一酸化窒素 (NO) による感染防御と 病態形成に関する研究

赤 池 孝 章

熊本大学医学部微生物学教室
〒860-0811 熊本市本荘2-2-1

〔受理：2001年8月1日〕

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は、循環系・神経系の情報伝達にとどまらず、感染・炎症・免疫反応のメディエーターとして機能し、さらには免疫反応の調節、アポトーシスの制御、発癌など幅広い生命現象にかかわっていることが明らかにされつつある。このような多彩な活性は、NO そのものによる直接的作用のみならず、パーオキシナイトライトなどの NO 由来の反応性窒素酸化物により間接的に発現されることもわかってきた。興味あることに、NO は感染症においてほぼ普遍的に産生され、生体内で抗菌活性を発揮するだけでなく病原体と宿主の相互作用を修飾する重要な役割を演じている。感染防御と病態形成における NO の多彩な生物活性の解明は、21世紀における感染病因論の新たな展開の糸口となるかもしれない。

1. は じ め に

1980年代後半、ガス状の非常に単純な無機ラジカル分子である一酸化窒素 (NO) が、血管内皮細胞より産生される血管平滑筋弛緩因子の本態であることが明らかにされた (24)。その後、マクロファージなどの感染防御のエフェクター細胞からも、NO が産生され、宿主の感染防御に関与していることが報告された。さらにこれまで、NO は、神経情報伝達の調節や、炎症反応、酸化ストレス・細胞死の制御、変異原性・発癌など様々な生理機能や病態生理活性の発現に関与していることがわかっている (図1) (9)。

この様な NO の生物活性の多面性は、NO そのものの活性に加えて、NO 由来の反応性窒素酸化

物の作用によるものと考えられている。例えば、NO は生体内の主要な酸素ラジカルであるスーパーオキシド (O_2^-) と速やかに反応し、NO やスーパーオキシドより反応性の高いパーオキシナイトライト ($ONOO^-$) を生じ、また、NO の酸化物である亜硝酸イオン (NO_2^-) が過酸化水素 (H_2O_2) 依存的に好中球ミエロパーオキシダーゼなどにより酸化され、二酸化窒素 (NO_2) が生成することが明らかにされている。NO の活性発現のユニークな点は、このような反応性窒素酸化物が、NO の多彩な生理活性・病態生理活性の影の立て役者として活躍しているということである (図2)。そこで本稿においては、NO やそれ由来の反応性窒素酸化物の多彩な機能に焦点をあてながら、細菌・ウイルスなど様々な病原体に対する感染防御と病態形成における NO の役割を論ずる。

Takaaki AKAIKE
NO in Host Defense and Microbial Pathogenesis
Department of Microbiology, Kumamoto University School
of Medicine, Kumamoto 860-0811

図1. NO の病態生理活性の多様性。NO の多彩な機能は、NO と酸素ラジカルや遷移金属イオン (Fe, Cu) などとの反応を経て産生される各種反応性窒素酸化物の多様な化学的・生物学的反応性にもとづき発現される。

2. 感染病態における NO の産生誘導

感染・炎症反応における宿主応答において、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) がほぼ普遍的に誘導され、過剰な NO 産生がもたらされる (図3)。これまでに iNOS の発現が認められている細胞種としてはマクロファージ、心筋細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞、気管支上皮細胞、消化管上皮細胞、各種腫瘍細胞など多岐にわたっているが (21)、各種感染病態においては、例えば、グラム陰性菌の外膜成分である内毒素 (エンドトキシン; lipopolysaccharide, LPS) や、炎症性サイトカインとして知られるインターロイキン 1β (IL- 1β)、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン γ (IFN- γ) などが iNOS の発現を誘導することが知られている (21, 22, 36)。また黄色ブドウ球菌の外毒素である toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) やグラム陽性球菌の菌体表層のリボタイコ酸も iNOS 誘導能を示すことが報告されている (17, 51)。これらはそれぞれ単独では誘導活性は低い、いくつかの組み合わせによって相乗的な増加が観察される。一方、iNOS の発現は細菌感染のみならずウイルス感染においてもほぼ普遍的に誘導され、その発現は多くの場合

図2. NO からの反応性窒素酸化物の生成メカニズムとそれらの生物活性。NO とスーパーオキシド (O_2^-) からパーオキシナイトライト ($ONOO^-$) が生じる。スーパーオキシドから、スーパーオキシド不均化酵素 (SOD) に触媒され、あるいは、自然の不均化反応により生成する過酸化水素 (H_2O_2) と、好中球の myeloperoxidase (MPO) による亜硝酸イオン (NO_2^-) の酸化反応により二酸化窒素 (NO_2) が作られる。亜硝酸イオンは、NO が溶存酸素により水溶液中で酸化されて生ずる安定な窒素酸化物である。一方、NO は、溶存酸素により酸化され、ニトロソニウムイオン (NO^+) となるが、この際、生体内の SH 基 (R-SH) と付加反応が起こり、ニトロソチオール (RS-NO) が生成する。セルロプラスミン (CP) や銅イオンはこのニトロソチオール生成反応を触媒し促進する。

IFN- γ の産生誘導を介して間接的にもたらされる (図3)。

3. NO の抗菌活性

Hibbs らは、NO 発見の当初より、マクロファージに L-アルギニン依存的に発現される抗菌活性が NO によるものであることを示唆していた (23)。我々も、ラットの肺マクロファージの非定型抗酸菌 (*Mycobacterium avium* complex, MAC) 感染系を用いて、MAC 感染に伴い過剰に産生される NO が、細胞内の MAC に対して増殖抑制作用を発現することを確認しているが、興味あることに、MAC のある種の菌株は、NO 依存性の抗菌作用に対して抵抗性を示し、このような MAC 株に感染したマクロファージの機能が、過剰に産生される NO によりむしろ損なわれることを見出した (19)。最近では、NO が宿主免疫応答に対して、抑制作用を持つことが知られて

図3. 細菌・ウイルス感染症における iNOS 発現誘導メカニズム。iNOS は Th1 依存性である IFN- γ の誘導に伴い、間接的に誘導される。反対に、宿主の Th2 応答は iNOS の発現に対して抑制的に作用する。いくつかの病原体の構成成分や毒素は、iNOS を直接誘導する。また、抗酸菌などのマクロファージ内増殖（感染）により、直接、iNOS が誘導されることもある。

おり、NO の免疫抑制作用については後ほど改めて紹介する。

一方、生理的濃度の NO にははっきりした抗菌作用が確認できない。実際我々は、NO に依存した抗菌作用は、NO そのものというより、NO 由来の反応性の高い酸化物であるパーオキシナイトライトや NO₂ によりもたらされることを1990代前半より指摘してきた (27, 29, 49)。このような反応性窒素酸化物による殺菌効果は、グラム陽性・陰性菌を問わず、さらに、カンジダなどの真菌に対しても発揮される。また、我々は、NO による抗菌活性の発現メカニズムに関して、ヒト血清中の主要なプロテアーゼインヒビターである α_1 -proteinase inhibitor (α_1 PI) が NO により効率よくニトロソ化され、強い抗菌活性を発揮することを明らかにした (32, 33)。NO が、酸素分子や銅イオンにより酸化される過程で、NO の一電子酸化体であるニトロソニウムイオン (NO⁺) が生じ、これが蛋白質やアミノ酸の SH 基をニトロソ化すること、すなわち、SH 基と付加体を形成することが知られている (1, 4, 25)。この様な、SH 基-NO 付加体をニトロソチオールと呼び、以前より、ニトロソチオールが抗菌作用を有することが報告されていたが、例えば、生体内の主要なニトロソ化合物であるニトロソログルタチ

オン (GS-NO) やニトロソ化アルブミンなどの抗菌活性に比較して、ニトロソ化 α_1 PI は、黄色ブドウ球菌、A 群レンサ球菌、大腸菌、ネズミチフス菌など幅広い細菌に対して、極めて強力な増殖抑制作用を示す (1, 32, 33)。

さらに、NO やニトロソチオールは、生体内で強い抗アポトーシス活性を発揮して、細胞死を制御していることが明らかにされている (1, 25, 38)。我々は、NO やニトロソチオールが、A 群レンサ球菌の exotoxin B によるアポトーシス発現や、ネズミチフス菌に感染した宿主の細胞・組織のアポトーシスを抑えることにより、これらの細菌の組織侵襲を軽減し、間接的に、宿主の感染防御活性を高めていることを示唆する知見を得ており（論文投稿中）、NO による生体防御作用は実に多彩である。

4. 感染病態における NO の二面性

以上述べてきた様に、iNOS は、主として炎症性サイトカインや病原体由来の成分により発現誘導されることから、NO は感染病態において非特異的（初期）感染防御のエフェクター分子としての位置付けがなされてきた。しかし実際には、病原微生物の種類や感染時の状況により抗菌因子として作用したり、あるいはまったく逆に病原因子として宿主に有害な作用をもたらすなど二面性を持つことがわかってきた (2, 7, 8, 9, 34)。そこで以下に、様々な感染症における NO の役割について概説する。

1) 細菌感染と NO

細菌感染症における iNOS の発現は、前述した様に、グラム陰性菌の LPS やグラム陽性菌のリポタイコ酸などの菌体成分による直接的な誘導あるいは炎症性サイトカインの誘導を介した間接的経路を介して誘導される。また、結核菌や非定型抗酸菌などの細胞内寄生菌のマクロファージ内増殖によってもマクロファージに iNOS が発現され過剰な NO 生成がもたらされる (19) (図3)。NO は、電子伝達系におけるエネルギー代謝に必要なヘム化合物などの鉄を含む酵素や、核酸合成に関与するリボヌクレオチドレダクターゼを不活化することが明らかにされており、感染局所においてマクロファージや好中球などの炎症細胞によ

り生成される NO は、病原微生物のエネルギー代謝および核酸合成を阻害することによって、感染防御作用を発現することが示唆されている (35)。さらに、これら炎症細胞の NADPH オキシダーゼや炎症局所で誘導されるキサンチンオキシダーゼから産生されるスーパーオキシドは、NO と速やかに反応して NO よりも反応性の高いパーオキシナイトライトを生じる (43)。このパーオキシナイトライトは強力な oxidant であり、強い細胞傷害性を有し NO の抗菌活性に関与する (27)。

我々はマウスチフス症モデルにおいてサルモネラ (ネズミサルモネラ菌; *Salmonella* serovar Typhimurium) 感染肝組織における iNOS の発現誘導とそれに伴った NO とスーパーオキシドの過剰生成を確認した (46)。この際 iNOS は、肝内で形成される微小膿瘍内に集積した好中球を中心とする炎症浸潤細胞に強く発現されており、パーオキシナイトライトなどの反応性窒素酸化物生成のバイオマーカーであるニトロチロシンの免疫染色を施すと、微小膿瘍内に限局した濃染像が認められる。このモデルに NOS 阻害剤を投与した場合や、あるいは、iNOS 欠損マウスのサルモネラ感染においては、肝における微小膿瘍形成不全が観察され、細菌数の増加とともに敗血症へと移行し致死率が上昇することもわかっている (46) (論文投稿中) (図 4)。一方で我々は、iNOS 欠損マウスにおけるサルモネラ感染肝組織においては、広範な肝細胞のアポトーシスがもたらされることを見出している。このことは、前述した通り、NO が単なる抗菌物質として作用するのではなく、その強い抗アポトーシス活性を介して、細胞・臓器保護作用を発揮し、感染宿主の感染防御作用を間接的にサポートしていることを示している。

また、長崎大学熱帯医学研究所の大石らのグループは、緑膿菌による気道感染モデルなどにおいても、NO が感染防御能を発揮することを確認しており (42)、サルモネラ感染モデルのみならず、多くの細菌感染症においては NO は抗菌的に作用すると考えられる。

一方、*Helicobacter pylori* による胃感染系においては、ヒトの感染でも、スナネズミ感染やマウ

図 4. ネズミチフス菌感染による iNOS 欠損マウスの生存率の時間経過。ネズミチフス菌 (*Salmonella* serovar Typhimurium LT2 株; 5×10^4 CFU/マウス) を野生型マウス、各種 iNOS 欠損マウスに腹腔内投与した。

ス感染モデルにおいても、感染胃粘膜局所における iNOS の誘導と NO の過剰産生がもたらされるものの、はっきりした NO 依存性の抗菌活性は認められない。これは、*H. pylori* が、パーオキシナイトライトの消去システムを発現しているため、NO の抗菌作用に耐性であるためであると推察されている。例えば、我々は、*H. pylori* の菌体表層に発現されている強力なウレアーゼ活性を介して産生される二酸化炭素 (CO_2) が、パーオキシナイトライトと速やかに反応し、パーオキシナイトライトを菌体外で分解させることで、パーオキシナイトライトの菌体内へのアクセスを妨げていることを見出している (27)。また、*H. pylori* をはじめとして、いくつかの病原細菌は、パーオキシナイトライトに優れた消去活性を発揮する peroxiredoxin を発現しているため、NO による抗菌活性に耐性を示しているという指摘もなされている (16)。同様のメカニズムで NO に耐性化している細菌としては、MAC などが知られているが、この様な NO 耐性菌による感染モデルにおいては、感染に伴い過剰に産生される NO が、マクロファージなどの感染防御のエフェクター細胞の機能障害や宿主の Th1 応答を低下させることにより、感染防御免疫を抑制することもわかっている (2, 18, 19)。さらに、*H. pylori* の慢性感染系においては、NO 由来の反応性窒素

酸化物により、宿主細胞の塩基損傷を介して、強力な変異原性が発揮され、胃癌の発生を誘発する可能性も示唆されている (2, 9)。従って、当然のことではあるが、生体内に侵入した病原体の NO に対する感受性の有無が、宿主の感染応答における NO による防御効果を決定する。

さらに、過剰な NO 産生が、宿主に不利に働く場合として、細菌性髄膜炎 (11, 45) や重症細菌感染症である敗血症やエンドトキシンショックなどが挙げられる (50)。すなわち、iNOS により過剰に産生される NO が、その強い血管弛緩作用や細胞障害作用を介して、エンドトキシンショックにおける遷延性の低血圧症や acute respiratory distress syndrome (ARDS) 病態の増悪の要因となることが明らかにされている。実際我々は、NO 消去剤、PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) を開発し、これが、ラットのエンドトキシンショックモデルに対し、著明な抗低血圧・抗ショック作用と致死率の改善を示すことを報告している (6, 13, 28, 29, 50)。

2) ウイルス感染と NO

ウイルス感染症においても iNOS の誘導が認められる (2, 5, 7, 8, 10-12, 20)。細菌感染の場合と同様に、ウイルス感染症においても、ウイルス構成蛋白や RNA による直接的な iNOS 誘導が知られているが、多くの場合、IFN- γ 等の炎症性サイトカインによって間接的に誘導されるものと考えられる (図 3)。実際、我々はマウスインフルエンザウイルス感染モデルにおいてみられる過剰な NO 産生が IFN- γ ノックアウトマウスでは著明に抑制されることを確認している。NO の抗ウイルス作用については議論のあるところで、細菌感染とは対照的に、ウイルス種によりかなり異なった報告が見られる。いくつかのウイルス、特に DNA ウイルスでは NO が抗ウイルス活性を持つことが指摘されており、RNA ウイルスではコクサッキーウイルスに対する抗ウイルス活性が報告されている。しかし、その他のウイルスに対する NO の抗ウイルス活性については不明の点が多い。最近の報告では、オルソミクソウイルス、パラミクソウイルス、マウスワクシニアウイルス、コロナウイルス、その他いくつかのウイル

スでは明らかな NO の抗ウイルス活性は認められないとされている (2, 7)。

我々はこれまで、ウイルス感染病態において過剰に産生される活性酸素・酸素ラジカルが宿主に酸化ストレスを与え有害な影響を及ぼすことを示してきた (3, 30, 37)。さらに我々は、マウスのインフルエンザウイルスおよびセンダイウイルス肺炎モデルにおいてウイルス感染に対する感染防御反応のひとつとして、iNOS が誘導され、局所に過剰な NO が産生されることを見出した (5, 10)。このモデルに NOS 阻害剤を投与したり、iNOS 欠損マウスを用いて本モデルにおける NO の役割を検討した結果、NO 産生が抑制されることにより (あるいは、NO 産生が欠如することにより)、肺炎像の改善とともに有意な生存率の改善がもたらされ、このときの肺内のウイルス増殖は何ら変化を受けなかった。野生型マウスに認められる浸潤マクロファージなどの炎症細胞や肺胞内滲出液などのニトロチロシンの免疫染色は iNOS 欠損マウスではほとんど認められないことから、本病態では NO は生体内で有効な抗ウイルス作用を発揮することなく、パーオキシナイトライトなどの反応性窒素酸化物に変換されることにより酸化ストレスのメディエータとして機能し、細胞傷害や組織障害をもたらすことが示唆された (31, 39, 41, 43, 44)。また我々は最近、パーオキシナイトライトが、これまで知られていなかった大変ユニークな蛋白質の翻訳後修飾を介して、matrix metalloproteinase (MMP) を活性化し、MMP 活性に依存した血管透過性亢進と細胞外マトリックスの分解をもたらすことにより、感染・炎症病巣の組織破壊を促進することを明らかにした (40, 48)。同様の組織障害メカニズムがヘルペス脳炎モデルや肺炎モデルなど他のウイルス感染症でも認められており、NO 依存性の組織障害はウイルス感染症の病態発現において普遍的なものである可能性が考えられる (2, 7)。

3) NO による病原体遺伝子の変異促進作用

インフルエンザウイルスやヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) などの RNA ウイルスは、その遺伝子複製の不正確さにより、一回の複製でヌクレチド残基あたり $10^{-5} \sim 10^{-3}$ という頻度で変異し、極めて高度な

遺伝的多様性をもつ集団, quasispecies として存在し, 様々な環境中のストレスにより淘汰されながら分子進化を繰り返していると考えられている (2)。例えば, インフルエンザウイルスや HIV の, 薬剤耐性化, 中和抗体からのエスケープなどの現象などは, 効果的な抗ウイルス薬やワクチンの開発を困難にしており, 各種ウイルスの感染症対策において深刻な問題となっている。遺伝子の多様性は, *H. pylori* などにおいても知られており, この様な, 遺伝学的多様性に基づいた病原体の速やかな進化の分子メカニズムの解明は, ウイルスのみならず細菌感染対策においても重要な課題である。

興味あることに, NO やパーオキシナイトライトによる酸化ストレスが, 宿主はもちろんこと, 局所で増殖を繰り返すウイルス側にも加えられ, ウイルスに変異原性をもたらし, その分子進化に関わることがわかってきた。例えば, Beck らは, コクサッキーウイルスの心筋炎モデルを用いて, 酸化ストレスがコクサッキーウイルス弱毒株の遺伝子にいくつかの点変異を誘発し, ウイルスが強毒株に変化することによりウイルスの病原性が増強し, 致死的な心筋炎がもたらされることを明らかにした (14, 15)。また, ウイルス以外では, 以前よりマクロファージから産生される活性酸素が, 通性細胞内寄生菌であるネズミチフス菌に対して変異原性を発現することが知られている (47)。

一方我々は, 酸化ストレスとウイルスの分子進

図5. ウイルス肺炎における NO 依存的ウイルス変異促進。iNOS 欠損マウスおよび野生型マウスに GFP-SeV を経鼻噴霧感染させ, 肺内で増殖したウイルスの変異率を経時的に測定した。

化の関わりについて, 特に NO やパーオキシナイトライトによるウイルスの変異促進作用に焦点をあて解析を試みた (5)。具体的には, green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を組み込んだ組み換えセンダイウイルス (GFP-SeV) を, *in vitro* の系でパーオキシナイトライトにより処理したり, iNOS 欠損マウスに感染させることで, GFP-SeV の GFP 遺伝子の変異率を解析した。その結果, パーオキシナイトライトがウイルス遺伝子に対して強い変異原性を発揮すること, また, NO の過剰生成がもたらされない iNOS 欠損マウスの肺炎病巣においては, 野生型マウスに比較して GFP-SeV の変異率が有意に低いことがわ

図6. NO の病原体ゲノム変異と分子進化への関与。

かった (図5)。さらに、この様な過剰な NO 産生に依存したウイルス変異率の上昇は、iNOS 遺伝子をトランスフェクトし、iNOS を強制的に発現した細胞の感染系においても確認された。これらの知見は、感染病態のメディエーターとして産生されるパーオキシナイトライトをはじめとする NO 由来の窒素酸化物が、宿主のみならず病原体に対しても酸化ストレスをもたらし、病原体ゲノムの変異を促していることを示しており、さらにこのことがウイルスゲノムの多様性を拡大させ、その分子進化を促進させるドライビングフォースとなる可能性を示唆している (図6)。

5. お わ り に

感染病態の本質は病原体と宿主の間で繰り広げられるダイナミックな相互作用である。近年、多くの感染症の病態が、コッホ・北里らにより提唱された画一的な感染病因論では、十分に理解できないことが指摘されはじめている。今後、多彩な生体機能を発揮する NO などのフリーラジカルや反応性窒素酸化物の作用機構の分子基盤を明らかにすることにより、感染病因論における新たなパラダイムシフトが展開することが期待される。

謝 辞

この度の小林六造記念賞受賞の応募にあたりご推薦の労を賜りました神谷 茂教授 (杏林大学医学部微生物学教室)、および、受賞の対象となりました研究を遂行する機会を頂きました前田 浩教授 (熊本大学医学部微生物学教室) に心よりお礼申し上げます。また、本研究遂行にあたり、貴重なご助言とご指導を頂きました永井美之名古屋大学名誉教授 (富山県衛生研究所長)、ならびに、発表論文に共著者として加わって頂きました多くの共同研究者の皆様と熊本大学医学部微生物学教室の宮本洋一博士、澤 智裕博士をはじめ、大学院生諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Akaike, T. (2000): Mechanisms of biological S-nitrosation and its measurement. *Free Radic. Res.* **33**, 461-469.
- 2) Akaike, T. (2001): Role of free radicals in viral

pathogenesis and mutation. *Rev. Med. Virol.* **11**, 87-101.

- 3) Akaike, T., Ando, M., Oda, T., Doi, T., Ijiri, S., Araki, S., Maeda, H. (1990): Dependence on O_2^- generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice. *J. Clin. Invest.* **85**, 739-745.
- 4) Akaike, T., Inoue, K., Okamoto, T., Nishino, H., Otagiri, M., Fujii, S., Maeda, H. (1997): Nanomolar quantification and identification of various nitrosothiols by high performance liquid chromatography coupled with flow reactors of metals and Griess reagent. *J. Biochem.* **122**, 459-466.
- 5) Akaike, T., Fujii, S., Kato, A., Yoshitake, J., Miyamoto, Y., Sawa, T., Okamoto, S., Suga, M., Asakawa, M., Nagai, Y., Maeda, H. (2000): Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection in vivo. *FASEB J.* **14**, 1447-1454.
- 6) Akaike, T., Maeda, H. (1996): Quantitation of nitric oxide using 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide (PTIO). *Methods Enzymol.* **268**, 211-221.
- 7) Akaike, T., Maeda, H. (2000): Nitric oxide and virus infection. *Immunology* **101**, 300-308, 2000.
- 8) Akaike, T., Maeda, H. (1999): Nitric oxide in influenza. p. 397-415, Fang, F.C. (ed), In *Nitric Oxide and Infection*, New York, Kluwer Academic/Plenum Publishing Co.
- 9) Akaike, T., Maeda, H. (2000): Pathophysiological Effects of High-Output Production of Nitric Oxide. p. 733-745, In Ignarro, L.J. (ed), *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, San Diego, Academic Press.
- 10) Akaike, T., Noguchi, Y., Ijiri, S., Setoguchi, K., Suga, M., Zheng, Y.M., Dietzschold, B., Maeda, H. (1996): Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 2448-2453.
- 11) Akaike, T., Suga, M., Maeda, H. (1998): Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**, 64-73.
- 12) Akaike, T., Weihe, E., Schaefer, M., Fu, Z.F., Zheng, Y.M., Voge, W., Schmidt, H., Koprowski, H., Dietzschold, B. (1995): Effect of neurotropic virus infection on neuronal and inducible nitric oxide synthase activity in rat brain. *J. Neurovirol.* **1**, 118-125.

- 13) Akaike, T., Yoshida, M., Miyamoto, Y., Sato, K., Kohno, M., Sasamoto, K., Miyazaki, K., Ueda, S., Maeda, H. (1993): Antagonistic action of imidazolineoxyl *N*-oxides against endothelium-derived relaxing factor/NO through a radical reaction. *Biochemistry* **32**, 827–832.
- 14) Beck, M.A., Esworthy, R.S., Ho, Y.S., Chu, F.F. (1998): Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. *FASEB J.* **12**, 1143–1149.
- 15) Beck, M.A., Beck, M.A., Shi, Q., Morris, V.C., Levander, O.A. (1995): Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nat. Med.* **1**, 433–436.
- 16) Bryk, R., Griffin, P., Nathan, C. (2000): Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **407**, 211–215.
- 17) De Kimpe, S.J., Kengatharan, M., Thiemermann, C., Vane, J.R. (1995): The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10359–10363.
- 18) Doherty, T.M., Sher, A. (1997): Defects in cell-mediated immunity affect chronic, but not innate, resistance of mice to *Mycobacterium avium* infection. *J. Immunol.* **158**, 4822–4831.
- 19) Doi, T., Ando, M., Akaike, T., Suga, M., Sato, K., Maeda, H. (1993): Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect. Immun.* **61**, 1980–1989.
- 20) Fujii, S., Akaike, T., Maeda, H. (1999): Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Virology* **256**, 203–212.
- 21) 藤井重元, 赤池孝章, 前田 浩 (1996): NO 合成酵素の発現調節機構と NO の機能. *呼吸* **15**, 151–158.
- 22) Fujisawa, H., Ogura, T., Hokari, A., Weisz, A., Yamashita, J., Esumi, H. (1995): Inducible nitric oxide synthase in a human glioblastoma cell line. *J. Neurochem.* **64**, 85–91.
- 23) Hibbs, J.B. Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z. (1987): Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235**, 473–476.
- 24) Ignarro, L.J. (2000): Introduction and overview. p. 3–19, In Ignarro, L.J. (ed), *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, San Diego, Academic Press.
- 25) Ikebe, N., Akaike, T., Miyamoto, Y., Hayashida, K., Yoshitake, J., Ogawa, M., Maeda, H. (2000): Protective effect of S-nitrosylated α_1 -protease inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 904–911.
- 26) Inoue, K., Akaike, T., Miyamoto, Y., Okamoto, T., Sawa, T., Otagiri, M., Suzuki, S., Yoshimura, T., Maeda, H. (1999): Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo. *J. Biol. Chem.* **274**, 27069–27075.
- 27) Kuwahara, H., Miyamoto, Y., Akaike, T., Kubota, T., Sawa, T., Okamoto, S., Maeda, H. (2000): *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production. *Infect. Immun.* **68**, 4378–4383.
- 28) Maeda, H., Akaike, T., Yoshida, M., Suga, M. (1994): Multiple functions of nitric oxide in pathophysiology and microbiology: analysis by a new nitric oxide scavenger. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 588–592.
- 29) Maeda, H., Akaike, T., Yoshida, M., Sato, K., Noguchi, Y. (1995): A new nitric oxide scavenger, imidazolineoxyl *N*-oxide derivative, and its effects in pathophysiology and microbiology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **196**, 37–50.
- 30) Maeda, H., Akaike, T. (1991): Oxygen free radicals as pathogenic molecules in viral diseases. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **198**, 721–727.
- 31) Maeda, H., Okamoto, T., Akaike, T. (1998): Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol. Chem.* **379**, 193–200.
- 32) Miyamoto, Y., Akaike, T., Alam, M.S., Inoue, K., Hamamoto, T., Ikebe, N., Yoshitake, J., Okamoto, T., Maeda, H. (2000): Novel functions of human α_1 -protease inhibitor after S-nitrosylation: inhibition of cysteine protease and antibacterial activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 918–923.
- 33) Miyamoto, Y., Akaike, T., Maeda, H. (2000): S-nitrosylated human α_1 -protease inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**, 90–97.
- 34) Nathan, C. (1997): Inducible nitric oxid synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* **100**, 2417–2423.
- 35) Nathan, C.F., Hibbs J.B. Jr. (1991): Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*, **3**, 65–70.
- 36) Nussler, A.K., Billiar, T.R. (1993): Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 171–178.

- 37) Oda, T., Akaike, T., Hamamoto, T., Suzuki, F., Hirano, T., Maeda, H. (1989): Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymer-conjugated SOD. *Science* **244**, 974-976.
- 38) Ogura, T., Tatemichi, M., Esumi, H. (1997): Nitric oxide inhibits CPP32-like activity under redox regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 365-369.
- 39) Okamoto, T., Akaike, T., Nagano, T., Miyajima, S., Suga, M., Ando, M., Ichimori, K., Maeda, H. (1997): Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* **342**, 261-274.
- 40) Okamoto, T., Akaike, T., Sawa, T., Miyamoto, Y., van der Vliet, A., Maeda, H. (2001): Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J. Biol. Chem.* (in press).
- 41) Sato, K., Suga, M., Akaike, T., Fujii, S., Muranaka, H., Doi, T., Maeda, H., Ando, M. (1998): Therapeutic effect of erythromycin on influenza virus-induced lung injury in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 853-857.
- 42) Satoh, S., Oishi, K., Iwagaki, A., Senba, M., Akaike, T., Akiyama, M., Mukaida, N., Matsushima, K., Nagatake, T. (2001): Dexamethasone impairs pulmonary defense against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS gene expression and peroxynitrite production in mice. *Clin. Exp. Immunol.* (in press).
- 43) Sawa, T., Akaike, T., Maeda, H. (2000): Tyrosine nitration by peroxynitrite formed from nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 32467-32474.
- 44) Sugiura, H., Ichinose, M., Oyake, T., Mashito, Y., Ohuchi, Y., Endoh, N., Miura, M., Yamagata, S., Koarai, A., Akaike, T., Maeda, H., Shirato, K. (1999): Role of peroxynitrite in airway microvascular hyperpermeability during late allergic phase in guinea pigs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 663-671.
- 45) Suzuki, Y., Fujii, S., Tominaga, T., Yoshimoto, T., Fujii, S., Akaike, T., Maeda, H., Yoshimura, T. (1999): Direct evidence of in vivo nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the brain of living rat during experimental meningitis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**, 1175-1178.
- 46) Umezawa, K., Akaike, T., Fujii, S., Suga, M., Setoguchi, K., Ozawa, A., Maeda, H. (1997): 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.
- 47) Weitzman, S.A., Stossel, T.P. (1981): Mutation caused by human phagocytes. *Science* **212**, 546-547.
- 48) Wu, J., Akaike, T., Hayashida, K., Okamoto, T., Okuyama, A., Maeda, H. (2001): Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases. *Jpn. J. Cancer Res.* **92**, 439-451.
- 49) Yoshida, K., Akaike, T., Doi, T., Sato, K., Ijiri, S., Suga, M., Ando, M., Maeda, H. (1993): Pronounced enhancement of NO-dependent antimicrobial action by an NO-oxidizing agent, imidazolineoxyl N-oxide. *Infect. Immun.* **61**, 3552-3555.
- 50) Yoshida, M., Akaike, T., Wada, Y., Sato, K., Ikeda, K., Ueda, S., Maeda, H. (1994): Therapeutic effects of imidazolineoxyl N-oxide against endotoxin shock through its direct nitric oxide-scavenging activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 923-930.
- 51) Zembowicz, A., Vane, J.R. (1992): Induction of nitric oxide synthase activity by toxic shock syndrome toxin 1 in a macrophage-monocyte cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 2051-2055.