

5) Sato H. et al., KL-6 levels are elevated in plasma from patients with acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 2004; 23:142-145

6) Gendler SJ et al., Molecular cloning and expression of human tumore-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem* 1990;265:15286-15293.

7) Janssen R et al., The Mucin-1 568 adenosine to Guanine polymorphism influences serum Krebs von den Lungen-6 levels. *Am J Respir Cell Mol Bio.* 34:496-499, 2006

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Phung TT, et al., Interleukin 12 and myeloperoxidase (MPO) in Vietnamese children with acute respiratory distress syndrome due to Avian influenza (H5N1) infection. *J Infect.* 62(1): 104-6. 2011

2) Roos D,et al., Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis.* 45(3): 246-65. 2010

2. 学会発表

1) 布井博幸, 河内正治, Thuy T.B. Phung, San T. Luong, Liem T. Nguyen, 岡本竜哉, 本間栄, 鈴木和男. ベトナムでの呼吸促進症候群における血中 KL-6 と cytochrome c を用いた病態解析—H5N1 インフルエンザ感染による劇症型 ARDS の理解のために—第 16 回 MPO 研究会, 仙台, 1 月 2011 年

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. なし

3. その他

図1

生存／死亡者間のKL-6比較

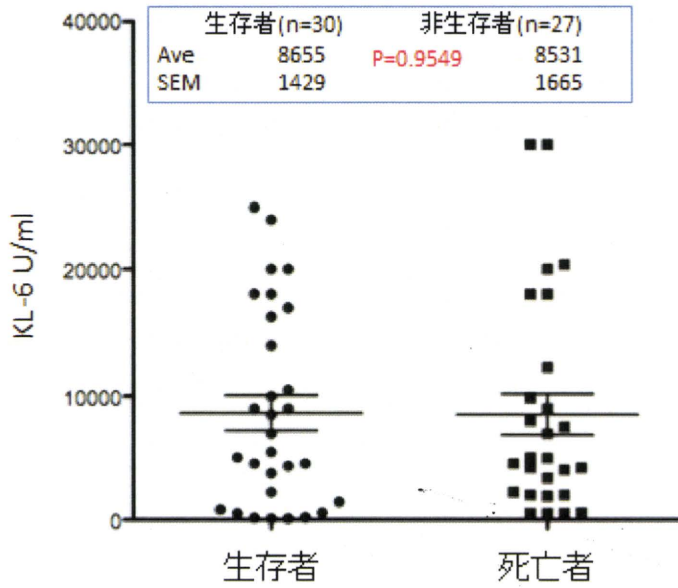


図2

H5N1+/-groupでのKL-6比較

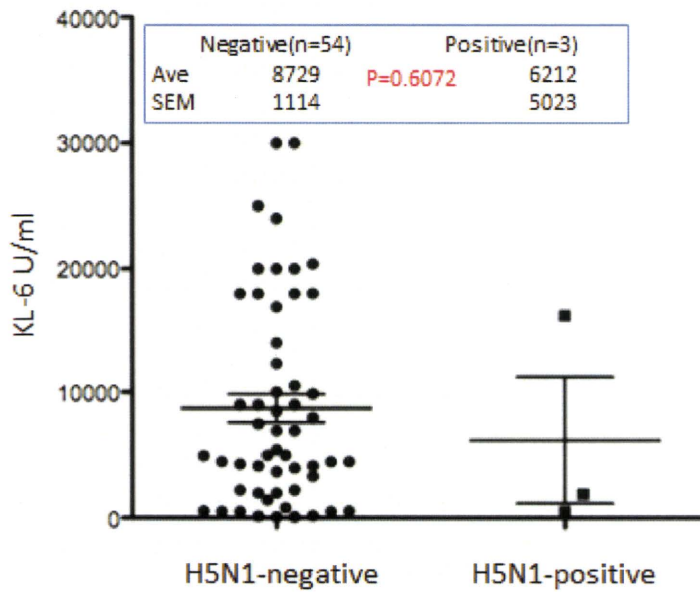


図3

KL-6/SP-D/other markers

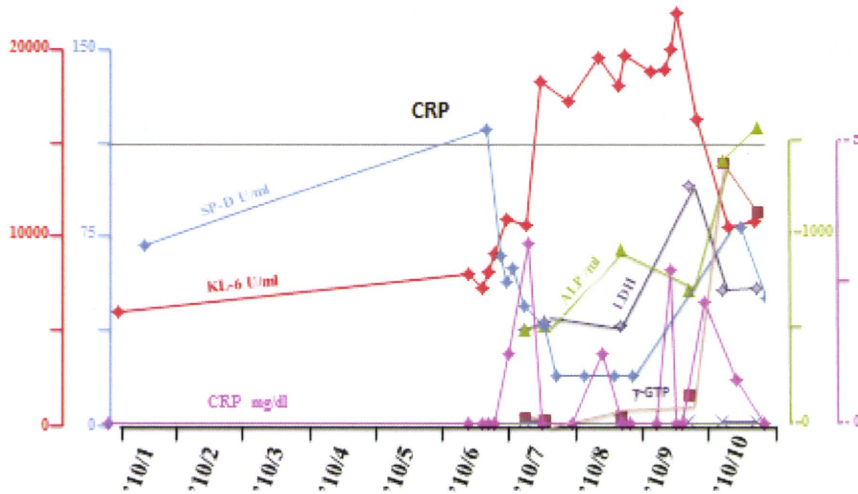
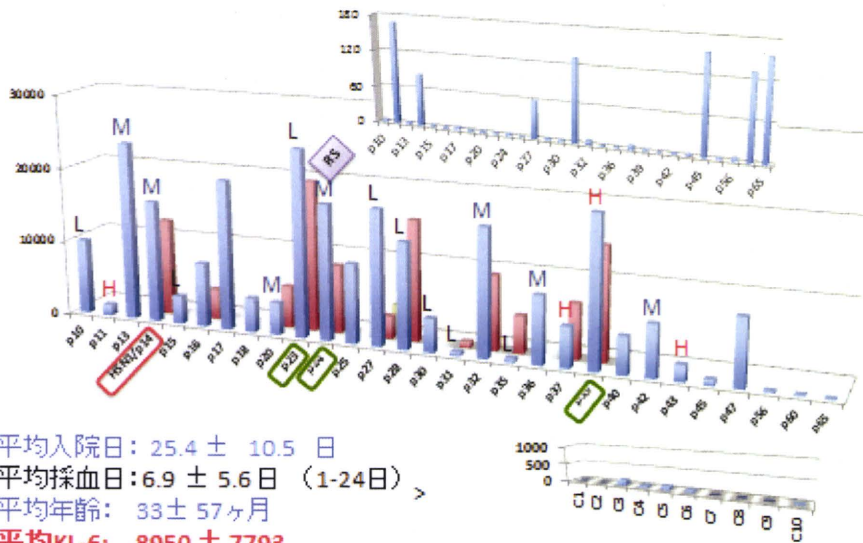


図4

生存者(n=29)のKL-6値

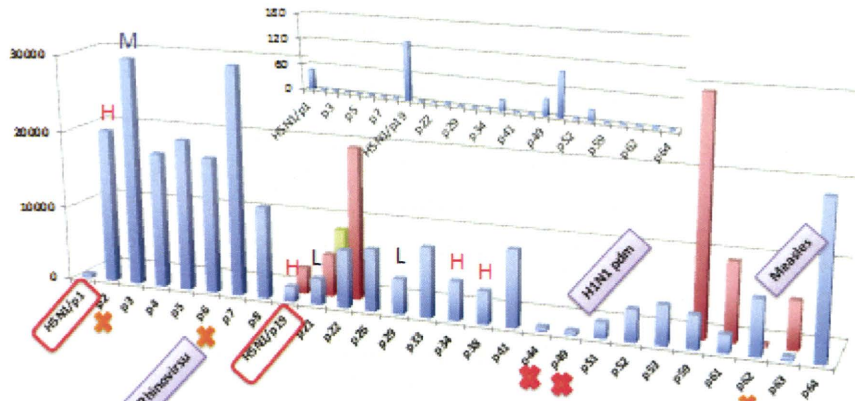


平均入院日: 25.4 ± 10.5 日
 平均採血日: 6.9 ± 5.6日 (1-24日)
 平均年齢: 33 ± 57ヶ月
平均KL-6: 8950 ± 7793

生存者

図5

死亡症例(n=27)のKL-6値



平均入院日: 25.4 ± 10.5 日	平均入院日: 16.5 ± 10.5 日
平均採血日: 6.9 ± 5.6 日 (1-24日)	平均採血日: 6.5 ± 4.8 日 (1-20日)
平均年齢: 33 ± 57ヶ月	平均年齢: 15.7 ± 31.0ヶ月
平均KL-6: 8950 ± 7793	> 平均KL-6: 8531 ± 8651
生存者	死亡者

高病原性鳥インフルエンザの人感染症に対する診断/治療ガイドライン

本間 栄¹，河内正治²，布井博幸³，菊池 直¹，杉野圭史¹
東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科¹
国立国際医療研究センター²
宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野³

研究要旨

新たなH1N1-pdmより病原性の高い鳥インフルエンザpdmが到来した際の有用な臨床ガイドラインとなりうる汎用性と実用性の高い診断/治療ガイドラインの作成を目指す。

A. 研究目的

ガイドライン作成主旨

高病原性鳥インフルエンザに対するより簡便な迅速遺伝子診断法の開発、関連バイオマーカーの検索ならびに、より有効な薬剤の選択、投与方法、呼吸管理法の開発が喫緊の課題である。そこで、新たなH1N1-pdmより病原性の高い鳥インフルエンザpdmが到来した際の有用な臨床ガイドラインとなりうる汎用性と実用性の高い診断/治療ガイドラインの作成を目指す。

B. 研究方法

対象疾患・記載内容

H5N1以外にH1N1も含め、小児から成人患者に対応した内容にする。

本研究班の特徴として基礎研究のより学術的な内容も含める。

読者対象

プライマリーケア医の診断の助けとなる。

執筆・レビューワー体制

執筆・レビューワーはガイドライン作成委員のみならず班員の中からも選出する。各項目にレビューワー1～2名程度を設ける。
高病原性鳥インフルエンザの人感染症に対する診断/治療ガイドライン作成委員会の構成（案）

ガイドライン作成委員会

▪委員長：本間 栄

▪委員：河内正治,布井博幸,鈴木和男,山本健二,大島正道,川上和義,赤池孝章,中島典子,影山 努

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班平成22～24年度

▪研究代表者：河内正治

▪分担研究者：布井博幸,本間 栄,鈴木和男,山本健二,大島正道,川上和義,赤池孝章,中島典子,影山 努

▪臨床医師団：岡本竜哉,佐多徹太郎,長谷川秀樹,志賀由佳,佐藤正規

▪研究協力者：松下竹次,前原康宏,平橋淳一,丸茂丈史,赤川清子,星野昭芳,秋山 透,荒谷康昭,永田典代,長谷川明洋,古屋博行

▪アドバイザー：小川道雄,藤倉敏夫

C. 研究結果

鳥インフルエンザに関しては臨床現場における迅速診断法はいまだに確立されていない。従来のARDS症例の自験例における検討では有用な検査法として、その急性期の病態把握と予後の推定にKL-6以外にSP-Dを測定する意義が示唆された。また、新規治療・予防法として、PMX-DHP吸着療法施行症例では予後に有意差は認めなかったものの、循環動態、特に血圧を適正に維持するカテコラミン量を減じることができた。また低容量換気(HFOV)の使用は、酸素化の上昇、高濃度

酸素投与の回避、人工呼吸器関連肺損傷 (VALI)の回避等の効果があり ARDS の肺保護換気として有効な呼吸管理法であった。さらに、気管内挿管・人工呼吸器管理を施行した症例において、15 員環系マクロライド薬 (AZM)の予防投与により人工呼吸器関連肺炎(VAP)の発症率が有意に低下した。今後、これらを踏まえて高病原性鳥インフルエンザに対するより簡便な迅速遺伝子診断法の開発、関連バイオマーカーの検索ならびに、より有効な薬剤の選択、投与方法、呼吸管理法を開発する。

ガイドライン作成進行スケジュール (案)

- 1) 第1回合同委員会：2011年7月
- 2) 原稿締切：2011年12月
- 3) 第2回合同委員会：2012年1月
- 4) 調整原稿締切：2012年5月
- 5) レビューワーへの査読締切：2012年7月
- 6) 第3回合同委員会：2012年9月
- 7) 再校出校・校閲：2012年10月
- 8) 意見集約、内容の最終確定：2012年12月
- 9) 三校出校・印刷・製本：2013年1月
- 10) 刊行：2013年1月末～2月

D. 考案

ガイドライン化の問題点

診療ガイドラインは根拠に基づいた医療 (EBM)の手順に沿った作成方法が用いられる。エビデンスの入手方法とその質 (レベル) の評価方法、推奨の強さ (グレード) の決定方法が明記されなければならない。以上の点に関し、高病原性鳥インフルエンザの治療に関する推奨度設定の際のエビデンス(RCT)がないことより手引きとした方が良い。

E. 結論

本「手引き」の内容は、一般論として臨床現場の意思決定を支援するものであり、様々な病状を示す患者に対して画一的に用いられることなく、個別的な治療を行うための参考の書として活用されると共に、本「手引き」が医療訴訟等の資料になるものではない。

F.健康危険情報

因果関係のある有害事象なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) Gocho K, Isobe K, Kaburaki K, Honda Y, Mitsuda A, Akasaka Y, Shimada N, Takagi K, Homma S: Malignant pleural mesothelioma presenting as an acute surgical abdomen due to metastatic jejunal perforation. Intern Med, 49:597-601, 2010
- 4) Hata Y, Isobe K, Sasamoto S, Tamaki K, Takahashi S, Sato F, Mitsuda A, Okubo Y, Shibuya K, Homma S, Takagi K: Pulmonary hamartoma diagnosed by convex probe endobronchial

- ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA). Intern Med, 49:1171-1173, 2010
- 5) Tanaka N, Kusunoki Y, Kaneko K, Yamamoto T, Kaburaki M, Muraoka S, Abe H, Endo H, Sato D, Homma S, Shibuya K, Kawai S. Systemic lupus erythematosus complicated by recurrent pneumothorax: case report and literature review. Jpn J Clin Immunol (Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi) 33(3):162-168, 2010
- 6) Ito T, Sugino K, Satoh D, Muramatsu Y, Sano G, Sato K, Sakaguchi S, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Hata Y, Shibuya K, Uekusa T, Kurosaki A, Homma S: Bird fancier's lung which developed in a pigeon breeder presenting organizing pneumonia. Intern Med, 49:2605-0608, 2010
- 7) 本間 栄、菊池 直、杉野圭史：ARDSにおける血清 KL-6、SP-D 値と肺組織内の局在・分布-特発性間質性肺炎との比較-。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」平成 21 年度総括・分担研究報告書, p19-23,2010
- 8) 本間 栄、菊池 直：ARDS における有用な検査法ならびに有効な治療・予防法の開発と重症化要因の臨床的検討。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」平成 21 年度総括・分担研究報告書, p23-26,2010
- 書籍
- 1) 杉野 圭史、本間 栄 (分担)：検査手順と診断フローチャート。間質性肺疾患診療マニュアル(久保恵嗣、藤田次郎編) p36-40.南江堂, 東京, 2010
2. 学会発表
- 国際会議
- 1) S. Homma, A. Azuma, H. Taniguchi, T. Ogura, Y. Mochizuki, Y. Sugiyama, S. Kudoh: A randomized, multicentre, controlled trial of inhaled N-acetylcysteine in patients with the early stage of idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. 2010 American Thoracic Society International Conference New Orleans USA, 2010.5
- 2) F.Ishida, K.Sugino, Y. Muramatsu, D. Sato, S. Sakaguchi, G. Sano, K. Isobe, S.Sakamoto, Y.Takai, J. Tatebe, T. Morita, C. Nishimura , S. Homma: Efficacy of Inhaled N-acetylcysteine on Lung Function and Redox Balance in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. 2010 American Thoracic Society International Conference New Orleans USA, 2010.5
- 3) Sugino K, Hebisawa A, Uekusa T, Homma S: Mechanisms of airway obliteration in human bronchiolitis obliterans. 2010 American Thoracic Society International Conference New Orleans USA, 2010.5
- 国内会議
- 1) 本間 栄：閉塞性細気管支炎(BO)の臨床像と形態学的特徴-DPB との比較-

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 日本内科学会東北地方会・第55回生涯教育講演会（教育講演），仙台，2010.2 | なし |
| 2) 鏑木教平、佐野 剛、菊池 直、伊藤貴文、後町杏子、和田知博、太田宏樹、岩田基秀、山越志保、石田文昭、阪口真之、佐藤大輔、佐藤敬太、磯部和順、坂本 晋、高井雄二郎、 <u>本間 栄</u> ：mesalazine（ペンタサ）が原因と考えられた急速進行性間質性肺炎の1例。第188回日本呼吸器学会関東地方会，東京，2010.2 | 2) 実用新案登録
なし |
| 3) 杉野圭史、石田文昭、杉野圭史、村松陽子、佐野 剛、磯部和順、坂本 晋、高井雄二郎、建部順子、盛田俊介、 <u>本間 栄</u> ：IPFにおけるNAC単独吸入療法の効果とレドックス制御。第50回日本呼吸器学会学術講演会，京都，2010.4 | 3) その他
なし |
| 4) 佐藤敬太、草野英美子、坂本 晋、石田文昭、阪口真之、佐藤大輔、佐野 剛、磯部和順、高井雄二郎、 <u>本間 栄</u> ：MPA合併肺病変の臨床的検討。第50回日本呼吸器学会学術講演会，京都，2010.4 | |
| 5) 杉野圭史、村松陽子、菊池 直、阪口真之、佐藤敬太、佐野 剛、坂本 晋、高井雄二郎、渋谷和俊、植草利公、 <u>本間 栄</u> ：鳥飼病における肺組織内のKL-6、SP-D産生細胞の局在・分布に関する検討。第30回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会，浜松，2010.10 | |

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1) 特許取得

2009 パンデミックインフルエンザウイルス感染症の病理学的解析

研究分担者 中島典子 国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官
研究協力者 佐藤由子 国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官

研究要旨

2009H1N1 パンデミックインフルエンザウイルス感染症 20 例の剖検組織を病理学的に解析した。び慢性肺胞障害 (DAD) を呈したウイルス性肺炎は 5 例、気管気管支炎に急性の肺うっ血、肺水種、肺出血などを呈した例は 5 例であった。その他、二次性の細菌性肺炎が 5 例、基礎疾患の増悪が 2 例、肺病変のない例が 2 例、解析不可が 1 例であった。ウイルス抗原は呼吸器官に限局し 10 例で陽性であったが、季節性インフルエンザと異なり肺胞上皮細胞に検出された例が 4 例あり、これらの組織所見はすべて硝子膜を伴う DAD であった。また肺胞領域から多量のウイルス核酸が回収された例においては、鳥型レセプターに親和性のたかい D222G のクローンが major であることがわかり、重症肺炎の病因の 1 つであると考えられた。

A. 研究目的

2009H1N1 パンデミックインフルエンザウイルスは H5N1 鳥インフルエンザウイルスと比較して病原性が低いが、感染すると ARDS を呈し、急性の呼吸不全で死亡する可能性がある。本邦での剖検例を解析することで 2009H1N1 インフルエンザの病態を説明する。

B. 研究方法

1. 材料：2009 年 8 月から 2010 年 6 月まで国立感染症研究所・感染病理部に病理学的検索を依頼してきた 15 医療機関からの 2009H1N1 インフルエンザウイルス感染症死亡例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織。倫理委員会承認番号：247

2. 方法：①-④について解析した。

- ①ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色標本による組織所見。
- ②A 型インフルエンザ NP 抗体を用いた免疫組織化学および細胞マーカー蛋白抗体との二重染色による感染細胞同定。
- ③FFPE 組織切片中のインフルエンザウイルスの定量。
- ④ウイルス抗原陽性例に関しては HA のレセプター結合部位のアミノ酸配列の解析。

C. 研究結果

1. 20 剖検症例の臨床的情報 (表 1、2) 20 例の 2009 パンデミックインフルエンザにおける男女比は 7 : 3、13 例が 15-59 歳で、13 例が 3 日以内に死亡し、14 例が抗ウイルス剤を使用していた。

表 1. 20 剖検症例の特徴

Characteristic	Case No. (%)	
Male	14	70%
Age, median (range) year	39.8	(2-81)
0-14	3	15%
15-29	3	15%
30-44	8	40%
45-59	2	10%
59-75	3	15%
75<	1	5%
Clinical history (some were overlapped)		
Cardiovascular disease	8	40%
Obesity (BMI>30)	5	25%
Asthma	3	15%
Diabetes	3	15%
Mental retardation	3	15%
Psychotic disorder	2	10%
COPD	2	10%
Cerebral hemorrhage	2	10%
Autoimmune disease	2	10%
No preexisting disease	5	25%
Clinical symptom (some were overlapped)		
Fever	19	95%
Cough	9	45%
Dyspnea	6	30%
Wheezing	2	10%
Diarrhea	4	20%
Myalgia	2	10%
General fatigue	3	15%
Seizure	1	5%
Clinically suspected myocarditis	4	20%

BMI:body mass index (kg/m²)

2. 組織所見

組織所見としては上気道では炎症と浮腫、上皮の壊死、出血がみられ、肺野では浮腫、硝子膜形成、炎症、線維化という一連のDADの所見のいずれかが認められている。必ずしもすべての剖検例の肺組織がDADを呈しているわけではない。DADは呈さず好中球が浸潤する細菌性肺炎を呈するものや、壊死性出血性気管支炎はあっても肺病変としては肺うっ血、肺水腫、肺出血などの非特異的な所見のみの例もあった。

3. 免疫組織化学によるウイルス抗原の検出

A型インフルエンザウイルスNP抗原は呼吸器官に限局して検出され、10例で陽性であった。検出部位によりH5N1鳥インフルエンザのように肺胞上皮細胞中心に検出された例(図1)、季節性インフルエンザのように上気道(気管、気管支、気管支腺上皮、細気管支)にのみウイルス抗原が検出された例(図2)、両方に検出された例(図3)の3つの群に分けられた。

図 1.

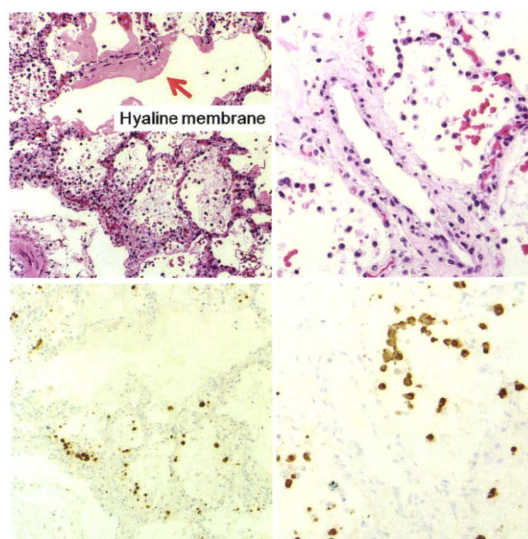


図 2

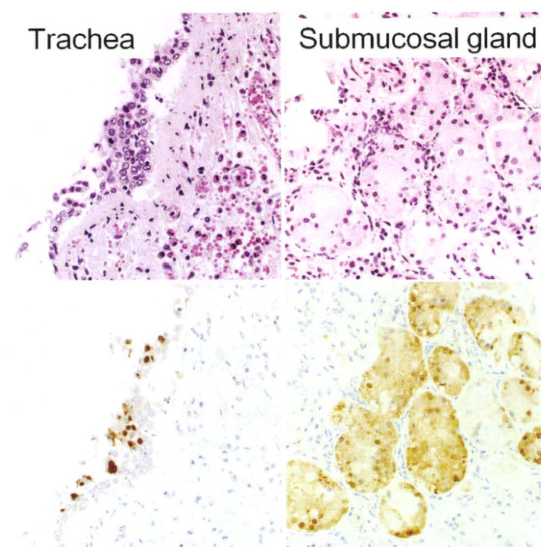
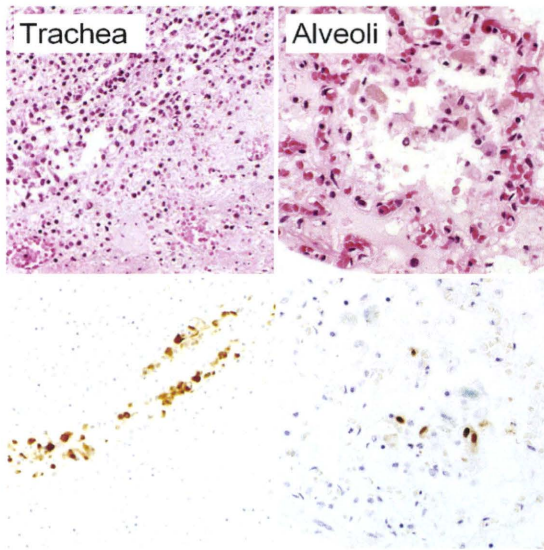


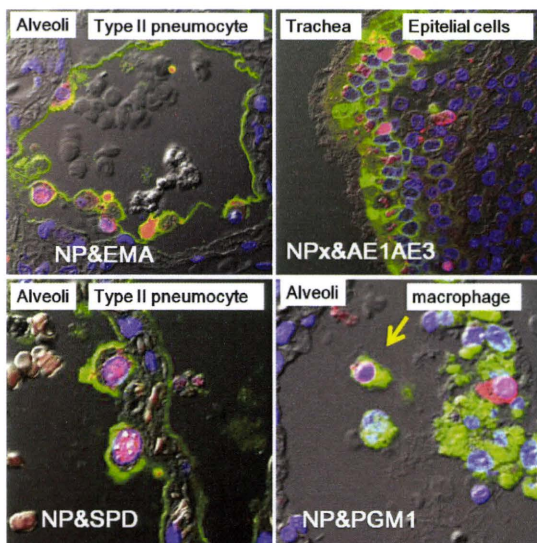
図 3.



(図 1-3 : 上段は HE 染色像、下段は免疫組織化学で茶色がインフルエンザウイルス NP 抗原)

硝子膜を形成する急性の DAD を呈した 4 例ではすべてウイルス抗原が肺胞上皮細胞から検出された (図 4 上段右、下段右)。

図 4 インフルエンザウイルス感染細胞の同定 (二重免疫組織化学)



Red:InfNP, Green:Cell marker protein, Blue:Nucleus

4. 定量 RT-PCR による組織切片中の 2009H1N1 インフルエンザコピー数 (表 3) 5 μ m のパラフィン包埋組織切片 2 枚から抽出した RNA 中のウイルスコピー数を β アクチンのコピー数とともにリアルタイム RT-PCR 法で解析した。ウイルスコピー数は 1 細胞中に存在するアクチンコピー数を 1500 個として換算している。表 3 に結果を示す。1 細胞平均コピー数が 0-1、1-10、10-50、50-100、100-500、500 以上をそれぞれ 1+、2+、3+、4+、5+、6+とした。

5. 2009H1N1 インフルエンザウイルス HA のレセプター結合部位の解析 Case1-10 について解析した。Case 1 についてのみ気管と肺から回収されたクローン majority が異なるのがダイレクトシーケンスでわかった (図 5)。気管では 222D が優位であったが、肺では 222G が優位であった。222G は鳥型レセプターに親和性が強い。

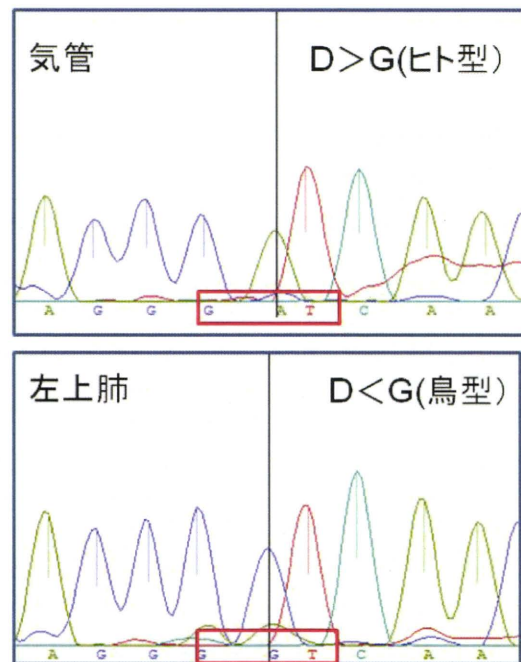


図 5 各気道部位から回収されたウイルスのレセプター結合部位 (HA) の塩基配列の

特徴 (Case1)

D. 考案

病理学的解析をすることで臨床的にはインフルエンザ肺炎と診断されている症例の中に季節性インフルエンザのように2次性の細菌性肺炎であって、インフルエンザウイルスは上気道のみを検出される例があることがわかった。肺以外の組織や血液の検索により、ウイルス血症や全身感染症は認められないことがわかった。不整脈や突然の血圧低下(心不全症状)など臨床的に心筋障害が疑われた症例では心筋組織に炎症細胞の浸潤、や心筋壊死などの所見はみられず、ウイルス抗原、ウイルス核酸も検出されなかった。ウイルスの直接感染による傷害でない別の発症機構が疑われた。

パラフィン包埋切片からも解析に十分なRNAが回収できるようになった。感染時、インフルエンザウイルスはQuasispeciesを形成していることが報告されている。今回解析した20例のうち1例では肺胞上皮細胞から多量のウイルスが検出されたが、肺から回収されたクローンは肺胞上皮が多く表出している鳥型レセプターに親和性の高いものであった。

E. 結論

2009H1N1 パンデミックインフルエンザはH5N1 鳥型インフルエンザウイルスと比較してヒト感染の場合の病原性は低い。しかしながら鳥インフルエンザヒト感染例と同様な劇症型ARDSを呈し、呼吸不全で死亡する例もあった。急性の呼吸不全で死亡した例の病理組織は硝子膜を形成する急性DADであった。4例あり、すべて肺胞上皮

細胞にウイルス抗原が検出された。この点はH5N1インフルエンザに類似していた。一方急性のDADはないが、肺うっ血、肺水腫、肺胞出血を伴う例ではおもにウイルス抗原は上気道の気管・気管支上皮から検出され、季節性インフルエンザの病理像に類似していた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Aina A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One*. 23;5(4): p1-9, 2010
- 2) Sato Y, Shimonohara N, Hanaki K, Goto M, Yamakawa Y, Horiuchi M, Takahashi H, Sata T, Nakajima N. ImmunoAT method: An initial assessment for the detection of abnormal isoforms of prion protein in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues *J Virol Methods*. 165(2):261-7, 2010

2. 学会発表

国際会議

- 1) N Nakajima, Y Sato, H Katano, H Hasegawa, T Sata Pathological findings of autopsy cases infected with 2009 pandemic influenza A virus in Japan. Options for the control of influenza VII in Hong Kong SAR, China, September 3-7, 2010

国内会議

- 1) 中島典子、羽田悟、飛梅実、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、岩田奈織子、辻隆裕、渡辺正秀、佐多徹太郎。本邦初の新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm）肺炎の剖検例 第99回日本病理学会総会 東京都、4月27-29日2010
- 2) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、佐多徹太郎。日本の2009年新型インフルエンザウイルス感染症剖検例の病理 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島県、11月7-9日、2010

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 2. 20 剖検症例

Case No.	Age/sex	Clinical history	Duration of illness	Hospitalization (d)	Clinical symptoms	Antibiotic treatment	Antiviral treatment
1	33/M	Dilated cardiomyopathy Obesity (BMI: 38) Diabetes, Asthma Atopic dermatitis	8	3	Fever Cough Dyspnea Diarrhea	+	+(from d7)
2	40/F	Hypertention Obesity (BMI: 30)	2	0	Fever Cough	-	-
3	45/M	unknown	3	0	Fever General fatigue	-	-
4	49/M	Hypertention Hashimoto's disease Obesity (BMI: 35)	4	0	Fever Cough	-	-
5	30/M	CHF Alcoholic liver disease Obesity (BMI: 34)	2	0	Fever Headache	-	+
6	25/M	np	1	0	Fever	-	+
7	81/M	Diabetes	3	2	Fever, cough Wheezing Diarrhea Vomiting	+	+
8	6/F	Cerebral hemorrhage Cerebral palsy Seizure	3	0 (DOA)	Fever Dyspnea	-	+
9	42/M	Cerebral hemorrhage Hypertention Hyperlipidemia Obesity (BMI: 59) Sleep apnea	2	0	Fever Cough	-	-
10	75/M	Asthma Atrial fibrillation COPD	2	2	Fever Dyspnea Wheezing	+	+
11	72/F	Autoimmune hepatitis Portal hypertention Hepatic encephalopathy Plumonary hypertention	4	4	Fever	+	+
12	30/F	Asthma	3	2	Fever Diarrhea Seizures	+	+
13	2/M	Hydrocephalus Laryngomalacia Mental retardation	9	7	Fever Cough	-	+
14	69/M	Esophageal cancer Diabetes COPD, CHF	10	10	Fever cough Dyspnea	+	+
15	44/M	np	2	1	Fever, VF Diarrhea Dyspnea Myalgia	-	+
16	13/F	np	3	1	Cough, Myalgia Headache General fatigue	+	-
17	15/M	np	29 (d2 PCPS)	28	Fever VF	+	+
18	24/F	Mental retardation	21 (d7 ECMO)	16	Fever Cough Dyspnea	+	+
19	33/M	Depression	2	0	Fever	-	+
20	41/M	np	1	0	Fever General fatigue	+	-

v: years old, d: days, M: male, F: female, IHC: immunohistochemstrv, rRT-PCR real time reversetranscriptase polymerase paraffin embedded, BMI: body mass index, +: positive, -: negative, DAD: diffuse alveolar damage, HM: hvaline membrane, N/A: not available, DOA: dead on arrival at the hospital, COPD: chronic obstructive pulmonary disease, VF: ventricular PCPS: percutaneous support, ECMO: extracorporeal membrane oxygenation

表 3

Case No	Histopathological pattern	IHC					rRT-PCR(FPPE)		
		trachea	lung				trachea	lung*	
			Bronchus	gland	bronchiole	alveolus			macrophage
1	Acute DAD with HM	-	-	-	+	+	+	1+	6+
2	Acute DAD with HM	-	-	-	-	+	+	-	3+
3	Acute DAD with HM	none	-	-	-	+	-	none	N/A
4	Acute DAD with HM	+	+	+	+	+	-	3+	5+
5	Massive pulmonary edema, hemorrhage	-	-	+	-	-	-	3+	3+
6	Massive pulmonary edema, hemorrhage	none	+	+	-	-	-	none	N/A
7	Bacterial pneumonia	+	+	+	-	-	-	1+	-
8	Bacterial pneumonia	+	-	+	-	-	+	-	3+
9	Hemorrhagic bronchitis, pulmonary edema	Mild	+	+	+	-	-	3+	3+
10	Bronchitis, Emphysema	none	-	+	-	-	-	none	3+
11	Bacterial pneumonia pattern	Plexiform	none	-	-	-	-	none	1+
12	Tracheobronchitis, pulmonary hemorrhage	Limited	-	-	-	-	-	1+	1+
13	Bacterial pneumonia		-	-	-	-	-	1+	1+

FPPE: formaline-fixed paraffin-embedded, Case No: Case number, IHC: immunohistochemistry,

DAD: diffuse alveolar damage, HM: hyaline membrane, N/A: not available due to RNA degeneration, None: no samp

lung*: lung section included bronchus, bronchiole, alveolus, macrophage and glands.

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）

22 年度 分担研究報告書

インフルエンザ感染誘導の劇症型肺障害機構の解析と

その治療薬の開発

分担研究者：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 特任講師

協力者：

千葉大院医 免疫発生学：菅又龍一、中山俊憲

国立感染研・免疫部：小林和夫、山本紀一、大島正道、戸高玲子

国立感染研・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

国立国際医療研究センター 麻酔科：河内正治、富澤一夫

宮崎大・医：布井博幸

北里大生命研生物有機化学）砂塚敏明、赤川清子、菅原章公、大村 智

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

研究要旨：1) **H5N1 インフルエンザ感染誘導の劇症型肺炎にかかわる因子の解析：**ベトナム（ハノイ）国立小児病院にて高病原性 H5N1 トリインフルエンザ感染の劇症型肺炎にかかわる因子を解析し、サイトカイン IL-12p40、TNF レセプター2(TNFR2) および好中球ライソゾーム酵素 Myeloperoxidase (MPO)の活性上昇が認められ発表した (Phung *et al.*, *J Infect* 2011; **62**: 104-108)。また、ハノイ国立小児病院研究者により第 14 回国際免疫学会（京都）にて口頭発表し、その発表は、医学系メディアにもとりあげられた。2) **H1N1 感染により誘導される劇症型肺炎モデルを使った治療薬の検討：**一方、高病原性 H5N1 トリインフルエンザ感染患者の病態を参考にし、H1N1(PR-8)感染によって誘導した劇症型肺炎モデルマウスを確立した。その初期の肺腔には、ケモカイン KC, MIP-2, MCP-1 の上昇が認められ、MPO 欠損マウスでは PR-8 の増殖抑制と病態の軽減が認められた（投稿中）。これらの結果から、新構造マクロライドライブラリーの 1056 種類を使って好中球の MPO 放出阻害効果を示す複数の物質を見出した。数種類を PR-8 感染誘導の劇症肺炎モデルマウスに投与し、肺組織でのウイルスの核酸量および延命効果が認められた。以上から、高病原性 H5N1 トリインフルエンザによって感染誘導される劇症型肺炎の誘導因子が挙げられ、インフルエンザウイルス感染誘導による劇症型肺炎モデルに対する新構造マクロライドの治療薬の候補が浮かび上がった。

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、劇症型の 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劇症型 ARDS=FARDS として報告した(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 FARDS 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 FARDS 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、これまでに、本病態のモデルマウスを作製してきた。マウス馴型 H1N1(PR8 株)インフルエンザウイルスにより劇症型呼吸不全症を呈するモデルマウスを確立した。

本年度は、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、H1N1(PR8 株)インフルエンザウイルス誘導による劇症型呼吸不全 FARDS 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)中の細胞の増加とサイトカイン・ケモカインを網羅的に解析し、モデルマウスによる治療薬開発も目的とした。

B. 研究方法

1) 劇症型 ARDS の発症機構：高病原性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ーの 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ーの 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ーの 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 をマウスネンブータル麻酔下、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) マウス肺組織病変の経時的变化

感染後毎日、ネン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、ネンブタール麻酔下、PBS 1 mL にて BALF を採取し、サイトスピリ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、ネンブタールにて安楽殺し、

ヒトおよびマウスの好中球からの MPO の放出を阻害するマクロライド薬剤を検討した。1056 種類のマクロライドライブラリーから好中球の MPO 放出阻害効果を解析した。

C. 結果

1) H5N1 インフルエンザ感染誘導の劇症型肺炎にかかわる因子の解析

ベトナム (ハノイ) 国立小児病院にて高病原性 H5N1 トリインフルエンザ感染の劇症型肺炎にかかわる因子を解析し、サイトカイン IL-12p40 および TNF レセプター2(TNFR2) が挙げられた。また、好中球ライソゾーム酵素 Myeloperoxidase (MPO) の活性上昇が認められ発表した(表 1) (Phung *et al.*, J Infect 2011; 62: 104-108)。

Cytokines	Plasma			NPA			NPA		
	H5N1-negative (n = 31)	H5N1-positive (n = 3)	P-value	H5N1-negative (n = 31)	H5N1-positive (n = 3)	P-value	H5N1-positive (n = 9)	P-value	
Chemokines	Mean value ± SD (pg/ml)	Mean value ± SD (pg/ml)		Mean value ± SD (pg/ml)	Mean value ± SD (pg/ml)		Mean value ± SD (pg/ml)		
TNF-α	56.4 ± 237.6	81.8 ± 171.3	0.858	5.9 ± 19.1	0.0 ± 0.0	0.668	240.4 ± 479.6	0.01	
IL-1β	10.8 ± 23.5	8.0 ± 17.0	0.842	56.4 ± 161.6	16.3 ± 0.4	0.732	349.7 ± 669.4	0.03	
IL-6	48.4 ± 66.1	117.9 ± 18.1	0.097	34.2 ± 79.1	33.9 ± 23.3	0.996	291.4 ± 393.9	0	
MCP-1	125.3 ± 362.9	303.1 ± 524.9	0.440	134.6 ± 412.3	73.2 ± 103.5	0.837	116.4 ± 170.9	0.9	
IFN-γ	1.5 ± 8.3	ND	—	3.34 ± 14.6	ND	—	ND	—	
IL-8	122.1 ± 390.8	3.6 ± 6.3	0.608	1201.5 ± 1556.0	244.1 ± 191.7	0.398	807.8 ± 1130.2	0.48	
IL-12p40	813.1 ± 786.2	2416.9 ± 1080.6	0.002	210.7 ± 175.1	252.1 ± 28.9	0.744	ND	—	
IL-12p70	91.5 ± 117.8	181.7 ± 100.3	0.211	15.6 ± 15.5	18.6 ± 10.7	0.794	ND	—	
TNF-R2	9813.8 ± 2983.7	21796.7 ± 285.6	0.001	83.8 ± 92.3	149.6 ± 68.1	0.332	863.7 ± 1408.3	0	
sIL-6R	26728.8 ± 7945.1	28520.6 ± 903.7	0.709	52.8 ± 88.2	345.8 ± 217.3	0.0002	103.8 ± 135.2	0.19	
MPO	units/min/ml 6.6 ± 5.8	units/min/ml 24.1 ± 17.4	0	units/min/ml 3.0 ± 3.2	units/min/ml 2.8 ± 1.0	0.708	units/min/ml 3.6 ± 6.3	0.042	

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。

5) 病態モデルを使った、インフルエンザ誘導劇症型 ARDS 治療薬の開発

表 1. Levels of cytokines, chemokines and MPO activity in plasma and NPA of pediatric patients with ARDS infected with H5N1 influenza.

また、本研究は、ハノイ国立小児病院研究者により第 14 回国際免疫学会 (京都) にて口頭発表し、医学系メディア Medical Tribune 誌 (Medical Tribune43 巻 41 号 13 ページ) にもとりあげられた (図 1)。

図1. Medical Tribune 誌 (Medical Tribune43 巻41号13ページ。



モカイン遺伝子を発現していた。

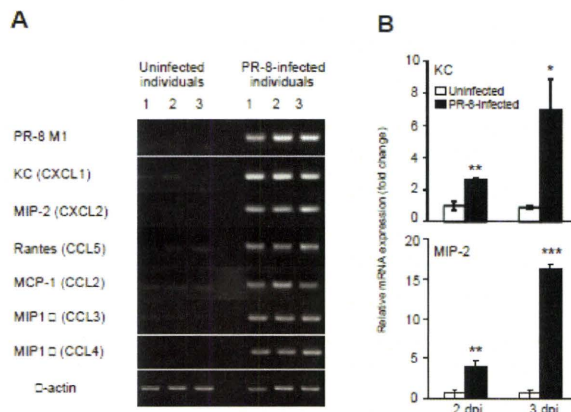


図2. 肺炎早期に働くケモカイン肺組織でのKC (CXCL1) とMIP-2 (CXCL2) の発現

次に、MPO-KO マウスを用いて肺傷害に際する好中球 MPO の関与を調べたところ、wild-type マウスに比べてMPO-KO マウスではPR-8 感染後の肺の組織傷害度およびインフルエンザウイルスの増殖が遅れることがわかった(図3、投稿中)。

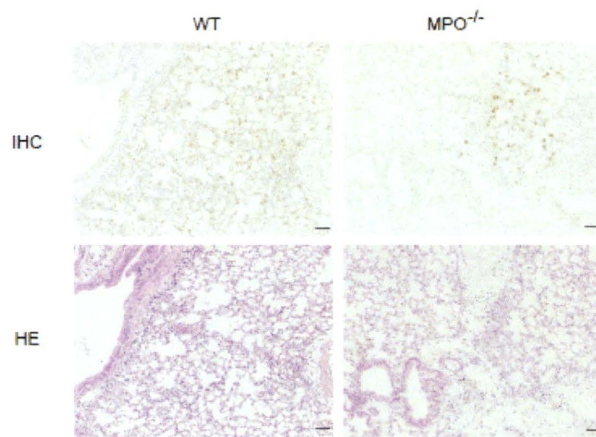


図3. PR-8 感染後の肺の組織傷害度とインフルエンザウイルスの増殖

左: Wild-type (WT)、右: MPO-KO マウス

3) インフルエンザ誘導劇症肺炎の新規治療薬: 新構造合成マクロライドの探索

患者およびモデルマウスの病態解析の結果から、好中球から放出されるMPOが病態にかかわっている可能性が考えられた。すなわち、

2) H1N1 感染により誘導される劇症型肺炎モデルを使った治療薬の検討

一方、高病原性 H5N1 トリインフルエンザ感染患者の病態に類似した病態モデルを確立した。

H1N1(PR-8)感染誘導による劇症型肺炎モデルマウスを確立してその病態を解析した。PR-8 の感染により劇症化した肺炎において、硝子膜の検出とともに急性肺傷害のマーカー分子とされる claudin の変動も認められた。この劇症肺炎では、IRFに関連したIFNに加え、肺炎早期に働くケモカインとして KC (CXCL1) と MIP-2 (CXCL2) の産生されている(図2)。また、BAL 中に浸潤する細胞もケ

MPO 放出を阻害する薬剤を投与することで、インフルエンザウイルス感染誘導による劇症肺炎を改善できる可能性を示した。そこで、新構造合成マクロライドライブラリーの 1056 種類を用いて、*in vitro* にて好中球による MPO 放出を阻害するから MPO 放出阻害効果を示す複数のマクロライドを見出した。これらのマクロライドを PR-8 感染マウスに投与し薬効を調べたところ、PBS およびクラリスロマイシン (CAM: 14 員環マクロライド) 投与群に比べて高い生存効果を示したそのうちの M1 の成績を図 4 に示す。

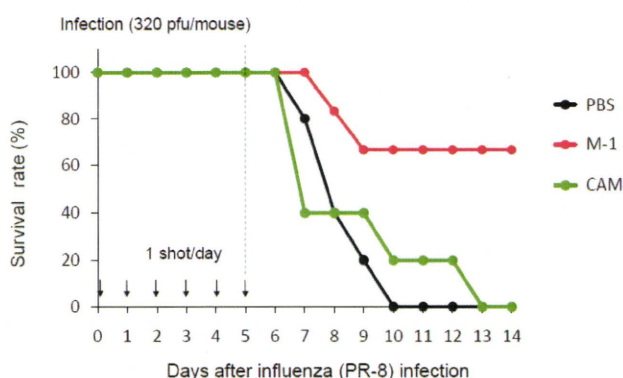


図 4. 新構造クラリスロマイシン M-1 による生存効果

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、高病原性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：特に、IL-12p40、TNFR2 および好中球 MPO が有意に上昇していたことを明らかにし、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することができた。

2) H1N1(PR-8)感染誘導による劇症型肺炎モデルマウス

モデルマウスを確立し、その病態解析から IRF に関連した IFN に加え、肺炎早期に働くケモカインとして KC (CXCL1) と MIP-2 (CXCL2) の産生が明らかとなった。また、BAL 中に浸潤する細胞もケモカイン遺伝子を発現しており、感染によって集積した白血球が炎症反応をカスケードするメカニズムが考えられた。

次に、MPO-KO マウスを用いた肺傷害への好中球 MPO の関与は、MPO-KO マウスでは PR-8 感染後の肺の組織傷害度およびインフルエンザウイルスの増殖が遅れることがわかったことから、主に好中球から放出される MPO は肺組織傷害に関わるだけでなく、ウイルス増殖にも影響を与えることが示唆された。

3) インフルエンザ誘導劇症肺炎の新規治療薬：新構造合成マクロライドの探索

患者およびモデルマウスの病態解析の結果から、好中球から放出される MPO が病態にかかわっている可能性が考えられたことから、1056 種類の新構造マクロライドライブラリーから *in vitro* にて好中球による MPO 放出を阻害する新構造合成マクロライドから MPO 放出阻害効果を示す複数のマクロライドを見出した。その内、M-1 が既存に使われている 14 員環マクロライドであるクラリスロマイシン(CM)よりも高い生存効果を示した。これは、新たな治療薬として有望である。

E. 結論

本年度のモデル動物による治療薬の開発の最初の目標は達成できた。

1) H5N1 インフルエンザ感染誘導の劇症型肺炎にかかわる因子の解析：ベトナム (ハノイ) 国立小児病院にて高病原性 H5N1 トリインフルエンザ感染の劇症型肺炎にかかわる因子を解析し、サイトカイン IL-12p40 および TNF レセプター 2(TNFR2) および