

高感度 ^{31}P NMRプローブの開発と生きた細胞への応用

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

タンパク質は、他のタンパク質、核酸、脂質、糖などをはじめ、さまざまな生体分子と相互作用しながら、生命活動を支えている。しかしながら、分子が実際に存在する環境すなわち個体や細胞そのものの中での性質あるいは挙動を調べることができる手法は少ない。この点、非侵襲的な観測法であり、個体や細胞あるいは様々な分子が混在した溶液から観測したいものの情報だけを原子レベルで抽出することができるNMRは極めて有用な分析手法である。NMRを用いると、生きた個体の中で観測したい生体分子を追跡することや、どのような状態で存在するのかを調べることが可能となる。

リン(^{31}P)は、DNAをはじめ、ATPなどのエネルギー源、イノシトールリン酸、リン脂質などのシグナル伝達物質や膜成分として、様々な形で生体内に存在している。また、NMR (核磁気共鳴) の感度が比較的高い核であるが、現在得られる ^{31}P NMR測定の間感度では、単一細胞を試料とする実験が出来ず、研究を進める上で大きな障害となってきた。しかしながら、近年、NMR測定に用いる磁場強度が上がり、また検出器 (プローブ) の技術も改良され、従って信号検出感度も向上してきたため、NMRを用いて生きたままの細胞を測定・解析できる可能性も高まってきた。本研究ではこのリン核に焦点を当て、生理的環境を灌流によって作り出した上で、直接モニターできるプローブヘッドおよびセルの開発を行った(図1)。

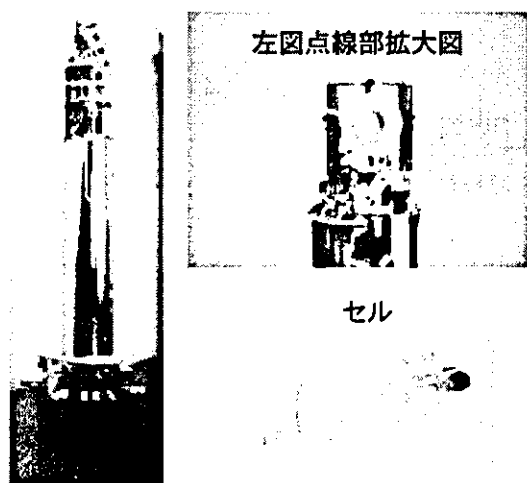


図1 作製したプローブヘッドとセル

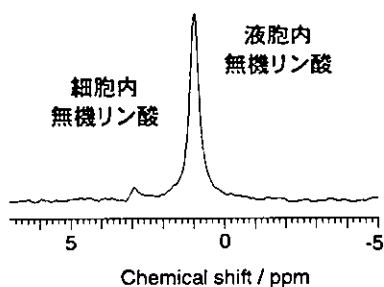


図2 水草の ^{31}P NMRスペクトル

本プローブは、特に、短い横緩和時間に対応できる様に、測定用パルス、レーザーのゲーティング・ダイナミックレンジを重点的に向上できるものとなっている。これにより、細胞や組織を生きた状態で長時間保持しながら、 ^{31}P NMRスペクトルを測定することを可能とした。今回、本プローブでの観測対象となる生体物質の混合物である牛乳について解析を行った。1次元 ^{31}P NMR測定に加え、2次元 ^1H - ^{31}P NMR測定法を適用することで、前処理を行うことなく、牛乳中に含まれるリン酸化合物成分について同定することに成功した。また、水草(オオカナダモ)の葉をそのままセルにつめ、生理的条件下で測定することによって、迅速に、液胞中と細胞質中の無機リン酸を検出することができた(図2)。これより、液胞内及び細胞内の無機リン酸含有量とpHを、細胞を壊すことなく、生きた状態で、短時間で調べることが可能となった。

細胞組織動態の解析に向けた軟X線顕微鏡技術開発

眞島 利和 独立行政法人 産業技術総合研究所・光技術研究部門

血管の炎症や血流障害を引き起こす疾患に付随して血管壁の厚みの増加や血管狭窄などが生じるが、こうした要因の一つは血管壁の結合組織内での細胞外マトリックス（ECM）の増加であることが知られている。特に動脈血管系では、内皮細胞・平滑筋細胞及び血管外膜の線維芽細胞により合成されるヒアルロン酸（HA）が、ECM成分として血管壁での平滑筋の分裂や移動、血管狭窄に密接に関連していることが明らかにされている。水分を多量に含むHA層を含めたECMのような試料を固定・脱水処理をすることなく、そのままの状態 で高分解能観察をするためには、従来の電子顕微鏡とは異なる技術手法が必要とされる。

本研究では、電子顕微鏡や光学顕微鏡観察では空白であった水中での高分解能観察（～40 nm）を目的として、生体の炭素分布密度を画像化できる軟X線イメージングによる培養細胞のECM観察をおこなった。軟X線イメージングの原理は、軟X線領域での炭素と酸素の軟X線吸収の差に着目して、生体を構成している炭素に吸収されやすい波長の軟X線を照射し、水による軟X線吸収を抑えて、水中にある試料の炭素密度分布を画像化することである。このため、生体透過性の高い硬X線を用いる非侵襲的な医学診断手法とは異なる。実験に用いた密着型フラッシュ軟X線顕微鏡は、レーザー生成プラズマを軟X線源とするもので、3ナノ秒以内に軟X線露光を終了し、X線感光性高分子であるPMMA薄膜上に試料の実物大のX線像を記録できる。得られたレリーフ状のX線像を原子間力顕微鏡（AFM）を用いて拡大読み出しする。

密着型フラッシュ軟X線顕微鏡では3ナノ秒間でフラッシュ露光を完了させるので、X線露光後数10ナノ秒後から始まる軟X線吸収による試料の熱変性過程による画像のブレの影響を受けないきれいな画像を得ることができる。本法は、試料に対して破壊的ではあるが、培養液中の細胞などの高分解能のX線像を得ることができる。軟X線イメージングによる細胞観察における問題点は、光学切片を観察する光学顕微鏡や超薄切片を観察する電子顕微鏡とは異なり、得られるX線像が二次元への投影像であるため、データの解釈が複雑になることである。軟X線像とそれを与えた実体を明確に対応付けることが必要とされる。このために、蛍光ラベルしたモノクローナル抗体などをプローブに用いて、試料の光学顕微鏡像と軟X線像との比較により軟X線像の帰属を決定する方法を取り入れた。軟X線イメージングはまだ歴史が浅い。汎用化に向けて装置の操作性の向上を図るとともに、観察例を重ねて、軟X線顕微鏡によりどのような情報が得られるのかを明らかにしていく必要がある。

薬物の電界放出に最適なリポソーム微粒子系の開発

松村 英夫 独立行政法人 産業技術総合研究所・光技術研究部門

組織細胞が正常でなくなったときにその回復のため薬をなんらかの手段で病細胞まで送る。通常行われる薬物輸送の方法にはいくつかある。一つは口から内服し消化器や粘膜から、あるいは静脈注射にて血管系に入れ毛細血管から組織細胞へ送る方法。一つは皮下注射や湿布により直に患部へ送る方法である。X線 CTやMRIなどの物理検査法により体内の疾患部の場所がはっきりしているときにはそこだけに薬を投与すれば十分であるし、余分な副作用も少なくなるはずである。任意の場所で任意の時間に薬物を放出・供給する方法やツールは種類が多いほど良く研究開発が望まれている。

一つの提案として、エレクトロ・ケモセラピーにリポソーム微粒子を利用することがあげられる。エレクトロ・ケモセラピーはパルス電場のアシストで細胞膜をとおして薬を細胞内へ輸送する方法である。通常の有効濃度より低い濃度で効果が期待できるため副作用防止も期待されている。ここに、リポソーム微粒子と磁性微粒子との複合体を用いれば、磁性針によりその存在場所のコントロールができ、針電極を用いて電場を印加することにより、リポソーム内部に保持していた薬物の局部放出を可能にすると考えられる。

この研究では、磁針により集積可能なリポソーム複合微粒子の作製と、電場により物質透過が促進されるリポソーム粒子について研究した。研究の個別課題としてあげた項目とその解決法や判明事項について以下に述べる。

- (1) 多数のリポソーム粒子を磁性粒子周囲に配す金平糖型複合微粒子の作製
 - A) 磁性粒子の選択 (分散性と磁気の兼ね合い)
 - 1 ミクロン前後のヘマタイト粒子の利用
 - B) 中心粒子の単一粒子としての水中分散性の実現
 - 磁性微粒子表面のシリカ層コーティング処理の適用
 - C) 中心粒子とリポソーム粒子の接合
 - 血清タンパク質 (リゾチーム等) をバインダーとして利用
- (2) 電場により物質を放すリポソーム
 - A) リポソーム膜の矩形波電場による物質透過能変化のメカニズム (周波数依存性、電圧依存性など)
 - 電気エネルギーの消散による物質透過能変化 (伝導度増加が有効)
 - B) 電気伝導度を増加させるリポソーム粒子の開発
 - 粒子表面電導度増加の試み (現在、研究中)

膜にイオン性脂質を混在させることによる表面電荷量の増加、表面電流量の増加
混在による膜構造の安定性 (不安定性) の変化、膜硬化の問題、自然リークの問題

現在、これらの点を考慮した最適な混合膜系を追及している。

量子ドットの生物・医療応用と安全性への問題点

山本 健二 国立国際医療センター研究所

量子ドットは最初1960年代に久保亮吾（日本の物理学者）によって、理論的に金属クラスターの量子計算を行い、日常見る金属とは著しく異なる性質を持っていることを示した。実際にこれを実現したのは、1990年代に合衆国マサチューセッツ工科大学において開発された。数ナノメートルサイズの金属クラスターの製造に成功し久保理論の実証をした。それにより金属が、ナノメートルサイズになると蛍光を発し、その粒子の大きさが大きくなれば、バンドギャップは小さくなり、低エネルギーの蛍光を発し、逆に小さくなればバンドギャップは増高し、高エネルギーの蛍光を発する性質（量子サイズ効果）、励起光の入射をくり返す事により蛍光強度が増加するような性質（光メモリー効果）等の特異的な性質を示した。

最近この量子ドットを、ナノプローブとしてイメージング技術すなわち視る技術として利用されている。実際その光量の大きさや、耐光性がすぐれ長期の一分子イメージングとして、利用されている。またこれを利用して細胞内の分子動態のみならず、細胞の生体内動態を観察する手段として注目されている。

われわれは、この量子ドットの安全性について検討している。現在 MTT アッセイでは、細胞のミトコンドリアの活性を計る技術であり、コメットアッセイは、DNA の損傷を測定する技術であり、これらの二法を用いて計測している。

その結果確かに、メルカプトウンデカン酸で表面加工するとコメットアッセイでは、陽性となり DNA 損傷が起きている。また同じ量子ドットを用いて、メルカプトグリセロールで表面加工した時には、コメットアッセイでは、陰性となり DNA 損傷が観測されない。このことにより、同じナノ粒子コアを用いて表面加工で生物毒性が異なることが判明した。すなわち、Cd/Se コアを持つナノ粒子でも十分に安全な粒子もあり、その逆に Si ナノ粒子でも表面加工を変えるとその粒子が毒性を示すことが判明した。すなわち量子ドットと細胞の相互作用は、界面と界面の情報交換で起こりそこで安全な物質、毒性のある物質とも製造可能であることが判明した。

backen@ri.imcj.go.jp

1 分子イメージングでタンパク質の機能を探る

船津 高志 東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室

全反射型エバネッセント蛍光顕微鏡を用いて、蛍光標識したタンパク質分子の機能を1分子レベルで解析できるようになった。本講演では、その例として、シャペロニン機能の1分子イメージングを紹介する。

タンパク質が機能を発揮するためには、ポリペプチドが正しく折れたたまった立体構造を形成する必要がある。折れたたみ途中でポリペプチド同士が不可逆に凝集してしまうのを阻止しているのが分子シャペロンである。様々な分子シャペロンの中で、最も研究が進んでいるのが大腸菌のシャペロニン GroEL, GroES システムである。1分子蛍光イメージング法を用いて、i) 1分子の GroEL と GroES の結合解離のダイナミクス、ii) GroEL/ES 複合体の内部で起こる GFP の折れたたみを解析した。

全反射蛍光顕微鏡を用いて、1分子の GroES が GroEL に結合・解離する様子を解析した結果、GroES は、ある中間体を経てから解離することが分り、2つの律速過程の速度定数は 0.34、0.18 s⁻¹ と見積もられた。

この中間体がどのような役割を果たしているのかを明らかにするため、続いて、シャペロニン分子内で起こる変性タンパク質の折れたたみを1分子イメージングした。このために、酸変性させた GFP を蛍光色素 IC5 で標識した GroEL の入った溶液に希釈し、変性 GFP・GroEL 複合体を作製した。この複合体を観察セルに流し込み、スライドガラス上に固定した。その後 GroES と Caged ATP を加え、紫外線を照射して ATP を生成し、シャペロニンの反応を開始させた。その結果、紫外線照射後、数秒たってから GFP の蛍光が GroEL の位置に次々と現れた。GFP が折れたたまれて蛍光を発するまでの時間のヒストグラムを作成したところ、時定数が約 3 秒と 25 秒の 2 段階反応であることが分った。一方、GFP の自発的な折れたたみは約 25 秒の 1 段階反応だった。以上の結果は、変性 GFP と GroES が GroEL の縁に同時に結合している中間体が存在し、変性 GFP が GroEL・GroES 複体内に落とし込まれて自由に折れたたみを始めるまでに約 3 秒の時間を要することを示している。この中間体はシャペロニンが変性タンパク質を空洞内に効率よく閉じこめるのに都合がよい。GroEL は、変性タンパク質、GroES と順を追って解離することで、確実に基質タンパク質を自らの空洞に閉じ込めていることが明らかになった。

このように、1分子イメージングの手法を用いて、様々な生体分子の機能解析が可能になった。

参考文献

1. Taguchi, H., T. Ueno, H. Tadakuma, M. Yoshida, and T. Funatsu. 2001. Single-molecule observation of protein-protein interactions in the chaperonin system. *Nature Biotechnol.* 19: 861-865.
2. Ueno T., H. Taguchi, H. Tadakuma, M. Yoshida and T. Funatsu. 2004. GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism. *Molecular Cell*, 14: 423-434

ペルオキシナイトライトにより誘導される神経細胞死に対する ネオエキヌリンAの防御作用

新井 孝夫 東京理科大学理工学部応用生物科学科

神経障害の防御活性をもつモノクローナル抗体は、神経障害防御機構のイメージング解析にとって有用なナノプローブである。私たちは、活性酸素類により誘導される神経細胞死を抑制するモノクローナル抗体の作製を試み、ヒドロキシラジカルによる細胞死を抑制するモノクローナル抗体 DT-1 を得た。この抗体は、アストログリアの細胞表面抗原を認識することから、アストログリアの細胞死抑制活性を有する因子の分泌を促進する作用を有していると思われる。この課題を遂行する過程で、微生物代謝物質ネオエキヌリンAがペルオキシナイトライトにより誘導される神経細胞死を抑制する作用を有することを見出した。今回は、この微生物代謝物質の防御作用について報告する。

はじめに、この物質がペルオキシナイトライトの消去能を有するが、NO やヒドロキシラジカルについては消去能を示さないことを明らかにした。次に、ペルオキシナイトライトによる細胞死に対するネオエキヌリンAの抑制能が初代培養神経細胞と分化 PC12 細胞では認められるのに対し、未分化 PC12 細胞、線維芽細胞では認められなかったことを見出した。このことは、ネオエキヌリンAの細胞死抑制能は、この物質の活性酸素消去能とともに、細胞の抗酸化能に影響している可能性を示している。さらに、ネオエキヌリンAと数時間作用させたのちにこの物質を除去した場合でも細胞死に対して耐性を示すこと、この物質はペルオキシナイトライトによるカスパーゼ-3の活性化を抑制するとともに細胞生存維持活性を示す神経栄養因子と同様に NADH-デヒドロゲナーゼを活性化することなどの結果を得、この考えを確かめた。また、ネオエキヌリンAの構造アナログを合成し、細胞死抑制活性と構造との関連についても調べた。

ネオエキヌリンAがNO及びヒドロキシラジカルには影響を及ぼさず、両者が反応して生成されるペルオキシナイトライトが標的となる点は、多くの神経疾患の治療や予防に有用な薬剤としても利用できる可能性がある。また、本研究で得られたネオエキヌリンAの作用に関する結果は、活性酸素による神経細胞死を抑制するモノクローナル抗体作製の上でも、重要なヒントになると思われる。

血液脳関門を壊さない脳標的化 DDS

澤田 誠 藤田保健衛生大学・総合医科学研究所

我々はある特殊な細胞（群）が、血流中に注入するだけで血液脳関門を越えて脳に侵入することを見いだした。この細胞浸潤においては標識細胞と水溶性蛍光色素を同時に投与しても細胞のみが浸潤することから、血液脳関門を破壊しない特殊な細胞浸潤であることが判った。我々はこの能力を持った細胞を株化することに成功したので、培養下で遺伝子導入したり、薬物封入したマイクロパーティクルを取り込ませたのち、血液中に注入することによって、脳に特異的に目的遺伝子を発現させたり薬物を送り込むことができるようになった。また、この細胞は単に脳に侵入するだけでなく、脳に侵襲があればその場所に集積する能力も持つことから、金属ナノ粒子を取り込ませた細胞を注入し、MRIにより撮像することによって脳の病変部の非侵襲モニタリングにも応用できることも判った。さらに、投与前に細胞に特殊な処理を施すことで神経損傷や脱落を抑制し、神経修復を増強することも明らかになった。この性質を利用すると脳への特異的ドラッグデリバリスシステムが構築できるだけでなく、細胞導入によって神経再生、修復が可能となることが考えられる。一方、我々は最近ミクログリアが脳に侵入するために必要な責任分子の候補分子を単離することに成功した。そこで、脳移行性分子をビオチン化して金コロイドを結合させたものをマウス頸動脈から注入して電子顕微鏡観察を行ったところ、金粒子が脳内に移行していることが確認できた。このとき、血液脳関門を壊さないメカニズム（トランス細胞侵入）により脳内へ移行している像が観察できた。さらに脳移行活性分子を提示させた組み換えファージを作成してマウスの血管内に注入したところ、ファージそのものが脳実質に侵入していることが確認できた。したがって、この技術を用いることにより薬物や PET リガンド分子などの低分子から抗体、酵素、リコンビナントタンパク質、さらに人工担体や金属粒子などあらゆる物質に脳移行性を持たせることが可能になる。この技術を応用することにより新しいタイプの脳標的化 DDS や標的化再生治療法などに利用できると考えている。

毛細管機能のフィジオミックな探索

梶谷 文彦 岡山大学大学院医歯学総合研究科 システム循環生理学

毛細管の主たる機能は組織への酸素供給であるが、ここでは代表的好気性臓器である心臓における毛細管についてフィジオミックにその機能を考察する。

毛細管は Y、T、H 型やヘアーピン状のネットワーク構造を持つとともに向流、対向流などの多様な流れを発生させやすく、これは心筋の隅々まで酸素を運搬するのに有利である。もし、毛細管内の流れが一方向性かつ、一様であれば血液のミキシングは生じにくいので、毛細管レベルでの流れの heterogeneity が必要である。事実、最近の分子血流トレーサーで血流分布の不均一性を確認している。

冠毛細管内の赤血球速度は、我々の計測も含め約 1-4mm/sec である。なぜ、窮屈な心筋内毛細管内を赤血球が比較的速くかつスムーズに流れるのであろうか。もちろん、赤血球の変形能が大きな要因ではあるが、内皮表面のグリコカリックス層（約 0.2-0.5 μm の厚さ）と赤血球の相互作用も重要である。グリコカリックスは酸化ストレスなどに弱く、その機能がそこなわれると水透過性が増して間質の浮腫を生じたり白血球の内皮下への浸潤へのバリアー機構の機能低下を来してさまざまな病態を引き起こす。

拡張期および収縮期固定ラット心筋において共焦点イメージングより求めた心周期毛細管容量変化は、約 30%であった。このことは、毛細管が拡張期優位に流れる動脈血流と収縮期優位に流れる静脈血流の間に介在する容量血管として機能することを示すとともに、動・静脈の血流の位相変化の分水嶺であることを意味する。

生理条件下での冠血流のコントロールは主として小動脈および細動脈で行われる。しかし、冠予備能を使い果たした（小動脈と細動脈を最大に開いた）条件下では、毛細管の抵抗の寄与が比較的大きくなり、極端な場合には全冠血管抵抗の数十%をも占めるようになる。冠動脈狭窄などの冠予備能が少なくなった際に毛細管機能障害が生じると局所血流にとってクリティカルな事態をもたらす。また、再灌流治療後の血流障害である no-reflow 現象の一因として血液貯留能低下などの毛細管機能障害が指摘されている。

最近、太い動脈血流と毛細管血流の量的解離が生じることが指摘されるようになり、血漿流と血球の流れの分離が再論議されつつある。元来、血流は血球（固相）と血漿（液相）との二相流であるが、固相と液相の部分的分離は、広義のディリクルートメント（derecruitment）であり、血漿のみが流れる毛細管が増加するとその周辺の心筋への酸素供給が不十分となる。

赤血球による微小循環機能制御機構と病態 — メタボローム解析技術による探索 —

末松 誠 慶應義塾大学医学部 医化学教室

ガス状メディエータは生体内で生成される低分子で細胞膜を他の物質に比べて容易に通過して蛋白質をはじめとする生体高分子の「隙間」に入り込み、部位特異的に結合してその機能を調節するさよう特徴を持つ分子群である。我々の教室では heme oxygenase (HO) から生成される一酸化炭素 (CO) が肝臓の類洞血管を恒常的に弛緩させ、この臓器に低い血管抵抗を保障することで血流維持作用をもたらすことを示し、内因性の CO が血管機能制御に関与することを証明した。これを契機として生体内での CO が NO と類似の血管拡張物質であることを示唆する報告が多数提示されたが、我々の知る限り両者は全く異なるガスメディエータであることをいくつかの実験から証明してきた。まず、抵抗血管の平滑筋細胞に HO-1 を高発現させると CO を介した NO 依存性血管拡張反応の減弱により、全身血圧が増加すること、あるいはヘム蛋白である Soluble guanylate cyclase (sGC) の活性化を感知する単クローン抗体を用いた免疫組織学的解析から、CO の増加が NO による細胞内 sGC 活性化を阻害することを示し、CO の生物作用は局所の NO のレベルによって 2 面性を以って現れることを明らかにした。ガス分子の作用点やレセプタ分子を探索することは困難を極めるが、メタボローム、いわゆる網羅的一斉代謝物解析技術を応用することにより戦略的に特定のガス分子の作用点を同定し、その生物学的考察を推進することが可能になった。その成果のひとつとして、ストレス誘導性 HO-1 由来の CO により、methionine から cysteine を生成する rate-limiting heme enzyme である cystathionine beta synthase が阻害され、肝臓の thiol 代謝の remodeling が起こることが明らかになった。CO のこのような作用は NO には存在しない。さらに代表的なヘム蛋白である hemoglobin は赤血球において酸素運搬体としてだけでなく、局所の酸素濃度を感知しながら各種の代謝物を活発に出し入れするメタボリックシンクとして作用し、CO はその作用を阻害、NO は活性化することが明らかになった。これら 3 つの現象はともに CO がヘムに結合すると 6 配位、NO が結合すると 5 配位をとるという根本的な違いからくる構造蛋白のコンフォメーション変化の違いによるものである。また cystathionine beta synthase の CO による阻害は第 3 のガスメディエータである硫化水素の阻害を起し、胆汁の quality control ももたらすことがあわせ明らかになった。講演では Gas Biology から見た新しい代謝制御ネットワークの解明について最新の知見を報告する。

糖尿病における血球と微小循環系の障害 —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—

関塚 永一 独立行政法人国立病院機構埼玉病院

糖尿病は現代を代表する生活習慣病であり、患者数は予備軍を含めると1000万人を超える。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。慢性高血糖により直接・間接的に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、致命的な合併症を引き起こす。血球成分である赤血球、血小板、白血球や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、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による血小板凝集能の亢進を示した。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、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し、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、微小流路を流れる赤血球を、高速度ビデオカメラで直接観察し、糖尿病赤血球の著しい変形能低下を証明した。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。

糖尿病性合併症の一つである脳梗塞において、血栓を取り除くことが逆に血栓の増加や脳浮腫の増大など、より状態を悪化させる「再灌流障害」につながる。そこで、マルチカラーイメージングを用いて血栓の原因となる白血球を赤に、血小板を緑に蛍光染色し、その動態について相互作用の解析を行った。また、*in vitro* では、擬似微小血管モデルである MC-FAN を用いて、マルチカラーイメージング手法を利用し、血小板凝集能、白血球膠着能および赤血球変形能について着目して、両者を定量化することにより、健常者および糖尿病患者における血小板および赤血球が血流動態に及ぼす影響について検討することを目的とした。

参考論文

- (1) J.Appl.Physiol., 96, pp1561-1568, 2004. (2) J. Pharmacol Sci., 93, pp227-233, 2003
- (3) IEEE EMBC 2003, pp1054-1057, 2003 (3) Microcirculation Annual, 19, 2003.
- (5) Microcirculation Annual, 20,2004

In Vivo Imaging

ナノイメージングの新技术で血管炎発症初期の分子機構を解明する

鈴木 和男 国立感染症研究所

共同研究者：長尾朋和^{1*}、村山研^{1,2}、松村実美子^{1,3}、山岸舞⁴、大川原明子¹、馬淵綾子⁵、南谷晴之³、三浦典子⁶、大野尚仁⁶、星野昭芳^{1,7}、長谷川明洋⁸、船津高志⁴、山本健二⁷、中山俊憲⁸、新井孝夫²

¹国立感染研・生物活性物質、²東京理科大・理工、³慶應大・院理工、⁴東京大院薬、⁵オタゴ大(ニュージーランド)、⁶東京薬大・薬、⁷国立医療センター研、⁸千葉大院医、*現コーネル大・医(ニューヨーク)

バイオイメージングによる生体内の動態を解析することが常套手段として行われるようになってきている。この技術は、*in vivo imaging* としてわれわれが提唱してからそれほど時間も経っていないが、急速に種々の生体機能に欠かせない方法として定着しつつある。一方、*in vivo imaging* には、ナノプローブの開発とその利用が必須である。今回は、新たなプローブによる *in vivo imaging* による血管炎発症の初期過程について述べる。

血管炎、特に急速進行性糸球体腎炎の発症には好中球自己抗体(MPO-ANCA)が関与しており、血液力学的因子が関与していることから、*in vivo* での検討が欠かせない。血管炎モデルマウスにより myeloperoxidase (MPO) 投与による血管炎発症過程をしらべた。また、MPO 抗体を QD で標識し(QD-antiMPO)し MPO の動態解析を試みた。一方、CD69 分子を発現する細胞が血栓形成に関与、特に、CD69 分子を表出する好中球が炎症反応に関与している可能性が示唆されていることから、CD69 分子動態についても述べる。

①*in vivo* イメージング：MPO-ANCA 投与により、血流速度の低下、血流の逆流、白血球の接着が見られた。また、通常血管外には漏れでない血漿成分が、MPO-ANCA 投与により血管外に漏出した。

②MPO-ANCA の血管内皮細胞への作用：MPO 抗体の濃度依存的に血管内皮細胞の ICAM-1 発現が上昇した。Fab 抗体でも同様の反応が見られた。この結果は、MPO 抗体が直接血管内皮細胞に作用していることを示唆している。

③ナノプローブ標識 MPO 抗体(QD-antiMPO)による MPO の認識：未刺激状態のヒト好中球には QD-antiMPO は結合しなかった。FMLP 刺激で活性化した好中球は、細胞表面に QD-antiMPO 抗体が特異的に結合した。また、0.1% Triton-X で処理し細胞膜透過させた場合は、MPO が細胞内に顆粒状に存在することが観察された。マウス好中球においても同様の結果が得られた。ヒトならびにマウスの好中球が活性化に伴って MPO を細胞表面に漏出させることが示された。

④活性化した好中球の細胞膜表面に局在する CD69 分子：CD69-KO マウスでは、血管内への活性酸素誘導の血栓形成による血流遮断が有意に遅延した。また、共焦点レーザー顕微鏡、FACS 解析により、炎症性サイトカインや走化性因子の刺激により CD69 分子が細胞膜周囲に局在した。また、射光照明蛍光顕微鏡を用いて CD69 分子の細胞膜局在に偏りが観察された。

Th1/Th2 細胞分化と気道炎症制御

中山 俊憲 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学

マウスでの喘息モデルとして卵白アルブミン (OVA) を用いた気道炎症モデルがある。これは、OVA-alum で免疫後、OVA を吸入させて気道炎症を起こすものである。OVA 特異的 Th2 細胞の分化・誘導が必須で、気管支周囲や血管周囲に好酸球性の浸潤を特徴とする。メタコリンなどによる気道収縮を起こしたときに非常に強く反応する (気道過敏症) ことで機能的な評価も可能であり、喘息のマウス実験モデルとして使用されている。今回は、TCR の下流の Ras/ERK MAPK カスケード、シグナル伝達を抑制する機能を持つ分子 SHP-1 (src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase) の Th2 分化および気道炎症における役割と NKT 細胞の気道炎症における関わりについての研究を紹介する。生理的には SHP-1 が Th2 細胞の分化を抑制していること、量が半減すると Th2 細胞の分化が亢進し、Th2 依存的气道炎症が増悪することがわかった(1)。NKT 細胞に関しては、経腹腔的にチャレンジすると効果は見られないが、経鼻的にチャレンジすると発症に NKT の存在が気道炎症の発症に必須であり、産生する IL-4 と IL-13 が関与していることが明らかになった(2)。この研究結果は上気道の樹状細胞の特殊性を示唆している。喘息の新しい治療法を開発する上で、これらの知見は有用であると考えている。さらに、最近得られた、マスト細胞の TLR4 が気道炎症の発症に深く関与しているということを示唆する実験結果を紹介する。

参考文献

- 1) Kamata, T., Yamashita, M., Kimura, M., Murata, K., Inami M., Shimizu, C., Sugaya, K., Wang C.-R., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: *src* homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase SHP-1 controls the development of allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* 111:109-119 (2003).
- 2) Akbari, O., Meyer, E., Stock, P., Kronenberg, M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Grusby, M. J., DeKruyff, R. H., and Uematsu, D. T.: Critical role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 9:582-588 (2003).

細胞障害メカニズムのイメージングプローブ： 血管組織，内皮細胞，HeLa 細胞等への応用

川西 徹、 大幡久之

国立医薬品食品衛生研究所生物薬品、昭和大学薬学部薬理学

組織細胞障害の解析研究に応用可能な細胞内生化学現象のイメージング用蛍光プローブ開発、および蛍光顕微鏡画像解析技術開発を行った。

細胞死に係るシグナルトランスダクションメカニズムであるカスパーゼカスケードをイメージングするための各種蛍光プローブを作製し、さらに 2 種のプローブを同時使用するマルチカラーイメージングを試みた。細胞死に関わるカスパーゼは多種類存在しており、シグナル伝達の上流で働くイニシエーターカスパーゼ (IC)、下流で働くエフェクターカスパーゼ (EC) の 2 種類に大別される。そこで FRET 現象を生じる 2 種の蛍光性タンパク質の間に、これらカスパーゼによって切断されるペプチド配列を挟む融合タンパク質を各カスパーゼ活性化検出用プローブとして設計、作製し、蛍光特性等を比較検討した。この中で、EYFP と DsRed を用いた IC 活性化プローブ、ECFP と DsRed を用いた EC 活性化プローブを同一 HeLa 細胞に発現させ、それぞれ 488 nm 励起による EYFP 蛍光の上昇（及び DsRed/EYFP 蛍光強度比の減少）、458 nm 励起による ECFP 蛍光の上昇によってカスパーゼ活性化をモニターすることにより、二種のカスパーゼ活性化の同一細胞、同時解析に成功した。この方法を用いると、TNF- α 刺激後 IC の活性化までは細胞個々で 30 分～5 時間と大きな違いがあるものの、すべての細胞において IC の活性化から EC の活性化までのカスパーゼカスケードは 10 分前後の短い時間経過で生じることが明らかとなった。これらの結果以外に、カスパーゼ活性化プローブを細胞内オルガネラ内に発現させ、オルガネラ内のカスパーゼ活性化のイメージングを行った結果を報告する。

生理活性リン脂質のリゾホスファチジン酸 (LPA) は摘出マウス大動脈の内皮細胞への流れ刺激に依存したカルシウム応答を著明に増強するが、この現象は動脈硬化症等の病態時の血管傷害に係る可能性がある。そこで、内皮細胞にカルシウム蛍光プローブの fluo-4/AM を取り込ませたマウス大動脈組織を自作の平行平板型流れ刺激負荷チャンバーに固定し、流れ刺激下 (20、40 dyne/cm²) のカルシウム応答、血管収縮応答及び内皮細胞傷害性に対する LPA の影響を共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージングによって解析した。その結果、シェアストレス 20 dyne/cm² では 3 μ M LPA により、40 dyne/cm² では 1 μ M LPA により内皮細胞の反復性のカルシウム応答の後に血管組織の収縮応答が認められ、さらに、シェアストレス 40 dyne/cm² において 3 μ M LPA 適用により、持続的なカルシウム上昇を起こす内皮細胞がその数分後に fluo-4 の漏出が生じ、内皮細胞傷害が示唆された。本実験系は、組織構築を保った血管組織における流れ刺激依存的なカルシウム応答、血管収縮応答及び内皮障害性を同時に細胞レベルで観察することが可能であり、血管病態解明の有用なツールとなると考えられる。

α -NO ヘモグロビン含有赤血球の出血性ショック に対する微小循環改善効果

塚田孝祐¹, 菅沼和弘¹, 米谷 隆², 末松 誠¹

¹慶應義塾大学医学部 医化学教室, ²ペンシルバニア大学 生化学

赤血球の主作用は酸素運搬や酸塩基平衡の調節であるが, 血流中の赤血球が積極的に微小循環を維持し, 酸素供給の低い領域に選択的に酸素供給を行う metabolic sink として作用していることがこれまでの研究から明らかになった. このメカニズムのトリガーとして作用するのが Hb のアロステリーであると仮説を立て, NO を Hb 蛋白の α 鎖に特異的に修飾させることでアロステリーを人為的に T 型に安定化させた赤血球を作製し, その微小循環血流保持機構や酸塩基平衡維持作用に対する効果を検討した.

Wistar 系雄性ラットを Isoflurane 麻酔下で腹部に縦横切開を加え肝臓を露出し, 顕微鏡ステージに展開した. 大腿動脈から脱血して血圧を 15 分間 40 ± 5 mmHg にコントロールし, その後大腿静脈から返血蘇生した. 輸血には洗浄赤血球 (RBC), α -NO-Hb 含有洗浄赤血球 (α -NO-RBC) を用い, 平均動脈血圧, 胆汁流量, 肝類洞の functional sinusoidal density (FSD), 類洞径, ならびに中心静脈酸素分圧を測定して検討を加えた. また脱血前および蘇生 60 分後に動脈血を採取し, 血液ガス分析を行った.

輸血後の血圧・中心静脈酸素分圧は RBC, α -NO-RBC 共に baseline まで回復した. また胆汁分泌量は α -NO-RBC で著明に増大した. 蘇生 60 分後の血液ガス分析から, RBC では代謝性アシドーシスを示したが α -NO-RBC では正常レベルまで改善されており, α -NO-RBC では何らかの機序により代謝性アシドーシスを改善する効果を有することが示唆された. 以上よりヘモグロビンアロステリーを T 型に安定化した α -NO-RBC は微小循環を改善する効果があることが示唆された.

酸化ストレスに基づく微小循環障害のマルチフォトリックイメージング

南谷 晴之

慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻

微小循環は数～数十マイクロメートルオーダーの非常に細い細動脈、細静脈、毛細血管、微小リンパ管などで構成されており、心ポンプの働きで送られてきた血液を組織や臓器に分配する役割を担っている。このような微小循環系は、酸素や栄養素を細胞に供給し、引き換えに二酸化炭素や老廃物を受け取って排出する機能を有し、ガス交換と物質代謝を頻繁に行って生命現象の恒常性維持にもっとも重要な役割を果たしている。一方、酸化ストレスは生体の内因性あるいは外因性因子によって活性酸素の処理が不十分な状態になるために生じるもので、恒常性の破綻に伴う活性酸素亢進や消去系の機能低下で活性酸素種の蓄積、より反応性の高い活性酸素種の生成が起こり、直接・間接的に微小循環障害に深く関わる。本研究では、Translational Research の観点からラット・マウスの微小循環を対象に光化学反応に基づく酸化ストレス付加モデルと虚血再灌流モデルを構築し、実質臓器内での酸化ストレスと微小循環障害の関係を各種蛍光・燐光ナノプローブのマルチフォトリックイメージング技術を駆使して解析した。臓器・組織微小循環の血流動態を可視化するために、①FITC-dextran iv 投与による血漿成分の蛍光標識を行い、全血血流動態を定量解析した。②ドナーから採血した赤血球の約5%をFITCでex-vivo標識した後、対象に投与し個々の蛍光標識赤血球の流動現象を可視化して赤血球の流速測定を行った。③白血球はアクリジンオレンジをiv投与体内染色するか、ローダミン6Gでex-vivo標識して、白血球のローリングや粘着数を可視化計測した。④血小板の可視化にはCFSEかローダミン6Gをiv投与体内染色するか、CFDASEでex-vivo標識した後、対象に投与し血小板の粘着や凝集塊の計測あるいは血栓生成動態を可視化評価した。これらの可視化解析に多波長励起マルチカラーフォトリックイメージングシステムを用い、画像相関法で血球細胞の速度計測を行った。またPdポルフィリンからの燐光寿命より酸素分圧を計測する技術を開発し、対象微小循環・組織の酸素分圧と蛍光標識細胞の流動現象を同時計測した。予め、対象動物にPdポルフィリンをiv投与し、対象となる微小血管にNd-YAGパルスレーザーSH光を照射する。酸素濃度に依存して発光する燐光をフォトマルで検出し、燐光寿命 τ より酸素分圧 pO_2 を求めた。一方、活性酸素のイメージング解析には、 O_2^- にはDHE、 H_2O_2 にはDHF-DA、 $\cdot OH$ および $ONOO^-$ にはHPFなどの蛍光試薬を用いて培養血管内皮細胞に発現する活性酸素を定量化した。結果として、光化学反応をトリガーとする活性酸素産生亢進において、内皮細胞の細胞骨格F-actinの重合、細胞接着tight junctionの喪失、細胞短縮、内皮下露出の顕著な増加、さらに血小板および好中球の内皮細胞接着性が有意に増加し血栓形成が促進されることを明らかにした。また、 β_2 インテグリン(CD18)、ICAM-1、CD11aの関与が認められ、血小板のVLA-2、vWFの関与も強く認められた。脳など実質臓器における虚血再灌流時の血行動態と酸素代謝解析では、虚血脳表層の血流速度の低下、酸素分圧の低下、白血球のrolling粘着と血小板の粘着亢進を認めた。糖尿病では易血栓性が一層顕著となることも確認した。

平成14年度 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
船津高志	1分子蛍光イメージング法	御子柴克彦 清水孝雄	感覚器官と脳内情報処理	共立出版	東京	2002	pp.192-199
H.Matsumura K.Furusawa	Aggregation of Liposomes and Effects of Electric Fields on it	A.Delgado	Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis	Marcel Dekker	New York	2002	pp.971-982
K.Furusawa H.Matsumura	Electrokinetic characteri- zation of colloid particles for composite preparation	J.A.Schwarz C.I.Contescu K.Putyera	Encyclopedia of Nano- science and Nano- technology	Marcel Dekker	New York	2003	773-786

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Ishikawa, E. Sekizuka, C. Oshio N. Yamaguchi, K. Tsukada, and H. Minamitani	Platelet adhesion and anterior dilation during photothrombosis -- Observation with rat closed cranial and spinal windows	J. Neurological Sci.	194 (1)	59-69	2002
南谷晴之, 高橋美帆, 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
T.Nagao, K.Matsuzaki, M.Takahashi, , Y. Imazeki, and 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
M.Takahashi, T.Nagao, Y. Imazeki, K. Matsuzaki, and 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
T.Nagao, K.Matsuzaki, M. Takahashi, Y. Imazeki, and 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
M.Takahashi, T.Nagao, K. Matsuzaki, T. Nishimura and H. Minamitani	Photodynamically induced endothelial cell injury and neutrophil-like HL-60 adhesion	J. Photoscience	9 (2)	518-520	2002
南谷晴之, 川村友美, 塚田孝祐, 飯島淳彦, 関塚永一, 大塩 力	原子力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
塚田孝祐, 酒井修平, 長谷憲太郎, 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
H. Minamaitani, K. Tsukada, E. Sekizuka, C. Oshio	Mesurement of blood flow and oxygen tension using flouorescent and phosphorescent probes in organ microcirculation	Microcirculation Annual	18	13-14	2002
K. Tsukada, Y. Ogata, N. Yamaguchi, E. Sekizuka, C. Oshio and H. Minamitani	Blood flow analysis in cerebral microcirculation during exchange blood trasfusion with hemoglobin-encapsulated liposome	Microcirculation Annual	18	41-42	2002
T. Ozawa, E. Sekizuka C. Oshio, K. Tsukada, T. Uchida, H. Nakadate and H. Minamaitani	Mechanism of increased platelet aggregation in diabetes mellitus -- Newly-devised investigation with laser scattering platelet aggregometer--	Microcirculation Annual	18	53-54	2002
T. Uchida, E. Sekizuka, C. Oshio K.Tsukada, T. Ozawa, H. Nakadate and H. Minamaitani	Investigation on the thrombus formation of diabetes mellitus	Microcirculation Annual	18	67-68	2002
H. Nakadate, E. Sekizuka, C. Oshio K.Tsukada, T. Uchida,, T. Ozawa and H. Minamaitani	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

K. Hase, S. Sakai, K. Tsukada, E. Sekizuka, C. Oshio and 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
K. Tsukada, S. Sakai, K. Hase and H. Minamitani	Development of catheter-type optical oxygen sensor and applications to bioinstrumentation	Biosensors and Bioelectronics	18 (12)	1439-1445	2003
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	15 (4)	196-197	2003
A. Iijima, M. Haida, N. Ishikawa, A. Ueno H. Minamitani and Y. Shinohara	Re-evaluation of tropicamide in the papillary response test for Alzheimer's disease	Neurobiol. Aging	24	789-796	2003
M.Takahashi, T.Nagao, Y. Imazeki, K. Matsuzaki, and H. Minamitani	Roles of reactive oxygen species in monocyte activation induced by photochemical reaction during photodynamic therapy	Frontiers of Biomed Eng.	11 (4)	279-294	2002
H. Minamitani, K. Tsukada, E. Sekizuka and C. Oshio	Imaging and functional analysis of blood flow in organic microcirculation	Jpn. J. Pharmacol.	93 (3)	227-233	2003
鈴木和男	SCG/Kj マウスとANCA 関連血管炎--血管炎病態に関する好中球機能: 動物モデルを用いた解析から--	リウマチ科	28	570-577	2002
Y. Aratani, F. Kura, H.Akagawa, Y.Takano, K. Suzuki, M.C. Dinauer, N. Maeda and H. Koyama	Critical role of myeloperoxidase and NADPH-oxidase in high-burden systemic infection of mice with <i>Candida albicans</i>	J. Infect. Dis.	185	1833-1837	2002
Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe H.Akagawa, Y.Takano, K. Suzuki, M.C. Dinauer, N. Maeda and H. Koyama	Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with <i>Candida albicans</i> and <i>Aspergillus fumigatus</i>	Med. Mycol.	40	557-563	2002
Frederik Vilhardt, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, Didier Trono and Karl-Heinz Krause	The HIV-1Nef Protein and Phagocyte NADPH Oxidase Activation	J. Biol. Chem.	277	42136-43	2002
Koji Ichimori, Naoto Fukuyama, Hiroe Nakazawa, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Shunya Takizawa, Yosuke Kumeoka, Akiko Ishida-Okawara, Fumikazu Kohi and Kazuo Suzuki.	Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice	Free Radical Research	37	481-489	2003

Mie Ito, Oda, S. Yamagoe, K. Suzuki, M. Tanokura	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
Mami Ishikawa, Ejichi Sekizuka, Boris Krischek, Ulrich Sure, Raif Becker and Helmut Bertalanffy	Role of nitric oxide in the regulation of spinal arteriolar tone	Neurosurgery	50 (2)	371-378	2002
K. Hatanaka, R. Hokari, K. Matsuzaki, S. Kato, A. Kawaguchi, S. Nagao, H. Suzuki, K. Miyazaki, E. Sekizuka, H. Nagata, H. Ishii and S. Miura	Increased expression of mucosal addressin cell adhesionmolecule-1 (MAdCAM- i) and lymphocyte recruitment in murine gastritis induced by Helicobacter pylori	Clin Exp Immunol	130	183-189	2002
山口則之, 小野塚聡, 関塚永一, 赤路和則	糖尿病における脳微小循環障害の特徴と外科的治療特集 糖尿病と微小循環	Complication	7 (2)	68-74	2002
Hikaru Tanaka, Eichi Ishii, Ryouichi Fujisaki, Yusuke Miyamoto, Yoshio Tanaka, Tokiko Aikawa, Wataru Hirayama, Toru Kawanishi and Koki Shigenobu	Effect of manganese on guinea pig ventricle: Initial depression and late augmentation of contractile force	Biol. Pharm. Bull.	25 (3)	323-326	2002
M. Yamada, K. Takahashi, M. Tsunoda, G. Nishioka, K. Kudo, H. Ohata, K. Kamijima, T. Higuchi and K. Momose	Differential expression of VANP2/synaptobrevin-2 after antidepressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex	Pharmacogenomics J.	2	377-382	2002
T. Hashimoto, Y. Nakano, M. Yamashita H. Ohata and , K. Momose	Role of Rho-associated protein kinase and histamine in lysophosphatidic acid-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs	Jpn. J. Pharmacol.	88	256-261	2002
Tetsu Kobayashi, Shingo Niimi, Toru Kawanishi, Masamichi Fukuoka and Takao Hayakawa	Changes in peroxisome proliferator-activated receptor γ -regulated gene expression and inhibin/activin-follistatin system gene expression in rat testis after an administration of di-n-butyl phthalate	Toxicology Letter	138	215-225	2003
S. Niimi, T.Oshizawa, T. Yamaguchi, M. Harashima, T.Seki, T. Ariga, T. Kawanishi and T. Hayakawa	Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes	Biochem. Biophys. Res. Comm.	300	770-774	2003
百瀬和享, 松田武久, 大池正宏, 小原一男, Ismail Laher, 杉浦清了, 大幡久之, 中山貢一	メカニカルストレス応答による細胞機能制御創薬と再生臓器開発への応用	日本薬理学雑誌	121	103-111	2003

T. Hashimoto, M. Yamashita, H. Ohata and Kazutaka Momose	Lysohosphatidic acid enhances in vivo infiltration and activation of guinea pig eosinophils and neutrophils via a Rho/ROCK-mediated pathway	J. Pharmacol. Sci.	91	8-14	2003
Hikaru Tanaka, Kazuide Nishimaru, Ryuji Makuta,Wataru Hirayama, Taro Kamakura, Tomoyuki Matsuda, Yoshio Tanaka, Toru Kawanishi and Koki Shigenobu	Possible Involvement of Prostaglandins F2 and D2 Acetylcholine-Induced Positive Inotropy in Isolated Mouse Left Atria	Pharmacology	67	157-162	2003
Wataru Nishii, Takafumi Maruyama, Rieko Matsuoka, Tomonari Muramatsu and Kenji Takahashi	The unique sites in SulA protein preferentially cleaved by ATP-dependent Lon protease from Esherichia coli	Eur. J. Biochem.	269	451-457	2002
Yoriko Sawano, Tomonari Muramatsu, Ken-ichi Hatano, Koji Nagata and Masaru Tanokura	Characterization of Genomic Sequence Coding for Bromelain Inhibitors in Pineapple and Expression of Its Recombinant Isoform	Journal of Biological Chemistry	Vol.277,No.31	28222-28227	2002
R. Yagi, W. Suzuki, N. Seki, M. Kohyama, T. Inoue, T. Arai and M. Kubo	The IL-4 production capability of different strains of native CD4+ T cells controls the differentiation of the helper T cell response	Int. Immunol.	14	1-11	2002
R. Yagi, H. Nagai, Y. Iigo, T. Akimoto, T. Arai and M. Kubo	Development of atopic dermatitis-like skin lesions in STAT6-deficient NG/Nga mice	J. Immunol.	168	2020-2027	2002
T. Hashimoto, T. Wakabayashi, A. Watanabe, H. Kowa, R. Hosoda, A. Nakamura, I. Kanazawa, T. Arai, K. Takio, D.M.A. Mann and T. Iwatsubo	CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor	CLAC-P/collagen type XXV. EMBO J.	21	1524-1534	2002
Takashi Ohuchi, Schio Maruoka, Akikazu Sakudo and Takao Arai	Assay-based quantitative analysis of PC12 cell differentiation	Journal of Neuroscience Methods	118	1-8	2002
S. Namekawa, F. Hamada, T. Sawado, S. Ishii, T. Nara, T. Ishizaki, T. Ohuchi, T. Arai and K. Sakaguchi	Dissociation of DNA polymerase α -primase complex during meiosis in Coprinus cinereus	E. J. Biochem.	270	2137-2146	2003
霜田幸雄, 呉桂栄, 中西敏雄, 重松康秀	肺動脈単離平滑筋におけるCaイオンの動態	日本バイオイメージング学会	第11回 学術集会	171-172	2002
霜田幸雄, 呉桂栄, 中西敏雄, 重松康秀	肺動脈平滑筋におけるCaイオンの動態	日本バイオイメージング学会	第11回 学術集会	173-174	2002
霜田幸雄	膜電位感受性色素による脊椎動物網膜細胞のグルタミン酸応答の記録	日本バイオイメージング学会	第11回 学術集会	181-182	2002