

MPO)の上昇が認められ発表できた (Phung *et al.*, J Infect 2011; **62**: 104-108)。また、本研究は、ハノイ国立小児病院研究者により第14回国際免疫学会(京都)にて口頭発表し、医学系メディアにもとりあげられるなど前進した。

2) H1N1 感染により誘導される劇症型肺炎モデルを使った治療薬の検討: 高病原性 H5N1 トリインフルエンザ感染患者の病態解析の成績と H1N1(PR-8)感染によって誘導した劇症型肺炎モデルマウスの病態が酷似しており、その病態初期の肺腔には、ケモカイン KC, MIP-2, MCP-1 の上昇が認められ、MPO 欠損マウスでは PR-8 の増殖抑制と病態の軽減が認められた(投稿中)。

3) 劇症型肺炎 FARDS の抑制効果を示した新構造マクロライド物質

新規構造のマクロライドの投与により延命効果や炎症抑制から、治療薬候補が挙げられた。すなわち、1056 種類のマクロライドライブラリーから MPO 放出阻害効果を示す複数のマクロライドを見出し PR-8 感染マウスでの肺組織ではウイルスの核酸量および延命効果が認められた。

以上から、H5N1 インフルエンザによって感染誘導される劇症型肺炎の誘導因子が推定され、治療薬候補を検索に H1N1 インフルエンザ感染誘導による劇症型肺炎モデルの有効性が確認できた。

F. 研究発表

論文発表

- 1) S. Kawachi, T. Matsushita, T. Sato, H. Nunoi, H. Noguchi, S. Ota, N. Kanemoto, K. Nakatani, T. Nishiguchi, A. Yuge, H. Imamura, H. Kitajima, K. Narahara, **K. Suzuki**, T. Miyoshi-Akiyama, T. Kirikae. Multicenter prospective evaluation of a novel rapid immunochromatographic

diagnostic kit specifically detecting influenza A H1N1 2009 virus. J Clin Virol 2011; in press.

- 2) T. Aoyagi, N. Yamamoto, M. Hatta, D. Tanno, A. Miyazato, K. Ishii, **K. Suzuki**, T. Nakayama, M. Taniguchi, H. Kunishima, Y. Hirakata, M. Kaku, K. Kawakami. Activation of pulmonary invariant NKT cells lead to exacerbation of acute lung injury caused by lipopolysaccharide through local production of IFN- γ and TNF- α by Gr-1+ monocytes. Int Immunol. 2011; **23**:97-108.
- 3) T.T.B. Phung, S.T. Luong, S. Kawachi, H. Nunoi, L.T. Nguyen, T. Nakayama, **K. Suzuki**. Key Factor Cytokines and Myeloperoxidase (MPO) in Vietnamese Children with Acute Respiratory Distress Syndrome and Induced Avian Influenza (H5N1) Infection. J Infect 2011; **62**: 104-108
- 4) Igari H, Segawa S, Watanabe A, Suzuki A, Watanabe M, Sakurai T, Kuroda F, Watanabe M, Tatsumi K, Nakayama M, Nakayama T, **Suzuki K**, Sato T. Immunogenicity of a Monovalent Pandemic Influenza AH1N1 Vaccine in Healthcare Workers. Microbiol Immunol 2010; **54**: 618-624
- 5) 高尾信一、原 三千丸、岡崎富男、鈴木和男: ヒト呼吸器系ウイルスの検出における呼吸器系ウイルス多項目同時解析アッセイ (Luminex xTAG Respiratory Viral Panel FAST Assay)

TV、新聞、メディア

「新型インフルエンザ簡易検出キット」共同開発の「新型インフルエンザ簡易検出キット」が科学技術政策担当大臣賞(産学官

連携功労者表彰)獲得：国立国際医療研究センター、株式会社ミズホメディィー、千葉大医学部附属病院、宮崎大学病院、及び千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学鈴木和男教授が共同で開発した新型インフルエンザ簡易検出キットに対し6月、科学技術政策担当大臣賞が贈られた。

2010年10月14日 第14回国際学会記事欄「～H5N1インフルエンザ感染小児～サイトカイン産生やMPO活性上昇が致死のARDS増加に寄与する可能性」に掲載された「Medical Tribune」43巻41号13ページ

学会発表

【国内学会】

- 1) Role of neutrophils and MPO in lung injury induced by influenza A/H1N1 (PR-8) in mice. KMC フロンティアセミナー 2010年5月19日、東京
- 2) 感染症誘発の肺障害にかわるサイトカイン・ケモカインの網羅的解析 感染研・村山セミナー2010年5月24日、東京
- 3) 鈴木和男 ベトナムでのインフルエンザH5N1の病態と劇症化の病因解析 NBCセミナー、2010年6月1日、東京
- 4) Yasuhiro Maehara, Shoji Kawachi, Tomokazu Naga, Yasuaki Aratani, Masamichi Oshima, Kazuo Suzuki. Contribution of cytokines/chemokines to ventilator-induced lung injury associated with myeloperoxidase in mice. 日本麻酔科学会、The 13th Asia Australasian Congress of Anesthesiologists.2010年6月1-5日、福岡
- 5) 高尾 信一、原 三千丸、岡崎 富男、鈴木 和男 呼吸器系ウイルス多項目同時

解析アッセイ (LuminexTAG Respiratory Viral Panel FAST) の有用性の検討 第59回日本感染症学会東日本地方会、2010年10月21-22日、東京

- 6) 菅又龍一、長尾朋和、土橋英紀、山本紀一、富澤一夫、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、小林和夫、河内正治、中山俊憲、鈴木和男 インフルエンザによる劇症呼吸障害の発症メカニズムの解明 第21回日本生体防御学会、2010年7月21-23日、仙台
- 7) Thuy T.B. Phung, San T. Luong, Shoji Kawachi, Hiroyuki Nunoi, Liem T. Nguyen, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Key cytokines/chemokines in acute respiratory distress syndrome with avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. 第21回日本生体防御学会、2010年7月21-23日、仙台
- 8) 鈴木和男 インフルエンザなど呼吸器系ウイルスの多項目を同時解析できる xTAG RVP法の有用性(教育セミナー) 第58日本ウイルス学会、2010年11月8日、徳島
- 9) 鈴木 和男 ミニレクチャーI「ベトナムにおける川崎病」第16回MPO研究会、2011年1月28-29日、仙台
- 10) 菅又 龍一、鈴木和男 インフルエンザ誘導性の劇症肺炎において肺傷害に関わるMPO機能の解析とMPO放出阻害活性をもつマクロライドを用いたインフルエンザ新規治療薬の探索 第16回MPO研究会、2011年1月28-29日、仙台
- 11) 志賀 由佳、鈴木和男 VILI modelによる劇症型ARDS誘発機構の解析：NKTの関与 第16回MPO研究会、2011年1月28-29日、仙台

【国際学会】

- 1) Hidenori Yasuda, Nobuaki Yoshizawa, Masaaki Matsumoto, Shoji Kawachi, Kazuo Suzuki. Transmission of Pandemic H1N1 Influenza in Japan in 2009: Simulated Measures and Post-Analysis. Applied Mathematics International Conference 2010 (AMIC2010) & The 6th EASIAM Conference June 22-24, 2010, PNB Darby Park, Malaysia
 - 2) Kazuo Suzuki. Host defense against Influenza (H5N1 and H1N1) infection. August 23-27, 2010, 14th International Congress of Immunology, Kobe
 - 3) Yuka Shiga, Kazuo Tomizawa, Tomokazu Nagao, Ryuichi Sugamata, Shoji Kawachi, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Risk cytokines/chemokines in the early phase of diffuse alveolar damage (DAD) of the ventilator induced lung injury (VILI) in mice. August 23-27, 2010, 14th International Congress of Immunology, Kobe
 - 4) Ryuichi Sugamata, Tomokazu Nagao, Hideki Dobashi, Ki-ichi Yamamoto, Kazuo Tomizawa, Noriko Nakajima, Yuko Sato, Yasuaki Aratani, Jun Zou, Reiko Todaka, Masamichi Oshima, Sata Tetsutaro, Kazuo Kobayashi, Shoji Kawachi, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Investigation of pathogenic mechanism of influenza pneumonia and therapeutic approach involved in MPO function with novel macrolides. August 23-27, 2010, 14th International Congress of Immunology, Kobe
 - 5) Thuy T.B. Phung, San T. Luong, Shoji Kawachi, Hiroyuki Nunoi, Liem T. Nguyen, Toshinori Nakayama, Kazuo Suzuki. Key cytokines/chemokines in acute respiratory distress syndrome with avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. August 23-27, 2010, 14th International Congress of Immunology, Kobe
 - 6) R. Sugamata, K. Suzuki. The contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. Seminar in NIAID, December 20, 2010, NIH-NIAID, Bethesda, USA.
 - 7) R. Sugamata, K. Suzuki. Discussion in infectious diseases and vasculitis. VCRC meeting in Boston University Medical School, December 22, 2010, Boston, USA.
 - 8) R. Sugamata, K. Suzuki. The contribution role of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. Seminar in NICHD, December 23, 2010, NIH-NICHD, Bethesda, USA.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 1) 特許取得
特になし
 - 2) 実用新案登録
特になし
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 特になし

インフルエンザウイルス感染に対する宿主側抵抗性因子と その誘導発現系による解析

研究分担者 大島正道 国立感染症研究所 室長

研究要旨：

外部からのウイルス感染に対して宿主側ではインターフェロン、MxA, OAS, Fas など感染防御に働く宿主遺伝子が誘導され感染に対抗する。一方インフルエンザウイルスはウイルス蛋白 NS1 を発現し宿主の抵抗因子発現を抑制し細胞を自らの複製の場に改変する。気管支系の細胞株 NCI-H292 はこの戦いに勝ちインフルエンザウイルスを排除できるが肺胞系の細胞株 A549 は排除できず死滅する。ジーンチップによる解析の結果インフルエンザウイルス感受性の A549 細胞ではウイルス感染誘導遺伝子(VSG)の発現は抵抗性の NCI-H292 細胞に比べて抑制されている。細胞のウイルス抵抗性因子の誘導発現の相違が一次防御における結果の相違をもたらしていることが示唆される。VSG の誘導発現の系を作製してこのメカニズムを解析している。

ウイルス感受性 A549 細胞にインフルエンザウイルスを感染すると一部に死滅を免れる細胞を見いだした。その細胞をクローン化してウイルス感染の抵抗性メカニズムを解析している。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは人に呼吸器系感染を起こす。生体の防御機構として IFN 系ならびに TLR 系の自然免疫機構が備わりインフルエンザウイルスを始め種々の感染に抵抗している。従って病原体が最初に接するこの気管支細胞および肺胞上皮細胞は一次防御の点で重要な位置を占めている。また呼吸器系の細胞でも気管支系の細胞と肺胞系の細胞ではウイルスに対する感受性が大きく異なっている。細胞のウイルス感染抵抗性因子をさらに解析し H5N1 インフルエンザウイルスがサイトカインストームを通して ARDS を起こすメカニズムを解明し

治療法の開発につなげる。

B. 研究方法

これまでに A549 と NCI-H292 でウイルス感染誘導遺伝子の発現に数倍の差異が見られている遺伝子(VSG)が多数認められている。これらウイルス抵抗性遺伝子は多くの場合細胞に対して有害で構成的に発現させることが困難である。従って誘導的にその遺伝子を発現させる系を作製した。昆虫細胞由来の誘導的転写システム (RheoSwitch (NEB)) を用いた。

RheoSwitch Mammalian Inducible Expression System (NEB) のレセプターアクチベータープラスミド pNEBR-R1 を改変しレセプター発現プラスミド pR^{puro} (図 1)、およびアクチベーター発現プラスミド pA^{bsr} (図 1)

を作成した。同様にpNEBR-X1の誘導系の下流にIRES-glucを挿入し誘導によってルシフェラーゼ活性が測定できるようにした。そのX1誘導系全体をEF1プロモーターによるneomycin耐性遺伝子発現システムのプロモーター領域と遺伝子領域の間に逆方向に挿入した誘導遺伝子発現システムpECI^{neo} systemを作成した。さらにインターフェロン誘導遺伝子(VSG)をMCS内にサブクローンして対象とする遺伝子の誘導発現系を作成した。(図1) VSGとしてIFI44, MxA, PKR, G1P2, TNFSF10, UBE2L6を用いた。作成したプラスミドベクターpA^{bsr}, pR^{puro}をMDCK細胞、A549細胞、NCI-H292細胞に遺伝子導入しblastidine, puromycin耐性クローンを選択した。得られたクローンに対しECIベクターにより作成したVSG誘導発現システムを遺伝子導入し陽性クローンを得、誘導をgluc活性で確認した。

<誘導遺伝子導入細胞での発現誘導>

発現誘導の誘導薬剤(RSL1)に細胞毒性がわずかに認められたため閾値を検討し細胞障害性がなく十分な誘導が得られる濃度範囲を選択して実施した。(図2)

<ウイルスのチャレンジ>得られた細胞クローン細胞株にウイルス(インフルエンザウイルスPR8株、Udorn/72株、H5N1(ベトナム株、インドネシア株)(未定))をチャレンジしウイルス抵抗性の有無を解析する。

C. 研究結果

RheoSwitch SystemのActivatorおよびReceptorプラスミドpA^{bsr}, pR^{puro}をA549, NCI-H292, huh7-it及びMDCK細胞に遺伝子導入しblastidine(bsr), puromycine(pur)を選択マーカーとして薬剤選択しNCI-H292-AR細胞、A549-AR細胞及びMDCK-AR細胞を作成した。

MDCK-AR細胞にVSGとしてMxA, PKR, IFI44, UBE2L6, NT5C3, G1P2を遺伝子導入しRheoSwitch Systemによる誘導発現細胞(MDCK-AR-MxA, MDCK-AR-PKR, MDCK-AR-IFI44, MDCK-AR-UBE2L6, MDCK-AR-NT5C3, MDC

K-AR-G1P2)を作製した。Realtime PCRにより目的とした遺伝子が誘導されることを確認した。

耐性遺伝子を組み込んだ遺伝子導入MDCK-AR-VSG細胞に耐性遺伝子誘導あるいは非誘導の条件でインフルエンザウイルスUdorn株をチャレンジした。ウイルス感染後時間を追って培養上清中に放出されるウイルス感染価をplaque assayにより測定した。(RSL1による誘導は細胞毒性が無視でき、遺伝子誘導が認められる濃度で行った。)耐性遺伝子の誘導、非誘導によるウイルス産生量の相違、あるいはウイルス産生の遅れは認めなかった。MxAの誘導細胞においてMxAの発現を蛍光抗体法により確認した。ウイルスチャレンジによりウイルスが感染した細胞ではMxAの発現量が非感染細胞と比べて低かった。(図3)

A549細胞にトリプシン存在下でインフルエンザウイルスを感染させ生き残った細胞クローン(A549-3S)を得た。その細胞クローンにMOI=1でインフルエンザウイルスをチャレンジした。蛍光抗体によるウイルスタンパクの発現はA549-3Sでは著しく低く、ウイルスの複製が障害されていることが示唆された。また時系列的に採取した培養上清中のウイルス量をreal-time PCRで測定した。ウイルス量はA549細胞の1/1000レベルであった。(図4)

D. 考案

MDCK, A549, NCI-H292細胞は共にインフルエンザウイルス許容細胞である。しかし今回誘導実験の対象に用いたMDCK細胞はベースとなるウイルス産生レベルがA549, H292に比べて非常に高いため個々の耐性遺伝子の影響が十分に大きくない場合単独では違いが明らかに示せない可能性が考えられる。今後直接A549細胞に抵抗性遺伝子を導入し検討する、また単独ではなく複数の抵抗性遺伝子を同時に誘導発現させ検討する予定である。ウイルス感染に著しく抵抗性を示すA549-3S細胞の解析がウイルス抵抗性メカニズムの解明につながる可能性が考えられる。

E. 結論

- ①宿主抵抗性遺伝子を誘導発現できる培養細胞系をMDCK, A549, NCI-H292細胞で作成した。
- ②インフルエンザ高感受性のMDCK細胞はウイルス抵抗性遺伝子(VSG)候補として上がった遺伝子(MxA,PKR,IFI44,G1P2, UBE2 L6,NT5C3,TNFSF10)単独ではウイルス産生に影響をあたえなかった。
- ③MxA誘導発現細胞において誘導時にMxA発現が強く見られる細胞ではウイルス感染は見られず逆にMxAの発現が弱い細胞にのみウイルスは感染した。MxA蛋白のウイルス抵抗性が示唆された。
- ④インフルエンザUdorn株に著しい抵抗性を示した細胞株A549-3Sによりウイルス抵抗性メカニズムの解明につながる可能性が示唆された。

健康危険情報

F. 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hori J, Taniguchi H, Wang M, Oshima M, Azuma M GITR ligand-mediated local expansion of regulatory T cells contributes to immune privilege of corneal allografts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Dec;51(12):6556-65. 2010
- 2) Lijuan Yu, Chie Aoki, Yohko Shimizu, Kazufumi Shimizu, Wei Hou, Fumihiko Yagy, Xianzi Wen, Masamichi Oshima, Aikichi Iwamoto, Bin Gao, Wenjun Liu, George Fu Gao, Yoshihiro Kitamura. Development of a simple system for screening anti-hepatitis C virus drugs utilizing mutants capable of vigorous replication. *Journal of Virological Methods*. Nov;169(2):380-4. 2010
- 3) Tomizawa K, Nagao T, Kusunoki R, Saiga

K, Oshima M, Kobayashi K, Nakayama T, Tanokura M, Suzuki K. Reduction of MPO-ANCA epitopes in SCG/Kj mice by 15-deoxyspergualin treatment restricted by IgG2b associated with crescentic glomerulonephritis. *Rheumatology* (Oxford) 2010 Jul;49(7):1245-56

- 4) Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Kawachi S, Oshima M, Yamamoto K, Suzuki K. 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 Jul ; 85(4):619-35
 - 5) YK. Shimizu, M. Hijikata, M. Oshima, K. Shimizu, and H. Yoshikura. Detection of 5' side subgenome of hepatitis C virus terminating at nucleotide 384 in patients' plasma and liver tissues *J Viral Hepati*. 2006,13, 746-755
 - 6) Rulli SJ Jr, Muriaux D, Nagashima K, Mirro J, Oshima M, Baumann JG, Rein A. Mutant murine leukemia virus Gag proteins lacking proline at the N-terminus of the capsid domain block infectivity in virions containing wild-type Gag. *Virology*. 2006 Apr 10;347(2):364-71.
- ### 2. 学会発表
- 1) 青木千恵、清水洋子、清水一史、大島正道、岩本愛吉、北村義浩. Interferon-Induced Protein 44 (IF44)に関する研究 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月
 - 2) シュ軍、前原康宏、長尾朋和、戸高玲子、大島正道、小林和夫、志賀由佳、

河内正治、中山俊憲.ARDS 病態モデルの肺組織変化に連動するサイトカインストームの意義・the pathological findings of lung involved in cytokine storm from an animal model of ARDS.2008年12月日本免疫学会総会

- 3) Tomizawa Kazuo, Nagao Tomokazu, Oshima Masamichi, Kobayashi Kazuo, Suzuki Kazuo MPO-ANCA specific IgG2b subclass decrease by treatment with 15-Deoxyspergualin in SCG/Kj mice:2008年12月日本免疫学会総会
- 4) 前原康宏、河内正治、鈴木和男、長尾朋和、戸高玲子、大島正道 Ventilatorinduced Lung injuryモデルマウス作製の試み.日本麻酔科学会55回学術総会2008/6/12-14
- 5) Tomizawa,K.,Nagao,T.,Saiga,K.,Oshima,M.,Kobayashi,K.,Nakayama,T.,Suzuki,K. PO-ANCA related vasculitis model SCG/Kjmouse. 2007年11月日本免疫学会総会
- 6) 田村彰教、清水洋子、下平義隆、大島正道、森山光彦、清水一史.C型肝炎ウイルス感染に対する宿主細胞応答の解析.第55回ウイルス学会2007年10月
- 7) 堀純子、王明聡、谷口ヒロ子、北原由紀、高橋 浩（日本医大眼科）大島正道（国立感染研免疫）、坂口志文（京大再生研生体機能調節）、東みゆき（東京医歯大分子免疫）.前眼部の抗原特異的免疫応答におけるGITR—GITRL経路の役割.第111回日本眼科学会総会、大阪、2007,4,22
- 8) 谷口ヒロ子、堀純子、王明聡、北原由紀、高橋 浩（日本医大眼科）、大島正

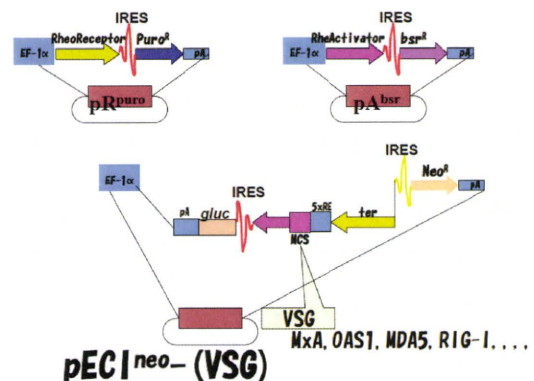
道（国立感染研免疫）、八木田秀雄（順天堂免疫）.前眼部の抗原特異的免疫応答におけるB7-H3の役割.第111回日本眼科学会総会、大阪、2007,4,22

- 9) 堀純子、王明聡、谷口ヒロ子、北原由紀、高橋浩、（日本医大眼科）大島正道（国立感染研免疫）、東みゆき（東京医歯大分子免疫）.角膜移植におけるGlucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligandと制御性T細胞の役割.第23回角膜移植学会、宮崎、2007,2,9
- 10) 光木裕也、大島正道、山本拓也、高木弘隆、森川茂、山岡昇司、永井美之、大西和夫、横田恭子.SARS-Co Spikeに対する中和抗体のエスケープ変異ウイルスの端離と感染防御に重要な抗体エピトープの同定.第54回日本ウイルス学会 2006年、名古屋

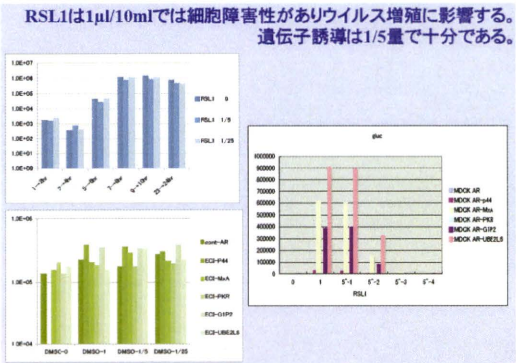
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当しない
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

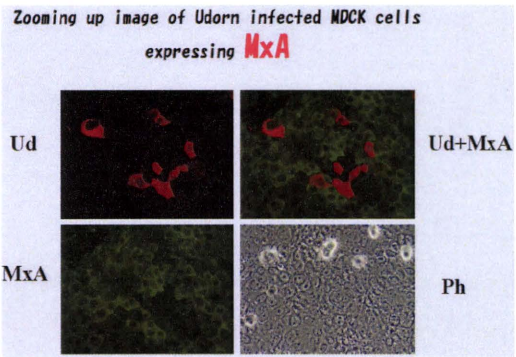
(図1)



(図 2)

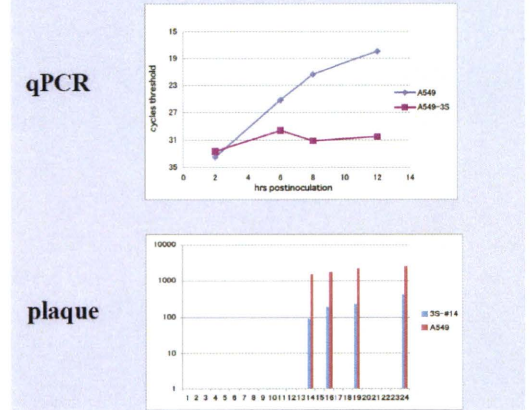


(図 3)



(図 4)

Virus production on A549 or A549-3S cells



FARDS マウスモデルを用いた発症病態の解析と治療薬の開発

研究分担者：川上 和義（東北大学大学院医学系研究科 教授）

研究要旨

これまでに我々は、Natural Killer (NK) T細胞の活性化剤である α -galactosylceramide を気管内に前投与したマウスに LPS を投与することで、急性呼吸窮迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS) に特徴的な病理所見である Diffuse Alveolar Damage (DAD) を呈するモデルマウスを作成することに成功した。本研究では、このモデルを用いることで、シベレスタットナトリウム、ガンマグロブリン製剤、マクロライド薬 (クラリスロマイシン、新規エリスロマイシン誘導体) についてその治療効果を検証したが、致死性 ARDS に対する治療効果を示すことができなかった。今後は、投与条件などさらに検討する必要があると考えられた。一方、インフルエンザウイルス誘発 ARDS の病態により近いモデルを作製する目的で、LPS の代わりにインフルエンザウイルス A/H1N1 あるいは TLR7 リガンドを投与したところ ARDS を発症することがなかったことから、I 型インターフェロンに着目しその治療効果について解析を行った。上記 ARDS モデルマウスにヒト IFN- α /D を投与したところ、生存期間の延長、肺における DAD の改善、湿乾肺重量比の低下、肺内 IFN- γ 産生の低下が観察された。これらの結果から、I 型インターフェロンが抗ウイルス作用に加え、抗炎症作用によって高病原性鳥インフルエンザウイルス感染にともなう劇症型 ARDS の治療薬の候補になりうると考えられた。今後さらに詳細な検討が必要である。

A. 研究目的

ARDS は肺の炎症と血管透過性の亢進を特徴とし、肺におけるガス交換の障害を呈する疾患で、致死率も高く、有効な治療も限られている。鳥インフルエンザ (H5N1) ウイルス感染症では、ARDS を合併し死亡率が高いことが知られている。また、H5N1 インフルエンザウイルス感染症では、ヒト血清中の interferon (IFN) - γ 、tumor necrosis factor (TNF) - α 、interleukin (IL) -6 などの炎症性サイトカインの上昇が知られている。また、種々の原因による早期 ARDS 患者の気管支肺泡洗浄液 (BALF) 中で、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 の上昇を

認めると報告されており、これらの炎症性サイトカインが ARDS の発症機序において重要な因子であると考えられてきた。

ARDS の発症機序を解明し、より効果的な治療法を得るためには、よりヒトの病態に近い実験動物モデルの確立が望まれる。ヒトの ARDS では急性発症の呼吸不全を呈し、病理組織学的に肺胞の好中球浸潤、間質・肺胞内における凝固・繊維素の沈着、基底膜の露出を伴った肺胞上皮の傷害 (Diffuse Alveolar Damage: DAD) を認める。これまで、ARDS の動物モデルは、LPS を全身あるいは気管内に投与したものが多く用いられてきた。LPS 投与による直接的

肺傷害では、肺内で大量の炎症細胞の浸潤を認めるが、この変化は48時間程度しか持続せず、肺胞上皮の傷害や血漿成分の滲出もわずかししか確認できない。このように、ARDSの発症・増悪機序を理解するためには、より有用な動物モデルを確立することが重要と考えられる。

これまでに我々は、臨床的にもARDSを発症して重篤化することで知られている肺炎球菌性肺炎のマウスモデルを確立し、その病態におけるNatural Killer T (NKT)細胞の役割に関して解析を行ってきた。NKT細胞は、自然免疫の時期に機能するリンパ球で、細胞表面にT細胞抗原受容体とNK細胞マーカーを発現しているT細胞の総称である。これらの細胞は、樹状細胞上のCD1dに結合した α -galactosylceramide (α -GalCer)などの糖脂質抗原を認識し、速やかにIFN- γ やIL-4を産生することで強力な免疫調節作用を発揮する。

我々は、これまでに、NKT細胞の活性化剤である α -GalCerを気管内に投与することで感作したマウスにLPSを気管内投与することで、ARDSに特徴的な病理所見であるDADを呈する動物モデルを作成することに成功した(Aoyagi et al. *Int. Immunol.* 23: 97-108, 2011)。そこで、本研究では、この動物モデルを用いることで、シベスタットナトリウム、ガンマグロブリン製剤の高用量投与、マクロライド薬など種々の薬剤についてARDSに対する治療効果の有無を検討した。さらに、インフルエンザウイルス誘発ARDSの病態により近いモデルを作製するために、LPSの代わりにインフルエンザウイルスA/H1N1 (PR8株)や、免疫系によるインフルエンザウイルスの認識に関与することが知られているTLR7 (Diebold et al. *Science* 303: 1529-1531, 2004)の合成リガンドであるR848を用いることでARDS発症への影響についても解析を行った。

B. 研究方法

1) FARDSモデルマウスの作成 C57BL/6マウス(6~8週齢、オス)に、 α -GalCer (1 μ g/マウス)または対照としてPBSを気管内に投与し、24時間後にLPS (50 μ g/マウス)を再度気管内投与した。実験によっては、LPSの代わりにTLR7のリガンドであるR848 (20 μ g/マウス)またはインフルエンザウイルスA/H1N1 (PR8株) (21pfu/マウス)を投与した。

2) 病理組織学的検討 肺摘出後10%ホルマリンで固定し、脱水した後パラフィンで封埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

3) サイトカイン測定 気管支肺胞洗浄液(BALF)または肺ホモジネート液中のIFN- γ 、IFN- α 濃度をELISAにて測定した。

4) シベスタットナトリウムの投与 ARDSマウスに、シベスタットナトリウム(50mg/kg)をLPS投与の1日前から2日後まで連日腹腔内に投与し、生存期間への影響について検討した。

5) 高用量ガンマグロブリンの投与 ARDSマウスに、ヒトガンマグロブリン製剤(2g/kg)をLPS投与の1日前から1日後まで連日腹腔内に投与し、生存期間への影響について検討した。

6) マクロライド薬の投与 ARDSマウスに、種々の濃度のクラリスロマイシンまたは新規マクロライド薬(EM900)をLPS投与の1日前から1日後まで連日腹腔または気管内に投与し、生存期間への影響について検討した。

7) I型インターフェロンの投与 ARDSマウスに、各種用量のヒトインターフェロン α (huIFN α /D)をLPS投与の12時間前から5日後まで連日経鼻投与し、生存期間、湿乾肺重量比、BALF及び肺ホモジネート中のIFN- γ 濃度への影響について検討した。

8) 統計学的解析 得られたデータはStat

View II software (Abacus Concept, Inc, Berkeley, CA, USA) を用いて解析された。データは平均 (mean) ± 標準偏差 (SD) で表している。各群の統計学的解析は ANOVA で多重比較検定を行った (Fisher PLSD test)。生存曲線は Wilcoxon test で解析した。P<0.05 をもって有意差ありとした。

9) 倫理面への配慮 すべての実験は、東北大学の動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) ARDS マウスモデルにおけるシベレスタットナトリウムの治療効果 ARDS の新たな治療法を探索するために、我々が開発したモデルマウスを用いることで、シベレスタットナトリウムの治療効果について検討を行った。最初の実験では、シベレスタットナトリウム (50mg/kg) の連日腹腔内投与により ARDS モデルマウスの生存期間が著明ではないものの有意に延長されたが、その後の検討では再現性が得られなかった。

2) ARDS マウスモデルにおける高用量ガンマグロブリンの治療効果 FARDS モデルマウスに高用量ガンマグロブリン (2g/kg) を連日腹腔内に投与したが、生存期間の延長は観察されなかった。

3) ARDS マウスモデルにおけるマクロライド薬の治療効果 FARDS モデルマウスにクラリスロマイシン及び新規マクロライド薬 (EM900) を腹腔内または気管内に投与したが、生存期間の有意な延長は観察されなかった。

4) インフルエンザウイルスまたは TLR7 リガンドを用いた ARDS モデルマウスの作製 インフルエンザウイルスで誘発される ARDS の病態により近いモデルを作製するために、 α -GalCer を前投与したマウスに、LPS の代わりに、免疫系によるインフルエンザウイルスの認識に関与することが報告されている TLR7 のリガンドである R848

を気管内に投与した。 α -GalCer を前投与することにより、R848 のみを投与した場合に比べて肺内での IFN- γ 産生が有意に増加した。しかし、 α -GalCer 前投与マウスに LPS を投与した場合 (LPS 誘発 ARDS モデル) に比べ IFN- γ 産生は 1/4 程度であり、病理学的解析では LPS モデルでみられた DAD は観察されなかった。

次に、R848 の代わりに、インフルエンザウイルス A/H1N1 (PR8 株) そのものを気管内に投与したが、LPS 誘発 ARDS モデルでみられるような早期致死や肺病理像での DAD にまでは至らなかった。

これらの結果から、A/H1N1 感染や TLR7 リガンド投与では、TLR4 リガンドである LPS 投与と異なり、何らかの抗炎症物質が産生されサイトカインストームや過剰な炎症反応に至らない可能性が推定される。A/H1N1 感染から、我々は I 型インターフェロンの関与について検討することにした。

5) 肺内 IFN- α 産生 この仮説について検討するために、 α -GalCer を前投与したマウスに LPS または A/H1N1 を投与した際の BALF、肺ホモジネート中の IFN- α 濃度を測定したところ、 α -GalCer / A/H1N1 投与マウスでは IFN- α 産生が検出されたのにもかかわらず、 α -GalCer/LPS 投与群ではその産生がほとんど検出されなかった。これらの結果から、LPS と異なり A/H1N1 では I 型インターフェロンが産生されることが LPS モデルでみられた激しい肺の炎症がみられないことと関係するのではないかとの仮説を考えた。

6) ARDS マウスモデルにおける I 型インターフェロンの治療効果 この仮説を検証するために、 α -GalCer 前投与マウスに LPS を投与することで誘導される ARDS へのヒト IFN- α A/D または IFN- β 投与の影響について検討を行った。生存期間への影響では、高用量の IFN- α A/D あるいは IFN- β 投与ではコントロールと比べて有意差はみられな

かったものの、100U のような低容量の IFN- α /D を投与したマウスでは生存期間が有意に延長した。

LPS 投与 3 日後の肺は、コントロール群では著明な浮腫、炎症性変化とともに血性胸水が認められたのに対して、低容量の IFN- α /D を投与したマウスでは血性胸水はみられず、炎症性変化の明らかな減弱が観察された。病理学的解析では、コントロール群で肺に著明な DAD 像が観察されたのに対して、低容量の IFN- α /D を投与したマウスでは DAD 像はみられず、炎症性変化の明らかな減弱が認められた。この結果に一致して、肺の湿乾重量比及び肺内での IFN- γ 産生は、コントロールマウスに比べ低容量の IFN- α /D を投与したマウスにおいて著明な低下が観察された。

D. 考案

高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 感染症では急速に進行する激的な ARDS (Fulminant ARDS: FARDS) により死に至る症例が少なくないことが、本研究グループのベトナムでの研究において明らかにされた (Kawachi S et al. *J. Infect. Dis.* 200; 510-515, 2009)。FARDS の病態は不明な点が多いが、肺内でのサイトカインストームが深く関係すると考えられている。したがって、治療には抗ウイルス薬による感染のコントロールに加えて過剰なサイトカイン産生を含めた免疫反応を制御することが重要になる。このような目的でステロイド薬が投与されるが、その治療効果はあまり期待できないと考えられている。わが国では ARDS に対してシベスタットナトリウムを用いることがあるが、H5N1 感染による FARDS への効果は明らかではない。また、本研究グループによるベトナムでの研究では、高用量ガンマグロブリン治療が試みられているが、今後のさらなる検証が必要と考えられる。このように、

H5N1 感染症にともなう FARDS の治療法はまだ十分に確立されているとはいえ、新たな治療薬も含めて、有効な治療法の開発が強く望まれている。

そこで本研究では、我々が開発した FARDS モデルマウスを用いて、いくつかの候補薬についてその治療効果を検証した。シベスタットナトリウム、ガンマグロブリン製剤の高用量投与、マクロライド薬については、実験によってはマウスの生存期間の有意な延長が認められる場合もあるが、いずれも再現性が示すことができず、投与条件も含めた今後の検討が必要と考えられた。

今回の研究では、H5N1 感染で誘発される ARDS の病態により近いモデルを作製するために、 α -GalCer を前投与したマウスに、LPS の代わりに、免疫系によるインフルエンザウイルスの認識に関与することが報告されている TLR7 のリガンド R848 を気管内に投与した。 α -GalCer を前投与することにより、R848 のみを投与した場合に比べて肺内での IFN- γ 産生が有意に増加したが、 α -GalCer 前投与マウスに LPS を投与した場合 (LPS 誘発 ARDS モデル) に比べ IFN- γ 産生は 1/4 程度であり、病理学的解析では LPS モデルでみられた DAD は観察されなかった。また、R848 の代わりに、A/H1N1 (PR8 株) そのものを気管内に投与したが、LPS 誘発 ARDS モデルでみられるような早期致死や肺病理像での DAD の進展にまでは至らなかった。これらの結果から、A/H1N1 感染や TLR7 リガンド投与では、TLR4 リガンドである LPS 投与と異なり、何らかの抗炎症物質が産生されサイトカインストームや過剰な炎症反応に至らない可能性が推定されたため、我々は I 型インターフェロンの関与について検討することにした。

この仮説を検証するために、 α -GalCer を前投与したマウスに LPS または A/H1N1

を投与した際の BALF、肺ホモジネート中の IFN- α 濃度を測定した。 α -GalCer/A/H1N1 投与マウスでは IFN- α 産生が検出されたにもかかわらず、 α -GalCer/LPS 投与群ではその産生がほとんど検出されなかったことから、LPS と異なり A/H1N1 では I 型インターフェロンが産生されることが LPS モデルでみられた DAD にまで進展しないことと関係するのではないかと考えられた。そこで、 α -GalCer/ LPS モデルマウスで誘導される ARDS への I 型インターフェロン投与の影響について検討を行ったところ、低容量 IFN- α A/D の投与により生存期間の有意な延長が観察されるとともに、肺におけるサイトカインの過剰産生や過剰な炎症応答が抑制され、病理学的解析では DAD にまで至ることはなかった。I 型インターフェロンの抗炎症作用については、他のモデル動物においても報告がみられ始めている (Durbin JE et al. *J. Immunol.* 164: 4220-4228, 2000; Cobelens PM et al. *Crit. Care* 14: R157, 2010)。

今回の研究成果から、H5N1 による FARDS の発症に I 型インターフェロンが深く関与する可能性が予測され、今後は実際の H5N1 感染者において FARDS の有無により I 型インターフェロン産生に違いがみられないかを検討する必要があると考えられる。さらには、このような症例に I 型インターフェロンを投与することで、その抗ウイルス活性に加え、抗炎症作用による FARDS の発症予防及び治療効果が期待できるかもしれない。

E. 結論

本研究では、我々が開発した致死性 FARDS モデルマウスを用いることで、いくつかの候補薬についてその治療効果を検証した。その中で、I 型インターフェロンがその抗ウイルス活性に加えて、抗炎症効果を示すことが明らかになり、H5N1 感染に

ともなう劇症型 ARDS の治療薬の候補になりうる可能性が考えられた。今後さらに詳細な解析を実施する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aoyagi T, Yamamoto N, Hattai M, Tanno D, Miyazato A, Ishii K, Suzuki K, Nakayama T, Taniguchi M, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M, Kawakami K: Activation of pulmonary invariant NKT cells leads to exacerbation of acute lung injury caused by LPS through local production of IFN- γ and TNF- α by Gr-1+ monocytes. *Int. Immunol.* 23: 97-108, 2011.

2. 学会発表

- 1) Aoyagi T, Yamamoto N, Tanno D, Kunishima H, Hirakata Y, Kitagawa M, Kaku M, Kawakami K: Role of Gr-1+ monocytes in the lethal acute lung injury caused by iNKT cell activation and LPS administration in mice. Workshop, 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August 2010.
- 2) 青柳哲史、山本夏男、宮里明子、八田益充、國島広之、北川美穂、平潟洋一、石井恵子、賀来満夫、川上和義: 致死性急性肺傷害モデルマウスの作成と発症・増悪機序の解析. 第21回日本生体防御学会学術総会, 仙台, 7月2010年.
- 3) 工藤大介他: NKT 細胞活性化が関与する劇症型 ARDS モデル動物の免疫病態解析と治療法開発の試み. シンポジウム, 第 16 回 MPO 研究会, 仙台, 1 月 2011 年.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

非炎症性マウス劇症肺炎モデルにおけるマクロファージの解析

研究分担者 山本健二
国立国際医療研究センター・研究所 副所長

研究要旨：

当分担研究は、本研究主任研究者である河内らの人工呼吸振動を利用した非炎症性マウス肺炎モデルにおける、マクロファージの解析を行う事を目的としている。特に非炎症性肺炎におけるケモカインやサイトカインの変化について検討し、好中球やリンパ球と異なるマクロファージの時間的挙動について、検討した。

A. 研究目的

本研究の目的は、非炎症性マウス劇症肺炎モデルにおけるマクロファージの挙動についての解析を行う事である。

これまでに、この肺炎モデルについてのサイトカインの変化については、主任研究者らの報告を得ている。そのため、本研究は、マクロファージやリンパ球などに存在するケモカインレセプターおよびケモカインの解析を行った。この解析に於いては、特にマクロファージのケモカインレセプターの非炎症性肺炎における健常時との差を検討することにより、ケモカインレセプターの役割を推定することを目的とした。

B. 研究方法

本研究方法は、これまでに我々が開発した方法で行う。すなわちわれわれは、特異的マクロファージに於けるケモカインレセプターの役割についての研究を行って来た。その方法は、注目している臓器に於けるマ

クロファージをマウス生体から分離し様々なケモカインレセプター発現量を計測し、同時に骨髄に於ける単球のケモカインレセプターにおける各々のケモカインレセプター量を比較検討する方法を用いる。これまでに我々は、マウスに於ける臓器特異的ケモカインレセプターを幾つか発見している。即ち、マウス腹腔マクロファージに於いてはケモカインレセプター8の変化が著しく、また破骨細胞に於いてはケモカインレセプター1および5が重要であることを発見し、その機能について解析している経緯がある。

そこで今回は肺胞マクロファージに於ける特異的マクロファージを検討し、更に非炎症性マウス劇症肺炎モデルにおけるマクロファージの挙動についての解析を行った。

C. 研究結果

今回、骨髄のマクロファージと刺激を加えていない定常時の肺胞マクロファージについて各々のケモカインレセプター量を測

定し比較検討を行った。

其の結果、これら両者に於いて殆ど変化がない事が判明した。

D. 考案

研究結果により、肺胞マクロファージについて、従来、我々のこれまでの研究により、腹腔マクロファージや破骨細胞と異なっていることが明らかと成った。即ち肺胞マクロファージのケモカインレセプターは、骨髄のマクロファージと同じで、特異的なケモカインレセプターは、存在しないことが判明した。

この結果で予想されることとしては、人工呼吸振動を利用した非炎症性マウス肺炎モデルにおける肺胞マクロファージは、何らかの特徴を有する特異的ケモカインレセプターが強く発現する事が期待される。このためモデルマウスの人工呼吸を利用した非炎症性肺炎マウスに於いて新たなケモカインレセプターが発見されるだろうと期待している。

E. 結論

本研究に於ける肺胞マクロファージが、ケモカインレセプターの発現が骨髄のマクロファージと殆ど変化内ことが確認された。この結果はこれまでの予想を覆すものであり、この結果こそが肺胞マクロファージの特徴と考えられる。今後非炎症性マウス肺炎モデルでの解析によって原因と結果を明らかにすることが可能であると確信している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Kato S, Itoh K, Yaoi T, Tozawa T, Yoshikawa Y, Yasui H, Kanamura N, Hoshino A, Manabe N, Yamamoto K, Fushiki S., Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain., *Nanotechnology*.2010 Aug 20; 21 (33): 335103.e-pub ahead of print; 2010 Jul 27.
- 2) Hoshino A, Iimura T, Ueha S, Hanada S, Maruoka Y, Mayahara M, Suzuki K, Imai T, Ito M, Manome Y, Kirino T, Yamaguchi A, Matsushima K, Yamamoto K. Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 2010 Sep 10; 285(37):28826-28837, e-pub ahead of print; June 22, 2010 as doi: 10.1074/jbc.M109.099424.
- 3) Osaki Y, Maehara Y, Sato M, Hoshino A, Yamamoto K, Nagao T, Suzuki K, Kawachi S. Analysis of cytokine chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluids from patients with acute respiratory distress syndrome. *Journal of the Japanese Society of Intensive Care Medicine* . 2010 Apr; 17(2):179-184.
- 4) Fujioka K, Manabe N, Nomura M, Watanabe M, Takeyama H, Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K., Manome Y., Detection of thyroid carcinoma antigen with Quantum dots and monoclonal IgM

antibody (JT-95) systems. J. Nanomater.
Volume 2010 (2010), Article ID 937684, 7
pages doi:10.1155/2010/937684

- 5) Yamamoto S, Manabe N, Yamamoto K.
High-Definition Slit Lamp Video Camera
System. Ophthalmic Surgery, Lasers &
Imaging March/April 2010; 41(2).
- 6) Shiohara A, Hanada S, Prabakar S,
Fujioka K, Lim TH, Yamamoto K,
Northcote PT, Tilley RD. Chemical
Reactions On Surface Molecules Attached
to Silicon Quantum Dots. J Am Chem Soc.
2010 Jan 13;132(1):248-253.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

インフルエンザウイルス肺炎・ARDSにおける 酸化ストレスバイオマーカー

研究分担者 赤池孝章 熊本大学大学院生命科学研究部 微生物学分野 教授
研究分担者 岡本竜哉 熊本大学大学院生命科学研究部 微生物学分野 助教

研究要旨

一酸化窒素（NO）と活性酸素種（ROS）は、感染、炎症、がんといった多彩な疾病に関わっている。我々はこれまで、マウスのインフルエンザウイルス肺炎モデルを用いて、NO・ROSによる生体分子の酸化・ニトロ化修飾について解析を行ない、感染肺局所にて3-ニトロチロシン（3-NT）や8-ニトログアニン関連化合物が生成することを、免疫染色法やHPLC-電気化学検出（ECD）法により証明し、病態との関連性について報告してきた。そこで本研究では、高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）および新型インフルエンザウイルス（AH1pdm）感染症を含む小児の致死性 ARDS 症例における血漿蛋白質中の 3-NT の HPLC-ECD 法による解析を行った。2008-2009 年にベトナム・ハノイ国立小児病院にて入院加療を受けた ARDS 症例（49 検体・40 症例）と非 ARDS 症例（15 検体・15 症例）を対象とし解析したところ、ARDS 検体において有意に高いレベルの血漿蛋白質 3-NT の生成を認めた。特にインフルエンザウイルス感染 ARDS 例においては非感染 ARDS 例に比べ、より高い傾向が見られた。また 3-NT のレベルは、死亡例に比べ生存例にてより高く、また多臓器不全がない症例にてより高い傾向がみられた。プロテオミクス解析にて、ニトロ化の標的蛋白質として、アルブミンやフィブリノーゲンといった血漿蛋白質が同定された。これまで一般に用いられてきた 3-NT の検出法は、免疫染色法や ELISA 法といった抗体を用いる方法であるが、定量性や特異性に問題があることが指摘されている。HPLC-ECD 法は、抗体に依らない定量的かつ特異的な検出法で、3-NT のバイオマーカーとしての応用において、有用なツールになり得るものと期待される。

A. 研究目的

我々はこれまで、マウスのインフルエンザウイルス肺炎モデルを用いて、一酸化窒素（NO）と活性酸素種（ROS）による蛋白質、核酸、脂質といった生体分子の酸化・ニトロ化修飾によってもたらされる機能変化（酸化ストレス）について研究を行って

きた。特に、蛋白質チロシン残基や核酸塩基グアニンの酸化・ニトロ化反応に着目し解析した結果、誘導型 NO 合成酵素（iNOS）の誘導に伴う過剰な NO の産生に依存して、感染局所において 3-ニトロチロシン（3-NT）や 8-ニトログアニン関連化合物が生成することを、免疫組織染色法や HPLC-電気化学

検出 (ECD) 法により証明し、病態との関連性やバイオマーカーとしての有用性について報告してきた。

これまで、ヒトや動物の様々な感染・炎症性病態において、病巣局所にて 3-NT が生成することが、免疫染色法や ELISA 法などを用いて数多く報告されているが、このような抗体を用いる解析法は、定量性や特異性に問題があることがしばしば指摘されている。また、多くの報告において、組織破砕液や気管支肺胞洗浄液といった生体試料が解析の対象となっているが、ヒトにおいては侵襲が大きく、特に重症例では試料を得ることが困難である。この点、血液は比較的侵襲的に得られる生体試料で、多くの症例で採取することが可能だが、血漿を用いて 3-NT を検出し得た報告は極めて限られているのが現状である。それは、元々のレベルが低いことに加え、血漿中に含まれる様々な夾雑物が S/N 比を低下させることが原因と考えられ、3-NT のバイオマーカーとしての臨床応用において大きな障壁となっている。

そこで本研究においては、血漿蛋白質の処理法を工夫することや HPLC の溶出条件を最適化することにより高感度で S/N 比の高い HPLC-ECD 測定系を構築し、劇症型 ARDS 症例における血漿蛋白質中の 3-NT の定量的な解析を試みた。

B. 研究方法

1) 2008-2009 年にベトナム・ハノイ国立小児病院にて入院加療を受けた、H5N1 感染症例を含む ARDS 症例の保存血漿を対象とし、以下の方法で 3-NT を測定し、臨床パラメーターや疫学データとの関連性を解析した。

2) 血漿 (100 μ l) に酢酸バッファー (0.1 M, pH 7.2) 400 μ l と氷冷したエタノール 500 μ l を加え、蛋白質を沈殿させた。遠心 (10000 rpm, 10 min) した後、5:8 酢酸バッファー・エタノール溶液 (1 ml) にて沈殿を洗浄後乾燥させ、血漿蛋白質試料を得た。

3) 持ち帰った血漿蛋白質試料に 10 mM DTT、1% SDS 添加酢酸バッファー 400 μ l を加え、50°C 24h 振とうし再溶解させた。

4) 再溶解液 200 μ l にプロナーゼ (50 μ g) を加え、50°C 24h 振とうし、蛋白質を消化、さらに未消化物を限外濾過 (3 kDa cut-off) にて除去した (図 1 A)。

5) 3-NT 濃度を HPLC-ECD システム (Eicom 社, HTEC-500/PEC-510) にて解析した。上記試料 20 μ l を逆相カラム (SC-500DS) にて分離した。移動相は 200 mM リン酸バッファー、2% アセトニトリル、5 μ g/ml EDTA (pH 2.9) を用い、流速は 400 μ l/min とした。移動相を酸性にすることで、3-NT の溶出時間を遅らせ、S/N 比を改善させた。カラムにて分離された 3-NT は、還元セル (-800 mV) で 3-アミノチロシンへと還元され、酸化セル (200 mV) で電気信号へと変換される (図 1 A)。

6) 3-NT のピークと同定する基準は、①標準 3-NT と同じ時間に溶出すること、②サンプルに一定濃度 (10 nM) の標準 3-NT を混入することで大きくなること、③還元電圧を -400mV にすることで消失すること、の 3 条件をみたすものとした (図 1 B)。

7) 3-NT の濃度は、ECD の下流に接続された UV 検出器にて測定したチロシン濃度にて補正した (3-NT/tyrosin, μ mol/mol)。なお、3-NT の標準曲線は広い範囲で直線性を示し、検出限界は 1 nM (20 fmol) であった。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立国際医療センター倫理委員会の審査を得た（2007年9月28日承認）。

C. 研究結果

研究対象とした症例（40例・49検体）の臨床データを表1に示す。インフルエンザウイルス感染を伴わないARDS群（Non-IFV-ARDS群）は、34例・41検体、インフルエンザウイルス感染を伴うARDS群（IFV-ARDS群）は、6例・8検体であった。また、今回対照群とした非ARDS群（Non-ARDS群）は、15例・15検体であった。図1Bに3-NTの増加を認めた症例（検体番号15C）の溶出プロファイルの例を示す。標準化合物と同じ時間に溶出し、還元電圧を-400 mVにすることで消失することから3-NTと同定した。全検体の3-NTの測定結果を図2に示す。IFV-ARDS群の3-NT/Tyrレベルは $0.977 \pm 0.386 \mu\text{mol/mol}$ (median 0.323, interquartile range [IQR], 0.156-2.037) と、Non-ARDS群の $0.171 \pm 0.029 \mu\text{mol/mol}$ (median 0.160, IQR, 0.055-0.255) に比べ、有意に高かった ($p = 0.038$)。一方、Non-IFV-ARDS群の3-NT/Tyrレベルは $0.502 \pm 0.112 \mu\text{mol/mol}$ (median 0.200, IQR, 0.098-0.452) と、Non-ARDS群に比べ、高い傾向はみられたが、有意差は認めなかった ($p = 0.083$)。また、病勢や予後との関連性を検討すると、3-NTのレベルは、死亡例に比べ生存例にてより高く、呼吸不全の程度が軽度の例により高い傾向が認められた。またARDSのみの症例の方が多臓器不全の症例よりも高い傾向が見られた（図3）。最後に、H5N1感染およびAH1pdm

感染に伴うARDS症例の血漿サンプル（検体19C, 90C）を二次元電気泳動にて展開し、3-NT抗体を用いたWestern blotを行った。プロテオミクス解析の結果、ニトロ化の標的蛋白質として、アルブミンやフィブリノーゲンといった血漿蛋白質が同定された（図4）。

D. 考案

3-NTは、NOとROSの反応によって生じるパーオキシナイトライト（ONOO⁻）や二酸化窒素（NO₂）などの活性酸化窒素種、あるいは、好中球ミエロペルオキシターゼによって亜硝酸イオン（NO₂⁻）から作られるNO₂によって、蛋白質のチロシン残基がニトロ化されることによって生じるものと考えられ、ARDSを始めとする多くの感染・炎症病態において、酸化ストレスのバイオマーカーとして用いられている。

HPLC-ECD法は、抗体に依存しない定量的かつ特異的な検出法であるが、これまで動物実験では報告があるものの、ヒトの血漿蛋白質中の3-NTの検出に成功した報告はほとんどない。今回、血漿蛋白質をいったんエタノール沈殿させたが、これにより、血漿中に含まれる可能性のある感染性ウイルス粒子を完全に不活化することができ、安全に輸送することが可能となった。また同時にHPLC-ECD解析の妨げとなる低分子夾雑物やartificialな3-NT生成の原因となるNO₂⁻を除去することができ、高感度かつS/N比に優れた3-NTの定量が可能となった。

今回の結果で、ARDS由来の8検体にて1 $\mu\text{mol/mol}$ 以上の高いレベルの3-NTを検出し、予後や病勢とむしろ逆相関する傾向が見られた。現在、症例数を増やし、この傾