

図1 インフルエンザウイルス感染マウス肺における 8-ニトロ-cGMP の生成
野生型マウスにおいては、iNOS 欠損マウスに比較して、より強い 8-ニトロ-cGMP の陽性像を、特に、気道上皮細胞の細胞質において認めた。

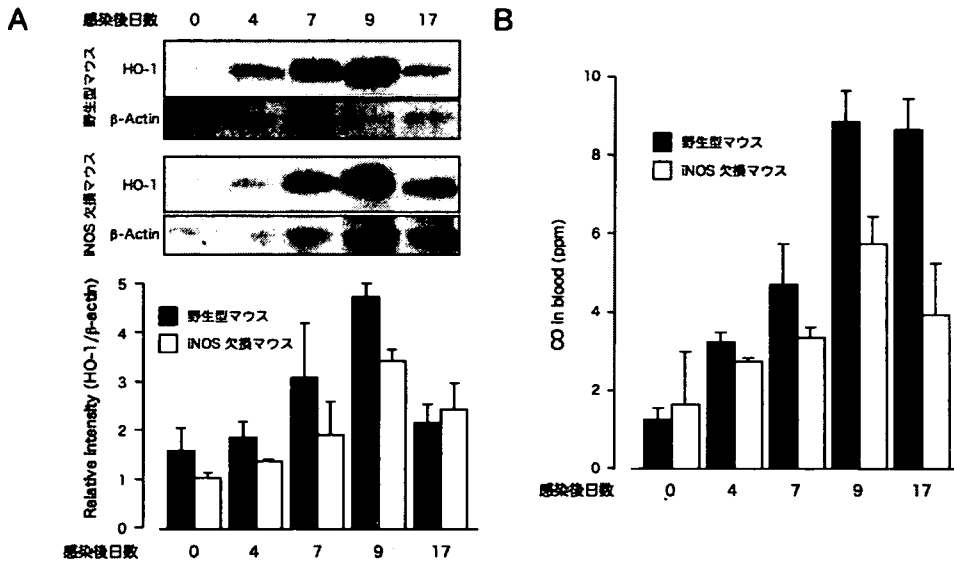


図2 インフルエンザウイルス感染マウスにおける HO-1 の誘導
野生型マウスにおいては、iNOS 欠損マウスに比較して、より強い HO-1 の誘導が認められた。
A: HO-1 蛋白質 (肺ホモジネート、Western blot)、B: HO-1 活性 (CO-Hb、ガスクロマトグラフィー)



図3 8-ニトロ-cGMP による HO-1 の誘導
iNOS 欠損マウスの腹腔マクロファージの細胞培養系に 8-ニトロ-cGMP を添加し、細胞破砕液中の HO-1 の発現を検討した。その結果、8-ニトロ-cGMP は、濃度依存的 (A; 0-30 μ M, 12 h)、かつ時間依存的 (B; 30 μ M, 3-18 h) に HO-1 を誘導した。

急性肺障害マウスモデルにおける

自然免疫細胞の動態とその役割の解明に関する研究

分担研究者 川上和義 東北大学医学部 教授

研究要旨：急性肺障害（ALI/ARDS）の発症機序を解明するために、肺炎球菌肺炎のマウスモデルとともに、リポポリサッカライド（LPS）投与による急性肺傷害モデルを用いて解析を行った。マウスに肺炎球菌を経気道感染させると、肺内で経時的な NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、好中球、そして好中球マーカーである Gr-1 を発現したマクロファージ様細胞の増加が観察された。ALI/ARDS の発症において重要なサイトカインとされる TNF- α が感染後の気管支肺胞洗浄液（BALF）中に経時的に検出され、その産生細胞として肺胞マクロファージのみならず好中球及び Gr-1 陽性マクロファージ様細胞が同定された。Gr-1 陽性マクロファージ様細胞は CD11b を発現するが F4/80 を発現しておらずユニークな細胞と考えられた。また、抗 Gr-1 抗体を投与することでこれらの細胞を除去すると、感染後の TNF- α 産生が有意に低下していた。また、LPS モデルでも好中球及び Gr-1 陽性細胞からの TNF- α 産生が観察され、さらには NKT 細胞の特異的活性化物質である α -galactosylceramide を同時に気道内投与すると好中球集積及び TNF- α 産生の増強が観察された。これらの結果から、好中球や Gr-1 陽性マクロファージ様細胞が自ら TNF- α を産生することで ALI/ARDS の発症に重要な役割を担っていると考えられ、NKT 細胞がこれらの反応を増強している可能性が示唆された。

A. 研究目的

急性肺障害（ALI/ARDS）は、先行する各種基礎疾患にともない急速に進行する肺胞傷害であり、浮腫・硝子膜形成、器質性変化、線維化の経過をたどる。その原因となる病態は直接損傷と間接損傷に分けられ、直接損傷では重症肺炎と胃内容物の誤飲が重要でありインフルエンザ（H5N1）はこちらに分類される。その発症には、各種免疫細胞や TNF- α のような炎症性サイトカインなど免疫病態が深く関わっているが、その詳細は未だ十分には理解されていない。その理由の一つとして、よい動物モデルが存在しないことがあげられる。これまでの研

究では、リポポリサッカライド（LPS）の経気道または全身投与によるモデルが多く用いられているが、ALI までは起こるが、なかなか典型的な ARDS にまでは進展しない。

これまで我々は、臨床的にも ARDS を発症して重篤化することが知られている肺炎球菌性肺炎のマウスモデルを確立し、その発症病態における natural killer (NK) T 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞といった自然免疫リンパ球の役割について解析を行ってきた。今年度は、肺炎球菌感染モデルとともに LPS 気道投与モデルを用いることで、肺障害の急性期における TNF- α 産生機構について検討するとともに、これらの反応における NKT 細胞の

役割について解析を行った。

B. 研究方法

1) マウスの気管内に直接肺炎球菌（臨床分離株、serotype-3）または LPS（大腸菌由来）を接種することで急性肺障害モデルを作製した。

2) 肺障害急性期における TNF- α の産生動態及び産生細胞を調べるために、1.5、3、6、12、24 時間後の気管支肺胞洗浄液（BALF）中の TNF- α 濃度を ELISA で測定するとともに、各種細胞表面マーカーと細胞内 TNF- α を蛍光標識した抗体で染色後フローサイトメトリーを用いて解析した。

3) Gr-1 陽性細胞について詳細に解析するために、磁気細胞分離装置（MACS）やセルソーターを用いてその精製を試みた。

4) Gr-1 陽性細胞の役割を解析するために、抗 Gr-1 抗体投与によって同細胞を除去しその影響について検討した。

5) 急性肺障害における NKT 細胞の役割を解析するために、 α -galactosylceramide (α -GalCer) を腹腔または気道内に投与してその影響について検討した。

C. 研究結果

1) 肺炎球菌感染後経時的に BALF 中に TNF- α 産生が検出されるとともに、肺胞マクロファージ以外にも、細胞内に TNF- α を発現した Gr-1 陽性細胞が著明に集積した。しかし、同様に肺内に集積する NKT 細胞や γ δ T 細胞では TNF- α の発現は観察されなかった。

2) Gr-1 陽性細胞はその形態的特徴から好中球とマクロファージ様細胞から構成されると考えられた。Gr-1 陽性マクロファージ

様細胞は CD11b 陽性、F4/80 陰性であり通常の肺胞マクロファージとは異なっていた。

3) 肺炎球菌感染後の BALF 中からセルソーターによって精製した Gr-1 陽性好中球から明らかな TNF- α 産生が検出された。

4) 抗 Gr-1 抗体を投与することで Gr-1 細胞を除去すると TNF- α が約 50% 低下した。

5) LPS の気道内投与モデルでは、肺炎球菌感染モデルに比べ Gr-1 陽性マクロファージ様細胞の集積が若干弱いものの同様な所見が得られた。

6) α -GalCer を LPS とともに気道内に投与すると好中球の集積及び TNF- α 産生の増加がみられ、急性肺障害が増強した。一方、LPS の接種なしに α -GalCer のみを気道内に投与しても肺内での好中球の有意な集積が観察されたが、TNF- α 産生は顕著ではなかった。

D. 考案

肺炎球菌肺炎はしばしば劇症化することが知られている。重症化の過程で侵襲性感染症（敗血症、髄膜炎）や ARDS の発症が問題となる。ARDS は過剰な炎症反応が基盤にあると考えられ、肺炎球菌による重症肺炎の解析は H5N1 に伴う ARDS の発症機序の解明にも有用である。今回の研究から、ALI/ARDS の発症に重要とされる TNF- α の産生には、従来から指摘されていた肺胞マクロファージの他に、好中球および Gr-1 陽性マクロファージ様細胞も関与していることが示唆された。好中球のサイトカイン産生能については近年幾つか報告がなされているが、好中球集積に直接関係する TNF- α の産生については、これまで報告がなく新しい知見と考えられる。また、肺炎球菌

感染後、早期から肺内に出現してくる TNF- α 産生性の Gr-1 陽性マクロファージ様細胞については、これまで同様の報告はほとんどなく新規の細胞集団である可能性があるが、本研究においてその形態的特徴や、表面マーカーの性状が明らかとなった。今後、その他の特徴や起源、急性肺障害時における動態や機能について更なる研究が必要である。

また、LPS の気道内投与モデルは、H5N1 の場合と同様に直接損傷による急性肺障害と考えられ、その発症機序の解明に有用である。今回の研究によって、LPS モデルにおいても肺炎球菌モデルと同様な結果が得られたことから、これらの知見は直接損傷による ALI/ARDS に共通の現象である可能性が考えられ、H5N1 による ALI/ARDS の発症にも関与している可能性が推察される。

これまでの我々の研究から肺炎球菌感染にともない NKT 細胞が肺内に集積し、好中球性炎症反応に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。今回の研究から、 α -GalCer の気道内投与によって LPS 誘発好中球性炎症反応が亢進することが明らかとなり、NKT 細胞が ALI/ARDS の発症に直接的あるいは間接的に関与する可能性が示唆された。

E. 結論

TNF- α 産生を通して好中球や Gr-1 陽性マクロファージ様細胞が肺炎球菌や LPS による ALI/ARDS の発症に関与し、これら一連の過程において NKT 細胞が何らかの役割を担っている可能性が推察された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川上和義: 呼吸器感染症と粘膜免疫, 医学のあゆみ, 221: 891-896, 2007.
- 2) 川上和義: 肺炎球菌感染と肺内自然免疫リンパ球による感染防御, 実験医学, 25 : 3157-3163, 2007.
- 3) 川上和義: NKT 細胞と細菌感染, 臨床検査, 51: 1085-1089, 2007.

2. 学会発表

- 1) Hatta M, Nakamatsu M, Nakasone C, Fujita J, Kaku M, Kawakami K: Regulation of neutrophil-mediated host defense to pneumococcal infection by NKT and $\gamma\delta$ T cells. FASEB Meeting, May 2007, Miami Beach, USA.
- 2) Kawakami K: $\gamma\delta$ T cells and infection in lung. The 13th International Congress of Mucosal Immunology, July 2007, Tokyo.
- 3) 八田益充、仲村 究、位田 剣、青柳哲史、宮里明子、賀来満夫、川上和義: 肺炎球菌感染初期防御における TNF α 産生細胞の解析. 第 37 回日本免疫学会・学術集会, 横浜, 2007 年 11 月.

F. 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（H5N1）の死因となる急性肺障害（ARDS）の病態解析とモデル動物の作製に関する研究」

ARDS の発症機構および病態モデルを用いた病理学的解析

分担研究者：永田典代 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

協力研究者：岩田奈織子 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

長谷川秀樹 国立感染症研究所 感染病理部 室長

佐多徹太郎 国立感染症研究所 感染病理部 部長

研究要旨：BALB/c マウスを用いた SARS 発症モデルの作製を試みた。マウス継代 SARS-CoV を 4 週齢動物と半年齢動物に経鼻接種し比較解析したところ、半年齢動物では局所における TNF- α などの炎症性サイトカインの過剰な産生と低 IFN- γ 発現が明らかとなった。また、感染前から半年齢では Th2 にシフトしており、ウイルス感染後の Th1/Th2 反応が正常にコントロールされていないことが示唆された。これらの現象は、サイトカインストームが関わりとされている呼吸器ウイルス感染後の ARDS 発症機序を解明する上で重要な知見である。

A. 研究目的

近年アジア各国で感染、発症が広がり問題となっている、インフルエンザ（H5N1）感染による急性肺障害（ARDS）の発症機序を解明することを目的とした。すでにわれわれは、2002-03 年冬期に世界的に流行した重症急性呼吸器症候群（SARS）の原因となる SARS 関連コロナウイルス（SARS-CoV）を用い、ラットで継代を重ねることにより動物モデルを作製し、SARS 発症にはウイルスの馴化と宿主の加齢が関わることを明らかにした（Nagata *et al.*, 2007, *J. Virol.*）。ヒトと同様、動物モデルにおいても加齢は SARS 発症のリスク因子として重要であることが明らかとなった。そこで今回は、実験動物としてさらに使いやすい、BALB/c マウスを用いた同様の SARS-CoV 感

染モデルの作製を試み、SARS 発症機序の解明を試みた。

B. 研究方法

SARS 患者からの分離株である Frankfurt 株（Dr. Ziebuhr より分与）をマウス（BALB/c, 4 週齢, 20 μ l 接種）に 10 回の継代接種を行い、得られたウイルスを VeroE6 細胞で一回継代した。このウイルス（F-musX-VeroE6 株）を 4 週齢と半年齢のマウスに 20 μ l 経鼻接種し、経過観察を行った（一群 n=5-10 匹）。また、経時的に材料を採取し、組織中のウイルス、サイトカインおよび病理学的検索を行った（n=3）。病理学的解析は、常法どおり作製した 10%ホルマリン緩衝液固定後のパラフィン切片肺組織を用いた。免疫組織化学によるウイルス抗

原の検出はUV不活化粒子 (HKU39849株) をウサギに免疫して得られた抗 SARS-CoV 血清を用いて実施した。サイトカイン量の測定はUV照射および0.1%SDSによるウイルス不活化処理後の材料を用いて、Mouse Cytokine twenty-plex antibody bead kit (BioSource International, Camarillo, CA)で行った。

C. 研究結果

ウイルス接種後いずれの動物も一過性に体重減少がみられたが、半年齢動物で体重減少率が高く、接種2日目から激しい呼吸器症状を示し、3日目以降に30-50%が瀕死となった。組織学的に半年齢では重度な肺水腫と出血を伴う急性肺炎を呈し、死亡例では肺全体に広がる重篤な肺水腫を伴うび慢性肺胞傷害をみとめた(図1)。ウイルス量は接種4日目の肺と鼻腔を含む上顎組織において半年齢で有意に高く、感染時期がやや延長した(データは示さない)。また、半年齢動物では接種1日以降から肺乳剤中の炎症性サイトカイン(IL-1, TNF- α , IL-6)量の上昇がみられたものの、抑制性サイトカイン(IL-10)とIFN- γ の発現量は若齢に比べて有意に低かった(図2)。

D. 考察

マウス継代 SARS-CoV を4週齢動物と半年齢動物に経鼻接種し比較解析したところ、半年齢動物では局所におけるTNF- α などの炎症性サイトカインの過剰な産生と低IL-10・IFN- γ 発現が明らかとなった。また、感染前から半年齢ではTh2にシフトしており、ウイルス感染後のTh1/Th2反応が正常にコントロールさ

れないことが示唆された。感染後の異常な炎症亢進作用(サイトカインストーム)が肺水腫を増悪させ、肺傷害を引き起こす結果、SARSを発症すると考えられた。さらに、抗TNF- α 抗体とIFN- γ の投与実験を試みたところ、抗TNF- α 抗体接種群では発症の遅延がみられたが致死率は逆に上昇した。一方、IFN- γ の投与によってSARS発症は阻止された(データは示さない)。このことから、感染後のIFN- γ 発現は免疫反応を調整し、重症化の機序に大きく関与していることが示唆されている。これらの現象は、サイトカインストームが関わると考えられているウイルス感染後のARDS発症機序を解明する上で重要な知見である。

E. 結論

SARS-CoV感染BALB/cマウスを用いたSARS発症モデルを作製した。半年齢マウスにおいて、感染局所のIFN- γ 発現による免疫調整がサイトカインストーム後のARDS発症に重要な役割を担うことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Sato Y, Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T, Ami Y, Odagiri T, Tashiro M, Sato T. Pathology and virus dispersion in cynomolgus monkeys experimentally infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus via different inoculation routes. *Int J Exp Pathol*. 2007. 88:403-414
2. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S,

Yokoyama M, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Morikawa S, Sata T. Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus. *J Virol.* 2007. 81:1848-1857.

2. 学会発表

1. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川 茂、佐藤由子、佐多徹太郎。SARS-CoV 感染動物モデルにおける加齢による免疫応答の相違。第55回日本ウイルス学会総会（2007年10月札幌）。

3. 永田典代、佐多徹太郎. SARS患者におけるARDSの病態とモデル動物の解析. 医学のあゆみ 2008. 224 (11) 印刷中.

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし。

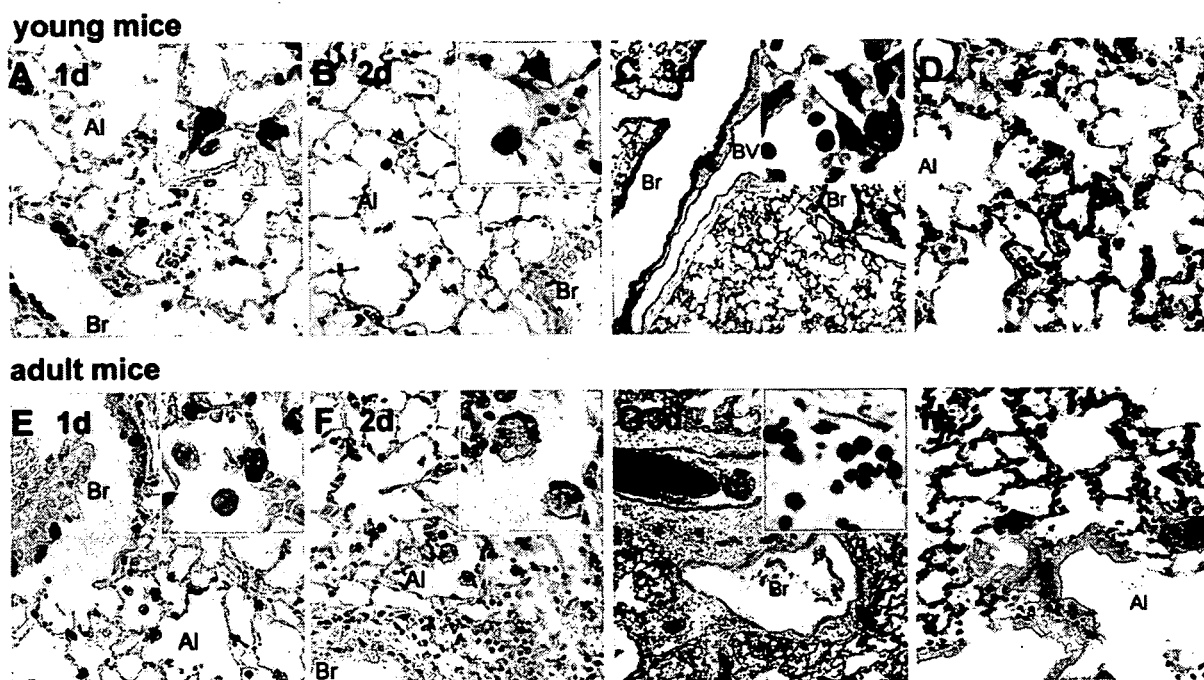


図1 A-Dは4週齢、E-Hは半年齢 BALB/c マウスの肺。接種後1, 2日目はいずれの動物においても肺胞上皮、マクロファージが SARS-CoV 抗原陽性であった (A,B,E,F)。半年齢において接種後2日目の肺胞内に泡沫マクロファージが存在した (F)。接種後3日目に4週齢の肺胞内では単核系細胞の浸潤がみられた (C,D) 一方で、半年齢では好中球浸潤を伴った血管周囲の明らかな水腫と肺胞における硝子膜の形成がみられ、び慢性肺胞傷害の様相を呈した (G,H)。

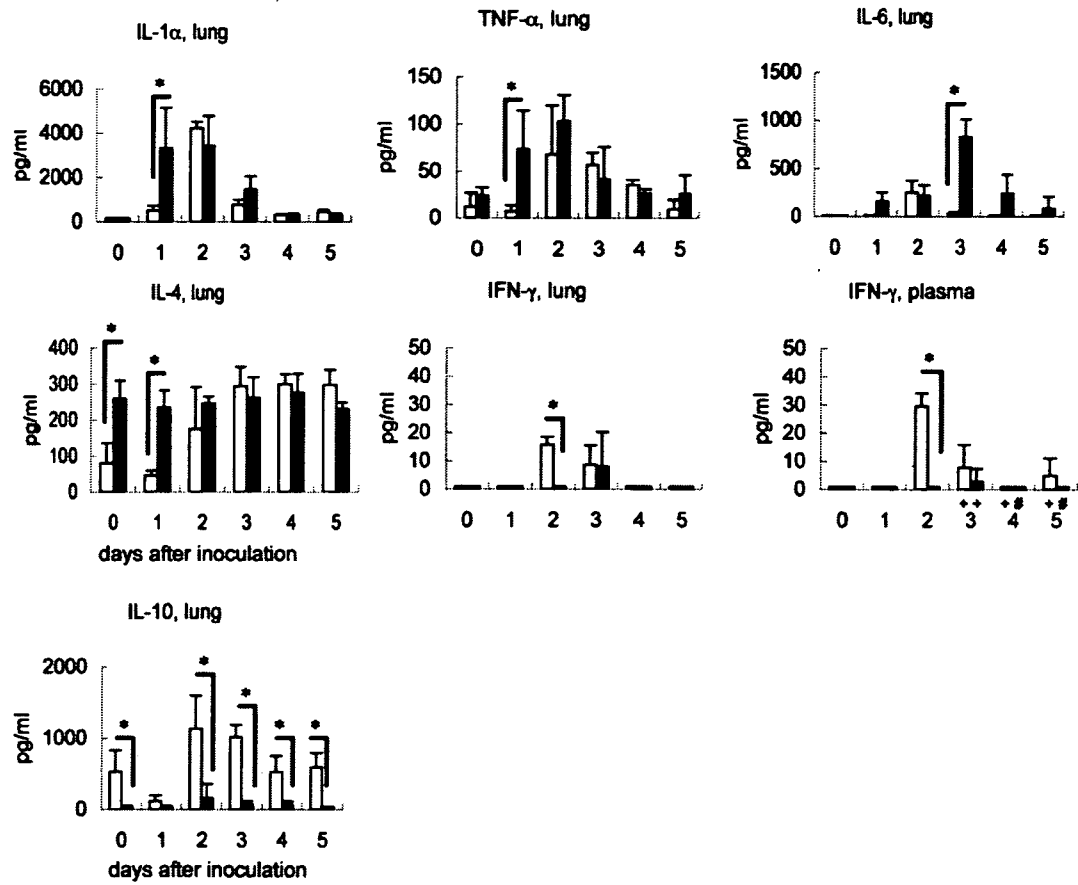


図2 肺乳剤上清あるいは血漿中のサイトカイン発現量。

好中球機能不全による肺病変の解析

分担研究者 荒谷康昭 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授

研究要旨：ミエロペルオキシダーゼのノックアウトマウス(MPO-KO マウス)の肺にザイモザンを投与すると、投与後6日目までに、MPO-KO マウスは野生型マウスよりも重篤な肺炎を誘発した。肺に浸潤した細胞のほとんどは好中球であった。投与後早期の肺中の KC 量、MIP 量、IL-17 量、および G-CSF 量は、野生型マウスよりも MPO-KO マウスの方が著しく高値を示した。すなわち、好中球からの次亜塩素酸産生が欠如すると、菌体成分で誘発される好中球性の肺炎を誘発しやすくなることが明らかになった。

A. 研究目的

急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) 発症機構の解明を目的として、肺炎の動物モデルを構築し、そのモデル病態の発症機構を究明することを本研究の目的とする。本病態における好中球の関与に主眼を置き、分担者自身が作製したミエロペルオキシダーゼ欠損マウス(MPO-KO マウス)マウスを駆使して解析する。

MPO は好中球のみに存在し、単球にわずかに検出されることを除いては、本酵素を保有する生体内組織はない。この酵素は、過酸化水素と塩化物イオンから次亜塩素酸を生成する反応を触媒する。分担者は、MPO-KO マウスがカンジダ菌など多くの真菌や細菌に易感染性を示すことをすでに報告しており、感染防御における MPO の重要性を個体レベルで証明している。一方、従来の *in vitro* の研究成果から、好中球由来の活性酸素が過剰分泌すると、それが生体組織に傷害を及ぼして、各種炎症性疾患を発症する引き金になる可能性がある。そこで本研究では、炎症誘発剤であるザイモザンの肺投与によって発症する肺炎をモデルと

して、MPO 欠損という好中球機能不全が肺炎の発症と重篤化に及ぼす影響を探る。

B. 研究方法

野生型マウス (C57BL/6 マウス) は日本 SLC から購入した。MPO-KO は、C57BL/6 マウスに 10 回以上戻し交配して、C57BL/6 と遺伝的背景を等しくした後に使用した。いずれも 8-10 週令の雄マウスを使用した。マウスの飼育は、横浜市立大学木原生物学研究所動物実験指針に準じて飼育管理した。

炎症誘発剤として使用したザイモザンは、市販粉末をリン酸緩衝液にけん濁し、これを麻酔を施したマウスに経鼻投与した。投与後、1日目、3日目、および6日目の肺の解剖像を観察するとともに、その組織切片をヘマトキシリン/エオジン染色して、肺の炎症像を組織学的に解析するとともに、胚全体に対する炎症領域の割合を計測した。また、気管支および肺胞中に集積した炎症細胞を肺胞洗浄によって回収し、その細胞数を計測した。さらに、好中球、マクロファージ、樹状細胞、NK 細胞、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、および B 細胞の各表面

抗原の抗体を用いたフローサイトメトリーにより、回収した細胞の細胞種を同定するとともに、各々の細胞数を算出した。肺中サイトカインとケモカインの濃度測定には、ザイモザン非投与のマウス、および投与後6時間後、1日目、3日目、および6日目のマウスの肺をプロテアーゼ阻害剤共存下で破碎し、破碎液の遠心上清を使用した。測定とデータ解析は、Bio-Plex (BIO-RAD) を用いてメーカーの推奨する方法に準じ、国立感染症研究所において行った。

(倫理面への配慮)

実験動物は、動物の保護及び管理に関する法律に準じて扱い、必要最小限の動物を使用した。やむを得ず動物を殺さなければならない場合には、できる限りその動物に苦痛を与えない頸椎脱臼法を採用して安楽死させた。

C. 研究結果

野生型マウスおよび MPO-KO マウスにザイモザンを投与すると、野生型マウスは1日後にすでに全肺葉のおよそ1割程度に炎症が認められた。しかし、その後6日目までほぼ同程度の炎症が持続し、それ以上の炎症の進行は認められなかった。一方、MPO-KO マウスの炎症は、投与後1日目ですでに野生型マウスよりも有意に炎症領域が広がっており、その後も炎症の拡大が経時的に進行し、6日目には胚全体のおよそ6割以上を占める領域に炎症像が観察された(図1)。

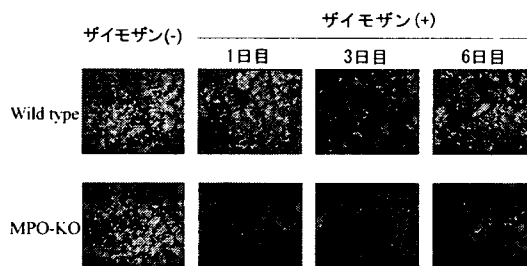


図1. ザイモザン非投与および投与後1、3、6日目のHE染色像

投与後1日目の野生型マウス肺から肺胞洗浄によって回収された細胞数は、およそ300万個であったのに対し、MPO-KO マウス肺からは、その3倍量の細胞が回収された。また、6日目のMPO-KO マウス肺からは野生型マウスの5倍以上の細胞が回収された(図2)。

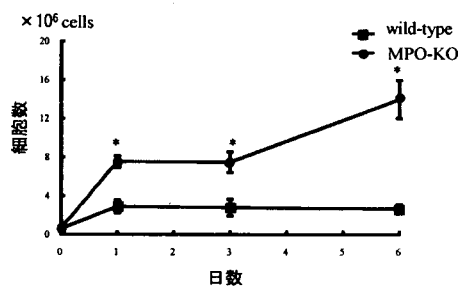


図2. 肺胞洗浄液中の炎症細胞数の経時変化
1群5個体を使用し、平均値と標準偏差を算出した。
(*p<0.001)

回収された細胞種を同定したところ、ザイモザンを投与していない対照群では、回収された細胞のおよそ9割が常在性マクロファージであったのに対し、ザイモザン投与6日目では、いずれのマウスにおいても8割以上が好中球であることが判明した。ザイモザン投与6日目のマクロファージの細胞数はザイモザン非投与時とほとんど変化はなく、樹状細胞、NK細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、およびB細胞の集積は、投与後6日間の実験期間ではほとんど認められなかった。

サイトカイン・ケモカインは、白血球の活性化や炎症患部への遊走を促進する。ザイモザン投与後6時間の肺組織中のKC量、IL-17量、およびG-CSF量は、MPO-KOマウスの方が野生型マウスよりも3-5倍量多く、また投与後1日目のKC、MIP-1、MCP-1、IL-1、IL-6、TNF- α 量、およびG-CSF量は、MPO-KOマウスの方が野生型マウスよりも有意に高値を示した。

以上の結果より、MPO-KOマウスの方が野生型マウスより、ザイモザンで誘発される好中球性肺炎が早期に重篤になることが明らかとなった。

D. 考察

本研究は、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)発症機構の解明を目的として、菌体抽出成分であるザイモザンによって誘発される肺炎を肺炎モデルとし、その病態の発症機構を究明することを目的とした。

好中球あるいは単球からの次亜塩素酸産生を欠如するMPO-KOマウスは、野生型マウスよりもザイモザン誘発性肺炎が重篤化することが示された。この好中球機能不全マウスの肺患部には、好中球がより早期に、しかもより多量に浸潤することから、浸潤した好中球が炎症の進行に関与していることが示唆された。また、この炎症は好中球性であり、リンパ球系細胞はこの炎症にほとんど関与していないことも明らかになった。好中球や単球などが組織に浸潤する際には、種々のサイトカインやケモカインが関与しているので、MPO-KOマウスの好中球が早期に肺に集積する理由を探るために、肺組織内における23種類のケモカイン・サイトカイン量の経時的变化も調べた。野生型マウスとMPO-KOマウスにおける好中球の肺への集積量の違いは、ザイモザン投与後1日目ですでに観察されたので、まず

ザイモザン投与後6時間のサイトカイン・ケモカインの変動に注目したところ、MPO-KOマウスのG-CSF量とKC量が野生型マウスよりも顕著に増加していた。興味深いことに、マウスの皮膚に組換えKCを注入すると、その部位へ集積する好中球数は、MPO-KOマウスの方が野生型マウスよりも多いことを我々は明らかにしている。これらの知見より、MPO-KOマウスではKCの産生量が多いことが、このマウスの肺炎が重篤化する一因になっている可能性が示唆される。一方、G-CSFは好中球の分化に必要である。同時期の血中G-CSF値もMPO-KOマウスの方が野生型マウスよりも遥かに高値である(結果未提示)ことを考え合わせると、ザイモザンの刺激によって肺で産生されたG-CSFが、血中を通過して骨髄に移行し、ここで骨髄細胞を刺激してMPO-KOマウスの好中球数を増加させ、その結果、肺への好中球の集積数が高まっている可能性も考えられる。

投与後1日目のサイトカイン・ケモカインの変動にも注目したところ、G-CSFとKCに加えて、MIP-1 α/β 、MCP-1、IL-1 α/β 、IL-6、TNF- α も、wild typeマウスに比べてMPO-KOマウスの方が有意に高値を示した。MIP-1もKCと同様の活性を持つので、このケモカインもMPO-KOマウス好中球の肺への浸潤を促進している可能性がある。

好中球が産生する次亜塩素酸が細胞傷害性を持つという従来*in vitro*の実験などから、次亜塩素酸を産生できないMPO-KOマウスの方がwild typeマウスよりも炎症は弱いはずであると一般的には予想できる。しかし、本研究でその予想とは逆の結果が得られたことは興味深い。今後、次亜塩素酸の直接的傷害作用だけでなく、様々なサイトカイン・ケモカインのネットワークも探っていくことは、好中球由来の次亜塩素

酸の生体内での機能を知り、MPO 欠損患者のリスクを軽減するために重要と考える。今後、MPO-KO マウスが早期に重篤な肺炎を発症するメカニズムを追求して真の発症機構を知ることは、炎症疾患の適切な評価系として確立するために不可欠な研究であると考えられる。

E. 結論

好中球からの次亜塩素酸産生を欠如する好中球機能不全マウスは、ザイモザンの肺投与によって重篤な肺炎を発症することが判明した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matthijsen, R.A., Huugen, D., Hoebbers, N.T., Vries, B., Peutz-Kootstra, C. J., Aratani, Y., Daha, M.R., Tervaert, J. W. C., Buurman, W. A., and Heeringa, P: Myeloperoxidase is critically involved in the induction of organ damage following renal ischemia reperfusion. **Am. J. Pathol.** 171, 1743-1752 (2007)

2. 学会発表

1. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Takano, Y., Okawara, A., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H: Contribution of myeloperoxidase to host defense against pulmonary and systemic infections with *Cryptococcus neoformans*. The 5th international Peroxidase Meeting, New Zealand (2007).
2. 荒谷康昭、瀬田玄樹、梅木 祐、西川 なつき、鈴木和男：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのザイモザンによる肺炎の誘発 第 13 回 MPO 研究会、2007 年 10 月、広島

3. 長尾朋和、松村実美子、荒谷康昭、星野昭芳、山本健二、中山俊憲、南谷晴之、鈴木和男：MPO-ANCA による糸球体内皮細胞の活性化、第 13 回 MPO 研究会、2007 年 10 月、広島

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

厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業

『インフルエンザ (H5N1) の死因となる劇症型 ARDS の病態解析と治療法の開発に関する研究』

平成 19 年度 第 1 回班会議 (合同会議 : ARDS 班)

プログラム

会場 : 千葉大学医学部附属病院 第一講堂

7 月 13 日 (金)

13:00-13:10

開催にあたって

鈴木和男 (千葉大学院医学研究院免疫発生学・炎症制御学)

13:10-13:40

オープニングレクチャー: CD69 分子によるアレルギー性気道炎症制御

中山俊憲 (千葉大学院医学研究院免疫発生学)

13:40-15:30

1. ARDS の臨床と病態、モデル動物

1-1 ARDS の発症機序への提言-H5N1 インフルエンザの病態と考えられる FARDS との比較検討-

河内正治 (国立国際医療センター)

1-2 ALI/ARDS ならびに特発性肺線維症(IPF)の急性増悪に対するシベレスタットナトリウムと PMX-DHP 併用療法についての検討

本間 栄、菊池 直 (東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科)

1-3 ARDS 病態モデルとしての VILI マウス作製

前原康宏 (国立国際医療センター)、河内正治 (国立国際医療センター)

1-4 急性肺傷害マウスモデルの作製と自然免疫リンパ球の関与に関する研究

青柳哲史¹、八田益充¹、賀来満夫¹、川上和義²

¹ 東北大学大学院医学系研究科感染制御・検査診断学分野

² 東北大学医学部保健学科病原検査学分野

1-5 インフルエンザウイルス肺炎における酸化ストレス適応応答の分子制御戦略

赤池孝章、岡本竜哉 (熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野)

1-6 ARDS の発症機構および病態モデルを用いた病理学的解析

永田 典代 (国立感染症研究所)

1-7 マクロファージ染色法の開発 ARDS 解析に向けて

山本健二、星野昭芳 (国立国際医療センター研究所 国際臨床研究センター)

1-8 今後の方針について

荒谷康昭(横浜市立大学)、小林茂人(順天堂大学附属順天堂越谷病院)

15:30-16:00 休憩

16:00-17:00

2. 感染症の諸問題

2-1 オーバービュー:千葉院内感染地域支援ネットワーク(千葉ネット)とニューヨーク市の感染症危機管理

佐藤武幸 (千葉大医学部附属病院)

2-2 ウイルス感染と宿主抵抗因子

大島正道 (国立感染症研究所)

2-3 ベトナムにおけるインフルエンザ流行とウイルス遺伝子解析

齋藤玲子、李丹娟、鈴木康司、鈴木宏

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 国際感染医学講座 公衆衛生学分野¹,

2-4 感染症情報

重松美加 (国立感染症研究所)

17:00- 18:20

3. 人工ガンマグロブリンと遺伝子解析

3-1 オーバービュー:免疫グロブリン人工化にむけて

鈴木和男 (千葉大学院医学研究院 免疫発生学・炎症制御学、国立感染症研究所)

3-2 人工ポリクローナル免疫グロブリンの開発

古谷昌弘¹、大野尚仁²、高橋啓³、亀岡洋祐⁴、鈴木和男⁵

¹積水化学工業 メディカル開発センター、²東京薬科大・薬・免疫、³東邦大・医・大橋、

⁴医薬基盤研究所・遺伝子資源、⁵千葉大院医・免疫発生・炎症制御

3-3 MPO リーダーペプチドは好中球顆粒に局在する

¹亀岡洋祐、⁶笠間 毅、³鈴木哲朗、⁴猪原登志子、⁵武曾恵理、¹橋本雄之、²鈴木和男

医薬基盤研・遺伝子資源¹、千葉大院医・免疫発生・炎症制御²、国立感染研・ウイルス²³、

京大・院医⁴、北野病院⁵、昭和大・医⁶

3-4 血管炎患者の末梢血細胞で特異的に転写誘導されている遺伝子群の単離と機能解析

野島 博 (大阪大学微生物病研究所)

18:20-18:50

まとめ 小川道雄 (熊本労災病院)

18:50-19:00 まとめ 河内正治 (国立国際医療センター)

厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業
『インフルエンザ (H5N1) の死因となる劇症型 ARDS の病態解析と
治療法の開発に関する研究』平成 19 年度第 2 回班会議

プログラム

日時：2008 年 1 月 25 日(金)13：30－(受付開始：13：00)

2008 年 1 月 26 日(土)09：30－12：00

会場：熊本大学山崎記念館

2008 年 1 月 25 日(金)

13：00－受付開始

13：30－13：50 開会の辞 主任研究者 河内正治、熊本大学大学院 赤池孝章

13：50－14：20 研究班 overview 主任研究者 河内正治

第 1 部 臨床班 14：20－15：20

座長：布井博幸(宮崎大学医学部)

1. NHP-ハノイにおけるインフルエンザ (H5N1) 症例報告

H5N1-ARDS(FARDS)と ARDS の差異 についての検討

(河内正治^{1,2}、布井博幸⁴、鈴木和男^{2,3} 国立国際医療センター 手術部麻酔科・ICU ²国立感染症研究所
免疫部 ³千葉大学大学院・医学研究院・感染分子生物学・炎症制御学 ⁴宮崎大学・医学部小児科)

2. H5N1 インフルエンザの病態解析 日本でのインフルエンザ脳症との比較検討

(布井博幸：宮崎大学小児科)

3. 当院救命センターでの ARDS の臨床的検討と今後の研究課題

(本間 栄 / 菊池 直：東邦大学大森病院呼吸器内科)

15：20－15：40 休憩

第 2 部—A 基礎班 I 15：40－17：00

座長：中山俊憲(千葉大学大学院)

1. 基礎班総括 (鈴木和男 千葉大学大学院医学研究院)

2. CD69 分子をターゲットにした新規急性気道炎症制御法とリアルタイム気道炎症モニタリング
システム

(中山俊憲 千葉大学大学院医学研究院)

3. ARDS 病態モデルとしての VILI モデルマウス

(前原康宏¹、河内正治^{1,2}、戸高玲子²、大島正道²、長尾朋和³、鈴木和男^{2,3} ¹国立国際医療センター
手術部麻酔科、²国立感染症研究所 免疫部、³千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 炎症制御学)

4. インフルエンザウイルス肺炎におけるニトロ化ストレスと生体防御機構

(赤池孝章、岡本竜哉：熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野)

17:00-17:30 まとめ (仁保喜之：千早病院)

18:00-21:30 研究打ち合わせ(含：夕食)

2008年1月26日(土)

第2部—B 基礎班Ⅱ 09:30-10:50

座長：赤池孝章(熊本大学大学院)

5. ARDS の発症機構および病態モデルを用いた病理学的解析

(永田典代：国立感染症研究所)

6. 菌体成分誘発性肺炎における好中球機能欠損の影響

(荒谷康昭：横浜市立大学 国際総合科学研究科)

7. シュートタイプレトロウイルスによる誘導的抗ウイルス作用遺伝子発現システムの作製

(大島正道、戸高玲子：国立感染症研究所)

8. ARDS マウスモデルにおける自然免疫細胞の動態とその役割の解明に関する研究

(川上和義¹、八田益充²、青柳哲史²：¹ 東北大学医学部保健学科、² 東北大学大学院医学系研究科)

10:50-11:10 休憩

11:10-11:50 特別講演

座長：河内正治(国立国際医療センター)

演者：小川道雄(熊本労災病院 院長)

11:50-12:00 閉会の辞

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hidenori Yasuda, Nobuaki Yoshizawa, Miko Kimura, Mika Shigematsu, Shoji Kawachi, Masamichi Oshima, Kenji Yamamoto, Kazuo Suzuki.	Preparedness for the Spread of Influenza: Prohibition of Traffic, School Closure, and Vaccination of Children in the Commuter Towns of Tokyo.	J Urban Health			2008, in press
Nguyen Thanh Liem, Teruaki Oka, Late Le Phuc Phat, Hoang Ngoc Thach, Pham Viet Hung, Luong Thi San, Yuko Sato, Noriko Nakajima, Harutaka Katano, Toshio Kumasaka, Shoji Kawachi, Takeji Matsushita, Tetsutaro Sata, Koichiro Kudo, Kazuo Suzuki.	The characterization for H5N1-infected cells in lung tissue sections of a fatal case in Vietnam.	Jap J Infect Dis			2008, in press
鈴木和男、河内正治	はじめに. 特集「ARDSとインフルエンザ (H5N1)」	医学の歩み	224(11)	813	2008
河内正治	インフルエンザ (H5N1) によるARDSの病態と治療. 特集「ARDSとインフルエンザ (H5N1)」.	医学の歩み	224(11)	815-819	2008
河内正治	とりインフルエンザとベトナム	医療	61(12)	831-832	2007
布井 博幸	慢性肉芽腫症研究の新展開	日本臨床免疫学会雑誌	30	p1-p10	2007
布井 博幸	好中球機能の分子機構に関する最近の展開	血液フロンティア	7	695-705	2007
Shigeo Uezono, et al	Outcome of ANCA-Associated primary Renal Vasculitis in Miyazaki Prefecture	INTERNAL MEDICINE	46	815-822	2007
布井 博幸	ヒト (H1, H3) と鳥 (H5N1) インフルエンザウイルスによる重症感染症の病態と発症機序の違い	医学のあゆみ	224(11)	832-833	2008
杉野圭史・本間 栄	インフルエンザウイルス感染後にARDSを合併した重症肺炎の病態と治療	医学のあゆみ	224(11)	820-825	2008
磯部和順、秦 美暢、杉野圭史、佐野 剛、高井雄二郎、木村一博、長谷川千花子、笹本修一、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増悪の検討	肺癌	47	849-854	2007
坂本 晋、本間 栄	高齢者肺線維症の特徴と維持管理	呼吸器科	12	515-521	2007

山口恵三、館田一博、中森祥隆、柴山明義、岩田 敏、松原啓太、荘司 路、本間 栄、佐野 剛、村上日奈子、濱崎雄平、田代克弥、林 真一郎、永沢善三、泉 信有、仲剛、土志田 健、蝶名林直彦、内山 伸、杉浦秀子	LAMP法を用いたMycoplasma pneumoniaeとLegionella spp. による呼吸器感染症の迅速診断試薬の評価	医学と薬学	58	565-571	2007
鈴木和男	インフルエンザによる呼吸器不全に關与するperoxidaseファミリー	医学のあゆみ	224(11)	835-837	2008
安田英典・鈴木和男	インフルエンザ伝搬の数理モデル	医学のあゆみ	224(11)	863-864	2008
Yoko Ogasawara, Hidetaka Kaya, Goro Hiraoka, Fumiaki Yumoto, Sachie Kimura, Yasuhiro Kadota, Haruka Hishinuma, Eriko Senzaki, Satoshi Yamagoe, Koji Nagata, Masayuki Nara, Kazuo Suzuki, Masaru Tanokura, and Kazuyuki Kuchitsu	Synergistic Activation of Arabidopsis NADPH Oxidase AtrbohD by Ca ²⁺ and Phosphorylation	J. Biol. Chem		in press	2008
Kiwamu Nakamura, K. Suzuki et al	Deoxynucleic acids from Cryptococcus neoformans activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway	J. Immunol		in press	2008
K. Suzuki, Shigeto Kobayashi, Kazushige Yamazaki, Masaaki Gondo, Kazuo Tomizawa, Yoshihiro Arimura, Kimimasa Nakabayashi, Shoichi Ozaki, Masaharu Yoshida, Toshiharu Yoshida, Norimasa Tsusaka, Eri Muso, Tomio Okazaki, and Hiroshi Hashimoto.	Analysis of risk epitopes of anti-neutrophil antibody MPO-ANCA in vasculitis in Japan population	Microbiol.Immunol	51	1215-1220	2007
M. Ohtomi, H. Nagai, H. Ohtake, Late T. Uchida, and K. Suzuki	Dynamic change in expression of LECT2 during liver regeneration after partial hepatectomy in mice.	Biomedical Research	28	247-253	2007
Shigehiro Uezono, Yuji Sato, Seiichiro Hara, Shuichi Hisanaga, Keiichi Fukudome, Shouichi Fujimoto, Hiroyuki Nakao, Kazuo Kitamura, Shigeto Kobayashi, Kazuo Suzuki, Hiroshi Hashimoto, Hiroyuki Nunoi	Outcome of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture	Internal Medicine	46	815-822	2007

Melissa Goedken, Sally McComick, Kevin G. Leidal, Kazuo Suzuki, Yosuke Kameoka, Joshua M. Astern, Meilan Huang, Artem Cherkasov, William M. Nauseef.	Impact of two novel mutations on the structure and function of human myeloperoxidase	J. Biol. Chem	282	27994-8003	2007
Akiyoshi Hoshino, Tomokazu Nagao, Toshiko Ito-Ihara, Akiko Ishida-Okawara, Kazuko Uno, Eri Muso, Noriko Nagi-Miura, Naohito Ohno, Kazuhiro Tokunaka, Shiro Naoe, Hiroshi Hashimoto, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, Kazuo Suzuki.	Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in Murine Systemic Vasculitis and Glomerulonephritis model mice	Microbiol. Immunol	51	551-566	2007
Akiko Ishida-Okawara, Noriko Nagi-Miura, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Akinori Okumura, Hitoshi Tachikawa, Shin-ichiro Kashiwamura, Haruki Okamura, Naohito Ohno, Hidechika Okada, Peter A. Ward, Kazuo Suzuki.	Neutrophil activation and induced by <i>C. albicans</i> water-soluble mannoprotein- β -glucan complex (CAWS)	Exp. Mol. Pathol.	82	220-226	2007
Tomokazu Nagao, Mimiko Matsumura, Ayako Mabuchi, Akiko Ishida-Okawara, Osamu Koshio, Haruyuki Minamitani, and Kazuo Suzuki	Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody.	Neprol. Dialysis Transplant	22	77-87	2007
長谷川明洋、中山俊憲	炎症性肺疾患における Th1/Th2バランスの異常 - Th1/Th2細胞分化における Toll様レセプターの役割	医学のあゆみ	224(11)	840-844	2008
Uchida, T., Horiguchi, S., Tanaka, Y., Yamamoto, H., Kunii, N., Motohashi, S., Taniguchi, M., Nakayama, T., and Okamoto, Y.	Phase I study of α -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer.	Cancer Immunol. Immunother.	57(3)	337-345	2008
Kitajima, M., Abe, T., Miyano, K. N., Taniguchi, M., Nakayama, T., and Takaku, H.	Induction of natural killer cell-dependent antitumor immunity by the Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus.	Mol. Ther.	16(2)	261-268	2008
Motohashi, S., and Nakayama, T.	Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer.	Cancer Sci.			in press.

Kaneko, T., Hosokawa, H., Yamashita, M., Wang, C. R., Hasegawa, A., Kimura, Y. M., Kitajima, M., Kimura, F., Miyazaki, M., and Nakayama, T.	Chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci in human type 2 helper T cells.	Mol. Immunol.	44(9)	2249-2256	2007
Iwamura, C., and Nakayama, T.	Role of α -galactosylceramide-activated Va14 natural killer T cells in the regulation of allergic diseases.	Allergology International	56(1)	1-6	2007
Nakamatsu, M., Yamamoto, N., Hatta, M., Nakasone, C., Kinjo, T., Miyagi, K., Uezu, K., Nakamura, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Iwakura, Y., Kaku, M., Fujita, J., and Kawakami, K.	Role of interferon- γ in Va14+ natural killer T cell-mediated host defense against <i>Streptococcus pneumoniae</i> infection in murine lungs.	Microbes and Infection	9(3)	364-374	2007
Kimura, Y. M., Iwamura, C., Suzuki, A., Miki, T., Hasegawa, A., Sugaya, K., Yamashita, M., Ishii, S., and Nakayama, T.	Schnurri-2 controls memory Th1 and Th2 cell numbers in vivo.	J. Immunol.	178(8)	4926-4936	2007
Iwamura, C., Kimura, Y. M., Shinoda, K., Endo, Y., Hasegawa, A., Yamashita, M., and Nakayama, T.	Schnurri-2 regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness.	Int. Immunol.	19(6)	755-762	2007
Usui, T., Yamagami, S., Kishimoto, S., Seiich, Y., Nakayama, T., and Amano, S.	Role of macrophage migration inhibitory factor in corneal neovascularization.	Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.	48(8)	3545-3550	2007
Masuda, K., Kakugawa, K., Nakayama, T., Minato, N., Katsura, Y., and Kawamoto, H.	T cell lineage determination precedes the initiation of TCR β gene rearrangement.	J. Immunol.	179(6)	3699-3706	2007
Yamamoto, H., Okamoto, Y., Horiguchi, S., Kunii, N., Yonekura, S., and Nakayama, T.:	Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis.	Allergy	62(12)	1451-1455	2007
Kimura, Y. M., Iwamura, C., Suzuki, A., Kitajima, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Yamashita, M., and Nakayama, T.	Schnurri-2 controls the generation of memory Th1 and Th2 cells.	13th International congress of Immunology		475-479	2007
Yamashita, M., Onodera, A., and Nakayama, T.:	Immune mechanisms of allergic airway diseases: Regulation by transcription factors.	Crit. Rev. Immunol.	27(6)	539-546	2007