

公式に則ってスコアを計算した。

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各種サイトカイン濃度を ELISA にて測定した。一部の実験では Bio-Plex を用いた測定も行った。

5) リコンビナント・トロンボモジュリン投与

リコンビナント・トロンボモジュリン (rTM) 旭化成ファーマ (千葉) から供与された。マウスに対して、rTM 3mg/kg あるいは 10mg/kg を LPS 投与の 12 時間前より、12 時間ごとに腹腔内投与した。

6) BALF と肺間質の白血球分離、肺ホモジネート上清

LPS 投与後様々な時期にマウスを犠牲死させ、開胸し、22 ゲージ静脈留置カテーテル (TERUMO、東京) を気管内に挿入して、1 ml の PBS を投与し、吸引、これを 3 回繰り返した。BALF を 4°C 450×g で 10 分間遠心し、その上清を -80°C でサイトカイン測定用に保存した。次に肺循環を洗浄するために、PBS 3ml を右心室に注入し、肺微小血管に接着しなかった細胞を除去した。その後、肺を摘出し PBS 1.5ml の中に入れ、ホモジネートし、4°C 450×g で 10 分間遠心し、その上清をサイトカイン測定用に -80°C で保存した。細胞解析を行う際は、肺ホモジネートから Percoll による比重遠心法にて採取した白血球分画を用いた。

7) Treg 細胞の解析

FITC 標識 CD4 抗体 (clone GK1.5; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) および Pacific Blue 標識 CD25 抗体 (clone PC61; BioLegend, San Diego, CA, USA) を用いて細胞表面を染色した。その後、Foxp3 staining buffer (e-Bioscience, San Diego, CA,

USA) にて細胞を固定し、PE 標識 Foxp3 抗体 (clone FJK-16S; eBioscience) または control rat IgG2aκ (clone RKT2758、Biolegend) で細胞内染色を行った。染色した細胞をフローサイトメーター (FACS Canto II、BD Biosciences) で解析し、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞を Treg 細胞とした。

8) 統計学的解析

データ解析は、マッキントッシュコンピュータで統計解析ソフト JMP Pro[®] 9.0.2 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。データは、平均 ± 標準誤差で表した。群間比較は、post hoc analysis を用いた分散分析 (Fisher's Protected Least Significant Difference test) で解析した。生存データは、一般化 Wilcoxon 検定で解析した。P 値 0.05 未満で統計学的有意とした。

9) 倫理面への配慮

すべての実験は、東北大学の動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) FARDS に対する rTM の治療効果

抗凝固薬である rTM は、近年、HMGB1 の中和作用により抗炎症効果を示すことが報告されている。そこで、FARDS に対して rTM が有効であるか否かを明らかにする目的で、α-GalCer/LPS 投与マウスに対して rTM を腹腔内投与して、生存観察を行った。rTM 3 mg/kg 投与では、生存率改善効果がなかったが、10 mg/kg 投与により、対照の PBS 投与群に比べて、明らかに生存率が改善した。さらに、劇症型 ARDS モデルマウスの肺における炎症性変化に対する rTM の治療効果を調べるために、病理組織学的検討を行った。LPS 投与 48 時間後の肺において、炎症性細胞の肺胞隔壁および肺胞腔内への浸潤と、肺間質の肺浮腫は、対照群に比べ

て rTM 投与群で明らかに軽減された。肺の炎症性変化を客観的に評価するために、肺傷害スコアリングシステムを用いて、肺傷害の組織学的変化を定量したところ、図 1 に示すように、肺傷害スコアは対照群に比

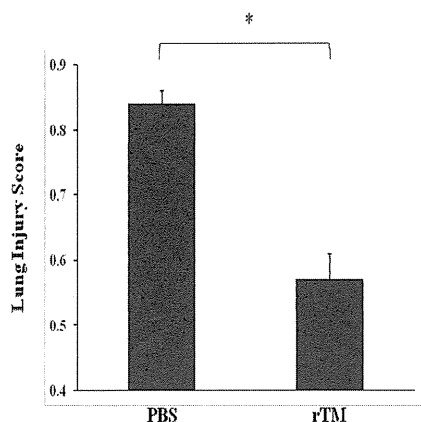


図1. rTMのFARDSマウスにおける急性肺傷害への影響

べて、rTM 投与群で明らかに低かった。以上の結果より、rTM は、 α -GalCer 感作と LPS 投与による FARDS の発症を抑制する効果を示した。

2) FARDS モデル肺での IFN- γ および TNF- α の産生に対する rTM の効果

我々のこれまでの解析により、FARDS の病態形成において、肺で産生される IFN- γ および TNF- α が重要な役割を担うサイトカインであることを明らかにしてきた。そこで、rTM が肺での IFN- γ および TNF- α 産生に影響を及ぼすか否かを明らかにする目的で、 α -GalCer/LPS 投与マウスに対して rTM および対照薬として PBS を投与して、6、12、24 時間後の BALF および肺ホモジネート中の IFN- γ および TNF- α 濃度を測定した。rTM 10mg/kg の投与は、LPS 投与 6、12、24 時間後すべての時間の BALF および肺ホモ

ジネートにおいて、IFN- γ および TNF- α 産生に明らかな影響を及ぼさなかった。この結果より、rTM による劇症型 ARDS の治療効果は、IFN- γ および TNF- α 産生抑制とは異なる機序によるものであることが示唆された。

3) FARDS モデル肺における Treg 細胞に対する rTM の効果

近年、LPS 誘発肺傷害の修復過程で、Treg 細胞が関与するという報告がなされた。そこで、マウス FARDS モデルにおいても、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ で同定される Treg 細胞が炎症の軽減に関わっているか否かを検討した。dPBS/LPS 投与マウスに比べて、 α -GalCer/LPS 投与マウスでは、Treg 細胞が減少していると仮説を立て、さらに rTM 投与により Treg 細胞がどのような影響を受けるかを検証するために実験を行った。図 2 に示すように、dPBS/LPS 投与マウスと比較

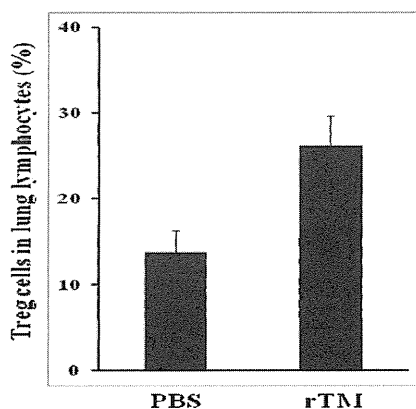


図2. rTMのTreg細胞への影響

して、 α -GalCer/LPS 投与マウスでは、肺内リンパ球における Treg 細胞の割合が明らかに減少していた。そして、 α -GalCer/LPS 投与マウスに対して rTM を投与すると、PBS 投与群と比較して、明らかに Treg 細胞の割

合が増加した。これらの結果から、FARDS マウスに対する rTM の治療効果として、肺において減少した Treg 細胞の割合を回復させることが、関与している可能性が示された。

4) FARDS モデル肺での IL-10 および TGF- β の産生に対する rTM の効果

IL-10 および TGF- β は、Treg 細胞の抗炎症作用において、重要な役割を担うサイトカインであることが知られている。そこで、FARDS マウスの肺内での IL-10 および TGF- β 産生に対する rTM の影響を調べた。図3に示すように、PBS 投与と比べて、rTM 投与により、 α -GalCer/LPS 投与マウスの肺ホモジネート中 IL-10 および TGF- β 濃度が

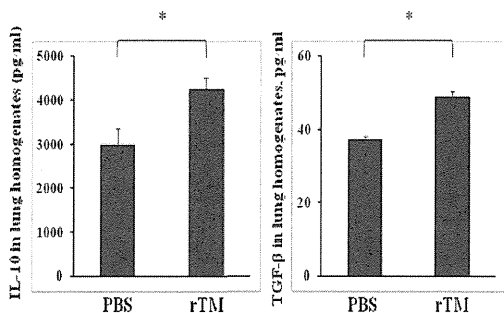


図3. rTMの抗炎症性サイトカインへの影響

有意に上昇した。この結果より、rTM の治療効果の機序として、抗炎症性サイトカインの産生増加による可能性があることが示唆された。

5) インフルエンザウイルス感染による肺線維化モデルの作製

2009年に起こったインフルエンザウイルス A/H1N1pdm のパンデミックの際に、重症 ARDS から救命できたにもかかわらず、肺の線維化をきたして著しく QOL を落とす症例が報告されている (Radiol. Med. 117: 185-200, 2012; Eur. J. Radiol. 79: 447-451, 2011)。これまでの研究の多くがインフルエ

ンザウイルスによる致死モデルを用いたものであったため、このような臨床的事例についてはその発症機序を解析することが容易ではなかった。そこで、我々は、非致死量のインフルエンザウイルス A/H1N1 (PR8 株) をマウスに経気道感染させ、ARDS が軽減した後に肺線維化をきたすモデルの作製に成功した。

6) インフルエンザウイルス感染による肺線維化モデルにおける炎症反応の解析

このモデルにおける感染後の肺内ウイルス量を M1 遺伝子のリアルタイム PCR で解析すると、7 日後をピークに増加し、その後徐々に減少することが分かった。この結果に一致して、感染 11 日~14 日後をピークに BALF 中のタンパク濃度の増加で示される浸出性変化と、病理学的に DAD の所見が観察された。この経時的な変化に一致して、BALF 中の白血球、好中球数が増加し、興味深いことに、これより遅れてリンパ球数の増加が観察された。マクロファージは早期と晩期に増加し 2 相性の変化を示した。BALF 中のサイトカインの解析では、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、G-CSF、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MCP-1、RANTES、IL-10 が 1 週間をピークに増加し、その後漸減した。こうして、本モデルでは、インフルエンザウイルス感染によって急激な炎症性変化を来し、感染自体が制御された後に、肺の線維化がみられることが明らかになった。

D. 考案

本研究において、 α -GalCer による感作後に LPS を投与することによって作製したマウスモデルを用いることで、FARDS に対する治療薬として rTM の有効性を示した。即ち、1) rTM 投与によって、FARDS マウスの生存率を改善し、肺の炎症性変化を軽減し、2) 肺の Treg 細胞は、LPS 誘発肺傷害マ

ウスと比較して、FARDS マウスで減少したが、rTM 投与によって Treg 細胞が増加し、抗炎症性サイトカインである IL-10 と TGF- β も上昇した。

rTM は、N 末端レクチン様ドメインで HMGB1 と結合することによって、炎症反応を抑制することが知られている。Abeyama らは、紫外線照射による皮膚傷害モデルにおいて、rTM 投与により白血球の炎症局所への集積と TNF- α 産生が減少したことを報告している (Abeyama et al. *J. Clin. Invest.* 115: 1267-1274, 2005)。同様に、Nagato らは、LPS 投与誘発敗血症モデルに対して rTM を投与すると、HMGB1 を抑制することによって、血清 IL-1 β および TNF- α 濃度が減少することを示した (Nagato et al. *Crit. Care Med.* 37: 2181-2186, 2009)。これらの研究結果と同様に、本研究においても rTM は FARDS マウスの転帰を改善し、肺における炎症反応を軽減した。しかしながら、予想に反して、FARDS マウスの重度肺傷害形成に重要な役割を担う IFN- γ および TNF- α の産生に対しては、影響を及ぼさなかった。rTM が何故これらの炎症性サイトカインに対して影響を及ぼさないかについては、さらなる研究が必要である。

FARDS マウスにおいて、rTM が有効に作用する機序を明らかにする目的で、Treg 細胞が関与する可能性を検証した。Treg 細胞は、IL-10 および TGF- β といった抗炎症性サイトカインを分泌することによって、炎症病態における免疫反応を調整することが知られている (Bilate et al. *Ann. Rev. Immunol.* 30: 733-758, 2012)。本研究では、LPS 投与 6 時間後という非常に早い時期において、肺の Treg 細胞が劇症型 ARDS マウスにおいて、

LPS 誘発肺傷害マウスと比べて、明らかに少なく、さらに rTM の投与により、FARDS マウス肺の Treg 細胞が増加した。この結果は、Treg 細胞が肺傷害の転帰に関与する可能性、つまり Treg 細胞が減少することにより FARDS が誘導され、Treg 細胞が増加することにより重度肺傷害が軽減される可能性を強く支持すると考えられる。FARDS の病態形成過程で、Treg 細胞の増減が、免疫反応の自然免疫の時期に認められたことから、この T 細胞は、ナイーブ T 細胞が抗原刺激を受けて分化する iTreg 細胞 (induced Treg cell; 誘導型制御性 T 細胞) ではなくて、nTreg (natural Treg cell; 自然発生型制御性 T 細胞) であることが示唆される (Bilate et al. *Ann. Rev. Immunol.* 30: 733-758, 2012)。今後は、FARDS の病態形成において、Treg 細胞の集積がいかんにして阻害されるのか、そして活性化 NKT 細胞や Treg 細胞集積阻害はどのように関連するのかについてさらに解析していきたい。

IL-10 および TGF- β は、免疫反応および炎症反応を制御する。これらのサイトカインは、Treg 細胞が介在する免疫反応および炎症反応の抑制に重要な役割を担っている。これらの報告と一致して、本研究においても、対照マウスと比較して rTM 投与マウスの肺で、IL-10 および TGF- β 産生が増加した。この結果より、rTM は Treg 細胞からの IL-10 および TGF- β という抗炎症性サイトカイン分泌を促進することによって、重度肺傷害に対する有効性を示す可能性が示唆された。

2009 年に起こったインフルエンザウイルス A/H1N1pdm のパンデミックの際に、重症 ARDS から救命できたにもかかわらず、肺

の線維化をきたして著しく QOL を落とす症例が報告されている (Radiol. Med. 117: 185-200, 2012; Eur. J. Radiol. 79: 447-451, 2011)。これまでの研究の多くがインフルエンザウイルスによる致死モデルを用いたものであったため、このような臨床的事例についてはその発症機序を解析することが容易ではなかった。そこで、我々は、非致死量のインフルエンザウイルス A/H1N1 (PR8 株) をマウスに経気道感染させ、ARDS が軽減した後に肺線維化をきたすモデルの作製に成功した。本モデルでは、インフルエンザウイルス感染によって急激な炎症性変化を惹起し、ウイルス感染自体が制御された後に、肺の線維化がみられることが明らかになり、インフルエンザにともなう新たな臨床的課題にアプローチする上で有用なモデルと考えられるので、その発症病態を明らかにするために今後さらに解析を行っていきたい。

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、rTM の有用性を示すことができ、その作用機序として Trge 細胞及び IL-10、TGF- β の関与を明らかにした。一方、非致死量のインフルエンザウイルス A/H1N1 を気道内感染させると、急性肺傷害の後に肺線維化を来すモデルを作製することに成功した。これは、インフルエンザによる ARDS 後の肺線維症の動物モデルとなり、その発症病態の解析に有用と考えられ、今後さらなる解析を実施していきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kudo D, Uno U, Aoyagi T, Akahori A, Ishii K, Kanno E, Maruyama R, Kushimoto S, Kaku M, Kawakami K: Low-dose interferon- α treatment improves survival and inflammatory responses in a mouse model of fulminant acute respiratory distress syndrome, Inflammation, 41319, online, 2013.

2. 学会発表

- 1) Kudo D, Ishii K, Kushimoto S, Kawakami K: Contributions of High-Mobility Group Box 1 in experimental fulminant acute respiratory distress syndrome. 7th International Shock Congress & 35th Annual Conference on Shock, Miami Beach, June 2012.

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 —インフルエンザ劇症化の解析と治療法を目指して—

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 CCR 5 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 CCR 1 レセプター及びそのライガンドも、CCR 5 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。CCR 5 および CCR 1 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。

我々は、マウスにおける PR8 を用いたインフルエンザ重症化モデルを構築することを本研究の目的とした。さらに DAD により死に至るまでどのように経過をたどるかを解析することがもう一つの目的である。このモデルでは、DAD により最終的にマウスが死亡する（図 1、参照）。

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、ケモカインの劇的な亢進による重症化に関する経過を観察する。さらにサンプルを RT-PCR により変化を解析する。

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する。

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する。

C. 研究結果

(1) インフルエンザ感染期において CCR5 の急激の亢進が確認された。それは、組織病変の重症度と一致するものである。

(2) 抗ウイルス剤により、上皮細胞への障害は抑制され、ケモカイン発現の一定の抑制が確認されたが、炎症病変は確認されたままである。

D. 考察

ケモカイン受容体の異常や暴走を検証し、制御することは、各種疾患の治療において意義があると考ええる。

E. 結論

マウスによるインフルエンザの重症化のモデルを用いて、DAD によるマウスの死亡についてケモカインレセプター1 及び 5 が疾病による死に関係があることを示せた。またケモカインレセプターのブロッカーを、コントロールすることにより、治療に結びつけられる可能性があることも示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1, 論文発表

1. Hanada S, Fujioka K, Futamura Y, Manabe Y, Hoshino A, **Yamamoto K.**

Evaluation of anti-inflammatory drug-conjugated silicon quantum dots: their

cytotoxicity and biological effect.

Intl. J. Mol. Sci. 2013 Jan 10;14(1):1323-34.

2. Hoshino A, Ueha S, Hanada S, Imai T, Ito M, **Yamamoto K**, Matsushima K, Yamaguchi A, Iimura T.

Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts.

J. Cell Sci. Epub ahead of print; Dec 21, 2012

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

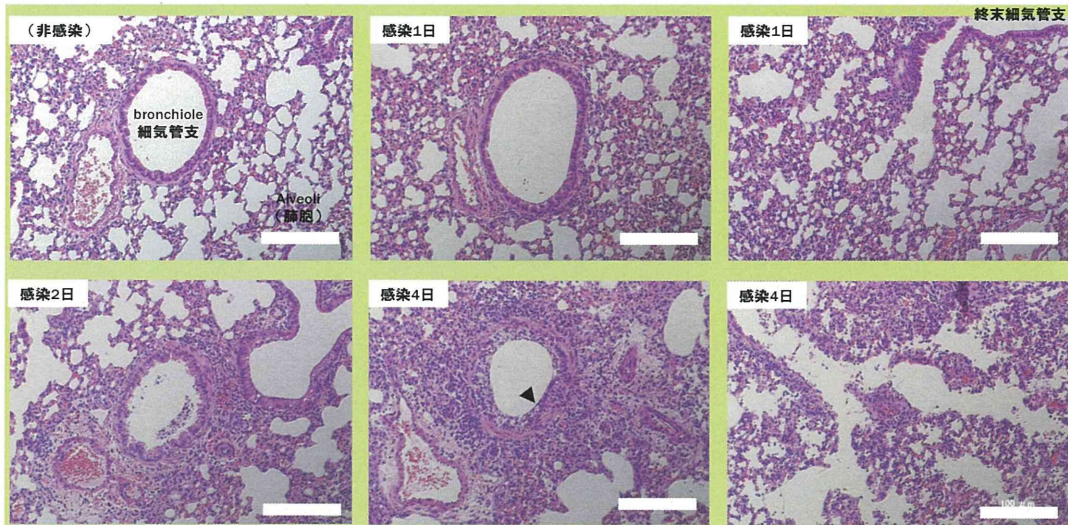
なし

3. その他

なし

図 1

1：感染肺の組織学的評価



感染2日目に細気管支の上皮が破壊され始め、4日目には肺胞域での組織破壊

6

生体内ポリスルフィド生成と酸化ストレス応答

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。NO・ROSに依存して生体内で生成する8-ニトロ-cGMPは、蛋白質S-グアニル化というユニークな翻訳後修飾を介して酸化ストレス応答における重要なシグナル分子として機能している。最近我々は、このような8-ニトロ-cGMPによるシグナルの制御に、各種チオール化合物に硫黄原子が付加した化合物（ポリスルフィド；R-S-S_(n)H）が関与していることを見出した。そこで本年度は、酸化ストレス応答を制御する新規因子としてポリスルフィドに注目し、質量分析を用いたポリスルフィドの高感度測定システムを確立した。マウスの各種臓器ホモジネートやヒトの血漿中にシステインポリスルフィド、グルタチオンポリスルフィドなどが様々なレベルで存在していることが示された。さらに、マウスのインフルエンザ肺炎モデルでは、肺炎の進展に伴って、肺ホモジネートおよび血漿中の各種ポリスルフィドの減少が観察された。これらのことから、生体内ポリスルフィドはインフルエンザウイルス肺炎における酸化ストレスのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

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。

昨年までの研究において、HPLC-ECDを用いた3-NTの高感度定量法を確立し、劇症型ARDS症例の血漿蛋白質中の3-NTの測定をおこない、ARDS病態と3-NTの関連について解析を行ってきた。一方、我々はニトロ化環状ヌクレオチドである8-ニトロ-cGMPの生理的役割について様々な病態モデルを使って研究を進めており、8-ニトロ-cGMPが酸化ストレス応答における重要なシグナル分子であることを明らかにしてきた。8-ニトロ-cGMPは、蛋白質中のシステ

イン残基のチオール基と反応し cGMP を付加するユニークな翻訳後修飾（蛋白質 S-グアニル化）によりシグナルを伝達している。また、ごく最近、8-ニトロ-cGMP によるシグナルの制御機構を探索する中で、各種チオール化合物に硫黄原子が付加したポリスルフィド (R-S-S_(n)H) が、8-ニトロ-cGMP と反応することにより、酸化ストレス応答シグナルを制御していることを見出した。そこで本年度は、生体内ポリスルフィドの定量システムを開発し、ポリスルフィドの生体内生成メカニズムを解析するとともに、インフルエンザウイルス肺炎の酸化ストレスのバイオマーカーとしてポリスルフィドの有用性について検討した。

B. 研究方法

- 1) 生体内に存在する各種低分子チオール化合物（システイン、ホモシステイン、グルタチオンなど）のポリスルフィド誘導体の安定同位体標識体を合成し、HPLC-タンデム質量分析 (MS/MS) を用いた各種ポリスルフィドの定量法を確立した。還元型ポリスルフィドは不安定なため、試料をチオール反応試薬であるモノプロモビマンと反応させた後、ポリスルフィド-ビマン付加体として定量を行った。この定量法を用いて、マウスの各種臓器（心臓、脳、肝臓）ホモジネートおよび血漿中のポリスルフィドレベルを測定した。また、健常ボランティアから採取したヒト血漿中のポリスルフィドレベルも同様に測定を行った。
- 2) 生体内でのポリスルフィドの生成メカニズムを明らかにするために、システイン代謝に関わる酵素であるシスタチオニン β-シターゼ (CBS) およびシスタチオニン γ-リアーゼ (CSE) の組換え蛋白質を用いて、各種基質（システイン、ホモシステインなど）添加後の酵素反応生成物を HPLC-MS/MS により定量解析した。
- 3) ddY マウスにインフルエンザウイルス

(H2N2 Kumamoto 株、2 LD₅₀ 量) を経鼻感染させ、感染 5 日後および 7 日後に肺組織と血漿を採取した。肺ホモジネートおよび血漿中の各種ポリスルフィドレベルを上記方法により測定した。

C. 研究結果

- 1) マウス臓器中では、様々なレベル (nM から μM) で各種ポリスルフィドが生成しており、特にグルタチオンポリスルフィドは 100 μM を超える高い濃度で存在することが示された。また、マウスおよびヒトの血漿中でも各種ポリスルフィドが検出され、定量が可能なことが分かった。
- 2) 組換え CBS および CSE の酵素反応生成物を解析した結果、これらの酵素がシステインやホモシステインを基質として、非常に効率よくシステインポリスルフィドやホモシステインポリスルフィドを生成することが示された。
- 3) インフルエンザウイルス肺炎モデルマウスでは、非感染コントロールマウスに比べ、肺ホモジネートおよび血漿中の各種ポリスルフィドが低下する傾向が見られた。ポリスルフィドの低下は、重篤な肺炎へと進行する感染後 7 日目で顕著であり、ARDS による酸化ストレスとポリスルフィドの低下との関連性が示唆された。

D. 考案

8-ニトロ-cGMP は、生体内において ROS・NO に依存して生成し、蛋白質 S-グアニル化を介して酸化ストレス応答に重要な役割を果たしている。最近我々は、ポリスルフィドが、8-ニトロ-cGMP と反応することにより、酸化ストレスにおけるシグナル活性を制御していることを見出した。今回、安定同位体希釈法と HPLC-MS/MS を用いた各種ポリスルフィドの定量的解析システムにより、マウスやヒトの臓器ホモジネートや血漿試料中に各種ポリスルフィドが

様々なレベルで存在することが明らかとなった。これは、生体内ポリスルフィドの生成を定量的に明らかにした世界で初めての成果と思われる。また、生体内におけるポリスルフィドの生成メカニズムとして CBS、CSE などの酵素が主要な役割を果たしていることが示された。さらに、インフルエンザ肺炎モデルマウスにおいて生体内ポリスルフィドの低下が観察され、肺炎病態との関連が示唆された。このことは、肺炎に伴う酸化ストレスがポリスルフィドの低下に関与していることを示唆しており、8-ニトロ-cGMP シグナル制御と肺炎病態の進展との関連が考えられる。今後、ポリスルフィドによる8-ニトロ-cGMPによる酸化ストレス応答シグナルの制御機構をさらに詳細に解析することにより、ARDS 発症メカニズムの解明がさらに進むことが期待される。

また、我々は、8-ニトロ-cGMP による酸化ストレス応答シグナルの制御因子としてポリスルフィドに注目してきたが、今回の定量的解析結果から、実はポリスルフィドが生体内の主要な抗酸化システムとして機能していることが示唆された。ポリスルフィドは血漿試料を用いて定量することが可能であり、ARDS 病態とポリスルフィドの関連性についてさらに詳細に解析を進めることにより、インフルエンザ肺炎における酸化ストレスのバイオマーカーとしてのポリスルフィドの有用性が明らかになってくるものと考えられる。

E. 結論

今回、HPLC-MS/MS による生体内ポリスルフィドの定量的解析システムを確立した。今後、生体内ポリスルフィドは、重症肺炎・ARDS をはじめとして様々な感染・炎症病態において、酸化ストレスバイオマーカーとしての臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shigemoto Fujii and Takaaki Akaike. Redox signaling by 8-nitro-cyclic guanosine monophosphate: nitric oxide- and reactive oxygen species-derived electrophilic messenger. *Antioxid Redox Signal*. in press, 2013.
- 2) Md. Mizanur Rahaman, Tomohiro Sawa, Ahmed Khandaker Ahtesham, Shahzada Khan, Hirofumi Inoue, Atsuhiko Irie, Shigemoto Fujii, and Takaaki Akaike. S-Guanylation proteomics for redox-based mitochondrial signaling. *Antioxid Redox Signal*. in press, 2013.
- 3) Takahiro Joudoi, Yudai Shichiri, Nobuto Kamizono, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Jun Yoshitake, Naotaka Yamada, and Sumio Iwai. Nitrated cyclic GMP modulates guard cell signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. in press, 2013.
- 4) Takaaki Akaike, Motohiro Nishida, and Shigemoto Fujii. Regulation of redox signalling by an electrophilic cyclic nucleotide. *J Biochem*. 153:131-138, 2013.
- 5) Yuki Kurauchi, Akinori Hisatsune, Yoichiro Isohama, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, and Hiroshi Katsuki. Nitric oxide/soluble guanylyl cyclase signaling mediates depolarization-induced protection of rat mesencephalic dopaminergic neurons from MPP(+) cytotoxicity. *Neuroscience*. 231:206-215, 2013.
- 6) Kaori Watanabe, Yu Ishima, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Teruo Kuroda, Wakano Ogawa, Hiroshi Watanabe, Ayaka Suenaga, Toshiya Kai, Masaki Otagiri, and Toru Maruyana. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. *FASEB J*. 27:391-398, 2013.
- 7) Kohta Oyama, Shahzada Khan, Tatsuya Okamoto, Shigemoto Fujii, Katsuhiko Ono, Tetsuro Matsunaga, Jun Yoshitake, Tomohiro Sawa, Junko Tomida, Yoshiaki Kawamura, and Takaaki Akaike. Identification of and screening for human *Helicobacter cinaedi* infections and

- carriers via nested PCR. *J Clin Microbiol.* 50:3893-3900, 2012.
- 8) Yohei Saito, Tomohiro Sawa, Jun Yoshitake, Chisato Ito, Shigemoto Fujii, Takaaki Akaike, and Hirokazu Arimoto. Nitric oxide promotes recycling of 8-nitro-cGMP, a cytoprotective mediator, into intact cGMP in cells. *Mol Biosyst.* 8: 2909-2915, 2012.
 - 9) Motohiro Nishida, Tomohiro Sawa, Naoyuki Kitajima, Katsuhiko Ono, Hirofumi Inoue, Hideshi Ihara, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto, Makoto Suematsu, Hitoshi Kurose, Albert van der Vliet, Bruce A Freeman, Takahiro Shibata, Koji Uchida, Yoshito Kumagai, and Takaaki Akaike. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat Chem Biol.* 8: 714-724, 2012.
 - 10) Shang Guoguo, Takaaki Akaike, Jiang Tao, Chen Qi, Zhang Nong, and Li Hui. HGF-mediated inhibition of oxidative stress by 8-nitro-cGMP in high glucose-treated rat mesangial cells. *Free Radic Res.* 46: 1238-1248, 2012.
 - 11) Yoshifumi Sato, Mitsutoki Hatta, Md. Fazlul Karim, Tomohiro Sawa, Fan-Yan Wei, Shoki Sato, Mark A. Magnuson, Frank J. Gonzalez, Kazuhito Tomizawa, Takaaki Akaike, Tatsuya Yoshizawa, and Kazuya Yamagata. Anks4b, a novel target of HNF4 α interacts with GRP78 and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *J Biol Chem.* 287: 23236-23245, 2012.
 - 12) Takatsugu Goto, Yoshitoshi Ogura, Hideki Hirakawa, Junko Tomida, Yuji Morita, Takaaki Akaike, Tetsuya Hayashi, and Yoshiaki Kawamura. Complete genome sequence of *Helicobacter cinaedi* strain PAGU611, isolated in a case of human bacteremia. *J Bacteriol.* 194: 3744-3745, 2012.
 - 13) Yu Ishima, Hitomi Hoshino, Takuya Shinagawa, Kaori Watanabe, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Ulrich Kragh-hansen, Toshiya Kai, Hiroshi Watanabe, Toru Maruyama, and Masaki Otagiri. S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. *J Pharm Sci.* 101: 3222-3229, 2012.
 - 14) 藤井重元、赤池孝章. 硫化水素と炎症. 感染・炎症・免疫 42: 235-237, 2012.
 - 15) 赤池孝章. 概論：活性酸素によるレドックス制御の新たなパラダイム転換に迫る. 実験医学増刊：活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患（山本雅之監修, 赤池孝章, 一條秀憲, 森 泰生編集）30: 2690-2696, 2012.
 - 16) 澤 智裕、赤池孝章. ROS・親電子リガンドとガス状分子のシグナルネットワーク. 実験医学増刊：活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患（山本雅之監修, 赤池孝章, 一條秀憲, 森 泰生編集）30: 2740-2745, 2012.
 - 17) 藤井重元、赤池孝章. NO シグナリング NO signaling. イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード事典（山本雅, 仙波憲太郎, 山梨裕司 編）. 羊土社, p.67-69, 2012.
2. 学会発表
- 【国際学会】
- 1) Takaaki Akaike, Motohiro Nishida, and Tomohiro Sawa. Nitrated cyclic nucleotide mediates endogenous electrophilic signaling for Ras-dependent senescence and autophagy. The 33rd Naito Conference on Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases. (Sapporo, JAPAN), June 26-29, 2012.
 - 2) Takaaki Akaike, Hideshi Ihara, and Tomohiro Sawa. 8-SH-cGMP endogenously formed from 8-nitro-cGMP as a second messenger of hydrogen sulfide. The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide. (Edinburgh, UK), July 22-26, 2012.
 - 3) Takaaki Akaike. Hydrogen sulfide regulation for electrophile-mediated ROS signaling. Second International Conference on H₂S Biology and Medicine. (Atlanta, USA), September 20-22, 2012.
- 【国内学会】
- 1) 赤池孝章. 感染防御における活性酸素シグナル制御と破綻. 第65回日本細菌学会中国・四国支部総会. 徳島市, 10月, 2012.

- 2) 赤池孝章. 硫化水素によるレドックスシグナル制御：新しいセカンドメッセンジャー 8-SH-cGMP の発見. 第 12 回日本 NO 学会学術集会. 神戸市, 6 月, 2012.
- 3) 赤池孝章. レドックスシグナル制御と酸化ストレスバイオマーカー. 第 20 回日本精神科救急学会学術総会. 奈良市, 10 月, 2012. Takaaki Akaike. Persulfide regulation of redox signaling involving unique polysulfur biology. 第 85 回日本生化学会大会. 福岡市, 12 月, 2012.

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

H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス遺伝子検査系の評価

研究分担者 影山 努

国立感染研究所インフルエンザウイルス研症究センター第二室 室長

研究要旨：

海外における H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染は、WHO による 2003 年以降の集計では、2013 年 2 月現在、世界 15 カ国で 615 人の感染例と 364 人の死亡例が確認されている。2013 年に入ってからカンボジアでは 5 人の感染例が確認されるなど、未だ流行が収束する気配は無い。H5N1 感染の診断には H5 亜型の同定が必要であるが、現在、多くの国々ではコンベンショナル RT-PCR 法やリアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検査により H5 亜型の同定が行われている。しかしこれらの遺伝子検査は、検体からの核酸精製を必要とし、反応に必要な試薬調製等の作業も煩雑なため、ラボコンタミネーションや検体の取り違えといった偽判定が起こる可能性が常にある。このため遺伝子検査等の実験室診断に熟練した技術者を必要としなくても、病院やクリニックなどの最小限の施設で、簡便かつ迅速に H5 亜型を同定できる遺伝子検査系の導入が待たれている。Direct RT-LAMP 法は、検体からの核酸精製を必要とせず、検体をバッファーに懸濁するだけで、RT-LAMP 反応を行う事ができる遺伝子診断系である。臨床検体を用いて A 型および H5 亜型同定ができる遺伝子診断系について評価検討を行った。

A. 研究目的

H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1-HPAI)は、2003 年以降、東南アジア地域から中国、ロシア、中東、アフリカ、ヨーロッパ諸国へと流行が広がり、現在でもわが国も含めて、野鳥および家禽を中心とした流行が続いている。このウイルスに感染した鳥との濃厚接触により、ヒトへの感染例も多数報告され、2003 年以降 2013 年 2 月までに 15 カ国 615 人の感染者および 364 人の死者が確認されている。こ

の H5N1-HPAI はブタなどのほ乳類にも感染するため、例えば、ヒト・鳥・ブタインフルエンザウイルスが同時に感染した場合にはこれらのウイルス同士の遺伝子交雑により、新たなインフルエンザウイルスが出現する可能性がある。また、同時感染ではなくても、家禽での流行により、鳥からヒトへの感染の機会が増加する事で、突然変異によりヒトからヒトへ感染しやすい新たなウイルスが出現する可能性がある。

このようなウイルスの出現をモニターす

る、あるいはこのようなウイルスが出現してヒトの間で流行するようになった際に、迅速に診断できる検査系をあらかじめ構築しておく事は重要である。

現在、多くの国々ではコンベンショナル RT-PCR 法やリアルタイム RT-PCR 法などの遺伝子検査により H5 亜型の遺伝子診断が行われている。しかしこれらの方法は、検体からの核酸精製を必要とし、反応に必要な試薬調製等の操作も非常に煩雑なため、ラボコンタミネーションや検体の取り違えといった偽判定の可能性が少なからずある。そのためこれらの検査を行うためには、熟練した技術を持った検査員による実験室診断が必要なため、病院やクリニックなど実験室を持たない施設では導入は難しかった。また、H5N1-HPAI 発生国の多くは発展途上国であり、流行地域の現場においては、診断もままならない状況であり、H5N1-HPAI のヒトへの感染状況も正確に把握できない状況である。

本研究では、核酸精製作業が不要で、これらの従来の RT-PCR 法による遺伝子検査法に比べて操作性がより簡便で、短時間で結果が得られる Direct Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification 法 (Direct RT-LAMP 法: 栄研化学(株))を利用して、昨年度に構築した簡便な H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス遺伝子検査系をさらに改良し、臨床検体を用いた検出系の評価を行う予定である。

B. 研究方法

Clade 1、2.1、2.2、2.3 に対してどの Clade にも反応するように、RT-LAMP 用のプライマーを再設計し、ベトナム国立衛生疫学研

究所(ハノイ)およびホーチミンパスツール研究所にて、Direct RT-LAMP 法を用いた H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス遺伝子検査系の評価を 3 月に行う予定である。

C. 研究結果

患者より採取した鼻腔拭い液などの臨床検体は、ウイルス分離や RT-PCR 検査が主体となるため、研究所にはウイルス輸送培地に懸濁されて輸送される。昨年度は、Loopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬を用いてウイルス輸送培地から抽出を行ったため、検体採取時よりかなり低濃度のウイルス量で検査を行う事になるため、検出効率が非常に悪くなってしまふ事が考えられた。本年度はこのウイルス輸送培地をなるべく多く持ち込めるように、試薬組成を変更した前処理液を使用し、またより高感度に検出できるように蛍光インターカラー剤を利用した RT-LAMP 法の構築を行い、臨床検体を用いてこれら検出系の検証を行う予定である。

D. 考案

現在、家禽および野鳥で流行している H5N1-HPAI は、赤血球凝集素 (HA) の遺伝的系統から Clade 0 から 10 のグループに分類されており、ヒトへの感染例のほとんどは Clade 1(2004 年以降、主にベトナムで流行した株)または Clade 2 に分類されたウイルスにより起きている。2006 年以降、Clade 2 はさらに 3 つの sub-clade に細分されており Clade 2.1 は、主にインドネシアで 2005 年以降に流行している株、Clade 2.2 は中国青海湖、中東、アフリカ、ヨーロッパ等の

地域で流行している株、Clade 2.3 は中国南部や東南アジアで流行している株が含まれる。さらに現在では Clade 2.1 は Clade 2.1.1～2.1.3、Clade 2.3 は 2.3.1～2.3.4 に細分されており（現在は、例えば Clade 2.1.3 は 2.1.3.1～2.1.3.3 のようにさらに細分されている）、H5N1-HPAI の遺伝的な多様性が広がっている。H5N1-HPAI の診断には、こうした遺伝的な違いに関係なく、全ての H5N1-HPAI 流行株を高感度かつ特異的に検出できる検査系でなければならない。今回、改良する RT-LAMP 法では、ベトナムでの流行の主体である Clade 2.3 についても反応性が良くなる事が期待されており、また、抽出過程におけるウイルス濃度の希釈度合いが低くなるため、より高感度に検出できる事が期待される。

E. 結論

インフルエンザ検査に必要な検体は、通常はスワブを用いて鼻腔拭い液、咽頭拭い液、あるいは鼻腔吸引液等を患者より採取して用いる。日本においてはウイルス分離や RT-PCR 検査を行うためには、病院等で採取した検体をウイルス輸送培地に懸濁して地方衛生研究所や国立感染症研究所に送付して検査を行う事になっている。ベトナムでも同様にして、病院からベトナム国立衛生疫学研究所やホーチミンパスツール研究所に検体を送付し、そこで検査が行われている。これらの施設で検査を行う際は、ウイルス輸送培地を利用して遺伝子検査を行うため、検出感度を良くするには遺伝子検査に持ち込む検体量を多くする必要がある。リアルタイム RT-PCR 法など従来の遺伝子診断法では、検体由来の夾雑物による

反応阻害の影響を少なくするために、検体からの核酸抽出を別に行う必要があるが、RT-LAMP 法では、これら反応阻害物に対して RT-PCR 法に比べると寛容であるため、必ずしも核酸精製を行わなくても、RT-LAMP 反応を行う事ができる。ウイルス輸送培地に懸濁された検体は、既にウイルスや検体由来物の濃度が薄まっているため、反応阻害の影響も少なく、Loopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬(4mL の抽出液に対し検体を～100 μ L 程添加して抽出を行う)を大量に用いなくても、抽出液が不要あるいは抽出液を使用しても極少量(検体量の 1/2 から 1/10 量程)の使用で RT-LAMP 反応を行う事ができるようになると考えられる。抽出時における検体の希釈度合いを少なくする事で、RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断をより高感度に行える事が期待される。

一方、Direct RT-LAMP 法は、従来の RT-PCR 法などの遺伝子検査に比べると、操作性や迅速性に優れてはいるが、遺伝子診断を行うクリーンな環境が整っていない病院やクリニックなどでこの検査を行うには、ピペットターを用いた分注作業があるため陽性コントロールやサンプル同士の混入などによるコンタミネーションのリスクが高く、遺伝子検査として臨床現場で行うはまだまだ問題が多い。臨床現場でイムノクロマト法などによる迅速診断キットを用いた検査並に、遺伝子検査を行うためには、簡便でコンタミネーションフリーな遺伝子検査系の開発が必須と考えられる。

現在、マルチプレックス型のマイクロ流路チップを用いた改良型 Direct RT-LAMP 遺伝子診断キットの開発を行っている。こ

の遺伝子診断キットは、検体採取後、抽出液に検体を懸濁し、反応試薬塗布済みのマイクロ流路チップにこの懸濁液を自動注入(ピペッター操作も不要で検体懸濁液の入ったチューブをチップに差し込むだけ)し、等温維持(63°C)できる蛍光検出装置に入れるだけで、Direct RT-LAMP 法を利用した遺伝子検査を行う事ができ、ピペッターなどを用いた分注操作が一切ないため、遺伝子検査で絶対に排除しなければならないコンタミネーションの心配が全くない。どんな診断検査でも RT-LAMP 法による診断系が構築できていれば、マイクロ流路チップ利用によるコンタミネーションフリーな遺伝子検査が可能になる。今後は本研究結果を踏まえて、一度にインフルエンザウイルスの A 型、B 型、H1pdm 亜型、H3 亜型、H5 亜型をタイピングも可能であり、検出)できる検査キットの構築を行い、日本のみならずベトナムなどの H5N1-HPAI 発生国において、臨床現場あるいは研究所などで本キットの有用性を評価する予定である。本診断系は臨床現場においてインフルエンザの診断のみならず、他の呼吸器感染症ウイルスの同定などにも応用でき、これまで詳細な調査ができなかった不顕性感染の有無や、臨床現場において様々な病原体サーベイランスに活用するなどして、様々な感染症の予防や治療・診断などの感染症対策に大きく寄与できる事が可能と考えられる。

F. 健康危険情報

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, Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. Japanese Journal of Infectious Diseases 65(1):19-27, 2012.
- 2) Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. Journal of Virological Methods 188(1-2):73-75, 2013.
- 3) Nobuhiro Takemae, Tung Nguyen, Long Thanh Ngo, Yasuaki Hiromoto, Yuko Uchida, Vu Phong Pham, Tsutomu Kageyama, Shizuko Kasuo, Shinichi Shimada, Yasutaka Yamashita, Kaoru Goto, Hung Vo Van, Do Thi Hoa, Tsuyoshi Hayashi, Aya Matsuu, Takehiko Saito. Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam. Archives of Virology. (in press)

2. 学会発表 該当なし

【国内会議】

3. その他

- 1) 影山 努. インフルエンザ診断検査の技術的課題と精度管理について. 衛生微生物技術協議会総会第 33 回研究会. 2012 年 6 月 該当なし
- 2) 大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断の臨床的検討. 第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012 年 10 月
- 3) 田中智子、大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. 中枢神経症状を呈した A/H3 亜型、B 型インフルエンザウイルス重複感染の 2 例. 第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012 年 10 月
- 4) 高山郁代、中内美名、大場邦弘、田代真人、影山 努. 蛍光標識プライマーを用いた Direct RT-LAMP 法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の構築. 第 59 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012 年 11 月
- 5) 影山 努、高山郁代、中内美名、田代真人、大場邦弘. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断法の開発. 第 59 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

平成 24 年度
班会議プログラム

平成 24 (2012) 年度 第 1 回班会議

プログラム

日時：平成 24 年 7 月 27 日(金)

9 : 30-受付 10 : 00~17 : 00

会場：国立国際医療研究センター

5 階大会議室

10 : 00-10 : 10 **開会の辞** (河内正治：国立国際医療研究センター手術部麻酔科)

10 : 10-10 : 20

**0-1 『高病原性鳥インフルエンザの診断・治療に関する国際連携研究 (H22-新興-一般-014)
- Overview と手引きの作成進展状況についての報告 -』**

河内正治 (研究代表者/ 国立国際医療研究センター手術部麻酔科)

10 : 20-11 : 40

臨床班 座長：本間 栄

**1-1 『特発性肺線維症急性増悪 (びまん性肺胞傷害) における予後因子解析ならびに
血中レドックスバランス・サイトカインの動向』**

杉野圭史、菊池 直、本間 栄 (東邦大学医療センター大森病院呼吸器内科)

1-2 『H5N1 高病原性鳥インフルエンザ剖検組織の病理学的解析 NHP-ハノイの 5 症例』

中島典子¹、佐藤由子¹、長谷川秀樹¹、佐多徹太郎²

¹国立感染症研究所・感染病理部、²富山県衛生研究所

1-3 『ライノウイルス感染で重症 ARDS を呈した 11 症例の解析』

布井博幸¹、河内正治²、岡本竜哉²、Thuy T.B. Phung³、San T. Luong³、Liem T. Nguyen³、
本間 栄⁴、鈴木和男⁵

¹宮崎大学医学部生殖発達学講座、²国立国際医療研究センター、³ハノイ国立小児病院-ベトナム、

⁴東邦大学医療センター、⁵帝京大学医学部

**1-4 『ハノイ国立小児病院 PICU における肺内要因の ARDS(FARDS)症例 (2007-2012) の
先行的研究』**

河内正治^{1,2}、布井博幸⁴、中島典子⁵、岡本竜哉^{1,2}、鈴木和男^{2,3}

Nguyen Thanh Liem⁶、Luong Thi San⁶、Thuy Thi Bich Phung⁶

¹国立国際医療研究センター NCGM : National Center for Global Health and Medicine