

果を発揮した。

D. 考察

HV Jエンベロープベクターを用いた手法、ヌクレオフェクターによるエレクトロポレーション法によって、ヒトおよびマウス血液細胞株への良好な分子導入が可能であった。これらの手法はいずれも、エンドゾーム形成によって遺伝子の細胞質への移行が阻まれるという欠点無く、他の手法に比べても極めて有用と考えられた。

E. 結論

HV Jエンベロープベクターを用いた手法、ヌクレオフェクターによるエレクトロポレーション法によって、ヒトもしくはマウス血液細胞株に対して、オリゴヌクレオチド、プラスミドDNA、蛋白、量子ドットを効率よく導入することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Saeki K, Zhang H, Nakatsu M, Yoshimori T, Kabeya Y, Yamamoto A, Kaburagi Y, Yuo A: Insulin-dependent signaling regulates azurophil granule-selective macroautophagy in human myeloblastic cells. *J Leukoc Biol*

74:1108-1116, 2003.

Kobayashi N, Saeki K, Yuo A: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 induce cell cycle progression through the synthesis of c-Myc protein by internal ribosome entry site-mediated translation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway in human factor-dependent leukemic cells. *Blood* 102:3186-3195, 2003.

Saeki K, Saeki K, Yuo A: Distinct involvement of cAMP-response element-dependent transcriptions in functional and morphological maturation during retinoid-mediated human myeloid differentiation. *J Leukoc Biol* 73:673-681, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

急性白血病細胞死誘導体

発明者：湯尾 明、佐伯久美子、中津雅美、佐々木道夫

出願人：佐々木道夫、湯尾 明、佐伯久美子、中津雅美

特願 2003-334125

2. 実用新案取得 なし

3. その他 なし

ナノ粒子の感染症研究への応用について

分担研究者 切替照雄 国立国際医療センター研究所部長

(研究目的)

様々な波長で安定した高い輝度の蛍光を発する量子ドットは、将来の感染症学研究や感染症診断への応用にとって欠かすことの出来ない手段となると考えられる。本研究では感染症学研究や感染症診断に量子ドットがどのように応用できるかを明らかにする。抗 IgG 抗体標識 Qdot を用いて、感染症とくに、肺結核の診断への応用をめざし研究を行った。

(平成15年度の成果)

Mycobacterium bovis BCG 株を液体培地にて培養し、実験に供した。*M. bovis* BCG は 2% Glutalaldehyde にて固定した。1% BSA/PBS にて抗体の非特異反応のブロッキングを行い、抗ウサギ *M. bovis* BCG ポリクローナル抗体を用いて 1 時間反応させ、その後 655nm 抗ウサギ IgG 抗体標識 Qdot を反応させ、共焦点顕微鏡にて観察を行った (図 1)。抗ウサギ *M. bovis* BCG ポリクローナル抗体の希釈倍率は 1000 倍で、1% BSA/PBS にて希釈した。また 655nm 抗ウサギ IgG 抗体標識 Qdot は 200-1000 倍希釈で行った。陽性コントロールには GFP 蛋白を発現させた *M. bovis* BCG で実験を行った (図 2)。この方法は、排菌肺結核患者より採取された喀痰中の結核菌を同定することへ応用可能である。現在は結核菌特異的菌体表層蛋白のモノクローナル抗体の作製に取り組んでいる。

さらに結核の virulence の理由であるマクロファージ内での菌の生存に関わる遺伝子について抗 IgG 抗体標識 Qdot を用いて実験を計画中である。virulence 遺伝子である Rv1615c および Rv3812 をクローニングし、その抗体を作製する。マクロファージに *M. bovis* BCG を感染させ、抗 Rv1615c 抗体および抗 Rv3812 抗体をそれぞれ反応させ、その後抗 IgG 抗体標識 Qdot を用いて蛋白の発現を確認する。もしこの 2 つの結核菌 virulence 因子がマクロファージ内で発現していれば、これらをターゲットにして、量子ドットを検出試薬とした免疫クロマトグラフィーなどのキット化が可能である。



図1. Qdotを用いた免疫染色（共焦点レーザー顕微鏡像）

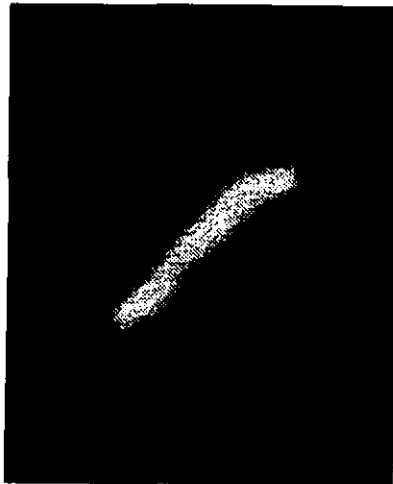


図2. Qdotを用いた免疫染色（共焦点レーザー顕微鏡像）

（研究業績「欧文」）

【原 著】

- 1) Ojima I, Fumero-Oderda CL, Kuduk SD, Ma Z, Kirikae F, Kirikae T: Structure-activity relationship study of taxoids for their ability to activate murine macrophages as well as inhibit the growth of macrophage-like cells. *Bioorganic Medicinal Chem* 11: 2867-2888, 2003.
- 2) Takai S, Tharavichitkul P, Takarn P, Khantawa B, Tamura M, Tsukamoto A, Takayama S, Yamatoda N, Kimura A, Sasaki Y, Kakuda T, Tsubaki S, Maneekarn N, Sirisanthana T, Kirikae T: Molecular epidemiology of

- Rhodococcus equi* of intermediate virulence isolated from patients with and without AIDS in Chiang Mai, Thailand. *J Infect Dis* 188: 1717-23, 2003.
- 3) Kawano F, Miyazaki H, Takami J, Fujino T, Sekiguchi J, Saruta K, Kuratsuji T, Kirikae T: Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Kumamoto Hospital in 2002. *Jpn J Infect Dis* 56: 129-132, 2003.
 - 4) Takahara M, Yajima Y, Miyazaki S, Aiyoshi M, Fujino T, Otsuka Y, Sekiguchi J, Saruta K, Kuratsuji T, Kirikae T: Molecular Epidemiology of Intra-Familial Tuberculosis Transmission. *Jpn J Infect Dis* 56:132-133, 2003.
 - 5) Sekiguchi J, Fujino T, Saruta K, Kawano F, Takami J, Miyazaki H, Kuratsuji T, Yoshikura H, Kirikae T: Spread of Erythromycin-, Tetracycline- and Aminoglycoside-Resistant Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates in a Kumamoto Hospital. *Jpn J Infect Dis* 56:113-117, 2003.
 - 6) Swierzko AS, Cedzynski M, Kirikae T, Nakano M, Klink M, Kirikae F, Ziolkowski A, Vinogradov EV, Kawakami M: Role of the complement-lectin pathway in anaphylactoid reaction induced with lipopolysaccharide in mice. *Eur J Immunol* 56: 2842-52, 2003.
 - 7) Sato T, Shimizu T, Watarai M, Kobayashi M, Kano S, Hamabata T, Takeda Y, Yamasaki S: Distinctiveness of the genomic sequence of Shiga toxin 2-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7 Okayama strain as compared to other Shiga toxin 2-converting phages. *Gene* 309: 35-48, 2003.
 - 8) Shimizu T, Hamabata T, Yoshiki A, Hori T, Ito S, Takeda Y, Hayashi H: An association of 27- and 40-kDa molecules with glycolipids that bind A-B bacterial enterotoxins to cultured cells. *Biochim Biophys Acta* 1612: 186-194, 2003.
 - 9) Shirai Y, Hashimoto M, Kato R, Kawamura Y, Kirikae T, Yano H, Takashima J, Kirihara Y, Saito Y, Fujino MA, Dohi T: Lipopolysaccharide induces CD25-positive, IL-10-producing lymphocytes without secretion of proinflammatory cytokines in the human colon: LowMD-2 mRNA expression in the colonic macrophages., *J Clin Immunol* 2004, in press.
 - 10) Liu F, Shinomiya H, Kirikae T, Hirata H, Asano Y: Characterization of murine grancalcin specifically expressed in leukocytes and its possible role in host defense against bacterial infections. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004, in press.

- 11) Otsuka Y, Parniewski P, Zwolska Z, Kai M, Fujino T, Kirikae F, Toyota E, Kudo K, Kuratsuji T, and Kirikae T: Characterization of a Trinucleotide Repeat Sequence (CGG)₅ and Its Potential Use in Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clinical Microbiol* 2004, in press.

(知的財産権の出願・登録状況)

切替照雄、関口純一郎、大槻隆司

結核菌に含まれる薬剤耐性遺伝子を検出する方法、PCR用プライマーペアセット、塩基配列用プライマーセット、及び薬剤耐性結核菌の診断用試薬キット

出願日:平成15年12月26日

出願番号:PCT/JP03/16941

生物・医療応用
QD を用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析

分担研究者 土肥 多恵子 国立国際医療センター 研究所部長
協力研究者 星野昭芳 国立国際医療センター研究所 研究生

本研究では消化管に存在する免疫担当細胞がどの様にその特徴的な機能を獲得していくかを明らかにすることを最終目的として、蛍光を発するナノ粒子 QD520 の特質を利用して細胞をラベルし、消化管と他の臓器との細胞交通を解析することを目指した。マウス腹腔内単核細胞を調整し、QD520 を細胞に効率よく取り込ませラベルするための条件検討を行った。さらに、QD ラベルした細胞をマウス腹腔内にもどし、48 時間後、腹腔、小腸・大腸粘膜固有層、パイエル板、腸管膜リンパ節、脾臓より細胞を回収し、フローサイトメトリーにて解析した。その結果、リポソームの利用によって、腹腔内マクロファージ系の細胞の QD ラベルが可能であった。さらにこれらの細胞は移植後 48 時間でパイエル板に移行していることが明らかとなった。QD によるラベルの輝度は生体に戻すことによってやや減弱する傾向にあった。以上のように、腹腔内マクロファージ様細胞を QD ラベルすることができ、その *in vivo* での動きを捉えることが可能であった。

A. 研究目的

生体防御の第一線である消化管粘膜局所においては、物理的および機能的バリアーの形成とともに、病原体と常在菌の認識、抗原に対する免疫応答と免疫寛容の緻密な調節がごくあたりまえに行われている。しかしその調節機構はいわゆる全身免疫とは作用する細胞もその作用機構も異なっていることが解明されつつある。我々は、ヒト末梢血単核細胞は lipopolysaccharide (LPS) 刺激に应答して炎症性サイトカインである TNF α や IL-6 などを大量に産生するにもかかわらず、大腸の単核細胞は LPS に应答しないことを見出し、このメカニズムとして、LPS 受容体である Toll 様受容体の細胞表面発現に必要な MD-2 という分子の発現が大腸で極めて低いことを示した。本研究ではこのような腸管免疫の特徴をさらに詳細に解明するため、この現象をマウスでも再現し、消化管に存在する免疫担当細胞がどのようにその特徴的な機能を獲得していくかを明らかにすることを目的として、消化管と他の臓器との細胞交通を解析する。細胞のラベルには種々の方法があるが、半導体ナノ粒子は蛍光が明るく、褪色が少ないと

いう特色があり、これを利用して腹腔マクロファージをラベルし腸を含む腹腔内臓器との交通を解析した。

B. 研究方法

① マウス腹腔内マクロファージと、大腸マクロファージの LPS 応答

BALB/c マウス腹腔細胞を採取し、培養プレートに付着する細胞を腹腔内マクロファージとして用いた。また、大腸から、EDTA, collagenase 処理により粘膜固有層単核細胞を分離し、これよりさらに培養プレートに付着する細胞を大腸マクロファージとして用いた。これらの細胞に *Salmonella minnesota* 由来の LPS を添加し、24 時間後に培養上清中のサイトカインを測定した。

② 腹腔内マクロファージの調整と QD ラベル

研究に用いた半導体ナノ粒子 QD520 は主任研究者の山本により調整されたものの供与を受けた。BALB/c マウス腹腔細胞を採取し、培養プレートに付着する細胞を腹腔内マクロファージとして用いた。ラベルの方法として、以下の条件を検討した。1) BSA-QD 混合物を直接細胞に取り込ませた。

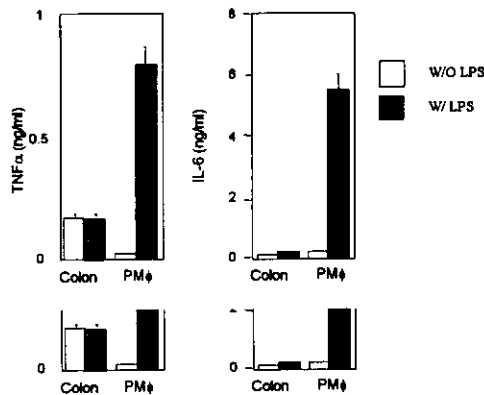
2) BSA-QD 混合物を種々のリポソームと共に細胞に加えた。3) カルボン酸、水酸基、アミド基で表面修飾を施した QD を無血清培地中のマクロファージに加え、直接取り込ませた。この後、蛍光顕微鏡にて細胞を観察した。

③ QD ラベルマクロファージの in vivo 移入と臓器からの回収

BSA-QD 混合物を種々のリポソームと共に細胞に加えてラベルしたマクロファージは、洗浄後ナイーブ BALB/c マウス腹腔内に 2×10^6 /head を移入し、48 時間後に腹腔、脾臓、腸管膜リンパ節、パイエル板、小腸・大腸粘膜固有層より細胞を回収してフローサイトメトリーで種々のマーカーとともに QD ラベル細胞を検出した。

C. 研究結果

① マウス大腸マクロファージの LPS 応答



マウス腹腔内マクロファージはヒト末梢血と同様、LPS 刺激に対して強い TNFα、IL-6 産生応答をした。これに対して、マウス大腸マクロファージは LPS 刺激に対するサイトカイン応答はほとんど認められなかった。

② 腹腔内マクロファージの QD ラベル

BSA-QD 混合物の直接取り込みによるラベルは可能であったもののラベル効率が 10% 程度であった。市販の数種類のリポソーム検討の結果 Promega 社 TRANSfast がラベルと細胞障害の面から最も適当で 80% 以上の細胞が標識された。これを用い、マウス腹腔マクロファージに BSA-QD を取り込ませたところ、培養 6 日後においても陽性細胞が、ラベル直後と同様な輝度で認められ、

安定してラベルされていることがわかった。

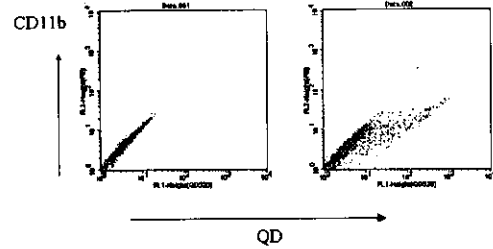


図 2. QD ラベルののち、PE-抗 CD11b 抗体染色を行った培養後のマウス腹腔由来着性単核細胞。左、QD ラベルなし。右、QD ラベル後。

カルボン酸、水酸基、アミド基で表面修飾を施した QD を、マクロファージに取り込ませたところ、カルボン酸のみ、アミド基+水酸基、アミド基のみによる表面修飾を受けた QD が、フローサイトメトリー上比較的効率よくラベルされたが、BSA-QD+liposome 法に比較してめだつた改善は見られなかった。表面修飾 QD についてはさらなる条件検討を必要とする。

③ QD ラベルマクロファージの in vivo 移入と臓器での検出

移植後 48 時間で、QD ラベルした細胞は腹腔内とパイエル板に存在していた。腹腔内細胞は移入前と同様、マクロファージマーカーである CD11b 弱陽性及び強陽性の細胞が存在していた。パイエル板では、CD11b 弱陽性細胞のみが検出された。よって、腹腔マクロファージのうち、特定の細胞が消化管リンパ組織に移行していることが明らかとなった。脾臓、

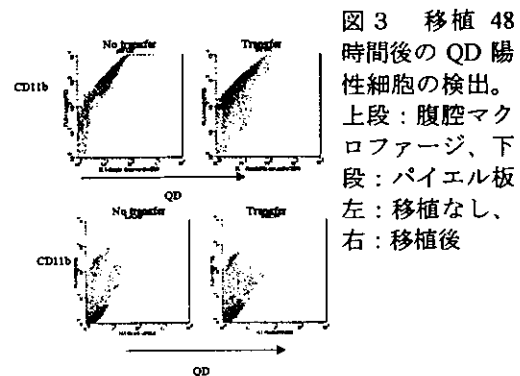


図 3 移植 48 時間後の QD 陽性細胞の検出。上段：腹腔マクロファージ、下段：パイエル板 左：移植なし、右：移植後

腸管膜リンパ節には明らかな以降は認められなかった。移植マクロファージの小腸、大腸粘膜固有層への移行を示唆する結果も一部で

得られたが、QDによるラベルは生体内でその輝度が減弱する傾向にあり、最終的な判断は現状では困難であった。

D. 考察

1) 達成度について

量子ドットの免疫学応用の基礎となるデータがえられ、マクロファージ系統の細胞の標識およびその標識された細胞の生体内導入が可能であることが明らかとなった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

量子ドットによるラベルを行い、細胞をトレースした結果、QDラベルした腹腔マクロファージは48時間後、腸管膜リンパ節には認められず、パイエル板から検出されたことから、腹腔とパイエル板との間に特異的な交通があることが明らかとなった。消化管免疫にかかわる組織マクロファージの及びその病的変化を解析する上で重要な基礎的知見のえられたことから量子ドットは粘膜免疫研究の上でも有用なツールであると考える。

3) 今後の展望について

さらなる細胞障害性の減弱、*in vivo*での輝度の維持を目指し、必要な表面加工法および細胞内導入方法の条件を検討していく必要がある。今後はラベルした細胞の回収と、その機能解析を目指したい。また、動物が生きた状態での生体内動態を観察できるような量子ドットの検出器を利用したいと考えている。

E. 結論

リポソームの利用によって半導体ナノ粒子を用いた腹腔内マクロファージ様細胞の蛍光標識が可能となり、細胞の*in vivo*での臓器間交通を捉えることができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shirai, B.Y., M. Hashimoto, R. Kato, Y.I. Kawamura, T. Kirikae, H. Yano, J. Takashima,

Y. Kirihara, Y. Saito, M.A. Fujino, and T. Dohi. 2004. Lipopolysaccharide induces CD25-positive, IL-10-producing lymphocytes without secretion of proinflammatory cytokines in the human colon: Low MD-2 mRNA expression in the colonic macrophages. *J. Clin. Immunol.* In press.

2. Kawamura, Y.I., Y. Shirai, R. Kato, T. Hamabata, M. Yamamoto, K. Furukawa, K. Fujihashi, J.R. McGhee, H. Hayashi, and T. Dohi. 2003. Cholera toxin activates dendritic cells through dependence on GM1-ganglioside which is mediated by NF- κ B translocation. *Eur. J. Immunol.* 33:3205-3212.
3. Kato, H., K. Fujihashi, R. Kato, T. Dohi, and J.R. McGhee. 2003. Lack of oral tolerance in aging is due to sequential loss of T cell responses in Peyer's patches. *International Immunology* 15:145-158.
4. Dohi, T., K. Fujihashi, T. Koga, Y. Shirai, Y.I. Kawamura, C. Ejima, R. Kato, K. Saitoh, And J.R. McGhee. 2003. T Helper Type-2 Cells Induce Ileal Villus Atrophy, Goblet Cell Metaplasia And Wasting Disease In T Cell-Deficient Mice. *Gastroenterology* 124:672-682.

学会発表

1. 白井裕子 土肥多恵子 (2003年4月). 炎症性腸疾患における大腸粘膜固有層細胞のリポポリサッカライド応答異常. 第89回日本消化器病学会総会
2. Kawamura, Y. I., Yuko Shirai, et al. (2003, May). Cholera toxin adjuvanticity is dependent upon GM1-mediated NF- κ B translocation and activation of dendritic cells. Digestive Disease Week, Orlando.
3. Dohi, T., et al. (2003年 12月) Macrophage migration inhibitory factor regulates lipopolysaccharide -induced TNF α secretion in human peripheral mononuclear cells 第33回日本免疫学会. 福岡.

H. 知的所有権の出願・取得状況

特許出願

なし

厚生労働科学研究萌芽的先端医療技術推進研究 分担研究

ペプチド標的治療に対するモニターリング法の可能性

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所部長

協力研究者 志村まり 国立国際医療センター研究所室長

標的治療は病巣局所治療薬の濃度を向上させ、薬剤使用量や副作用の軽減につながり、臨床上大変有用である。我々は、ペプチドによる特定分子 (RET 蛋白) に対する標的化について検討を行ってきた。RET binding peptide (RBP1) は、8つのペプチドからなり神経芽腫に好発する RET 蛋白を認識する。臨床診断応用のために、3価の Fe を有する磁性体ナノパーティクルに RBP1 を結合させることに成功し、これまでに、MRI (4.7T) により 5×10^6 個の RET 陽性細胞を認識している。さらに、RBP1 と化学療法剤との複合体形成により、治療効果の増大も期待される。しかしながら、実際の標的化の効果について、磁性体や化学療法剤を細胞レベルで直接評価することは困難である。今回、われわれは蛍光放射光顕微鏡 (SX-FM) の開発により、細胞内元素分布の画像化を可能とした。SX-FM は、磁性体である Fe や Pt 製剤 (シスプラチン) の細胞内での局在を明らかにした。今後、白金などの生体にはない元素をラベルすることで、SX-FM は標的化のモニターに有用と考えられる。

A. 研究目的

分子標的を評価するためには、蛍光や放射性同位元素を、直接あるいは間接にラベルする方法が頻繁におこなわれてきた。本研究では、元素そのものを、高輝度放射光により得られる蛍光放射光の元素固有エネルギーを、細胞においてスキヤニングすることで、細胞の高分解能画像化および、新規分子標的モニター法への応用を目的とした。

B. 研究方法

1. SX-FM 試料作成

細胞を SX-FM 専用基盤へ播種し、21 時間後シスプラチン 2 microM を細胞培養上清中に添加処置する。12 時間後、2% パラホルムアルデヒド PBS および 70% 氷冷エタノール固定を施す。固定処理後 12 時間乾燥処理を施す。微分干渉像を得る。

2. シスプラチンの細胞結合および取り込み能

(ア) ICP-MS 白金元素測定

(イ) SX-FM による白金元素の測定

測定は、理化学研究所播磨研究所 (SPring-8) 施設による高輝度放射光にて、大阪大学工学部との共同研究で行った。高感度蛍光放射光検知計 (DSS) により、細胞内元素特異エネル

ギースベクトルを、X-ray Beam Size: 0.1H x 0.2V μm, Scanning Pitch: 0.2 μm, 150x150 pts., 0.5sec/pt. 12HRS で測定した。

C. 研究結果

シスプラチン 2 microM を培養上清に添加 48 時間後において、白金シグナルが細胞全体で著しく増加していること、特に核小体では白金シグナルは強い。SX-FM では、白金以外の元素における変動も見ることができた。銅シグナルの増大がシスプラチン添加により顕著である。

D. 考察

本研究により、細胞内元素のモニターが可能であることが示唆された。今後、標的分子に生体内に存在しない元素、例えば白金、チタン、金などをラベルすることで、細胞内での局在、結合能を、高分解能画像で評価可能である。

F. 結論

SX-FM は新規分子標的モニター法において有用である。

E. 健康危険情報 ; 特記事項なし

F. 研究発表

1. Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s controls the cytoplasmic localization of

CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, in press.

2. Minemoto, Y., Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Sasagawa, T., Hirata M., Nakagama, H., Ishizaka, Y., and Yamashita, K. Loss of p53 Induces M-phase retardatio following G2 DNA camage Checkpoint abrogation. *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 13-19, 2003.

2. 学会発表

1. Disrupted nuclear HP1 with premature chromatid separation by epigenetic effects of HIV-1 VPR. EMBL meeting; Chromatin and Epigenetics, Heidelberg,

Germany, 6月, 2003.

2. HIV アクセサリー遺伝子 VPR によるゲノム不安定性と HP1 α 第25回日本分子生物学会, 神戸, 12月, 2003.

H. 知的財産権の出願: なし

腎疾患治療に向けた DDS

分担研究者 名取 泰博 国立国際医療センター研究所部長

研究協力者 欧 周羅 復旦大学上海医学院副教授

尿細管間質病変の進展は糸球体腎炎の増悪に重要な役割を果たす。本研究では、尿細管上皮細胞への選択的 DDS の標的分子の候補としてフラクタルカイン (FKN) に注目し、ヒト腎疾患及びラットモデルを用いてその発現動態を調べた。正常腎組織には FKN の発現はほとんど見られなかったのに対し、腎疾患患者 52 例中 15 例の腎尿細管間質領域 (多くは尿細管上皮細胞) に FKN が検出された。FKN 陽性例の多くは FKN 受容体も陽性であり、FKN 陽性例は陰性例に比べて、血液尿素窒素、血清クレアチニン値、尿蛋白のいずれも高値を示した。また間質への白血球浸潤の程度は FKN の発現が高い症例ほど顕著であり、FKN 陽性の尿細管の周囲には多数の白血球が観察されることが多かった。同様の現象は動物モデルでも観察された。これらの結果から、FKN 発現尿細管上皮細胞は腎炎における間質白血球浸潤や病態の進展に重要な役割を担うことが示唆され、DDS の標的分子となる可能性が示された。

A. 研究目的

我が国における慢性腎不全の主な原疾患は慢性糸球体腎炎と糖尿病性腎症である。昨年度の本研究で我々は、ラット腎炎モデルにおいて、糸球体に指向性のあるリポソームに封入したステロイド剤が、フリーのステロイド剤より優れた治療効果を有して腎機能低下を阻止し得ることを示し、糸球体選択的な DDS として有用であることを報告した。

一方、糸球体腎炎の進展には尿細管上皮細胞を介した間質の病変が深く関与すると考えられており、尿細管間質病変の進展抑制も慢性糸球体疾患における腎不全阻止に有効な手段となることが示唆されている。従って尿細管上皮細胞を標的とした DDS は腎疾患治療に有用と考えられるが、同細胞への選択的 DDS は未だ開発されておらず、適切な標的分子も同定されていない。

ケモカインは白血球遊走活性化能を有する一群のサイトカインで、そのほとんどは分子量 1 万前後の分泌性の小さいタンパク質であるが、フラクタルカイン (FKN) は現在まで知られる唯一の膜結合型ケモカインである。一般に FKN は活性化された血管内皮細胞に発現し、血管から間質組織への白血球浸潤に関与すると言われている。一方、腸炎などにおいては FKN が上皮系細胞に発現するとも報告されている。しかし腎

炎における FKN の発現に関する研究は少ない。そこで我々は、ヒトの種々の腎疾患及びラット腎炎モデルにおける FKN の発現について調べ、FKN が尿細管上皮選択的 DDS の標的となり得るかどうかを検討した。

B. 研究方法

上海・復旦大学医学院附属中山医院の腎臓内科に受診した糸球体疾患患者 52 名 (IgA 腎症 22 名、微小変化型腎症 16 名、膜性腎症 3 名、巣状分節性増殖性腎炎 4 名、巣状糸球体硬化症 2 名、メサングウム増殖性腎炎 2 名、膜性増殖性腎炎 1 名、半月体性糸球体腎炎 2 名、病理診断名は同病院の分類に従った) を対象とし、その腎生検組織を FKN 及び FKN 受容体に対する抗体で免疫染色を行った。正常コントロールとして腎癌患者 4 名から摘出した腎組織の正常部分を用いた。これらの組織を本研究に用いることは同医院の倫理委員会にて承認されている。

腎炎動物モデルには、Wistar 系ラット (雄 6 週齢) の頸静脈より 9 mg/100 g 体重のピュロマイシンアミノヌクレオシドを投与して作製した、進行性の巣状糸球体硬化症モデルを用いた。本モデルでは 5 日目頃から次第に尿タンパクが増加し、7-10 日目頃からネフローゼを呈するようになる。また間質への白血球浸潤が顕著であり、我々

は既に本モデルにおいて多くのケモカイン分子の発現が亢進することを報告している。

C. 研究結果

ヒト正常腎組織には、間質及び糸球体への白血球浸潤や FKN 及び FKN 受容体の発現はほとんど見られなかった。

腎疾患患者の腎生検組織には FKN が検出される症例が 52 例中 15 例あり、陽性例の疾患別の内訳は、IgA 腎症 5 例、膜性腎症 3 例、巣状糸球体硬化症 2 例、半月体性糸球体腎炎 2 例、巣状分節性増殖性腎炎 1 例、メサングウム増殖性腎炎 1 例、膜性増殖性腎炎 1 例であった。これらの症例で FKN は尿細管間質領域にのみ検出され、その多くは尿細管上皮細胞に発現していることが確認された。一方、糸球体内に FKN の発現は見られなかった。

FKN 陽性例では陰性例に比べて、血液尿素窒素、血清クレアチニン値 ($P=0.01$)、尿蛋白 ($p=0.001$) のいずれも高値を示し、FKN の発現は臨床的に重症であるほど顕著であることが明らかとなった。

FKN 受容体の発現は FKN の発現より頻度が高く、また腎間質だけでなく、糸球体内にも見られた。腎間質での陽性例は 35 例、糸球体内陽性例は 21 例あり、そのうち両方が陽性だった例は 18 例あった。また FKN 陽性例 15 例のうち腎間質での FKN 受容体陽性例が 13 例あり、FKN が尿細管間質領域に発現すると、その受容体発現細胞が集積することが示唆された。

間質への白血球浸潤の程度は FKN 及び FKN 受容体の発現が高い症例ほど顕著であり、FKN が陽性の尿細管の周囲には多数の白血球が観察されることが多かった。FKN の発現は種々の浸潤白血球数と相関し、特に FKN の発現と CD68 陽性細胞数との相関が最も強かった ($P<0.01$)。

正常ラット腎組織において FKN の発現は見られなかったが、腎炎モデルではその初期に糸球体内に発現が認められ、蛋白尿が出始める 5 日目頃から尿細管上皮細胞に FKN の発現が観察された。この発現亢進は mRNA レベルでも確認された。また、臨床例の場合と同様、FKN 発現尿細管上皮細胞の周囲に白血球浸潤が観察された。

D. 考察

本研究の結果から、腎炎の重症度が高いほど FKN の発現が亢進し、その発現は主に尿細管上皮細胞であることがわかった。また FKN の発現が高い症例ほど白血球浸潤の程度も高く、さらにヒト及び動物モデルにおいて FKN を発現する尿細管上皮細胞の周囲には FKN 受容体発現細胞や単球/マクロファージなどが集積していることが示され、FKN がこれらの白血球浸潤に関与することが示唆された。

本研究の結果で興味深い点の一つは、微小変化型腎症の患者腎組織には FKN の発現が 1 例も見られなかったことである。これらの症例のうち蛋白尿が 3.5 g/日以上を示したのは 2 例のみであるが、いずれも FKN の発現はなく、一方、同程度の蛋白尿を示した他の疾患患者 9 例中 8 例には FKN の発現が見られた。この結果から、微小変化型腎症では尿細管上皮細胞における FKN の発現誘導がかからないことが示唆され、同疾患が予後が良いこととの関連が考えられる。

以上の結果から、尿細管上皮における FKN の発現は白血球浸潤などの病変に深く関与することが示唆され、FKN を標的とした尿細管上皮細胞への DDS は、このような病変部位に選択的に作用する系として有用となる可能性が考えられた。

E. 結論

進行性の腎炎において尿細管上皮細胞に発現する FKN は、腎炎治療のための DDS に効果的な標的分子となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Altered expression of NDST-1 messenger RNA in puromycin aminonucleoside nephrosis K. Nakayama, Yu. Natori, T. Sato, T. Kimura, A. Sugiura, H. Sato, T. Saito, S. Ito, Y. Natori (2004) J. Lab. Clin. Med., in press

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

厚生労働科学研究萌芽的先端医療技術推進研究
分担研究

正常ヒト角化細胞と線維芽細胞における半導
体ナノ粒子の取り込み

分担研究者 大河内仁志 国立国際医療センター研
究所部長

研究要旨

正常ヒト角化細胞と線維芽細胞への半導体ナノ
粒子の取り込みを検討し、14日間の観察を行
った。ともに細胞内に取り込まれたが、細胞分
裂に従って、個々の蛍光強度は減少した。創傷
治癒過程のモデルとしてのヒト角化細胞による
シート状増殖する新しい実験系を構築した。

A 研究目的

正常ヒト角化細胞と線維芽細胞への半導体ナ
ノ粒子の取り込みを検討し、トレーサーにな
りうるかについてと安全性を検討する。

B 研究方法

正常ヒト角化細胞と正常ヒト線維芽細胞と
HaCat 細胞を96穴培養皿に2000個、500個
ずつ播種し、半導体ナノ粒子 (CdSe/ZnS core
shell 型 カルボン酸による表面加工) を
50ug/ml となるように加えた。1時間あるは
2時間後に培養液を取り替え、取り込まれな
かった半導体ナノ粒子を除去した。その後1
日おきに14日間、位相差顕微鏡および蛍光
顕微鏡にて観察した。

またクローニングリングを用いて正常ヒト角
化細胞がシート状に増殖するのに関わる培養
条件の検討を行った。

(倫理面への配慮)

今回用いた正常ヒト細胞は市販のものを使用
し、HaCat 細胞はすでに樹立された細胞株な
ので、特別な倫理上の配慮は要しないものと
考えた。

C 研究結果

HaCat 細胞は5-10%の細胞に半導体ナノ粒子
の取り込みがみられ、添加による増殖への影
響はほとんどなかった。正常ヒト角化細胞で
はラベル時間が1時間の場合、5-10%の細胞
に蛍光色素が観察された。しかし無添加群に

比べてコンフルエントになるまでに1-2日遅れた。ラベル時間が2時間の場合は10-20%の細胞に蛍光色素が観察されたが、コンフルエントになるまでに3-4日遅れた。個々の細胞の蛍光強度は細胞分裂とともに弱まったが、14日後にも蛍光を保持している細胞が存在した。正常ヒト線維芽細胞においては5-10%の細胞に蛍光の取り込みがみられ、増殖は無添加群と変わらなかった。7日後まで蛍光が観察された。

正常ヒト角化細胞がシート状に増殖するのに関わる培養条件の検討を検討したところ、0.5mM以上のカルシウム濃度が必要で、血清の添加により形態学的により整ったシートを形成することが判明した。

D 考察

半導体ナノ粒子を正常培養細胞に添加すると、初期に一時的に増殖抑制がかかることが判明した。半導体ナノ粒子を取り込んだ細胞が少なくとも14日生存していること、また蛍光強度が徐々に弱まっていったのは分裂によるものと考えられ、細胞毒性は致命的なものではないと思われた。細胞のラベリング効率は5-20%であったので、効率を上げるためにはさらなる検討が必要であると考えられた。今後シート状に増殖する角化細胞を創傷治療モデルとして活用していく予定であるが、細胞の動態を研究するのに半導体ナノ粒子が有用であるか否かを検討していきたい。

E 結論

半導体ナノ粒子を正常ヒト培養細胞に取り込ませることができた。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

英語論文

1. Kawase Y, Yanagi Y, Fujimoto M, Okochi H: Characterization of multipotent stem cell in the skin-positive effect of TGF-beta on sphere colony formation. *Exp Cell Res* in press
2. Itoh M, Hiraoka Y, Kataoka K, Huh NH, Tabata Y, Okochi H: Novel collagen sponge reinforced with polyglycolic acid fiber produces robust, normal hair in murine hair reconstitution model. *Tissue Engineering* in press
3. Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K: Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* in press
4. Yazawa N, Fujimoto M, Sato S, Miyake K, Asano N, Nagai Y, Takeuchi O, Takoda K, Okochi H, Akira S, Tedder TF, Tamaki K: CD19 regulates innate immunity by the toll-like receptor RP105 signaling in B lymphocytes. *Blood*. 2003 ;102(4):1374-80.
5. Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K. : Interleukin 15 induces the signals of epidermal proliferation through ERK and PI 3-kinase in a human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Feb 21;301(4):841-7.
6. Tsunemi Y, Ihn H, Idezuki T, Okochi H,

Tamaki K. : Psoriasis guttata in association with hepatocellular carcinoma. *Acta Derm Venereol.* 2003;83(1):70-1

7. Mitsui H, Komine M, Shirai A, Kanda N, Asahina A, Okochi H, Hitomi S, Kimura S, Tamaki K. Chronic active EB virus infection complicated with IgG3 subclass deficiency: an adult case treated with intravenous immunoglobulin and IFN-alpha. *Acta Derm Venereol.* 2003;83(1):31-5.

8. Nagaoka Y, Okochi H, Tamaki K. Leukocytopenia after administration of itraconazole. *Mycoses.* 2003 Jun;46(5-6):240-1.:

日本語論文

- 1.大河内仁志 皮膚の幹細胞と再生医療 最新医学 58suppl:789-796, 2003
- 2.大河内仁志 毛髪再生医療 遺伝子医学別冊 p173-177 2003
- 3.大河内仁志 皮膚と再生医療 日皮会誌 113:247-251, 2003
- 4.大河内仁志 毛髪再生にむけて 臨床現場での再生医療の最前線 羊土社 p84-88 2003
- 5.大河内仁志 皮膚にある幹細胞と再生医療への応用 *BIO Clinica* 18:76-80, 2003

1. 学会発表

1. Ura H, Yano S, Fujimoto M, Okochi H: A keratinocyte outgrowth system useful as a new tool for analyzing proliferation, migration, and differentiation *International Investigative Dermatology* 2003 Miami Beach May 2003
- 2.Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, Fujimoto M, Okochi H: Effect of transforming growth factor-beta on the proliferation and differentiation of multipotential sphere colonies from skin *International Investigative Dermatology* 2003 Miami Beach May 2003
- 3.Fujimoto M, Asano N, Okochi H, Tedder TF, Sato S: Exaggerated B cell signaling by disrupted CD22/SHP-1 inhibitory regulation in the tight-skin mouse *International Investigative Dermatology* 2003 Miami Beach May 2003

G 知的所有権の取得状況

なし

半導体などナノ粒子による DDS ピンポイント DDS(分担者の課題)

分担研究者 近藤昭彦 神戸大学工学部教授

本研究の目的は、低侵襲な方法（注射等）により生体内で標的部位へピンポイントに薬剤、遺伝子、タンパク質等を輸送して効率よく導入することで、副作用を軽減することができるキャリアー（運搬体）を開発することである。本研究では B 型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)粒子をキャリアーとして用いることを試みた。この粒子は、ウイルスゲノムを除去したタンパク質中空ナノ粒子であるため、内部に薬剤等を封入することで、ヒト肝細胞に安全かつピンポイントに導入することができる。本年度は、このタンパク質中空ナノ粒子に外来タンパク質を封入し、ヒト肝臓に特異的に導入することを試みた。モデルタンパク質としてオワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用い、HBsAg タンパク質の C 末端側に融合させて形成した粒子が、ヒト肝臓に効率よく GFP を導入可能であることを確認した。

A. 研究目的

近年、重篤な疾患に対して、微量でありながら強い治療効果を発揮する医薬品が数多く開発されている。しかし、標的部位に効率良く投与することが難しく、全身性の副作用が問題となっている。そのため、低侵襲な方法（注射や経口投与等）により、生体内で標的部位へピンポイントに薬剤を輸送し、副作用を軽減することができるキャリアー（運搬体）の開発が求められている。そこで、本研究グループでは、B 型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)粒子をキャリアーとして用いることに着目した。この粒子は、ウイルスゲノムを除去したタンパク質中空ナノ粒子であるため、粒子内に薬剤を封入し、静脈注射によって、ヒト肝細胞に安全かつピンポイントに導入することができる。また、酵母や動物細胞を用いて簡便かつ安全に調製する手法が確立されている。

しかし、現在のところ、タンパク質を粒子内に簡便に封入する技術は確立されていない。そこで、本研究では粒子内に外来タンパク質を封入する手法を開発することでヒト肝細胞へ特異的に導入することを目指した。具体的には、Fig. 1 に示す様に、HBsAg

タンパク質の C 末端側に封入するタンパク質 (Fig.1 ではオワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP)) を融合して発現させることで、タンパク質封入を行うことを試みた。

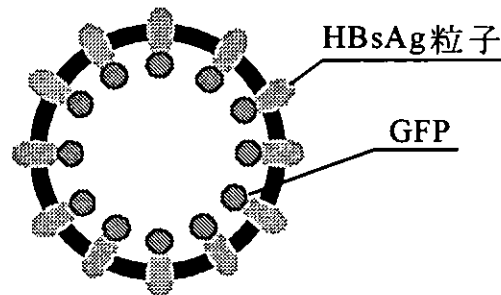


Fig.1 目的タンパク質 (GFP) 封入タンパク質中空ナノ粒子の模式図

B. 研究方法

動物細胞において HBsAg タンパク質の C 末端部位にモデル系としてオワンクラゲ由来で緑色蛍光を発するタンパク質である GFP を融合発現させるプラスミド pSR α -HBsAgGFP を構築した (Fig. 2)。このプラスミドをサル腎臓由来細胞(COS7)

に 300V、950 μ F の条件でエレクトロポレーション法によって形質転換を行った。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下で 4 日間培養を行った後、培養上清をウエスタンブロッティング及び酵素免疫測定装置 IMx(DINABOT) によって解析することで、融合タンパク質粒子の生成を確認した。

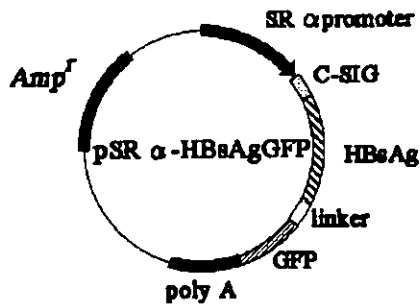


Fig.2 発現プラスミド

次に、得られた粒子を用いることで GFP をヒト肝細胞にのみ特異的に導入することができるか検討した。培養上清を限外濾過によって 50 倍濃縮し、濃縮液をヒト肝癌細胞(HepG2)及びヒト扁平上皮癌細胞(A431)の培地上清にそれぞれ添加した。4 時間培養後、導入されていない粒子を除去するために洗浄し、12 時間培養した。GFP の蛍光を蛍光顕微鏡で観察することにより、細胞内への導入効率を評価した。

C. 研究結果

1) GFP 融合タンパク質中空ナノ粒子の生産

pSR α -HBsAgGFP を導入した COS7 細胞培養上清の濃縮液を 1 次抗体に抗 GFP 抗体および抗 S (HBsAg の S 領域) 抗体を用いてウエスタンブロッティングにより解析した結果を Fig.3 に示す。HBsAg タンパク質と GFP の融合タンパク質の分子量 81kDa 付近に抗 GFP 抗体および抗 S 抗体いずれを用いた場合においても明瞭なバンドが検出されたことから、HBsAg-GFP 融合タンパク質が発現していることが確認された (Fig. 3)。また、酵素免疫測定装置 IMx によりナノ粒子が形成されていることが確認できた。

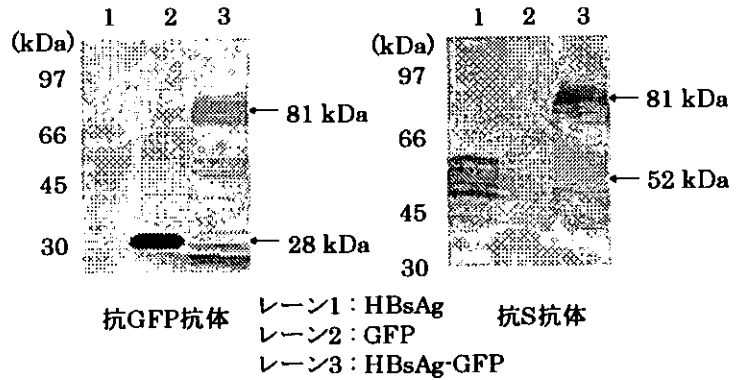


Fig.3 ウエスタンブロッティング解析

また、得られた HBsAg-GFP 融合タンパク質ナノ粒子について、プロテアーゼを用いた消化実験を行ったところ、GFP は消化されずに HBsAg の preS 領域が消化されることが明らかとなった。この結果は、GFP が粒子内部に封入された形で存在することを示している。

2) HBsAg-GFP 粒子の肝細胞特異的な導入の検討

HBsAg-GFP ナノ粒子を HepG2 および A431 の培養液に添加して、特異的な導入の可能性について検討した結果を Fig. 4 に示す。HepG2 においては HBsAg-GFP 粒子の GFP に由来する緑色蛍光が観察されたが、A431 においては全く観察されなかった。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察から、融合粒子は細胞内に取り込まれていることが示された。したがって、HBsAg-GFP ナノ

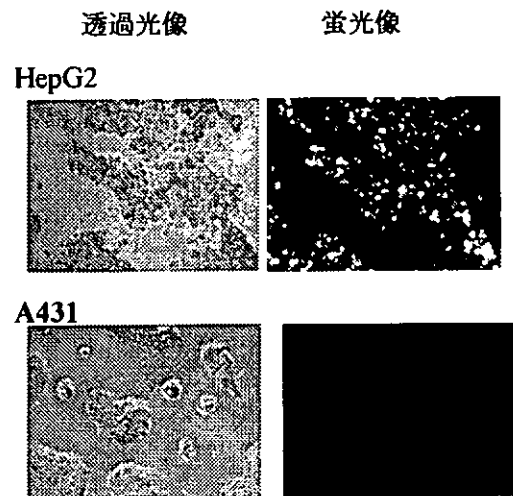


Fig. 4 HBsAg-GFP 粒子の導入実験結果

粒子を用いることによってヒト肝細胞に特異的に GFP を導入することができることが確認できた。

D. 考察

1) 達成度について

HBsAg の C 末に目的のタンパク質を融合することで、目的タンパク質を粒子内部に包含したタンパク質中空ナノ粒子が調製でき、標的の肝細胞に特異的に導入できたことから、HBsAg タンパク質ナノ粒子が外来タンパク質の DDS に有効であることの基本データが示されたと言える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

HBsAg タンパク質ナノ粒子を用いたピンポイント DDS は、日本初の技術であり、ウイルスの持つ高い特異的な感染能力と安全性を併せ持つ手法であり、学術的・国際的に見て、先進的なものである。この手法により、遺伝子やタンパク質をピンポイントで、標的臓器に導入できれば、副作用の心配がなく安全で、かつ低侵襲な治療が可能となり、その社会的な意義は極めて大きい。今回、タンパク質についても、HBsAg タンパク質の C 末側に融合して発現することで、目的の細胞に特異的に導入可能なことが明らかとなったことは、治療の幅を広げる上でも大きい一歩である。

3) 今後の展望について

次年度以降は、今年度作成した蛍光を示す融合ナノ粒子を用いて、細胞内や生体内におけるナノ粒子の動態についての詳細を明らかにしていくとともに、特異性を変換した粒子においても、標的細胞に同様にタンパク質を導入できるかを明らかにする予定である。また、様々な可視化や薬剤の結合が可能な半導体ナノ粒子や磁性ナノ粒子等によるタギングを行い、動態の可視化について更なる検討を行う予定である。

E. 結論

以上のように本研究を通じて、HBsAg からなるタンパク質ナノ粒子が、タンパク質の標的細胞特異的な DDS に有効であることが明らかとなり、今後の医療への応用の基礎を示すことができたと言える。

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) Shimojyo, R., Furukawa, H., Fukuda, H., and Kondo, A., Preparation of Yeast Strains Displaying IgG Binding Domain ZZ and Enhanced Green Fluorescent Protein for Novel Antigen Detection Systems., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(5) (2003).
- 2) Yamada, T., Iwasaki, Y., Tada, H., Iwabuki, H., Chuah, M., VandenDriessche, T., Fukuda, H., Kondo, A., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S., Nanoparticles for the Delivery of Genes and Drugs to Human Hepatocytes., *Nature Biotechnology*, 21(8), 885-890 (2003).
- 3) Lin, Y., Tsumuraya, T., Wakabayashi, T., Shiraga, S., Fujii, I., Kondo, A., and Ueda, M., Display of a Functional Hetero-oligomeric Catalytic Antibody on the Yeas Cell Surface., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 226-232 (2003).
- 4) Furukawa, H., Shimojyo, R., Ohonishi, N., Fukuda, H., and Kondo, A., Affinity Selection of Target Cells from Cell Surface Displayed Libraries : a Novel Procedure Using Thermo-Responsive Magnetic Nanoparticles., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 478-483 (2003).
- 5) 近藤昭彦, 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 上田政和, 中空バイオナノ粒子によるピンポイントドラッグデリバリーシステム, *化学工学* 67(12), 686-688 (2003)
- 6) 妹尾昌治, 黒田俊一, 近藤昭彦, 多田宏子, 谷澤克行, 上田政和, バイオナノ粒子を用いる遺伝子・薬剤のピンポイントドラッグデリバリーシステム, *バイオインダストリー* 20(4), 54-64 (2003)
- 7) 植田充美, 林影, 近藤昭彦, 藤井郁雄, 抗体酵素の新しいディスプレイ

- 法の開拓, バイオインダストリー 20(7), 15-22 (2003)
- 8) 大西徳幸, 古川裕考, 近藤昭彦, 熱応答性磁性ナノ粒子 (Therma-Max) の開発, 応用物理 72(7), 909-913 (2003)
 - 9) 近藤昭彦, 大西徳幸, 古川裕考, 磁性ナノ粒子材料の開発とバイオ領域への展開, Pharm Tech Japan 19(10), 1753-1762 (2003)
 - 10) 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 近藤昭彦, 上田政和, 中空バイオナノ粒子を用いるピンポイント DDS および遺伝子導入, ナノバイオテクノロジーの最前線, シーエムシー出版 295-303 (2003)
2. 学会発表
- 1) 村岡優, 上田政和, 妹尾昌治, 多田宏子, 谷澤克行, 黒田俊一, 福田秀樹, 近藤昭彦, 各種臓器へのピンポイント薬剤導入を目指したタンパク質中空ナノ粒子の開発, 第 68 回化学工学会年会, 2003 年 3 月 (東京)
 - 2) 村岡優, 山田忠範, 上田政和, 妹尾昌治, 谷澤克行, 黒田俊一, 福田秀樹, 近藤昭彦, タンパク質中空ナノ粒子を用いたピンポイント遺伝子導入法の開発, ナノ学会創立大会, 2003.5.30 (神戸)
 - 3) 近藤昭彦, タンパク質中空ナノ粒子を用いたピンポイントターゲッティング, シンポジウム: ナノとバイオの融合学理構築と産業基盤形成, 2003 年 10 月 (仙台)
 - 4) 村岡優, 上田政和, 妹尾昌治, 多田宏子, 谷澤克行, 黒田俊一, 福田秀樹, 近藤昭彦, 各種臓器へのピンポイント薬剤導入を目指したタンパク質中空ナノ粒子の開発, 第 55 回生物工学会大会, 2003 年 9 月 (熊本)
 - 5) 近藤昭彦, 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 上田政和, 中空バイオナノ粒子の任意の臓器へのリターゲッティング, 第 52 回高分子討論会, 2003 年 9 月 (山口)
 - 6) Tadanori Yamada, Hiroko Tada, Hidehiko Iwabuki, Akihiko Kondo, Masakazu Ueda, Masaharu Seno, Katsuyuki Tanizawa, and Shun'ichi Kuroda, Novel nanoparticle-mediated gene and drug delivery system specific to human hepatocytes, 第 76 回生化学会大会, 2003 年 10 月 (横浜)
 - 7) 山田一朗, 多田宏子, 福田隆之, 西野年昭, 黒田俊一, 谷澤克行, 近藤昭彦, 上田政和, 山田秀徳, 妹尾昌治, 変異導入による HB ウイルスエンベロープ蛋白質の C 末端領域構造の解析, 第 26 回分子生物学会 2003 年 12 月 (神戸)
 - 8) 隈元裕司, 小野総子, 福田隆之, 黒田俊一, 谷澤克行, 近藤昭彦, 上田政和, 山田秀徳, 多田宏子, 妹尾昌治, Cripto を標的するバイオナノ粒子の分子デザイン第 26 回分子生物学会 2003 年 12 月 (神戸)
 - 9) Dongwei Yu, Chie Amano, Takayuki Fukuda, Shun'ichi Kuroda, Katsuyuki Tanizawa, Akihiko Kondo, Masakazu Ueda, Hidenori Yamada, Hiroko Tada, Masaharu Seno, Design of Bio-nanoparticle, in which proteins are enclosed, 第 26 回分子生物学会 2003 年 12 月 (神戸)
 - 10) 近藤昭彦, 中空バイオナノ粒子による遺伝子・タンパク質のデリバリー, 公開シンポジウム: ナノとバイオイメージングの融合と医用への応用, 2004 年 1 月 (東京)
- H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

CdSe/ZnS コアシェル型の半導体ナノ粒子の DNA 損傷性の検討

分担研究者 太田 敏博 東京薬科大学・生命科学部・助教授

協力研究者 佐々木 有 国立八戸工業高等専門学校・教授

親水性有機化合物 (11-メルカプトウンデカン酸 : MUA) で表面被覆した CdSe/ZnS コアシェル型ナノ粒子 (QD-MUA)、およびサンプル中に混在する MUA の DNA 損傷性の有無について、ヒトのリンパ腫由来の WTK1 細胞を用いたコメットアッセイで調べた。WTK1 細胞を 2 種の QD-MUA (粗精製品、限外濾過精製品)、および MUA で 2、12、24 時間処理した後、常法にしたがってアガロースゲルに包埋したスライド標本を作成し、細胞を低温でアルカリ溶解後、アルカリ条件下 (pH13、0°C) で DNA unwinding と電気泳動を行った。1 本鎖 DNA 切断によって核から流れ出す DNA 断片を、エチジウムブロマイドで染色して DNA 移動距離 (tail length) を 50 個の核について測定した。QD-MUA は 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の用量で WTK1 細胞に DNA 損傷を誘発したが、その作用は精製品の方が弱かった。MUA は 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の用量で強い DNA 損傷性を示した。以上の結果から、QD-MUA の DNA 損傷性の原因が親水性加工に用いた MUA に起因していることが推定され、親水化加工に用いる物質の選択が重要であることが示唆された。

また、5 mg/ml QD-MUA (粗精製品) 0.5 ml をマウスに強制経口投与、および腹腔内投与 (90 mg/kg BW) したが、投与後 2 週間において毒性兆候となる臨床症状は認められなかった。

A. 研究目的

新素材として開発されたセレン化カドミウムの半導体ナノ粒子(QD)は UV を照射すると、その粒径に応じて可視光領域で発光波長が変化する特徴を有する。この QD は極めて耐光性が高く長時間露光によっても劣化しないため、蛍光標識試薬として用いられる有機色素に比べて、遙かに長時間の蛍光観察が可能である。この性質を利用して、蛍光標識物質として生体への応用が研究されている。一方で、QD は水に不溶であるため、11-mercaptoundecanoic acid (MUA) などを用いて表面被覆することで親水加工し、水に分散可能にしている。

これらの新規化合物は構成成分にカドミウムやセレンなどの有毒元素を含んでいるため、細胞や生体に対する毒性については十分に調べておく必要がある。しかし、これまで QD に関する安全性については全く調べられていない。本研究では、ヒト培養細胞を用いて親水加工したナノ粒子 (QD-MUA) およびこのサンプル中に混在

物として存在する可能性のある物質の DNA 損傷性の有無について、コメットアッセイで調べることを目的とした。昨年度の研究により、QD-MUA とこれを合成する際の原料中に大量に存在する Trioctylphosphine oxide (TOPO) について調べ、そのいずれにも DNA 損傷性が認められることを示した。今年度は MUA について調べ、さらに QD-MUA の精製を行うことによる影響の有無について検討した。

B. 研究方法

2 種の QD-MUA (粗精製品、限外濾過精製品) を用いた。5-10 mg/ml の濃度で滅菌水に懸濁し、15,000 g で 15 分間遠心して上清を回収した。これを 0.1 μm のメンブレンフィルターに通したものを QD-MUA (粗精製品) とした。粗精製品には TOPO, MUA, ZnS などの低分子物質が相当量混在しているため、Sephadex G-25 カラムによるゲル濾過、さらに Microcon YM-10 を用いた限外濾過を行って低分子物質を除去した。得られ