H5N1
26		N	4	A	41	1	35	SIMV	RS
27		N	7.5	A	37	1	61	intubate	pneumonia X3
28		N	2.5	D	15	1	45	intuated	Acinetobactor
29		N	7	A	19	0.5	106	intubate	?
30		P	24	D	16	1	53	intubate	H3 influ/Adeno
31		PN	4	A	33	1	65	intubate	?
32		PN	4	A	27	1	37	intubate	H. influ
33		PN	36	D	9	1	76	intuate	H1N1
平均			25.5		24.2±		61.4±		
偏差			43.5		15.2		30.2		

ARDS における血清 KL-6、SP-D 値と肺組織内の局在・分布

研究分担者 本間 栄

研究協力者 菊池 直 / 杉野 圭史

東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科

研究要旨 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。そこで今回、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。

A. 研究目的

血清中のシアル化糖鎖抗原 KL-6 (KL-6) および肺サーファクタントプロテイン D (surfactant protein-D; SP-D)は、慢性間質性肺炎の診断や活動性の指標として臨床的に広く応用されているが、近年、急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS) においても臨床的に有用なマーカーとして注目されている。そこで、今回、肺炎および敗血症による ARDS 症例を対象に、血清中の KL-6 や SP-D が病態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 値と予後との関係ならびに肺組織における KL-6/SP-D の局在・分布を明らかにする。

B. 研究方法

当院救命センターに入室し、人工呼吸器管理となった ARDS 症例のうち、発症時に血清 KL-6/SP-D を測定していた 15 症例を対象に、生存例と死亡例に分けて血清 KL-6/SP-D 値を retrospective に検討した。また剖検された ARDS 2 症例において、肺組織における KL-6/SP-D の局在・分布を検討

した。さらに慢性安定期の特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) 52 症例をコントロールとして比較検討した。標本はパラフィンブロックを 4 μ m の厚さで作製し、Hematoxylin-Eosin 染色、Elastic van Gieson 染色を施行し、KL-6 (モノクローナル抗体、Eisai, Japan)、SP-D (モノクローナル抗体、Yamasa, Japan)、D2-40 (モノクローナル抗体、Novocastra)、CD34 (モノクローナル抗体、Novocastra) それぞれの抗体を用いて免疫染色を行なった。

C. 研究結果

ARDS 15 症例の原因として、肺炎による直接障害が 10 例、敗血症による間接障害が 5 例であった。ARDS 発症急性期の血清 KL-6 値は 564 ± 907 U/ml で、15 例中 3 例 (生存 2 例、死亡 1 例) のみで 500 U/ml 以上の高値を示した。これは慢性安定期の IPF 症例 (N=52) の KL-6 値 (1189 ± 653 U/ml) と比較すると有意に低い値であった ($P < 0.05$)。一方、同時期における血清 SP-D 値は 205 ± 164 ng/ml で、14 例中 9 例 (生存 3 例、死亡 6 例) で 110 ng/ml 以上の高値を示した。これは慢性安定期の IPF 症例 (N=52) の SP-D 値 (237 ± 137 ng/ml) と比較すると有意差はみられなかった。また、平均値はそれぞれ生存群 218 ± 234 ng/ml、死亡群 191 ± 59 ng/ml であったが、高値例の割合をみると生存群で 3/7 (42.9%)、死亡群で 6/7 (85.7%) と、死亡群の方が有意に高かった。IPF 症例の慢性安定期の SP-D 値 (237 ± 137 ng/ml) との比較では有意差は認めなかった (表 1)。次に、KL-6/SP-D の肺内局在・分布について検討したところ、IPF の UIP パターン部では、KL-6 は II 型肺胞上皮細胞、細気管支

上皮細胞、Bronchiolization を起こした上皮細胞、腺様化生細胞に強く陽性を示した。特に気腔表層は線状に染色された。また、小葉間隔壁やリンパ管にも陽性所見が顕著であった。一方、SP-D は II 型肺胞上皮細胞に断続的に陽性を示し、強弱を認めた。しかし細気管支上皮細胞や Bronchiolization を起こした上皮細胞、腺様化生細胞では陰性であった。これらの所見と比較して、ARDS の剖検肺は 2 症例ともに、びまん性肺胞障害 (Diffuse Alveolar Damage; DAD) の所見を認め、免疫染色でも両症例はほぼ同様の所見を呈した。IPF 症例で示されたように、KL-6 が気腔表層で線状に陽性を示し、SP-D でも強弱があるものの多くの陽性細胞を認めた。細気管支上皮細胞および Bronchiolization を起こした上皮細胞では KL-6 は陽性を示したが、SP-D は陰性であった。硝子膜では KL-6 は弱陽性、SP-D は陽性であった (表 2)。

D. 考案

ARDS は、敗血症や重症肺炎、多発外傷などの種々の病態を誘因として発症し、肺の急性炎症による肺胞上皮の障害とそれに伴う肺毛細血管内皮の透過性亢進による肺水腫を特徴とし、病理学的には急性期では DAD の所見を呈する。これは間質性肺炎の急性増悪時の所見と類似し、近年では ARDS でも、KL-6 や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。しかし、ARDS の原疾患によって各々が異なった変化を示すなど、診断マーカーとしての有用性には一定の評価は定まっていないのが現状である。

KL-6 は MUC-1 ムチンに属する非分泌型

の巨大な糖蛋白で、分子量は 2000kDa 以上である。MUC-1 は細胞膜直上で切断され可溶性となり、BAL 中、血中で検出され、肺では II 型肺胞上皮細胞、細気管支上皮の管腔側、他に乳腺、膵管で発現する。一方、肺サーファクタント蛋白には、SP-A、SP-B、SP-C、SP-D の 4 種類があり、肺の II 型肺胞上皮細胞やクララ細胞で産生される。SP-B や SP-C は疎水性で、肺胞腔の表面張力低下作用などサーファクタント本来の機能である界面活性能が主な役割であるが、SP-A、SP-D は親水性のリポ蛋白であり、分子量はそれぞれ約 500kDa、600kDa と KL-6 と比較すると小さい。界面活性能は少なく免疫能や生体防御に大きく関与していると言われている。

今回、当院での ARDS 症例における発症時の血清 KL-6/SP-D 値の検討では、KL-6 は 3 例の高値症例を除き、生存例、死亡例の両群に差はなく正常値であった。一方、SP-D はほとんどの症例で高値を示し、異常高値例を除くと生存群に比べ死亡群でやや高い傾向があった。これは、過去の文献的報告とも矛盾しない結果であった。これらの報告をまとめると、①ARDS において BAL 中・血清中 KL-6 値は上昇、②BAL 中 SP-D 値は低下あるいは変動なし、③血清中 SP-D 値は上昇するとされており、ともに重症度との相関があると報告されている。しかしながら発症時もしくは超急性期では、KL-6 値は変動せず、かわりに SP-D 値が上昇するとの報告が多い。これは、KL-6 の分子量がアルブミンと比較しても巨大分子であり、一方、SP-D は比較的小さな分子量で、その差が血中への流入時間や移行性に違いを生じさせていると推測される。さらに今回行

った病理免疫組織学的手法により、ARDS 症例では IPF 症例に比べて、II 型肺胞上皮細胞における SP-D 陽性細胞の割合が高く、硝子膜の多くに SP-D 陽性所見を認めたことも、SP-D が急性期の ARDS 症例における有用な血清マーカーであることを裏付ける所見として考えられる。

E. 結論

IPF のように慢性経過を呈する疾患では、KL-6 は治療効果の指標として有用であるが、肺炎や敗血症などに起因した ARDS の急激な肺障害に対する病態把握、予後の指標としては、サーファクタント蛋白、特に SP-D が有用であった。今後、インフルエンザウイルス (H5N1) 感染による致命的な ARDS 症例においても KL-6 だけでなく SP-D を測定する意義が示唆された。

表 1.

	ARDS			IPF
	全体	生存	死亡	全体
KL-6 (U/ml)	564 ± 907	707 ± 1211	402 ± 389	1189 ± 653
KL-6 上昇/正常	3/12 例	2/6 例	1/6 例	47/5 例
SP-D (ng/ml)	205 ± 164	218 ± 234	191 ± 59	237 ± 137
SP-D 上昇/正常	9/5 例	3/4 例	6/1 例	44/8 例

表 2.

症例	1	2	3
診断	IPF	ARDS	ARDS
主な組織パターン	UIP	DAD	DAD
II型肺胞上皮細胞 (KL-6/SP-D)	+++ / ++	+++ / +++	+++ / +++
細気管支上皮表層 (KL-6/SP-D)	+++ / -	+++ / -	+++ / -
腺様化生 (KL-6/SP-D)	++ / -	++ / -	ND
硝子膜 (KL-6/SP-D)	ND	+ / ++	+ / ++

-- = negative, + = weak, ++ = moderate,

+++ = intense, ND = not detect

G. 研究発表

(当該年度分、当該研究に関するもののみ)

1. 論文発表

1. Sugino K, Kobayashi M, Iwata M, Gocho K, Kaburaki K, Muramatsu Y, Ishida F, Miyazaki T, Sato D, Sakaguchi M, Sano G, Kusano E, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Takagi K, Homma S: Successful treatment with pneumonectomy for pulmonary mycobacterium abscessus infection. Intern Med, 48:459-63, 2009.
2. Sugino K, Kobayashi M, Sato D, Sakaguchi M, Sano G, Kusano E, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Homma S: Marked improvement after long-term sildenafil therapy for secondary pulmonary arterial hypertension: A report of two cases. 東邦医会誌, 56:227-233, 2009.
3. Sekiya K, Sugino K, Hojo T, Ishida H, Sano G, Isobe K, Kimura K, Taniguchi M,

Akiyama K, Homma S: Clinical evaluation of severe asthma attacks requiring tracheal intubation and mechanical ventilation. Allergol Int 58: 289-294, 2009.

4. Sugino K, Gocho K, Ota H, Kobayashi M, Sano G, Isobe K, Takai Y, Shibuya K, Izumi H, Kuraishi Y, Shibuya K, Homma S: Miliary tuberculosis associated with chronic neutrophilic leukemia. Intern Med, 48:1283-1287, 2009.
5. Sakamoto S, Homma S, Miyamoto A, Kurosaki A, Fujii T, Yoshimura K: Cyclosporin A treatment in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Intern Med, 49:109-115, 2010.
6. Isobe K, Hata Y, Sakamoto S, Takai Y, Homma S: Clinical characteristics of acute respiratory deterioration in pulmonary fibrosis associated with lung cancer following anti-cancer therapy. Respirology, 15:88-92, 2010.

2. 学会発表

1. K Sugino, C Hasegawa, G Sano, M Iwata, T Ito, T Arita, K Gocho, K Kaburaki, S Yamakoshi, F Ishida, T Miyazaki, D Sato, S Sakaguchi, E Kusano, K Isobe, S Sakamoto, Y Takai, K Shibuya, K Takagi, S Homma: Pathophysiological study of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis associated with sequelae of pulmonary tuberculosis. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, Japan, 2009.5.
2. Takai Y, Yamashiro Y, Sato D, Sano G, Sugino K, Sakaguchi M, Isobe K, Sakamoto S, Homma S: Cephalometric assessment of craniofacial morphology in Japanese male patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. 2009 APSS USA, 2009.6.
3. K. Suzuki, K. Tomizawa, T. Nagao, S. Kobayashi, E. Muso, W. Yumura, T. Sasaki, O. Hotta, Y. Harabuchi, S. Homma, Y. Yamanishi, M. Nishii, D. Jayne, N. Rasmussen, T. Nakayama, H. Hashimoto: Risk Epitopes of MPO-ANCA in Patients with MPA in Japan. 14 th International Vasculitis & ANCA Workshop, Copenhagen, Denmark, 2009.6.
4. 杉野圭史, 佐野剛, 菊池直, 岩田基秀, 伊藤貴文, 後町杏子, 鏑木教平, 山越志保, 石田文昭, 小林美奈穂, 阪口真之, 佐藤大輔, 草野英美子, 磯部和順,

- 高井雄二郎, 本間 栄: ARDS を合併したレジオネラ肺炎患者の臨床的検討. 第 83 回日本感染症学会総会, 東京, 2009.4 月.
5. 杉野圭史, 佐野 剛, 阪口真之, 佐藤大輔, 磯部和順, 坂本 晋, 高井雄二郎, 舘田一博, 山口恵三, 本間 栄: レジオネラ市中肺炎患者の臨床像ならびに予後の検討. 第 57 回日本化学療法学会総会, 東京, 2009.6 月.
 6. 秦 美暢, 草野英美子, 阪口真之, 笹本修一, 田巻一義, 高橋祥司, 佐藤史朋, 鏑木教平, 菊池 直, 杉野圭史, 坂本 晋, 磯部和順, 本間 栄, 中山晴雄, 渋谷和俊, 高木啓吾: 術中の高濃度酸素暴露回避と低侵襲に留意しながらも術後急性増悪を生じた 1 例. 第 79 回間質性肺疾患研究会, 東京, 2009.6 月.
 7. 菊地 直, 舘田一博, 山口恵三, 阪口真之, 佐野 剛, 草野英美子, 磯部和順, 坂本 晋, 高井雄二郎, 本間 栄: AZM 持続投与による VAP 発症予防効果についての検討. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2009.6 月.
 8. 磯部和順, 秦 美暢, 阪口真之, 鏑木教平, 佐野 剛, 杉野圭史, 坂本 晋, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 高木啓吾, 本間 栄: UIP 合併肺癌における治療後急性増悪の検討. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2009.6 月.
 9. 山越志保, 草野英美子, 岩田基秀, 阪口真之, 伊藤貴文, 鏑木教平, 後町杏子, 石田文昭, 佐藤大輔, 佐野 剛, 磯部和順, 坂本 晋, 高井雄二郎, 本間 栄, 伊藤金次, 石川壽晴, 植草利公, 黒崎敦子: 画像所見と解離を認めた急速進行型の間質性肺炎の一剖検例. 第 185 回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2009.7 月.
 10. 杉野圭史, 山越志保, 伊藤貴文, 和田知博, 鏑木教平, 後町杏子, 太田宏樹, 岩田基秀, 石田文昭, 村松陽子, 佐藤大輔, 阪口真之, 佐藤敬太, 佐野 剛, 磯部和順, 坂本 晋, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 植草利公, 本間 栄: 血清 KL-6 および SP-D が異常高値を示した間質性肺炎の臨床病理学的検討. 第 80 回間質性肺疾患研究会, 東京, 2009.11 月.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

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）
分担研究報告書

インフルエンザ誘導の急性肺障害機構の解析

研究分担者：鈴木和男 千葉大学大学院医学研究院 特任教授
研究協力者：長尾朋和 千葉大学大学院医学研究院 特任教員

協力者：

国立感染症・免疫部：小林和夫、山本紀一、大島正道、戸高玲子

国立感染症・感染病理部：佐多徹太郎、中島典子、佐藤由子

横浜市大・院生命：荒谷康昭

国立国際医療センター 麻酔科：河内正治、富澤一夫

千葉大院医 免疫発生学：中山俊憲、菅又龍一

宮崎大・医：布井博幸

国立小児病院（ハノイ）：Thuy T. B. Phung, San T. Luong, Liem T. Nguyen

研究要旨：高病原性トリインフルエンザ(H5N1)によって短期間で誘発される劇症型の急性呼吸障害（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。その解析の結果、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。これらの結果は、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、この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・ケモカインの変動をその網羅的解析から、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。

A. 研究目的

インフルエンザ(H5N1)は、ベトナムやインドネシアをはじめ、東南アジアを中心にひろがり世界の脅威になっている。インフルエンザ(H5N1)は、これまでのインフルエンザにはない病態を示し、タイをはじめとするインフルエンザ(H5N1)陽性肺炎患者で死亡した病理解剖所見から肺にはウイルスは検出できず、極度のARDSによって呼吸不全になったことが報告されている(Human Pathol, 2005)。また、ベトナムのケースでは、かなり初期段階の病態での死亡例がある(NEJM, 2005)。また、ごく最近われわれの病理解析から肺胞上皮細胞と血管内皮細胞に H5N1 ウイルスを確認している(Jpn J Infect. Dis, 2008)。その病態から、肺でのウイルス増殖が関与して、劇症型のARDSが誘発されたことが主な死因となっていると推定される。また、死因は、多臓器不全というより呼吸障害によっていることがあきらかになっていることを我々が報告した(JID, 2009)。これらの事実は、インフルエンザ(H5N1)感染によって病初期の急速に誘導されるARDS進行には、季節インフルエンザとは異なり、爆発的なサイトカインストームに続く好中球・マクロファージ浸潤による呼吸障害の進展を類推させる。

本疾患の呼吸障害の発症機構とその治療薬開発には、インフルエンザ誘導のモデルマウスの作製が必須であるため、昨年度までに、これらの呼吸障害を惹起するモデルマウスを作製、解析してきた。インフルエンザ H5N1 ウイルスを使用した呼吸障害モデルの作製を検討したが、H5N1 ウイルスの使用を許諾しない(関係部署談)とのことから、PR8 株インフルエンザウイルスにより劇症型を作製した。劇症呼吸不全を誘発する因子としてサイトカインス

トームとその産生の経時変化を検討した。

本年度は、昨年度にひきつづき、ハノイの国立病院(国立熱帯病・感染症研究所、国立小児病院)を訪問し、その臨床データの解析とともに、PR8 株により、劇症型呼吸不全モデル動物での肺組織の病理学的検索をし、気管支洗浄液(BALF)中の細胞の増加をしらべ、サイトカイン・ケモカインの網羅的解析により、経時的な動態を解析することを目的とした。また、これまでに因子解析法をハノイ国立小児病院への技術移転を確立し、11種類のサイトカイン・ケモカイン、肺障害マーカのELISA測定および好中球顆粒酵素で傷害活性を示す酵素の測定系を導入した。また現地で測定した肺傷害因子の分析と、臨床像との相関について解析し、劇症モデルマウスでの解析結果と考察し、今後の治療法の開発につなげることとした。

B. 研究方法

1) 劇症型 ARDS の発症機構：トリインフルエンザ H5N1 患者(ハノイ)の重症化因子の解析

(1) システムの導入、測定法をおよび解析法の指導：H5N1 感染による劇症型 ARDS(FARDS)に関わる因子を、通常のARDSの病態と比較するため、まず、ハノイ・国立小児病院に11種類のサイトカインおよび肺障害マーカのELISA測定および好中球傷害酵素を測定するシステムの導入と測定法をおよび解析法について現地スタッフを指導した。

(2) 患者血漿および咽頭洗浄液内の11種類のサイトカインおよび肺障害マーカのELISA測定：患者血漿および咽頭洗浄液内の11種類のサイトカインおよび肺障害マーカのELISA測定および好中球傷害酵素を測定し、ハノイの国立小児病院および千葉大学医学研究院にて、ト

リインフルエンザウイルス(H5N1)感染者と通常の ARDS の病態とを比較・解析した。

2) PR-8 株感染マウスの重症化因子の解析

インフルエンザ PR-8 株 0.75-3.3LD₅₀ をマウスネブタール麻酔下、鼻腔から Balb/c(8 週齢、メス)に、投与・感染させ、感染 1-7 日間の経時的な肺組織の変化、BALF 中の細胞の増加、サイトカイン産生の変化を網羅的に定量した。

3) 肺組織病変の経時的变化の観察

感染後毎日、ネブタールにて安楽殺のマウスより肺組織を摘出し、ホルマリン固定・パラフィンブロックを、HE 染色および A 型インフルエンザ抗体により肺組織でのインフルエンザの増殖を調べた。BALF 中の細胞の経時的变化の観察は、感染後毎日、ネブタール麻酔下、PBS 1 mL にて BALF を採取し、サイトスピンにより細胞をスライドグラスに収集し、Dif-quick にて固定染色し、顕微鏡により細胞種の変化を観察した。

4) 血漿および BALF 中のサイトカイン・ケモカインの解析

感染後経時的に、ネブタールにて安楽殺し、心臓より採取した血漿および BALF を Triton X-100 でウイルスを不活性化し、その 15 μL を用いて、Bio-Plex™ Assays (Bio-RAD) により、23 種類サイトカイン・ケモカイン (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, KC, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, MCP-1, MIP-1β, TNF-α, RANTES など) を同時に測定・解析した。

C. 研究結果

本年度は、トリインフルエンザ H5N1 患者 (ハノイ) の重症化因子の解析を行い、作製した劇

症型呼吸不全モデル動物による肺組織の病理所見、BALF 中の細胞の増加と網羅的なサイトカイン産生と比較した。

1) 劇症型 ARDS の発症機構：トリインフルエンザ H5N1 患者 (ハノイ) の重症化因子の解析

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 (図 1)。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、IL-6, IL-12p70 と IL-6sR がやや高い傾向を示した (図 2)。しかし、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 (図 3) が、咽頭ぬぐい液では両者に差はなかった。

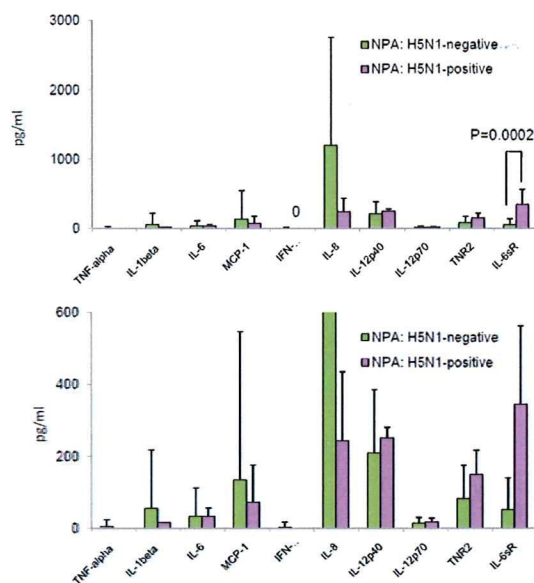


図 1. H5N1 陽性および陰性の ARDS 患者咽頭ぬぐい液中のサイトカイン・ケモカインの濃度の比較

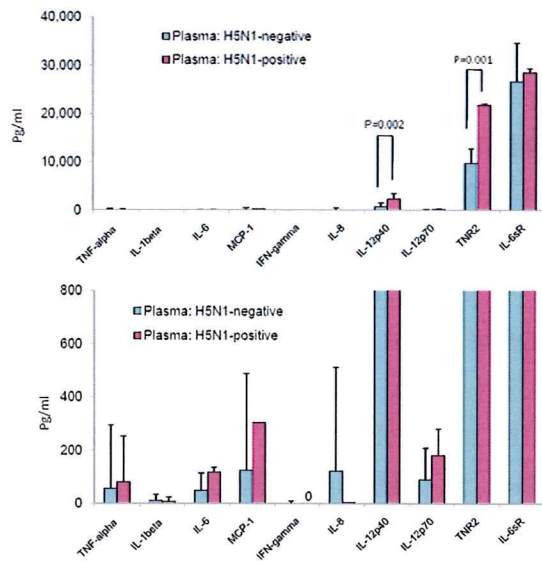


図2. H5N1 陽性および陰性の ARDS 患者血漿中のサイトカイン・ケモカインの濃度の比較

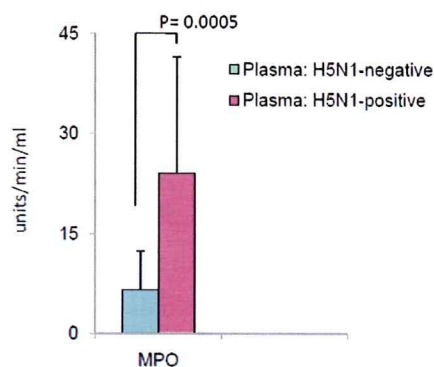


図3. H5N1 陽性および陰性の ARDS 患者血漿中の MPO 活性の比較

2) マウスを用いた PR-8 株感染による劇症型モデルの解析

H5N1 患者の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変動を解析した。BALF 中のサイトカイン・ケモカインの網羅的解析から、KC、RANTES、MCP-1、IL-6、G-CSF、IL-1 β が順番に経時的に上昇(図4)し、それと共に、BALF 中には多数の好中球浸潤が観察された。肺組織は、好中球を主体とする多数の浸潤細胞と細気管支破壊像が観

また、BALF 中の MPO 活性はそれと連動して高値を示した(図5)。

察された。しかし、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 Wild と有意な差が認められたのは、MIP-1 β で、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。

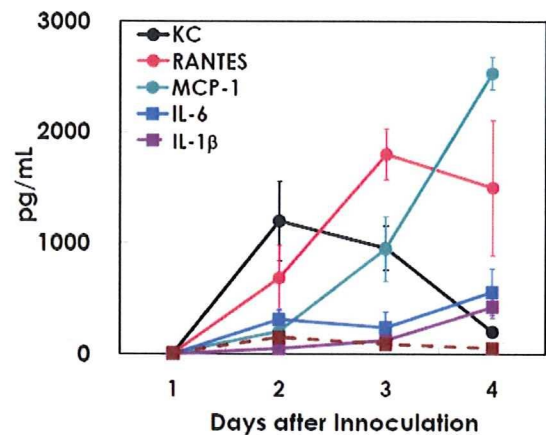


図4. BALF 中のサイトカイン・ケモカインの順を追った経時変化

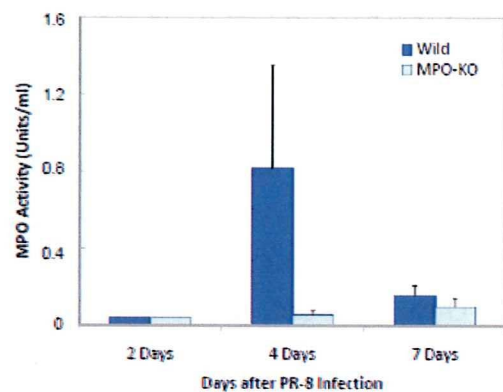


図5. 感染後おマウス BALF 中の MPO 活性の経時変化

D. 考察

1) 劇症型 ARDS の発症機構：トリインフルエンザ H5N1 患者（ハノイ）の重症化因子の解析

ベトナム・ハノイの国立小児病院との共同研究により、トリインフルエンザウイルス (H5N1) の感染患者の病態と劇症化の因子について明らかにし、マウス感染モデルの解析により誘発されるサイトカインと好中球傷害酵素と患者の重症化因子と比較した。

2) マウスを用いた PR-8 株感染による劇症型モデルの解析

一方、重症化の解明と治療法の開発のために、インフルエンザ感染モデルマウスを開発し、重症化時の肺傷害機構にかかわる因子を明らかにして、患者の重症化への対応に応用し、日本国内で発生するインフルエンザによる重症化症化に対応できる可能性が広がった。

マウスの解析から、BALF 中への浸潤細胞は、好中球を主体とする浸潤細胞は3日以後から増加し、その前日に、好中球走化性ケモカイン KC の爆発的産生が誘導されていおり、それと平行してウイルスの増殖と組織破壊が進展していることが推定された。BALF 中の KC、RANTES、MCP-1、IL-6、G-CSF、IL-1 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。肺組織は、好中球を主体とする多数の浸潤細胞と細気管支破壊像が観察された。しかし、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 Wild と有意な差が認められたのは、MIP-1 β で、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。これらの結果から、劇症型 ARDS のモデルの構築とその病態におけるサイトカイン発

現およびそれに関連した分子の発現状態を解析することができた。

トリインフルエンザウイルス (H5N1) 感染患者の解析：重症化の因子について、肺障害マーカーの ELISA 測定および好中球顆粒酵素で傷害活性を示す酵素の測定系を導入し、臨床像との相関を比較検討した結果、H5N1 陽性 ARDS 患者と劇症肺炎モデルマウスのサイトカインおよび MPO の活性の比較から、IL-6、IL-12p40 および TNFR2 と MPO が傷害惹起に関与して劇症型になっていると推定される。

E. 結論

本年度（終年度）の目標は達成できた。

1) トリインフルエンザウイルス (H5N1) 感染患者の解析：重症化の因子について、肺障害マーカーの ELISA 測定および好中球顆粒酵素で傷害活性を示す酵素の測定系を導入し、臨床像との相関を解析できた。

2) 劇症型ウイルス感染モデルマウスでの解析：劇症型 ARDS (FARDS) の発症機序解明と治療法を開発するため、感染誘導の劇症型肺傷害モデルマウスを作製し、肺傷害機構にかかわる因子を明らかにした。

3) トリインフルエンザウイルス (H5N1) 感染患者の因子と劇症型ウイルス感染モデルマウスの因子の解析比較：劇症型 ARDS (FARDS) の発症機序解明と治療マウス感染モデルの解析により誘発されるサイトカインと好中球傷害酵素と患者の重症化因子と比較し、H5N1 陽性 ARDS 患者と劇症肺炎モデルマウスのサイトカインおよび MPO の活性の比較から、**IL-6、IL-12p40 および TNFR2 と MPO が傷害惹起に関与して劇症型になっていると推定される。**

F. 研究発表

論文発表

1. Yasuda H, Suzuki K. Measures against transmission of pandemic H1N1 influenza in Japan in 2009: simulation model. *Euro Surveill.* 2009;14(44): pii=19385. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19385>
 2. Masumitsu Hatta, Natsuo Yamamoto, Akiko Miyazato, Kiwamu Nakamura, Ken Inden, Tetsuji Aoyagi, Kazuo Suzuki, Mitsuo Kaku, Kazuyoshi Kawakami. Early production of tumor necrosis factor- α by Gr-1+CD11b+ mononuclear cells and its role in the host defense to pneumococcal infection in lungs. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; in press
 3. Akihiro Hasegawa, Katsuhiko Hayashi, Hiroyuki Kishimoto, Meng Yang, Soichi Tofukuji, Kazuo Suzuki, Hiroshi Nakajima, Robert Hoffman, Mutsunori Shirai, Toshinori Nakayama. Color-coded real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:461-8.
 4. Miura NN, Komai M, Adachi Y, Osada N, Kameoka Y, Suzuki K, Ohno N. IL-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice as assessed by comparison with Bruton's tyrosine kinase-deficient CBA/N mice. *J Immunol.* 183(5):3417-24 (2009).
 5. Hirahashi J, Hishikawa K, Kaname S, Tsuboi N, Wang Y, Simon DI, Stavrakis G, Shimosawa T, Xiao L, Nagahama Y, Suzuki K, Fujita T, Mayadas TN. *Circulation.* 120(13):1255-65 (2009).
 6. Yuka Osaki, Yasuhiro Maehara, Masaki Sato, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Tomokazu Nagao, Kazuo Suzuki, Shoji Kawachi. Analysis of cytokines in broncho-alveolar lavage fluids of patients with ARDS: Increase of IL-6, G-CSF, MCP-1, MIP-1 β . *JJICM(Journal of Japanese Society of Intensive Care.* in press 2009.
 7. Shoji Kawachi, San Thi Luong, Mika Shigematsu, Hiroyuki Furuya, Thuy Thi Bich Phung, Phuc Huu Phan, Hiroyuki Nunoi, Liem Thanh Nguyen, Kazuo Suzuki. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome followed by avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. *J. Infectious Dis.* 2009; 200: 510-515.
 8. Tomoko Nozu, Mitsuko Kondo, Kazuo Suzuki, Jun Tamaoki, Atsushi Nagai. A Comparison of the Clinical Features of ANCA-Positive and ANCA-Negative Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients. *Respiration* 2009;77:407-415.
- 総説 (邦文)
1. 鈴木和男 インフルエンザ感染と免疫応答免疫学事典(朝倉書店:桂監修) in press
 2. 長尾朋和、鈴木和男 MPO-ANCA 関連血
 3. 鈴木和男 ナノ粒子の知恵の塊-ドラッグデリバリーシステムのイメージング 技術評論社刊「光る生き物—ここまで進んだバイオイメージング技術」pp140-153, 2009年11月1日刊行
 4. 鈴木和男、安田英典 「わが国の新型インフルエンザの影響予測とその対策」, インフルエンザ(メディカルレビュー社), 10, 143-149, (2009.4)
 5. 鈴木和男 特集—感染症防御・慢性疾患の初期機構—総論 「好中球の機能」「細胞」 41: 48-50, 2009年2月、ニューサイエンス社
- 学会発表
- 【国内学会】
1. 長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、中島典子、佐藤由子、荒谷康昭、鄒軍、戸高玲子、大島正道、佐多徹太郎、小林和夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男 インフルエンザウイルス 感染誘導による劇症型 ARDS の発症機構の解析第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2009年6月26-27日
 2. 鄒軍、長尾朋和、志賀由佳、前原康宏、土橋英紀、河内正治、中山俊憲、鈴木和男 ARDS 病態モデルの肺組織傷害初期に産生する TNF- α と連動するサイトカイン・ケモカイン IL-6 と KC 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、京都、2009年6月26-27日
 3. 鈴木和男 感染症初期の好中球の役割と慢性炎症疾患「平成 21 年度東京麻酔専門医会リフレッシュコース」平成 21 年 7 月 25 日(土)、26 日(日)、東京
 4. 長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、中島典子、佐藤由子、富澤一夫、荒谷康昭、鄒軍、戸高玲子、大島正道、佐多徹太郎、小林和夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男 インフルエンザウイルス PR-8(H1N1)感染による肺傷害機構の解析 20 回日本生体防御学会学術集会、東京、2009年7月25-26日
 5. 菅又龍一、長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、富澤一夫、中島典子、佐藤由子、荒谷康昭、鄒軍、戸高玲子、大島正道、佐多徹太郎、小林和夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男 劇症型インフルエンザ肺炎の発症機構に關与する MPO の解析. 第 15 回 MPO 研究会、2009年11月7-8日、栃木
 6. 鈴木和男 好中球研究の新たな展開. 第 15

- 回 MPO 研究会、2009 年 11 月 7-8 日、栃木
7. 鈴木和男 トリインフルエンザ H5N1 の病態と現状. 広島小児感染症フォーラム. 10 月 22 日、広島
 8. 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学術集会、2009 年 10 月 25 日~27 日、東京
 9. 鈴木和男 新型インフルエンザ対応の最前線「成田空港-千葉・東京」アウトリーチ. 11 月 14 日、東京
 10. Kazuo Tomizawa, Tomokazu Nagao, Ryuichi Sugamata, Ki-ichi Yamamoto, Yasuaki Aratani, Reiko Todaka, Masamichi Oshima, Kazuo Kobayashi, Shoji Kawachi, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Role of Neutrophils and Myeloperoxidase in Lung Injury induced by Influenza A/H1N1 (PR-8) Infection in Mice. 39 回日本免疫学会, 12 月 2-4 日、大阪
 11. 志賀由佳, 富澤一夫, 長尾朋和, シュゲン, 前原康宏, 河内正治, 中山俊憲, 鈴木和男. マウスモデルにおける VILI と TNF α , IL6, KC の先行投与によるびまん性肺障害 (DAD) の初期段階の誘導/Early phase of diffuse alveolar damage induced by VILI plus TNF α , IL6, KC in mice. 39 回日本免疫学会, 12 月 2-4 日、大阪
- in Mice with A/H1N1 (PR-8) and Patients with Avian Flu (H5N1) Phagocyte Imaging joint with 3th International Symposium for Bioimaging. 3rd International Symposium on Bioimaging Jan. 18-21, 2010, Okazaki
6. S. Kawachi, K. Suzuki, et al. Treatment of severe ARDS (including H5N1-FARDS) with IVIg -From the Cases of NHP-Hanoi- International Forum on nflammation-2009, 'IVIg treatment and development of synthetic IgG' (国際炎症フォーラム 2009,j 人工グロブリンによる血管炎治療 2009/1/9-10 Tokyo
 7. 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特になし

【国際学会】

1. Kazuo Suzuki Discussion Leader 'Myeloperoxidase and the heart' 6th International Human Peroxidase Meeting April 19-22, 2009, Chapel Hill, North Carolina, USA.
2. Yasuaki Aratani, Fumiaki Kura, Haruo Watanabe, Hisayoshi Akagawa, Nobuyo Maeda, Hideki Koyama, and Kazuo Suzuki. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense against fungi. ISHAM, Tokyo, May 29.
3. Kazuo Suzuki. Contribution of neutrophils to host-defense and chronic diseases. Lecture in Peking University 1st Hospital. 2009 年 10 月 6 日, Beijing, China
4. Kazuo Suzuki. Role of Neutrophils and Myeloperoxidase in Severe Lung Injury in Mice with influenza infection, Seminar in NIAID-NIH, Oct 15, 2009, Bethesda, USA
5. Kazuo Suzuki. Role of Neutrophils and Myeloperoxidase in Severe Lung Injury

ARDS における Th1/Th2 バランスの異常

研究分担者 中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院 教授
研究協力者 長谷川明洋 山口大学大学院医学系研究科 講師

研究要旨 ナイーブ CD4T 細胞は、外来抗原の刺激により末梢リンパ組織でそれぞれ異なったリンホカインを産生する 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 細胞は互いにバランスをとりながら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。これまでに CD69 ノックアウトマウスを作製し、疾患との関わりの解析を進め、CD69 ノックアウトマウスではアレルギー性喘息が起きないことを見出した。また抗 CD69 抗体の投与で炎症反応が抑制され、治療効果が認められた。さらにイメージング技術を駆使した解析により、特に T 細胞上の CD69 分子がアレルギー性喘息の発症に重要であることを明らかにしてきた。今年度は、さらに 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。

A. 研究目的

ナイーブ CD4T 細胞は、外来抗原の刺激により末梢リンパ組織でそれぞれ異なったリンホカインを産生する Th1 または Th2 タイプのメモリーT 細胞に分化する。Th1 細胞は IFN- γ を産生して細胞内感染病原体に対する細胞性免疫に関与し、Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-13 など産生して細胞外感染病原体に対する液性免疫やアレルギー反応に関与する。Th1 細胞と Th2 細胞は互いにバ

ランスをとりながら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 family に属する II 型の膜分子で、45kd の膜蛋白であるが、通常はホモダイマーとして存在している（図 1）。T 細胞や B 細胞を刺激すると数時間以内に発現が上昇し、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。また胸腺内で分化途中のセレクションを受けている T 細胞にも発現がみられる。コレセプターとして抗原レセプターからのシグナル伝達を増強する機能が推測されているが、詳細は不明である。リガンドは現在までのところ、同定されていない。一方、血小板には恒常的に発現しており、活性化した好中球や好酸球などにも発現がみられることから、血小板の機能発現や局所の炎症反応における役割が推測されている。

樹立した CD69 ノックアウト (CD69-KO) マウスを用いて、生体内での CD69 分子の役割の解析を進めることを目的として、卵白アルブミン (OVA) を用いた気道炎症モデルを用いた解析を行った。

このアレルギー性喘息モデルは Th2 細胞依存性であるが、Th2 細胞は数の上では浸潤細胞の数パーセント程度で、Th2 細胞が実際の肺の炎症の場でどのような機序で炎症誘導における重要な機能を果たしているのかに関してはほとんど明らかになっていない。そこで、蛍光を発する GFP トランスジェニックマウスの Th2 細胞を移入するシステムを使って、喘息を起こしたマウスの肺での Th2 細胞の浸潤を蛍光顕微鏡を用いて定量的に解析できるイメージング解析システムを構築し、抗原特異的 Th2 細胞の喘息肺への浸潤過程を解析するとともに炎症巣の形成における Th2 細胞の役割を解析した。

ARDS は免疫炎症細胞浸潤をとまなう急性の肺傷害で、予後不良な重症病態を示す。現在ステロイド投与などによる対症療法的な治療法しかなく、有効な治療法の開発が急務となっている。これまでの研究から、

肺胞洗浄液や肺組織中の炎症性細胞数と肺機能所見との相関も報告されており、炎症細胞から放出される蛋白分解酵素などのケミカルメディエーターが関与していると考えられているが、炎症細胞の浸潤過程についてはほとんど明らかになっていない。そこで、GFP トランスジェニックマウスの T 細胞や好中球を移入する方法を使って、ARDS を発症したマウスの肺での浸潤過程をイメージング解析するとともに CD69 分子の役割を解析した。

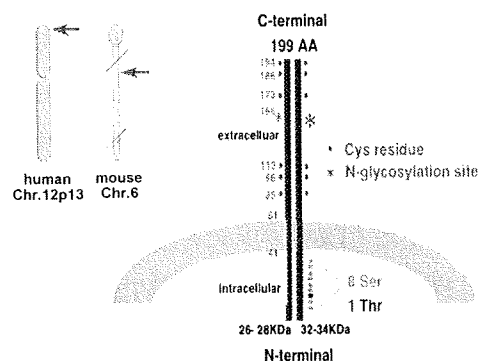


図1 CD69 の分子構造

B. 研究方法

1) アレルギー性喘息の誘導

マウスでのアレルギー性喘息モデルとして、卵白アルブミン (OVA) で免疫後、OVA を吸入させて気道炎症を誘導する系を用いた。気道炎症誘導後、肺胞洗浄を行い、浸潤細胞の種類と数と調べた。また気管支および肺の組織切片を作製し、炎症細胞の浸潤や腺分泌の程度を比較した。メタコリン誘導性の気道過敏症モデルを用いて、機能面の評価を行った。さらに抗 CD69 抗体を用いて急性の気道炎症を抑制する試みを行った。炎症の誘導前に投与、また炎症誘導の後に投与を行っ

て、その効果を解析した。

2) T細胞浸潤のイメージング解析

蛍光を発する GFP トランスジェニックマウスからナイーブ CD4T 細胞を精製分離し、*in vitro* で抗原特異的 Th2 細胞を調製して同系の免疫していない C57BL/6 マウスに移入した。2 日後に OVA を吸入させ、その後肺に集積してくる GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

3) ARDS の誘導と炎症細胞浸潤のイメージング解析

マウスでの ARDS モデルとして、LPS を経鼻投与する系を用いた。GFP トランスジェニックマウスから CD4T 細胞や好中球を精製分離し、同系の C57BL/6 マウスに移入した。1 日後に 10 mg/kg の LPS を経鼻投与した後、経時的に肺を取り出し、肺に集積してくる GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡で観察した。さらに抗 CD69 抗体を用いて急性の細胞浸潤を抑制する試みを行った。ARDS の誘導前に投与し、その効果をイメージング解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は千葉大学および山口大学の実験動物委員会の定める規定を遵守して行った。

C. 研究結果

1) CD69 ノックアウトマウスでのアレルギー性喘息

CD69 ノックアウトマウスでは、肺胞洗浄液中の浸潤細胞、とくに好酸球の数が有意に減少していた。肺の組織染色を行ったと

ころ、CD69 ノックアウトマウスでは細胞浸潤や気道炎症に伴う腺分泌が抑制されており、メタコリン誘導性の気道過敏症も減少していた。抗 CD69 抗体の投与でも喘息反応は抑制された。詳細な経時的解析を行ったところ、気道炎症が誘導された後でも抗 CD69 抗体の投与によって、炎症が強く抑制されることが明らかになった。また野生型マウスから T 細胞や B 細胞、好中球、マクロファージなどを個別に単離して CD69 ノックアウトマウスに注射した後、喘息を誘導する実験を行ったところ、T 細胞を移入した場合に喘息発症の抑制が解除された。

2) 抗原特異的 Th2 細胞浸潤のイメージング解析

GFP トランスジェニックマウスからナイーブ CD4T 細胞を精製分離し、*in vitro* で抗原特異的 Th2 細胞を調製して同系の野生型マウスに移入した。2 日後に OVA 吸入を行うと、肺への GFP 陽性細胞の集積が観察できた。タイムコースを追った実験を行ったところ、GFP 陽性細胞の肺への集積は抗原吸入後 6 時間後から観察され、18~24 時間でピークに達し、その後も肺に留まることが明らかになった (図 2)。また、抗原特異的 Th2 細胞は好酸球などの他の炎症細胞よりも先に肺に集積して focus とよばれる細胞集団を形成し、その後の炎症巣の形成を制御していることが明らかとなった。さらに抗 CD69 抗体のほか、抗 ICAM-1 抗体や抗 VCAM-1 抗体の投与により、アレルギー性喘息の誘導にもなう肺への T 細胞集積や focus 形成が抑制されることが明らかになった。

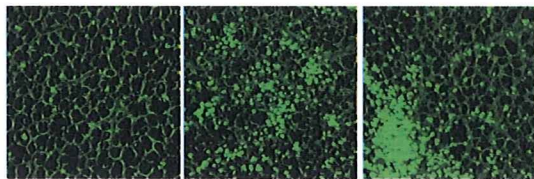


図2 喘息肺の内部を撮影したスチール写真

3) ARDS の誘導にともなう炎症細胞浸潤のイメージング解析

GFP トランスジェニックマウスから CD4T 細胞や好中球を精製分離し、同系の C57BL/6 マウスに移入した後、LPS を経鼻投与して ARDS を誘導した。経時的に肺を取り出し、肺に集積してくる GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、LPS 投与 12 時間後から肺への細胞集積が観察され、CD4T 細胞、好中球とも 24 時間でピークに達し、ARDS の誘導にともなう免疫細胞の集積過程が明らかとなった。さらに抗 CD69 抗体を用いて急性細胞浸潤に対する効果を調べたところ、抗 CD69 抗体投与により肺への好中球の集積が抑制できることが明らかとなった (図 3)。

D. 考案

アレルギー性喘息を起こした正常マウスでは、浸潤した炎症細胞上に CD69 の発現がみられ、CD69 ノックアウトマウスでは喘息が起きないことから、CD69 分子が喘息の発症に重要な役割を果たしていると考えられた。また、抗 CD69 抗体の投与

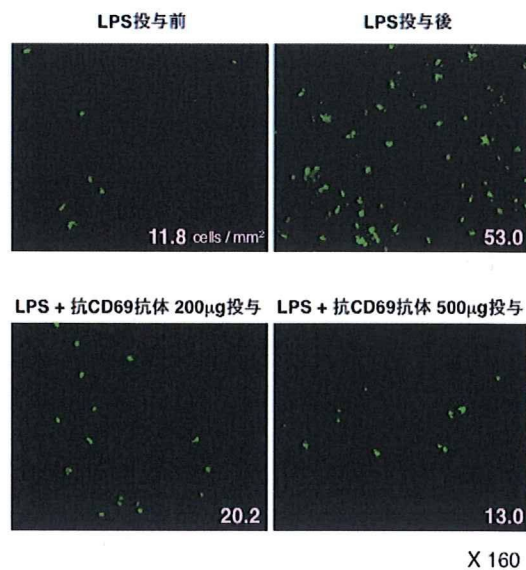


図3 ARDS の発症にともなう好中球浸潤に対する抗 CD69 抗体の抑制効果

によっても喘息反応が抑制できることが明らかになった。さらに正常マウスからの細胞移入実験の結果から、特に T 細胞上の CD69 分子がアレルギー性喘息の発症に重要であると考えられた。一方、これまで抗原特異的 Th2 細胞が実際の肺の炎症の場でどのような機序で炎症誘導における重要な機能を果たしているのかに関してはほとんど明らかになっていなかったが、イメージング解析により Th2 細胞が focus を形成して炎症巣の形成を制御していることが明らかとなった。

また、イメージング解析により ARDS の発症にともなう好中球などの免疫炎症細胞の浸潤過程が明らかになった。さらに抗 CD69 抗体の投与により、その細胞浸潤が抑制できることが明らかとなった。従ってこれまで有効な治療法がない ARDS に対して、CD69 分子を標的にしたまったく新しい治療法の開発が可能になるかもしれない。

E. 結論

CD69 ノックアウトマウスではアレルギー性喘息が起きないことを見出した。特にイメージング解析の結果から T 細胞上の CD69 分子がアレルギー性喘息の発症に重要であると考えられた。また抗 CD69 抗体投与により、肺のアレルギー性炎症を抑制する治療効果が有ることが分かった。さらに 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により、抗 CD69 抗体投与により急性免疫細胞浸潤を抑制できることが分かった。今後、免疫炎症細胞浸潤を抑制する至適条件の検討を行い、抗体治療の可能性を追求することが望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Motohashi, S., Nagato, K., Kunii, N., Yamamoto, H., Yamasaki, K., Okita, K., Hanaoka, H., Shimizu, N., Suzuki, M., Yoshino, I., Taniguchi, M., Fujisawa, T., and **Nakayama, T.**: A phase I-II study of α -Galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J. Immunol.* 182:2492-2501, 2009.
2. Motohashi, S., and **Nakayama, T.**: Natural killer T cell-mediated immunotherapy for malignant diseases. *Frontiers in Bioscience* S1:108-116, 2009.
3. **Nakayama, T.**, and Yamashita, M.: Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory. *Semin. Immunol.* 21:78-83, 2009.
4. Kunii, N., Horiguchi, S., Motohashi, S., Yamamoto, H., Ueno, N., Yamamoto, S., Sakurai, D., Taniguchi, M., **Nakayama, T.**, and Okamoto, Y.: Combination therapy of *in vitro*-expanded natural killer T cells and α -galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Sci.* 100:1092-1098, 2009.
5. **Nakayama, T.**, and Kimura, Y. M.: Memory Th1/Th2 cell generation controlled by schnurri-2. *Memory T-Cells*, edited by Maurizio Zanetti., 2009.
6. Kitajima, M., Iwamura, C., Miki, H. T., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hashimoto, K., Motohashi, S., Koseki, H., Ohara, O., Yamashita, M., and **Nakayama, T.**: Enhanced Th2 cell differentiation and allergen-induced airway inflammation in *Zfp35*-deficient mice. *J. Immunol.* 183:5388-5396, 2009.
7. Kohu, K., Ohmori, H., Wong, W. F., Onda, D., Wakoh, T., Kon, S., Yamashita, M., **Nakayama, T.**, Kubo, M., and Satake, M.: The Runx3 transcription factor augments T_h1 and down-modulates T_h2 phenotypes by interacting with and attenuating GATA3. *J. Immunol.* 183:7817-7824, 2009.
8. Miki, H. T., Hasegawa, A., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Watanabe, Y., Hosokawa, H., Motohashi, S., Hashimoto, K., Shirai, M., Yamashita, M., and **Nakayama, T.**: CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. *J. Immunol.* 183:8203-8215, 2009.
9. Iwata, A., Watanabe, N., Oya, Y., Owada, T., Ikeda, K., Suto, A., Kagami, S., Hirose, K., Kanari, H., Kawashima, S., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Iwamoto, I., and Nakajima, H.: Protective roles of B and T lymphocyte attenuator in NKT cell-mediated experimental hepatitis. *J. Immunol.* 184:127-133, 2010.
10. Hasegawa, A., Hayashi, K., Kishimoto, H., Yang, M., Tofukuji, S., Suzuki, K., Nakajima, H., Hoffman, R. M., Shirai, M., and **Nakayama, T.**: Color-coded real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model. *J Allergy Clin. Immunol.* 125:461-468, 2010.
11. Iwamura, C., Shinoda, K., Yoshimura, M., Watanabe, Y., Obata, A., and **Nakayama, T.**: Naringenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells. *Allergology International* in press.

2. 学会発表

1. 中山俊憲 免疫システム、その統御による免疫治療の開発研究 特別講演 第9回 Cardiovascular Frontier Conference (CFC), 東京, 4月4日, 2009.

2. Nakayama, T., Hirahara, K., and Yamashita, M. ROG, repressor of GATA, regulates Th2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. 96th Annual Meeting the American Association of Immunologists Immunology 2009 (Seattle), May 8-12, 2009.
3. Tokoyoda, K., Nakayama, T., and Radbruch, A. Professional memory CD4⁺ T lymphocytes reside and rest in the bone marrow. The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2009, (Japan), June 1-4, Kyoto, 2009.
4. Nakayama, T., Yamashita, M., Hosokawa, H., and Iwamura, C. Regulation of memory Th cell survival and function by the polycomb and trithorax group gene products. The 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2009, (Kyoto, Japan), June 1-4, 2009
5. 中山俊憲 CD4 陽性 T 細胞の機能分化：機能獲得と維持のメカニズム 特別講演 第 21 回日本比較免疫学会学術集会, 藤沢, 8 月 3-5 日, 2009.
6. 櫻本昌輝、山本紘士、斎藤諒、澤田景子、板倉光夫、中山俊憲、橋本香保子 抗原提示細胞にみられる分泌小胞輸送分子 Sec8 と抗原ペプチドの動態 第 18 回日本バイオイメージング学会学術集会, 岡山, 9 月 3-5 日, 2009.
7. 松長修、田口純、岡田美鈴、櫻本昌輝、中山俊憲、橋本香保子 B 細胞のプラズマ細胞化とその分化マーカー分子のイメージング解析 第 18 回日本バイオイメージング学会学術集会, 岡山, 9 月 3-5 日, 2009.
8. 長谷川明洋、中山俊憲、白井睦訓 喘息肺への T リンパ球細胞浸潤のイメージング 第 18 回日本バイオイメージング学会学術集会, 岡山, 9 月 3-5 日, 2009.
9. Nakayama, T., and Yamashita, M. Bmi1 regulates memory Th2 cell survival via repression of the noxa gene. European Journal of Immunology 2009, (Berlin, Germany), September 13-16, 2009.
10. 植草康浩、稲嶺絢子、堀口茂俊、本橋新一郎、中山俊憲、岡本美考 アレルギー性鼻炎モデルマウスに対する α GalCer-pulsed DC 細胞療法 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 10 月 29-31 日, 2009.
11. 稲嶺絢子、大川翼、堀口茂俊、米倉修二、植草康浩、中山俊憲、岡本美考 Lactobacillus paracasei KW3110 刺激により活性化された樹状細胞はアレルギー性鼻炎炎症を抑制する 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田, 10 月 29-31 日, 2009.
12. 中山俊憲 アレルギー疾患の合併をどのように考えるか? 基礎研究からの考察 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 シンポジウム, 秋田, 10 月 29-31 日, 2009.
13. 中山俊憲 ヒト免疫疾患におけるメモリー T 細胞の役割: 新展開 第 37 回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム, 東京, 11 月 13-15 日, 2009.
14. Yamashita, M., Kuwahara, M., and Nakayama, T. Regulation of GATA3-induced immune responses by the transcription factor Sox4. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
15. Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Radbruch, A., and Nakayama, T. Professional memory CD4 T lymphocytes reside and rest in bone marrow. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 シンポジウム, 大阪 12 月 2-4 日, 2009.
16. Motohashi, S., Okita, K., Yamasaki, K., Nagato, K., Hijikata, A., Kitamura, H., Fujii, S., Taniguchi, M., Ohara, O., and Nakayama, T. NKT 細胞療法によるインターフェロノン産生増強および生存期間延長に相関するバイオマーカーの検討/A set of genes whose expression is associated with the IFN- γ response/survival undergoing NKT cell-based immunotherapy. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪 12 月 2-4 日, 2009.
17. Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Fukasawa, T., Radbruch, A., and Nakayama, T. 記憶ヘルパー T リンパ球は骨髄に定着している /Professional memory CD4 T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 12 月 2-4 日, 2009.
18. Kuwahara, M., Yamashita, M., Tofukuji, S., Shinoda, K., Onodera, A., Suzuki, J., Iwamura, C., and Nakayama, T. Sox4 は GATA3 によって誘導される Th2 細胞分化および Th2 型炎症反応を制御する/Sox4