

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、報告者らが作製した 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、本炎症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。

B. 研究方法

実験には 8-10 週令の雌マウスを使用した。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 の各マウスの背部に UVB を照射し、0、48、または 72 時間後の皮膚組織切片を常法にしたがって作製し、H&E 染色および免疫染色を行った。

C. 研究結果

UVB を照射したマウスの皮膚の炎症細胞の浸潤および組織の形態変化を H&E 染色像で観察した。UVB 照射後 48 時間では、Wild-type マウスには炎症細胞の浸潤が認

められなかった。一方、MPO-KO マウスでは既に真皮層への炎症細胞の浸潤がわずかに認められた。CGD マウスでは MPO-KO マウスよりも顕著な炎症細胞の浸潤と上皮の剥離が認められた。さらに、MPO-KO/CGD マウスでは最も顕著な炎症細胞の浸潤と重度の上皮の剥離が認められた (図 1)。

UVB 照射後 72 時間が経過すると、Wild-type マウスでも顕著な炎症細胞の浸潤と重度の上皮の剥離が認められた。この症状は、照射後 48 時間の MPO-KO/CGD マウスに類似するものであった。一方、MPO-KO マウスでは既に炎症細胞の浸潤の沈静化が認められた。CGD マウスでは炎症細胞の浸潤はほとんど認められなくなっており、炎症は沈静化していた。さらに MPO-KO/CGD マウスでは炎症が沈静化しているだけでなく、表皮有棘層の再構成が認められた。以上の結果から、Wild-type マウスと比較して MPO-KO マウスの方が早期に皮膚炎を進行させ、CGD マウスはより早期に、MPO-KO/CGD マウスが最も早期に皮膚炎を進行させることが明らかになった。

炎症細胞を同定するために、好中球特異的な Gr-1 抗体を用いて、免疫組織化学染色を行ったところ、UVB 照射後 48 時間では、Wild-type マウスには Gr-1 陽性細胞は検出されなかったが、MPO-KO マウスでは既に好中球の浸潤がわずかに認められた。CGD マウスでは MPO-KO よりも顕著な好中球の浸潤が認められた。さらに MPO-KO/CGD マウスでは最も顕著な好中球の浸潤が認められた (図 2)。続いて、マクロファージ特異的な

F4-80 抗体を用いて同様の実験を行ったところ、好中球の浸潤速度と同様の傾向が得られた。すなわち、UVB 照射後 48 時間では、Wild-type マウスには F4-80 陽性細胞は検出されなかったが、MPO-KO マウスでは既にマクロファージの浸潤がわずかに認められた。CGD マウスでは MPO-KO よりも顕著なマクロファージの浸潤が認められた。さらに MPO-KO/CGD マウスでは、最も顕著なマクロファージの浸潤が認められた。UVB 照射後 72 時間になると、Wild-type マウスでも顕著なマクロファージの浸潤が認められた。その浸潤量は、照射後 48 時間の MPO-KO/CGD マウスに類似するものであった。一方、MPO-KO マウスでは既にマクロファージの浸潤が沈静化し始めていた。CGD マウスではほとんどマクロファージは認められなかった。さらに MPO-KO/CGD マウスではマクロファージの浸潤は完全に沈静化していた。

UVB により誘発された皮膚傷害において、MMP の関与が示唆されている。中でも、MMP-9 は好中球やマクロファージにより産生されることが知られている。そこで、図 1 で観察された皮膚炎時に MMP-9 が産生しているかを免疫組織学的に解析した。その結果、好中球やマクロファージの浸潤速度と同様の傾向が得られた。

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皮膚組織で発現していることが、皮膚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、皮膚で MMP-9 を産生している細胞は、皮膚に浸潤してきた好中球とマクロファ-

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、UVB 照射を施した皮膚に好中球やマクロファージが早期に浸潤し、その結果、皮膚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 UVB 誘発皮膚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皮膚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皮膚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紫外線誘発皮膚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) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M. C., Maeda, N., and Koyama, H.: *In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn J Infect Dis.* 57: S15 (2004).
- 2) Sugo, N., Niimi, N., Aratani, Y., Takiguchi-Hahashi, K., and Koyama, H.: p53 deficiency rescues neuronal apoptosis but not differentiation in DNA polymerase β -deficient mice. *Mol. Cell Biol.* 24: 9470-9477 (2004).

2. 学会発表

- 1) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機：ミエロペルオキシダーゼと真菌感染。生体防御機能異常ワークショップ2004、2004年6月（沖縄）
- 2) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの生体防御能。第26回日本フリーラジカル学会学術集会、2004年6月（山形）
- 3) Komatsu, J., Koyama, H., and Aratani, Y.: Role of neutrophil-derived reactive oxygen species for the ultraviolet-induced skin Inflammation. 第77回日本生化学会大会、2004年10月

(横浜)

- 4) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M., Maeda, N., and Koyama, H.: *In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense. 4th international Peroxidase Meeting, Kyoto, October 27, 2004.
- 5) 新見直子、菅生紀之、荒谷康昭、小山秀機：神経発生期におけるBERとNHEJの相互作用。第27回日本分子生物学会年会、2004年12月（神戸）

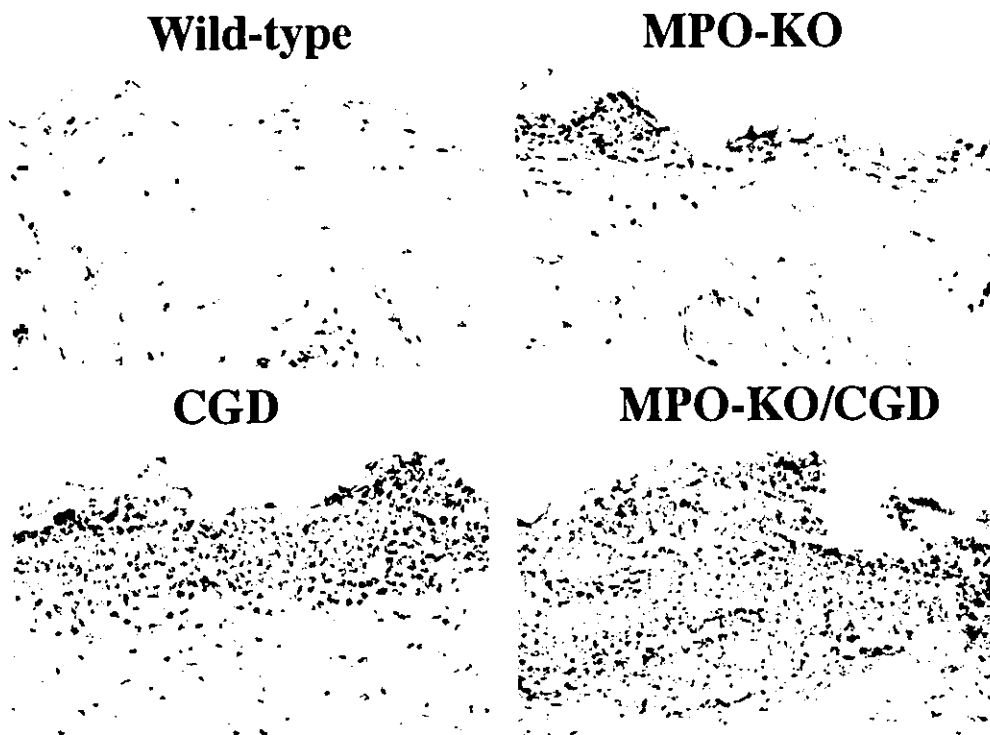


図1 UVB 照射 48 時間後の皮膚組織切片の HE 染色像

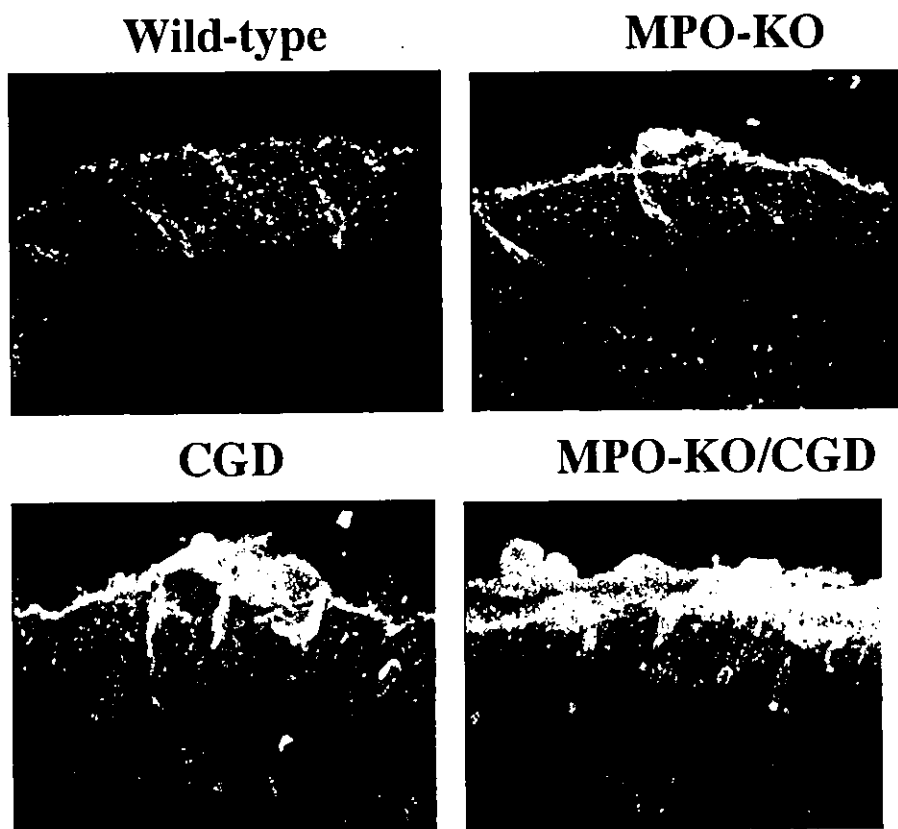


図2 UVB 照射 48 時間後の抗 Gr1 抗体による好中球の染色像

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

量子ドットの多臓器不全診断治療への応用

分担研究者 山本 健二 国立国際医療センター 研究所・副所長
協力研究者 星野 昭芳 国立国際医療センター研究所・流動研究員
協力研究者 真鍋 義則 国立国際医療センター研究所・研究生
協力研究者 藤岡 宏樹 国立国際医療センター研究所・研究生
協力研究者 塩原あまね 国立国際医療センター研究所・研究生

研究要旨

本研究の目的は、量子ドット（半導体ナノ粒子）を用いたナノプローブの開発とその利用による生体組織、培養細胞内の可視化技術の開発、次年度は各種イメージングシステムの改良と新規開発によりガンマグロブリンの生体内動態解析を行う。様々な疾患に対するガンマグロブリンによる治療過程、およびそのメカニズムについて局所高感度診断を遂行、超極限分子プローブを用いたガンマグロブリンの治療効果を評価することを示す。本年度は、シグナルペプチドを用いて細胞内小器官への局在化をイメージングする技術を開発した。

A. 研究目的

半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を出すことが可能であるため、細胞内レベルから生体レベルまで、その動体を追跡することが可能である。我々は、これまでに細胞内小器官であるライソゾームのマーカーとなる蛍光プローブを開発している。また細胞質全体を量子ドットで染色する方法を開発している、さらに本年度は特に細胞の核とミトコンドリアを特異的に染色する方法を開発することを目的に研究を進めた。

B. 研究方法

細胞内小器官の染色については、本研究初年度アルブミンとの結合より、ライソゾームへの伝達に成功している。また2年度には、リポソームにより細胞質への伝達が可能と成った。本年度は、まず、上記のようにして得られた量子ドットに、アダプター分子を作成し、それを介してシグナルペプチドを結合させることを行っている。

この方法により、安定に量子ドットとシグナルペプチドが結合され、また水溶液中にて分散可能となる。

1) シグナルペプチド

核やミトコンドリアに特異的に局在化するシグナルペプチドを何本か合成しそれを用いて量子ドットに結合させた。実際にいくつか試し成功した例を以下に示す。

2) 量子ドット作成

現在量子ドットは、赤、黄色、緑が作成できる。これを利用し同時に異なる細胞小器官を染色することがかのである。

3) 安全性

量子ドットの安全性は、MTTアッセイ、コメットアッセイを用いて行った。

4) シグナルペプチドのタグging

シグナルペプチドを量子ドットにタグgingする方法は、まず量子ドットの方をメルカプト有機酸あるいはメルカプトアミンで水溶液に分散させ特別なアダプター分子を介

してカルボキシル端あるいは、アミノ端に結合させている。

C. 研究結果

安全性についての検討は、本年度 MTT アッセイ法を用いてミトコンドリアの呼吸能力を計測することにより行った(A. Shiobara et al., Microbiol. Immunol 2004)。この研究により、細胞毒性については、閾値が存在することを明らかにした。これにより安全基準を設定することが可能となり、医療応用および産業化において重要な一歩をクリアしたことになった。また本年度さらにこの細胞毒性は、ナノ粒子の表面加工に深く依存し様々な表面加工により生物・医療応用に最適な表面加工およびその製造過程を明らかにした(A. Hoshino et al., Nano Letters (2004))。

実際に成功した例を以下に示す。

1) 細胞の核特異的マーカー
前述した方法により量子ドットによる核特異的染色した動物細胞を図1に示す。図1は、経時的に観察している。共焦点顕微鏡によって核に局在していることを核認している。

2) 細胞のミトコンドリアマーカー
前述した方法により量子ドットによる動物細胞のミトコンドリア特異的染色に成功した。緑の量子ドットによるミトコンドリア特異的染色と、従来法による有機赤色素によるミトコンドリア染色を重ねあわせ黄色になっていることから両者が同じ場所にあることを示すことによって確認した。

3) 両方同時に生きている細胞に投与した実験結果を図2に示す。核とミトコンドリアに量子ドットが局在している像がみられる。

D. 考察

1. 達成度について

量子ドットの製造法の改善により、当初の30倍を一度に生産可能と成り、製造・精製プロセスを改良した結果、安全性が飛躍的改善され、動物に使用可能と成った。

また、細胞内小器官は、ライソゾーム、ミトコンドリア、核、サイトソルなどを特異的に染色する方法が開発できるまでに至った。大きな成果を得ることができた。これにより当初の計画を十分に達成し、さらに今後複数の染色をすることが可能と成り、同時多色、多種の細胞をトレーシングできる技術開発も今後行える可能性が出て来た。

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重要である。また、この技術および成果を利用して生きた動物で細胞、分子などを生体内で観測する事は、血管炎など疾病のメカニズムを解析する上に於いても極めて重要である。さらにこの研究成果により、患者の負担を軽減し国民医療のみならず、社会的にも意義が大きく成ることを期待する。

3) 今後の展望について

本年度は、細胞レベルでのミトコンドリアの機能におよぼす影響およびアポトーシスについて詳しく検討した。次年度は、変異源性、腫瘍源性などについて細胞と動物両方をもちいて検討し、その結果によりヒトへの臨床応用に近付けることができる。

本年、我々は、核移行、或は、ミトコンドリア移行のシグナルペプチドを用いて量子ドットに結合させると、非常に高い効率で細胞内に侵入し、各々、ミトコンドリア、核に局所的に集積したことから、この量子ドットを用いて細胞内小器官特異的に染色するシステムを開発した。

E. 結論

以上のように、本研究を通じて、半導体ナノ粒子によって安全に動物に投与することが可能と成った。また細胞レベルでは、ライソゾーム、サイトソル、ミトコンドリア、核に伝達できる量子ドットドットキャリアーを開発した。

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) Akiyoshi Hoshino, Kouki Fujioka, Taisuke Oku, Masakazu Suga, Yu F. Sasaki, Toshihiro Ohta, Masato Yasuhara, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto; Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification, *Nano Letters* 2004;4(10):2163-2169
- 2) Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells. *Microbiol Immunol.* 2004;48:985-994
- 3) Akiyoshi Hoshino, Ken-ichi Hanaki, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto; Application of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314 (2004) 46-53
- 4) Amane Shiohara, Akiyoshi Hoshino, Ken-ichi Hanaki, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto; On the Cyto-Toxicity Caused by Quantum Dots, *Microbiol. Immunol.*,48(9)(2004), 669-675
- 5) Kenji Yamamoto and Noriyoshi Manabe, Randomnes and Organization of the Bio-Nano-Particles into the Functional Structure. *Applied Mechanics, Science Council of Japan, Theoretical and applied Mechanics, Japan (Vol.53)*, 111-114.
- 6) A. Aringazin A.K., Dahnovsky Yu., Krevchik V.D., Semenov M.B., Veremyev V.A., Ovchinnikov A. A., Yamamoto K. Two-dimensional tunnel bifurcations with dissipation, *Hadronic Journal.* - 2004, - v. 27, N 2. - P. 115-150
- 7) Yayoi Otsuka, Ken-ichi Hanaki, Jizi Zhao, Ryuuji Otsuka, Kiminori Toyooka, Hiroshi Yoshikura, Tadatoshi Kuratsuji, Kenji Yamamoto, Teruo Kirikae, Detection of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin using Quantum Dot immuno-conjugates. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57 (2004) 183-184
- 8) 8. Kenji Yamamoto, Noriyoshi Manabe,

Randomness and organization of the bio-nano-particles into the functional structure. *Theoretical and Applied Mechanics Japan* 53 (2004) 111-114.

(総説)

- 1) 星野彰芳、山本健二、カンタムドットナノ粒子を用いた蛍光イメージング素材の開発「医学のあゆみ」2004;210(3);183-186
- 2) 星野昭芳、山本健二 量子ドット蛍光を用いた細菌毒素の1分子抗原抗体反応検出システム *BioClinica*2005;20(1):23-262.
- 3) 山本健二、山屋俊一、「一般細菌以外の培養同定困難な菌」臨床検査データブック2005—2006 高久史監修、医学書院(2005)
- 4) 山屋俊一、山本健二 広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査(ノイラミン酸・シアル酸) *日本臨床* 62 (2004)
- 5) 山本健二、「治療技術の進歩」最近の化学工学56:先端医療における化学工学、化学工学会(2004) p1-p8.

2 学会発表

(国内学会)

- 1) 真鍋法義, 星野昭芳, 梁一強, 後藤知将, 加藤規弘, 山本健二 Quantum dots と薬剤の結合による *in vivo* での効果、日本薬学会第125年会(2005年3月、東京)
- 2) 二村泰弘、後藤知将、山本健二 アミノ酸からの蛍光物質の水熱合成 化学工学会第70年会(2005年3月、名古屋)
- 3) 星野昭芳、村山研、大川原明子、三浦典子、大野尚仁、安原真人、山本健二、鈴木和男: 血管炎発症に関わる活性化好中球MPO分子の蛍光ナノ粒子による検出 第13回バイオイメージング学会学術集会 京都医科大学(2004年11月)
- 4) 道尊宇遠、二村泰弘、山本健二、河合剛太 RNAの二次構造予測, デザインおよびフォールディングダイナミクスへの新しいアプローチ、第6回日本RNA学会年会(2004年8月、熊本)
- 5) 後藤知将、二村泰弘、山口由岐夫、山本健二 断熱膨張を用いた亜臨

界・超臨界水リアクターによるアミノ酸の縮合反応 化学工学会第69年会 (2004年4月、大阪)

- 6) Hoshino A, Toyama-Sorimachi N, Dohi T: Specific recruitment of peritoneal macrophages into perforating ulcers in murine trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. 第34回日本免疫学会総会(札幌, 2004.12)
 - 7) Kazumi Omata, Kenji Yamamoto. Theoretical study on the structure of super critical fluids、第54回力学応用講演会 (2004年1月東京)
 - 8) Wayne Dawson, Kenji Yamamoto. Applying the principles of chaperons to material designs in nanotechnology applications、第54回力学応用講演会 (2004年1月東京)
 - 9) Fumihiko Takeuchi, Kenji Yamamoto. Effectiveness of vaccination strategies for infectious diseases according to human contact networks 第54回力学応用講演会 (2004年1月東京)
- (国際学会)
- 1) Kazumi Omata, Yasuhiro Futamura and Kenji Yamamoto, SUPERCRITICAL FLUIDS STUDIED BY MONTE CARLO SIMULATIONS, The 3rd International CIMTEC Conference "COMPUTATIONAL MODELING AND SIMULATION OF MATERIALS" (May, 2004, Acireale, Sicily, Italy).
 - 2) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Kenji Yamamoto, "Synthesis of Oligopeptide under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling" The 5th Green & Sustainable Chemistry Symposium (Mar, 2005, Tokyo)
 - 3) Yasuhiro Futamura, Tomomasa Goto, Kenji Yamamoto, "Prebiotic Biopolymer Synthesis under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling: Volcanic Eruption from Hydrothermal Environment into the Atmosphere" The 1st International Symposium (MISASA-1): Origin Evolution and Dynamics of the Earth (Mar. 2005 Misasa, ToTTori)
 - 4) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Yukio Yamaguchi, Kenji Yamamoto, "Reaction of amino acids in a subcritical and supercritical water flow reactor with adiabatic expansion cooling" The 10th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering (APCCChE) Congress (Oct. 2004, Kita-Kyushu)
 - 5) Kenji Yamamoto, Toward the cell delivery system with the quantum dots (No. 29-5P10): The 4th International Peroxidase Meeting, Oct. 2004, Kyoto, Japan
 - 6) Akiyoshi Hoshino, Ken Murayama, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Noriko N. Miura, Naohito Ohno, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, and Kazuo Suzuki MPO. Expressed on the Surface of Activated Neutrophils with Quantum Dot-conjugated Antibody. 4th International Peroxidase Meeting, Palulu Plaza Kyoto, Kyoto (2004.10)
 - 7) Akiyoshi HOSHINO, Masato YASUHARA, Taeko DOHI, Kazuo SUZUKI, and Kenji YAMAMOTO. Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots. 4th International Peroxidase Meeting, Palulu Plaza Kyoto, Kyoto (2004.10)
 - 8) N. Manabe, A. Hoshino, Y. Q. Liang, T. Goto, N. Kato and K. Yamamoto. Quantum dots conjugated with captopril while remained effect in vivo. The International Society for Optical Engineering (Jan. 2005 U.S.A.)
 - 9) A. Hoshino, K. Fujioka, M. Suga, Y. F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki, K. Yamamoto. Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots. SPIE Biomedical Optics Meeting, San Jose Intl. Convention Center , San Jose, CA (2005.01)
 - 10) Kenji Yamamoto, The fluorescence intensity of the quantum dots in the water depends on the surface processing. SPIE Biomedical Optics Meeting, San Jose Intl. Convention Center , San Jose, CA (2005.01)
 - 11) Hoshino A, Yamamoto K. Fluorescent Nanocrystal Quantum Dots for Medical Applications 5th International Symposium on Future Medical Engennering based on Bio-Nanotechnology. Tohoku University

School of Medicine, Sendai (2005.2)

- 12) Noriyoshi MANABE, Akiyoshi HOSHINO, Yi-qiang LIANG, Tomomasa GOTO, Norihiro KATO and Kenji YAMAMOTO. Quantum dots conjugated with captopril while remained effective in vivo. The Second International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology. Queenstown, New Zealand (Feb. 2005)
- 13) Amane Shiohara, Noriyoshi Manabe and Kenji Yamamoto. Novel surface processing with sulfonic acid for quantum dot and its characters, The Second International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology. Queenstown, New Zealand (Feb. 2005) .
- 14) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Kenji Yamamoto, "Process of Novel Hydrothermal Flow-Reactor with Adiabatic Expansion Cooling: Toward Production of Functional Biopolymer" International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology (AMN-2) Queenstown, New Zealand (Feb. 2005) .
- 15) Wayne Dawson, Kenji Yamamoto Kazuo Suzuki. 3D-Structural Model Building of LECT2 by Way of a Hybrid Experimental and Theoretical Strategy, GIW , Tokto (Dec. 2004)

(知的所有権の出願・取得状況)

1) 特許

なし

2) その他なし

図1 赤色量子ドットによる各染色

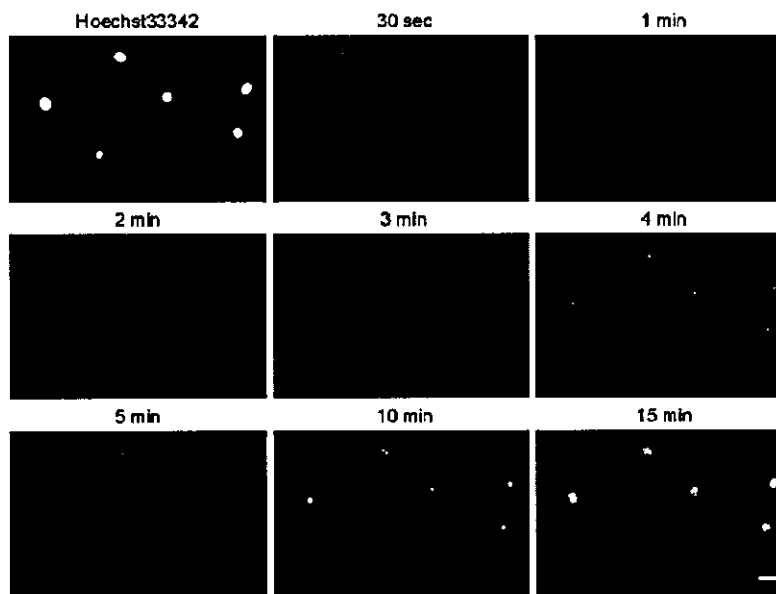
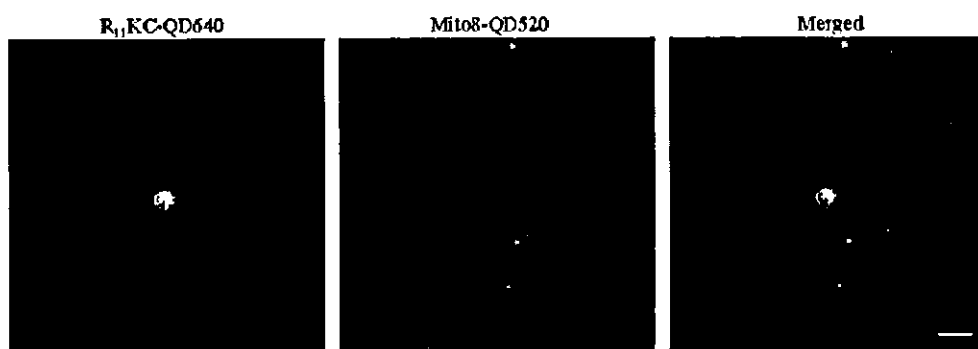


図2 生きている細胞への2種類の量子ドットの局在化 左 核移行、中 ミトコンドリア移行、右 核、ミトコンドリア同時移行



MPO-ANCA および好中球機能異常を示す血管炎 動物モデルの検討

分担研究者 大川原明子 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究は重要である。*Candida albicans* released a water-soluble polysaccharide fraction (CAWS) の腹腔内投与によって心動脈炎を誘発するモデルを用い、投与後初期に、末梢好中球数が急速に増加し、その機能 (MPO 放出、活性酸素産生能) が活性化することを明らかにした。動脈炎発症にいたる初期のステップにおける活性化好中球の関与が示唆された。

A. 研究目的

炎症関連細胞は外来異物などを排除する生体防御機能を担っているが、その過程で血管傷害を引き起こすことも考えられる。これまで、血管炎発症にかかわる因子としては、ANCA および、いくつかの自己抗体、IL-8 や TNF- α などの炎症性サイトカイン、内皮細胞の活性化、接着分子、血管内膜・中膜・外膜あるいは細胞外マトリックスの反応系などが考えられており、それらの因子が連鎖して血管炎発症の引き金になっていると推測される。一方、血管炎の患者では、末梢好中球の活性化が認められ、病態の推移と関連していることが報告されている。たとえば血管炎患者では血中に好中球抗体 ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody) が上昇することや、好中球、好中球抗体が血管炎に関与していることが明らかになってきている。

一方、血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究は必須である。加齢に伴って腎炎や血管炎を発症する NZB/WF1、MRL/lpr、SCG/Kj マウスなど血管炎モデルマウスを用いて血管炎発症に関与する MPO-ANCA

や好中球機能について解析する必要がある。

Candida albicans released a water-soluble polysaccharide fraction (CAWS) 接種後の病理所見の観察から、血管炎発症局所へのマクロファージ、好中球、リンパ球等の炎症細胞の集積が観察される。しかし、これらの細胞がどのように関与しているかについては不明な点も多い。

本研究では、CAWS 投与によって心動脈炎を発症するモデルマウスを用いて、活性化好中球、炎症性サイトカイン等の産生と血管炎発症との関係について基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

1) マウス

C57BL/6N マウス、6W、♂を SPF 環境下飼育し用いた。

2) CAWS の調整と投与

CAWS は *C. albicans* IFO 1385 を完全合成培地で培養し、その培養上清より得た。PBS で 20 mg/ml に調整した CAWS をオートクレーブし、マウスに腹腔内投与 (4 mg/マウス) した。

3) 血球分画の解析

マウス心臓より EDTA 採血し、血球分画解析を行った。

4) 好中球の分離

マウス心臓よりヘパリン採血し、比重法によって末梢好中球画分を単離した。

5) 好中球の機能解析

5-1) MPO 放出活性：終濃度 10^{-5} M の FMLP および $5 \mu\text{g/ml}$ の サイトカラシン B (C/F) で好中球を刺激して脱顆粒し、 H_2O_2 を基質として細胞外への MPO 放出率を求めた。

5-2) 活性酸素産生：好中球を C/F あるいは PMA ($1 \mu\text{g/ml}$) で刺激し、チトクローム c の還元能により求めた。

6) 炎症性サイトカイン、ケモカインの解析

マウス心臓より EDTA 採血し、分離した血漿を用いて炎症性サイトカイン産生について検討した。

(倫理面への配慮)

動物使用に際しては、飼育、薬剤投与、屠殺などすべての過程において動物愛護の精神を遵守し実験を行った。

C. 研究結果

4 mg/マウスの CAWS 腹腔投与直後から、総白血球数は増加し、特に末梢好中球数の増加が顕著であった(図 1a-d)。また、好中球機能について解析したところ、MPO 放出、活性酸素産生能いずれも CAWS 投与 1 時間後から活性化する傾向を認めた(図 2a, b)。さらに、炎症性サイトカイン産生について解析したところ、CAWS 投与後早期において IL-12/p70、IL-1 β 、IL-10、IL-6 (図 3a-d) の炎症性サイトカイン産生を認めた。また、MIP-2、G-CSF の産生を認めた(図 4a, b)。

D. 考察

CAWS 投与初期に好中球は骨髄から末梢へ移動し、活性化され、心動脈炎発症に関与している可能性が示唆された。また、CAWS 投与後短時間で炎症性サイトカインの産生を認めたことから、活性化好中球がこれらの産生をすることによって免疫ネットワークを進展させる引き金としての役割を担う可能性が示唆された。

E. 結論

血管炎の病因の解析、ガンマグロブリンをはじめとする治療薬を開発する上で、モデルマウスを用いた研究が必須である。本研究において、CAWS 腹腔内投与によって末梢好中球は著しく増加し、活性化されることを示した。さらに、真菌由来物質 CAWS で発症する動脈炎の発症機序の詳細な解析をすることによって、臨床の病態の解明、治療法の糸口を見出すことが可能になれば非常に有用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

1. 論文発表

- 1) Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Takahiko Ono, Kan Saiga, Kyuichi Nemoto, Kazuo Suzuki Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19: 708-15, 2004
- 2) Noriko Nagai-Miura, Yuko Shingo, Yoshiyuki Adachi, Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki and Naohito Ohno Induction of Coronary Arteritis with Administration of CAWS (Candida albicans Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 26, 527-543, 2004
- 3) 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- 腎とフリーラジカル 第7集 東京医学社 66-72 ページ (図書)

2. 学会発表

- 1) 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、岡村春樹、大野尚仁、鈴木和男 血管炎を誘導する CAWS 投与初期のマウス好中球活性化とサイトカインの変動 第 69 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2004 年 7 月、三沢
- 2) 小野孝彦、猪原登志子、劉寧、北徹、雑賀寛、根本久一、武曾恵理、大川原明子、鈴木和男 好中球活性化、活性酸素産生とフィブリン沈着を介した SCG/Kj マウスにおける半月体形成機序 第 16 回腎とフリーラジカル研究会 2004 年 9 月、京都
- 3) Toshiko Ito-Ihara, Akiko Ishida-Okawara, Eri Muso, Ning Liu, Kan Saiga, Kyuichi Nemoto, Kazuo Suzuki, Toru Kita and Takahiko Ono SCG/Kj Mice, a Model of ANCA-Associated Crescentic Glomerulonephritis, Develop Crescent Formation through Neutrophil Activation and Fibrin Precipitation. The 4th International Peroxidase Meeting 2004, September, Kyoto
- 4) Akiko Okawara, Noriko Miura, Toshiaki Oharaseki, Naohito Ohno, Kei Takahashi, Haruki Okamura, Kazuo Suzuki Effect of Arteritis Inducer, *C. albicans* Water-Soluble Mannoprotein- β -Glucan Complex (CAWS), on Neutrophil Activation in Mouse. The 4th International Peroxidase Meeting 2004, September, Kyoto
- 5) Hitoshi Tachikawa, Akiko Okawara, Kazuhiro Tokunaka, Yoshifusa Aizawa, Kazuo Suzuki Cytokine Levels of Serum and Immunological Properties in the Spleen during Developing

Glomerulonephritis Associated with MPO-ANCA in SCG/Kj Mice. The 4th International Peroxidase Meeting 2004, September, Kyoto

- 6) Wako Yumura, Mitsuyo Itabashi, Akiko Ishida-Okawara, Junji Yamashita, Yoshiaki Kaneshiro, Hiroshi Nihei, Kazuo Suzuki A Novel Model Mouse of MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis with Increased Neutrophil Contribution. The 4th International Peroxidase Meeting 2004, September, Kyoto
- 7) 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、柏村信一郎、岡村春樹、大野尚仁、鈴木和男血管炎を誘導する CAWS 投与初期のマウス好中球活性化とサイトカインの変動 第 34 回日本免疫学会総会 2004 年 12 月、札幌
- 8) 太刀川 仁、大川原明子、徳中一寛、相澤義房、鈴木和男 MPO-ANCA 関連糸球体腎炎モデルマウスにおける脾臓腫大は血管炎進行に関わる 第 34 回日本免疫学会総会 2004 年 12 月、札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

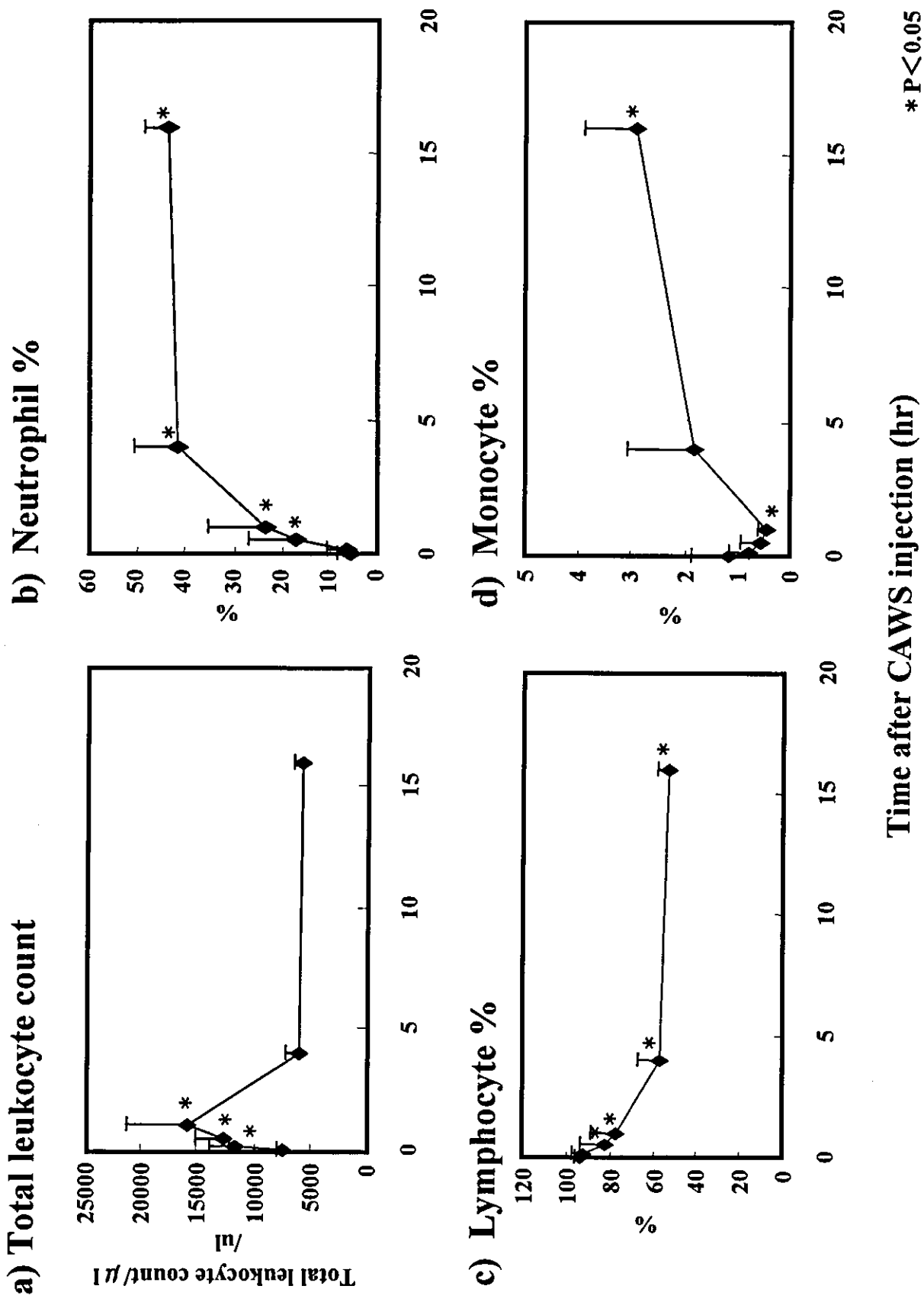
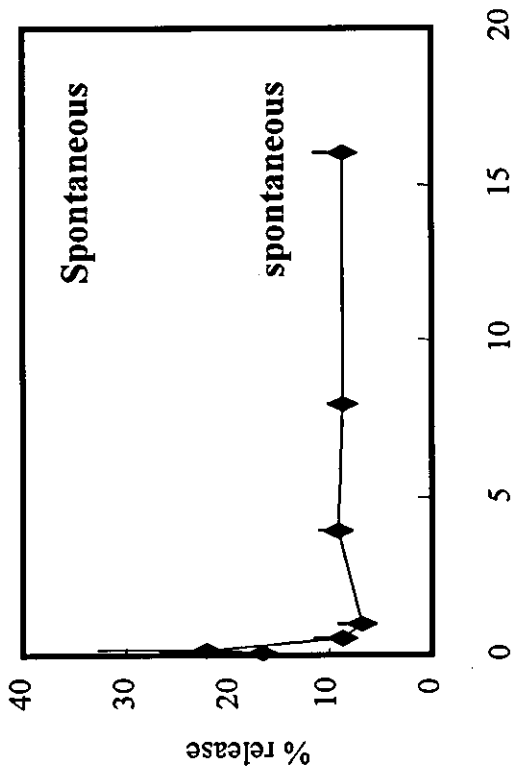
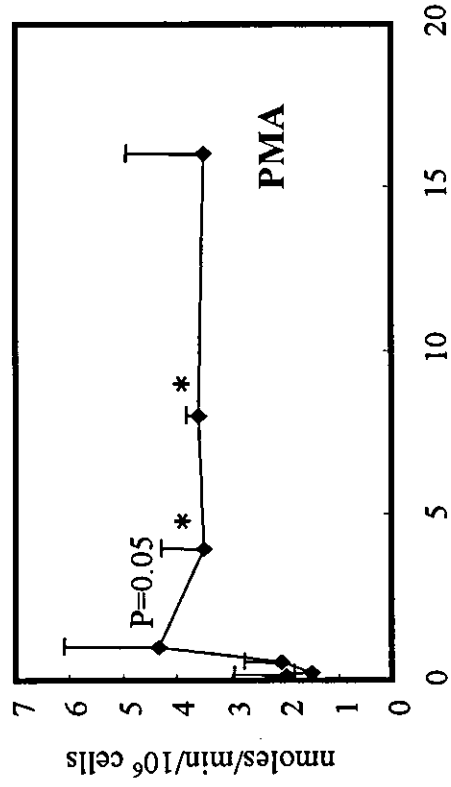
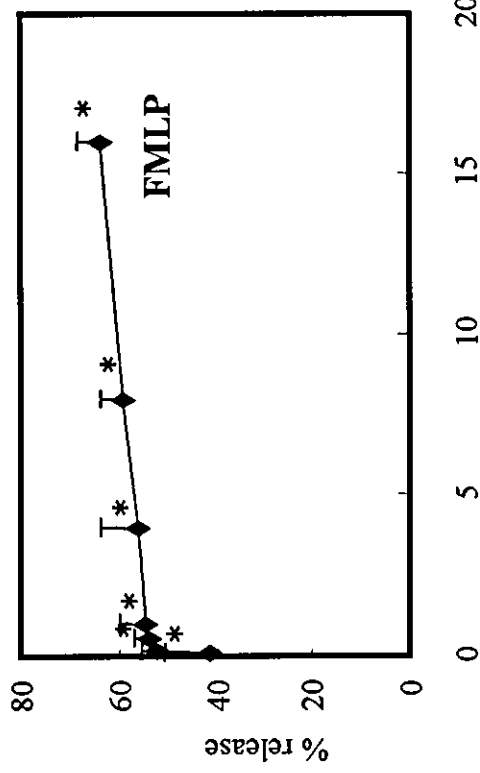
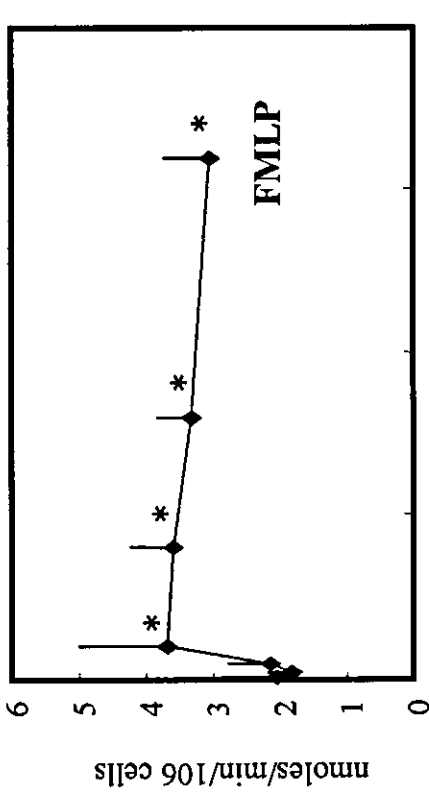


図 1 CAWS投与後の血球分画の変化

a) MPO release



b) O₂⁻ production



Time after CAWS injection (hr)

* P < 0.05

図2 CAWS投与後の好中球の活性化

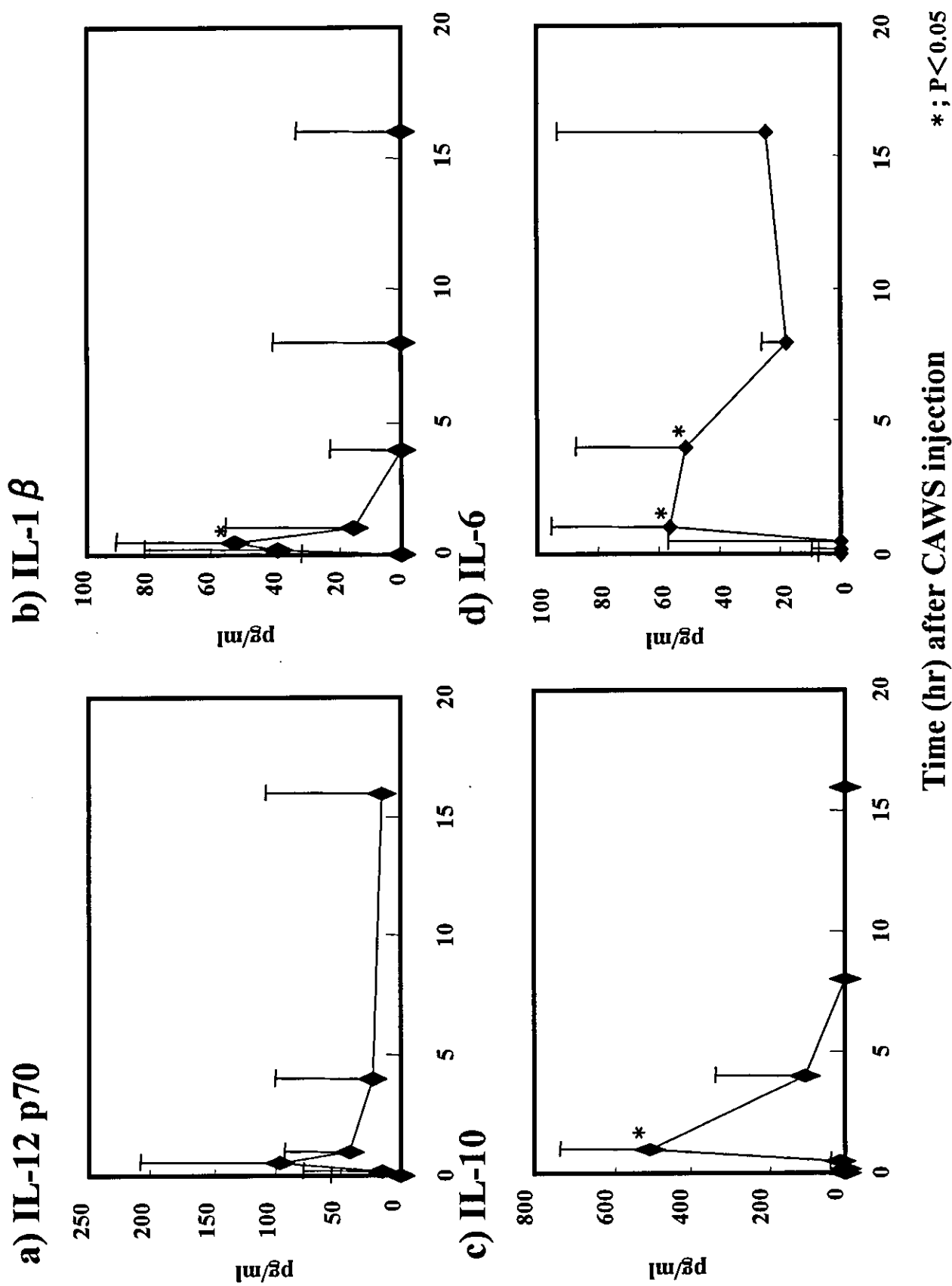
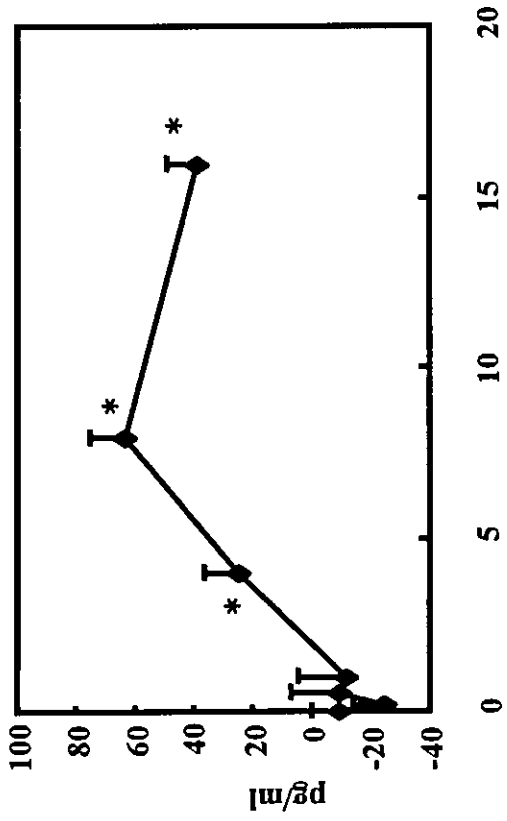
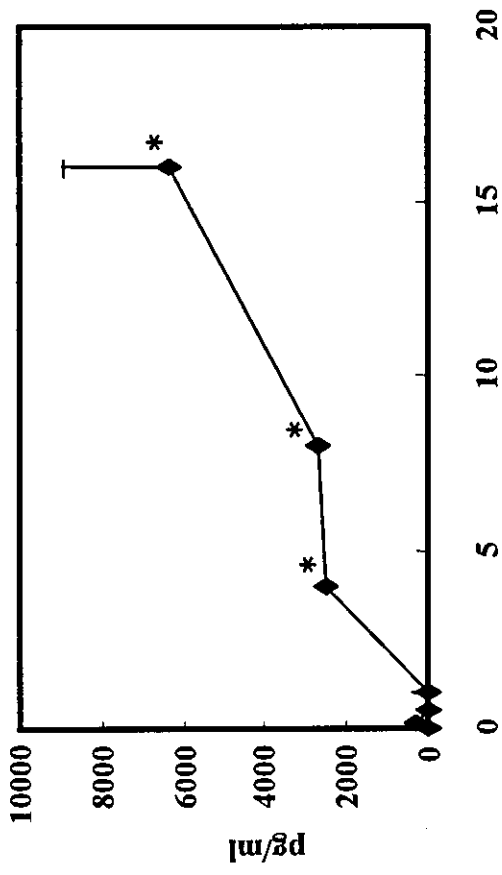


図3 CAWS投与後の炎症性サイトカイン産生

a) MIP-2



b) G-CSF



Time (hr) after CAWS injection

*; P < 0.05

図4 CAWS投与後のMIP-2, G-CSFの産生

副作用評価に関する研究

分担研究者 鈴木章一 長崎大学熱帯医学研究所 助手

研究要旨

樹状細胞(DC)は自己免疫疾患に深く関与した細胞であり、人工グロブリンがDCの分化や機能に及ぼす影響を知ることはその副作用や治癒機序を明らかにするうえで重要である。その解析方法として、マウス骨髄細胞を用いたDC分化培養系は有用な方法である。DCはconventional DCとplasmacytoid DCとに大別されている。conventional DCの分化培養系に関してはGM-CSFを用いた骨髄細胞培養系という非常に再現性がよい系が確立されているのに対し、plasmacytoid DCに関してはFlt-3 ligandを用いた骨髄細胞培養系が報告されているものの、再現性が非常に悪く、この系で産生されるDCの殆どはconventional DCであるという相反する結果が複数のグループから報告されていた。これまで得られた結果より、再現性が悪い原因として、Flt-3 ligandのヒトとマウスの由来の違いや糖鎖の有無といった質的な違いが考えられたので、マウス骨髄細胞培養系におけるFlt-3 ligandの質的条件を比較検討した。まず、ヒトとマウスの糖鎖結合型Flt-3 ligandを用いてplasmacytoid DCの分化に及ぼす影響を比較した。ヒトFlt-3 ligandを用いた場合には、観察されたDCの約30%はplasmacytoid DCであり、ウェルあたり 1.8×10^6 個の細胞が産生されることがわかった。一方、マウスFlt-3 ligandを用いた場合にはその割合は2%程度であり、 4.9×10^4 個の細胞しか産生されないことがわかった。このように、ヒトとマウスの由来の違いが、本骨髄細胞培養系におけるplasmacytoid DCの分化に著しい影響を与えることを明らかにした。次にマウスFlt-3 ligandの糖鎖結合型と非結合型を用いて比較した。その結果、糖鎖結合型と比較し、非結合型Flt-3 ligandを用いた場合は、plasmacytoid DCの産生数は3倍程度増加することがわかった。また、conventional DCに関してはその産生数が著しく減少することがわかった。このように糖鎖が骨髄細胞培養系における各々のDCの分化に影響を及ぼす可能性も見いだした。これらの発見によりDCの新たな分化機構を提示すると共に人工グロブリンがplasmacytoid DCの分化や機能に及ぼす影響を解析することを容易にした。次に、plasmacytoid DCはconventional DCの分化を制御するInterferon Regulatory Factor-4 (IRF-4)を発現していることから、IRF-4がplasmacytoid DCの分化や機能も調節している可能性が考えられたので、plasmacytoid DCの分化におけるIRF-4の必要性をIRF-4欠損マウスを用いて調べた。この結果、脾臓のplasmacytoid DCの数はIRF-4欠損マウスで減少していないことがわかった。しかし、Flt-3 ligandを用いた骨髄細胞培養系においてはIRF-4/-骨髄細胞より産生されるplasmacytoid DCの数が約半分まで減少していた。この結果から、IRF-4がplasmacytoid DCの分化に関与していると考えられると同時に、IRF-4の機能を補う機構が存在することが示唆された。

A. 研究目的

免疫系の司令塔である樹状細胞(DC)は、細胞性免疫機構と体液性免疫機構の両方で重要な役割を担う細胞である。DCは典型的な突起やveilをもつ conventional DC と形質細胞様の plasmacytoid DC とに大別されている。両タイプの DC は共に自己免疫疾患に深く関与しており、conventional DC は抗原と GM-CSF などの炎症シグナルとにより移動と分化を起こし、組織障害の場に現れ、MHC クラス II や共刺激因子の発現増強によって自己抗原を提示し自己反応性 T 細胞を活性化する。plasmacytoid DC は自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスの発症に深く関与するインターフェロン α をウイルス感染などにより大量に放出する。また両者は Fc 受容体を発現しており、その受容体からの刺激は免疫応答を調節する。したがって、人工グロブリンが DC の分化や機能に及ぼす影響を知ることは人工グロブリンの副作用を知る上でもその治療機序の詳細を明らかにするうえでも重要である。conventional DC の分化培養系として GM-CSF を用いたマウス骨髄細胞培養系が確立されており、この系は人工グロブリンが conventional DC の分化や機能に与える影響を調べる方法として有用である。一方、plasmacytoid DC の分化培養系に関しては、Flt-3 ligand と共にマウス骨髄細胞を培養すると主に plasmacytoid DC が産生されるという報告がなされているが、しかし、私のグループを含むいくつかのグループから、この培養系で産生される殆どの細胞は conventional DC であるという報告がなされ、再現良い plasmacytoid DC の分化培養条件の確立が必要とされていた。研究グループ間において、そのような結果の違いが生じた原因として、Flt-3 ligand のヒトとマウスの由来の違いや糖

鎖の有無の違いが考えられたので、人工グロブリンの副作用解析の最初のステップとして、再現性良く plasmacytoid DC が分化する骨髄細胞培養系を確立することを目的に Flt-3 ligand の質的条件を検討した。

また、これまで私どもは、conventional DC の分化や機能における Interferon Regulatory Factor-4 (IRF-4)の必要性を明らかにしてきた。plasmacytoid DC は IRF-4 を発現していることから、その分化や機能にも IRF-4 が関与していると考えられたので、plasmacytoid DC における IRF-4 の必要性を IRF-4 欠損マウス及び、先に開発した培養系を用いて評価した。

B. 研究方法

マウス骨髄細胞培養系における Flt-3 ligand の質的条件検討

・Flt-3 ligand のヒトとマウスの由来の違いが及ぼす影響

1. C57BL/6 マウスの大腿骨より骨髄細胞を単離した。
2. 12 well plate に細胞を 1×10^6 /ml の濃度 (total 2 ml) で蒔いた。
3. 以下に示す2種の Flt-3 ligand の中から、1種を添加し9日間培養した。

A.マウス Flt-3 ligand cDNA をミエローマ細胞に発現させ精製した Flt-3 ligand

B.ヒト Flt-3 ligand cDNA をミエローマ細胞に発現させ精製した Flt-3 ligand

4. 産生された細胞に含まれる DC(CD11c+)集団の中の plasmacytoid DC (B220+CD11c+CD11b-) の数と割合を anti-B220-PerCP、anti-CD11c-PE 及び anti-CD11b-FITC を用いた FACS 解析により調べた。

・糖鎖の有無が及ぼす影響

1. C57BL/6 マウスの大腿骨より骨髄細胞を

単離した。

2. 12well plate に細胞を 1×10^6 /ml の濃度 (total 2 ml) で蒔いた。

3. 以下に示す 2 種の Flt-3 ligand の中から、1 種を添加し 9 日間培養した。

A. マウス Flt-3 ligand cDNA をミエローマ細胞に発現させ精製した Flt-3 ligand

B. マウス Flt-3 ligand cDNA を大腸菌に発現させ精製した Flt-3 ligand

4. 産生された細胞に含まれる DC(CD11c+) 集団の中の plasmacytoid DC (B220+CD11c+CD11b-) の数と割合を anti-B220-PerCP、anti-CD11c-PE 及び anti-CD11b-FITC を用いた FACS 解析により調べた。

plasmacytoid DC の分化における IRF-4 の必要性の解析

・ In vivo 解析

1. 野生型マウス及び IRF-4 欠損マウスより脾臓を単離した。

2. 脾臓細胞をコラゲナーゼ、DNaseI 処理した後、ナイコデンツを用いた遠心分離により plasmacytoid DC を濃縮した。

3. plasmacytoid DC (B220+CD11c+CD11b-) の数と割合を anti-B220-PerCP、anti-CD11c-PE 及び anti-CD11b-FITC を用いた FACS 解析により調べた。

・ In vitro 解析

1. 野生型マウス及び IRF-4 欠損マウスの大腿骨より骨髓を単離した。

2. 骨髓細胞をヒト Flt-3 ligand (糖鎖結合型) と共に 9 日間培養した。

3. 産生された細胞に含まれる DC(CD11c+) 集団の中の plasmacytoid DC (B220+CD11c+CD11b-) の数と割合を anti-B220-PerCP、anti-CD11c-PE 及び anti-CD11b-FITC を用いた FACS 解析により

調べた。

(倫理面への配慮)

マウスから脾臓や大腿骨を採取する際に、エーテル麻酔で安楽死させ、マウスに苦痛を与えないように配慮した。

C. 研究結果

マウス骨髓細胞培養系における Flt-3 ligand の質的条件検討

1. ミエローマ細胞を用いて調整したマウス Flt3L を用いた場合、1 well あたり 2.2×10^6 個の CD11c 陽性細胞が産生された。CD11b-B220+細胞の割合は全体の 2% であり、数にすると 4.9×10^4 個しか plasmacytoid DC が産生されていなかった。これに対し、CD11b+B220- 細胞の割合は全体の 88%、数にして 2.1×10^6 個であり、殆どが conventional DC であることがわかった。そのうち、CD11b+DC が 1.0×10^6 個、CD11b- DC が 1.1×10^6 個であった。(表 1)

2. ミエローマ細胞を用いて調整したヒト Flt3L を用いた場合、1 well あたり 5.6×10^6 個の CD11c 陽性細胞が産生された。CD11b-B220+細胞は全体の割合の 30% であり、数にすると 1.8×10^6 個もの plasmacytoid DC 細胞が産生されていた。一方 CD11b+B220- 細胞の割合は 64% であり数にして、 3.9×10^6 個の conventional DC が産生されていた。そのうち、CD11b+DC が 2.0×10^6 個、CD11b- DC が 1.9×10^6 個であった。(表 2)

表 1 と 2 より、マウス Flt-3 ligand よりも、ヒト Flt-3 ligand を用いた方が、全 CD11c+細胞に対する割合が大きく、かつ、約 40 倍多くの数の plasmacytoid DC が産生されることがわかった。

3. 大腸菌を用いて調整したヒト Flt3L を用いた場合、1 well あたり 1.8×10^5 個しか CD11c 陽性細胞が産生されなかった。しかし、