

epilepticus. *Neurology*. 2013 (in press)

- (3) Kato M, Yamagata T, Kubota M, et al.  
Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia*. 2013 Apr 26. doi: 10.1111/epi.12200. [Epub ahead of print]
- (4) Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J-i, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, et al. *MLL2* and *KDM6A* mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 2013;Part A 161A:2234–2243.
- (5) Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Kubota M et al. De Novo Mutations in *GNAO1*, Encoding a Gαo Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 2013; 93, 1–10
- (6) Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, Takanashi J, Kubota M, Kato M. Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders. *Brain Dev* 2013 in press.

(イ) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

(ア) 特許取得

なし

(イ) 実用新案登録

なし

(ウ) その他

なし

図1 MELAS 12才男児。初回の脳卒中様発作時の神経画像。左後頭頭頂葉に信号異常と血流低下、MRSで乳酸高値を認める（矢印）。

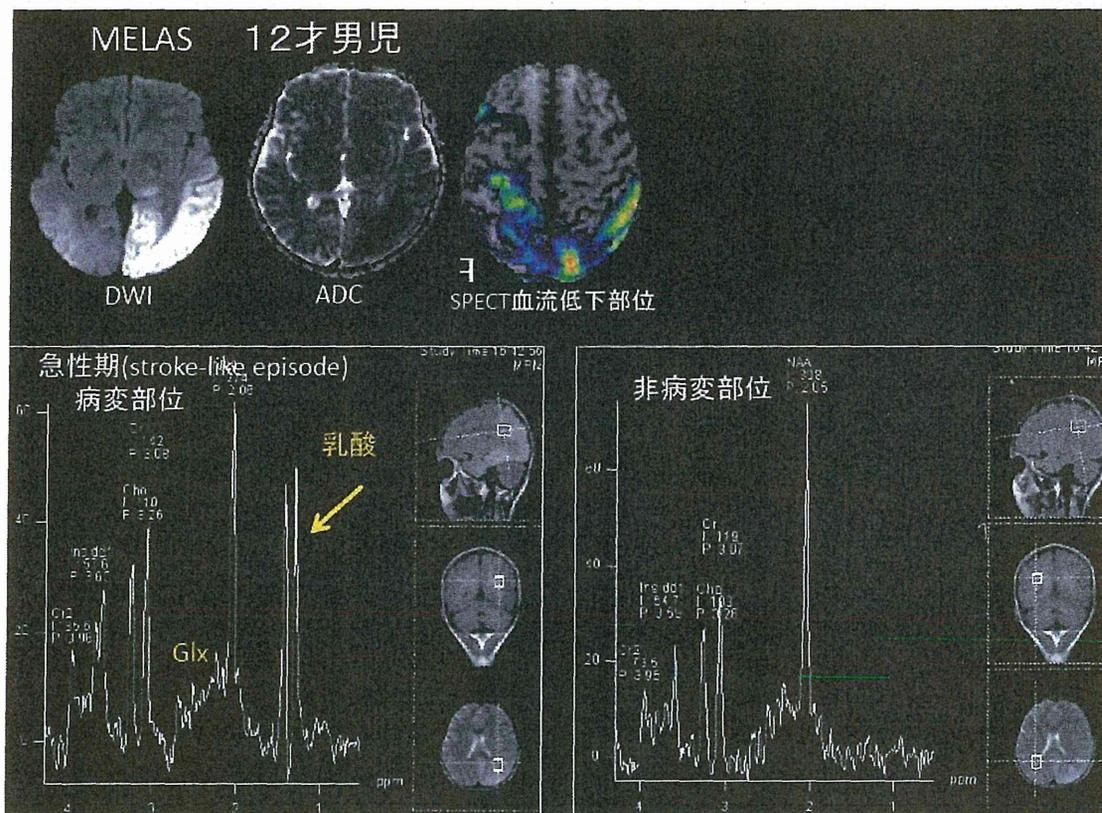


図2 PDHC 欠損症9才男児。インフルエンザ感染による意識障害の急性期および回復期のMRI, MRS。急性期には小脳歯状核の病変、乳酸上昇（長矢印）、Glutamate-glutamin complex (Glx)の増加（短矢印）を認める。

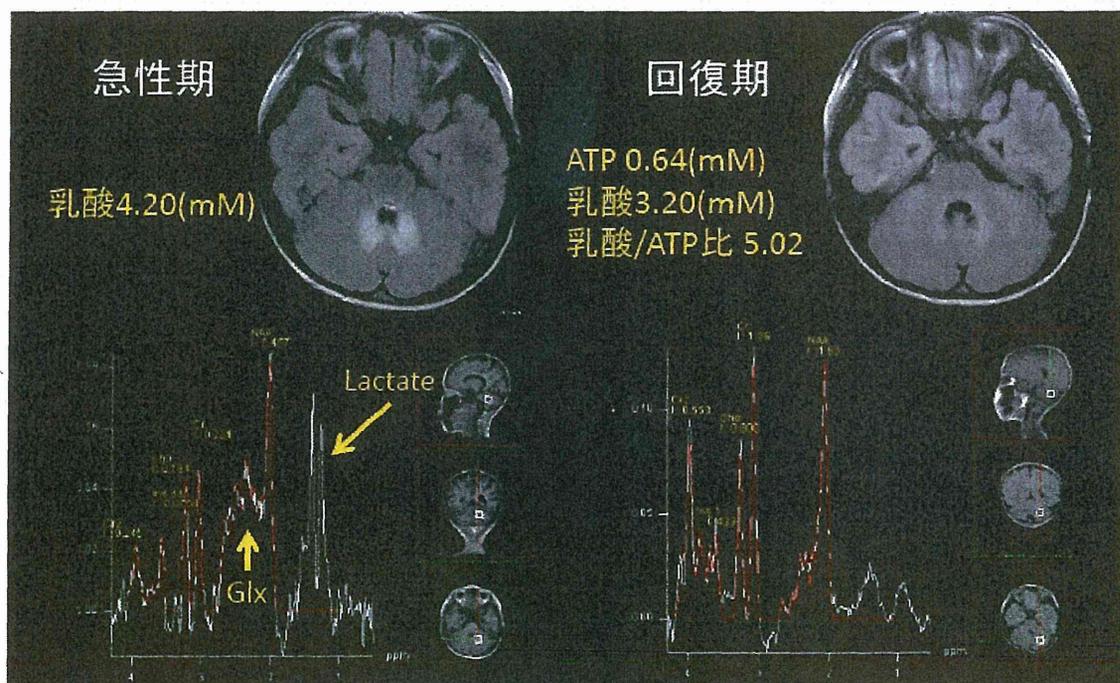


図3 PDHC 欠損症 26才男性の頭部 MRI, MRS。ピーナッツ40粒を連日摂取している時。乳酸上昇はない。

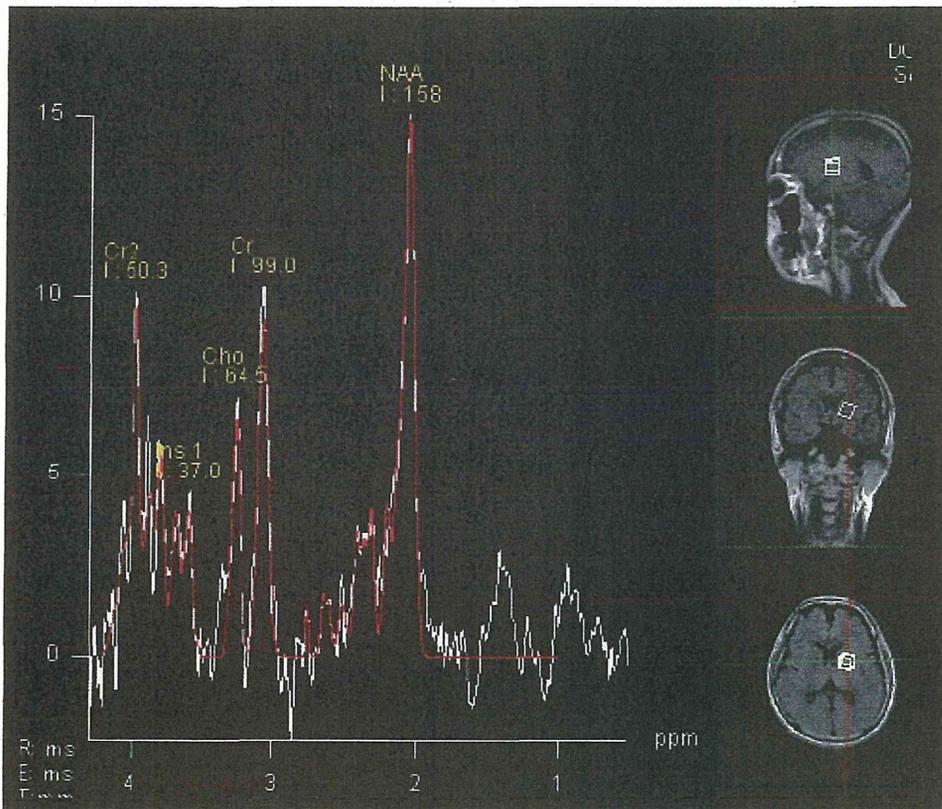
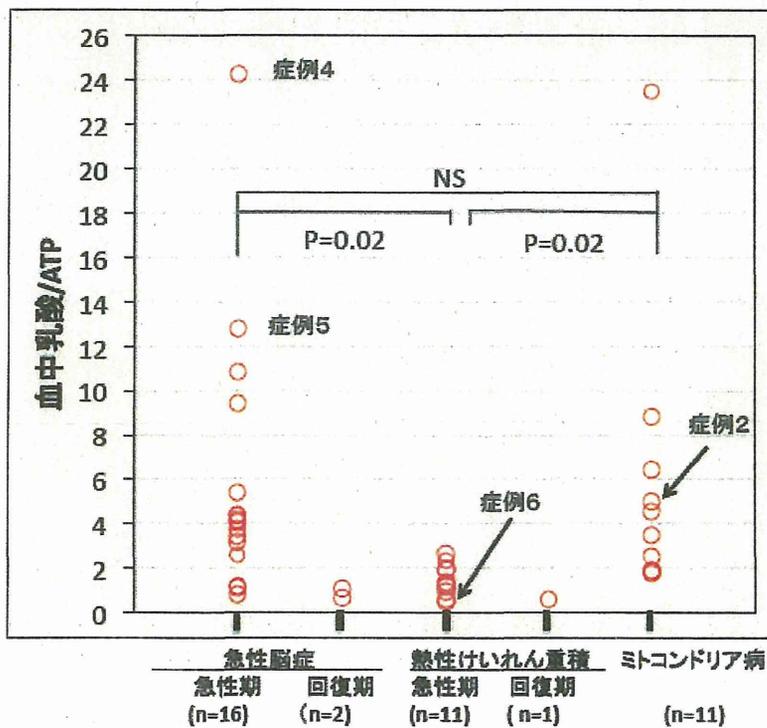


図4 急性脳症、熱性けいれん重積、ミトコンドリア病における乳酸/ATP比



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

ICU 入室患者における末梢血アデノシン三リン酸(ATP)と転帰との  
関係に関する研究

研究分担者 西村匡司 徳島大学大学院救急集中治療医学 教授

研究要旨

重症度スコアは必ずしも患者予後を反映しない。また、多くのスコアは経時的な変化をとらえることができない。簡便に重症患者の変化を経時的、客観的にとらえることが可能となれば、重症患者の治療効果を早期に把握することができ、予後改善にも役立つ可能性がある。本研究では ATP、A-LES (ATP-lactate energy risk score) を測定し、重症患者の予後および従来のスコアとの関連を検討した。ATP、A-LES は重症患者ではいずれも正常範囲を逸脱していた。特に感染症患者では予後との相関が高く、重症患者の予後予測因子として重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究協力者

・小野寺 睦雄

徳島大学大学院救急集中治療医学  
講師

A. 研究目的

集中治療を必要とする患者では、重症度を評価するためさまざまな指標が用いられる。普及率の高いものに APACHE (acute physiology and chronic health evaluation) II スコアや SAPS (simplified acute physiology score) があり、集中治療室に入室した際の重症度評価は予後と良い相関を示す。これらのスコアと予後が相関しない症例も稀ではない。わが国では APACHE II スコアが一般的であるが、これは集中治療室 (ICU) 入室後 24 時間の検査値やバイタルサインから算出するものである。しかし、重症患者のバイタルサインは時々刻々変化していく。簡便、客観的かつ継時的に重症度を評価できる指標があれば、患者管理に有用である。重症患者では呼

吸・循環不全のため抹消組織への酸素供給が悪化することが多い。そのような病態では ATP 産生が低下している可能性がある。しかし、末梢血における ATP 濃度の意義は明らかでない。抹消循環不全、抹消での酸素利用の悪化の指標として乳酸値が良く用いられている。この二つを組み合わせることにより、重症患者の重症度評価がより正確になることが推測される。本研究では判定することが。本研究では末梢血 ATP 濃度、乳酸値、ATP/乳酸比 (ATP-lactate energy risk score : A-LES) が重症患者における重症度や予後予測の指標となり得るか検討した。

B. 研究方法

集中治療部に入室した重症患者から血液を経時的に採取し、血液ガス測定装置で pH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, ヘモグロビン値とともに乳酸値を測定した。同時に ATP 測定用の血液を EDTA 含有チューブで -20°C で保存した。重症

度評価としては集中治療部に入室 24 時間での APACHE II スコアを計算し用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、徳島大学病院倫理委員会の承認を得た上で、対象者には研究内容を説明し、同意を得た上で実施した。

## C. 研究結果

表 - 1 に対象となった患者の基本情報を示す。平均年齢、性別、基礎疾患には死亡患者と生存患者で差はなかった。死亡患者は生存患者と比較して有意に入室 24 時間での APACHE II スコアが高かった。

### 1. 入室時の ATP および A-LES

図 1 に示すように、入室時の ATP および A-LES は生存患者、死亡患者で統計学的に有意差を認めなかった。末梢血 ATP は赤血球内に存在すると考えられる。ICU に入室する患者ではヘモグロビン値が正常範囲にない場合が多い。ヘモグロビン値で ATP 値を補正することで標準化する方法をとった。ヘモグロビン 10g/dL あたりで補正した結果を図 2 に示す。入室時の ATP (ヘモグロビン補正後) および A-LES は生存患者、死亡患者で差を認めなかった (それぞれ  $0.43 \pm 0.13$  vs.  $0.40 \pm 0.28$ ,  $9.6 \pm 8.6$  vs.  $16.8 \pm 17.2$ )。

### 2. ATP 及び A-LES と APACHE II スコアの相関

図-3 に ATP 及び A-LES と従来利用されている APACHE II スコアの相関を示す。有意な相関を認めなかった。M 抗原間では、ルシフェラーゼ活性に変化は無く、プラトーに達していると判定した。

### 3. ATP 及び A-LES の経時的変化

ATP の特徴は経時的な変化を見ることが出来る点にある。時間経過を生存患者と死亡患者で検討した結果が表-2 である。入室翌日の値は ATP では差を認めなかったが、A-LES は死亡患者で悪化傾向にあった。

## 4. 感染症患者での解析

ICU 入室患者で予後が悪い代表疾患として敗血症がある。感染症に伴う多臓器不全を来す疾患である。基礎疾患として感染症を有する患者で生存患者 (17 人) と死亡患者 (4 人) を比較した (図-4)。ATP は生存患者と死亡患者で差を認めなかったが、A-LES は死亡患者で有意に高値であった。感染症患者での予後判定予測を APACHE II スコア、ATP、A-LES で比較すると曲線下の面積は APACHE II 0.801、ATP (ヘモグロビン補正) 0.279、A-LES 0.941 で、A-LES で有意に良かった (図-5)。

## D. 考察

インフルエンザ感染症では重症化機序に熱不安定性フェノタイプによる ATP 産生不全が関与していると報告されている。熱中症患者の重症化にも同様の機序の関与が示唆されている。これら以外の疾患でも重症化の機序に同様に ATP 産生不全が関与している可能性は十分にある。ICU に入室する患者は呼吸・循環動態が不安定なことが多い。肺での酸素取り込み、心不全による酸素供給の問題から、組織での酸素利用が障害される。一般的に末梢組織での酸素不足を見るには嫌気性代謝の産物である乳酸を測定する。しかし、理論的には乳酸よりも ATP は酸素供給に対し、より鋭敏な反応を示すはずである。

今回、ICU 入室患者の ATP および

A-LES の予後判定効果を検討した。ATP、A-LES ともに対象患者全員では生存患者と死亡患者で差を認めなかった。基礎疾患により酸素供給、末梢組織での酸素利用が異なることが原因と考えられる。従来用いられている重症度評価スコアである。APACHE II スコアは死亡患者で高く、ICU 入室患者の予後判定としての APACHE II スコアの精度を示す結果となった。しかし、APACHE II スコアの計算には 24 時間を要するという欠点がある。ATP 及び A-LES の測定は入室時に可能であり、その後も経過を追って変化をとらえることができる。入室時と翌日の検査値の変化を評価した結果でも生存患者と死亡患者で有意差は認めなかったが、生存患者では ATP は増加傾向、A-LES は減少傾向、死亡患者では反対の傾向が認められた。患者数を増やすことで経時的変化の意義が明らかになると期待できる。

感染症患者を対象とすると A-LES の予後判定予測値は最も良好であった。敗血症は集中治療室で管理する患者群の中では予後不良の疾患である。

敗血症は細菌感染が原因で臓器不全が起きる病態である。抹消組織での酸素利用障害が病態生理の一つとして考えられている。敗血症患者で発症する多臓器不全に ATP 産生不全が関与しているか可能性は高い。これが感染症患者で A-LES の予後判定予測が良好であった理由の一つと考えられる。全ての患者に当てはまるわけではないが、A-LES は簡便に測定できるとともに、経時的変化を追うことができる点で優れている可能性がある。

#### E. 結論

重症患者で ATP、A-LES を測定した。重症患者ではいずれも正常範囲を逸脱していた。さらに感染症患者では予後との相関が高く、重症患者の予後予測因子として重要な役割を果たす可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

表-1 対象患者の基本情報

	Survivor (n=74)	Non-survivor (n=18)	P value
年齢	66.0±14.4	66.3±10.3	.918
性別 (男性:女性)	45:29	7:11	.115
APACHE II score	18.3±8.1	27.7±10.6	.000
基礎疾患			
感染症	17	4	
心原性肺水腫	10	0	
虚血性心疾患	8	1	
呼吸器疾患	6	2	
神経系疾患	8	0	
術後	22	1	
熱傷	0	3	
その他	3	7	

表-2 ATP と A-LES の入室日と翌日での比較

	ATP/Hb*10			A-LES/Hb*10		
	入室日	翌日	変化	入室時	翌日	変化
Survivor	0.43±0.13	0.47±0.15	0.05±0.14	9.6±8.6	4.6±3.3	-4.9±8.0
Non-Survivor	0.40±0.28	0.39±0.28	-0.01±0.16	16.8±17.2	23.8±35.6	7.0±20.2

図-1 入室時の ATP と A-LES

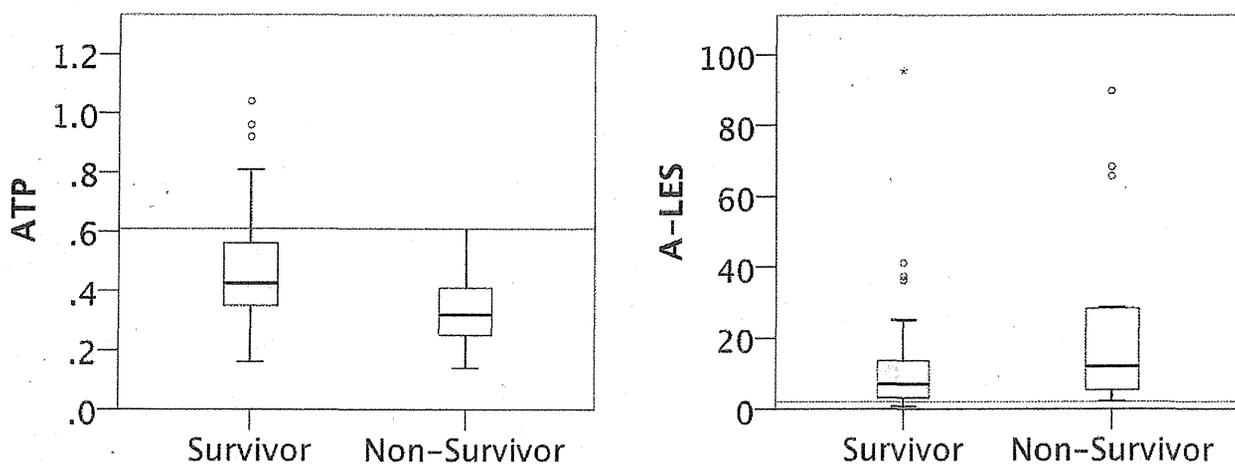


図-2 ヘモグロビン値で標準化した入室時の ATP と A-LES

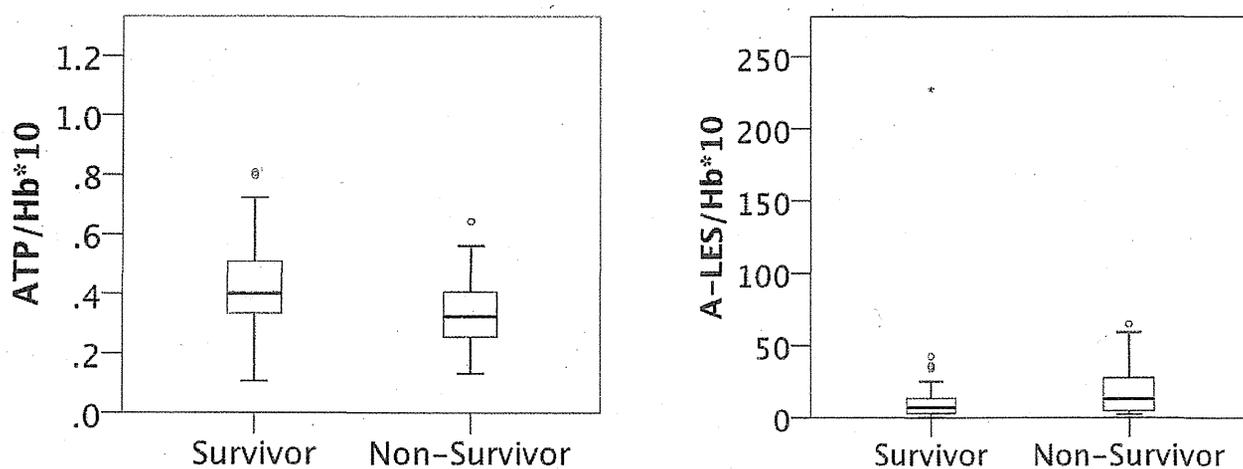


図-3 ATP、A-LES と APACHE II スコアの関係

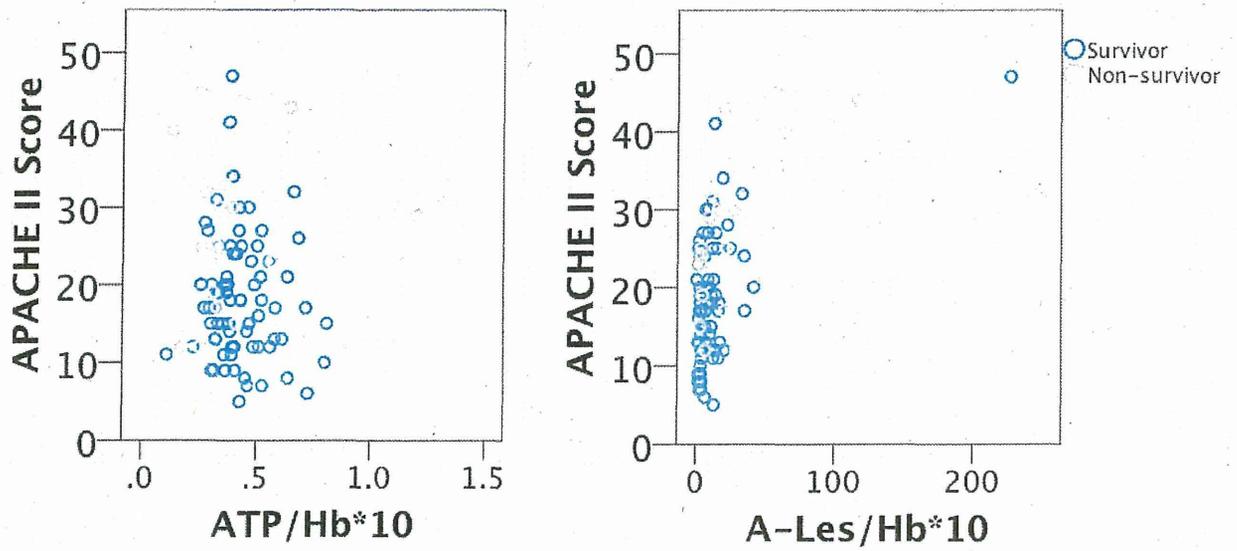


図-4 感染症患者のICU入室時ATPとA-LES

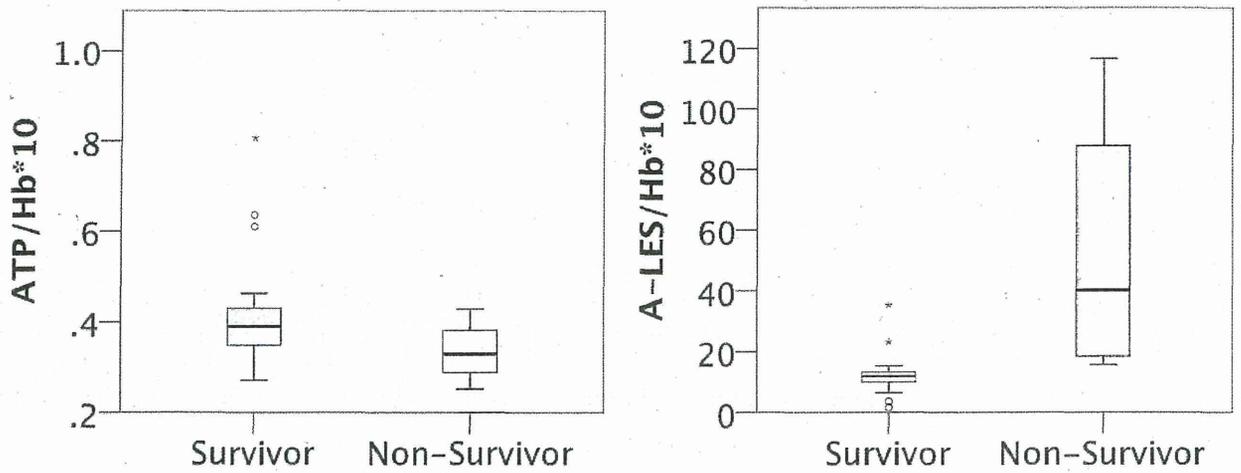
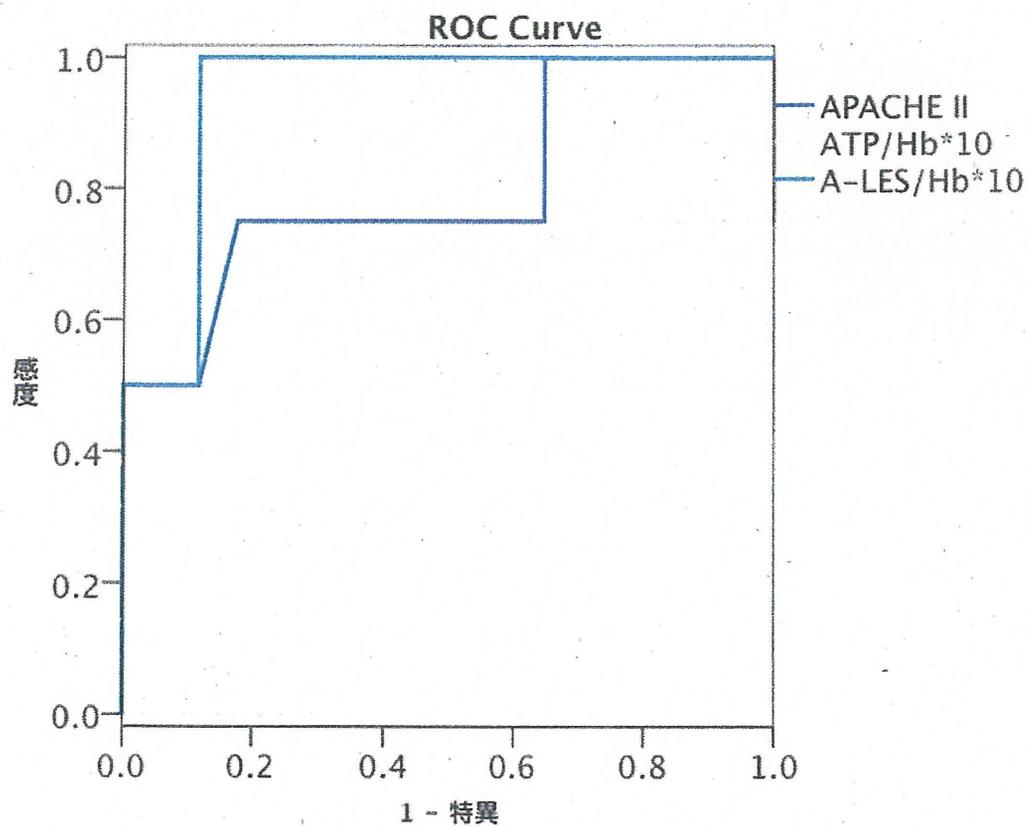


図-5 感染症患者の ROC 曲線



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

新型インフルエンザ肺炎・脳症の診断・治療法開発研究

研究分担者 佐々木 信一（順天堂大学医学部附属浦安病院 呼吸器内科 准教授）  
研究協力者 南條 友央太（順天堂大学医学部附属浦安病院 呼吸器内科 助教）

研究要旨

インフルエンザ(IFV)脳症、重症肺炎症例をいち早く診断するバイオマーカーの解明と確立を目的とし、インフルエンザ患者血清および気管支肺胞洗浄液検体からの ATP をはじめとした各種バイオマーカー検査体制を整え、インフルエンザ患者を中心に計 16 症例において各種 marker を測定した。多くの症例で IL-6、MMP-9 や TNF- $\alpha$  といったサイトカインの高値が認められた。血中の乳酸を ATP の値で割った ATP-lactate energy risk score (A-LES) の値は概ね 20 以下の低値を示したが、B 型インフルエンザ 2 例で高値を示した。今後症例を増やして、さらなる検討を続けて行く。

A. 研究目的

2009 年に勃発した新型インフルエンザ (A/H1N1pdm09) では小児における脳症 (図 1、2)、ならびに ARDS に陥る重症肺炎が認められ問題となった。本プロジェクトの主任研究者の木戸らによりインフルエンザ(IFV)脳症、重症肺炎の病態には、血管内皮と臓器に誘発される IFV-サイトカイン-プロテアーゼサイクルが深く関わっていることが解明されてきている。しかしながら、重症化する症例をいち早く診断するバイオマーカーは現在のところ不明で、診断の遅れが問題となっている。本年度の研究目的は、これら重症化のバイオマーカー (Flu alarmin) の測定系を確立し、早期診断に向けた戦略を構築することにある。Flu alarmin の候補として、患者末梢血の ATP-lactate energy risk score (ALES)、各種サイトカイン等を測定し、その実用性の検証を行う。

B. 研究方法

患者の鼻腔もしくは咽頭ぬぐい棒検体からインフルエンザ迅速キットで検査し、インフルエンザと診断された症例を対象に、同意を得られた患者より血液もしくは肺胞洗浄液を採取し検査を施行した。ATP の測定は、和光純薬工業株式会社の ATP 測定キット (AMERIC-ATP Kit) を用いて、患者検体 (血液・気管支肺胞洗浄液) から測定。同時に採取した検体から各種検査 (アルブミン、グルコース、乳酸、LDH、尿酸、ケトン体、トリプシン、CRP、IL-6、IL-33、MMP-9、TNF- $\alpha$  等) を測定した。具体的には、ATP は当院で患者検体から ATP 抽出溶液を作成し凍結保存後、SRL 社に委託してルミノメーターで測定。同時に採取した血清から、他の項目も SRL 社に委託し測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、順天堂大学医学部附属浦安病倫理委員会の承認を得た上で、対象者には研究内容を説明し、同意を得た上で実施した。

### C. 研究結果

昨年度、当院の倫理委員会に諮り、本研究(浦倫24-43号:「重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究:新規診断・治療に関する提案と検証」)は承認された。これを元に、今インフルエンザシーズンは計16例のインフルエンザ患者等から同意を得、患者血液検体から各種markerを測定した。現在各マーカーの検証中である。検討した症例内訳は、A型インフルエンザ:7例、B型インフルエンザ:3例、細菌性肺炎:2例、急性肺障害:4例である。途中経過であるが、主な結果を図1に示す。多くの症例でIL-6、MMP-9やTNF- $\alpha$ といったサイトカインの高値が認められたが、血中の乳酸をATPの値で割ったATP-lactate energy risk score (A-LES)の値は概ね20以下の低値を示したが、B型インフルエンザ症例2例で比較的高値を示した(値:91.7、40.4)。

### D. 考察

本年度は、現時点で計16症例において各種markerを測定することが出来た。現在各種病態とmarkerの値の関係を解析中である。インフルエンザ症例や肺炎、急性肺障害例では、かなりの症例で各種サイトカインの高値が認められ、いわゆるサイトカインストームの状態が示唆された。現時点で死亡例は経験しておらず、それを反映してかA-LESは概ね低値であったが、B型インフルエンザ症例で高値になる傾向が認められた。この傾向がインフルエンザウイルス

による特性なのか、単に重症度の問題なのかは、現在症例を蓄積し検討中である。

ARDSに陥る症例はインフルエンザに限らず存在するため、そのメカニズム解明とインフルエンザ症例との比較検討のために、今後はインフルエンザ以外のARDS症例(細菌性肺炎、敗血症、重症外傷等)においても検討を加える予定である。

また、当院は東京ディズニーランドに隣接しており、現在中国において問題となっている鳥インフルエンザ(A/H7N9)患者が中国からの観光客として来訪する可能性も秘めているため、患者トリアージシステムを構築し、疑い例を直ちに隔離する体制を確立している。鳥インフルエンザ(A/H7N9)疑いの患者が当院を受診した際には、中国語等で同意を得、本研究に生かせるよう現在同意書の翻訳版(英語版、中国語版)を準備している。

### E. 結論

今後さらに症例数を増やし、さらに検討を深めていく。

F. 健康危険情報  
なし。

### G. 研究発表

(ア) 論文発表

1. Nagashima O, Ohashi R, Yoshioka Y, Inagaki A, Tajima M, Koinuma Y, Iwakami S, Iwase A, Sasaki S, Tominaga S, Takahashi K. High prevalence of gene abnormalities in young patients with lung cancer. J Thorac Dis 2013;5:27-30.
2. Mori T, Tajima K, Hiramama M, Sato T, Kido K, Iwakami S, Sasaki S, Iwase A, Shiomi K, Maeda M, Hino O, Takahashi K. The n-erc

index is a novel monitoring and prognostic marker for advanced malignant pleural mesothelioma. J Thorac Dis 2013;5:145-148.

3. 門屋講太郎, 吉岡 泰子, 難波由喜子, 桂 蓉子, 高 遼, 小池 建吾, 吉岡 正剛, 佐々木信一, 富永 滋, 高橋 和久. 肺膿瘍・膿胸 7 例における菌周病細菌 PCR 検査の臨床的意義の検討. 日本呼吸器学会雑誌 2013; 2: 79-84.

4. 南條友央太, 佐々木信一, 松野 圭, 石森絢子, 牧野文彦, 吉岡正剛, 吉岡泰子, 富永 滋, 山口哲生. *Nocardia wallacei* が検出され, ST 合剤投与で軽快した気管支拡張症の 1 例. Therapeutic Research 2013; 34: 759-60.

5. 磯部 全, 佐々木 信一, 富永 滋, 前野敏孝, 倉林 正彦. 喘鳴を伴わずに発症した好酸球性細気管支炎の 1 例. 日本呼吸器学会誌 2013; 2: 607-11.

6. 磯部 全, 佐々木信一, 神戸将彦, 相澤智弘, 原 健一郎, 前野敏孝. 喀血を主訴とし, びまん性肺胞出血との鑑別を要した気管支管支骨軟骨形成症の 1 例. 気管支学 2014; 36: 73-7.

#### (イ) 学会発表

1. 高 遼, 佐々木 信一, 松野 圭, 石森 絢子, 南條 友央太, 牧野 文彦, 吉岡 正剛, 吉岡 泰子, 富永 滋, 高橋 和久: Fexofenadine は EGFR TKI 投与に伴う interstitial lung disease 発症を抑制する. 第 53 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2013.04.19

2. 石森 絢子, 佐々木 信一, 松野 圭, 南條 友央太, 牧野 文彦, 吉岡 正剛, 吉岡 泰子, 中沢 武司, 富永 滋: 幼少期に発症した気管支拡張症の経過観察中に、喀痰培養で *Aspergillus lentulus* を検出した一例. 第

87 回日本感染症学会学術集会, 2013.06.05

3. 笹野仁史, 吉岡泰子, 松野 圭, 石森絢子, 南條友央太, 牧野文彦, 吉岡正剛, 佐々木信一, 富永 滋: 早期の PMX-DHP を含む集学的治療を行った amyopathic dermatomyositis 合併急速進行性間質性肺炎の 1 例. 第 205 回日本呼吸器学会関東地方会, 2013.07.13

4. 井上 貴昭, 中沢 武司, 麻生 恭代, 成田 久美, 秋田 美佳, 石井 幸, 田中 裕, 南條 友央太, 大日方 薫, 佐々木 信一, 堀賢: ICU が抱える感染症の諸問題 救命センターに発端をなす 2 剤耐性 *Acinetobacter Baumannii* アウトブレイクとその制御過程. 第 61 回感染症学会東日本地方会, 2013.10.10

5. Yasuko Yoshioka, Shinichi Sasaki, Kei Matsuno, Ayako Ishimori, Yuta Nanjo, Humihiko Makino, Keiko Muraki, Shigeru Tominaga, Kazuhisa Takahashi: Two Cases Of Rapidly Progressive Interstitial Pneumonia Associated With Clinically Amyopathic Dermatomyositis Successfully Treated With Early Intensive Therapy. 18th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama, 2013.11.12

6. 南條友央太, 佐々木信一, 中澤武司, 木下綾子, 関口康宣, 成田久美, 岩崎沙奈美, 飯田美奈子, 月山智美, 古田あずさ, 金森由和, 玉野知佐, 伊藤友美, 鈴木俊介, 唐島孝彰, 米山桂一, 富永 滋: 当院における ART 導入した HIV 感染症 21 症例の検討. 第 27 回日本エイズ学会総会, 熊本, 2013.11.20

7. 木下綾子, 佐々木信一, 中沢武司, 南條友央太, 高森建二, 須賀 康: 順天堂大学浦安病院における過去 10 年間の新規 HIV 感染者にともなった皮膚症状の検討. 第 27 回

日本エイズ学会総会, 熊本, 2013.11.20

8. 村木 慶子, 松野 圭, 小池 建吾, 推名 健太郎, 朝尾 哲彦, 本間 裕一郎, 宿谷 威仁, 柴山 里奈, 小山 良, 嶋田 奈緒子, 木戸 健治, 佐々木 信一, 富永 滋, 高橋 和久: 順天堂大学におけるクリゾチニブの使用経験. 第 54 回日本肺癌学会総会, 東京, 2013.11.22

9. 長野則之, 長野由紀子, 外山雅美, 佐々木信一, 中澤武司, 堀 賢, 柴山恵吾, 荒川宜親: NDM-1 メタロ-β-ラクタマーゼ, OXA-181 カルバペネマーゼ等同時産生の広範囲抗菌薬耐性 *Klebsiella pneumoniae* の出現. 第 25 回日本臨床微生物学会総会, 名古屋, 2014.02.01

10. 中村美子, 中澤武司, 秋田美佳, 成田久美, 井上貴昭, 大日方薫, 佐々木信一: 選択培地を用いた *Acinetobacter* の環境リザーバーに関する環境調査. 第 29 回日本環境感染学会総会, 品川, 2014.02.15

11. 松岡遊貴, 吉岡泰子, 松野圭, 推名健太郎, 鈴木洋平, 南條友央太, 村木慶子, 佐々木信一, 二川俊郎, 富永 滋: リンパ管シンチと胸腔鏡により漏出部位を確認した乳糜胸の 1 例. 第 208 回日本呼吸器学会関東地方会, 東京, 2014.02.22

12. 中澤武司, 南條友央太, 井上貴昭, 佐々木信一, 西田香南, 大出恭代, 三澤 成毅, 横山栄二, 菊池 俊: 肝膿瘍より分離された *Desulfovibrio desulfuricans* の 1 例. 第 44 回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術講演会, 那覇, 2014.02.22

(ウ) 著書

1. 佐々木信一. がん性髄膜炎に対する治療戦略. 編集:大江裕一郎, 加藤晃史, 堀之内秀仁. ガイドラインに載っていない肺がん Practical Treatment. 東京:Medical

View 社, 2014; 181-5.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

(ア)特許取得

なし

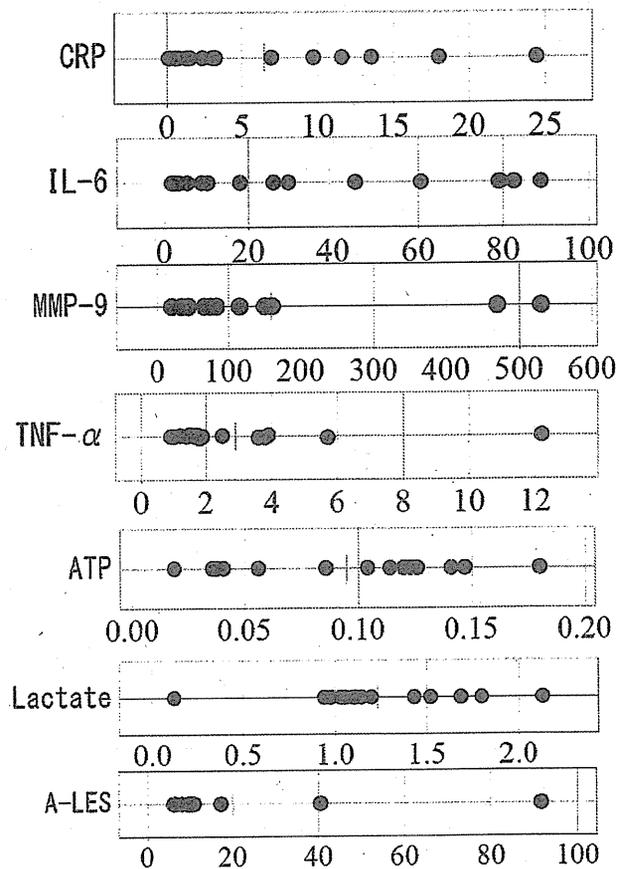
(イ)実用新案登録

なし

(ウ)その他

なし

図 1



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

重症のインフルエンザによる肺炎・脳症の診断・治療に関する研究：  
検体収集とインフルエンザ重症化バイオマーカーの検索

研究分担者 西村秀一

国立病院機構仙台医療センター 臨床研究部ウイルス疾患研究室長

研究要旨

1) 肺炎・脳症・多臓器不全のきっかけとなる「血管内皮細胞障害」の発症因子の解明と早期診断マーカーの候補である Flu Alarmin を、実際の患者血清等を対象に検索するための下準備を行った。まずは、これまでの本研究班における重症化にかかわる遺伝子候補の検索において、脳症を含む多臓器不全にかかわる因子として検討されてきた CPT2 遺伝子や Toll-like Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の解析を行う目的で、小児科のインフルエンザの二峰性発熱研究グループや内科の成人・高齢者の肺炎研究グループ等との連携により、多方面で発症急性期の気道分泌液や血液検体等の検体収集を行った。

2) インフルエンザウイルスの最初の感染病巣のひとつとして重要な組織であり、細胞自らが産生する蛋白分解酵素がウイルスの感染に重要な働きを持つことが知られている実際のヒト呼吸器上皮細胞を実験系として得るために、病理解剖由来のヒト気管支細胞の初代培養を試み、3人のドナー由来の、気管支上皮細胞を凍結保存した。さらに、これらについて培養時にレンチウイルスベクターを用いて SV40 の Large T 抗原遺伝子の導入による不死化を試みている。

インフルエンザ脳症の重症化にかかわる因子としての異所性トリプシン産生にかかわるエンテロキナーゼを産生する細胞として知られるヒト十二指腸上皮細胞を得る目的で、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の初代培養を試み成功した。それらの細胞についても、凍結保存するとともに不死化を試みている

研究協力者

- ・ 山谷睦夫 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 教授
- ・ 織田慶子 川崎医科大学附属川崎病院小児科医師
- ・ 高橋洋 宮城厚生協会坂総合病院呼吸器科部長
- ・ 武田和憲 国立病院機構仙台医療センター臨床研究部長
- ・ 手島伸 同上 外科医長

A. 研究目的

1) 新型インフルエンザや高病原性鳥インフルエンザの出現とその流行による肺炎・脳症・多臓器不全の多発が危惧され、健康危機管理としての対策が急がれている。本研究では、肺炎・脳症・多臓器不全のきっかけとなる「血管内皮細胞障害」の発症因子の解明と早期診断マーカーの候補である Flu Alarmin を実際の患者

血清等を対象に検索する。

それによって重症化の早期診断バイオマーカーが明らかになる。

また、これまでは小児科領域における脳症を対象に研究を行ってきたが、本研究では、成人の肺炎の重症化例について研究範囲を拡げた。

2) ヒト呼吸器上皮細胞は、インフルエンザウイルスの最初の感染病巣のひとつとして重要な組織と考えられる。そこでの増殖においては、細胞自らが産生する蛋白分解酵素がウイルスの感染に重要な働きを持つことが知られているが、さらに我々の研究で呼吸器組織以外の異所性産生の同酵素がインフルエンザの脳症において重要な働きをしていることが明らかになっている。

その一方で、膵臓以外のヒト組織細胞における同酵素の産生に関する研究は、ほとんど見あたらず、よって呼吸器上皮細胞が常に供給されるような状態にあれば極めて重要な解析実験系となりうると考えられる。また、そうした細胞がインフルエンザ感染の再産生する何らかの物質がサイトカイン等のFlu Alarmin候補に何らかの影響を与える、あるいはその逆にサイトカイン等の物質が呼吸器系上皮にそのもの、あるいはそこでのインフルエンザ感染に何らかの影響を与える可能性についても検討の価値はあると考えられる

さらに、そうした細胞にウイルス感染や種々の外的刺激を与えることでインフルエンザ重症化の本体の理解につながる可能性のある何らかの新たな所見が得られる可能性もある。そうした細胞系を種々の実験に用いることのできる態勢を整えるためのいくつかの試みを開始する。

## B. 研究方法

1) 臨床検体としてのインフルエンザ罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液を収集：

1-1) 小児科のインフルエンザの二峰性発熱研究グループならびに

1-2) 内科の成人・高齢者の肺炎研究グループとの連携により発症急性期の気道分泌液や血液検体を収集する

1-3) さらに当ウイルスセンターには、ウイルス感染による重症肺炎や脳症についての検査目的で、仙台市内ならびに全国各地から臨床検体が寄せられているが、そうした症例の主治医に対して急性期ならびに回復期血清やFlu Alarmin 検索のための検体の確保とその後の送付を受ける。

2) これまでのインフルエンザ罹患者の凍結保存検体のピックアップ：

これまでに種々の呼吸器感染症患者や急性脳症患者から採取した急性期血清ならびにペア血清を当院血清ライブラリーからのピックアップし、Flu Alarmin の候補の検索対象とする。

3) 上記1) 2) で収集した検体についてToll-like Receptor の下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定を行う。

また、これまでの本研究班における重症化にかかわる遺伝子候補の検索においては、脳症を含む多臓器不全の遺伝子解析はCPT2のみを対象としていたが、重症肺炎症例医についても、インフォームド ConsentのもとCPT検査を試みる。

4) ヒト、初代細胞の確保は、上記目的の項目で説明したとおり、インフル

エンザの重症化の機序解明の一手段として大きな可能性を秘めている。

4-1) まずは、協力研究者の山谷らによる病理解剖由来の気管支上皮細胞の培養系について、その一部凍結保存とライブラリーづくりとを行う。

また、そうした細胞の初代ではないが、その性質をある程度保ったまま長期継代が可能な系を作ることを目的に、上記細胞に対してSV40のLarge T抗原遺伝子導入による不死化を試した。

4-2) インフルエンザ脳症の重症化にかかわる因子としての異所生産トリプシンがつくられるためには、トリプシノーゲンがPRSS3と呼ばれるエンテロキナーゼの作用によってトリプシンに変わる必要がある。ヒト十二指腸上皮細胞は、このエンテロキナーゼがつくられる組織として知られている。エンテロキナーゼのヒト細胞での種々の動きに関して解析のためには、ヒト十二指腸上皮細胞の初代継代細胞がぜひとも必要である。そこで、本研究では、インフォームド Consentのもと、外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の培養を試みた。

## C. 研究結果

1) 臨床検体としてのインフルエンザ罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液の収集：

2013-2014年インフルエンザシーズンは、それまで鳴りを潜めていたA/H1N1pdm09亜型の再出現があり、このウイルス感染による成人の肺炎症例が全国で見られた。その中で、当院に寄せられたいくつかの症例について、ペア血清ならびに急性期全血を確保し、それらについてのToll-like

Receptorの下流のシグナルや各種サイトカイン、プロテアーゼ等の測定ならびに、CPT2についての遺伝子解析のため徳島に送付した。

そのほか、ヒトパラインフルエンザ3型による脳症についても数例分、ペア血清を確保しており、今後解析予定である。また、ヒト・メタニューモの施設内流行を捉えており、そこでも重症化例のペア血清を確保している。

4-1) 病理解剖由来のヒト気管支細胞の初代培養とその不死化の試み：

協力研究者の山谷がつくった3人のドナー由来の、気管支上皮細胞を凍結保存した。さらに、これらについて培養時にレンチウイルスベクターを用いてSV40のLarge T抗原遺伝子の導入による不死化を試みており、現在継続中である。(図1)

4-2) 消化器外科手術材料由来の十二指腸細胞の初代培養と、その不死化の試み：

外科手術で摘出された組織を材料に十二指腸上皮細胞の培養の試みを3度行い、うち2回で培養に成功し、十二指腸上皮細部の培養法を習得した。それらの細胞についても凍結保存をするとともに、レンチウイルスベクターを用いてSV40のLarge T抗原遺伝子の導入による不死化を試みており、現在継続中である。(図2)

## E. 結論

臨床検体としてのインフルエンザ等の急性感染症罹患者由来の発症急性期の気道分泌液や血液等の収集を広く行い、解析を開始している。

ヒトの気管支上皮ならびに十二指腸上皮の初代培養細胞に成功し、今後の応用のために凍結保存を完了し、また、通常種々の実験に頻繁に使えるように不死化を試みている。

F. 健康危険情報  
なし。

G. 研究発表 (平成 25 年度)

論文発表

- 1) Takashita E, Ejima M, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M. A community cluster of influenza A(H1N1)odm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill.* 19: pii=20666, 2014
- 2) Nguyen, Abe S, Sun G, Matsuoka A, Nishimura H, Ishihara M, Matsui. Rapid screening for influenza using a multivariable logistic regression model to save labor at a clinic in Iwaki, Fukushima, Japan. *Am J Infection Control*, 2014, in press.
- 3) Nishimura H, Sakata S, Kaga A: A New methodology for studying dynamics of aerosol particles in sneeze and cough using a digital high-vision, high-speed video system and vector analyses. *PLoS ONE* 8: e80244.  
doi:10.1371/journal.pone.0080244
- 4) Yamaya M, Nishimura H, Nadine LK, Ota C, Kubo H, Nagatomi R: Ambroxol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial

cells *Arch. Pharm. Res. Arch Pharm Res.* [Epub ahead of print] 2013

- 5) Yamaya M, Nishimura H, Lusamba Nadine L, Kubo H, Nagatomi R: Tulobuterol inhibits rhinovirus infection in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Physiological Reports* 2013. 1: e00041.
- 6) Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Hongo S, Itagaki T, Katsushima N, Ohmi A, Nishimura H, and Ahiko T: Molecular epidemiology of Coxsackievirus A16 strains isolated from children in Yamagata, Japan between 1988 and 2011. *Microbiol. Immunol.* 57: 400-405, 2013.
- 7) 山口育男、青山知枝、山本優、木下恵子、伊藤由美、西村秀一: イムノクロマト法インフルエンザウイルス抗原検出キット BD ベリターシステム Flu における機器判定の感度とその目視判定に対する優越性の検討. *日本臨床微生物学雑誌* 23:39-44, 2013

学会発表

とくになし

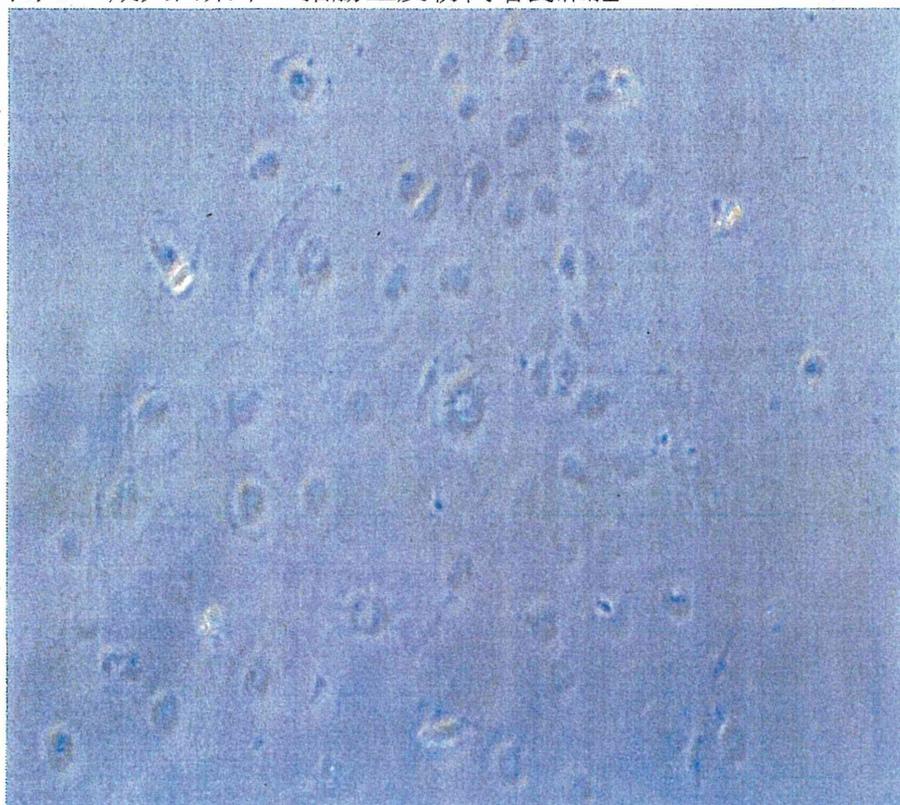
H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

とくになし

图 1 成人由来气管支上皮初代培养细胞



图 2 成人由来十二指肠上皮初代培养细胞



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

脳症発症と $\beta$ 酸化障害の関連性に関する研究

研究分担者 山口清次 (島根大学医学部小児科学 教授)

研究要旨

正常だった小児が感染などを機に急性増悪するミトコンドリア $\beta$ 酸化異常症( $\beta$ 酸化異常症)はインフルエンザ脳症の発症形態と類似点がある。このため、インフルエンザの重症化が $\beta$ 酸化障害を介して発展してゆくという仮説のもとに、 $\beta$ 酸化に影響する因子について、培養皮膚線維芽細胞とタンデムマスを用いる *in vitro* probe assay (IVP assay) を用いて調べた。以下の結論が得られた。①PPAR アゴニストで高脂血症薬のベザフィブラート (BEZ) は、 $\beta$ 酸化異常を改善する効果が期待される。②培養環境が、高温下 (41°C) では長鎖脂肪酸の代謝が障害され、低温下 (33°C) では $\beta$ 酸化が改善する。変異タンパクの立体構造の安定化などがこの理由として考えられる。さらに、③サイトカインの $\beta$ 酸化におよぼす影響について調べた。インフルエンザで増加するといわれるサイトカイン (IL1, IL6, INF $\gamma$  および TNF $\alpha$ ) の存在下で $\beta$ 酸化能の変化を評価した。結論として、INF $\gamma$  と IL6 による $\beta$ 酸化への影響は少なく、IL1 $\beta$  と TNF $\alpha$  は、 $\beta$ 酸化障害を悪化させる可能性が高い。すなわちサイトカインの種類によって $\beta$ 酸化に影響を及ぼしインフルエンザの病態を悪化させる可能性が示唆された。インフルエンザに関連したこの他の諸因子についても $\beta$ 酸化への影響をみる価値がある。

研究協力者

長谷川有紀 (島根大学小児科助教)  
小林弘典 (島根大学小児科助教)  
山田健治 (島根大学小児科医科医員)  
高橋知男 (島根大学小児科医科医員)

に急激に悪化して、急性脳症、乳幼児突然死様の経過をとり、インフルエンザ脳症と $\beta$ 酸化異常症の臨床的特徴に類似性がある。インフルエンザ脳症等の急性増悪における $\beta$ 酸化障害の関わりの有無を明らかにする。

A. 研究目的

正常だった小児がインフルエンザ感染を機に短時間のうちに急性脳症に発展し、死亡することもある。これは「インフルエンザ脳症」として知られている。一方、ミトコンドリア脂肪酸 $\beta$ 酸化異常症 ( $\beta$ 酸化異常症) も、安定している時はふつうと変わりなく、感染などを契機

B. 方法

1) *in vitro* probe assay

培養皮膚線維芽細胞を特殊なメディウム (最小限のブドウ糖遊離脂肪酸を含まずかつ過剰量のカルニチン) で培養し、 $\beta$ 酸化を亢進させた状態で、パルミチン酸などの脂肪酸を添加してメディウム