

表 1. 症例の背景

	N = 95
Age (yr)	72.0 (70.4-73.6)
Sex (M:F)	94:1
Smoking status (C:F)	13:82
Pack-years	66.9 (59.8-74.1)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.7 (21.1-22.3)
FEV <sub>1</sub> (% pred)	55.3 (50.7-59.9)
RV/TLC (%)	43.8 (42.4-45.1)
DL <sub>CO</sub> /V <sub>A</sub>	2.81 (2.60-3.04)
PaO <sub>2</sub> (torr)	67.2 (59.9-74.4)
PaCO <sub>2</sub> (torr)	39.7 (38.9-40.5)
Exacerbation frequency (/year)	1.61 (1.25-1.98)
GOLD 分類 (I/II/III/IV)	(13/46/31/5)

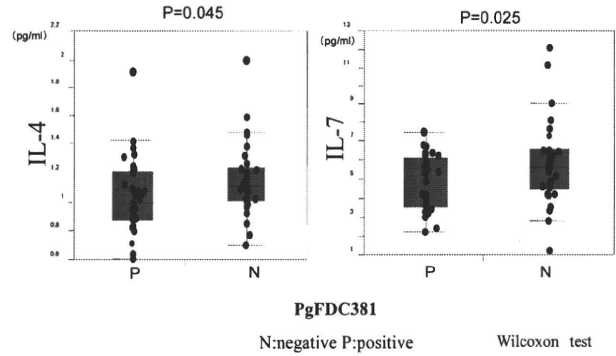


図 4. 血清歯周病抗体価と炎症性サイトカイン

IL-4・IL-7 は抗体陽性例で有意に低値であった (図 4)。

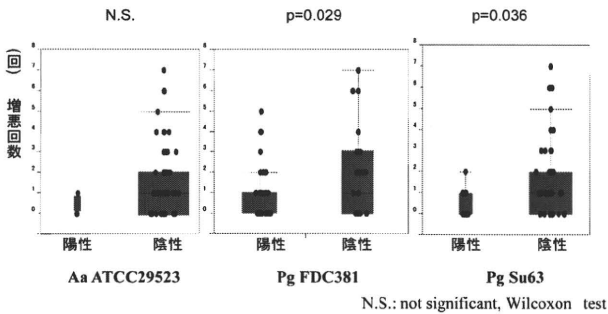


図 2. 血清歯周病抗体価と増悪頻度

血清歯周病抗体価は Pg FDC381 57% > Pg SU63 21% > Aa ATCC29523 16% の順に陽性率が高かった。Pg FDC381, Pg SU63 に対する抗体価陽性群で有意に増悪の程度が減少し, Pg FDC381, Pg SU63 に対する抗体価陽性は増悪回数減少と関連がみられた (図 2)。

Pg FDC381 株に対する抗体価陽性・陰性群で血清 CRP および喀痰上清中の IL-8・TNF-alpha 濃度に有意な差は認めなかったが (図 3), 血清

考 案

重度呼吸不全患者において, COPD は既知の危険因子 (年齢・喫煙指数・BMI・骨密度・ステロイド使用など) と独立した歯周病の危険因子であることが報告されている<sup>10)</sup>。歯周病は非常に罹患率の高い疾患であるが, 65歳以上になると喪失歯が増加するため罹患率はやや下がり, 70~74歳では歯周ポケットを有する患者は48.4%と報告されている<sup>11)</sup>。歯周病の診断は歯周ポケットの測定・出血・歯槽硬線の有無などによって診断されることが一般的であるが, 歯周病ポケットの深さと歯周病菌に対する抗体価には相関があり, 治療などにより抗体価が低下することから<sup>12)</sup>, 本検討ではスクリーニングとしての使用が検討されつつある抗体価を使用して検討した。

仮説では COPD 患者では歯周病に罹患している方が増悪の頻度が高いのではないかと考えたが, 本検討では, 予想に反して抗体価陽性群で増悪頻度が低いことが判明した。また, 頻回増悪 (3回≧年) も, 抗体価陽性群で優位に少なかった (data not shown)。抗体価陽性群は感染に対する抗体産生能自体が高く, 増悪の原因となる感染に対しても重症化する前に改善してしまうかもしれない増悪を検討するうえでは症状・治療に基づいて, 頻度を用いるのが一般的ではあるが, 今後, 増悪期間や重症度なども含めて検討する必要

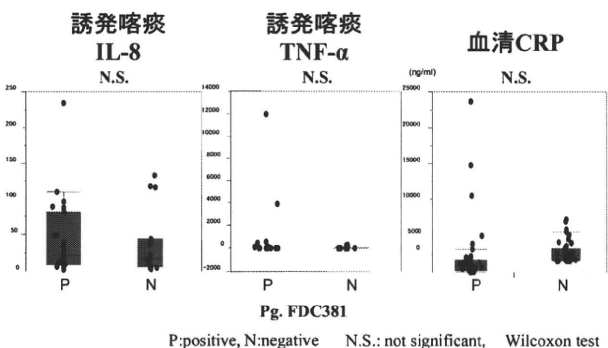


図 3. 血清歯周病抗体価と炎症

があると考えられる。また、抗体価陰性群の中には総義歯の患者群が含まれるため、栄養状態などが影響した可能性も否定できず、今後さらなる検討が必要である。

なお、本検討では増悪が多い患者で血清 IL-4 が高値となる傾向が見られた。IL-4 は液性免疫・好酸球性炎症に関与すると考えられるが、実際に増悪時の反応が異なるのかどうかについては今後さらに検討を進める予定である。

## 結 論

歯周病抗体価陽性群では COPD の増悪回数が有意に減少していた。

## 参考文献

1. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) updated, 2006
2. Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, Adachi M, Nagai A, Kuriyama T, Takahashi K, Nishimura K, Ishioka S, Aizawa H, Zaher C: COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology*, 9(4): 458-465, 2004
3. 厚生労働省大臣統計情報部編, 厚生統計要覧
4. Vestbo J, Prescott E, Lange P: Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity Copenhagen city heart study group. *Am J Respir Crit Care Med*, 153: 1530-1535, 1996
5. Groenewegen KH, Wouters EF: Bacterial infections in

patients requiring admission for an acute exacerbation of COPD; a 1-year prospective study. *Respir Med*, 97(7): 770-777, 2003

6. Terada K, Muro S, Sato S, Ohara T, Haruna A, Marumo S, Kinose D, Ogawa E, Hoshino Y, Niimi A, Terada T, Mishima M: Impact of gastro-oesophageal reflux disease symptoms on COPD exacerbation. *Thorax*, 63 (11): 951-955, 2008
7. Terada K, Muro S, Ohara T, Kudo M, Ogawa E, Hoshino Y, Hirai T, Niimi A, Chin K, Mishima M: Abnormal swallowing reflex and COPD exacerbations. *Chest*, 137 (2): 326-332, 2010
8. Leuckfeld I, Obregon-Whittle MV, Lund MB, Geiran O, Bjørtuft Ø, Olsen I: Severe chronic obstructive pulmonary disease: Association with marginal bone loss in periodontitis. *Respiratory Medicine*, 102 (4): 488-494, 2008
9. Yoneyama T, Yoshida M, Sasaki H, et al: Oral Care Working Group. Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. *J Am Geriatr Soc*, 50 (3): 430-433, 2002
10. Leuckfeld I, Obregon-Whittle MV, Lund MB, Geiran O, Bjørtuft Ø, Olsen I. Severe chronic obstructive pulmonary disease: association with marginal bone loss in periodontitis. *Respir Med*, 102(4): 488-494, 2008
11. 厚生労働省, 平成17年歯科疾患実態調査
12. Maehata E, Maehata Y, Lee MC, Kudo C, Takashiba S, Shimizu K, et al: Evaluation of Immunoglobulin G antibody titer measurement in the simplified test for multiple bacterial infection in periodontal disease based on self-sampling of fingertip capillary blood—Focusing on Porphyromonas gingivalis antigen—. *Ningen Dock*, 22 (6): 35-41, 2008

# 喫煙暴露にウイルス疑似刺激を加えるモデルによる COPD 増悪の病態解明 (続報)

田辺 直也, 星野 勇馬, 清川 寛文, 丸毛 聡  
小川恵美子, 室 繁郎, 平井 豊博, 三嶋 理晃  
京都大学大学院医学研究科呼吸器内科学

## はじめに

ウイルス感染は COPD 増悪の誘因の約50%を占め, 重症化することもしばしば経験されるが, そのメカニズムについては不明な点が多く残されている<sup>1-3)</sup>。昨年, 我々は喫煙暴露したマウスに合成 2 重鎖 RNA である polyinosine-polycytidylic acid [poly (I:C)] をウイルス疑似刺激として投与すると, 気道炎症, 酸化ストレス, アポトーシスが增強すること, このモデルが COPD 増悪の病態解明に有用であることを示した。本研究ではこのモデルを用いて COPD 増悪の治療薬の 1 つである全身性ステロイドの効果, 限界を検証することとした。

## 対象と方法

慢性喫煙暴露を行った C57Bl/6 マウスに poly (I:C) を気道内投与した。昨年, 慢性喫煙と poly (I:C) により相乗的に增強することが示された肺の炎症, 酸化ストレス, 肺アポトーシスに対する全身性ステロイドの効果を検討するためにデキサメサゾン (DEX) を poly (I:C) 投与 1 時間前に腹腔内投与した。DEX の投与量は 0.1, 0.3, 1.0 mg/kg の 3 種類とした。肺炎症につい

ては BALF 細胞分画, 酸化ストレスについては BALF 中のカルボニル化蛋白, アポトーシスに関しては免疫組織染色にて ss-DNA・caspase 3 の陽性細胞を評価した。

## 結 果

喫煙暴露したマウスに poly (I:C) を気道内投与すると, BALF 中の好中球数, カルボニル化蛋白は有意に增強した。肺の免疫組織化学にて cleaved caspase 3, ssDNA 陽性細胞の有意な増加も認めた。DEX 投与は容量依存的に BALF 中の好中球数, リンパ球数を抑制した。中等量 (0.3 mg/kg) の投与によりリンパ球増加は抑制されたが, 好中球増加は抑制されなかった (表 1)。BALF 中のカルボニル化蛋白は DEX のどの容量を投与しても減少しなかった (図 1)。肺の cleaved caspase 3 陽性細胞数は, 高容量の DEX (1.0 mg/kg) でのみ有意に減少した。ssDNA も同様の傾向を認めた。

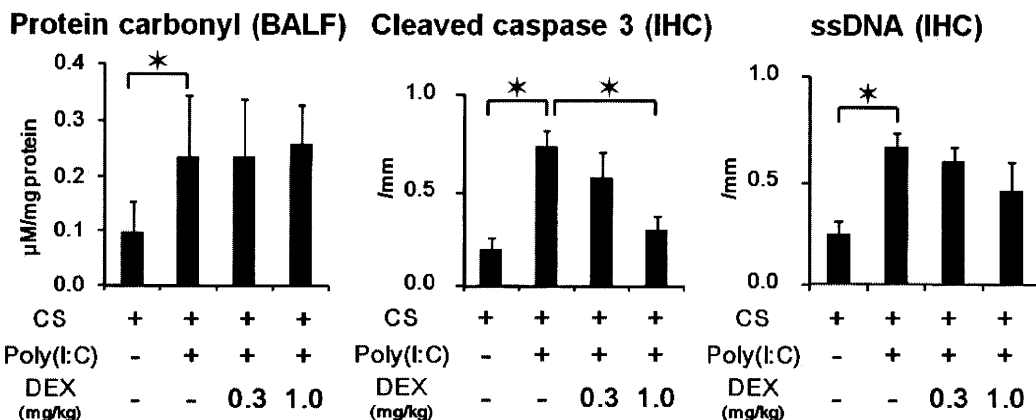
## 考 察

COPD 患者では増悪により COPD の進行が促進されると考えられている<sup>1,4)</sup>。またウイルス感染は増悪の主な原因の 1 つである<sup>2,3)</sup>。しかしウ

表 1. Inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid

	CS	CS + poly (I:C)	CS + poly (I:C) + DEX0.1	CS + poly (I:C) + DEX0.3	CS + poly (I:C) + DEX1.0
Total cell ( $\times 10^4$ /ml)	3.54	8.05	8.39	7.70	5.66
Neutrophil ( $\times 10^3$ /ml)	0.11	6.26	5.88	5.93	3.81
Lymphocyte ( $\times 10^3$ /ml)	0.30	4.45	4.79	1.76	1.41

Data are expressed as mean. n=4-6



CS; cigarette smoke, n=4-6, data are expressed as mean ± SD. \* p<0.05.

図1. Oxidative stress and apoptosis in the lung

ウイルス感染による COPD 増悪の病態について十分検討されてきたとは言い難い。近年、ウイルス感染に対する免疫応答や合成 2 重鎖 RNA である poly (I:C) に対する自然免疫応答が喫煙により増強することが示された<sup>5,6)</sup>。しかし、これまでの報告では、その増強した自然免疫応答が COPD の病態のどの要素を悪化させ、肺の破壊を促進するかについては十分検討されていなかった。昨年、我々は喫煙暴露したマウスに poly (I:C) を気道内投与すると、気道好中球炎症、酸化ストレス、肺アポトーシスが増強することを示した。この結果よりウイルス感染による COPD 増悪では、プロテアーゼや気道リンパ球炎症の増強よりは、気道好中球炎症、酸化ストレス、アポトーシスの増強がその主病態であると考えられた。本検討では、COPD 急性増悪でしばしば用いられる全身性ステロイドのこのような病態に対する有効性をこの動物モデルを用いて検証した。

全身性ステロイドの酸化ストレスや好中球性炎症に対する抑制効果の限界は以前より報告されている<sup>1)</sup>が、本研究でもリンパ球炎症に比べ、好中球炎症はより高容量の全身性ステロイドでないと抑制しえず、また酸化ストレスに対してはすべての容量で抑制効果を認めなかった。さらに肺の破壊の指標である肺アポトーシスが高容量のステロイドでのみ抑制されることは、副作用などを考慮して比較的低用量、低期間にとどめられやすい増

悪時のステロイド療法が、症状コントロールには有用であったとしても肺の破壊や肺機能低下の促進を抑制しえないことを示唆している。

## 結 論

ウイルス感染による COPD 増悪時に認められる気道好中球炎症、酸化ストレス、アポトーシスの増強に対する全身性ステロイドの効果は限定的であることが示唆された。特に増悪による肺の破壊促進を抑制しえない可能性があることについては今後さらなる検討が必要であると考えられた。

## 参考文献

1. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) updated, 2009
2. Seemungal TAR, Harper-Owen R, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA: Detection of rhinovirus in induced sputum at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 16: 677-683, 2000
3. Seemungal TAR, Harper-Owen R, Bhowmik A, et al: Respiratory viruses, symptoms and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 164: 1618-1623, 2001
4. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA: Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease.

# ウイルス感染誘発 COPD 増悪抑制に関する研究

山谷 陸雄<sup>1</sup>, 西村 秀一<sup>2</sup>, 安田 浩康<sup>3</sup>, 鄧 雪<sup>4</sup>, 久保 裕司<sup>5</sup>

研究協力者・東北大学先進感染症予防学寄附講座教授<sup>1</sup>

研究協力者・仙台医療センター臨床検査部病因研究室<sup>2</sup>

研究協力者・東北大学未来医工学治療開発センター臨床応用部門<sup>3</sup>

研究協力者・東北大学未来医工学治療開発センター臨床応用部門<sup>4</sup>

研究協力者・東北大学大学院医学系研究科先進感染症予防学寄附講座<sup>5</sup>

## はじめに

季節性インフルエンザウイルス感染はライノウイルス等と同様に、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 増悪を惹起することが報告されてきた<sup>1)</sup>。インフルエンザウイルスは気道上皮細胞に感染して細胞傷害や細胞刺激を生じ、気道炎症を引き起こす。2009年に流行した新型インフルエンザウイルス (A/H1N1 pdm) 感染は小児の気管支喘息および成年・老年の COPD 患者で重症化を引き起こした。私たちはこれまで、季節性インフルエンザウイルス感染がヒト気管上皮細胞において炎症性サイトカイン等の気道炎症惹起物質を放出することを報告した<sup>2,3)</sup>。本年度は、新型インフルエンザウイルスの細胞傷害性に関して、季節性インフルエンザウイルスと比較した。

私たちは、本研究班において、喀痰調整薬である L-カルボシステインおよびマクロライド系抗菌薬であるクラリスロマイシンがライノウイルス感染に加えて季節性インフルエンザウイルス感染を抑制することを報告してきた<sup>2,3)</sup>。カルボシステインおよびクラリスロマイシンは気管上皮細胞表面のインフルエンザウイルス感染受容体の発現を減少させた。また、ウイルス RNA が細胞質に進入する部位である酸性エンドゾームを減少させ、これらの機序で季節性インフルエンザウイルス感染抑制作用を有する。他方で、酸性エンドゾームから水素イオンがウイルス内に流入した後、セリン・プロテアーゼがヘマグルチニンを開離し、ウイルス構造を変化させて、細胞質内への

ウイルス RNA 流入に関与すると報告されている<sup>4)</sup>。このため、本年度は種々のセリン・プロテアーゼ阻害薬を用いて、インフルエンザウイルス感染抑制作用を検討した。

長時間作用性抗コリン薬は COPD 安定期治療薬の第一選択である。長時間作用性抗コリン薬は気管支拡張作用を介して 1 秒量の増加や咳・痰、息切れの改善、QOL の改善をもたらす。さらに、長時間作用性抗コリン薬は増悪回数を減少して生存率を向上する作用を有する<sup>5)</sup>。COPD の増悪にはライノウイルス感染などの呼吸器ウイルス感染に伴う気道炎症や喀痰増加が関連する。昨年度は長時間作用性抗コリン薬のライノウイルス感染抑制効果を報告した。本年度は作用機序に関して検討を加えた。

## (倫理面への配慮)

ヒト気管上皮細胞培養は東北大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

## 対象と方法

1) ヒト気管上皮細胞を 24-ウエルプレートに培養し、7~10日目に実験に使用した。細胞増殖を確認後、新型インフルエンザウイルス (A/H1N1 pdm) および季節性インフルエンザウイルス (A 香港型, A/H3N2) を感染させた。

培養上清を経時的に回収し、ウイルス放出量を測定した。また、感染 5 日後の IL-6 放出量および感染 7 日後の浮遊細胞数を計算した。インフルエンザウイルス量の測定は、10倍希釈した培養液を MDCK 細胞に感染させ、50%細胞変性効果を

- Thorax*, 57(10): 847-852, 2002
5. Robbins CS, Bauer CM, Vujicic N, Gaschler GJ, Lichty BD, Brown EG, Stämpfli MR: Cigarette smoke impacts immune inflammatory responses to influenza in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 174(12): 1342-1351, 2006
6. Kang MJ, Lee CG, Lee JY, Dela Cruz CS, Chen ZJ, Enelow R, Elias JA: Cigarette smoke selectively enhances viral PAMP- and virus-induced pulmonary innate immune and remodeling responses in mice. *J Clin Invest*, 118 (8): 2771-2784, 2008

示す希釈倍率 (TCID<sub>50</sub> units/ml) で求めた。

さらに、トラネキサム酸 (トランサミン<sup>®</sup>, 1 μg/ml), シベレスタット (エラスポール<sup>®</sup>, 10 μg/ml), ガベキサート (エフオーワイ<sup>®</sup>, FOY, 10 μg/ml) およびカモスタット (フォイパン<sup>®</sup>, 0.01 μg/ml) を細胞に3日前から作用し、インフルエンザウイルスを感染させた。

2) ヒト気管上皮細胞を試験管に培養し、チオトロピウム (10 μM) をヒト気管上皮細胞に3日間作用させた。細胞核蛋白および細胞質蛋白を抽出し、転写因子 NF-kappa B (NF-κB) を測定した。核蛋白は ELISA 法で p50, p65 および c-Rel 量を測定した。細胞質蛋白はリン酸化 I-κB-α (p-I-κB-α) および I-κB-α 総量を Western blot 法で測定した。

### 結果

1) ヒト気管上皮細胞からの新型インフルエンザウイルス放出量は時間経過で増加し、感染5日後前後で最大量を観察した (図 1A)。また、季節性インフルエンザウイルス感染に比較して、放出量の増加を認めた (図 1B)。ただし、感染直後1日目は季節性インフルエンザウイルス放出量が多い現象を認めた。

インフルエンザウイルス感染後、ヒト気管上皮細胞培養液中には剥離した細胞が遊離して浮遊する。この浮遊細胞数は A 香港型インフルエンザ

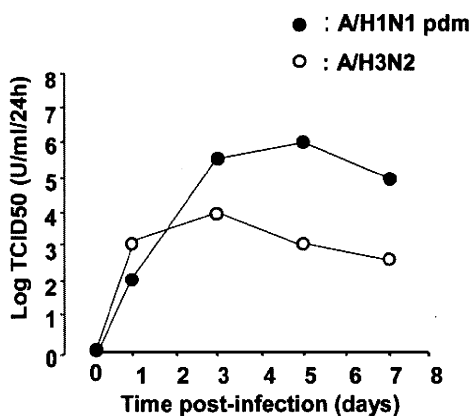


図 1A. 新型インフルエンザおよび A 香港型インフルエンザウイルス放出量の時間経過

ウイルス感染後に比べて新型インフルエンザウイルス感染後は、さらに増加した (図 2)。

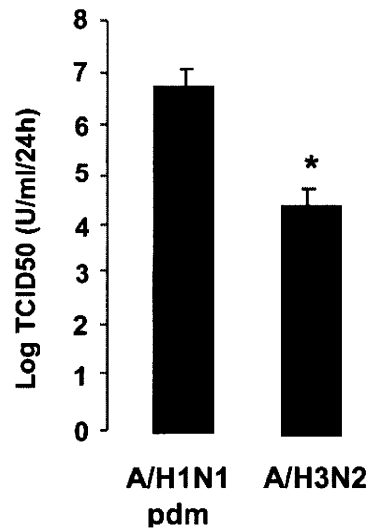


図 1B. 新型インフルエンザおよび A 香港型インフルエンザウイルス放出量の比較

培養液ウイルス放出量は時間経過で 3~5 日まで増加する (図 1A)。新型インフルエンザ (A/H1N1, pdm) では 3 日後 (図 1A) および 5 日後 (図 1A, B) のウイルス量が季節性インフルエンザ (A/H3N2) に比べて増加する。  
\* P<0.05; 季節性インフルエンザと比較した有意差。

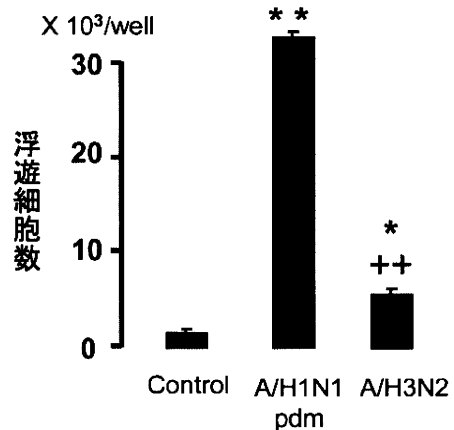


図 2. 新型インフルエンザおよび A 香港型インフルエンザウイルス感染後の培養液中遊離細胞数

培養液遊離細胞数は新型インフルエンザウイルス感染 (A/H1N1) 7 日後で増加を示す。季節性 A 香港型インフルエンザウイルス感染後 (A/H3N2) にも増加するが、新型インフルエンザウイルス感染後の増加幅が大きい。  
\* P<0.05, \*\* P<0.01; 感染していない細胞 (Control) に対する有意差。++ P<0.01; 新型インフルエンザと比較した有意差。

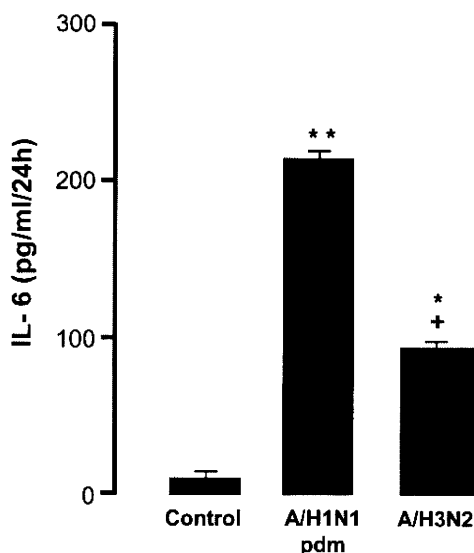


図3. 新型インフルエンザおよびA香港型インフルエンザウイルス感染後の培養液中 IL-6 放出量  
新型インフルエンザウイルス感染 (A/H1N1) 後5日目, 培養液中IL-6 放出量は増加を示す。季節性A香港型インフルエンザウイルス感染後 (A/H3N2) にも増加するが, 新型インフルエンザウイルス感染後の増加幅が大きい。\* P<0.05, \*\* P<0.01; 感染していない細胞 (Control) に対する有意差。+P<0.01: 新型インフルエンザと比較した有意差。

インフルエンザウイルス感染後, ヒト気管上皮細胞培養液中には炎症性サイトカインのインターロイキン (IL)-6 が増加した。IL-6 放出量はA香港型インフルエンザウイルス感染後に比べて新型インフルエンザウイルス感染後は, さらに増加した (図3)。

2) トラネキサム酸 (1 μg/ml) およびカモスタット (0.01 μg/ml) は, ヒト気管上皮細胞から培養液に放出される季節性A香港型インフルエンザウイルス量を減少した。また, 上皮細胞内で複製されるウイルス RNA 量を減少した (図4)。

一方で, シベレスタット (エラスポール®, 10 μg/ml), およびガベキサート (エフオーワイ®, FOY, 10 μg/ml) は, 新型インフルエンザウイルス放出量を減少させた (図5)。

3) 長時間作用型抗コリン薬チオトロピウム (10 μM) 添加による気管上皮細胞培養により, ライノウイルスの培養液放出量は減少した (図6)。

チオトロピウムによるライノウイルス感染抑制

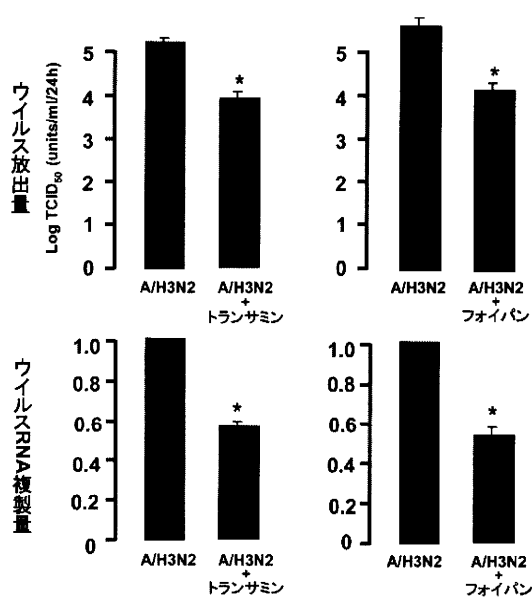


図4. 季節性A香港型インフルエンザウイルス感染に対するセリン・プロテアーゼ阻害薬の抑制作用  
季節性A香港型インフルエンザウイルス (A/H3N2) の放出量および細胞内ウイルス RNA 複製量はトラネキサム酸 (トラネキサミン®) およびカモスタット (フォイパン®) で減少する。\* P<0.05; ウイルス感染のみに対する有意差。

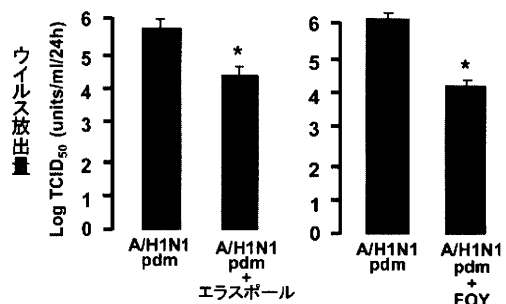


図5. 新型インフルエンザウイルス感染に対するセリン・プロテアーゼ阻害薬の抑制作用  
新型インフルエンザウイルス (A/H1N1) の放出量はシベレスタット (エラスポール®), およびガベキサート (エフオーワイ®, FOY) で減少する。\* P<0.05; ウイルス感染のみに対する有意差。

効果を検討するため, ライノウイルス感染受容体 ICAM-1 発現に及ぼす影響を調べた。その結果, ICAM-1 mRNA 細胞内合成量および可溶性 ICAM-1 (sICAM-1) 培養液濃度ともにチオトロピウム (10 μM) 添加で減少した (図7)。

ライノウイルス感染により, 培養液中のイン



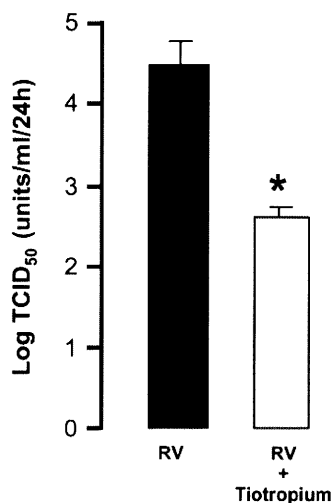


図 6. ライノウイルス感染に対するチオトロピウムの効果

培養液ライノウイルス放出量はチオトロピウム (Tiotropium) で減少した。\* P<0.05 ; ウイルスのみ (RV) と比較した有意差。

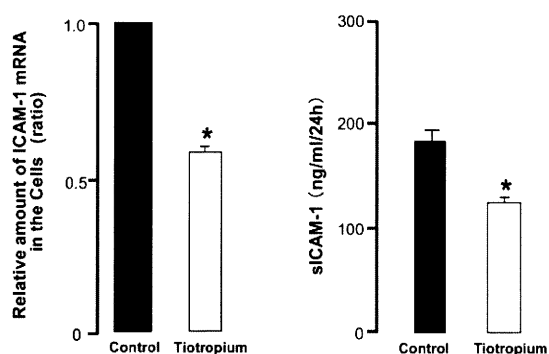


図 7. ライノウイルス感染受容体発現に対するチオトロピウムの効果

細胞内 ICAM-1 mRNA 発現量および培養液 sICAM-1 濃度はチオトロピウム (Tiotropium) で減少した。\* P<0.05 ; 培養液のみ (Control) と比較した有意差。

ターロイキン (IL)-1 $\beta$  および IL-6 など、炎症性サイトカインは増加した (図 8)。チオトロピウムの添加によって、これらのサイトカインが減少した (図 8)。

このように、ライノウイルス感染受容体 ICAM-1 発現と炎症性サイトカイン放出をチオトロピウムが抑制することが明らかになった。ICAM-1 および炎症性サイトカインの発現・合成は転写因子 NF- $\kappa$ B が関与するため、チオトロピウムの作用を検討した。その結果、チオトロピウ

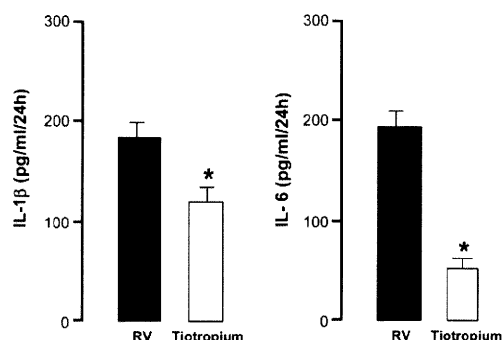


図 8. 炎症性サイトカイン放出に対するチオトロピウムの効果

ライノウイルス感染 (RV) で増加したインターロイキン (IL)-1 $\beta$  および IL-6 はチオトロピウム (Tiotropium) で減少した。\* P<0.05 ; ウイルス感染のみ (RV) と比較した有意差。

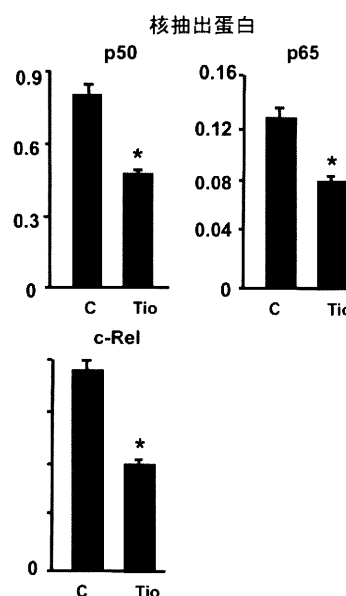


図 9. チオトロピウムの NF- $\kappa$ B 抑制作用

チオトロピウム (Tio) はヒト気管上皮細胞における p50, p65, および c-Rel を減少した。\* P<0.05 ; 培養液のみ (Control, C) に対する有意差。

ムは核抽出蛋白 p50, p65 および c-Rel 量を測減少した (図 9)。また、チオトロピウムは細胞質蛋白のリン酸化 I- $\kappa$ B- $\alpha$  (p- I- $\kappa$ B- $\alpha$ ) を減少し、逆に I- $\kappa$ B- $\alpha$  量を増加した (図10)。

### 考 察

1) 2009年に世界的に流行した新型インフルエンザ感染 (A/H1N1 pdm) はメキシコなどの海外

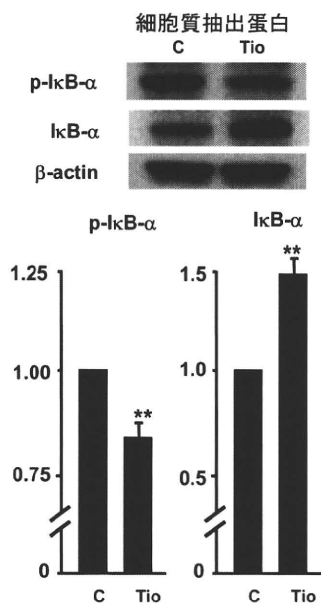


図10. チオトロピウムのNF-κB抑制作用  
チオトロピウム (Tio) はヒト気管上皮細胞におけるp-IκB-αを減少し、IκB-αを増加した。  
\* P<0.05; 培養液のみ (Control, C) に対する有意差。

における重症例、死亡例が多く報告された<sup>6)</sup>。その一方で、わが国では死亡者数が例年の季節性インフルエンザ感染による死亡者数と同じレベルに留まっている。そこで、本年度は新型インフルエンザウイルス感染の、ヒト気管上皮細胞に対する傷害性を検討した。その結果、新型インフルエンザ感染による培養液中に剥離した上皮細胞数が季節性A香港型インフルエンザウイルス感染に比較して増加した。また、培養液ウイルス放出量や気道炎症惹起物質の一つであるIL-6の放出量が増加した。これらの結果より、新型インフルエンザウイルスの感染は季節性インフルエンザに比べて細胞傷害性や炎症惹起能力が高いのではないかと考えられた。

他方で、感染1日目のウイルス放出量は季節性インフルエンザで多かった。今回の実験では33°Cで、ウイルス感染後に細胞を培養した。この低温に対するウイルス増殖性の違いが、新型と季節性インフルエンザであるのではないかと示唆された。豚由来のウイルス遺伝子を受け継いでいる新型インフルエンザの特性に関して、今後の検

討を予定している。

2) インフルエンザウイルスが気道上皮細胞に感染する際、細胞内にウイルスが進入して酸性エンドゾームに取り込まれる。酸性エンドゾームから水素イオンがウイルス内に流入した後、セリン・プロテアーゼがヘマグルチニンを開離し、ウイルス構造を変化させて、細胞質内へのウイルスRNA流入に参与すると報告されている<sup>4)</sup>。このため、本年度は種々のセリン・プロテアーゼ阻害薬を用いて、インフルエンザウイルス感染抑制作用を検討した。その結果、セリン・プロテアーゼ阻害作用を有するトラネキサム酸 (トランサミン<sup>®</sup>) およびカモスタット (フォイパン<sup>®</sup>) がヒト気管上皮細胞から培養液に放出される季節性A香港型インフルエンザウイルス量を減少した。また、上皮細胞内で複製されるウイルス量を減少した。さらに、シベレスタット (エラスポール<sup>®</sup>)、およびガベキサート (エフオーワイ<sup>®</sup>) は、新型インフルエンザウイルス放出量を減少させた。セリン・プロテアーゼによるウイルス構造の変化は高病原性インフルエンザウイルスの進入経路でも共通するため、抗酵素薬によるウイルス感染抑制は治療薬として将来的に有用と考える。

3) 長時間作用性抗コリン薬はCOPD安定期治療薬の第一選択である<sup>7)</sup>。長時間作用性抗コリン薬は気管支拡張作用を介して1秒量の増加や咳・痰、息切れの改善、QOLの改善をもたらす。さらに、長時間作用性抗コリン薬は増悪回数を減少して生存率を向上する作用を有する<sup>5)</sup>。COPDの増悪にはライノウイルス感染などの呼吸器ウイルス感染に伴う気道炎症や喀痰増加が関連する。これまで、ライノウイルス感染やウイルス感染誘発の気道炎症に対する長時間作用性抗コリン薬の作用は調べられていなかった。このため、昨年度から長時間作用性抗コリン薬チオトロピウムのライノウイルス感染抑制効果を検討している。

昨年度に報告の通り、本研究において、チオトロピウムは気管上皮細胞から培養液に放出されるライノウイルス量を減少させた。このことから、

チオトロピウムのライノウイルス感染抑制効果が示唆された。感染抑制機序として、チオトロピウムによるライノウイルス感染受容体 ICAM-1 発現抑制作用を認めた。さらに、チオトロピウムによる酸性エンドゾーム減少効果を認めた。これらの結果より、感染受容体発現抑制および RNA 進入抑制を介したチオトロピウムのライノウイルス感染抑制作用が示唆された。

さらに、ライノウイルス感染により、培養液中に炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  および IL-6) が増加し、チオトロピウムの添加によって減少した。したがって、チオトロピウムがライノウイルス感染による気道炎症を抑制する作用を有している可能性も示唆された。

本年度は細胞核蛋白および細胞質蛋白を抽出し、転写因子 NF-kappa B (NF- $\kappa$ B) を測定した。核蛋白は ELISA 法で p50, p65 および c-Rel 量を測定した。細胞質蛋白はリン酸化 I- $\kappa$ B- $\alpha$  (p-I- $\kappa$ B- $\alpha$ ) および I- $\kappa$ B- $\alpha$  総量を Western blot 法で測定した。その結果、p50, p65 および c-Rel 量の減少、p-I- $\kappa$ B- $\alpha$  減少、および I- $\kappa$ B- $\alpha$  増加を認めた。これらの結果はチオトロピウムの NF-kappa B 抑制作用を示唆している。この機序も含めて、チオトロピウムがライノウイルス感染による気道炎症を抑制する作用を有していると示唆された。

## 結 論

新型インフルエンザは季節性インフルエンザに比べて、気道上皮傷害作用および気道炎症作用が

強いと示唆された。抗酵素薬は季節性および新型インフルエンザの感染を抑制すると示唆された。また、長時間作用性抗コリン薬チオトロピウムは転写因子 NF- $\kappa$ B の抑制を介して、受容体である ICAM-1 の発現と炎症性サイトカインの合成、放出を抑制すると示唆された。

## 参考文献

1. Hayden FG, Gwaltney JM Jr : Viral infections : Textbook of Respiratory Medicine, Saunders Co. Philadelphia, pp 748-802, 1988
2. Yamaya M, Shinya K, Hatachi Y, et al : Clarithromycin inhibits type A seasonal influenza virus infection in human airway epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 333 : 81-90, 2010
3. Yamaya M, Nishimura H, Shinya K, et al : Inhibitory effects of carbocysteine on type A seasonal influenza virus infection in human airway epithelial cells. *Am J Physiol*, 299 : L160-168, 2010
4. Palese P, Shaw ML : Orthomyxoviridae. in Knipe DM, Howley PM (Eds), Fields Virology 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1647-1689, 2006
5. Tashkin DP, Celli B, Senn S, et al : A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 359 : 1543-1554, 2008
6. Perez-Padilla R, Rosa-Zamboni D, Leon S, et al : Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med*, 361 : 680-689, 2009
7. 日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第3版作成委員会 : 安定期の管理. COPD (慢性閉塞性肺疾患) 診断と治療のためのガイドライン. 第3版, pp 76-85, 2009

# COPD 肺における Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

## シグナルの位置づけに関する検討

安尾 将法<sup>1</sup>, 野村 弥生<sup>1</sup>, 伊東 理子<sup>1</sup>

花岡 正幸<sup>1</sup>, 久保 恵嗣<sup>1</sup>, Norbert F. Voelkel<sup>2</sup>

信州大学内科学第一講座<sup>1</sup>

Pulmonary and Critical Care Medicine Division and Victoria Johnson Center  
for Obstructive Lung Diseases, Virginia Commonwealth University<sup>2</sup>

### はじめに

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) とはタバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入暴露することで生じた肺の炎症性疾患であり, 末梢気道病変と気腫性病変が様々な割合で複合的に作用することによって起こる進行性の気流閉塞を伴うと定義される疾患である<sup>1)</sup>。禁煙を前提として様々な治療方法が上市, 研究開発されており, 近年では高い evidence を持った治療も出現している<sup>2)</sup>が, 未だ十分とは言えない。COPD 発症の予防策を講じるにしても治療方法を講じるにしても, 発症にどのような因子が関与しているのかを解明することは重要である。

従来 COPD の病因は炎症に伴うプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説を基に説明されてきた。しかしこの仮説では同様に炎症を伴うはずの細菌性肺炎や喘息において COPD (気腫性病変) を発症しないことが説明不能である。近年, この COPD の病態の新しい概念として肺胞構成細胞のアポトーシスが COPD, 少なくとも肺気腫発症の重要な機序として認識されるようになってきた。

この肺胞構成細胞のアポトーシスの原因として, 我々の共同研究グループは重症 COPD 症例において肺組織内の血管内皮増殖因子 (以下 VEGF) が低下していることを報告した<sup>3)</sup>。また, 実験的にも VEGF 受容体を阻害 (SU5416 投与)

することでラット肺の気腫性病変が惹起されることを報告した<sup>4)</sup>。上記二つの報告はいずれも VEGF の低下が肺胞構成細胞のアポトーシスを惹起することを示していたが, なぜ COPD 肺において VEGF の発現が低下しているのかについては解明されていなかった。

今回我々は, COPD 患者肺を用いて, 肺胞構成細胞とくに血管内皮細胞の maintenance factor である VEGF の上流因子である低酸素誘導因子

表 1. 症例プロフィール

Characteristic	No COPD (N=7)	Mild COPD (N=6)	Severe COPD (N=13)
GOLD stage	—	1 and 2	3 and 4
Age (yr)	63.3 $\pm$ 7.1	69.8 $\pm$ 3.6	56.2 $\pm$ 2.1*
Sex (M/F)	1/6	5/1	5/8
FEV1 (%)	115.9 $\pm$ 8.5	79.7 $\pm$ 3.3	21.1 $\pm$ 2.3
Smoking (pack years)	0	35 $\pm$ 6.8	61.3 $\pm$ 9.0
Current smoker (no)	0	1	0
Medication (no)			
Oral Corticosteroid	0	2	1
Inhaled Corticosteroid	0	0	5
Accompanied with lung cancer (no)	4	5	1

Definition of abbreviations; COPD = chronic obstructive pulmonary disease; GOLD = Global Initiative for Obstructive Lung Disease; FEV1 % = Forced Expiratory Volume in 1 Second % predict; Plus-minus values are means  $\pm$  SE.; \*P<0.05 vs mild COPD

(以下 HIF-1 $\alpha$ ) に着目し、この因子が重症 COPD 患者肺において低下しているのかどうか、また VEGF のみならず、既報の関連因子との関係、患者背景や呼吸機能などとの関係などについても調査したのでその結果を報告する。

対象と方法

検討に用いた肺組織は肺移植や手術の目的で切除された計26例の新鮮凍結肺組織を用いた（検体の使用に当たっては NIH Lung Tissue Repository

と The explanted lung tissue bank of the UCHSC Lung Transplant Program からの認可を受けた）。この26例の肺の内訳は、非喫煙健常者肺 7 例、GOLD 分類 stage I, II の肺 6 例、stage III, IV の肺 13 例であった。これらを順に no COPD 群, mild COPD 群, severe COPD 群の 3 群に分けて検討を行った。

新鮮凍結肺から mRNA, 核・細胞質蛋白を抽出し定量的 PCR およびウエスタンブロット法, ELISA 法に用いた。また一部の組織はパラフィ

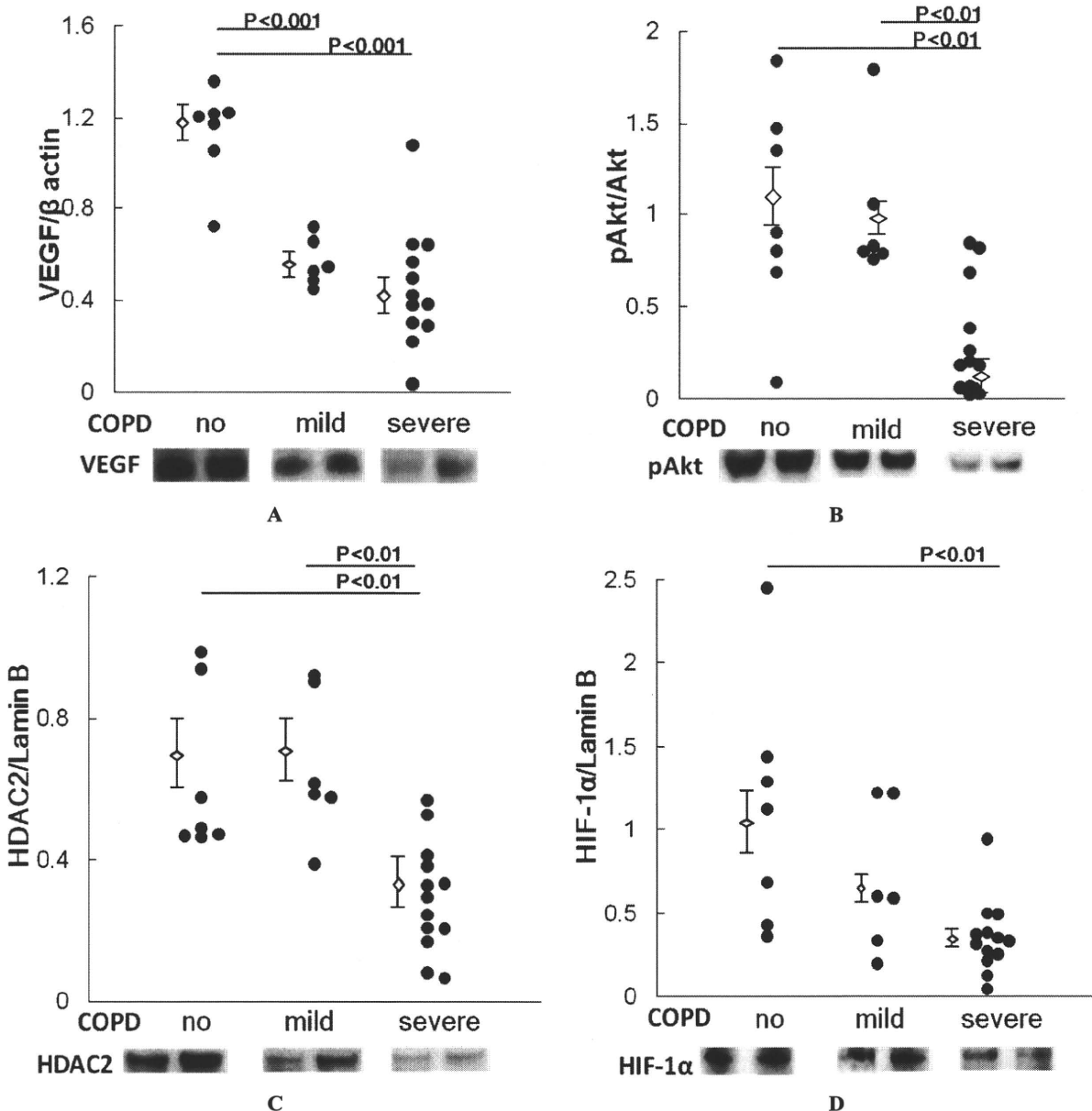


図1. Western blot 法による細胞質・核蛋白発現の検討

ン包埋後、免疫組織化学法を行った。

## 結果

### ①症例プロフィール

検討に用いた26症例の profile を表 1 に示す。検討に用いた COPD 症例はすべて小葉中心型の肺気腫であった。mild COPD 群にくらべて severe COPD 群は年齢において有意差をもって若年齢であった ( $P < 0.05$ )。

### ②Western blot 法による核・細胞質蛋白の発現

個々の Western blot 法による蛋白発現の解析には、発現の程度を Densitometric analysis により解析し定量評価した。細胞質蛋白として VEGF および phospho Akt (pAkt) の発現を検討した。Reference 蛋白として、VEGF に対しては  $\beta$ actin を、pAkt に対しては Akt を用いた (図 1A, B)。核蛋白として HIF-1 $\alpha$  および HDAC2 の発現を検討した。Reference 蛋白としては双方とも Lamin B を用いた (図 1C, D)。

これら 4 種の蛋白はいずれも no COPD 群に比べて severe COPD 群で有意に発現の低下を認めた。また、VEGF では no COPD 群と mild COPD 群との間に、pAkt および HDAC2 では mild COPD と severe COPD との間にも有意な発現の低下を認めた (図 1)。

### ③ELISA 法による HIF-1 $\alpha$ 蛋白の発現解析

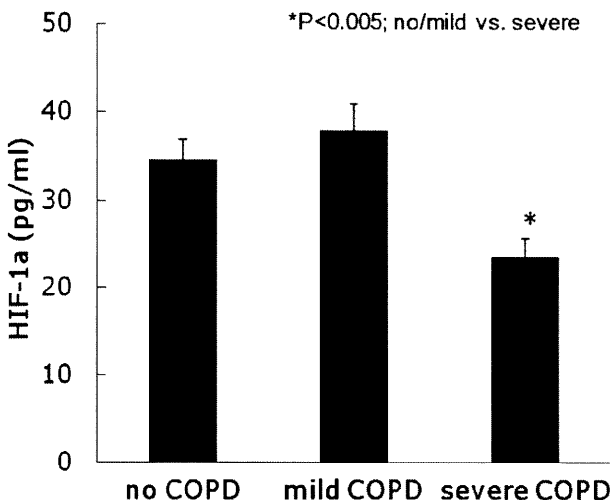


図 2. ELISA 法による HIF-1 $\alpha$  蛋白発現の検討

Western blot 法で得られたデータの信ぴょう性を確認するために、より定量性が高いと思われる ELISA 法を用いた解析を行った。図 2 に示すように、ELISA 法によっても no COPD 群と比べて severe COPD 群の HIF-1 $\alpha$  蛋白発現は有意に低下していた。

### ④HIF-1 $\alpha$ 蛋白発現と HDAC2 蛋白発現の関係

すでに COPD 肺での発現の低下が報告されている HDAC2<sup>5)</sup> との関連を検討したところ、Western blot 法による HDAC2 蛋白と HIF-1 $\alpha$  蛋白発現との間に有意な相関関係が認められた (図 3A)。また、HIF-1 $\alpha$  蛋白の下流シグナルにあたると考えられる、VEGF 遺伝子や VEGF 関連シグナル以外の下流シグナルである GLUT1 遺伝子との間にも有意な正の相関関係を認め、この HIF-1 $\alpha$  蛋白がシグナル伝達に寄与していることが示唆された (図 3B, C)。

### ⑤HIF-1 $\alpha$ 蛋白発現と COPD 重症度との関係

Western blot 法による HIF-1 $\alpha$  蛋白発現と一秒量との間には正の相関を認めた (図 4)。一方で、HIF-1 $\alpha$  蛋白発現と年齢、喫煙歴の間には有意な相関関係は認められなかった。

### ⑥HIF-1 $\alpha$ の免疫組織化学的検討

末梢肺における HIF-1 $\alpha$  の免疫組織化学的検討を行ったところ、HIF-1 $\alpha$  陽性細胞数の alveolar perimeter に対する割合は no COPD 群に比し、severe COPD 群で有意に低下していた (図 5)。

### ⑦HIF-1 $\alpha$ 蛋白と HIF-1 $\alpha$ 遺伝子および HDAC2 遺伝子発現との関連

Western blot 法による HIF-1 $\alpha$  蛋白と定量 PCR 法による HIF-1 $\alpha$  遺伝子および HDAC2 遺伝子 (いずれも Reference gene は  $\beta$ actin) との関連を解析したところ、両遺伝子ともに HIF-1 $\alpha$  蛋白発現との間に正の相関関係を認めた (図 6A, B)。

## 考案

我々の共同研究者である Norbert F. Voelkel の研究室から提唱された“Lung structure maintenance program”<sup>6)</sup> は、VEGF signaling を中心とした lung

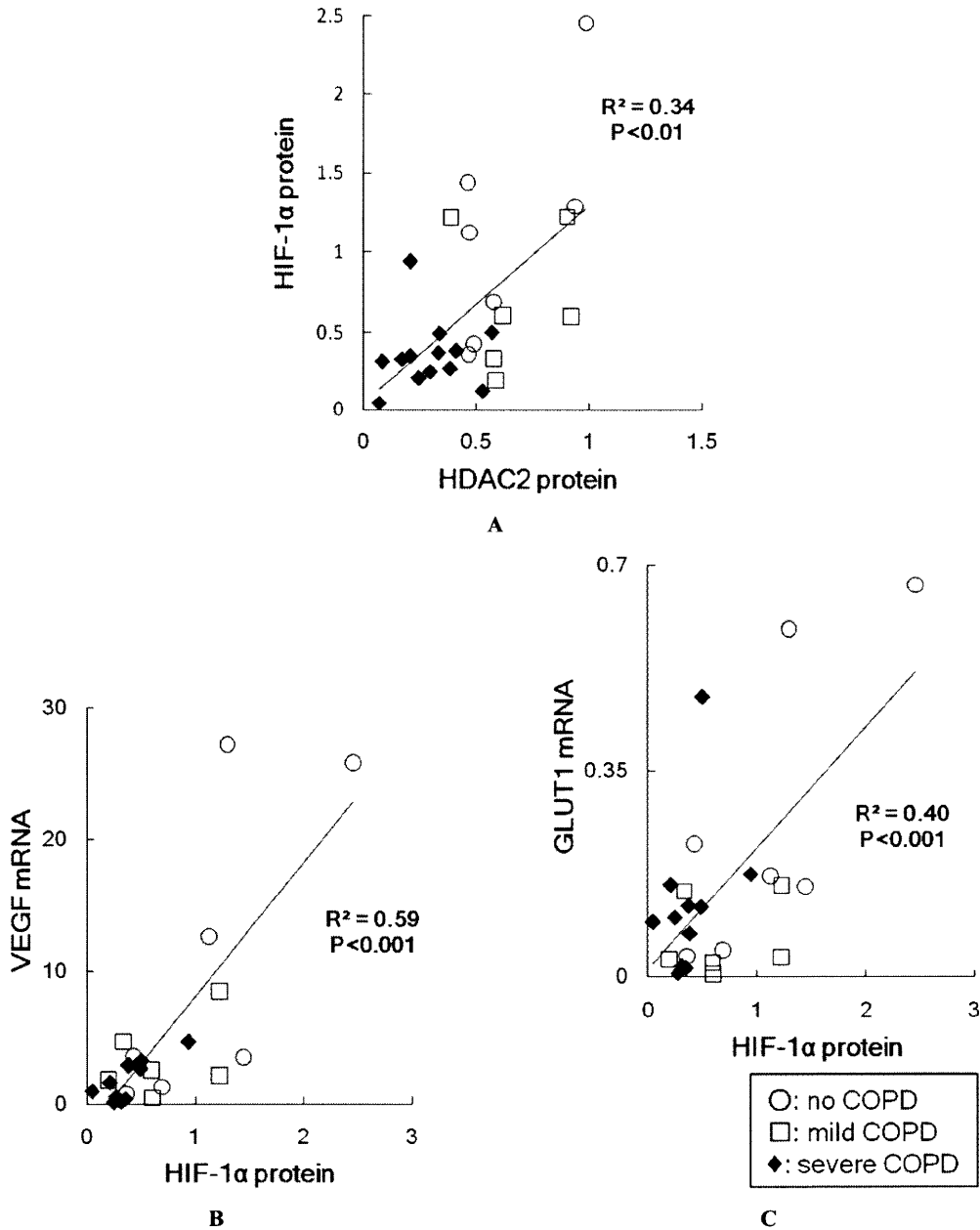


図3. HIF-1α と HDAC2 蛋白の関係および HIF-1α 下流シグナルの相関

endothelial health (survival) の COPD (肺気腫) の病因論の一つである。この “Lung structure maintenance program” における VEGF 発現を調節する因子として “One pathway likely involved in lung cell structure maintenance.” として参考文献 6 を発展させた Review<sup>7)</sup> のなかで取り上げられた因子が HIF-1α である。我々は今回、ヒト COPD (肺気腫優位型) 肺を用いて、VEGF と同様に HIF-1α 蛋白も有意に発現が低下しており、またこの低下

と VEGF 遺伝子との間に相関関係を認めたことで、実際に “Lung structure maintenance program” における VEGF の上流の因子として HIF-1α が位置することを証明し得た。また、我々の今回の検討はまた、既報である重症 COPD 肺での HDAC2 蛋白発現の低下<sup>5)</sup> を支持するものであった。この HDAC2 蛋白の発現と HIF-1α の蛋白と遺伝子いずれもが正の相関関係であったことと、HIF-1α 蛋白と遺伝子発現との間にも正の相関があったこ

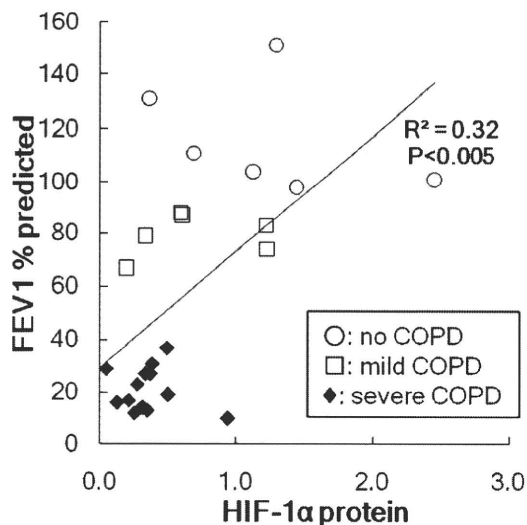


図4. HIF-1α 蛋白発現と%FEV1 との相関関係

とは、これまで考えられてきた HIF-1α 蛋白の分解による活性制御の他に、HIF-1α 遺伝子発現による HIF-1α シグナル伝達の経路の存在を示唆する所見として興味深いと思われた。

また、今回の我々の検討では、HIF-1α 蛋白発現の程度は COPD の重症度を規定する要素である一秒量との間に相関関係が認められたが、一方

で喫煙歴や年齢との間には相関関係が認められなかった。このことは COPD 肺における HIF-1α 蛋白の発現は喫煙歴や年齢とは独立した COPD の重症度予測因子であるといえると思われる。

COPD 肺において、産生の過剰にせよ、消去の障害にせよ、過剰な酸化ストレスがその発症にかかわっていることはすでに確立されたものである<sup>1,8)</sup>。過剰な酸化ストレスの存在は“Lung structure maintenance program”の中心的存在である VEGF の発現を低下させる<sup>9)</sup>ことが報告されている。今回の我々の検討はヒト検体を扱った研究であり、過剰な酸化ストレス下での HIF-1α-VEGF シグナルの低下を直接証明することはできないが、HIF-1α-VEGF シグナルは、喫煙の反復やこれに伴う炎症による過剰な酸化ストレスによってその発現が低下し、この結果 VEGF-pAkt およびその下流につながる細胞生存シグナルの低下が肺胞構成細胞のアポトーシスを招来し、結果として肺気腫型の COPD を形成するという構図の中に位置づけられると考えられた (図7)。

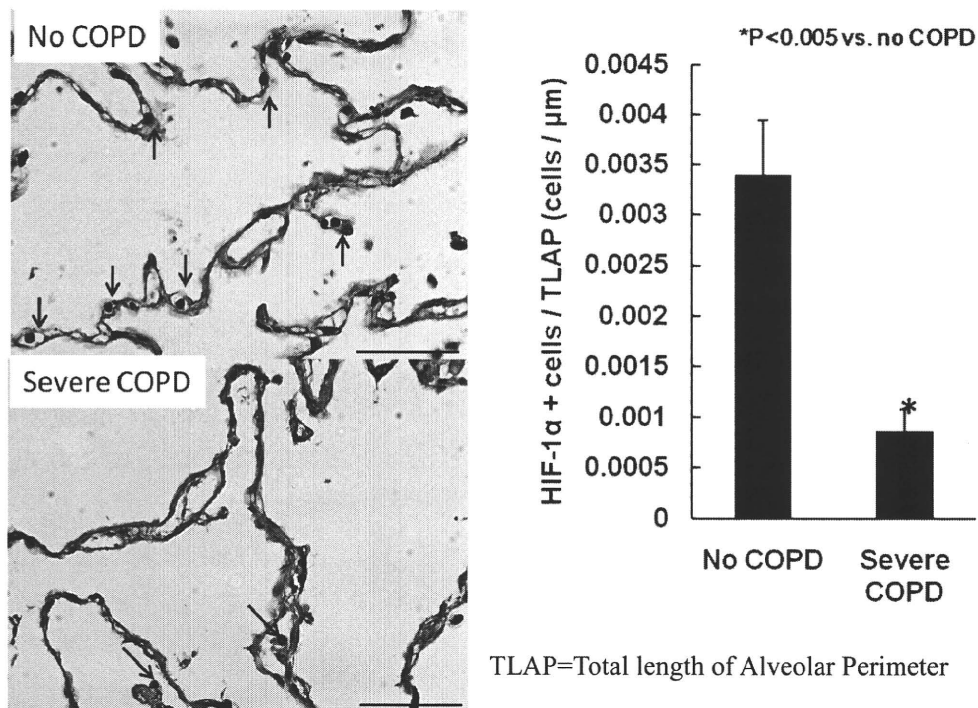


図5. HIF-1α 蛋白発現における免疫組織化学的検討



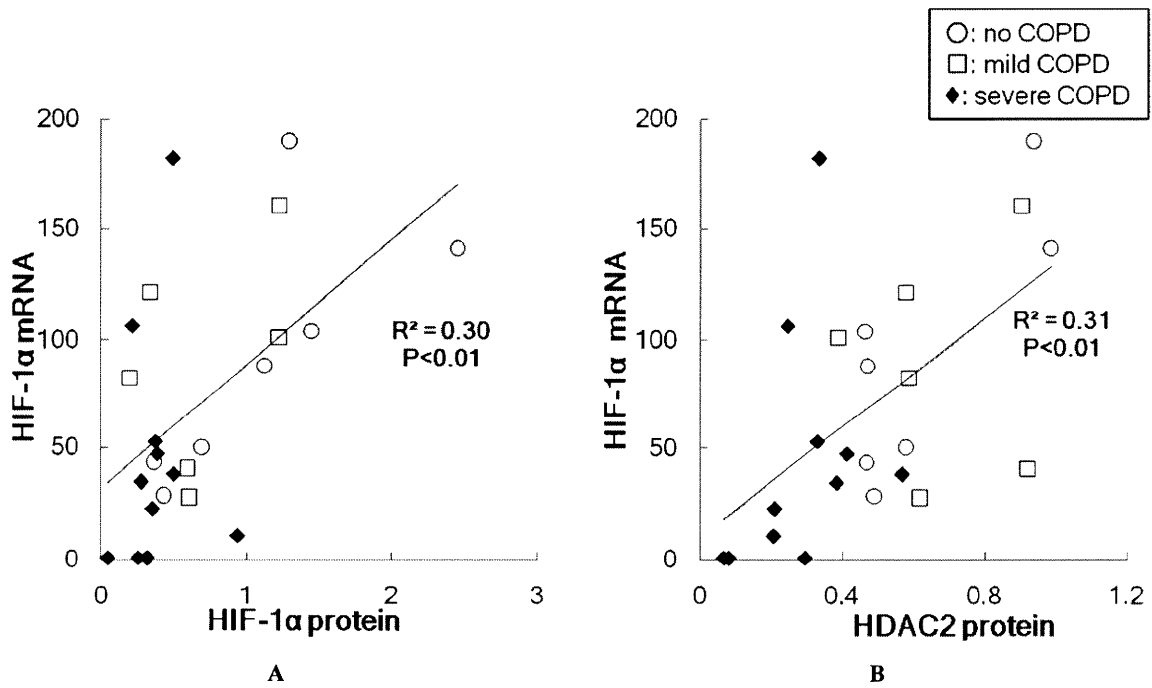


図 6. HIF-1α 蛋白と HIF-1α 遺伝子・HDAC2 遺伝子との相関関係

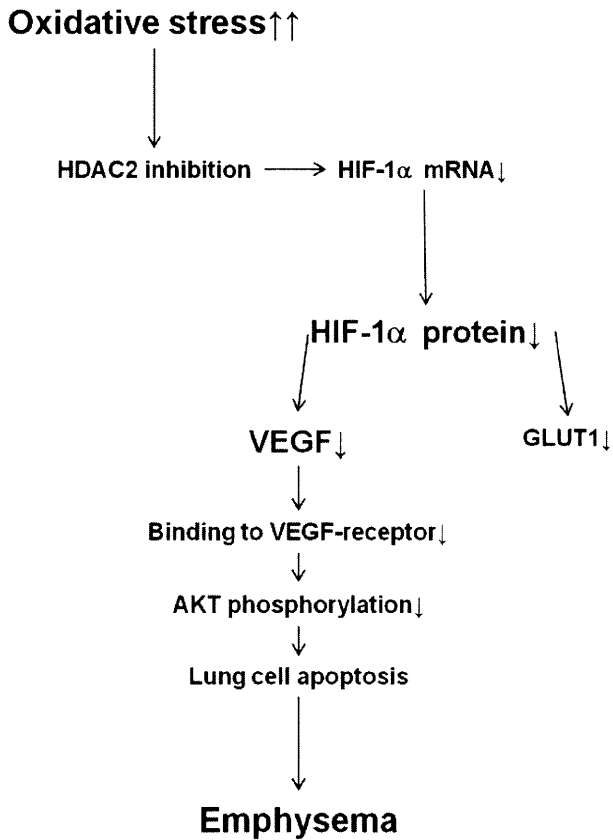


図 7. COPD 肺における HIF-1α-VEGF シグナルの位置づけ

参考文献

1. 日本呼吸器学会 COPD ガイドライン作成委員会：COPD（慢性閉塞性肺疾患）診断と治療のためのガイドライン 第3版。メディカルレビュー社、東京、2009
2. Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, Decramer M: UPLIFT Study Investigators. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 359: 1543-1554, 2008
3. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF: Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 737-744, 2001
4. Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF: Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest*, 106: 1311-1319, 2000
5. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, Barnes PJ: Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 352: 1967-1976, 2005
6. Voelkel NF, Vandivier RW, Tuder RM: Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung*

*Cell Mol Physiol*, 290 : L209-221, 2006

7. Taraseviciene-Stewart L, Voelkel NF : Molecular pathogenesis of emphysema. *J Clin Invest*, 118 : 394-402, 2008
8. Deslee G, Woods JC, Moore C, Conradi SH, Gierada DS, Atkinson JJ, Battaile JT, Liu L, Patterson GA, Adair-Kirk TL, Holtzman MJ, Pierce RA : Oxidative damage to nucleic acids in severe emphysema. *Chest*, 135 : 965-974, 2009
9. Klekamp JG, Jarzecka K, Perrett EA : Exposure to hyperoxia decreases the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in adult rat lungs. *Am J Pathol*, 154 : 823-831, 1999

# タバコ抽出液によるラット肺気腫における カルボシステインの効果

花岡 正幸<sup>1</sup>, 野村 弥生<sup>1</sup>, 池川香代子<sup>1</sup>, 吾妻 俊彦<sup>1</sup>, 北口 良晃<sup>1</sup>

伊東 理子<sup>1</sup>, 安尾 将法<sup>1</sup>, Norbert F. Voelkel<sup>2</sup>, 久保 恵嗣<sup>1</sup>

信州大学医学部内科学第一講座<sup>1</sup>, バージニアコモンウェルス大学<sup>2</sup>

## はじめに

COPD は慢性進行性の気流閉塞を特徴とする疾患で、先進国における最大の原因は喫煙である。COPD の病因として、オキシダント・アンチオキシダント不均衡説, プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説, あるいはアポトーシスの関与などが提唱されている。このうち、過剰な酸化ストレスは、細胞障害や組織破壊を惹起する<sup>1,2)</sup>のみならず、好中球エラスターゼや  $\alpha 1$  アンチトリプシンの活性化<sup>3)</sup>, あるいはアポトーシスの誘導<sup>4)</sup>を通して、COPD の病態形成に深く関与すると考えられている。

カルボシステイン (carboxymethylcysteine; CMC) は喀痰調整薬として日常臨床で広く使用されているが、近年その抗酸化作用に注目が集まっている<sup>5)</sup>。Pinamonti らの報告<sup>6)</sup>では、CMC を投与した COPD 患者の気管支肺胞洗浄液中の酸化ストレスは著明に減少していた。また、培養血管内皮細胞や気道上皮細胞における、抗酸化力の増強作用やアポトーシスの抑制効果も報告されている<sup>6,7)</sup>。

本研究では、タバコ抽出液 (cigarette smoke extract; CSE) によるラット肺気腫に対する CMC の抑制効果と、その機序を検討した。

## 対象と方法

本研究計画は、信州大学動物実験委員会より承認を得た。6週齢のオス SD ラットを、①コントロール群、②CSE 群、③CSE + CMC 125mg/kg/day (低用量 : L) 群、④CSE + CMC 250mg/kg/day

(高用量 : H) 群の 4 群に分けた。コントロール群は第 1, 8, 15日にリン酸緩衝液 (PBS) を、CSE 群は第 1, 8, 15日に CSE をそれぞれ腹腔内投与した。CSE は既報告<sup>8,9)</sup>に基づいて、マールボロ (フィリップモリス社) から作製した。CMC は杏林製薬から譲渡を受け、蒸留水に溶解し経食道的に連日投与した。第21日に全身麻酔下で採血と肺の摘出を行った。右肺はすり潰して上清を採取し、種々のメディエーターの測定に用いた。また、左肺は進展固定ののちパラフィン包埋を行い、組織学的な検討に用いた。本研究では以下の項目に関し検討を加えた。

### (1) 組織学的検討

肺組織の HE 染色を行い、肺胞拡大の指標である mean linear intercept (MLI) と、肺胞破壊の指標である destructive index (DI) を計算した。

### (2) 抗酸化力の測定

肺と血清の抗酸化力を、bioantioxidant power (BAP) テストにて測定した。

### (3) アポトーシスの検討

肺組織の TUNEL 染色を行い、TUNEL 陽性細胞をカウントし、apoptotic index (AI) を計算した。また、活性化カスパーゼ 3 の免疫染色を行った。

### (4) ザイモグラフィー

肺の matrix metalloproteinase (MMP)-2 および MMP-9 の活性を、ザイモグラフィーを用いて測定した。

## 結果

### (1) 組織学的検討

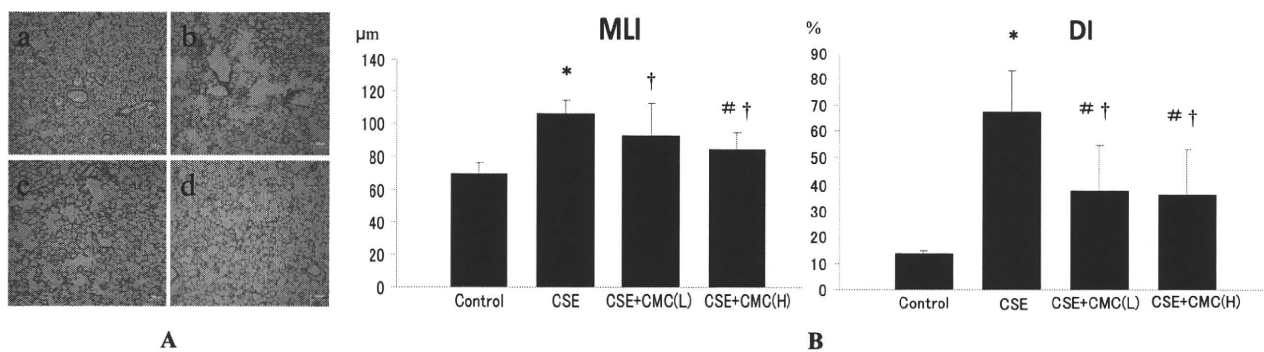


図1. 肺の組織学的検討 A. HE染色; a: コントロール群, b: CSE群, c: CSE+CMC(L)群, d: CSE+CMC(H)群 B. mean linear intercept (MLI) と destructive index (DI)

図1に肺組織のHE染色と、MLIおよびDIを示す。CSEの投与により肺胞腔の有意な拡大と破壊が惹起されたが、これら変化はCMCの同時投与により有意に抑制された。

(2) 抗酸化力

図2に肺と血清の抗酸化力(BAP)を示す。

CSEの投与により肺および血清のBAPは有意に低下したが、CMCの同時投与により回復を認めた。

(3) アポトーシス

図3にTUNEL染色とAIを、図4に活性化カスパーゼ3の免疫染色を示す。CSEの投与によ

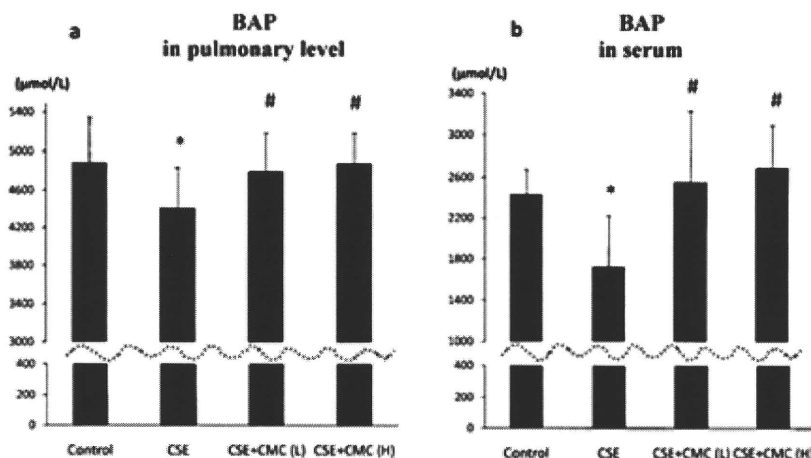


図2. 肺と血清の抗酸化力 (bioantioxidant power; BAP)

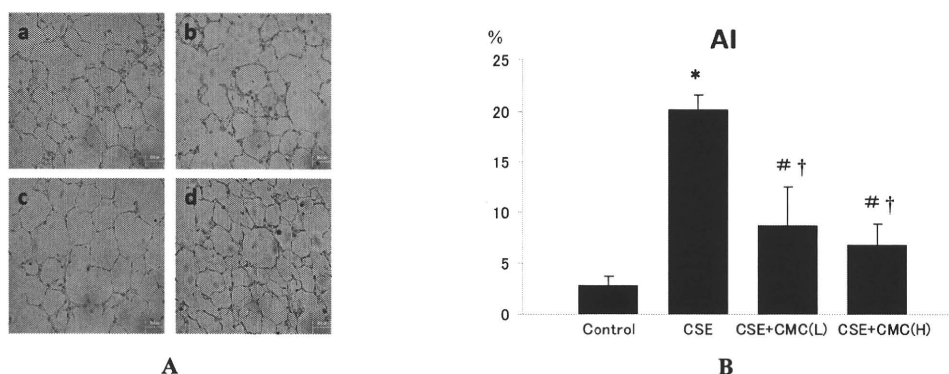


図3. 肺のアポトーシス (1) A. TUNEL染色; a: コントロール群, b: CSE群, c: CSE+CMC(L)群, d: CSE+CMC(H)群 B. apoptotic index (AI)