

20020757

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

超極限分子プローブによる組織障害の
再生・治癒機構の解析と
高精度局所診断技術の開発

(H14-ナノ-018)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

南 谷 晴 之

平成15（2003）年3月

目 次

I. 総括研究報告			
超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析と 高精度局所診断技術の開発	主任研究者	南谷晴之 1
II. 分担研究報告			
1) In vivo イメージングによる血管炎に伴う細胞傷害過程の解析	分担研究者	鈴木和男 17
2) 微小循環イメージングと糖尿病性細小血管障害機構の解明	分担研究者	関塚永一 23
3) 心筋・肝細胞・内皮細胞等のマルチカラーイメージングと 分子機能解析	分担研究者	川西 徹 31
4) 腫瘍・消化器系組織障害の分子機構の解析と診断治療への応用	分担研究者	村松知成 39
5) 標識モノクローナル抗体による神経障害防御機構の解析と 診断治療への応用	分担研究者	新井孝夫 45
6) 神経細胞再生因子の動的解析	分担研究者	霜田幸雄 49
7) 細胞組織動態の解析に向けた密着型フラッシュ軟X線顕微鏡技術開発	分担研究者	眞島利和 59
8) ナノプローブを用いた単一分子レベルの細胞内生体機能解析と 病理診断への応用	分担研究者	船津高志 63
9) 局所選択的診断治療用リポソーム粒子包含ナノ粒子の開発	分担研究者	松村英夫 73
10) 量子ドットの多臓器不全診断治療への応用	分担研究者	山本健二 79
11) 好熱メタン菌のFKBPの立体構造に関する研究	分担研究者	田之倉優 83
12) 関節炎の発症および血小板機能におけるCD69の役割	研究協力者	長谷川明洋 91
13) 脳微小循環の血流・代謝イメージングシステム	研究協力者	塚田孝祐 97
14) 脳への選択的物質移送システムを用いて脳梗塞や脳虚血による 傷害の画像化	研究協力者	鈴木弘美103
15) ストレス応答・細胞死情報伝達過程のイメージング手法の開発	研究協力者	朽津和幸113
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		121
IV. 研究成果の刊行物・別刷		129

厚生労働科学研究費補助金 萌芽的先端医療技術推進研究事業
総括・分担研究報告書

超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析 と高精度局所診断技術の開発

主任研究者

南谷晴之 (慶応義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻・教授)

分担研究者

鈴木和男 (国立感染症研究所生物活性物質部・室長)
関塚永一 (国立埼玉病院・副院長)
川西 徹 (国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部・部長)
村松知成 (国立がんセンター研究所生物物理部・主任研究者)
新井孝夫 (東京理科大学理工学部応用生物科学科・教授)
霜田幸雄 (東京女子医科大学総合研究所・助教授)
眞島利和 (産業技術総合研究所光技術研究部門ライフエレクトロニクス研究ラボ 主任研究員)
船津高志 (早稲田大学理工学部物理学科・教授)
松村英夫 (産業技術総合研究所光技術研究部門ライフエレクトロニクス研究ラボ 主任研究員)
山本健二 (国立国際医療センター研究所・部長)
田之倉優 (東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻・教授)

研究協力者

鈴木弘美 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所難病治療共同研究部門・助手)
長谷川明洋 (千葉大学大学院医学研究院免疫細胞医学教室・助手)
塚田孝祐 (川崎医科大学生理学教室・助手)
朽津和幸 (東京理科大学理工学部応用生物科学科・助教授)
大幡久之 (昭和大学薬学部薬理学教室・助教授)
大内 敬 (東京理科大学理工学部応用生物科学科・助手)
古澤邦夫 (産業技術総合研究所・客員研究員)

超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析と 高精度局所診断技術の開発

主任研究者 南谷 晴之 慶応義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻 教授

研究要旨

蛍光・燐光発光分子、磁気微粒子、抗体などの物理的・生化学的作用に基づく分子認識機構を有する超極限分子プローブを用いて、生体内で起こる血管障害、微小循環障害によって誘起される種々の組織傷害や細胞傷害のメカニズムを分子・細胞レベルで解析・診断する超高感度イメージング技術を開発するとともに、その障害の発現メカニズムと障害からの組織再生・治癒過程に関する分子機序を局所的に解析し、治療への応用展開を目指して研究を遂行した。研究は、1)超極限分子を骨格とするナノ粒子プローブの開発と応用、2)超高感度バイオイメージング技術の開発と応用、3)分子生理機能の時空間的計測・解析技術の開発と応用、4)糖尿病性細小血管障害・脳血栓・腎炎にともなう血管障害などのイメージングと薬理効果の解析について進められた。とくに自己免疫疾患にともなう難治性血管炎、慢性合併症・最小血管傷害を誘発する糖尿病性血管障害、脳血管閉塞・血栓生成に関わる組織・細胞内のオルガネラや機能分子の動態をイメージング解析しそれぞれの生理機能や病態発現と治癒機構の解明を試みた。すなわち、血管傷害にともなう血流遮断および血栓形成機序の解明、光化学反応による血流遮断機序および糖尿病易血栓性機序の解明、糖尿病微小循環障害に関わる赤血球変形能・血小板粘着能・易血栓性および活性酸素関与の検討、実質臓器微小循環における虚血・再灌流時の血流動態と酸素代謝の定量化、腎微小血管傷害のイメージング解析、血管炎発症初期機構における好中球の関与の解析を行った。

A. 研究目的

本研究では、蛍光・燐光発光分子、磁気微粒子、抗体などの物理的・生化学的作用に基づく分子認識機構を有する超極限分子プローブを用いて、生体内で起こる血管障害、微小循環障害によって誘起される種々の組織傷害や細胞傷害のメカニズムを分子・細胞レベルで解析・診断する超高感度イメージング技術を開発するとともに、その障害の発現メカニズムと障害からの組織再生・治癒過程に関する分子機序を局所的に解析し、治療への応用展開を目指して研究を遂行した。今年度は巻末の図 1A～4A に示すように分担研究者および研究協力者を含めて、1)超極限分子を骨格とするナノ粒子プローブの開発と応用、2)超高感度バイオイメージング技術の開発と応

用、3)分子生理機能の時空間的計測・解析技術の開発と応用、4)糖尿病性細小血管障害・脳血栓・腎炎にともなう血管障害などのイメージングと薬理効果の解析を行った。とくに自己免疫疾患にともなう難治性血管炎、慢性合併症・最小血管傷害を誘発する糖尿病性血管障害、脳血管閉塞・血栓生成に関わる組織・細胞内のオルガネラや機能分子の動態をイメージング解析し、それぞれの生理機能や病態発現と治癒機構の解明を試みた。

B. 研究方法

B-1. 微小循環および血球細胞の流動現象の可視化法

腸間膜など組織微小血管内の血流動態や個々の血球細胞の挙動を可視化するには種々

の蛍光標識プローブを利用するのが有効である。組織微小血管内の血行動態を評価するために FITC-dextran (励起波長 488nm, 蛍光波長 520nm) 20mg/ml を iv 投与し, 血漿成分の流動現象を可視化した。また, 赤血球の流速を測定するために, 予め循環赤血球の約 5% を採血し, これを体外で蛍光プローブ FITC (励起波長 488nm, 蛍光波長 520nm) で標識した後, 返血し, 顕微鏡下で微小血管を流れる個々の蛍光標識赤血球の動態を可視化した。白血球の可視化にはアクリジンオレンジ (励起波長 430nm 水銀ランプ BV 励起, 蛍光波長 530nm) 0.5mg/kg を iv 投与し体内染色するか, ローダミン 6G (励起波長 514nm 励起, 蛍光波長 590nm) 50ug/ml を iv 投与・体内染色し, 微小血管内の白血球のローリングやスティッキング数を可視化・計数した (図 1)。一方, 血小板の可視化には CFSE かローダミン 6G を iv 投与・体内染色して血小板血栓生成動態を評価した (図 2)。これら血球細胞の挙動や血流動態を可視化するには超高速高感度 CCD カメラ (Kodak EktaPro, 浜松ホトニクス SIT) を使用し, 1000~2000 コマ/秒の動画を収録した後, 標準速度で再生した画像をコンピュータ処理して血球細胞の移動量・移動速度を計測した。

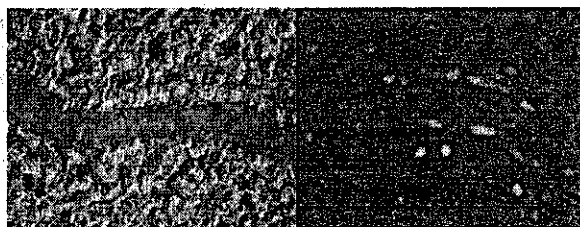


図 1 蛍光プローブで標識した白血球のローリング・スティッキングの可視化



図 2 蛍光プローブで標識した血小板血栓形成過程の可視化

B-2. 光化学反応による血流遮断・糖尿病易血栓形成機構の観測・解析法

一般に光化学反応は, 光感受性物質の光励起によって産生される活性酸素が主体となって細胞傷害や血行障害を誘起させるものであり apoptosis の重要因子となるが, 本研究では血小板血栓生成に関わる活性酸素種の同定と効果の程度を活性酸素消去剤のスカベンジャ作用によって評価した。活性酸素消去剤として一重項酸素に対して L ヒスチジンを 50mg/kg, スーパーオキシドアニオンに対して SOD を 3mg/kg, 過酸化水素に対してカタラーゼを 3mg/kg, ヒドロキシラジカルに対して DMSO を 1ml/kg を使用し, 非適用群との相違を比較検討した。また, 単球や内皮細胞内で産生する過酸化水素を定量化するために DCFH-DA を用いて DCF 蛍光の画像解析を行うとともに上記の活性酸素種の関与を定量的に評価した。糖尿病ラット微小血管内の血流動態と易血栓性を観測するために, 7 週齢 (180-200g) Wistar 系雄性ラットに Storeptozotocin (STZ, Sigma) 55mg/kg を大腿静脈より注入し 3 週間後, STZ 誘発糖尿病ラットとして使用した。これに対しコントロール群には 10 週齢 (270-310g) ラットを使用し糖尿病群と週齢を合わせるようにして比較検討した。

つづいて光化学反応による血栓モデル (血小板や内皮細胞が障害を受け, 血小板の内皮細胞への粘着・凝集過程を経て血流遮断が起こる) を使い, 糖尿病の易血栓性を評価した。対象ラットにネブタール 5mg/kg を腹腔内注入麻酔後, ポリエチレンカテーテルを大腿静脈から挿入し, 光感受性物質 Photofrin (日本レダリー社) の薬剤投与経路とした。下腹部を切開し, 注意深く腸間膜ループを展開し, その像を生体顕微鏡下に観察した。内径 30~50 μ m 程度の細動脈・細静脈を対象血管として血栓形成部位とした。Photofrin を大腿静脈内カテーテルより投与 30 分後, 水銀ランプ G 励起 (ピーク波長 540nm) の緑色光を励起光とし目標血管に照射した。微小血管内の血

流動態及び血栓形成過程は高速度 CCD カメラを介して撮像・記録した後、再生画像により評価を行った。

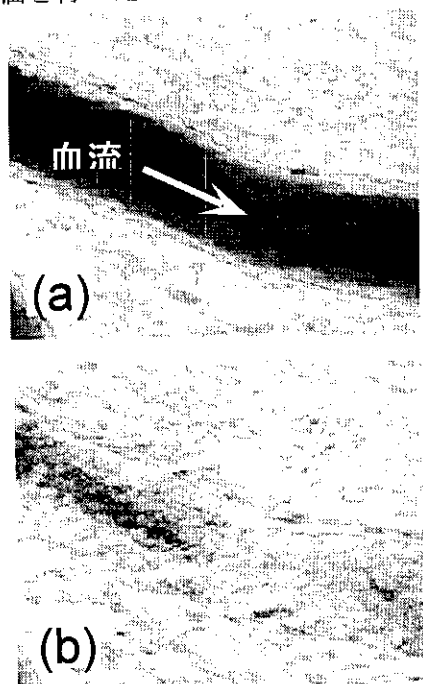


図3 光化学反応による糖尿病易血栓性の可視化解析：(a)正常な血流動態，(b)血栓形成による血流遮断

さらに腫瘍血管内の血流動態を観測するために、腹膜播種性腫瘍モデルラットを作成し、血管径、血流速度、血小板粘着・血栓形成開始時間、血流遮断時間、アクリジンオレンジ体内染色による蛍光標識白血球数について腫瘍血管と正常血管の比較を行った。Fisher344系雄性ラット（8~9週齢）の腹腔内に Fisher系ラット由来大腸癌株 RCN-9 を 1×10^7 個播種して腸間膜ループに腫瘍モデルを作成し、9~10日経過後に実験に使用した。対象ラットを sodium pentobarbital 腹腔内投与・麻酔後、光感受性物質 5-aminolevulinic acid (ALA)300mg/kg を iv 投与し 1.5 時間後に開腹し、腸間膜微小循環を顕微鏡下に展開して血流動態を観測するとともに、波長 630nm の励起光源 (0.5mW) で光化学反応を生じさせた。

B-3. 実質臓器微小血管内の血流の可視化・解析法

Wistar 系雄性ラット（約 300-320 g）を α -chloralose (60 mg/kg), urethane (600 mg/kg) の腹腔内投与下に麻酔し、頸部を切開し気管挿管後、調節呼吸とした。ラットの大腿動静脈にカニューレーションを行い、それぞれ血圧測定および薬品投与に使用した。脳微小循環血流動態を観測するには脳表を露出後、約 4 mm 径の closed cranial window を作成した。window 内は人工髄液 (Na^+ 147.8 mEq/L, K^+ 3.0 mEq/L, Mg^{2+} 2.3 mEq/L, Ca^{2+} 2.3 mEq/L, Cl^- 135.2 mEq/L, HCO_3^- 19.6 mEq/L, lactate 1.7 mEq/L, phosphate 1.1 mM, and glucose 3.9 mM) を灌流した。その後、円形カバーガラスでラバーリングを覆い密閉した。脳微小循環血流は赤血球を蛍光色素 FITC で標識することで可視化した (図 4)。また血流画像の解析にはパターンマッチングを応用した画像処理システムを利用した。FITC 標識赤血球の利用は脳のみならず肝臓、腎臓などの実質臓器内の血流動態を評価する上で有効である。



図4 FITC 標識赤血球による血流動態可視化

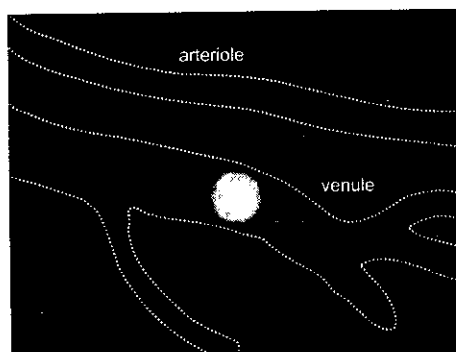


図5 レーザー照射による微小血管内酸素分圧計測

B-4. ナノプローブによる微小血管内酸素分圧計測法

FITC 蛍光標識赤血球を観察する一方で、脳表など実質臓器表層微小血管内の酸素分圧は光励起されたポルフィリン分子から発光するリン光の酸素消光作用を利用することで計測を行った。Pd-meso-tetra-(4-carboxyphenyl)-porphyrin (Pd-TCPP) を酸素プローブとして用いた。予め対象動物に Pd-TCPP を静脈内投与し、落射光学顕微鏡の対物レンズを通して対象臓器の微小血管に励起光 (Q-switched Nd:YAG laser-SH, 波長 532 nm) を照射する (図 5)。酸素濃度に依存して発光するリン光は 620 nm のロングパスフィルターを介して光電子増倍管を用いて光電変換し、電圧信号は AD 変換器 (NR-2000, KEYENCE) を用いてサンプリング周波数 200 kHz, サンプリング数 500 点で取得した。リン光寿命を算出する波形処理では、出力信号の波形取り込み開始から 10 サンプリング分 (時間にすると 50 μ s に相当) および最大電圧値に対する 1% 以下の範囲のデータを棄却した。その他の有効データを最小二乗法により指数関数でフィッティングすることでリン光寿命 τ を算定した。酸素分圧値への変換はリン光寿命を Stern-Volmer 式(1)に代入することで定量化した。

$$I_0/I = \tau_0/\tau = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot pO_2 \dots\dots\dots (1)$$

ここで I_0 と I は酸素分圧が 0 mmHg および pO_2 mmHg の時のリン光強度, τ_0 と τ は同様に酸素分圧が 0 mmHg および pO_2 mmHg の時のリン光寿命, K_q は Stern-Volmer 定数である。

B-5. 血管内皮細胞と血球細胞の相互作用の *in-vitro* 実験・観測法

培養内皮細胞と各種血球細胞を用いて *in-vitro* 血栓形成モデルを作成し、細胞間の分子間相互作用のメカニズムを解析した。ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC, Clone Tech) の培養には、Modified Czapek Dox broth 131 medium (MCDB131, Sigma) 培地 (0.033g/l

penicillin G, 0.05 g/l kanamycin, 10 ng/ml bFGF, 0.276 g/l heparin を添加・さらに FBS を 54°C で 30 分間非働化して、終濃度 10% となるよう添加) を用いた。コラーゲンコートをした 75cm² プラスチックフラスコを用いて培養し、confluent な状態を確認した後、0.25% trypsin によって細胞をはがして遠心・回収し、継代培養を行った。実験にはコラーゲンコートをした 35mm 径プラスチックディッシュに 4 代目から 18 代目の細胞 40×10^4 個を播種して、1 日或いは 2 日後に confluent な状態を確認した上で実験に供した。継代培養、実験ともに洗浄には Hank's Balanced Salt Solution (HBSS (-)) を用いた。

光化学反応に基づく HUVEC と血球細胞の粘着・凝集過程を観測するために、光感受性物質として Zn CP-III を終濃度 100 μ g/ml となるよう添加し、高輝度 LED 光 (5mW, 530nm) を 10 分間照射し PDT を施行した。所定時間後に共焦点レーザー顕微鏡によって細胞の形態変化を観察し、透過画像 (Differential Interference Contrast : DIC) の取得、あるいは trypan blue 色素排除法による細胞生存率の評価を行った。HUVEC の細胞質を Calcein-AM (終濃度 10 μ M, 20min, 37°C, 5%CO₂) で染色し、内皮細胞の形態変化と短縮にともなう内皮下露出面積を画像処理によって算出し、内皮下露出割合を評価指標として求めた。また、活性酸素の影響を考察するため、活性酸素消去剤を投与した場合の内皮下露出割合を検討した。

内皮細胞の形態変化に関与する細胞骨格の変化を検討するため、F-actin と内皮細胞間の接着を司るタイトジャンクション構成タンパク質である ZO-1 (Zonula Occludin 1) の変化を調べた。F-actin の染色には rhodamine-phalloidin (Molecular Probes) を 1:200 の割合で添加し、核染色には DAPI を添加して共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察・画像取得を行った。ZO-1 の免疫染色については、一次抗体として、250 μ g/ml rabbit polyclonal ZO-1 antibody を 1:100 の割合で添加して、二次抗

体として、FITC goat anti-rabbit IgG (H+L) を 1:100 の割合で添加した後、共焦点レーザー顕微鏡によって画像を取得した。Apoptosis による核の断裂を観測するために HBSS(-) と 1mM Hoechst 33342 (Molecular Probe) を 5 : 1 の割合で混合したものを添加・蛍光染色し、倒立顕微鏡において蛍光観察 (V 励起) し、蛍光画像取得を行った。

B-6. 腎微小血管傷害のイメージング法

Candida albicans 由来糖ペプチド CAWS と rabbit anti-mouse myeloperoxidase (anti-mMPO) によって誘導される腎微小血管傷害についてイメージング解析を行った。C57BL/6 マウス (雄性, 9 週齢) に CAWS (150 μ g/mouse) を iv 投与し、その 3 時間後に anti-mMPO (1mg/mouse) を iv 投与した。その 5 日後、同様に CAWS と anti-mMPO を投与した後、加えて f Met-Leu-Phe (FMLP, 10⁻⁸mol/mouse) を iv 投与し、その 3 日後に腎表面における血流状態を観察した。血流の可視化には FITC-dextran を蛍光プローブとして用い、各マウスの腎表面における尿細管周囲毛細血管の血流を観察した。観察した血流動態は顕微鏡に接続したビデオカメラで撮影、DVD に録画し、再生画像の解析を行った。

C. 研究結果

C-1. 血管傷害にもなう血流遮断および血栓形成機序の解明

光感受性物質の光化学反応は、活性酸素産生に伴う血流遮断効果 (血栓生成) と殺細胞効果 (apoptosis 発現) のメカニズムを解明するのに重要な手法となる。南谷、関塚らは、B-1. と B-2. の手法を用いて *in vivo* 系蛍光イメージングで血流遮断効果を検討した結果、ラット微小血管中の活性酸素産生と白血球の活性化、内皮細胞傷害と血小板粘着を経て、血栓形成が著しく促進されることを明らかにした。また *in vitro* 系でラット末梢血から分取した単球細胞に対し DCFH-DA 蛍光プローブと共焦点レーザー顕微鏡を用いて、光化学作

用中の単球の活性酸素産生が有意に増加していることを確認するとともに産生量への活性酸素消去剤の影響を検討した。さらに B-5. の手法を用いて Calcein-AM で染色した血管内皮細胞に対し形態変化を観測した結果、光化学作用で細胞短縮が起こり、内皮下の露出が顕著に増加することを確認した。rhodamine-phalloidin によるアクチンフィラメントの蛍光イメージングの結果、光化学作用後に細胞骨格 F-actin の変化で顕著なアクチン重合を示し、また細胞間接着を司る tight junction の構成タンパク質 ZO-1 を免疫蛍光イメージングした結果、細胞間の tight junction が喪失していることを明らかにした (図 6)。また、Calcein-AM 蛍光イメージングにより、光化学作用で好中球の内皮細胞接着性が有意に増加することを確認、抗体を用いた接着阻害実験では、接着因子 P セレクチン、E セレクチンの関与は少なく、 β_2 インテグリン CD18, ICAM-1, CD11a の関与が認められた。

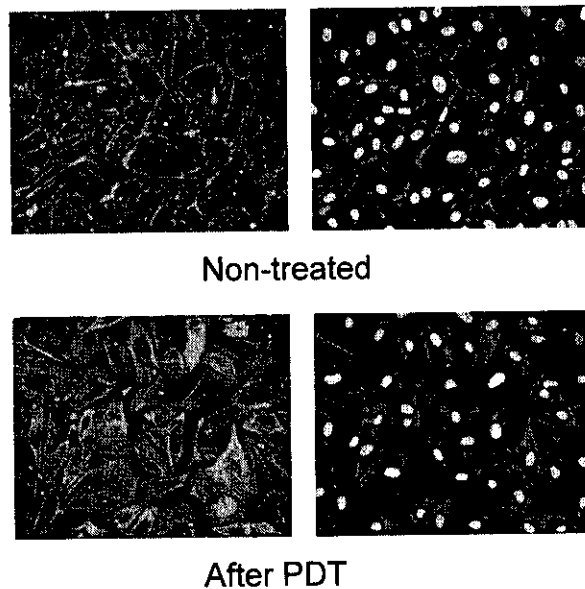
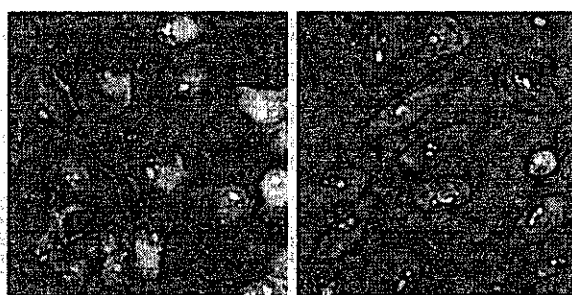


図 6 培養正常下及び光化学反応後の HUVEC の F-actin 染色像 (左) と F-actin と核の二重染色画像 (右) : PDT の条件は、Zn CP-III 濃度 : 100 μ g/ml, インキュベート時間 : 1h, 光照射強度 : 5.0 mW/cm², 照射時間 : 10 min, PDT 施行直後に細胞を固定・染色し、画像を取得した。Bar = 50 μ m.

一方、血小板の CFSE 蛍光イメージングにより内皮細胞への接着性が有意に増加することを確認、血小板接着因子としてセレクチン系の関与はなく、血小板の VLA-2, 内皮細胞の vWF の関与が強く認められた。光化学作用によって血小板単独の凝集能は抑制されたため、血小板と内皮細胞との相互作用が血流遮断効果に必要な不可欠であることがわかった。以上にあわせて、光化学反応の活性酸素産生による細胞の apoptosis 誘導経路、カルシウム経路、ミトコンドリア経路、Caspase 系列の活性化、DNA 傷害経路など、分子シグナル伝達の探索を GFP, rhodamine123, rhod-2 などのナノプローブと高感度イメージングシステムを使って行っている。



Non-treated Just after PDT

図7 培養正常下及び光化学反応後の HUVEC の ZO-1 の変化: PDT の条件は, Zn CP-III 濃度: 100 $\mu\text{g/ml}$, インキュベート時間: 1h, 光照射強度: 5.0 mW/cm^2 , 照射時間: 10 min とした。PDT 直後に細胞を固定・染色し, 画像を取得した。Bar = 50 μm 。

C-2. 糖尿病微小循環障害に関わる赤血球変形能, 血小板粘着能・易血栓性および活性酸素関与の検討

B-1, B-2, と B-5. の手法を用いて, 糖尿病の微小循環において血小板の変形流動, 血管内皮損傷部位への粘着・凝集, 血栓形成のプロセスを蛍光ナノプローブで可視化し, 定量的に評価した結果, 健常群に比べて糖尿病群で血小板の凝集, 粘着, 血栓形成が容易に起こることを明らかにした。また, 血栓形成に関わる活性酸素種の影響を各種スカベンジャを用いてイメージング解析し, $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$,

H_2O_2 , OH による血管内皮傷害とともに血小板膜破壊・脱顆粒・作用物質の放出が促進され, これに続いてカスケード的に血小板粘着能の亢進, 凝固系の促進, 血栓成長, 血管閉塞へ至る活性化メカニズムが働くことを明らかにした (図8)。

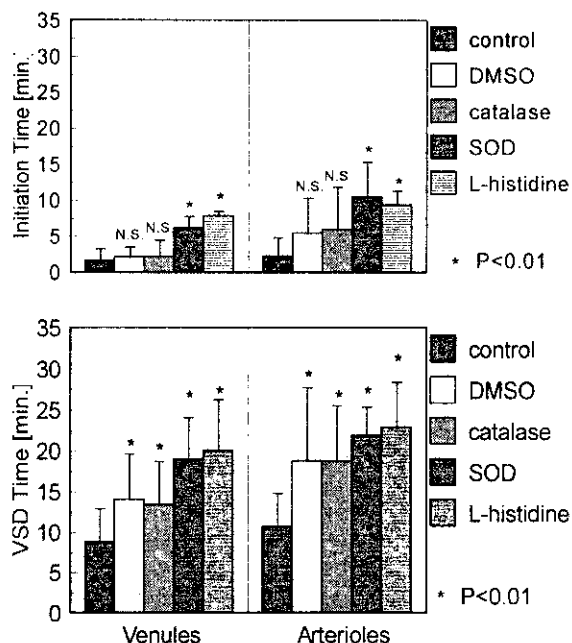


図8 血栓形成・血流遮断における細静脈, 細動脈の血小板粘着開始時間(上)と完全血管閉塞・血流遮断時間(下)とスカベンジャによる活性酸素消去による血流遮断時間の延長。一重項酸素とスーパーオキシドアニオンの関与が大: 糖尿病ではいずれの時間も大幅に短縮し, 易血栓性が示される。

さらに各種抗血栓薬 (ベラプロスト, アスピリン, p55, ヘパリン) を用いて, 酵素作用, 血栓促進・抑制因子, 粘着・凝固因子の関与を解析し, 血栓抑制に関わる薬理効果を検証した。これらの抗血栓薬の投与によって血小板粘着開始時間と完全血管閉塞・血流遮断時間のいずれもが延長した。これに関連して, 糖尿病赤血球の変形能の低下が赤血球内ソルビトール及び HbA1c の増加と高く相関することを明らかにし, 糖尿病では変形能が血流速度・ずり応力の増加とともに著しく減少し, 血管壁の損傷を促進する可能性が大である事を示した (図9)。原子間力顕微鏡のフォース

カーブ測定に基づく赤血球のヤング率の増加、軟X線顕微鏡を用いた細胞膜の炭素イメージングにより膜組成・構造の違いを検討した。アルドース還元酵素阻害剤の投与により血球内へのソルビトール蓄積が減少し、赤血球変形能が増加・改善されること、また血行改善薬（ペントキシフィリン）の投与により同様な赤血球変形能の増加・改善を確認している。

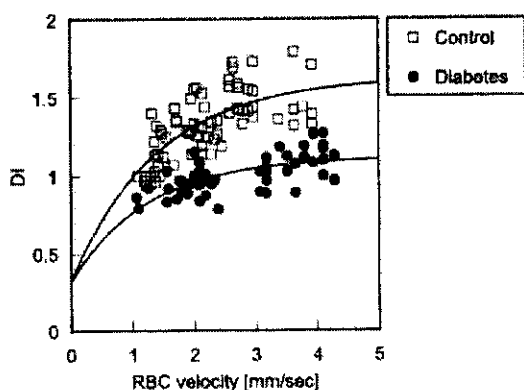


図9 糖尿病赤血球の変形能の低下

C-3. 実質臓器微小循環における虚血・再灌流時の血流動態と酸素代謝の定量化

B-3. および B-4. で示した蛍光・燐光ナノプローブによるイメージング手法を用いて虚血・再灌流時の脳実質表層の血流動態と酸素代謝を定量化し、組織傷害の発展過程を解析し、定量化技術の有効性を示した。循環赤血球の2%を蛍光色素(FITC)でラベルし、血流マーカとして機能させ、その血流ダイナミクスを高速度高感度 CCD カメラで可視化する。蛍光標識赤血球のフレーム間局所移動ベクトルを求めることによって、微小循環系の血流速度および血管径の変化を計測した。本法により、脳軟膜上の毛細血管を中心とした末梢循環動態を定量解析可能となった。同時に酸素代謝の評価法として、酸素感受性リン光プローブ Pd-meso-tetra-(4-carboxyphenyl)-porphyrin の光化学反応を利用し、微小血管内の組織酸素分圧を光学的に非接触かつ局所的に計測することが可能となった。これは酸素分圧に依存して発する燐光が quenching 作用によ

って変化し、燐光強度、燐光寿命の変化から酸素分圧を定量化するものである。これによりラット中大脳動脈閉塞による局所脳梗塞モデルを作成し、急性期脳梗塞治療における補液による脳循環代謝への影響や、人工血液を含む新たな酸素輸液の有効性を示すことが可能である(図10)。さらに脳組織酸素代謝を評価するために、細胞内ミトコンドリアのエネルギー代謝過程で使用される NADH の紫外線蛍光特性に着目し、組織の代謝レベルをイメージングし、局所領域における虚血の指標を定量化することが可能となった。このような成果は、肝臓や腎臓などの実質臓器微小循環系においても同様に得られており、計測、解析手法の有効性が確かめられている。

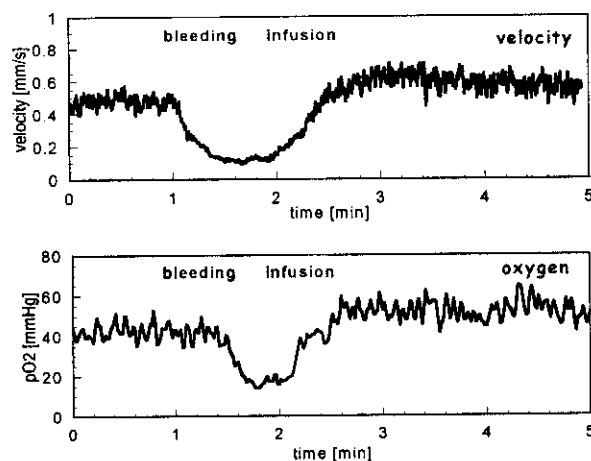


図10 急性虚血・再灌流における脳表層細静脈の血流速度変化(上)と血中酸素分圧変化(下)

C-4. 腎微小血管傷害のイメージング解析

腎炎, SLE, リウマチをはじめとする難治性血管炎は、自己免疫疾患などの免疫異常による好中球活性化や好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) と連動して進行するものと予想されるが、この仮説の大部分は *in vitro* の検討によるものであることから、*in vivo* での検証が必要とされている。病理組織切片の観察からも重要な知見が得られるが、血圧・血流速度などの血行力学的因子が常に変化している血管

においては、これらの因子からも新たな知見が得られるものと考えられる。顕微鏡を用いた *in vivo* 系観察では臓器微小循環における血圧・血流速度などの血行力学的因子を定量的に評価できるとともに、腎炎で重要な働きを担っていると思われる好中球の動態も観察可能である。そこで、腎炎の発症・進展における好中球の役割を明らかにするために、B-1、B-3、とB-6. の手法を用いて腎炎モデルマウスの構築および観察を行った結果、*Candida albicans* 由来糖ペプチド、MPO 抗体および fMet-Leu-Phe によって腎血管傷害を誘導したマウスでは、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流をイメージングで確認した。最も顕著な場合、広範囲にわたる腎表面血流の停止も観察された。また、血管障害に関与する CD69 分子を欠損したマウスでは、その血管閉塞が遅延した。これらの現象には血管内皮への白血球の接着を伴うことが観察されるが、この腎炎誘導モデルにおいては MPO が関連していることから、特に好中球が炎症における重要な役割を担っているものと考えられる。これらの障害機構を詳細にイメージング解析するために、白血球の標識ナノプローブを開発中であり、ほぼ予備的にはできた。また、白血球による内皮細胞が障害される時に特異的に発現する分子の mRNA をイメージングするプローブの開発も行った。

C-5. 血管炎発症初期機構における好中球の関与の解析

血管炎発症初期機構における好中球の関与を解析するために、B-5. に準じる手法を用いて血管内皮細胞傷害時の apoptosis signal 伝達に対する cytokine 類の影響を調べた。好中球による血管内皮細胞傷害時の apoptosis signal 伝達過程における p38 MAPK(p38)と Caspase 8 の活性化を検討した。その結果、TNF α 、IL-1 β により MAPK-p38 が最も磷酸化された。また、Caspase 8 の 18kDa の活性化型(c-Cas8)が生成された。血管内皮細胞傷害が、活性化された好中球を介して生起し、その際、

血管内皮細胞内では、IL-1 β 等の受容体を介し p38 の磷酸化や Caspase 8 の活性化が起こり、apoptosis が誘導されている可能性が示唆された。そこで、この反応を生きた細胞でイメージングするためのナノプローブとして p38 抗体を細胞に導入する方法を確立した。また、Caspase を特異的にイメージングするプローブの開発もほぼ成功している。

D. 考察

D-1. 血管傷害に基づく血流遮断・血小板血栓形成の促進について、本研究では光化学反応を用いて検討した。光化学反応に基づく血流遮断効果における血小板血栓形成機構は、まず、血球や内皮細胞以外の血漿等の液性媒質における光感受性物質が光励起されることにより光化学反応で活性酸素が産生されることから始まり、つぎのようなプロセスがカスケード的に進むものと考えられる。活性酸素は血小板に対して LDH の放出を誘発するが、血小板そのものの凝集作用には凝集作用を抑制する方向へ働き、内皮細胞に対しては、F-アクチンの重合など細胞骨格の変化、タイトジャンクションの消失をもたらす、細胞質の収縮を生じる。生体内ではこれが血管内皮基底膜の露出につながる。基底膜の主成分であるコラーゲンが直接血小板のコラーゲン受容体を介して血小板を活性化する。また、von Willebrand factor (vWF) を介する接着も生じる。この相互作用がその後のカスケード的な血小板凝集、血栓形成の引き金となる。さらに光化学反応由来の活性酸素は白血球を活性化させ、内皮細胞との接着性亢進や活性酸素産生を誘発する。この二次的な活性酸素が内皮下組織の露出を促し、結果として血小板の接着性を亢進させる。以上のような個々の血球細胞が互いに影響しあって血小板血栓形成、血管閉塞に至ると考えられる。産生される活性酸素種のうち一重項酸素とスーパーオキシドアニオンの関与が顕著であり、*in vivo* 実験によるラット微小循環の血流遮断効果ならば

に培養内皮細胞と血小板凝集の相互作用に関する *in vitro* 実験のいずれにおいても同様な結果が得られた。

D-2. 糖尿病における易血栓性を光化学反応による血栓形成モデルで検討したが、光化学反応によって活性酸素が産生され、血小板の活性化とともに血管内皮傷害がより強く引き起こされ、血小板血栓が形成されるものと考えている。血小板血栓が照射領域近辺に一定して形成されることから内皮細胞傷害により血小板血栓が惹起されている可能性が強く、血栓形成部位の血管内皮の脱落や基底膜の露出など形態的变化が起こるものと考えられる。血栓形成には一次凝集反応と、二次凝集反応の2段階の過程があり、前者は血小板が内皮細胞に粘着を開始する現象、後者は血小板の内皮細胞への粘着後、血小板同士が互いに結合し血小板血栓を形成していく現象である。血小板粘着開始時間と血管閉塞時間はそれぞれ一次凝集と二次凝集を反映しているものと考えている。糖尿病群と健常群を壁ズリ速度1000~2000[s⁻¹]の範囲で比較検討したが、糖尿病群においていずれの時間も短縮が認められた。これは同程度の傷害を与えた際に糖尿病群では血栓形成が促進されていることを意味し、糖尿病における易血栓性を示すものである。血小板血栓形成の分子機構として血小板膜状に存在する血小板膜糖蛋白(GP)が重要な働きを担っており、一次凝集には vWF レセプターである血小板膜糖蛋白 GPIb, 二次凝集には主にフィブリノーゲンに対するレセプターの血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa が関与している。糖尿病によりトロンボキサン合成能の亢進した大きな血小板が遊離し、巨核球内で合成される血小板膜蛋白の非酵素的糖化(グリケーション)により、GPIb と GPIIb/IIIa の数が増加して、血小板機能が亢進している事が考えられる。本研究の結果からも、糖尿病では2つの膜糖蛋白が過剰に発現している可能性が考えられ、これは糖尿病性合併症の原因の一つと言われている血栓症と大きな関

係があるものと思われる。また、血漿フィブリノーゲン(Fbg)とシアル酸が糖尿病でより増加していること、血小板の粘着に必要な vWF も増加していること、血管内皮細胞についても内皮細胞形態変化、血管基底膜の肥厚と血管透過性の亢進など、様々な要素が複雑に絡み合い、易血栓性が示されるものと考えられる。

一方、腫瘍組織の微小血管の構造は正常に比べて極めて複雑であり、多数の分岐と交叉がみられ、また血管径は細く内皮細胞が希薄で脆弱である。正常の微小血管と同一血管径の腫瘍血管のずり速度は正常血管より低く、全体的に低流速である。低ずりであるがゆえに腫瘍血管に対する光化学反応・血流遮断効果は高く、血管内皮への血小板粘着は容易であり、血栓粘着開始時間、血管完全閉塞時間はともに正常血管に比べ大幅に短縮したものと考えられる。このとき、白血球のローリング数が正常に比べて少ないのは血管壁への白血球の接着を阻害する因子の働き、あるいは内皮細胞上の接着因子の欠如が考えられる。阻害因子の働きとしては白血球の血管内皮への接着を抑制する NO 産生量が VEGF (vascular endothelial growth factor) の分泌亢進にともない変化していることが考えられる。これはまた血小板血栓形成の亢進にも関わっているものと考えられる。

D-3. 脳神経細胞は虚血侵襲にきわめて脆弱であり、脳虚血は脳血管障害のみならず心肺蘇生時や外傷時などでも見られる病態である。本研究で提案した末梢循環・組織酸素代謝イメージング法により、脳微小循環の血流動態を可視化し、微小血管・組織の酸素分圧変化および NADH 蛍光から脳神経細胞の酸素代謝レベルを評価する必要がある。また微小循環において血流動態と血中酸素濃度は密接な関係にあり、両者を同時に計測することは極めて重要である。微小循環血流は赤血球を FITC 色素で蛍光標識し、血管内において血流マーカーとして機能させ、落射光学顕微鏡下で蛍

光標識赤血球を観察することで臓器血流を可視化することが可能となった。標識した赤血球の投与量は体重 300g ラットの場合、全身血液量は約 21 ml と見積もられるので、その内の赤血球量は約 10 ml であり、蛍光標識赤血球を 0.2 ml 灌流すれば循環赤血球の約 2% が蛍光赤血球として流れることになる。血管内の血流動態を評価する量としてはこれで十分であり、投与による血圧の変動は認められなかった。

一方、微小血管内の酸素分圧は接触型の電極法ではなく、レーザー励起によるポルフィリン色素の光化学反応を利用した酸素分圧計測法を利用した。非接触・無侵襲かつ局所的な酸素計測が可能であり、また酸素濃度を分圧値として絶対値計測が可能な本法は、近赤外分光法とは決定的に異なる特徴がある。組織酸素代謝は NADH 蛍光を計測することによって虚血の指標とした。生体には NADH と同様の吸収帯を有する物質がヘモグロビンを含め複数存在すると考えられ、蛍光輝度から組織中の NADH 濃度を推定することは困難である。しかし、正常状態から蛍光輝度が上昇した増加分は明らかに組織低酸素によって NADH が増加したことを示すものであり、NADH 蛍光を計測することで虚血状態を推測することが可能である。本研究で提案した計測システムは、光励起した FITC から発する蛍光から血流動態計測を、光励起した Pd ポルフィリンから発する燐光寿命から酸素分圧を同時計測するものである。複数の異なるナノプローブの光励起による発光現象を利用することで双方の情報を連続的かつ簡便に取得可能となったことは今後の研究に大きな進展をもたらすものと考えられる。

D-4. CAWS および anti-mMPO によって誘導される腎臓微小血管傷害を生体内で観察したところ、白血球の関与が示唆された。 この腎臓微小血管傷害誘導モデルにおいては、まず CAWS によって好中球数の増加・好中球活性化を誘発している。この状態において投与さ

れた好中球自己抗体 (anti-mMPO) は、活性化によって細胞膜表面へ移行した MPO と複合体を形成し、さらなる好中球の活性化・血管内皮細胞への接着・活性酸素種の産生を引き起こし、血管傷害に至ると考えられる。このことから白血球の中でも特に好中球が炎症における重要な役割を担っているものと推察される。CAWS 投与時の脾臓からのサイトカインの産生は、IFN γ 、IL-6 に加え IL-10 が、より血管炎と連動して起こるが、さらに内皮細胞傷害に関与する情報伝達系も解析し、IL-1 β および TNF- α 誘導によって apoptosis と関連して p38-MAPK のカスケードな上昇が明らかである。本血管炎誘導モデルにおいて、CADS/CAWS が、MPO および MPO-ANCA 産生による発症誘導に不可欠であることから、真菌由来分子が血管炎発症に関わる好中球の活性化に重要な役割を果たしているものと考えられる。今後、この血管傷害誘導法を用いて腎炎モデルを確立するとともに、ANCA 関連腎炎における炎症のターゲットである糸球体血流の観測方法を確立していく必要がある。

E. 結論

血管傷害にともなう血流遮断および血栓形成機序の解明、光化学反応による血流遮断機序および糖尿病易血栓性機序の解明、糖尿病微小循環障害に関わる赤血球変形能・血小板粘着能・易血栓性および活性酸素関与の検討、実質臓器微小循環における虚血・再灌流時の血流動態と酸素代謝の定量化、腎微小血管傷害のイメージング解析、血管炎発症初期機構における好中球の関与の解析を行った。いずれも蛍光・燐光ナノプローブで標識した細胞や生体分子の動態を生体蛍光顕微鏡、共焦点レーザー走査型顕微鏡や原子間力顕微鏡を用いて観測し、その動画像を超高速度高感度 CCD カメラで撮像した後、コンピュータ画像処理によって定量化した。とくに脳微小循環の血流速度、血管径、血中酸素分圧、組織 NADH 蛍光の連続計測が可能なシステムは

新規に構築したものであり、その有効性が確認された。本計測システムは糖尿病や高血圧等の病態モデルにおける微小循環障害および障害により二次的に引き起こされる組織障害の検討に有効であり、対象は肝臓、腎臓をはじめとする各種実質臓器の微小血管の血流動態と酸素代謝の定量化に使用可能である。糖尿病による最小血管症に頻発する血小板血栓生成機序や光化学反応による血流遮断機序の解明にも大きな成果が得られたが、その実験・解析手法は病態の診断・治療や薬理効果の評価、再生治療機構の解明にもつながると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) **H.Minamitani**, K.Tsukada, E.Sekizuka, C.Oshio : Imaging and functional analysis of blood flow in organic microcirculation, *Jpn. J. Pharmacol*, 2003, in press.
- 2) K.Tsukada, S.Sakai, K.Hase, **H.Minamitani** : Development of catheter-type optical oxygen sensor and applications to bioinstrumentation, *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, in press.
- 3) M.Takahashi, T.Nagao, Y.Imazeki, K.Matsuzaki, **H.Minamitani** : Roles of reactive oxygen species in monocyte activation induced by photochemical reaction during photodynamic therapy, *Frontiers of Biomed. Eng.* 2003, in press.
- 4) A.Iijima, M.Haida, N.Ishikawa, A.Ueno, **H.Minamitani**, Y.Shinohara : Re-evaluation of tropicamide in the papillary response test for Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, 2003, in press.
- 5) 塚田孝祐, 緒方嘉貴, 辻岡克彦, **南谷晴之** : 人工酸素運搬体 Neo Red Cell 交換輸血時の脳微小循環動態および酸素分圧計測, 脳循環代謝, 2003, 印刷中.
- 6) M.Ishikawa, E.Sekizuka, C.Oshio, N.Yamaguchi, K.Tsukada, **H.Minamitani**, T.Kawase : Platelet adhesion and arterior dilation during photothrombosis - Observation with rat closed cranial and spinal windows, *J. Neurological Sci.*, 194(1), 59-69, 2002.
- 7) T.Nagao, K.Matsuzaki, M.Takahashi, Y.Imazeki, **H.Minamitani** : Apoptotic signaling cascade of 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy in human promyelocytic leukemia HL-60 cells, *J. Photoscience*, 9(2), 509-511, 2002.
- 8) M.Takahashi, T.Nagao, K.Matsuzaki, T.Nishimura, **H.Minamitani** : Photodynamically induced endothelial cell injury and neutrophil-like HL-60 adhesion, *J. Photoscience*, 9(2), 518-520, 2002.
- 9) **H.Minamitani**, Y.Suzuki, A.Iijima, T.Nagao : A denture base type of sensor system for simultaneous monitoring of hydrogen ion concentration pH and tissue temperature in the oral cavity, *IEICE Trans. Information and Systems*, 85D(1), 22-29, 2002.
- 10) T.Nagao, K.Matsuzaki, M.Takahashi, Y.Imazeki, **H.Minamitani** : Quantitative analysis for intracellular distribution of a photosensitizer using confocal laser scanning microscope, *IEICE Trans. Information and Systems*, 85D(1), 152-159, 2002.
- 11) M.Takahashi, T.Nagao, Y.Imazeki, K.Matsuzaki, **H.Minamitani** : Fluorescence image analysis for quantification of reactive oxygen species derived from monocytes activated by photochemical reaction, *IEICE Trans. Information and Systems*, 85D(1), 160-166, 2002
- 12) **南谷晴之**, 川村友美, 塚田孝祐, 飯島淳彦, 関塚永一, 大塩力 : 原子間力顕微鏡による赤

- 血球弾性計測，電気学会論文誌 C, 122-C(9), 1664-1671, 2002.
- 13) 塚田孝祐，酒井修平，長谷憲多朗，南谷晴之：医用カテーテル型光学式酸素センサ，医工学治療，14(3)，163-167，2002.
- 14) K.Tsukada, Y.Ogata, N.Yamaguchi, E.Sekizuka, C.Oshio, H.Minamitani：Blood flow analysis in cerebral microcirculation during exchange blood transfusion with hemoglobin-encapsulated liposome, *Microcirculation Annual*, 18, 41-42, 2002.
- 15) H.Minamitani, K.Tsukada, E.Sekizuka, C.Oshio, Measurement of blood flow and oxygen tension using fluorescent and phosphorescent probes in organ microcirculation, *Microcirculation Annual*, 18, 13-14, 2002.
- 16) H.Nakadate, E.Sekizuka, C.Oshio, K.Tsukada, T.Uchida, T.Ozawa, H.Minamitani：Fundamental study of a particle counting method using laser-light scattering in detection of platelet aggregates under diabetes mellitus, *Microcirculation Annual*, 18, 129-130, 2002.
- 17) T.Uchida, E.Sekizuka, C.Oshio, K.Tsukada, T.Ozawa, H.Nakadate, H.Minamitani：Investigation on the thrombus formation of diabetes mellitus, *Microcirculation Annual*, 18, 67-68, 2002.
- 18) T.Ozawa, E.Sekizuka, C.Oshio, K.Tsukada, T.Uchida, H.Nakadate, H.Minamitani：Mechanism of increased platelet aggregation in diabetes mellitus -- Newly-devised investigation with laser scattering platelet aggregometer-, *Microcirculation Annual*, 18, 53-54, 2002.
- 19) 南谷晴之，高橋未帆，今関善晴，長尾朋和，関塚永一，大塩力：血栓形成過程における白血球動態と活性酸素産生，日本バイオレオロジー学会誌，16(1)，29-31，2002.
- 20) K.Hase, S.Sakai, K.Tsukada, E.Sekizuka, C.Oshio, H.Minamitani：Continuous measurement of blood oxygen pressure using a fiber optic sensor based on phosphorescence quenching, Proc. 2nd Joint EMBS/BMES Conf., 1777-1778, 2002.

G-2. 学会発表

- 1) 南谷晴之：超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析と高精度局所診断技術の開発，厚生労働科研公開シンポジウム（バイオイメージングとナノテクノロジー），2003-2（東京）
- 2) 塚田孝祐，関塚永一，大塩力，南谷晴之，辻岡克彦：脳虚血における微小循環血流と局所酸素代謝の可視化解析，厚生労働科研公開シンポジウム（バイオイメージングとナノテクノロジー），2003-2（東京）
- 3) 関塚永一，大塩力，南谷晴之：糖尿病性血管障害のイメージング診断と治療への応用，厚生労働科研公開シンポジウム（バイオイメージングとナノテクノロジー），2003-2（東京）
- 4) 新井達也，塚田孝祐，長谷憲多朗，南谷晴之：血液希釈時の脳微小循環領域における血流増加と酸素供給に関する研究，厚生労働科研公開シンポジウム（バイオイメージングとナノテクノロジー），2003-2（東京）
- 5) 長尾朋和，越尾修，馬淵綾子，大野尚仁，高橋啓，南谷晴之，鈴木和男：免疫異常による腎微小血管傷害のイメージング，厚生労働科研公開シンポジウム（バイオイメージングとナノテクノロジー），2003-2（東京）
- 6) 高橋未帆，長尾朋和，松崎和喜，南谷晴之：光線力学的治療における血流遮断機構の解析－光化学反応によって誘起される内皮細胞傷害と血栓形成，厚生労働科研公開シンポジウム（バイオイメージン

- グとナノテクノロジー), 2003-2 (東京)
- 7) 渋谷典子, 長尾朋和, 高橋未帆, 松崎和喜, 南谷晴之: 腫瘍血管における光線力学的治療施行時の血流動態の研究, 厚生労働科研公開シンポジウム (バイオイメージングとナノテクノロジー), 2003-2 (東京)
 - 8) 守屋智子, 長尾朋和, 松崎和喜, 高橋未帆, 南谷晴之: 光化学反応によるアポトーシス誘導におけるデスレセプターの検討, 厚生労働科研公開シンポジウム (バイオイメージングとナノテクノロジー), 2003-2 (東京)
 - 9) 南谷晴之: ナノプローブとバイオイメージング技術を用いた微小循環障害の機構解析, 第 28 回日本微小循環学会総会, 2003-2 (東京)
 - 10) 岡崎絵里奈, 中楯浩康, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩力, 南谷晴之: 原子間力顕微鏡による赤血球ゴーストの弾性解析, 第 28 回日本微小循環学会総会, 2003-2 (東京)
 - 11) 広瀬耕徳, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 中楯浩康, 南谷晴之: 糖尿病患者の血小板凝集能亢進における GPⅡb/Ⅲa の関与, 第 28 回日本微小循環学会総会, 2003-2 (東京)
 - 12) 新井達也, 長谷憲多朗, 塚田孝祐, 関塚永一, 寺尾聰, 大塩力, 南谷晴之: 血液希釈時の脳微小循環細動脈の血行動態・酸素分圧計測, 第 28 回日本微小循環学会総会, 2003-2 (東京)
 - 13) 中楯浩康, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之, 関塚永一, 大塩力, 森下鉄夫: 糖尿病状態下における血管内皮細胞と血小板との相互作用の検討, 第 28 回日本微小循環学会総会, 2003-2 (東京)
 - 14) 小澤正, 関塚永一, 大塩力, 内田朋宏, 中楯浩康, 広瀬耕徳, 南谷晴之: 光化学反応血栓モデルを用いた糖尿病状態の内皮細胞と血小板の相互作用の検討, 第 25 回日本血栓止血学会学術集会, 2002-11 (神戸)
 - 15) 中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之: 糖尿病における LSPA を用いた血小板凝集能の評価, 第 25 回日本血栓止血学会学術集会, 2002-11 (神戸)
 - 16) 長谷憲多朗, 塚田孝祐, 酒井修平, 南谷晴之: カテーテル型酸素センサによる血中酸素分圧の連続計測, 電気学会医用生体工学研究会, 2002-11 (早稲田)
 - 17) 中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之: 散乱光を用いた血小板凝集能測定装置の基礎特性と糖尿病血小板凝集能亢進の検討, 電気学会医用生体工学研究会, 2002-11 (早稲田)
 - 18) 広瀬耕徳, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 中楯浩康, 南谷晴之: 光散乱法を用いた血小板凝集能測定装置の出力特性, 第 9 回日本ヘモレオロジー学会大会, 2002-11 (和光)
 - 19) 中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之: レーザー散乱粒子計測型血小板凝集能測定装置を用いた糖尿病における血小板障害メカニズムの検討, 第 9 回日本ヘモレオロジー学会大会, 2002-11 (和光)
 - 20) 小澤正, 関塚永一, 大塩力, 中楯浩康, 広瀬耕徳, 南谷晴之: 光化学反応血栓モデルにおける糖尿病内皮細胞-血小板の相互作用の検討, 第 9 回日本ヘモレオロジー学会大会, 2002-11 (和光)
 - 21) 新井達也, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩力, 長谷憲多朗, 南谷晴之: 血液希釈時の脳微小循環細動脈の血行動態・酸素分圧計測, 第 9 回日本ヘモレオロジー学会大会, 2002-11 (和光)

- 22) 泉田太郎, 関塚永一, 石井主税, 末次麻里子, 大塩 力, 広瀬耕徳, 中楯浩康, 小澤正, 南谷晴之, 片山茂裕: 超高速高感度ビデオカメラシステムを用いた自然発症高血圧ラットにおける微小循環速度分布の検討, 第 9 回日本ヘモレオロジー学会大会, 2002-11 (和光)
- 23) 岡崎絵里奈, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩力, 南谷晴之: 原子間力顕微鏡による赤血球ゴーストのヤング率計測, 第 9 回日本ヘモレオロジー学会大会, 2002-11 (和光)
- 24) 塚田孝祐, 緒方嘉貴, 辻岡克彦, 南谷晴之: 人工酸素運搬体 Neo Red Cell 交換輸血時の脳微小循環動態および酸素分圧計測, 第 14 回脳循環代謝学会総会, 2002-10 (大宮)
- 25) 南谷晴之, 西村俊彦, 高橋未帆, 長尾朋和, 関塚永一, 大塩力: ALA-PDT の血流遮断効果における光感受性物質動態の解析, 第 11 回日本バイオイメージング学会学術集会, 2002-10 (名古屋)
- 26) 長尾朋和, 越尾修, 馬淵綾子, 大野尚仁, 高橋啓, 南谷晴之, 鈴木和男: 免疫異常による腎血流傷害のイメージング, 第 11 回日本バイオイメージング学会学術集会, 2002-10 (名古屋)
- 27) 長谷憲多朗, 酒井修平, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩 力, 南谷晴之: 光ファイバ型酸素センサによる動脈血酸素分圧の連続計測, 第 41 回日本エム・イー学会大会, 2002-5 (京都)
- 28) 高橋未帆, 長尾朋和, 松崎和喜, 西村俊彦, 南谷晴之: 光化学反応によって誘起される内皮細胞傷害に関する検討, 第 41 回日本エム・イー学会大会, 2002-5 (京都)
- 29) 岡崎絵里奈, 川村友美, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩力, 南谷晴之: 原子間力顕微鏡を用いた赤血球弾性解析, 第 41 回日本エム・イー学会大会, 2002-5 (京都)
- 30) 南谷晴之: 臓器微小循環の血流イメージングと機能解析, 第 75 回日本薬理学会年会, 2002-3 (熊本)
- 31) 塚田孝祐, 緒方嘉貴, 山口則之, 関塚永一, 大塩 力, 南谷晴之: リポソーム封入ヘモグロビン交換輸血時の脳微小循環動態解析, 第 27 回日本微小循環学会総会, 2002-2 (東京)
- 32) 南谷晴之, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩 力: 蛍光・燐光プローブによる臓器微小循環の血流動態と酸素分圧計測, 第 27 回日本微小循環学会総会, 2002-2 (東京)
- 33) 小澤正, 関塚永一, 大塩 力, 内田朋宏, 中楯浩康, 塚田孝祐, 南谷晴之: レーザー散乱粒子計測型血小板凝集能測定装置を用いた糖尿病における血小板障害メカニズムの検討, 第 27 回日本微小循環学会総会, 2002-2 (東京)
- 34) 中楯浩康, 関塚永一, 大塩 力, 内田朋宏, 小澤正, 塚田孝祐, 南谷晴之: 糖尿病血小板凝集能測定におけるレーザー散乱粒子計測法の基礎的検討, 第 27 回日本微小循環学会総会, 2002-2 (東京)
- 35) 内田朋宏, 関塚永一, 大塩 力, 小澤正, 中楯浩康, 塚田孝祐, 南谷晴之: 光化学反応血栓モデルにおける糖尿病内皮細胞・血小板の相互作用の検討, 第 27 回日本微小循環学会総会, 2002-2 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし.



図 1A 超極限分子プローブによる組織障害の再生・治癒機構の解析と高精度局所診断技術の開発内容

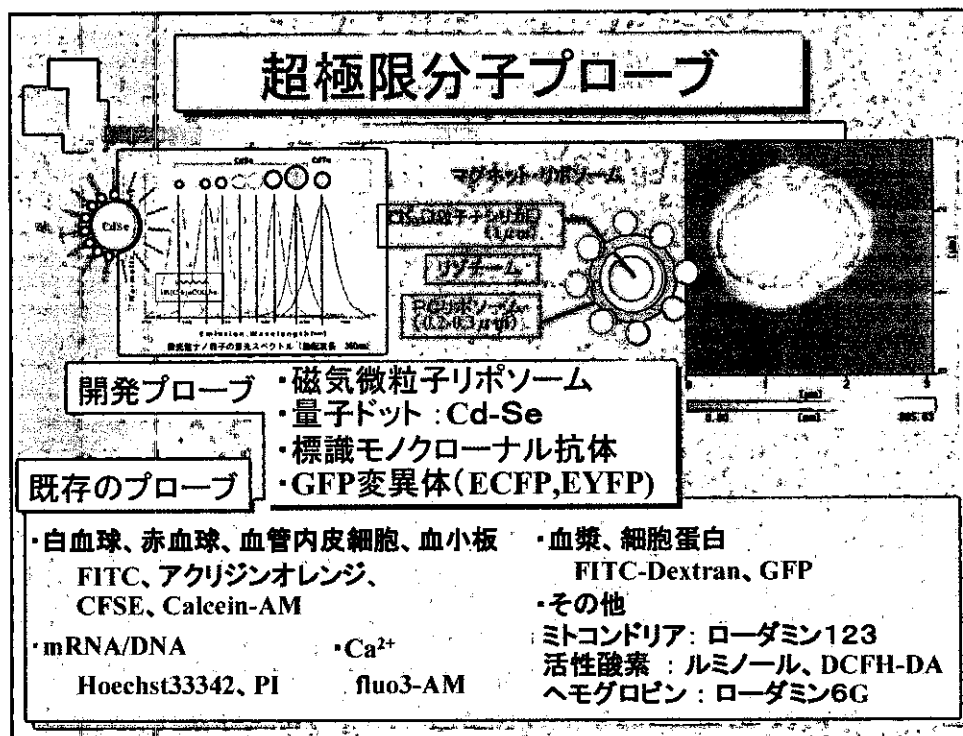


図 2A 超極限分子プローブ (ナノプローブ) の新規開発と各種生体標識プローブの応用



図3A バイオイメージング技術と組織・細胞機能の解析技術の開発

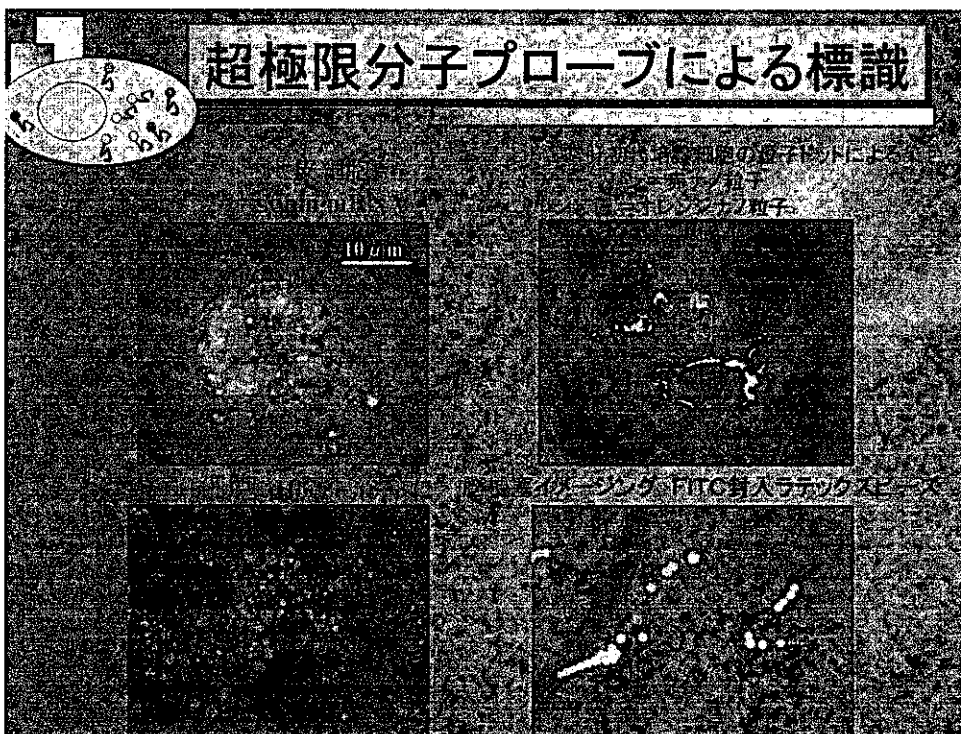


図4A 超極限分子プローブ（ナノプローブ）による組織・細胞の標識と機能解析

厚生労働科学研究費補助金
(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告書

In vivo イメージングによる血管炎に伴う細胞傷害過程の解析

分担研究者：鈴木 和男 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

Tel: 03-5285-1111 内線 2329 Fax: 03-5285-1160 E-mail: ksuzuki@nih.go.jp

研究要旨：血管炎の発症要因には、活性化された好中球が深く関わっている。特に、局所では、好中球のライソゾームに存在する myeloperoxidase (MPO) を初めとした酵素の触媒により、 O_2^- , H_2O_2 , OCl^- , NO などの傷害分子が産生され、血管内皮などの組織破壊に関与していると考えられている。そこで、本研究では、血管炎発症に関与する血管の傷害をナノメディシンの技術を開発しその機構を明らかにすることを目的とした。本年度は、真菌 *C.andida* に由来分子 CADS/CAWS によって誘導される血管炎モデルマウスを用いて、イメージング技術の有用性を検討した。その結果、血管炎発症機構を解明する方法として、新たなイメージング技術として in vivo イメージング法をほぼ確立できた。具体的には、CAWS と anti-mouseMPO を投与後、再度、CAWS と anti-mouseMPO および FMLP を投与して、腎臓の血管傷害の誘導状態を in vivo でのイメージングにより解析した。このイメージング (in vivo イメージング) により、マウスが生きた状態で、血流速度の低下、血流停止、逆流を観察し、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着を観察できた。また、IL-18 および TNF- α 誘導の血管傷害時における内皮細胞の apoptosis に関与するシグナル情報伝達もあわせて解析し、p38-MAPK のカスケードの上昇が顕著であることを認めた。本血管炎誘導モデルにおいて開発した in vivo イメージングの評価法は、血管炎の治療法の開発、治癒機転や発症機構を解析する上でも有用であることを示した。今後は、現在開発中の種々の新しいナノプローブを使った in vivo イメージング評価法を確立することが急務である。

尚、本研究は、長尾朋和、越尾修（以上、国立感染症研）、大野尚仁、三浦典子（東京薬大）、高橋啓、大原関利章、直江史郎（以上、東邦大・医・大橋病院）、南谷晴之（慶応義塾大学・院基理工）、馬淵綾子（日医大・微生物免疫）、中山俊憲（千葉大・院医）各博士の協力のもとに行なわれた。

A. 研究目的

血管炎の発症要因には、好中球殺菌酵素の自己抗体の産生に関与することなどを、これ

までに報告してきた（Inflammation 25:381,2001）。好中球殺菌酵素の不全は、重篤な免疫不全の誘発に加え、自己抗体の産