

ことでも知られている。特に低出生体重児では下気道感染症の主な病原体である。しかし、日本では小児期の重症感染症でライノウイルスの報告がほとんどなく、世界でもまだあまり詳しい解析をされていない。

B. 研究方法

国立ハノイ小児病院とのプロジェクトに従い採取された血清について、サイトカインを含めた検査を行った。採血は入院当日に行われた。7例 (p3, p6, p7, p69, p80, p87, p88) は発熱より3-4病日、一部では各々5病日 (p4), 7病日 (p71), 8病日 (p74), 10病日 (p85) に行われた (表2)。KL-6測定はKL-6海外用EIAキット (セティ株式会社) を用いた。他のサイトカインプロファイル測定については既に報告している (3)。ライノウイルスの診断はPCR法にて行った。ヒトライノウイルス (HRV) はA, B, C型が知られているが、現在市販されているprimerではすべてのHRVを検出できるとは限らない。今回用いたprimerセット (4) でも、2006年にクレード分類されたHRV-C型の一部を除いて検出可能と考えられた (5)。

C. 研究結果

今回ARDSを呈した患者88名中、11名の患者がライノウイルス感染でP/F ratioが100以下のARDSを呈した。発熱から入・退院までのP/F ratioの推移 (図1、表1) と治療経過を見ると、7名 (p6, p69, p71, p80, p85, p87, p88) では2g/Kgの免疫グロブリン (IVIG) 療法がなされ、4名 (p3, p4, p7, p74) ではIVIG療法がなされていなかった。臨床データを見ると、IVIG療法が採用された (IVIG+) 群 (7名中4名生存) では、採用されていなかった (IVIG-) 群 (4名中1名生存)

に比べて、生存者が多かった。さらに、IVIG+群での生存例4名中3例 (p69, p80, p88) で発熱より3、4病日にIVIGが施行されていた。反対にIVIG+群でも、発熱より6病日以降にIVIGが実施された3例中3例 (p6, 71, 87) とも死亡されていた。症例p85は、 paO_2 やP/F ratioが11例中最も良かった症例 (表1) であった。

同様に、サイトカインプロファイル (表2) の比較検討を行ったところ、KL-6が高値を示した7名中5名が死亡され、測定域内の患者4名中1名で死亡されていた。

IL-12p40およびIL-12p70の上昇した5例中4症例 (p3, p4, p7, p6) が死亡されていた。

またMPO低値群 (5u/min/ml以下) では死亡者が多く (6例中5例)、高値群では少なかった (5名中4例生存)。

他のサイトカインでMCP-1が生存者5名中4名で上昇している、IL-6sRが死亡者で高値を示したこと以外、TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, については明らかな関係は見いだせなかった。

D. 考案

河内らはハノイ国立病院でのウイルス感染で誘発された重篤なARDS症例ではIVIG療法を実施した群で統計上優位に予後を改善したと報告している。その報告のもと、ライノウイルス感染症と判明した11名の解析を行ったところ、発熱後早期 (3-4病日) にIVIG療法を実施された症例では明らかに良好な予後が得られていた。6病日以降に実施された症例ではP/F ratioが100前後の比較的中等症の1症例を除くと全員死亡されていたことから、ライノウイルス感

感染症では早期診断、早期IVIG療法がかなり有効であると思われた。

ライノウイルスは喘息の重症化(6)や新生児の重篤肺疾患(7)に関わっていることが報告されている。そのリセプターであるICAM-1が喘息の炎症での中心的役割を担っていることから注目されている(8)が、まだその詳しい病態の解析は報告されていない。

今回我々は、ライノウイルス感染症で血中KL-6異常高値(10000-30000 U/ml)の重篤ARDS症例(11例中7例が測定域以上で内5名が死亡)を経験した。成人ARDS症例では、喀痰中のKL-6が3453U/ml以上で、血中KL-6が530U/ml以上では優位に予後が悪いと報告されている(9)。肺胞蛋白症ではしばしばKL-6高値が報告されているが、BALF中で30,000 U/ml, 血中が5,000u/ml程度である(10)。今回経験したライノウイルス感染症でのKL-6 10000-30000 U/mlという値は特異的である。肺胞蛋白症の病因として、II型肺胞上皮細胞からの分泌亢進か、肺胞マクロファージ機能低下によるサーファクタントの処理能低下が考えられている(11)。新生児慢性肺疾患でも生後6週間で200-700 U/ml程度の上昇をピークに低下し始める(12)との報告や、Wilson Mikity症候群ではKL-6が4700 u/mlの高値を示す症例もある(13)ので、今回経験した患者さんが2-3ヶ月の乳幼児がほとんどであることから、肺胞マクロファージ機能低下(14)と、ライノウイルスによる何らかのII型肺胞上皮細胞への分泌亢進作用が、相まって、病初期でも異常高値を示したのではないかと考えられる。

KL-6抗体が認識するMUC-1タンパク質の

産生機構については、Cytomix (Boehringer Mannheim社: IFN- γ , IL-1 β , and TNF- α ,を各々終濃度で10または50 ng/ml 含んでいる。)で産生亢進がおこる(15)こと、IL-6(16)やSTAT3の活性化(17)などのサイトカインによるII型肺胞上皮細胞刺激が産生亢進をおこすこと知られているが、現在のところまだはっきりしたMUC-1の産生機序とそのシグナル経路は分かっていない。

今回解析できたサイトカインではIL-12p40とp70が高値の場合に死亡者が多かったことから、IL-12p40も、ライノウイルスの増悪化因子と考えられる。IL-12p40はIL-12p70, IL-23やIL-12p80とホモまたはヘテロダイマーを形成し、IL-12R β 1/ β 2, IL-23R(IL-12R β 1 /IL-23R), IL-12R(β 1/ β 1)と結合し、前2はJak2-STATにシグナルを伝え、後者はNF- κ Bやp38 MAPK経路を介して、T細胞の増殖活性を促している。IL-12p40単独ではマクロファージ遊走因子としてまた喘息などの気道炎症に関わっている(18)と考えられている。今回MCP-1上昇もマクロファージの遊走に関わっていることから病態との関与に興味を持たれた。

また今回ライノウイルス感染症によるARDS群では血中MPO低値症例(5u/min/ml以下)で死亡者が多くかった(5例中5例)のに対し、H5N1+のFARDS群では血中MPO高値症例で死亡者が多かったこと(2)と相反している。反対にライノウイルス感染症では血中MPO高値症例で死亡者がすくなかった(5名中1例)。ウイルスの種類によりMPOの病態への関与が異なることを示しており、今後の詳細な解析が必要である。

E. 結論

重症ARDSを呈した88症例の中で、ライノウイルス感染症 11 症例を経験し、血中サイトカイン、KL-6のデータを加え報告した。日本ではライノウイルス感染症による重症ARDSはあまり経験しないが、中国や東南アジアでの死亡者が多く報告されてきており、今後日本でも問題となる疾患だと思われる。治療にはPCRによる早期診断と早期のIVIG療法が有効であると思われた。

図表説明：

図1。ライノウイルス感染患者のP/F ratio推移：赤は生存者、黒は死亡者、矢印は各々IVIGを実施した病日を示している。

表1。ライノウイルス感染患者の臨床データ：赤は生存者、黒は死亡者

表2。ライノウイルス感染患者の血中サイトカイン：略語：Adm;発熱日から入院までの病日、IVIG;IVIGを実施した病日、赤は生存者、黒は死亡者

参考文献

- 1) Kawachi S, et al., J Infect Dis. 2009; 200(4):510-5.
- 2) Phung TT, et al., J Infect. 62(1): 104-6. 2011
- 3) Phung TT, et al., Microbiol Immunol. 2011;55(12):874-84.
- 4) Robin Brittain-Long et al., J. Clin Virol. 2008; 41: 53-56
- 5) Cassandra E et al., Emerging Infectious Diseases 2011; 17(2):296-298,
- 6) Broberg E, et al., J Clin Virol. 2011; 51(1):79-82.
- 7) Contoli M, et al., Minerva Med. 2009;100(6):467-78.

- 8) Yamaya M, et al., Eur J Pharmacol. 2011;650(1):431-44.
- 9) Kondo T, et al., Respir Res. 2011;12:32.
- 10) Ishikawa N, et al., Intern Med. 2002;41(5):381-5.
- 11) Shah PL, et al., Thorax. 2000;55(1):67-77.
- 12) Yamane M, Yokoyama N. Kobe J Med Sci. 2004; 50(5-6):131-40.
- 13) Takami T, et al., J Perinatol. 2003; 23(1):56-8.
- 14) Grigg J, et al., Eur Respir J. 1999;14(5):1198-205.
- 15) Ishizaka A, et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Jun;286(6):L1088-94.
- 16) Li YY, et al., Cell Immunol. 2009;256(1-2):19-26.
- 17) Gao J, et al., Int J Oncol. 2009; 35(2):337-45.
- 18) Andrea M. et al., Trends in Immunology 2007; 28(1): 33-38

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Moritake H, Hidaka F, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Nunoi H. Concomitant transient erythroblastopenia of childhood with neonatal hepatitis. Pediatr Int. 2012 Feb;54(1):147-50.
- 2) Mizukami T, Obara M, Nishikomori R, Kawai T, Tahara Y, Sameshima N, Marutsuka K, Nakase H, Kimura N, Heike T, Nunoi H. Successful Treatment with Infliximab for Inflammatory Colitis in a

- Patient with X-linked Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency. J Clin Immunol. 2012 Feb;32(1):39-49.
2. 実用新案：なし
3. その他：なし
- 3) Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, Suzuki K, Jayne DR, Scott DG, Hashimoto H, Nunoi H. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U.K. Rheumatology (Oxford). 2011 Oct;50(10):1916-20. 5.
- 4) Kawachi S, Matsushita T, Sato T, Nunoi H, Noguchi H, Ota S, Kanemoto N, Nakatani K, Nishiguchi T, Yuge A, Imamura H, Kitajima H, Narahara K, Suzuki K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Multicenter prospective evaluation of a novel rapid immunochromatographic diagnostic kit specifically detecting influenza A H1N1 2009 virus. J Clin Virol. 2011 May;51(1):68-72.
- 5) Phung TT, Luong ST, Kawachi S, Nunoi H, Nguyen LT, Nakayama T, Suzuki K. Interleukin 12 and myeloperoxidase (MPO) in Vietnamese children with acute respiratory distress syndrome due to Avian influenza (H5N1) infection. J Infect. 2011 Jan;62(1):104-6.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

図1: ライノウイルス感染患者のP/F ratio推移

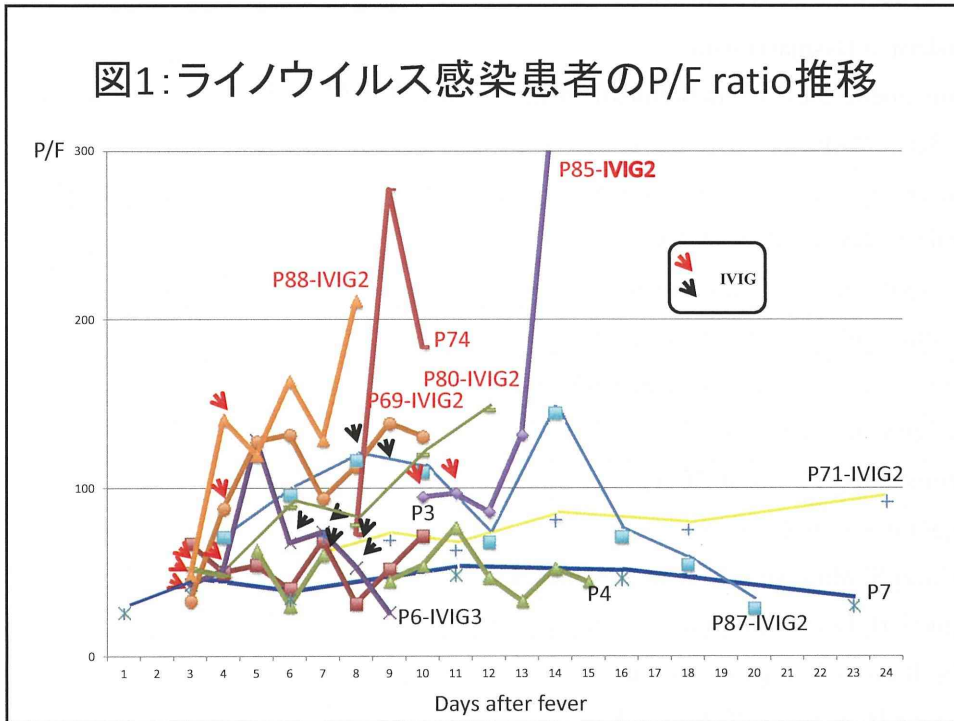


表1: ライノウイルス感染患者の臨床データ

Pt#	Gender	Prognosis	Age	Wt	MOF	pH	PaO2	PaCO2	FiO2	P/F	P/F Lowest	BT onset	BT adm	Days adm	Days	IVIg (2g/kg)
p3	F	D	0.18	3.6	+	7.29	67	43	1	67	31	37.2	37.2	8	10	-
p4	F	D	0.18	4.5	+	7.37	63	56	1	63	33	38.5	38	8	13	-
p6	F	D	0.25	4.2	+	7.23	42.7	75.7	1	43	26	38	36.5	6	8	6,7,8Y
p7	F	D	0.18	4	+	7.15	25.7	55.1	1	26	26	36	36	22	22	-
p69	F	A	0.2	3	-	7.28	33.3	35.4	1	33	33	36	36	23	25	3,4Y
p71	F	D	0.2	3	DOA	7.28	71.1	65.6	1	71	38	37	37.4	23	25	7,8Y
p74	F	A	0.25	3.5		7.43	29.3	36.2	0.4	73	73	37	37.5	16	23	-
p80	F	A	0.2	3	DOA/d	7.34	52.4	45.9	1	52	48	37.5	37.8	25	31	3,4Y
p85	F	A	0.33	4		7.26	75.6	71.3	0.8	95	95	36.5	36.5	15	28	10,11Y
p87	M	D	0.4	4		7.31	70.7	47.5	1	71	29	38.5	37.6	19	22	8,9Y
p88	F	A	2.5	13	DOA	7.35	48.3	45.7	1	48	48	38.5	36.5	14	16	3,4Y

表2:ライノウイルス感染患者の血中サイトカイン

Pt #	Days		TNF α	IL-1 β	IL-6	MCP-1	IL-8	IL-12 p40	IL-12 p70	TNFR2	IL-6sR	KL-6	MPO
	Adm.	IVIG	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	u/ml	units/ml n/ml
p3	3	-	0	0	47	0	0	1439	173	8845	29700	too high	0
p4	5	-	0	0	82	0	215	1369	227	11394	25652	too high	0.24
p6	3	6,7,8	23	0	0	0	0	1859	305	6576	32538	too high	2.07
p7	1	-	0	0	51	0	0	2045	219	11169	28786	too high	1.52
p69	3	3,4	0	0	0	277	0	0	0	10658	27062	too high	9.48
p71	7	7,8	0	0	0	1858	33	0	0	7359	15205	too high	7.11
p74	8	-	0	0	0	1172	0	0	0	9470	13658	too high	17.39
p80	3	3,4	0	0	0	0	3	0	0	11146	16810	6950	15.81
p85	10	10,11	0	30	0	177	158	651	0	7203	270	370	0.73
p87	4	8,9	0	0	0	0	0	0	0	9984	14328	3439	0.67
p88	3	3,4	0	0	41.26	677	51	0	0	4241	21969	833	6.63

鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染して起こすもの
-インフルエンザ重症化因子としての劇症型ARDS：診断・治療の手引き-

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／治療の手引き作成を目指す。

A. 研究目的

手引き作成主旨

鳥インフルエンザの人への感染、診断、予防などについて現在得られている知見をまとめ、診断と治療に関する医学的・科学的に正確な手引書として出版する。

緊急時のマニュアル（フローチャート）と、そのマニュアルの基盤となる「根本的かつ詳細な情報解説」という2本立ての構成とする。劇症型(Fulminant)-ARDSについては世界初の詳しい報告である。

B. 研究方法

記載内容・特徴

- 1) マニュアルとしての機能を持つ
「インフルエンザによるF-ARDS診断／治療マニュアル」
重症化しF-ARDSに陥った症例に対するマニュアル。流行時に直ちに臨床現場で使用可能な体裁とする。
- 2) 全体でインフルエンザについて全般的な知識を獲得可能。
- 3) 疫学、病理、診断において、班の研究結果を含む最新の内容。
- 4) 臨床のみならず、基礎部門の成果も掲載。

読者対象

広く一般医師が利用できるように平易な表現で執筆し、緊急時のマニュアル（フローチャート）は出版社のHPで公開しすぐ利

用できるようにする。

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。

手引き作成委員会の構成

手引き作成委員会

- 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

目次・内容（13章）

- 1) はじめに

2) インフルエンザとは何か

歴史、疫学 (全体的な概論)、ウイルス (構造、感染のメカニズム、抗ウイルス薬の作用点)、A 型パンデミック化する理由、重症化要因、重症化する病態 (脳症、MOF、横紋筋融解症、心筋症、FARDS、その他)、季節性インフルエンザ時の肺炎

3) 症例 (H5N1) : ヒト A(H5N1)感染症

について実際の症例を呈示して解説

(鳥とヒトとは症状などが異なる)

4) インフルエンザによる F-ARDS

診断/治療マニュアル

5) 疫学 (全体) : 感染症法の解説、

A(H5N1)ウイルスの分子疫学

6) 病理 (H5N1 を中心に、H1N1 も含めた

flu-ARDS)、ウイルス感染の局在

7) 診断と検査 (ARDS 全体、H5-FARDS の特徴)

H5N1 ウイルス検出方法 (検体採取/保存)

、臨床所見、生理検査所見、画像所見、

血液検査所見、バイオマーカー

(サイトカイン、KL-6、酸化ストレス)

8) 治療

薬物療法 (抗ウイルス薬、抗菌薬、マクロライド系、グルココルチコイド療法、好中球エラスターゼ阻害薬、IVIg 療法、その他)

呼吸管理療法、ECMO 療法、他

9) インフルエンザワクチン: 総説

ワクチンとは何か?、製造法、種類、効果、今後の展望、H5N1 ワクチンの現状

10) 予後 : 比較検討 (Seasonal Influenza, H1pdm, H5N1)

11) FARDS 以外の重症化因子 (脳症、MOF、横紋筋融解症、心筋症、その他)

12) 感染シミュレーション

(influenza pdm simulation 臨床医の立場で)

13) FARDS の動物 (マウス) モデル

(インフルエンザ感染、化学的、VILI)

手引き作成進行スケジュール

既に割り付け作業は終了し出版に向けて準備中である。

1) 初回打ち合わせ会 : 2011 年 3 月 5 日

2) 第 2 回打ち合わせ会 : 2011 年 7 月 8 日

3) 第 3 回打ち合わせ会 : 2011 年 9 月 2 日

4) 第 4 回打ち合わせ会 : 2011 年 9 月 22 日

5) 第 5 回打ち合わせ会 : 2011 年 10 月 6 日

6) 第 6 回打ち合わせ会 : 2011 年 10 月 6 日

7) 原稿締切 : 2012 年 3 月

8) 調整原稿締切 : 2012 年 5 月

9) レビューワーへの査読締切 : 2012 年 7 月

10) 再校出校・校閲 : 2012 年 9 月

11) 意見集約、内容の最終確定 : 2012 年 10 月

12) 三校出校・印刷・製本 : 2012 年 11 月

13) 刊行 : 2012 年 12 月末

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) が無いことより手引きとした。

E. 結論

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と治療の手引きの作成を目指す。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) Homma S, Azuma A, Taniguchi H, Ogura T, Mochiduki Y, Sugiyama Y, Nakata K, Yoshimura K, Takeuchi M, Kudoh S, the Japan NAC clinical study group: Efficacy of inhaled N-acetylcysteine monotherapy in patients with early stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* : 2011 in press
- 2) Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*, 410: 38-47, 2011
- 3) Sakamoto S, Homma S, Mun M, Fujii T, Kurosaki A, Yoshimura K: Acute exacerbation of idiopathic interstitial pneumonia following lung surgery in 3 of 68 consecutive patients: A retrospective study. *Intern Med*, 50:77-85, 2011
- 4) Sugino K, Hebisawa A, Uekusa T, Hatanaka K, Abe H, Homma S: Histopathological bronchial reconstruction of human bronchiolitis obliterans. *Pathol*

Intern, 61:192-201, 2011

- 5) Isobe K, Hata Y, Sakguchi S, Sato K, Sano G, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Takagi K, Homma S: The role of fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography for the detection of gastrointestinal tract lesions in patients with lung cancer. *Thoracic Cancer* 2: 190-195, 2011
- 6) Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Tsuchiya T, Ito H, Tokunaga K, Ohashi J, Homma S, Kobashi Y, Taguchi Y, Azuma A, Kudoh S, Keicho N: Molecular cloning of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Human Genetics*, 129: 117-128, 2011

2. 学会発表

【国際会議】

- 1) Y. Muramatsu, K. Sugino, N. Kikuchi, S. Sakaguchi, K. Sato, G. Sano, K. Isobe, S. Sakamoto, Y. Takai, J. Tatebe, T. Morita, S. Homma: Efficacy of inhaled N-acetylcysteine on lung function and redox balance in idiopathic pulmonary fibrosis. 2011 American Thoracic Society International Conference Denver USA, 2011.5
- 2) N. Urabe, K. Sugino, Y. Muramatsu, K. Sato, S. Sakamoto, Y. Takai, S. Homma: Efficacy of long-term inhaled N-acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. 2011 American Thoracic Society International Conference Denver USA, 2011.5

- 3) K. Sugino, T. Ito, Y. Muramatsu, J. Tatebe, T. Morita, K. Matsuda, A. Azuma, S. Homma: N-acetylcysteine and pirfenidone attenuate expression of epithelial mesenchymal transition in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. 2011 American Thoracic Society International Conference Denver USA, 2011.5
- 4) T. Ito, N. Hirota, M. Ono, H. Ohta, S. Hisata, S. Homma, T. Nukiwa, M. Ebina: Synergistic anti-fibrotic effects of pirfenidone and cyclosporine A on lung. 2011 American Thoracic Society International Conference Denver USA, 2011.5
- 5) K. Isobe, Y. Hata, S. Sakaguchi, K. Sato, K. Sugino, G. Sano, S. Sakamoto, Y. Takai, K. Shibuya, K. Takagi, S. Homma: Circulating tumor cells and detection of EGFR mutation in cell-free tumor DNA in blood plasma in metastatic non-small cell lung cancer with *EGFR* mutation(#80513). 2011 ASCO Chicago USA, 2011.6
- 6) Hijikata, I Matsushita, H Ito, J Ohashi, S Homma, Y Taguchi, A Azuma, S Kudoh, N Keicho: Genetic analysis of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. 2011 ERS Amsterdam Holland, 2011.9
- 7) Taniguchi, K Kataoka, Y Kondoh, S Homma, M Mishima, Y Inoue, T Ogura, M Bando, K Hagiwara, H Takahashi, K Chida, K Kishi, Y Sugiyama: Proposal for revised clasification of disease severity of idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. 2011 ERS Amsterdam Holland, 2011.9
- 【国内会議】
- 1) 本間 栄：慢性期の薬物療法と管理（副作用対策を含めて）。第51回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム「特発性間質性肺炎の管理、治療」, 東京, 2011.4
- 2) 本間 栄、杉山幸比古：特発性間質性肺炎 診断と治療の手引き改訂の要点. 第51回日本呼吸器学会学術講演会イブニングシンポジウム「特発性間質性肺炎診療の近年の動向」, 東京, 2011.4
- 3) 菊池 直、杉野圭史、石田文昭、阪口真之、佐藤敬太、佐野 剛、磯部和順、坂本 晋、高井雄二郎、本間 栄、佐藤大輔、吉原克則：当院における間質性肺炎急性増悪(IP-AE)に対するPMX-DHPの検討. 第51回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2011.4
- 4) 市川敦央、阪口真之、坂本 晋、後町杏子、菊池 直、石田文昭、菊池 直、佐藤敬太、高井雄二郎、黒崎敦子、本間 栄：セミノーマ術後補助化学療法(BEP)中に出現した薬剤性肺障害に対し、PMX-DHP療法が奏功した1例. 第194回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2011.5
- 5) 磯部和順、秦 美暢、石田文昭、菊池直、廣田 直、佐藤敬太、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：間質性肺炎合併肺癌における治療後急性呼吸器障害の検討. 第52回日本日本肺癌学会総会ワークショップ, 大阪, 2011.11

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

H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染症の病理学的解析 —ハノイ国立小児病院 5 症例の解析—

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： H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの鳥-ヒト感染は今なお続いている。ヒト感染の病態の解明に剖検組織の病理学的解析は必須であるが、本研究班で解析しているベトナムの 5 例以外には、香港、中国、タイから 14 例報告されているのみで非常に少ない。我々はベトナムハノイ国立小児病院で 2003-2008 年に H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡した 5 症例のホルマリン固定パラフィン包埋肺組織ブロックを解析してきた。5 症例とも劇症型の急性呼吸促進症候群を呈し呼吸不全で死亡しており、肺病理像では硝子膜形成を伴うび慢性肺障害が認められた。肺以外の組織では特記すべき病理組織所見はなく、1 例の肝臓の局所で、脂肪変性像が見られただけである。肺から検出されたウイルス核酸量は病日が早い例ほど多く、ウイルス核酸量の多い肺切片では免疫組織化学でウイルス NP 抗原が検出できた。インフルエンザ抗原は主に II 型肺胞上皮細胞およびマクロファージ、細気管支上皮細胞、また血管内皮細胞に検出された。肺以外の組織でウイルス抗原やウイルス核酸は検出できなかった。パラフィン包埋肺組織から RNA を抽出し、TNF α 、IL-6、IL-8、IP-10、RANTES の mRNA をリアルタイム定量 RT-PCR で測定した結果、肺の局所でサイトカイン・ケモカインの発現が高かったことがわかった。免疫組織化学では TNF- α は肺胞上皮細胞、マクロファージに検出され、IL-6 は血管内皮細胞からも検出された。

A. 研究目的

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの鳥-ヒト感染は今なお続いており、およそ 8 年間で感染者数は 576 人、死亡者数は 339 人となった。ヒト感染例では鳥-鳥感染で見られる脳炎は顕著でなく、肺中心にウイルスが増殖していることがわかっている。さらに H5N1 高病原性インフルエンザウイルスを感染させても肺胞性肺炎はおこっても

ARDS は発症せず治癒する。このように H5N1 鳥インフルエンザウイルスの病原性や感染動態は宿主動物によってことなるため、ヒト感染の病態を明らかにするためにはヒト剖検組織の病理学的解析は非常に重要である。しかしながら本研究班で解析している 5 例以外で報告されている剖検例は 14 例のみ（香港、中国、タイの症例）である。我々はベトナムハノイ国立小児病院との共同研

究で2003-2008年にH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡した5症例（それぞれ8、10、13、16、18病日で死亡）のホルマリン固定パラフィン包埋肺組織ブロック（2症例では肝臓、心臓、腎臓、脾臓、腸管、膵臓も）を解析してきた。ベトナム5例のパラフィン包埋組織を病理学的、分子生物学的に解析した結果を報告する。

B. 研究方法

（材料）

ベトナムハノイ国立小児病院で2003-2008年にH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡した5症例のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）肺組織ブロック解析した（表）。

（方法）

①組織病理所見：ヘマトキシリン・エオジン染色およびエラスティカ・マッソン染色により組織所見を観察した。

②免疫組織化学：インフルエンザウイルスNP（nucleoprotein）抗原をマウス抗A型インフルエンザNP抗原モノクローナル抗体、ラビット抗A型インフルエンザNP抗原ポリクローナル抗体を用いてLSAB法（DAKO）で検出した。細胞マーカー蛋白はモノクローナル抗体を用いて主にLSAB法で、TNF α 、IL-6、IL-8、IP10、RANTESについてはポリクローナル抗体を用いてCSAII法で検出した。

③in situ hybridizationAT-tailing法：インフルエンザウイルスが増殖しているか確認するためにmRNAとゲノムRNAをそれぞれに特異的なオリゴプローブを用いて検出した。

④二重染色：ウイルス抗原陽性細胞を同定

するために細胞マーカー蛋白との二重免疫組織化学を施行し共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

⑤パラフィン包埋組織から核酸を抽出し定量RT-PCR法によりウイルス核酸やサイトカイン・ケモカインのmRNAをリアルタイム定量RT-PCRで解析した。

C. 研究結果

①肺病理像：5症例ともに硝子膜形成を伴う慢性肺障害（DAD）が認められた（図1a）。症例1-3ではDADの滲出期、症例4-5は増殖期を呈していた。肺の間質に浸潤している細胞の多くはMPO陽性であり（図1c）、エラスターゼ陽性の好中球とCD68陽性の単球系細胞の両方が認められた。症例5では細菌性肺炎の合併が疑われる微小膿瘍が形成されていた。

②肺以外の組織：2例のみでの検索である。特記すべき病理組織所見はなく、1例の肝臓の局所で、脂肪変性像が見られただけであった。血球貪食像や脾臓リンパ濾胞の低形成/過形成などの所見は見られなかった。

③ウイルス核酸の検出：FFPE組織からRNAを抽出しウイルス核酸の検出を試みたところ、症例1-4の肺組織のみで陽性であった。ウイルス量は病日が早い例ほど多かった。

④インフルエンザNP抗原の免疫組織化学：ウイルス量の多い肺切片では免疫組織化学でウイルスNP抗原が検出できた（図1b）。インフルエンザ抗原は主にII型肺胞上皮細胞およびマクロファージ、細気管支上皮細胞、また血管内皮細胞に検出された。H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスはヒトに感染するとウイルス血症となり呼吸器以外の臓器に感染すると報告されている

が、2 症例において肺以外の組織でウイルス抗原やウイルス核酸を検出できなかった。⑤TNF α 、IL-6、IL-8、RANTES、IP10 の発現量：肺組織の 4-5 か所の FFPE 切片を解析したが、肺の部位によって発現量は異なっていた。病日の早い例で IL-6 と TNF- α の発現量が高かった。H5N1 感染例（症例 1）

と同様 ARDS-呼吸不全で病日 8 に死亡したパンデミックインフルエンザウイルス（A/H1N1pdm2009）感染例 とで肺組織中の各サイトカイン・ケモカイン mRNA 量を比較したところ、IL-6 と IL-8 で差がみられた（ $p=0.05$ ）。（図 2）

症例	年齢/性別	死亡病日	入院病日	解析組織
1	12/女	8	day 6	肺
2	11/男	10	day 7	肺、肝臓、心臓、腎臓、膵臓、脾臓、小腸
3	4/男	13	day 11	肺、肝臓、心臓、腎臓
4	4/男	16	day 8	肺

表. H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡した 5 症例

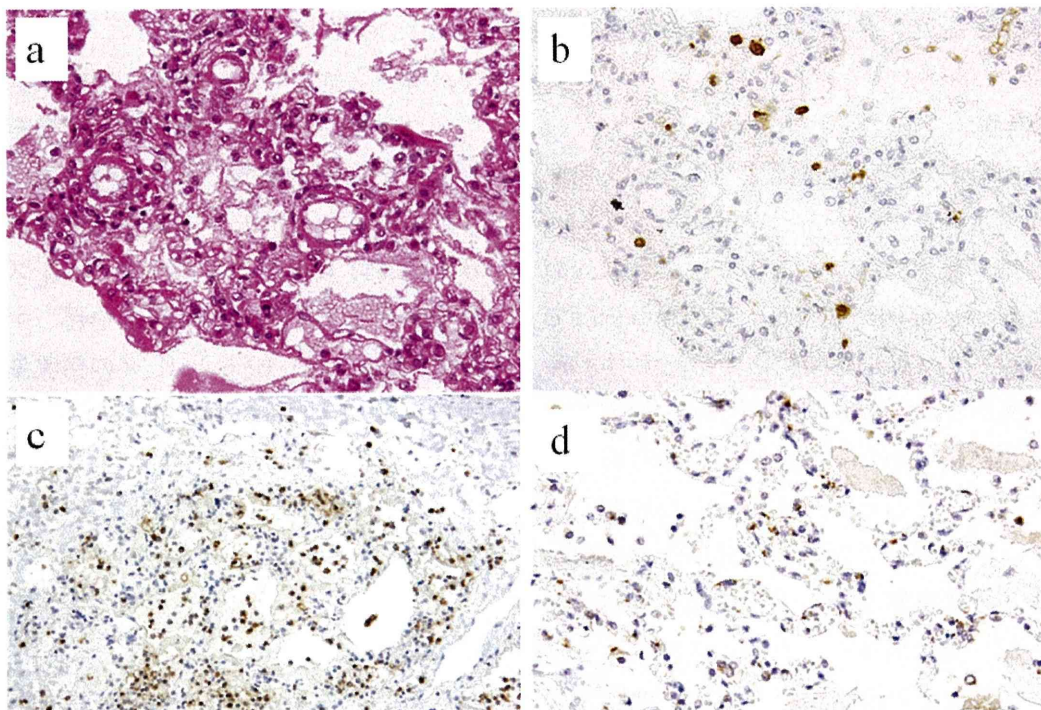


図 1. a. Hamatokyline-Eosin 染色 b. A 型インフルエンザウイルス NP 抗原免疫組織化学（茶色：抗原） c. 浸潤細胞はミエロペルオキシダーゼ（MPO）陽性、免疫組織化学。 d. IL-6 免疫組織化学（症例 1）

⑥サイトカイン・ケモカインの免疫組織化学：TNF- α は肺胞上皮細胞、マクロファ-

ジに検出され、IL-6は血管内皮細胞からも検出された(図1d)。IP10は細気管支上皮細胞で陽性であった。

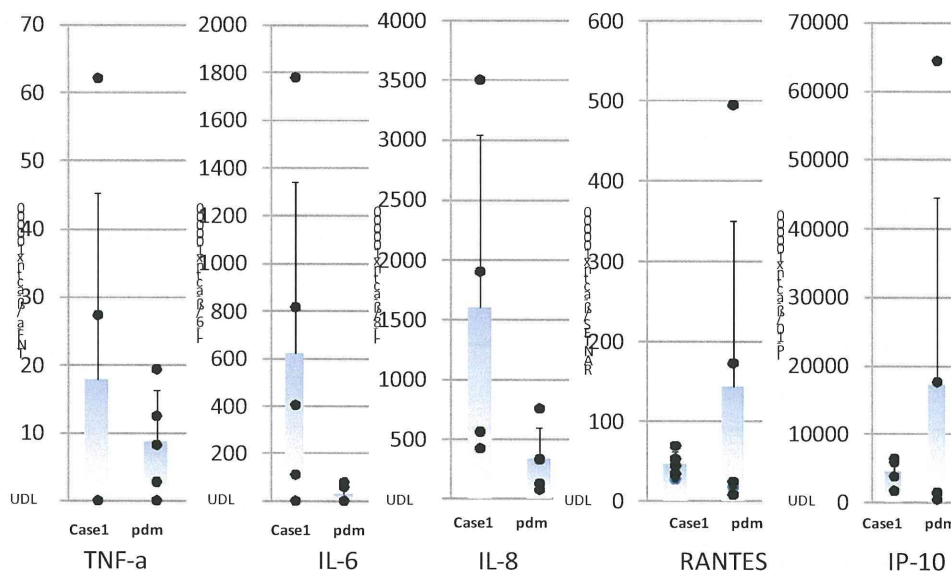


図2. H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染剖検肺と A/H1N1pdm ウイルス感染剖検肺における各サイトカイン・ケモカインの発現の比較

D. 考案

解析対象がホルマリン固定パラフィン包埋されたネクロプシーあるいはオートプシー(剖検)標本であり、入手できた肺以外の組織も1-2症例に限られ、十分な解析はできなかった。肺以外の組織に特記すべき病理所見がなかったのは解析した5症例では臨床的に明らかな多臓器不全(MOF)を併発していないことと関連するかもしれない。タイ、中国からの報告では肺以外の組織からウイルス抗原やウイルス核酸を検出しているが、死亡病日や、ウイルス抗原、ウイルス核酸などの検出感度、宿主の免疫応答、などを考慮すると疑問に思われるデータもある。H5N1鳥インフルエンザウイルスに感染し、致死感染症を発症する患者の特異

性が解明されていない現在、剖検症例を1つ1つ詳細に解析し、得られた結果を集積していくことが重要である。今年度はヒトサイトカイン・ケモカインの定量解析を試みた。H5N1鳥インフルエンザウイルスはより強いサイトカインストームを起こすと報告されているが、IL-6とIL-8の発現量が、同じ8病日でARDS-呼吸不全で死亡したパンデミックインフルエンザウイルス(A/H1N1pdm 2009)の剖検肺組織と比較して高かったことは、これと矛盾しなかった。

E. 結論

H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトからヒトに感染したという報告はないが、ヒト-ヒト感染が可能となるウイルスに変異しパンデミックとなる場合を想定し

て対策が練られている。ヒトにおける病原性メカニズムの直接的な証拠として、剖検例の病理学的解析は重要である。我々は肺組織以外にウイルス抗原やウイルス核酸を検出できなかったが、いくつかの論文で他臓器からウイルス抗原やウイルス核酸を検出している。今後さらに剖検報告数が増えることにより H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例における病態が解明されていくと思う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima, N., Sato' Y., Katano, H., Hasegawa, H., Kumasaka, T., Hata, S., Tanaka, S., Amano, T., Kasai, T., Chong, J.M., Iizuka, T., Nakazato, I., Hino, Y., Hamamatsu, A., Horiguchi, H., Tanaka, T., Hasegawa, A., Kanaya, Y., Oku, R., Oya, T., Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol.* 25(1):1-13, 2012 (Epub 2011 Aug 26.)
- 2) Sugamata, R., Dobashi, H., Nagao, T., Yamamoto, KI., Nakajima, N., Sato, Y., Aratani, Y., Oshima, M., Sata, T., Kobayashi, K., Kawachi, S., Nakayama, T., Suzuki, K. The contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiol Immunol.* 2011 Dec 30. Epub ahead of print

- 3) Ohnishi, K., Takahashi, Y., Kono, N., Nakajima, N., Mizukoshi, F., Misawa, S., Yamamoto, T., Mitsuki, Y., Fu, S., Hirayama, N., Oshima, M., Ato, M., Kageyama, T., Odagiri, T., Tashiro, M., Kobayashi, K., Itamura, S., Tsunetsugu-Yokota, Y. Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies. *Jap J Infect Dis.* 65:19-27, 2012
- 4) Ishiwada, N., Takada, N., Okunishi, T., Hishiki, H., Katano, H., Nakajima, N., Kohno, Y. Rhabdomyolysis associated with influenza A/H1N1 2009 infection in a pediatric patient. *Pediatrics International.* 54, *in press*, 2012

2. 学会発表

国内会議

- 1) 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、熊坂利夫、羽田悟、田中伸哉、笠井孝彦、鄭子文、飯塚利彦、仲里巖、樋野陽子、濱松晶彦、堀内尚、田中智之、長谷川章雄、尾矢剛志、佐多徹太郎. 2009H1N1 パンデミックインフルエンザウイルス感染症 20 剖検例の臨床病理学的解. 第 100 回日本病理学会総会. 横浜, 4 月, 2011.
- 2) 長谷川秀樹、中島典子、佐多徹太郎. インフルエンザウイルス A/H1N1pdm 感染症の病理学的解析. 衛生微生物技術協議会第 32 回研究会 東京, 6 月, 2011
- 3) 長谷川秀樹、中島典子. パンデミックインフルエンザウイルス H1N1/09 感染症の病理学的解析. 第 43 回日本小児感染症学会総会・学術集会 岡山, 10

月, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

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：菅又龍一 千葉大学大学院医学研究院 特任助教

協力者：

千葉大院医 免疫発生学：中山俊憲

国立感染研・免疫部：小林和夫、大島正道

国立感染研・感染病理部：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

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)インフルエンザ誘導性 ARDS に対する治療薬候補：先の探索研究で、インフルエンザ誘導性の劇症肺炎に好中球の MPO 放出阻害効果のある 16 員環マクロライドスピラマイシン、ロイコマイシンを見出した。インフルエンザウイルス感染劇症型肺炎モデルマウスにこれら薬剤を投薬することで生存効果を認めた。肺組織中のウイルスの核酸量減少と、肺胞洗浄液中のケモカイン・サイトカインの産生抑制が見られた。これらの結果から、劇症肺炎時にこれらマクロライドが、インフルエンザ感染症の新規治療薬の候補となる可能性を示した。(2)劇症型インフルエンザの発症機構の解明：H5N1 インフルエンザ感染誘発 ARDS ベトナム小児患児の血中および肺胞洗浄液中に増加したサイトカイン・ケモカインおよび myeloperoxidase(MPO)活性に焦点を当て、*in vitro* にて A/H1N1 インフルエンザウイルス(PR-8 株)感染させた A549 ヒト上皮細胞でのサイトカイン・ケモカインの産生機構を検討した。TNF- α と RANTES は、A549 細胞から有意に産生され、siTNF- α mRNA 処理により RANTES の発現と RANTES, IL-8 と MCP-1 の分泌が抑制された。加えて、非感染細胞に TNF- α と RANTES を投与することで、RANTES, IL-8 および MCP-1 の分泌が亢進された。これらの事実から、初期の段階で TNF- α によって産生誘導された RANTES が、ひきつづく IL-6, IL-8, MCP-1 および IFNs のレベルの上昇をコントロールしていることが強く示唆された。また、ウイルスの NS1 プラスミドを感染させた細胞は、H₂O₂-MPO 系の存在下で、大量の IL-8 と MCP-1 が産生された。これは、PR-8 中の NS1 が H₂O₂-MPO 系存在下で、上皮細胞でサイトカインストームを誘発することが示唆された。これらの結果は、H5N1 患者での MPO が肺の好中球増多により促進され、ひきつづく肺でのケモカイン・サイトカインの産生と類似している。インフルエンザウイルス感染によって H₂O₂-MPO 系がはたらくと、インフルエンザウイルス NS1 と連動して肺上皮細胞のサイトカインストームを誘発すると推定される。

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、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、以下の 2 項目について検討した。

1) 劇症型インフルエンザ治療薬の開発

先の研究で見出した 16 員環構造を含む 3 種

類のマクロライド、EM900、Spiramycin、Leucomycin およびコントロールとしてクラリストマイシン(CM)を、致死濃度のインフルエンザウイルスを感染させたマウスに投薬し、劇症肺炎時において MPO 放出阻害活性を示すマクロライド薬剤が、インフルエンザ感染症に対する新規治療薬の候補となる可能性を検討した。

2) 劇症型インフルエンザの発症機構の解明

インフルエンザウイルス non-structure protein1(NS1)と myeloperoxidase(MPO)が連続するサイトカイン・ケモカイン誘導亢進：H5N1 インフルエンザに感染し ARDS を発症した小児患児の中のサイトカイン、ケモカインの応答および MPO 活性に焦点を当てて、*n vitro* にて A/H1N1 インフルエンザウイルス(PR-8 株)あるいは非構造タンパク質 1 (NS1) プラスミッドを感染させた A549 ヒト上皮細胞でのサイトカイン・ケモカインの産生における役割について検討した。

B. 研究方法

1) インフルエンザ誘導劇症型病態モデルを使った ARDS 治療薬の開発—PR-8 株感染マウスへのマクロライド投与

インフルエンザ PR-8 株 420pfu をマウスネンブタール麻酔下、鼻腔から Balb/c(8 週齢、メス)に、投与・感染させ、初日よりマクロライド 66 µg/mouse を 6 回腹腔投与した。

感染 3 および 6 日後に肺組織の変化、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。

2) マウス肺組織病変の経時的変化

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 中の細胞の経時的変化の観察は、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。

3) 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、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 μ L 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-1 β , 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-1 β , TNF- α , RANTES など) を同時に測定・解析した。

4) PR-8 感染 A549 上皮細胞での *in vitro* 解析
A549 肺上皮細胞にインフルエンザ PR-8 を 1,000pfu 感染させ、2, 4 日後の細胞および細胞上清中のサイトカイン・ケモカインを Bio-Plex により測定した。また、細胞からのサイトカイン・ケモカインの発現も real-time PCR にて測定した。

5) PR-8 ウイルス NS1 プラスミッド感染 A549 上皮細胞でのサイトカイン・ケモカインの発現
A549 肺上皮細胞に NS1 プラスミッド感染させ、2, 4 日後の細胞および細胞上清中のサイトカイン・ケモカインを Bio-Plex により測定した。また、細胞からのサイトカイン・ケモカインの発現も real-time PCR にて測定した。

C. 結果

(1) 劇症型インフルエンザ治療薬の開発＝インフルエンザ誘導性 ARDS に対する治療薬候補：マクロライド、EM900、Spiramycin、Leucomycin(LM-A3)、クラリストマイオシン (CM) 致死濃度のインフルエンザウイルスを感染させたマウスに投薬したところ、感染マウス

は体重の回復を伴う生存効果を示した。

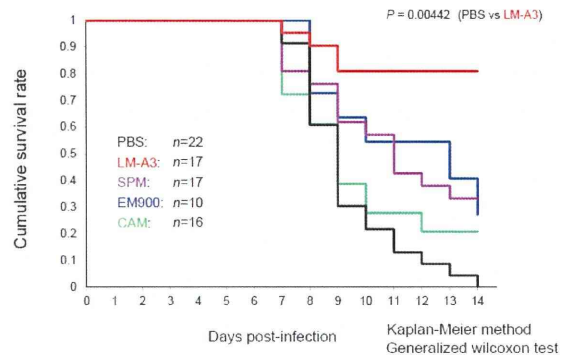


図 1. マクロライド治療による生存効果

マクロライドを投与したマウスの肺組織では、ウイルスの核酸量が減少していた。

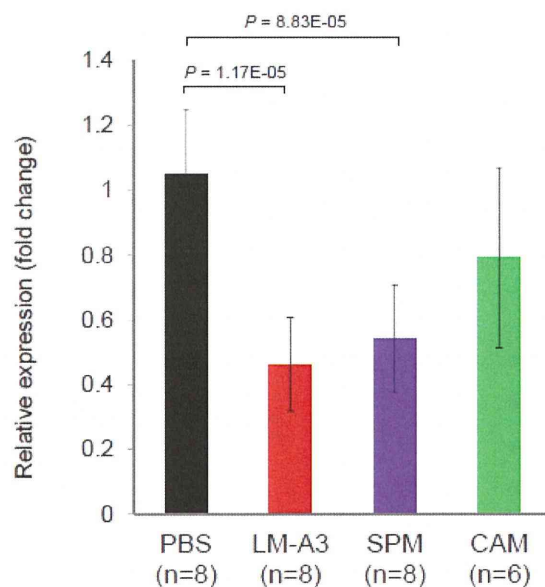


図 2. マクロライドを投与したマウス肺組織でのウイルス核酸量の減少。

さらに、マクロライドの投薬によって、感染マウスの肺胞洗浄液中のケモカインやサイトカイン産生が抑制されることがわかり、炎症抑制に作用している可能性が示された。