

ミエロペルオキシダーゼコード領域の日本人集団での変異に関する研究

分担研究者 亀岡 洋祐 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は抗好中球抗体 (誘導) 血管炎 (MPO-ANCA) 発症のトリガーとなる分子と考えられ、MPO の日本人集団における変異の頻度を明らかにすることは、MPO-ANCA 関連血管炎治療方策を考案する際の基礎的データとして重要である。本研究においては、MPO 欠損症患者および、健常者の MPO 遺伝子コード領域を解析し MPO コード領域における日本人集団における変異頻度を求めた。その結果、MPO の機能に重要なエクソン 9 における変異頻度は 1000 人中 7 人と比較的高い頻度で観察されたことから、血管炎およびその他の炎症性疾患の背景として考慮されなければならない要因であることが示唆された。

A. 研究目的

抗好中球抗体誘導性血管炎は炎症性疾患において局部炎症に中心的な役割を果たす好中球から放出される MPO は、局所炎症において多量に放出されハライドイオンの生成によって殺菌・殺ウイルス作用の中心的な役割を担っている。この MPO は生体細胞にとっても毒性があり、炎症局所においては好中球が放出した MPO によって組織が傷害される場合がある。組織に対して障害性の強い MPO に対して生体内では抗 MPO 抗体が生成され、この抗 MPO 抗体によって、局所炎症反応はカスケードを起こし炎症増強が起こるものと考えられる。自己の分子である MPO に対する抗体は通常は生成されないが、MPO の遺伝子変異がこの免疫寛容のバランスを崩し自己抗体形成にかかわっている可能性が考えられ

ることから、日本人集団における MPO 遺伝子の変異頻度を測定するとともに、変異種を同定し、全身性炎症への性臨床対応に寄与するための基礎データを提供することを目的とした。

B. 研究方法

MPO 欠損症患者材料として、3 例の完全欠損症、1 例の不完全欠損症の計 4 例の末梢血単核球より mRNA およびゲノム DNA を調整し、RT-PCR およびゲノミック PCR により標的領域を増幅し塩基配列を解析することにより遺伝子変異の探索を行った。日本人集団の変異解析のためインフォームドコンセントのもとに 145 名の健常ボランティア、160 名の HCV 感染患者、82 名のリウマチ患者の合計 387 検体のゲノム DNA を PCR ベースのシーケンズ解

析により MPO コード領域の変異頻度推定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するためのサンプル収集についてはインフォームドコンセントのもとに行われ、MPO 欠損患者サンプル以外の頻度推定用サンプルについては、データ非連結として行われた。したがってサンプル提供者とデータは個々に結びつけることが不可能となっており、提供者の個人情報には完全に保護される。MPO 欠損症患者についてもインフォームドコンセントの元にサンプル提供を依頼し、患者発見臨床医のみが個人情報との連結が可能で、遺伝子情報解析研究者は個人情報を知ることはできない。患者の個人情報保護は適正に行われている。

C. 研究結果

我々のグループにおいてはすでに 3 例の MPO 完全欠損症、および不完全欠損症 1 例の患者の mRNA およびゲノム DNA 解析を行っており、完全欠損症 3 例中 2 例においてはいずれも、Exon9 におけるアミノ酸置換を伴う点突然変異をホモに持つことによって不機能性分子を生じ MPO の活性が無いことが示唆される。(図 1) この 2 種類の点突然変異以外の完全欠損例では mRNA はまったく検出されずなかった。ゲノム DNA の解析から、MPO 遺伝子プロモーター領域からコード領域にかけて 6 kb 以上の長い領域が欠損していることを確認した。

完全欠損の 2 例がともに exon 9 上の 8 番ヘリックスを構成するドメインに検出されたことから、エキソン 9 における変異が

機能欠損に影響を与えるものと考えられたため、エキソン 9 を標的領域として、健常ボランティア、リウマチ患者、HCV 感染患者のゲノム DNA の塩基配列解析を行い日本人集団における変異頻度を求めた。(図 2)

対象集団 387 人からは、MPO 完全欠損例より検出された Gly501Ser、Arg499Cys の変異は検出されなかったことから、これら完全欠損を引き起こす遺伝子変異頻度は低い (10 万人中 280 以下) と推定された。上記変異のほかにアミノ酸置換を伴う変異 Ile490Thr および、アミノ酸の置換を伴わないシノニマス変異 G1434A、C1478A を見出した。この結果から、エキソン 9 領域における変異頻度を推定すると約 0.7% が何らかの変異を持つことになる。人口 10 万人に対しては 298 個の変異体 (ハプロイドとして) が存在するという結果であった。

D. 考察

MPO 欠損症を引き起こす点突然変異は Y173C、M251T、R569W が世界的には、知られている。日本人における MPO 欠損症の変異はこのいずれとも異なり、日本人集団に特異的な変異が原因となっていることが明らかとなった。(図 3) MPO 遺伝子はバイアレリックに転写されており (不完全欠損症患者解析により確認)、日本人 MPO 完全欠損症の発症は低い確率の変異がホモ接合体となることによって起きていた。

日本人集団での MPO 遺伝子変異頻度の解析では Gly501Ser、Arg499Cys の MPO 機能欠損を引き起こす変異頻度は低いと考

えられたが、エクソン 9 内において異なる 3 種の遺伝子変異が検出されたことは注目に値し、その頻度が 1000 人中 7 人に変異が認められることとなり比較的高い頻度で変異が検出されることが判明した。これら新規変異の MPO 発現や分子機能への影響は未知であるが、不機能性の MPO 分子が MPO-ANCA の不規則的抗原として血管炎発症のトリガーとなっている可能性もあり、MPO 遺伝子の変異について全身性炎症、血管炎発症との関連において観察を進める必要があるもと考えられた。

E. 結論

日本人集団における MPO 分子機能に重要な影響を与えるエクソン 9 についての変異頻度を測定し、1000 人に 7 人が変異を持つことが推定された。この変異頻度は無視できるほど低いものではなく、MPO 遺伝子全体のコード領域を考えるとさらに高い頻度で MPO 遺伝子に何らかの変異を持つことが考えられる。その変異が MPO-ANCA 発症へ関与している可能性は十分考えられることから、臨床対応において MPO 遺伝子変異の有無についての情報を考慮することが重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

MPO 欠損症に関してはノックアウトマウスの実験からカンジダ症等の真菌感染において持続感染を起こす危険性がある。MPO 欠損症の臨床例からは不明熱、および肺疾患との関連性が疑われ真菌感染と密接に関与していることが考えられる。全身性血管炎について患者の MPO 遺伝子変異についての情報を得ることは、その治療対応

を決定する上での重要な因子であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Arai T.Y, Kuzmin V.I, Kameoka Y, Botvinkin D. A. Identification of a new lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*) in Kyrgyzstan. *Emerging Infectious Diseases*, 2003 Mar 9;3:333-336.

Ichimori K, Fukuyama N, Nakazawa H, Aratani Y, Koyama H, Takizawa S, Kameoka Y, Ishida-Okawara A, Kohi F, Suzuki K. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radical Research*, in press.

Takahashi I, Kameoka Y, Hashimoto K. MacroH2A1.2 binds the nuclear protein Spop. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Aug 19;1591(1-3):63-8.

Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka, M. Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. *Molecular and Cellular Probes*, 16, in press, 2002

2. 学会発表

亀岡洋祐、大原関利章、橋本ゆき、倉文明、

高橋啓、山田仁美、鈴木和男、直江史郎：
川崎病類似マウス冠状動脈炎モデルにおける
血管炎抑制遺伝子の染色体マッピング、
第 75 回日本生化学会大会、京都、平成 14
年 10 月

Persad A, Kameoka Y, Kanda S, Suzuki K,
Identification of a Non-Synonymous
Mutation in a Patient with Complete
MPO Deficiency、第 25 回日本分子生物学
会総会、横浜、平成 14 年 12 月

亀岡 洋祐、Persad Amanda、小池 和彦、
堤 武也、松浦知和、須藤 勉、井出 達也、
田中 一雄、佐田 通夫、日野 邦彦、神代 正
道、橋本 雄之、宮村 達夫、鈴木 哲朗：C
型肝炎ウイルス感染を制御する宿主遺伝要
因の探索、第 25 回日本分子生物学会総会、
横浜、平成 14 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

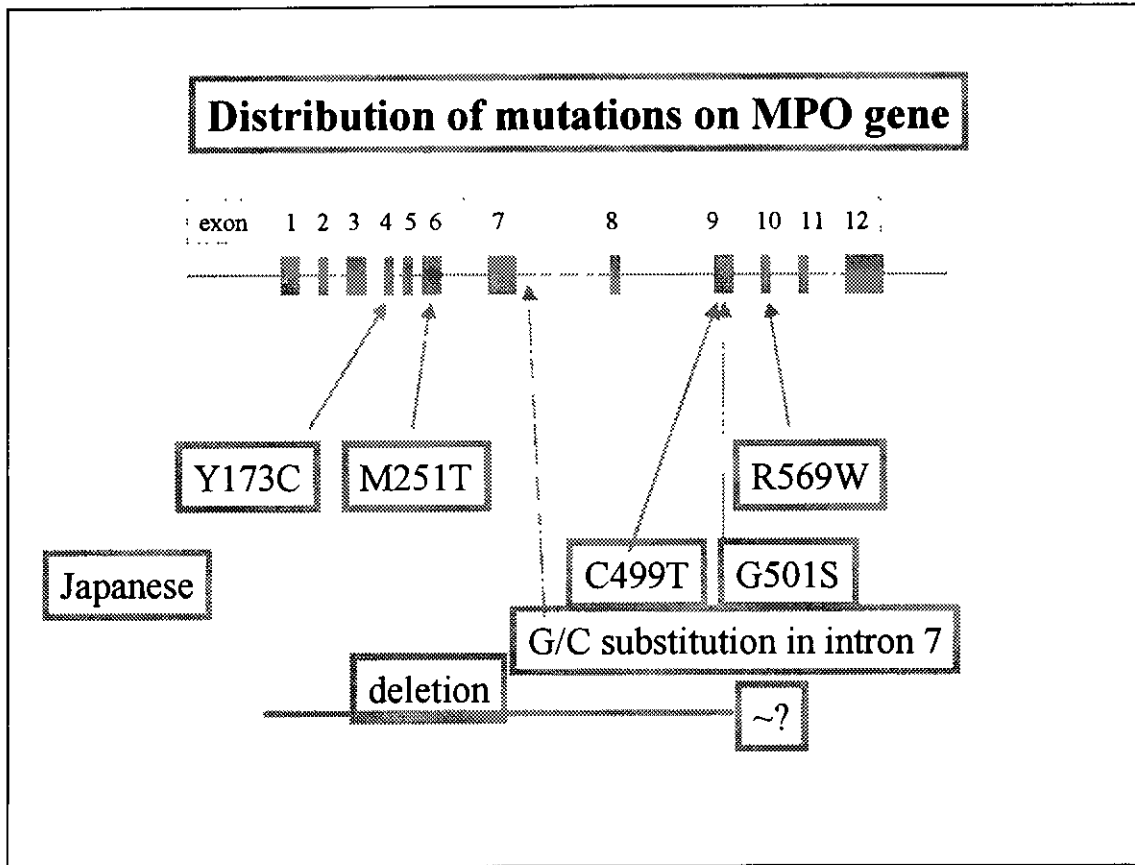
図1 日本人 MPO 欠損患者における遺伝子変異 (3. は不完全欠損、4. は6 kb 以上の領域欠損)

Mutations of MPO deficiency in Japanese			
Location (from first Met)	Location (in Zhang)	Helix	local struc.
1. Gly 501Ser	335	H8	core
2. *Arg499Cys	333	H8	core
3. Alternative splice on intron 7	del. downstream from exon8 (H5)		
4. Del over 6 kb	from promoter to exon9 ? (undefined)		

図2、日本人集団における MPO エキソン 9 における遺伝子変異頻度の推定

conclusion			
Mutations	No. found in 387		
Gly501Ser	G1501A	0	
Arg499Cys	C1495T	0	
Ile490Thr	T1464C	1	heterozygote
Synonymous	G1434A	1	heterozygote
	C1478A	1	heterozygote
Mutation frequency of this region $\frac{3 \text{ mutations}}{774 \text{ haploid}} = \frac{298 \text{ mutations}}{200,000 \text{ haploid}}$ (in 100,000 persons)			
Homozygote frequency of non-synonymous mutation was estimated			
Less than $\frac{1}{600,000} = \frac{0.16}{100,000}$			

図3 MPO 遺伝子コード領域における変異



多臓器不全に関与するサイトカインモデルマウス

分担研究者 岩倉洋一郎 東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター教授

研究要旨： IL-1 の内在性阻害分子である IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) の遺伝子を欠損させたマウスは自己免疫を発症する。また、このマウスは関節炎の他、血管炎やカンセン (psoriasis)、痩せ、など多様な症状を呈する。今年度はこのうち血管炎について、発症への自己免疫の関与を検討した。その結果、自己免疫によって発症する関節炎とは対応が見られず、また、抗 CD40L、あるいは抗 OX40L 抗体によっても症状の改善が認められなかった。この血管炎は TNF α を欠損させることにより発症が完全に抑制されることから、過剰 IL-1 シグナルにより発現誘導された TNF α による炎症反応であることが示唆された。

A. 研究目的

我々は先に IL-1Ra 欠損マウスを作製し、このマウスが自己免疫性の関節炎を発症することを報告した (Horai et al., JEM, 2000)。このマウスでは IL-1Ra の欠損により、過剰の IL-1 シグナルが入ることが予想される。IL-1 には T 細胞上に CD40L や OX40L などの副シグナル分子の発現を誘導する活性があり、このため、このマウスでは免疫系が異常に活性化され、自己免疫を発症するものと考えられる。このマウスでは関節炎の発症が認められるが、この関節炎は T 細胞移植によってヌードマウスに引き起こすことができることや、抗 CD40L や抗 OX40L 抗体によって抑制できることから、自己の滑膜組織に対する免疫応答が惹起され、関節炎を発症するものと考えられる。ところで、このマウスは関節炎の他に血管炎や、カンセンを発症することが分かっている。また、このマウスは野生型に比べ体重が軽く、脂肪蓄積に問題のあることが分かっている。このように IL-1 の過剰シグナルにより、きわめて多様な症状が引き起こされることが分かったが、これらの症状が同じ自己免疫を背景として引き起こされているものか、それとも全く独立のメカニズムによって発症しているものなのかは興味深いところである。

本研究では血管炎の発症機構に焦点を絞り、自己免疫との関連を検討した。その結果、関節炎とは異なり、自己免疫の関与は少ないことが示唆された。

B. 方法

IL-1Ra KO マウス：IL-1Ra KO マウスは、エクソン 1-4 をネオマイシン耐性遺伝子で置換す

ることにより作製した。その後、BALB/cA マウスに 8 世代戻し交配し、実験に供した。

C. 結果

1. Balb/c 背景 IL-1Ra 欠損マウスで血管炎の発症を検討したところ、3 ヶ月齢で 50~60% のマウスが血管炎を発症することを見いだした。血管炎は大動脈弁尖部にもっとも典型的に見られ、血管壁の弾性板の破壊、血管壁および弁組織への炎症性細胞の浸潤が認められた。また、一部には、動脈壁への石灰の沈着や軟骨様素式の出現が認められた。

2. 心エコーによる検討の結果、IL-1Ra 欠損マウスでは心中核壁厚、後壁厚とも肥厚しており (各 1.20 vs. 0.75 mm, 1.14 vs. 0.75 mm)、また、流出路速度 (181 vs. 94 cm/sec)、圧較差 (14.0 vs. 3.6 mmHg) ともに亢進していた。これらの所見は血管炎による血管内腔の狭小化を示すものである。

3. 関節炎の場合、80-100% 程度認められた関節炎の発症率が、抗 CD40L、および抗 OX40L を投与することにより、50-60% に減少する。ところが、同じ抗体による血管炎の治療を試みたが、発症率、重症度とも、全く効果が認められなかった。

4. IL-1Ra 欠損マウスと TNF α 欠損マウスとを掛け合わせたところ、血管炎の発症が完全に阻止されることが分かった。一方、IL-6 を欠損させても発症には全く影響が認められなかった。

D. 考察・結論

最近 Nicklin らは MF1 背景の IL-1Ra 欠損マ

ウスが血管炎を発症する事を見いだしている。我々はBALB/c背景のIL-1Ra欠損マウスでも同様の血管炎が発症することを見いだした。この血管炎発症に於ける免疫系の関与を検討したところ、CD40LやOX40Lに対する抗体を加えても血管炎の発症が全く影響を受けなかったことから、自己免疫の可能性は低いことが示唆された。従って、IL-1Raの欠損によって引き起こされる、関節炎と血管炎は異なるメカニズムによって引き起こされることが示唆された。

この血管炎はTNF α 欠損マウスでは全く発症しなくなることから、発症にはTNF α が重要な役割を果たしていることが分かった。我々はこれまでに、IL-1がTNF α を誘導すること、また、TNF α はIP-10を誘導することにより、炎症性細胞の局所への遊走を引き起こすことを示している。従って、これらの知見から、TNF α の阻害剤、あるいは産生阻害剤が血管炎の治療に有効であることが示唆された。

E. 研究発表

- Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H., and Iwakura, Y. Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J. Gen. Virol.*, **83**, 141-150 (2002).
- Saijo, S., Asano, M., Horai, R., Yamamoto, H., and Iwakura, Y. Suppression of autoimmune arthritis in IL-1-deficient mice in which T cell activation is impaired due to low levels of CD40L and OX40 expression on T cells. *Arth. Rheum.*, **46**, 533-544 (2002).
- Kakuta, S., Tagawa, Y., Shibata, S., Nanno, M., and Iwakura, Y. Inhibition of B16 melanoma experimental metastasis by interferon- γ through direct inhibition of cell proliferation and activation of anti-tumor host mechanisms. *Immunology*, **105**, 92-100 (2002).
- Nagai, Y., Shimazu, R., Ogata, H., Akashi, S., Sudo, K., Yamasaki, H., Hayashi, S., Iwakura, Y., Kimoto, M., and Miyake, K. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide. *Blood*, **99**, 1699-1705 (2002).
- Oguro, T., Takahashi, Y., Ashino, T., Takaki, A., Shioda, S., Horai, R., Asano, M., Sekikawa, K., Iwakura, Y., and Yoshida, T. Involvement of tumor necrosis factor α rather than interleukin-1 or nitric oxides in the HEME Oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide in the mouse liver. *FEBS Letters*, **516**, 63-66 (2002).
- Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.*, **3**, 667-672 (2002).
- Ishida, Y., Kondo, T., Ohshima, T., Fujiwara, H., Iwakura, Y., and Mukaida, N. A pivotal involvement of IFN- γ in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB J.*, **16**, 1227-1236 (2002).
- Iwakura, Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: Consideration from mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **13**, 341-355 (2002).
- Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., and Iwakura, Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, resulting in the suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, **17**, 375-387 (2002).
- Konishi, H., Tsutsui, H., Murakami, T., Yumikura-Futatsugi, S., Yamanaka, K., Tanaka, M., Iwakura, Y., Suzuki, N., Fuchs, E. V., Takeda, K., Akira, S., Nakanishi, K., and Mizutani, H. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2002) **99**, 11340-11345
- Kakuta, S., Shibata, S., and Iwakura, Y. Genomic structure of the mouse 2', 5'-oligoadenylate synthetase gene family. *J. Interferon Cytokine Res.*, **22**, 981-993 (2002).
- Nakae, S., Komiyama, Y., Narumi, S., Sudo, K., Horai, R., Tagawa, Y., Sekikawa, K., Matsushima, K., Asano, M., and Iwakura, Y. IL-1-induced TNF α elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing interferon- γ -inducible protein-10 in the elicitation phase of contact hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, **15**, in press.
- Iwakura, Y. Autoimmune chronic inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-I tax gene. *Gann Monograph*, in press.
- Nakae, S., Horai, R., Komiyama, Y., Nambu, A., Asano, M., Nakane, A., and Iwakura, Y. The role of IL-1 in the immune system. In "Cytokine Knockouts", (ed. G. Fantuzzi), Humana Press, Totowa, NJ, in press.
- Tanaka, J., Ishida, T., Choi, B.-I., Watanabe, T., Yasuda, J., and Iwakura, Y. Latent HIV-1

reactivation in transgenic mice requires cell cycle-dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR. *AIDS*, in press.

Nakae, S., Komiyama, K., Yokoyama, H., Nambu, A., Umeda, M., Iwase, M., Homma, I., Sudo, K., Horai, R., Asano, M. and Iwakura, Y. Interleukin-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, in press.

Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., and Apte, R. N. Interleukin 1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

F。知的財産権の出願・登録状況
なし

肝機能不全症解析：LECT2 ノックアウトマウス

分担研究者 山越 智 国立感染症研究所 生物活性物質部 主任研究官

研究要旨：LECT2 は主に肝細胞で産生される分子量 16 kDa の血清蛋白質である。生物種をこえ魚からヒトまでに広くその存在が確認されており、線虫でもこのタンパクと相同性を示す遺伝子がコードされている。In vitro の実験から LECT2 は好中球走化性活性、軟骨細胞や骨芽細胞の増殖促進等の生物活性を持つことが分かってきているが生体内での機能は不明である。そこで我々は、LECT2 の生体内機能を明らかにするために LECT2 ノックアウトマウスを作成し肝炎モデルを用いて解析した。その結果、LECT2 ノックアウトマウスにおいて concanavalin A 誘導肝炎が重篤になり、その原因の一つとして肝臓 NKT 細胞量の増加であることが判明した。

A. 研究目的

LECT2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2) は、ヒト好中球に対して走化性を有する蛋白質として発見された肝臓で特異的に産生され、血中に放出される分子量約 16kDa のサイトカインである。これまでに好中球走化性活性、骨芽細胞および軟骨細胞の増殖促進活性、生体レベルではその遺伝多型が慢性関節リウマチの病態の進行と相関することが判明している。現在までに魚からヒトまで種を越えて広く保存されていることが分かっている。さらに *C. elegans* にも LECT2 に特徴的なモチーフをもつ蛋白質が見つかっており、LECT2 が生体機能に重要な働きをしている可能性が示唆されている。

本研究では、ヒトのウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎に似た症状を示すことが知られている Con A 肝炎における LECT2 の作用機序を各種遺伝子改変マウスを使って、分子生物学的、生理学的、病理学的に解析することを目的にした。これらのメカニズムが判明すれば新しい治療方法等の開発につながると考えられる。

B. 研究方法

1) LECT2 遺伝子 KO マウスは、ES 細胞を用いた相同遺伝子組換えにより作製した。10 世代以上戻し

交配し実験に供した。マウスの飼育は全て SPF 環境下で行った。

2) ノックアウトマウスを使った concanavalin A(ConA)肝炎モデル

C57BL/6、BALB/c マウス（7 週齢）および同系統 LECT2 ノックアウトマウス（7 週齢）に Con A（10-25mg/kg）を尾静脈内投与して肝障害を誘発した。投与後、血清 GPT 活性の測定、血清サイトカイン量の測定、ならびに、摘出した肝臓より total RNA を抽出し、RT-PCR 法により各種サイトカインの mRNA を検出した。

3) 肝臓、胸腺、脾臓からのリンパ球分離

肝臓からのリンパ球分離は、摘出した肝臓を細切しステンレスメッシュ上ですりつぶし、35% Percoll 液を用いた比重遠心法により行った。胸腺・脾臓は、肝臓と同様にすりつぶし、溶血バッファーにて赤血球を除去し、リンパ球を得た。

4) Flowcytometry によるリンパ球の解析

各臓器より分離されたリンパ球は、T 細胞（ $\alpha\beta$ 型 TCR 及び $\gamma\delta$ 型 TCR 細胞を含む）、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ、好中球に対する標識モノクローナル抗体で染色し、Flowcytometry で解析した。

5) 血清中サイトカインの濃度

各モデルマウスにおいて経時的に尾静脈から血

液を採取し、血清を調製し pharmingen 社の ELISA キットにてサイトカイン濃度を測定した。

C. 研究結果

LECT2-KO マウスを用いたマウス Concanavalin A (Con A) 肝炎モデルの解析

Con A をマウスに投与することによりヒトのウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎に似た症状を示すことが知られている。BALB/c マウスを用いこの肝炎モデルにおいて血中 LECT2 の量を測定したところ Con A 投与後 8 時間から 24 時間にかけて一過性の発現量の低下が観察されている。アポトーシス阻害剤の実験からこの一時的低下は肝細胞の破壊に伴う二次的な結果ではなく、サイトカインなどのシグナル伝達により引き起こされた結果であり、Con A 肝障害に対する何らかの生体側の反応だと考えられた。そこで LECT2 欠損マウス (LECT2-KO マウス) を用い同モデルの解析をおこなった。C57BL/6 (B6) マウス、同背景の LECT2-KO マウスに 25 mg/kg Con A を尾静脈内投与、肝障害の指標として血中 GPT の活性と肝臓の DNA 断片化を調べた。処理 5 時間後に、野生型では変化が認められなかったが LECT2-KO マウスではすでに GPT の上昇が観察され、組織染色において肝細胞のアポトーシスをはじめとする肝細胞の変性が観察されより重篤になることが明らかとなった。各種サイトカインの血清中のレベルを ELISA 法で測定し、肝臓における遺伝子発現を半定量的 RT-PCR 法により検討した。その結果、IL-4 が LECT2-KO マウスにおいて処理後 1 時間という極めて初期に発現量の倍増が見られた。肝臓での発現同様、血中サイトカイン量においても TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-10 では差が見られなかったが、IL-4 は処理後 1 時間で 2 倍の差が見られた。Con A 肝炎の重篤化は BALB/c 背景 LECT2-KO マウスでも再現された。すでに IL-4 が Con A 肝炎発症に必須でありその産生細胞が NKT 細胞であることが報告されていることから、フローサイトメトリーにより LECT2-KO マウスの肝臓 mononuclear cells (MNC) 画分にお

ける NKT 細胞の割合を調べた。その結果、LECT2-KO マウスは野生型に比べて約 2 倍の CD3^{int} NK1.1⁺ (NKT cells) 細胞を持つことがわかった。一方、CD3⁻ NK1.1⁺ 細胞 (NK cells)、及び CD3⁺ NK1.1⁻ 細胞 (conventional T cells) の割合はほとんど差が見られなかった。また、胸腺、および脾臓の mononuclear cells 画分でも同様に NKT 細胞の割合が高いことが判った。T 細胞抗原受容体 V α 14-J α 281 を発現する NKT 細胞は、糖脂質抗原 α -galactosylceramide (α -GalCer) で活性化し多量の IFN- γ 、IL-4 を産生する。LECT2-KO マウスの α -GalCer 投与により産生される 2 時間後の IFN- γ は、野生型とほとんど差が見られなかったが、IL-4 産生は約 2 倍多く誘導された。さらに、肝臓、脾臓から mononuclear cell 画分を調製し in vitro で α -GalCer 刺激をしてもマウス個体を用いて得られた場合とほぼ同様の結果がえられた。

D. 考察

Con A 肝炎モデルを用いることで LECT2 ノックアウトマウスにおいて NKT 細胞の増加が見られ、IL-4 の産生の増加につながりそれが Con A 肝炎の感受性上昇の原因であることがわかった。NKT 細胞は、近年その機能が明らかとなっており、T 細胞抗原レセプターと NK 細胞の標識分子を発現するリンパ球であり、特に CD1d 依存的に α -GalCer により活性化される NKT 細胞について詳しく研究されている。また、獲得免疫と自然免疫の橋渡しをするリンパ球であることが明らかとなり、腫瘍免疫、自己免疫、感染免疫、免疫寛容等の広い領域で重要な働きをしていることが判ってきている。LECT2-KO マウスで NKT 細胞の増加が見られたことより、LECT2 が NKT 細胞の発生分化、或いは維持に重要な役割をしており、しかもそれが抑制的に働いていることを示唆した。これまで、NKT 細胞の発生、増殖に関係する様々な遺伝子が報告されてきているが、いずれも発生分化を促進する方に働いているものであり、LECT2 が NKT 細胞の増加の抑制

に働きうることを示した初めての例であり極めて意義が大きいものと考えられる。今後 NKT 細胞の関与する様々な生体反応に LECT2 が関わる可能性がある。

E. 結論

Con A 肝炎における LECT2-KO マウスでの IL-4 の過剰産生は肝 NKT 細胞の増加が原因であること、Con A 処理及び α -GalCer 処理では IFN- γ の産生にあまり影響が無かったことから LECT2-KO マウスの NKT 細胞の性質が Th2 型に傾いている可能性が示唆された。また、この NKT 細胞の増加が肝臓特異的で無いことより、LECT2 が NKT 細胞の発生分化、或いは生体内での恒常性維持の機能調節を抑制的に制御することが考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ito-ishida, M., Nagata, K., Oda, Y., Yamagoe, S., Suzuki, K., Tanokura, M. Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. *Protein Expression Purif.* in press

2. 学会発表

1) Dawson, W., Ito-ishida, M., Yamagoe, S., Yamamoto, K., Tanokura, M., Suzuki, K. Polymorphism and changes in the structural stability of LECT2 as evidenced by molecular dynamics simulations. 第 25 回分子生物学会年会、横浜、12 月、平成 14 年

- 2) 小田佳史、伊藤三恵、山越 智、山本健二、鈴木和男、田之倉優 「サイトカイン LECT2 の X 線結晶構造解析」 第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月、平成 14 年
- 3) 斎藤 武、奥村彰規、渡部久実、浅野雅秀、大川原明子、安保 徹、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越 智 「肝障害モデルを用いた LECT2 の機能解析」 第 32 回日本免疫学会学術集会、東京、12 月、平成 14 年
- 4) 奥村彰規、斎藤 武、大谷 功、浅野雅秀、大川原明子、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越 智 「関節炎モデルを用いた LECT2 の役割解析」 第 32 回日本免疫学会学術集会、東京、12 月、平成 14 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

川崎病類似マウス系統的動脈炎惹起モデルにおける動脈炎起炎物質の検討

分担研究者 高橋 啓 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座 助教授
研究協力者 大原関利章 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座 助手
直江史郎 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座 名誉教授
大野尚仁 東京薬科大学薬学部免疫学教室 教授

研究要旨：

我々は、川崎病剖検例の病理学的検索の一方で、*Candida Albicans*(*C.albicans*)アルカリ抽出物をマウスの腹腔内に接種することにより川崎病に類似する系統的動脈炎を惹起させることに成功した。ここでは血管炎起炎物質である *C. albicans* 菌体抽出物の内、いかなる成分が冠状動脈炎発生に強く関与しているのかを検討した。その結果、動脈炎発生にはこれまで我々が推定してきたマンナン以外に、本物質中に少量含まれる β 1,6-グルカンや蛋白も関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

血管炎起炎物質である *Candida albicans* 菌体抽出物を構成する糖および蛋白のうち、いかなる成分が冠状動脈炎発生に関与するのか検討した。

B. 研究方法

1. 川崎病罹患児糞便から分離、培養した *C. albicans* を用いて既報に従いアルカリ抽出物質 (CADS) を作製、NMR を用いてアルカリ抽出物の成分分析を行った。

2. CADS および、CADS に対して以下の処理をした物質を作製した。

- (A) Zymolyase 消化検体
- (B) フェーリング処理検体
- (C) 硫安処理検体上清
- (D) 同 沈殿物
- (E) 抽出残渣の次亜塩素酸処理可溶物質
- (F) 同 不溶物質

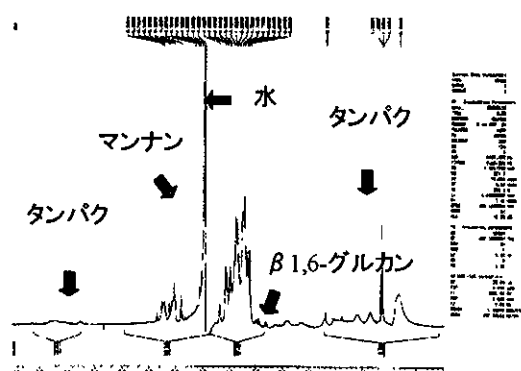
また、 α -1,6-グルカンを中心に含む抽出残渣の次亜塩素酸処理可溶物質並びに α 1,3-グルカンを主に含む不溶物質を作製した。*C. albicans* 標準株 (IFO1385)を完全合成培地で培養し、培養濾液のエタノール沈殿物 (CAWS)を作製した。各検体を PBS に懸濁ないし溶解して、実験第1,5週に各々5日間、C3H/HeN マウス(4週齢、雄)腹腔内に連続接種(4mg/回)、第9週に屠殺した。諸臓器の病理標本作製、冠状動脈炎の有無を組織学的に検索した。

C. 研究結果

NMR の結果、アルカリ抽出物質はマンナンを主成分とし、少量の α グルカンおよび蛋白で構成されていた。冠状動脈炎の発生頻度は、Zymolyase 処理群：4/10、アルカリ抽出物質群：5/10、フェーリング処理物質群：1/10、硫安処理物質群：4/10、次亜塩素酸処理可溶物質群：3/10、次亜塩素酸処理不溶物質群：2/10 であった。一

方、CAWS 群は 9/9 であった

各群間における冠状動脈炎の組織像には明らかな差異を見出せなかった。



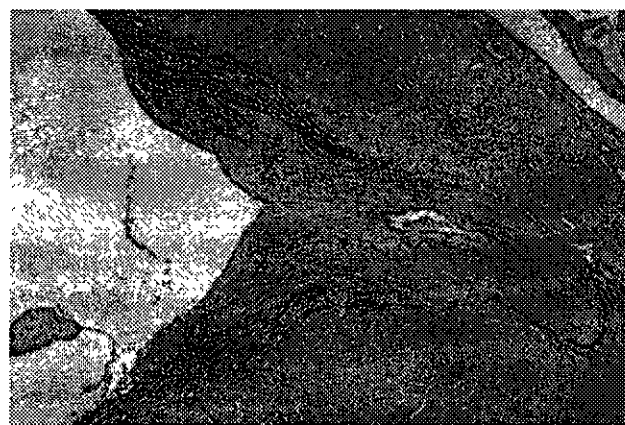
C. albicans アルカリ抽出物の NMR 解析

	血管炎	mannan	β 1,6-glucan	β 1,3-glucan	protein	N 含量 (%)
アルカリ抽出物						
CADS	5/10	+++	+++	++	+++	613
Zymolyase 消化	4/10	+++	+++		+++	
フェーリング処理	1/10	+++	+++			062
硫安処理、上清	4/10	+++	+++			017
沈殿物	2/10	++	+++		+++	1089
アルカリ抽出残渣の次亜塩素酸処理						
可溶成分	3/10	++	+++			045
不溶成分	2/10	++		+++		

CADS 処理群における血管炎発生頻度と主構成成分

D. 考察

川崎病は系統的血管炎を基盤とする小児の疾患である。我々は、川崎病剖検例の病理学的検索の一方で、川崎病罹患児糞便から分離された *C. albicans* アルカリ抽出物を用いてマウス系統的動脈炎作製実験を続けている。本実験系で惹起される動脈炎は、病変分布や組織像の点で川崎病動脈炎と類似する点が多く、川崎病動脈炎モデルとしての評価を受けている。



CADS 接種により得られる冠状動脈炎 (EvG)

今回の検索により、動脈炎発生には我々がこれまで考えてきたマンナンに加えて β 1,6-グルカンが関与している可能性が高く、逆に β 1,3-グルカンの関与の可能性は低いと推測された。また、フェーリング処理および硫安処理で得られた物質はいずれもマンナンが主成分と考えられるが、これらの群間で血管炎発生率に差が見られたことから、構成糖についての詳細な解析が必要と思われる。

さらに、CAWS は非常に高い血管炎誘発性を有し、川崎病血管炎発症機序を考える上で今後、更に検討を進める必要があると考えられた。

E. 結論

CADS によるマウス系統的血管炎誘発モデルでは冠状動脈炎発生には、マンナンおよび β 1,6-グルカンが関与している可能性が高く、1,3-グルカンの関与は低いものと推測された。

F. 研究危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

高橋 啓：瘤を確認できなかった冠状動脈の狭窄性病変への進展の可能性について。Prog.Med. 22:

1676-1678, 2002

2. 学会発表

大原関利章、高橋 啓、直江史郎、三浦典子、大野尚人：川崎病冠状動脈炎モデルにおける *Candida albicans* 菌体成分の関与。代 37 回日本小児循環器学会、静岡、2001.7

大原関利章、高橋 啓、直江史郎、三浦典子、大野尚人：川崎病冠状動脈炎モデルにおける *Candida albicans* 菌体成分の関与。第 42 回日本脈管学会総会、大阪、2001.11

Oharaseki. T, Takahashi K., Miura N., Wakayama M., Shibuya K., Okawara A., Suzuki K., Ohno N., Naoe S.: Analysis of component of *Candida albicans* cell wall inducing systemic vasculitis in mice. The seventh International Kawasaki Disease Symposium, Hakone, Japan, 2001.12

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

ナノ粒子プローブによる多臓器不全の解析

分担研究者 山本健二 国立国際医療センター 部長

研究要旨：本研究の目的は、血管炎による多臓器不全のメカニズムを解明するため蛍光ナノプローブを用いて自己免疫疾患のモデルマウスの免疫細胞に標識し、その標識された特定細胞を、正常のマウス血管に導入しその生体内動態を解析し、疾患メカニズムを明らかにすると共に、治療に対する評価を行うことにある。本年度は、その準備段階として、既に合成手法が確立されている5 nmのCd/Seの半導体ナノ粒子（量子ドット）を利用し、蛍光顕微鏡を用いそのプローブの細胞内動態評価手法確立し、その *in vitro* の有用性を確認した。

A. 研究目的

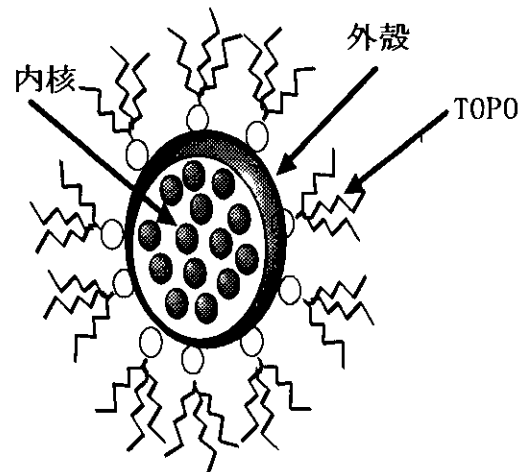
近年ナノメートルサイズの視点で捕らえる生物学が盛んである。X線やNMRで構造を解析したり様々な装置に直結した質量分析計、1分子のリアルタイムの可視化などがそれである。すなわち従来m、mm、 μ と進んできた生物学の延長上の先に有るのがナノバイオロジーである。本分担研究はこれを目指すのではない。粉碎することにより機能材料を作るのには、限界があり一桁 nm サイズのそれを作るには従来技術では対応が難しい。ところが前人未踏の世界というわけでもない。生物は、細胞レベルでそれに直面してきたわけでまさに nm サイズのエンジニアリングを心得ている。そのような観点に立ち立生物材料などを通じた、バイオナノ工学的立場に自己組織化法による蛍光ナノ粒子の合成を行ない、血管炎による多臓器不全のメカニズムを解明する。そのため蛍光ナノプローブを用いて自己免疫疾患のモデルマウスの免疫細胞に標識し、その標識された特定細胞を、正常のマウス血管に導入しその生体内動態を解析し、疾患メカニズムを明らかにすると共に、治療に対する評価を行うことにある。

B. 研究方法

1. 合成方法

研究に用いている半導体ナノ粒子はセレン化カドミウムを核、硫化亜鉛を殻とするコア・シェル型ナノ粒子である。この粒子はトリ・オクチル・フォスフィン・オキサイド (TOPO) と言う有機溶媒を350℃に加熱し、溶融させた状態で（トリ・オクチル・フォスフィン・オキサイドは、爆発性があるため脱気するかアルゴンで充満した

状態で合成を行う）で合成されている。則ち、その溶融したTOPOに酸化カドミウムとセレンを同時に打ち込み単分子分散させる。分散した時に、溶媒の温度が270℃程度の一旦低下するが、さらに加熱し300℃にて一定に保つと、TOPO溶媒内で半導体ナノ粒子が自己組織化する事により生成されてくる。半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果を持っているためこのように非常に均質な粒子直径を持つように製造される必要性がある。



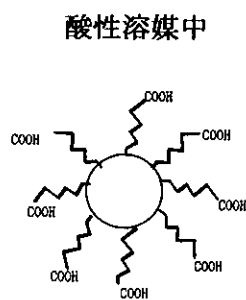
2. 表面加工

疎水性化合物であるが、11-メルカプトウンデカン酸と硫化亜鉛とを結合させて粒子表面にカルボキシル基を出させることによって親水性粒子としている。この置換方法は、まず11-メルカプトウンデカン酸を8

0℃に加熱し恒温に保つと熔融しており、この熔融した 11-メルカプトウンデカン酸に前述の量子ドットを溶かしこみ数時間放置することにより置換し、さらにナトリウム塩又は、カリウム塩として親水性を示すようになる。

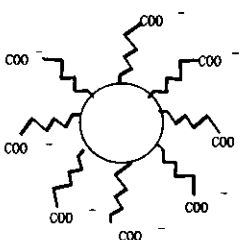
3. 表面修飾

ところがこのままでは、中性または、塩基性水溶液には分散できるが、下の図に示すよう酸性酸い溶液中または高塩濃度において凝集し析出してくると言った欠点がある。



凝集

塩基性溶媒中



分散

半導体ナノ粒子の親水化は既報の研究ではカルボン酸によるものがほとんどである。このカルボン酸で親水化した半導体ナノ粒子は中性から塩基性水溶液では分散安定であるが、酸性または中性であっても生理食塩水や動物細胞用培地のように塩を含むものでは凝集体を形成してしまう。ナノスケールにおける凝集は分子間力によっても強固で、再分散させることは困難である。そして、生体内では塩を含み酸性である場合がほとんどのため、現行のカルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子は応用が難しい。

酸性下での分散安定な半導体ナノ粒子を調製するため、現在、アミノ基を出すような表面修飾の開発を検討している

現在はこのカルボン酸の dendrimer となる量子ドットをさらに表面修飾し生物・医療用途に利用可能と成るように両親水性物質で表面修飾を施してある。

C. 研究結果

このナノ粒子はセレン、カドミウムという重金属を主成分として含むため、その安全性については関心の集まる場所であるが、現在までのところそれに言及した発表は皆無である。セレン化カドミウム自身はカドミウムレッドに代表される赤色系顔料として 1920 年頃から用いられており、現在も絵の具、ガラスや陶器などの彩色に使われている。しかし、その毒性のため医薬品害毒物に指定されている。一方、半導体ナノ粒子のセレン化カドミウムは硫化亜鉛に強固に封入されているため、カドミウムレッドに比べて毒性は低いと思われる。しかし、硫化亜鉛に未封入または不完全封入のセレン化カドミウム粒子の夾雑は排除できないために、その毒性評価は重要である。現在研究に用いている半導体ナノ粒子は実験室レベルで合成されたもので、動物個体での毒性評価を行うためには量的に潤沢でない。そのため、動物培養細胞を用いて合成ロット毎に毒性評価を行っている。

半導体ナノ粒子の親水化は既報の研究ではカルボン酸によるものがほとんどである。このカルボン酸で親水化した半導体ナノ粒子は中性から塩基性水溶液では分散安定であるが、酸性または中性であっても生理食塩水や動物細胞用培地のように塩を含むものでは凝集体を形成してしまう。ナノスケールにおける凝集は分子間力によっても強固で、再分散させることは困難である。そして、生体内では塩を含み酸性である場合がほとんどのため、現行のカルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子は応用が難しい。酸性下での分散安定な半導体ナノ粒子を調製するため、現在、アミノ基を出すような表面修飾の開発を検討している。

一方、カルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子は、非特異的に血清アルブミンと複合体を形成する。その複合体は生理食塩水または動物細胞用培地中でも分散安定である。そして、その複合体はヒト肝細胞や

アフリカミドリザル腎由来の Vero 細胞に貪食されて、エンドソームに蓄積される。その様子は蛍光顕微鏡下で半導体ナノ粒子の蛍光を観察することで容易に確認することができる。エンドソームマーカーとしては、一般にフルオレセインやローダミンといった有機系蛍光色素標識アルブミンやデキストランが用いられているが、半導体ナノ粒子の高い光量と耐光性という特質によりカルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子と血清アルブミンの複合体は既存のエンドソームマーカーに代わるものとしてその応用が期待される。

D. 考察

1) 達成度について

我が国において、はじめて量子ドットを使った生物学・医学応用が本年度我々の研究でなされた。特定細胞の標識およびその標識された細胞の生体内導入に必要な準備がなされたと言える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

半導体ナノ粒子の研究開発は米国におけるナノテクノロジー研究の最重要課題の一つとされている量子サイズ効果 (Quantum Dot Effect) 理論に基づく新規な化合物で、粒子サイズにより発光色が変化し、発光強度と耐光性が既存の有機系蛍光色素をはるかに凌駕することが知られている。半導体ナノ粒子はまた、表面加工により様々な機能を賦与することが可能である。そこで、生体に安全な半導体ナノ粒子を開発し、開発した半導体ナノ粒子に様々な薬剤を結合させ、薬物動態を半導体ナノ粒子の可視光観察によって細胞・組織・臓器・生体レベルで解析する事は国際的に極めて重要である。また量子ドットにより特定細胞に標識しその標識された細胞を正常マウスに導入する事によりその生体内動態を明らかにし宿主との相互作用を見る事により、血管炎による多臓器不全について解析する事は、国民医療における難病を克服する事は、社会的にも意義が大きいと考える。

3) 今後の展望について

次年度以降は、細胞内動態解析のために必要な表面加工法を開発するとともに、実際開発された方法を利用して、細胞内分布

や生体分布について実際に応用し新しいナノプローブの性能を評価する予定である。

今後実験デザイン1、および実験デザイン2に示すように血管炎についての解析を行う予定である。

E. 結論

以上のように、本研究を通じて、半導体ナノ粒子がタンパク質やその他の生体分子に結合させその細胞内動態を観察するのに十分な特性を有する事がしめせた。更に、*in vitro*, *in vivo* のみならず EX-*vivo* および生体内動態について広範な動態解析する事も可能と成るという極めて特徴的な性質を有するため、生物・医療において今後の展開に向けての素地が築かれたと言える。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Hanaki, A. Momo, T. Oku, A. Omoto,, Y. Yamaguchi and K. Yamamoto. Semiconductor quantum dot/albumin complex Is a long-life and highly photostable endosome marker, B.B.R.C. (In press).
- 2) J. Kizu, M. Arakawa, K. Yamamoto, Is There Relation between Antibiotic Sensitivity of Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus and Consumption of Antibiotics in a Hospital?: A Study in April 1993 - March. Jpn. J. Infect. (2002) 55 : 65-67.
- 3) Takeuchi, F., Futamura, Y., Yoshikura, H., Yamamoto, K. Statistics of trinucleotides in coding sequences and evolution, J. Theor. Biol., (In press).
- 4) Baba T., Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA, Lancet (2002) 359, 1819-1827

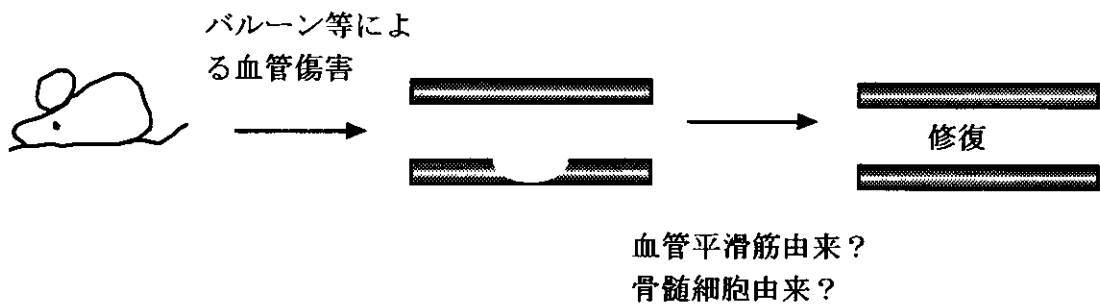
2. 学会発表

- 1) 花木賢一 桃あさみ 山本健二、エンドソームマーカーとしての半導体ナノ粒子の応用、第11回日本バイオイメージング学会学術集会、2002.10.31
- 2) 山本健二、半導体ナノ粒子の生物・医療応用、第16回日本ME学会、分子・細胞療法におけるME研究会（招待講演）
- 3) 栄羽範子，前之園信也，山本健二，山口由岐夫，半導体ナノ粒子水溶液の蛍光強度振動現象の非線形反応解析」，物理学会，秋季大会（2002），愛知県春日井
- 4) 栄羽範子，前之園信也，山本健二，山口由岐夫，半導体ナノ粒子水溶液の蛍光振動解析，化学工学会，第35回秋季大会（2002），神戸

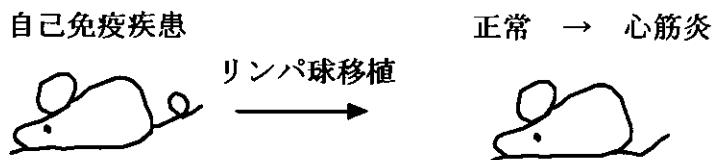
H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) なし

実験Design1



実験Design2



多臓器不全因子(LECT2)の構造解析

分担研究者 田之倉 優 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

研究協力者 鈴木倫太郎、伊藤三恵、小田佳史

本研究では、サイトカイン LECT2(leukocyte cell-derived chemotaxin 2)の高次構造解析を、核磁共鳴スペクトル(NMR)と X 線結晶構造解析を用いて行っている。慢性関節リュウマチ患者においては、LECT2 の 58 番目の Val 残基が Ile 残基に置換されている患者ほど、疾病の重篤度が高いことが明らかになった。LECT2 の機能発現に 58 番目の Val 残基のメチレン基1つ分の役割がいかに重要かを明らかにし、LECT2 とリュウマチとの因果関係を突きとめる為に LECT2 の立体構造を明らかにする。

- (1) NMR を用いた高次構造解析については、安定同位体標識したサンプル調製法の確立と NMR 測定とスペクトルの解析を行った。現在までのところ、主鎖のスペクトル帰属はほぼ完了し、二次構造情報まで得られている。
- (2) X 線結晶構造解析については、動物細胞による発現系を用いて前年度から引き続き進めており、位相決定に向けて結晶化条件の精密化を行った。その結果、以前よりも大きく良質な結晶を得ることに成功した。

A. 研究目的

慢性関節リュウマチ患者において、LECT2 の 58 番目の Val 残基が Ile 残基に置換されている患者ほど、疾病の重篤度が高いことが明らかになった (Y.Kameoka, et al., *Arthritis & Rheumatism* 43, 2000)。58 番目の Val 残基が受容体との結合に関わっているか、もしくは LECT2 自体の立体構造を維持するために重要な役割を果たしている事が考えられる。現在では、LECT2 の立体構造が明らかでない為に、メチレン基1つ分が LECT2 の機能発現にいかに関係が特定できていない。58 番目の Val 残基の役割を明らかにし、LECT2 とリュウマチとの因果関係を突きとめる為には LECT2 の立体構造を明らかにする必要がある。本研究では、野生型 LECT2 の高次構造と、Ile 型 LECT2 の高次構造解析、更には、受容体ペプチドとの

複合体の高次構造を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法・結果

- (1) 大腸菌を用いた発現系の構築と NMR を用いた立体構造解析

構造解析に足りるだけの量を血清中から精製するのはコスト、時間の面で問題があり、さらに CHO 細胞を用いた発現系よりも大量調製を目指して、より安価な大腸菌を宿主とする LECT2 の大量生産に取り組んだ。LECT2 遺伝子の N 末端に(His)₆-tag を付加し、これを T7 プロモーターを持つ pET21(a) ベクターに挿入して発現プラスミドを作成した。宿主は BL21(DE3)体を形成し、大部分が不溶性画分となった。そこで、可溶性画分への発現を増加させるために、

- i. 培養条件の検討