

D. 考察

細胞を対象とした簡便な系を構築することは、動物愛護の観点とともに、抗体の評価の効率化の面からも重要である。本研究で示されたようにカチオン性脂質によるモノクローナル抗体導入法をもちいれば、抗体導入に伴う細胞内の酵素活性の変化などを追うことが可能である。適当な指標を定めることができれば、短時間にしかも多数の標品の効果を調べることができる。

Ha 領域には SS 結合が複数存在し、これが MPO の立体構造に重要な寄与をしていると考えられている。Hb 領域ペプチドに対する抗体が MPO を認識したのに対し、Ha 領域ペプチドに対する抗体が MPO 結合性を示さなかったことに対するひとつの解釈として、この領域の SS 結合が関係していると思われる。

E. 結論

本研究は、MPO-ANCA リスクエピトープに対するモノクローナル抗体の作製と評価にとって重要な貢献をした。第一は、ポリカチオン性脂質をもちいた抗体導入法を利用して、抗体導入に伴う細胞内酵素、タンパク質の機能変化を評価する系確立の基礎を築いたことである。第二は、各リスクエピトープに対するモノクローナル抗体を作製し、抗体の性質からみた各領域の特徴を知ったことである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Namekawa, S., Hamada, F., Sawado, T.,

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

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

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

4) Maruyama, K., Ohuchi, T., Yoshida, K., Shibata, Y., Sugawara F. and Arai, T. (2004) Protective properties of neoechinulin A against SIN-1-induced neuronal cell death. *J. Biochem. (Tokyo)* 136: 81-87.

5) 新井孝夫 (2004) モノクローナル抗体をもちいたポリグルタミン酸化チューブリンの神経細胞内局在、*実験医学*、22: 1876-1877.

6) Okada, Y., Suzuki, A., Takagi, S., Hirai, H., Saitoh, R., Adachi, A., Yanagisawa, T., Ueki, M., Fujii, T. and Arai, T. (2004) Polyglutamylation of tubulin during differentiation of neural precursor cells. *Bioimages*, 12: 71-83.

7) Aoki, T., Kamisuki, S., Kimoto, M., Onishi, K., Takakusagi, Y., Kuramochi, K., Takeda, Y., Nakazaki, A., Kuroiwa, K., Ohuchi, T., Sugawara, F., Arai, T. and Kobayashi, S. (2006) Total synthesis of (-)-neoechinulin. *Synlett*, in press.

2. 学会発表

- 1) 大内 敬、新井孝夫：モノクローナル抗体の生細胞導入のための新しい技術の開発、公開シンポジウム バイオイメーシングとナノテクノロジー、東京、2003年2月
- 2) 鳥飼祐介、石川広平、大谷圭司、栗原傑、大内敬、新井孝夫、抗 Thy-1 抗体 2E11 誘因による PC12 細胞の突起伸展を阻害するモノクローナル抗体の作製、第 56 回日本細胞生物学会大会、大津、2003年5月
- 3) 大内敬、柴田麻衣、前川原淳、新井孝夫、カチオン性リポソームによるモノクローナル抗体導入法を用いた細胞内タンパク質の機能解析、第 56 回日本細胞生物学会大会、大津、2003年5月
- 4) 新井孝夫：モノクローナル抗体による分子機能解析、日本バイオイメーシング学会と化学工学会の連携による「ナノとバイオの融合学理構築、産業基盤形成」シンポジウム、松島、2003年9月
- 5) Y. Shibata, K. Maruyama, K. Yoshida, T. Ohuchi, T. Arai: Neuroprotective effect of neoechinulin A on peroxynitrite treated PC12 cells, 第 76 回日本生化学会大会、横浜、2003年10月
- 6) Y. Okada, A. Suzuki, K. Ishikawa, T. Ohuchi, T. Arai: Polyglutamylation of tubulin during the neuronal differentiation of neural precursor cells induced by retinoic acid and BDNF, 第 76 回日本生化学会大会、横浜、2003年10月
- 7) 新井孝夫、大内敬：タンパク質の機能解析に有用なモノクローナル抗体の作製戦略と応用技術の開発、第 12 回日本バイオイメーシング学会学術集会、東京、2003年10月
- 8) 眞島利和、大谷圭司、富江俊尚、大内敬、新井孝夫：細胞外マトリックスの X 線イメージング、第 12 回日本バイオイメーシング学会学術集会、東京、2003年10月
- 9) 清水一生、大内敬、新井孝夫：生細胞中の微小管と結合するモノクローナル抗体のリポソーム法によるスクリーニング、第 12 回日本バイオイメーシング学会学術集会、東京、2003年10月
- 10) 石川広平、鳥飼祐介、新井孝夫：神経幹細胞からアストロサイトへの分化における Thy-1、integrin 分子の役割、第 12 回日本バイオイメーシング学会学術集会、東京、2003年10月
- 11) 小久保潤、吉田健二、新井孝夫：脂質過酸化反応産物 4-hydroxynonenal の微小管重合に対する影響、第 57 回日本細胞生物学会大会、大阪、2004年5月
- 12) 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男：血管炎における活性化好中球の CD69 分子、15 回日本生体防御学会、長崎、2004年7月
- 13) 木本匡昭、青木俊明、倉持浩司、柴田康史、丸山清稔、大内敬、黒岩憲二、小林進、新井孝夫：neoechinulin A 及び構造類似縁体の、分化 PC12 細胞に対する保護作用と細胞毒性、第 77 回日本生化学会大会、横浜、2004年10月

14) 小久保潤、岡田陽介、黒岩憲二、新井孝夫：脂質過酸化反応産物 4-hydroxynonenal の微小管に対する影響、第 13 回日本バイオイメーキング学会学術集会、京都、2004 年 11 月

15) 山岸舞、村山研、坂本明彦、新井孝夫、鈴木和男、船津高志：好中球の活性化に伴う CD69 分子の細胞膜表面移行のイメージング、第 13 回日本バイオイメーキング学会学術集会、京都、2004 年 11 月

16) 塚田充泰、小久保潤、黒岩憲二、新井孝夫：アストログリア細胞の分子マーカーとなるモノクローナル抗体の作製、第 13 回日本バイオイメーキング学会学術集会、京都、2004 年 11 月

17) 新井孝夫：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、ナノメディシン公開シンポジウム「「ナノバイオイメーキングで切り開く先端的生体機能解析—血管炎と微小循環血流障害における分子生理機能を解き明かす—」、東京、2004 年 12 月

18) 畠山佳子、柴田康史、木本匡昭、石原航介、青木敏明、黒岩憲二、小林進、新井孝夫：ネオエキヌリン A の神経保護作用の研究、第 58 回日本細胞生物学会大会、大宮、2005 年 6 月

19) 藤井佐和子、岡田陽介、小久保潤、山岸竜大、塚田充泰、黒岩憲二、新井孝夫：神経細胞の分化におけるチューブリンポリグルタミン酸化の役割、第 58 回日本細胞生物学会大会、大宮、2005 年 6 月

20) 小久保潤、足立磨美、山岸竜大、藤井佐和子、塚田充泰、黒岩憲二、新井孝夫：チューブリンは脂質過酸化反応産物 4-ヒドロキシノネナールの主要な標的タンパク質

である、第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005 年 10 月

21) 木本匡昭、青木敏明、畠山佳子、塚越百合子、倉持幸司、黒岩憲二、小林進、新井孝夫：ネオエキヌリン A による神経保護作用の研究、第 78 回日本生化学会大会、神戸、2005 年 10 月

22) 塚田充泰、小久保潤、黒岩憲二、新井孝夫：モノクローナル抗体 1A6 及び 1E7 の認識するアストログリア特異的抗原の解析、第 14 回日本バイオイメーキング学会学術集会、東京、2005 年 10 月

23) 山岸竜大、小久保潤、藤井佐和子、黒岩憲二、新井孝夫：ニトロチロシン添加により誘導される神経細胞死におけるチューブリンの修飾、第 14 回日本バイオイメーキング学会学術集会、東京、2005 年 10 月

H. 知的所有権の取得状況

なし

炎症疾患治療評価を行うためのモデル動物の解析と MPO 抗体作製のデザイン

分担研究者： 荒谷康昭 横浜市立大学木原生物学研究所・助教授

研究要旨: ミエロペルオキシダーゼ (MPO) および MPO-ANCA 関連免疫疾患の発症機序の解析と、その治療法の開発のために有効利用できる、MPO ノックアウトマウス (MPO-KO マウス) の性状解析に従事した。また、MPO-ANCA 血管炎における MPO のリスクエピトープ領域の抗体を作製するための抗原ペプチドのデザインに携わった。紫外線をマウスの背部に照射し、実験的皮膚炎を誘発させ、皮膚の組織病理像を比較したところ、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、NADPH オキシダーゼ (Nox2) を欠損する 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。すなわち、MPO や Nox2 を欠損することによって紫外線誘発皮膚炎の発症が促進することが明らかとなった

A. 研究目的

炎症疾患治療評価を行うためのモデル動物としての、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) のノックアウトマウス (MPO-KO マウス) の性状解析を行うことを第一の目的とした。好中球は病原微生物の感染等によって活性化されることで、様々な活性酸素やプロテアーゼを産生して、その病原微生物を殺菌し、感染初期の生体防御に重要な役割を担っている。ところが、好中球からの活性酸素の産生が長時間持続すると正常組織にも傷害を与えて炎症を助長するという生体にとっての悪影響が懸念される。

活性化した好中球は、NADPH オキシダーゼ (Nox2) によって酸素からスーパーオキシドを、また 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-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、紫外線誘発皮膚炎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。また、MPO-ANCA 血管炎のリスクエピトープを検証するための MPO 抗体を作製することを第二の目的とした。

B. 研究方法

実験には 8-10 週令の雌マウスを使用した。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 マウスの交配により作製した。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飼育管理した。各マウスの背部に紫外線(UVB)を照射し、組織切片の H&E 染色像および免疫染色像によって炎症の経時的变化を解析した。皮膚患部のケモカイン産生量は、組織破砕液上清を調製して、ELISA 法で測定した。好中球からのケモカイン産生量は、チオグリコレートを腹腔投与し、4 時間後に侵出してきた好中球をフォルボールエステル(PMA)で活性化し、1 時間後の培養上清を ELISA 法で測定した。好中球の *in vivo* ケモカイン走化性は、マウス背部に常法に準じて air pouch をつくり、その中に KC を注入し、2 時間後の pouch 内好中球数を測定した。

MPO 抗体作製のための MPO ペプチドは、本研究班主任研究者の鈴木らの研究結果より、Ha 領域(63 アミノ酸)、Hb 領域(69 アミノ酸)、および Hg 領域(82 アミノ酸)に焦点を絞り、それらの領域のすべてを網羅できる 8-47 アミノ酸からなるペプチドを化学合成する戦略をデザインした。モノクローナル抗体は、本研究班の新井によって作製された。

C. 研究結果

紫外線誘発皮膚炎の解析：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 マウスをはじめとするすべてのノックアウトマウスでは既に炎症細胞の浸潤の沈静化が認められた。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す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)。

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から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。

このように炎症速度に違いが生じる理由を知るために、UVB 照射 48 時間後の皮膚患部の KC 量と MIP-2 量を測定した。その結果、MPO-KO マウスや CGD マウスの方が、野生型マウスよりも MIP-2 産生量が多いことが判明した (図 3)。KC 量に差は認められなかった。MIP-2 の産生源を知るために、腹腔から単離した好中球を PMA で活性化させた際の MIP-2 産生量を測定した。その結果、MPO を欠損する好中球も NADPH オキシダーゼを欠損する好中球も、野生型好中球よりも有意に多量の MIP-2 を産生することがわかった (図 4)。すなわち、好中球由来の活性酸素は、自身が産生する MIP-2 量を制御していることが示された。次に、KC に対する好中球の *in vivo* 走化性を調べた。マウス背部に作製した air pouch 内に KC を注入し、2 時間後に pouch 内に侵出した好中球数を測定

したところ、MPO-KO マウスの方が野生型マウスよりおよそ 2 倍多く、CGD マウスや MPO-KO/CGD マウスでは MPO-KO マウスよりもさらに多くの好中球の侵出が観察された (図 5)。

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。また、好中球が産生する活性酸素は、好中球の KC に対する走化性や MIP-2 産生能を制御し、このことが UVB 照射を施した際の皮膚炎の発症速度に寄与している可能性が示唆された。

MPO のペプチドの化学合成: MPO のペプチドは、Ha 領域について 3 種類 (アミノ酸 4-11、14-37、39-63)、Hb 領域について 2 種類 (アミノ酸 1-47、47-68)、Hg 領域について 2 種類 (アミノ酸 1-39、40-82) を化学合成した。

D. 考察

本研究によって、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がより早期に浸潤することから、浸潤した好中球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。また、好中球が産生する活性酸素は、好中球自身の走化性やケモカイン産生も制御していることが示された。以上の結果によって、活性酸素産生を欠如するマウスが、より早期に皮膚炎を発症するメカニズムの一端が解き明かされたことになり、炎症疾患治療評価を行うためのモデル動物の解析という本研究課題に飛躍的進展を認めた。活性酸素が走化性を制御するメカニズムや、ケモカイン産生を制御するメカニズムをさらに詳細に解析することが、今後の課題として残されている。

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、好中球の走化性やケモカイン産生に異常をきたし、紫外線による皮膚炎の早期発症を起こすことがわかった。

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) Komatsu, J., Koyama, H., Maeda, N., and Aratani, Y: Earlier onset of neutrophil-mediated inflammation in the ultraviolet-exposed skin of mice deficient in myeloperoxidase and NADPH oxidase. *Inflamm. Res.* In press.

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, 2004.
- 5) 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、2005 年 4 月 (東京)
- 6) 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, June, 2005
- 7) 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集会、2005 年 8 月 (東京)
- 8) 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: *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集会、2005 年 8 月 (東京)
- 9) 荒谷康昭: 真菌感染と好中球ミエロペルオキシダーゼ。第 49 回 日本医真菌学会総会、2005 年 10 月 (千葉)
- 10) 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、2005 年 10 月 15 16 日 (福岡)
- 11) Aratani, Y: Role of neutrophil-derived ROS for the ultraviolet-induced skin inflammation. International symposia on therapeutic strategy to the best advantage of collaboration between basic research and clinical research, Tokyo, February, 2006.
- 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

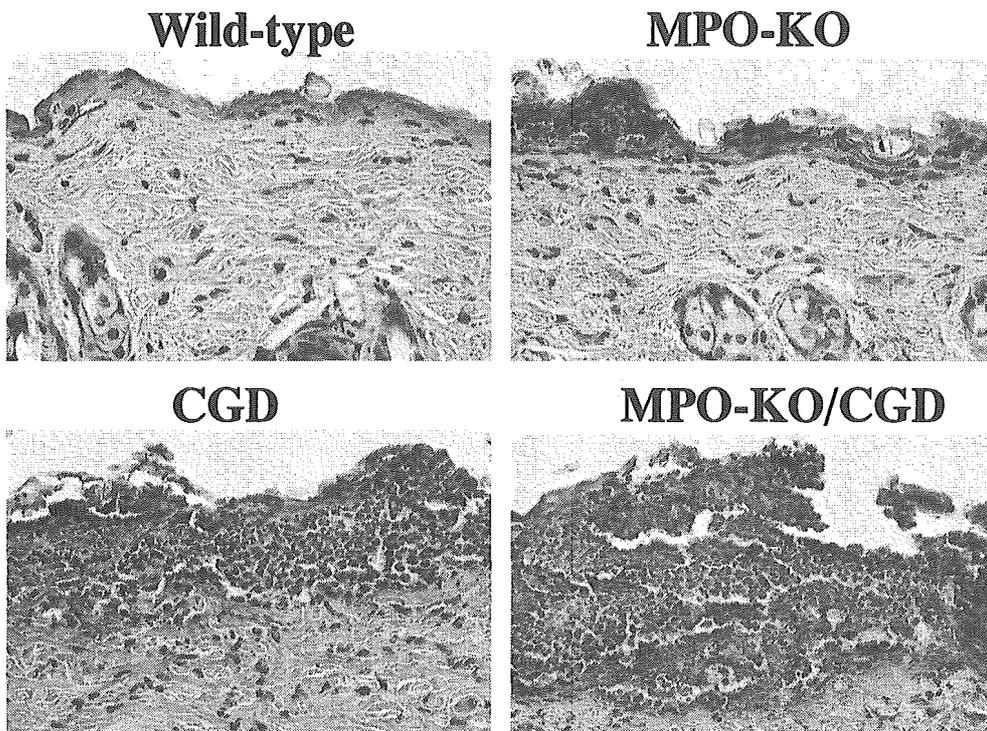


図 1 UVB 照射 48 時間後の皮膚組織切片の HE 染色像

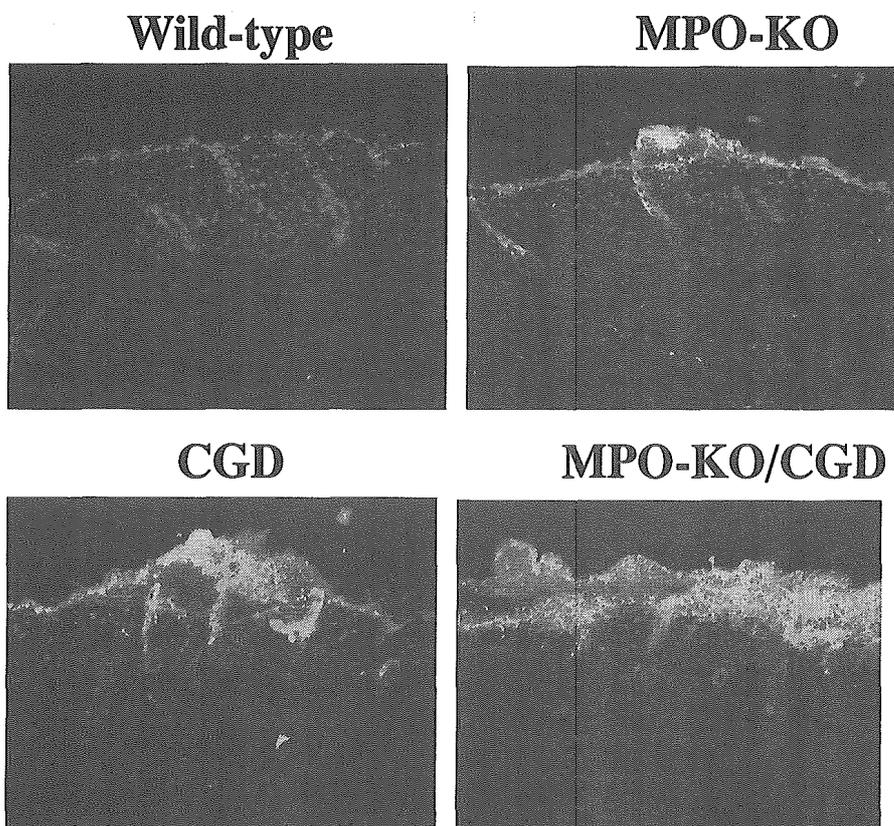


図2 UVB 照射 48 時間後の抗 Gr1 抗体による好中球の染色像

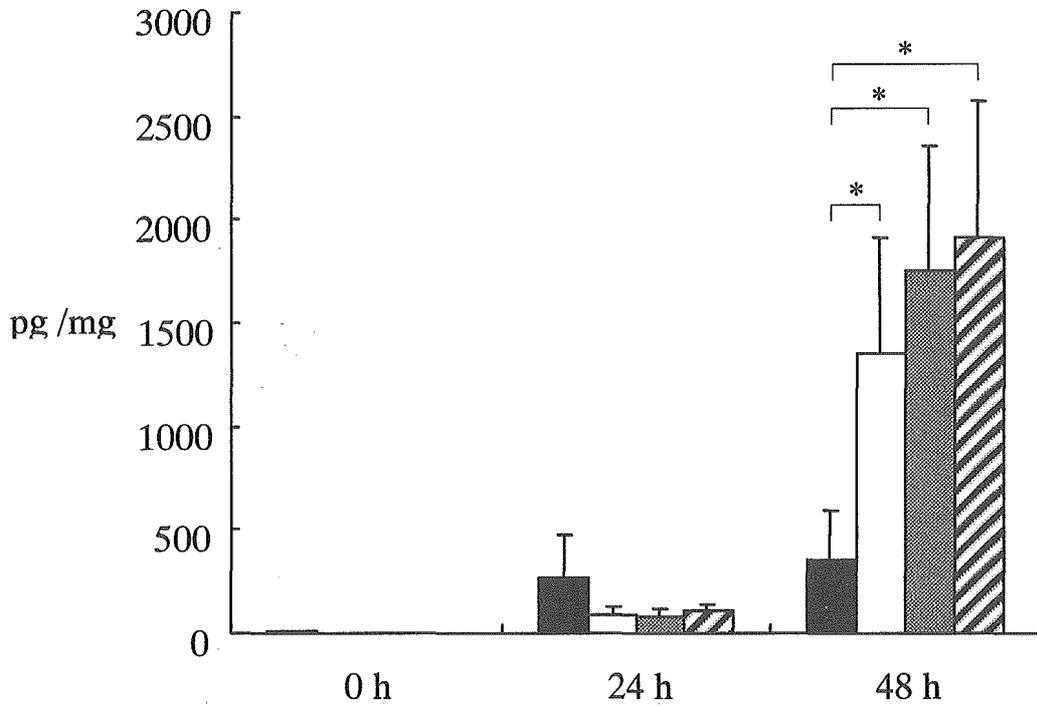


図3 紫外線照射後 24 時間および 48 時間における皮膚患部の MIP-2 量
 黒:野生型、白:MPO-KO、灰:CGD、斜:MPO-KO/CGD. *, $P < 0.05$

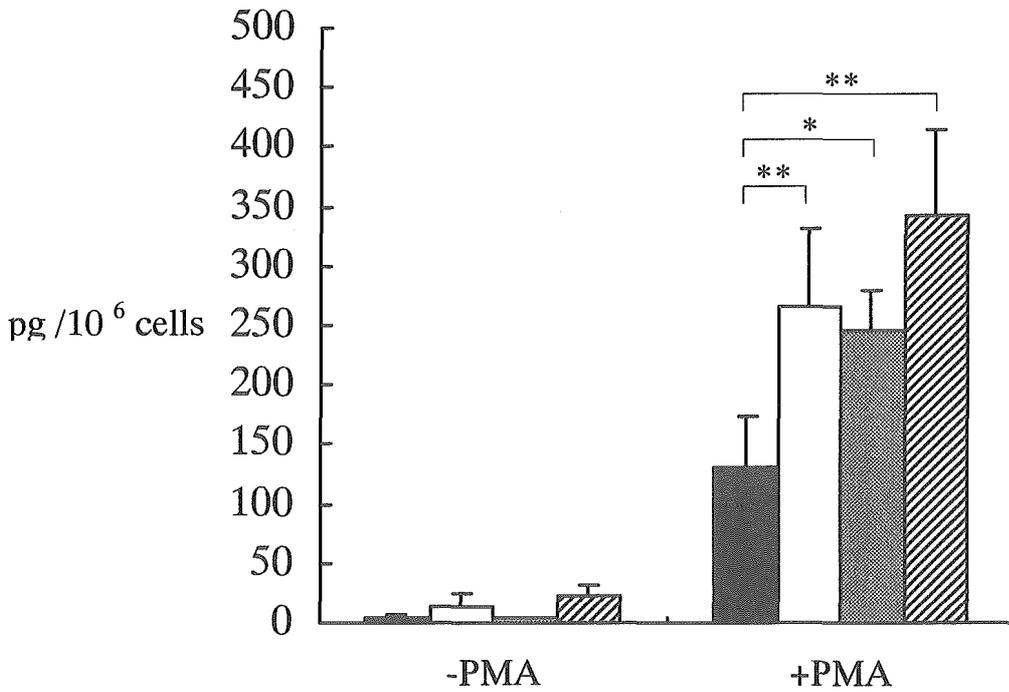


図4 単離好中球からの MIP-2 産生量

黒:野生型、白:MPO-KO、灰:CGD、斜:MPO-KO/CGD. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$;

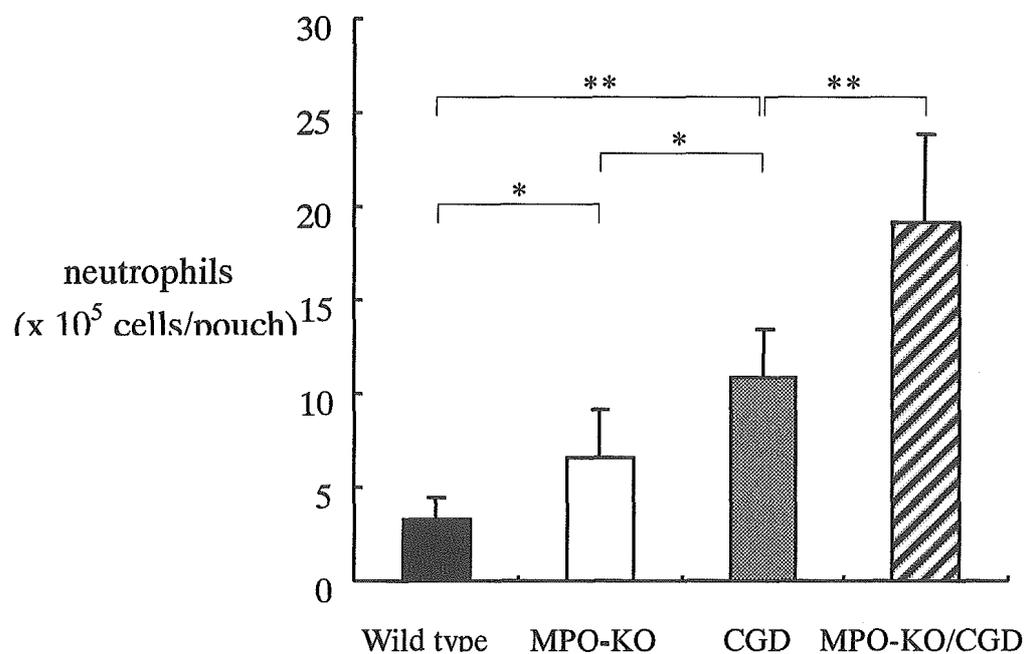


図5 KC に対する好中球の走化性

黒:野生型、白:MPO-KO、灰:CGD、斜:MPO-KO/CGD.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$;

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細胞染色、特に血管炎関連抗原について標識した血球成分の動態を生体内で観測する技術を開発することを目的としている。特に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。またナノプローブを用いて好中球関連の抗原であるMPOに対する抗体を標識し活性化した好中球を可視化した。

A. 研究目的

半導体ナノ粒子は、強力な蛍光を有する結晶でその大きさは数ナノメートルである。そのため軌道電子が量子サイズの領域にコンパクトに存在することになり、その結果量子サイズ効果によって軌道準位が大ききなさを生じ、強力な蛍光を出すことが可能となる。この強い蛍光を利用し従来有機色素で染色していたが、非常に暗くはっきりと可視化できなかった分子も可視化できるようになる。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。

またこの技術の応用として好中球の炎症関連抗原であるMPO抗原に対し量子ドットで染色し、その細胞内局在、またその好中球の生体内局在性を観測することを目的とする

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しめす。

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。

5) 抗MPO抗体の量子ドットタグ:

炎症関連抗原MPOに対する抗MPO抗体に対しアビジン・ビオチンを用い量子ドットを結合させる。その量子ドット結合抗MPO抗体を用いてMPO抗原と抗原抗体反応させることによりMPO抗原を量子ドットで染色することとした。

上記の方法で製造した量子ドットタグ化MPO抗原が正しいか否かをウエスタンブロットにて確認した。

6) 活性化好中球の染色:

好中球を *in vitro* 実験において界面活性剤で細胞膜に穴を開けることにより、細胞内に量子ドットタグ化抗MPO抗体の染色を行った。また活性化した好中球は、直接量子ドットタグ化抗MPO抗体の染色を行った。

7) 体内活性化好中球の動態:

マウス生体内より好中球を取り出し、サイトカインなどで好中球を活性化させるか、あるいは血管炎モデル化マウスを用い、マウス生体内に導入する。その後時間を追いマウスの状態を観察し、また経時的に腎臓、肺などの臓器の組織切片を前述の量子ドット結合抗MPO抗体を用い染色し。好中球の生体内動態を解析する。

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。

4) 好中球における炎症関連抗原MPOの局在性:

非活性化状態にある正常の好中球について量子ドット結合抗MPO抗体によって染色を行い蛍光顕微鏡で観察したが、染色されていないことが判明した。そこで量子ドット結合抗MPO抗体によって細胞内の染色を行うため界面活性剤 (TritonX) を用いて、好中球の細胞膜に穴を開け、量子ドット結合抗MPO抗体によって染色した結果MPOが非活性化好中球の細胞内に存在することを確認した。

次にサイトカインなどで活性化させた好中球について同様のことを調べた結果、細胞内には、MPOが存在せず、活性化好中球の細胞表面にMPOが存在することが判明した。

5) 血管炎モデル化マウスによる好中球生体内動態:

血管炎モデル化マウスを用い、その好中球を分離し正常マウスに導入する。2時間以内に蛋白尿を出し、腎炎が誘導され、24時間以内に激しい血管炎により耳介の崩壊が誘導される。そのマウスより臓器を摘出し組織切片の解析を行った結果、腎臓の糸

球体に活性化された好中球が浸潤していることが、量子ドットタグ化抗MPO抗体の染色により明らかになった。

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、サイトゾ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。

量子ドットタグ化抗MPO抗体の染色により、これまでの有機蛍光色素を使った研究では、追跡が不可能だった。そのひとつの大きな原因は、MPO分子が有機蛍光色素を使った実験にとって十分な量が好中球には、存在しないことであると考えられる。好中球は、mRNAが、それほど多くなく、合成されたMPOを残し新たな細胞内合成量は、少ないと考える。分子数の少なさと、有機蛍光色素の蛍光強度の弱さがこれまで成功しなかった原因であると示唆される。それに対し、量子ドットタグ化抗MPO抗体は、十分な蛍光強度があり今回のような計測に最適であることが判明した。

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、量子ドットタグ化抗MPO抗体を用いて血管炎を起こしたマウス生体

内における活性化好中球の臓器内局在性について解析可能なシステムを構築した。今後同様のシステムを用いヒト臨床検体を用い疾病の診断、病態の解析、病因の解明、治療法の評価などに役立つシステムを開発する。

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量子ドットタグ化抗MPO抗体を用いて血管炎を起こしたマウス生体内における活性化好中球の臓器内局在性について解析可能なシステムを構築した。

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) Hoshino A, Fujioka K, Manabe N, Yamaya S, Goto Y, Yasuhara M, Yamamoto K. Simultaneous Multicolor Detection System of the Single-Molecular Microbial Antigen with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. *Microbiol Immunol.* 2005; 49(5): 461-470

2) Warner JH, Hoshino A, Yamamoto K, Tilley RD. Water-Soluble Photoluminescent Silicon Quantum Dots *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005; 44(29): 4550-4554.

3) Wayne Dawson, Kazuya Fujiwara, Yasuhiro Futamura, Kenji Yamamoto, Gota Kawai. A new paradigm for finding optimal RNA secondary structures by thermodynamics alone. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, in press. 2005

4) Yasuhiro Futamura and Kenji Yamamoto ; Hydrothermal Synthesis of Olygoglycines with Adiabatic Expansion Cooling, *Viva Origino*, (in press) 2005

5) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Yukio Yamaguchi, Kenji Yamamoto. Condensation Reactions of Amino Acids under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling.

Journal of Chemical Engineering of Japan, 38, (4) 295-299, April 2005.

6) Amane Shiohara, Noriyoshi Manabe, Kazumi Omata and Kenji Yamamoto; Novel surface processing with sulfonic acid for quantum dot and its characteristics, Chemical Engineering, (in press), 2005

7) Kenji Yamamoto; Nanotechnology and Trends in Drug Delivery Systems with Self-Assembled Carriers. Biomedical Nanotechnology (Ed. By Neelina H. Malsch) Taylor & Francis. 29-40, 2005

8) 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

9) 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

10) 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

11) 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

12) Kenji Yamamoto and Noriyoshi Manabe, Randomness 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.

13) 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

14) 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

15) 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) Yu.I. Dahnovsky, V.D. Krevchik, E.I. Kudryashov, V.G. Mayorov, M.B. Semenov, V.Ch. Zhukovsky K. Yamamoto; One - dimensional quantum dissipative tunneling in structures with quantum dots, UT Rearch Institute Press, 348-360, 2005

2) A.K. Aringazin, Yu.I. Dahnovsky, V.D. Krevchik, M.B. Semenov, A.A., V.A. Veremyev, K. Yamamoto; Two-dimensional tunnel correlations with dissipation, UT Rearch Institute Press 2005,.

3) A.K. Aringazin, Yu.I. Dahnovsky, V.D. Krevchik, M.B. Semenov, A.A., V.A. Veremyev, K. Yamamoto; Two - dimensional tunnel bifurcations with dissipation, UT Rearch Institute Press 2005,

4) Wayne Dawson, Kenji Yamamoto; Harnessing the biophysical principles of chaperons to process specialized materials for nanotechnology applications, UT Rearch Institute Press, 434-443, 2005,.

5) Kenji Yamamoto ; The fluorescence intensity of the quantum dots in the water depends on the surface processing, UT Rearch Institute Press, 444-450, 2005,.

6) Wayne Dawson , Kazuo Suzuki, Kenji Yamamoto; A Physical Origin for Functional Domain Structure in Nucleic Acids as Evidenced by Cross-linking Entropy: I, UT Rearch Institute Press, 451-492, 2005.

6) Wayne Dawson, Kazuo Suzuki, Kenji Yamamoto ; A Physical Origin for Functional Domain Structure in Nucleic Acids as Evidenced by Cross-linking Entropy: II, UT Rearch Institute Press, 493-532, 2005.

- 7) 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 BioClinica2005:20(1):23-262.
- 8) 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)

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 (APCCHE) 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 charcters, 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)

H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 特許 なし
- 2) その他 なし

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 生物活性物質部 主任研究官

研究要旨：種々の疾患の病因を解明し、治療薬を開発する上でモデル動物を用いた解析はきわめて有用である。本研究では、*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マウスモデルを用い解析を行った。CAWS 投与後初期に骨髄からの移動によって末梢好中球が増加、活性化すること、また炎症性サイトカイン、ケモカインが産生されること、*in vitro* の系で CAWS 刺激によって好中球がサイトカインを産生することを明らかにした。また、ICAM-1 を指標として 心大動脈局所における傷害について、さらに、好中球活性化の原因のひとつとして補体活性化が関与することを明らかにした。動脈炎発症にいたる初期の段階における好中球の活性化をコントロールすることによって動脈炎の進展を制御できる可能性が示唆された。

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ことは有用である。*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。また、*in vitro* の系では、CAWS 1mg/ml を腹腔滲出好中球 (5×10^6 cells/ml) に作用させ、好中球が産生するサイトカインについて解析を行った。

3) Gr1⁺ 細胞の解析

4mg/マウスの CAWS を腹腔内投与し、経時的にマウスの脛骨を摘出して骨髓細胞を調製した。同時に末梢白血球も調整し、両細胞を抗 CD11b-FITC 抗体と抗 Gr-1-PE 抗体で処理をしフローサイトメトリーによる解析を行った。

4) 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。

5) 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。

6) 好中球の機能解析

6-1) 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。

6-2) 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。

7) 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およびケモカイン産生について検討した。

8) 心大動脈局所における ICAM-1 の発現、血中可溶性 ICAM-1 の経時的変化

CAWS 投与 16 hr 後に心大動脈を分離し、ICAM-1 の発現を real time PCR で定量した。

一方、CAWS 投与直後から血中の可溶性 ICAM-1 を ELISA 法で経時的に定量した。

9) 補体活性化の検討

CAWS を投与したマウス心臓より EDTA 採血し、血漿を分離した。サンドイッチ ELISA 法、ウェスタンブロットリング法によって、complement 3 (C3) を検出、定量し補体活性化の指標とした。

(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、末梢好中球は増加した (図 1)。その原因は骨髓から末梢への移動と考えられた (表 1)。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 2)。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 3e,f)。CAWS 投与によって産生が有意に増加した IL-1 β 、IL-6、IL-10 を好中球が産生する可能性を明らかにするため、CAWS 1 mg/ml を腹腔滲出好中球に作用させたところ、IL-6 の産生は CAWS によって亢進したが IL-1 β 、IL-10 は CAWS の存在とは無関係に好中球が産生していることが示された (図 4 a-c)。心大動脈局所の内皮の傷害性について ICAM-1 発現を指標にして検討をしたところ、CAWS 投与 16 時間後には有意な上昇を認めた (図 5a)。また、血中の可溶性 ICAM-1 も CAWS 投与後、時間の経過とともに上昇した (図 5b)。一方、好中球活性化の

原因のひとつとして補体の活性化について検討したが、CAWS 投与直後からその活性化が認められた (図 6a、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 投与初期に活性化された末梢好中球は炎症性サイトカインを産生すること、また CAWS は IL-6 の産生を直接亢進することが示された。一方、ICAM-1 を指標にして行った組織傷害の解析から、CAWS 投与初期の段階で、血管内皮傷害の可能性が示唆された。CAWS 投与初期のこの知見は心動脈炎にいたる過程と思われる。vitro の系でヒト好中球に CAWS を作用させることによって補体のレクチン経路が活性化されるという知見が既に得られているが (未刊行データ)、マウスの vivo の系でも補体活性化が認められたことから、好中球の活性化の原因のひとつが補体の活性化であることが示唆された。補体活性化を阻害することによる好中球活性化関連血管炎の改善が示唆された。

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 (15-17 年度の本研究に関するもののみ)

1. 論文発表

- 1) Kohji Ichimori, Naoto Fukuyama, Hiroe Nakazawa, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Shunya Takizawa, Yosuke Kameoka, 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, 2003, 37, 481-89.
- 2) 大川原明子、鈴木和男、猪原登志子、小野孝彦、武曾恵理、雑賀寛、根本久一 半月体形成性腎炎モデルとしての SCG/Kj マウスの好中球機能 Pharma Medica 2003, 21, 157-162
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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