

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究

分担研究者 狩野 繁之 国立国際医療センター研究所適正技術開発移転研究部・部長  
協力研究者 奥 浩之 群馬大学工学部材料工学科・助教授

研究要旨 熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼの部分人工抗原ペプチド AD22 を材料として、ポリ乳酸グリコール酸共重合体と乳化させることでナノ粒子を生成することに成功した。本材料がマラリアワクチン DDS の概念の中で、徐放性人工抗原として有用であることを実証する。

A. 研究目的

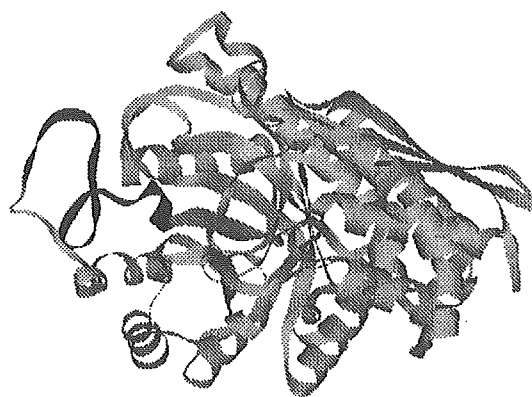
本研究は、熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼをマラリアワクチン候補抗原と想定し、そのワクチン材料と DDS の開発をナノスケールで達成することを目的とした。本研究の成果が、近年再び世界に猖獗するマラリアを克服するために基礎的な知見を提供し、具体的なプロダクトにつながることを期待される。

B. 研究方法

開発する材料としては、蛋白抗原を徐々に放出できる材料（すなわち徐放性人工抗原）を目標とした。試薬や溶液の混合比は「リュープリン」の製造方法を参考にした。即ち、微粒子の基材はポリ乳酸グリコール酸共重合体（PLGAと略称）のうち、乳酸とグリコール酸の組成比が 75 : 25 の基材を選択した。但し分子量はリュープリンの製造方法の 1 万より大きいものを採用した。これはリュープリンが 1 ヶ月ほどで消失してしまうため、より高分子量で分解速度の遅い基材とした。また人工抗原ペプチドはゼラチン水溶液として用いた。これは「リュープリン」に於いては薬物を保護するためと説明されているが、球状微粒子

の安定化にも必要であった。

PLGA のジクロロメタン溶液（揮発性の高い有機溶媒）とマラリア原虫エノラーゼ部分人工抗原（AD22-MAP）（図 1）のゼラチン水溶液を室温で混合し、超音波処理を行い、溶液が乳化することを確認した。この懸濁液に対し、PVA 水溶液を少しずつ加え再び超音波処理を行い、溶液が乳化することを確認した。



AD22 : A<sup>256</sup>SEFYNSNKTYDLDFKTPNND<sup>277</sup>

図 1 : 熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの立体構造（Homology modeling）とワクチン候補抗原ペプチド AD22 の位置・構造

こうして得られた W/O/W エマルジョンを 24 時

間攪拌し、ナスフラスコから有機溶媒を揮発させ、微粒子を得た。粒径の大きな微粒子や不定形の固まりは沈殿し易く、粒径の小さな微粒子は分散しやすかった。沈降速度の差で生成物は3つに分画した。

#### (倫理面への配慮)

本研究においては、一部 AD22 抗原性の解析にタイ王国マヒドン大学熱帯医学部のマラリア患者血清を用いたが、検体の採取にあたっては、同大学の倫理規定に従って行った。また、今後動物実験を予定しているが、同実験は国立国際医療センターにおいて行われる「動物実験に関する基本方針」及び同センター「動物実験施設管理運営規定」に則って行う。

#### C. 研究結果

生成した微粒子の電子顕微鏡写真を示した。最も小さな微粒子で数百 nm、大きな微粒子で 20  $\mu$ m 程度になった (図 2)。

基材そのものが低融点のため (100°C 以下)、電子線走査では観察中に膨らんだり、割れたりした。

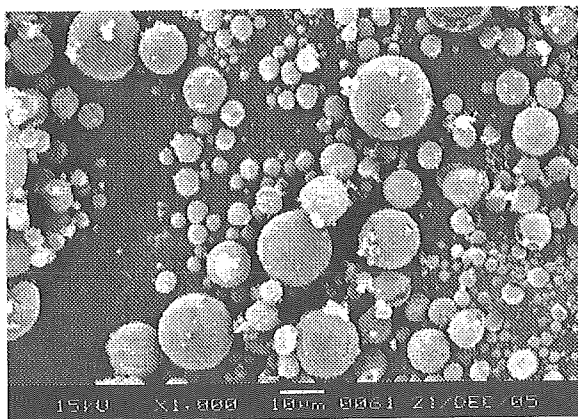


図 2 : 徐放性人工抗原ナノ・マイクロ微粒子

#### D. 考察

生成微粒子の大きさに不均一性が認められているが、マラリア原虫人工部分抗原を内包したナノオーダーの微粒子を徐放性ワクチン抗原に用いるための新規材料開発に成功した。本オーダー

の微粒子で免疫した場合、抗原としてだけでなく、一定のアジュバント効果が期待され、その効果はアラムと同程度との報告もある。今後は本材料を用いて実験動物に様々な方法で免疫するなど、その抗原性の強さ、抗原リリース持続期間等を解析し、徐放性抗原としての有用性を解析してゆく。また、一定の抗原性が証明されれば、その防御免疫惹起能力について実証していくことは当然である。

#### E. 結論

マラリア原虫エノラーゼ部分人工抗原を内包したナノ粒子の生成に成功し、徐放性ワクチン材料としての有用性を立証してゆく基盤が出来上がった。DDS の概念の中におけるワクチン開発を展開してゆく。

#### F. 健康危険情報「なし」

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Omi K, Kuriyama K, Yamada K, Oku H, Kano S, Sato K, Suzuki H, Katakai R: Synthetic study of an antigenic peptide having a partial sequence from *Plasmodium falciparum* enolase. *In: Peptide Science 2004*, Y Shimohigashi, Ed.; The Japanese Peptide Society, Osaka, 637-640, 2005

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 奥浩之、栗山圭祐、山本隼也、山田圭一、片貝良一、佐藤久美子、鈴木守、河津信一郎、狩野繁之:「熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼ蛋白質の部分ペプチドの製造方法」特許協力条約に基づく国際出願、2005 (PCT/JP2005/017851)

## 腎疾患治療に向けた DDS

分担研究者 名取 泰博 国立国際医療センター 部長

腎疾患治療用 DDS としての量子ドット (QD) の可能性を調べる第一歩として、ラット個体における Cd/Se-QD の挙動を調べた。ジヒドロリボ酸 (DHHLA) で表面修飾した赤色及び緑色 QD、及び各々にラット血清アルブミン (RSA) を結合させたものを調製し、実験に用いた。1 mL の 100  $\mu$ M DHHLA-QD 溶液を赤色、緑色の順に尾静脈からラットに投与したところ、赤色 QD 投与後に著変は見られなかったが、緑色 QD 投与直後にラットが死亡した。死亡したラットの膀胱尿には緑色 QD のみが検出され、赤色 QD は検出されなかった。一方、RSA 結合 QD 2 種を同様に順次投与しても、DHHLA-QD の場合と同様、緑色 QD 投与直後にラットが死亡したが、この場合は尿中に QD が検出されず、両色とも血清中に検出された。これらのラット肺における QD の分布を調べた結果、DHHLA-QD、RSA-QD どちらを投与した場合でも、肺の毛細血管に緑色 QD が観察された。以上、高濃度の緑色 QD の投与は肺塞栓の原因となる可能性が示されたことから、DDS への応用に向けて、より安全な QD の開発が必要であると考えられた。

### A. 研究目的

QD を腎疾患における DDS のキャリアーとして用いるには、QD が生体内、特に腎においてどのような動態をとるかを知る必要がある。すなわち、QD は nm オーダーの粒子径であることから、その微妙なサイズの違いによって、糸球体の毛細血管壁を通り抜け、原尿中に移行する可能性も考えられる。そこで本研究では、カドミウム/セレンからなる QD のうち、大きい QD として赤色 QD を、小さい QD として緑色 QD を選び、ラットにおけるそれらの体内動態を調べることにした。また QD そのものとともに、ラット血清アルブミンを結合させた QD についても合わせて検討した。

### B. 研究方法

ジヒドロリボ酸 (DHHLA) にて表面修飾した赤色及び緑色 QD に、それぞれラット血清アルブミン (RSA) を EDC カップリング試薬を用いて結合させた。以下、RSA を結合させていない QD を DHHLA-QD、結合させた QD を RSA-QD と記す。赤色 QD は 640 nm、緑色 QD は 520 nm の波長にて測定した。QD の粒子径は DLS 法にて測定した。

同一ラットにおける赤色、緑色の QD の挙動を比較する目的で、DHHLA-QD、

RSA-QD とともに赤、緑の QD を同一ラットに投与することにした。Wistar 系ラット (4 週令雄、約 100 g 体重) に 100  $\mu$ M QD 溶液 1 mL を赤色、緑色の順に、数分間の間隔で、尾静脈より投与した。

ラットの血液は心臓から、尿は膀胱からそれぞれ採取し、血液は血清分離後、尿はそのままで吸光度を測定し、QD の有無を調べた。また肺、腎を採取し、薄切後、蛍光顕微鏡にて QD の分布を観察した。

### C. 研究結果

尿中での QD 測定が可能かどうかを調べるために、赤色、緑色の 200  $\mu$ M QD 溶液をラット新鮮尿で希釈し、それぞれの検出可能濃度を調べた。その結果、いずれの QD も 1  $\mu$ M まで検出可能であることがわかった。

そこで次に、100  $\mu$ M QD 溶液をラットに投与し、その動態を調べることにした。赤色、緑色の順に、数分間の間隔で、尾静脈より投与したところ、DHHLA-QD、RSA-QD のいずれの場合も、赤色 QD の投与後にラットに著変は見られなかったが、緑色 QD 投与直後に死亡した。この実験は 2 回繰り返したが、結果は全く同じであった。

死亡したラットの血清中の QD を調べた

結果、RSA-QD 投与の場合には赤色、緑色ともに高濃度の QD が検出されたが、DHHLA-QD 投与群ではその濃度が遙かに低かった。一方、尿中には DHHLA-QD 投与群で緑色 QD が検出されたのみで、RSA-QD 投与群では全く検出されなかった。これらの結果から、DHHLA-緑色 QD は速やかに尿中に排泄されるが、他の QD は排泄されにくいことがわかった。

次に死亡したラットの肺、腎における QD の分布を蛍光顕微鏡にて調べた。RSA-QD 投与ラットの腎では糸球体や傍尿管毛細血管に赤色 QD が観察され、緑色 QD はほとんどみられなかったのに対し、同ラットの肺においては、赤色、緑色ともに毛細血管に観察された。一方、DHHLA-QD 投与ラットの腎では、赤色 QD がわずかに毛細血管に、緑色 QD が尿管と思われる部位に強く観察され、RSA-QD の場合とは分布が異なった。これに対して、同ラットの肺では RSA-QD 投与の場合とほぼ同じく、赤色、緑色ともに毛細血管に観察された。DHHLA-QD、RSA-QD のいずれの場合も緑色 QD 投与直後にラットが死亡したことと考え合わせ、肺における緑色 QD が蓄積したことが肺塞栓の原因となってラットが死亡したと考えられた。

最後に、投与した各 QD の粒子径を DLS 法により測定した。その結果、DHHLA-緑色 QD は平均粒子径が約 10 nm であったのに対し、DHHLA-赤色 QD、RSA-緑色 QD、RSA-赤色 QD はいずれも 20 nm 前後の粒子径であることがわかった。

#### D. 考察

本研究の結果から、100  $\mu$ M という高濃度の緑色 QD 溶液を 1 mL ラットに尾静脈投与すると、投与直後にラットが死亡することが示された。投与から死亡までの時間が極めて短いこと、ラットは苦しむ様子を全く示さずに死亡したこと、死亡したラットではいずれも肺の毛細血管に多量の QD が観察されたことから、死因は肺塞栓と推測された。

本研究で用いた QD は絶対量、濃度ともに、これまで本研究班における他の研究で DDS として用いるよりも遙かに高い。従って、これまでマウスを用いた DDS 実験

で動物が死ななかったのに対して、本研究でラットが死亡したことは、マウスとラットの違いというより、投与量の違いが原因と考えられた。

RAS-緑色 QD は DHHLA-緑色 QD と比較して粒子径が大きく、DHHLA-赤色 QD や RAS-赤色 QD に近い。腎において DHHLA-緑色 QD のみが尿中に速やかに排泄されるのに対し、その他の QD は排泄されにくいのは、これらの QD のサイズを反映していると考えられた。一方、腎及び肺の毛細血管における挙動は、必ずしも QD のサイズと対応しなかった。腎の毛細血管における各 QD の挙動はそれぞれ異なったのに対し、肺においては 4 種の QD 全てが毛細血管と思われる部位に観察された。この理由は不明であるが、体内における QD を明らかにする上で重要な知見と考えられた。

QD を DDS のキャリアーとして用いる場合には、本研究の場合より遙かに少量を投与すると思われることから、今回の結果が直ちに QD のキャリアーとしての危険性を示唆するものではない。しかし、本研究で示した大量の QD の致死活性が血管をつまらせたことによる肺塞栓が原因であるならば、たとえ少量投与でも血管の障害となる可能性も推測され、今後の詳細な検討が必要と考えられた。

#### E. 結論

高濃度の緑色 QD の投与は肺塞栓の原因となる可能性が示されたことから、DDS への応用に向けて、より安全な QD の開発が必要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

Shiga toxin-1 causes direct renal injury in rats. Yamamoto EC, Mizuno M, Nishikawa K, Miyazawa S, Zhang L, Matsuo S, Natori Y: *Infect Immun* 73:7099-7106, 2005

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

## QD を用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析

分担研究者 土肥多恵子 国立国際医療センター 研究所・研究部長  
協力研究者 河村 由紀 国立国際医療センター研究所・協力研究員  
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

### 研究要旨

本研究の目的は、半導体ナノ粒子(QD)を用いて、消化管炎症における消化管と他の臓器との細胞交通を解析し、診断・治療のターゲットを探索することである。我々は腹腔由来マクロファージが炎症後及び外科侵襲後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見だし、そのメカニズム研究を行ってきた。その結果、腹腔マクロファージは炎症刺激により局所に遊走すると同時にケモカイン CCL1 を産生し、さらにその受容体 CCR8 のみをケモカイン受容体として特異的に発現するようになるため局所にとどまって細胞塊を形成するというメカニズムが明らかになった。さらに、この現象を、腹膜中皮細胞と腹腔マクロファージの共培養中に CCL1 を加えることによって *in vitro* で再現することができ、さらにこの凝集形成を CCL1 中和抗体により阻害することができた。この成果により癒着性腹膜炎のメカニズムが明らかになった。

### A. 研究目的

生体防御の第一線である消化管粘膜局所においては、物理的および機能的バリアの形成とともに、病原体と常在菌の認識、抗原に対する免疫応答と免疫寛容の緻密な調節がごくあたりまえに行われている。しかしその調節機構はいわゆる全身免疫とは作用する細胞もその作用機構も異なっていることが解明されつつある。これに対して、消化管疾患における腹腔内の免疫応答の研究はほとんど行われていないが、消化管の漿膜病変は、全層性潰瘍や外科的侵襲による癒着等、QOLには大きな影響をもたらす。本研究では腸管免疫の特徴に加えて消化管炎症時の腹腔内の免疫応答を解明し、局所の漿膜側の免疫応答を明らかにすることを目的として、消化管と腹腔内との細胞交通を解析した。ラベルに用いる半導体ナノ粒子(QD)は蛍光が明るく、褪色が少ないという特色があり、これを利用して腹腔内及び骨髄マクロファージをラベルし腸を含む腹腔内臓器との交通を解析する。昨年度までに、炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊を形成するのは腹腔由来マクロファージであり、この部位には特異

なケモカイン受容体 CCR8 を発現していることを見いだしたので、腹膜癒着のトリガーという面からさらにそのメカニズム研究を行った。

### B. 研究方法

1. ケモカイン及び炎症刺激によるマクロファージの CCR8/CCL1 発現  
C57BL/6 マウスより採取した腹腔マクロファージまたは、骨髄細胞から M-CSF により誘導したマクロファージを用い、リポポリサッカライド(LPS)、ペプチドグリカン(PGN)、CpG ヌクレオチド(CpG)、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、及び CCR8 のリガンドである CCL1 で刺激をした後2時間・4時間後の CCR8 及び CCL1 の mRNA 発現を定量 RT-PCR により測定した。また、細胞表面での CCR8 発現を蛍光顕微鏡で観察した。

### 2. 腹膜癒着 *in vitro* モデルの作成

マウス大網をコラゲナーゼ消化して培養し、中皮細胞を分離した。これを単層培養し、その上に QD ラベルした腹腔マクロファージを加え、共培養を行った。CCL1 をはじめとする種々の刺激物質を加えて、2-12

時間後、蛍光顕微鏡で細胞凝集を観察した。凝集は画像解析により定量化した。

### 3. ケモカイン及び炎症刺激による中皮細胞の CCL1 発現

培養中皮細胞に種々の炎症刺激を加え、CCL1, CCR8 の mRNA 発現を定量した。

## C. 研究結果

マウス腹腔マクロファージに上記の炎症性刺激を加えるとどの刺激物質によっても CCR8 mRNA の発現は4倍程度に亢進した。この中で CCL1 の添加によって、2時間後の CCR8 mRNA 量が1.2倍以上に上昇した。これに対して、骨髄由来マクロファージではどの刺激物質によっても有意な CCR8 mRNA 発現の上昇は見られなかった。腹腔マクロファージでは、LPS, PGN, TNF- $\alpha$ , 及び CCL1 により有意な CCL1 mRNA の発現上昇が見られた。LPS 及び CCL1 刺激による腹腔マクロファージ表面の CCR8 発現は蛍光抗体法によっても確認され、その機能を保っていることはケモタキシスアッセイでも明らかであった。

中皮細胞単層培養上では、腹腔マクロファージは緩く接着して細胞の伸展は見られず球形の細胞形態を保っていた。この共培養系に CCL1 を加えると、3時間以降で、中皮細胞層の剥離を伴った径 100  $\mu$ m 以上の細胞凝集塊が形成された。細胞塊は LPS, PGN, CpG を加えることによっても形成されたが、CCL1 が最も効率良い刺激であり、抗 CCL1 抗体を加えることによって、細胞塊形成はほぼコントロールレベルまで阻害された。さらに、この細胞塊を回収して凍結切片を作製し、免疫染色したところ、サイトケラチン陽性 QD 陰性の中皮細胞を巻き込んでいることが明らかとなった。

マウス中皮細胞は、炎症刺激及び CCL1 刺激によって CCL1 を産生することが明らかとなった。CCR8 は定常的に発現していた。

以上より、腹腔の侵襲による中皮細胞の傷害がトリガーとなって、中皮細胞と腹腔マクロファージによる CCL/CCR8 によるポジティブフィードバックが働き、傷害局所に腹膜を巻き込みながら、マクロファージ凝集が起こることが明らかになった。

## D. 考察

### 1. 達成度について

本年度は、ケモカインの発現機構について細胞レベルでの実験でも証明することができた。さらに、中皮細胞を巻き込んだ腹腔マクロファージによる腹膜癒着のメカニズムを *in vitro* でも再現することができ、診断・治療へのターゲット探索という目標を達成できたと考えている。

### 2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究成果は、外科手術後や、炎症による侵襲に伴って起こる腹膜癒着の新しいメカニズムを明らかにしたものである。特異なケモカイン受容体発現による、マクロファージと中皮細胞の腹腔内の漿膜における自然免疫応答の発見という意味でも学術的意義が高い。更に、この成果をもとに CCR8 をターゲットとした腹膜癒着の予防が可能である。腹膜癒着防止剤のマーケットは非常に大きく、医療サービス面からのニーズも高い。また、腹膜癒着の防止により再手術が減少し、術後の症状が緩和されれば、医療経済的な貢献も期待される。

### 3) 今後の展望について

CCL1/CCR8 阻害剤の低分子化合物スクリーニングを、*in vitro* 癒着モデルを用いて行い、*in vivo* モデルで検証して腹膜癒着の防止法を開発する。

## E. 結論

QD を用いた *in vivo*, *in vitro* 細胞トラフィックの研究から癒着性腹膜炎のメカニズムを明らかにした。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, Dohi T. Predominant T Helper Type 2-Inflammatory Responses Promote Murine Colon Cancers. *Int J Cancer*, In press: Published Online: 5 Dec 2005.

2. Kanai T, Kawamura T, Dohi T, Makita S, Nemoto Y, Totsuka T, Watanabe M. TH1/TH2-Mediated Colitis Induced by Adoptive Transfer of CD4+CD45RBhigh

T Lymphocytes Into Nude Mice. **Inflamm Bowel Dis**, 12: 89, 2006.

3. Dohi T, Ejima C, Kato R, Kawamura YI, Kawashima R, Mizutani N, Tabuchi Y, Kojima I. Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice. **Gastroenterology**, 128: 411, 2005.

2 学会発表

(国内学会)

1. Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Noriko T-S, Dohi T. Aggregation of peritoneal macrophages via CCL1/CCR8 triggeres inflammatory and postoperative adhesion, The 18th Naito Conference, Kanagawa, 2005 Oct. 27.
2. 土肥多恵子. 消化管疾患の病理と粘膜免疫異常, 日本食品免疫学会, 東京, 2005年11月10日.
3. Hoshino A, Kawamura Y, N T-S, T D. Aggregation of peritoneal macrohpages via CCL1/CCR8 triggers inflammatory and postoperative adhesion, 第35回日本免疫学会学術集会, 横浜, 2005 Dec 14.

4. (国際学会)

1. Dohi T, Hoshino A, Kawamura YI, Yamamoto K. Intestinal immunity in surgical and inflammatory stress, The 3rd Stage Surface Barrier Immunology Study Group (SBARIS) 2nd Meeting, Nago, Okinawa, 2005 Nov 5.

(知的所有権の出願・取得状況)

1) 特許

出願中 1件

「CCR8阻害剤を用いる癒着の診断、予防および治療剤」2005年9月12日特願2004-345267、2005-264160、2005年11月30日PCT/JP2005/21980

2) その他なし

## QD 標識 MPO 抗体による血管炎の解析

分担研究者 鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質 室長

**研究要旨** 血管炎の発症要因の解析と治療法開発を目的とし、Qdot で標識した myeloperoxidase (MPO) 抗体の定量化を昨年度できたことを受けて、本年度は、われわれが開発した血管炎モデルマウスに、Qdot で標識 MPO 抗体(QD-antiMPO)を投与し、MPO 抗体の腎、肺、脾、肝の各組織への集積動態を解析した。また、この動態の *in vitro* の解析のため、マウスの腎臓糸球体由来の血管内皮細胞のプライマリカルチャー系を確立した。この内皮細胞を用い、MPO 抗体の結合動態を解析し、ICAM-1 の mRNA 発現および QD-antiMPO が結合した内皮細胞で ICAM-1 の発現ともに増加した。以上から、血管炎発症における MPO 抗体の動態や DDS の *in vitro* での解析に、QD-antiMPO が有用であることを示した。

### A. 研究目的

血管炎の発症の要因に、活性化した好中球の関与が推定されている(Arimura, Y., et al. *Clinical Nephrology* 40, 256-264, 1993, L. Harper, et al. *Arthritis Rheumatism* 44:921-930, 2001)。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、その発症要因には、好中球抗体 MPO-ANCA も関与している。本抗体は、好中球の活性化や血管内皮細胞の活性化および傷害性に関与している。しかし、MPO-ANCA がどのように好中球を活性化し内皮細胞の傷害を誘導しているかは不明である。

MPO-ANCA 動態の解析と血管炎の DDS の治療法開発には、Qdot 標識抗 MPO 抗体の開発が不可欠であった。昨年度、QD 標識 MPO-ANCA 抗体の作製に成功し報告した。

一方、血管炎の発症には、血液力学的因子も関与していることから、*in vivo* でのイメージング技術も含めた総合的な検討が欠かせない。われわれが提唱した *in vivo imaging* は、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に利用され、常套手段として行われるようになってきている。本法は、種々

の生体機能に欠かせない方法として急速に定着しつつある。この *in vivo imaging* には、ナノプローブの利用が必須である。

本年度は、QDot を用いた血管炎の発症要因の解析と DDS 治療への応用について検討した。具体的には、われわれが開発した血管炎モデルマウスに、myeloperoxidase (MPO) 抗体を投与して血管炎発症過程をしらべた。また、糸球体から単離したプライマリー培養の糸球体血管内皮細胞に QD で標識した MPO 抗体を(QD-antiMPO)を加え、*in vitro* での QD-antiMPO の糸球体血管内皮細胞への結合と作用について解析した。

本結果より、組織に侵入した活性化好中球を標的とするイメージングによる抗体の動態の解析が可能となり、MPO 抗体の糸球体血管内皮細胞への作用も明らかにできた。

### B. 研究方法

#### 1) 糸球体内皮細胞の初代培養

C57BL/6N マウスの腎臓を採取し髄質を切除後、コラゲナーゼ処理によって単一細胞を取得した (differential sieving technique)。継代培養を繰り返し内皮細胞培養のプライマリカルチャー系を確立した。抗マウス CD31



抗体陽性・Desmin 陰性により血管内皮細胞を特定した。

## 2) QD-antiMPO の作製

QD-antiMPO は、QD で蛍光標識した抗 MPO 抗体を作製した。抗 MPO 抗体の QD 標識は、セレン化カドミウム QD の表面にチオプロピオン酸を配位させ、システインで被覆した。次いで、QD 表面に抗 MPO 抗体をアミノ酸カップリングにより結合させた(A. Hoshino, *et al.* Nanolett. 4:2163-2169, 2004)。

## 3) MPO-ANCA の内皮細胞への作用

MPO-ANCA の内皮細胞への結合をイメージングで解析し、MPO 抗体依存の血管内皮接着分子 ICAM-1 の発現を RT-PCR で測定した。また、QD-antiMPO-FITC-ICAM-1 の 2 重標識による FACS 法による解析も行った。

## 4) MPO 抗体の内皮細胞への結合

内皮細胞障害は、MPO-ANCA の結合により誘導されると想定されることから、MPO 抗体の血管内皮細胞への結合を可視化した。

## 5) QD-antiMPO の生体内動態解析

CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction, 100 µg/ml) を 0.4 mg/mouse と anti-rmMPO 抗体を C57BL/6 に iv 投与した。5 日後に、再度 CAWS と QD-antiMPO を iv 投与 1, 2, 5 日後 (それぞれ、Day-6, Day-7, Day-10) に固定し、腎、肺、脾、肝の各組織標本の QDots の蛍光を検出し、MPO 抗体の動態を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の動物愛護の指針にもとづいて行った。

## C. 研究結果

### 1) QD-antiMPO の生体内動態解析

CAWS と QD-antiMPO 抗体を C57BL/6 に 2 回投与 12、24 時間後に固定し、腎、肺、脾、肝の各組織標本の QDots の蛍光を検出した (図 1)。

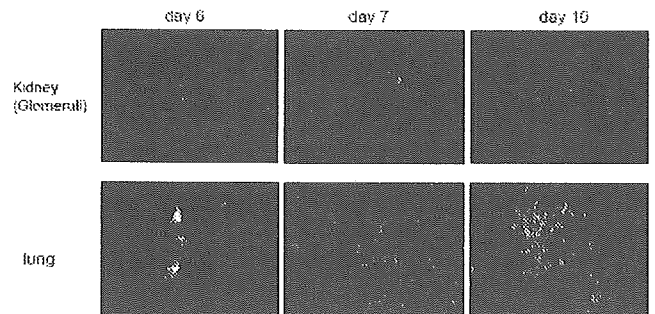


図 1. CAWS と QD-antiMPO 抗体投与後の腎、肺への QDots の蛍光。

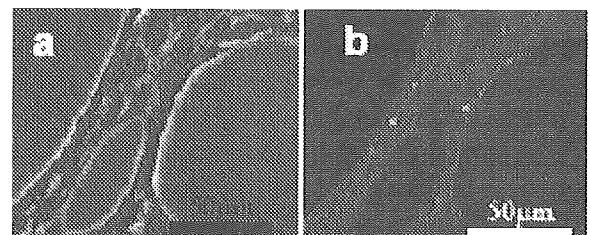
上:腎、下:肺、表示の Day は、初回の CAWS 投与後の固定日

### 2) 糸球体内皮細胞の初代培養

C57BL/6N マウスの腎臓を採取し髄質を切除後、コラゲナーゼ処理によって単一細胞を取得し、糸球体由来の血管内皮細胞のプライマリカルチャー系を確立した。CD31 陽性、Desmin 陰性として確立できた (図 2)。

図 2. 初代培養の糸球体内皮細胞

a: 光学顕微鏡像 : b: CD31 抗体陽性



### 3) 抗マウス MPO 抗体の結合

抗マウス MPO 抗体を糸球体血管内皮細胞に 4-6 時間作用させ、MPO 抗体の結合をイメージングにより解析した (図 3)。

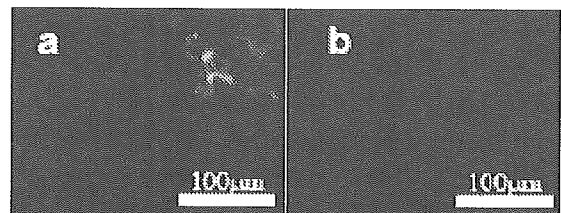


図 3. 抗マウス MPO 抗体の糸球体血管内皮細胞への結合

a:抗マウス MPO 抗体の結合、b: IgG: コントロール rabbit IgG

#### 4) MPO-ANCA の内皮細胞への作用

MPO抗体依存のICAM-1のmRNA発現は、抗体の結合に依存して増加した(図4a)。また、FITC-ICAM-1の発現は、QD-antiMPOの結合細胞において増加した(図4b)。

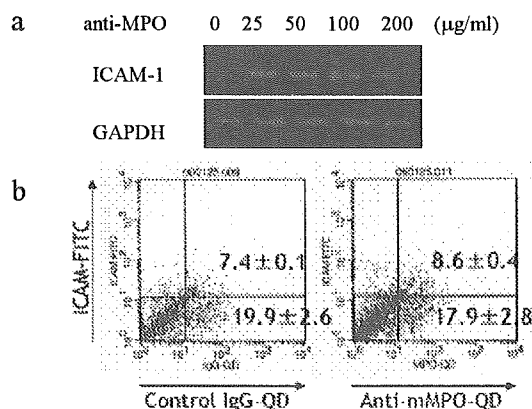


図4. MPO抗体依存のICAM-1の発現

a: ICAM-1のmRNA発現

b: QD-antiMPO結合細胞のFITC-ICAM-1の発現のFACS解析

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の動物愛護の指針にもとづいて行った。

#### D. 考察

C57BL/6Nマウスに、QD-antiMPOを生体内に投与し、血管炎発症時のMPO抗体の生体内動態解析を行い、腎、肺、脾、肝の各組織への集積動態を解析することができた。このMPO抗体の生体内動態を*in vitro*で解析するためにC57BL/6Nマウスの腎糸球体由来の血管内皮細胞のプライマリカルチャー系を確立した。この血管内皮細胞のプライマリカルチャー系の確立は、MPO抗体の生体解析および動態やDDSの*in vitro*での解析に必要であり、有用な方法として利用が可能になった。その結果、抗マウスMPO抗体の糸球体血管内皮細胞への結合動態をイメージングするとともに、QD-antiMPOが結合した内皮細胞では、ICAM-1の発現が上昇した。これは、内皮細胞の傷害が、MPO抗体が結合したことによって上昇することがわかった。

同時に、MPO抗体の濃度に依存したICAM-1のmRNA増加も確認できた。これらの結果から、QD-antiMPOを生体に投与し血管炎発症時のMPO抗体の腎、肺、脾、肝の各組織へ集積の動態が、内皮細胞のプライマリカルチャーでの結合に依存したICAM-1の発現に見られた内皮細胞の傷害程度と符号することがわかった。

以上から、血管炎発症におけるMPO抗体の動態やDDSの*in vitro*での解析にQDotsを用いた方法が利用可能であり有用であることが成果として挙げられる。

本研究は、星野昭芳、山本健二(以上国立国際医療センター研究所)、大川原明子、松村実美子、野津朋子、太刀川仁、小林美登利(国立感染症・生物活性物質)、長尾朋和(国立感染症・生物活性物質、現コーネル大・医[ニューヨーク])、三浦典子、大野尚仁(以上東京薬大・薬)、南谷晴之(慶應大・院理工)の先生方の協力による。

#### E. 結論

QD-antiMPOを生体に投与し、血管炎発症時のMPO抗体の生体内動態解析を行い、腎、肺、脾、肝の各組織への集積動態を解析することができた。この動態を*in vitro*で解析するため、マウスの腎糸球体由来の血管内皮細胞のプライマリカルチャー系をした。このプライマリカルチャーの血管内皮細胞を使って、抗マウスMPO抗体の糸球体血管内皮細胞への結合動態を*in vitro*にてイメージング解析することができた。また、内皮細胞の傷害の指標となるICAM-1のmRNAは、MPO抗体の濃度に依存して増加し、また、QD-antiMPOが結合した内皮細胞のICAM-1の発現が、対照のQD標識IgGに比し増加した。以上から、血管炎発症におけるMPO抗体の動態やDDSの*in vitro*での解析に、QDotsを用いた方法が利用可能であることを示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Y. Hamano, K. Tsukamoto, M. Abe, G.D. Sun, D. Zhang, H. Fujii, S. Matsuoka, M. Tanaka, A. Ishida-Okawara, H. Tachikawa, H. Nishimura, K.

- Tokunaka, O. Hino, S. Hirose, and K. Suzuki. Genetic Dissection of Vasculitis, Myeloperoxidase-Specific Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Production, and Related Traits in Spontaneous Crescentic Glomerulonephritis-Forming/Kinjoh Mice. *J. Immunol.*, in press, 2006.
2. W. Yumura, M. Itabashi, A. Ishida-Okawara, K. Tomizawa, J. Yamashita, Y. Kaneshiro, H. Nihei, and K. Suzuki. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis. *Microbiol.Immunol.* in press, 2006.
  3. N. Nagai-Miura, T. Harada, H. Shinohara, K. Kurihara, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S., Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal pathogen, CAWS. *Atherosclerosis* in press, 2006.
  4. A. S. Persad, Y. Kameoka, S. Kanda, Y. Niho, K. Suzuki. Arginine to Cysteine Mutation (R499C) Found in a Japanese Patient with Complete Myeloperoxidase Deficiency. *Gene Expression* in press, 2006.
  5. H. Yasuda, N. Yoshizawa, K. Suzuki Modeling on social spread from immunity. *Jpn J Infect Dis*, 58, S14-S15, 2005
  6. K. Suzuki, K. Yamamoto and H. Yoshikura. Focusing on Assessment of Risk to Communities in International Symposium on Infectious Agent Transmission Model Building. *Jpn J Infect Dis*, 58, S1-S2, 2005.
  7. T. Matsuki, K. Isoda, R. Horai, A. Nakajima, Y. Aizawa, K. Suzuki, F. Ohsuzu, and Y. Iwakura. Involvement of TNF- $\alpha$  in the development of T cell-dependent aortitis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation* 112: 1323-1331, 2005.
  8. T. Ito-Ihara, T. Ono, F. Nogaki, K. Suyama, M. Tanaka, S. Yonemoto, A. Fukatsu, T. Kita, K. Suzuki, and E. Muso. Clinical Efficacy of Intravenous Immunoglobulin for Patients with MPO-ANCA-associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract.* 102:c35-c42, 2005
  9. R. Suzuki, K. Tomizawa, K. Suzuki, M. Tanokura. MPO-ANCA binding site on MPO molecule estimated from epitope mapping study and molecular modeling. *Bioimages* 12: 85-90, 2005.
  10. M. Fujieda, K. Suzuki, H. Sato, M. Hattori, N. Wada, M. Tsuchiya, N. Okamoto, T. Murata, M. Matsudaira, M. Shimizu, K. Ohta, K. Naruse, S. Sugihara and H. Wakiguchi. Epitope analysis of myeloperoxidase-specific antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (MPO-ANCA) in childhood onset Graves'disease treated with propylthiouracil. *Clinical Nephrology*, 63:437-445, 2005.
  11. T. Oharaseki, Y. Kameoka, F. Kura, A.S. Persad, K. Suzuki, S. Naoe. Susceptibility loci to coronary arteritis in animal model of Kawasaki disease induced with *Candida albicans*-derived substances. *Microbiol.Immunol.* 49: 181-189, 2005.
  12. N. Nagai-Miura, Y. Shingo, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S. Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Induction of Coronary Arteritis with Administration of CAWS (*Candida albicans* Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 26:527-543, 2004.
2. 学会発表  
国際会議
1. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H: Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Cryptococcus neoformans*. 13th Gordon Research Conference, Connecticut, USA.
  2. K. Suzuki, K. Murayama, T. Nagao, T. Oharaseki, A. Hasegawa, A. I. Okawara, N. N. Miura, N. Watanabe, M. Handa, K. Takahashi, N. Ohno, H. Minamitani, T. Nakayama, T. Arai. Contribution of CD69 to the development of coronary arteritis induced with a vasculitis Inducer *Candida albicans* water soluble fraction. 13th Gordon Research Conference, Connecticut, USA.
  3. N. Ohno, N. N. Miura, H. Shinohara, H. Sankawa, Y. Adachi, A. I. Okawara, and K. Suzuki. Strain dependency of CAWS-induced

- coronary arteritis in mice. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
4. Eri Muso, Toshiko Ito-Ihara, Takahiko Ono, Enyu Imai, Kunihiro Yamagata, Akira Akamatsu, Kazuo Suzuki. Establishment of the evidence of beneficial effect of Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy on MPO-ANCA related polyangiitis combining rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) in Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  5. Toshiko Ito-Ihara, Kazuko Uno, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Toshiyuki Komiya, Akiko Ishida-Okawara, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Kazuo Suzuki, and Eri Muso. Sensitive detection of myeloperoxidase expression on neutrophil of patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  6. S. Fujimoto, S. Uezono, S. Hisanaga, K. Fukudome, S. Kobayashi, N. Tamura, K. Suzuki, H. Hashimoto, H. Nunoi. Incidence of primary renal vasculitis in Miyazaki, Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  7. S. Kobayashi, N. Tamura, T. Ihara, E. Muso, K. Suzuki, M. Yoshida, K. Nakabayashi, N. Tsuchiya, M. Kurosawa, Y. Inaba, S. Fujimoto, H. Nunoi, H. Hashimoto. Prevalence of microscopic polyangiitis/Wegener's granulomatosis and the ratio of P-,MPO-/C-,PR-3- ANCA in ANCA-associated vasculitis in Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  8. A. Ishida-Okawara, N. Nagi-Miura, T. Oharaseki, N. Ohno, K. Takahashi, H. Okamura, P.A. Ward, K. Suzuki. Neutrophil activation as in initial step with CAWS in mouse. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  9. K. Suzuki, K. Murayama, T. Nagao, T. Oharaseki, A. Hasegawa, A. Ishida-Okawara, N. Miura, N. Watanabe, M. Handa, K. Takahashi, N. Ohno, H. Minamitani, T. Nakayama, T. Arai. Contribution of CD69 to the development of coronary arteritis induced with a vasculitis Inducer *Candida albicans* water soluble fraction. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  10. Hoshino, T. Nagao, K. Murayama, A. Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, K. Uno, E. Muso, N. Nagi-Miura, N. Ohno, S. Naoe, K. Tokunaka, M. Yasuhara, K. Yamamoto and K. Suzuki. Trace of antibody to myeloperoxidase (MPO) with nanocrystal quantum dots-labeled antibody recognizing activating neutrophils in glomerulonephritis and a vasculitis inducer CAWS-injected mice. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  11. T. Ito-Ihara, K. Uno, T. Ono, A. Fukatsu, T. Kita, K. Suzuki, and E. Muso. Circulating myeloperoxidase and cytokine profiles in myeloperoxidase- antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. 3rd World Congress of Nephrology. Singapore.
  12. Kura F, Kobayashi S, Amemura-Maekawa J, Aratani Y, Suzuki K, Watanabe H. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Legionella pneumophila*. 6th International Conference on Legionella. October 16-20, 2005, Chicago, USA.
  13. Miura NN, Komai M, Shingo Y. Adachi Y, Okawara AI, Oharaseki T, Takahashi K., Naoe S, Suzuki K, Ohno N. Cytokine synthesis of splenic lymphocytes in murine coronary arteritis model induced by CAWS (*Candida albicans* water-soluble fraction) administration. International Cytokine Society Conference 2005, October 27-31, 2005, Soul, Korea.
  14. Suzuki K. Estimation of the development of rapid progressive glomerulonephritis (RPGN) by the Quantum Dots. International Symposium on Colloidal Quantum Dots for Bio-Medical Applications and Their Safety, November 26, 2005, Kobe, Japan.
  15. A. Hoshino, T. Nagao, K. Fujioka, T. Ito-Ihara, K. Uno, E. Muso, K. Murayama, A. Ishida-Okawara, N. Nagi-Miura, N. Ohno, S. Naoe, K. Tokunaka, M. Yasuhara, K. Yamamoto, and K. Suzuki. Trace of Antibody to Myeloperoxidase with Nanocrystal Quantum Dot-Labeled Antibody Recognizing Activating Neutrophils in Glomerulonephritis and Vasculitis Inducer *Candida albicans* Water-Soluble Glycoprotein-Injected Mice. The International Society for Optical Engineering-BIOS 2006 - Symposia - Photonics West 2006 - Program - Conferences 21-26 January 2006, San Jose, California, USA
  16. K. Suzuki. Needs of Synthetic IVIg in the World. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  17. T. Nozu, M. Kondo, K. Suzuki, A. Nagai. Prevalence and clinical manifestation of pulmonary fibrosis in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  18. K. Takahashi, K. Suzuki, et al. The Effect of Synthetic Immunoglobulin (SyIG) in Mice

- Vasculitis Model caused by CAWS. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
19. N. Ohno, K. Suzuki, et al. Culture condition modulates active moiety of CAWS, vasculitis inducer from *C. albicans*. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  20. A.I. Okawara, K. Suzuki, et al. Activation of neutrophils in the initial step of arteritis induction by CAWS. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  21. T. Ito-Ihara, K. Suzuki, et al. Circulating Levels of IL-12, 23 and IL-18 in Patients with MPO-ANCA-associated Vasculitis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  22. T. Ono, K. Suzuki, et al. The relationship between renal lesions and lung vascular lesions in SCG/Kj mice as a model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  23. W. Yumura, K. Suzuki, et al. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis - Analysis of Pathogenesis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  24. Y. Yamanishi, K. Suzuki, et al. Usefulness of nMPO-ANCA in diagnosing and treating vasculitis - discrepancy between MPO-ANCA and nMPO-ANCA-. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  25. M. Furutani, K. Suzuki, et al. Synthetic polyclonal immunoglobulin. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
1. 荒谷康昭, 倉 文明, 渡辺治雄, 高野幸枝, 鈴木和男, 小山秀機 真菌感染と好中球機能 第78回 日本細菌学会総会シンポジウム 4月4日-5日 (東京)
  2. 多田 壘, 三浦典子, 安達禎之, 鈴木和男, 大野尚仁 *Candida albicans* 菌体由来多糖画分とLPS (*E. coli* O9)の免疫化学・生物活性の交差反応性の解析 第78回日本細菌学会総会 4月4日-6日 (東京)
  3. 鈴木和男 安全なガンマグロブリン製剤-血管炎治療をめざして- 第12回代替血液学会 6月6-7日 (東京)
  4. 原田 敏江, 川南 裕美, 三浦 典子, 安達禎之, 鈴木 和男, 大野 尚仁 真菌多糖によるGM-CSFを介したサイトカイン産生誘導機構 生体防御機能ワークショップ2005-第2回香川ガレクチンカンファレンス共催 6月9日-10日 (高松)
  5. 鈴木和男, 村山研, 長尾朋和, 大川原明子, 大原関利章, 高橋啓, 長谷川明洋, 三浦典子, 大野尚仁, 渡邊直英, 半田誠, 南谷晴之, 野津朋子, 永井厚志, 新井孝夫, 中山俊憲 *Candida albicans* water soluble fraction(CAWS)によって誘導される冠状動脈炎の発症へのCD69の関与 生体防御機能ワークショップ2005-第2回香川ガレクチンカンファレンス共催 6月9日-10日 (高松)
  6. 猪原登志子, 古宮俊幸, 宇野賀津子, 田原佐知子, 辻井知美, 塚本達雄, 小野孝彦, 岸田綱太郎, 鈴木和男, 深津敦司, 北徹, 武曾恵理 MPO-ANCA 関連急速糸球体腎炎の血中サイトカインの動態 第48回日本腎臓学会学術総会 6月24日 (横浜)
  7. 星野昭芳, 長尾朋和, 村山研, 大川原明子, 猪原登志子, 武曾恵理, 宇野賀津子, 三浦典子, 大野尚仁, 直江史郎, 徳中一寛, 安原真人, 山本健二, 鈴木和男 血管炎発症初期の好中球活性化に関与する血中サイトカインの変動とQD標識MPO抗体の*in vivo*トレース 第70回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 7月20-21日 (京都)
  8. 長尾朋和, 村山研, 大川原明子, 大原関利章, 高橋啓, 長谷川明洋, 三浦典子, 大野尚仁, 渡邊直英, 半田誠, 南谷晴之, 野津朋子, 永井厚志, 新井孝夫, 中山俊憲, 鈴木和男 CD69関与の血管炎発症に連動する8種サイ

## 国内会議

- トカインの挙動第 70 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 7月 20-21 日 (京都)
9. 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理 ANCA 関連血管炎症候群における IL-12 と IL-18 の動態 第 70 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 7月 20-21 日 (京都)
  10. 武曾恵理、猪原登志子、古宮俊幸、宇野賀津子、岸田綱太郎、鈴木和男 シンポジウム 1 『生体防御異常が誘発する難治性疾患』難治性血管炎の発症機序と治療戦略第 16 回日本生体防御学会学術総会 8月 4 日～8月 6 日 (東京)
  11. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、高野幸枝、赤川久義、鈴木和男、小山秀機好中球の機能異常が誘発する真菌感染 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8月 4 日～8月 6 日 (東京)
  12. 亀岡洋祐、伊東玲子、笠間毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、鈴木和男 ミエロペルオキシダーゼ遺伝子コード領域の多型 (SNP) と炎症性疾患の重篤度との関係 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8月 4 日～8月 6 日 (東京)
  13. 倉文明、小林静史、前川純子、常彬、荒谷康昭、鈴木和男、渡辺治雄 シンポジウム 3 『生体防御の役割をになう新ファミリー NOX: 植物-動物』*Legionella pneumophila* に対する感染防御機構、NOX2 など 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8月 4 日～8月 6 日 (東京)
  14. 鈴木和男 パネルディスカッション『感染症防御-歴史と新しい研究アプローチに向けて』 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8月 4 日～8月 6 日 (東京)
  15. 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 16 回日本生体防御学会学術総会 8月 4 日～8月 6 日 (東京)
  16. 長尾朋和、村山研、野津朋子、大川原明子、大原関利章、高橋啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田誠、南谷晴之、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 CD69 分子と活性化好中球による血管炎発症 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8月 4 日～8月 6 日 (東京)
  17. 星野昭芳、長尾朋和、村山研、大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、宇野賀津子、三浦典子、大野尚仁、直江史郎、徳中一寛、安原真人、山本健二、鈴木和男量子ドット(QD)標識抗マウス MPO 抗体を用いた血管炎発症に関わる活性化好中球 MPO 分子の蛍光による検出 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8月 4 日～8月 6 日 (東京)
  18. 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低下 第 11 回 MPO 研究会 10月 15～16 日 (福岡)
  19. 大野尚仁、篠原弘靖、三浦典子、石橋健一、安達禎之、大川原明子、鈴木和男、大原関利章、高橋啓、直江史郎 真菌由来の PAMPs, *Candida albicans* Water-soluble fraction (CAWS) の血管炎惹起能における  $\beta$  マンノース残基の影響 第 11 回 MPO 研究会 10月 15～16 日 (福岡)
  20. 亀岡洋祐、Persad A、鈴木和男 「ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチドに対する抗体の性状 第 11 回 MPO 研究会 10月 15～16 日 (福岡)
  21. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒト MPO 分子にける MPO-ANCA エピトープ解析 第 11 回 MPO 研究会 10月 15～16 日 (福岡)
  22. 武曾恵理、鈴木進子、岩崎由加子、辻井知美、古宮俊幸、米本智美、塚本達雄、猪原登志子、宇野賀津子、鈴木和男 MPO-ANCA 関連腎炎血管炎に合併する悪性疾患症例の解析と

- 考察 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15~16 日 (福岡)
23. 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理 ANCA 関連血管炎症候群における IL-12, IL-23 と IL-18 の動態 ANCA 関第 11 回 MPO 研究会 10 月 15~16 日 (福岡)
  24. 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 11 回 MPO 研究会 10 月 15~16 日 (福岡)
  25. 鈴木和男、長尾朋和、村山研、大川原明子、大原関利章、高橋啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田誠、南谷晴之、野津朋子、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲 好中球血管炎発症にかかわる CD69 分子と活性化好中球 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15~16 日 (福岡)
  26. 松村実美子、長尾朋和、三川浩輝、村山 研、大川原明子、南谷晴之、鈴木和男血管炎発症機構の解析：MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15~16 日 (福岡)
  27. 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理 ANCA 関連血管炎症候群における IL-12, IL-23 と IL-18 の動態 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15~16 日 (福岡)
  28. 鈴木和男、星野昭芳、長尾朋和、猪原登志子、宇野賀津子、徳中一寛、大川原明子、三浦典子、大野尚仁 Q ドットによる進行性糸球体腎炎の評価 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15~16 日 (福岡)
  29. 松村実美子、長尾朋和、三川浩輝、村山 研、大川原明子、南谷晴之、鈴木和男血管炎発症機構の解析：MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用 第 14 回日本バイオイメーキング学会 10 月 26-28 日 (東京)
  30. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒト MPO 分子における MPO-ANCA エピトープ解析 第 14 回日本バイオイメーキング学会 10 月 26-28 日 (東京)
  31. 鈴木和男 好中球自己抗体 MPO-ANCA の抗原性と病態 第 33 回臨床免疫学会 10 月 28-30 日 (京都)
  32. 鈴木和男 血管炎発症機構における CD69 分子を介する好中球・血小板相互反応第 28 回日本血栓止血学会 11 月 23-25 日 (福岡)
  33. 飛田俊介、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、中山俊憲、大野 尚仁  $\beta$  グルカンをを用いたコラーゲン誘発関節炎モデルにおける CD69 の発現解析第 28 回分子生物学会 12 月 8-10 日 (福岡)
  34. 亀岡洋祐、笠間 毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男 ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチドの細胞内局在第 28 回分子生物学会 12 月 8-10 日 (福岡)
  35. 松村 実美子、長尾 朋和、三川 浩輝、村山 研、大川原 明子、南谷 晴之、鈴木 和男血管炎発症機構の解析：MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用 第 28 回分子生物学会 12 月 8-10 日 (福岡)
  36. 野津朋子、松村実美子、大川原明子、長谷川明洋、中山俊憲、永井厚志、鈴木和男 活性化好中球関与の肺血管内皮細胞の機能解析 第 28 回分子生物学会 12 月 8-10 日 (福岡)
  37. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒト MPO 分子上の MPO-ANCA 結合部位エピトープ解析 第 28 回分子生物学会 12 月 8-10 日 (福岡)
  38. 長尾朋和、大原関利章、長谷川明洋、大川原明子、三浦典子、野津朋子、高橋啓、大野尚仁、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 CD69 contributes to the development of vasculitis 第 35 回免疫学会 12 月 13-15 日 (横浜)
  39. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、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 第 35 回免疫学会 12 月 13-15 日 (横浜)
  40. 鈴木和男、星野昭芳、長尾朋和、猪原登志子、宇野賀津子、徳中一寛、大川原明子、三浦典子、大野尚仁 血管炎発症初期の好中球活性化に関与する血中サイトカインの変動と QD 標識 MPO 抗体の in vivo トレース 第 35 回免疫学会 12 月 13-15 日 (横浜)
  41. 大野尚仁、三浦典子、石橋健一、安達禎之、高橋啓、大原関利章、直江史郎、大川原明子、鈴木和男 *Candida albicans* 由来の血管炎惹起物質 CAWS の活性部位の解析 第 35 回免疫学会 12 月 13-15 日 (横浜)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

**G. 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



## 新規半導体ナノ粒子 Si-QD, Ge-QD の細胞毒性

分担研究者 太田 敏博 東京薬科大学・生命科学部・助教授  
協力研究者 松元 郷六 財) 残留農薬研究所・毒性部・室長

Si または Ge をコアにした新規半導体ナノ粒子(QD)は、その表面の親水加工にアリルアミンが使われている。アリルアミンは毒性の非常に強い物質であるため、新規 QD の安全性についての知見を集積するため、ほ乳動物培養細胞に対する細胞毒性を調べることを目的とした。Si-QD, Ge-QD (いずれも 50  $\mu\text{mol/mL}$ ) を 1/1000 (v/v) 量添加した場合には ATP 量の減少は全く見られなかったが、1/200 (v/v) 量添加した場合には ATP 量が半分以下になり、1/100 (v/v) 量添加では細胞がすべて死滅した。したがって 0.5  $\mu\text{mol/mL}$  以上の濃度では強い細胞毒性があることが判明した。供試サンプル中に遊離のアリルアミンが混在している可能性も考えられたため、透析によって低分子のアリルアミンを除いた精製品について調べた。Si-QD (purify) は 0.5  $\mu\text{mol/mL}$  で、Ge-QD (purify) は 0.2  $\mu\text{mol/mL}$  処理で ATP 量は各々無処理対照の 4%、0.1% となり、透析前のサンプルと同程度の強い細胞毒性が認められた。透析処理が有効でなかった可能性、QD 表面のアリルアミンが細胞内で解離して毒性を示している可能性などが考えられる。いずれにしても表面加工物質に低毒性物質を選択して開発を進めることが重要と判断された。

### A. 研究目的

Si または Ge をコアにした新規半導体ナノ粒子(QD)の安全性についての知見を集積するため、ほ乳動物培養細胞に対する細胞毒性を調べることを目的とした。供試サンプル Si-QD, Ge-QD はいずれもアリルアミン( $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{NH}_2$ )で表面の親水加工が施されている。しかし、このアリルアミンは毒劇物取締法では毒物に指定されている有害性物質であることから、Si-QD, Ge-QD の安全性については十分に検討する必要があると考えられる。

一方、QD 類はその製法、製造コストの理由から大量に入手することが困難である。したがって、一般化学物質の毒性評価で用いられているコロニー形成法などの標準試験法を適用することができない。そこで、本研究では細胞増殖の指標として細胞内 ATP 量を測定することによって細胞毒性を評価した。24 ウェルプレートで培養した CHL 細胞を QD で 24 時間処理した後、細胞から ATP を抽出してその総量をルシフェラーゼアッセイによって定量した。

### B. 研究方法

細胞内 ATP の総量の定量には、ルシフェール 250 を用いた。この試薬キットにはホタルルシフェラーゼとルシフェリンが入っている。ATP (および酸素) と共存すれば、ルシフェリンがオキシルシフェリンに変化すると同時に光を放つ。反応によって生じる光の量は ATP 量に比例するため、細胞内 ATP の総量を求めることにより、細胞総数を測定することができる。

ルミテスター用いた細胞増殖率の測定

1. 24-well plate に CHL 細胞を 50,000 個/well の割合で播種。
2. 24 時間後、パスツールピペットを用いて各穴の培地を捨て、各用量の試験培地 1 mL を静かに加える。陰性対照も含む。各用量あたり 3 穴を用いる。
3. 24 時間後、各穴の検体処理培地を捨てる。
4. PBS(-)を約 1 mL ずつ添加し細胞をリンスする。
5. 0.15 mL の 0.25%トリプシン液を添加し

37°Cで10分間保温。

6. 100%冷メタノールを1 mL ずつ添加し4°Cで15分間放置 (ATPの抽出)。
7. 攪拌後、各穴からメタノール抽出液 50  $\mu$ L を取り出し、5 mL の純水で希釈 (100倍希釈)。
8. この希釈液 100  $\mu$ L を ATP 測定用チューブ (ルミチューブ) に移す。
9. 発光試薬 (ルシフェール 250) 100  $\mu$ L を添加し、攪拌後、直ちにルミノメーター (ルミテスター C-100LU) にて相対発光量 (Relative Light Unit=RLU) を測定。

#### C. 研究結果

Si-QD, Ge-QD (いずれも 50  $\mu$ mol/mL) を 1/1000 (v/v) 量添加した場合には ATP 量の減少は全く見られなかったが、1/200 (v/v) 量添加した場合には ATP 量が半分以下になり、1/100 (v/v) 量添加では細胞がすべて死滅した。したがって 0.5  $\mu$ mol/mL 以上の濃度では強い細胞毒性があることが判明した。供試サンプル中に遊離のアリルアミンが混在している可能性も考えられたため、透析によって低分子のアリルアミンを除いた精製品 (1  $\mu$ mol/mL Si-QD, 0.3  $\mu$ mol/mL Ge-QD) について調べた。Si-QD (purify) は 0.5  $\mu$ mol/mL で、Ge-QD (purify) は 0.2  $\mu$ mol/mL 処理で ATP 量は各々無処理対照の 4%、0.1% となり、透析前のサンプルと同程度の強い細胞毒性が認められた。

#### D. 考察

透析処理によって細胞毒性の軽減が認められなかったことから、QD 表面のアリルアミンが細胞内で解離して毒性を示している可能性も考えられる。あるいは透析が有効でない可能性もあり、粒子サイズを考慮した精製法を検討する必要がある。一方で、低毒性・無毒性の表面加工物質の選択も今後の重要な開発課題であると思われる。

#### E. 結論

毒性の懸念が払拭できない Cd/Se コアシェル型 QD 粒子に比べ、Si-QD は安全性の観点から有望であると考えられる。しかし、表面加工物質に現在使われているアリルアミンは毒性が非常に高いため、これに替わる物質を見つけることが必要である。

#### F. 健康危険情報

培養細胞を用いた細胞毒性試験において Si-QD, Ge-QD はかなり強い細胞毒性を示した。表面加工に用いたアリルアミンが原因と考えられるが、混在量については不明なため、使用時に QD 粒子を吸入しないよう注意が必要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Watanabe-Akanuma, M. and T. Ohta, Inhibitory effects of NADH/NADPH in S9mix on photo-mutagenicity of thiabendazole following UVA-irradiation in *E. coli*. *Environ. Mutagen Res.*, 27, 7-12 (2005)
- (2) Watanabe-Akanuma, M., T. Ohta, and Y. F. Sasaki, A novel genotoxic aspect of thia-bendazole as a photomutagen in bacteria and cultured human cells. *Toxicol. Lett.*, 158, 213-219 (2005)
- (3) 祖父尼俊雄, 能美健彦, 太田敏博, 林真, 遺伝毒性: DNA 直接作用物質に閾値は存在するのか, 環境変異原研究, 27, 61-73 (2005)
- (4) Ohta, T., S. Tokishita, M. Sakahira, K. Mochizuki, J. Kawase, and H. Yamagata, UV sensitivity and mutagenesis of the extremely thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus* HB27. *Genes Environ.*, (in press)

##### 2 学会発表

(国内学会)

- (1) 森一朗、時下進一、太田敏博、山形秀夫, *Thermus thermophilus* の  $\beta$ -glucosidase 遺伝子をレポーターにした DNA 修復遺伝子の発現様式の解析 (1), 極限環境微生物学会, 2005
- (2) 今塚礼子、時下進一、太田敏博、山形秀夫, *Thermus thermophilus* の  $\beta$ -glucosidase 遺伝子をレポーターにした DNA 修復遺伝子の発現様式の解析 (2), 極限環境微生物学会, 2005
- (3) 望月佳世、時下進一、太田敏博、山形秀夫, 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の脱アミノ、アルキル化損傷塩基の修復欠損株の特性の解析, 日本環境変異原学会, 2005
- (4) 坂平昌英、時下進一、太田敏博、山形秀夫, 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の UV エンドヌクレアーゼ欠損株の特性の解析, 日

- 本環境変異原学会, 2005
- (5) 角田真澄、中島大介、倉持秀敏、後藤純雄、赤沼三恵、太田敏博, マルトールへの紫外光照射によって生成する変異原性物質の探索, 日本環境変異原学会, 2005
- (6) 赤沼三恵、稲葉洋平、太田敏博, 香料マルトールの UVA 照射による変異原性の発現機構, 日本環境変異原学会, 2005
- (国際学会)
- (1) Mie Watanabe-Akanuma and Toshihiro Ohta, Photomutagenic property of a flavoring maltol with UVA-irradiation in bacterial cells, 9th International Conference of Environmental Mutagen, San Francisco, 2005
- (2) Toshihiro Ohta, Mutagenesis in DNA repair-deficient mutants of the extremely thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus* HB27, 9th International Conference of Environmental Mutagen, San Francisco, 2005
- (3) Toshihiro Ohta, The safety of the colloidal quantum dots, International Symposium on Colloidal Quantum Dots for Biomedical Applications and their Safety, Kobe, 2005
- H. 知的所有権の出願・取得状況  
「なし」

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告

量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

分担研究者 山本 悟 国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院眼科・医長

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

研究要旨

本研究は、一桁ナノメートルサイズの量子ドットを用いて、生物・医療分野に利用できるように、表面加工および表面修飾したものを透明な眼球硝子体腔に入れることによって量子ドットが持つ蛍光で硝子体を染色し、硝子体の詳細を観察可能なようにするものであり、これによって安全で簡易な硝子体手術も可能となる。これらにより硝子体を引き起す眼疾患の病理の解明や治療法の進歩に貢献することを目指す。

A. 研究目的

近年、多くの眼疾患が硝子体の病理学的及び／又は生理学的変化と関連していることが知られてきている。たとえば、加齢による硝子体の液化融解（liquefaction）は網膜剥離や網膜裂傷（retinal tear）を誘導し、また黄斑浮腫（macular edema）は黄斑（macula）への硝子体牽引（traction）に関連し、それぞれを原因として重症例、進行例では失明をもたらす。

そのため、硝子体内の混濁状態や病変の有無を観察することは重要である。しかし、硝子体は透明なゲル上物質から構成されるため、硝子体内の観察は困難であり、日常的な臨床的状況で透明な硝子体を観察するための適切な方法はない。

更に、硝子体の手術においても透明な

ゲルを対象とするため視認性の高い組織の手術に較べると難しく、また、手術によるリスクも高い。

以上のことから日常的な診断及び／又は手術において、眼の硝子体を簡便に安全に観察し得る手段及び方法を提供することを目的とする。

B. 研究方法

ナノ粒子を摘出豚眼内に27Gの注射針にて注入し、日常外来で使用する細隙灯顕微鏡で観察する。

他の染色材料も同様に注入して比較検討を行なう。

また、硝子体手術を豚眼にてシュミレーションし、注入したナノ粒子で染色された豚眼と、その他の染料にて染色された豚眼における手術の簡易性・安全性を比較検討する。

C. 研究結果

他の染料に較べ、ナノ粒子によって染色された硝子体の観察は容易であり、詳細