

図-1 入室時の ATP と A-LES

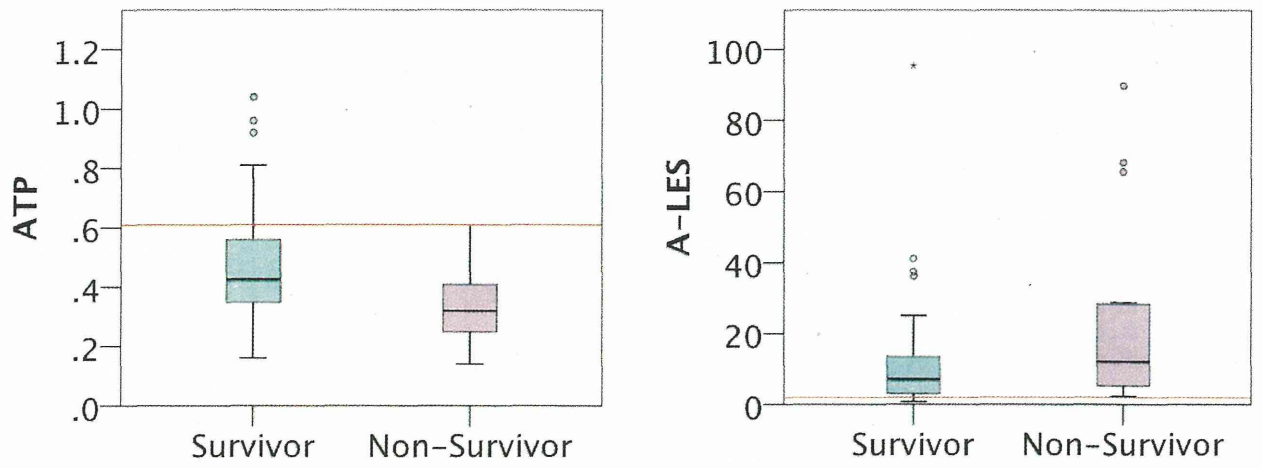


図-2 ヘモグロビン値で標準化した入室時の ATP と A-LES

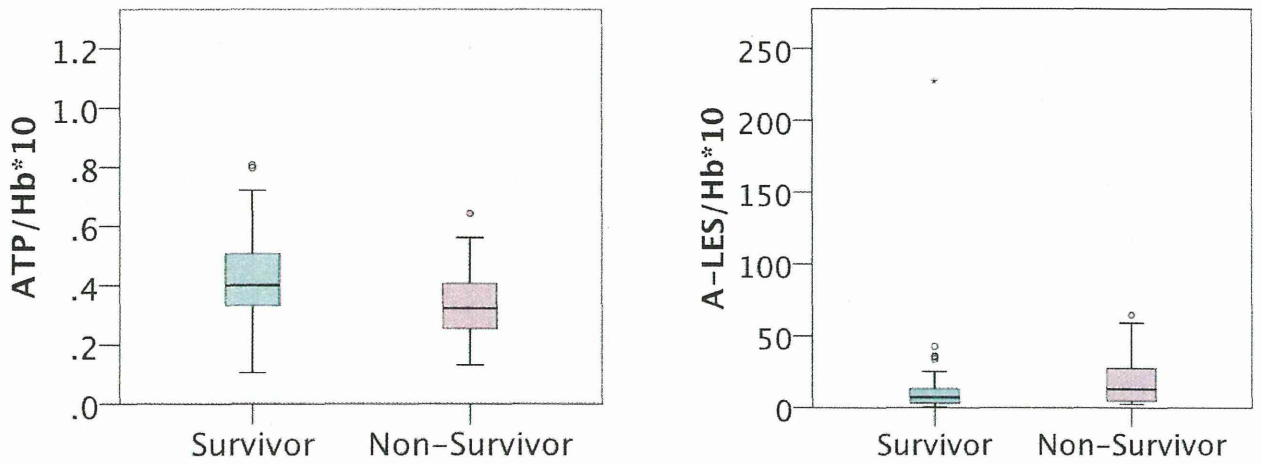


図-3 ATP、A-LES と APACHE II スコアの関係

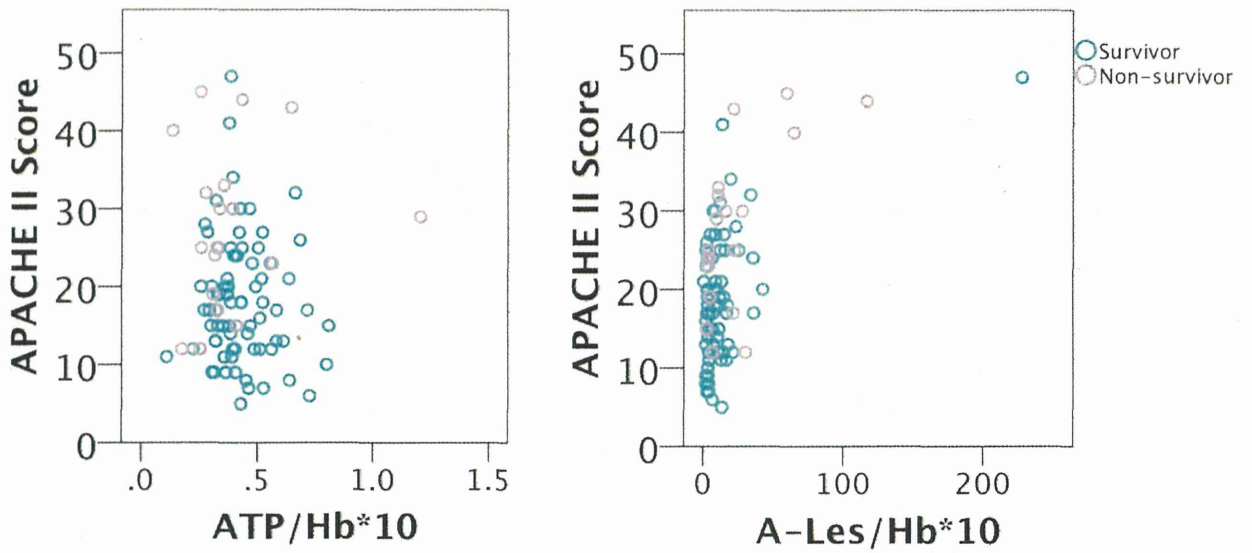


図-4 感染症患者のICU入室時ATPとA-LES

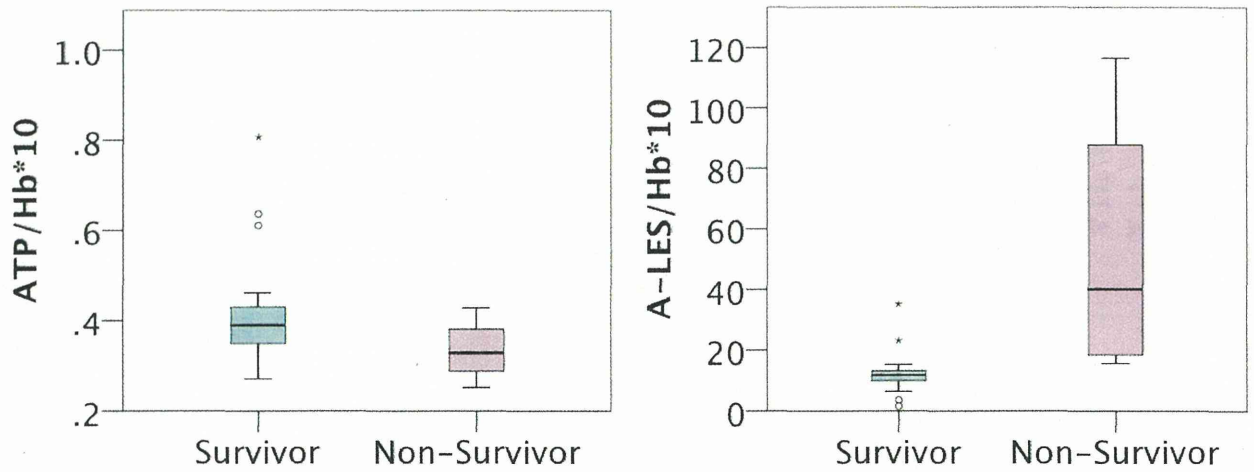


図-5 敗血症と非敗血症患者の A-LES 経時変化

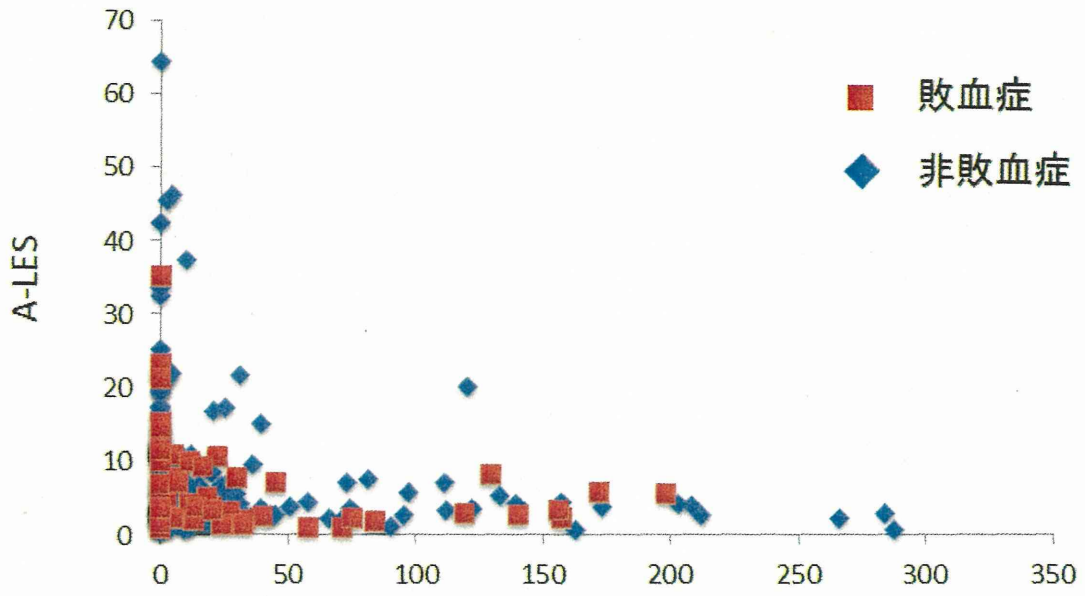
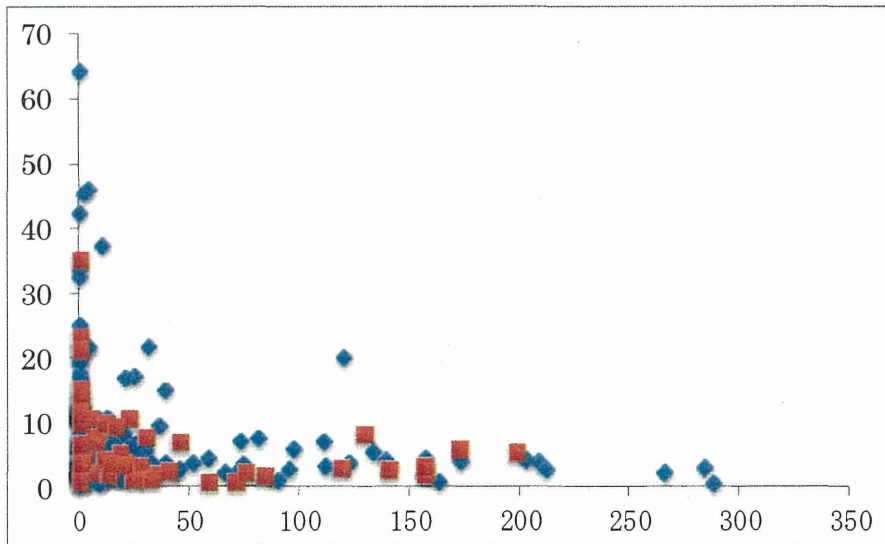
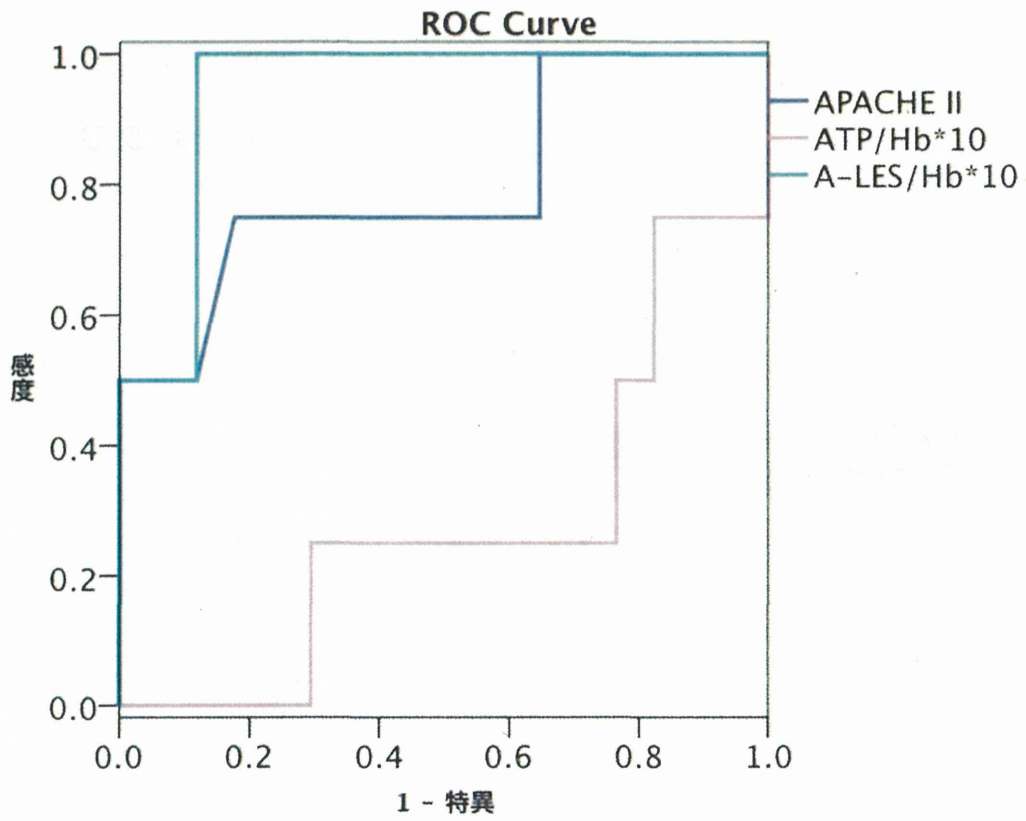


図-6 感染症患者の ROC 曲線



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

**概要：**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 23 症例において各種 marker を測定した。

### 結果：

(1) インフルエンザの中等症・重症例および各種呼吸器疾患症例（細菌性肺炎、間質性肺炎急性増悪、ARDS、薬剤性肺障害、膠原病関連肺障害等）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。

(2) 血中の乳酸を ATP の値で割った ATP-lactate energy risk score (A-LES) の値は、正常者の既報値 (<2.00) より高値を示した。特に B 型インフルエンザ症例 2 例で著明な高値を示した。

(3) A-LES 値と各種サイトカインの比較検討では、CRP と IL-6 で弱い相関が認められた。

(4) 重症度別での検討では、重症度が高いほど、ATP 低値、A-LES 値高値の傾向が認められた。

**結論：**インフルエンザにおける A-LES 値は、他の呼吸器疾患と同等かそれ以上に上昇傾向が認められ、バイオマーカーとしての有用性が示唆された。

## 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った。

## 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

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、計 23 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。検討対象は A 型インフルエンザ: 5 例、B 型インフルエンザ: 3 例、対称として各種呼吸器疾患: 細菌性肺炎: 4 例、間質性肺炎急性増悪: 5 例、PCP: 1 例、CVD-IP: 2 例、過敏性肺炎: 1 例、薬剤性肺炎: 1 例、放射線肺炎: 1 例で検討した (表 1)。

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 (図 1)。

血中の乳酸を ATP の値で割った ATP-lactate energy risk score (A-LES) の

値は、正常者の既報値 (<2.00) より高値を示した。特に B 型インフルエンザ症例 2 例で著明な高値を示した (値: 91.7、40.4) (図 1, 3)。

A-LES 値と各種サイトカインの比較検討では、CRP と IL-6 で弱い相関が認められた (図 2)。

重症度別での検討では、重症度が高いほど、ATP 低値、A-LES 値高値の傾向が認められた (図 4)。

### D. 考察

Chida らは、ICU 入室した症例に対して、血中 ATP と乳酸値を測定し、その比である Lactate/ATP Ratio (A-LES 値) が real time の予後因子として有用であることを報告した。(Chida J, et al. Blood lactate/ATP ratio, as an alarm index and real-time biomarker in critical illness. PLoS One 2013; 8: e60561.) 本研究におけるインフルエンザ患者の A-LES 値は、他の呼吸器疾患と同等かそれ以上に上昇傾向が認められ、バイオマーカーとしての有用性が示唆された。今回の検討では、症例数が少なく、正常コントロールが取られていないという limitation がある。今後、検討症例を増やすと共に、健常者のコントロールも確認し、詳細に解析予定である。

### E. 結論

血中 ATP 値、ならびに乳酸値との比である A-LES 値は、インフルエンザのバイオマーカーとして、その有用性が示唆された。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

(ア) 論文発表

1. K. Tajima, K. Miura, T. Ishiwata, F. Takahashi, M. Yoshioka, K. Minakata, A. Murakami, **S. Sasaki**, S. Iwakami, T. Annoura, M. Hashimoto, T. Nara, K. Takahashi. Sex hormones alter Th1 responses and enhance granuloma formation in the lung. *Respiration* 2011; 81: 491-8.
2. K. Muraki, R. Koyama, Y. Honma, S. Yagishita, T. Shukuya, R. Ohashi, F. Takahashi, K. Kido, S. Iwakami, **S. Sasaki**, A. Iwase, K. Takahashi. Hydration with magnesium and mannitol without furosemide prevents the nephrotoxicity induced by cisplatin and pemetrexed in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic disease* 2012; 4: 562-8.
3. T. Mori, K. Tajima, M. Hirama, T. Sato, K. Kido, S. Iwakami, **S. Sasaki**, A. Iwase, K. Shiomi, M. Maeda, O. Hino, K. Takahashi. The N-ERC index is a novel monitoring and prognostic marker for advanced malignant pleural mesothelioma. *Journal of thoracic disease* 2013; 5: 145-8.
4. O. Nagashima, R. Ohashi, Y. Yoshioka, A. Inagaki, M. Tajima, Y. Koinuma, S. Iwakami, A. Iwase, **S. Sasaki**, S. Tominaga, K. Takahashi. High prevalence of gene abnormalities in young patients with lung cancer. *Journal of thoracic disease* 2013; 5: 27-30.
5. N. Nagano, Y. Nagano, M. Toyama, T. Nakazawa, **S. Sasaki**, K. Shibayama, Y. Arakawa. Successful detection of blaNDM-1-harboring but modified Hodge test-negative *E. coli* by modified SMA-Disk method, and first characterization of XDR-klebsiella pneumonia harboring blaNDM-1 and/or blaOXA-181 from a foreigner visited to Japan. *Jpn J Infect Dis* 2015; Manuscript under review.
6. **S. Sasaki**, Y. Yoshioka, R. Ko, Y. Katsura, Y. Namba, T. Shukuya, K. Kido, S. Iwakami, S. Tominaga, K. Takahashi. Diagnostic significance of cerebrospinal fluid EGFR mutation analysis for non-small cell lung cancer patients harboring an active EGFR mutation with leptomeningeal metastasis following gefitinib therapy failure. *Respir Invest* 2015; Manuscript under review.
7. 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 例における歯周病細菌 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.
8. 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.
9. 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.
10. 磯部 全, 佐々木信一, 神戸将彦, 相澤 智弘, 原 健一郎, 前野敏孝. 咯血を主訴とし、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.
11. 井上貴昭, 中澤武司, 麻生恭代, 成田久美, 秋田美佳, 中村美子, 石井幸, 佐々木信一, 田中裕. 多職種 ICT ラウンドがもたらす効果について. *日臨救医会誌* 2014; 17: 25-31.

(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

13. 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, 富永 滋: Bepridil が原因と考えられた薬剤性間質性肺炎の 3 例. 第 54 回日本呼吸器学会総会, 大阪, 2014.04.25

14. 鈴木洋平, 南條友央太, 推名健太郎, 松野 圭, 村木慶子, 吉岡泰子, 佐々木信一, 富永 滋: 若年女性で緑膿菌と *M.kansasii* 共感染により肺膿瘍を形成した一例. 第 209 回日本呼吸器学会関東地方会, 幕張, 2014.05.24

15. 佐々木信一, 南條友央太: インフルエンザウイルス感染症におけるバイオマーカーの検討. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2014.10.31

16. 南條友央太, 佐々木信一: 脊椎への直接浸潤をきたした菌球型肺アスペルギルス症の一例. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2014.10.31

17. 推名健太郎, 佐々木信一, 宿谷威仁, 松野 圭, 堤 建男, 栗山祥子, 南條友央太, 村木慶子, 吉岡泰子, 長岡鉄太郎, 富永 滋, 高橋和久: EML4-ALK 陽性非腺癌非小細胞肺癌に対するクリゾチニブ投与の 4 症例の検討. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.14

18. 推名健太郎, 高橋史行, SFariz Nurwidya, 小林 功, 宿谷威仁, 村上明子, 朝尾哲彦, 金丸良太, 柳下薫寛, 加藤元康, 村木慶子, 大橋里奈, 小山 良, 高橋元美, 嶋田奈緒子, 吉岡泰子, 佐々木信一, 富永 滋, 高橋和久: 非小細胞肺癌の EGFR-TKI 耐性獲得における ZEB1 の発現検討. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.16

19. 村木慶子, 吉岡泰子, 鋤崎恵理子, 推名

健太郎, 松野 圭, 栗山祥子, 南條友央太, 佐々木信一, 富永 滋: EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における EGFR-TKI 耐性獲得後の 2 次変異検索の有用性. 第 55 回日本肺癌学会総会, 京都, 2014.11.16

20. 岸井 絢, 吉岡泰子, 推名健太郎, 荒野直子, 関本康人, 栗山祥子, 南條友央太, 村木慶子, 佐々木信一, 富永 滋: 癌性髄膜炎に対し、VP shunt と WBRT、erlotinib 投与を施行し長期生存を得た EGFR 陽性肺線癌の一例. 第 212 回日本呼吸器学会関東地方会, 横浜, 2014.11.22

21. 佐々木信一, 南條友央太, 中澤武司, 木下綾子, 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: 声帯部カポジ肉腫の生検時にキシロカインショックを生じ、治療に難渋した全身性カポジ肉腫合併 AIDS の一例. 第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪, 2014.12.03

#### (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

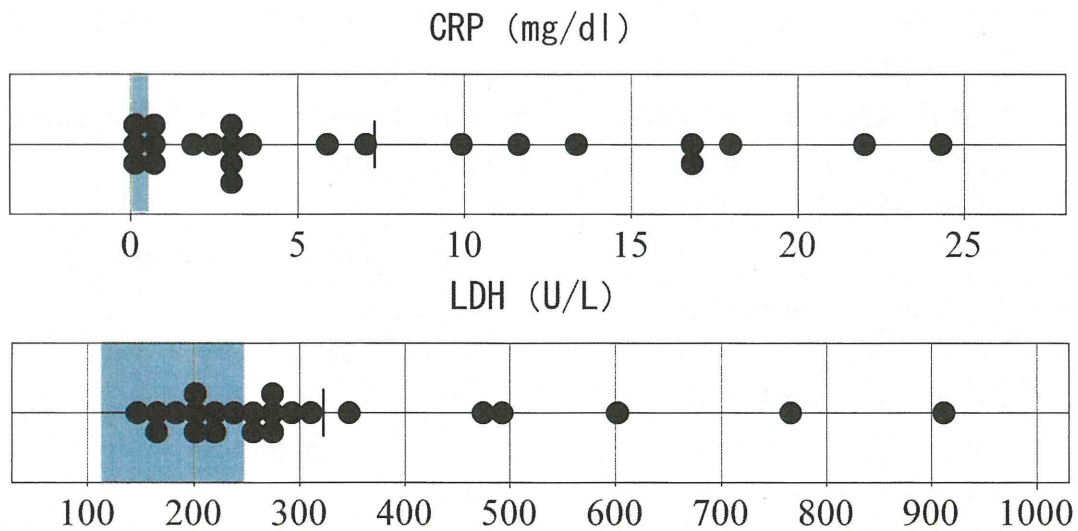
なし

表 1. 患者背景

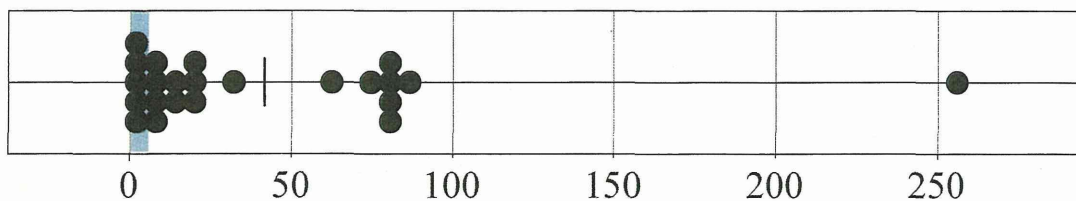
No	Gender	Age	duration from onset	Diag	外来・入院	*severity	temp	Comobities	Outcome
1	F	31	3	A型インフルエンザ	入院	M	39.7	BA	alive
2	F	28	1	A型インフルエンザ	外来	M	38.2	-	alive
3	M	35	4	A型インフルエンザ	外来	M	39.4	-	alive
4	M	31	3	A型インフルエンザ	外来	M	38.7	-	alive
5	F	19	2	A型インフルエンザ	外来	M	38.7	-	alive
6	M	80	2	B型インフルエンザ	入院	I	39.1	LK	alive
7	M	74	9	B型インフルエンザ	入院	I	38.3	COPD	alive
8	F	23	1	B型インフルエンザ	外来	M	38.5	-	alive
9	M	64	7	肺炎球菌性肺炎	外来	M	?	-	alive
10	M	66	9	肺炎球菌性肺炎	外来	M	36.7	-	alive
11	F	65	12	重症肺炎球菌性肺炎	入院	S	37.3	-	alive
12	M	80	1	インフルエンザ桿菌肺炎、COPD急性増悪	外来	S	37.9	COPD	alive
13	M	70	12	IPF急性増悪	外来	M	36.9	RA	alive
14	M	83	5	IPF急性増悪	入院	S	37.1	IP	alive
15	M	80	20	IPF急性増悪	入院	VS	36.7	IPF	dead
16	M	70	7	fNSIP急性増悪	入院	I	36.4	fNSIP	alive
17	M	69	2	CPFE急性増悪(術後)	入院	VS	?	CPFE	dead
18	F	67	5	PCP、ARDS	入院	VS	36.6	fNSIP	dead
19	M	74		CVD-IP	外来	M	36.5	IP	alive
20	F	67	19	MPO-ANCA陽性間質性肺炎	外来	I	37	IP	alive
21	M	70		過敏性肺炎	外来	M	36.8	-	alive
22	M	69	10	薬剤性好酸球性肺炎	入院	I	38.3	-	alive
23	M	80		放射性肺炎	外来	I	?	LK	alive

\*Severity: M; mild, I; intermediate, S; severe, VS; very severe

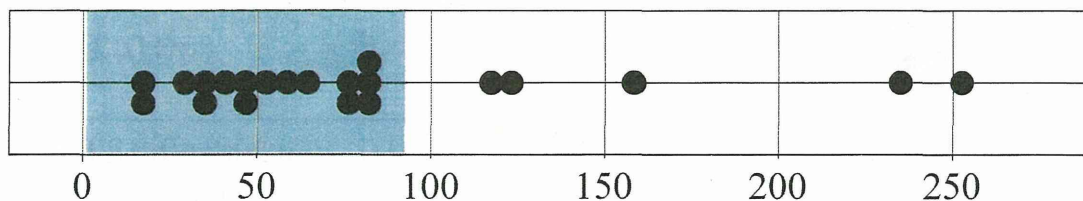
図 1. 各種 marker 一覧



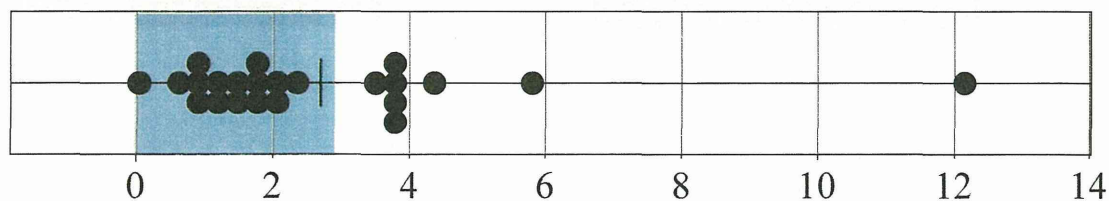
IL-6 (pg/ml)



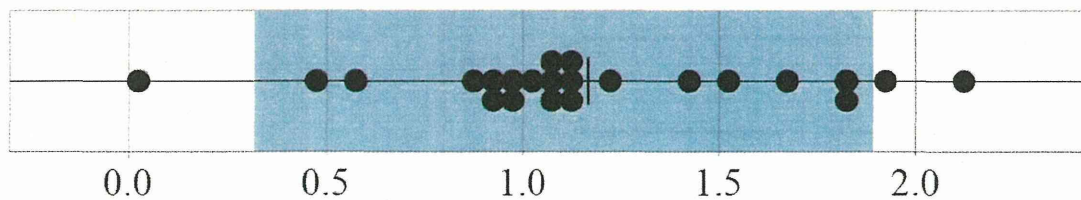
MMP-9 (ng/ml)



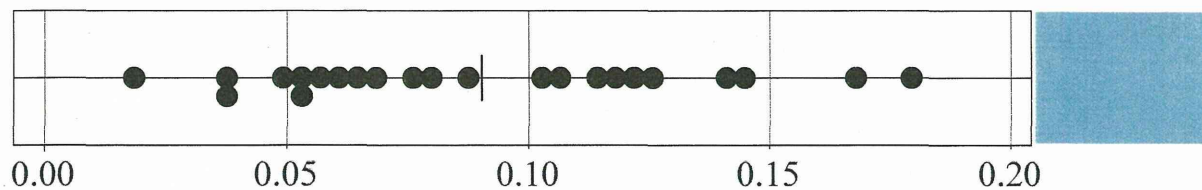
TNF- $\alpha$  (pg/ml)



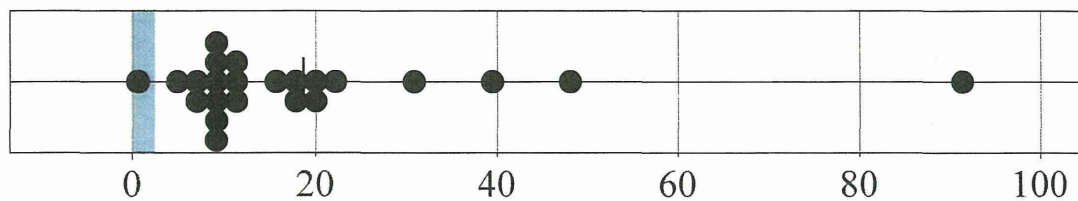
乳酸 (mmol/L)



ATP (mmol/L)



A-LES



\*A-LES = 血中ATP値 / 血中乳酸値

図 2. 各種 marker と A-LES の相関

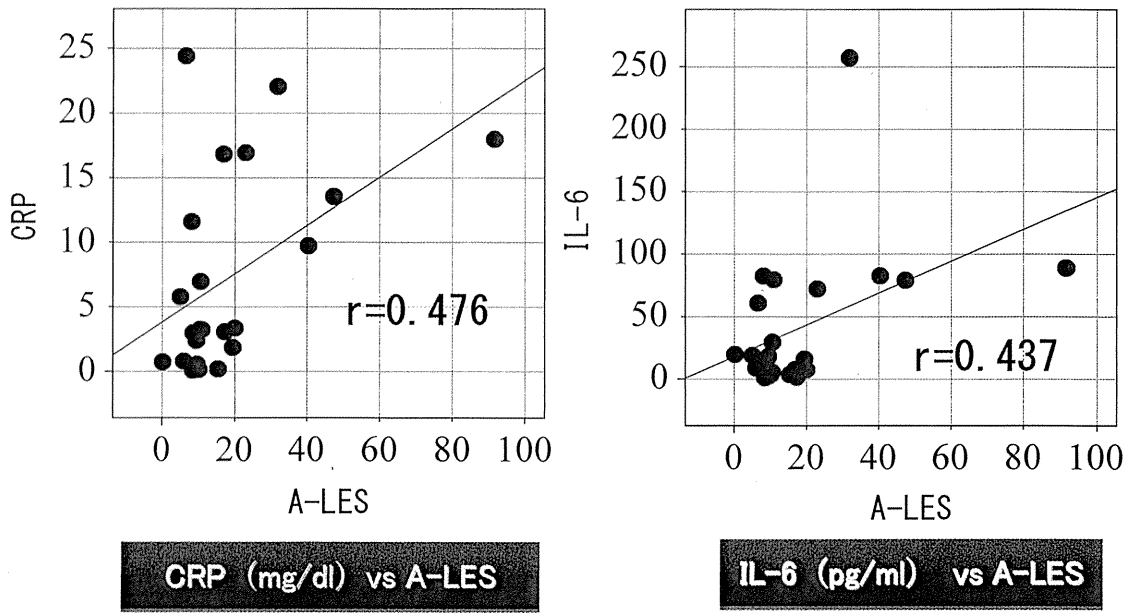
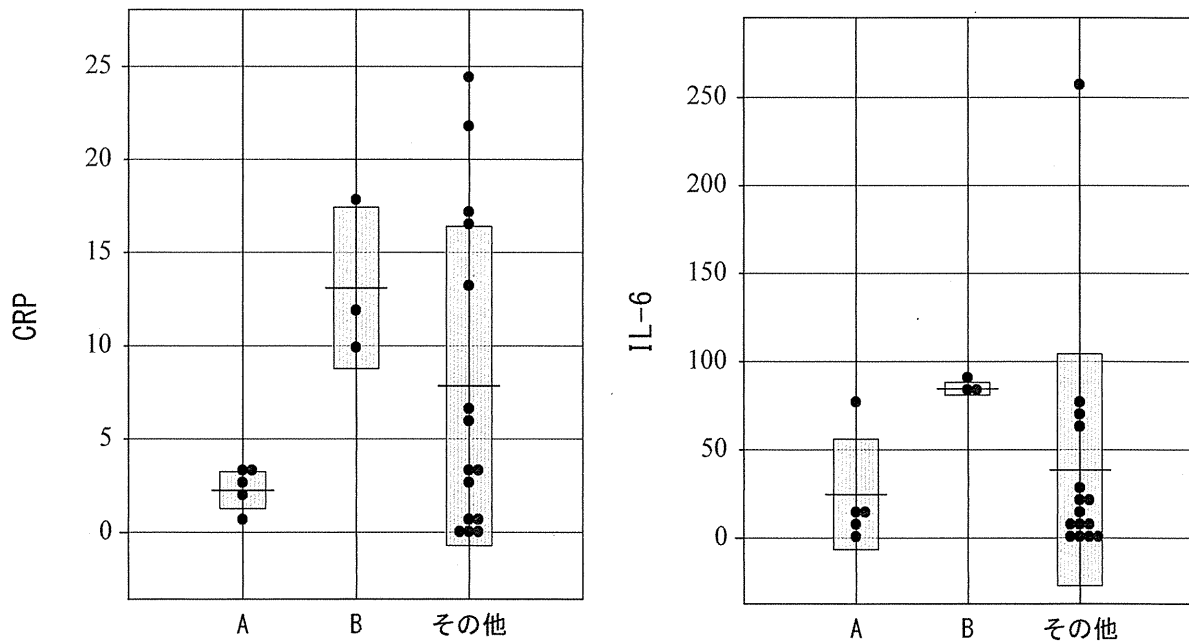


図 3. A 型、B 型、その他呼吸器疾患における各マーカーの値



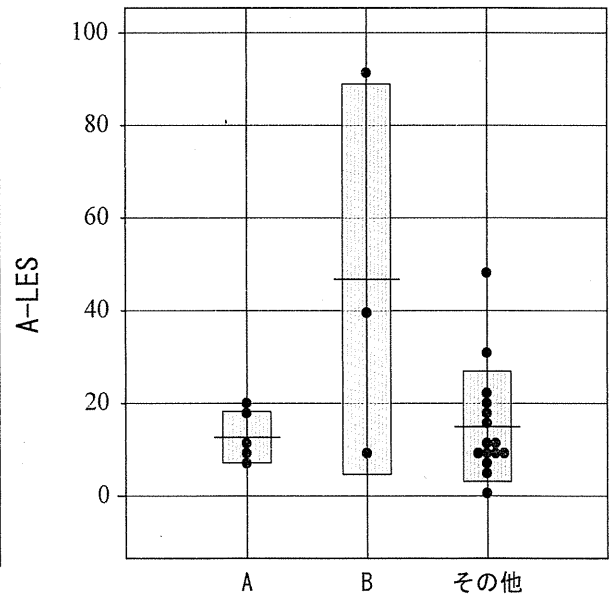
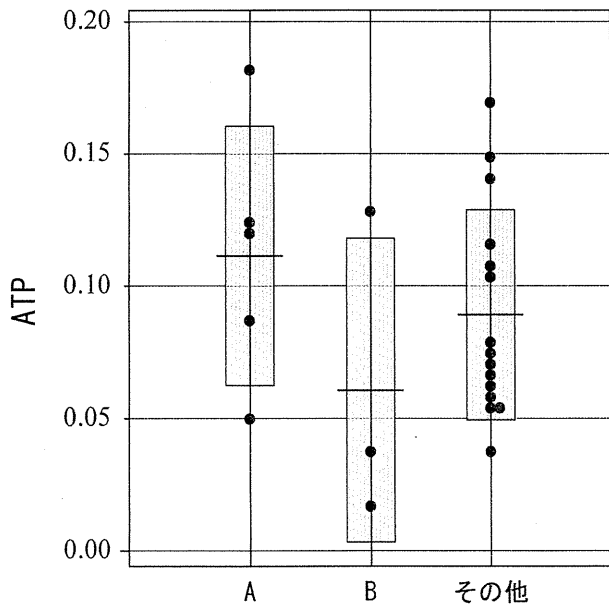
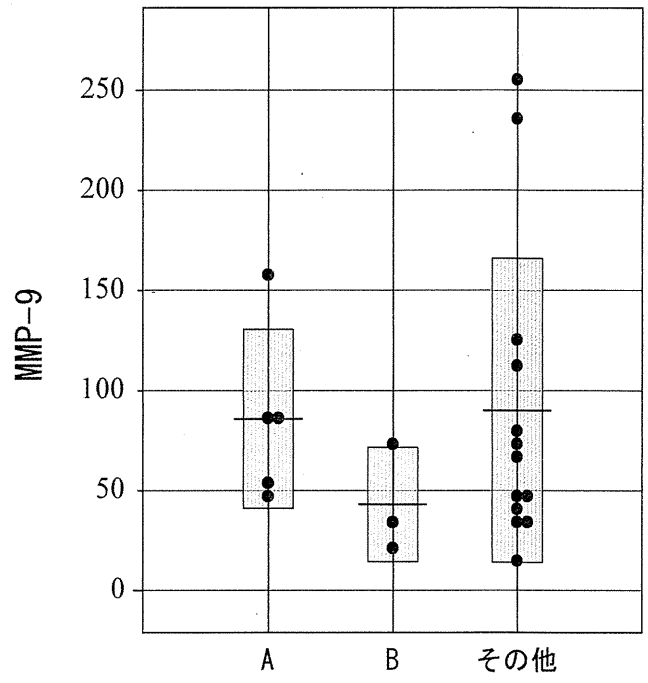
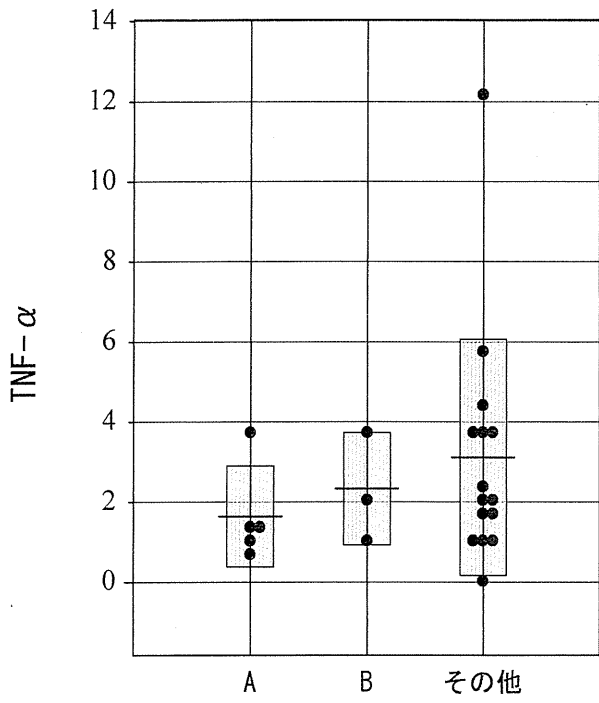
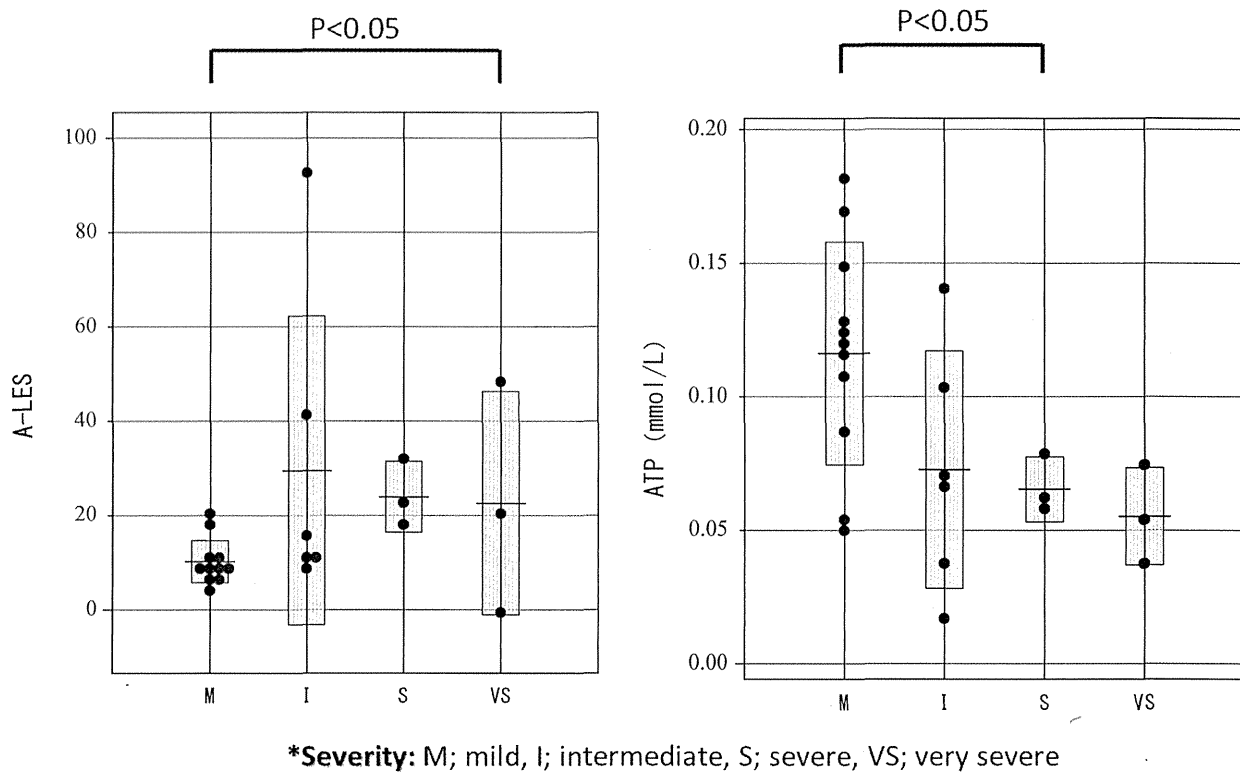


図4. 重症度別各マーカー値



平成 24 年度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 (平成 26 年度)

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 部長)

手島伸 (国立病院機構仙台医療センター 外科 医長)

研究要旨

1) 実際の患者血清等を対象に、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」の発症因子やそれらの病態の早期診断マーカーの候補としての仮称 FluAlarmin を検索するための準備を行った。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、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、今年度も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連携して、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ならびに臨床情報の収集を行った。

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、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とその維持を試みた。それらを用いた感染実験を試み、その結果、初代ヒト気管上皮細胞にインフルエンザウイルスに感染性を与えるセリンプロテアーゼ TMPRSS2 の発現を確認した。さらに、膜結合型である同酵素を、前立腺がん細胞での所見と同様、培養上清中に 50-100ng/ml という濃度で検出した。また、同細胞に対するインフルエンザウイルス感染によって IL6 が誘導され、その IL6 自体が同細胞に障害を引き起こすことを見出した。

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、実際の患者血清等を対象に、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」の発症因子やそれらの病態の早期診断マーカーの

候補としての仮称FluAlarminを検索する。

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ている。

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トリプシン様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。そしてさらに我々の研究により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。一方、臍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であれば極めて重要な解析実験系となると考えられる。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。我々は、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しているが、本年度もそれを継続した。

3) インフルエンザウイルスの感染に大きく関わる細胞由来のトリプシン

様の蛋白分解酵素の代表的なものにTMPRSS2とHATと膜結合型のセリンプロテアーゼが知られている。ただ、その分布や作用は、実際のヒトの呼吸器系細胞での解析は、ほとんどない。そこで、今年度は前者に注目してヒトの初代細胞で検討を開始する。

## B. 研究方法

1) 本年度も引き続き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：

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した。

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おり、そうした症例の主治医に対し、急性期ならびに回復期血清やFlu Alarmin 検索のための検体の送付を要請した。

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：Flu Alarmin の候補の検索対象とする目的で、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を試みた。

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試みた。

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を CPT2 を対象としていたが、重症肺炎症例医についても、イン



フォームドコンセントのもとCPT検査を試みた。

4) ヒト初代細胞の確保は、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研究材料として大きな可能性を有している。4-1) 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、本年度もその一部凍結保存とライブラリーづくりとを行った。

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、インフォームドコンセントのもと、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、それらしき細胞を得、この細胞についても不死化を行い、ウイルス感受性の検討を行った。

また、今年度は耳鼻科の扁桃腺摘出材料からの扁桃腺上皮細胞の培養と不死化も試みた。

4-3) インフルエンザウイルスに感染性を与える膜結合型のセリンプロテアーゼTMPRSS2の初代ヒト気管上皮細胞における発現を、蛍光抗体法での確認を試みた。また、同酵素は、前立腺がんにおいては膜から外れて細

胞外に遊離することが知られており、同様のことが実際の種々のヒト初代細胞においても起きているのかを、培養上清を材料とするELISAで調べた。

## 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： 前回の2013-2014年インフルエンザシーズンは、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、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できたが、本シーズンは、既往症を有する高齢者の肺炎が多く、全シーズンのような健康成人での重症肺炎例は少ない（毎年検体を送ってくれる臨床医の印象）。そのためか、ほとんど検体の確保ができなかった。

一方、比較的高齢者でヒトパラインフルエンザ3型やヒトメタニューモウイルスやRSウイルスによる肺炎入院例は多数経験しており、それらの検体の気管支洗浄液や血清の確保はできている。

2) 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：

昨年度は協力研究者の山谷がつくった3人のドナー由来の、気管支上皮細胞でレンチウイルスベクターを用いてSV40のLarge T抗原遺伝子等の導入による不死化を何度か試みたが、結果的に成功しなかった。この不成功を受け、本年度はさらにLarge T抗原遺伝子に加えて、c-mycあるいはH-ras

遺伝子の導入による不死化を試みた。しかし、また一時的には成功したかのように見えることがしばしばあったものの、最終的にはどれも培養を継続できず、現在に至るまで成功していない。

3) 外科手術材料由来の十二指腸および扁桃腺上皮細胞の初代培養と、その不死化の試み：昨年度から本年度にかけ、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、十二指腸上皮細胞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と、それらの細胞のウイルス感受性の検討を試み成功している。本年度、本細胞については、インフルエンザウイルスを含む種々のウイルスに対する感受性を検討してきたが、残念ながら未だインフルエンザを含めた特定のウイルスに対する感受性は見出せていない。

さらに本年度開始した、扁桃腺上皮細胞の培養は、一応初代培養まで成功したが、その不死化には至らず、また継代培養しているうちに最終的に繊維芽細胞に置き替わってしまった。

4) インフルエンザウイルスに感染性を与えるセリンプロテアーゼTMPRSS2の初代ヒト気管上皮細胞における発現を、蛍光抗体法で確認した。さらに、培養上清を材料とするELISAで調べたところ、膜結合型である同酵素が、前立腺がん細胞での所見と同様、培養上清中に50-100ng/mlという濃度で検出された。また、同細胞に対するインフルエンザウイルス感染によってIL6

が誘導され、そのIL6自体が同細胞に障害を引き起こすことを見出した。

## E. 結論

臨床応用可能な、最適なFlu Alaminの同定にとっては、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臨床検体の収集と解析を今後も粘り強く継続していくことが必要である。

ヒトの気管支上皮ならびに十二指腸と扁桃腺上皮の初代培養細胞に成功し、一部は今後の応用のために凍結保存を完了しており、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。だが、不死化に成功した小腸上皮と思われた細胞は、未だインフルエンザを含め特定のウイルスに対する感受性は見出せておらず、また気管上皮と扁桃腺上皮の不死化は未だ成功していない。これらの試みは、あきらめることなく継続していく必要がある。

今回行ったヒト気管上皮初代細胞を用いた解析のような、蛋白分解酵素やIL6に関する仕事は、治療薬の選択も視野に入れつつ、今後も*in vitro*, *in vivo*で継続していく必要がある。

(図1)

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表 (平成26年度)

### 論文発表

1) Nishimura H, Okusa Y. A verification of an overestimation of “deaths associated with influenza pandemic of 1918-1919, Japan” claimed in a demographic study. JJID, in press

2) Katsushima Y, Katsushima F, Suzuki Y, Seto J, Mizuta K, Nishimura H, Matsuzaki Y. Characteristics of mycoplasma pneumoniae infection identified by culture in a pediatric clinic. *Pediatr Int.* 2014, 57: doi: 10.1111/ ped. 12513

3) M Yamaya, LK Nadine, C Ota, H Kubo, T Makiguchi, R Nagatomi, H Nishimura: . Magnitude of influenza virus replication and cell damage is associated with interleukin-6 production in primary cultures of human tracheal epithelium. *Resp Physiol Neurol.* 2014, 202, 16-23.

4) E Hatagishi, Okamoto, Ohmiya, H Yano, T Hori, W Saito, H Miki, Y Suzuki, R Saito, T Yamamoto, M Shoji, Y Morisaki, S Sakata, H Nishimura. Establishment and Clinical Applications of a Portable System for Capturing Influenza Viruses Released through Coughing. *PLOS ONE*, 2014, 9(8), e103560. doi: 10.1371.

5) 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.* 2014, 37: 520-529.

6) Yamaya M, Nishimura H, Nadine L, Kubo H, Nagatomi R. Formoterol and budesonide inhibit rhinovirus infection and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Resp Invest.* 2014, 52, 251-260.

7) M Yamaya, L Nadine, H Kubo, K Saito, R Saito, H Nishimura: Effects of neuraminidase inhibitors on the release of oseltamivir-sensitive and oseltamivir-resistant influenza viruses from human airway epithelial cells. *J Med Virol* 2014, DOI: 10.1002/jmv.23974.

8) 小山田厚子、三木祐、鈴木克之、佐々木悟、深瀬真由美、伊藤洋子、大宮卓、他 ICT メンバー、西村秀一. 地域流行前の一病棟内でのインフル

エンザ集団発生と対応、医療（印刷中）

9) 大宮卓、佐々木純一、西村秀一. イムノクロマト法を原理とする種々のアデノウイルス迅速抗原検出キットの、ウイルス検出感度の比較. 医学検査（印刷中）

10) 菊地祐樹、鈴木優子、伊藤洋子、西村秀一. 噴霧式インフルエンザ生ワクチンの力価についての検討. 仙台医療センター医学雑誌 2014, 4: 39-41.

11) 菱川容子、橋本真帆、倉橋宏和、別府玲子、大谷可菜子、西村秀一. 重症心身障害児（者）施設におけるヒトメタニューモウイルスの集団感染と重症例の発生. 日本重症心身障害学会誌, 2014, 39: 379-383.

#### 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）

1) 特許取得 特許第 685769 号 登録日 2015 年 1 月 30 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、西村秀一、感染防止ブース

2) 特許取得 特許第 5618169 号 登録日 2014 年 9 月 2 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、西村秀一、換気ブース

3) 特許取得 特許第 5531340 号 登録日 2014 年 5 月 9 日、発明者 阪田総一郎、上村泰、西村秀一、換気ブース

図1 今後の課題

