

Fig. 6 Effect of SCG on Adherent Cell or Nonadherent Cell

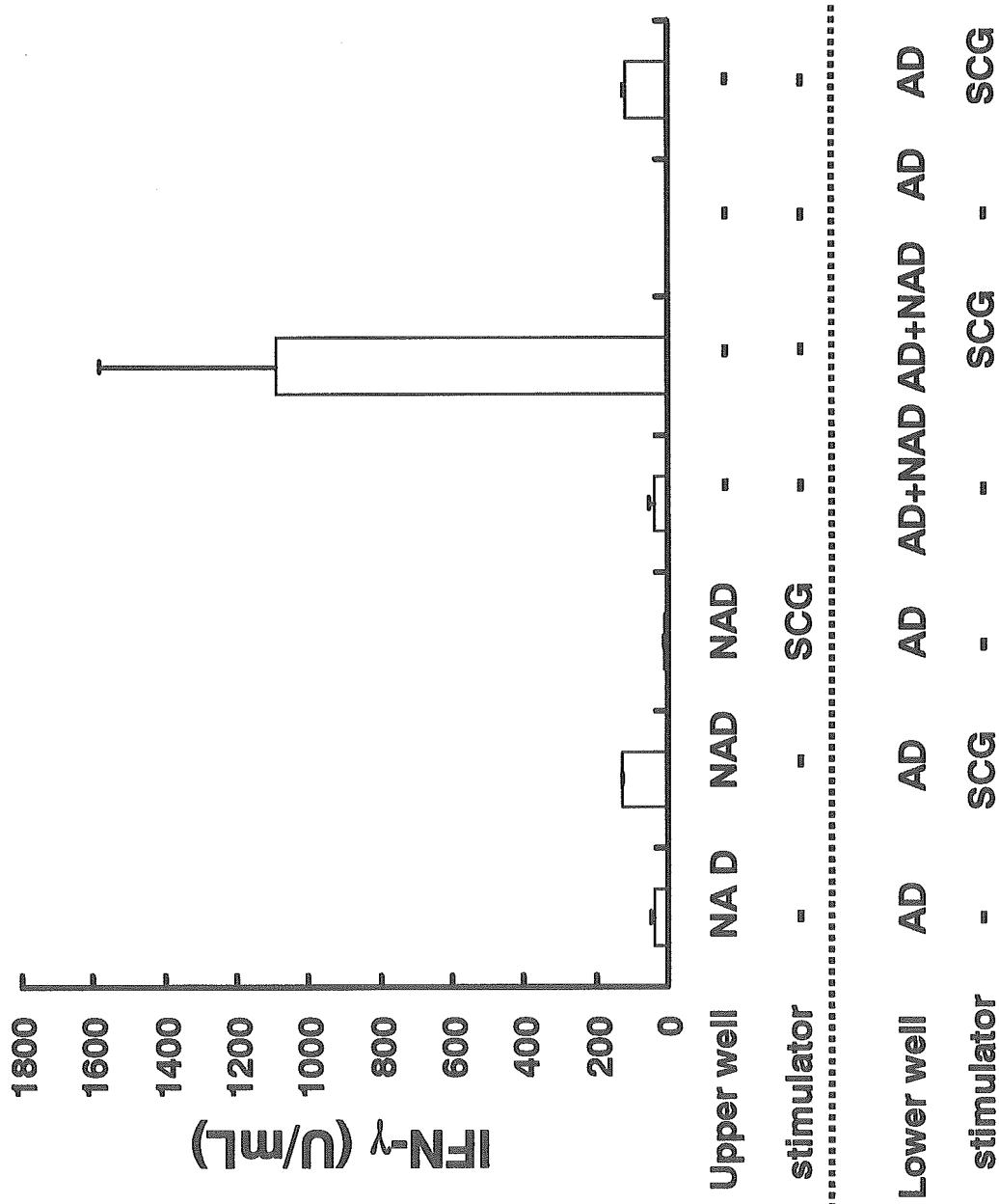


Fig. 7 Effect of Cell-cell Contact on SCG-elicited IFN- γ Synthesis

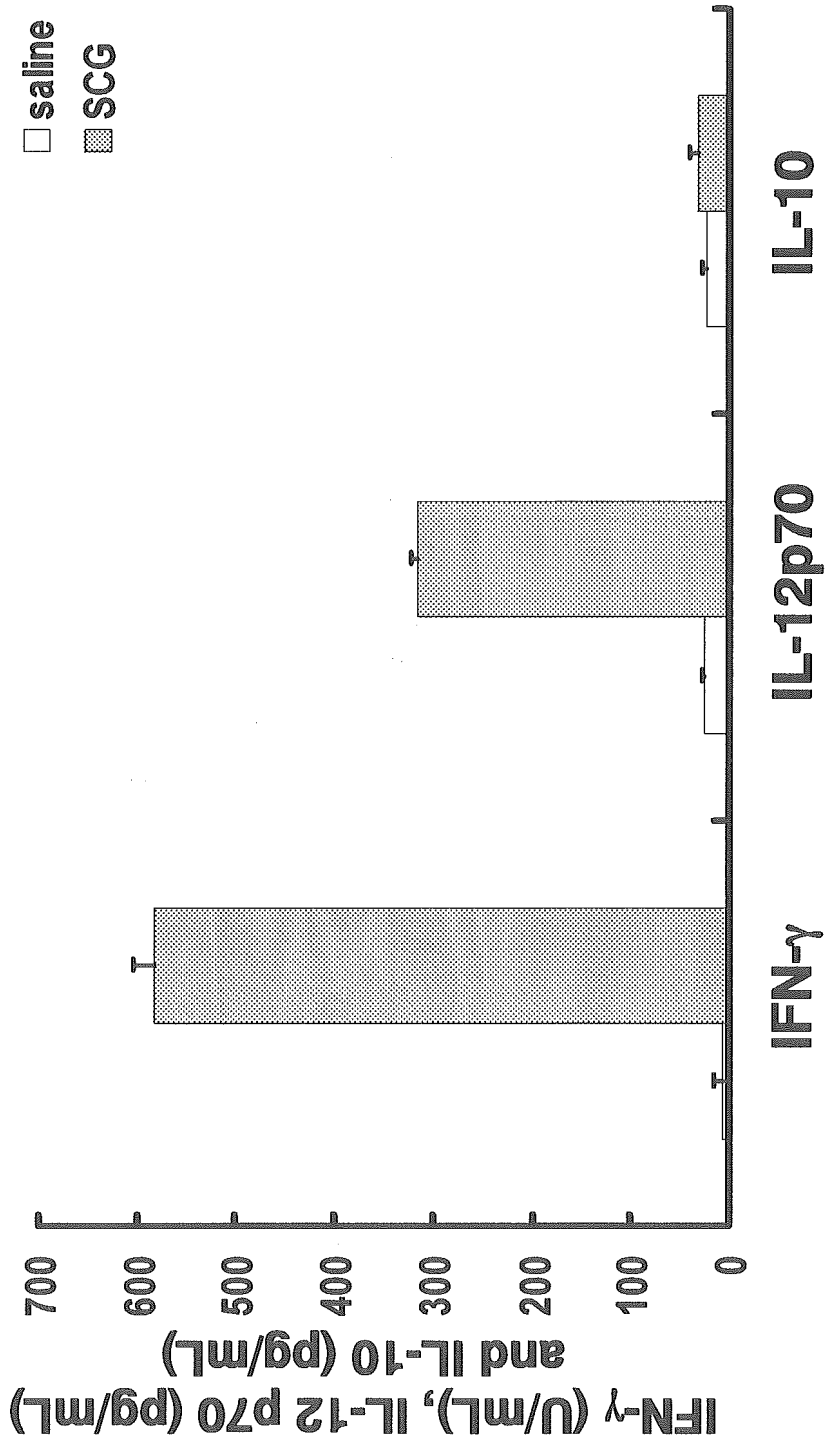


Fig. 8 Effect of SCG on Cytokine Synthesis of Splenocytes

MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究

分担研究者 新井孝夫 東京理科大学工学部教授

研究協力者 大内 敬 東京理科大学工学部助手

研究要旨

前身の「人工ポリクローナル F_v グロブリン製剤の開発に関する研究」において、抗 MPO マウスモノクローナル抗体を多数作製し、スクリーニングにカチオン性リポソームを用いたモノクローナル抗体導入法をスクリーニングに適用するなどの成果をあげて来た。本年度は、ポリクローナルの状態、モデル動物に対する治療効果を具体的に評価することを目標とした。まず、ポリクローナル製剤を主要成分と添加成分の2つに分けて調製する戦略を検討している。添加成分の主体は人工抗 MPO 抗体であり、人工抗体の材料とする目的で、これまでに作製した抗体のうち5種類のハイブリドマクローンを大量培養した。次に、ポリカチオン性脂質をもちいたモノクローナル抗体導入法を利用したアゴニスト・アンタゴニスト抗体の性質解析法を確立した。

A. 研究目的

本研究分担者は、本プロジェクトの前身である「人工ポリクローナル F_v グロブリン製剤の開発に関する研究」において、抗 MPO モノクローナル抗体の作製とスクリーニング法の開発を行った。さらに、オリゴクローナル人工抗体の治療効果を評価する戦略の検討も行った。その結果、1) リコンビナントマウス MPO を免疫した MPO ノックアウトマウスの B 細胞より抗 MPO マウスモノクローナル抗体 6 クローンの作製、2) カチオン性リポソームによるモノクローナル抗体導入法を利用した好中球中の MPO と抗 MPO 抗体との反応の測定法の確立などの成果をあげた。

本年度の目標は、ポリクローナルの状態、モデル動物に対する治療効果を具体的に評価することである。

B. 研究方法

腹水は、あらかじめプリスタンを注射した Balb/c マウス（オス、8 週齢）の腹腔にハイブリドマクローンを注射することにより作製した。

リポソーム法による抗体の細胞内導入は、次のようにして行った。まず、モノクローナル抗体とカチオン性脂質リポフェクトアミン（1%）を導入溶液 OPTI-MEN 中で室温、1 時間混合した。次に、繊維芽細胞株 3Y1 細胞を OPTI-MEN で洗浄後、モノクローナル抗体・リポフェクトアミン混合液を加え、炭酸ガスインキュベーター中（37°C, 5% CO₂）で 1 時間反応させた。さらに 2 日間培養したのち、導入した抗体による増殖阻害を細胞数カウンティングキットをもちいることにより調べた。

（倫理面への配慮）

実験動物の動物愛護上の配慮は、本大学実験施設の指針に基づいて行った。

C. 研究結果

本年度は、ポリクローナルの状態で、モデル動物に対する治療効果を具体的に評価することを目標とした。まず、ポリクローナル製剤を主要成分と添加成分の2つに分けて調製する戦略(図1)を検討している。添加成分の主体は人工抗MPO抗体であり、人工抗体の材料とする目的で、これまでに作製した抗体のうち5種類のハイブリドマクローンを大量培養した。現在、これらの抗体をもちいて、治療効果を評価する試みを行っている。

抗 α -チューブリン抗体D2D6は、ウニ卵にマイクロインジェクション法で導入した場合、その卵割を阻害することが知られている。D2D6と卵割を阻害しない抗 β -チューブリン抗体E1をカチオン性脂質法により3Y1細胞に導入し、その増殖阻害効果を調べたのが図2である。この図は、D2D6は増殖阻害するのに対し、E1は阻害しないことを示している。

D. 考察

モデル動物をもちいた治療効果の評価は長い期間を要するために、多種類の標品を扱うことは困難である。そこで、2つの方向から、検討している、第一は、主要成分と添加成分の2つに分けて調製することである。この方法であれば、モデル動物を対象とした治療実験の戦略とすることが可能である。第二は、細胞を対象とした簡便な系を構築することである。本研究で示されたようにカチオン性脂質によるモノクローナル抗体導入法をもちいれば、抗体導入に伴う細胞内の酵素活性の変化などを追うことが可能である。適当な指標を定めることができれば、短時間にしかも多数の標品の効果を調べることができる。

E. 結論

MPO-ANCA自己免疫疾患の治療に有効なポリ

クローナル製剤の評価に対する2つの戦略を検討した。第一は、ポリクローナル製剤を主要成分と添加成分の2つに分けて調製する戦略である。第二は、ポリカチオン性脂質をもちいた抗体導入法を利用して、抗体導入に伴う細胞内酵素、タンパク質の機能変化を追う戦略である。両者を併用することにより、目的の製剤の評価が効率的に行われることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Namekawa, S., Hamada, F., Sawado, T., Ishii, S., Nara, T., Ishizuka, T., Ohuchi, T., Arai, T., and Sakaguchi K: Dissociation of DNA polymerase α -primase complex during meiosis in *Coprinus cinereus*, *Eur. J. Biochem.*, 270, 2137-2146 (2003)

2) 大内敬、新井孝夫:リポソームを用いたモノクローナル抗体の生細胞導入法の開発とその応用、ナノバイオテクノロジーの最前線(監修:植田充美)、pp 258-265、シーエムシー出版、2003年10月

3) Toshiyuki Matsuoka Kaoru Kato, Nao Hoshino Tiichiro Matsunaga, Noriko Saito, Masahiro Yamada, Naoki Shimojo, Yoichi Kono, Takao Arai, and Kazuo Suzuki: Disorganization of Actin Polymerization in Neutrophils of Patient with Leukocyte Adhesion Dysfunction: A Bioimaging Analysis System using a Polarized Microscopic System LC-Pol Scope, *Bioimages*, in press

2. 学会発表

1) 鳥飼祐介、石川広平、大谷圭司、栗原傑、大内

敬、新井孝夫、抗 Thy-1 抗体 2E11 誘因による PC12 細胞の突起伸展を阻害するモノクローナル抗体の作製、第 56 回日本細胞生物学会大会、大津、2003 年 5 月

2) 大内敬、柴田麻衣、前川原淳、新井孝夫、カチオン性リポソームによるモノクローナル抗体導入法を用いた細胞内タンパク質の機能解析、第 56 回日本細胞生物学会大会、大津、2003 年 5 月

3) 新井孝夫:モノクローナル抗体による分子機能解析、日本バイオイメーキ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、松島、2003 年 9 月

4) Y. Shibata, K. Maruyama, K. Yoshida, T. Ohuchi, T. Arai: Neuroprotective effect of neoechinulin A on peroxynitrite treated PC12 cells, 第 76 回日本生化学会大会、横浜、2003 年 10 月

5) Y. Okada, A. Suzuki, K. Ishikawa, T. Ohuchi, T. Arai: Polyglutamylolation of tubulin during the neuronal differentiation of neural precursor cells induced by retinoic acid and BDNF, 第 76 回日本生化学会大会、横浜、2003 年 10 月

6) 新井孝夫、大内敬:タンパク質の機能解析に有用なモノクローナル抗体の作製戦略と応用技術の開発、第 12 回日本バイオイメーキング学会学術集会、東京、2003 年 10 月

7) 眞島利和、大谷圭司、富江俊尚、大内敬、新井孝夫:細胞外マトリックスの X 線イメーキング、第 12 回日本バイオイメーキング学会学術集会、東京、2003 年 10 月

8) 清水一生、大内敬、新井孝夫:生細胞中の微小管と結合するモノクローナル抗体のリポソーム法によるスクリーニング、第 12 回日本バイオイメーキング学会学術集会、東京、2003 年 10 月

9) 石川広平、鳥飼祐介、新井孝夫:神経幹細胞からアストロサイトへの分化における Thy-1、integrin 分子の役割、第 12 回日本バイオイメー

キング学会学術集会、東京、2003 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

主要成分＋添加成分 ⇒ 治療効果の上昇

主要成分： γ -グロブリン製剤（ヒト型）
人工ポリクローナルグロブリン
（マウス型）など

添加成分： 抗 MPO モノクローナル抗体
抗 MPO オリゴクローナル抗体など

図1 ポリクローナルグロブリン製剤の治療効果評価の戦略

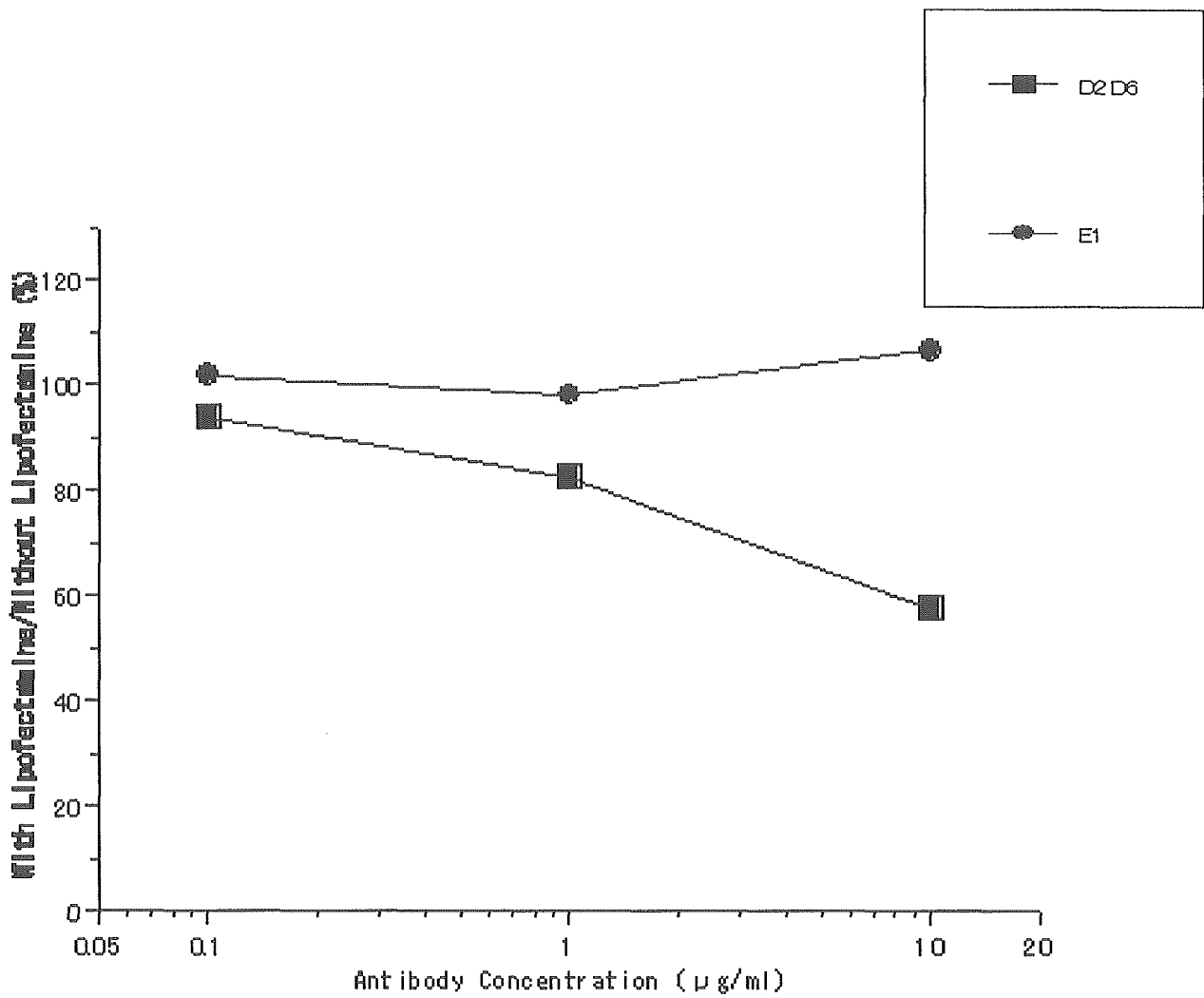


図2 リポソーム法で導入した抗チューブリン抗体D2D6による
3Y1細胞の増殖阻害

CAWS 誘発マウス動脈炎モデルにおける経静脈的免疫グロブリン投与(IVIG)の有効性に関する基礎的研究

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
共同研究者 大原関利章、山田仁美 東邦大学医学部
三浦典子、大野尚仁 東京薬科大学薬学部
村山 研、大川原明子、鈴木和男 国立感染症研究所

研究要旨

Candida albicans Water Soluble fractions(CAWS)誘発マウス動脈炎モデルにおける経静脈的免疫グロブリン投与(IVIG)の有効性、至適投与時期について検討することを目的とした実験を行った。C57BL/6N マウス、4 週齢、雄の腹腔に CAWS 4mg を連続 5 日間接種した。同時に IVIG を様々なスケジュールで行った。接種後 28 日目に安楽死させ、冠状動脈、大動脈起始部のステップ標本を作製。血管炎の性状について病理組織学的に検討した。その結果、中期投与群においてのみ汎血管炎発生は抑制された。中期投与群と対照群とで組織学的差異をより詳細に検討したところ、中期投与群では対照群に比し汎血管炎の前段階ともいえる内膜・外膜に局限した炎症をみる個体が多数存在した。IVIG で炎症の発生を完全に抑えることは困難であるが、汎血管炎への進展を抑制している可能性が示唆された。一方、他のスケジュールで IVIG を行った群では、汎血管炎の発生を抑制し得なかったことより、IVIG で血管炎を抑制するためには至適投与時期があると考えられた。

A. 研究目的

CAWS 誘発マウス動脈炎モデルにおける IVIG の有効性、および至適投与時期について検討することを本研究の目的とした。

ここでいう大動脈炎、冠状動脈炎とは、炎症細胞浸潤が血管壁全層に及ぶ汎血管炎と定義した。一方、剖検時採取した血液、血清は白血球数、血小板数、MPO-ANCA 値の計測に用いた。

B. 研究方法

C57BL/6N マウス、4 週齢、雄を購入し、試験飼育後、PBS に懸濁した CAWS 4mg をマウス腹腔内に連続 5 日間接種した。この際、図 1 に示すスケジュールで IVIG を行う群を設けた。

CAWS 接種後 28 日目に炭酸ガス下に安楽死させ、直ちに剖検。冠状動脈分岐部を含む心基部大動脈水平断のステップ標本を作製し、大動脈炎ならびに冠状動脈炎の有無、病理組織像を観察した。

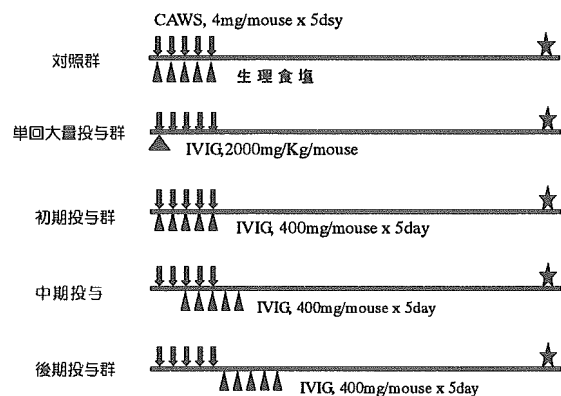


図1 実験スケジュール

C. 研究結果

1. 汎血管炎発生頻度

炎症が血管壁全層にわたって認められた汎血管炎発生頻度は表1に示す通りである。

実験群	動脈炎発生
対照群	5/10 匹
単回大量投与群	8/10
初期投与群	7/10
中期投与群	3/10
後期投与群	5/10

表1 汎血管炎発生頻度

対照群と比して汎血管炎発生率の低下をみたのは中期投与群のみであり、他の群では汎血管炎は同程度あるいはより高頻度に生じる結果となった。

2. 中期投与群と対照群との組織学的比較

汎血管炎発生率の低下をみた中期投与群と対照群との組織学的差異をより詳細に検討するため、炎症細胞浸潤が内膜に局限するものを Stage I、内膜と外膜に認められるものを Stage II、内膜・中膜・外膜の血管壁全層に達するもの(汎血管炎)を Stage III とし、個体毎に炎症の波及範囲を評価し、比較検討した。その結果、対照群では Stage I-5/10, Stage II-0/10, Stage III-5/10 匹であったのに対し、中期投与群では Stage I-4/10, Stage II-3/10, Stage III-3/10 匹であった(表2)。

Stage ごとの血管病変を両群間で比較したが、明らかな組織学的差異は見出せなかった。

	対照群	中期投与群
Stage I	5	4
Stage II	0	3
Stage III	5	3

表2

3. 白血球数、血小板数、MPO-ANCA 値

いずれの項目も各群間で有意な差異は見出せなかった(図2)。

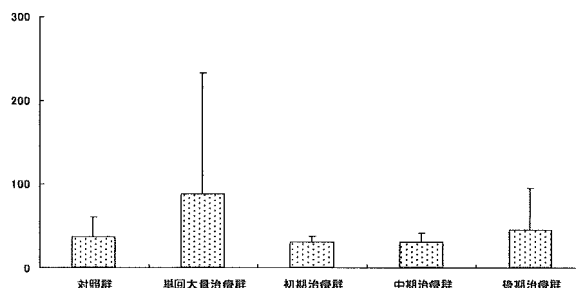


図2 各群における MPO-ANCA 値

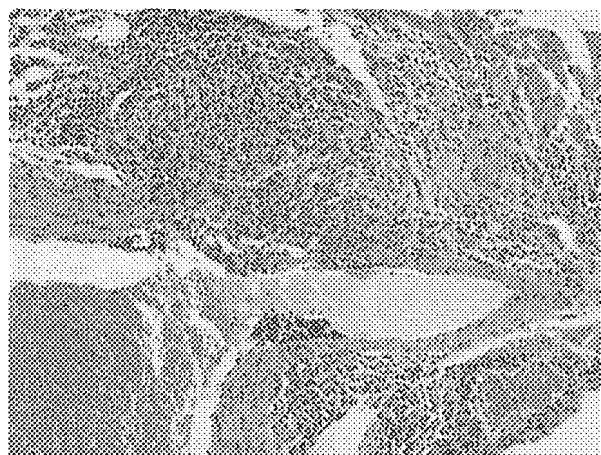


図3 中期投与群 冠状動脈汎血管炎

D. 考察

CAWS 誘導マウス動脈炎モデルにおける免疫グロブリン製剤の有効性、至適投与時期について検討した。その結果、中期投与群では動脈炎発生率を低下させることができ、IVIg が有効であると考えられた。次に、本群における血管変化をより詳細に観察したところ、個体の全てに何らかの炎症性変化を認めており、中期投与群においても血管の炎症を完全に抑制することは出来なかった。しかし、汎血管炎である Stage III 病変の低下にかわり、炎症細胞浸潤が内膜および外膜に局限する Stage II 病変が増加している

ことから、IVIG は Stage II から Stage III への進展を抑制している可能性が考えられた。

一方、他の投与群では汎血管炎の発生を防ぐことは出来なかった。さらには、より高頻度の発生をみる群も存在した。このことは、IVIG には至適時期があり、動脈炎抑制効果を得るためには IVIG のタイミングが極めて重要であることを示すものと考えられた。大量 IVIG が治療として広く用いられている川崎病においても、有効な治療効果を得るための投与時期については現在、議論がなされている。今回の結果は、この問題を考える上での一助となり得るものとする。さらに検討を進めたい。

E. 結論

CAWS 誘発マウス動脈炎モデルにおける IVIG の血管炎抑制効果について検討した。IVIG により血管の炎症性変化を完全に抑制することは困難であったが、汎血管炎への進展過程を抑制している可能性が考えられた。

一方、適切な効果を得るためには IVIG の至適時期が存在すると推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

高橋 啓、直江 史郎：分子誘導型モデル動物—*Candida Albicans* 菌体成分による動脈炎誘発モデル。医学のあゆみ 206:147-149, 2003

高橋 啓、大原関 利章、直江 史郎：特集川崎病 Q&A カンジダ菌体抽出物によるマウス系統的動脈炎誘発モデルの特徴はなにか。小児内科 35:1500-1502, 2003

高橋 啓、大原関利章、村田久雄、直江史郎：カンジダ菌体抽出物によるマウス系統的血管炎

誘発モデルと川崎病。脈管学 43:673-678, 2003

Takahashi K, Oharaseki T, Wakayama M, Yokouchi Y, Naoe S, Murata H: Histopathological features of murine systemic vasculitis caused by *Candida albicans* extract - an animal model of Kawasaki Disease. *Inflamm res.* 53: 72-77, 2004

2. 学会発表

大原関利章、横内 幸、若山 恵、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、高橋 啓：川崎病類似動脈炎モデルにおける動脈炎形成過程の組織学的検討、第 39 回日本小児循環器学会総会、2003.7、神戸

大原関利章、横内 幸、若山 恵、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、村田久雄、直江史郎、高橋 啓：カンジダ誘導系統的動脈炎モデルにおける動脈炎形成過程の組織学的検討、第 44 回日本脈管学会総会、2003.11、福岡
高橋 啓、三浦典子、大川原明子、金城義明、大原関利章、村山 研、土田和則、大野尚仁、鈴木和男：川崎病類似マウス動脈炎モデルにおけるヒト免疫グロブリンの治療効果、第 33 回日本免疫学会総会、2003.12、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

炎症疾患治療評価を行うための諸条件の検討：
好中球機能異常が関わる炎症性疾患の解析

分担研究者 荒谷康昭 横浜市立大学木原生物学研究所助教授

研究要旨

潰瘍性大腸炎は原因不明の炎症性腸疾患であるが、白血球由来の活性酸素がこの疾患に大きく寄与している可能性が高い。活性化した好中球は NADPH オキシダーゼによって酸素からスーパーオキシドを、またミエロペルオキシダーゼ (MPO) によって過酸化水素から次亜塩素酸を活発に産生する。本研究では、我々が作製した MPO 欠損 (MPO-KO) マウスに加えて、NADPH オキシダーゼ欠損マウス (CGD マウス)、およびその両酵素の二重欠損マウス (MPO-KO/CGD マウス) も用いて、本疾患における好中球由来の活性酸素の関与を個体レベルで解析した。マウスに dextran sulfate sodium を経口投与して実験的大腸炎を発症させたところ、MPO-KO/CGD、MPO-KO、CGD、野生型の各マウスの順に大腸炎が速く進行した。ただし、MPO-KO マウスと CGD マウスの大腸炎の進行速度は、ほぼ同程度であった。すなわち、好中球に存在する活性酸素の代謝酵素を欠損することによって炎症性腸疾患が促進することが明らかとなった。

A. 研究背景・目的

炎症性疾患は感染説やストレス説など様々な説が提唱されているが、いまだ原因不明のものが多い。この疾病は特効薬が乏しいので、新たな治療法の開発が急がれており、その治療法に対する適切な評価系を確立することも重要視されている。

好中球は病原微生物の感染等によって活性化されることで様々な活性酸素やプロテアーゼを産生してその病原微生物を殺菌し、感染初期の生体防御に重要な役割を担っている。ところが、好中球からの活性酸素の

産生が長時間持続すると正常組織にも傷害を与えて炎症性疾患を誘発するという、生体にとっての悪影響が懸念される。しかし、実際に好中球が組織傷害に関与することを個体レベルで実証した成果は極めて少ない。

潰瘍性大腸炎の発症原因はいまだ不明であるが、大腸炎患部には白血球の顕著な浸潤が認められることなどから、白血球がこの疾患に大きく関与している可能性が疑われている。

活性化した好中球は NADPH オキシダーゼによって酸素からスーパーオキシドを、ま

たミエロペルオキシダーゼ (MPO) によって過酸化水素から次亜塩素酸を活発に産生する。本研究では、報告者が作製した MPO のノックアウト (MPO-KO) マウスに加えて、NADPH オキシダーゼ欠損マウス (CGD マウス)、およびその両酵素の二重欠損マウス (MPO-KO/CGD マウス) も用いて、本疾患における好中球由来の活性酸素の関与を個体レベルで解析し、炎症性疾患治療評価系としてのこれらのマウスの有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

実験には 8-10 週令の雄マウスを使用した。野生型 C57BL/6 マウスは日本 SLC から購入した。MPO-KO マウスと CGD マウスは、C57BL/6 マウスに戻し交配したマウスを用いた。また、MPO-KO/CGD 二重欠損マウスは、MPO-KO マウスと CGD マウスを交配させることによって作製した。マウスは、横浜市立大学木原生物学研究所動物実験指針に準じて SPF 環境下で飼育管理したものを実験に供した。野生型、MPO-KO、CGD、MPO-KO/CGD の各マウスに大腸炎誘発剤である dextran sulfate sodium (DSS) を 5-11 日間経口投与して、実験的炎症性腸疾患を発症させた。投与開始からの大腸組織の炎症を経時的に観察した。大腸の組織標本は常法にしたがって作製し、大腸組織からのプロテアーゼ活性は、zymography で検出した。

C. 研究結果

DSS 投与開始後 8 日目の大腸組織を alcian

blue 染色し、杯細胞の消失度を比較したところ、MPO-KO/CGD マウスの杯細胞の消失が最も顕著であり、MPO-KO マウスと CGD マウスの重篤度がそれに続き、野生型マウスの症状が最も顕著であった (図 1)。すなわち好中球から産生される活性酸素の代謝酵素を欠損するノックアウトマウスのほうが野生型マウスよりも早期に実験的大腸炎を進行させることが明らかとなった。

そこで好中球からの活性酸素産生を欠如するノックアウトマウスにおいて実験的大腸炎が早期に進行する原因を解析した。まず、大腸組織でのプロテアーゼ産生について検討するためにゼラチンを基質タンパク質とする Gel zymography を行った。その結果、MPO-KO/CGD で最もプロテアーゼ活性が強く、野生型マウスで最も弱い 92 kDa 付近のバンドを観察した。Western blot 解析によってこのプロテアーゼが Matrix metalloproteinase (MMP) -9 であることを同定した (図 2)。すなわち、MMP-9 が MPO-KO/CGD、CGD、MPO-KO、野生型マウスの順に早期に大腸組織で発現していることが、大腸の組織傷害を進行させている一因であることが示唆された。また、大腸で MMP-9 を産生している細胞は、大腸に浸潤してきた好中球とマクロファージであった。

以上の結果から、好中球からの活性酸素産生を欠如するノックアウトマウスは、大腸組織に好中球やマクロファージが早期に浸潤し、その結果、実験的大腸炎が早期に進行することが明らかとなった。

D. 考察

好中球からの活性酸素産生を欠如する好中球機能異常マウスは野生型マウスよりも実験的大腸炎を早期に誘発することが示された。これらの好中球機能異常マウスの大腸炎患部には好中球やマクロファージがより早期に浸潤することから、浸潤したこれらの細胞が炎症の進行に関与していることが示唆された。また、炎症の進行に伴って患部から MMP-9 プロテアーゼが産生されたが、好中球機能異常マウスの方が MMP-9 の産生がより早期に観察されたことから、このプロテアーゼが炎症の進行に大きく寄与している可能性が高いと考えられた。

今後、活性酸素産生を欠如するマウスが早期に大腸炎を発症するメカニズムを追求して真の発症機構を知ることは、炎症疾患の適切な評価系として確立するために不可欠な研究であると考えられる。

E. 結論

好中球からの活性酸素産生を欠如する好中球機能異常マウスは、野生型マウスよりも実験的大腸炎を早期に誘発することが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawai, Y., Furuhashi, A., Toyokuni, S., Aratani, Y., and Uchida, K. Formation of

acrolein-derived 2'-deoxyadenosine adduct in an iron-induced carcinogenesis model. *J. Biol. Chem.* 278:50346-50354 (2003).

2. 学会発表

1) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M., Maeda, N., and Koyama, H: Critical role of myeloperoxidase and NADPH-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. Gordon Research Conference, USA, June, 2003

2) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H: Contribution of myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Cryptococcus neoformans*. 第76回日本生化学会大会、2003年10月(横浜)

3) Shimono, M., Endo, R., Takahashi, H., Sugo, N., Kura, F., Dinauer, M., Maeda, N., Koyama, H., and Aratani, Y: Increased sensitivity of mice deficient in myeloperoxidase and NADPH-oxidase to dextran sulfate-induced colitis. 第76回日本生化学会大会、2003年10月(横浜)

4) 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(東京)

5) 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 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月（福岡）

6) 荒谷康昭、高橋 元、Nobuyo Maeda、小山秀機：活性酸素の産生を欠如するマウス好中球のアポトーシス 2004 年度 日本農芸化学会大会、2004 年 3 月（広島）

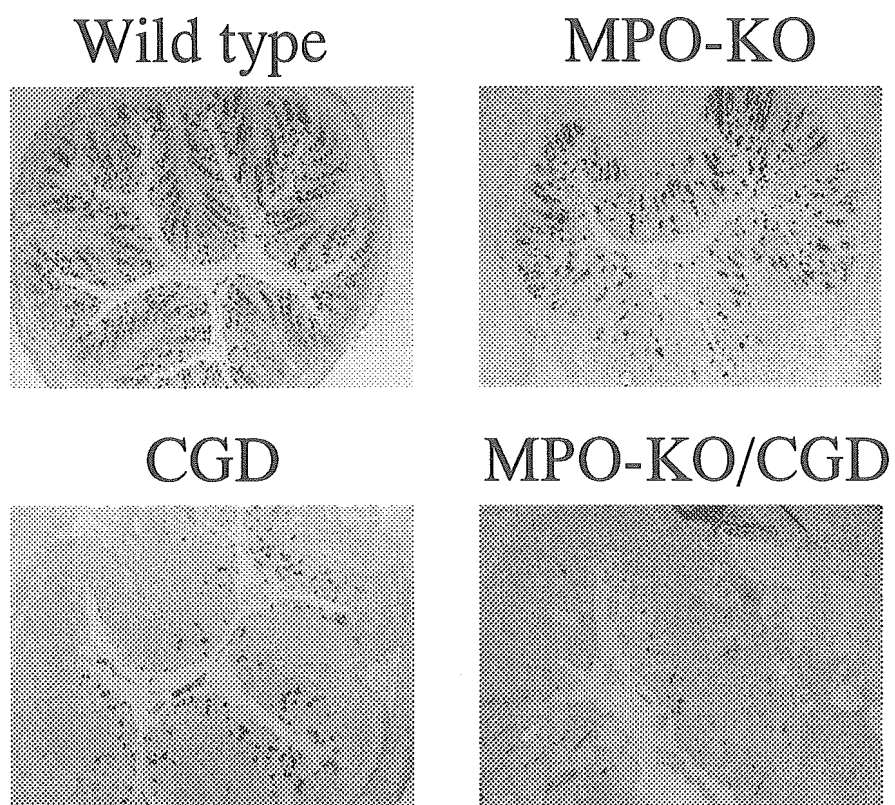


図1. DSS投与開始後8日目の大腸のAlcian blue染色像

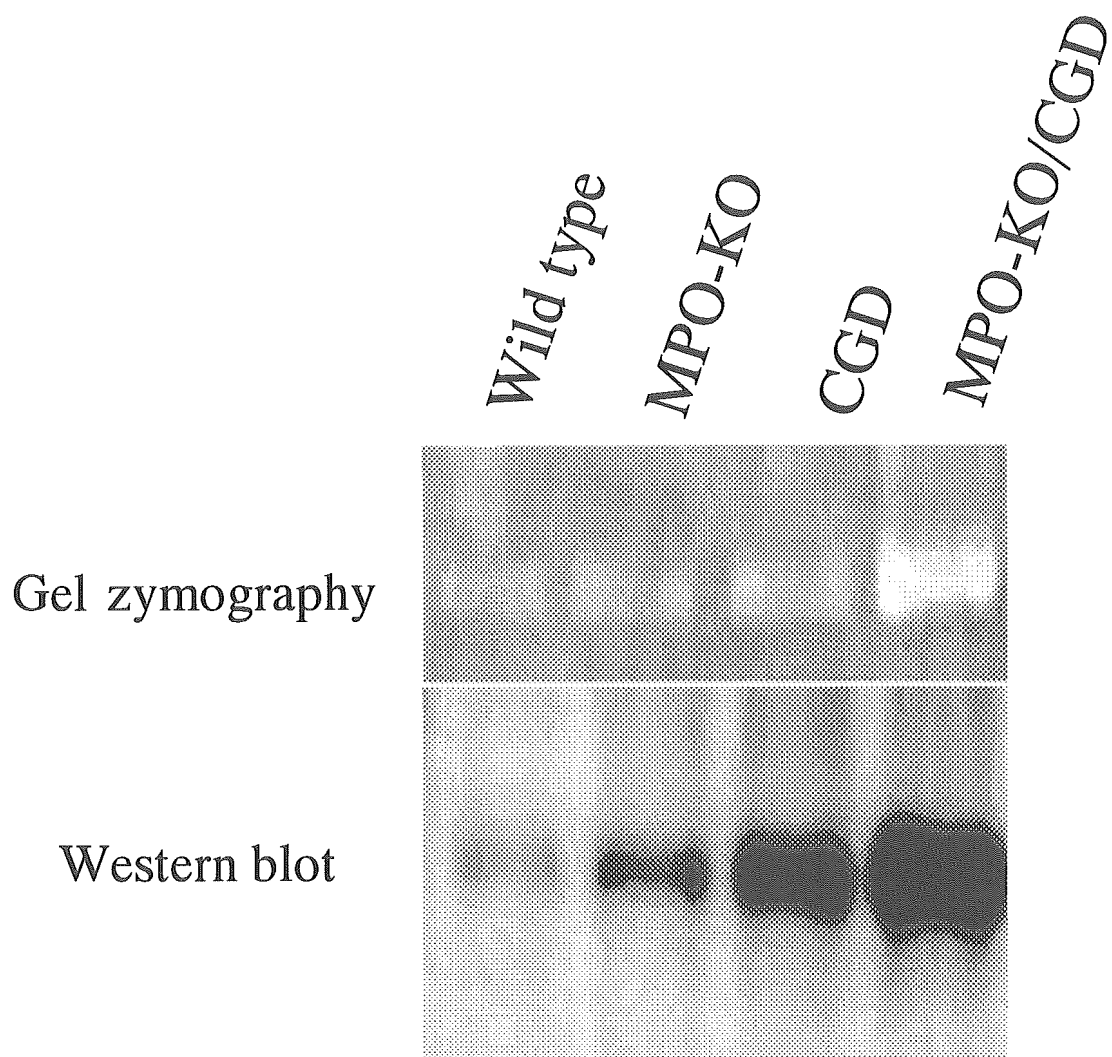


図 2. DSS を 8 日間投与したマウスの大腸の Gel zym ography と、
抗 MMP-9 抗体による Western blot 解析

量子ドットによる人工ガンマグロブリンの生体内動態解析

分担研究者 山本健二 国立国際医療センター研究所・医療生態学部 部長

研究要旨

人工γグロブリン開発においてその生体内動態を解明することにより、自己免疫疾患などにおけるグロブリン製材の有効性についての作用メカニズムの解析を行なうことを目的としている。本年度は、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動態解析に必要な表面加工の開発についての研究を行ないその結果、その生体内動態評価手法確立し、そ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もまさに 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ち自己組織化法による蛍光ナノ粒子の合成を行ない、その蛍光ナノプローブを用いて LECTII 分子にタグgingし

LECTII の生体内動態を解析し、また LECTII ノックアウトマウスやその他の自己免疫疾患モデルマウスなどにおいてその生体内動態を解析することを通じて LECTII が係わる疾患メカニズムを明らかにすることにある。

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) という有機溶媒を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80℃に加熱し恒温に保つと溶融しており、この溶融した 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。

そこでこの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ところであるが、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。その細胞導入に必要な準備がなされたと言える。今後この粒子に標的と成る蛋白質に結合させその細胞内動態を解析する準備がすべて整った段階にある。

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わり、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じゅうようであるため、LECTII に量子ドットを結合させその細胞内動態を見る事により、リウマチ関節炎の増悪化について解析する事は、社会的にも重要な事である

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は実際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。

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ふ極めて特