

図3. マクロライド投与により変動の大きかったBALF中および血漿中のサイトカイン・ケモカイン

## 2) 劇症型インフルエンザの発症機構の解明

本研究は、*in vitro*にてインフルエンザウイルスを感染させたA549ヒト上皮細胞でのサイトカイン・ケモカインの産生における役割について検討した。

TNF- $\alpha$ とRANTESは、PR-8ウイルスに感染させたA549上皮細胞から優勢に産生されることが示された。

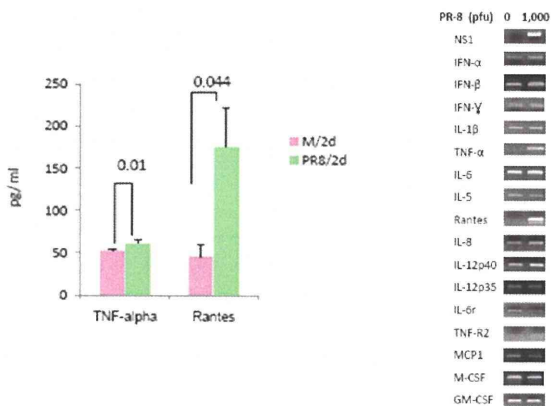


図4. PR-8ウイルスに感染させたA549上皮細胞から有意に上昇したTNF- $\alpha$ とRANTES

そしてsiTNF- $\alpha$  mRNA処理によりRANTESの発現とRANTES, IL-8とMCP-1の分泌が抑制された。さらに、siRANTES mRNA処理によって、インターフェロン(IFN)- $\gamma$ の発現が抑制され、RANTES, IL-8とMCP-1の分泌も抑制された。

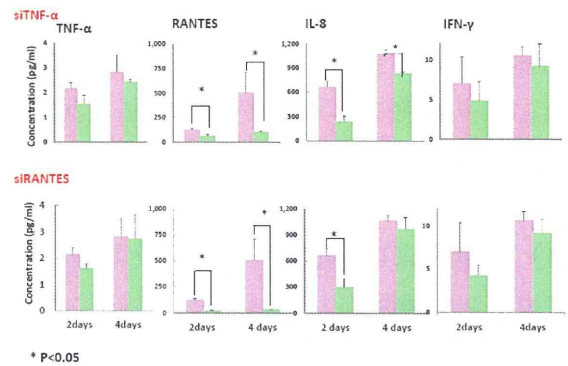


図5. siRNA処理によるRANTES、IL-8、MCP-1、IFN- $\gamma$ 分泌の抑制

そして、非感染細胞にTNF- $\alpha$ とRANTESを投与することで、RANTES, IL-8およびMCP-1の分泌が亢進された。これらの事実から、初期の段階でTNF- $\alpha$ によって産生誘導されたRANTESが、ひきつづくIL-6, IL-8, MCP-1およびIFNsのレベルの上昇をコントロールしていることが強く示唆された。

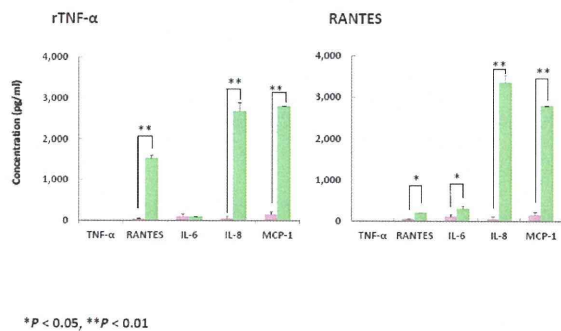


図6. 非感染A569細胞へのTNF- $\alpha$ とRANTES投与によるRANTES, IL-8およびMCP-1の分泌亢進

一方、ウイルスの NS1 プラスミドを感染させた細胞は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-MPO 系の存在下で、大量の IL-8 と MCP-1 が産生された。

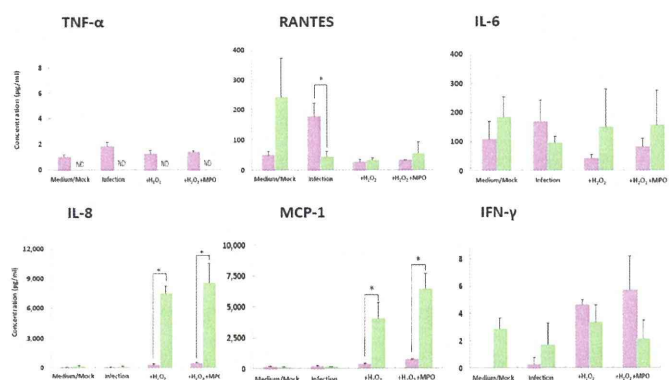


図 7. NS1 プラスミド感染 A549 細胞における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-MPO 存在下での大量 IL-8 と MCP-1 の産生  
左カラム (ピンク) : PR-8 感染、右カラム (緑) : NS1 プラスミッド感染

## D. 考察

### 1) 劇症型インフルエンザ治療薬の開発

これまで 1000 種類のマクロライドライブラリーからのスクリーニングにより、インフルエンザ誘導性の劇症肺炎において、好中球 MPO が肺傷害因子として働き、ウイルス増殖にも関与することを示してきた。このことは MPO 放出を阻害する薬剤の投与により、肺傷害レベルとウイルス増殖を抑制することで劇症肺炎を改善できる可能性を示している。本年度では、先の研究で見出した 16 員環構造を含むマクロライド、SPM、LM-A3、CM を、致死濃度のインフルエンザウイルスを感染させたマウスに投薬したところ、感染マウスは体重の回復を伴う生存効果を示した。マクロライドを投与したマウスの肺組織では、ウイルスの核酸量が減少していたことから、何らかのメカニズムでウイルス増殖を抑制する効果ももつことが明らかとなった。さらに、マクロライドの投与によって、感染マウスの肺胞洗浄液中のケモカインや

サイトカイン産生が抑制されることがわかり、炎症抑制に作用している可能性が示された。このことから、劇症肺炎時において MPO 放出阻害活性を示すマクロライド薬剤が、インフルエンザ感染症に対する新規治療薬の候補となる可能性を示した。これは、新たな治療薬として有望である。

### 2) 劇症型インフルエンザの発症機構 (サイトカインストーム) の解析: インフルエンザウイルス感染には、周期的に毎年発生する

季節性と急速に拡大するよりパンデミック感染の世界的流行の両方がある。インフルエンザ A 型ウイルスは上皮細胞に感染し、ウイルスは上皮細胞で増殖してマクロファージや白血球が反応してケモカイン・サイトカインを産生する。それに加えて、好中球の中の MPO は、インフルエンザウイルス感染の細胞の損傷に関わっている。H5N1 型インフルエンザウイルス感染により高熱を伴う ARDS が誘導され深刻な呼吸不全へと進展する。本年度の研究では、H5N1 インフルエンザに感染し ARDS を発症した小児患者の中のサイトカイン、ケモカインの応答および MPO 活性に焦点を当て、*in vitro* にて A/H1N1 インフルエンザウイルス PR-8 株を感染させた A549 ヒト上皮細胞でのサイトカイン・ケモカインの産生における役割について検討した。TNF- $\alpha$  と RANTES は、PR-8 ウイルスに感染させた A549 上皮細胞から優勢に産生されることが示さ siTNF- $\alpha$  mRNA 処理により RANTES の発現と RANTES, IL-8 と MCP-1 の分泌が抑制され、siRANTES mRNA 処理によって、IFN- $\gamma$  の発現が抑制され、RANTES, IL-8 と MCP-1 の分泌も抑制された。そして、非感染細胞に TNF- $\alpha$  と RANTES を投与することで、RANTES, IL-8 および MCP-1 の分泌が亢進された。これらの結果は、感染初期の段階で TNF- $\alpha$  によって産生誘導された RANTES が、ひきつづく IL-6, IL-8, MCP-1 および IFNs のレベルの上昇をコントロールしていることが強く示唆

された。

また、ウイルスの NS1 プラスミドを感染させた細胞は、 $H_2O_2$ -MPO 系の存在下で、大量の IL-8 と MCP-1 が産生された。これは、PR-8 中の NS1 が  $H_2O_2$ -MPO 系が存在する時に、上皮細胞でサイトカインストームを誘発することを示唆しているという結果は、患者において、MPO が肺の好中球増多症により促進され、ひきつづく肺でのケモカイン・サイトカインの産生の結果と類似している。そして、インフルエンザウイルス感染によって  $H_2O_2$ -MPO 系がはたらくと、インフルエンザウイルス NS1 と連動しておこる肺の上皮細胞のサイトカインストームを誘発すると推定される。

## E. 結論

本年度のモデル動物による治療薬の開発とその発症にかかわるサイトカインストームの一端を明かにでき最初の目標は達成できた。

1)インフルエンザ誘導性 ARDS に対する治療薬：ジョサマイシン（ロイコマイシン）、スピラマイシンを候補として得た。インフルエンザウイルス感染劇症型肺炎マウスに、これら薬剤を投薬することで生存効果を示した。肺組織中のウイルスの核酸量減少と、肺胞洗浄液中のケモカイン・サイトカインの産生抑制が見られた。本研究により、劇症肺炎時にこれらマクロライド薬剤が、インフルエンザ感染症の新規治療薬の候補となる可能性を示した。2)劇症型インフルエンザの発症機構の解明：PR-8 を感染させた A549 ヒト上皮細胞でのサイトカイン・ケモカインの産生機構について検討し、TNF- $\alpha$  と RANTES は、PR-8 ウイルスに感染させた A549 上皮細胞から有意に産生され、siTNF- $\alpha$  mRNA 処理により RANTES の発現と RANTES, IL-8 と MCP-1 の分泌が抑制された。さらに、非感染細胞に TNF- $\alpha$  と RANTES を投与することで、RANTES, IL-8 および MCP-1 の分泌が亢進された。これらの事実から、初期の段階で TNF- $\alpha$  によって産生誘導された RANTES が、ひきつ

づく IL-6, IL-8, MCP-1 および IFNs のレベルの上昇をコントロールしていることが強く示唆された。また、NS1 プラスミド感染時に  $H_2O_2$ -MPO 系が存在すると、大量の IL-8 と MCP-1 が産生された。これは、インフルエンザウイルス感染時に NS1 が  $H_2O_2$ -MPO 系が存在する時、上皮細胞でサイトカインストームを誘発すること *in vitro* で示された。

これらの結果は、H5N1 患者において、MPO が肺の好中球増多により促進され、ひきつづく肺でのケモカイン・サイトカインの産生の結果と類似し、インフルエンザウイルス感染によって  $H_2O_2$ -MPO 系がはたらくと、インフルエンザウイルス NS1 と連動して肺上皮細胞のサイトカインストームを誘発すると推定される。

## F. 研究発表

### 論文発表

- 1) Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Yamamoto K, Nakajima N, Sato Y, Aratani Y, Oshima M, Sata T, Kobayashi K, Kawachi S, Nakayama T, **Suzuki K**. The contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiol Immunol*. in press.
- 2) Phung TTB, Sugamata R, Uno K, Aratani Y, Ozato K, Kawachi S, Nguyen LT, Nakayama T, **Suzuki K**. Key role of RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted), nonstructural protein1 and myeloperoxidase in cytokine storm induced by influenza virus PR-8(A/H1N1) infection in A549 bronchial epithelial cells. *Microbiol Immunol*. 2011; Dec; **55**(12):874-884.
- 3) Igari H, Watanabe A, Chiba H, Shoji K, Segawa S, Nakamura Y, Watanabe M, **Suzuki K**, Sato T. Effectiveness and safety of

pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine in healthcare workers at a university hospital in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2011;**64**:177-82.

- 4) Kawachi S, Matsushita T, Sato T, Nunoi H, Noguchi H, Ota S, Kanemoto N, Nakatani K, Nishiguchi T, Yuge A, Imamura H, Kitajima H, Narahara K, **Suzuki K**, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Multicenter prospective evaluation of a novel rapid immunochromatographic diagnostic kit specifically detecting influenza A H1N1 2009 virus. *J Clin Virol.* 2011; **51**:68-72.
- 5) Phung TTB, Luong ST, Kawachi S, Nunoi H, Nguyen LT, Nakayama T, **Suzuki K**. IL-12 and myeloperoxidase (MPO) in Vietnamese children with acute respiratory distress syndrome and induced avian influenza (H5N1) infection. *J Infect.* 2011; **62**: 104-108.
- 6) Aoyagi T, Yamamoto N, Hatta 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 lead to exacerbation of acute lung injury caused by lipopolysaccharide through local production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by Gr-1+ monocytes. *Int Immunol.* 2011; **23**:97-108.
- 7) Furuya H, Kawachi S, Shigematsu M, **Suzuki K**, Watanabe T. Clinical factors associated with severity in hospitalized children infected with avian influenza (H5N1). *Environ Health Prev Med.* 2011; **16**:64-68.

#### 学会発表

##### 【国内学会】

- 1) 濱野慶朋 草野英二 鈴木和男 湯村和子 SCG/Kj マウスに自然発症する半月体形成性腎炎における F4/80 陽性細胞の役

割 第 54 回日本腎臓学会、2011 年 6 月 15 日-18 日、横浜

- 2) 菅又龍一、廣瀬友靖、長尾朋和、鈴木浩也、菅原章公、砂塚敏明、赤川清子、大村 智、中山俊憲、鈴木和男 好中球 myeloperoxidase (MPO) 放出阻害活性を利用した劇症型肺炎治療薬の探索による 8 つの ARDS 治療薬としての新マクロライド候補第 18 回マクロライド新作用研究会、2011 年 7 月 15-16 日、東京
- 3) 菅又龍一、廣瀬友靖、長尾朋和、鈴木浩也、山本紀一、大島正道、菅原章公、小林和夫、砂塚敏明、赤川清子、大村 智、中山俊憲、鈴木和男 インフルエンザ誘導性 ARDS に対する治療薬候補 16 員環マクロライド Spiramycin および Leucomycin 第 18 回マクロライド新作用研究会、2011 年 7 月 15-16 日、東京
- 4) Suzuki K. Their Contribution to the Future in Medical and Biological Research Fields. 第 20 回日本バイオイメージング学会、2011 年 9 月 1 日-2 日、千歳
- 5) 武永祥子、菅又龍一、澤田和明、奥村弘一、鈴木和男 電荷転送型イメージセンサを用いたインフルエンザウイルス遺伝子の型別診断法の開発第 20 回日本バイオイメージング学会、2012 年 9 月 1 日-2 日、千歳
- 6) 鈴木和男 MPO-ANCA と Moesin 抗体のクロストークによる血管内皮細胞の傷害、第 52 回日本脈管学会総会、2011 年 10 月 20 日-22 日、岐阜
- 7) 鈴木和男 MPO-ANCA と Moesin 抗体のクロストークによる血管内皮細胞の傷害 第 17 回 MPO 研究会、2011 年 10 月 28-29 日、熊本
- 8) 高橋 啓、大原関利章、亀岡洋祐、横内 幸、山田仁美、直江史郎、大野尚仁、鈴木和男 川崎病類似マウス血管炎モデルを用いた ヒト monovalent-hScFv1 の病理学的 評価 第 17 回 MPO 研究会、2011 年 10 月 28-29 日、熊本
- 9) Phung T, Sugamata R, Uno K, Ozato K, Kawachi S, Nakayama T, Nguyen TL,

- Suzuki K インフルエンザ感染誘導によるサイトカイン・ケモカインストームの調節機構解析と MPO と NS1 の役割 40 回日本免疫学会, 2011 年 11 月 27-29 日、千葉
- 10) 志賀由佳、菅又龍一、長尾朋和 1、岩村千秋。川上和義、河内正治、中山俊憲、鈴木和男 VILI (Ventilator-Induced Lung Injury) model における NKT 細胞の関与と役割 .40 回日本免疫学会, 2011 年 11 月 27-29 日、千葉
  - 11) 鈴木浩也、濱野慶朋、中山俊憲、鈴木和男 MPO-ANCA 関連血管炎における新規自己抗体(抗モエシン抗体) . 40 回日本免疫学会, 2011 年 11 月 27-29 日、千葉
  - 12) Ohmura T, Miura NN, Ishibashi K, Adachi Y, Suzuki K, Ohno O. Acute phase response of mice to *Candida* mannoprotein CAWS assessed by gene expression in liver.. 40 回日本免疫学会, 2011 年 11 月 27-29 日、千葉
  - 13) 鈴木和男 半月体形成腎炎の血管内皮細胞傷害に関与する MPO-ANCA と Moesin 抗体のクロストーク 第 33 回関東腎臓研究会、2012 年 1 月 21 日、東京
  - 14) 鈴木和男 MPO-ANCA と Moesin 抗体のクロストークによる糸球体血管内皮細胞の傷害ーシンポジウム 1 第 45 回 日本臨床腎移植学会、2012 年 2 月 1 日-3 日、軽井沢
- 3) Suzuki K, Nagao T, Itabashi M, Sugamata R, Yamazaki Y, Yumura Y, Tsukita S, Wang P-C, Nakayama T, Suzuki K. A novel anti-neutrophil antibody in serum of patients with MPO-ANCA associated vasculitis. 15th International Vasculitis and ANCA Workshop, May 15-18, 2011, Chapel Hill, NC, USA
- 4) Tomizawa K, Nagao T, Kusunok 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. 15th International Vasculitis and ANCA Workshop, May 15-18, 2011, Chapel Hill, NC, USA
  - 5) Kusunoki R, Nagao T, Iwamura C, Kobayashi S, Yumura W, Nakayama T, Suzuki K. Treatments for MPO-ANCA-associated vasculitis in SCG/Kj mouse. 15th International Vasculitis and ANCA Workshop, May 15-18, 2011, Chapel Hill, NC, USA.
  - 6) Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Tomizawa K, Yamamoto K, Nakajima N, Sato Y, Aratani Y, Oshima M, Yamazaki Y, Tsukita S, Sata T, Kobayashi K, Kawachi S, Nakayama T, Suzuki K. Neutrophil-derived myeloperoxidase contribution in early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome (FARDS) induced by influenza virus infection. 7-th International Peroxidase Meeting, May 22-25, 2011, Brussels, Belgium.
  - 7) Suzuki K, Kobayashi S, The activities of Japanese vasculitis investigators and announcement of the Asia-Pacific ANCA meeting, November 5, 2011, Chicago, IL, USA.
  - 8) Suzuki. Role of Myeloperoxidase in Vasculitis and Crescentic Glomerulonephritis. American society of nephrology-2011 Kidney week, Nov. 8-13, 2011, Philadelphia, PN, USA.
- 【国際学会】
- 1) Suzuki K. Activities of Japanese vasculitis investigators. Vasculitis Clinical Research Investigators Meeting - The Vasculitis Clinical Research Consortium (Vcrc) & The European Vasculitis Study Group (Euvas-. May 15, 2011, Chapel Hill, NC, USA.
  - 2) Nagao T, Suzuki K, Utsunomiya K, Matsumura M, Saiga K, Wang P-C, Minamitani H, Aratani Y, Nakayama T, Suzuki K. Direct activation of glomerular endothelial cells by anti-moesin activity of anti-myeloperoxidase antibody 15th International Vasculitis and ANCA Workshop, May 15-18, 2011, Chapel Hill, NC, USA

- 9) Suzuki K, Oharaseki T, Yamada H, Nagi-Miura N, Ohno N, Takahashi K. Application of synthetic IgGs for IVIg Treatment in Kawasaki Disease, 10th International Kawasaki disease symposium, Feb. 7-13, 2012, Kyoto, Japan.

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

特になし

## インフルエンザウイルス感染抵抗性細胞の解析

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。肺胞由来の細胞株 A549 はインフルエンザウイルスを排除できず死滅するが、一部に死滅を免れる細胞 (A549-3S) 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。ウイルスの細胞への吸着には差が見られなかったが A549-3S 細胞ではウイルス mRNA の出現過程が遅れる。A549-3S 細胞はウイルス RNA の核移行までの間にウイルス抵抗性を示す可能性が示唆される。これを解析している。

### A. 研究目的

現在のインフルエンザウイルスに対する治療薬は主にウイルス蛋白をターゲットとするが、ウイルスは容易に変異を獲得し薬剤耐性を生じる。これに対し、宿主側の蛋白に対する薬剤は薬剤耐性の問題は生じにくい。我々は、肺胞由来細胞株の中に、インフルエンザ感染は成立するが死滅は免れる細胞を得ている。この変異細胞のインフルエンザウイルス抑制機構を解明することで、変異を生じやすいウイルス側をターゲットとするのではなく、変異の生じにくい宿主側因子を標的とした治療法の開発につなげる。

### B. 研究方法

(A549-3S細胞の樹立) 肺胞由来の細胞株 A549細胞はインフルエンザUdorn株 (H3N2) 感染によりほぼ死滅するが、トリプシン存在下でマルチラウンド感染が可能な状態でも死滅しない細胞集団を得た。その細胞に

同様の方法でマルチラウンド感染を繰り返し、限界希釈により細胞クローンをえた。得られた細胞クローンA549-3S株にUdorn株をトリプシン非存在下で感染し、18時間～24時間に蛍光抗体法で染色し感染細胞を観察した。(図1) またウイルス感染後、経時的に培養上清を取り上清に放出されたウイルスのゲノム量及びウイルスタイターを定量PCR及びプラークアッセイにより決定した。(図2)

(ウイルス吸着量測定) A549, A549-3S細胞においてウイルス吸着に違いがあるか調べるために、細胞にウイルスを感染後氷上に一時間静置後に非吸着粒子を除き定量PCRによってゲノム量を測定する。

(ウイルスmRNAの測定) A549, A549-3S細胞にインフルエンザウイルスUdorn株を感染し、継時的にRNAを回収後、定量PCRにてのインフルエンザウイルスmRNA量を測定した。

(抵抗性遺伝子の探索) A549, A549-3S細胞のmRNAの発現の違いをsubtraction法およびこれまで多くのsiRNAの実験により報告されている遺伝子を個別に定量的PCRによって探索する。

(誘導発現系による再構成実験) 探索によつ



て得られた遺伝子を、プラスミドベクターpA<sup>bsf</sup>, pR<sup>puro</sup>を遺伝子導入して作製した誘導発現細胞にECIベクターを用いて遺伝子導入しウイルス抵抗性を解析する。

### C. 研究結果

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インフルエンザウイルス抵抗性細胞クローン(A549-3S#14)を得た。その細胞クローンにMOI=1, 10, 20, 40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。

(図1) 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。ウイルスゲノム量はA549細胞の1/1000レベルであった。A549, A549-3S細胞間で細胞表面へのウイルス吸着に違いがあるか調べた。細胞にウイルスを感染後氷上に一時間静置後に非吸着粒子を除き定量PCRによってゲノム量を測定した。両細胞間でウイルスの細胞表面への吸着は同等であった。A549-3S細胞においてウイルスに対する抵抗性が発揮されるのが核移行以前か以後か確認する為に、ウイルス感染後継時的に感染細胞からtotal RNAを抽出し定量PCRにて比較した。A549細胞に比べてA549-3S細胞ではウイルスmRNAの出現が数時間遅れることが示された。

### D. 考案

A549細胞はインフルエンザウイルス許容細胞であるが、今回ウイルス感染に著しく抵抗性を示すA549-3S細胞が得られた。A549, A549-3S間に明らかな表現系の相違は見られていない為細胞の生存に影響を与えない遺伝子である可能性もある。また形質は安定しているため、この両者を解析することで細胞に重大な影響を及ぼさずにウイルス抵抗性に関与する因子の解明につながる可能性が考えられる。

### E. 結論

①インフルエンザウイルスUdorn株に著しい抵抗性を示す細胞株A549-3Sが得られた。培養上清のウイルスタイトルは約1/10であった。

②一年以上に渡りこの性質は安定である。

③A549-3S細胞におけるUdorn株ウイルス抵抗性はウイルス吸着から核移行までの間に示されることが示唆された。

### F. 健康危惧情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, and Yasuko Tsunetsugu-Yokota Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 19-27, 2012
- 2) Guoli Shi, Fumihiko Yagyu, Yohko Shimizu, Kazufumi Shimizu, Masamichi Oshima, Aikichi Iwamoto, Bin Gao, Wenjun Liu, George Fu Gao, Yoshihiro Kitamura Flow Cytometric Assay Using Two Fluorescent Proteins For the Function of the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus *Cytometry Part A* 79A:653-660, 2011

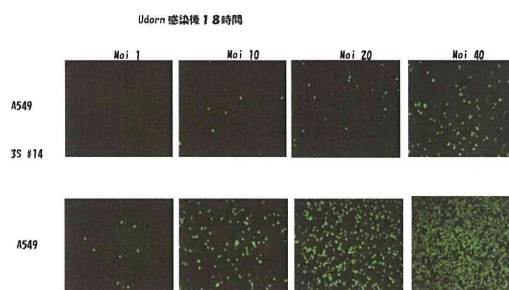
#### 2. 学会発表

- 1) Kazufumi Shimizu, Toshikatsu Shibata,



Tomoko Nishikawa, Keiko Toyosawa, Yutaka Sasaki, Torahiko Tanaka, Kazumichi Kuroda, Reiko Todaka, Masamichi Oshima, Tatsuo Yamamoto  
 Loss-of-Function Mutation on NS1 Gene Enhances the Virulence of Influenza Virus in Mice IUMS 2011 XV, International Congress of Virolog Sapporo, 11-16 September 2011

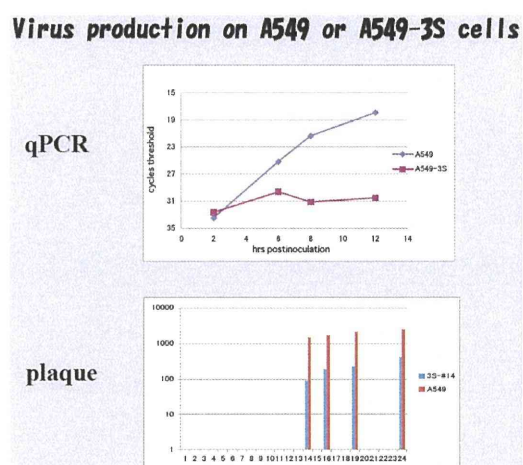
(図 1)



H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
 2010-122480  
 インフルエンザ H5 亜型検出用抗体及び検出用キット  
 横田恭子、大西和夫、阿戸学、高橋宣聖、大島正道、平山中己、小林和夫、板村繁之、曾家義博、三沢修平、西村研吾高橋和郎
2. 実用新案登録  
 なし
3. その他  
 なし

(図 2)



## 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

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、NKT 細胞の活性化剤である  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) を気管内に前投与したマウスに LPS を投与することで、劇症型 ARDS (FARDS) の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、Damage-associated Molecular Patterns (DAMPs) の一つとして注目されている High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) および、上皮細胞間のタイトジャンクション構成分子として発見された Claudin の FARDS における役割を解析した。致死性 FARDS マウスでは、非致死性急性肺傷害マウスに比べて、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の HMGB1 濃度が著明な高値を示し、肺胞腔内へ浸潤する炎症細胞から分泌される可能性があることがわかった。また、肺内、末梢白血球における Claudin-2、-4、-5、-8.1 の発現パターンが両マウス間で顕著に異なることが明らかになり、致死に至る病態に関与する可能性が示唆された。今後、HMGB1 や Claudin が FARDS の分子マーカーや治療標的になり得るかについて検討を進めていく。

### 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、急速に進行する激しい ARDS (Fulminant ARDS: FARDS) を合併し死亡率が高いことが知られている (Kawachi et al. *J. Infect. Dis.* 200; 510-515, 2009)。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)  $-\gamma$ 、tumor necrosis factor (TNF)  $-\alpha$ 、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 患者の気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中で、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、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開発するためには、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内への好中球浸潤、間質や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。我々は、Natural Killer T (NKT) 細胞の活性化剤である  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -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の作成に成功した (Aoyagi et al. *Int. Immunol.* 23: 97-108,

2011)。これまでの研究で、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、IFN- $\alpha$  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てきた。

近年、High Mobility Group Box 1 (HMGB1) は Damage-associated Molecular Patterns (DAMPs) の一つであり、新たな炎症性メディエーターとして注目されている。HMGB1 は炎症の後期に上昇し、高値が長期間持続することより、治療標的になる可能性があるといわれている (Wang H, et al. Science 285:248-51, 1999)。本研究では、我々の FARDS モデルマウスにおける HMGB1 の役割を明らかにし、治療標的としての可能性を検討した。

ARDS は非心原性に起こる肺水腫であり、急激な炎症により透過性の高まった血管から炎症細胞や液性成分が肺胞上皮細胞間隙を経て肺胞腔へ浸出する病態である。しかし、生理状態下では、肺胞上皮細胞間のタイトジャンクション (TJ) がバリアとなり、恒常的に呼吸スペースが確保されている。近年、TJ の分子機構の研究が急速に進展し、その構築に重要な分子群が見出されており、その中で、Claudin は中心的な役割を担っている。ARDS の病態を考えると、TJ、特に Claudin の重要性が想像に難くないが、その研究はまだ途についたばかりである。本研究では、我々の動物モデルを用いることで、FARDS の病態における Claudin の関与についても解析を実施した。

## 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、 $\alpha$ -GalCer (1 $\mu$ 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 $\mu$ g/マウス) を再度気管内投与した。

2) 病理組織学的検討 肺摘出後 10%フォルマリンで固定し、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) 免疫組織化学解析 ニワトリ抗マウス HMGB1 抗体、ウサギ抗マウス Claudin-2 または Claudin-4 抗体を用いて、間接二段階標識法 (an indirect, two-step labeling technique) でおこなった。

4) 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- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、HMGB1 濃度を ELISA にて測定した。

5) 抗 HMGB1 抗体投与の影響 FARDS マウスに、ニワトリ抗 HMGB1 抗体 (45 $\mu$ g/マウス) を LPS 投与と同時に気管内に投与し、生存期間への影響について検討した。

6) Claudin mRNA 発現の解析 FARDS の病態における Claudin の関与について調べるために、Claudin-2、-4、-5、-18.1 mRNA の発現をリアルタイム PCR にて解析した。特に、致死に至る病態との関係を調べるために、BALF 中の細胞、BAL および右心室環流後の肺、そして末梢血白血球に分けて解析し、致死モデル ( $\alpha$ -GalCer/LPS 投与群) と非致死モデル (PBS/LPS 投与群) との間で比較検討を実施した。インターナルコントロールとして glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現を解析した。各 Claudin のコピー数は、目的産物をクローニングしたプラスミドを段階希釈した標準曲線をもとに定量し、同様に得られた GAPDH の発現量で補正した。

7) 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。

8) 倫理面への配慮 すべての実験は、東北大学の動物実験専門委員会および遺伝子組換え実験安全専門委員会の承認を得て実施した (承認番号: 2011 医動-200、研研 76 号)。

### C. 研究結果

1) FARDS マウスにおける BALF 中 HMGB1 濃度の増加 致死性 FARDS マウスにおける HMGB1 の関与を調べるために、BALF 中の HMGB1 濃度を経時的に測定した。FARDS マウス ( $\alpha$ -GalCer/LPS 群) の対照として、 $\alpha$ -GalCer/PBS 群、PBS/LPS 群、PBS/PBS 群をおき比較した (図 1)。LPS 投与 0 時間後 ( $\alpha$ -GalCer 投与 24 時間後) では、4 群間で差はなかった。LPS 投与 6 時間後では、 $\alpha$ -GalCer/LPS 群と  $\alpha$ -GalCer/PBS 群で高値となり、LPS 投与 12 時間後には、 $\alpha$ -GalCer/PBS 群は減少したが、 $\alpha$ -GalCer/LPS 群では、さらに高値になり、24 時間後も高値は持続した。PBS/LPS 群は、時間経過とともに緩徐な上昇を示したが、LPS 投与 24 時間後でも  $\alpha$ -GalCer/LPS 群には及ばなかった。軽度な肺傷害を起こす PBS/LPS 群 (非致死マウス) に比べて、致死性 FARDS マウス ( $\alpha$ -GalCer/LPS) で、HMGB1 値がより早期に、かつ有意に高値であったことより、HMGB1 が FARDS の病態形成に寄与することが示唆された。

2) FARDS マウスにおける HMGB1 分泌細胞 FARDS マウス ( $\alpha$ -GalCer/LPS 群) における HMGB1 分泌細胞を明らかにする目的で、HMGB1 が最も高値であった LPS 投

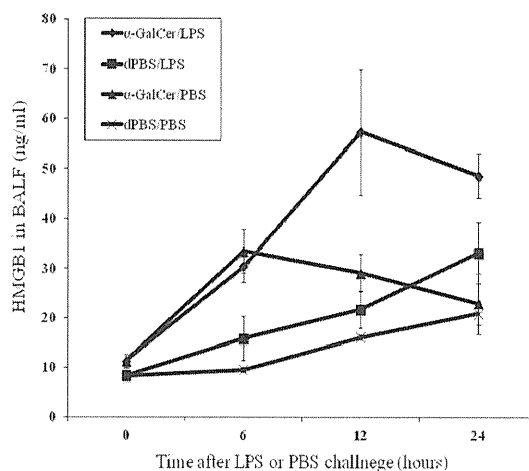


図1. FARDSモデルにおける肺内HMGB1産生の推移

与 12 時間後の肺病理標本の HMGB1 免疫組織化学解析をおこなった。 $\alpha$ -GalCer/LPS 群では肺胞内への炎症性細胞 (好中球とマクロファージ・単球系細胞) の浸潤がみられ、これらの細胞で HMGB1 が陽性であったが、PBS/PBS 群では肺胞内への炎症性細胞浸潤はほとんどみられなかった。一方、気管支・肺胞上皮細胞における HMGB1 の発現は  $\alpha$ -GalCer/LPS 群と PBS/PBS 群との間で顕著な差はみられなかった。これらの結果より、FARDS マウスにおいて、肺胞腔内へ浸潤する炎症性細胞からの HMGB1 分泌が、HMGB1 高値につながっている可能性が示唆された。

3) FARDS マウスにおける抗 HMGB1 中和抗体投与の影響 FARDS マウスにおける HMGB1 の関与を直接調べる目的で、抗 HMGB1 中和抗体投与をおこなった。LPS 投与と同時に気管内投与 (45 $\mu$ g/マウス) をおこなったところ、生存期間の改善傾向はあるものの有意な差は認められなかった。

4) FARDS マウスにおける Claudin-2、-4、-5、-18 の発現 FARDS の病態における Claudin の関与を調べるために BALF 細胞、肺ホモジネート、末梢血白血球における各種 Claudin の発現を解析した。非致死性モデル (PBS/LPS 群) では、LPS 投与前におい

ても肺ホモジネートで Claudin-5、-18.1 が発現していた。LPS 投与6時間後では Claudin-2、4 の発現が増加し、Claudin-2 は24時間後にはベースラインまで低下し、Claudin-4 は24時間以降漸減傾向にあった。さらに、Claudin-5、-18.1 は24時間以降減少した。

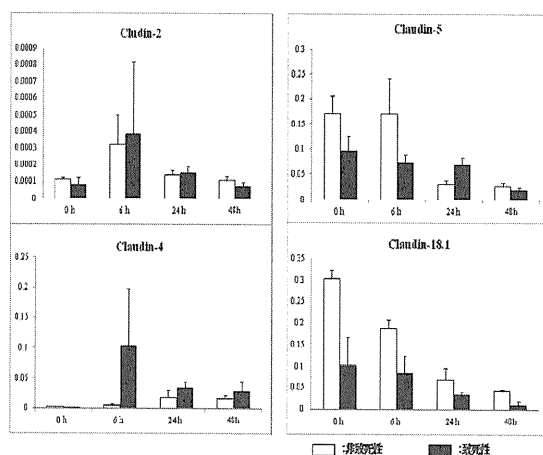


図2. FARDSマウスの肺内におけるClaudinの発現

一方、 $\alpha$ -GalCer を前投与することで、PBS 投与マウスと比較し、Claudin-5、-18.1 の発現が低下した。致死性モデル ( $\alpha$ -GalCer/LPS 群) では、LPS 投与6時間後で、非致死性モデルと比較して有意に Claudin-4 の発現が亢進し、観察期間内で Claudin-5、-18.1 の発現抑制を認めた。興味深いことに、BALF 細胞や末梢血白血球にも Claudin の発現を認め、発現の推移が肺組織のそれとは異なっていた。特に、致死性モデル ( $\alpha$ -GalCer/LPS 群) では、末梢血白血球において、Claudin-2 の発現が非致死性モデルと比較して著明に増加し、一方 Claudin-5、-18.1 の発現が有意に低下していた。

また、Claudin-2、4 の発現分布を調べるために、致死性マウスと非致死性マウスの肺病理標本を用い、各 Claudin に対する抗体による免疫組織化学染色を試みた。現時点では、気道上皮細胞における発現は両マウス間で明らかな違いはみられていない。

## 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 FARDS により死に至る症例が少ないことが、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 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。これまでの研究では、我々が開発した FARDS モデルマウスを用いることで、低容量インターフェロン ( $\text{IFN}$ )  $-\alpha/\text{D}$  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 への進展が抑えられることを明らかにしてきた。

今回の研究では、FARDS のさらなる治療オプションの可能性を探る目的で、我々の FARDS モデルマウスを用いることで、その発症病態の分子機序の解明を試みた。HMGB1 は DAMPs の一つであり、新たな炎症性メディエーターとして注目されている。また炎症の後期に上昇し、高値が持続することより治療標的となる可能性がある (Wang et al. Science 285: 248-251, 1999)。そこで我々は、FARDS モデルマウスにおける BALF 中の HMGB1 の動態を調べた。 $\alpha$ -GalCer の前投与の代わりに PBS を投与した後に、LPS を投与した群 (PBS/LPS) に比べて、FARDS モデルでは、LPS 投与6時間後より HMGB1 が明らかに高値となり、それは24時間まで持続した。一方、PBS/LPS 群では、HMGB1 は緩徐に上昇した。前述のように LPS 単独の気道内投与では、炎症は軽微であることより、HMGB1 が FARDS の高度な炎症に寄与することが示唆された。免疫組織化学的検討では、

PBS/PBS 群 (sham-operated マウス) では、肺胞腔内にも間質にも炎症性細胞はみられないのに対して、FARDS モデルマウスでは、肺胞腔内への炎症性細胞 (好中球とマクロファージ・単球系細胞) 浸潤がみられ、HMGB1 染色陽性であることより、これらの細胞が HMGB1 を分泌していることが明らかになった。HMGB1 の関与を明確にするため、抗 HMGB1 中和抗体の投与もおこなったが、現時点では有意な生存期間延長効果は観察されなかった。ただし、今回は LPS 投与と同時に 1 回のみ気管内投与をおこなったが、投与回数や投与方法、投与量を再検討して、再実験をおこなう必要があると考えられる。

今後、HMGB1 が FARDS の治療標的になり得るかをさらに検討していく必要がある。HMGB1 を標的とする薬剤としては、リコンビナントトロンボモジュリン (recombinant thrombomodulin; rTM) が、抗 DIC 薬として、現在本邦において市販されている。rTM は、抗凝固作用 (Esmon et al. Br. J. Haematol. 131: 417-430, 2005) に加えて HMGB1 を吸着、中和、分解することによって、抗炎症効果を示すことが報告されている (Maruyama et al. J. Clin. Invest. 115: 1267-1274, 2005; Maruyama et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 29: 1825-1830, 2008)。また、トロンビンとの結合を介しての抗炎症作用を有する (Freistritzer et al. Blood. 105: 3178-3184, 2005) との報告もあり、今後 rTM が FARDS の治療薬となり得るかについて、検討を進めていく。

ARDS の発症機構において、細胞同士をつなぐ TJ のバリア機能が重要な働きをし、細胞間 TJ の主要接着分子として Claudin、Occluding、ZO-1、ZO-2、ZO-3 が会合していることが知られている。肺気管支、肺胞上皮 (I 型、II 型) 細胞に Claudin-1、-3、-4、-5、-7、-10、-15、-18 が発現し、ARDS モデルにおいて Claudin-4、-5 が上皮細胞間

同士の接着や血管透過性に関与している報告があるが、炎症性細胞の肺胞腔内への浸潤における上皮細胞 TJ の役割は不明である。今回、我々の検討で、致死性および非致死性 ARDS モデルマウスを使用し、BALF 細胞、肺組織、末梢白血球細胞の Claudin の発現が経時的に全く異なるパターンを示していることから、定常状態で気道上皮に発現している Claudin と炎症細胞に発現している Claudin の役割が異なっていることが示唆された。今後、炎症に関与する Claudin と組織構造維持に関与する Claudin を明らかにすることで、Claudin 自体が炎症あるいは肺組織破壊の新たなバイオマーカーや治療薬につながる可能性が期待される。

## E. 結論

本研究では、我々が開発した致死性モデルを用いることで、FARDS の病態において、HMGB1 や Claudin が重要な役割を果たすことを示唆するデータが得られつつある。今後、これらの分子が FARDS の分子マーカーや治療標的になり得るかについても、さらなる検討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) 工藤大介、久志本成樹、川上和義：病態生理, 第 2 章 病理・病態生理「新しい診断と治療の ABC 肺炎 改訂第 2 版」、最新医学別冊、最新医学社、39-45、2011.

### 2. 学会発表

- 1) 工藤大介、宇野賀津子、石井恵子、久志本成樹、川上和義：マウス ARDS モデルに対するインターフェロン $\alpha$ の抗炎症効果と治療効果. 第40回日本免疫学

会学術集会、幕張、11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



## 蛍光ナノ粒子解析に伴うケモカインレセプターの役割 ーインフルエンザ劇症化の解析を目指してー

研究分担者 山本 健二  
国立国際医療研究センター研究所

### 研究要旨

我々は、新型インフルエンザにおける重症化についてケモカイン・ケモカインレセプターの役割について検討した。その結果 CCR5 レセプター及びそのライガンドの変化が顕著に多く測定された。また CCR1 レセプター及びそのライガンドも、CCR5 に比べればその変化量は少ないが、これもやはり顕著な変化を測定された観測できた。CCR5 および CCR1 が膜タンパクであることから、何かの細胞のメンブレインに存在していると考えられる。その細胞は、何であるかについては、不明である。またインフルエンザウイルス株 PR-8 に感染させる以前から肺臓器内いたのか、あるいは、どこか他の臓器から来たのか、さらにまた、その両方が起こっているのか、については現在のところ不明である

### A. 研究目的

本研究の目的は、インフルエンザ感染症における重症化のメカニズムを解明し、その結果から得られる情報を用いて、早期診断法断の開発を行ない、さらにその知見を通して有効な治療法を開発することである。

そのため新たな疾病モデルのマウスを用いて構築し、Defused Arbeola Damage (DAD) のメカニズムの解明を行なうことも本研究の目的である。

本研究は、当初、量子ドット (QD) を用いた好中球殺菌分子の動体解析を中心に行なってきたが、好中球より更に早い段階において重症化する可能性について研究してきた。肺胞内に存在するマクロファージについて更に詳しく検討した結果、ケモカイン・ケモカインレセプターが重要な機能を持っていることに気がついた。

### B. 研究方法

マウスに感染する能力のあるインフルエンザウイルス株 PR-8 を用いて、劇症型 ARDS モデルのマウスを用いて構築し、そのシステムを用いて、インフルエンザ感染症における重症化のメカニズムを解明するシステムを構築した。

具体的には、インフルエンザウイルス株 PR-8 を BALB/c に感染させ時間を追って、肺組織全体を分解し、その中に存在するケモカインレセプターCC ケモカイン及びそれらのケモカインレセプター量を網羅的に測定した。

また時間軸としては、DAYS 0 から 1 日間隔で数日に渡って計測した。

### C. 研究結果

CCR5 レセプター及びそのライガンドの変化が顕著に多く測定された。また CCR1 レセプター及びそのライガンドも、CCR5 に比べればその変化量は少ないが、これもやはり顕著な変化を測定された観測できた。

### D. 考察

本研究にて得られたデータによると CCR5 および CCR1 が膜タンパクであることから、何かの細胞のメンブレインに存在していると考えられる。その細胞は、何であるかについては、不明である。またインフルエンザウィルス株 PR-8 に感染させる以前から肺臓器内いたのか、あるいは、どこか他の臓器から来たのか、さらにまた、その両方が起こっているのか、については現在のところ不明である。

また今後、インフルエンザ重症化にどういう意味があるのかについては今後さらに検討する必要があると考えている。

### E. 結論

感染の初期からケモカインレセプター CCR5 と CCR1 およびこれらに対応する複数のケモカインが認められた。これらの結果に関してはこれまでの報告には存在しない。

今後さらに研究を行なうことによりさらに重要な知見を得られると期待している。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

1, 論文発表

- 1) Fujoka K, Hanada S, Kanaya F, Hoshino A, Sato K, Yokosuka S, Takigami Y, Hirakuri K, Shiohara A, Tilley RD, Manabe N, Yamamoto K, Manome Y. Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles. Journal of Physics: Conference Series 2011, in press
- 2) Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K. Toxicity of nanocrystal quantum dots: The relevance of surface modifications. Arch. Toxicol. 2011 Jul;85(7):707-20. Epub ahead of print; Mar 29, 2011
- 3) Yamamoto K.. The Exposure of nanoparticles for Human Body. Journal of Society of Powder Technology of Japan. 2011;48(1):34-38.

### 2. 学会発表

- 1) 国内会議  
なし
- 2) 国際会議  
なし

### 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

## 小児致死性 ARDS および鳥インフルエンザウイルス感染症例の 血漿蛋白質中の 3-ニトロチロシンの解析

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  
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 2009) 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 レベルを HPLC-ECD 法を用いて解析した。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 (47 症例) と非 ARDS 症例 (25 症例) を対象とし解析したところ、ARDS 症例において有意に高い血漿蛋白質 3-NT の生成を認めた。インフルエンザウイルス感染 ARDS 例 (7 症例) は非感染 ARDS 例 (40 症例) に比べ、3-NT レベルがより増加する傾向が見られ (オッズ比 2.26)、死亡するリスクも高かった (オッズ比 5.83)。興味あることに、3-NT のレベルは死亡例に比べ生存例にてより高く、また生存率も 3-NT 高値例のほうが低値例に比べ高い傾向が見られた。3-NT 生成の時間経過を解析すると、ARDS 発症後 14 病日ごろをピークとして増加する群と増加しない群に分けられ、増加する群では増加しない群に比べ死亡率が低かった (23.0 vs 41.2%)。また、3-NT レベルは肺胞上皮修復のマーカーである KL-6 や酸素化の指標である P/F 比と正の相関を認めた。以上のことから、3-NT の生成は ARDS 後の肺の修復を反映している可能性が示唆された。また、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 (IFV) 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、組織破碎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、血液は比較的非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 症例の前向き症例集積検討で得られた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  $\mu$ l) に酢酸バッファー (0.1 M, pH 7.2) 400  $\mu$ l と氷冷したエタノール 500  $\mu$ 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  $\mu$ l

を加え、50°C 24h 振とうし再溶解させた。

4) 再溶解液 200  $\mu$ l にプロナーゼ (50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml EDTA (pH 2.9) を用い、流速は 400  $\mu$ 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,  $\mu$ mol/mol, 図 1 A)。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 (72 症例) の臨床データを表 1 に示す。IFV 感染を伴わない ARDS 群 (Non IFV-ARDS 群) は 40 症例、IFV 感染を伴う ARDS 群 (IFV-ARDS 群) は 7 症例であった。また非 ARDS 群 (Non-ARDS 群) 25 症例を対照群とした。図 1 B に 3-NT の増加を認めた症例の溶出プ

ロフィールを示す。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。

全検体の測定結果を図 2 に示す。IFV-ARDS 群の 3-NT/Tyr レベルの中央値は 0.350  $\mu\text{mol/mol}$  (interquartile range [IQR], 0.182-1.675) と、Non-ARDS 群の 0.210  $\mu\text{mol/mol}$  (0.122-0.278) に比べ、有意に高かった ( $p = 0.046$ )。一方、Non IFV-ARDS 群の 3-NT/Tyr レベルは 0.270  $\mu\text{mol/mol}$  (IQR, 0.125-0.640) と、Non-ARDS 群に比べ、やはり有意に高い傾向がみられた ( $p = 0.039$ )。3-NT/Tyr レベルが全体中央値 0.3  $\mu\text{mol/mol}$  より高い値となる危険度が対照群に比べどの程度高いかをロジスティック回帰分析にて求めたところ、Non IFV-ARDS 群でオッズ比 3.17 (1.05-9.59) であるのに対し、IFV-ARDS 群ではオッズ比 4.42 (0.73-24.44) とより高い傾向が見られた(図 3)。さらに、IFV-ARDS 群と Non IFV-ARDS 群の 3-NT/Tyr レベルには有意差を認めなかったものの、全体の平均値である 0.6  $\mu\text{mol/mol}$  より高い値をとる危険度をロジスティック回帰分析にて求めると、オッズ比 2.26 (0.43-11.82) と IFV-ARDS 群の方が高かった(図 4A)。また、死亡リスクも、オッズ比 5.83 (0.99-34.38) と IFV-ARDS 群の方が高く、Kaplan-Mayer 生存曲線でも明らかに Non IFV-ARDS 群に比べ予後不良であった(図 4B)。

以上、3-NT レベルの増加が ARDS、特に予後不良な IFV 感染群でより高い傾向がみられることから、病勢や予後と 3-NT との関連性についてさらに詳細に検討した。その結果、3-NT のレベルは、死亡例に比べ生存例にてより高く(図 5A)、生存曲線も 3-NT 高値例のほうが低値例に比べよりよい傾向が見られた(図 5B)。3-NT レベルと発症から採血までの日数との関係を調べてみたところ、ARDS の発症後 14 日目ごろをピークとして増加する群と増加しない群

に分けられ、増加する群では増加しない群に比べ死亡率が低かった (23.0 vs 41.2%, 図 5C)。

最後に、3-NT レベルと肺胞上皮修復のマーカーである KL-6 や酸素化の指標である PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> (P/F) 比との関連を調べたところ、どちらも正の相関を認め、3-NT レベルが ARDS に伴う肺の修復に関連している可能性が示唆された(図 6)。

#### 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<sup>-</sup>) や二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) 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 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) から作られる NO<sub>2</sub> 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 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 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。

本研究で、3-NT が増加する症例は、増加しない例に比べ予後がよく、ARDS 後の肺の修復が良好に行われていることを反映しているためと考えられた。このことは、3-NT の増加をもたらす活性酸素種や NO が、肺の修復シグナルの一端を担っている可能性を示唆しており、現在症例数を増やし、こ