

C. 研究結果

各計測パラメータの精度・妥当性については昨年報告したので割愛する。脳組織における酸素代謝を時系列的に評価するために、ラット脳微小循環を対象とした出血性ショックモデルにおける血流・酸素分圧の変化と、NADH 蛍光輝度を同一プロトコールにおいて実験した。図 4 に急性出血性ショックおよび返血蘇生時の脳表微小循環動態と NADH の変化を示した。計測開始 5 分後から 1 分間で血圧が 40 mmHg に低下するまで脱血を行い、その 5 分後から返血蘇生を行った。脳血流の低下は血圧とほぼ同様に低下し、全脳虚血に従って NADH 蛍光輝度が血圧の変化に対してやや緩やかに変化し、NADH 蛍光の計測から虚血の指標を得ることが可能であることが示された。

Figure 7(a)は動脈血圧，細静脈血流速度，細静脈酸素分圧の典型的な時間変化を示している。細静脈血流動態および酸素分圧の変化は平均動脈血圧(MAP)の変化に呼応していた。また、(b)は脱血前ベースライン，ショック中，自己血液輸血蘇生後 10 分間の各パラメータの平均値を示している。MAP の変化は 117.3 ± 9.2 , 38.2 ± 1.4 , 119.3 ± 11.9 ，同様に細静脈血流速度は脱血前からの相対比でショック中，蘇生後それぞれ 0.43 ± 0.04 , 1.10 ± 0.12 ，また，細静脈酸素分圧の値は 41.9 ± 5.8 , 24.0 ± 9.0 , 40.0 ± 7.2 であった。同様にして，NADH 蛍光輝度の上昇は脱血前からの相対変化で 1.14 ± 0.09 , 0.98 ± 0.05 であった。全てのパラメータにおいて，脱血による変化は輸血によりベースラインまで回復する様子が観察された。

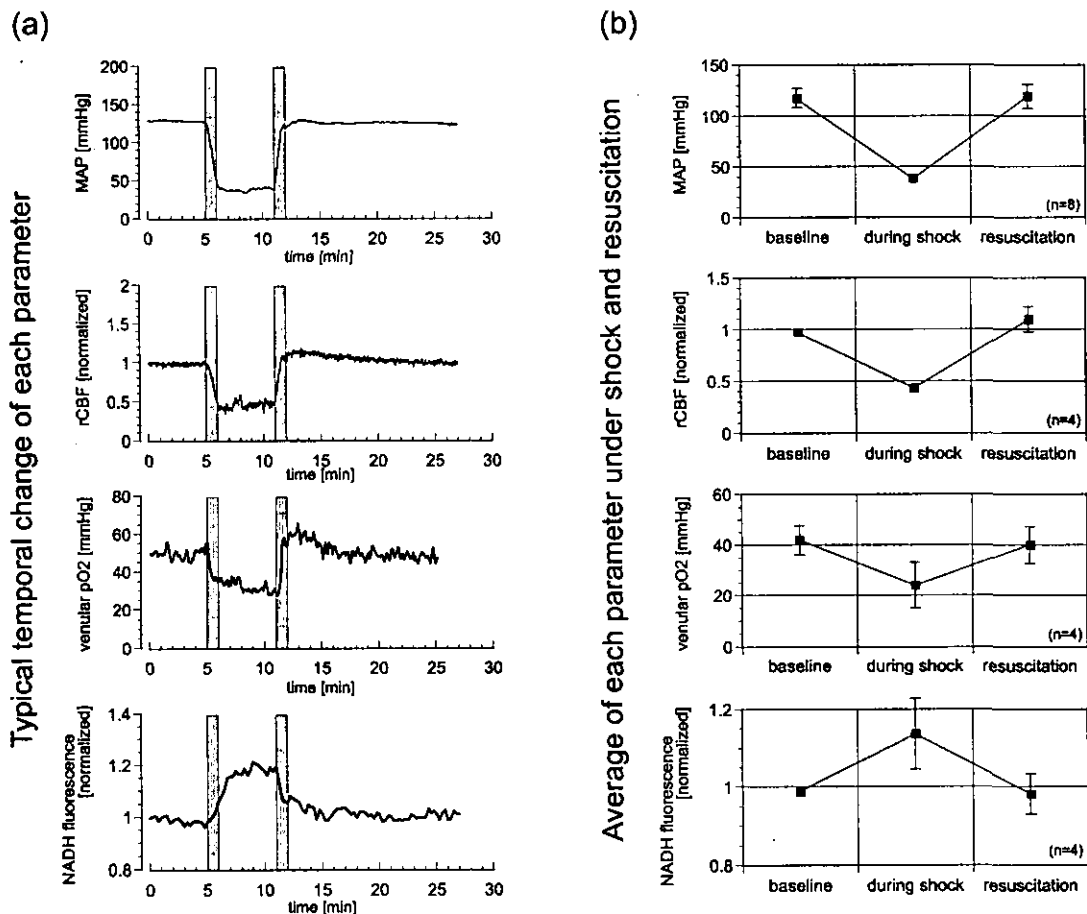


図 4 急性出血性ショックモデルにおける血圧,局所脳血流,細静脈酸素分圧,NADH 蛍光の計測 (a)は典型例, (b)は各パラメータの平均値を示す

D. 考察

微小循環はエネルギーを得るための酸素やその他栄養物の運搬を行い、生命現象の恒常性維持に非常に重要な役割を担っている。従って微小循環における血流障害は直接組織への酸素供給に影響を及ぼすことになる。脳循環代謝の研究分野においては、臨床や実験レベルで脳血管疾患に関するマクロ的情報は fMRI や SPECT を利用することで得られるが、マイクロ・ナノスケールの微小循環レベルの血流動態や酸素代謝の計測は方法論の欠如のため不可能である。本研究ではラット大脳皮質における脳微小循環調節機構の解析のために脳微小循環動態と微小血管内酸素濃度の同時計測が可能な方法を提案し、脳局所酸素代謝計測の定量評価を可能にした。また、血流・酸素分圧の微小循環パラメータに加えて脳細胞内ミトコンドリアの NADH 蛍光から虚血の指標を得る検討を加えた。血流・酸素分圧は微小血管内の情報であり、即ち酸素を供給する側の情報であるが、それに対し、虚血の指標とした NADH 蛍光は脳細胞内のミトコンドリアから発せられたものであり、酸素受給側の酸素代謝レベルを表すものと位置付けられる。以上のように微小循環レベルで酸素代謝を議論するためには酸素供給元である微小循環血流・酸素濃度を定量化し、その一方で酸素を受給・消費する組織の代謝状態の双方を定量解析できる点が本研究の大きな特徴であると考えられる。

E. 結論

本研究を総すると、脳皮質における酸素代謝を定量的に解析するためにポルフィリン色素の光化学反応を利用した非接触かつ連続的な酸素分圧計測法の生体計測への応用を提案し、その基礎的実験を行うと共に生体計測を実施することで有効性を検討した。またラットの脱血による虚血実験を行い、計測系の有効性を明

らかにした。今回施行した出血ショック・返血蘇生実験の他、臓器虚血・再灌流実験による虚血再灌流障害の検討への応用、また各病態モデル実験への応用が可能である。本年度は昨年度における局所酸素代謝を評価するための要素技術を落射蛍光顕微鏡を中心にシステム化することに重点を置いた。本システムは脳だけでなく腎、肝など実質臓器微小循環の血流ダイナミクスと、それによる酸素供給能の定量化に有効であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1 論文発表

- 1) Tsukada K., Sekizuka E., Oshio C., Tsujioka K., Minamitani H.: Red blood cell velocity and oxygen tension measurement in cerebral microvessels by double-wavelength photoexcitation, *Journal of Applied Physiology*, in press.
- 2) Tsukada K., Sakai S., Hase K. and Minamitani H.: Development of catheter-type optical oxygen sensor and applications to bioinstrumentation, *Biosensors and Bioelectronics*, 18(12), pp 1439-1445, 2003.
- 3) Minamitani H., Tsukada K., Sekizuka E. and Oshio C.: Imaging and functional analysis of blood flow in organic microcirculation, *Journal of Pharmacological Science*, 93(3), pp.227-33, 2003.
- 4) 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, vol. 15(4), pp. 196-197, 2003

G-2 学会発表

- 1) 塚田孝祐, 畑野瑞恵, 山根正信, 辻岡克彦: 出血性ショック時の脳微小循環動態と酸素代謝の光学的連続非侵襲評価法, 第 80 回日本生理学会大会, 2003-3 (福岡)
- 2) 塚田孝祐, 畑野瑞恵, 山根正信, 南谷晴之, 辻岡克彦: 脳虚血における微小循環血流と酸素代謝の非接触連続計測法, 第 42 回日本エム・イー学会大会, 2003-6 (札幌)
- 3) 南谷晴之, 長谷憲多朗, 塚田孝祐: 血中酸素分圧の長期連続測定用生体適合型オプトードセンサ, 第 42 回日本エム・イー学会大会, 2003-6 (札幌)
- 4) 南谷晴之, 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩 力: 臓器血流と酸素代謝の光・イメージング解析, 公開シンポジウム「ナノとバイオの融合 学理構築, 産業基盤形成」, 2003-9 (仙台)
- 5) Arai T., Tsukada K., Sekizuka E., Oshio C., Terao S., Hase K., Minamitani H., Effect of hemodilution on oxygen supply to brain cortical arterioles, *25th Annual International conference of the EMBS and Annual Fall Meeting of the BMES*, 2003-10, (Cancun)
- 6) 塚田孝祐, 南谷晴之, 辻岡克彦: 脳皮質酸素代謝の可視化解析, 一軟膜微小循環血流と局所酸素分圧および NADH 蛍光計測からの検討一, 第 18 回生体・生理工学シンポジウム, 2003-10 (新潟)
- 7) 塚田孝祐, 南谷晴之, 辻岡克彦: 蛍光と燐光を利用した脳微小循環血流と酸素代謝の可視化解析, 第 17 回日本エム・イー学会秋季大会専門別研究会, 2003-10 (京都)
- 8) 塚田孝祐, 辻岡克彦: 脳皮質 NADH 蛍光と微小循環血流計測による局所酸素代謝の定量化, 第 15 回日本脳循環代謝学会総会, 2003-10 (大阪)
- 9) 塚田孝祐, 関塚永一, 大塩 力, 南谷晴之, 辻岡克彦: 軟膜微小循環血流と局所酸素分圧および NADH 蛍光計測による脳皮質酸素代謝の可視化解析, 第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会, 2003-10 (横浜)
- 10) 高橋知大, 脇 琢磨, 塚田孝祐, 辻岡克彦: リン光寿命を利用した大脳皮質酸素分圧計測のための基礎的検討, 第 26 回日本 M E 学会中国四国支部大会, 2003-11 (高松)
- 11) 塚田孝祐, 辻岡克彦: 脳虚血における微小循環解析と組織酸素代謝イメージング, 第 44 回日本脈管学会総会, 2003-11 (福岡)
- 12) 塚田孝祐: 人工赤血球の輸血に伴う脳循環調節系への影響, 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展開 ー安全な医薬・治療法へのアプローチ」, 2004-01 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

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 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

研究要旨：ミクログリアは脳に存在するマクロファージ様の細胞で高い貪食能を持つため蛍光マイクロビーズなどの人工物を効率良く取り込み細胞の標識ができる。我々はこのミクログリアと骨髄前駆細胞のごく一部の細胞が血液中から脳に特異的に侵入することを見出した。脳は血液脳関門が存在するため末梢からの投与では脳に特異的に導入することができないが、この性質を利用すると脳に特異的に遺伝子や薬物を運ぶドラッグデリバリーシステムに基づいた新しい治療法や診断法、さらには予防法を確立することができると考えられる。今回、脳・神経系に特定の細胞の浸潤を可視化するために微小循環解析システムを作出して、血管注入した外来性ミクログリアの動態を単細胞として経眼球下に観察を行ったところ、血流中のミクログリア細胞が遊走する様子が観察できた。今回の観察ではミクログリアが神経組織に遊走する様子は観察できなかったが、いろいろな病態モデルを作成することにより観察できると考えている。また、今回のシステムと MRI による非侵襲モニタリングを組み合わせることにより、ミクログリアを用いた脳・神経系を標的化した DDS の精度や有効性を改善できる可能性がある。さらに、ミクログリアの網膜での細胞浸潤と脳での動態の相関性を明らかできれば、治療応用時に有用であると考えられる。

A. 研究目的

ミクログリアは脳に存在する貪食能の高いマクロファージ様の細胞で、人工物を効率良く取り込むため細胞の標識ができる。我々はこのミクログリアと一部の骨髄前駆細胞が血中から脳に特異的に侵入することを見出した。脳は血液脳関門が存在するため末梢から投与した物質は脳に導入することが難しいが、これらの細胞の性質を利用すると脳に特異的に遺伝子や薬物を運ぶこ

とができるため、新しいドラッグデリバリーシステム（DDS）として応用できる。また、脳に特異的な治療法や診断法、予防法を確立することができると考えられる。

そこで、本研究は脳・神経系に特定の細胞の浸潤を可視化するために血管注入した外来性ミクログリアの動態を単細胞として経眼球下に観察を行い、微小循環解析システムを確立することをめざして行った。

B. 研究方法

- (1) 細胞の調整と注入：マウスのミクログリアの株化細胞である Ra2 を使用した。ミクログリア細胞 (Ra2) をプラスチックシャーレに接着させた状態で食色細胞染色液で調整した蛍光色素 PKH67 を 10% 血清を含む培地に 1 : 1 で混合して 37°C で 30 分染色したのち回収し、 2×10^6 cells を、マウスの腋下動脈より注入した。
- (2) 微小循環解析装置の作製：ペントバルビツール麻酔下でマウスの腋下動脈にプラスチックチューブを挿入した後、脳定位固定装置を使用してマウス頭部を固定した。眼組織の血管を観察することから、脳定位固定を約 45 度傾斜させてレンズに眼組織が水平になるように設置した。腋下動脈に挿入したプラスチックチューブよりミクログリア細胞を注入してから直後より細胞の動態を観察した。今回、眼組織を観察する際、脳定位固定装置を使用することから、顕微鏡はオリンパス社製の落斜型ステージ固定式正立顕微鏡 (BX51W1)、レンズは高開口数水浸対物レンズ (XLUMPLF20xW / N.A. = 0.95) を用いた。(図 1)

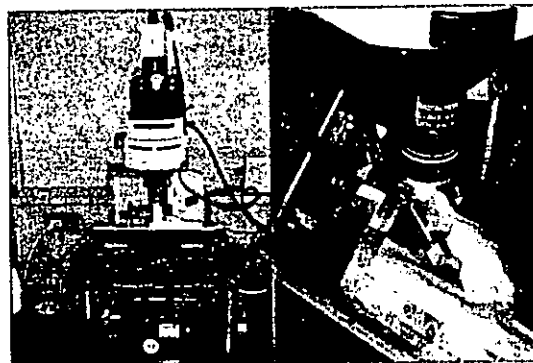


図 1 経眼下における顕微鏡システム

- (3) 細胞動態の観察：血流の可視化には FITC-dextran (0.01mg/0.1ml) を用い、マウスの眼球における毛細血管の血流を同定・観察した。観察される血流動態は顕微鏡に接続した CCD カメラ (SONY, DXC-S500/6L) で撮影し、デジタルビデオ (SONY, Mini DV, GV-D300 NTSC) に録画した。

C. 研究成果

脳定位固定装置にマウスを固定し、顕微鏡下で眼組織の毛細血管を観察するためには、従来の顕微鏡ではなく独立したステージを設置した顕微鏡を用いることにより可能となった。さらに、レンズも高開口数を持つ水浸型のレンズを用いることで画像を取得できた。これらのシステムを用いることによって血管内を遊走するミクログリア細胞の動態を網膜動脈より観察できた (図 2)。

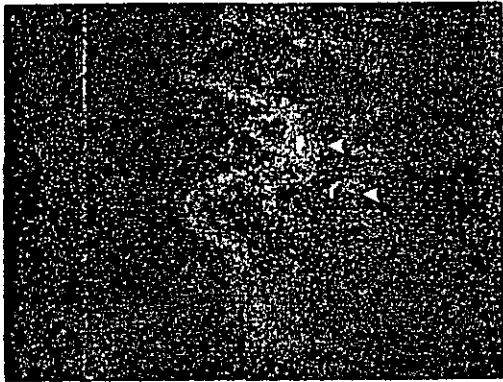


図2 蛍光色素で標識したミクログリアを動脈に注入すると血管内を遊走する蛍光標識細胞が観察できる

D. 考察

今回新たに組み立てた顕微鏡システムを用いることにより、血流中のミクログリア細胞が遊走の様子が観察できた。今回の観察ではミクログリアが神経組織に遊走する様子は観察できなかったが、いろいろな病態モデルを作成することにより観察できると考えている。

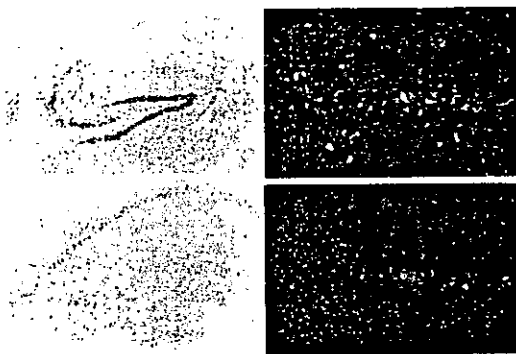


図3 外来性ミクログリアは虚血による神経細胞層に集積する。
 (左上) 虚血脳での海馬領域の Nissel 染色
 (左下) 同領域の TUNEL 染色
 (右上) サイモシン抗体による活性化ミクログリアの免疫染色

(右下) 同領域に集積した PKH 陽性外来性ミクログリア

ミクログリアはその細胞の性質から脳内で神経変性や細胞障害がある部位に集積して活性化されることが知られており、我々は蛍光標識をしたミクログリアを血管注入した動物に一過性前脳虚血を起こして脳内に侵入したミクログリアの動態を調べたところ、外来性に脳に浸潤したミクログリアは特異的に神経傷害部位に集積することを確認している (図3)。

一方、ミクログリアは高い貪食機能を持つため蛍光マイクロビーズなどの人工物を効率良く取り込み細胞の標識ができる (図4)。

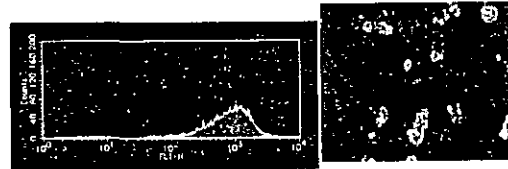


図4 ミクログリアの貪食機能
 (左) 蛍光ビーズを取り込ませた場合の蛍光強度の測定
 (右) 蛍光ビーズを取り込ませたミクログリアの形態

そこで、脳に導入する前に金属微粒子マグネタイトを取り込ませたミクログリアをラットの頸動脈に注入すると、MRI の陰影画像として細胞の浸潤をモニタリングすることに成功している。今回のシステムと MRI による非侵襲モニタリングを組み合わせることによってミクログリアを用いた脳・神経系を標的化したドラッグデリバリシステム (DDS) の精度や有効性を改善できる可能

性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Ono K, Yoshihara K, Suzuki H, Tanaka K, Onozaki K and Sawada M. Preservation of Hematopoietic Properties in Transplanted Bone Marrow Cells in the Brain. *J Neurosci Res.* 74(4): 503 – 507 , 2003
2. Imai F, Sawada M and Suzuki H. The Application of Cell Therapy using Microglia for Brain and CNS. *Nou 21.* Vol. 6 (3): 26 – 30, 2003

G-2 学会発表

1. 鈴木弘美、澤田 誠: ミクログリアの脳特異的侵入と障害神経細胞への遊走と保護作用, 第 11 回バイオイメージング学会学術集会・横浜・2003
2. 澤田 誠、鈴木弘美: Monitoring of Brain-Specific Migration and Repair by Microglia., The 5th Osteopontin Meeting Dysfunction of Host Defence Workshop・札幌・2003
3. 鈴木弘美: マイクログリアを利用した脳疾患の治療の試み, バイオベンチャ

ー・ハイテクフロンティア合同セミナー・名古屋・2003

4. 鈴木弘美、澤田 誠

脳・神経系に特異的な細胞浸潤のイメージング, 第 12 回バイオイメージング学会学術集会・横浜・2003

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特になし。

血管炎発症機構の *in vivo* イメージング —MPO-ANCA の関与—

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：血管炎や腎炎の発症初期の機構を解析するためには、*in vitro*での解析に加え、*in vivo*での解析が必須である。そこで、本研究では、*In-vivo Imaging (IVI)*を開発して血管炎や腎炎の発症初期の病態を解析した。血管炎や腎炎の発症初期には、臨床研究からMPO-ANCA (Myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody)と活性化好中球が関与していることが明らかになってきている。そこで、抗マウスMPO抗体をマウスに*i.v.*投与して血管障害についてIVIにより調べた。傷害のマーカープローブとして蛍光標識されたデキストランを用い、その漏出を*in-vivo imaging*により解析した。その結果、抗マウスMPO抗体の投与により、腎血管の傷害が進行し、近尿細管からデキストランが流出した。この現象は、別途行った*in vitro*での糸球体由来の血管内皮細胞に抗マウスMPO抗体を投与した際に観察されたadhesion moleculesの発現増加に呼応していると思われる。

A. 研究目的

血管炎の発症要因に好中球機能不全が関与していることが示唆されている。そこで、これまで、われわれは、血管炎の発症要因となっている好中球殺菌酵素が自己抗体の産生に関与することを報告してきた (Inflammation 25:381,2001)。また、好中球殺菌酵素の不全によって産生される好中球自己抗体ANCAが、好中球を活性化し、血管炎の発症に関わっていると推定される。

血管炎発症機構については、これまで病理学的解析あるいは、*in vitro*での細胞機能や

サイトカインの解析が中心に行われてきた。

そこで、本研究では、腎炎モデルマウスを作製して、イメージング観察する系 (*in vivo* イメージング) を確立するとともに、血管内皮細胞の機能を解析することにより、血管炎発症機構を検討した。

特に、血管炎の発症要因に関連し病態マーカーとして臨床検査として現在広く利用されている好中球自己抗体MPO-ANCAが関与していることを明らかにされてきている。しかし、血管炎や腎炎の発症初期でのMPO-ANCAの関与には*in vitro*での解析に

加え、*in vitro*での解析が必須である。

一方、血管炎の病態と MPO-ANCA との関連については、臨床研究に加えて、モデルマウスにおいても明らかにされてきている。それは、血管炎を示す腎炎の病態を示す良いモデルである SCG/Kj マウスやカンジダ由来分子誘導の冠状動脈炎マウスなど種々のモデルマウスが有用である。これらのマウスを用いて、血清学的、病理学的に解析による病態解析をすでに報告した (Okawara et al, NDT 2004, in press)。しかし、これらマウスでの解析には病理学的な評価法が主であり、実際の傷害機構の解析は不十分であった。

そこで、本年度の研究では、病態を検討した腎炎モデルマウスを用いて、血管炎や腎炎の発症初期の機構を、*in vitro*での解析に加え、*In-vivo Imaging* (IVI)を開発して病態の発症機構を解析した。これにより、腎機能障害による血液成分の漏出を *Imaging* 解析した。また、あわせて、糸球体の *primary culture* による血管内皮細胞の傷害を *in vitro*で解析した。

B. 研究方法

- 1) **In vivo イメージング**: C57BL/6 マウス(オス、9 週齢)に anti-mMPO を投与した、腎臓からの分子の漏出を *In vivo* イメージングにより観察した。
血 流 の 可 視 化 に は

Rhodamin-Dextran を用い、各マウス尿細管周囲毛細血管の血流および近尿細管からの分子の移動を観察した。観察される血流および近尿細管からの分子の移動の動態は顕微鏡に接続したビデオカメラで撮影し、DVD に録画した。必要に応じて CAWS (150 mg/mouse)を iv 投与し、その 3 時間後に anti-mMPO (1 mg/mouse)を iv 投与した。

- 2) **マウス糸球体からの血管内皮細胞の分離と primary culture**: マウスの糸球体から血管内皮細胞を分離し、*primary cell culture* を施行した。必要に応じて、*adhesion molecule* の発現を RT-PCR および *real time PCR* により解析した。
- 3) **血管炎モデルマウスの調整**: 本疾患モデルは、川崎病リスクの冠状動脈炎発症モデルとして作られ、罹患児糞便から分離した *C. albicans* 由来物質 (CAWS) を投与して誘導した。

C. 研究結果

血管炎や腎炎での MPO-ANCA の役割を明らかにするために、血管炎モデルマウスを開発し、MPO-ANCA に関連した発症機構を *In-vivo Imaging* により検討し、血管傷害初期の MPO-ANCA と好中球の関与

について検討した。

1) 血管傷害による近尿細管への血液成分の流出:

MPO-ANCA によって血管傷害が引き起こされ、腎炎が誘発された。その初期機構を *in-vivo* イメージングにより解析した。

蛍光標識した分子で、通常血管外には漏れ出さないものを投与して血管傷害に引き続き誘発される腎炎の障害を近尿細管への漏出で検出した。anti-mouse MPO の投与によって、RITC-dextran が近尿細管に流出することが観察された (図1)。

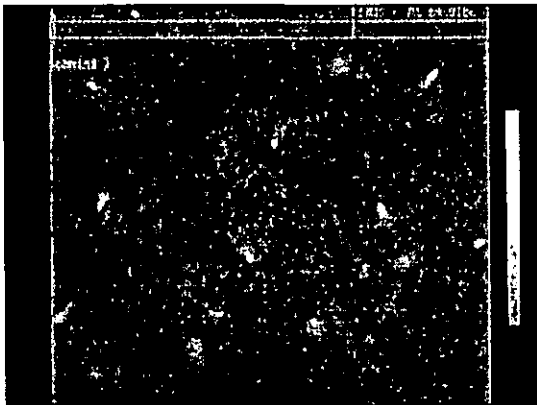


図1. 近尿細管へのデキストラン分子の流出

Rhodamine B isothiocyanate (RITC)-conjugated Dextran (RITC-dextran: mol wt 73,000)

コントロールとして用いた MPO 抗体を含まない IgG の投与では、観察されなかった。*in vivo* イメージングの解析により、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流も観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着についても観察された。

一方、マウス糸球体からの血管内皮細胞を分離し、*primary culture* により血管内皮細胞の機能を *in vitro* で解析した。anti-mouse MPO の投与によって、インテグリン、セレクチンなどの *adhesion molecules* の発現が増加した。しかし、コントロールとして用いた MPO 抗体を含まない IgG の投与では、変化は見られなかった。

D. 考察

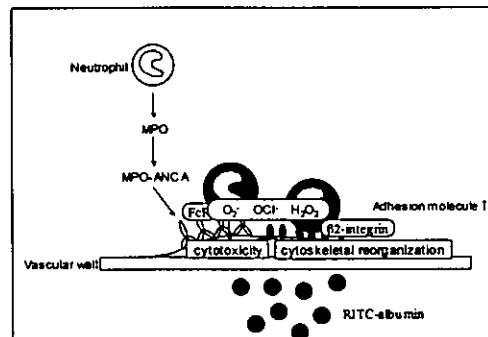
血管炎モデルマウスおよび臨床研究の結果から、MPO および MPO-ANCA 産生が血管炎の発症誘導に不可欠であること、また、炎症性サイトカインが血管炎の発症に連動し、特に、TNF- α , IL-6, IL-10 が重要であることが明らかになってきている。このことは、これらサイトカインに連動した MPO と MPO-ANCA がこれらサイトカイ

ンと連動してこの発症の原因になっていることが強く示唆されている。さらに、これらサイトカインおよびMPO-ANCAは好中球を活性化する際にも重要な役割を担っているものと考えられている(NDT, in press)。

以上のように、*in vitro*での解析に加え、本年度の*in-vivo imaging*の研究により、MPO-ANCAが好中球と連動あるいは直接に血管傷害を引き起こし、腎機能障害をおこしていることを明らかにした。

2) 糸球体血管内皮細胞の傷害と関連する adhesion molecules の発現 :

一方、マウス糸球体の血管内皮細胞の primary culture による血管内皮細胞の傷害を *in vitro* で解析した結果、コントロールのMPO抗体を含まないIgGの投与では、その発現の変化が認められないインテグリン、セレクトリンなどの adhesion molecules が、anti-mouse MPOの投与によって、その発現が増加した。この現象は、好中球を介し、あるいは直接、血管内皮細胞にMPO抗体が作用していることが考えられる。以上のことから、図2のSchemeに示すようにMPO-ANCAが好中球を活性化し、なおかつ直接糸球体の血管内皮細胞に作用して adhesion molecules を発現させ、再度好中球を活性化している可能性がある。



これらのことから、次年度以降、MPO-ANCAによる好中球の活性化と血管内皮細胞との関係について*in vivo imaging*と*in vitro*での adhesion molecules の発現について検討する必要性がある。

E. 結論

血管炎や腎炎でのMPO-ANCAの役割を明らかにするために、血管炎モデルマウスを開発し、MPO-ANCAに関連した発症機構をIn-vivo Imagingにより検討し、血管傷害初期のMPO-ANCAと好中球の関与について検討した。

anti-mouse MPOの投与によって、RITC-dextranが近尿細管に流出することが観察された。また、*in vivo*イメージングの解析により、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着についても観察された。

一方、マウス糸球体から血管内皮細胞を分離し、primary cultureにより血管内皮細胞

胞を得、その機能を *in vitro* で解析した。
インテグリン、セレクトリンなどの adhesion molecules が anti-mouse MPO の投与によって発現が増加した。

今後は、MPO-ANCA による好中球の活性化と血管内皮細胞との関係について *in vivo imaging* と *in vitro* での adhesion molecules の発現について検討する必要がある。さらに、血管炎誘導のごく初期の血管傷害における好中球活性化についても *in vivo imaging* により明らかにする。

尚、本研究は、国立感染症研究所・長尾朋和博士の協力により行われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(1) 誌上発表

1. Akiko Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, Eri Muso, Takahiko Ono, Kan Saiga, Kyuichi Nemoto, Kazuo Suzuki. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrology, Dialysis and Transplantation*, 2004 in press
2. Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K., Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochem. Biophys.*

Res. Comm. 314: 46-53, 2004.

3. Ohashi, Y.Y., Kameoka, Y., Persad, A.S., Kohi, F., Yamagoe, S., Hashimoto, K., and Suzuki, K. Novel missense mutation found in Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene* in press.
4. Ichimori, K., Fukuyama, N., Nakazawa, H., Aratani, Y., Koyama, H., Takizawa, S., Kameoka, Y., Ishida-Okawara, A., Kohi, F., and Suzuki, K. Myeloperoxidase has directly opposed effects on nitration reaction Study on myeloperoxidase deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radical Research* 37: 481-489, 2003.
5. Murata, K., Inami, M., Kubo, S., Kimura, M., Yamashita, M., Hosokawa, H., Nagao, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S.F., H., Nakayama, T. CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type-II collagen antibodies. *Int. Immunol.* 15: 987-992, 2003.
6. Nunoi, H., Kohi, F., Kajiwara, H.,

- Suzuki, K. Prevalence of Inherited Myeloperoxidase Deficiency in Japan. *Microbiol Immunol.* 47: 527-531, 2003.
7. Sakamoto, M., Hasegawa, A., Sugaya K., Hashimoto, K., Kimura, M., Yamashita, M., Suzuki, K., Nakayama, T. Distinct calcium response induced by T-cell antigen receptor stimulation in thymocytes and mature T cells. *Bioimages* 11: 1-8, 2003.
 8. Suzuki, K. Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis *Internal Med.* 42: 552-553, 2003.
 9. Kamei, K., Sano, A, Kikuchi, K., Makimura, K., Niimi, K., Suzuki, K., Uehara, Y., Okabe N., Nishimura, K., Miyaji, M. The trend of imported myucoses in Japan. *J. Infect. Chemother.* 9: 16-20, 2003.
 10. Mie Ito, Oda, 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.* 27: 272-278, 2003.
 11. 鈴木和男 血管炎をめぐる世界の動き 「医学のあゆみ」 206:123-126, 2003
 12. 鈴木和男 血管炎発症機構の解析研究—活性化好中球の関与「医学のあゆみ」 206:133-139, 2003
 13. 鈴木和男 ANCA 関連血管炎の発症機序—活性化好中球の関与—リウマチ科 29:228-236, 2003.
 14. 大川原明子、鈴木和男、猪原登志子、小野孝彦、武曾恵理、雑賀 寛、根本 久一：半月体形成性腎炎モデルとしての SCG/Kj マウスの好中球機能 *Pharma Medica* 21: 157-161, 2003.
- (2)学会発表
1. Kazuo Suzuki Seminar in the Department of Biochemistry, Cornell University, Medical School (New York City, USA). "Role of activated neutrophils in vasculitis development: in-vivo imaging", June 6, 2003, New York City, USA.
 2. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M. C., Maeda, N., and Koyama, H. "Critical role of myeloperoxidase and nicotineamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of

- mice with *Candida albicans*." Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
3. Kazuo Suzuki "Role of activated neutrophils in vasculitis development". Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
 4. Nagao, T., Koshio, O., Mabuchi, A., Ohno, N., Takahashi, K., Minamitani, H., Suzuki, K. "Imaging of renal microvascular injury induced by immune abnormality" Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
 5. Koshio, O, Nagao, T., Ishida-Okawara, A., Mabuchi, A., Suzuki, K. "The contribution of PMN and the degranulated substances to the activation of p38 MAPK and Caspase 8 in the introduction of Apoptosis of human Endothelial cell" Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
 6. Kazuo Suzuki Seminar in Marine Biological Laboratories. "Role of activated neutrophils in vasculitis development: in-vivo imaging" USA, June 13, 2003, Woods Hole.
 7. 猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、北徹、鈴木和男、武曾恵理「ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討」第 46 回日本腎臓病学会学術総会、2003 年 5 月 23 日、東京
 8. Kazuo Suzuki International Symposium Sponsored by Center of Excellence for Advanced Life Science on the Base of Bioscience and Nanotechnology, Sapporo (北海道大学 21 世紀 COE プログラム - バイオとナノを融合する新生命科学拠点 - ナノ・イメージングによって切り開く新たなバイオ医療 "In-vivo Imaging of Vasculitis"、2003 年 7 月 19 日、札幌
 9. Manger, B., Suzuki, K. 5th International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium, "Chair Talk: The Use of IVIG in Collagen Vascular Diseases, Vasculitis and Atherosclerosis", September 25-27, 2003, Interlaken, Switzerland
 10. Ito-Ihara, T., Suzuki, K., Ono, T., Nogaki, F., Suyama, K., Kita, T., Muso, E. 5th International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium. "Beneficial effect of intravenous immunoglobulin for patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated rapidly progressive glomerulonephritis", September 25-27, 2003, Interlaken, Switzerland
 11. 鈴木和男「血管炎の研究がめざす新たな展開：特に ANCA 関連血管炎」第 5 回オ

- ステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
12. 高橋啓、大原関利章、鈴木和男、直江史郎「マウス系統的血管炎誘発モデルにおける動脈病変の免疫組織学的検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 13. 武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、北徹、鈴木和男「ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 14. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、大野尚仁「真菌多糖の *in vitro* における IFN- γ 産生増強作用の検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 15. 長谷川明洋、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲「関節炎および血管炎の発症における CD69 分子の役割」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 16. 越尾修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「血管炎への好中球の関与と炎症性サイトカインによるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 17. 鈴木和男「レビュートーク：血管炎に關与するインターフェロン γ 」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
 18. 三浦典子、新郷裕子、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大川原明子、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 由来可溶性菌体外多糖 CAWS の血管炎誘発活性」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
 19. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、栗原和記、Keiko Ozato、鈴木和男、大野尚仁第「真菌多糖の樹状細胞分化の調節におよぼす影響—IRF-8 欠損マウスの解析から—」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
 20. 越尾修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「血管炎に關与する TNF α および IL-1 β によるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
 21. 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山

- 研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦「血管炎発症における活性化好中球の関与」第14回日本生体防御学会、2003年7月31日～8月2日、京都
22. 鈴木和男、松岡俊行、栗原和記、佐々木健夫、Keiko Ozato「血管炎に關与する異常好中球：IRF-8 ノックアウトマウスによる解析」第14回日本生体防御学会、2003年7月31日～8月2日、京都
23. 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦「血管炎発症における活性化好中球の関与」第14回日本生体防御学会、2003年7月31日～8月2日、京都
24. 鈴木和男、南谷晴之、山本健二、眞島利和「日本バイオイメージング学会と化学工学会の連携による『ナノとバイオの融合学理構築、産業基盤形成』シンポジウム—公開シンポジウム「ナノとバイオの融合 学理構築、産業基盤形成」開催から学ぶ—」、2003年9月10日～11日、松島
25. 鈴木和男、長尾朋和、長谷川明洋、中山俊憲、大野尚仁、三浦典子、越尾 修、馬淵綾子、南谷晴之「新しいイメージング技術へ向けて—IVI 技術 (in-vivo imaging)—」2003年9月10日～11日、松島
26. 大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、小野孝彦、雑賀寛、根本久一、鈴木和男「糸球体腎炎の発症、進行における好中球活性化の役割— SCG/Kj マウスを用いた解析 —」第15回腎とフリーラジカル研究会、2003年9月20日、東京
27. Mabuchi, A., Nagao, T., Koshio, O., Suzuki, K., and Wheatley, A.M. "Induction of F4/80^{high+} Mac-1^{high+} nonparenchymal adherent liver cell suppressor function in T cell-mediated murine hepatic injury: involvement of nitric oxide?" American Association of Liver Diseases in 2003, October 24-28, 2003, Boston, USA..
28. 鈴木和男、長尾朋和、越尾 修、馬淵綾子、大野尚仁、高橋 啓、南谷晴之、直江史郎「In-vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析」第8回血管炎研究会、2003年10月18日、秋田
29. 三浦典子、三川浩輝、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWS の DBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
30. 長谷川明洋、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲「関節炎の発症における CD69 分子の役割」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
31. 川上真紀子、鈴木和男、F. Vilhardt, K-H Krause, 澤田誠「脳内細胞ミクログリアのMPO産生」第9回MPO研究会、2003

- 年 10 月 24 日—25 日、八王子
32. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、小山秀機 「ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのクリプトコッカス感染防御能の解析」第 9 回 MPO 研究会、2003 年 10 月 24 日—25 日、八王子
 33. 長尾朋和、長谷川明洋、中山俊憲、大野尚仁、三浦典子、越尾 修、馬淵綾子、南谷晴之、鈴木和男 「In-vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析」第 9 回 MPO 研究会、2003 年 10 月 24 日—25 日、八王子
 34. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、山田仁美、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、高橋 啓「カンジダ菌体抽出物誘導動脈炎モデルにおける動脈炎形成過程の経時的検討」第 9 回 MPO 研究会、2003 年 10 月 24 日—25 日、八王子
 35. 三浦典子、三川浩輝、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWS の DBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性の解析」第 9 回 MPO 研究会、2003 年 10 月 24 日—25 日、八王子
 36. 大川原 明子、武曾 恵理、猪原 登志子、高野 薫、野口 洋子、松田 潤一郎、鈴木 和男 「遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウス ICGN の好中球活性化の解析」第 9 回 MPO 研究会、2003 年 10 月 24 日—25 日、八王子
 37. 亀岡洋祐、Amanda Persad、池田文恵、仁保善之、鈴木和男「新規ミエロペルオキシダーゼ欠損症患者に同定された遺伝子変異」第 9 回 MPO 研究会、2003 年 10 月 24 日—25 日、八王子
 38. 鈴木和男「MPO-ANCA 関連血管炎」第 9 回 MPO 研究会、2003 年 10 月 24 日—25 日、八王子
 39. 越尾修、長尾朋和、大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「The contribution of PMN and the degranulated substances to the activation of p38 MAPK and Caspase 8 in the introduction of Apoptosis of human Endothelial cell」第 76 回日本生化学会大会、2003 年 10 月 16 日～18 日、横浜
 40. 星野昭芳、花木賢一、鈴木和男、山本健二「生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用」第 1 2 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年 10 月 29 日—31 日、横浜
 41. 鈴木和男「細胞・組織障害のメカニズム解析—血管炎を分子とバイオイメージングで解析する—」第 1 2 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年 10 月 29 日—31 日、横浜
 42. 長尾朋和・長谷川明洋・越尾 修・馬淵綾子・南谷晴之・中山俊憲・鈴木和男「活性酸素誘導の血小板血栓形成における CD69 の役割」第 1 2 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年 10 月 29 日—31 日、横浜
 43. 星野昭芳、花木賢一、鈴木和男、山本健二「生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用」第 1 2 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年

- 10月29日—31日、横浜
44. 三川浩輝, 三浦典子, 安達禎之, 大川原明子, 大原関利章, 高橋 啓, 直江史郎, 鈴木和男, 大野尚仁「*Candida albicans* 由来菌体外多糖画分 CAWS による致死的血管炎誘発メカニズムの解析」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 45. 大川原明子, 三浦典子, 大野尚仁, 鈴木和男「*C. albicans* 由来物質 CAWS によって誘起されるマウス冠状動脈炎発症における活性化好中球の役割について」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 46. 村田薫, 稲見真倫, 長谷川明洋, 久保秀一, 宮本健志, 木村元子, 山下政克, 長尾朋和, 鈴木和男, 谷口克, 中山俊憲「CD69 ノックアウトマウスにおける抗 type II コラーゲン抗体誘導性関節炎発症の抑制」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 47. 長尾朋和, 長谷川明洋, 越尾 修, 馬淵綾子, 南谷晴之, 中山俊憲, 鈴木和男「活性酸素誘導性の血小板血栓形成における CD69 の役割」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 48. 村山 研, 長尾朋和, 越尾 修, 長谷川明洋, 中山俊憲, 新井孝夫, 鈴木和男「活性化好中球における CD69 分子の表面局在」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 49. 濱野慶朋, 広瀬幸子, 鈴木和男「MPO-ANCA 関連半月体形成性腎炎自然発症モデル SCG/Kj マウスの遺伝的解析」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 50. 武曾恵理, 大川原明子, 鈴木和男「遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウス ICGN の好中球活性化の解析」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 51. 鈴木和男“Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis” 第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 52. Aratani, Y., Kura, F., Suzuki, K., and Koyama, H. “*In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense against fungal and bacterial infections.” 第33回日本免疫学会総会・学術集会、福岡、2003年12月8日～10日、福岡
 53. 荒谷康昭, 倉 文明, 鈴木和男, 小山秀機「*Cryptococcus neoformans* 感染に対する生体防御におけるミエロペルオキシダーゼの役割」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 54. 亀岡 洋祐, Persad Amanda, 橋本 雄之, 鈴木 和男「ミエロペルオキシダーゼの第8ヘリックスにおける日本人集団の変異頻度」第26回日本分子生物学会年会 2003年12月10—13日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 国立埼玉病院副院長

研究要旨

糖尿病における慢性高血糖状態が持続すると、心筋梗塞や脳梗塞などの大血管障害や、網膜症、腎症、神経障害の糖尿病に特有の細小血管障害といった合併症が引き起こされる。慢性高血糖により生じる生体内の異常には、血管障害や血液レオロジー異常が複雑に関与し、血管障害を引き起こす。血小板、赤血球、血管内皮細胞に着目し、糖尿病における血栓形成性と赤血球変形能低下のメカニズムを検討した。光感受性物質フォトフリンを利用した *in vivo* 血栓モデルを使用し、糖尿病ラットにおいて血栓粘着開始時間および血栓成長時間において有意な短縮を認め、糖尿病微小循環における易血栓形成性を初めて示した。血栓形成の場である血管内皮細胞と血小板に注目し *in vitro* での検討を行い、まず血小板の検討では、血小板の凝集能に注目し、濁度法の欠点を改善すべく開発された、散乱光による血小板凝集能測定装置(LSPA)を用いて、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進を示した。糖尿病患者の血小板においては GPIIb/IIIa の発現異常の可能性が示された。また内皮細胞の検討では、培養ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて、糖尿病状態下 (高グルコース培養および高 CML-AGE 培養) にある内皮細胞と血小板の静止接触下での相互作用を検討し、光化学反応血栓モデルでは濃度依存的な血小板粘着を認め、糖尿病状態により内皮細胞は著しく機能障害を受けていることが確認された。高血糖培養および高 CML-AGE 培養した内皮細胞における機能障害を、ミトコンドリア由来の活性酸素によるものであることを、各種の活性酸素を可視化することにより証明し、その影響はグリケーションの亢進により過剰に産生される終末糖化産物 AGE によって誘導される活性酸素からの障害が著しいことが示唆された。また糖尿病性細小血管症においては、活性酸素による血管内皮細胞機能障害が誘発されて、内皮細胞非剥離性血栓形成を助長していると考えられた。

シエアストレスを考慮に入れた血流のあるより血管内に近い状態を研究するため、Parallel Plate Flow Chamber に培養血管内皮細胞を組み込んだ灌流システムを構築し、低シエアおよび高シエアストレス下の糖尿病易血栓性における接着因子の関与について検討を行なった。その結果、正常培養 HUVEC においても、高シエアストレス下で血小板粘着が認められ、高血糖培養 HUVECs では、シエアストレスに依存して、血小板粘着が増大した。更に、拮抗剤およびモノクローナル抗体を用いた粘着抑制実験より、低シエアストレス下では、血小板膜上の GPIIb/IIIa と内皮細胞膜上の ICAM-1 が、高シエアストレス下では、血漿中の vWF と内皮細胞膜上の GPIb/IX/V の関与が強いことが示唆された。

また、原子間顕微鏡を用い赤血球の resealed ghost を作成し赤血球膜のみに依存した弾性特性を計測するための手法を確立し、同手法により赤血球ヤング率は赤血球膜・内液の双方の影響を大きく反映していることが示唆された。糖尿病において赤血球膜弾性の上昇が赤血球変形能低下の一因であることが示唆された。

A. 研究目的

糖尿病における慢性高血糖状態は、膵臓より生成されるインスリン量が減少したり、インスリン抵抗性が上昇したりすることにより、体内の糖が代謝されず、慢性の高血糖を引き起こすと考えられている。また、糖尿病における慢性高血糖状態は、血管障害や血液レオロジー異常をもたらす。前述した糖尿病性合併症を引き起こす中心的な要因と考えられている。しかし、

なぜ糖尿病がこれだけ多彩な細胞障害、臓器障害をもたらすのか、その機序は完全に明らかにされているわけでない。

我々研究班では、糖尿病微小循環における血管障害機序を解明するため、光化学反応を利用した *in vivo* 血栓モデルを用いて、健常ラット群に比し、糖尿病ラット群では有意に血栓形成時間が短縮し、糖尿病における易血栓性が示された。更に、本血栓モデルでは、動脈硬化症な