

好中球機能不全による肺病変の解析

研究分担者 荒谷康昭 横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 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、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。投与直後の肺中の MIP-2 量と KC 量は、野生型マウスよりも MPO-KO マウスの方が一過的に著しく高値を示した。MIP-2 抗体を投与すると症状が著しく軽減した。MPO-KO マウス好中球は、野生型好中球よりも高い MIP-2 産生能を示した。すなわち、MPO の欠損による好中球からの MIP-2 産生の促進が、MPO-KO マウスにおけるザイモザン誘発性肺炎の重篤化の一因になっている可能性が示された。

A. 研究目的

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。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 マウスは、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、公立大学法人横浜市立大学動物実験指針、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。

市販ザイモザンの懸濁液をマウスに経鼻投与した。投与後、1 日目、3 日目、および 6 日目の肺の組織切片を HE 染色して、肺の炎症像を組織学的に解析するとともに、肺胞洗浄によって回収された細胞数を計測した。さらに、回収した細胞の細胞種をフローサ

イトメトリーで同定した。肺中のサイトカイン・ケモカイン類の濃度は、Bio-Plex (BIO-RAD) もしくは市販の測定キット (R&D) を用いて測定した。抗ケモカイン抗体は経鼻的に投与した。

好中球は、マウスの大腿骨髄より Percoll 密度勾配遠心法により単離した。その好中球をザイモザン存在下で 3 時間または 6 時間培養し、その上清に分泌した MIP-2 量を市販の測定キット (R&D) を用いて ELISA 法で測定した。一方、単離好中球にザイモザンまたは蛍光ザイモザンを食させ、その食食量を顕微鏡下あるいはフローサイトメトリーで測定した。

(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。頸椎脱臼法もしくはエーテル麻酔法で安楽死させた。

C. 研究結果

野生型マウスにザイモザンを経鼻投与すると、投与後 1 日目から 6 日目までほぼ同程度の軽度の肺炎しか観察されなかった。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進行し、6 日目には重篤な炎症が発症した (図 1)。投与後 6 日目の MPO-KO マウス肺からは野生型マウス肺の 5 倍量の細胞が回収された。

(図 2)。投与 6 日目の肺から回収された細胞の 8 割以上が好中球であった。

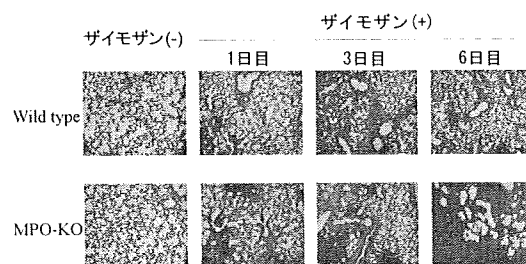


図1. ザイモザン非投与および投与後1、3、6日目のHE染色像

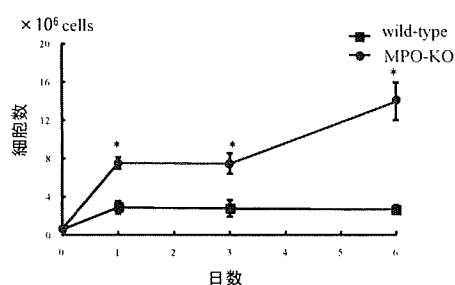


図2. 肺胞洗浄液中の炎症細胞数の経時変化
1群5個体を使用し、平均値と標準偏差を算出した。
(*p<0.001)

以上より、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。

サイトカイン・ケモカイン類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 量と MIP-2 量は、MPO-KO マウスの方が野生型マウスよりも 3 倍高値を示した。MIP-2 が MPO-KO マウスにおける好中球の浸潤に関わっているかを知るために、MIP-2 の抗体を経鼻投与して中和した結果、好中球の集積が半減した。このことから MIP-2 は炎症初期の好中球の集積に関与していることが明らかになった。

野生型および MPO-KO マウスの大腿骨髄から単離した好中球に *in vitro* でザイモザンを添加して 6 時間培養し、培地に分泌さ

れた MIP-2 量を測定したところ、MPO-KO マウス好中球は野生型よりもおよそ 3 倍高値を示した (図 3)。また、好中球のザイモザン貪食能を野生型マウスと MPO-KO マウスとで比較した。両マウスの骨髄由来の好中球に蛍光標識されたザイモザンを *in vitro* で添加した後、顕微鏡およびフローサイトメトリーにより解析したところ、MPO-KO マウスの好中球は野生型のものよりも多くのザイモザンを貪食した。

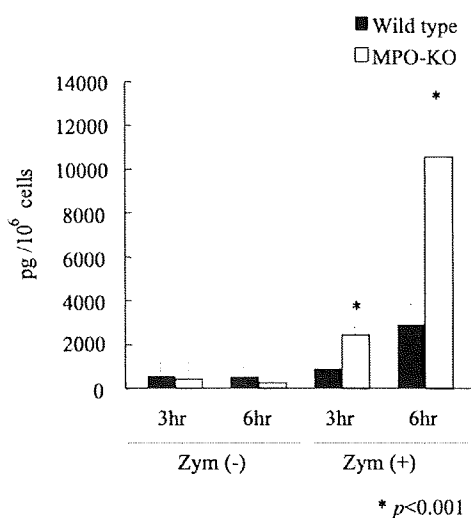


図 3 単離好中球からのMIP 2産生量

D. 考察

本研究は 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病変を解析した。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。この炎症は好中球性であり、リンパ球の集積はほとんど検出できなかった。MPO-KO マウスで多くの好中球が肺に集積する理由を知るために、肺中のケモカイン

ン・サイトカイン量の経時変化を解析した結果、ザイモザン投与後 6 時間の MPO-KO マウスの MIP-2 量と KC 量が、野生型マウスよりも顕著に増加していた。MIP-2 抗体の投与によって炎症が軽減したことから、MIP-2 量が一過的に上昇することが、肺炎重篤化の一因であると考えられた。MPO 欠損好中球のザイモザン貪食能が高いことが、MIP-2 の過剰産生の一因とも考えられた。

次亜塩素酸が細胞傷害性を持つという従来の知見などから、次亜塩素酸を産生できない MPO-KO マウスの方が野生型マウスよりも炎症は軽度であると考えるのが一般的であるから、本研究で逆の結果が得られたことは興味深い。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さらに追求することは、炎症疾患全般の発症機構を知るための一助になると考える。

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した。このマウス好中球は野生型好中球よりも、ザイモザン貪食能と MIP-2 産生能が高いことが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 荒谷康昭 (分担): ミエロペルオキシダーゼ(MPO)の抗菌活性。臨床検査 (医学書院) 51, 1121-1125 (2007)
2. 荒谷康昭 (分担): 好中球 myeloperoxidase の役割。生体防御医学事典 (朝倉書店) 145-149 (2007)
3. 荒谷康昭 (分担): 好中球機能異常による呼吸器不全-ミエロペルオキシダーゼ欠損を中心に。医学のあゆみ (歯歯薬出版) 224,861-862 (2008)
4. 荒谷康昭 (分担): 真菌・細菌感染防

御の鍵：好中球 Myeloperoxidase。細胞
(ニューサイエンス社) 41, 56-59
(2009)

2.学会発表

国際会議

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. Aratani, Y., Umeki, Y., Nishikawa, N., Tozuka, S., Yoshida, M., Suzuki K: Myeloperoxidase deficiency enhances zymosan-induced acute lung inflammation by up-regulating KC and MIP-2. 7th International Peroxidase Meeting, USA (2009)
 3. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Maeda, N., Koyama, H., Suzuki, K: *In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense against fungi. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (2009)
 4. Nagao, T., Dobashi, H., Yamamoto, K., Nakajima, N., Sato, Y., Tomizawa, K., Aratani, Y., Jun, Z., Todaka, R., Oshima, M., Sata, T., Kobayashi, K., Kawachi, S., Nakayama, T., Suzuki, K: Role of Neutrophils and Myeloperoxidase in Lung Injury induced by Influenza A/H1N1 (PR-8) Infection in Mice. 14th International Vasculitis and ANCA Workshop, Denmark (2009)
- ### 国内会議
1. 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
 2. 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
 3. 梅木 祐、瀬田玄樹、西川なつき、鈴木和男、荒谷康昭：Zymosan 誘発性肺炎における Myeloperoxidase の役割。第14回MPO研究会、2008年10月、東京
 4. 長尾朋和、松村実美子、荒谷康昭、中山俊憲、南谷晴之、鈴木和男：MPO-ANCAによる糸球体血管内皮細胞の好中球走化性因子の発現。第14回MPO研究会、2008年10月、東京
 5. Umeki, Y, Nishikawa, N, Suzuki, K, Aratani, Y.: Myeloperoxidase deficiency promotes zymosan- induced acute lung inflammation.第38回日本免疫学会学術集会、2008年12月、京都
 6. Nishikawa, N, Umeki, Y, Aratani, Y.: Phagocyte NADPH-oxidase deficiency promotes zymosan- induced acute lung inflammation. 第38回日本免疫学会学術集会、2008年12月、京都
 7. Nagao, T, Aratani, Y., Nakayama, T, Suzuki K: Secretion of neutrophil chemotactic factors from glomerular endothelial cells by anti- myeloperoxidase antibody.第38回日本免疫学会学術集会、2008年12月、京都
 8. 荒谷康昭、梅木 祐、西川なつき、戸塚彩子、吉田后那、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誘発性肺炎の促進。日本農芸化学会2008年度大会、2009年3月、福岡
 9. 長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、中島典子、佐藤由子、荒谷康昭、鄒軍、戸高玲子、大島正道、佐多徹太郎、小林一夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男：インフルエンザ感染誘導による劇症型ARDSモデルマウスの作製とその発症機構の解析。第74回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2009年6月、京都
 10. 長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、中島典子、佐藤由子、富澤一夫、荒谷康昭、鄒軍、戸高玲子、大島正道、佐多徹太郎、小林和夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男：インフルエンザウイルスPR-8(H1N1)感染による肺傷害機構の解析。第20回日本生体防御学会学術総会2009年7月、東京
 11. 吉田后那、山本桂、鈴木和男、荒谷康昭：ミエロペルオキシダーゼ欠損好中球のケモカイン産生能の解析。第15回MPO研究会 2009年11月、栃木
 12. 荒谷康昭：The Structure and Function of Myeloperoxidase. 第15回MPO研究会 2009年11月、栃木
 13. Tomizawa, K, Nagao, T, Sugamata, R, Aratani, Y., Kobayashi, K, Kawachi, S, Nakayama, T, Suzuki, K: Role of neutrophils and myeloperoxidase in lung injury induced by influenza A/H1N1 (PR-8) Infection in Mice. 第39回日本免疫学会学術集会 2009年12月、大阪

14. 荒谷康昭、吉田后那：好中球機能異常による炎症性腸疾患の解析。第17回食細胞機能異常症研究会 2009年12月、東京
15. 山本 桂、吉田后那、鈴木和男、荒谷康昭：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス好中球のケモカイン産生能の促進。2010年度日本農芸化学会大会 2010年3月、東京（予定）
16. 松本典子、吉田后那、荒谷康昭：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス好中球のイモザン貪食能の促進。2010年度日本農芸化学会大会 2010年3月、東京（予定）

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特になし

ARDS の発症機構および病態モデルを用いた病理学的解析

研究分担者：永田典代 国立感染症研究所 感染病理部 第二室長

研究協力者：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 インフルエンザウイルス研究センター 第六室長

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 発症モデルを作出し、重症肺炎に関わる宿主側の因子について解析をおこなった。その結果、半年齢 BALB/c マウスでは局所における 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。感染前から半年齢では Th2 にシフトしており、4 週齢マウスとのサイトカインの比較解析の結果から、ウイルス感染後の Th1/Th2 反応に相違があることが示された。またこのモデルにおいて、感染 3 時間目の IFN- γ 腹腔内投与による発症防御が確認され、IFN- γ の免疫調整作用が感染後のサイトカインストームを抑制し SARS 発症を防御すると考えられた。さらに、C57BL/6 マウスを用いた比較実験の結果から、Th1 優位な反応は SARS-CoV の排除や感染後の免疫調整作用に重要であると推測された。本モデルにおいては Th2 側へシフトした個体における感染後の免疫応答の Th1/Th2 バランス異常が SARS 発症の引き金になると結論された。

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複製し、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

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。一方で、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスをはじめとするいくつかの呼吸器感染症における炎症亢進による病態の悪化は、宿主の Th1/Th2 バランス異常が背景にあるとされ、Th1 あるいは Th2 側、もしくはいずれの場合でもその要因となることが報告されている。本モデルにおける Th1/Th2 バランスと重症急性肺炎発症の関連性について明らかにした。

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 週齢あるいは半年齢の BALB/c マウスあるいは C57BL/6 に 20 μ l 経鼻接種し、10 日間、経過観察を行った。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。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

ウイルス接種後の BALB/c マウス群は一過性に体重減少がみられたが、半年齢 BALB/c 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 BALB/c マウス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 BALB/c マウスで有意に

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 BALB/c マウスでは接種 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。

次に、半年齢 BALB/c にウイルスを経鼻接種後、3 時間目に IFN- γ を投与したところ、感染 3 日目から体重減少は阻止され動物はすべて生残した。対照群では 3 日目から 10 日目までに SARS を発症し半数の動物が致死性であった。

そこで、接種 3 日目までのウイルス量、サイトカイン・ケモカイン発現量を調べた結果、ウイルス量は接種 48 時間目で 0.5log \sim 1log の有意差が認められたものの、24 時間、72 時間では差は見られなかった。また、対照群と比較して IFN- γ 群で血清中の IFN- γ , IL-6, IL-12, IP-10, MIG が 24 時間目に高値を示し、肺乳剤上清で TNF- α , IL-6, IL-1, KC, MIP-1 α , MCP-1 が 48 時間目に有意に低下した (図 2)。

さらに、4 週齢、半年齢の C57BL/6 を用いた感染実験を実施した。その結果、いずれも接種 3 日目までに 3%程度の体重減少を示したが、呼吸器症状はみられなかった。肺内のウイルス量は 1,2 日目までは半年齢の BALB/c 感染マウスの結果と比較して同等の増殖を示したが、3 日目には有意に減少した。また、非接種群と比較して、肺乳剤上清で接種 6 時間から FGF basic, IL-10, IL-1 β , IL-2, IL-6, MCP-1, MIG の有意な上昇がみられ、2 日目には IL-1 α , IL-5, IP-10, KC, MIP-1 α が有意に上昇した。これらの炎症性サイトカイン、ケモカインの上昇は

多くが2日目をピークとし、3日目には減少した。

D. 考察

本モデルにおいて、Th2 シフト (IL-4 高値と IFN- γ 低値) を示す半年齢 BALB/c マウスはマウス継代株を経鼻感染後、ウイルス増殖局所における炎症性サイトカインの過剰な発現 (IL-6, KC 等の高発現)、抑制性サイトカイン (IL-10) と IFN γ の低発現を示す。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。その結果、ウイルス増殖と血管透過性亢進による慢性肺胞傷害と強い肺水腫が引き起こされ SARS を発症する。このモデルに感染 3 時間後の IFN- α 投与することにより、SARS による致死を免れた。今回、C57BL/6 では SARS 発症はみられず、ウイルス感染後早期に炎症性、抑制性サイトカイン等がバランスよく発現し、ウイルス排除と炎症の調整に働いていることが示された。よって、マウスモデルにおいては、Th1 優位な反応は SARS-CoV の排除や感染後の免疫調整作用に重要であり、Th2 側へシフトした Th1/Th2 バランス異常が SARS 発症の引き金になると推察された。

E. 結論

本マウスモデルでは、Th2 側へシフトした動物における SARS-CoV 感染後の Th1/Th2 レスポンスのバランス異常が重症肺炎の発症の引き金になると結論した。

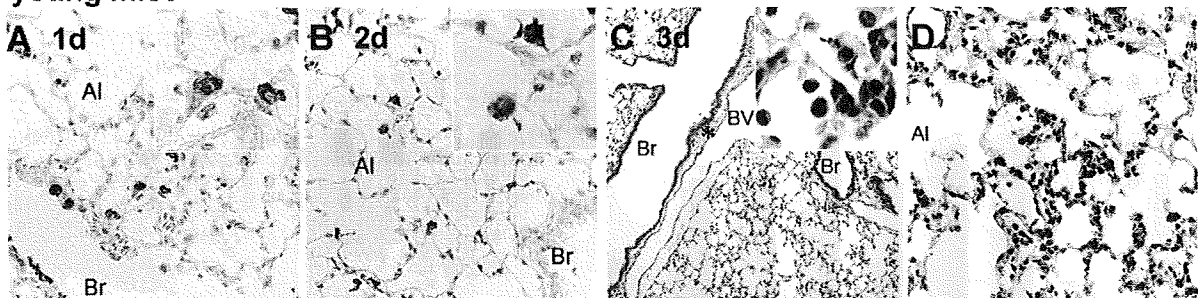
G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koji Ishii, Hideki Hasegawa, Noriyo Nagata, Yasushi Ami, Shuetsu Fukushi, Fumihito Taguchi, Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Neutralizing antibody against severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. *Microbiology and Immunology*, 53:75-82, 2009.
2. Shiori Haga, Noriyo Nagata, Tadashi Okamura, Norio Yamamoto, Tetsutaro Sata, Naoki Yamamoto, Takehiko Sasazuki, Yukihito Ishizaka. TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. *Antiviral Res.* 2009. in press
3. Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Ayako Harashima, Yuko Sato, Masayuki Saijo, Fumihito Taguchi, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata. Mouse-Passaged Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Leads to Lethal Pulmonary Edema and Diffuse Alveolar Damage in Adult but Not Young Mice. *Am J Pathol.* 2008;172:1625-1637.
4. Yasushi Ami, Noriyo Nagata, Kazuya Shirato, Rie Watanabe, Naoko Iwata, Keiko Nakagaki, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Fumihito Taguchi F. Co-infection of respiratory bacterium with severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol Immunol.* 2008. 52:118-127.
5. Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Shigeyuki Itamura, Takehiko Saito, Yasushi Ami, Taketo Odagiri, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata. 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.
6. Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Masaru Yokoyama, Ayako Harashima, Yuko Sato, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa, Tetustaro Sata. 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.
7. 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) 838-839
2. 学会発表
1. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐多徹太郎. 重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS-CoV) 感染モデルを用いた SARS に対する治療法の検討. 第 97 回日本病理学会総会. 京都府, 5 月, 2009.
 2. 原崎一浩、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐多徹太郎、山本直樹、高久洋、佐藤人美、山本陽子、平松啓一、田代真人、山本典生. 免疫抑制剤の SARS コロナウイルス増殖に与える影響についての解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 東京都, 10 月, 2009.
 3. 山本典生、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐多徹太郎、松本武久、高久洋、山本陽子、佐藤人美、平松啓一、田代真人、山本直樹. Structure-based drug design (SBDD) による SARS コロナウイルス増殖抑制剤の同定. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 4. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎. SARS-CoV 感染動物における宿主の Th1/Th2 バランスと重症化の関連. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京都, 2009.
 5. 長谷川秀樹、相内章、永田典代、岩田奈織子、網康至、小淵正次、岸田典子、小田切孝人、佐多徹太郎、田代真人. 新型インフルエンザ H1N1 のフェレットにおける病原性の検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 6. 岸田典子、小淵正次、高下恵美、徐紅、氏家誠、永田典代、岩田奈織子、相内章、長谷川秀樹、田代真人、齋藤玲子、鈴木宏、池松秀之、小田切孝人. 季節性インフルエンザワクチンにより誘導される中和抗体の新型インフルエンザウイルスに対する交差反応性および新型インフルエンザウイルスの性状. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 7. 岩田奈織子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎. SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副反応について. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
 8. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊教、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎. 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの財形と効果検討. 第 13 回日本ワクチン学会学術集会. 札幌, 9 月, 2009.
 9. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, and Sata T. A Mouse model for Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) using BALB/c mice and mouse-passaged SARS-Coronavirus. XIth International Nidovirus Symposium (2008.6. Oxford, UK).
 10. 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 感染動物モデルを用いた SARS 発症機序の解明と治療法の検討. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 岡山市, 10 月, 2008 年.
 11. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐多徹太郎. SARS-CoV 感染動物モデルにおける SARS 重症化とサイトカインの関与. 第 96 回日本病理学会総会. 金沢市, 5 月, 2008.
 12. 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札幌市, 10 月, 2007.
- H. 知的財産権 の出願、登録状況
なし。

young mice



adult mice

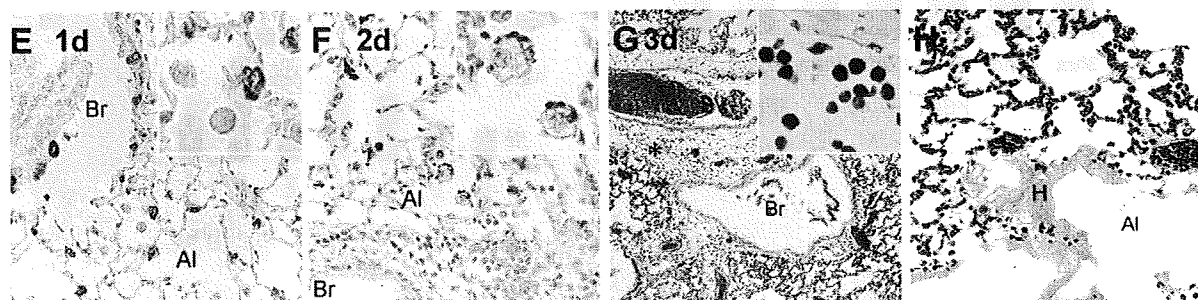


図1 A-Dは4週齢、E-Hは半年齢 BALB/c マウスの肺。接種後1, 2日目はいずれの動物においても肺胞上皮、マクロファージが SARS-CoV 抗原陽性であった (A,B,E,F)。半年齢において接種後2日目の肺胞内に泡沫マクロファージが存在した (F)。接種後3日目に4週齢の肺胞内では単核系細胞の浸潤がみられた (C,D) 一方で、半年齢では好中球浸潤を伴った血管周囲の明らかな水腫と肺胞における硝子膜の形成がみられ、び慢性肺胞傷害の様相を呈した (G,H)。

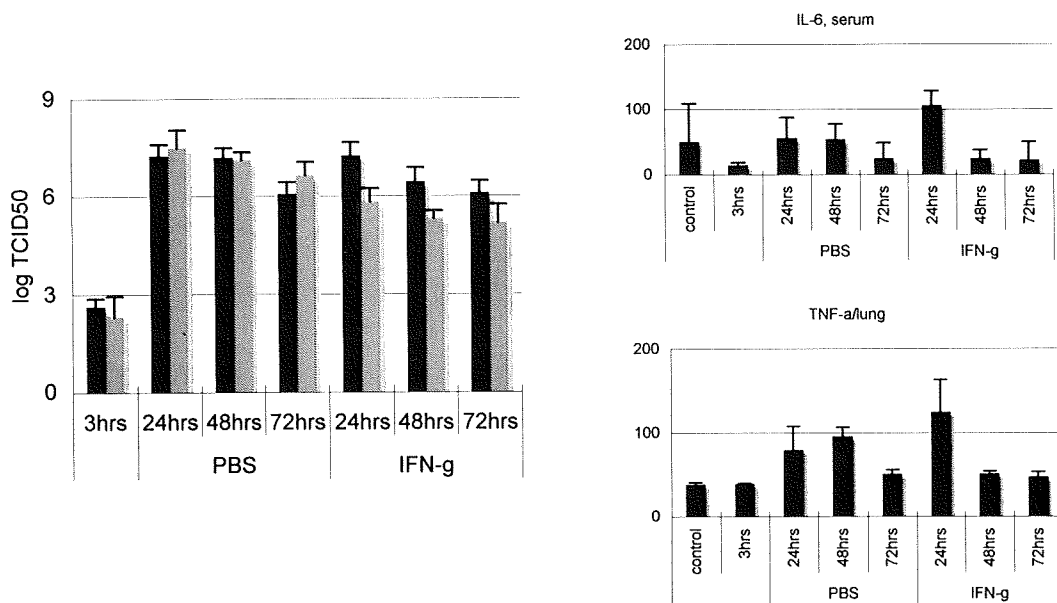


図2 感染3時間から72時間目のウイルス量とサイトカイン発現量。左図はウイルス量、黒棒が肺乳剤上清中、灰色棒は肺洗浄液中のウイルス量。48時間目で有意差がみられた。

右図はIL-6, TNF-aの発現量を示す。IL-6は24時間目に有意差がみられ、TNF-aは48時間目に有意差が認められた。

鳥インフルエンザウイルス（H5N1）感染症の病態解析

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 熊坂利夫 日赤医療センター・病理部

研究要旨 鳥インフルエンザ H5N1 感染症の多くは、劇症型 ARDS を呈し、呼吸不全で死亡するが、その病態については明らかでない。ベトナムハノイ国立小児病院（NHP）との共同研究により H5N1 感染症で死亡した 5 症例の肺組織について病理学的に解析した。2009 年にパンデミックとなったインフルエンザ A/H1N1pdm ウイルス感染症は季節性インフルエンザの場合と異なり、重症肺炎を併発し、ウイルス肺炎により死亡する例がある。我々は本邦で最初のインフルエンザ A/H1N1pdm ウイルス肺炎の剖検例を解析し、鳥インフルエンザ H5N1 感染症および季節性インフルエンザ感染症と比較検討した。

A. 研究目的

鳥インフルエンザ H5N1 感染症では多くが劇症型 ARDS を呈し、呼吸不全で死亡するが、その病態については明らかでない。本研究では高病原性インフルエンザウイルス感染症の病態をヒト剖検材料から明らかにし、その予防・治療法の開発に必要な知見を得ることを目的とする。また 2009 年に出現したいわゆる新型インフルエンザは高病原性ではないが、季節性インフルエンザと異なり重症肺炎を併発することがあることがわかった。これらの違いを剖検組織の病理学的解析から明らかにし、新型インフルエンザ感染ではウイルス血症となるかについても明らかにする。

B. 研究方法

(1) H5N1 感染症剖検肺組織の病理学的解析

材料：ベトナムハノイ小児病院で 2003 年から 2008 年に H5N1 感染症で亡くなった剖検

例 5 例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロック。うち、3 例は肺組織のみ。1 例は肺のほか心臓、肝臓、腎臓。1 例は肺のほか心臓、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、腸管。

方法：HE 染色にて組織学的病変の性状を評価し、A 型インフルエンザ NP 抗原を免疫組織化学で検出した。さらに細胞マーカー蛋白との二重蛍光免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡による解析により抗原陽性細胞を同定した。パラフィン切片から RNA を回収し、定量 RT-PCR 法によりウイルス量を測定した。

(2) インフルエンザ A/H1N1pdm ウイルス肺炎の剖検例の病理学的解析

材料：パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm ウイルス肺炎で死亡した症例の剖検組織。

方法：(1) の方法に加えて、in situ hybridization 法によるウイルス核酸の検出、肺組織からのウイルス分離、ネガティブ染

色による電子顕微鏡によるウイルス像の解析、ウイルスの全塩基配列決定を行った。また血液、肺組織中のサイトカイン・ケモカインの測定をした。

(3) インフルエンザ A/H1N1pdm ウイルス感染におけるウイルス血症に関する研究

材料：臨床例として 2009 年 9 月 27 日より 11 月 19 日までに迅速検査で A 型インフルエンザウイルス抗原陽性となった患者 16 名の血清および全血、計 32 検体。剖検例として感染研感染病理部に解析依頼された 4 症例の生前時の血清 10 検体。合計 42 検体。
方法：各検体 100μl から RNeasy kit で RNA を抽出し DNase 処理後リアルタイム RT-PCR 法で A/H1N1pdm ウイルスの HA 遺伝子の検出を βactin 遺伝子を内因性コントロールとして行った。

(倫理面への配慮)

剖検例については剖検承諾書にて了解を得ている。また血液材料に関しては個々の患者にインフォームドコンセントが取れている。

C. 研究結果

(1)H5N1 感染症剖検肺組織の病理学的解析
肺の病理組織像はびまん性肺障害 (DAD) の滲出期 (exudative stage) あるいは増殖期 (proliferative stage)を呈しており、ARDS の臨床所見と矛盾しなかった。硝子膜の形成、間質の浮腫と細胞浸潤、II 型肺胞上皮の過形成および出血が認められた (図 1)。5 例のうち病日の早い 3 例で A 型インフルエンザ NP 抗原が免疫組織化学で検出された。

図 1

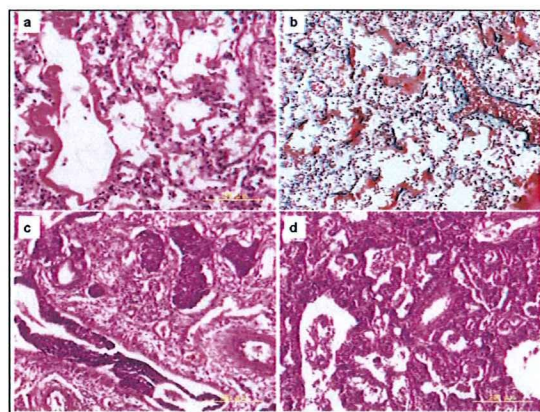


図 1. H5N1 感染肺の組織所見 a. DAD 滲出期 b.硝子膜 (赤) 形成 c. DAD 増殖期 d. DAD 増殖期

細胞マーカー抗原との蛍光二重染色法、共焦点レーザー顕微鏡による解析によって、インフルエンザ抗原陽性細胞は主に II 型肺胞上皮細胞およびマクロファージであることがわかった (図 2)。

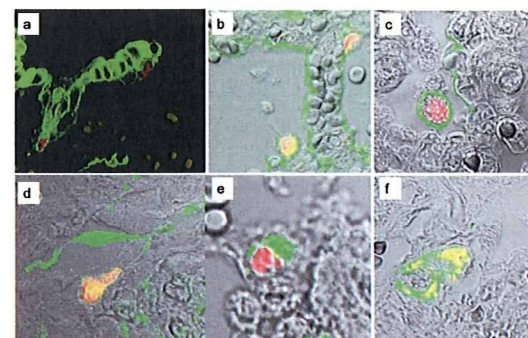


図 2. インフルエンザ NP 抗原(赤)と細胞マーカー(緑)との蛍光二重染色:すべて共局在する。a. サイトケラチン (細気管支上皮) b. EMA8 上皮細胞) c. SP-D(II 型肺胞上皮)d.CD34 (血管内皮細胞) e. KP-1(マクロファージ) f. PGM-1(マクロファージ)

2 例のパラフィン包埋肺組織からインフルエンザウイルス由来核酸を RT-PCR 法により検出した。なお、肺以外の臓器に関して

は、非特異的な病理学的変化にとどまり、インフルエンザ抗原は検出されなかった。

(ベトナムハノイ国立小児病院との共同研究)

(2)インフルエンザ A/H1N1pdm ウイルス肺炎の剖検例の病理学的解析

剖検例は 33 歳の男性。基礎疾患として拡張型心筋症、糖尿病、小児喘息、肥満 (170cm、112kg、BMI:38) があつた。発症から 5 日目に呼吸不全となり入院加療するも 7 日目に永眠した。入院時咽喉頭スワブ迅速診断で陰性であったためタミフルは遺伝子診断がでた 6 日目から投与開始した。病理所見として、肺は水腫状で正常含気部分はわずかであつた。主気管支は泡沫状分泌物で満たされ、分泌物は A 型インフルエンザ抗原迅速診断で陽性であつた。肺の病理組織像は肺水腫が主たる病変で II 型肺胞上皮細胞の増生と I 型肺胞上皮細胞の喪失、また一部に硝子膜形成がみられた。肺の病理組織像は肺のセクションによって新しい病変から古い病変まで DAD の病期が異なつていた (図 3)。全般的には硝子膜形成前の初期のびまん性肺障害 (DAD) 像が多かつた。図 3 に示したようにインフルエンザ NP 抗原は古い病変からはほとんど検出されなかつた。その他にヘモジデリンを貪食した肺胞マクロファージ (心不全細胞) が多数見られた。免疫組織化学により A 型インフルエンザ NP 抗原は気管支上皮細胞と肺胞上皮細胞に検出された (図 3)。一方、マクロファージおよび血管内皮細胞には検出されなかつた。呼吸器官以外の組織にはインフルエンザ抗原は検出されなかつた。剖検凍結生組織とホルマリン固定パラフィン包埋組織切片から RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法で解析し

たところ、ウイルス核酸も気管、気管支、肺に限局されて検出され、特に肺組織からはおよそ $10^5/\text{cell}$ コピー検出された。

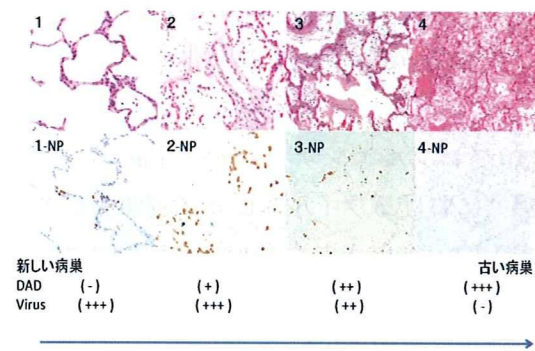


図 3. 1-4 : HE 染色、1-NP-4-NP : インフルエンザ NP 抗原の免疫組織化学(茶色)

また電顕で類円形およびひも状粒子のウイルスの形態を捕えることができた (図 4)。

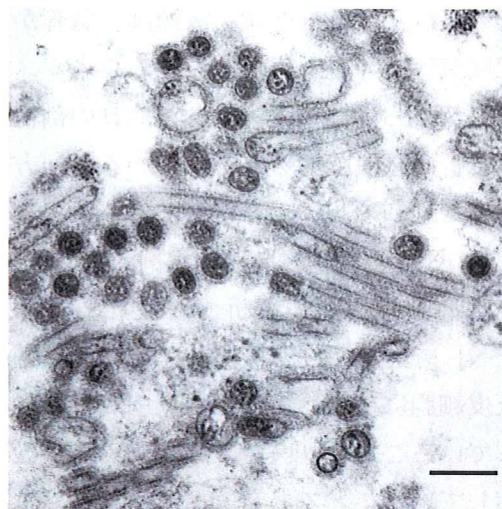


図 4.肺組織中のパンデミックインフルエンザウイルス電顕像 scale:200nm

ISH-AT 法によりウイルス mRNA とゲノム RNA を検出したところ mRNA のほうが多く検出され、ウイルスが増殖していることが確認できた。肺からは感染ウイルス粒子が分離されたが、ウイルス血症はみとめられなかつた (表 1、患者番号 17)。死亡時の

組織中のサイトカイン量を Human Cytokine 25-plex(BIOSOURCE 社)で解析したところ、肺では IL-2R、IFN- γ 、IFN- α 、IL-6、IL-10、TNF- α 、MCP-1、MIG、IL-8 が上昇していた。
(長野日赤病院との共同研究)

(3) インフルエンザ A/H1N1pdm ウイルス感染におけるウイルス血症に関する研究

表 1 に示すようにウイルス血症は認められなかった。(研究協力者：松下竹次、河内正治 (主任研究者))

D. 考案

ベトナムにおける H5N1 感染症例は減少しているため、剖検例は大変貴重である。H5N1 感染の病態をさらに詳細に解明するためには、今後、咽頭、喉頭部、気管から区域気管支等の上気道におけるウイルス分布の解析および感染まもない病日の剖検例の解析が必要であると考えている。一方、本邦で最初のパンデミックインフルエンザ H1N1pdm ウイルス肺炎剖検例の解析では、全身の剖検組織の解析が可能であった。H5N1 感染剖検例と類似している点は肺胞上皮細胞に感染し、直接の肺胞障害をおこしていること、程度の差はあるが DAD 像を示していることである。また異なる点は、本症例ではインフルエンザ抗原陽性のマクロファージが検出されなかったことである。今後、解析剖検症例数が増えることにより病態や発症機構が解明されるのではないかと考えている。パンデミックインフルエンザウイルスのウイルス血症の有無について明らかにすることは、献血におけるウイルスの混入などの安全性の面で必須である。今回対象とした症例では季節性インフルエ

ンザと同様ウイルス血症は認められなかった。現時点でインフルエンザウイルス感染は呼吸器官に限局されており、心筋、腸管、脳などからは検出されていない。一方、H5N1 のヒト感染症では、ウイルス血症となる可能性が示唆されており、呼吸器以外からウイルス核酸が検出されたという報告がある。

E. 結論

季節性インフルエンザではウイルスは主に上気道に感染し、細気管支上皮細胞には感染するが、肺胞上皮細胞に感染することはほとんどなく、肺炎を併発しても 2 次性の細菌性肺炎であるといわれている。一方、鳥インフルエンザ (H5N1) ウイルスは主に肺胞上皮、マクロファージに感染し、劇症型 ARDS を引き起こす致死性感染症である。2009 年のパンデミックインフルエンザ (A/H1N1pdm) ウイルスは高病原性ではないが、重症肺炎をひきおこすこともあり、剖検例の解析により肺胞上皮細胞にウイルスが感染し、ウイルス性肺炎による肺胞障害を起こすことがわかった。

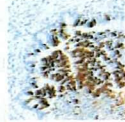


	季節性	H5N1	H1N1 _{pdm}
感染細胞	気管 気管支 細気管支	肺胞上皮細胞 マクロファージ	気管支 肺胞上皮細胞
呼吸器症状	上気道症状。ウイルス性肺炎はなく、二次的な細菌性肺炎によるARDSの報告はある。	劇症型ARDS	重症例でウイルス性肺炎ならびにARDS
ウイルス抗原分布			

図 5. 季節性インフルエンザ、鳥インフルエンザ (H5N1)、パンデミックインフルエンザ (H1N1pdm) の相違

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nguyen Thanh Liem, Noriko Nakajima, Le Phuc phat, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Pham Viet Hung, Luong Thi San, Harutaka Katano, Toshio Kumasaka, Teruaki Oka, Shoji Kawachi, Takeji Matsushita, Tetsutaro Sata, Koichiro Kudo, Kazuo Suzuki. H5N1-infected cells in lung with diffuse alveolar damage in exudative phase from a fatal case in Vietnam. *Jap J Infect Dis* 61:157-160, 2008.
2. Noriko Nakajima, Satoru Hata, Yuko Sato, Minoru Tobiume, Harutaka Katano, Keiko Kaneko, Noriyo Nagata, Michiyo Kataoka, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Makoto Kuroda, Tamami Odai, Nobuyuki Urasawa, Tomoyoshi Ogino, Hiroaki Hanaoka, Masahide Watanabe, Tetsutaro Sata. The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jap J Infect Dis* 63:67-71, 2010.
3. Akihiro Takiyama, Lei Wang, Mishie Tanino, Taichi Kimura, Naoki Kawagishi, Yasuyuki Kunieda, Harutaka Katano, Noriko Nakajima, Hideki Hasegawa, Tomoyuki Takagi, Hiroshi Nishihara, Tetsutaro Sata, Shinya Tanaka. Sudden death of a patient with pandemic influenza(A/H1N1pdm) virus infection by acute respiratory distress syndrome. *Jap J Infect Dis* 63:72-74, 2010.

2. 学会発表

1. 中島典子、佐藤由子、下ノ原望、片野晴隆、熊坂利夫、ウエンリエム、河内正治、鈴木和男、佐多徹太郎 鳥インフルエンザウイルス(H5N1)感染症の病態の病理学的解析 第57回日本ウイルス学会学術集会. 東京都, 10月25-27日, 2009
2. Hata Sataoru, Urasawa Nobuyuki, Ogino Tomoyoshi, Hanaoka Hiroaki, Watanabe Masahide, Odai Tamami, Nakajima Noriko, Tobiume Minoru, Sato Yuko, Sata Tetsutaro. An Autopsy case of new influenza virus A/2009(H1N1, PDM) pneumonia. 第55回日本病理学会秋期特

別総会, 東京都, 11月19-20日, 2009.

3. Noriko Nakajima. First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan. 14th Annual meeting of US-Japan cooperative medical science program Acute respiratory infections (ARI) panel. in San Francisco, California, U. S. A., January 25-26, 2010.

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

患者 番号	検体 番号	*病 日	体温(°C)	上気道 症状	消化器 症状	神経症状	検体	Real time RT-PCR	
								血球	血清
1	1	2	40.2			痙攣	血清・血球	0	0
	2	5	36				血清・血球	0	0
2	3	7	36	気管支炎			血清・血球	0	0
3	4	2	38.6	肺炎			血清・血球	0	0
4	5	2	40.5	肺炎		異常行動	血清・血球	0	0
5	6	4	36	肺炎		意識障害	血清・血球	0	0
6	7	3	38.4			異常行動	血清・血球	0	0
7	8	4	40	肺炎			血清・血球	0	0
8	9	2	38.6			痙攣	血清・血球	0	0
9	10	2	39.8			意識障害	血清・血球	0	0
10	11	2	39	肺炎			血清・血球	0	0
11	12	2	39	呼吸不全			血清・血球	0	0
12	13	1	39	喘息			血清・血球	0	0
13	14	2	38	呼吸不全			血清・血球	0	0
14	15	2			嘔気		血清・血球	0	0
15	16	2	40.1	咳			血清・血球	0	0
16	17	2	39.7	肺炎			血清・血球	0	0
17	18	3	37.8	咳	下痢		血清		0
	19	5	39	肺炎	下痢		血清		0
	20	6	不明	肺炎			血清		0
	21	7#		肺炎			血清		0
18	22	6	不明	肺炎			血清		0
	23	9#	不明	肺炎			血清		0
19	24	2	不明			ライ脳症	血清		0
	25	2	不明				血清		0
	26	2	不明				血清		0
20	27	不明	不明	肺炎			血清		0
陽性コントロール								9.72x10 ⁶	
陰性コントロール								0	
*病日は発熱した日を1とする。						患者 17-20 は剖検症例	#死亡日		

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
河内正治	心不全	東口高志編	JJN SPECIAL「治る力」を引き出す 実践！臨床栄養	医学書院	東京	2010	194-1994-2
河内正治	IV-29 呼吸障害患者の栄養管理は？	東口高志編	重症患者と栄養管理 Q&A 改訂版	総合医学社	東京	2010	156-62
河内正治	ARDS の臨床	鈴木和男監修	生体防御医学事典	朝倉書店	東京		325-329
佐野 剛、本間 栄	空洞形成性の多発結節影を呈した 52 歳女性	山口恵三、館田一博編	New 専門医を目指す ケース・メソッド・アプローチ 11 感染症	日本医事新報社	東京	2009	103-108
杉野圭史、本間 栄	人アジュバント病	藤翔二、中田紘一郎、永井厚志、太田 健編	呼吸器症候群 III	日本臨床社	東京	2009	657-660
本間 栄	新しい診断と治療の ABC 突発性肺線維症	泉 孝英 編	呼吸機能	最新医学社	大阪	2008	61-70
坂本 晋、本間 栄	検査と技術 これから広がる生理検査・新たにはじまる生理検査	阿部信行、竹中克、永江 学、信岡祐彦 編	今後の生理検査に望むこと：呼吸凝集検査	医学書院	東京	2008	1164-1166
鈴木和男	インフルエンザ感染と免疫応答	桂監修	免疫学事典	朝倉書店	東京	2010	In press
鈴木和男	インフルエンザ感染と免疫応答免疫学事典	桂監修	インフルエンザ感染と免疫応答免疫学事典	朝倉書店	東京		in press
Tatsuya Okamoto, Mohammad Hasan Zaki, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike.	Nitric oxide-mediated host immune response and microbial pathogenesis.	Bahar Tunctan	Nitric Oxide Synthase Inhibitors: From Animal Studies to Clinical Implications	American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET)	Bethesda, USA	2010	in press
赤池孝章	活性酸素のシグナル伝達機能—その生理機能の再発見と酸化ストレス研究の新展開.	谷口直之	実験医学増刊：病態解明に迫る活性酸素シグナルと酸化ストレス	羊土社	東京都	2009	2320-2329
澤智裕、有本博一、赤池孝章	チオール基の修飾による活性酸素のセンサー機能制御.	谷口直之	実験医学増刊：病態解明に迫る活性酸素シグナルと酸化ストレス	羊土社	東京都	2009	2341-2347

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Yuka Osaki, Yasuhiro Maehara, Atsuko Matsuya, Masaki Sato, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Tomokazu Nagao, Kazuo Suzuki, <u>Shoji Kawachi</u> .	Analysis of cytokine/chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluids from patients with acute respiratory distress syndrome.	J Jpn Soc Intensive Care Med	17	179-184	2010
Tatsuya Okamoto, Shahzada Khan, Kohta Oyama, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, <u>Takaaki Akaike</u> .	A new paradigm for antimicrobial host defense mediated by a nitrated cyclic nucleotide.	J Clin Biochem Nutr	46	14-19	2010
Khandaker A. Ahmed, Tomohiro Sawa, <u>Takaaki Akaike</u> .	Protein cysteine S-guanylation and electrophilic signal transduction by endogenous nitro-nucleotides	Amino Acids	—	in press	2010
Takeshi Marumo, Keiichi Hishikawa, Masahiro Yoshikawa, Junichi Hirahashi, <u>Shoji Kawachi</u> , and Toshiro Fujita	Histone deacetylase modulates the proinflammatory and -fibrotic changes in tubulointerstitial injury	Am J Physiol Renal Physiol	298	133-141	2010
<u>Noriko Nakajima</u> , Satoru Hata, Yuko Sato, Minoru Tobiume, Harutaka Katano, Keiko Kaneko, <u>Noriyo Nagata</u> , Michiyo Kataoka, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro, Makoto Kuroda, Tamami Odai, Nobuyuki Urasawa, Tomoyoshi Ogino, Hiroaki Hanaoka, Masahide Watanabe, Tetsutaro Sata.	The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination.	Jpn J Infect Dis	63	67-71	2010
Akihiro Takiyama, Lei Wang, Mishie Tanino, Taichi Kimura, Naoki Kawagishi, Yasuyuki Kunieda, Harutaka Katano, <u>Noriko Nakajima</u> , Hideki Hasegawa, Tomoyuki Takagi, Hiroshi Nishihara, Tetsutaro Sata, Shinya Tanaka.	Sudden death of a patient with pandemic influenza(A/H1N1pdm) virus infection by acute respiratory distress syndrome	Jpn J Infect Dis	63	72-74	2010
<u>Kawachi S</u> , Luong ST, Shigematsu M, Furuya H, Phung TT, Phan PH, <u>Nunoi H</u> , Nguyen LT, <u>Suzuki K</u> .	Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome and avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children.	J Infect Dis.	200	510-515	2009
Mohammad Hasan Zaki, Shigemoto Fujii, Tatsuya Okamoto, Sabrina Islam, Shahzada Khan, Khandaker A. Ahmed, Tomohiro Sawa, <u>Takaaki Akaike</u> .	Cytoprotective function of heme oxygenase-1 induced by a nitrated cyclic nucleotide formed during murine salmonellosis.	J Immunol	182	3746-3756	2009
<u>Nakayama T</u> , and Yamashita, M.	Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory.	Semin. Immunol.	21(2)	78-83	2009
Kazuyoshi Kaneko, Teruo Akuta, Tomohiro Sawa, Ha Won Kim, Shigemoto Fujii, Tatsuya Okamoto, Hitoshi Nakayama, Hajime Ohigashi, Akira Murakami, <u>Takaaki Akaike</u> .	Mutagenicity of 8-nitroguanosine, a product of nitrative nucleoside modification by reactive nitrogen oxides, in mammalian cells.	Cancer Lett	262	239-247	2008
Nguyen Thanh Liem, <u>Noriko Nakajima</u> , Le Phuc Phat, Yuko Sato, Hoang Ngoc Thach, Pham Viet Hung, Luong Thi San, Harutaka Katano, <u>Toshio Kumasaka</u> , Teruaki Oka, <u>Shoji Kawachi</u> , Takeji Matsushita, Tetsutaro Sata Koichiro Kudo, <u>Kazuo Suzuki</u> .	H5N1-infected cells in lung with diffuse alveolar damage in exudative phase from a fatal case in Vietnam.	Jpn J Infect Dis	61(2)	157-160	2008
鈴木和男、河内正治	はじめに。特集「ARDS とインフルエンザ (H5N1) 」	医学のあゆみ	224(11)	813-814	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) 」	医学のあゆみ	224(11)	815-816	2008
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』—特集「ARDS とインフルエンザ (H5N1) 」—	医学のあゆみ	224(11)	820-825	2008

鈴木和男	『インフルエンザによる呼吸器不全に関与する Peroxidase ファミリー』－特集「ARDS とインフルエンザ－呼吸器不全の病態と発症機構－」－	医学のあゆみ	224(11)		2008
安田英典、鈴木和男	『インフルエンザの拡大シミュレーション』－特集「ARDS とインフルエンザ－呼吸器不全の病態と発症機構－」－	医学のあゆみ	224(11)		2008
長谷川明洋、中山俊昭	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
川上和義	ALI/ARDS と自然免疫リンパ球	医学のあゆみ	224(11)	845-849	2008
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	224(11)	838-839	2008
荒谷康昭	『好中球機能異常による呼吸器不全－ミエロペルオキシダーゼ欠損を中心に－』－特集「ARDS とインフルエンザ (H5N1)」－	医学のあゆみ	224(11)	861-862	2008
Nakayama, T., and Yamashita, M.	Initiation and maintenance of Th2 cell identity. Truncated title: Regulation of Th2 responses.	Curr. Opin. Immunol	20	265-271	2008
Hidenori Yasuda, Nobuaki Yoshizawa, Mikio Kimura, Mika Shigematsu, Masaaki Matsumoto, 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	85	619-635	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
Tomokazu Nagao, Mimiko Matsumura, Ayako Mabuchi, Akiko Ishida-Okawara, Osamu Koshio, Toshinori Nakayama, Haruyuki Minamitani, and Kazuo Suzuki	Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody.	Nephrol. Dialysis Transplant	22	77-87	2007
Kaneko T, Hosokawa H, Yamashita M, Wang CR, Hasegawa A, Kimura YM, 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., Kimura, Y. M., Shinoda, K., Endo, Y., Hasegawa, A., Yamashita, M., and Nakayama, T.	Schurri-2 regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness.	Int. Immunol.	19(6)	755-762	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
川上和義	呼吸器感染症と粘膜免疫	医学のあゆみ	221(11)	891-896	2007
Tomohiro Sawa, Mohammad Hasan Zaki, Tatsuya Okamoto, Teruo Akuta, Yoshiko Tokutomi, Shokei Kim-Mitsuyama, Hideshi Ihara, Akira Kobayashi, Masayuki Yamamoto, Shigemoto Fujii, Hirokazu Arimoto, Takaaki Akaike	Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate	Nature Chem Biol	3	727-735	2007