

真菌感染による肺炎誘発機構の解析

分担研究者 荒谷康昭 横浜市立大学 準教授

研究要旨：ミエロペルオキシダーゼ(MPO)欠損マウスは、クリプトコッカス(*Cryptococcus neoformans*)を鼻腔内投与によって、肺における易感染性を示して重篤な肺炎を起こした。感染時のこのマウスの肺の Th1/Th2 サイトカインバランスは攪乱しており、このことがこのマウスが重篤な肺炎を発症する一因であることが示唆された。

A. 研究目的

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)発症機構の解明を目的として、肺炎の動物モデルを構築し、そのモデル病態の発症機構を究明することを本研究の目的とする。本病態における好中球の関与に主眼を置き、分担者自身が作製したミエロペルオキシダーゼ欠損マウス(MPO-KO マウス)マウスを駆使して解析する。

MPO は好中球のみに存在し、単球にわずかに検出されることを除いては、本酵素を保有する生体内組織はない。この酵素は、過酸化水素と塩化物イオンから次亜塩素酸を生成する反応を触媒する。分担者は、MPO-KO マウスがカンジダ菌など多くの真菌細菌に易感染性を示すことをすでに報告しており、感染防御における MPO の重要性を個体レベルで証明している。しかし、感染に起因する炎症の誘発機構は必ずしも明白ではない。そこで、本研究では、クリプトコッカス(*Cryptococcus neoformans*)の肺感染によって発症する肺炎をモデルとして、その発症機構に迫る。

B. 研究方法

野生型マウス(C57BL/6 マウス)は日本 SLC から購入した。MPO-KO は、C57BL/6 マウスに 10 回以上戻し交配して、C57BL/6 と遺伝的背景を等しくした後に使用した。いずれも 8-10 週令の雄マウスを使用した。マウスの飼育は、横浜市立大学木原生物学研究所動物実験指針に準じて行い、感染実験に際しては、国立感染症研究所動物実験規則を遵守した。

感染に用いたクリプトコッカス菌(*Cryptococcus neoformans*, ATCC 24067)は、yeast malt broth 寒天プレートで培養して調製した。麻酔下の野生型マウスおよび MPO-KO マウスに調製したクリプトコッカス菌を鼻腔内投与し、生存率を追跡すると共に、肺の残存菌数を、半年間にわたって経時的に測定した。また、ヘマトキシリン/エオジン染色を施して、肺の炎症像を組織学的に解析した。肺中サイトカインとケモカインの濃度測定には、未感染のマウスおよび感染後 7 日目と 34 日目のマウスの肺をプロテアーゼ阻害剤共存下で破碎し、破碎液の遠心上清を濾過滅菌した標品を使

用した。測定とデータ解析は、Bio-Plex (BIO-RAD)を用いてメーカーの推奨する方法に準じ、国立感染症研究所において行った。

(倫理面への配慮)

実験動物は、動物の保護及び管理に関する法律に準じて扱い、必要最小限の動物を使用した。やむを得ず動物を殺さなければならない場合には、できる限りその動物に苦痛を与えない頸椎脱臼法を採用した。

C. 研究結果

野生型マウスおよび MPO-KO マウスにクリプトコッカスを鼻腔内投与すると、30日後から MPO-KO マウスのみ生存率の低下が認められ、60日目までに8割の感染マウスが死亡した。肺での残存菌数は、19日目までは、野生型マウスも MPO-KO マウスも増加傾向が認められた。しかしその後、野生型マウスのみ経時的な減少な現象が認められ、MPO-KO マウスでは、60日目までの観察期間中減少しなかった。60日目の肺の病理解析では、野生型マウスの肺の炎症はごく軽微にとどまっており、わずかな炎症細胞の集積が認められるにとどまった。一方、MPO-KO マウスでは大量の炎症細胞が侵出していた。

クリプトコッカスに対する生体防御には細胞性免疫系が大きく寄与している。そこで、Th1/Th2 サイトカイン濃度を測定した。感染7日目の MPO-KO マウス肺は、野生型マウス肺に比べて IL-4 値が有意に高く、IL-2, IL-12p70, および IFN- γ 値は逆に低値を示した。すなわち、MPO-KO マウスでは Th1 型サイトカイン濃度が野生型マウスよりも低いことが判明した。このような Th1 の応答

異常が易感染性の一因となっている可能性が示唆された。また、感染後 34 日目の MPO-KO マウスでは、IL-1 α と IL-1 β 量の増加も観察され、このような炎症性サイトカイン量の増加が炎症をさらに助長している可能性が示唆された。

D. 考案

本研究は、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) 発症機構の解明を目的として、クリプトコッカス感染誘発性肺炎を肺炎モデルとして採用し、そのモデル病態の発症機構を究明することを目的とした。

昨今の研究によると、クリプトコッカス感染防御には細胞性免疫系が大きく寄与しており、Th1 サイトカインは必須であるとされている。興味深いことに、MPO-KO マウスの感染後7日目の IL-2, IL-12p70, IFN- γ のレベルが野生型マウスよりも低値を示し、この Th1 型サイトカイン量の低下が、易感染性を示す一因であると推察できた。MPO-KO マウスでのみ Th1 サイトカイン量が低下する理由は不明であり、さらなる解析が必要となる。ただし、IL-4 は Th1 応答を抑制するので、感染7日目の MPO-KO マウス肺で認められた高 IL-4 が、同時期の Th1 応答を抑制している可能性が考えられる。

今後はクリプトコッカス肺炎モデルに留まらず、その他の肺炎モデルをも精力的に解析し、肺炎発症における好中球由来活性酸素の役割とその発症機構の解析を継続する。これらの研究は、ARDS の発症メカニズムの解明とその制御法の開発のための基盤となる。

E. 結論

MPO-KO マウスは、真菌感染によって Th1/Th2 バランスの乱れが生じ、極度の肺炎を発症し、死に至ることが判明した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Ishida-Okawara, A., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H.: Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defense against *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Microbiol.* 55:1291-1299 (2006).

2. 学会発表

- 1) 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、高野幸枝、大川原明子、鈴木和男、小山秀機：クリプトコッカス感染防御におけるミエロペルオキシダーゼの関与。第27回関東医真菌懇話会（東京）2006年5月。
- 2) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Okawara, A., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H.: *In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense against fungal infection. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Japan (2006)
- 3) 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、高野幸枝、大川原明子、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クリプトコッカス感染防御能の解析。

第17回日本生体防御学会学術集会（札幌）2006年7月。

- 4) 小林美登里、松村実美子、長尾朋和、荒谷康昭、星野昭芳、大川原明子、山本健二、南谷晴之、鈴木和男：血管炎発症に関わる MPO-ANCA は直接系球体内皮細胞へ作用する。第17回日本生体防御学会学術集会（札幌）2006年7月。
- 5) 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、大川原明子、鈴木和男、小山秀機：クリプトコッカス感染防御における MPO-H2O2-Cl⁻系の関与。第12回 MPO 研究会（大阪）2006年9月。
- 6) 高橋 啓、大原関利章、山田仁美、三浦典子、大野尚仁、村山 研、野津朋子、松村実美子、大川原明子、鈴木和男、新井孝夫、荒谷康昭：CAWS 誘発血管炎モデルにおける合成免疫グロブリン(SyIg)の血管炎抑制作用。第12回 MPO 研究会（大阪）2006年9月。
- 7) 古谷昌弘、荒谷康昭、亀岡洋祐、大野尚仁、鈴木和男：人工ポリクローナル免疫グロブリンの開発。第12回 MPO 研究会（大阪）2006年9月。
- 8) Kobayashi, M., Nagao, T., Okawara, A., Aratani, Y., Hoshino, A., Yamamoto, K., Minamitani, H., and Suzuki, K.: Glomerular endothelial cell activation in vasculitis induced by anti-myeloperoxidase antibody and activated neutrophils. 第36回日本免疫学会学術集会（大阪）2006年12月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

インフルエンザマウスモデルを用いた治療法の予備的検討

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

鈴木和男 国立感染症研究所・生物活性物質部 室長

研究要旨：

マウス型に馴化したヒトインフルエンザ PR-8 株 (H1N1) を鼻腔感染することによって発症するマウスモデル系を確立した。感染 7 日目から死亡する個体を認め、15 日目に全例の死亡を確認した。一方、G 製剤、活性化好中球で発現するとされている表面抗原に対する抗 C 抗体、また好中球活性化の阻害剤 E 製剤を投与することにより、炎症関連サイトカイン産生の抑制、生存の改善が認められた。これらの知見から、感染直後の好中球活性化が病態の進行に関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは、既に数十年前に分離され、その基礎・臨床研究が進み、ワクチンも早い時期から実用化され改良が続けられてきた。しかし、流行はくり返され、さらに近年にいたってはグローバル化の急速な進行から地球規模の大きな脅威とさえなっている。すなわち、疫学的には流行の把握とそれに対する予防方法の徹底が不十分であり、またウイルス感染と宿主免疫のメカニズム、変異などの基礎も十分に解明されていないと考えられる。今年度、マウス感染モデルを用いて、インフルエンザ感染のメカニズム、複数の薬剤による治療効果について明らかにする目的で以下の解析を行ない、検討した。

B. 研究方法

1) マウス

SPF 条件下飼育した Balb/c マウス (♀、8W) を使用した。無処置群、G 製剤治療群、E 製剤治療群、抗 C 抗体治療群、溶剤 (2.5% グルコース含有 生理食塩水) 投与群の 5 群とし、各群 6 匹とした。

2) インフルエンザウイルスの投与

マウス型に馴化したヒト PR-8 株 (H1N1) 1.5LD、30 μ l をネブタール麻酔下 鼻腔より投与した。

3) 治療用薬剤の投与

ウイルス投与翌日、G 製剤 (8 mg/マウス) を尾静脈より投与した。また 抗 C 抗体 (250 μ g/マウス) を腹腔内投与した。E 製剤 (1 mg/マウス) はウイルス投与翌日より 5 日間 連続で腹腔内投与した。

4) サイトカイン・ケモカインの網羅的解析
PR-8 投与 4hr 後、治療 4hr 後、PR-8 投与 1 週間後にヘパリン処理したキャピラリを用いて眼底採血を行い、血漿を分離した。Bio-Plex (BioRad 社製)を用いて、23 種類のサイトカインおよびケモカインを網羅的に測定し、解析を行った。

5) 生死の観察

PR-8 投与後、連日 生死の観察を行なった。また、各薬剤による治療はウイルス感染翌日に行い、同様に生死の観察を行った。

6) G 製剤による PR-8 中和活性の検討

MEM に 10 % FCS を加えた培地で培養した MDCK 細胞 2×10^5 cells/ml を 6 穴 プレートにコーティングした。3 日後に PR-8 株 100 PFU/well、あるいは 50 PFU/well を G200 $\mu\text{g/ml}$ 、1 mg/ml、5 mg/ml で 1hr 処理し、その後 MDCK 細胞に 1hr 作用させ G 製剤による PR-8 中和活性について検討した。

C. 研究結果

1) 生死の観察

1.5LD PR-8 ウイルスを鼻腔感染したマウスでは 7 日目から死亡し始め 15 日目までにすべて死亡した (図 1)。各種薬剤で治療したグループのマウスはいずれも延命効果を認め、 $P=0.09173$ (G 製剤)、 $P=0.03502$ (抗 C 抗体)、 $P=0.05668$ (E 製剤) であり、抗 C 抗体の治療効果は有効であると考えられた。

2) サイトカイン・ケモカインの網羅的解析

G 製剤投与後の 23 種類のサイトカイン、ケモカインの経時的変化について検討した (図 2)。G 製剤治療は、好酸球の活性化・増殖に関与するとされる IL-5、炎症性サイトカイン IL-6、TNF- α および抗炎症性サイ

トカイン IL-10 の産生を抑制する傾向を認めた (図 2)。データは示さないが、その他のサイトカイン、ケモカインについては G 製剤投与による変化を認めなかった。

3) G による PR-8 中和活性の検討

PR-8 株 100 PFU/well、あるいは 50 PFU/well を G200 $\mu\text{g/ml}$ 、1 mg/ml、5 mg/ml、あるいは溶媒のみで 1hr 処理したところ、データは示さないが、G 製剤処理した well ではウイルスのコロニー形成は全く認めなかった。

D. 考察

マウス型に馴化した PR-8 株 (H1N1) を鼻腔感染することによってマウスの病態が成立し、感染 7 日目から死亡する個体を認め、15 日目に全例の死亡を確認した。一方、G 製剤、好中球活性化で発現するとされている抗原に対する抗体 C、また好中球の活性化を阻害する E を投与することにより、炎症関連サイトカイン産生の抑制、生存の改善が認められた。これらの知見から、感染直後の好中球活性化が病態の進行に関与する可能性が考えられた。

E. 結論

インフルエンザ感染初期における好中球の活性化が病態進行に関与している可能性が示唆されたことから、好中球活性化抑制に着目した治療法の検討が有効であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Noriko Nagi-Miura, Toshie Harada, Hiroyasu Shinohara, Kiyoshi Kurihara, Yoshiyuki Adachi, Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki, Naohito Ohno. Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal pathogen, CAWS, *Candida albicans* water-soluble fraction. *Atherosclerosis*, 186, 310-320, 2006
- 2) Shinohara H, Nagi-Miura N, Ishibashi K, Adachi Y, Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, Ohno N. Beta-mannosyl linkages negatively regulate anaphylaxis and vasculitis in mice, induced by CAWS, fungal PAMPS composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by *Candida albicans* *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29, 1854-1861, 2006
- 3) 猪原登志子、宇野賀津子、田中麻理、山本聡、米本智美、古宮俊幸、田原佐知子、辻井知美、塚本達雄、南方保、小野孝彦、深津敦司、北徹、岸田綱太郎、大川原明子、小林美登里、鈴木和男、武曾恵理 *Pasken Journal*(ルイ・パストゥール医学研究センター研究報告)18:67-78;2006
- 4) Yumura W, Itabashi M, Ishida-Okawara A, Tomizawa K, Yamashita J, Kaneshiro Y, Nihei H, Suzuki K. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis. *Microbiol Immunol.* 50,149-157, 2006
- 5) Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Ishida-Okawara A, Suzuki K, Maeda N, Koyama H. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defense against *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Microbiol.* 55: 1291-1299, 2006
- 6) Tomokazu Nagao, Mimiko Matsumura, Ayako Mabuchi, Akiko Ishida-Okawara, Osamu

Koshio, Haruyuki Minamitani, and Kazuo Suzuki Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody *Nephrology Dialysis and Transplantation*, 22, 77-87, 2007

- 7) Akiko Ishida-Okawara, Noriko Nagi-Miura, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Akinori Okumura, Hitoshi Tachikawa, Shin-ichiro Kashiwamura, Haruki Okamura, Naohito Ohno, Hidechika Okada, Peter. A. Ward, Kazuo Suzuki Neutrophil Activation and Arteritis Induced by *C. albicans* Water-soluble Mannoprotein- β -glucan Complex (CAWS) *Experimental Molecular Pathology*, 2007, in press
- ### 2. 学会発表
- 1) 太刀川仁、Mahmoud Ramadan、小玉 誠、大川原明子、三間 渉、伊藤正洋、柏村 健、広野 暁、鈴木和男、相澤義房 冠動脈疾患患者におけるMPO-ANCAの挙動 第103回日本内科学会総会 年次講演会 平成18年4月、横浜
 - 2) Tachikawa H, Okawara A, Suzuki K. Contribution of the systemic, splenic, and renal Th2 responses to the developing glomerulonephritis in ANCA-associated crescent-forming glomerulonephritis mice. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, 2006 June.
 - 3) Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Okawara A, Suzuki K, Maeda N, and Koyama H. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense against fungal infection. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, 2006 June
 - 4) 小林美登里、松村実実子、長尾朋和、荒谷康昭、星野昭芳、大川原明子、山本健二、南谷晴之、鈴木和男 血管炎発症に関わるMPO-ANCAは直接糸球体内皮細胞へ作用する 第17回日本生体防御学会学術集会 平成18年7月、札幌
 - 5) 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、大川原明子、鈴木和男、小山秀機 クリプトコ

- ツカス感染防御における MPO-H2O2-Cl⁻系の関与 第12回 MPO研究会 平成18年9月、大阪
- 6) 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、岡田秀親、大野尚仁、鈴木和男 CAWS 培養条件の違いによる好中球活性化への影響 第12回 MPO研究会、平成18年9月、大阪
- 7) 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋啓、大川原明子、鈴木和男、大野尚仁 各種マウス系統を用いた CAWS 血管炎発症に関わる遺伝的素因の解析 第12回 MPO研究会、平成18年9月、大阪
- 8) 猪原登志子、武曾恵理、宇野賀津子、大川原明子、山西裕司、田村直人、小林茂人、鈴木和男、橋本博史 ANCA-ELISA 測定法の違いに関する研究 第12回 MPO研究会、平成18年9月、大阪
- 9) 高橋啓、大原関利章、山田仁美、三浦典子、大野尚仁、村山研、野津朋子、松村実美子、大川原明子、鈴木和男、新井孝夫、荒谷康昭 CAWS 誘発血管炎モデルにおける合成免疫グロブリン(SyIG)の血管炎抑制作用 第12回 MPO研究会、平成18年9月、大阪
- 10) 富澤一夫、大川原明子、雑賀寛、田之倉優、鈴木和男 急性進行性糸球体腎炎モデル SCG/Kj マウスの MPO-ANCA 病因エピトープは治療により減少する 第12回 MPO研究会、平成18年9月、大阪
- 11) Suzuki K., Hoshino A., Nagao T., Kobayashi M., Ito-Ihara T., Ishida-Okawara A., Uno K., Muso E., Nagi-Miura N., Ohno N., and Yamamoto K. Trace of Antibody to Myeloperoxidase (MPO) with Nanocrystal Quantum Dots-labeled Antibody Recognizing Activating Neutrophils in Glomerulonephritis. The International Symposia for Bioimaging 2006, Oct., Kyoto
- 12) Itabashi M., Yumura W., Ishida Okawara A., Yamashita J., Kaneshiro Y., Suzuki K., and Nitta K. The Cytokine Network in Model Mouse of MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis 39th annual meeting of American Society of Nephrology, 2006, Nov., San Deigo
- 13) 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、岡田秀親、大野尚仁、鈴木和男 Neutrophil Activation by CAWS in Different Cultured Condition 第36回日本免疫学会総会・学術集会 平成18年12月 大阪
- 14) 星野昭芳、長尾朋和、大川原明子、宇野和子、三浦典子、大野尚仁、雑賀寛、山本健二、鈴木和男 Candida albicans-secreted CAWS mannoprotein triggers murine glomerulonephritis and systemic vasculitis via IL-6, IL-17 and IL-23 production in concert with MPO-ANCA. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 平成18年12月 大阪
- 15) 小林美登里、長尾朋和、大川原明子、荒谷康昭、星野昭芳、山本健二、南谷晴之、鈴木和男 Glomerular endothelial cell activation in vasculitis induced by anti-myeloperoxidase antibody and activated neutrophils. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 平成18年12月 大阪
- 16) 野津朋子、長尾朋和、小林美登里、大川原明子、鈴木和男 Function of primary lung endothelial cells associated with activated neutrophils. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 平成18年12月 大阪
- 17) 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋啓、大川原明子、鈴木和男 CAWS 血管炎の発症と重篤かに関わる遺伝的素因の各種マウス系統を用いた解析 第36回日本免疫学会総会・学術集会 平成18年12月 大阪
- 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

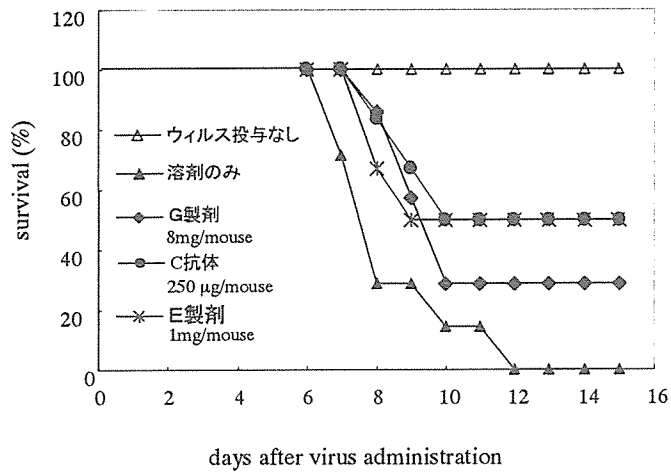


図1 各薬剤によるマウス延命効果

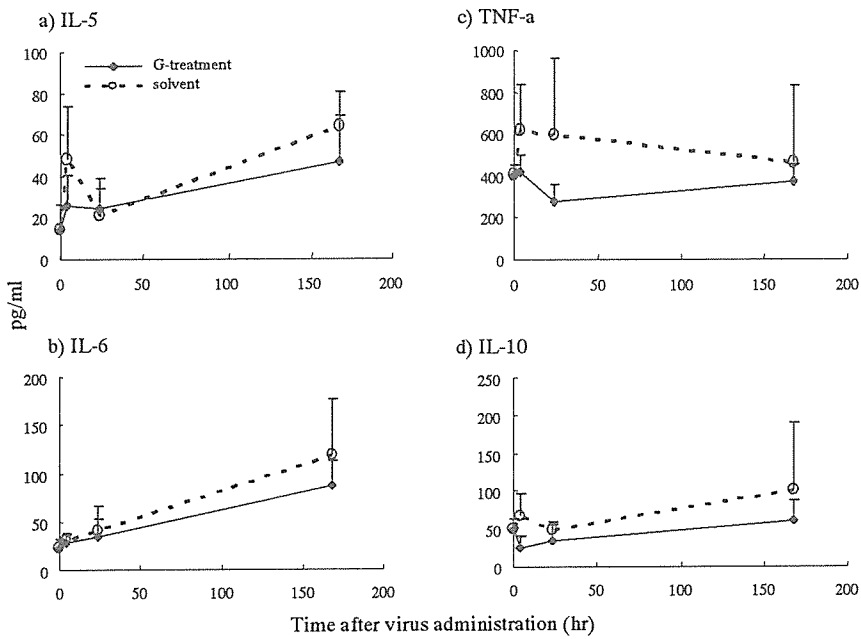


図2 G製剤投与後のサイトカインの経時的変化

半導体ナノ粒子を用いた ARDS の解析にむけて

分担研究者 山本健二

国立国際医療センター研究所・国際臨床研究センター長

研究要旨 ナノ粒子の安全性の安全性についての検討は、これまでに 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。本研究により、細胞毒性については、閾値が存在することを明らかにし、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。一方、蛍光プローブとして、半導体ナノ粒子を用いて生体分子である抗 MPO 抗体に蛍光プローブとして結合させ、その動態をバイオイメージングとしての解析に利用することが可能となった。

A. 研究目的

急速進行性糸球体腎炎などの血管炎の発症の要因に免疫系細胞が関与していると考えられている。好中球が産生するオキシダーゼであるミエロペルオキシダーゼ(MPO)は、細菌などの微生物が体内に侵入した時に好中球がこれを細胞内に取り込みライソゾームにて MPO で殺菌される。また好中球は、FMLP などの菌対成分に刺激されると活性化し MPO を細胞外に放出する。好中球の関与する血管炎は、この MPO に対する自己抗体 (MPO-ANCA) が関係している。血管内皮細胞と好中球は何らかの相互作用をしており、活性化された好中球が血管内皮に損傷を与えることで、血管障害が起きると考えている。本研究は、このような研究をふまえて、半導体ナノ粒子を用い細胞

や分子に結合させその動態を観測可能とするようなプローブを作成することを目的とし、それらの分子や、細胞の動態を観察することにより ARDS の原因を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 本研究に利用している半導体ナノ粒子はセレン化カドミウムを核として、硫化亜鉛を殻とする二重構造に成っている コア・シェル型ナノ粒子である。この粒子はトリ・オクチル・フォスフィン・オキサライド (TOPO) という有機溶媒を 350℃に加熱し、熔融させた状態で (トリ・オクチル・フォスフィン・オキサライドは、爆発性があるため脱気するかアルゴンで充満した状態で合成を行う) で合成されている。則ち、

その溶融した TOPO に酸化カドミウムとセレンを同時に打ち込み単分子分散させる。分散した時に、溶媒の温度が270℃程度の一且低下するが、さらに加熱し300℃にて一定に保つと、TOPO 溶媒内で半導体ナノ粒子が自己組織化する事により生成されてくる。

2) ナノ粒子の表面加工

疎水性化合物であるが、11-メルカプトウンデカン酸と硫化亜鉛とを結合させて粒子表面にカルボキシル基を出させることによって親水性粒子としている。この置換方法は、まず 11-メルカプトウンデカン酸を80℃に加熱し恒温に保つと溶融しており、この溶融した 11-メルカプトウンデカン酸に前述の量子ドットを溶かしこみ数時間放置することにより置換し、さらにナトリウム塩又は、カリウム塩として親水性を示すようになる。さらに本年ペプシド特にシステインを有する様々なジペプチドを用いて表面加工を行いその特性を検討した。其の結果、システニル・プロリンが最も安定で蛍光強度が高いことが判明した。またこのシステニル・プロリンのシステインのカルボキシル基をメチル基に置き換えたものである誘導体で表面加工すると更に特性が良くなることが判明した。

(倫理面への配慮)

本研究は、動物実験、臨床研究を必要としない

C. 研究結果

1) ナノ粒子の安全性

安全性についての検討は、これまでに 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. Shiohara 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)。

2) 蛍光プローブとしての半導体ナノ粒子

半導体ナノ粒子を用いて生体分子である抗 MPO 抗体に蛍光プローブとして結合させ、その動態をバイオイメージングとしての解析に利用することが可能となった

D. 考察

我が国において、はじめて、半導体ナノ粒子を用いて抗 MPO 抗体と結合させ MPO 分子の細胞内の分布を観測することが可能となった。同様の手段にて今後 ARDS の解析に有効であると考えられる。

また半導体ナノ粒子の研究開発は米国におけるナノテクノロジー研究の最重要課題の一つとされている量子サイズ効果 (Quantum Dot Effect)理論に基づく新規な化

合物で、粒子サイズにより発光色が変化し、発光強度と耐光性が既存の有機系蛍光色素をはるかに凌駕することが知られている。半導体ナノ粒子はまた、表面加工により様々な機能を賦与することが可能である。剤を結合させ、薬物動態を半導体ナノ粒子の可視光観察によって細胞・組織・臓器・生体レベルで解析する事は国際的に極めて重要である。また量子ドットにより特定細胞に標識しその標識された細胞を正常マウスに導入する事によりその生体内動態を明らかにし宿主との相互作用を見る事により、血管炎による多臓器不全について解析する事は有用で、研究成果の学術的・国際的・社会的意義も大きいと考える。今後の展望については、細胞内動態解析のために必要な表面加工法を開発するとともに、実際開発された方法を利用して、細胞内分布や生体分布についてに実際応用し新しいナノプローブの性能を評価する予定である。

E. 結論

本研究によって、半導体ナノ粒子を抗MPO抗体と結合させMPO分子の細胞内および細胞膜への動態を観察することが可能となった。またその特性を有する疾患についても検査法として有用である。更に、*in vitro*, *in vivo*のみならずEX-*vivo* および生体内動態について広範な動態解析する事も可能と成るといふ極めて特徴的な性質を有するため、同様のことがARDSについても今後の応用展開に向けての素地が築かれたと言える

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) Manabe N, Hoshino A, Liang YQ, Goto T, Kato N, Yamamoto K., Quantum dot conjugated with medicine as the drug tracer *in vitro* and *in vivo*. IEEE Transactions on NanoBioscience 2007; in press

2) Satoru YAMAMOTO, Noriyoshi MANABE, Kouki FUJIOKA, Akiyoshi HOSHINO and Kenji YAMAMOTO, Visualizing Vitreous Using Quantum Dots as Imaging Agent, IEEE Transactions on NanoBioscience 2007; in press.

3) Yasuhiro Futamura, Kazuyuki Yahara and Kenji Yamamoto, Evidence for the production of fluorescent pyrazine derivatives using supercritical water, The Journal of Supercritical Fluids, (2007) in press.

2. 学会発表

1) Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Toshiko Ito-Ihara, Kazuko Uno, Eri Muso, and Kazuo Suzuki; Activated neutrophils produce IL-17 and IL-23 by MPO-ANCA stimulation in Cndida-derived manno-protein induced murine glomerulonephritis and systemic vasculitis model, International Symposium on Sustainable Materials Engineering, (Hosted by Research Center for Sustainable Materials Engineering, Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University), 2006. Aug. 04, Sendai, Miyagii.

2) Kenji Yamamoto; The design of the quantum dot and the application on the drug,, First International Conference of Nanobiomedical Technology and Structural Biology (Sponsored by Chendu City People's Government and Sichuan University), 2006. June 25-28, Changdu, Sichuan, China.

3) K. Fujioka, A. Hoshino, N. Manabe, Y.

Futamura, R. D. Tilley, and K. Yamamoto;
Synthesis of novel silicon nanocrystals in
inverse micelles, SPIE Photonics West (Bios
2007), 2007. Jan. 20-25, San Jose, California,
The U.S.A. (where Kenji Yamamoto also
presided over a conference).

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akiyoshi Hoshino, Tomokazu Nagao, Toshiko Ito-Ihara, Akiko Ishida- Okawara, Kazuko Uno, Eri Muso, Noriko Nagi- Miura, Naohito Ohno, Kazuhiro Tokunaka, Shiro Naoe, Hiroshi Hashimoto, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, Kazuo Suzuki	Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in Murine Systemic Vasculitis and Glomerulonephritis model mice	Microbiol. Immunol	in press		2007
Akiko Ishida-Okawara, Noriko Nagi-Miura, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Akinori Okumura, Hitoshi Tachikawa, Shin-ichiro Kashiwamura, Haruki Okamura, Naohito Ohno, Hidechika Okada, Peter. A. Ward, Kazuo Suzuki	Neutrophil activation and induced by <i>C. albicans</i> water-soluble mannoprotein- β -glucan complex (CAWS)	Exp. Mol. Pathol	in press		2007
Tomokazu Nagao, Mimiko Matsumura, Ayako Mabuchi, Akiko Ishida- Okawara, Osamu Koshio, Haruyuki Minamitani, and Kazuo Suzuki	Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody.	Neprol. Dialysis Transplant	22	77-87	2007
Shinohara Hiroyasu Nagai-Miura Noriko Ishibashi Ken-ichi, Adachi Yoshiyuki Akiko Ishida- Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki , and Naohito Ohno	Beta-mannosyl linkages negatively regulate anaphylaxis and vasculitis in mice, induced by CAWS, fungal PAMPs composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by <i>Candida</i> <i>albicans</i> .	Biol. Pharm. Bull.	29	1854-1861	2006
Shouichi Fujimoto, Shigehiro Uezono, Shuichi Hisanaga, Keiichi Fukudome, Shigeto Kobayashi, Kazuo Suzuki , Hiroshi Hashimoto, Hiroyuki Nakao, Hiroyuki Nuno	Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture: The first population-based, retrospective epidemiological survey in Japan.	Clinical Journal of American Society of Nephrology.	1	1016-1022	2006
Yasuaki Aratani, Fumiaki Kura, Haruo Watanabe, Hisayoshi Akagawa, Yukie Takano, Akiko Ishida-Okawara, Kazuo Suzuki , Nobuyo Maeda, and Hideki Koyama	Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defense against <i>Cryptococcus</i> <i>neoformans</i> .	J. Med. Microbiol.	55	1291-1299	2006

A. S. Persad, Y. Kameoka, S. Kanda, Y. Niho, K. Suzuki	Found in a Japanese Patient with Complete Myeloperoxidase Deficiency.	Gene Expression	13	67-71	2006
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, <i>Candida albicans</i> water-soluble fraction	Atherosclerosis	186	310-320	2006
杉野圭史、本間栄、高谷久史、宮本篤、坂本晋、川畑雅照、岸一馬、坪井永保、元井紀子、吉村邦彦	インフルエンザウイルス感染を契機に発症した致死的侵襲性肺アスペルギルス症の一例	日本呼吸器学会雑誌	第44巻	207-214	2006
畑中一仁、本間栄、植草利公	肺の疾患-非腫瘍性病変をどう見るか- II. 間質性肺炎以外のびまん性肺疾患 びまん性汎細気管支炎、綿毛不動症候群の病理と病態	病理と臨床	24	949-956	2006
松下竹次 瓜生英子 山中純子	小児インフルエンザの臨床	アレルギーと免疫	31	52-58	2006
Nigo, I. Y., Yamashita, M., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Inami, M., Kimura, M., Hasegawa, A., Kohno, Y., and Nakayama, T.	Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	103	2286-2291	2006
Meyer, E. H., Goya, S., Akbari, O., Berry, G. J., Savage, P. B., Kronenberg, M., Nakayama, T. , DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T.	Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NKT cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	103	2782-2787	2006
Kunisaki, Y., Tanaka, Y., Sanui, T., Inayoshi, A., Noda, M., Nakayama, T. , Harada, M., Taniguchi, M., Sasazuki, T., and Fukui, Y.	DOCK2 is required in T cell precursors for development of Va14 natural killer T (NKT) cells.	<i>J. Immunol.</i>	176	4640-4645	2006
Yamashita, M., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Norikane, S., Kimura, Y. M., Hasegawa, A., and Nakayama, T.	Crucial role of MLL for the maintenance of memory T helper type 2 cell responses.	<i>Immunity</i>	24	611-622	2006
Seino, K., Motohashi, S., Fujisawa, T., Nakayama, T. , and Taniguchi, M.	Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications.	<i>Cancer Sci.</i>	97	807-812	2006

Tenda, Y., Yamashita, M., Kimura, Y. M., Hasegawa, A., Shimizu, C., Kitajima, M., Onodera, A., Suzuki, A., Seki, N., and Nakayama, T.	Hyperresponsive TH2 cells with enhanced nuclear factor- κ B activation induce atopic dermatitis-like skin lesions in Nishiki-nezumi Cinnamon/Nagoya mice.	<i>J. Allergy Clin. Immunol.</i>	118	725-733	2006
Motohashi, S., Ishikawa, A., Ishikawa, E., Otsuji, M., Iizasa, T., Hanaoka, H., Shimizu, N., Horiguchi, S., Okamoto, Y., Fujii, S., Taniguchi, M., Fujisawa, T., and Nakayama, T.	A phase I study of <i>in vitro</i> expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer.	<i>Clin. Can. Res.</i>	12	6079-6086	2006
Shinnakasu, R., Yamashita, M., Shinoda, K., Endo, Y., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Ikemizu, S., and Nakayama, T.	Critical YxKxHxxxRP motif in the C-terminal region of GATA3 for its DNA binding and function.	<i>J. Immunol.</i>	177	5801-5810	2006
Kinjo, T., Nakamatsu, M., Nakasone, C., Yamamoto, N., Kinjo, Y., Miyagi, K., Uezu, K., Nakamura, K., Higa, F., Tateyama, M., Takeda, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., Kaku, M., Fujita, J., and Kawakami, K.	γ δT cells play a limited role in the neutrophilic inflammatory responses and host defense to pulmonary infection with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	<i>Microbes and Infection</i>	8	2679-2685	2006
Hosokawa, H., Kimura, Y. M., Shinnakasu, R., Suzuki, A., Miki, T., Koseki, H., van Lohuizen, M., Yamashita, M., and Nakayama, T.	Regulation of Th2 cell development by <i>Polycomb</i> group gene <i>bmi-1</i> through the stabilization of GATA3.	<i>J. Immunol.</i>	177	7656-7664	2006
Harada, M., Magara, K. K., Watarai, H., Nagata, Y., Ishii, Y., Kojo, S., Horiguchi, S., Okamoto, Y., Nakayama, T., Suzuki, N., Yeh, W. C., Akira, S., Kitamura, H., Ohara, O., Seino, K., and Taniguchi, M.	IL-21-induced Be cell apoptosis mediated by natural killer T cells in the suppression of IgE responses	<i>J. Exp. Med.</i>	203	2929-2937	2006
Nagao, T., Matsumura, M., Mabuchi, A., Ishida-Okawara, A., Koshio, O., Nakayama, T., Minamitani, H., and	Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody.	<i>Nephrol. Dial. Transplant.</i>	22	77-87	2007

Kaneko, T., Hosokawa, H., Yamashita, M., Wang, C. R., Hasegawa, A., Kimura, Y. M., Kitajima, M., Kimura, F., Miyazaki, M., and Nakayama, T.:	Chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci in human type 2 helper T cells.	<i>Mol. Immunol.</i>	44	2249	2007
S.J. Rulli Jr, D.Muriaux, K. Nagashima, J. Mirro, M.Oshima, J.G. Baumann, A.Rein	Mutant murine leukemia virus Gag proteins lacking proline at the N-terminus of the capsid domain block infectivity in virions containing wild-type Gag	VIROLOGY	347	364-371	2006
Kinjo T, Nakamatsu M, Nakasone C, Yamamoto N, Kinjo Y, Miyagi K, Uezu K, Nakamura K, Higa F, Tateyama M, Takeda K, Nakayama T, Taniguchi M, Kaku M, Fujita J, <u>Kawakami K.</u>	NKT cells play a limited role in the neutrophilic inflammatory responses and host defense to pulmonary infection with <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Microbes and Infection	8	2679-2685	2006
Nakasone C, Yamamoto N, Nakamatsu M, Kinjo T, Miyagi K, Uezu K, Nakamura K, Higa F, Ishikawa H, O'Brien RL, Ikuta K, Kaku M, Fujita J, <u>Kawakami K.</u>	Accumulation of gamma/delta T cells in the lungs and their roles in neutrophil-mediated host defense against pneumococcal infection	Microbes and Infection		[Epub ahead of print] PMID: 17306586	2006
Nakamatsu M, Yamamoto N, Hatta M, Nakasone C, Kinjo T, Miyagi K, Uezu K, Nakamura K, Nakayama T, Taniguchi M, Iwakura Y, Kaku M, Fujita J, <u>Kawakami K.</u>	Role of interferon-gamma in Valpha14+ natural killer T cell-mediated host defense against Streptococcus pneumoniae infection in murine lungs	Microbes and Infection		[Epub ahead of print] PMID: 17314060	2007
Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Ishida-Okawara, A., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H	Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defense against Cryptococcus neoformans.	J. Med. Microbiol.	55	1291-1299	2006



Neutrophil activation and induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein- β -glucan complex (CAWS)

Akiko Ishida-Okawara ^a, Noriko Nagi-Miura ^{a,b}, Toshiaki Oharaseki ^{a,c}, Kei Takahashi ^c, Akinori Okumra ^a, Hitoshi Tachikawa ^{a,d}, Shin-ichiro Kashiwamura ^e, Haruki Okamura ^c, Naohito Ohno ^b, Hidechika Okada ^f, Peter A. Ward ^g, Kazuo Suzuki ^{a,*}

^a Department of Bioactive Molecules, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640, Japan

^b Laboratory of Immunopharmacology of Microbial Products, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo, 192-0392, Japan

^c Department of Pathology, Ohashi Hospital, Toho University School of Medicine, 2-17-6 Ohashi, Meguro-ku, Tokyo, 153-8515, Japan

^d Department of Clinical Pharmacology, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, Asahimachi-dori 1, Niigata, Niigata 951-8510, Japan

^e Department of Physiology, Hyogo College of Medicine, 1-1, Mukokawa-cho, Nishinomiya-city, Hyogo, 663-8131, Japan

^f Nagoya City University, Graduate School of Medicine, 1, Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-city, Aichi, 467-8601, Japan

^g Department of Pathology, The University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109, USA

Received 4 May 2006

Abstract

We have established a mouse model which shows the symptoms of coronary arteritis after consecutive injections of CAWS, which is released from *Candida albicans*. In this study, we examined neutrophil activation in the initial period after CAWS injection intraperitoneally. During 10 min to 16 h after the injection, blood profiles and neutrophil functions were determined. At the same time, levels of inflammatory cytokines and chemokines in plasma were measured. Furthermore, level of ICAM-1 as a marker of lesion endothelial cell. Counts of the peripheral leukocytes increased immediately after CAWS injection, especially neutrophil. In vitro sensitivity of neutrophils to stimuli was enhanced. Moreover, proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-12 and IL-6), in plasma initially followed by an increase in IL-10, G-CSF, MIP-2 and soluble ICAM-1. Locally, ICAM-1 message in arterial walls was significantly increased 16 h after CAWS injection. A decrease in C3 levels was observed in plasma, suggesting complement activation and consumption. In summary, neutrophil activation occurred after CAWS injection, followed by complement activation, and production of proinflammatory cytokines chemokines and G-CSF which may be involved in development of coronary arteritis.

© 2006 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Complement activation; Inflammatory cytokines; Endothelium injury

Introduction

Recently, clinical relevance of fungal diseases has increased, mainly because of an increasing population of immunocompromised individuals including those infected with HIV,

transplant recipients and patients with cancer (Zupanic-Krmek and Nemet, 2004). Neutrophils play a key role during *Candida albicans* infection (Urban et al., 2006; Fradin et al., 2005). *C. albicans* exposed to erythrocytes, mononuclear cells, plasma or blood lacking neutrophils physiologically active and rapidly switch to filamentous growth. In contrast, the presence of neutrophils arrested *C. albicans* growth (Urban et al., 2006; Fradin et al., 2005). Recently, immune responses to some components of *C. albicans* such as mannan (Muller and Melchinger, 2004) or β -glucan (Gantner et al., 2005) have been reported.

Abbreviations: CAWS, *C. albicans* water-soluble mannoprotein- β -glucan complex; fMLP, fMet-Leu-Phe.

* Corresponding author. Fax: +81 3 5285 1160.

E-mail address: ksuzuki@nih.go.jp (K. Suzuki).

46 Animal model is useful to clarify mechanism of infection
47 process, genetic background differences and to strategy for
48 therapy (Nagi-Miura et al., 2004; Aratani et al., 2002; Spellberg
49 et al., 2005).

50 Some microorganisms or microorganism-derived products
51 are specific diseases. For example, certain *Campylobacter*
52 *jejuni* strains trigger Guillain-Barre syndrome while other
53 strains trigger the Fisher syndrome in the Japanese population
54 (Takahashi et al., 2005). Esper et al. have reported that New
55 Haven coronavirus (HCoV-NH) infection is associated with
56 Kawasaki disease (Esper et al., 2005). Recently, Iwai et al. have
57 identified oral microorganisms in the lesions of Buerger disease,
58 suggesting a possible etiologic link between Buerger disease
59 and chronic infections such as oral bacterial infections (Iwai et
60 al., 2005). We have established a mouse model which shows the
61 symptoms of coronary arteritis following consecutive injections
62 into mice of a water-soluble polysaccharide (CAWS) (Nagi-
63 Miura et al., 2004; Ohno, 2003). In this study, we examined
64 neutrophil activation and subsequent events after a single
65 injection of CAWS (Fig. 1).

66 Materials and methods

67 Reagents

68 ELISA kits for mouse IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 p70, IFN- γ , TNF- α were
69 purchased from BD Biosciences (CA, USA), IL-18 was from Medical and

Biological Laboratories (Tokyo, Japan), soluble ICAM-1 and MIP-2 were from
70 R&D Systems (MN, USA), G-CSF and GM-CSF were from AN'ALYZA (MN,
71 US). fMet-Leu-Phe (fMLP) was purchased from Peptide Institute (Osaka,
72 Japan), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), cytochalasin B (CB), cytochrome
73 c, RPMI 1640 medium, aprotinin and PMSF were purchased from Sigma
74 Chemical Co. (MO, USA). Casein was purchased from Calbiochem. Co.
75 (Darmstadt, Germany). TaqMan Universal PCR master mix was purchased from
76 PE Biosystems (NJ, USA). Monoclonal antibody and peroxidase-conjugated
77 IgG fraction to mouse C3 were purchased from HyCult biotechnology (Uden,
78 The Netherlands) and MP Biochemicals, Inc. (CA, USA), respectively.
79

Mice

C57BL/6N male mice were purchased from Charles River Japan, kept under
81 SPF conditions, and used according to a guideline for animal care of the
82 National Institute of Infectious Diseases. The mice were used in the experiment
83 at 6 weeks of age.
84

Preparation and administration of CAWS

CAWS was prepared from *C. albicans* strain IFO1385 in accordance with
86 conventional methods (Nagi-Miura et al., 2004). CAWS was dissolved in PBS
87 autoclaving, 0.2 ml of the (20 mg/ml) was intraperitoneally injected into a
88 mouse. For *in vitro* assay, neutrophils isolated from 8% casein-induced peritoneal
89 exudated cells were co-cultured with CAWS in RPMI medium containing
90 0.3 mM PMSF and 0.4 μ g/ml aprotinin.
91

Histological observations of coronary arteritis

Coronary artery segments were fixed in 10% buffered (pH7.2) formalde-
93 hyde, paraffin-embedded, and sections stained with hematoxylin and eosin.
94

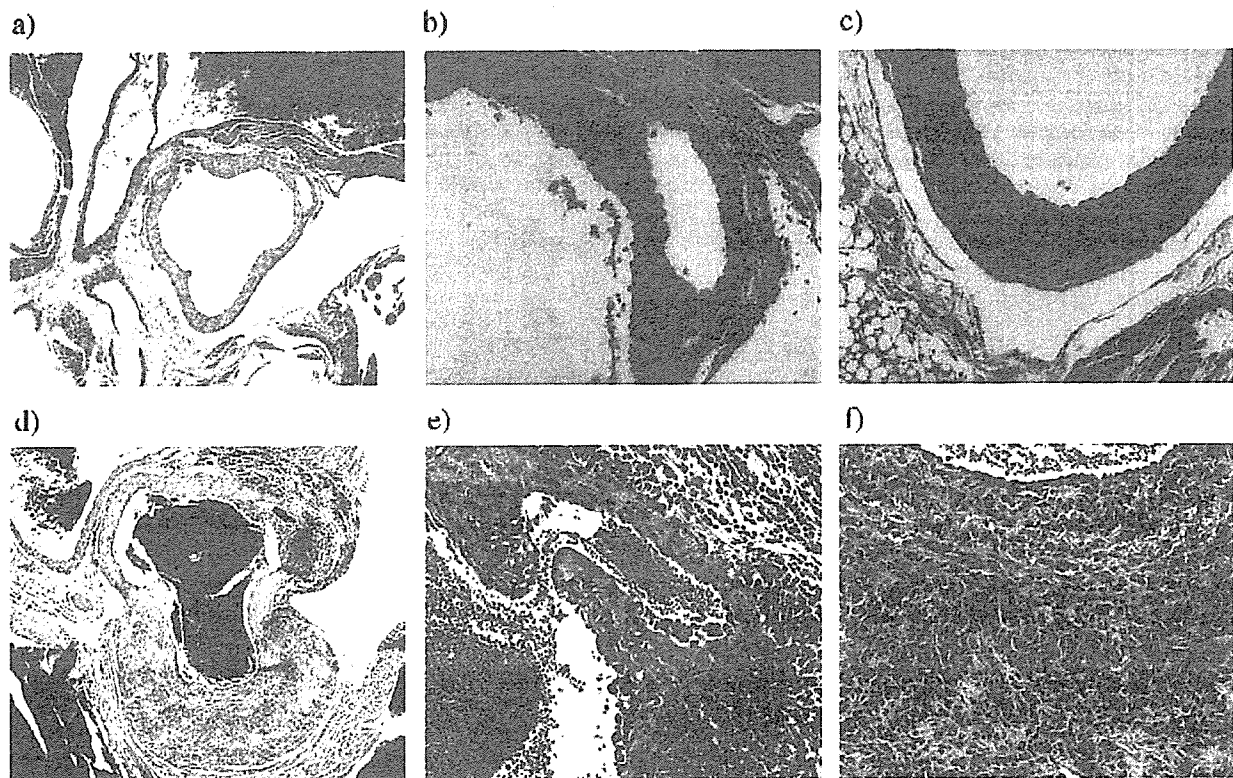


Fig. 1. Histological analysis of coronary arteritis administration of a single dose of CAWS. Normal (a) aortic root including coronary artery $\times 40$, (b) coronary artery $\times 200$ and (c) aorta, $\times 200$. Histology 4 weeks after CAWS injection a single dose of 4 mg/mouse vasculitis at the coronary artery and aortic root, $\times 40$, (e) coronary arteritis, $\times 200$, (f) aortitis, $\times 200$.

95 *Analysis of leukocytes profile*

96 Peripheral blood was collected from heart and EDTA-2K was added.
 97 Leukocyte profiles were analyzed by use of automation instruments (Mitsubishi
 98 BCL Corp., Tokyo, Japan).

99 *Flow cytometric analysis*

100 Peripheral blood was collected from heart and EDTA-2K was added.
 101 After lysis for 5 min at 4 °C, subsequent centrifugation (1000×g at 4 °C,
 102 cells) was suspended in HBSS. Bone marrow cells were prepared from a
 103 shinbone. The cells were incubated with mAb against surface markers (BD
 104 Pharmingen, CA, USA). Gr-1 (RB6-8C5), Mac-1 (M1/70) were used for flow
 105 cytometric analysis, and then analyzed with FACSCalibur using CellQuest
 106 software (BD Biosciences, CA, USA).

107 *Neutrophil function assay*

108 Heparinized blood was collected from heart, and neutrophil was prepared.
 109 MPO release and superoxide generation were measured as described previously
 110 (Ishida-Okawara et al., 1991).

111 *Measurement of proinflammatory cytokines and chemokine in
 112 plasma*

113 Levels of proinflammatory cytokines IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18,
 114 TNF-α, INF-γ, MIP-2, soluble ICAM-1, G-CSF, GM-CSF in plasma using
 115 individual ELISA.

116 *Preparation of peritoneal exudate neutrophils and measurement of
 117 cytokine production level by co-cultured neutrophil with CAWS*

118 Normal C57BL/6N mice were intraperitoneally injected with 4 ml of 8%
 119 casein in PBS and exudate cells containing resident macrophage or casein-
 120 induced neutrophils were recovered 8 h lavage with 5 ml of PBS. The
 121 exudate cells were put onto M-SMF (Japan Immunoresearch Laboratories

Co., Ltd., Takasaki, Japan), centrifuged 1200×g for 20 min at room 122
 temperature. Neutrophils were suspended (5×10⁶ cells/ml) in RPMI-1640 123
 medium containing 0.3 mM PMSF and 0.4 μg/ml aprotinin and co-cultured 124
 with 1 mg/ml CAWS for 0.5 to 4 h. At the end of culture, culture supernatant 125
 was prepared by centrifugation and levels of cytokines IL-1β, IL-6, IL-10 126
 determined using by ELISA kits. 127

Measurement of ICAM-1 mRNA expressed in aortic wall after CAWS 128
injection 129

The thoracic aortas of mice were isolated and frozen immediately for 130
 detection of ICAM-1 mRNA. The total aortic RNA for each mouse was 131
 isolated using ISOGEN (Nippon ene, Tokyo Japan). One microgram of RNA 132
 was reverse transcribed with ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) to obtain 133
 cDNA. Real-time PCR was performed using ABI PRISM 7000 Sequence 134
 Detection System (Applied Biosystems, CA, US) according to the manufac- 135
 ture's protocol. Primers and TaqMan probes specific for ICAM-1 was 136
 obtained from Assay-on-Demand Gene Expression Products (Applied 137
 Biosystems). For endogenous control, the level of GAPDH in each sample 138
 was measured using TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents VIC 139
 (Applied Biosystems). Data analyses were performed on ABI PRISM 7000 140
 SDS software version 1.0 (Applied Biosystems). 141

Detection of mouse complement 3 (C3) by ELISA and Western 142
blotting 143

Peripheral blood was collected from heart and EDTA-2K was added. 144
 One μg/ml of C3 monoclonal antibody was coated to ELISA plate for 145
 overnight. After washing, blocking was done by 50% FCS for 1 h. 146
 Sample plasma (×100) was added to the plate for 1 h, after washing 147
 peroxidase labeled-2nd antibody (×1000) was added to the plate. After 148
 washing, o-phenylenediamine chloride was added to the plate for 3 min. 149
 Finally, reaction was stopped 2 N hydrogen sulphate and measured at 150
 490 nm by auto reader (Nippon Bunko, Tokyo, Japan). Western blotting was 151
 performed by using mouse C3 monoclonal antibody and peroxidase-labeled 152
 anti-Rat IgG as 2nd antibody. 153

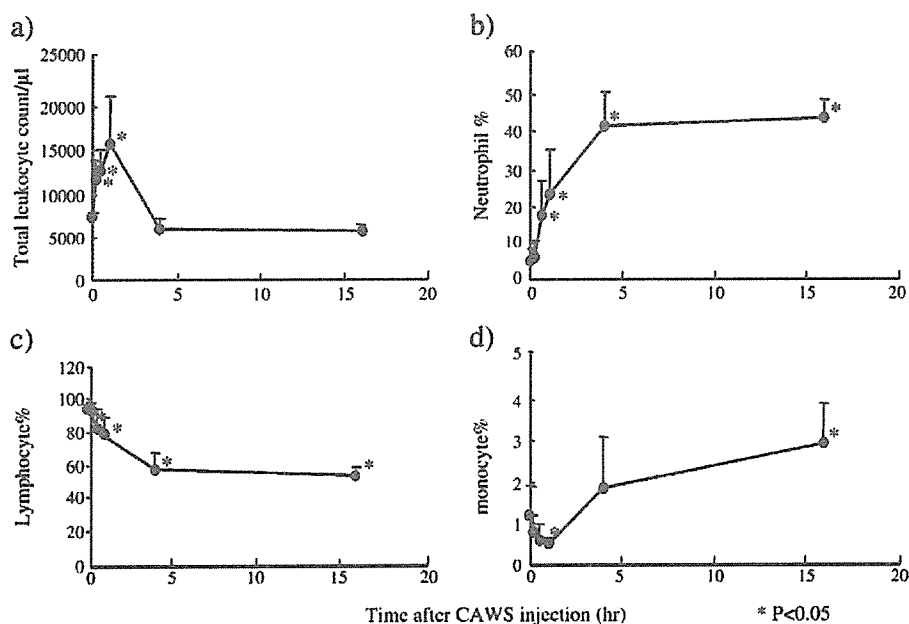


Fig. 2. Change of blood profile after CAWS injection. Peripheral blood was collected from heart EDTA-2K. Blood profile was analyzed by Mitsubishi Kagaku BCL Inc. (a) total leukocyte number, ratio of (b) neutrophil, (c) lymphocyte and (d) monocyte, respectively. N=6 in each group.

t1.1 Table 1

t1.2 Change of Gr-1⁺ cells ratio after CAWS injection

t1.3		Time after CAWS injection (hr)					
t1.4		0	0.17	0.5	1	4	16
t1.5	Bone marrow	19.47±5.35	15.85±1.89	9.65±1.14 *	10.42±1.26 *	7.39±1.97 *	11.73±6.58
t1.6	Peripheral blood	5.24±6.92	5.30±0.36	10.35±2.00 *	9.78±3.59	8.06±6.69	6.12±5.34

t1.7 * P<0.05.

154 *Statistical analysis*

155 Results expressed as the mean±SD. Statistical analysis was using Mann-
156 Whitney U-test. The probability value of <0.05 considered significant.

157 **Results**

158 *Observation of coronary arteritis administration of a single*
159 *dose of CAWS*

160 We have severe coronary arteritis by daily injection of
161 CAWS (4 mg/mouse/day) for 5 days. In order to compare
162 initial events and development of coronary arteritis, the
163 current studies employed a one shot injection of CAWS at a
164 dose of 4 mg/mouse. Four weeks after CAWS injection with
165 this protocol, arteritis was evident in both coronary and aorta.

166 *Profiles of peripheral leukocytes*

167 After CAWS injection, total leukocyte counts were increased
168 and later returned to baseline levels 4 h (Fig. 2a). The ratio of

lymphocytes decreased after CAWS injection, while ratio of
neutrophils promptly increased (Figs. 2b, c), the ratio of
monocyte increased (Fig. 2d).

Profile of leukocyte by flow cytometric analysis

To confirm the leukocyte counts, flow cytometric
analysis of peripheral and bone marrow cells after
CAWS injection was done (Table 1). Bone marrow cell
numbers the tibia were significantly increased 4 h after
CAWS injection (data not shown). The ratio of Gr-1 cells
in bone marrow significantly decreased at 0.5, 1, 4 h after
CAWS injection, while the ratio of the cells in peripheral
blood increased suggesting that neutrophils in bone
marrow promptly migrate to peripheral blood CAWS
injection.

CAWS effect on neutrophil activation

To the functional response of neutrophils after CAWS
injection, MPO release and superoxide generation were

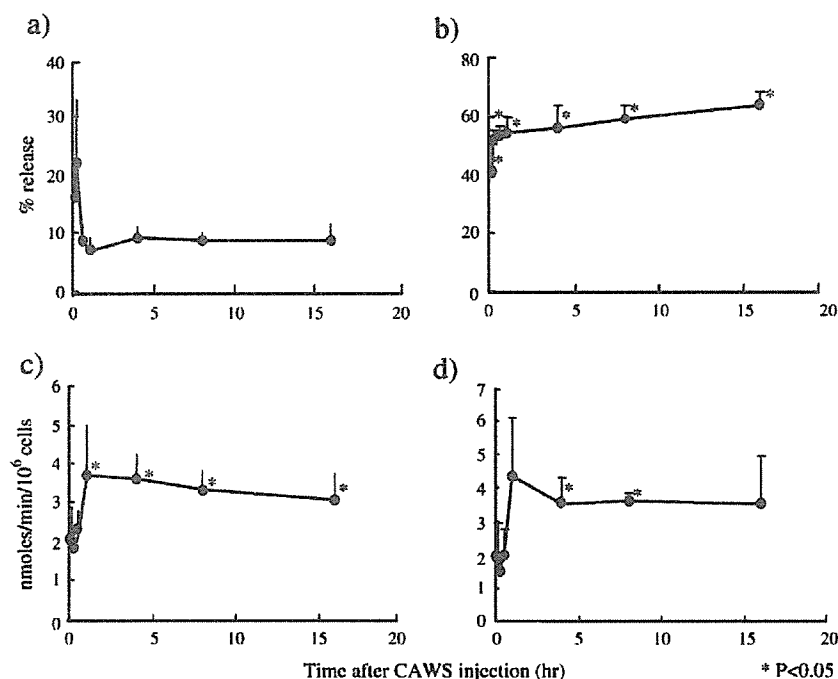


Fig. 3. Neutrophil activation after CAWS injection. (a, b) MPO release from neutrophils after CAWS injection. Neutrophils (10⁶ cells/ml) were stimulated in the (a) absence, or (b) presence of (10⁻⁵ M) and (5 μg/ml). (c, d) Superoxide generation after CAWS injection. Neutrophils (10⁶ cells/ml) were stimulated with (c) (10⁻⁵ M) and (5 μg/ml) or (d) PMA (1 μg/ml). N=6 in each group.