

学位論文

Doctor's Thesis

自己免疫疾患モデルマウスを用いたぶどう球菌腸管毒素誘導による  
間質性肺炎におけるフリーラジカルの関与

(Role of free radicals and effects of iNOS and xanthine oxidase inhibitors on  
staphylococcal enterotoxin B-induced interstitial pneumonia in autoimmune-  
prone mice)

宮川 比佐子

Hisako Miyakawa

指導教官

安藤正幸 元教授

菅 守隆 助教授

熊本大学大学院医学研究科内科学第一講座

2002 年 3 月

# 学位論文

## Doctor's Thesis

論文名：自己免疫疾患モデルマウスを用いたぶどう球菌腸管毒素誘導  
による間質性肺炎におけるフリーラジカルの関与  
(Role of free radicals and effects of iNOS and xanthine oxidase  
inhibitors on staphylococcal enterotoxin B-induced interstitial  
pneumonia in autoimmune-prone mice)

著者名：宮川 比佐子

Hisako Miyakawa

指導教官名：内科学第一講座 元教授

安藤 正幸

内科学第一講座 助教授

菅 守隆

審査委員名：微生物学講座担当教授

前田 浩

分子遺伝学講座担当教授

森 正敬

病理学第一講座担当教授

吉永 秀

分子病理学講座担当教授

山本哲郎

2002年3月

## 目次

1. 要旨	1
2. 発表論文リスト	5
3. 謝辞	6
4. 略語一覧	7
5. 研究の目的と背景	9
5-(1) 自己免疫疾患に伴う間質性肺炎	
5-(2) スーパー抗原	
5-(3) スーパー抗原と自己免疫疾患	
5-(4) フリーラジカル	
5-(5) 自己免疫疾患とフリーラジカル	
5-(6) 自己免疫疾患モデルマウス	
5-(7) 本研究の目的	
6. 実験方法	16
6-(1) 試薬及び抗体	
6-(2) マウス	
6-(3) マウスへの経気道的 SEB 投与	
6-(4) iNOS 及び XO 阻害剤の投与	
6-(5) 肺の病理組織学的検査	
6-(6) 気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL)	
6-(7) Nitrite/nitrate の測定	
6-(8) Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy	
6-(9) 免疫組織化学	
6-(10) XO 及び xanthine dehydrogenase (XD) 活性の測定	
6-(11) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)	
6-(12) NOS-inducing activity の定量的解析	

6-(13)	ELISA	
6-(14)	統計学的解析	
7.	実験結果	21
7-(1)	SEB 投与後の病理学的変化における iNOS 及び XO 阻害剤の効果	
7-(2)	SEB 投与後の BAL 細胞所見における iNOS 及び XO 阻害剤の効果	
7-(3)	Nitrite/nitrate の産生及び iNOS 及び XO 阻害剤の効果	
7-(4)	直接的 NO の検出及び iNOS 及び XO 阻害剤の効果	
7-(5)	免疫組織化学による iNOS、nitrotyrosine の発現	
7-(6)	XO 酵素活性及び XO 阻害剤の効果	
7-(7)	BAL 細胞における iNOS 及び XO/XD mRNA の発現	
7-(8)	NOS-inducing activity の定量的解析	
7-(9)	BALF 中のサイトカインの発現及び iNOS 及び XO 阻害剤の効果	
8.	考察	24
9.	結語	28
10.	参考文献	29
11.	図及びその説明	36

## 1. 要旨

自己免疫疾患では肺に病変が形成される頻度が高く、この肺病変の存在は患者の予後、QOL を規定している重要な因子のひとつである。自己免疫性疾患における肺病変は間質性肺炎を始め、肺胞出血、末梢気道炎、胸膜炎、血管炎などの多彩な病像を呈するが、その発生機序は不明である。自己免疫疾患の発生機序には遺伝的要素と環境的要素の関与が考えられており、最近環境因子の一つとしてスーパー抗原の関与が報告されている。Shinbori らは自己免疫疾患モデルマウス（MRL-lpr/lpr マウス、MRL-+/+マウス、NZB/W F1 マウス）と細菌性スーパー抗原（staphylococcal enterotoxin B: SEB）を用いて、自己免疫疾患における肺病変の発症にスーパー抗原が関与することを明らかにした。次に、我々は気管支肺胞洗浄液（bronchoalveolar lavage fluid: BALF）の解析を行い、この自己免疫疾患モデルにおける間質性肺炎の発生機序には、SEB に反応性の  $V\beta 8^+$ T 細胞の増加と、SEB によって活性化された T 細胞や炎症細胞が肺胞腔内で重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。更に今回、自己免疫疾患モデルにおける間質性肺炎の発生機序における酸化ストレスとニトロ化ストレスの役割について検討した。

近年、肺傷害や線維化の病因の一つに活性酸素種（reactive oxygen species: ROS）や反応性窒素酸化物（reactive nitrogen species: RNS）の関与が報告されている。また以前より、一酸化窒素（nitric oxide: NO）が自己免疫疾患の組織傷害におけるメディエーターとして機能する可能性が示唆されている。本研究では自己免疫疾患における間質性肺炎に認められる肺胞上皮細胞障害が下気道に存在する酸化ストレスやニトロ化ストレスの増強によってもたらされている可能性があるかと仮定した。そこでこの SEB を MRL-+/+マウスに経気道的に投与し、NO 及びスーパーオキシド（superoxide anion:  $O_2^-$ ）の産生を直接的、間接的に検討した。またこれらの阻害剤を投与することによる炎症性サイトカインの変化や BAL 細胞数、肺病変の変化を検討した。NO の代謝産物である nitrite/nitrate は SEB 投与 3 日後の BALF 及び血清中で増加しており、このことは Electron Paramagnetic Resonance (EPR) 法を用いた直接的 NO の検出にても確認された。この増加した NO の産生量は inducible NO synthase (iNOS) 阻害剤を投与することにより減少した。肺、BALF、血漿中の xanthine oxidase (XO) 活性も SEB 投与 3 日後にピークを認め、XO 阻害剤で抑制された。更に iNOS や XO 阻害剤の投与にて BALF 中のサイトカイン産生量、総細胞数の減少を認め、そして肺病変が改善された。

以上の結果より、本自己免疫疾患モデルにおける間質性肺炎の発生には NO 及び  $O_2^-$  の

過剰産生が重要な役割を果たしており、更に iNOS 及び XO 阻害剤がこのモデルにおいて防御的効果を持つことが示唆された。これらの結果は間質性肺炎における胞隔炎と線維化に対する今後の治療戦略を考える上で重要な知見と考えられた。

## Summary

The lung is frequently involved in autoimmune disease and lung complications are critical in determining prognosis and threaten the quality of life of patients with autoimmune diseases. Although common histological findings include interstitial pneumonia (IP), pulmonary vasculitis, alveolar hemorrhage, and pleuritis, the pathogenesis remains unclear. Genetic and environmental factors are known to contribute to the pathogenesis of autoimmune diseases, and recently the role of superantigens in the induction and relapse of these diseases has been suspected as one of the environmental factors. To examine whether superantigens participate in the development of IP in autoimmune diseases, Shinbori et al. instilled the bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB) into the tracheas of autoimmune strains, MRL-*lpr/lpr*, MRL-*+/+*, and NZB/W F1 mice and non-autoimmune strain mice. The intratracheal administration of SEB resulted in the induction of IP manifested by infiltration of inflammatory cells into alveolar septal walls and periarterial space and an increase of pulmonary interstitial collagen fibers in the autoimmune strain mice. These data suggest that bacterial superantigens may be involved in the development of IP associated with autoimmune diseases. To further study the mechanisms underlying the development of IP in autoimmune diseases, we analyzed bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from the autoimmune strain mice with IP, which was induced by the intratracheal instillation of SEB. The numbers of total cells, macrophages, lymphocytes, and neutrophils increased in BALF from MRL-*+/+* mice instilled with SEB. Flow-cytometric analysis revealed the increase of SEB-reactive V $\beta$ 8<sup>+</sup> T cells in BALF. These data indicated that SEB-reactive cells play an important role in the bronchoalveolar space.

There has been an explosion of papers in the last several years arguing that both reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are involved in the pathogenesis of lung injury and fibrosis. Extensive circumstantial evidence suggests that nitric oxide (NO) can function as a mediator of tissue damage in autoimmune diseases. We hypothesize that the alveolar

epithelial cell injury that characterizes IP associated with autoimmune diseases may result, at least in part, from enhanced oxidative and nitrosative stress that may exist in the lower respiratory tract. Thus, we investigated involvement of NO and superoxide anion ( $O_2^-$ ) in the pathogenesis of IP in this autoimmune-prone mice. Nitrite/nitrate levels were increased in BALF and serum from SEB-injected mice, and peaked at 3 days after SEB instillation. The generation of NO was detected directly by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, confirming the nitrite/nitrate results. NO production was significantly decreased by inducible NO synthase (iNOS) inhibitor treatment. Xanthine oxidase (XO) activity in the lung, BALF, and plasma was increased with instillation of SEB, and peaked at 3 days. Moreover, both iNOS and XO inhibitors decreased production of proinflammatory cytokines, the numbers of total cell in BALF, and the area of the pathological changes in the SEB-injected lung. These data suggested that overproduction of NO and  $O_2^-$  was implicated in the pathogenesis of IP, and iNOS and XO inhibitors have protective effects against IP in this model.



## 2. 発表論文リスト

1. Miyakawa H., Sato K, Shinbori T, Okamoto T, Gushima Y, Fujiki M, Suga M. Effects of iNOS and xanthine oxidase inhibitors on SEB-induced interstitial pneumonia in mice. *Europ. Respir. J.* (In press)
2. Gushima Y, Ichikado K, Suga M, Okamoto T, Iyonaga K, Sato K, Miyakawa H., Ando M. Expression of matrix metalloproteinases in pigs with hyperoxia-induced acute lung injury. *Europ. Respir. J.* 18: 827-837, 2001.
3. Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H., Akaike T, Ando M. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162: 1949-1956, 2000.
4. Fujiki M, Shinbori T, Suga M, Miyakawa H., Mizobe T, Ando M. Bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B induces interstitial pneumonia in SCID mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from collagen vascular disease patients. *Clinical Immun.* 96: 38-43, 2000.
5. Fujiki M, Shinbori T, Suga M, Miyakawa H., Ando M. Role of T cells in bronchoalveolar space in the development of interstitial pneumonia induced by superantigen in autoimmune-prone mice. *Am. J. of Respir. Cell Mol. Bio.* 21: 675-83, 1999.
6. Iyonaga K, Suga M, Yamamoto T, Ichiyasu H, Miyakawa H., Ando M. Elevated bronchoalveolar concentrations of MCP-1 in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Europ. Respir. J.* 14: 383-9, 1999.

### 3. 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的にご支援下さいました熊本大学大学院医学研究科内科学第一講座 安藤正幸元教授及び菅守隆助教授に深く感謝いたします。

論文作成にあたりましては、熊本大学大学院医学研究科内科学第一講座 菅守隆助教授を始め、新堀俊文先生、佐藤圭創先生、岡本竜哉先生及び熊本大学大学院医学研究科内科学第一講座の皆様に深く感謝いたします。

#### 4. 略語一覽

BAL: bronchoalveolar lavage

BALF: bronchoalveolar lavage fluid

BOOP: bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia

DAB: diaminobenzidine

DAD: diffuse alveolar damage

DTCS: N-(Dithiocarboxy) sarcosine

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EPR: electron paramagnetic resonance

FCS: fetal calf serum

HRP: horse-radish peroxidase

IDDM: insulin-dependent diabetes mellitus

IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$

IIP: idiopathic interstitial pneumonia

IL-1 $\beta$ : interleukin-1 $\beta$

IPF: idiopathic pulmonary fibrosis

KRP: Krebs-Ringer phosphate

mAb: monoclonal antibody

MHC: major histocompatibility complex

NO: nitric oxide

iNOS: inducible NO synthase

NSIP: nonspecific interstitial pneumonia

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: superoxide anion

ONOO<sup>-</sup>: peroxynitrite

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PPB: potassium phosphate buffer

RA: rheumatoid arthritis

RNS: reactive nitrogen species

ROS: reactive oxygen species

RT-PCR: reverse transcriptase-PCR

SEB: staphylococcal enterotoxin B

TCR: T cell receptor

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$

UIP: usual interstitial pneumonia

XD: xanthine dehydrogenase

XO: xanthine oxidase

## 5. 研究の目的と背景

5-(1) では自己免疫疾患に伴う間質性肺炎について、5-(2) ではスーパー抗原につて、5-(3) ではスーパー抗原と自己免疫疾患との関連について、5-(4) フリーラジカルについて、5-(5) では自己免疫疾患とフリーラジカルについて、5-(6) では自己免疫疾患モデルマウスについて、5-(7) では本研究の目的を述べる。

### 5-(1) 自己免疫疾患に伴う間質性肺炎

膠原病は 1942 年に Klemperer により提唱された病理形態学的概念である。血管・結合組織を病変とする系統的疾患を包括したもので、自己免疫疾患に属する一連の疾患群の総称である。

膠原病において高頻度に病変を来す臓器の一つとして肺・胸郭が挙げられる。その病変は多様で、間質性肺炎、肺胞出血、末梢気道病変、胸膜炎、血管炎等の病像を呈する。これらのうち間質性肺炎は頻度も高く、経過・生命予後を規定する因子となる。膠原病に伴う間質性肺炎の病理組織像は多彩であり、usual interstitial pneumonia (UIP)、diffuse alveolar damage (DAD)、nonspecific interstitial pneumonia (NSIP)、bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia (BOOP) 等を呈する (Nagai, *et al.* 1997, Tazelaar, *et al.* 1990)。これらの病理像によって治療反応性が異なり、治療方針や予後推定等に関して病理形態の把握は重要である。また膠原病の典型的症状に先行した間質性肺炎の場合、治療反応性が悪く予後不良である特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia: IIP) / 特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) との鑑別が重要であり、膠原病に伴う間質性肺炎発症機序の解明は IIP の病態解明や肺の線維化の解明にも寄与すると考えられる。

### 5-(2) スーパー抗原

T 細胞レセプター (T cell receptor: TCR) は $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖または $\gamma$ 鎖、 $\delta$ 鎖からなり、 $\alpha$ 鎖は variable (V)、joining (J) 遺伝子セグメントが、 $\beta$ 鎖は V、diversity (D)、J 遺伝子セグメントが再構成されることにより、多様性が形成される。T 細胞による抗原認識は抗原提示細胞によりプロセッシングされた抗原ペプチドが抗原提示細胞上の主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex: MHC) 分子により形成される溝に結合し、特異的なレセプターを持つ T 細胞がこの MHC-抗原ペプチド結合体を認識する。従って T 細胞は抗原に対する TCR の特異性以外に MHC の拘束性を受ける。

一方、スーパー抗原は抗原提示細胞によるプロセッシングを受けることなく、直接 MHC クラス II 分子の溝の外側と TCR  $\beta$ 鎖 V 領域 (V $\beta$ ) に結合する (White, *et al.* 1989, Marrack, *et al.* 1990, Dellabona, *et al.* 1990)。スーパー抗原に反応する T 細胞のレパートリーは V $\beta$  の種類により決定される。通常の抗原が  $1/10^4 \sim 1/10^6$  の少数の T 細胞に認識されるのに対し、スーパー抗原は数%~20%程度の非常に大きなレパートリーの T 細胞に認識され、T 細胞の活性化を誘導する。最近、MHC クラス II 分子の溝に結合している抗原ペプチドがスーパー抗原に影響するという報告 (Wen, *et al.* 1996) や、抗原提示細胞が MHC クラス I であっても、これに結合し T 細胞を活性化するという報告 (Häffner, *et al.* 1996) がある。

このような活性を持つスーパー抗原にはマウスの内因性ウイルス蛋白等の内因性スーパー抗原と細菌・ウイルス等から産生される蛋白である外因性スーパー抗原がある。外因性スーパー抗原を産生するものとして、細菌では *Staphylococcus aureus*、Group A streptococci、*Mycoplasma arthritidis*、*Yersinia pestis* 等が、ウイルスでは Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)、Rabies virus、Epstein-Barr virus 等が報告されている (Michie, *et al.* 1998)。

### 5-(3) スーパー抗原と自己免疫疾患

自己免疫疾患の発症には遺伝的要因のみでなく、環境的要因の関与も考えられている。近年ヒトのサンプルや動物実験モデルを用いた研究で、この環境因子としてのスーパー抗原が自己免疫疾患の発症や再発に関与しているという報告がある。

#### (I) Rheumatoid arthritis (RA)

RA 患者の関節腔内に浸潤している T 細胞のレパートリーを解析したところ、V $\beta$ 14<sup>+</sup>T 細胞の割合が末梢血に比べ増加していたという報告 (Paliard, *et al.* 1991) や、V $\beta$ 3<sup>+</sup>T 細胞、V $\beta$ 14<sup>+</sup>T 細胞、V $\beta$ 17<sup>+</sup>T 細胞の 3 種類が増加していたという報告 (Howell, *et al.* 1991) がある。また *in vivo* の実験ではスーパー抗原が滑膜細胞を活性化し、RANTES、monocyte chemoattractant protein-1、IL-8 等のケモカインの産生を誘導したという報告もある。

#### (II) Kawasaki disease (KD)

急性期・回復期患者の末梢血 T 細胞の TCR V $\beta$ の解析にて、急性期の患者では V $\beta$ 2<sup>+</sup>T 細胞、V $\beta$ 8.1<sup>+</sup>T 細胞が著増しており、回復期の患者ではこの傾向は認めないという報告がされた (Abe, *et al.* 1992)。さらにこの増加している V $\beta$ 2<sup>+</sup>T 細胞、V $\beta$ 8.1<sup>+</sup>T 細胞の TCR  $\beta$ 鎖の junctional region のシーケンスを施行したところ、かなりの多様性があり、V $\beta$ 2<sup>+</sup>T 細胞、V $\beta$ 8.1<sup>+</sup>T 細胞は polyclonal に増殖していたことより、急性期の T 細胞の活性化はスーパー抗原によるものという可能性が報告されている (Abe, *et al.* 1993)。その後も KD

の死亡例で、心筋・冠動脈に junctional region に多様性を持った  $V\beta^{2+}T$  細胞が多数浸潤したという報告や小腸粘膜に選択的に  $V\beta^{2+}T$  細胞が浸潤していたという報告がある。

### (III) Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)

Conrad らは IDDM の死亡症例において膵ランゲルハンス島（ラ島）で  $V\beta^{7+}T$  細胞の増加を認め、これらの T 細胞の junctional region には多様性がみられたと報告した (Cornad, *et al.* 1994)。その後、膵ラ島細胞の培養上清から内在性と考えられるレトロウイルス遺伝子を分離し、この遺伝子を導入した形質転換細胞上に発現した蛋白が IDDM 患者の T 細胞に対してスーパー抗原作用を持つことを明らかにし、これが自己免疫性糖尿病の発症に関与している可能性を示唆した (Cornad, *et al.* 1997)。

以上、スーパー抗原の関与が示唆されている数種の自己免疫疾患を挙げたが、この他にも multiple sclerosis (MS) や Sjögren syndrome 等の報告がある。一方、MS、RA 等では解析患者数の増加、多くの研究者による追試が施行されるに従い、特定の  $V\beta$ がどの患者でも著増しているわけではないという報告がある。スーパー抗原が自己免疫疾患の発症及び経過に関係しているか否かは、病変部で特定の  $V\beta^{7+}T$  細胞の expansion あるいは deletion が起きているという報告はあるものの、現在のところ明白ではない。

### 5-(4) フリーラジカル

フリーラジカルとは「1個またはそれ以上の不対電子を有する、独立して存在できる化学種」を指す。その中には酸素とその誘導体、オゾン、窒素酸化物、遷移金属等が含まれる。これらの中で活性酸素種及び窒素酸化物について以下に述べる。

#### (I) 活性酸素種

酸素の1電子還元で生じるスーパーオキシド (superoxide anion:  $O_2^-$ ) をはじめ1重項酸素、ヒドロキシルラジカル等の活性酸素は生体反応内で生成される。これらを生成する反応はオキシダーゼ反応と呼ばれ、これらの反応を触媒する酵素が存在する。代表的なものとして細胞膜に存在する NADPH オキシダーゼと細胞質内に存在するキサンチンオキシダーゼ (xanthine oxidase: XO) がある。細胞が種々の刺激を受けると、これらの酵素が活性化され  $O_2^-$ 生成能を獲得する。活性酸素は白血球やマクロファージによる生体防御機構、主として殺菌効果が強調されてきたが、病原体のみならず、周囲の細胞への非特異的傷害を起こしうる。そして生体内の標的は脂質、酵素、蛋白質、核酸等と多岐に渡る。

#### (II) 窒素酸化物

窒素酸化物の一つである一酸化窒素 (nitric oxide: NO) は生体内で NO synthase (NOS) によりアルギニンのグアニジノ基が酸化されて生成する。NOS には神経型 (neuronal NOS)、誘導型 (inducible NOS: iNOS)、内皮型 (endothelial NOS) の3種類がある。非刺激下では iNOS はマクロファージ、線維芽細胞、Th1 細胞や好中球といった細胞には発現していないが、ある種のサイトカインにより細胞が刺激を受けると iNOS の発現は著しく上昇する。NO は血管拡張因子、神経伝達物質としての作用のみならず、細胞傷害性やアポトーシスといった病理的作用が示唆されている (Gotoh, *et al.* 1999)。

NO は  $O_2$  と速やかに反応してペルオキシナイトライト (peroxynitrite: ONOO<sup>-</sup>) を生成する。これは生理的 pH 下では速やかに ONOOH となり、反応性に乏しい  $NO_3^-$  へと異化される。一方で ONOO<sup>-</sup> は生体内で蛋白 (チロシン残基、システイン残基など) や脂質、核酸などといった各種生体分子に対して高い化学反応性を有しており、 $NO_3^-$  への消滅反応を上回る速度でこれらの物質を酸化あるいはニトロ化し、更に  $CO_2$  と反応することにより、そのニトロ化反応が増強される (Lyman, *et al.* 1996)。ONOO<sup>-</sup> の病態生理活性としては生体内における蛋白ニトロ化反応による機能変化に加えて、過酸化脂質反応を促進させたり、細胞傷害やアポトーシスをもたらしたりすることが挙げられる (Beckman, *et al.* 1996, Rubbo, *et al.* 1996, Ischiropoulos, *et al.* 1998)。

#### 5-(5) 自己免疫疾患とフリーラジカル

マクロファージ、単球、好中球等により産生されたフリーラジカルは炎症の惹起に重要である。スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase: SOD) やその他のラジカル消去剤は若干のモデル系で皮膚の逆受動的アルサス反応のような炎症を抑制することが認められている。したがって、フリーラジカル及びその放出酵素が自己免疫疾患において重要な役割を果たしている可能性があり、これらを支持する報告がなされている。自己免疫疾患の代表的疾患である RA や systemic lupus erythematosus (SLE) について以下に述べる。

##### (I) RA

RA 患者の関節腔内の滑膜細胞や軟骨細胞、内皮細胞からの iNOS 過剰発現を認めたという報告 (Sakurai, *et al.* 1995) や RA 患者の末血単核球における iNOS の過剰発現を認めたという報告 (William, *et al.* 1996) がある。また自己免疫疾患マウスの実験では腎臓や脾臓で NO の産生が認められ、iNOS 阻害剤を投与することで関節炎や糸球体腎炎が改善した (Weinberg, *et al.* 1994)。NO は直接的組織傷害、二次的に  $O_2$  を産生、またサイトカイ



ンを産生するという働きによりこれらの関節炎等の発症に関与していることが示唆されている。

## (II) SLE

Emerit らは SLE 患者の血清中に「破壊因子 (clastogenic factor)」が含まれ、この因子がリンパ球から放出され、染色体傷害を引き起こすことを報告した (Emerit, *et al.* 1981, Michelson *et al.* 1982)。そしてこの作用に対して SOD が防御的効果を有することを示した。また SLE 患者の末血中の好中球は  $O_2$  や  $H_2O_2$  を多く産生しており、その活性は SLE の活動性に相関しているという報告がある (Via, *et al.* 1984, Niwa, *et al.* 1985)。更に SLE 類似症状を呈する自己免疫疾患マウスの腹腔マクロファージは  $O_2$  や  $H_2O_2$  を多く産生し、重症である程その量は増加する報告がある (Khan, *et al.* 1988)。またこのマウスに抗酸化剤を投与すると疾患の発現が減少し、マウスの平均寿命が延長することが見いだされている。

以上、フリーラジカルの関与が示唆されている代表的自己免疫疾患を挙げたが、この他にも IDDM 等の報告がある。一方、experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) や experimental autoimmune myocarditis (EAM) 等の確立された自己免疫疾患モデルマウスにおいても NO 等が増加しているという報告がある。フリーラジカルが自己免疫疾患における肺病変の発症及び経過に関係しているか否かは、現在のところ明白ではない。しかし、肺傷害や線維化の病因の一つに活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) や反応性窒素酸化物 (reactive nitrogen species: RNS) の関与が報告されており、また以前より、NO が自己免疫疾患の組織傷害におけるメディエーターとして機能する可能性が示唆されている (Stuehr, *et al.* 1985, McCartney-Francis, *et al.* 1993, Weinberg, *et al.* 1994)。

## 5-(6) 自己免疫疾患モデルマウス

自己免疫疾患を自然発症する動物モデルとして、マウスでは NZB、(NZB×NZB) F1、MRL/lpr、NOD 等の多くのモデルが知られている。我々は現在まで自己免疫疾患モデルとして MRL/Mp-lpr/lpr (MRL-lpr/lpr) マウス、MRL/Mp-+/+ (MRL-+/+) マウス、(NZB×NZW) F1 マウスを用いてきた。

### (I) MRL-lpr/lpr マウス、MRL-+/+マウス

AKR/J、C57BL/6J、C3H/Di、LG/J マウスとの交配あるいは退交配を通じて得られた MRL マウスを兄弟交配すると 12 代目に発現したリンパ節の著しい腫大を来した突然変異マウ

スが得られた。このリンパ節腫大を来したマウス MRL/l を 40 代、来さないマウスを 32 代、それぞれ兄弟交配した後、後者の近交系を MRL-+/+とした。このマウスに前者の MRL/l のリンパ節腫脹を発現する遺伝子 *lpr* (Fas 抗原の欠損型変異) を導入したコンジェニックマウスを作成し、これを MRL-*lpr/lpr* マウスとした (Murphy, *et al.* 1978)。MRL-*lpr/lpr* マウスは Fas 介在性アポトーシス不全により自己反応性 T 細胞を除去できず、全身リンパ節腫脹、関節炎、多発性動脈炎、糸球体腎炎等の多彩な自己免疫疾患を同一固体に自然発症し、膠原病疾患群モデルとして用いられている。一方、MRL-+/+マウスは抗 DNA 抗体、抗 Sm 抗体、リウマトイド因子、抗 gp70 抗体等の自己抗体が認められるが、その抗体価は MRL-*lpr/lpr* マウスと比して低値であり、上記疾患はほぼ発症しない (Theofilopoulos, *et al.* 1985、Nose, *et al.* 1989)。しかし *lpr* 遺伝子を他の近交系マウスに導入してもリンパ節腫脹、抗 DNA 抗体、リウマトイド因子等は認められるものの、腎炎、動脈炎、関節炎等は発症しないことより MRL-+/+マウスには自己免疫疾患を惹起する遺伝背景が存在すると考えられている (Nose, *et al.* 1990)。

#### (II) (NZB×NZW) F1 マウス

New Zealand マウスのうち NZB (H-2<sup>d</sup>) マウスは高力価の抗赤血球自己抗体、IgM クラス抗 DNA 抗体を産生する自己免疫性溶血性貧血のモデルマウスである。この NZB マウスに正常の自然歴を示す NZW (H-2<sup>k</sup>) マウスを交配した(NZB×NZW) F1(H-2<sup>d/k</sup>)マウスでは IgM クラス抗 DNA 抗体は低値で、IgG クラス抗 DNA 抗体の上昇、免疫複合体形成、ループス様腎炎発症等のヒトの SLE に類似した病態を発症する。コンジェニックマウスを用いた実験では H-2 ハプロタイプが *d/k* 型のヘテロ結合体であることがこのマウスの病態に必須であることが明白になり (Hirose, *et al.* 1986)、更に H-2<sup>d/k</sup> ヘテロ結合体を持ったコンジェニックマウス NZB、NZW マウスは(NZB×NZW) F1 マウスと比較すると同じ H-2<sup>d/k</sup> を有するにも関わらず IgG クラス抗 DNA 抗体の産生が低値であり、H-2 に連鎖しない NZB 及び NZW 両マウス由来の遺伝子の関与も必要であると判明した (Hirose, *et al.* 1990)。

#### 5-(7) 本研究の目的

自己免疫疾患の発症には遺伝的要因と環境的要因の関与が考えられており、近年この環境因子の一つとしてスーパー抗原の関与が報告されている。そこで自己免疫疾患における肺病変の発症に対するスーパー抗原の関与を調べる目的で、以前 Shinbori らは自己免疫疾患モデルマウス (MRL-*lpr/lpr* マウス、MRL-+/+マウス、NZB/W F1 マウス) と非自己免疫疾患モデルマウスに細菌性スーパー抗原である staphylococcal enterotoxin B (SEB) を経

気道的に投与した。その結果、自己免疫疾患モデルマウスでは間質性肺炎が誘導され、自己免疫疾患における肺病変の発症に対するスーパー抗原の関与が示唆された（図 1: Shinbori, *et al.* 1996）。その病理像では肺胞隔壁、肺血管周囲への炎症細胞の浸潤や線維芽細胞の浸潤領域における膠原線維の増生が認められた（図 2）。次に、我々はこの自己免疫疾患における間質性肺炎の発生機序を明らかにする目的で、この SEB 誘導間質性肺炎モデルマウスにおける気管支肺胞洗浄液（bronchoalveolar lavage fluid: BALF）の解析を行った。その結果、BALF 中の総細胞数、肺胞マクロファージ、リンパ球及び好中球の増加を認めた（図 3: Fujiki, *et al.* 1999）。また SEB に反応性の V $\beta$ 8<sup>+</sup>T 細胞が増加しており、SEB によって活性化された細胞が肺胞腔内で重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究では自己免疫疾患における間質性肺炎に認められる肺胞上皮細胞傷害が下気道に存在する酸化ストレスやニトロ化ストレスの増強による可能性があるかと仮定し、自己免疫疾患における間質性肺炎の発症に対するフリーラジカルの関与を調べる目的で、この SEB 誘導間質性肺炎モデルマウスにおける iNOS 及び XO 阻害剤を投与することによる炎症性サイトカイン産生や BAL 細胞数、肺病変の変化を評価した。また、このモデルにおける局所及び全身の NO 及び O<sub>2</sub><sup>-</sup>の産生を直接的、間接的に検討した。

## 6. 実験方法

### 6-(1) 試薬及び抗体

pentobarbital は Abbot 社 (North Chicago, IL) より購入した。SEB、aminoguanidine (AG)、pterine、allopurinol、methylen blue、leupeptin、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) は Sigma Chemical 社 (St. Louis, MO) より購入した。4-amino-6-hydroxypyrazolo[3,4-d]-pyrimidine (AHPP) は Acros Organics 社 (New Jersey) より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium:F-12 (1:1. DMEM/F-12) は Gibco-BRL. Life Technologies 社 (Rockville, MD) より、isoxantopterin は Aldrich Chem.社 (Milwaukee, WI) より購入した。 ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EDTA) 及び N-(Dithiocarboxy) sarcosine (DTCS) は同仁堂 (熊本、日本) より購入した。Dithiothreitol (DTT) は Wako Pure Chemical 社 (大阪、日本) より購入した。

### 6-(2) マウス

12 週齢の雌性 MRL-+/+マウス (日本 SLC、静岡) を使用した。全てのマウスは熊本大学資源開発研究センター内で飼育した。

### 6-(3) マウスへの経気道的 SEB 投与

マウスを pentobarbital (60 µg/g body weight) の腹腔内投与にて麻酔後、頸部正中を約 5 mm 切開、気管を露出した。27 ゲージ針を気管に刺入し、1 ml シリンジで SEB 40 µg あるいは 2 µg、コントロールとして PBS 40 µl を投与した (Shinbori, *et al.* 1996)。

### 6-(4) iNOS 及び XO 阻害剤の投与

経気道的 SEB 投与の前日より 0.1M NaOH 0.2ml に溶解した XO 阻害剤としての AHPP (1.0mg/mouse) あるいはコントロールとしての 0.1M NaOH 0.2ml を連日経口投与した。iNOS 阻害剤としては SEB 気管支投与の前日より生理食塩水 0.2ml に溶解した AG (100 mg/kg/mouse) あるいはコントロールとしての生理食塩水を 1 日 2 回腹腔内投与した。各投与量は以前の論文を参考とした (Tuctan, *et al.* 1998, Umezawa, *et al.* 1997)。

### 6-(5) 肺の病理組織学的検査

経気道的 SEB あるいは PBS 投与 7 日後に肺を取り出し、6%ホルマリンで 20 cmH<sub>2</sub>O

圧にて固定した。パラフィン包埋後、縦断面にて葉の中心を通るように薄切し、hematoxylin-eosin (HE) 染色及びアザン染色を行った。このモデルにおける病理学的特徴は間質の炎症と線維芽細胞の増殖を伴った肺胞隔壁の肥厚である (Shinbori. *et al.* 1996)。全葉の面積当たりのこの病理学的変化を認める領域の面積を NIH イメージを用いて算出し、全葉あたりの割合 (Area Percentages of Thickened Aveolar Septa) で表示した。

#### 6-(6) 気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL)

BAL は経気道的 SEB あるいは PBS 投与、各々1、3、5、7、14 日後のマウスにて施行した。マウスを pentbarbital で腹腔麻酔し、腹部大動脈より脱血後、胸部を開き肺全体を露出した。気管に 20 ゲージのプラスチック製チューブを挿入し、各マウスとも 1 ml の冷 PBS で 2 回洗浄した。Hemocytometer で細胞数を計測し、細胞分画はサイトスピンでスライドグラス上に細胞を固定後、Diff-Quick 染色を行った。細胞成分 (以下 BAL 細胞) は以下の mRNA の抽出に用いた。またサイトカインの enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による測定、Nitrite/nitrate の測定には 1 回目の洗浄液のみを使用した。

#### 6-(7) Nitrite/nitrate の測定

血清及び BALF 上清中の NO の産生量として NO の代謝産物である nitrite/nitrate 量を測定した (Green, *et al.* 1982)。除タンパクしたサンプル中の nitrite/nitrate 濃度は autoanalyzer system (TCI-NOX 1000: Tokyo Chemical Industry 社、東京、日本) を用いて Griess 法を応用して測定した。

#### 6-(8) Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy

マウスに DTCS 及び  $\text{FeSO}_4$  を各々投与することにより組織で形成される  $(\text{DTCS})_2\text{-Fe}^{2+}$  複合体は、生体内で生成された NO と反応し、 $\text{NO-(DTCS)}_2\text{-Fe}^{2+}$  複合体を形成する。マウス肺及び全血中の NO 産生量は、超低温下で EPR spectroscopy にてサンプルを分析し、本複合体に特異的な superfine structure signal の出現により、直接的に検出定量することができる。EPR spectroscopy は以下のように行った (Doi, *et al.* 1996)。生食で溶解した DTCS (400 mg/kg) 及びクエン酸溶液で溶解した  $\text{FeSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  (40 mg/kg) を各々マウスの腹腔内及び皮下に投与し、その 30 分後肺及び全血を採取した。サンプルは液体窒素で凍らせ、EPR の測定に用いた。EPR の測定は 110K 中で X-band EPR spectrometer (ESP380E, Bruker Instrument 社、Rheinstetten, Germany) を用いた。EPR 測定条件は microwave frequency: 9.39GHz、

microwave power: 4 mW、modulation frequency: 100kHz、modulation amplitude: 0.5 mT とした。また magnetic field は DPPH ( $g = 2.00354$ ) を用いて計算した。NO-(DTCS)<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>複合体の濃度の定量化は EPR スペクトル標準試料として 1.0 mM Tempol を用いて行った。

#### 6-(9) 免疫組織化学

経気道的 SEB あるいは PBS 投与 3 日後に肺を取り出し、6%ホルマリンで 20 cmH<sub>2</sub>O 圧にて固定した。組織はエタノールとキシレンを通して脱水し、パラフィン包埋した。3 μm 厚に薄切し、脱パラフィン、洗浄後、免疫染色に使用した。1: 500 に希釈した抗 iNOS 抗体 (和光、大阪、日本) 及び 1: 100 に希釈した抗 nitrotyrosine 抗体 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) を用いて間接免疫ペルオキシダーゼ法を行った。二次抗体として 1: 100 で希釈したペルオキシダーゼラベル抗ラビット免疫グロブリン (DAKO, Glostrup, Denmark) を用い、ペルオキシダーゼ活性は 3,3'-diaminobenzidine (DAB、同仁、熊本、日本) を基質として発色させた。

#### 6-(10) XO 及び xanthine dehydrogenase (XD) 活性の測定

XO 及び XD 酵素活性は蛍光分光光学的方法を用いて測定した。これは XO/XD が xanthine を基質として蛍光物質である isoxanthopterin を産生することを利用して、その酵素活性を測定する方法である (Akaike, *et al.* 1990)。

血漿は阻害剤 (2 mM EDTA、2 mM PMSF、10 mM DTT) を付加して採取した。BALF は leupeptin 0.5 μg/ml をさらに追加して採取した。これらの液は 4℃、400 g、10 分遠心し、細胞細分を除去した。肺組織は leupeptin 0.5 μg/ml を加えた阻害剤を含む 50 mM PPB (pH 7.6) 2 ml 中で組織 homogenizer (Polytron homogenizer; Kinematica GmbH, Luzern, Switzerland) を用いて磨砕した。そのホモゲネートは 4℃、10000 g、20 分遠心し、細胞細分を除去した。さらに低分子量成分を除去するために BALF 及び肺ホモゲネートの上清は 4℃、18 時間 PBS を用いて透析を行った。蛍光吸光計 (F-4500、日立、日本) を用い、excitation 345 nm、emission 390 nm にてこれらのサンプルにおける isoxanthopterin の蛍光測定を行った。この反応系に methylene blue を XD の補酵素として添加した。これにより生ずる活性の増大分を XD 由来の活性として評価できる。よって総 isoxanthopterin 産生を XO/XD 活性として評価した。また、XO/XD 特異的阻害剤である allopurinol を添加することにより活性の抑制を確認した。

#### 6-(11) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

経気道的 SEB あるいは PBS 投与後、各々1、3、5、7、14 日後のマウスから回収した BAL 細胞から mRNA を抽出、cDNA を作成し、PCR を施行した。

##### (I) mRNA の抽出、cDNA の作成

各々の BAL 細胞より Micro-FastTrack™ 2.0 kit (Invitrogen 社、Carlsbad、CA) を用いて直接 mRNA を抽出した。moloney murine leukemia virus 逆転写酵素 (Gibco-BRL 社) を用いて 1 µg の mRNA を oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Gibco-BRL 社、Rockville、MD) をプライマーとして cDNA (20 µl) を合成し、以下の PCR に使用した。

##### (II) PCR

PCR 反応液の組成は、cDNA (1 µl)、各々のプライマー (500 nM)、dNTP mix (200 µM)、MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM)、DNA polymerase (1.25 U) (AmpliTaq; Perkin-Elmer 社、Foster City、CA) とした。最初の denaturing (95°C、10 min) 後、denaturing (94°C、1 min)、annealing (54°C、2 min)、extension (72°C、3 min) を 1 サイクルとし、β-actin: 28 サイクル、iNOS 及び XO/XD: 38 サイクルで施行した。

β-actin 及び iNOS のプライマー配列は以下の通りである。

β-actin:	5'-AGGGTGTGATGGTGGGAATG-3'
	5'-GGCTGGGGTGTGAAGGTCTC-3'
iNOS:	5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGCGGC-3'
	5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'
XO/XD:	5'-CAGGGTCTTGGTCTTTTCAC-3'
	5'-CGTTGGTTTCAGCGTCAGGA-3'

#### 6-(12) NOS-inducing activity の定量的解析

BAL は KRP 液 (pH 7.4) を用いて施行した。BALF 上清中の NOS-inducing activity はマウスのマクロファージの細胞株である RAW 264 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) を刺激することで評価した (Akaike, *et al.* 1996)。前日 24 穴プレートに RAW 264 1 x 10<sup>6</sup> 個/穴ずつ分注し、24 時間後、SEB 投与群及び非投与群から回収した BALF 上清 100 µl あるいは 250 µl を 250 µl の培地 DMEM/F12+10% FCS とともに加え培養した。48 時間後培養上清を回収し、6-(7)の方法に従い nitrite/nitrate 量を測定した。

#### 6-(13) ELISA

SEB あるいは PBS 投与 3 日後の BALF 中の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN $\gamma$ 濃度を、各々の ELISA kit (BioSource International 社、Camarillo、CA) を用いて測定した。感度は各々以下の通りであった。

TNF- $\alpha$  < 3 pg/ml、IL-1 $\beta$  < 7 pg/ml、IFN $\gamma$  < 1 pg/ml

また、AG あるいは AHPP 投与群においても同様の検討を行った。

#### 6-(14) 統計学的解析

結果は mean  $\pm$  SEM で示した。統計学的処理は unpaired Student's *t* test を用い、 $P < 0.005$  を統計学的有意差とした。



## 7. 実験結果

### 7-(1) SEB 投与後の病理学的変化における iNOS 及び XO 阻害剤の効果

SEB 誘導間質性肺炎モデルの病因における NO 及び O<sub>2</sub> の関与を評価するために、iNOS 及び XO の阻害剤である AG 及び AHPP を用いて検討した。

SEB 投与 7 日後の肺組織の HE 染色及びアザン染色を行った (図 4)。肺胞腔及び肺胞隔壁への炎症細胞の浸潤、線維芽細胞の浸潤した領域での膠原線維の増生を認めた。縦断面にて葉の中心を通るように薄切し、全葉の面積当たりのこの病理学的変化を認める領域の面積を NIH イメージを用いて算出したところ、AG 及び AHPP 投与群では、これらの所見の減少を認めた (図 5)。

### 7-(2) SEB 投与後の BAL 細胞所見における iNOS 及び XO 阻害剤の効果

PBS 投与 3 日後の BAL では総細胞数が  $1.2 \pm 1.1 \times 10^5$  /ml で、その大部分がマクロファージであった (図 6)。一方、SEB 投与後の BAL では総細胞数が  $9.2 \pm 3.6 \times 10^5$  /ml と有意に上昇していた。細胞分画においてマクロファージ、リンパ球、好中球の各々の細胞数の上昇 ( $3.4 \pm 1.6 \times 10^5$  /ml、 $2.8 \pm 0.8 \times 10^5$  /ml、 $2.7 \pm 2.4 \times 10^5$  /ml) を認めた。この SEB 投与マウスは AG 及び AHPP の投与によって総細胞数は  $5.2 \pm 1.6 \times 10^5$  /ml、 $5.0 \pm 1.85 \times 10^5$  /ml、マクロファージ数は  $1.7 \pm 0.6 \times 10^5$  /ml、 $1.2 \pm 0.6 \times 10^5$  /ml、リンパ球数は  $1.8 \pm 0.6 \times 10^5$  /ml、 $1.7 \pm 0.7 \times 10^5$  /ml と有意に減少した。

以上の所見より、NO 及び O<sub>2</sub> が SEB 誘導間質性肺炎の病因に関与し、更に各々の阻害剤が間質性肺炎の治療的効果を有する可能性が示唆された。そこで、このモデルにおける NO 及び O<sub>2</sub> の産生及び産生に対する各種阻害剤の効果を検討した。

### 7-(3) Nitrite/nitrate の産生及び iNOS 及び XO 阻害剤の効果

SEB 誘導間質性肺炎モデルにおける NO の産生を明らかにする目的で NO の代謝産物である nitrite/nitrate 産生量を Griess 法を用いて評価した。血清及び BALF 中の nitrite/nitrate 産生量の経時的変化を図 7 に示す。SEB 投与群において血清及び BALF 中いずれも nitrite/nitrate 産生量の増加を認めた。血清において SEB 投与 3 日後 nitrite/nitrate 産生量 ( $131.55 \pm 14.8 \mu\text{M}$ ) はピークを示し、PBS 投与群の nitrite/nitrate 産生量 ( $19.8 \pm 2.81 \mu\text{M}$ ) と比べ、有意に上昇していた。BALF 中の nitrite/nitrate 産生量においても同様に SEB 投与群で増加を認めた (3 日後 SEB 投与群:  $19.27 \pm 0.74 \mu\text{M}$ , PBS 投与群:  $11.84 \pm 1.699 \mu\text{M}$ )。

AG の投与にて血清及び BALF いずれの場合も SEB 投与 3 日後の nitrite/nitrate 産生量は明らかに減少していた (図 8)。AHPP の投与は nitrite/nitrate 産生量に影響を及ぼさなかった。

#### 7-(4) 直接的 NO の検出及び iNOS 及び XO 阻害剤の効果

直接 EPR 法及び DTCS 法を用いて NO の産生を直接評価した。肺及び全血の NO の産生は EPR を用いて NO hemoglobin あるいは NO hemocomplex のシグナルにて検出した (data not shown)。感度を上げるため DTCS 法を用い、肺および全血中の NO 産生を検出した (図 9)。DTCS 及び  $\text{FeSO}_4$  を投与後、SEB 投与肺および全血において NO-(DTCS) $_2$ - $\text{Fe}^{2+}$ 複合体の強い EPR シグナルを検出した。これに対し、PBS 投与群では (DTCS) $_2$ - $\text{Fe}^{2+}$ 複合体投与後 EPR シグナルを検出できなかった。AG 投与群では NO-(DTCS) $_2$ - $\text{Fe}^{2+}$ 複合体の EPR シグナルは明らかに減少した (図 9, 10)。特記すべきことに AHPP 投与群では肺及び全血中の NO-(DTCS) $_2$ - $\text{Fe}^{2+}$ 複合体の EPR シグナルが増強した。 $\text{O}_2$  は NO を速やかに ONOO $^-$ へと変換する。従って、AHPP 投与による NO 産生の増加分は  $\text{O}_2$  と素早く反応し ONOO $^-$ を産生することに寄与した NO 量と考えられ、これはとりもなおさず、生体内で生成した ONOO $^-$ の量に相当する。

#### 7-(5) 免疫組織化学による iNOS、nitrotyrosine の発現

SEB 投与 3 日後の肺組織および BAL 細胞における iNOS 蛋白の発現をみるために抗 iNOS 抗体を用いて免疫組織化学法を行った。iNOS 陽性細胞は SEB 投与肺組織の肺胞及び肺胞隔壁に浸潤したマクロファージ及び好中球であり、PBS 投与肺組織においては陽性細胞をほとんど認めなかった (図 11)。また SEB 投与 BAL 細胞においても陽性細胞はマクロファージ及び好中球であった。PBS 投与群ではほとんど染色されなかった。また SEB 投与肺及び BAL 細胞における ONOO $^-$ の生成および局在を明らかにするために nitrotyrosine の形成を評価した。Nitrotyrosine 陽性細胞はマクロファージ及び好中球であり、iNOS と同様の結果を示した。

#### 7-(6) XO 酵素活性及び XO 阻害剤の効果

$\text{O}_2$  の産生に対する SEB 投与の影響をみる目的で  $\text{O}_2$  産生に関与する XO/XD 酵素活性について蛍光分光学的方法を用いて評価した。肺、BALF 及び血漿中の XO/XD 酵素活性の経時的変化を図 12 に示す。SEB 投与群において肺、BALF 及び血漿中いずれも XO/XD

活性の増加を認め、肺及び BALF におけるそのピークは投与後 3 日目であった。BALF 及び血漿中の投与 3 日目における XO/XD 酵素活性は XO/XD 阻害剤である AHPP の投与で著明に低下した (図 13,  $p < 0.05$ )。

#### 7-(7) BAL 細胞における iNOS 及び XO/XD mRNA の発現

NO 及び  $O_2^-$  の過剰産生が iNOS 及び XO/XD mRNA の誘導を介しているか明らかにするために SEB 投与 1、3、5、7、14 日後の BAL 細胞における iNOS 及び XO/XD mRNA の発現について RT-PCR 法を用いて検討した (図 14)。iNOS 及び XO/XD mRNA レベルは SEB 投与群で増加しており、そのピークは 3 日後であった。PBS 投与群では iNOS 及び XO/XD mRNA レベルの増加を認めなかった。

#### 7-(8) NOS-inducing activity の定量的解析

SEB 投与後 BALF における NOS-inducing activity を評価するために、RAW264 細胞株の培養液中の nitrite/nitrate 量を評価した。SEB 投与マウスから 3 日後回収した BALF を RAW264 細胞に付加すると nitrite/nitrate の産生が増加するも、PBS 投与群では nitrite/nitrate 量の増加は認められなかった (図 15)。RAW264 細胞に SEB を直接付加しても NOS-inducing activity は認められなかった (data not shown)。以上の結果より SEB 投与により iNOS を誘導しうる TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  のような炎症性メディエーターの産生が BALF 中に誘導される可能性が示唆された。

#### 7-(9) BALF 中のサイトカインの発現及び iNOS 及び XO 阻害剤の効果

SEB 投与後 3 日後における BALF 中の炎症性サイトカインレベルに対する AG 及び AHPP の効果を図 16 に示した。SEB 投与群では PBS 投与群と比較し TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN $\gamma$  レベルの上昇を認めた。AG 及び AHPP の投与で IL-1 $\beta$  レベルは有意に低下し各々その程度は 50.4%、38.3%であった。IFN $\gamma$  レベルは AG 及び AHPP の投与で各々 78.6%、59.9%低下した。以上のことより、NO 及び  $O_2^-$  は炎症性サイトカインの産生に関与しており、そして AG 及び AHPP が炎症性サイトカインの産生の抑制を介した抗炎症作用を有していることが示唆された。

## 8. 考察

本研究では自己免疫疾患における間質性肺炎に認められる肺胞上皮細胞傷害が下気道に存在する酸化ストレスやニトロ化ストレスの増強による可能性があるかと仮定し、細菌性スーパー抗原である SEB を自己免疫疾患モデルマウスに経気道的に投与することにより誘導される間質性肺炎における NO 及び  $O_2^-$  の関与について解析を行った。

SEB 誘導間質性肺炎モデルにおいて NO 及び  $O_2^-$  が上昇することを見いだした。そして、この NO 及び  $O_2^-$  の過剰産生は BALF 中の炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$ 、IFN $\gamma$  の上昇と密接に関連していた。また iNOS 及び XO 阻害剤である AG 及び AHPP を投与することにより NO 及び  $O_2^-$  の産生が抑制されると、炎症性サイトカインの生成が抑制され、BAL 細胞数が減少し、間質性肺炎の進展に防御的効果を示した。これらの結果は間質性肺炎の発生機序を理解する上で有用であり、新しい間質性肺炎の治療戦略を考える上で重要な知見と考えられる。

SEB 投与マウスにおいて血清及び BALF 中の nitrite/nitrate の産生量が増加していた。このことはマウス肺及び全血中の NO 産生量を NO-(DTCS) $_2$ -Fe $^{2+}$  複合体を用いた直接的検出法にて確認を行った。同様に SEB 投与マウスにおける XO/XD の産生分泌が蛋白レベル及び mRNA レベルで促進し、肺胞腔内へ放出されていることを観察した。今まで NO は細胞機能を調節したり、肺傷害に対し抗炎症作用を示したりすることが報告されている (Suga, *et al.* 1998. Cantin, *et al.* 1987)。しかし、肺の炎症局所において NO は肺胞腔内の高濃度酸素や  $O_2^-$  の産生により、速やかに ONOO $^-$  や NO $_2$  などの反応性窒素酸化物 (reactive nitrogen species: RNS) へと変換される。つまり、NO の細胞障害性を考えると NO が単独で作用する場合と ONOO $^-$  等の RNS が作用する場合の 2 つが存在する。そして NO そのものは化学反応に乏しく、NO によりもたらされる病理学的現象のかなりの部分が ONOO $^-$  等の RNS により発現されている。RNS は肺の炎症の重要なメディエーターとして考えられており、肺細胞にとって極めて毒性が高いという報告がされている (Akaike, *et al.* 1996. Rubbo, *et al.* 1996)。生体内での ONOO $^-$  の検出はその半減期が非常に短いため困難である。しかし、AHPP の投与にて NO-(DTCS) $_2$ -Fe $^{2+}$  複合体の EPR シグナルが増強したという所見は SEB 投与マウス肺における ONOO $^-$  の生成を間接的に裏付けるものである。さらに、nitrotyrosine 抗体を用いた免疫組織化学法は、生体内における ONOO $^-$  の生成の fingerprint として広く用いられており、今回の検討でも iNOS の局在に一致した nitrotyrosine の存在を証明しており、iNOS/XO に依存して ONOO $^-$  が生成することを直接的に証明することに

成功している。また AG 及び AHPP が BALF 中のマクロファージ数、リンパ球数、そして好中球数を減少させ、病理学的にも肺傷害の及んだ面積を減少させたという所見は ONOO<sup>-</sup> が肺傷害に関与し、SEB 誘導間質性肺炎の病因の一つである可能性を示唆するものである。

ヒトやマウスのマクロファージにおいて NO は TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の産生に対し調節的役割を果たすことが報告されている (Akaike, *et al.* 1996, Kuo, *et al.* 2000, Yan, *et al.* 1997)。内因性の NO は TNF- $\alpha$  の産生を促進することがヒト未熟単核細胞株である U937 や肺胞マクロファージにおいて認められている (Kuo, *et al.* 2000, Yan, *et al.* 1997)。しかしながら、ある状況下では NO がサイトカインの発現を抑制するという報告もある (Akaike, *et al.* 1996, Persoons, *et al.* 1996)。これらの報告の矛盾を説明する理由はなおもって不明である。

本研究で SEB 投与マウスから得られた BALF はマウスマクロファージの細胞株である RAW264 に対して強い iNOS 誘導活性を示した。マクロファージに対して iNOS 誘導能を有するいくつかの炎症性サイトカインが知られている。更に XO/XD の発現も IL-1 $\beta$  のような炎症性サイトカインによって調節されている。XD はそれ自体 O<sub>2</sub><sup>-</sup> の産生能が低いが、システインの酸化や蛋白分解反応により高い O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生能を有する XO へと変換される。実際、SEB 投与マウスから得た BALF 中には炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$ 、IFN $\gamma$  の上昇が認められた。これらの所見より SEB より活性化された Th1 細胞より産生される IFN $\gamma$  や SEB により活性化された炎症細胞より産生される TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  が肺胞腔内へ浸潤したマクロファージを刺激して iNOS や XO を誘導するものと考えられる。加えて、AG や AHPP が炎症性サイトカインの産生を抑制したという結果は NO 及び O<sub>2</sub><sup>-</sup> がこれらのサイトカインの生成を促進していることを示唆するものである。以上のことより、iNOS 及び O<sub>2</sub><sup>-</sup> と炎症性サイトカインの誘導は positive feedback loop を形成し、お互いに増強しあい、そのことが SEB 投与肺における RNS や活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の過剰産生をもたらしていると考えられる。

転写調節因子である NF- $\kappa$ B と AP-1 は免疫反応、ストレス反応、細胞の成長や死にかさどる因子の発現を誘導する。NF- $\kappa$ B をブロックすると iNOS の発現が抑制され、NO が産生されないという報告がある (Griscavage, *et al.* 1996)。このように NF- $\kappa$ B や AP-1 の活性化は肺の炎症における TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS そして IFN $\gamma$  などの発現に不可欠であることが報告されている (Schreck, *et al.* 1992, Gurujeyalakshmi, *et al.* 2000)。また NF- $\kappa$ B と AP-1 はレドックス制御を受け、RNS や ROS により活性化を受ける転写調節因子であることが知られている。この機序の解明は目下のところ多くの研究がなされているところである。サイトカインからのシグナルは上流のプロテインキナーゼカスケードから下流の

転写調節因子まで伝えられる。最初に増殖因子のシグナル伝達経路で活性化される分子として同定された MAP kinase (MAPK) は増殖因子のみならず、LPS 等の炎症刺激や IL-1、TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインによっても活性化される。RNS や ROS においても、これらは細胞膜に作用し細胞表面レセプターや Ras を直接活性化し、その下流にある MAPK カスケードを活性化する。その一部は I $\kappa$ B kinase (IKK) や NF- $\kappa$ B を活性化する。そして MAPK と NF- $\kappa$ B の経路間ではクロストークが起こることが知られている (Janssen-Heininger, *et al.* 2000)。抗酸化剤は NF- $\kappa$ B や AP-1 の活性化を抑制することによりサイトカイン遺伝子の発現を抑制するという多くの報告がなされている (Phan, *et al.* 1992. Nathens, *et al.* 1997)。従って SEB により惹起される肺の炎症や線維化に対して AG や AHPP が有効である機序として、その NF- $\kappa$ B や AP-1 の活性化の阻害とそれに伴う炎症性サイトカインの産生の抑制が想定される。AG や AHPP による NO や O<sub>2</sub><sup>-</sup>の産生抑制はこれらの持つフリーラジカルとしての直接的な毒性を抑制するばかりでなく、フリーラジカルによるサイトカインの産生をも抑制するものと考えられる。

本研究では iNOS 及び XO 阻害剤である AG 及び AHPP を投与することにより NO 及び O<sub>2</sub><sup>-</sup>の産生が抑制されると、炎症性サイトカインの生成が抑制され、BAL 細胞数が減少し、間質性肺炎の進展に防御的効果を示した。SEB によるショックモデルにおいて、iNOS 阻害剤である AG の投与が防御的な効果を有したという報告がある一方、SEB 投与による内因性 NO が防御的効果を有し、iNOS 阻害剤を投与することによりショックの死亡率が上昇したという報告がある (Sarawar *et al.* 1994, Florquin *et al.* 1994)。つまり SEB による組織傷害における NO の役割は微妙なバランスの上に成り立っている。

NO 濃度に依存した NF- $\kappa$ B の活性化の調節が報告されている (Umansky, *et al.* 1998)。つまり低濃度の NO は IKK の活性化を介して NF- $\kappa$ B を活性化し、NF- $\kappa$ B の DNA 結合能を高める。これに対し高濃度の NO は NF- $\kappa$ B p50 サブユニットの <sup>62</sup>Cys をニトロソ化して NF- $\kappa$ B の DNA 結合能を失わせることにより、NF- $\kappa$ B 経路を抑制するというものである。また ONOO<sup>-</sup>産生物質の投与により NF- $\kappa$ B の活性化を認めるという報告がある。近年、このように ONOO<sup>-</sup>や NO<sub>2</sub> といった RNS による NF- $\kappa$ B の活性化がますます報告されている。NO の細胞傷害性の多くは NO それ自体ではなく ONOO<sup>-</sup>の生理活性を評価しているのかもしれない。従って、この NO のサイトカイン誘導能における二面性は NO の産生源、産生量、細胞の種類、そして細胞内外のレドックス状態や ROS の産生量の違いによって説明させるのであろう。

以上をまとめると、V $\beta$ 8<sup>+</sup>T 細胞に作用するスーパー抗原は NO と O<sub>2</sub><sup>-</sup>の産生と炎症性サ

イトカインの産生を肺の炎症局所で増加させることが見いだされた。NO は  $O_2$  と反応し、肺の炎症に重要な ONOO<sup>-</sup>へと変換される。炎症性サイトカイン産生は内因性の NO と  $O_2$  の産生に調節されており、また ONOO<sup>-</sup>は本モデルにおける肺傷害に関与していることが示唆された。更に iNOS 及び XO 阻害剤は間質性肺炎における胞隔炎と線維化に対して治療薬として期待させるものと思われる。

## 9. 結語

本研究では自己免疫疾患における間質性肺炎に認められる肺胞上皮細胞障害が下気道に存在する酸化反応やニトロ化反応の増強による可能性があるかと仮定し、自己免疫疾患における間質性肺炎の発症に対するフリーラジカルの関与を調べる目的で、この SEB 誘導間質性肺炎モデルマウスにおける iNOS 及び XO の関与を解析した。このモデルにおいて NO 及び  $O_2^-$  が上昇することを見だし、この NO 及び  $O_2^-$  の過剰産生が BALF 中の炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$ 、IFN $\gamma$  の上昇と密接に関連していることを明らかにした。また iNOS 及び XO 阻害剤の投与により NO 及び  $O_2^-$  の産生が抑制されると、炎症性サイトカインの生成や BAL 細胞数が減少し、間質性肺炎の進展に防御的效果を示した。これらの結果は間質性肺炎の発生機序を理解する上で有用であり、新しい間質性肺炎の治療戦略を与えるものであるかもしれない。

ONOO $^-$  は細胞外マトリックスの改変において重要な役割を担っており、肺の線維化・リモデリングに関与していると言われているマトリックスメタロプロテアーゼを活性化することが報告されている。今後は、フリーラジカルの過剰産生による胞隔炎から線維化・リモデリングへの機序やこれに対するマトリックスメタロプロテアーゼの関与について検討していきたい。



10. 参考文献

**Abe J, Kotzin BL, Jujo K, Melish ME, Glode MP, Kohsaka T, Leung DYM.** Selective expression of T cells expressing T-cell receptor variable regions V $\beta$ 2 and V $\beta$ 8 in Kawasaki disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 4066-4070, 1992.

**Abe J, Kotzin BL, Meissner C, Melish ME, Takahashi M, Fulton D, Romagne F, Malissen B, Leung DYM.** Characterization of T cell repertoire changes in acute Kawasaki disease. *J. Exp. Med.* 177: 791-796, 1993.

**Akaike T, Ando M, Oda T, Doi T, Ijiri S, Araki S, Maeda H.** Dependence on O $_2^-$  generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice. *J. Clin. Invest.* 85: 739-745, 1990.

**Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S, Setoguchi K, Suga M, Zheng YM, Dietzschold B, Maeda H.** Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 2448-2453, 1996.

**Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, Murphy ED, Roths JB, Dixon FJ.** Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148: 1198-1215, 1978.

**Beckman JS, Koppenol WH.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* 271 (*Cell Physiol.* 40): C1424-1437, 1996.

**Cantin AM, North SL, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG.** Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 79: 1665-1673, 1987.

**Clair EW, Wilkinson WE, Lang T, Sanders L, Misukonis MA, Gilkeson GS, Pisetsky DS, Granger DL, Weinberg JB.** Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. *J. Exp. Med.* 184: 1173-1178, 1996.

**Conrad B, Weidmann E, Trucco G, Rudert WA, Behboo R, Ricordi C, Rodriguez-Rilo H, Finegold D, Trucco M.** Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature.* 371: 351-355, 1994.

**Conrad B, Weissmahr RN, Böni J, Arcari R, Schüpbach J, Mach B.** A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell*. 90: 303-313, 1997.

**Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, Hance AJ, Keogh BA.** Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract. *N. Engl. J. Med.* 310: 154-166, 235-244. 1984.

**Dellabona P, Peccoud J, Kappler J, Marrack P, Benoist C, Mathis D.** Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell*. 62: 1115-1121, 1990.

**Doi K, Akaike T, Horie H, Nogichi Y, Fujii S, Beppu T, Ogawa M, Maeda H.** Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. *Cancer* 77: 1598-1604, 1996.

**Emerit I, Michelson AM.** Mechanism of photosensitivity in systemic lupus erythematosus patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 2537-2540, 1981.

**Florquin S, Amraoui Z, Dubois C, Decuyper J, Goldman M.** The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J. Exp. Med.* 180: 1153-1158, 1994.

**Fujiki M, Shinbori T, Suga M, Miyakawa H, Ando M.** Role of T cells in bronchoalveolar space in the development of interstitial pneumonia induced by superantigen in autoimmune-prone mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21: 675-683, 1999.

**Gotoh T, Mori M.** Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J. Cell Biol.* 144: 427-434, 1999.

**Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR.** Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138, 1982.

**Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ.** Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 3308-3312, 1996.

- Gurujeyalakshmi G, Wang Y, Giri SN.** Taurine and niacin block lung injury and fibrosis by down-regulating bleomycin-induced activation of transcription nuclear factor- $\kappa$ B in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293: 82-90, 2000.
- Häffner AC, Zeptere K, Elmetts CA.** Major histocompatibility complex class I molecule serves as a ligand for presentation of the superantigen staphylococcal enterotoxin B to T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 3037-3042. 1996.
- Hirose S, Kinoshita K, Nozawa S, Nishimura H, Shirai T.** Effects of major histocompatibility complex on autoimmune disease of H-2-congenic New Zealand mice. *Int. Immunol.* 2: 1091-1095, 1990.
- Howell MD, Diveley JP, Lundeen KA, Esty A, Winters ST, Carlo DJ, Brostoff SW.** Limited T-cell receptor  $\beta$ -chain heterogeneity among interleukin 2 receptor-positive synovial T cells suggests a role for superantigen in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 10921-10925, 1991.
- Ischiropoulos H.** Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 365: 1-11, 1998.
- Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA.** Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor  $\kappa$ B. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1317-1327, 2000.
- Kelly C, Gardiner P, Pal B, Griffiths I.** Lung function in primary Sjögren's syndrome: a cross sectional and longitudinal study. *Thorax* 46: 180-183, 1991.
- Kuo HP, Wang CH, Huang KS, Lin HC, Yu CT, Liu CY, Lu LC.** Nitric oxide modulates interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  synthesis by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161: 192-199. 2000.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH.** Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* 120: 227-237, 1994.

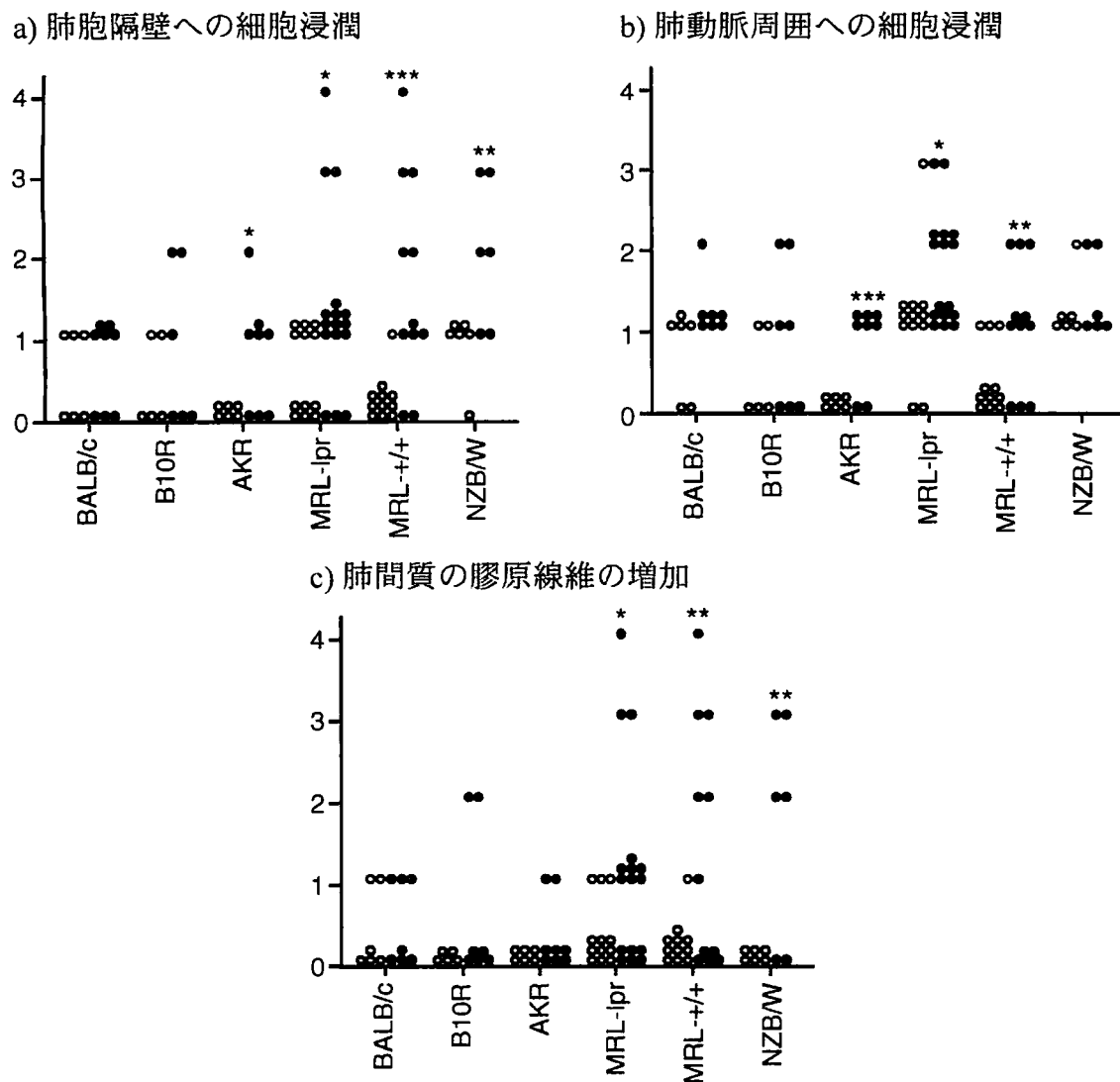
- Lyman SV, Jiang Q, Hurst JK.** Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxynitrite. *Biochemistry*. 35: 7855-7861, 1996.
- Marrack P, Kappler J.** The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*. 24: 705-711, 1990.
- McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM.** Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178: 749-754, 1993.
- Michelson AM.** Oxygen radicals. *Agents Actions (suppl.)*. 11: 179-201, 1982.
- Michie CA, Cohen J.** The clinical significance of T-cell superantigens. *Trends Microbiol.* 6: 61-65, 1998.
- Murphy ED, Roths JB.** Autoimmunity and lymphoproliferation. *In*: Rose NR, Gigazzi PE, Warner NL, Eds. Genetic control of autoimmune disease. New York, Elsevier/North-Holland, pp. 207-221, 1978.
- Nagai S, Izumi T.** Immunopathology of collagen vascular disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 3: 356-360, 1997.
- Nathens AB, Bitar R, Davreux C, Bujard M, Marshall JC, Dackiw APB, Watson RWG, Rotstein OD.** Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17: 608-616, 1997.
- Niwa Y, Sakane T, Shingu M, Miyachi Y.** Role of stimulated neutrophils from patients with systemic lupus erythematosus in tissue injury, with special reference to serum factors and increased active oxygen species generated by neutrophils. *Inflammation*. 9: 163-171, 1985.
- Nose M, Nishimura M, Kyogoku M.** Analysis of granulomatous arteritis in MRL/Mp autoimmune disease mice bearing lymphoproliferative genes. *Am. J. Pathol.* 135: 271-280, 1989;.
- Nose M, Kyogoku M.** Molecular aspects of autoimmune disease animal model MRL/lpr mice. *Protein, Nucleic Acid, Enzyme*. 35: 67-72, 1990. (Japanese)
- Paliard X, West SG, Lafferty LA, Clements JR, Kappler JW, Marrack P, Kotzin BL.** Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 253: 325-329, 1991.

- Persoons JHA, Schornagel K, Tilders FFH, Vente J, Berkenbosch F, Kraal G.** Alveolar macrophages autoregulate IL-1 and IL-6 production by endogenous nitric oxide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14: 272-278, 1996.
- Pullen AM, Wade T, Marrack P, Kappler JW.** Identification of the region of T cell receptor  $\beta$  chain that interacts with the self-superantigen Mls-1<sup>d</sup>. *Cell* 61: 1365-1374, 1990.
- Rubbo H, Darley-Usmar V, Freeman BA.** Forum on nitric oxide: chemical events in toxicity. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 809-820, 1996.
- Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, Saito I, Miyasaka N.** Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J. Clin. Invest.* 96: 2357-2363, 1995.
- Sarawar SR, Blackman MA, Doherty PC.** Superantigen shock in mice with an inapparent viral infection. *J. Infect. Dis.* 170: 1189-1194, 1994.
- Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA.** Nuclear factor- $\kappa$ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic. Res. Commun.* 17: 221-237, 1992.
- Schwarz MI, Sutarik JM, Nick JA, Leff JA, Emlen JW, Tuder RM.** Pulmonary capillaritis and diffuse alveolar hemorrhage. A primary manifestation of polymyositis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151: 2037-2040, 1995.
- Shinbori T, Matsuki M, Suga M, Kakimoto K, Ando M.** Induction of interstitial pneumonia in autoimmune mice by intratracheal administration of superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Cell. Immunol.* 174: 129-137, 1996.
- Stuehr DJ, Marletta MA.** Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7738-7742, 1985.
- Suga M, Okamoto T, Ando M.** Nitric oxide and interstitial lung disease. *Curr. Op. Pul. Med.* 4: 251-255, 1998.

- Tazelaar HD, Viggiano RW, Pickersgill J, Colby TV.** Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 727-733, 1990.
- Theofilopoulos AN, Dixon FJ.** Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv. Immunol.* 37: 269-390, 1985.
- Tunçtan B, Uludag O, Altug S, Abacioglu N.** Effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Pharmacol. Res.* 38: 405-411, 1998.
- Umansky V, Hehner SP, Dumont A, Hofmann TG, Schirmacher V, Droge W, Schmitz ML.** Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF- $\kappa$ B implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur. J. Immunol.* 28: 2276-2282, 1998.
- Umezawa K, Akaike T, Fujii S, Suga M, Setoguchi K, Ozawa A, Maeda H.** Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against salmonella typhimurium infection in mice. *Infect. Immun.* 65: 2932-2940, 1997.
- Via CS, Allen RC, Welton RC.** Direct stimulation of neutrophil oxygenation activity by serum from patients with systemic lupus erythematosus: a relationship to disease activity. *J. Rheumatol.* 11: 745-753, 1984.
- Vladutiu AO.** Role of nitric oxide in autoimmunity. *Clin. Immunol. Immunopath.* 76: 1-11, 1995.
- Weinberg JB, Granger DL, Pisetsky DS, Seldin MF, Misukonis MA, Mason SN, Pippen AM, Ruiz P, Wood ER, Gilkeson GS.** The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and regulation of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine. *J. Exp. Med.* 179: 651-660, 1994.
- Wen R, Cole GA, Surman S, Blackman MA, Woodland DL.** Major histocompatibility complex class II-associated peptides control the presentation of bacterial superantigens to T cells. *J. Exp. Med.* 183: 1083-1092, 1996.

**White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P.** The V $\beta$ -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell*. 56: 27-35. 1989.

**Yan L, Wang S, Rafferty SP, Wesley RA, Danner RL.** Endogenously produced nitric oxide increases tumor necrosis factor- $\alpha$  production in transfected human U937 cells. *Blood* 90: 1160-1167, 1997.



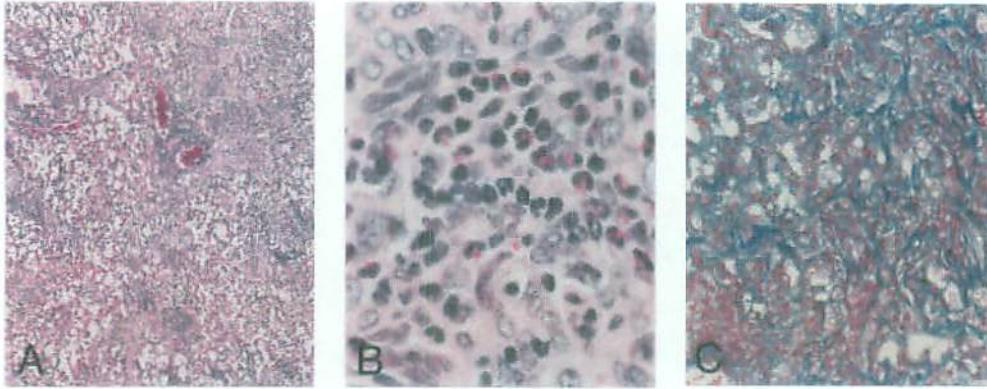
Shinbori T., *Cell. Immunol.* p129-137, 1996

図1 経気道的SEB投与による肺組織への影響

自己免疫疾患モデルマウス（MRL-lpr/lprマウス、MRL-+/+マウス、NZB/Wマウス）、非自己免疫疾患モデルマウス（BALB/cマウス、B10Rマウス、AKRマウス）にPBS（40-50  $\mu$ l）あるいはSEB（50  $\mu$ g/40-50  $\mu$ l PBS）を経気道的に投与し、14日後に肺組織を評価した。各々のポイントは個々のマウスの値を示している。

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.02$ , \*\*\* $p < 0.005$  対 PBS群。



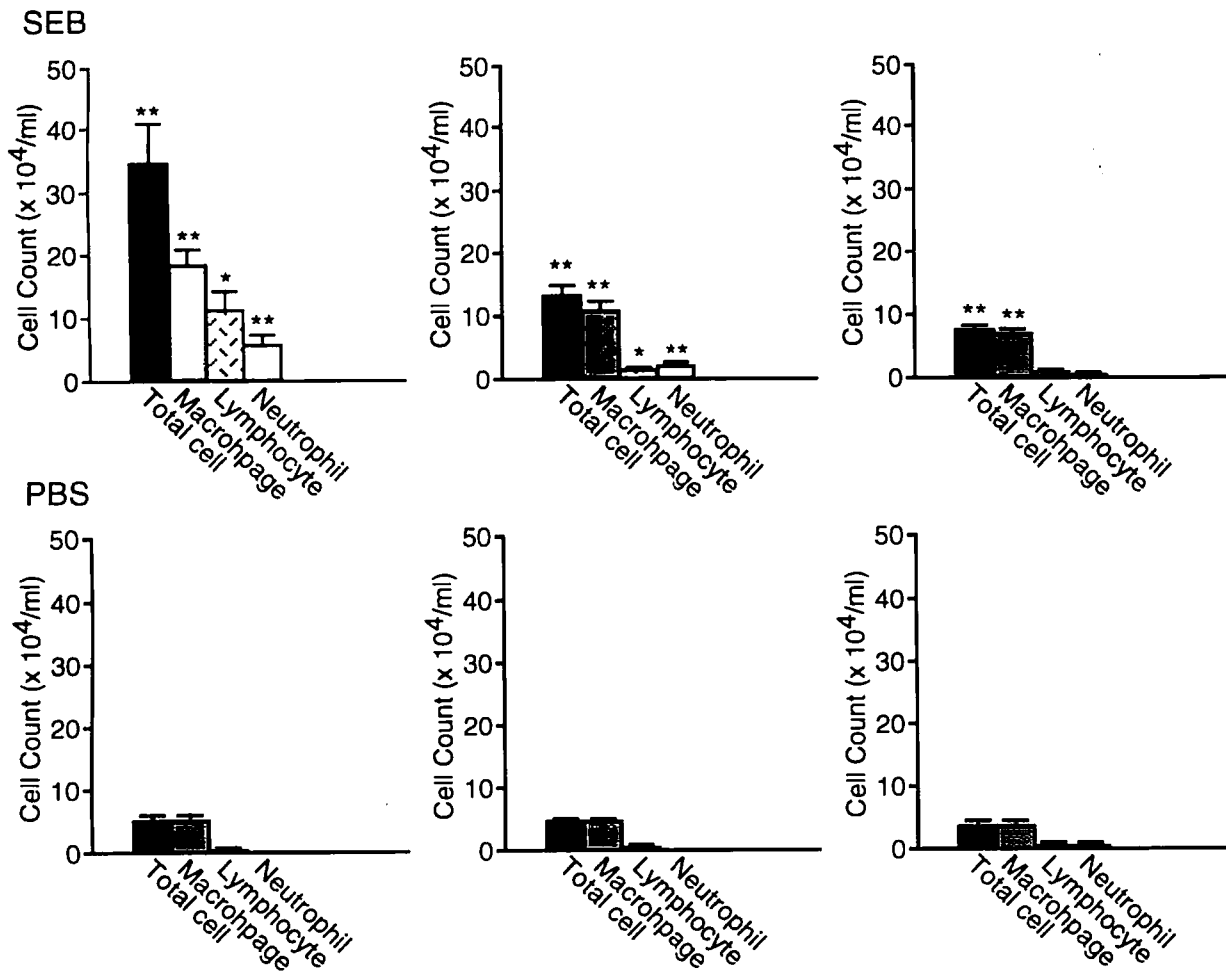


*Shinbori T., Cell. Immunol. p129-137, 1996*

## 図2 経気道的SEB投与後の肺組織所見

12週齢の雌性MRL-lpr/lprマウスにSEB 50  $\mu$ gを経気道的に投与し、15日後に肺組織を評価した。A、BはHE染色、Cはazan染色を施行した。

倍率：A: x40, B: x400, C: x200。



Fujiki M., *Am. J. Cell Mol. Biol.* p675-683, 1999

図3 SEBあるいはPBS投与後のBAL細胞数及び細胞分画

SEBあるいはPBS投与3日後、7日後、14日後のMRL-+/+マウスの肺を1 mlのPBSで3回洗浄後、総細胞数を計測し、細胞分画はDiff-Quickで調べた。細胞数は平均値 ± 標準偏差で示した。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  対 PBS群。

(PBSマウス : 3日後  $n = 5$ , 7日後  $n = 5$ , 14日後  $n = 5$ )

(SEBマウス : 3日後  $n = 8$ , 7日後  $n = 6$ , 14日後  $n = 6$ )

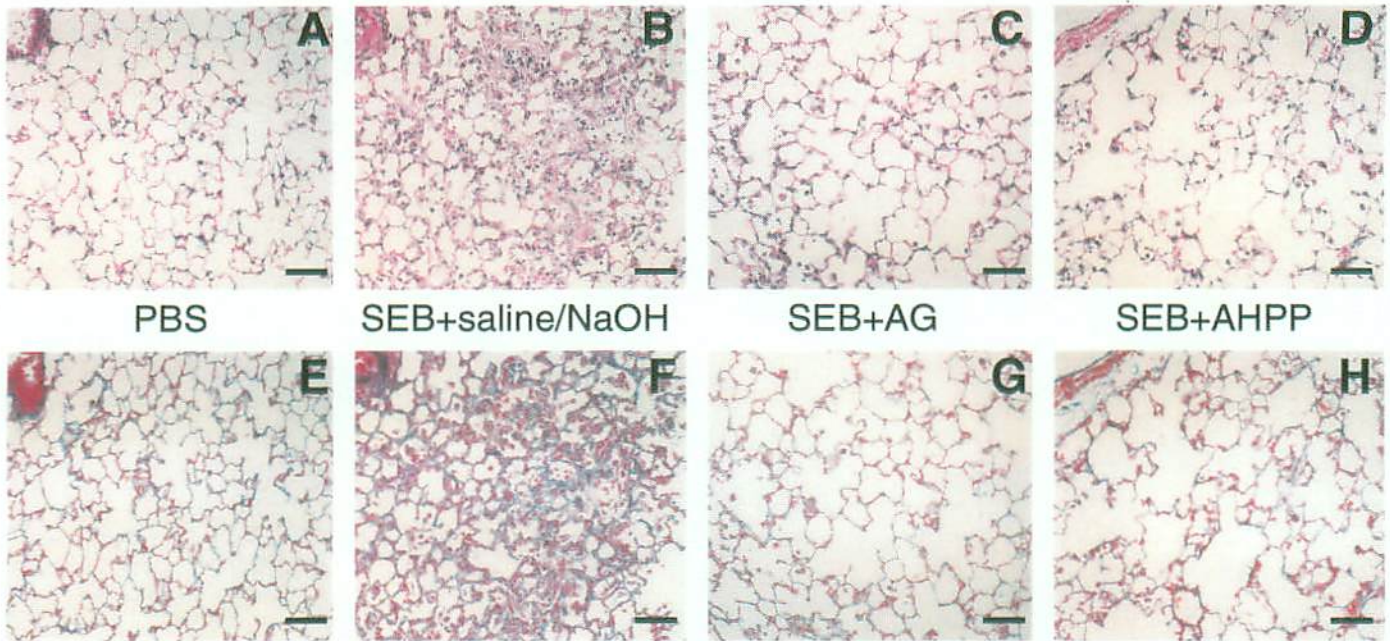


図4 経気道的SEB投与後の肺組織所見に対するAG及びAHPPの影響

PBS投与マウス (A, E)、saline/NaOH 投与 (B, F)、AG 投与 (C, G)、そして AHPP 投与 (D, H) を行ったSEB投与マウスから肺組織を7日後に採取した。それぞれの組織はHE染色(A-D) 及びアザン染色 (E-H)を行った。SEB投与マウスでは肺胞隔壁への明らかな炎症細胞の浸潤と膠原線維の増生を認めた (B, F)。AG及びAHPPの投与で炎症細胞の浸潤と膠原線維の増生が減少した (C, G, D, H)。

Scale barは50  $\mu\text{m}$ を示す。

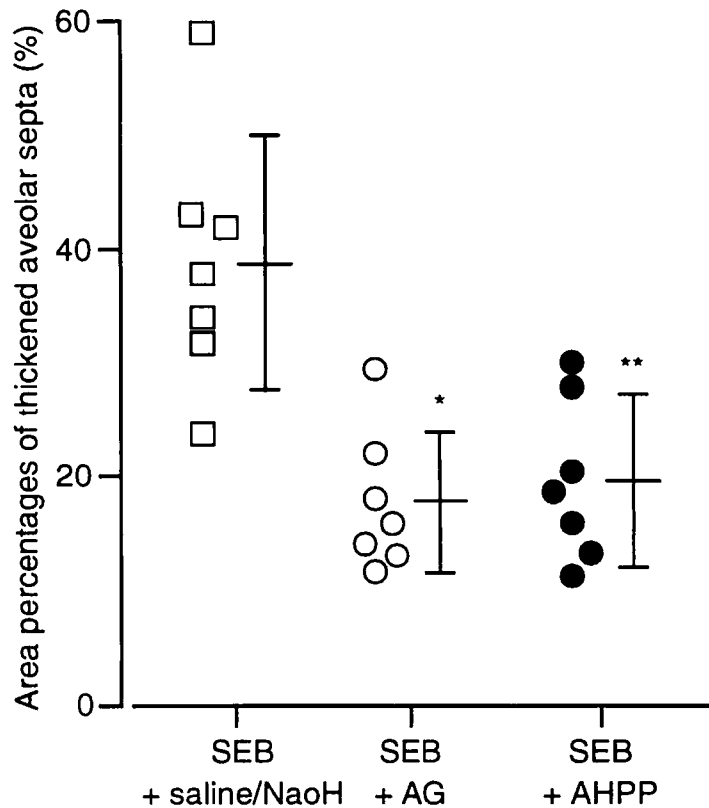


図5 SEB投与後の肺組織所見に対するAG及びAHPPの影響のスコア化

saline/NaOH投与、AG投与、そしてAHPP投与を行ったSEB投与マウスの7日後の全肺面積当たりの肺病変領域の割合を算出することによりスコアリングを行った。炎症及び線維芽細胞による肺胞隔壁の肥厚を認める領域のパーセントを平均値±標準偏差で示した。saline/NaOH投与マウスと比較するとAG及びAHPP投与マウスではその病変領域が明らかに減少した。\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.005$  対 SEB+saline/NaOH群。

(SEB+saline/NaOHマウス :  $n = 7$ , SEB+AGマウス :  $n = 7$ , SEB+AHPPマウス :  $n = 7$ )

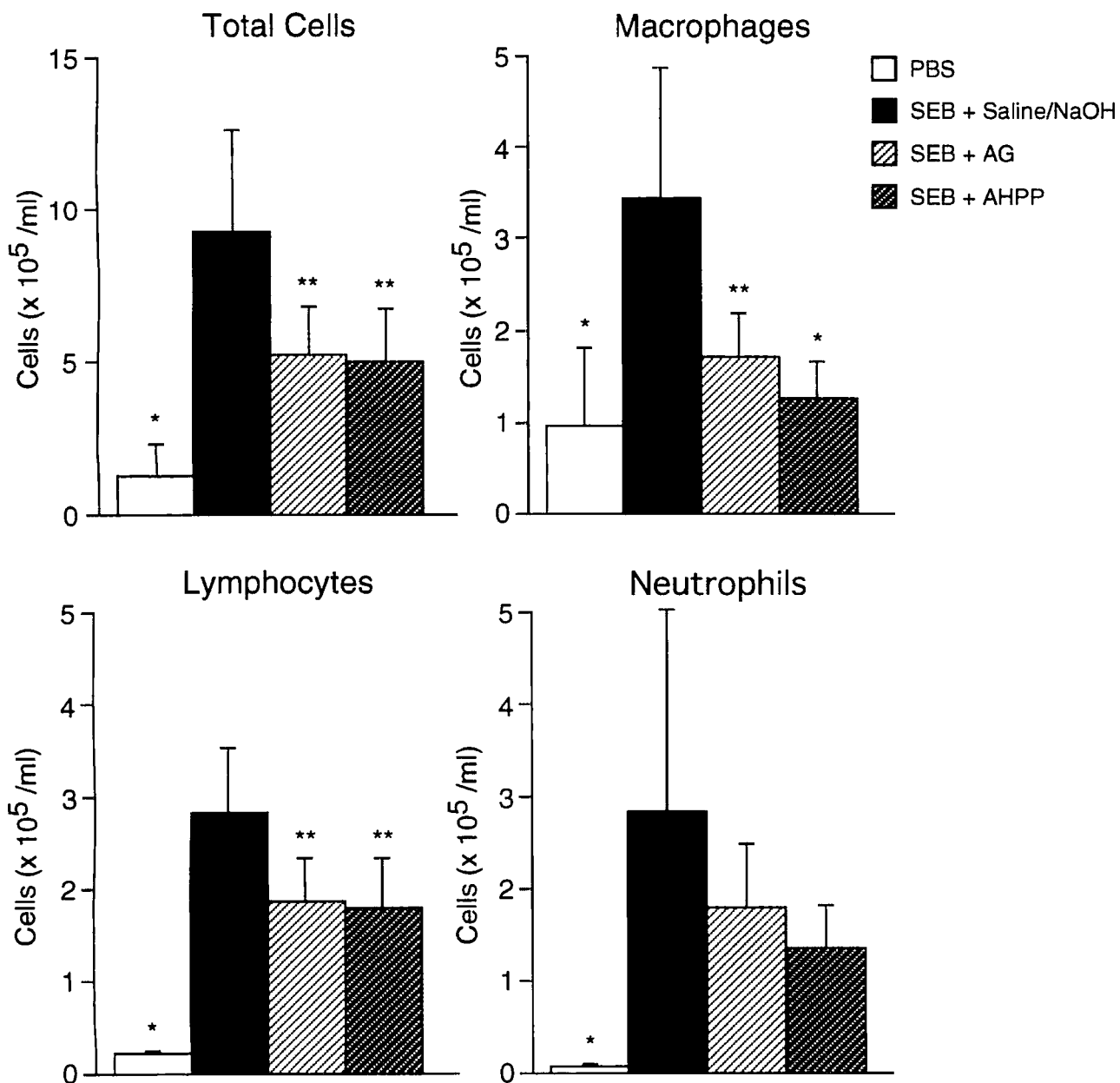


図6 SEB投与後のBAL所見に対するAG及びAHPPの影響

saline/NaOH投与、AG投与、そしてAHPP投与を行ったSEB投与マウスの3日後にBALを施行。BALF中の総細胞数、マクロファージ数、リンパ球数、そして好中球数について検討した。AG及びAHPP投与でBALF中への炎症細胞の集積が抑制された。

細胞数は平均値 ± 標準偏差で示した。\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$  対 SEB+saline/NaOH群。

(SEB+saline/NaOHマウス :  $n = 8$ , SEB+AGマウス :  $n = 8$ , SEB+AHPPマウス :  $n = 8$ )

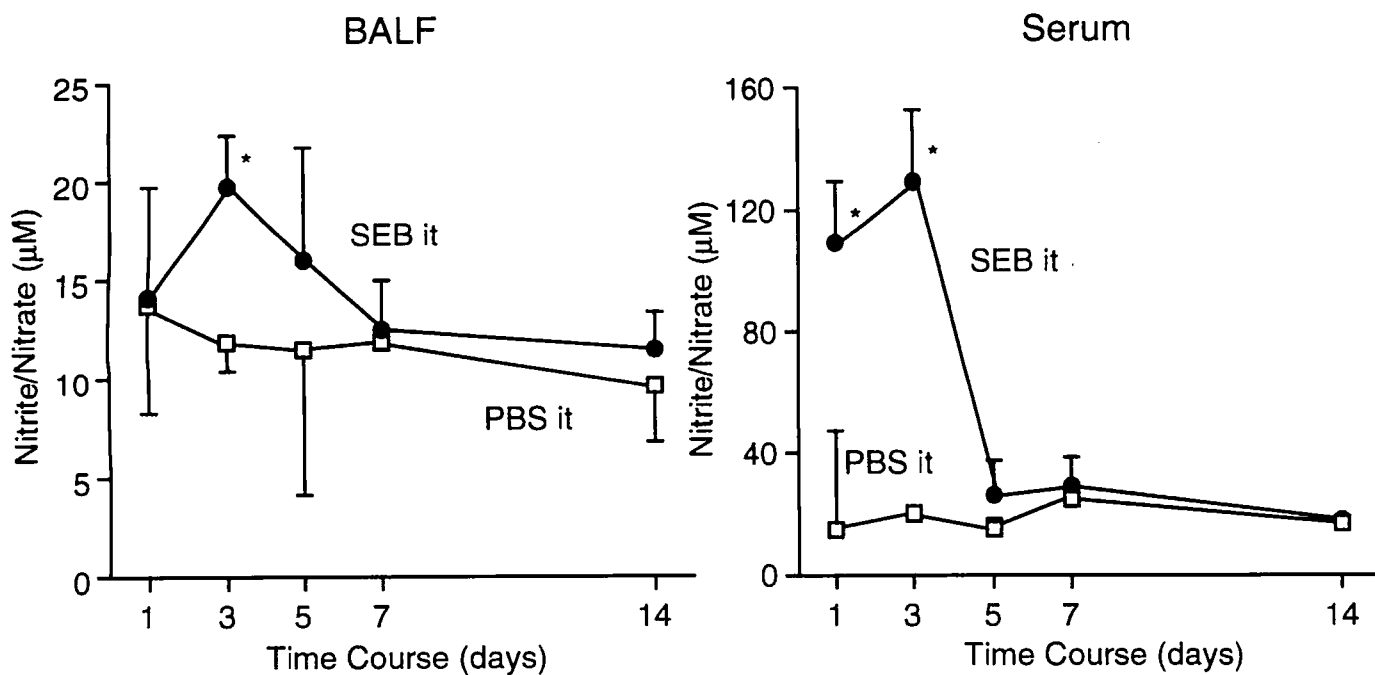


図7 SEB投与後のnitrite/nitrateの経時的変化

BALF及び血清中のnitrite/nitrate産生量を経時的に評価した。PBS投与マウスと比較しSEB投与マウスでは3日後、nitrite/nitrate産生量が上昇していた。産生量は平均値±標準偏差で示した。\* $p < 0.001$  対PBS群。(PBSマウス： $n = 6$ 、SEBマウス： $n = 6$ )

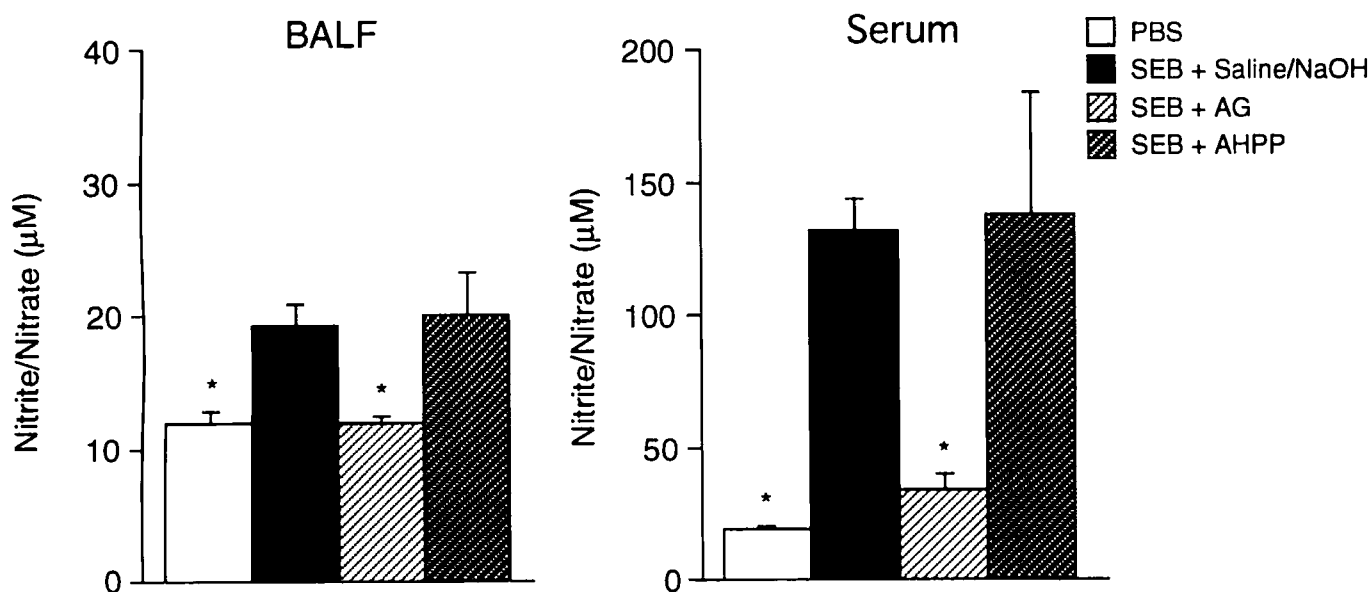


図8 SEB投与後のnitrite/nitrateに対するAG及びAHPPの影響

SEB投与3日後のBALF及び血清中のnitrite/nitrate産生量はAG及びAHPPの投与により抑制された。産生量は平均値±標準偏差で示した。\* $p < 0.001$  対SEB+saline/NaOH群。

(SEB+saline/NaOHマウス： $n = 6$ 、SEB+AGマウス： $n = 6$ 、SEB+AHPPマウス： $n = 6$ )

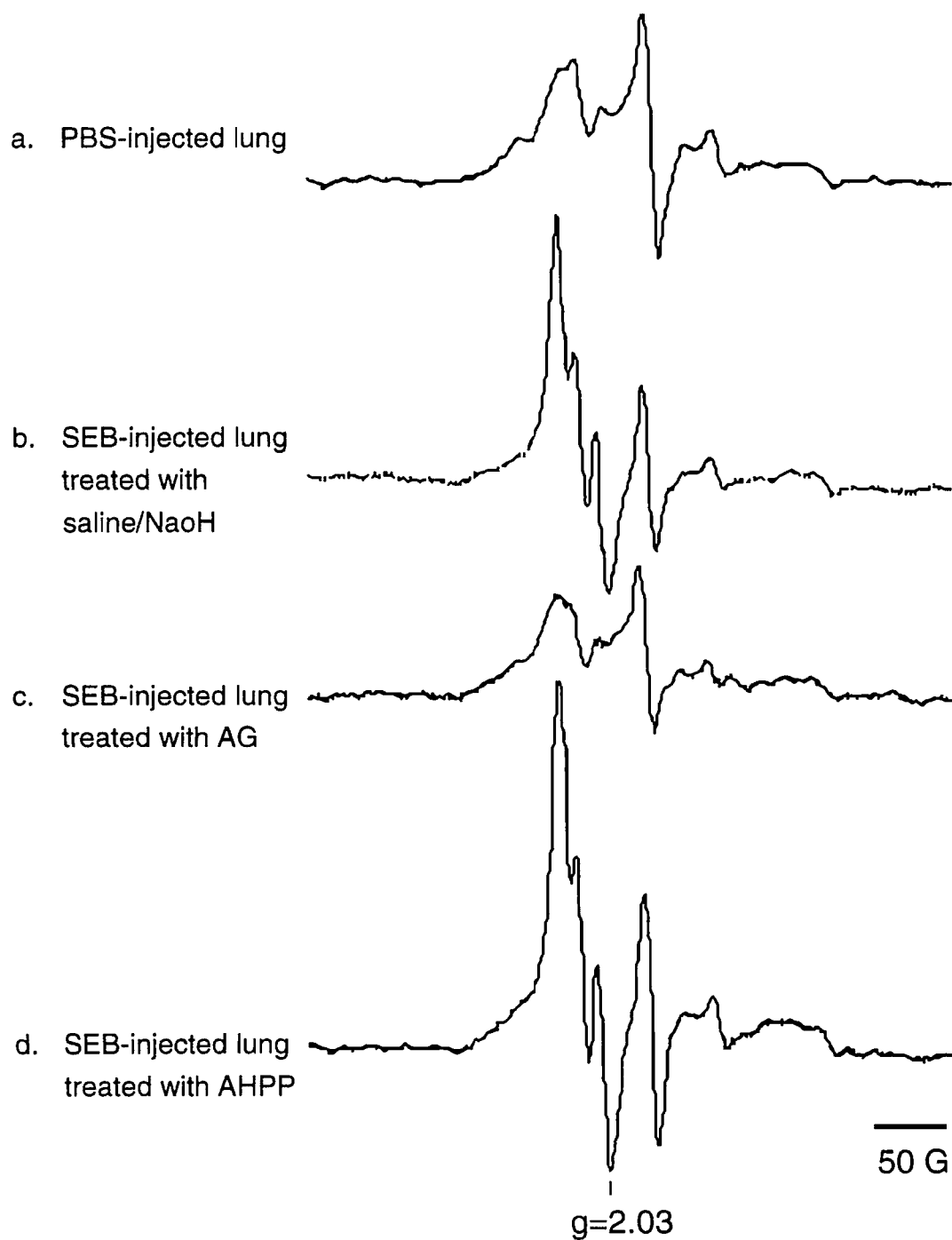


図9 SEB投与後のEPRスペクトル法を用いた直接的NO検出

スピントラッピング法によりSEB投与3日後のマウス肺におけるNO-(DTCS)<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>複合体のEPRシグナルを検出した。PBS投与マウス肺 (a)、saline/NaOH投与 (b)、AG投与 (c)、そしてAHPP投与 (d) を行ったSEB投与マウス肺におけるEPRスペクトルを示した。

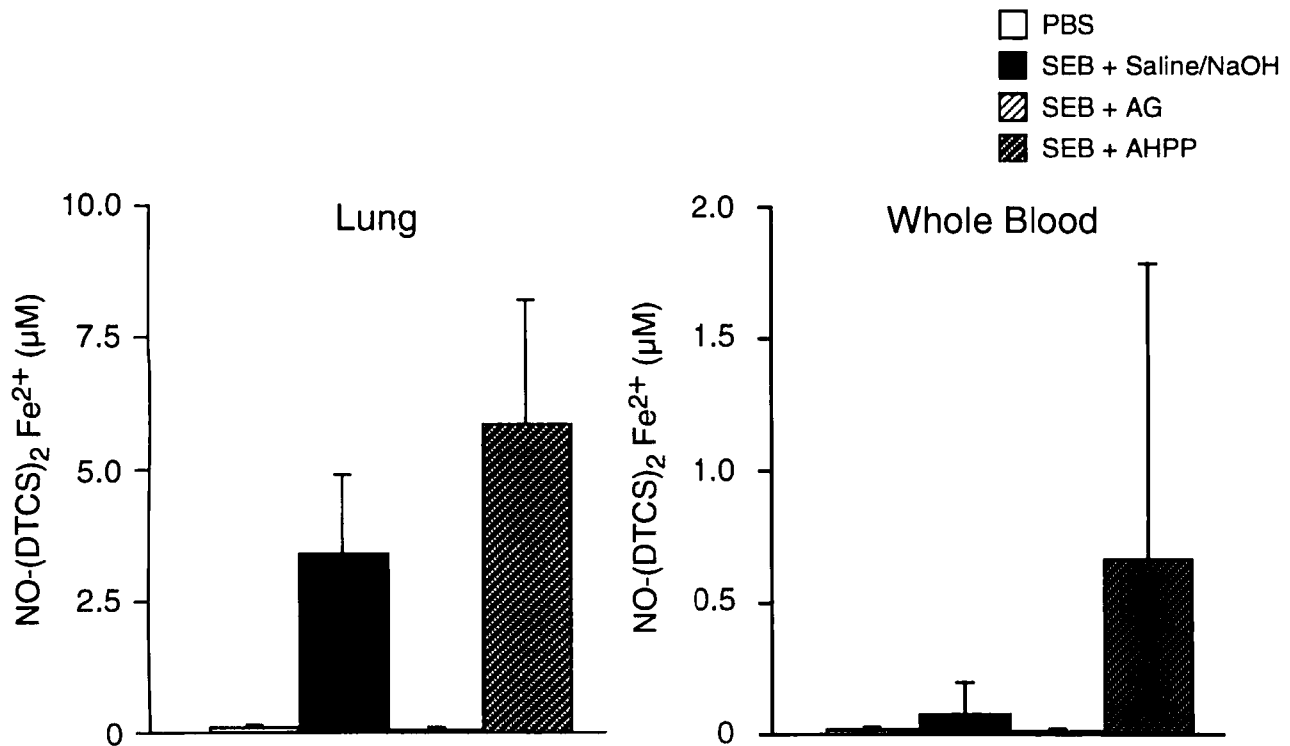


図10 EPRシグナルのスコア化及びAG、AHPPの影響

PBS投与マウス、saline/NaOH投与、AG投与、そしてAHPP投与を行ったSEB投与マウスの全血及び肺におけるNO-(DTCS)<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>複合体のEPRシグナルの強度をスコア化した。SEB投与3日後の全血及び肺におけるNO-(DTCS)<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>複合体のEPRシグナルの強度はAG及びAHPPの投与により抑制された。EPRシグナル強度は平均値 ± 標準偏差で示した。

(SEB+saline/NaOHマウス : n = 3、SEB+AGマウス : n = 3、SEB+AHPPマウス : n = 3)



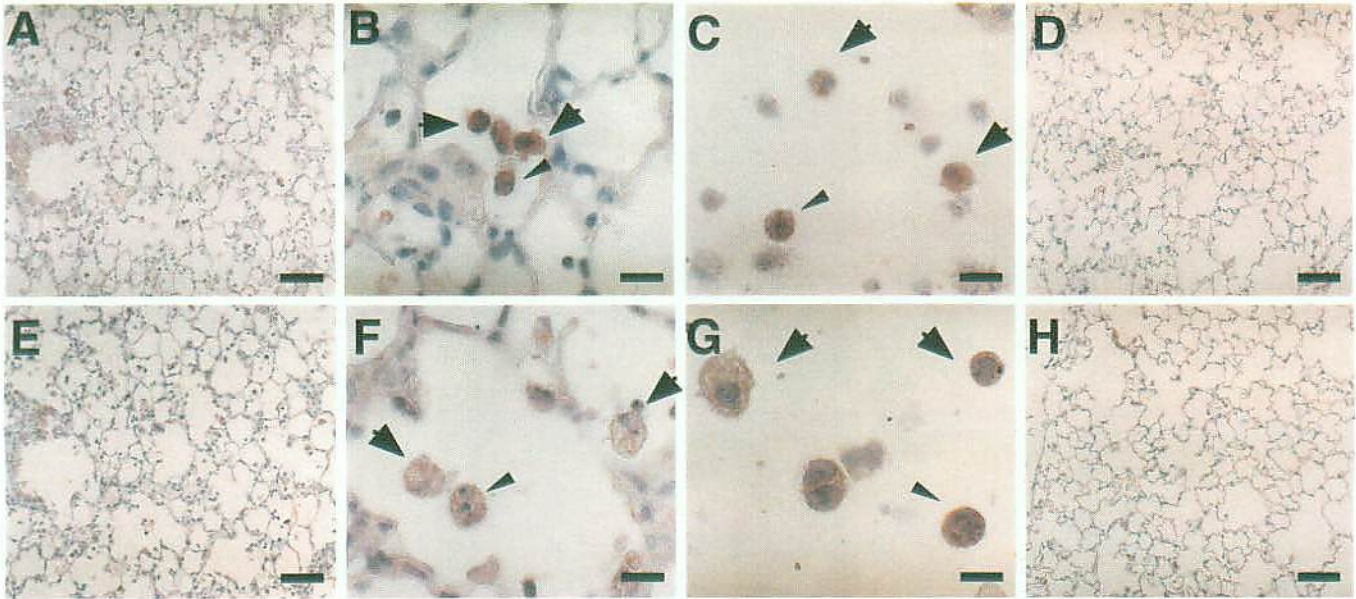


図11 SEB投与後の肺組織所見における免疫学的検討

SEB投与3日後のマウス肺及びBAL細胞において抗iNOS抗体(A-D)と抗nitrotyrosine抗体(E-H)を用いて免疫染色を行った。抗iNOS抗体での染色ではSEB投与マウス肺の肺胞と肺胞隔壁に浸潤したマクロファージ(矢印)と好中球(矢頭)に陽性像が認められた(A, B)。SEB投与BAL細胞でもマクロファージ(矢印)と好中球(矢頭)に陽性像が認められた(C)。コントロールとしてPBS投与肺を抗iNOS抗体で染色した(D)。抗nitrotyrosine抗体での染色で、同様の結果を得た(E-H)。Scale barはA, D, E, Hで50  $\mu\text{m}$ を示し、B, C, F, Gで10  $\mu\text{m}$ を示す。

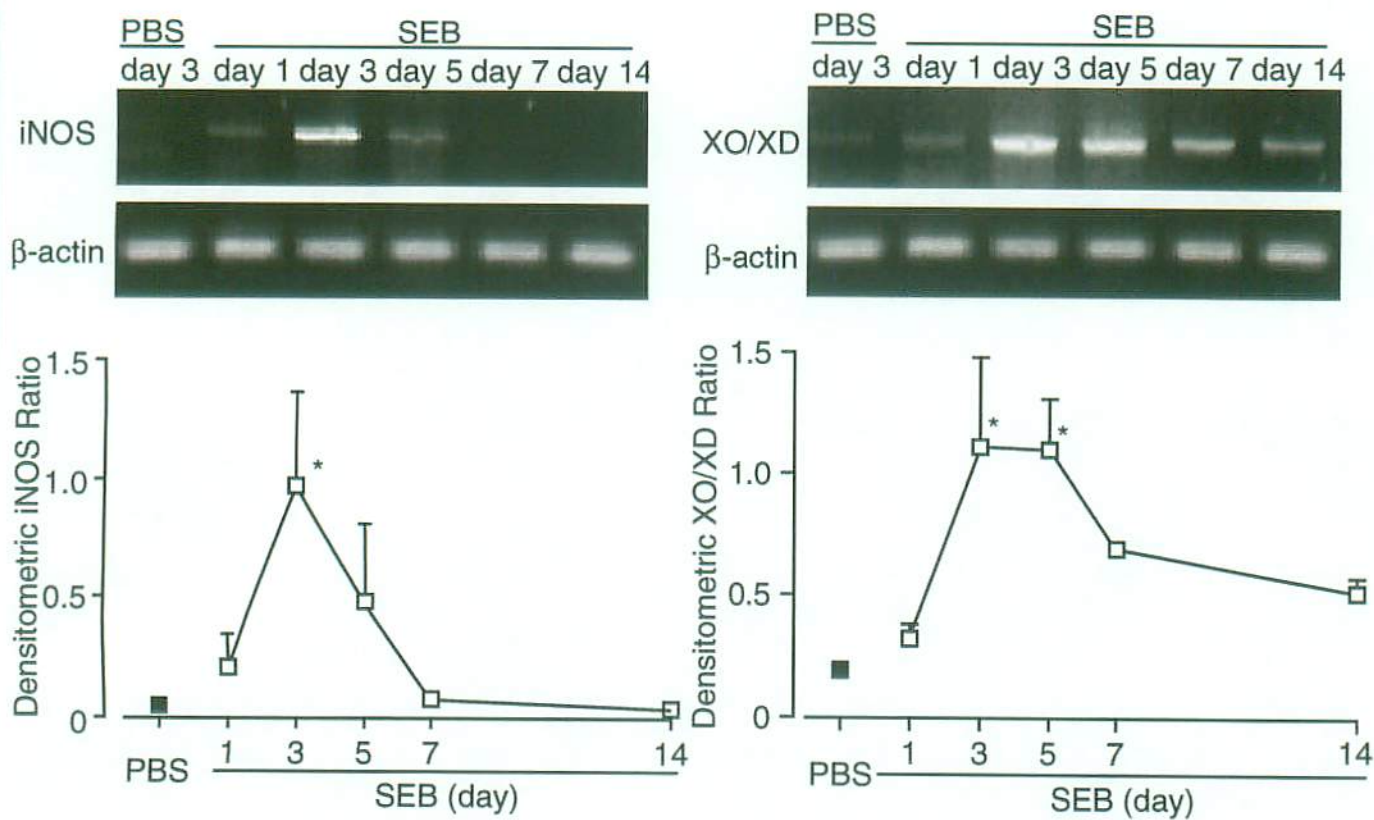


図14 BAL細胞中のiNOS及びXO/XD mRNA発現の経時的変化

PBS投与3日後及びSEB投与1、3、5、7、14日後のBAL細胞におけるiNOS及びXO/XD mRNA発現をRT-PCR法を用いて経時的に評価した。β-actin mRNAに対するiNOS及びXO/XD mRNAのDensitometric ratioは平均値±標準偏差で示した。\* $p < 0.005$  対PBS群。(PBSマウス：n=5、SEBマウス：n=5)

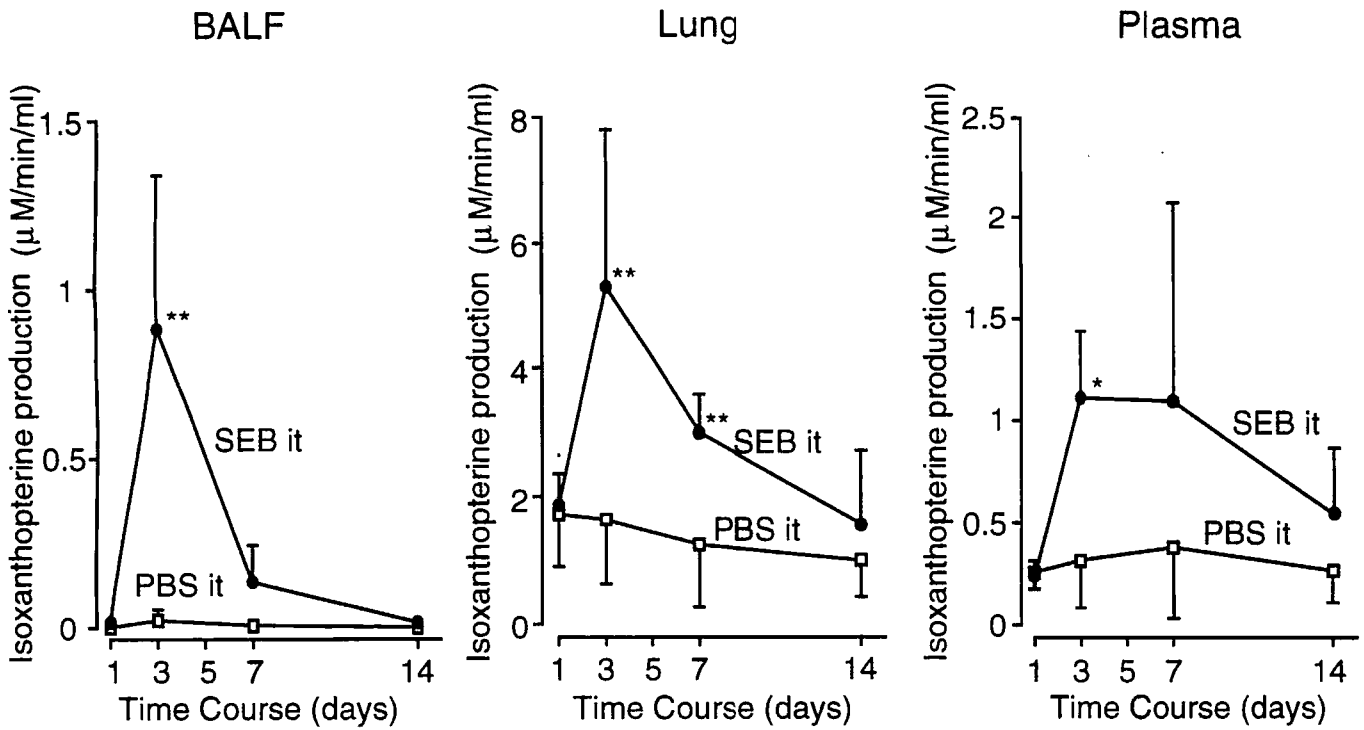


図12 SEB投与後のXO/XD活性の経時的変化

BALF、肺及び血漿中のXO/XD活性を経時的に評価した。PBS投与マウスと比較しSEB投与マウスでは3日後、XO/XD活性が上昇していた。活性は平均値±標準偏差で示した。\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.005$  対PBS群。(PBSマウス： $n = 5$ 、SEBマウス： $n = 5$ )

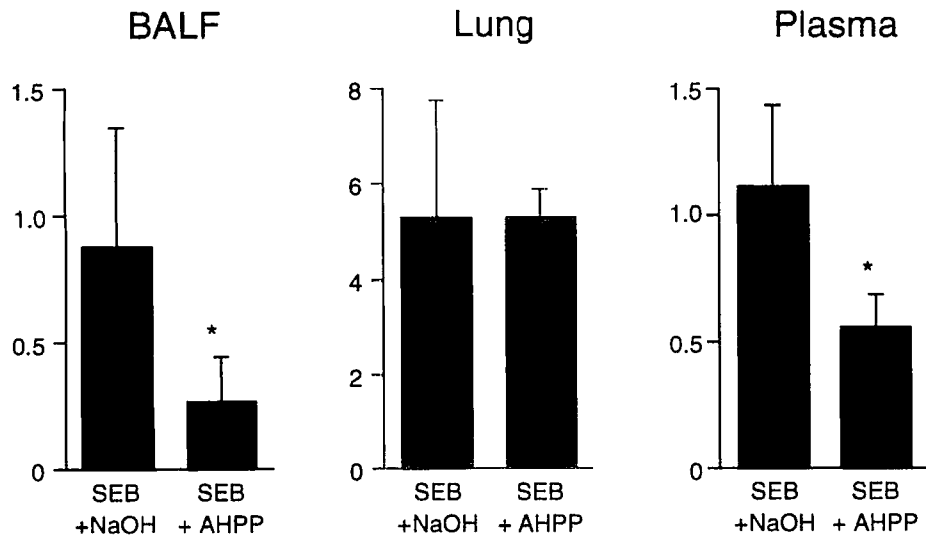


図13 SEB投与後のXO/XDに対するAHPPの影響

AHPP投与によってSEB投与3日後のBALF、肺及び血漿中のXO/XD活性は抑制された。活性は平均値±標準偏差で示した。\* $p < 0.005$  対SEB+NaOH群。(SEB+NaOHマウス： $n = 5$ 、SEB+AHPPマウス： $n = 5$ )

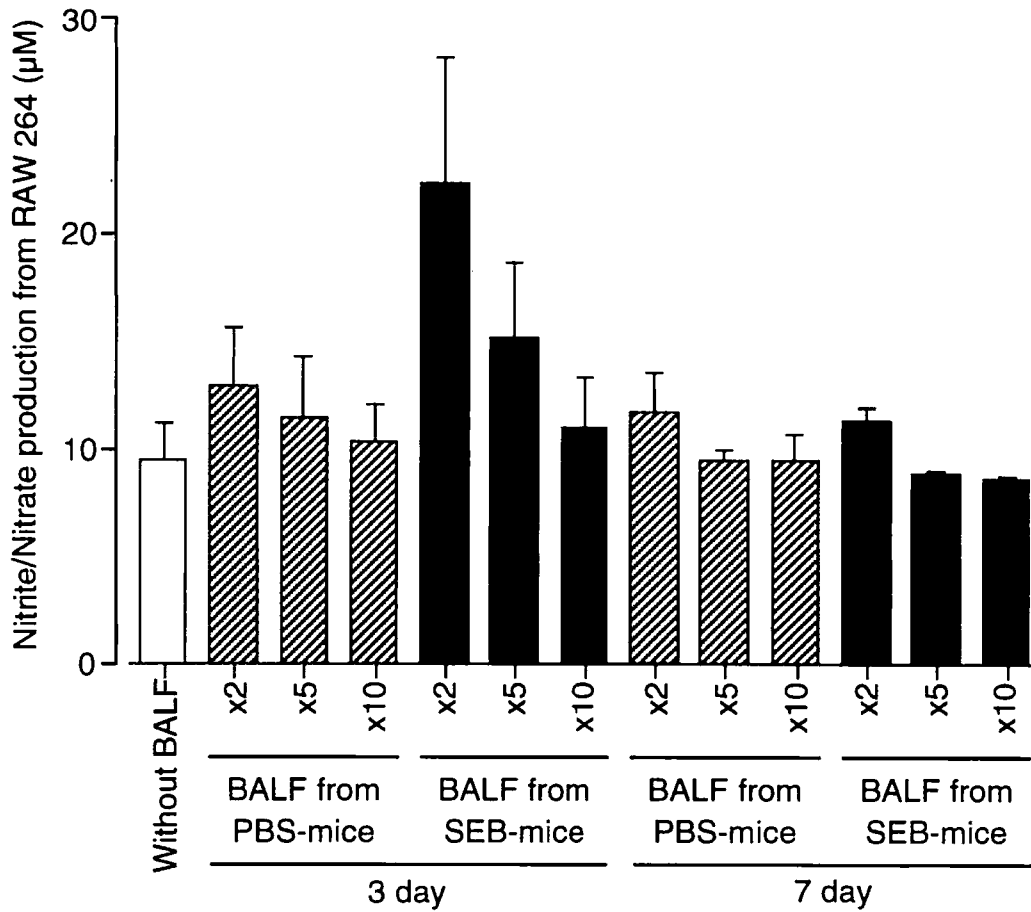


図15 SEB投与後BALFにおけるNOS-inducing activity

SEB投与後のBALF希釈付加しRAW264細胞株の培養液中のnitrite/nitrate産生量を測定することによりiNOSの誘導を評価した。産生量は平均値 ± 標準偏差で示した。

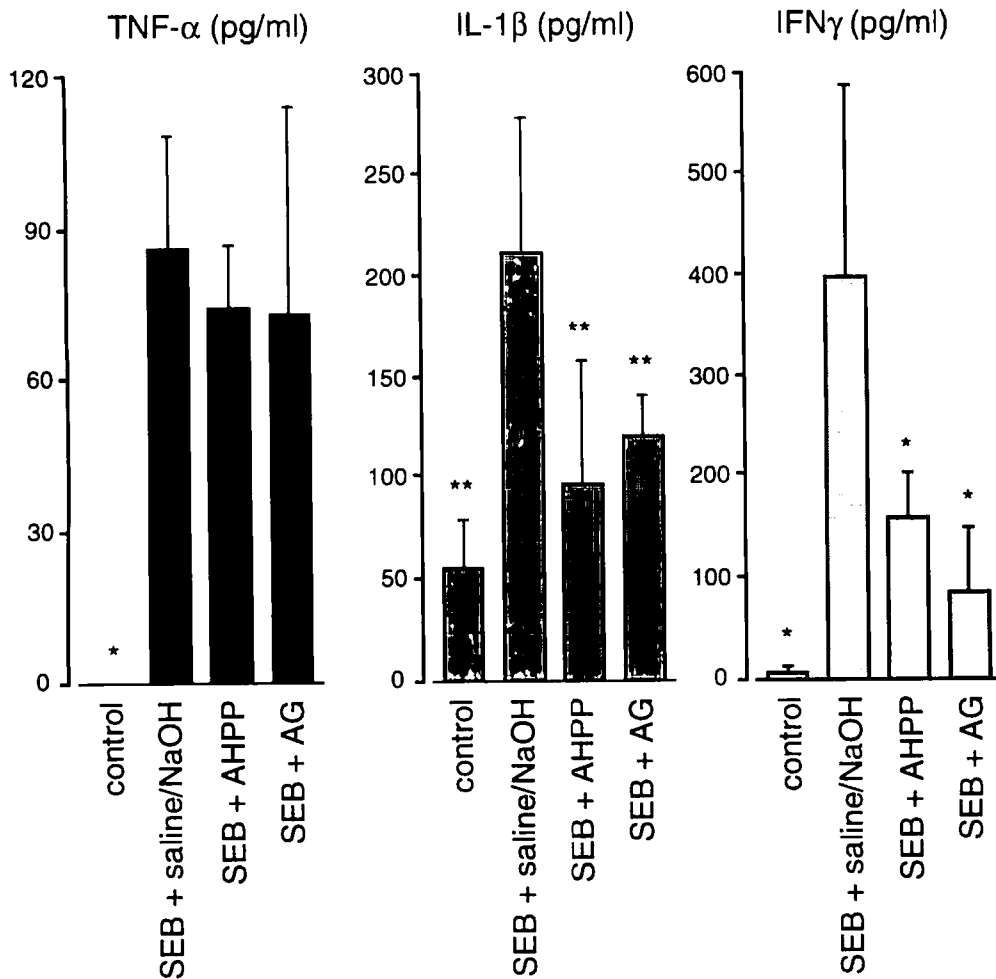


図16 SEB投与後BALF中のサイトカイン濃度に対するAG及びAHPPの影響

PBS投与マウス、saline/NaOH投与、AG投与、そしてAHPP投与を行ったSEB投与マウスからの3日後のBALFにおけるサイトカイン濃度をELISAを用いて評価した。サイトカイン濃度は平均値 ± 標準偏差で示した。\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$  対 SEB群。

(PBSマウス :  $n = 6$ 、SEBマウス :  $n = 6$ )