

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659636

研究課題名(和文)特発性気胸におけるブレブ形成の病態解明

研究課題名(英文)Pathogenesis of bleb formation in idiopathic pneumothorax

研究代表者

武田 雄二(Takeda, Yuji)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20530182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：目的：自然気胸発症の原因となり得るブレブ組織において、そのブレブ形成に特異的な病原体が証明し得ないか研究を行った。方法：自然気胸手術の際に切除された肺から、DNA・RNA抽出を行った後、高感度網羅的病原体検索法を用いて遺伝子検索を行った。結果：ブレブよりHHV-6・HHV-7・EBV・parvovirus B19・TTVが検出された。しかしそれらウイルスはparvovirus B19を除き常在性のあるウイルスであり、正常肺組織からも検出された。現時点でこれらの病原体とブレブ形成との関連性は不明。結論：自然気胸の発症原因となり得るブレブ組織に特異的病原体の同定はできなかった。

研究成果の概要(英文)：Purpose: The Bleb, which can cause spontaneous pneumothorax development. We conducted a study in order to identify the presence of a specific pathogen in the formation of the Bleb. Method: From the lungs excised during spontaneous pneumothorax surgery, by extracting RNA and DNA, was subjected to gene search using a sensitive exhaustive search method pathogens. Result: Such as TTV, HHV-6, HHV-7, EBV, parvovirus B19 were detected from Bleb part. But these viruses are detected from the normal lung tissue, except parvovirus B19. Relevance of bleb formation and these pathogens unknown at this time. Conclusion: Identification of specific pathogens were unable to Bleb tissue that could be the pathogenesis of pneumothorax.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：ブレブ形成 自然気胸

1. 研究開始当初の背景

特発性自然気胸は胸膜直下にできた嚢胞(ブレブ)の破裂によるが、このブレブが発生する原因は不明である。組織学的にブレブと胸膜中皮の間には fibroelastosis が見られ胸膜の外弾性膜が断裂もしくは消失しており、ブレブ発生には炎症の関与が示唆されている(藤井義敬、呼吸器外科学改訂4版、南山堂)。一方、この炎症を惹起する要因は現在、明らかにされていない。

肺はその3次元的な構造より、それぞれの区域によって物理的・力学的ストレスが異なることはよく知られている。また、その物理学的特性が肺結核をはじめとする感染症の好発部位となることが明らかとされている。興味深いことに、近年、自然気胸の原因として、物理的ストレスのみならず、様々な身体的、精神的ストレス(栗原正利、日産多摩川病院のホームページ) 気候(今給黎ら 2010年)の関与が提唱された。また、頻繁に遭遇する口腔内ヘルペス等の常在性ウイルスは、ストレス等で宿主の免疫力が低下した場合に増殖し、炎症を惹起し水泡が形成される。以上の知見から、我々はブレブを形成する炎症の原因は、宿主のストレスによる免疫力の低下がもたらす、常在病原体の再賦活化ではないかと推察した。そこで自然気胸症例の肺組織において、HSV 抗原の免疫染色を行ったところ、少数の陽性細胞を同定し得た。一方、非病変部では HSV 陽性細胞を同定し得なかった。この結果は、ブレブ形成におけるウイルス感染症の関与を強く支持するものである。以上の結果を踏まえ、自然気胸のブレブ病変部位に特異的に存在する病原体微生物の同定を試みる本研究を計画した。

2. 研究の目的

特発的自然気胸はブレブの破綻に起因するが、このブレブの発生機序は現在も未解明である。また、その治療法も外科的切除が標準的とされる。今回、我々はブレブ形成の原因として、ウイルスによる感染症を予想し、免疫染色を行ったところ、ブレブ周囲の肺胞組織にヘルペス抗原陽性を同定し得た。この知見は、ブレブ形成におけるウイルス感染の関与を示唆する。本研究の目的は、自然気胸の発症原因となりうるブレブ組織に特異的な病原体の同定である。

3. 研究の方法

自然気胸手術の際に切除された部分切除肺のブロックより、ブレブ直下の肺実質およびブレブ直下以外の非病変正常肺部位からのサンプリングをそれぞれ2か所ずつ行い、DNA・RNA抽出を行ったのち網羅的な遺伝子検索を行った。網羅的遺伝子解析は、東京医科

歯科大学難治疾患研究所の清水則夫博士らが開発した呼吸器系疾患系に対する高感度網羅的病原体検索法を用いた。

今回の研究期間中集積された10例(正常肺10例、ブレブ部10例)の計20部位を検索した。Allprep DNA/RNA mini kit (QIAGEN)にて抽出し、網羅的に検索した病原体群は単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)・単純ヘルペスウイルス2(HSV-2)・ヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)・ヒトヘルペスウイルス7(HHV-7)・BKウイルス(BKV)・JCウイルス(JCV)・エプスタインバールウイルス(EBV)・水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)・parvovirus B19・アデノウイルス(ADV)・B型肝炎ウイルス(HBV)・サイトメガロウイルス(CMV)/Mycoplasma・TT型肝炎ウイルス(TTV)を検索した。

4. 研究成果

結果は、ブレブ部より HHV-6 が8例・HHV-7 が6例・EBV が1例・parvovirus B19 が3例・TTV が9例検出され Mycoplasma は検出されなかった。しかし、検出されたウイルスは parvovirus B19 を除き常在性のあるウイルスでありそれぞれ正常肺部からも8例・3例・1例・4例・9例と検出されており、また特に HHV-6・HHV-7・TTV は通常、肺組織(正常肺組織)から頻出されるため、現時点でこれらの病原体のブレブ形成との関連性は不明である。

結論としては、自然気胸の発症原因となりうるブレブ組織に特異的な病原体の同定はできなかった。

結果

症例数: 20 症例
(正常肺: 10 検体、ブラ: 10 検体)

抽出: Allprep DNA/RNA mini kit (QIAGEN)

検討ウイルス(日和見感染症セット ver. 9):
HSV-1, HSV-2, HHV6, HHV-7, HHV-8,
BKV, JCV, EBV, VZV, parvovirus B19,
ADV, HBV, CMV/Mycoplasma
TTV (定量のみ)
マイコプラズマ (定量のみ)

サンプル DNA 量:
定性: 100 ng/reaction
定量: 200 ng/reaction

定性・定量:
Thermo taq polymerase (Thermo)
2 x Buffer (in house)

HHV6 PPmix (in house)
 HHV7 PPmix (in house)
 EBV PPmix (in house)
 ParvoB19 PPmix (in house)
 TTV PPmix (in house)
 Mycoplasma PPmix (in house)

表1 サンプル (核酸濃度)

sample	tube No.	部位	DNA			RNA		
			ng/uL	260/280	260/230	ng/uL	260/280	260/230
saga 1	1	正常肺	129.1	1.88	2.04	374.4	2.09	2.11
	2	ブラ	144.9	1.89	2.18	335.2	2.11	2.15
saga 2	3	正常肺	116.0	1.88	2.14	211.2	2.08	2.07
	4	ブラ	220.8	1.88	1.70	821.7	2.11	2.24
saga 3	5	正常肺	132.3	1.87	1.77	138.6	2.05	2.33
	6	ブラ	70.8	1.91	0.89	78.9	2.1	2.36
saga 4	7	正常肺	40.0/537.2	1.93/1.85	0.81/2.19	28.1/602.9	2.07/2.05	1.71/2.25
	8	ブラ	217.5	1.90	1.66	228.5	2.12	1.99
saga 5	9	正常肺	234.8	1.89	0.79	224.0	2.13	2.01
	10-2	ブラ	115.5	1.87	2.20	137.6	2.09	2.12
kurume 1	11-2	正常肺	76.1	1.93	2.11	63.0	2.16	2.20
	12	ブラ	73.8	1.90	0.38	71.1	2.15	0.27
kurume 2	13	正常肺	158.9	1.91	0.72	76.8	2.11	1.84
	14	ブラ	124.2	1.91	1.55	165.4	2.10	1.71
kurume 3	15	正常肺	113.3	1.89	2.11	62.0	2.17	1.91
	16	ブラ	128.8	1.89	1.88	196.7	2.11	2.28
kurume 4	17	正常肺	82.4	1.91	2.10	56.4	2.14	1.84
	18	ブラ	63.7	1.84	1.17	62.1	2.12	2.35
kurume 5	19	正常肺	100.1	1.88	1.30	17.0	2.32	1.98
	20	ブラ	47.2	1.88	0.79	182.0	2.10	2.07

表2 結果：ウイルス

sample	tube No.	部位	検出ウイルス(定価)	検出ウイルス(定量)copies/ugDNA					検定			
				HHV6	HHV7	EBV	parvoB19	TTV	HHV6B	HHV7	parvoB19	TTV
saga1	1	正常肺	HHV7	2.64E+01	1.23E+01			1.04E+02	HHV6B	HHV7		TTV
	2	ブラ	HHV6(EBV)	1.09E+02	8.20E+02			8.86E+01	HHV6B	HHV7		TTV
saga2	3	正常肺	HHV6,HHV7	8.67E+01			8.61E+01	5.53E+01	HHV6B		parvoB19	TTV
	4	ブラ	ParvoB19	9.17E+01	4.34E+02		8.33E+01	8.93E+01	HHV6B	HHV7	parvoB19	TTV
saga3	5	正常肺	HHV7					1.71E+01				TTV
	6	ブラ						6.86E+01				TTV
saga4	7	正常肺	HHV6,EBV	6.32E+01		1.22E+01		6.88E+01	HHV6B		EBV	TTV
	8	ブラ	HHV6,HHV7	1.25E+02	7.01E+02	3.26E+01		3.18E+01	HHV6B	HHV7	EBV	TTV
saga5	9	正常肺	ParvoB19	8.67E+01			2.07E+02	1.88E+01	HHV6B		parvoB19	TTV
	10-2	ブラ	HHV6,HHV7	2.42E+02	1.94E+03			3.14E+03	HHV6B	HHV7		TTV
kurume1	11-2	正常肺	HHV6,HHV7	5.27E+02	3.70E+02				HHV6B	HHV7		TTV
	12	ブラ	HHV6	8.00E+01	5.32E+02				HHV6B	HHV7		TTV
kurume2	13	正常肺	HHV6	1.68E+02				2.06E+02	HHV6B			TTV
	14	ブラ		1.67E+02				2.01E+02	HHV6B			TTV
kurume3	15	正常肺	HHV6,ParvoB19	1.35E+02		2.54E+02		1.58E+01	HHV6B		parvoB19	TTV
	16	ブラ	HHV6,ParvoB19	3.93E+02		2.88E+02		3.12E+01	HHV6B		parvoB19	TTV
kurume4	17	正常肺	HHV6,HHV7	8.77E+01				4.32E+01	HHV6B			TTV
	18	ブラ	HHV6	2.44E+01				9.06E+01	HHV6B			TTV
kurume5	19	正常肺	HHV7,ParvoB19		2.90E+01		19.94E+01	1.93E+01		HHV7	parvoB19	TTV
	20	ブラ	HHV7		6.31E+02		3.48E+01	1.47E+02		HHV7	parvoB19	TTV

*カッコ書きは陽性疑い
 *定量検査に関しては定性検査で正常肺あるいはブラのどちらかでウイルスが検出された場合、そのウイルスについては正常肺とブラの両方について定量検査を行った。

表3 検出ウイルスまとめ

total	HHV-6		HHV-7		EBV		parovirus B19		TTV	
	正常肺	ブラ	正常肺	ブラ	正常肺	ブラ	正常肺	ブラ	正常肺	ブラ
	8/10	8/10	3/10	6/10	1/10	1/10	4/10	3/10	9/10	9/10

コメント：
 検出されたウイルスは、parvovirus B19 以外、常在性のあるウイルスであった。
 特に、HHV-6、HHV-7、TTV は、肺組織から頻出であるため、現時点で気胸との関連性は不明である。

表4 結果：マイコプラズマ

sample	tube No.	部位	マイコプラズマ(定量) ug/DNA	マイコプラズマ種類
saga1	1	正常肺	0.00.E+00	
	2	ブラ	0.00.E+00	
saga2	3	正常肺	0.00.E+00	
	4	ブラ	0.00.E+00	
saga3	5	正常肺	0.00.E+00	
	6	ブラ	0.00.E+00	
saga4	7	正常肺	0.00.E+00	
	8	ブラ	0.00.E+00	
saga5	9	正常肺	0.00.E+00	
	10	ブラ	0.00.E+00	
kurume1	11	正常肺	0.00.E+00	
	12	ブラ	0.00.E+00	
kurume2	13	正常肺	0.00.E+00	
	14	ブラ	0.00.E+00	
kurume3	15	正常肺	0.00.E+00	
	16	ブラ	0.00.E+00	
kurume4	17	正常肺	0.00.E+00	
	18	ブラ	0.00.E+00	
kurume5	19	正常肺	0.00.E+00	
	20	ブラ	0.00.E+00	

表5 まとめ

検出マイコプラズマ	正常肺	ブラ	TOTAL
マイコプラズマ	0/10	0/10	0/20

コメント：
 マイコプラズマは検出されなかった。

5. 主な発表論文等
 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
 出願状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：
 [その他]
 ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

武田 雄二 (Takeda, Yuji)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20530182

(2)研究分担者

青木 茂久 (Aoki, Shigehisa)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：10448441

桜木 徹 (Sakuragi, Toru)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：20315188