

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

ハノイ小児病院での重症呼吸急迫症候群を起こす背景の検討

研究分担者 布井博幸 宮崎大学医学部生殖発達学講座 小児科学分野教授

研究協力者

河内正治, 岡本竜哉：国立国際医療研究センター

Thuy T.B. Phung, Le T.M. Huong, San T. Luong, Liem T. Nguyen：

ハノイ国立小児病院、ベトナム

中島典子：国立感染症研究所

小原収：かずさ DNA 研究所

研究要旨： これまでハノイ小児病院で鳥インフルエンザによる劇症呼吸急迫症候群 (Fluminant Acute Respiratory Distress Syndrome: FARDS)を中心に、P/F 比が100を下る重症 ARDS の背景について検討してきた。この間、重症 ARDS 88 症例の中で、Rhinovirus 感染症 11 症例を経験した。Rhinovirus C 型は中国や東南アジアでの死亡者が多く報告されてきた新型の Rhinovirus で、流行が心配されたが、遺伝子解析の結果、保存された気道吸引物から 5 例で Rhinovirus A 型が確認された。また、重症化する背景として、免疫不全があるのではないかと考え、数名の BTK などの遺伝子解析し、病歴の解析も試みたが、同様の重症 ARDS 症状を示した患者はみられなかった。これらの結果から、重症 ARDS の背景として、環境因子（孤児院などでの集団生活や栄養状態など）が強いのではないかと考えられた。

A. 研究目的

これまで重症 ARDS に罹患した患者で、KL-6 異常高値を示したことに関して、1) 人種差ではない。(コントロールでもほぼ日本人と同じ(<250u/ml)、麻疹肺臓炎 (p62) もほぼ同じ (KL-6:6000 台) を示した。また、H1N1pdm 感染では低値を示した事でも同じであった。) 2) 施設からのこどもが多いので、紹介が遅れ、診断が遅れたため、末期の状態ではなかったのか? 3) II 型肺胞上皮

細胞の増殖を促すような熱帯地方に特有な感染があるのではないかと? 4) 先天性異常の可能性はないのか? (ABCA3, サラセミアメージャなど、かなり特殊な病気も国立病院なので集中しているためではないか) という疑問があげられた。

Human Rhinovirus (HRV) は喘息発症の重要な因子であることは既に報告されている。藤井らのフィリピンからの報告では、HRV C 型が、重症肺炎の原因になっている (1, 2)。

Cystic Fibrosis の増悪因子にも HRV が関わっていることは明らかである。今回、3)「熱帯地方に特有な感染がないのか」を検証すべく、東南アジアで流行が報告されている HRV C 型が、ベトナムでも呼吸器感染症の増悪因子になっているのか、HRV の遺伝子解析を行った。また、重症 ARDS の背景としての先天性免疫不全でも特殊なタイプの病型があるのか、BTK 遺伝子解析を行い検討した。

B. 研究方法

症例：ベトナム国立ハノイ小児病院の約4年間で88名の ARDS (P/F<100) を経験した。11例が PCR 法で HRV 陽性であった。11名の HRV 感染者で 2g/Kg の IVIG 療法が試行できた患者は7例で、早期に(3-4病日)投与された患者は全員回復したが、遅れて10、11病日に IVIG 施行し、回復した症例が1例、6、7、8、9病日に投与されたが死亡された症例が2例であった。IVIG 未投与群は4名で3例死亡されている。また、サイトカインプロファイルから、KL-6 / sTNFR2 / IL-12 も高値症例は予後不良(4例中4死亡・IVIG1 例)、一方 IL-12 が低い症例は予後改善(3例中1例死亡・IVIG2 例)されていた。KL-6/TNFR2 上昇、IL-12 が低い症例は予後良好(4例中1例死亡・IVIG4 例で2例は遅れての投与となっている)であった。

1) HRV 遺伝子解析：HRV は一本鎖の約 7.2kb の大きさで、プラス・ストランドの RNA virus であり、多くの遺伝子変異が確認されている。VP4-VP2 領域を含む 549bp の非翻訳領域の塩基配列に型別の違いが集中しているため、sequence primers of 5' noncoding region (VP4-VP2) は 9565 position 1083 - 1058: 57-GCA TCIGGY ARY TTC CAC CAC CAN

CC-37 と、9895position 534 - 560:57-GGG ACCAAC TAC TTT GGG TGT CCG TGT-37; (I=inosine; Y=T, C; R=G, A; N=A, G, C, T) の二つの forward primer と、もう一方の 3' primer for hemi-nested PCR: (450 bp) ATG GGN GCW CAN GTNTCH ANH CA (W=A/T, N=A/C/G/T, H=A/C/T) を用いて、RT-PCR で増幅後、Gel より cDNA を抽出後、Direct sequence を行った。結果は HRV database と比較検討した。

2) BTK 遺伝子解析：

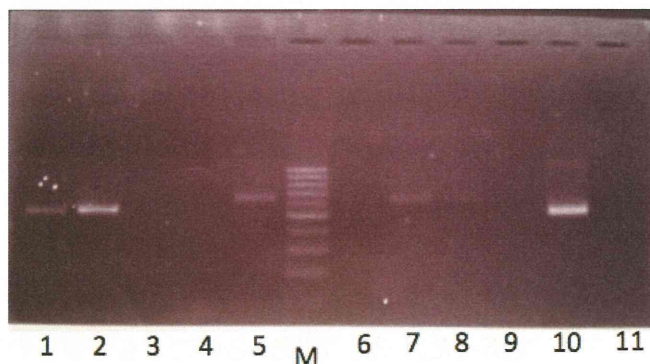
低ガンマーグロブリン血漿患者6名のうち4名の男性患者について、かずさDNA 研究所の小原収先生の協力を得て、BTK 遺伝子解析を行った。患者およびその家族からの遺伝子解析に関する同意は、現地の医師にお願いし、実施した。

C. 結果

1) HRV ウイルス遺伝子解析結果：

気道吸引物からの PCR については、入院直後に行われた検体では11名とも陽性であったが、いずれも冷凍保存されており2-3年以上経過していたが、図1の様に、5例で今回も陽性となった。

図1：患者 RT-PCR 解析



いずれも、陽性のバンドを Gel から抽出後、同じ Primer で direct sequence を行った。Band1 は JF31675.1 のヒト HRV A type と 351/376 の割合で matching していた (図 2)。同様に Band2 は JX074051.1 と、Band 5 と Band 10 は JF285243.1 と 各々 377/393, 344/370, 372/385 の割合で matching していた。その結果、5 名とも HRV A type と判定した。

図 2: HRV RT-PCR 産物の Direct sequence と RT-PCR data base とのアラインメント比較

```
>|_cb|JF31675.1| Human rhinovirus A isolate LZ90 polyprotein gene, nt
Length=420

Score = 513 bits (568), Expect = 7e-142
Identities = 351/376 (93%), Gaps = 16/376 (4%)
Strand=Plus/Plus

Query 24  CAATTCAGTTTCTAATGGGATCTAGGTTTAAACTATTTTAAAGATCAATTATTTCAN
Sbjct 48  CAATTCAGTTTCTAATGG-ATCTAG--TTTAAACTATTTTAAAGATCAATTACTTCAN
Query 84  GATGCTGCATCAAGCGGGGATCAAAGCTTGGAGTCTCACAAGATCCAAAGCAATTTM
Sbjct 103 GATGCTGCATCAAGCGGGGATCAAAGCTTG-AGTCTCACAAGATCCAAAGCAATTTM
Query 144 TGATCCAGTCAAAGATGTTCTAGAGAAAGGAATCCCAACTTTGCAATCTCCAACAGTAGI
Sbjct 162 TGATCCAGTCAAAGATGTTCTAGAGAAAGGAATCCCAACTTTGCAATCTCCAACAGTAGI
Query 204 GGCCTGTGTGTTATTTCAGACAGGATATATAAAATCACCAGAGGGGATCAACATAACAT
Sbjct 222 GGCCTGTGTGTTATTTCAGACAGGATATATAAAATCACCAGAGGATCAACATAACAT
Query 264 TCAAGATGTAGCAAATCTGTGG-TGGGTATGGAGATGG-CTCCATATTCGAC-CCCCI
Sbjct 282 TCAAGATGTAGCAAATCTGTGGTGTGGGTATGGAGATGGCCCTCATTTCGACACCACI
Query 321 AGATGCCAC-GCAATCGAC-AAACCAGCC-AOCTGA-ACATCATCAACAGG-TTTATM
Sbjct 342 AGATGCCACAGCAATTCACAAACCAGCCAAOCTGATACATCATCAACAGGTTTATM
Query 376 CC-AGAAAG-AAAGAA 389
Sbjct 402 CCTGGAAAGTAAAGAA 417
```

2) 低ガンマーグロブリン血症患者の BTK 遺伝子解析

4 名の低ガンマーグロブリン血症患者と 1 名の母親の解析も行った。

表 1: 患者 BTK 遺伝子解析結果

Pt No.	Age	Muta	Exo No	Nucleotide Change	AA type	AA cha
1578*	? mother	3	17	c.1742delG	Frameshift	p.Ala582L
1576	6 yo	4	14	c.1249A>T	Nonsense	p.Lys4
1572	10 yo	3	18	c.1779delG	Frameshift	p.Gly594C
1254	?	4	6	c.441G>A	Nonsense	p.Trp1
1251*	?	1	17	c.1742delG	Frameshift	p.Ala582L

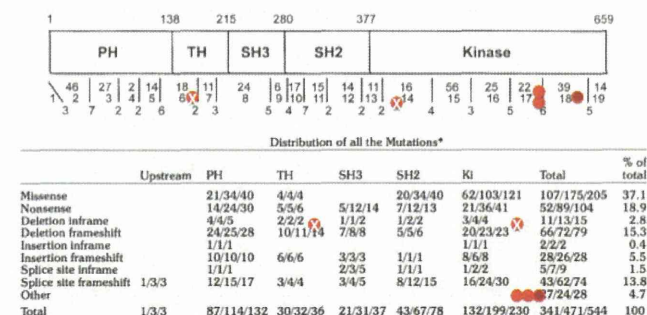
Pt 1578* is a motner of 1251*

解析結果、各患者で 1-4 カ所の変異が認

められたが (Muta.の項目)、database から SNPs(一塩基置換)と考えられる変異を除くと、表 1 のように、framesift 変異が 2 名、Nonsense 変異が 2 名であった。

各患者結果をこれまで報告されている BTK 欠損患者の Database (3) と比較すると、図 3 のように、Kinase ドメインに 3 名の変異が同定され、もう一例は TH ドメインに変異が存在した。同様の変異は既に報告されているものが 1 例 (pt.1254) で他の 3 例は新規の変異で、特に変異に偏りは認められなかった。

図 3: 患者 BTK 遺伝子変異の比較



D. 考察

Rhinovirus(HRV)は、ほとんどが鼻腔から上気道の ICAM-1 に吸着し、感染する。単なる鼻風邪ウイルスの一つであると考えられていたが、藤井らのフィリピンからの報告では、HRV C 型が、重症肺炎の原因になっている

(1)。ベトナムでも HRV C 型が呼吸器感染症の増悪因子になっているのか、HRV の遺伝子解析を行った結果、増幅できた 5 例とも RAV A 型と Homonogy が高く、C 型ではないことが判明した。

また、低ガンマーグロブリン血症の遺伝子解析を行ったところ BTK 遺伝子異常が 4 名発見され、3 例で新規の遺伝子変異が確認された。1 例は既に報告された変異であったが、3 例は新規変異であった。しかし、これらの

患者でも、中耳炎やリンパ節炎などが主症状で、日本での同疾患での状況と大きくは変わらず、重症肺炎を示した患者はおられなかった。

これらのことから、新たな変異 HRV の可能性は考えづらく、また先天性免疫不全症患者に独特の症状でもないことが考えられた。児の栄養状態などもっと詳細な背景の調査が必要である。

E. 結論

HRVA 型感染でも劇症 ARDS 臨床症状を示すことがあり、KL-6 高値で HRV が陽性であれば、IVIG などの早期の治療が必要である。背景としての免疫不全については、BTK 欠損症のみの検査であったが、新規変異が見つかったこと、これらの患者で重症 ARDS を起こした患者はおられないことから、重症 ARDS の背景として、やはりその他の環境因子(孤児院などでの集団生活や栄養状態など)が問題となるのではないかと思われた。

参考文献

1. Naoko Fuji et al. PLoS One 2011;6:27247
2. Wilkie RP, et al. *Infect Immun*. 2007
3. Mauno Vihinen et al, HUMAN MUTATION 13:280-285 (1999)

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O. A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing

Proteins. *Curr Chem Genomics*. 2012; 6: 27-37.

- 2) Yamada A, Moritake H, Shimonodan H, Yokogami K, Takeshima H, Marutsuka K, Nunoi H. *J Pediatr Efficacy of Temozolomide in a Central Nervous System Relapse of Neuroblastoma With O 6 -Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation.*
- 3) Moritake H, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Harada M, Sugimoto T, Nao-I N, Nunoi H. *Cytomegalovirus retinitis as an adverse immunological effect of pulses of vincristine and dexamethasone in maintenance therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013; 60(2): 329-31.*
- 4) Matsunaga T, Yamashita K, Kubuki Y, Toyama T, Imataki O, Maeda K, Kawano N, Satou S, Kawano H, Ishizaki J, Yoshida S, Kameda T, Sasaki T, Sekine M, Kamiunten A, Taniguchi Y, Hidaka T, Katayose K, K-Shimoda H, Shide K, Yamamoto S, Moritake H, Nunoi H, Makino S, Kitanaka A, Matsuoka H, Shimoda K. *Int J Hematol. Acute myeloid leukemia in clinical practice: a retrospective population-based cohort study in Miyazaki Prefecture, Japan. 2012; 96(3): 342-9.*
- 5) Hosoki K, Fujisawa T, Hashiguchi A, Nagao M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Nakano T, Nunoi H, Ihara T. *Aberrant cytokine responses to influenza A virus in a child with severe influenza A infections. *Allergol Int*. 2012; 61(3):507-9.*

- 6) Nakamura H, Fang J, Mizukami T, Nunoi H, Maeda H. PEGylated D-amino acid oxidase restores bactericidal activity of neutrophils in chronic granulomatous disease via hypochlorite. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012; 237(6): 703-8.
- 7) Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Blood*. 2012; 119(23): 5458-66.
- 8) Moritake H, Yamada A, Kimoto Y, Sawa D, Shimonodan H, Nunoi H. Acute megakaryoblastic leukemia and severe pulmonary fibrosis in a child with Down syndrome: successful treatment with ultra low-dose cytarabine using GATA1 mutation to monitor minimal residual disease. *Am J Hematol*. 2012; 87(4): 447-50.
- 9) Arai T, Oh-ishi T, Yamamoto H, Nunoi H, Kamizono J, Uehara M, Kubota T, Sakurai T, Kizaki T, Ohno H. Copy number variations due to large genomic deletion in X-linked chronic granulomatous disease. *PLoS One*. 2012; 7(2):e27782.
- 10) Moritake H, Hidaka F, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Nunoi H. Concomitant transient erythroblastopenia of childhood with neonatal hepatitis. *Pediatr Int*. 2012 ; 54(1):147-50.
- 11) 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. *Mizukami J Clin Immunol*. 2012 ; 32(1):39-49.
- 12) 中原 彰彦(宮崎大学 医学部生殖医学講座小児科学分野), 布井 博幸【クローズアップ感染症】 <感染症治療の進歩>急性脳症と臓器障害 インフルエンザ脳症を中心に(解説/特集) 小児内科(0385-6305)44 巻 7 号 Page1104-1108(2012.07)
- 13) 布井 博幸(宮崎大学 医学部生殖発達医学講座小児科学分野). インフルエンザ脳症 アポトーシスを伴う多臓器不全?(解説) *LiSA(1340-8836)19巻別冊'12* Page92-100(2012.05)
- 14) 田中 悦子, 此元 隆雄, 織田 真悠子, 中原 彰彦, 池田 俊郎, 布井 博幸. 重症心身障害児に透析を導入した2例日本小児腎不全学会雑誌.32 58-60
- 15) 原田 雅子, 高木 純一, 近藤 恭平, 久保尚美, 布井 博幸. 小児心疾患における迅速測定系BNP値の有用性. *新薬と臨床(0559-8672)61 巻 11 号* Page2329-2332(2012.11)
- 16) 山中 龍宏(日本小児科学会), 溝口 史剛, 市川 光太郎, 木崎 善郎, 滝沢 琢己, 平岩 敬一, 森 臨太郎, 渡辺 博, 清沢 伸幸, 布井 博幸, 竹内 宗之, 青木 康博, 渡辺 とよ子, 箕輪 良行, 松平 隆光,. 子どもの死に関する我が国の情報収集システムの確立に向けた提言(解説). *日本小児科学会雑誌(0001-6543)116巻6号* Page1027-1035(2012.06)

H. 知的財産圏の出現・登録状況、参考文献

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

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

特発性肺線維症急性増悪（IPF-AE）における予後因子解析 ならびに non-IPF-AE との臨床画像病理学的検討

研究分担者 本間 栄 東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科 教授
研究協力者 杉野 圭史、菊池 直 東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科

研究要旨

特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)の急性増悪 (Acute exacerbation; AE) は、IPF の慢性経過中に両肺野に新たな肺の浸潤影の出現とともに急速な呼吸不全がみられる極めて予後不良の病態である。一方で、近年、IPF 以外の特発性非特異性間質性肺炎 (Idiopathic non-specific interstitial pneumonia; I-NSIP)や膠原病肺 (Interstitial pneumonia associated with collagen vascular disease; CVD-IP)にも AE が合併することが知られてきている。病理組織学的には、いずれもびまん性肺胞障害 (diffuse alveolar damage; DAD)の像を呈し、IPF-AE と同様に極めて予後不良である。そこで IPF-AE における予後不良因子を明らかにし、non-IPF における AE 症例と臨床・画像・病理学的所見について比較検討した。IPF の AE 発症予測因子は、男性および CPI 高値であった。IPF-AE の予後予測因子として、入院時の P/F 比、第3病日の P/F 比、 Δ P/F 比 (Day 1-3)、入院時の diffuse type の ground glass opacity、AE 発症前の IPF 治療介入が挙げられた。IPF-AE 死亡群では、生存群に比べて有意に P/F 比が低値であり、第3病日においてさらに悪化を示した。次に急速進行性の悪化を辿り、呼吸不全によって死亡し剖検された AIP および AE を発症した慢性線維型間質性肺炎 (UIP、fibrotic NSIP)症例の検討では、画像上 NSIP パターンと判断された5例中3例で病理学的に UIP と診断、一方、画像上 UIP パターンと判断された12例中2例で病理学的に fibrotic NSIP と診断された。いずれも新旧の DAD 所見が混在し、DAD の質的・量的な病理学的相違点は認められなかった。以上のことから、AIP、CVD-IP ならびに fibrotic NSIP の AE に対しては、IPF-AE と同様に積極的な集学的治療を行う必要があるが、いまだに極めて予後不良症例も存在するため、今後は AE 発症や予後不良例における共通した責任遺伝子などの検討、検索が期待される。

A. 研究目的

特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)の急性増悪 (Acute exacerbation; AE)は、IPF の慢性経過中に両肺野に新たな肺の浸潤影の出現とともに急速な呼吸不全がみられる極めて予後不良の病態である。一方で、近年、IPF 以外の特発性非特異性間質性肺炎 (Idiopathic non-specific interstitial pneumonia; I-NSIP)や膠原病肺 (Interstitial pneumonia associated with collagen vascular disease; CVD-IP)にも AE が合併することが知られてきている。病理組織学的には、いずれもびまん性肺胞障害 (diffuse alveolar damage; DAD)の像を呈し、IPF-AE と同様に極めて予後不良である。そこで IPF-AE における予後不良因子を明らかにし、non-IPF における AE 症例と臨床・画像・病理学的所見について比較検討した。

B. 研究方法

2003年4月から2012年12月までに当科に入院したIPF患者124例中AEを発症した43例を対象に、臨床像ならびに予後不良因子について検討した。次に2007年4月から2012年12月までの期間で、当院で病理解剖が施行され病理組織学的に確定診断されたfibrotic NSIP-AE 3例、CVD-IP-AE 2例、肺サルコイドーシス 1例、急性間質性肺炎 (Acute interstitial pneumonia; AIP) 3例、IPF/UIP-AE 11例を対象に、画像所見ならびに病理学的所見について比較検討した。なお、臨床的IPFおよびAEの診断は、厚生労働省びまん性肺疾患研究班第4次診断基準に基づいた。初回AE後の生存例とは、発症後30日を超え生存し、かつ画像所見の悪化が止まったものと定義した。AE時の

ground glass opacity (GGO)の画像分類は、periferal/multifocal/diffuse type の3型に分類した。Composite physiologic index (CPI)は、 $\{91 - (0.65 \times \%DLco) - (0.53 \times \%FVC) + (0.34 \times \%FEV_1)\}$ により算出した。統計学的解析として、成績は平均値±標準偏差で示し、有意差水準を5%未満とした。2群間の比較には、Mann-Whitney U 検定およびカイ2乗検定を用い、予後因子解析には、Cox 比例ハザード回帰分析を用いた。生存率はKaplan-Meier 法で算出し、その有意差検定には log rank test を用いた。なお統計解析ソフトは JMP (version 10.0.0, SAS Institute, Cary, NC, USA)を使用した。

C. 研究結果

IPF 全体の患者背景では、AE 合併例は非合併例に比べて有意に症状出現から初診までの期間が長く、CPI 高値であった。また、AE の発症は初発症状出現から4年の時点で最も多く (25.6%)、AE 発症予測因子は、男性およびCPI 高値であった。AE に対する治療内容は、全例でステロイドパルス療法 (CS pulse)が施行されており、好中球エラスターゼ阻害剤 (NE-I) (93.0%)、シクロスポリン A (CyA) (76.7%)、トロンボモジュリン (TM) (37.2%)、低分子ヘパリン (25.6%)、ポリミキシン B 固定線維カラムを用いた直接血液灌流法 (PMX-DHP) (32.6%)で、ステロイドパルス療法の回数は、1回 (44%)、2回 (19%)、3回 (28%)、4回以上が9%であった。IPF 全体の予後因子解析において、AE 合併は有意な予後因子の一つであった (HR 2.419, 95% CI 1.309-4.420; p value = 0.005)。IPF-AE 合併例と IPF-AE 非合併例の生存率の比較では、AE 合併例で有意に予後不良で

あった (MST: 27 ヶ月 vs. 47 ヶ月, p value = 0.022)。IPF-AE の予後予測因子として、入院時の P/F 比、第 3 病日の P/F 比、 Δ P/F 比 (Day 1-3)、入院時の diffuse type の GGO、AE 発症前の IPF 治療介入が挙げられた。IPF-AE 死亡群では、生存群に比べて有意に P/F 比が低値であり、第 3 病日においてさらに悪化を示した (P/F Day 1; 261 ± 66 vs. 159 ± 69 , P/F Day 3; 259 ± 94 vs. 106 ± 47 , $p < 0.0001$)。次に間質性肺炎剖検例の検討では、臨床画像的に NSIP パターンと診断された 5 例中 3 例で病理学的に UIP と診断された。一方、臨床画像的に UIP パターンと診断された 12 例中 2 例で fibrotic NSIP と診断された。最終的に病理学的診断において、3 例の fibrotic NSIP の急性増悪が確認された。既存肺の間質性肺炎パターンおよび基礎疾患の有無にかかわらず、様々な時期の DAD 所見が混在していた。AIP および慢性線維型間質性肺炎 (UIP、fibrotic NSIP) の急性増悪では、いずれも同様の DAD 所見を認め、急速進行性に悪化していた。

D. 考案

IPF の AE に関する臨床的検討は、いままでに幾つかの報告がみられ、IPF における AE は大変重要な予後不良因子の 1 つと考えられており、本検討でも IPF 全体の独立した危険因子として AE が挙げられた。その頻度は、通常年間 5~15% とされるが、対象群の重症度や AE の定義の違いなどにより頻度にばらつきがある。AE の危険因子に関しては、報告数は少ないものの 6 ヶ月以内の FVC の 10% 以上の低下、非喫煙者、初診時の FVC 低下などが指摘されており、進行例あるいは活動性の高い症例において注意

が必要と考えられる。しかしながら、本検討では症例数は少ないものの、軽症例や活動性が低いと考えられる症例においても AE の合併を認めており、既報告のような結果は得られなかった。AE の治療においては、従来、ステロイドパルス療法と免疫抑制剤の併用療法が有効であったとする報告も認められるが、現時点までに IPF の AE に明らかな有効性が示された薬物療法はない。一方で、近年本邦より PMX-DHP 療法により P/F 比が改善し、30 日以上生存率の改善が認められたとの報告がされたが、いずれも後ろ向きかつ複数の薬物療法との併用下での検討であり、PMX-DHP 療法単独の効果は明らかではない。本検討では、PMX-DHP 療法を施行した 14 例中 7 例 (50.0%)、TM 使用例 16 例中 12 例 (75%) で良好な治療成績であったが、さらに CS pulse + CyA + NE-I + TM + PFD 併用療法の 4 例中 4 例 (100%)、CS pulse + CyA + NE-I + TM + PFD + PMX 併用療法の 3 例中 2 例 (66.7%) で 30 日以上生存を認めており、今後は前向き検討の必要性はあるものの、PMX-DHP 療法や TM の使用ならびにこれらを含む多剤併用療法は期待できる治療法の一つと考えられる。予後に関して従来の報告では初回 AE での死亡率は約 80%、改善例でも平均 6 ヶ月で死亡するとされており、本邦で行われた厚生労働省調査での Web 登録の結果では、生存期間中央値は 1.3 ヶ月と一般に予後不良である。本検討では、初回 AE の死亡率は 42.9% であり、生存期間中央値も 2.3 ヶ月と比較的良好な結果であった。また、AE 時の予後不良因子として、P/F 低値、CRP 高値、GGO パターンならびに線維化の拡がり等が報告されているが、本検討

でも P/F 低値や diffuse type の GGO の他、AE 発症前の IPF 治療介入が予後不良因子として挙げられた。一方、急速進行性の悪化を辿り、呼吸不全によって死亡し剖検された AIP および AE を発症した慢性線維型間質性肺炎 (UIP、fibrotic NSIP) 症例の検討では、画像上 NSIP パターンと判断された 5 例中 3 例で病理学的に UIP と診断、一方、画像上 UIP パターンと判断された 12 例中 2 例で病理学的に fibrotic NSIP と診断されていた。既存肺の病変の有無、パターンの違いはあるものの、いずれも新旧の DAD 所見が混在し、DAD の質的・量的な病理学的相違点は認められなかった。以上のことから、初回 IPF-AE に対する集学的治療は、死亡率を低下させたが、IPF に対する治療が既に行われている患者で、AE 発症時の P/F 低値および diffuse type の GGO 分布を示す IPF-AE 患者は極めて予後不良であり、可及的速やかにステロイドや免疫抑制剤に加えて好中球エラスターゼ阻害剤、抗凝固療法（トロンボモジュリン）等の多剤併用療法を施行し、可能であれば PMX-DHP 療法の導入を検討するべきと考える。

E. 結論

AIP、CVD-IP ならびに fibrotic NSIP の AE に対しては、IPF-AE と同様に積極的な集学的治療を行う必要があるが、いまだに極めて予後不良症例も存在するため、今後は AE 発症や予後不良例における共通した責任遺伝子などの検討、検索が期待される。

F. 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

なし

2. 学会発表

杉野圭史, 菊池 直, 石田文昭, 廣田 直, 佐藤敬太, 佐野 剛, 磯部和順, 坂本 晋, 高井雄二郎, 本間 栄: 特発性肺線維症急性増悪の臨床的特徴. 第 106 回臨床呼吸生理研究会, 東京, 2012, 6

G. 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

ハノイ国立小児病院における H5N1 鳥インフルエンザを含む
重症肺炎の病理学的解析

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：ハノイ国立小児病院との共同研究によりH5N1インフルエンザのネクロプシーあるいはオートプシー例を5症例解析してきた。肺局所でのH5N1-RNA量と炎症性サイトカイン・ケモカインmRNA量をリアルタイム定量RT-PCR法で定量し、ウイルス量とサイトカイン・ケモカインの発現量が相関していることを明らかにし、さらに二重蛍光免疫組織化学によりTNF- α 、IL-6、IL-8、IP-10は肺胞マクロファージのみならず、肺胞上皮細胞や血管内皮細胞(IL-6)でも陽性であることを示した(Nakajima et al, Modern Pathology 2012 e-pub)。H5N1の肺胞上皮細胞への直接傷害とH5N1感染によって誘導されたサイトカイン・ケモカインの作用により致死率60%にも及ぶ劇症型のARDSが引き起こされると考えられた。H5N1非感染の重症肺炎3例(2008年)の剖検組織を解析した。1例はカリニ肺炎とサイトメガロウイルス(CMV)肺炎を併発していたことがわかり免疫不全状態にあったと予測された。残りの2例では、気管吸引物からはライノウイルス(A型)が検出されたが、ホルマリン固定パラフィン組織切片から抽出したRNA/DNAをもちいてマルチウイルス定量RT-PCRを行ったところ、CMV-DNAが検出された。組織学的には肺、腎臓、肝臓にCMV封入体がみとめられ、免疫組織化学でCMV抗原が陽性であった。肺はDADを呈していた。年齢は生後2か月と3か月であり、周産期の母子感染あるいは孤児院での水平感染が考えられ、低栄養状態による免疫低下が推測された。CMVの感染あるいは再活性化が肺炎の重症化因子あるいは病原体となりうることを考え、ARDSの病原ウイルス検索の際、呼吸器系疾患関連ウイルス以外にCMVも加え検索することを提案したい。

A. 研究目的

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ARDSによる呼吸不全で亡くなっている。今年度

は重症肺炎の病態を明らかにするために肺局所でのサイトカイン・ケモカインの発現を解析した。さらにH5N1非感染の重症肺炎3例(2008年)の剖検組織を病理学的に解析した。

B. 研究方法

(材料)

ベトナムハノイ国立小児病院で 2003-2008 年の H5N1 感染の重症肺炎 5 例および H5N1 非感染の重症肺炎 3 例(2008 年)のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE)肺組織ブロック。

(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 抗原、サイトメガロウイルス抗原、細胞マーカー蛋白および TNF α 、IL-6、IL-8、IP10、RANTES を免疫組織化学で検出した。

③二重染色：サイトカイン発現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。

④核酸の定量：パラフィン包埋組織から核酸を抽出しウイルス核酸およびサイトカイン・ケモカインの mRNA をリアルタイム

RT-PCR で定量解析した。H5N1 非感染例ではマルチウイルス RT-PCR, PCR 法でウイルス核酸を検索した。

C. 研究結果

・H5N1 感染例

肺病理像は、5 症例ともに硝子膜形成をうみ慢性肺障害 (DAD)が認められた。3 症では DAD の滲出期、2 症例は増殖期を呈していた。1 症例につき、4-5 か所の肺切片中のサイトカイン・ケモカイン (TNF α 、IL-6、IL-8、RANTES、IP10) の発現と H5N1-RNA コピー数を解析した。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。局所の各サイトカイン・ケモカイン量と H5N1-RNA 量の関係を調べた結果互いに相関することが分かった(図 1)。

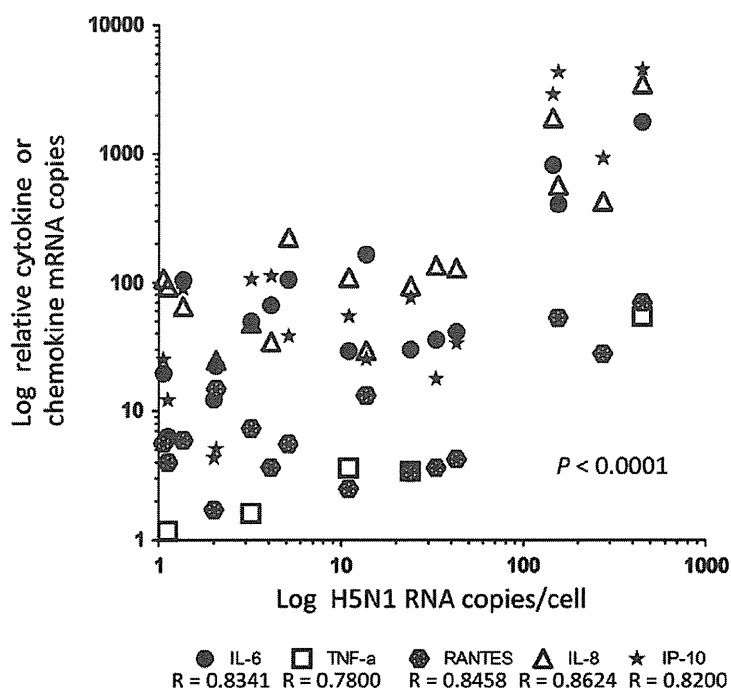


図 1. 肺局所の各サイトカイン・ケモカイン量と H5N1-RNA 量の関係

サイトカイン・ケモカインを発現する細胞は単球・マクロファージ以外に肺胞上皮細胞、細気管支上皮細胞、血管内皮細胞であった。

・H5N1 非感染 ARDS 例

3 例とも 2-3 カ月の孤児であった。体重が 3.5-4.2kg で体重増加不良が認められた。マルチウイルスリアルタイム RT-PCR/PCR 法により 3 例ともサイトメガロウイルス (CMV) DNA が検出された。咽頭から検出されたライノウイルスゲノムは FFPE 標本からは検出されなかった。剖検肺では間質のみならず肺胞上皮細胞に CMV 封入体が認められ、CMV 肺炎を併発していることが分かった。1 例ではカリニ肺炎も合併しており、何らかの免疫不全状態であったと考えられた。

D. 考案

H5N1 感染剖検肺組織中のサイトカイン・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剖検組織においても病日の早い例ほど炎症性サイトカインの発現が高かった。H5N1-RNA 量が多い切片でサイトカイン・ケモカインの発現量が多かったが、H5N1 感染細胞がこれらのサイトカインを発現しているかどうかは不明である。H5N1 非感染肺炎の原因は CMV 肺炎であった。低栄養などによる免疫低下状態で、水平感染したと推測された。ベトナムにおける H5N1 以外のウイルス性呼吸器感染の状況を把握する必要があると思われた。

E. 結論

H5N1 感染により惹起される ARDS は非感染例と比較して重症で致死率が高い理由の 1 つに肺局所のサイトカインストームが示唆されたが、そのメカニズムの解明には詳細な解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Nakajima N](#), Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam *Mod Pathol.* 2012 Nov 23. [Epub ahead of print]
- 2) Ishiwada N, Takada N, Okunushi T, Hishiki H, Katano H, [Nakajima N](#), Kohno Y. Rhabdomyolysis associated with influenza A/H1N1 2009 infection in a pediatric patient *Pediatr Int.* 2012 Oct;54(5):703-5.
- 3) Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Yamamoto K, [Nakajima N](#), Sato Y, Aratani Y, Oshima M, Sata T, Kobayashi K, Kawachi S, Nakayama T, Suzuki K. Contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiol Immunol.* 2012 Mar;56(3):171-82.

4) Ohnishi K, Takahashi Y, Kono N, Nakajima N, Mizukoshi F, Misawa S, Yamamoto T, Mitsuki YY, Fu S, Hirayama N, Ohshima M, Ato M, Kageyama T, Odagiri T, Tashiro M, Kobayashi K, Itamura S, Tsunetsugu-Yokota Y. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus Jpn J Infect Dis. 2012;65(1):19-27.

5) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, 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. 2012 Jan;25(1):1-13.

6) 中島典子、長谷川秀樹：インフルエンザウイルス感染症の病理。医学のあゆみ 241巻1号：37-43, 2012

2. 学会発表

【国際会議】

1) Noriko Nakajima, Ngo Van Tin, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Harutake Katano, Pho Hong Diep, Toshio Kumasaka, Nguyen Trung Thuy Hideki Hasegawa, Luong Thi San, Shoji Kawachi, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki, Tetsutaro Sata. Pathological study of formalin-fixed paraffin-embedded lung tissues with H5N1 influenza infection in Vietnam: Sever Influenza: Burden, Pathogenesis and

Management, October 29-31, 2012. Hanoi

2) Shoji Kawachi, Noriko Nakajima, Tatsuya Okamoto, Hiroyuki Nuoi, Luong Thi San, Nguyen Trung Thuy, Nguyen Thanh Liem, Kazuo Suzuki. The Higher Mortality Rate of ARDS Associated with Viral Infection-From the Prospective Study Cases of PICU in NHP-Hanoi. Sever Influenza: Burden, Pathogenesis and Management, October 29-31, 2012. Hanoi

【国内会議】

1) 高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルス感染症で死亡したベトナム小児例の病理学的解析：中島典子、佐藤由子、片野晴隆、熊坂利夫、佐多徹太郎、長谷川秀樹 第101回日本病理学会総会（東京）2012年4月

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

インフルエンザウイルス感染抵抗性細胞の解析

研究分担者 大島正道 国立感染症研究所 室長

研究要旨：

外部からのウイルス感染に対して宿主側ではインターフェロン、MxA, OAS, Fas など感染防御に働く宿主遺伝子が誘導され感染に対抗する。一方インフルエンザウイルスはウイルス蛋白 NS1 を発現し宿主の抵抗因子発現を抑制し細胞を自らの複製の場に改変する。肺胞由来の細胞株 A549 はインフルエンザウイルスを排除できず死滅するが、一部に死滅を免れる細胞(A549-3S)を見いだした。その細胞をクローン化してウイルス感染の抵抗性メカニズムを解析している。ウイルスの細胞への吸着には差が見られなかったが A549-3S 細胞ではウイルス mRNA の出現過程が遅れる。A549-3S 細胞はウイルス RNA の核移行までの間にウイルス抵抗性を示すことが示唆される。このメカニズムを解析している。

A. 研究目的

現在のインフルエンザウイルスに対する治療薬は主にウイルス蛋白をターゲットとするが、ウイルスは容易に変異を獲得し薬剤耐性を生じる。これに対し、宿主側の蛋白に対する薬剤は薬剤耐性の問題は生じにくい、副作用が問題となる。我々は、肺胞由来細胞株の中に、細胞自体の増殖は親株細胞と同等で、インフルエンザ感染は成立するが死滅は免れる細胞を得ている。この変異細胞のインフルエンザウイルス抑制機構を解明することで、変異を生じやすいウイルス側をターゲットとするのではなく、変異の生じにくい宿主側因子を標的とした治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

(A549-3S細胞の樹立)肺胞由来の細胞株A549細胞はインフルエンザUdom株 (H3N2) 感染によりほぼ死滅するが、トリプシン存

在下でマルチラウンド感染が可能な状態でも死滅しない細胞集団を得た。その細胞に同様の方法でマルチラウンド感染を繰り返し、限界希釈により細胞クローンをえた。得られた細胞クローンA549-3S株にUdom株をトリプシン非存在下で感染し、18時間～24時間に蛍光抗体法で染色し感染細胞を観察した。(図1) またウイルス感染後、経時的に培養上清を取り上清に放出されたウイルスのゲノム量及びウイルスタイターを定量PCR及びプラークアッセイにより決定した。(図2)

(ウイルス吸着量測定) A549,A549-3S細胞においてウイルス吸着に違いがあるか調べるために、細胞にウイルスを感染後氷上に一時間静置後に非吸着粒子を除き定量PCRによってゲノム量を測定する。

(ウイルスmRNAの測定) A549,A549-3S細胞にインフルエンザウイルスUdom株を感染し、経時的にRNAを回収後、定量PCRにてのインフルエンザウイルスmRNA量を測定した。

(抵抗性遺伝子の探索) A549,A549-3S細胞のmRNAの発現の違いをsubtraction法およ

びこれまで多くのsiRNAの実験により報告されている遺伝子を個別に定量的PCRによって探索する。

(誘導発現系による再構成実験)探索によって得られた遺伝子を、プラスミドベクター pA^{bsr}, pR^{puro}を遺伝子導入して作製した誘導発現細胞にECIベクターを用いて遺伝子導入しウイルス抵抗性を解析する。

C. 研究結果

①A549細胞にトリプシン存在下でインフルエンザウイルスを感染させインフルエンザウイルス抵抗性細胞クローン(A549-3S#14)を得た。②その細胞クローンにMOI=1,10,20,40でインフルエンザウイルスをチャレンジした。蛍光抗体による感染細胞におけるウイルスタンパクの発現はA549-3Sでは著しく低く、ウイルスの複製が障害されていることが示唆された。(図1)また時系列的に採取した培養上清中のウイルス量をreal-time PCRで測定した。ウイルスゲノム量はA549細胞の1/1000 レベルであった。

(図2)

③A549,A549-3S細胞間で細胞表面へのウイルス吸着に違いがあるか調べた。細胞にウイルスを感染後氷上に一時間静置後に非吸着粒子を除き定量PCRによってゲノム量を測定した。両細胞間でウイルスの細胞表面への吸着は同等であった。

④A549-3S細胞においてウイルスに対する抵抗性が発揮されるのが核移行以前か以後か確認する為に、ウイルス感染後継時的に感染細胞からtotal RNAを抽出し定量PCRにて比較した。A549細胞に比べてA549-3S細胞ではウイルスmRNAの出現が数時間遅れることが示された。

⑤A549細胞とA549-3S細胞の違いを調べる為にインフルエンザウイルス感染に必要と報告されている遺伝子を定量PCRにより定量した。小胞輸送 (ARCN1)、プロトンポンプ (ATP6AP1)、プロテアソーム (PSMA1)、ユビキチン用蛋白 (FAU、スプライシング関連蛋白 (SF3A1)、タンパク質の核外移行 (NUP98) に関する遺伝子発現において両者に違いを認めている。

D. 考案

A549細胞はインフルエンザウイルス許容細胞であるが、われわれはウイルス感染に著しく抵抗性を示すA549-3S細胞を得た。

A549,A549-3S間に明らかな表現系の相違は見られず、増殖も同等であることから、両者の違いは細胞増殖に重大な悪影響をおよぼさない遺伝子であると思われる。また両者のこの形質は安定している。この両者を解析することで、一時的に機能を抑制しても宿主に重大な影響を及ぼさずにウイルス感染に対して抵抗性を付与でき、また宿主因子を標的とする為、変異や耐性の生じる可能性が低い宿主因子の解明につながると考えられる。

E. 結論

①インフルエンザウイルスUdorn株に著しい抵抗性を示す細胞株A549-3Sが得られた。培養上清のウイルスタイターは約1/10であった。

②一年以上に渡りこの性質は安定である。

③A549-3S細胞におけるUdorn株ウイルス抵抗性はウイルス吸着から核移行までの間に示されることが示唆された。

④インフルエンザウイルスの生活環前半に一時的に機能を抑制しても宿主に対する影響は軽微であるがインフルエンザ感染を強く抑制可能な宿主因子の存在が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yohko K. Shimizu, Minako Hijikata, Masamichi Oshima, Kazufumi Shimizu, Harvey J. Alter, Robert H. Purcell, Hiroshi Yoshikura, Hak Hotta. Isolation of Human Monoclonal Antibodies to the Envelope E2 Protein of Hepatitis C Virus and Their Characterization. plos one. 07Feb,2013

- 2) Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, and Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 19-27, 2012
 - 3) Sugamata, Ryuichi; Dobashi, Hideki; Nagao, Tomokazu; Yamamoto, Ki-ichi; Nakajima, Noriko; Sato, Yuko; Aratani, Yasuaki; Oshima, Masamichi; Sata, Tetsutaro; Kobayashi, Kazuo; Kawachi, Shoji; Nakayama, Toshinori; Suzuki, Kazuo. The contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiology and Immunology*. 56(3),171-82,2012
 - 4) Guoli Shi, Fumihiko Yagyu, Yohko Shimizu, Kazufumi Shimizu, Masamichi Oshima, Aikichi Iwamoto, Bin Gao, Wenjun Liu, George Fu Gao, Yoshihiro Kitamura. Flow Cytometric Assay Using Two Fluorescent Proteins For the Function of the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus. *Cytometry Part A* 79A:653-660, 2011
 - 5) Hori J, Taniguchi H, Wang M, Oshima M, Azuma M G1TR ligand-mediated local expansion of regulatory T cells contributes to immune privilege of corneal allografts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Dec;51(12):6556-65. 2010
 - 6) Lijuan Yu, Chie Aoki, Yohko Shimizu, Kazufumi Shimizu, Wei Hou, Fumihiko Yagyu, Xianzi Wen, Masamichi Oshima, Aikichi Iwamoto, Bin Gao, Wenjun Liu, George Fu Gao, Yoshihiro Kitamura. Development of a simple system for screening anti-hepatitis C virus drugs utilizing mutants capable of vigorous replication. *Journal of Virological Methods*. Nov;169(2):380-4. 2010
 - 7) Tomizawa K, Nagao T, Kusunoki R, Saiga K, Oshima M, Kobayashi K, Nakayama T, Tanokura M, Suzuki K. Reduction of MPO-ANCA epitopes in SCG/Kj mice by 15-deoxyspergualin treatment restricted by IgG2b associated with crescentic glomerulonephritis. *Rheumatology (Oxford)* 2010 Jul;49(7):1245-56
2. 学会発表
【国際会議】
- 1) Kazufumi Shimizu, Toshikatsu Shibata, Tomoko Nishikawa, Keiko Toyosawa, Yutaka Sasaki, Torahiko Tanaka, Kazumichi Kuroda, Reiko Todaka, Masamichi Oshima, Tatsuo Yamamoto. Loss-of-Function Mutation on NS1 Gene Enhances the Virulence of Influenza Virus in Mice. IUMS 2011 XV, International Congress of Virology. Sapporo, 11-16 September 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

2010-122480

インフルエンザ H5 亜型検出用抗体及び検出用キット

横田恭子、大西和夫、阿戸学、高橋宣聖、大島正道、平山中己、小林和夫、板村繁之、曾家義博、三沢修平、西村研吾高橋和郎

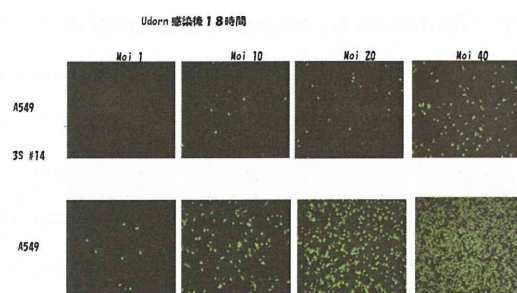
2. 実用新案登録

なし

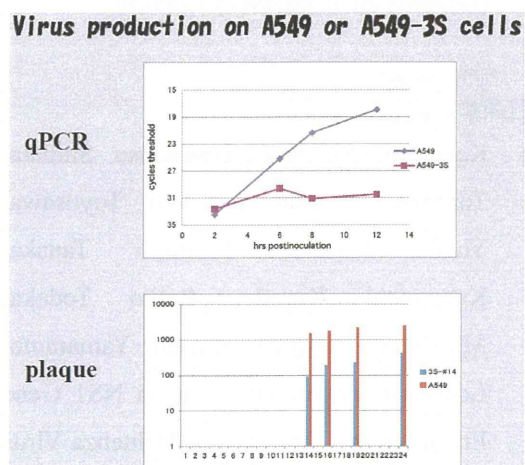
3. その他

なし

(図 1)



(図 2)



FARDS マウスモデルを用いた病態の解析と治療薬の開発

研究分担者：川上 和義 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：

核内タンパク質である High Mobility Group Box 1 (HMGB1) は、侵襲時には細胞外に分泌され、炎症を惹起することより Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) として注目されており、最近では急性肺傷害のメディエーターとしても作用することがわかってきた。遺伝子組換えトロンボモジュリン (recombinant thrombomodulin: rTM) は、抗凝固作用に加えて HMGB1 を中和することにより炎症反応を抑制する作用を示すことが知られている。これまでに我々は、劇症型 ARDS (FARDS) モデルマウスを用いることで、急性肺傷害と HMGB1 との関連性を示唆する結果を得ていることから、rTM による FARDS マウスへの治療効果について検討を行った。FARDS マウスに rTM を投与すると、びまん性肺胞傷害が軽減され、生存期間の延長が観察された。rTM の作用機序を調べるために、近年 LPS 誘発肺傷害モデルの回復期に炎症反応を制御することが報告された regulatory T (Treg) 細胞に注目した。FARDS マウスでは、肺内での Treg 細胞の減少がみとめられたが、rTM 投与によって Treg 細胞が有意な増加を示すとともに、IL-10、TGF- β 産生が有意に増加した。これらの結果から、rTM が、肺内での Treg 細胞及び抗炎症性サイトカインである IL-10、TGF- β の産生を増加させることによって治療効果を発揮する可能性が示唆された。今回は、LPS 投与モデルに加えて、非致死量のインフルエンザウイルス A/H1N1 (PR8 株) を経気道感染させることによって惹起される急性肺障害の後に、肺の線維化を発症するモデルを作製することにも成功した。これは、臨床の場でもみられるインフルエンザウイルス感染による ARDS 後に発症し、その後の QOL にも大きな影響を及ぼす肺線維化の病態解析に有用と考えられ、今後さらなる検討が望まれる。

A. 研究目的

ARDS は肺の炎症と血管透過性の亢進を特徴とし、肺におけるガス交換の障害を呈する疾患で、致死率も高く、有効な治療も限られている。鳥インフルエンザ (H5N1) ウイルス感染症では、急速に進行する激しい ARDS (Fulminant ARDS: FARDS) を合併し死亡率が高いことが知られている (Kawachi et al. J. Infect. Dis. 200; 510-515, 2009)。また、

H5N1 インフルエンザウイルス感染症では、ヒト血清中の interferon (IFN) - γ 、tumor necrosis factor (TNF) - α 、interleukin (IL) -6 などの炎症性サイトカインの上昇が知られている。また、種々の原因による早期 ARDS 患者の気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中で、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 の上昇を認めると報告されており、これらの炎症性サイトカインが ARDS の発症機序において重要な

因子であると考えられてきた。

ARDS の発症機序を解明し、より効果的な治療法を開発するためには、よりヒトの病態に近い実験動物モデルの確立が望まれる。ヒトの ARDS では急性発症の呼吸不全を呈し、病理組織学的に肺胞内への好中球浸潤、間質や肺胞内における凝固・繊維素の沈着、基底膜の露出を伴った肺胞上皮の傷害 (Diffuse Alveolar Damage: DAD) を認める。我々は、Natural Killer T (NKT) 細胞の活性化剤である α -galactosylceramide (α -GalCer) を気管内に投与することで感作したマウスに LPS を気管内投与することで、ARDS に特徴的な病理所見である DAD を呈する動物モデルの作成に成功した (Aoyagi et al. *Int. Immunol.* 23: 97-108, 2011)。これまでの研究で、この動物モデルを用いることで、シベレスタットナトリウム、ガンマグロブリン製剤の高用量投与、マクロライド薬、IFN- α など種々の薬剤について ARDS に対する治療効果の有無を検討してきた。

近年、High Mobility Group Box 1 (HMGB1) は Damage-associated Molecular Patterns (DAMPs) の一つであり、新たな炎症性メディエーターとして注目されている。HMGB1 は炎症の後期に上昇し、高値が長期間持続することより、治療標的になる可能性があるといわれている (Wang H, et al. *Science* 285:248-51, 1999)。これまでの研究で、我々は、FARDS モデルマウスにおける HMGB1 の役割を明らかにし、治療標的としての可能性を示してきた。本研究では、HMGB1 を標的とする新たな治療薬として recombinant thrombomodulin (rTM) の FARDS モデルへの影響について検討した。

インフルエンザでは、ウイルス感染にともなう急性肺傷害を乗り越えても、肺の線維化によりその後の QOL を落とす症例も少なくない。2009 年に起こったインフルエンザウイルス A/H1N1pdm のパンデミック

の際にも、ARDS から救命できたにもかかわらず、肺の線維化をきたした症例が報告されている (*Radiol. Med.* 117: 185-200, 2012; *Eur. J. Radiol.* 79 : 447-451, 2011)。これまでの研究の多くがインフルエンザウイルスによる致死モデルを用いたものであったため、このような臨床的事例についてはその発症機序を解析することが容易ではなかった。そこで、我々は、非致死量のインフルエンザウイルス A/H1N1 (PR8 株) をマウスに経気道感染させ、ARDS が軽減した後に肺線維化をきたすモデルの作製を試みた。

B. 研究方法

1) 試薬

α -GalCer はフナコシ (東京) から購入し、DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) で溶解し、5mg/ml として、さらに PBS (phosphate-buffered saline; リン酸緩衝生理食塩水) で希釈して、終濃度は 0.4% DMSO とした。大腸菌 (O111: B4) 由来の LPS は、Sigma-Aldrich から購入した。

2) FARDS モデルマウスの作成 C57BL/6 マウス (6~8 週齢、オス、日本クレア) に、 α -GalCer (1 μ g/マウス)、または対照として PBS を気管内に投与し、24 時間後に LPS (50 μ g/マウス) を再度気管内投与した。

3) 病理組織学的検討 肺摘出後 10% フォルマリンで固定し、脱水した後パラフィンで封埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。肺線維化の解析では、エラスチカ・マッソン染色を行った。肺組織傷害の組織学的評価として、米国胸部学会推奨の肺傷害スコアを計算した。評価項目は、好中球の肺胞腔内への浸潤、好中球の肺胞隔壁への浸潤、硝子膜構造、肺胞腔内のタンパク様デブリス、肺胞隔壁肥厚、である。ここれらを光学 400 倍で少なくとも 20 以上のランダムな視野で評価し、各項目について 0 点から 2 点の点数をつけ、定められた