

第39回補体シンポジウム・第13回日本生体防御学会

同時開催学術集会

講演集



2002年7月東京

Proceeding of the Complement Symposium Vol.39
Bio DEFENCE Vol.13

第39回補体シンポジウム・第13回日本生体防御学会

同時開催学術集会

講演集

会期： 2002年7月11日（木）・12日（金）・13日（土）

会場： 日大会館

東京都千代田区九段下4-8-24

〒173-8610

東京都板橋区大谷口上町30-1

日本大学医学部内科学講座内科2

補体シンポジウム集会長 大井 洋之

TEL 03-3972-8111

FAX 03-3972-1098

〒113-8657

東京都文京区弥生1-1-1

東京大学農学部応用免疫学教室

日本生体防御学会学術集会長 小野寺 節

TEL 03-5841-3090

FAX 03-5841-8020

会場案内

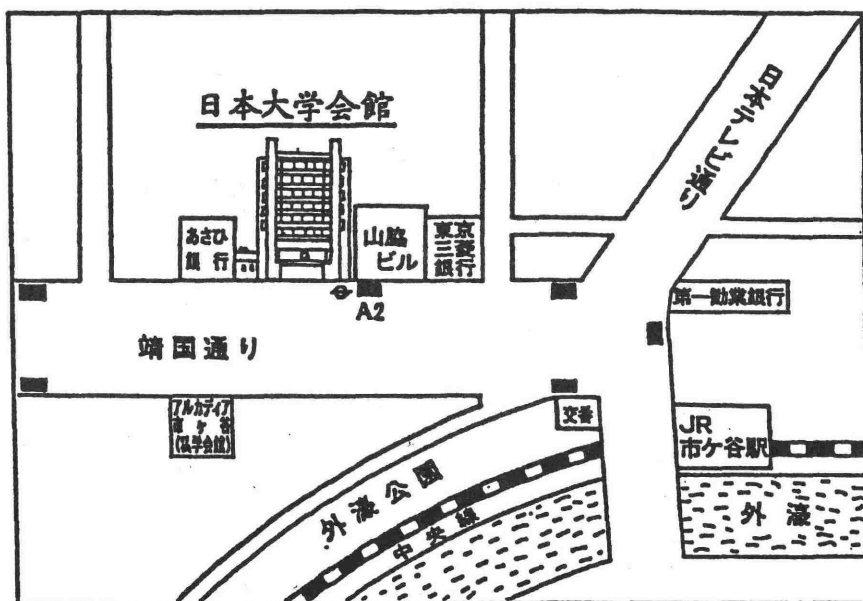
日本大学会館 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 24 号

電話 03 (5275) 8112 番

日本大学会館交通要因

JR 市ヶ谷駅下車 徒歩 3 分

営団有楽町線、南北線、都営地下鉄市ヶ谷駅下車 徒歩 3 分



懇親会会場

アルカディア市ヶ谷

私学会館

〒102-0073 東京都千代田区九段北4-2-25

TEL.03(3261)9921(代)/FAX.03(3261)7760

第39回補体シンポジウム・第13回日本生体防御学会

同時開催学術集会

日 程 表 (会場： 日大会館)

7月11日 (木)

補体シンポジウム

生体防御学会

11:00- 受付開始	
	12:00-13:00 生体防御理事会
13:00-13:10 開会の辞 (B会場)	13:00-13:10 開会の辞 (A会場)
13:10-15:00 一般演題 (B会場)	13:10-15:00 一般演題 (A会場)
15:00-15:20 コーヒーブレイク	
15:20-17:00 一般演題 (B会場)	15:20-15:50 一般演題 (A会場)
	15:50-17:00 生体防御シンポジウム (A会場)
17:00- 補体運営委員会	

7月12日 (金)

9:00-10:20 一般演題 (A会場)	10:00-12:00 一般演題 (B会場)
10:20-10:40 コーヒーブレイク	
10:40-12:00 一般演題 (A会場)	
12:00-13:00 補体ランチョンセミナー (A会場)	
13:00-13:30 補体総会 (A会場)	13:30-14:00 生体防御総会 (B会場)
14:00-15:40 臨床補体シンポジウム (A会場)	14:00-16:15 一般演題 (B会場)
16:30-18:00 生体防御特別講演 (A会場)	
18:30-	懇親会 (アルカディア市ヶ谷)

7月13日（土）

9：00－12：30

補体教育講演： 補体学への招待 （ A 会場 ）

13：30－15：30

生体防御学会市民講座 （ A 会場 ）

第39回補体シンポジウム

補体シンポジウム参加案内

受付 第1日 7月11日(木) 午前11:00より

講演会場 日本大学会館 (受付は2階です)

参加費 一般 5,000円

学生 3,000円

教育講演のみ参加 1,000円

懇親会費 1,000円

年会費 年会費を未納の方および新たに入会される方は、当日受付にてご納入ください。

発表方法 全て口頭発表で行います。一般演題、臨床シンポジウムは討論を含めて約15分を予定しています。進行は座長の指示に従ってください。スライドプロジェクターは35mmスライド用を一台設置いたします。スライド枚数制限はありませんが、発表時間内に終了するように準備し、発表30分以上前にスライド受付にお渡しください。

運営委員会 第1日 7月11日(木) 17:00 ~

総会 第2日 7月12日(金) 13:00 ~ 13:30

ランチョンセミナー 第2日 7月12日(金) 12:00 ~ 13:00

懇親会 第2日 7月12日(金) 18:30 ~ 20:30

アルカディア市ヶ谷 (生体防御学会と合同)

第 39 回補体シンポジウム・プログラム

第 1 日 7 月 11 日

一般演題 (セッション A) 13:10 ~ 15:00

座長 野中 勝、瀬谷 司

- 1 尾索動物マボヤ補体制御因子候補遺伝子の単離
宮沢清太、野中 勝
(東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻)
- 2 カタユウレイボヤ補体系遺伝子のゲノム構造の解析
吉崎史子、野中 勝
(東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻)
- 3 *Xenopus ficolin* の cDNA クローニングと タンパクの精製
柿沼雄二、遠藤雄一、高橋 実、松下 操、藤田禎三
(福島県立医大・医・二生化)
- 4 ヤツメウナギ血清中の C1q 様レクチン
松下 操、野澤亜紀子、遠藤雄一、中田宗宏¹⁾²⁾、小島直也¹⁾²⁾、
藤田禎三
(福島県立医大・医・二生化,¹⁾ 東海大・工・生命化学,²⁾ 糖鎖工学研究施設)
- 5 コイ B 因子/C2 アイソタイプ遺伝子の連鎖解析および機能的多様性
中尾実樹、中原マキ子、原田あゆみ、無津呂淳一、加藤陽子、矢野友紀
(九州大学大学院・農学研究院・水族生化学研究室)
- 6 MASP1/3 遺伝子の起源と分子進化
遠藤雄一¹⁾、野澤亜紀子¹⁾、柿沼雄二¹⁾、高橋 実¹⁾、松下 操¹⁾、野中 勝²⁾、
藤田禎三¹⁾
(¹⁾ 福島県立医大・医・二生化、²⁾ 東京大学大学院・理・生物科学)

一般演題 (セッション B) 15:20 ~ 17:00

座長 松下 操、松本 美佐子

- 7 ニワトリの RCA 遺伝子座の解析
押海裕之¹⁾、信田京子¹⁾、加藤順²⁾、大場慎也²⁾、玉木雄一郎²⁾、服部崇史²⁾、
山田のぞみ²⁾、水野重樹²⁾、山田和彦³⁾、松田洋一³⁾、井上徳光¹⁾、
松本美佐子¹⁾、瀬谷 司¹⁾
(¹⁾ 大阪府立成人病センター研究所免疫学部門、²⁾ 日本大学生物資源科学部農芸化学科酵素科学
研究室、³⁾ 北海道大学先端科学技術共同研究センター動物染色体研究室)
- 8 マウス C4b-binding protein の精巢上体における発現様式
野中真弓¹⁾、菱川善隆²⁾、森山信男³⁾、小路武彦²⁾、野中 勝¹⁾
(¹⁾ 東大・院理・生物、³⁾ 同・医・血液浄化、²⁾ 長崎大・医・解剖)
- 9 補体レクチン経路における MASP-1 および MASP-3 の役割
高橋 実、松下 操、遠藤雄一、藤田禎三
(福島県立医科大学・医学部・生化学第二)

1 0 SOLUBLE PEPTIDOGLYCAN CAN ACTIVATE THE LECTIN
COMPLEMENT PATHWAY

Ma Young Girl¹⁾、Zhaong Rong¹⁾、Ji-Won Park¹⁾、Misao Matsushita²⁾、
Teizo Fujita²⁾ and Bok Luel Lee¹⁾

(¹⁾College of Pharmacy, Pusan National University, ²⁾Department of Biochemistry,
Fukushima Medical University School of Medicine)

1 1 PNH クロンの拡大に関わる遺伝子変異およびそのモデルマウス作成への試み
泉井朋久¹⁾、桑山真輝^{1),2)}、村上良子¹⁾、西村純一^{1),2)}、待井隆志²⁾、金倉 譲²⁾、
木下タロウ¹⁾、井上徳光³⁾

(¹⁾ 大阪大学微生物病研究所免疫不全、²⁾ 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科、³⁾ 大阪
府立成人病センター研究所免疫学部門)

第2日 7月12日

一般演題 (セッションC) 9:00 ~ 10:20

座長 山本 哲郎、岡田 則子

1 2 ヒト C5aR に対するペプチド抗体の作成

土肥名月、金子葉子¹⁾、岡田則子、岡田秀親

(名古屋市立大学大学院医学研究科・生体防御学 ¹⁾ 藤田保健衛生大学医学部・第一生理学)

1 3 S19 リボソーム蛋白2量体分子上の C5a レセプターに対するアゴニスト・アン
タゴニスト変換部位の同定

山本哲郎、アージュン・シュレスタ、渋谷陽子、塩川 徳、西野憲和

(熊本大学医学研究科、同医学部、九州工業大学工学部)

1 4 Complement C5a receptor mediated signalling may be involved in
neurodegeneration in Alzheimer's disease

Farkas I.¹⁾、Fukuda A.²⁾、Yamamoto N.³⁾、Tateyama H.⁴⁾、Okada N.¹⁾、
Okada H.¹⁾

(¹⁾ Department of Molecular Biology, Nagoya City University School of Medicine,
Nagoya, Japan, ²⁾ Department of Physiology, Hamamatsu University School of
Medicine, Hamamatsu, Japan, ³⁾ Department of Bioregulation Research, Nagoya City
University School of Medicine, Nagoya, Japan, ⁴⁾ Department of Pathology, Nagoya City
University School of Medicine, Nagoya, Japan)

1 5 HIV-1 感染細胞に反応する IgM 抗体の補体活性化能とアミノ酸配列との関連性
朝井鈴佳、土肥名月、尹 淑萍¹⁾、岡田則子、岡田秀親

(名古屋市立大学大学院医学研究科・生体防御学、¹⁾ Dept of Pathology, Wayne Stated
University School of Medicine)

1 6 補体蛋白D因子の新しい溶血活性測定法

内堀恵美、西垣雅子、北野悦子、村上能庸、岩田博夫、北村 肇

(大阪府立看護大学医療技術短期大学部、京都大学再生医科学研究所)

一般演題 (セッションD) 10:40 ~ 12:00

座長 松尾 清一、阿部 正義

- 17 異種移植応用に向けた可溶化補体レセプター(sCR1)の機能解析及び結晶化
加藤久宗^{1,2)}、石井則行²⁾、村上能庸³⁾、瀬谷 司⁴⁾、王 碧昭⁵⁾
(¹⁾ 筑波大・バイオシステム、²⁾ 産総研・生物情報、³⁾ 京都大・再生医科研、⁴⁾ 大阪府立成人病センター・免疫、⁵⁾ 筑波大・応用生物)
- 18 ウイルス由来補体制御因子 HSV-gC1 のブターヒト異種移植への応用
松浪勝義^{1,2)}、宮川周士¹⁾、福田大輔^{1,3)}、白倉良太¹⁾
(¹⁾ 大阪大学大学院医学系研究科・組織再生医学講座・臓器置換、²⁾ 日本動物工学研究所(AERI)、³⁾ ニプロ株式会社)
- 19 Barrett 粘膜における特殊円柱上皮の分子マーカー
平岡佐規子、水野元夫、那須淳一郎、岡咲博昭、水野将克、堀伸一郎、
槇殿知穂、豊川達也、竹中龍太、武 進、高岡伸行、富田淳子、岡田裕之、
寺田 亮、山本和秀、藤田禎三¹⁾、白鳥康史
(岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科学、¹⁾ 福島県立医大・生化学)
- 20 透析患者における赤血球 CR1 のポリモルフィズムの検討
玉野まり子、大井洋之、福家吉伸、日高睦子、里村厚司、大澤 勲、遠藤守人、
藤田宜是、須藤祐正¹⁾
(日本大学医学部内科学講座内科2部門、¹⁾ 春日部嬉泉病院)
- 21 糖尿病性腎症における血管中膜平滑筋障害 一糖酸化反応と補体の活性化との関連について
上杉憲子¹⁾、阿部正義²⁾、坂田則行¹⁾
(¹⁾ 福岡大学医学部病理、²⁾ 同薬理)

ランチョンセミナー 12:00 ~ 13:00

司会: 長澤 滋治

潰瘍性大腸炎やクローン病の発症と顆粒球 ー正しい治療に向けてー
安保 徹 (新潟大学大学院・免疫学・医動物学)

臨床補体シンポジウム 14:00 ~ 15:40

座長 北村 肇、大井 洋之

- 1 腎移植後の拒絶反応における C4d の検討
阿部正浩¹⁾、澤田登起彦¹⁾、堀田 茂²⁾、中島一朗¹⁾、洲之上昌平¹⁾、
田辺一成³⁾、東間 紘³⁾、山口 裕⁴⁾、寺岡 慧¹⁾
(¹⁾ 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター外科、²⁾ 病理検査部、³⁾ 泌尿器科、⁴⁾ 東京慈恵医科大学柏病院病理科)
- 2 症例からみた遺伝性血管神経性浮腫 (HANE) の問題点
大澤 勲
(日本大学医学部内科学講座内科2部門)

3 補体欠損症と SLE

塚本 浩、堀内孝彦、永江祥之介¹⁾、北村 肇²⁾、北野悦子²⁾、原田実根
(九州大学大学院病態修復内科学(第一内科)、¹⁾ 九州大学大学院皮膚科学、²⁾ 大阪府立看護大学
医療技術短期大学部臨床検査学科)

4 消化器疾患における補体制御因子発現異常とその臨床的意義

水野元夫、那須淳一郎、岡咲博昭、水野将克、堀伸一郎、平岡佐規子、
槇殿知穂、豊川達也、竹中龍太、武 進、高岡伸行、富田淳子、岡田裕之、
山本和秀、藤田禎三¹⁾、白鳥康史
(岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科学、¹⁾ 福島県立医大・生化学)

5 発作性夜間血色素尿症の発症メカニズム

井上徳光
(大阪府立成人病センター研究所)

第3日 7月13日

教育講演：補体学への招待 9:00 ～ 12:30

座長 岡田 秀親

1 生体防御における補体系のオリエンテーション

岡田秀親
(名古屋市立大学分子医学研究所 生体高分子部門)

2 3つの補体経路：補体活性化因子と初期反応

藤田禎三
(福島県立医科大学生化学第二講座)

3 臨床からみた補体活性

遠藤守人
(日本大学医学部内科学講座内科2)

4 補体の後期反応

岡田則子
(名古屋市立大学大学院医学研究科生体防御学)

5 補体制御因子とその生体機構

瀬谷 司
(大阪府立成人病センター研究所)

6 補体系よりみた治療の可能性

南学正臣
(東京大学医学部附属病院腎臓内分泌内科)

7 遺伝子からみた補体系の成り立ち

野中 勝
(東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

尾索動物マボヤ補体制御因子候補遺伝子の単離

宮沢 清太、野中 勝

東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻

Cloning of regulators of complement activation (RCA) from a solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*

Seita Miyazawa, Masaru Nonaka

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, the University of Tokyo

〔目的〕

補体系は新口動物の進化の過程で、最も強力かつ洗練された自然免疫系のひとつとして確立されてきたと考えられる。哺乳類の補体系においては、その強力な潜在的攻撃力が誤った活性化によって自己組織の損傷へ向かうことを防ぐため、さまざまな補体制御因子が存在し、厳密かつ適正な活性化の制御に働いている。

このような「安全装置」が、いつ、どのような形で獲得されたかという問題は、補体系の進化を考える上で興味深い。我々はこれまでに、尾索動物のマボヤより C3¹⁾、factor B、MASP²⁾ を単離し、レクチン経路と第2経路からなる原始的な補体系が高等無脊椎動物に存在することを示した。また、マボヤ血球表面に補体レセプターを同定し、原始補体系が異物の貪食促進に機能していることを示した³⁾。今回、この原始補体系に補体系の活性化を制御するシステムが備わっているか否かを検証するため、マボヤ補体制御因子の候補遺伝子の探索を行った。

〔方法〕

哺乳類補体制御因子群に共通に見られる特徴的な構造である SCR (Short Consensus Repeat) を指標

として、(1) 異なる補体制御因子間、あるいは多種動物の補体制御因子間で比較的良好に保存された部分配列をもとに縮退プライマーを設計し、RT-PCR を用いてマボヤ各組織 mRNA から目的配列の増幅を試みた。(2) マボヤ受精卵の EST データベース (MAGEST データベース) に対して BLAST 検索を行い、SCR 様配列を持つクローンの探索を行った。

〔結果〕

SCR 配列を持つ 4 つの新規遺伝子を同定し、翻訳領域の塩基配列のほぼ全長を決定した。うち 1 種は推定アミノ酸配列の N 末端側にレクチン様領域を持ち、セレクチンファミリーに属すると考えられた。残り 3 種 (HrSCR-1,-2,-3) はそれぞれ 5 個、9 個、1 個の SCR を持ち、HrSCR-1 には C 末端側に膜貫通領域と、約 380 アミノ酸からなる細胞内領域が存在した。また、HrSCR-2 は C タイプレクチン様領域を、HrSCR-3 は SCR を挟む 2 つの EGF 様配列と C 末の膜貫通領域を持っていた。RT-PCR を用いた発現解析により、*HrSCR-1* はすべての組織で発現が確認されたが、*HrSCR-3* は鰓嚢、消化腺、生殖腺でのみ発現していた。*HrSCR-2* は肝臓、生殖腺に弱い発現が見られた。

〔考察〕

HrSCR-1 は、哺乳類の DAF、MCP や近年同定されたニワトリの補体制御因子である Cremp⁴⁾ などの構造上の類似性、およびすべての組織で発現が見られる膜タンパク質であることなどから、マボヤ各組織の細胞表面で補体活性化の制御を担っている可能性が高いものと考えられる。今後の生化学的、機能的な解析により、これら補体制御因子候補が原始補体系においてどのような機能を持つものであるかが明らかになると期待される。

〔文献〕

- 1) Nonaka,M.et al., *J.Immunol.*,**162**: 387 (1999)
- 2) Ji,X.et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **94**: 6340 (1997)
- 3) Miyazawa, S. et al., *J.Immunol.*,**166**: 1710 (2001)
- 4) Inoue, N. et al., *J.Immunol.*, **166**: 424 (2001)

カタユウレイボヤ補体系遺伝子のゲノム構造の解析

吉崎 史子、野中 勝

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

Isolation and Genomic Structural Analyses of Complement Genes of an Ascidian, *Ciona intestinalis*

Fumiko Yoshizaki, Masaru Nonaka

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo

<はじめに>

近年の研究により補体系は後口動物の系統で獲得され、その後脊椎動物の系統で遺伝子重複などにより発展を遂げたことが示唆されている¹⁾。演者らは昨年の本大会で、尾索動物カタユウレイボヤから2つの *C3* factor *B(Bf)*, *MASP*, セリンプロテアーゼドメインを持たない *MASP* related protein (*MRP*) cDNA を単離し、分子系統樹による解析からいずれの遺伝子においても脊椎動物における遺伝子重複に先駆けた分岐が示唆されることを報告した。本研究ではさらに補体成分を探索するとともに、ヒトおよびゼノパスで主要組織適合性抗原複合体 (MHC) class III 領域に連鎖して存在する *C4*, *C2*, および *Bf*²⁾ についてその連鎖の成立時期を知るために、カタユウレイボヤをもちいて *C2/Bf* と *C3/C4/C5* の共通祖先遺伝子の間の連鎖の有無を Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を用いて検討した。

<方法>

補体系遺伝子の探索は、京都大学佐藤研究室を中心に行われている EST プロジェクトのデータベースの検索によって行った。

分子系統樹による解析から脊椎動物の *C3/C4/C5*、及び *C2/Bf* それぞれの共通祖先から直接分岐したと考えられた *CiC3-1*, *CiC3-2*⁴⁾ と *CiBf-1* (昨年の本大会で報告) について、cDNA 配列を用いて BAC のゲノムライブラリ (京都大学 小林博士) をスクリーニングした。得られ

た BAC クローンについてサザンハイブリダイゼーションを行った。染色体標本はカタユウレイボヤ成体の精巣からカルノア固定により作製した。BAC クローンを DIG または biotin で標識したプローブを用いて染色体標本に対して Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を行った。シグナルはローダミン標識抗 DIG 抗体および FITC 標識アビジンを用いて検出し、蛍光顕微鏡、CCD カメラで観察、記録した。

<結果と考察>

CiBf-2 の単離

京都大学の EST データベースよりマボヤ *Bf* に高い相同性を示す EST クローンを見出し、そのクローンの全塩基配列を決定し、*CiBf-2* とした。*CiBf-2* はアミノ酸配列でマボヤ *Bf* に対して 34%、*CiBf-1* に対して 43% の相同性を示した。分子系統樹による解析から、*CiBf-2* は *CiBf-1* とクラスターをなし、脊椎動物の系統での *Bf/C2* の遺伝子重複とは独立にカタユウレイボヤの系統で起こった遺伝子重複によって分岐したことが示唆された。カタユウレイボヤの *C3* についても同様な樹形になることが示されており⁴⁾、補体系がカタユウレイボヤにおいて独自に成分を増やし進化を遂げたことを示唆している。

また BAC クローンのサザンハイブリダイゼーションの結果から、*CiBf-1* 遺伝子と *CiBf-2* 遺伝子はゲノム上でタンデムに並んで存在していることが示された。

FISH 法による連鎖解析

現在までに、C3 のうち主に発現している *CiC3-1* と、*CiBf* の間の連鎖の有無を FISH によって検討した。間期核での結果であるので限定的ではあるものの、*CiC3-1*、*CiBf* のシグナルは異なる位置で検出された。至近での連鎖があれば、両者のシグナルは重なり合い、オレンジ色のスポットとして検出されるので、この結果は *CiC3-1* と *CiBf* の間に緊密な連鎖はないということを示唆する。このことからヒト、ゼノパスで見られるような *C2/Bf* と *C4* あるいはその共通祖先の間の連鎖は脊椎動物の系統で成立したと考えられる。この結果は、これら遺伝子間の連鎖の成立が獲得免疫の出現時期と一致し、古典経路の確立に進化上なんらかの役割を果たした可能性を示唆する。

また、本研究でもちいた FISH 法は、改善の余地は多々あるものの、遺伝学的な解析が困難な動物種において遺伝子の物理的位置関係を知る方法として非常に有効であると思われる。

<総括>

カタユウレイボヤから *CiBf-2* を単離し、ホヤの系統で独自の遺伝子重複が起こっていることを示した。FISH 法により、*CiC3-1* と、*CiBf-1/CiBf-2* の間にはヒト MHC クラス III 領域の *C4,C2,Bf* 間に見られる緊密な連鎖は存在しないことを示した。

<文献>

- 1) Nonaka, M. Curr Opin Immunol 13:69 (2001)
- 2) The MHC sequencing consortium Nature 401:921 (1999)
- 3) Nonaka, M. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 94:5789 (1997)
- 4) Marino, R. Immunogenetics 53:1055 (2002)

Xenopus ficolinの cDNAクローニングとタンパクの精製

柿沼雄二、遠藤雄一、高橋 実、松下 操、藤田禎三
福島県立医大・医・二生化

cDNA cloning of *Xenopus* ficolins

Yuji Kakinuma, Yuichi Endo, Minoru Takahashi, Misao Matsushita and Teizo Fujita

Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine

〈はじめに〉

ficolinは、ブタ子宮細胞膜上のTGF- β 1結合蛋白として発見されたが、その後、ヒトやマウスにおいては血中に存在し、レクチン活性をもつことが明らかになった。ficolinは、コラーゲン様ドメインとフィブリノーゲン様ドメインからなっている。ヒトでは3種類が知られており、そのうち、L-ficolin/P35とH-ficolin/Hakata抗原は、レクチン経路の認識分子として働いていることが明らかにされた¹⁾²⁾。無脊椎動物尾索類であるマボヤのficolinについても報告した³⁾。今回は、両生類である*Xenopus*のficolinに関し、cDNAクローニングとタンパクの精製を試みた。

〈方法〉

1) 既に報告されているficolin cDNAの配列をもとに degenerated primerを作成し、*Xenopus*肝臓cDNAを鋳型としてPCRを行い、4種の*Xenopus* ficolin cDNAの一部を得た。さらに5'RACEおよび3'RACEを行い、全長のficolin cDNAを得た。

2) *Xenopus*の6種の組織（心、肺、肝、脾、筋、末梢白血球）からRNAを抽出し、1)で得られた*Xenopus* ficolin cDNAをプローブとしてNorthern blotを行った。

3) タンパクとしての機能を解析するため、*Xenopus*の血液から血清を抽出し、GluNAc affinity chromatographyによる精製を試みた。

〈結果〉

1) cDNAクローニングの結果、4種の*Xenopus*

ficolinのcDNAが得られた。これらは、各々、309、319、280、319のアミノ酸をコードしており、すでに報告されているヒトの3種のficolinとは、54~59%の相同性を示した。4種の*Xenopus* ficolin間の相同性は66~83%であった。

2) Northern blotの結果、*Xenopus* ficolin 1は、主に肝と脾臓で発現しており、ficolin 2と4は、主に肺と末梢白血球に発現していた。前者は、マウス ficolin Aの発現パターンに近く、後者は、ヒトM-ficolinに類似していた。

3) GluNAc column後のSDS-PAGEでは、37kDaと40kDaに2本のメインバンドが認められ、非還元下の泳動では単一バンドであった。N末端のアミノ酸配列を決定した結果、ficolin 1であることがわかった。

〈考察〉

今回得られた4種の*Xenopus* ficolinと他のficolin familyについて、分子系統樹を作成し解析した結果、*Xenopus*の4種のficolinは、*Xenopus*という種の中で分岐したと考えられた。また、Northern blotとタンパク解析の結果より、4種のうち、*Xenopus* ficolin 1は、ヒトL-ficolin/P35やマウスficolin Aと同様、血液中に存在して生体防御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

〈文献〉

- 1) Matsushita M et al., J. Immunol., 164: 2281 (2000)
- 2) Matsushita M et al., J. Immunol., 168:3502 (2002)
- 3) Kenjo A et al., J. Biol. Chem., 276:19959 (2001)

ヤツメウナギ血清中の C1q 様レクチン

松下 操、野澤亜紀子、遠藤雄一、中田宗宏¹⁾²⁾、小島直也¹⁾²⁾、水落次男¹⁾²⁾、藤田禎三
福島県立医大・医・二生化,¹⁾ 東海大・工・生命化学,²⁾ 糖鎖工学研究施設

Clq-like lectin in lamprey serum

Misao Matsushita, Akiko Nozawa, Yuichi Endo, Munehiro Nakata,
Naoya Kojima, Tsuguo Mizuochi and Teizo Fujita

Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine

¹⁾ Department of Applied Biochemistry and ²⁾ Institute of Glycotechnology, Tokai University

〈はじめに〉

獲得免疫がない脊椎動物円口類のヤツメウナギや無脊椎動物ではレクチンが自然免疫の担い手として重要であると推定される。ヒトで明らかになったように、血清中には *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を認識するレクチンとして MBL とフィコリンがあり、いずれも補体レクチン経路を活性化することにより自然免疫に関与している¹⁾。今回我々はヤツメウナギ血清より GlcNAc 結合レクチンを単離して解析したところ、これが哺乳類の C1q 様の構造をしていることを見い出した。

〈方法〉

- 1) GlcNAc カラムと Mono Q を用いて、ヤツメウナギ血清より GlcNAc 結合レクチンを精製した。
- 2) ヤツメウナギ GlcNAc 結合レクチンの部分アミノ酸配列をもとに作製したプライマーと肝臓 cDNA を鋳型として PCR を行い、全一次構造を決定した。
- 3) BIAcore を用いて、Mannose-BSA, Glucose-BSA, Galactose-BSA, GlcNAc-BSA, GalNAc-BSA へのヤツメウナギ GlcNAc 結合レクチンの結合性を検討した。

〈結果〉

- 1) ヤツメウナギ GlcNAc 結合レクチンは 26kDa

のサブユニットから成るオリゴマー。

- 2) ヤツメウナギ GlcNAc 結合レクチンは BIAcore の解析で検討した neoglycoprotein の内、GlcNAc-BSA にのみ結合性を示した。
- 3) ヤツメウナギ GlcNAc 結合レクチンはシグナルペプチドを含め 239 アミノ酸から成り、N 末側には 28 個の Gly-X-Y の繰り返しのコラーゲン様構造があり、全体として哺乳類の C1q 様の構造をとる。哺乳類の C1q の C 末側の特徴的な構造 (C1q ドメイン) は多くの蛋白にあることが報告されている²⁾。これらの C1q ドメインの系統樹を描かせると、ヤツメウナギ GlcNAc 結合レクチンは哺乳類の C1q のグループに含まれることがわかった。

〈考察〉

抗体の出現前、ヤツメウナギにおいて既に C1q 様の蛋白が存在する。この C1q 様蛋白は GlcNAc 結合レクチンとして自然免疫に働いていると推定される。

〈文献〉

- 1) Fujita T Nature Rev. Immunol. 2: 346: (2002)
- 2) Kishore U. et al. Immunopharmacol 49: 159 (2000)

コイB因子/C2アイソタイプ遺伝子の 連鎖解析および機能的多様性

中尾実樹、中原マキ子、原田あゆみ、無津呂淳一、加藤陽子、矢野友紀
九州大学大学院・農学研究院・水族生化学研究室

Genetic linkage analysis and functional divergence of factor B/C2 isotypes of the common carp (*Cyprinus carpio*)

Miki Nakao, Makiko Nakahara, Ayumi Harada, Junichi Mutsuro, Yoko Kato and Tomoki Yano

Laboratory of Marine Biochemistry,

Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

〈はじめに〉

補体B因子/C2は、それぞれ第2経路および古典経路のC3転換酵素を形成するセリンプロテアーゼであり、共通の祖先から分岐したと考えられるが、その分岐の時期は明らかではない。硬骨魚類では、ニジマス¹⁾、ゼブラフィッシュ²⁾、メダカ³⁾、およびコイ⁴⁾からB/C2様のcDNAが単離されているが、それらは哺乳類のBとC2に同程度の類似性を示す。また、ゼブラフィッシュ、ニジマスおよびコイではB/C2遺伝子が複数存在する。我々はコイから4種のB/C2アイソタイプ(B/C2-A1, B/C2-A2, B/C2-A3およびB/C2-B)をクローニングしている^{4,5)}。本研究では、これらコイB/C2アイソタイプの多様性の生物学的意味を推定するために、それらの遺伝子重複機構や機能的な差異について解析した。

〈方 法〉

1. 連鎖解析

11対のコイ雌雄から得た受精卵を実験室内で孵化させ、体長約3 cmの稚魚まで飼育した後、実験に用いた。親魚のゲノムDNAから各B/C2アイソタイプ遺伝子の第7および第17イントロンをPCR増幅し、それらの多型性をPAGEあるいはダイレクトシーケンスによって解析した。

2. 組換えB/C2アイソタイプの発現と精製

B/C2-A1, B/C2-A3およびB/C2-Bをコードするプラスミドから、それぞれのオープンリーディングフレームをPCR増幅した。その際、6×Hisをコードする配列を付加した3'プライマーを用いた。

増幅産物を一旦pGEM-Tベクターにサブクローニングして塩基配列を確認後、インサートをpVL1392ベクターに移し、BaculoGoldウイルスDNAと共に、Sf9細胞に導入した。ブランクアッセイによって純化した組換えウイルスを2回増幅後、Sf9細胞に感染させ、SF900-II無血清培地中で27℃で72時間培養した。培養上清を回収し、NTA-アガロースカラムを用いたキレートアフィニティークロマトグラフィーによって各組換えタンパク質を精製した。

3. コイC3アイソフォームの精製

既報⁶⁾の方法に従い、コイ血清からC3-H1（触媒性His残基をもつC3）とC3-S（触媒性HisがSerに置換されたC3）を精製した。

4. C3転換酵素形成試験

rB/C2-A1, rB/C2-A3およびrB/C2-Bを、コイ血清から単離したC3-H1およびC3-Sアイソタイプと混合し、コイD因子およびMg²⁺の存在下または非存在下で25℃、30minインキュベート後、SDS-PAGEおよび抗His-tag抗体を用いたウェスタンブロットングで分析し、C3とB/C2-Bの断片化の有無を解析した。

〈結 果〉

1. 連鎖解析

B/C2-A1, B/C2-A2およびB/C2-Bの第17イントロン、およびB/C2-A3の第7イントロンの多型性を利用して各遺伝子をタイピングした。2ペアのコイ親魚と各ペアから得られた48尾の稚魚の

タイピング結果から、B/C2-A1とB/C2-A3遺伝子間に連鎖が認められた。

2. B/C2-A1およびB/C2-A3とC3アイソフォームによるC3転換酵素形成

rB/C2-A1は、C3-H1またはC3-Sのいずれと組み合わせた場合も、D因子と Mg^{2+} 依存性にC3bおよびBb断片が出現した。一方、rB/C2-A3とC3-H1を組み合わせた場合、D因子と Mg^{2+} 依存性にC3bとBb断片を生じたが、rB/C2-A3とC3-Sを組み合わせた場合には、D因子が存在しなくてもC3-SがC3bに断片化した。この時、B/C2-A3はBbには断片化しなかった。したがって、B/C2-A3はC3-Sと結合すると、D因子によって限定分解されなくても、C3-Sを分解するセリンプロテアーゼ活性を発現すると考えられる。

rB/C2-Bは、D因子と Mg^{2+} の存在下にいずれのC3アイソフォームと組み合わせてもC3転換酵素を形成しなかったし、D因子による限定水解を受けなかった。

〈考 察〉

連鎖解析の結果と分子系統樹から、B/C2-A1とB/C2-A3は、コイとゼブラフィッシュが種分化する前に、直列的な遺伝子重複によって生じたと考えられる。その後、コイの4倍体化によって

B/C2-A1とB/C2-A2が生じたと考えられる。一方、その4倍体化によってB/C2-A3遺伝子も倍加したはずであるが、現在のコイのB/C2-A3遺伝子はシングルコピーであるので、倍加した片方は消失したか偽遺伝子化したと推定される (Fig. 1)。

rB/C2-A3がC3-SとD因子非依存的にC3転換酵素を形成した現象は、近年報告されたマウスB因子とコブラ毒因子(CVF)との反応に類似している⁷⁾。このようなD因子非依存的な第2経路活性化機構がコイの生体内で果たす役割は不明であるが、B/C2-A3のmRNAが急性期応答因子様の発現パターンを示す⁵⁾ことから、感染時に第2経路の活性化を亢進させる防御反応の一つであるかもしれない。

〈文 献〉

- 1) Sunyer, J.O. et al., J. Immunol., 161: 4106 (1998).
- 2) Seeger, A. et al., Mol. Immunol., 33: 511 (1996).
- 3) Kurada, N. et al., Immunogenetics, 44: 459 (1996).
- 4) Nakao, M. et al., J. Immunol., 161: 4811 (1998).
- 5) Nakao, M. et al., Dev. Comp. Immunol., 26: 533 (2002).
- 6) Nakao, M. et al., Eur. J. Immunol., 30: 858 (2000).
- 7) Xu, Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 14577 (2001).

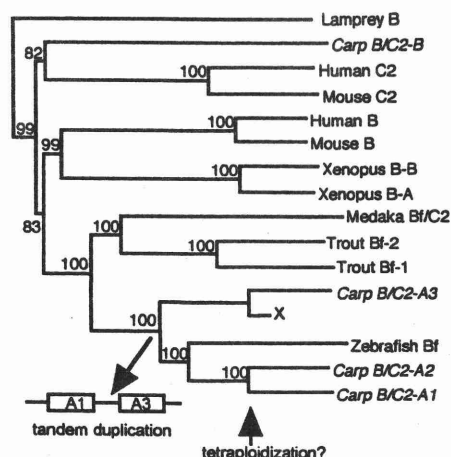


Fig. 1. 推定されたコイB/C2アイソタイプ遺伝子の重複機構。数字は近隣結合法による分子系統樹のブートストラップパーセントを示す。

MASP1/3遺伝子の起源と分子進化

遠藤雄一¹、野澤亜紀子¹、柿沼雄二¹、高橋 実¹、松下 操¹、野中 勝²、藤田禎三¹
¹福島県立医大・医・二生化、²東京大学大学院・理・生物科学

Ancient origin of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)1/3 gene

Y. Endo¹, A. Nozawa¹, Y. Kakinuma¹, M. Takahashi¹, M. Matsushita¹, M. Nonaka² and T. Fujita¹

¹Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine,

²Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo

〈はじめに〉

ヒト補体レクチン経路では、MBL(マンノース結合レクチン)やフィコリンが認識分子として働き、これに結合しているセリンプロテアーゼMASPが補体系を活性化する。哺乳類や*Xenopus*にはMASP-1、MASP-2およびMASP-3の3種類のMASPが存在する¹⁻³⁾。ヒトや*Xenopus*のMASP1/3遺伝子は二つのプロテアーゼドメインコード領域をもっており、splicingの違いによってMASP-1とMASP-3を産生する^{2, 3)}。今回、我々はヤツメウナギおよびナメクジウオから4種類の新規MASPcDNAをクローニングした。

〈方法〉

1) 既に報告されているMASP/C1r/C1sのcDNA配列をもとにdegenerated primerを作成し、ヤツメウナギの肝臓cDNAおよびナメクジウオの脊索cDNAを鋳型としてPCRを行い、ヤツメウナギから2種類(laMASP-1およびlaMASP-like)、ナメクジウオから2種類(amMASP-1とamMASP-3)の新規cDNAをクローニングした。

2) amMASP1/3遺伝子についてはPCR法を用いて遺伝子構造を解析した。

〈結果〉

1) 2種類のヤツメウナギのcDNA配列のうちの1つ(laMASP-1)は哺乳類や*Xenopus*のMASP-1のホモログであった。この配列は以前報告したTCNタイプ¹⁾に属し、その特徴をよく保存していた。他の1つはAGYタイプで、以前報告したlaMASP¹⁾に近い配列と考えられた。

2) ナメクジウオの2つの配列は、H-chainをコードする配列が同一でL-chainをコードする配列が異なっていた。それぞれのプロテアーゼドメインは、活性中心セリンがともにAGCでコードされ、両者ともヒスチジンループをもっていた。PCR法による遺伝子構造の解析の結果、片方のプロテアーゼドメインは単一エクソンで他方は分断エクソンでコードされており、ヒトや*Xenopus*のMASP1/3遺伝子の構造に類似していた。また、下流に位置する分断エクソンでコードされるプロテアーゼドメインでは、そのイントロンの挿入位置がヒトMASP-1と4ヶ所相同であった。このことから、ナメクジウオの2つのcDNA配列は、ヒトや*Xenopus*のMASP-1およびMASP-3の相同配列と考えられた。

〈考察〉

今回、脊椎動物円口類のヤツメウナギでMASP-1の配列が得られ、また原索動物頭索類のナメクジウオでMASP-1とMASP-3相同配列が得られたことによって、原索動物尾索類のマボヤからヒトに至るMASP/C1r/C1sファミリーの分子進化がほぼ解明された。MASPはマボヤとナメクジウオの間の段階で、レトロポジションまたは部分的遺伝子重複によりMASP-1/3遺伝子が作られ、この時点でTCNとAGYタイプの2系統に分岐して進化してきたと考えられる。

〈文献〉

- 1) Endo Y. et al., J. Immunol., 161: 4924 (1998)
- 2) Dahl M R et al., Immunity, 15:127 (2001)
- 3) 柿沼雄二ら、本シンポジウム抄録集b15 (2002)

ニワトリの RCA 遺伝子座の解析

押海裕之¹ 信田京子¹ 加藤順² 大場慎也² 玉木雄一郎² 服部崇史²

山田のぞみ² 水野重樹² 山田和彦³ 松田洋一³ 井上徳光¹、松本美佐子¹、瀬谷司¹

¹大阪府立成人病センター研究所免疫学部門

²日本大学生物資源科学部農芸化学科酵素科学研究室

³北海道大学先端科学技術共同研究センター動物染色体研究室

Regulator of Complement Activation (RCA) locus of chicken

Hiroyuki Oshiumi¹, Kyoko Shida¹, Jun Kato², Shinya Ohba², Yuichiro Tamaki², Takashi Hattori², Nozomi Yamada², Shigeki Mizuno², Kazuhiko Yamada³, Yo-ichi Matsuda³, Norimitsu Inoue¹, Misako Matsumoto¹, Tsukasa Seya¹ (¹Osaka Medical Center for Cancer, Dept. Immunol., ²Nihon Univ., Coll. Bioresouse Sci. Dept. Agric. & Biol. Chem., ³Hokkaido Univ., Center for Advanced Sci. and Tech.)

<はじめに>

ヒトの補体制御因子(CR1, CR2, DAF, MCP, C4bp)は第一番染色体の 1q32 の約 1 Mbp の領域の RCA (regulator of complement activation)遺伝子座にクラスターを形成している¹⁾。補体制御因子は、Short Consensus Repeat (SCR)ドメインの繰り返しからなる共通した構造をもつため、一つの祖先型遺伝子の遺伝子重複により、クラスターが生じたと考えられている。そのため、クラスターの形成過程の解明は、補体の制御機構の進化の解明につながり、非常に興味深い。このクラスターは哺乳類では存在するが、その他の脊椎動物では報告がない。そこで、我々は、鳥類の RCA 遺伝子座を明らかにし、ヒトの RCA 遺伝子座と比較検討を試みた。

<方法>

エクソントラッピング: cremp 遺伝子を含む BAC (Bacterial Artificial Chromosome)に対し、pSPL3B 由来のエクソントラッピング用のベ

クターを用い、エクソントラッピングを行った。RACE 反応: ニワトリの DT40 細胞より、mRNA を回収し、Marathon kit (クロンテック)を用い 3'RACE と 5'RACE を行った。

<結果>

ニワトリ補体制御因子をコードする cremp 遺伝子はマイクロクロモソームの一つに遺伝子座がある。鳥類にクラスターが存在するかどうかを調べるため、我々が単離したニワトリの補体制御因子の cremp²⁾を含む約 150 kbp の BAC クローンを単離し、エクソントラッピング法で、BAC 上のエクソンを調べた。結果、興味深いことに、SCR ドメインをコードするエクソンを多数単離することができた。これらのエクソンを含む遺伝子が発現しているかどうかを RT-PCR で調べたところ、幾つかは、B 細胞由来の DT40 細胞株や、マクロファージ由来の HD11 細胞株で発現した。そこで、RACE 法により cDNA の全長の単離を試みたところ、2つの遺伝子の

ほぼ全長が単離でき、chCRL1, chCRL2 (chicken Complement Receptor Like protein) と名付けた。

chCRL1 は SCR ドメインを10個コードしていたが、膜貫通領域は持たず細胞外で可溶性の蛋白質で存在すると推測された。相同性検索の結果は、興味深いことに、N 末側の SCR ドメインはヒトの CR1 や DAF と似ていたが、C 末端側は CR2 と相同性が高かった。chCRL2 は、SCR ドメインを7個持ち、膜貫通領域が無かったが、GPI アンカー予測部位が存在することから、DAF のように、GPI アンカー型の細胞膜に結合した分子であると予測された。相同性検索の結果は、N 末端側は CR1 に似ているが、中央部分は DAF と相同性が高く、C 末端が CR2 と最も似ていた。今回単離したエクソンの中には、chCRL1 と chCRL2 のどちらにも含まれないものが存在したことから、これら以外にも補体制御因子が存在すると考えられる。

以上のことから、ニワトリ補体制御因子 cremp の近傍の約 150 kbp の領域に、cremp を含め、ヒト補体制御因子と相同性が高い chCRL1、chCRL2、未同定の遺伝子、の少なくとも4つが存在し、ヒトと同様に、クラスターを形成していることがわかった。

<考察>

クラスターがニワトリにおいて存在したことから、祖先型遺伝子が遺伝子重複を起こし、複数の補体制御因子を獲得したのは、ヒトと鳥類分岐以前であると考えられる。また、今回単離されたニワトリの補体制御因子は、それぞれの領域がヒトの異なる補体制御因子と高い相同性を示した。Cremp も N 末側が、DAF

に似ているが、C 末側が MCP に似ており、ニワトリの系統か、ヒトの系統、あるいはその両方で、クラスター内の遺伝子間での組み換えによる遺伝子混成が複数回起きたと推測される。哺乳類においても、マウスの Cr1 は、ヒト CR1 と CR2 が混成を起こしたと考えられる遺伝子であることから³⁾、補体制御因子は進化の過程で、クラスター内での遺伝子混成を繰り返している可能性が考えられる。

<総括>

RCA 遺伝子座のクラスターは哺乳類以外にも存在し、ヒトと鳥類分岐以前に既に存在していたことが明らかとなった。

<参考文献>

- 1) Carroll, M.C., et al., J. Exp. Med. 167 : 1271 (1988)
- 2) Inoue N. et al., J. Immunol., 166 : 424 (2001)
- 3) Kurtz C.B., et al., J. Immunol. 144 : 3581 (1990)

マウス C4b-binding protein の精巣上体における発現様式

野中真弓¹、菱川善隆²、森山信男³、小路武彦²、野中 勝¹

¹東大・院理・生物、³同・医・血液浄化、²長崎大・医・解剖

Expression of the murine complement C4b-binding protein gene in epididymis

Mayumi Nonaka¹, Yoshitaka Hishikawa², Nobuo Moriyama³, Takehiko Koji², Masaru Nonaka¹

¹Department of Biological Sciences and ³Department of Hemodialysis & Apheresis, University of Tokyo,

²Department of Histology & Cell Biology, Nagasaki University School of Medicine

＜はじめに＞演者らはこれまで、体液性補体制御因子の一つである C4b-binding protein (C4BP) の α 鎖 mRNA が、モルモットおよびマウスの精巣上体においてアンドロジェン依存的に強く発現していること、モルモットにおける肝臓および精巣上体 C4BP α の発現には、同一遺伝子上に存在する複数のプロモーターが組織特異的に用いられていることなどを明らかにしてきた¹⁾。今回、マウスを用いて C4BP の精巣上体における発現様式の解析を行ったので報告する。

＜方法＞

1. RT-PCR, 5'RACE, および 3'RACE により、マウス精巣上体 C4BP α の cDNA を単離し、塩基配列を決定した。
2. ゲノムライブラリーからのクローンの単離およびゲノミックサザンなどにより、マウス C4BP α 遺伝子の解析を行った。また RNA protection assay により転写開始点を決定した。
3. ウサギ抗マウス C4BP 抗血清²⁾ を用いた免疫組織染色により、マウス精巣上体における C4BP の発現の様子を調べた。また同抗血清を用いて精巣上体抽出液のウエスタンブロッティングを行い、精巣上体 C4BP α の分子量を決定した。

4. ヒト精巣上体における C4BP の発現の有無を、ノザンブロッティングおよび市販のヒツジ抗ヒト C4BP 抗体を用いた免疫組織染色により検討した。

＜結果＞マウス肝臓 C4BP α と精巣上体 C4BP α の mRNA は、ノザンブロッティングにおいてそのサイズががわずかに異なっていたため、精巣上体 C4BP α の cDNA を単離し、解析を行ったところ、タンパクをコードしている領域および 3'UT 領域は肝臓 C4BP α cDNA と同一であったが、5'UT 領域の長さが異なっていた。ゲノム解析の結果、マウス C4BP α 遺伝子は 1 コピーであり、肝臓および精巣上体の各々に特異的な複数の転写開始点を有することが明らかになった。

マウス C4BP の精巣上体における発現はタンパクレベルでも確認された。精巣上体抽出液を用いたウエスタンブロッティングでは、非還元・SDS 存在下で約 70kDa のバンドが検出され、血漿 C4BP α とほぼ同一の分子量を示した。さらに、免疫組織染色により発現部位を検討したところ、精巣上体管の頭部近位では C4BP の発現は全く見られず、頭部遠位から体部にかけての上皮細胞内のゴルジ装置および先端部分の不動毛 (stereocilia)、および同

領域の管腔内液に強い局在が認められた。また、管腔内に存在する精子表面にも染色が認められた。

一方、ヒト精巣上体においては、C4BP α mRNA の発現は見られず、免疫組織染色においても血管内腔以外ほとんど染色されないことから、C4BP の特異的な産生・分泌は行われていないと考えられ、精巣上体における C4BP の発現は種により異なることが明らかになった。

＜考察＞精巣上体は雄性生殖器官の一つであり、精巣を出た精子は、精巣輸出管を経てこの管内に入り、頭部から体部へとゆっくり移行する間に様々な形態学的・生化学的变化をとげ、運動能や受精能を有する成熟精子となり、その尾部に貯えられる。マウス C4BP はこのような生殖器官の、主に頭部遠位から体部にかけての上皮細胞で作られ、管腔内に分泌されていることが明らかになった。

現在知られている C4BP の機能は、言うまでもなく補体活性化の抑制にあるが、元来、精巣上体管内には血清成分は存在せず、一般には補体の活性化は起こらないため、C4BP がこの器官において補体制御を行っている可能性は極めて低い。また雌性生殖器官内においては、血清および卵胞液由来の C4BP が常に存在すると考えられるため、精巣上体において C4BP を精子表面に付着させる必要性はないと思われる。従って、精巣上体 C4BP は補体系よりも生殖系で機能している可能性が高い。

一方、精巣上体では、各部分でそれぞれ異なる、種々の糖タンパクが分泌されており、それらが精子の成熟に重要な役割を果たしているものと考えられていることから、マウス精巣上体 C4BP もこのような精巣上体タンパクの一つとして、精子成熟に関与しているものと推測される。

近年、いろいろな動物種より種々の補体制御因子がクローニングされ、種間ホモロジーが非常に低いこと、種により異なるアイソフォームを有すること、種によりその組織分布が異なることなど、種間の相違が大きいことが明らかになってきているが、今回、C4BP の解析により、機能的にも多様化していることが示唆された。補体制御因子と生殖系との関連性については、MCP に関して、マウス、ラット、モルモットなどではその発現が精子に限られているほか、ヒトでも卵—精子認識反応に関与している可能性が示されている。さらに、DAF もマウスでは精子が主要な発現部位となっている。また最近、C4BP に構造的に類似したタンパクである sp56/AM67 がマウスおよびモルモットの精子先体内に存在することが報告されている。これらのことから、SCR タンパクが生殖系と密接に関わりながら多様化してきた可能性も考えられる。

＜文献＞

- 1) Nonaka, M.I., Wang, G., Mori, T., Okada, H., and Nonaka, M. (2001) Novel androgen-dependent promoters direct expression of the C4b-binding protein α -chain gene in epididymis. *J. Immunol.* 166, 4570-4577
- 2) Ogata, R.T., Mathias, P., Bradt, B.M., and Cooper, N.R. (1993) Murine C4b-binding protein. Mapping of the ligand binding site and the N-terminus of the pre-protein. *J. Immunol.* 150, 2273-2280

補体レクチン経路における MASP-1 および MASP-3 の役割

高橋 実、松下 操、遠藤雄一、藤田禎三

(福島県立医科大学・医学部・生化学第二)

Role of MASP-1 and/or MASP-3 in activation of the lectin pathway

【はじめに】

我々は本シンポジウムで報告したように Masp-1 を欠損したマウス (*Masp1*KO) を作出した。*Masp1*^{-/-} は同腹の正常マウス *Masp1*^{+/-}、*Masp1*^{+/+} に比べて有意に小さく、成長に影響している可能性も考えられた。さらに特定のインフルエンザウイルスによる感染によって死にやすいことも報告した。MASP には MASP-1、MASP-2 および MASP-3 が知られ、さらに MASP-2 の N 末端の二つのドメイン(CUB1 と EGF 様)のみからなる sMAP もその複合体に含まれることがわかっている¹⁾。MASP は補体古典経路の C1 中の C1r/C1s に構造が似ているが、その活性化機構に関しては C1r/C1s に比べてほとんど明らかになっていない。ヒトにおいては MASP-2 が C4、C2 を活性化すること²⁾、MASP-1 に関しては直接 C3 を活性化すること³⁾が報告されている。MASP-3 は MASP-1 と共通の H 鎖をもつが、セリンプロテアーゼドメインは MASP-1 とは異なり、その基質に関しては未知である。*Masp1*^{-/-}において *Masp-1* と共に *Masp-3* も欠損していることを確認した。このマウスの血清を用いた解析から、レクチン経路の活性化メカニズムに考察を加えたので報告する。

【方法】

1) マウス血清を用いた MBL-MASP 複合体による C4 の活性化。一昼夜、マンナンでコートした ELISA プレートを用意し、BSA でブロック後、マウス血

清を TBS 緩衝液(Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 5mM CaCl₂)で 300 倍に希釈したもの 100 μ l を室温で 0-45 分反応させた。TBS 緩衝液で洗浄後、ヒト精製 C4 を氷中にて 30 分間反応させた。プレート上に沈着した C4 は HRP 標識抗ヒト C4 と TMB 試薬で発色させ、OD450 で検出した。

2) マウス Masp-2 の活性化に関する検討。マウス血清 20 μ l を TBS 緩衝液で 0.5 ml にした溶液をマンナンアガロース(25 μ l)と室温で反応させた。ビーズを TBS で洗浄後、1 X SDS-PAGE サンプルバッファ(含 2ME)で溶出し、SDS-PAGE で展開後、PVDF 膜に転写した。Masp-2 の H 鎖に対するポリクローナル抗体で Masp-2 および smap のバンドを検出した。

3) マウス Mbl-a および Mbl-c の血清中における濃度の検討。一昼夜、マンナンでコートした ELISA プレートを用意し、BSA でブロック後、マウス血清を TBS 緩衝液で適宜に希釈したもの 100 μ l を室温で 10 分反応させた。マンナンプレート上の Mbl-a および Mbl-c はそれぞれラットモノクローナル抗体 (8G6, 17E2, 共に Steffen Thiel 博士(デンマーク)より供与) で 1) 同様、発色検出を行った。

【結果】

1) マウス血清を用いた Mbl-Masp 複合体による C4 の活性化。*Masp1*^{3/+}および *Masp1*^{3/-}各々、5 匹

のマウスを用いた解析から、20 分までの早い時期までは *Masp1/3^{-/-}* は *Masp1/3^{+/+}* に比べて有意に C4 の沈着が低いことがわかった。しかし、反応時間が 30 分を超えると *Masp1/3^{-/-}* も *Masp1/3^{+/+}* と同程度に C4 が沈着していることが示された。(図参照)

2) マウス *Masp-2* の活性化に関する検討。ウェスタンブロットでマンナンアガロースに結合した Mbl-Masp 複合体に含まれる *Masp-2* を調べたところ、*Masp1/3^{+/+}* では 10 分の反応時間で活性型 *Masp-2* が認められたが、*Masp1/3^{-/-}* では活性型 *Masp-2* は全く存在せず、未活性型のままだった。しかし、30 分以上反応を行うと *Masp1/3^{-/-}* でも *Masp1/3^{+/+}* と同程度に活性型 *Masp-2* のバンドが確認された。

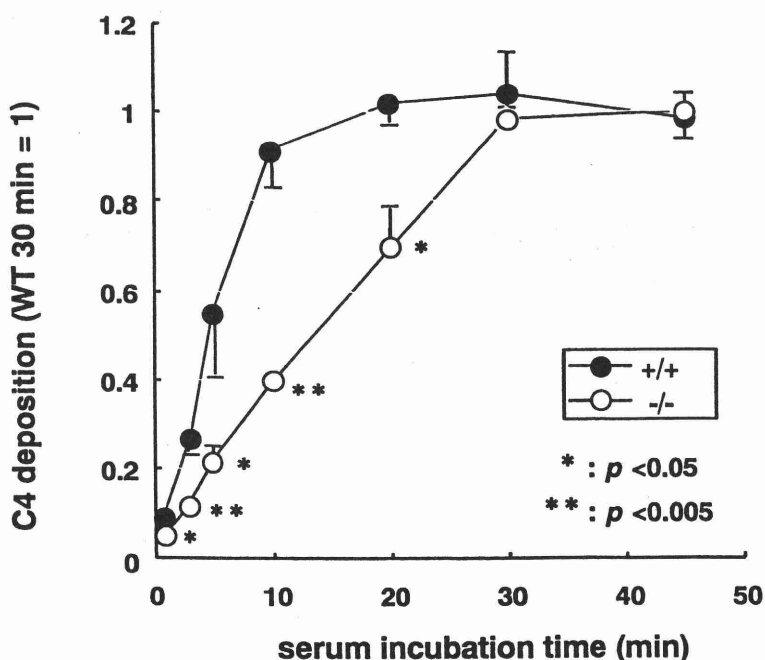
3) マウス Mbl-a および Mbl-c の血清中における濃度の検討。マンナンアガロースに結合した Mbl-a および Mbl-c をそれぞれを特異的に認識するモノクローナル抗体で検出したところ、*Masp1/3^{-/-}* において Mbl-a、Mbl-c 共に *Masp1/3^{+/+}* に比べて低値を示し

た。特に Mbl-a に関しては正常マウスの平均値の 20-60% の値であった。さらに *Masp1/3^{+/+}* でも 5 匹中 3 匹のマウスで *Masp1/3^{-/-}* と同様に低値を示した。

【考察】

今回の実験において、*Masp-1* と *Masp-3* を欠損したマウス血清では早期のレクチン経路による C4 活性化能が低いことが示された。この結果は Mbl-Masp 複合体中の *Masp-2* の活性化に強く相関しており、*Masp-1* あるいは *Masp-3* が *Masp-2* の活性化に影響することを強く示唆した。同時に 30 分以上反応を行うと *Masp-2* が自己活性化し、補体を活性化する可能性が考えられた。また *Masp1/3^{-/-}* では Mbl-a、Mbl-c 濃度も低いことが示された。このことは *Masp-1* または *Masp-3* が血清中で Mbl の安定化にも関与していると推定された。

- 1) Takahashi M. et al., Int. Immunol., 11: 859 (1999)
- 2) Thiel S. et al., Nature, 386: 506 (1997)
- 3) Matsushita M. et al., Immunobiol., 194: 443 (1995)



SOLUBLE PEPTIDOGLYCAN CAN ACTIVATE THE LECTIN COMPLEMENT PATHWAY

Ma Young Girl¹, Zhaong Rong¹, Ji-Won Park¹, Misao Matsushita², Teizo Fujita² and Bok Luel Lee¹

¹College of Pharmacy, Pusan National University, Busan, 609-735, Korea

²Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima, Japan

Because peptidoglycan (PGN) is an essential cell wall component of all bacteria, it is an excellent target for recognition by the human innate immune system. Also, it is known that PGN can activate monocytes, macrophages and B lymphocytes in mammals. PGN is linear glycan chains interlinked with short peptide bridge. The glycan chains are composed of alternating units of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc). However, the biological functions of PGN recognition proteins in human serum were poorly understood except CD14 and PGN recognition proteins. The relationship between complement components and PGN was also not determined at the molecular level.

To characterize PGN-recognition proteins in human serum, we purified PGN recognition proteins by using soluble PGN-attached Sepharose column.

When we eluted the absorbed proteins of PGN-column with 0.3 M-mannose and 0.3 M-GlcNAc, mannose binding lectin (MBL) and L-ficolin/P35 were obtained, respectively. Western blotting analysis showed that the purified MBL and L-ficolin/P35 were associated with MBL-associated serine protease (MASP)-1 and -2.

MBL-MASP and L-ficolin/P35 complex were deposited on the soluble PGN-coated microplate. C4 activation by MBL-MASP and L-ficolin/P35-MASP bound to soluble PGN was observed. When we compared the C4 activation ability by MBL-MASP and L-ficolin/P35-MASP bound to soluble PGN, MBL-MASP complex more effectively activated C4 than L-ficolin/P35-MASP complex. These results suggest that MBL and L-ficolin/P35 recognize soluble PGN and then activate the lectin complement pathway.

PNHクローンの拡大に関わる遺伝子変異および そのモデルマウス作成への試み

泉井朋久¹⁾、桑山真輝^{1,2)}、村上良子¹⁾、西村純一^{1,2)}、待井隆志²⁾、金倉 譲²⁾、木下タロウ¹⁾、井上徳光³⁾

¹⁾大阪大学微生物病研究所免疫不全、²⁾大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科

³⁾大阪府立成人病センター研究所免疫学部門

Production of transgenic mice which carry a candidate gene responsible for clonal expansion of PNH cells

Tomohisa Izui¹⁾, Maki Kuwayama^{1,2)}, Yoshiko Murakami¹⁾, Jun-ichi Nishimura^{1,2)},
Takashi Machii²⁾, Yuzuru Kanakura²⁾, Taroh Kinoshita¹⁾, and Norimitsu Inoue³⁾.

¹⁾Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

²⁾Department of Hematology and Oncology, Osaka University Medical School

³⁾Department of Molecular Genetics Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Disease

【背景と目的】

発作性夜間血色素尿症(PNH)は補体制御因子であるDAFやCD59の欠損のため、自己補体による溶血発作を起こす後天性疾患である。これらの補体制御因子はグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)と呼ばれる糖脂質を介して細胞膜に発現している。PNH患者の血球細胞においてはGPIアンカー型蛋白が全般に欠損しており、GPIの生合成に関わる遺伝子であるPIG-Aが原因遺伝子として同定されている。PNH患者ではPIG-Aの突然変異およびそれによるGPIアンカー型蛋白の欠損を示す血球細胞が全系統とも骨髓・末梢血中でクローン性に優位となることが知られている。

しかしながら当研究室および他の研究グループによるマウスホモログPig-aノックアウトマウスの

解析では異常造血幹細胞のクローン性優位は導かれなかったことから、PIG-A以外の第2の異常がGPIアンカー型蛋白欠損細胞(PNH細胞)のクローナルな拡大に関与していると考えられている^{1,2)}。

PNHクローンの拡大については、PNH細胞が自己免疫システムの攻撃から逃れうることによるとする選択説と、PNH細胞そのものが正常細胞をしのぐ増殖能力を獲得するとする良性腫瘍説の2つの仮説が提唱されている。

当研究室で数年にわたって経過を追っているPNH患者ではPIG-Aの変異に加えて12番染色体の異常をもつ血球細胞が優位となっている³⁾。興味深いことに、骨髓においてPIG-Aの変異を持つ細胞と、上記の染色体異常を持つ細胞は例外なく一致している。PIG-Aの変異と染色体異常が同一の造血幹細胞

に起こっていることは、前述の良性腫瘍説を支持するものである。PNHクローンの拡大に染色体異常をきたしている部位に存在する遺伝子の関与が示唆されることから、その遺伝子の同定を目標とした。

【方法と結果】

1.染色体異常の解析 昨年度の本シンポジウムで、本症例の染色体異常が単純な相互転座ではなく、一方の12番染色体のq13-q15領域が欠失(deletion)し、この9.3Mbps程度が他方の12番染色体のq15領域に挿入(insertion)されていることを報告した。本年度は、挿入された染色体断片を解析したところ、さらなる異常が認められたのでこれを報告する。12番染色体のq15領域にある挿入部位のテロメア側において15Kbpsの欠失があり、加えてそこにq13領域の2.7Kbpsが逆位(inversion)で挿入されていることが判明した。

2.HMGA2遺伝子によるPNHモデルマウス作成の試み 挿入が起こっている部位には既知の遺伝子HMGA2(high-mobility group protein A2)が存在し、挿入によって遺伝子が3'-UTRで分断されていた。HMGA2はAT-hookと呼ばれるDNA binding domainをもつ転写因子であり、ヒトの脂肪腫や子宮筋腫などの良性腫瘍細胞において高レベルで発現もしくは染色体転座によって組換えが起こったキメラ蛋白として発現していることが知られている^{4,5,6}。前述のハイブリドーマにおいて良性腫瘍の症例と同

様に、HMGA2の異常なmRNAを検出した。我々は、HMGA2遺伝子の異常がPNH細胞のクローナルな拡大に関与している可能性があると考え、これを証明するためにHMGA2トランスジェニック・マウスを作成した。このマウスは、良性腫瘍症例および本研究で検出された異常なmRNAに共通する構造、すなわち5つのエクソンのうちC末端側のエクソン1-3のみを発現している。現在、このマウスの造血幹細胞を用いて、HMGA2を発現する幹細胞が野生型のそれに比べて優勢に拡大するか否かについてin vivo、in vitroで解析を進めている。

【参考文献】

- 1.Murakami Y. et al., Blood, 94:2963(1999)
- 2.Tremml G. et al., Blood, 94:2945(1999)
- 3.Nishimura J. et al.,
Am J Hematol., 62:175(1999)
4. Schoenmakers EF. et al.,
Nat Genet., 10:436(1995)
- 5.Ashar H. R. et al., Cell, 82:57(1995)
- 6.Goodwin G.,
Int J Biochem Cell Biol. ;30:761(1998)

ヒト C5aR に対するペプチド抗体の作成

土肥名月 金子葉子¹ 岡田則子 岡田秀親

名古屋市立大学大学院医学研究科・生体防御学

¹ 藤田保健衛生大学医学部・第一生理学

Anti-human C5aR peptide antibodies

Natsuki Dohi, Yoko Kaneko¹, Noriko Okada, and Hidechika Okada

Department of Biodefense, Nagoya City University Graduated School of Medical Science

¹ Department of Physiology, Fujita Health University School of Medicine

[はじめに]

補体第5成分フラグメント C5a は強力なアナフィラトキシン活性を持ち、毛細血管の透過性亢進、肥満細胞や好塩基球からのヒスタミンやセロトニンなどのケミカルメディエーターの放出、好中球・マクロファージ・血管内皮細胞の活性化などにより炎症反応を誘導する。

C5a の受容体 C5aR (CD88) は G 蛋白結合 7 回膜貫通型のレセプターで 1991 年に Gerard N.P. らと Boulay F. らによりクローニングされ cDNA 配列が報告されている。^{1,2)} 我々はこの配列をもとに C5aR の結合部位である N 末端領域と、中心領域、C 末端領域にあたる 3 種の MAP ペプチドを合成し、これらを免疫源としてヒト C5aR の各領域特異的モノクローナル抗体の作成を試みた。得られたモノクローナル抗体を用いてヒト C5aR を発現している細胞との反応性の検討を行った。

[方法]

報告されているアミノ酸配列より C5aR (CD88) の 10-27, 101-116, 227-243 部分のペプチドを MAP レジンをを用いて合成し HPLC で精製した。合成ペプチドの配列は Protein Sequencer にて確認した。

モノクローナル抗体の作成は常法に従い、

BALB/c マウスに合成した各ペプチドを免疫し、P3X63Ag.8.653 と Fusion し抗体産生ハイブリドーマを得た。

[結果と考察]

3 種類のペプチドそれぞれに対して得られたモノクローナル抗体はいずれもアイソタイプ κ , μ の IgM 抗体であった。

この抗体を用いてヒト単球系細胞株 U937, ヒト神経芽腫細胞株 TGW, C5aR トランスフェクタント等を用いてフローサイトメトリー法により細胞表面の C5aR 発現の検討を行ったが、いずれの抗体を用いても弱い反応性しか示さなかった。これに対し細胞をパラフォルムアルデヒドで固定後染色し、細胞内タンパク質を検出するといずれの抗体でも強い反応性を示した。C5aR (CD88) は通常より細胞内に蛋白分子として存在し炎症時に迅速に膜提示されるとにより、急性期反応として細胞内にシグナルを伝達する機構をもっているのではないかと推測される。

[引用文献]

- 1) Gerard N.P. et al., Nature, 349:614(1991)
- 2) Boulay F. et al., Biochemistry, 30:2993(1991)

S19 リボソーム蛋白 2 量体分子上の C5a レセプターに 対するアゴニスト・アンタゴニスト変換部位の同定

山本哲郎、アージュン・シュレスト、渋谷陽子、塩川 徳、西野憲和

熊本大学医学研究科、同医学部、九州工業大学工学部

Identification of moiety of S19 ribosomal protein dimer
converting from agonist to antagonist for C5a receptor

Tetsuro Yamamoto, Arjun Shrestha, Yoko Shibuya, Megumi Shiokawa and Norikazu Nishino
Graduate School of Medical Sciences and School of Medicine, Kumamoto University,
and Kyushu Institute of Technology

<はじめに>

S19 リボソーム蛋白(RP S19)は、リボソーム小サブユニットの構成成分で 145 アミノ酸残基からなるが、アポトーシスの過程でトランスグルタミナーゼにより二量体化されて細胞外に遊離され、単球/マクロファージを走化させて、アポトーシス細胞の食食処理を促進する¹⁾。この際、RP S19 二量体は単球の C5a レセプターにアゴニストとして結合する。この結合は、C5a の結合の場合と同様に、2 段階の過程を踏むが、RP S19 二量体分子上のそれぞれの結合部位が、-Lys41-His42-Lys43-および-Leu131-Asp132-Arg133-であることをすでに報告した²⁾。

ところが一方で、RP S19 二量体は、多核球の C5a レセプターにはアンタゴニストとして作用する³⁾。今回、このアゴニストをアンタゴニストへ変換する RP S19 二量体分子上の部位を同定した。

<方法>

野生型および変異型 RP S19 を大腸菌の発現系を用いて調製した。RP S19 の部分アナログペプチドおよび C5a とのキメラペプチドを固層法により

合成した。単球および多核球を健常人の末梢血から分離し、それぞれに対する走化活性を、チャンバー法を用いて測定した。

<結果>

- 1) C5a レセプターへの第 2 結合部位を含むカルボキシル (C) 末端 18 残基から成る RP S19 アナログペプチドは、単球の C5a レセプターにはアゴニストとして、逆に多核球のそれにはアンタゴニストとして作用した。一方、C5a の C 末端 10 残基から成るアナログペプチドは、単球および多核球にアゴニストとして作用した。
- 2) C5a ペプチドの C 末端に RP S19 の C 末端 12 残基を連結したところ、このキメラペプチドは、多核球の C5a レセプターに対してアンタゴニストに変貌した。
- 3) キメラペプチドの C 末端から順次アミノ酸残基を欠失させていくと、2 残基失った時にアンタゴニスト性も消失した。
- 4) C 末端 4 残基を欠失させた変異 RP S19 二量体は、単球のみならず、多核球にもアゴニス

トとして作用した。また、野生型の場合と異なり、この変異型二量体は、モルモット皮内注射において、単球および多核球の双方を浸潤させた。

<考察>

上記の結果から、RP S19 分子の C 末端 His を除く C 末端部 11 残基が、多核球の C5a リセプターに対する作用をアンタゴニストに変換していると結論できる。この部位が結合することにより負のシグナルが多核球内に伝達されることになるが、多核球側の結合分子の同定が今後の課題である。C5a リセプター自身は単一遺伝子の産物と考えられており、スプライスバリエーションの報告も無いので、多核球側の未知の結合分子は C5a リセプターの近傍に補助因子として存在し、シグナルを負に換えている可能性が高い。

<結論>

RP S19 二量体の作用を、多核球の C5a リセプターに対しアンタゴニスト作用に変換する部位が、RP S19 の C 末端部の 11 アミノ酸残基中にあることを明らかにした。

<文献>

- 1) Horino K. et al., Lab. Invest., 78:603 (1998)
- 2) Shibuya Y. et al., Am. J. Pathol., 159:2293 (2001)
- 3) Nishiura H. et al., Lab. Invest., 78:1615 (1998)

Complement C5a receptor mediated signalling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease

¹Farkas I., ²Fukuda A., ³Yamamoto N., ⁴Tateyama H., ¹Okada N., ¹Okada H.

¹Department of Molecular Biology, Nagoya City University School of Medicine, Nagoya, Japan

²Department of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan

³Department of Bioregulation Research, Nagoya City University School of Medicine, Nagoya, Japan

⁴Department of Pathology, Nagoya City University School of Medicine, Nagoya, Japan

In our earlier results we demonstrated that cells including TGW neuroblastoma cells and fibroblast cells expressing the complement C5a receptor (C5aR), are vulnerable and that abnormal activation of C5aR caused apoptosis of these cells. We also described that pyramidal cells of the human hippocampus and cortex and granular cells of the hippocampus expressed C5aR. In addition, while this staining was also positive for vascular dementia, it disappeared in the Alzheimer's disease (AD) brain. In this present study we report that administration of abnormal fragments of the C5a and C5aR resulted in elevation of the intracellular calcium content of TGW neuroblastoma cells. The calcium imaging experiments revealed that the responses were specific for the amino-acid sequences of these fragment peptides and mediated via a C5aR-associated pathway. The measurements showed that cells of a neuron-rich primary culture and pyramidal cells of the hippocampal slices of the rat brain also responded to such an activation with an increase in the intracellular calcium level, suggesting that calcium metabolism was affected in these cells. TUNEL-staining demonstrated that C5aR-mediated apoptosis could be induced both in cells of the primary culture and in the pyramidal neurons of cortical slices of the rat brain, as well. Since inflammation and consequent activation of the entire complement cascade including production of C5a are known phenomena in the AD brain, our present results provide further support that C5a and/or C5aR may be involved in neurodegeneration.

This research was conducted with the support of the fellowship program of the Japanese Society for the Promotion of Science (JSPS).

HIV-1 感染細胞に反応する IgM 抗体の補体活性化能とアミノ酸配列との関連性

朝井鈴佳 土肥名月 尹淑萍¹ 岡田則子 岡田秀親
名古屋市立大学大学院医学研究科・生体防御学

¹ Dept of Pathology, Wayne Stated University School of Medicine

Relevance of the complement activation to the amino acid sequences of the IgM Abs
against to HIV-1 infected cells

Suzuka Asai, Natsuki Dohi, Shuping Yin¹, Niriiko Okada, and Hidechika Okada
Department of Biodefense, Nagoya City University Graduated School of Medical Science

¹ Dept of Pathology, Wayne Stated University School of Medicine

[目的]

HIV 感染者において、血清中に IgM 抗体が存在すると AIDS 発症を長期にわたり防ぐことがわかっている¹⁾。これは IgM 抗体が感染細胞上の抗原に結合して、感染細胞に対し補体依存性の細胞傷害性を持つためと考えられる^{2) 3)}。

我々は HIV ⅢB 感染細胞で TC マウス(キリンビール社)を免疫し、ヒト IgM 抗体(9F11 抗体および 2G9 抗体)を産生する細胞株を樹立した。9F11 抗体は強い補体活性化能を持ち、HIV ⅢB 感染細胞に補体による細胞傷害を誘導した。一方 2G9 抗体は HIV ⅢB 感染細胞にアポトーシスを誘導するものの、補体活性化能はなかった。これまでに IgM 抗体においては μ -chain constant region(C region)の、特に C μ 3 ドメイン内におけるアミノ酸が補体活性化に関与するという報告がある^{4) 5) 6)}。そこで 9F11 抗体および 2G9 抗体の cDNA の塩基配列を調べ、補体活性化能の違いがアミノ酸配列の違いによるものかどうかを検討した。

[方法]

9F11 細胞および 2G9 細胞より mRNA を単離した。これをテンプレートとして dsDNA を作製し、IgM 抗体の全領域を PCR により増幅した。

μ -chain については全長が約 1.9kb であるため N 側(μ N)と C 側(μ C)とに分けた。N 側は μ -chain、 κ -chain いずれも variable region(V region)であり、この部位に相補的な配列のプライマーが作製できないので 5'RACE 法を用いた。 μ C はこれま

でに報告のあるヒト型 IgM 抗体の塩基配列をもとにプライマーを設計した。

PCR により増幅した cDNA はクローニングを行い、これを用いて sequence 解析を行った。

[結果]

μ N は 9F11 抗体について 4 つ、2G9 抗体について 7 つ、また μ C は 9F11 抗体について 4 つ、2G9 抗体について 5 つのクローンの cDNA 配列を決定し、その配列から推定されるアミノ酸配列を各クローン間で比較解析した。9F11 抗体および 2G9 抗体のどちらにも、クローン間でいくつかのアミノ酸の置換があった。しかしながら、いずれの置換も DNA 配列の 1 塩基変異によるものであり、またクローン間で同位置での置換はなかった。一方 κ -chain についても同様の結果が得られた。これらの結果より、9F11 抗体と 2G9 抗体の間には μ -chain および κ -chain の C region 全域において、補体活性化能の違いを引き起こすようなアミノ酸配列の相違はないことがわかった。

[考察]

これまでに、IgM 抗体については C μ 3 ドメインにおけるアミノ酸配列と補体活性化能との関連性が報告されている。しかしながら、9F11 抗体と 2G9 抗体のアミノ酸配列の比較解析からは、そのような関連性は認められなかった。したがって、これら 2 つの IgM 抗体の補体活性化能の違いは、IgM 抗体の五量体や六量体形成に関与する J-chain の

発現の違い、あるいは認識している HIVⅢB 感染細胞上の抗原の性状の違いに起因する可能性も考慮される。これらの可能性については目下検討中であり、近く解明できると期待している。

[引用文献]

- 1) Wu X. et al. Int.Immunol., 8: 153-8(1996).
- 2) Okada H. et al. Int.Immunol., 10: 91-5(1998).
- 3) Wu X. et al. J.Immunol., 162: 533-9(1999).
- 4) Putnam F. et al. Science, 182: 287-91(1973).
- 5) Wright F. et al. J.Biol.Chem., 263:11221-6 (1988).
- 6) Arya S. et al. J.Immunol., 152: 1206-12 (1994).

補体蛋白D因子の新しい溶血活性測定法

内堀恵美, 西垣雅子, 北野悦子, 村上能庸, 岩田博夫, 北村 肇
大阪府立看護大学医療技術短期大学部, 京都大学再生医科学研究所

A NOVEL ASSAY FOR FACTOR D ACTIVITY

Etsuko Kitano, Masako Nishigaki, Emi Kobayashi, Yoshinobu Murakami*, Hiroo Iwata* & Hajime Kitamura,
Department of Clinical Laboratory Science, Osaka Prefecture College of Health Sciences, *Institute for Frontier
Medical Sciences, Kyoto University

【 はじめに 】

補体蛋白D因子は、低分子量（24,000）、血清中低濃度（1～2 μ g/ml）を特徴とする第二経路の蛋白で血清中では活性型として存在していると考えられている。これまでのD因子活性測定法は、①EAC43Bb法、②BioRex-70によるD欠損血清（RD）法、③CVF-B法の3種があるが、いずれも、低感度、低再現性、試薬が入手困難、手技が煩雑、精製成分が必要、などの欠点を持ち、簡単に信頼に足る測定法の開発が必要となっている。今回、新しい方法で選択的にD因子を除去したRDを作成し、それを利用して新しいD因子活性測定法の開発を試みた。

【 材料及び方法 】

1. 材料

1) ビーズ：ポリスチレンビーズにスルホン酸基を有する高分子電解質 Poly（2-acrylamide 2-methylpropane sulfonate）、Poly（acrylic acid）、Poly（methacrylic acid）をそれぞれグラフトした PAMPS-beads⁷⁾、PA-beads、PM-beads の計3種を用いた。

2) 血清：ボランティア健康人14人より血清を採取し混合し、RD作成用血清とした。ボランティア健康人50人より血清を採取し混合後分注し、健康人ヒト血清（NHS）とした。また、精製D因子はシグマ社より購入した。

2. 方法

1) beads 処理血清の作成：血清に種々の濃度のビーズを加え30℃で30分反応させた後、3000 rpm、20分間遠心しbeadsを除いた上清を採取した。

2) 補体溶血活性測定：マイクロプレート法でCH50値はEAを、ACH50値はウサギ赤血球（Erab）を用い測定した。

【 結果 】

1. RDの作成

1) RD作成用のビーズの選択

3種のビーズを種々の濃度でヒト血清と反応させ、比較した。ビーズと反応後のヒト血清について、①CH50値が低下せず、②ACH50値が0 u/mlまで低下し、③精製D因子添加でACH50値が100%回復する、の3点を検討した結果、PM-beadsではACH50値の低下が不十分で、PS-beadsでは20 mg 加えてやっと低下し

た。PAMPS-beads は最も低濃度 ($1.25 \mu\text{g/ml}$ 以上) で効果があった。このことより D 欠損血清作成には PAMPS-beads を用いることとした。

2) ヒト血清とビーズとの反応条件

EDTA の有無や反応温度などについて検討したところ、 30°C で反応させると CH50 値がやや低下し、 4°C で反応させると ACH50 値の低下が不十分であった。EDTA を加えて血清中の補体成分の消費を抑えた状態にすると温度に関係なく CH50 値が低下せず、ACH50 値が 0 になったが、(-)コントロールの ACH50 値が低い値を示した。そこで測定時に Mg^{++} を加えると (-)コントロールの ACH50 値は元の値となり、各ビーズと反応させた血清では 0 のままだった。よってビーズとの反応条件は 10mM EDTA 存在下で 30°C 30 分間とした。EDTA 存在下で反応させるのが最も良かったので、以後、RD 作成のためのヒト血清は EDTA plasma とした。

3) 検体測定時の RD 濃度

PAMPS-beads 2.5 mg/ml plasma 及び PA-beads 20 mg/ml plasma で作成した 2 種の RD をそれぞれ 1.5 倍から 4 倍、及び 4 倍に希釈し、D 因子と NHS の測定に適する濃度を検討した。PA-beads は 4 倍では感度が低く、2 倍では凝集を起こして測定できなかった。PAMPS-beads では 1.5 倍希釈では (-)コントロールの値が高く、4 倍希釈以上では感度が落ちるので、2 倍希釈を用いることとした。

2. 新しい D 因子活性測定法

1) 原理

Erab に RD と D 因子を加えると、第二経路を介して溶血することを原理とする。

2) 手技

96well のマイクロプレートを用い、連続希釈した sample, Mg^{++} を添加した RD と Erab を $25 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C 、60 分反応後、buffer を加えて遠心し、上清の溶血度を測定した。

3) D 因子活性測定値の表現法

精製 D 因子を検体とし測定し、横軸に検体濃度、縦軸に溶血率をとってプロットすると、S 字状の曲線になり、補体価と同じように溶血率 (y) より算出した $y/1-y$ 値を横軸に、検体量を縦軸に log-log グラフにプロットすると直線に乗った。血清を検体としても同様の結果が得られた。以上より D 因子活性値を 50 % 溶血 CH50 単位 (u/ml) で表すことができた。

4) 新方法による D 活性測定結果

NHS を被検体として用いて D 因子活性を測定した結果、同時再現性は、測定値平均 = 160.86 CH50 u/ml , $\text{SD} = 17.43 \text{ u/ml}$, $\text{CV} = 10.83 \%$ ($n = 20$) であった。また、7 人の健常人の血清及び血漿を被検体とし D 因子活性を測定した。血清及び血漿中の D 因子活性値に有意差はなく、どちらでも測定可能であることがわかった。

【 考察と結論 】

今回用いた 3 種類のビーズのうち、RD 作成には PAMPS-beads が最も適しており、また PAMPS-beads で作成した RD を使って D 活性を簡単に測定できることが判明した。この方法により、D 因子活性はこれまで報告されたどの方法よりも簡単に測定できると考えられる。

異種移植応用に向けた可溶化補体レセプター(sCR1)の 機能解析及び結晶化

加藤 久宗^{1,2}, 石井 則行², 村上 能庸³, 瀬谷 司⁴, 王 碧昭⁵

¹筑波大・バイオシステム, ²産総研・生物情報, ³京都大・再生医科研

⁴大阪府立成人病センター・免疫, ⁵筑波大・応用生物

Analysis and crystallization of the immunosuppressive protein sCR1 for the application to xenograft

Hisamune Kato^{1,2}, Noriyuki Ishii², Yoshinobu Murakami³, Tsukasa Seya⁴, Pi-Chao Wang⁵

¹Master program of Biosystem, University of Tsukuba, ²National Inst. of Advanced Industrial Science and Technology,

³Inst. for Frontier Medical Science, Kyoto University, ⁴Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer Cardiovascular Diseases

⁵Inst. Appl. Biochem, University of Tsukuba

[目的]

最近臓器移植の新しい試みとして、動物の臓器が注目を集めている。しかしながら、異種間移植では、生体の免疫防御系である補体系 (Complement) による超急性拒絶反応が問題となる。最近、可溶化補体レセプター (sCR1=soluble Complement Receptor type1) が、補体系の活性化を抑制する物質の一つとして注目されている。しかしながら sCR1 の立体構造やその作用機序についての情報は未だ不十分である。本研究では sCR1 の三次元構造解析を目指し、大量試料精製法を開発した。更に sCR1 の活性の確認及び結晶化条件の検討を行った。

[方法]

1) 細胞培養及び精製法…sCR1 生産細胞として CHO 細胞 (DUXB11 株) を用い、生産プロセスを二段階に分けることで、精製に適した sCR1 含有培地を得た。精製は sCR1 含有培地を Heparin-Sepharose カラム、限外濾過膜による濃縮等を行い、最終的に HPLC ゲル濾過カラムによって

高純度な sCR1 を得た。また、一般に糖蛋白質の結晶化

は、難しいとされているため、生合成から糖鎖を含まない sCR1 (Aglyco-sCR1) が得られる細胞培養法を試行し、Tunicamycin 浸潤期を置くことにより、これを達成した。精製法は native な sCR1 と同様な方法で行った。

2) 精製物の検出および機能解析…得られた蛋白質は四種類の抗体を用いたウェスタンブロットティング法により確認した。また sCR1 の機能解析としては、1) co-factor 活性、2) CH50 及び ACH50 による測定を行った。

3) 結晶化方法…精製した sCR1 を単分散させるために、界面活性剤を共存させているので、シットティングドロップ蒸気拡散法を選択した。結晶化は、sCR1 (12mg/ml) と沈殿剤を 1:1 で混合し、23℃で平衡化させた。定期的に実体顕微鏡を使って、経過観察を行った。

[結果及び考察]

1) sCR1 及び Aglyco-sCR1 の精製…細胞培養を二段階に分け、迅速な二段階カラム精製法を採用した結果、高濃度・

高純度の sCR1 が得られた。一方 Aglyco-sCR1 に関しては、Tunicamycin 浸潤期 (添加濃度が $6-8 \mu\text{g/ml}$) をおくことで、糖鎖が除去された sCR1 を得ることができた。

2) 検出及び機能解析…ウェスタンにより sCR1 に対しては、四種類の抗体が特異的に結合することが確認されたが、Aglyco-sCR1 では一種類の抗体でのみ標識された。それゆえ、Aglyco-sCR1 では、Tunicamycin により糖鎖がほぼ完全に除去されたと推察される。HPLC ゲル濾過によって得られる sCR1 ではモノマーとして、また、Aglyco-sCR1 ではオリゴマーとして存在していることが、電子顕微鏡法による観察から示唆された。機能解析では、共に co-factor 活性は認められたものの、補体価の測定では両者間で有為な差が見られた。

3) 結晶化…スクリーニングにより、sCR1 の沈殿剤の種類、pH などに対する感受性の傾向がわかってきた。Aglyco-sCR1 については現在検討中である。引き続き、両者において結晶成長を促すような条件を検討する予定である。

ウイルス由来補体制御因子 HSV-gC1 の ブタ-ヒト異種移植への応用

松浪勝義^{1,2)}、宮川周士¹⁾、福田大輔^{1,3)}、白倉良太¹⁾

¹⁾大阪大学大学院医学系研究科・組織再生医学講座・臓器置換、

²⁾日本動物工芸研究所(AERI)、³⁾ニプロ株式会社

Herpes simplex virus glycoprotein C (HSV-gC1) regulates the
complement activation on swine endothelial cell.

Katsuyoshi Matsunami^{1,2)}, Shuji Miyagawa¹⁾, Daisuke Fukuta^{1,3)}, and Ryota Shirakura¹⁾

¹⁾Division of Organ Transplantation (E9), Department of Regenerative Medicine, Osaka
University Graduate School of Medicine, ²⁾Animal Engineering Research Institute (AERI),

³⁾Research & Development Laboratory, NIPRO corporation

<目的>

異種移植において補体反応は超急性拒絶反応および細胞性免疫による急性拒絶反応に大きく関与している。これまでに DAF などの補体制御因子を遺伝子導入した transgenic pig がいくつかのグループから報告されているが完全に補体反応を制御するまでには至っていない。この問題を解決する方法としては制御時期および作用機序の異なる複数の補体制御因子を発現させて相加あるいは相乗的に抑制することが重要である¹⁾。

ウイルスは宿主内に持続感染するためにさまざまな免疫防御戦略を獲得していることが知られている。とくに DNA ウイルスは長い年月にわたる進化の過程で免疫関連遺伝子を宿主細胞から獲得し、宿主の免疫反応により選択をうけた結果、宿主免疫系の回避に適した遺伝子配列を有するにいたっている。我々はウイルス由来の免疫抑制因子の利用は

ブタ-ヒト間の異種移植に新しいアプローチを提供できると考え、比較的よく解析されている Herpes simplex virus type I (HSV-I) 由来の糖蛋白 HSV-gC1 に着目し、ブタ細胞における補体抑制機能を検討した²⁾。

<方法>

HSV-I の genome DNA を鋳型にして PCR 法で HSV-gC1 遺伝子配列をクローニングした。遺伝子配列をシーケンサーにて確認した後、発現ベクター pCAGGS に構築し、エレクトロポレーション法およびリポフェクション法で chinese hamster ovary tumor(CHO) cell およびブタ血管内皮細胞 (SEC) に遺伝子導入した。G418 薬剤選択によって安定形質発現株をクローニングし、細胞表面での発現を FACS で解析した。得られたクローンについて補体抑制効果を LDH アッセイにより検討した。その際

補体および抗体の供給源として 6 人の健常人から調製したヒト血清を使用した。CHO cell についてはウサギ免疫血清を補体のアクチベーターとして添加した。また比較のために DAF の遺伝子導入株も同様に解析した。個々のヒト血清中に存在する抗 HSV-gC1 抗体の存在はウェスタンブロット法にて解析をおこなった。

<結果>

HSV-gC1 は、ウェスタンブロットおよび FACS 解析の結果、予想されたサイズで SEC および CHO cell の細胞表面上に発現することが示された。また、LDH アッセイの結果から、SEC に発現させた場合 HSV-gC1 の細胞傷害抑制効果は 20-50%で、80-95%の DAF に比べて低い有意に補体抑制効果を示すことが明らかになった。CHO cell での結果は SEC の場合と若干異なり、いくつかの血清でむしろ補体反応を活性化する傾向が見られた。これらのヒト血清をウェスタンブロットにて解析したところ HSV-gC1 に対する抗体反応が陽性であることが示された。

<考察>

HSV-gC1 は alternative pathway C3 convertase (C3bBb)の解離活性を有しており、それ以外に C3 と C5 の結合や C3 convertaseの安定化因子 properdin の結合を阻害する独特の機能が報告されている³⁾。今回の結果にあるように DAF に比べて補体制御効果が小さいのは HSV-gC1 が classical pathway C3 convertase C4b2aには作用しないためと考えられる。また、HSV-gC1 は高度に糖鎖付加を受けた分子であり、糖鎖構造の違いに

より機能に差が生じることが報告されている⁴⁾。SEC と CHO cell で個々の血清による反応性に違いが見られたのは、この種差による糖鎖付加様式の違いが関係している可能性があると考えられる。

これまでに Vaccinia virus 由来の分泌型補体制御因子 VCP、Poxvirus 由来の apoptosis inhibitor CrmA など、ウイルス性免疫制御因子を異種移植に応用した報告がいくつかなされている^{5, 6)}。これらは膜結合型の HSV-gC1 とは発現様式が異なるものの HSV-gC1 の CHO cell における結果は、これらウイルス性免疫制御因子を異種移植に応用するにはさらに詳細な解析が必要であることを示唆しているのかもしれない。

<総括>

今回の報告により HSV-gC1 はブタ細胞をヒト補体系から防御する新しい方法になりうることが示唆された。ウイルス性補体制御因子 HSV-gC1 はブタ-ヒト間の異種移植に有効である。

<文献>

- 1) Miyagawa S. et al., J Card. Surg., 16: 429 (2001)
- 2) Matsunami K. et al., J. Biochem., 131:745 (2002)
- 3) Lubinski J. et al., J. Exp. Med., 190: 1637 (1999)
- 4) Smiley M.L. et al., J. Virol., 55: 857 (1985)
- 5) Al-Mohanna F. et al., Transplantation, 71: 796 (2001)
- 6) Fujino M. et al., Xenotransplantation, 8: 115 (2001)

Barrett 粘膜における特殊円柱上皮の分子マーカー

平岡佐規子、水野元夫、那須淳一郎、岡咲博昭、水野将克、堀伸一郎、槇殿知穂、豊川達也、竹中龍太、武 進、高岡伸行、富田淳子、岡田裕之、寺田 亮、山本和秀、藤田禎三¹⁾、白鳥康史
岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科学、¹⁾福島県立医大・生化学

Decay-accelerating factor as a molecular maker of the specialized columnar epithelium in Barrett's mucosa

Sakiko Hiraoka, Motowo Mizuno, Jyunichirou Nasu, Hiroaki Okazaki, Masakatsu Mizuno, Shinichirou Hori, Chiho Makidono, Tatsuya Toyokawa, Ryuta Takenaka, Susumu Take, Nobuyuki Takaoka, Jyunko Tomita, Hiroyuki Okada, Ryo Terada, Kazuhide Yamamoto, Teizou Fujita, and Yasushi Shiratori
Department of Medicine and Medical Science, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, ¹⁾Department of Biochemistry, Fukushima Medical College

<目的>

Barrett 食道は食道腺癌の発生母地となり、特に腸上皮化生型の粘膜(いわゆる specialized columnar epithelium ; SCE) が悪性化の危険因子とされている。一方胃の分化型腺癌は、腺腫、腸上皮化生粘膜が発生母地とされているが、これらの粘膜で補体制御因子である Decay-accelerating factor (DAF、CD55) が強発現することを以前報告した¹⁾。そこで、今回我々は Barrett 粘膜における補体制御因子である DAF、Homologous restriction factor 20 (HRF20、CD59)、Membrane cofactor protein(MCP、CD46) の発現の変化について検討し、発癌リスクの高い SCE に特異的な分子マーカーの同定を試みたので報告する。

<対象>

Barrett 食道 3 例、Barrett 粘膜 33 例より得られた内視鏡下生検組織を用いた。

ここで Barrett 食道は内視鏡的に見られる食道柵状血管網の下端を食道胃境界部とし、これを越えて上昇している円柱上皮が全周性に 3cm 以上のものと

し、3cm 未満のものを Barrett 粘膜とした。

<方法>

①SCE の同定 : Hematoxylin-eosin 染色、Alcian blue (pH 2.5) 染色施行し、Alcian blue 染色陽性の杯細胞を認める粘膜を SCE、それ以外を non SCE とした。

②補体制御因子の検討 : SCE、non SCE 部に関して DAF (1C6)、HRF20 (名古屋市立大学、岡田秀親教授より供与)、MCP に対するマウスモノクローナル抗体を使用し、酵素抗体間接法により免疫組織学的に補体制御因子の発現と局在を検討した。

③DAF mRNA の検討 : 新鮮凍結切片を 8 μ m に薄切したものをエタノール固定した後、HE 染色施行し、Laser capture microdissection を用い SCE、non SCE 部をそれぞれ 500 細胞以上転写した。続いて RNA を抽出し、RT-PCR を施行した。

<結果>

①SCE の同定 : 27 標本中 7 標本で SCE を認めた。

②補体制御因子の検討 : DAF は SCE 陰性の Barrett 上皮細胞ではほとんど発現を認めなかったが、SCE

では、7 標本すべてで、上皮の管腔側面に強い発現の増強を認めた($p<0.0001$) (表)。また HRF20 は SCE 陰性の円柱上皮の管腔側面にわずかに発現が認められ、SCE では若干発現の増強を認めた。MCP は、SCE 陰性の円柱上皮、SCE とも細胞の側底面に発現し、両者で発現の差は認めなかった。

③DAF mRNA の検討 : SCE では検討した 6 例で、全例 DAF mRNA を検出した。non SCE11 例では 7 例が DAF mRNA 陽性、4 例が陰性であった。

<考察>

Barrett 粘膜に発生する SCE で、DAF タンパク質、mRNA とも発現の増加を認めた。DAF は、SCE の管腔側面に強発現することから、内視鏡下の SCE imaging の標的分子など、SCE に特異的な分子マーカーとして有用と考えられた。

<文献>

- 1) Kiso T et al, Histopathology, 40, 339-47 (2002)

表 Barrett 粘膜における補体制御因子の発現

	DAF			HRF20			MCP		
	-	+	2+	-	+	2+	-	+	2+
SCE	0	0	7	0	5	2	0	2	5
Non SCE	17	6	0	7	15	1	0	6	17

-: 染色を認めないもの、もしくはわずかに染色を認めるもの

+: 半数以下の上皮細胞に染色をみとめるもの

2+: 半数以上の上皮に染色を認めるもの

透析患者における赤血球 CR1 のポリモルフィズムの検討

玉野まり子, 大井洋之, 福家吉伸, 日高睦子, 里村厚司, 大澤 勲, 遠藤守人, 藤田宜是, 須藤祐正*

日本大学医学部内科学講座内科2部門, *春日部嬉泉病院

CR1 numerical polymorphism on erythrocytes of hemodialysis patients

Mariko Tamano, Hiroyuki Ohi, Yoshinobu Fuke, Mutsuko Hidaka, Atsushi Satomura, Isao Ohsawa, Morito Endo,
Takayuki Fujita, Sukemasa Sudo*

Department of Internal Medicine II, Nihon University School of Medicine, *Kasukabe-Kisen Hospital

〔目的〕 補体制御因子の一員である Complement receptor type 1 (CR1) は補体活性化の制御を行うとともに、免疫複合体の肝臓/脾臓への輸送を行ったり C1q, mannan-binding lectin のレセプターとしても発見されるなど、primitive な生体防御の観点からも重要な分子である [1]。我々は透析患者において赤血球上の CR1 の発現が低い一群 (Low-CR1) を見いだしており、この群は CR1 高値発現群 (High-CR1) と比べて易感染性であり 5 年生存率も有意に低いことを報告している。本研究では透析患者の CR1 の遺伝性多型に着目し、赤血球 CR1 の低下との関連について検討を行った。

〔方法〕 High-CR1, Low-CR1 のスクリーニング 透析患者 195 名について EDTA 採血を行い、赤血球上の CR1 をフローサイトメトリーにより測定した。赤血球上の CR1 結合量 (antibody binding capacity, ABC) として表示した。本研究では ABC 1280 以上を High-CR1, 621 以下を Low-CR1 と定義し、スクリーニングを行った。

遺伝性多型の検討 The Hind III RFLP: High-CR1 (n=29), Low-CR1 (n=30) について genomic DNA を抽出後 intron 27 について HindIII による PCR-RFLP を行った [2]。

Hind III フラグメントは H allele では 1800 bp, L allele では 1300, 500bp を示した。また exon 22 (A3650G), exon 33 (C5507G) の polymorphic site を PCR により増幅しシーケンスを行った [3]。

透析膜による影響 透析膜の影響を調べるため、補体活性膜 (Cellulose membrane, AMSD 18M) を使用して透析を行っていた Low-CR1 (LL alleles, n=7; HH alleles, n=8) 患者を、非補体活性膜 (polyacrylonitrile (PAN) membrane, PAN 17DX) に交換し 3 ヶ月後に再び CR1 の測定を行った。

〔結果〕 195 名の患者のうち High-CR1, 30 名 (CR1, 1506 ± 126 ABC)、Low-CR1, 29 名 (CR1, 508 ± 87 ABC) をスクリーニングした。High-CR1 では 87% が HH allele を持ち、13% が HL allele であった。Low-CR1 では 24% が LL, 45% が HL, 31% が HH allele であった。Low CR1 グループに対して行ったシーケンスアナライシスの結果を図 1 に示す。3650G (予想アミノ酸 アルギニン), 5507G (アルギニン) は L-allele とリンクし、3650A (ヒスチジン), 5507C (プロリン) は H-allele とリンクしていた。1 例のみ HH allele にもかかわらず 3650G の allele を持つものを認めた。

Low-CR1 のうち homozygous な allele を持つ患者(LL n=7, HH n=8) について透析膜の影響を検討した。透析膜を cellulose membrane から PAN membrane へ変更後3ヶ月で CR1 の発現は有意に上昇した($p<0.02$)。特に HH allele を持つ3名は著しい増加をみせ、半年後もその上昇を維持していた。

〔考察〕 Xiang らは白人において L allele では 1208、1827 番目のアミノ酸が両方ともアルギニン (H allele ではヒスチジン、プロリン) に置換していることを報告しているが、このアミノ酸の置換により赤血球上の CR1 は aging や循環中に trypsin like なプロテアーゼによる proteolysis を受けやすいと考えられる[3]。今回の我々の結果も同様のものであった。HH allele をもっているにもかかわらず Low CR1 を示す患者について、アミ

ノ酸置換があるのではないかと考えていたが、1例を除いて置換は認められなかった。そこで CR1 の減少の原因として透析膜の影響を検討した。透析膜の Cellulose 膜は白血球の活性化、補体の活性化などによりエラスターゼやサイトカインなどさまざまな活性物質を放出する。ある種の患者の CR1 はこれらの protease に感受性が高いのではないかと考えた。透析膜をより生体適合性の高い PAN 膜に変えると、3ヶ月後には CR1 のレベルは有意に上昇した。これは特に HH allele を持つものに有効であった。

〔結論〕 透析患者の Low-CR1 症例には Hind III の restriction site により、HH、HL、LL の polymorphism が認められた。また後天的な CR1 の低下の一因に HD 膜による proteolysis の可能性が示唆された。

〔文献〕

1. Krych-Goldberg M, Atkinson JP: Structure-function relationships of complement receptor type 1. Immunological Reviews 2001, 180:112-122
2. Cornillet P, Philbert F, Kazatchkine MD, Cohen JHM: Genomic determination of the CR1(CD35) density polymorphism on erythrocytes using polymerase chain reaction amplification and Hind III restriction enzyme digestion. Journal of Immunological Methods, 1991, 136:193-197
3. Xiang L, Rundles JR, Hamilton DR, Wilson JG: Quantitative alleles of CR1: Coding sequence analysis and comparison of haplotypes in two ethnic groups. The Journal of Immunology, 1999,163:4939-4945

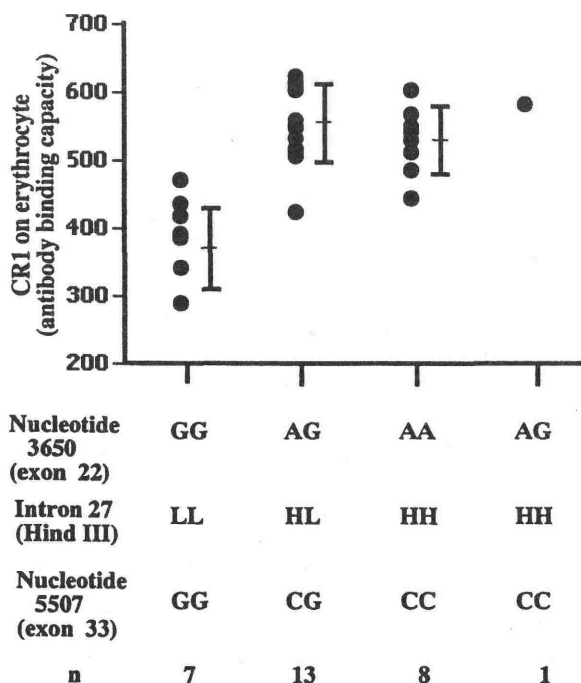


Fig.1 CR1低発現の透析患者におけるCR1のポリモルフィズム

糖尿病性腎症における血管中膜平滑筋障害 —糖酸化反応と補体の活性化との関連について—

上杉憲子¹⁾、阿部正義²⁾、坂田則行¹⁾

¹⁾ 福岡大学医学部病理、²⁾ 同薬理

Possible mechanism for smooth muscle cell injury in human DM
due to focal complement activation mediated by glycoxidation

Noriko Uesugi¹⁾, Masayoshi Abe²⁾, Noriyuki Sakata¹⁾

Dep. of Pathology¹⁾ and Pharmacology²⁾, Fukuoka University,

<はじめに>

糖尿病患者の腎内血管壁には、membrane attack complex(MAC)の沈着があることが知られている¹⁾。MACはそのsublytic effectを介し、局所の酸化反応を促進、動脈硬化の促進に関与するのではないかとされる^{2),3)}。一方、糖尿病で過剰に産生されるadvanced glycation end products(AGEs)、特にその生成過程に酸化反応を伴う糖酸化物は、糖尿病腎症における糸球体硬化と動脈硬化を促進すると考えられている⁴⁾。我々は、糖尿病性腎症の腎内血管中膜では、平滑筋の消失とMACやAGEの沈着が相関していることを報告した⁵⁾。今回、我々は糖尿病ではAGEが、補体の活性化に関与し、その結果、中膜平滑筋の障害を引き起こし、糸球体硬化症にも関与すると仮説し、これを証明するために、以下の検討をおこなった。

<対照>

49例の剖検例の腎組織：糖尿病26例（平均年齢 64 ± 9 才）、高血圧12例（HT）（ 67 ± 13 才）、コントロール11例（ 63 ± 13 才）。糖尿病症例は、その糸球体障害度により1）KW結節を持つ進行した糸球体硬化症8例（KW）、2）中程度の硬化7例（DS）3）軽症の硬化3例（Mild）4）腎障害を持たない11例（NI）に分類した。

<方法>

1. 免疫化学法：凍結あるいはカルノア固定パラフィン切片を持ち、Envision法にて、酸化的糖酸化物 carboxymethyllysine (CML), MAC, smooth muscle actin(SMA)の免疫化学染色をおこなった。
2. 画像解析：NIH imageを用い、中膜におけるMACとCMLの%陽性面積（%MAC、%CML）とSMAの%消失面積を算出した。
3. 平滑筋とCMLやMACの共存を、免疫二重染色を用いて確認した。
4. In vitroでの補体の活性化：正常血清を各濃度のAGEで、各時間刺激し、補体のfragments（C4d, Bb, iC3b, MAC）の生成を検討した。

<結果>

1. CMLとMACは平滑筋消失部位に存在した。
2. %MACと%CMLは有意にKW（ $30 \pm 17\%$, $11 \pm 10\%$ ）がDS（ $22 \pm 16\%$, $5 \pm 5\%$ ）、Mild（ $8 \pm 17\%$, $2 \pm 3\%$ ）、NI（ $8 \pm 13\%$, $2 \pm 7\%$ ）、HT（ $11 \pm 10\%$, $1 \pm 2\%$ ）とcontrol（ $7 \pm 7\%$, $0.3 \pm 1.2\%$ ）に比較して高かった。
3. %SMC消失面積は、KW（ $56 \pm 18\%$ ）ではDS、Mild、NI、HTとcontrolに比較し有意に大きかった（ $43 \pm 12\%$, $30 \pm 9\%$, $28 \pm 14\%$, $34 \pm 16\%$, $28 \pm 12\%$ ）。

4. 平滑筋消失部位における CML の陽性率は有意に KW と DS ($26 \pm 18\%$, $20 \pm 15\%$) で、HT と controls ($5 \pm 16\%$, $5 \pm 8\%$)より高かった。
5. どの濃度の AGE も in vitro での補体の活性化を示さなかった。

<結論>

糖尿病における腎内血管中膜平滑筋の障害は、糖酸化反応により促進され、さらに糖尿病糸球体硬化にも関与する。糖酸化物による平滑筋細胞の細胞膜上での補体の活性化がその機序の一つであることが示唆された。

<文献>

- 1) Hinglais N, et al., Kidney Int., 30: 399 (1986)
- 2) Niculescu F, et al., Mol Immunol., 36:949 (1999)
- 3) Acosta J, et al Proc Natl Acad Sci U S A. 97 :5450 (2000)
- 4) Uesugi.N et al., Am J Kidney Dis. 38:1016 (2001)
- 5) Uesugi.N et al., J Am Soc Nephrol, 12: 920A (2001) , abstract

潰瘍性大腸炎やクローン病の発症と顆粒球
—正しい治療に向けて—

安保 徹

新潟大学大学院・免疫学・医動物学

Onset of ulcerative colitis and Crohn's disease and the association of granulocytes

—Proposal of improved treatments—

Toru Abo

Department of Immunology, Niigata University School of Medicine

〈はじめに〉

潰瘍性大腸炎やクローン病の炎症性腸疾患に「白血球の自律神経支配」の考えをとり入れないと病態の正しい把握ができない。また正しい治療も見えてこない。白血球は顆粒球とリンパ球の二大細胞から成り、それぞれ交感神経と副交感神経の支配を受けている(図 1)。活動的な体調では顆粒球が増加し、細菌処理を速やかに行う防御体制を敷く。逆に、休息や食物摂取の時の体調ではリンパ球が増加し、微小抗原処理を行う防御体制を敷く。

このような白血球の変化は生体にとって合目的な反応であるが、自律神経がどちらかに偏り過ぎると生体は破綻をきたし、炎症性腸疾患を始めとした病気を引き起こす。潰瘍性大腸炎もクローン病も激しいストレスを引き金にして発症する。ストレス→交感神経緊張→血流障害と顆粒球増多→炎症性腸疾患の発症、である。

下痢、腹痛、炎症などは、上記したストレスから開放される時起こる治癒反応と見る必要がある(図 2)。つまり、副交感神経反射である。いくら患者にとって不快な症状と言っても、これを

完全に止めようとする治療は間違いであろう。

炎症性腸疾患の治療に日常的に使用されているサラゾピリンやペンタサはいずれも腸溶性のアミノサリチル酸である。つまり、消炎鎮痛剤(痛み止め)である。消炎鎮痛剤の長期投与で粘膜破壊が起こることはよく知られている(胃の障害など)。

大腸もこの例外ではないのである。次の図式を考える必要がある。消炎鎮痛剤の使用→プロスタグランジン産生の抑制→交感神経緊張→顆粒球増多→胃、大腸、小腸などの粘膜破壊、である。プロスタグランジンはカテコールアミンと拮抗系を構成しているので、この産生抑制は交感神経緊張をもたらす。

もちろん COX-2 阻害剤に変えても大腸や小腸に炎症を引き起こすことに変わりはない。

このように消炎鎮痛剤の長期使用は、下痢や炎症反応(治癒反応)を止め、逆に顆粒球を活性化し炎症性疾患を悪化させてゆくのである。ステロイドも同様にリンパ球の働きを止め顆粒球を活性化する力を持っている。このような間違った治療が、今日の爆発的な潰瘍性大腸炎患者の増加を

ランチョンセミナー

もたらしたものと考えられる(図3)。

炎症性腸疾患の治療として次の項目を実践し、
ほぼ全例を治癒に導くことができた。

1. サラゾピリン、ペンタサ、ステロイドを使わない。急にこれらの薬を止めると下痢や腹痛などの治癒反応が強く出てくる。それ乗り越えて、その後に症状が治まってゆくことをよく患者に説明して薬を止める。
2. 精神的ストレスやその他のストレスが病気の発症の背景にあるので、この面のサポートを行う。
3. 副交感神経優位の体調にする(運動、入浴、笑い、鍼、よい食事など)。

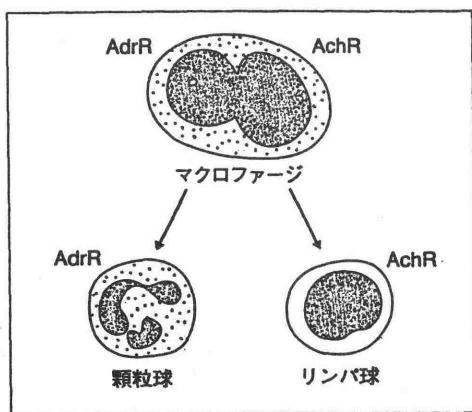


図1 白血球の進化と自律神経支配
AdrR: アドレナリン受容体, AchR: アセチルコリン受容体。

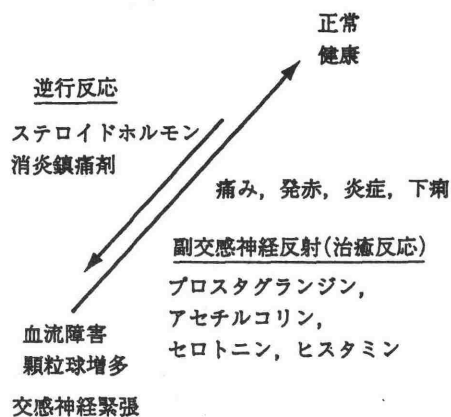


図2 組織傷害や血流障害からの回復

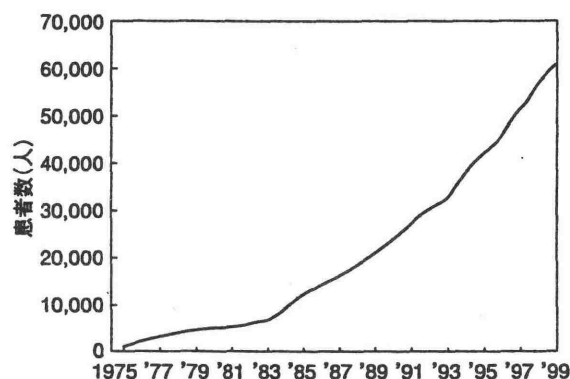


図3 潰瘍性大腸炎患者数の爆発的増加

腎移植後の拒絶反応における C4d の検討

阿部正浩¹、澤田登起彦¹、堀田茂²、中島一朗¹、瀧之上昌平¹、田辺一成³、東間紘³、
山口裕⁴、寺岡慧¹

東京女子医科大学 腎臓病総合医療センター外科¹、病理検査部²、泌尿器科³、
東京慈恵医科大学 柏病院 病理科⁴

Peritubular capillary deposition of C4d fragment in allograft rejection
after renal transplantation

Masahiro Abe¹, Tokihiko Sawada¹, Shigeru Horita², Ichiro Nakajima¹, Shouhei
Fuchinoue¹, Kazunari Tanabe³, Hiroshi Toma³, Yutaka Yamaguchi⁴, Satoshi Teraoka¹
Department of Surgery¹, Pathology Unit² and Department of Urology³, Kidney
Center,
Tokyo Women's Medical University
Department of Pathology⁴, Kashiwa hospital, Tokyo Jikei Medical College

<はじめに>

腎移植の成績は免疫抑制法の進歩により早期の生着率は、飛躍的に向上したものの急性拒絶反応から移植臓器不全にいたる症例をみとめ十分満足するものではない。また晩期にみられる慢性拒絶反応は、病態および治療法も確立しておらず10年生着率は60～70%にとどまっている。近年、傍尿細管毛細血管(PTC)上の Complement (C) 4d の沈着と拒絶反応との関係が報告されている¹⁻³⁾。今回我々は PTC 上の C4d の沈着が、提供者(ドナー)に対する抗体の有無とともに移植後早期の病態の変化を反映するかを比較検討するとともに、晩期における移植腎機能との関係を検討した。

<方法>

対象症例：当施設で1991年から2000年までに施行した成人の生体腎移植620症例中、1)早期の症例；移植後急性拒絶反応から乏尿に至りその治療として

血漿交換を要した40症例である。症例は4群に分けられ、血液型適合で機能不全(c-ABO GL; n=6); 血液型適合で機能不全から回復(c-ABO RE; n=10); 血液型不適合で機能不全(in-ABO GL; n=9); および血液型不適合で機能不全から回復(in-ABO RE; n=15)である。2)晩期の症例；移植後6ヶ月以上経過し、その経過および組織学的所見から慢性拒絶反応と診断された46症例である。

C4d の移植腎組織における評価：移植腎組織の凍結切片で monoclonal 抗体を使用し間接蛍光抗体法により行った。発色強度は-から+++までで、-は PTC 上の発色を認めず、+++はほとんどの PTC 上に強度に発色を認めるまでの4段階で評価した。40症例中39症例がその経過中に2回以上の生検を行っている。

血中の抗 HLA 抗体および抗血液型抗体の評価：抗 HLA 抗体は flow panel reactive assay で、抗血

臨床補体- 1

液型抗体は生食法および間接クームス法により評価した。

<結果>

1) 早期症例：4 群の患者背景に急性拒絶反応の治療法を含め差を認めなかった。初回の生検で血液型適合 16 症例中 6 症例に、また血液型不適合 24 症例中 23 症例に C4d(+++)の沈着を認め、その頻度に有意差を認めた($p<0.05$)。また初回と最後の生検での C4d 沈着の程度の推移は、c-ABO GL では 6 症例中 4 症例で増強し、一方 c-ABO RE では 10 症例中 8 症例で減弱した。また in-ABO GL では 8 症例中 7 症例で増強あるいは+++で変化なく、一方 c-ABO RE では 15 症例中 6 症例で減弱した。初回と最後の生検時での抗 HLA 抗体では c-ABO GL で最後の生検時には全例に陽性、c-ABO RE 初回陽性の 7 症例中 3 症例に陰性に変化し、血液型適合症例で病態を反映した。また、抗血液型抗体価の変化では、間接クームス法で in-ABO GL で 9 症例中 7 症例に増加を in-ABO RE で 15 症例中 8 症例に減少を認め、病態を反映した。2) 46 症例中 23 症例に陽性を認めた。陽性症例と陰性症例のクレアチニン値に有意差を認めなかった。

<考察>

今回の検討で、移植後の強い急性拒絶反応の病態の推移を把握するうえで PTC 上の C4d を検討することは、特に血液型適合移植では有用であることが示された。また、血液型適合移植では抗 HLA 抗体価の推移は C4d の推移とも関連していることが示された。抗 HLA 抗体価および血液型不適合移植での抗血液型抗体価の推移を把握することは重要であると考えられる。また、このような機能不全にいたる急性拒絶反応症例に対し病態の本質が血管内皮に対する抗原抗体反応と考え、また慢性拒絶反応症例で抗体陽性症例では抗体除去を目的に血漿交換などの

治療を行っている。

今後さらに C4d の存在が本当に血管内皮上での抗原抗体反応を反映しているのかを、MAC 等の染色で検討する必要があると考えられる。また今回、早期の機能不全から改善した症例としない症例のあいだに、補体が関与することが示されたので、今後は補体制御因子等を検討する必要があると考える。

<総括>

PTC 上の C4d の推移を検討することは、腎移植後の特に急性期の病態を把握するうえで有用である。ドナーに対する抗体および補体を管理することにより、新たな拒絶反応の治療法が期待できる。

<文献>

- 1) Lederer S.R. et al., Kidney Int., 334 (2001)
- 2) Crespo M., et al., Transplantation., 652 (2001)
- 3) Bohmig G.A., et al., Am J Kidney Dis., 667(2000)

症例からみた遺伝性血管神経性浮腫 (HANE) の問題点

大澤 勲

日本大学医学部内科学講座内科2部門

Clinical problems in the treatment of hereditary angioedema

Isao Ohsawa

Internal Medicine II, Nihon University School of Medicine

【はじめに】

遺伝性血管神経性浮腫 (HANE) は、若年期より出現消退を繰り返す浮腫と低補体血症を呈することから特徴的な所見を備えた疾患である。しかし、我々がこれまでに経験した数例の経過から、臨床医の間では必ずしも疾患認知度が高くないことを痛感している。そのうちの一例の経過を提示し、併せて本疾患の強い発作時に搬送されると思われる本邦の救命救急センターに依頼したアンケート調査の結果から、臨床の場における HANE の問題点を浮き彫りにしたい。

【症例】

60 歳、女性。〈現病歴・既往歴〉10 歳代より、喉頭浮腫による呼吸困難・時として腸管浮腫によると考えられる激しい腹痛・そのほか全身各所に浮腫の出現消退を繰り返していた。54 歳の時、急性腹症を発症し当院外科へ入院した。急性膵炎による多臓器不全と診断され、膵仮性嚢胞に対し待機的に手術を行った。その後の外来通院中も身体各部の軽度の浮腫は繰り返し、呼吸困難・腹痛の強いときには入院加療をしていた。

平成 11 年秋頃より、生じた限局性の浮腫が、徐々に全身へ波及し、翌年 1 月 (60 歳) に同外科へ入

院。喉頭および口腔内の浮腫により気道閉塞を生じたため、経鼻挿管された。この時、ネフローゼ症候群を来していたため、我々の腎臓内科へ依頼があった。〈家族歴〉母親が同様の浮腫を繰り返していたがすでに他界。

〈経過〉病歴より HANE を疑い、腎疾患の鑑別もかねて補体 (C3, C4, CH50)、C1-inhibitor (C1-INH) 活性を含む検査をオーダーした。同時に C1-INH の定量を行い (SRID)、臨床的に HANE の確定診断を得た (表 1)。インフォームド・コンセントの上にヒト血漿分画製剤ベリナート P® (C1-INH 製剤) を投与し、徐々に呼吸困難は消失し抜管に成功した。以後数日間が多尿となり全身の浮腫も消失した。入院中、腎生検を施行し糸球体には管内管外増殖性変化を認め、細動脈に閉塞性病変を認めた。

その後も、外来通院中は、週に 2-3 回の割合で軽度の発作が起きていたが、自宅安静で軽快していた。その後約 2 年半の間に HANE の発作により 10 回以上の入退院を繰り返している。

これまでに生命を脅かす気道閉塞とともに全身の浮腫が出現し入院したことが 2 回ある。15kg 以上の体重増加を呈し、C1-INH 製剤の効果が低く、

臨床補体- 2

長期の気管挿管を強いられた。 HANE の発作に効果があると思われる nafamostat mesilate (フサン®) 投与も試してみた。最終的には C1-INH 製剤の大量投与で発作を離脱できたと考えている。 本患者では、このような強い発作の際、採血管がごく短時間で凝固してしまうほどの著しい過凝固状態となる。

C1-INH の肝合成能亢進を期待し、danazole を投与してみたが、副作用としての肝機能障害・血糖上昇・多毛出現があり中止した。

平成 14 年に入り、徐々に腎機能が増悪しており、将来的に人工透析などの血液浄化法が必要である。しかし、度重なる発作や点滴療法のため、内シャント造設に適した血管のみならず中心静脈の確保すら難しい。

【アンケート調査】

日本全国の救命救急センター142 施設の責任者に対し、HANE の概略を明記し簡単なアンケート調査を行った。 81 施設 (57%) より回答があった。 HANE を知っていたと答えたものは 36 施設 (44%) でそのうち経験したことがあるのは 4 施設のみであった。しかし、知らなかったと答えた 45 施設の内、14 施設で過去に HANE と思われる症例を経験し、その患者の延べ人数は 30 例以上であった。

【考察】

HANE はその病態において未だ不明な点が多いが、臨床の場では生命に関わる発作を起こす可能性があり、鑑別診断に挙がるのが第一に重要である。現在日本にどれだけの症例が存在するか不明であるが、今回のアンケートを通して、臨床医が本疾患に遭遇する機会が少なからずあることは明らかである。また一方で、診断後も医療経済的に莫大な費用がかかることも事実である。 今回の報告から臨床にお

ける問題点を列挙すると

- ① HANE の認知度が低い。
- ② 迅速な C1-INH の検査ができない。
- ③ C1-INH 製剤は高価である (約 12 万円/1vial)。非発作時の予防投与は保険上認められていない。また、C1-INH 製剤の投与量・投与間隔の目安がない。
- ④ 度重なる莫大な医療費。
- ⑤ 発作時における他の薬物治療の可能性。
- ⑥ 非発作時における発作予防の可能性。
- ⑦ 線溶凝固系の動きについて一定の見解が得られていず、補助療法としての薬物選択が困難。
- ⑧ 体外循環用の blood access 作成が難しい。
- ⑨ 体外循環時に HANE の発作を誘発する危険。などがある。

【結語】

以上より、われわれは基礎的・臨床的な報告を通して本疾患を広くアピールして行かなければならないのではないかな。

表 1 診断時の補体測定値

H.12 年 1 月 15 日	測定値	正常値
C3 (mg/dl)	103	60-140
C4 (mg/dl)	3	10-40
CH50 (U/ml)	13	30-45
C1-INH 定量 (%)	18	100
C1-INH 活性 (%)	<25	80-125

補体欠損症と SLE

塚本 浩、堀内孝彦、永江祥之介¹、北村 肇²、北野悦子²、原田実根

九州大学大学院病態修復内科学(第一内科)、¹九州大学大学院皮膚科学

²大阪府立看護大学医療技術短期大学部臨床検査学科

Complement deficiency and SLE

Hiroshi Tsukamoto, Takahiko Horiuchi, Shonosuke Nagae¹,

Hajime Kitamura², Etsuko Kitano², Mine Harada

Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences,

¹Dermatology, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, ²Department of Medical Technology, Osaka Prefectural College of Health Sciences

全身性エリテマトーデス(SLE)は代表的な全身性自己免疫疾患で自己抗体の産生、免疫複合体の組織への沈着と引き続き起こる補体の活性化が病態の中心と考えられている。一方、前期補体成分の欠損症において高頻度に SLE を合併することが知られてきた。近年、SLE の疾患感受性遺伝子の探索が精力的に行われ、複数の遺伝子が同定されているが、その中で補体成分の遺伝子は SLE の発症に関連の深い遺伝子として再注目されている。

1. 古典経路

C1q 欠損マウスでは自己抗体の出現や腎炎の発症等ループス様症状を呈し、免疫複合体の除去力の低下が原因であると報告されている。C4 欠損マウスでも C1q 欠損マウスよりは程度が軽いものの免疫複合体除去力の低下があり、ループス様症状を呈すると報告されている。ヒトでは C1q 欠損症で 94%、C1r と C1s 欠損症で 55%、C4(完全)欠損症で 75%、C2 欠損症で 35%に SLE を合併すると報告されている。C4 には C4A と C4B の二つの遺伝子があり、いずれかの欠損症(部分欠損症、特に C4A)が SLE と関連しているとする報告が多い。

2. レクチン経路

マンノース結合レクチン(MBL)は 54 番目あるいは 57 番目のアミノ酸変異により完全欠損症となる事が知られており、全ての人種に 5-10%存在する。欧米では SLE において MBL 欠損症の頻度が高いことが知られている。本邦でも両者の関連を認めたとの報告もあるが、我々の検討では両者の関連を認めなかった¹。

3. 第二経路

特に SLE との関連は報告されていない。

4. C3

C3 欠損マウスはループス様症状を呈さない。ヒト C3 欠損症は、膜性増殖性糸球体腎炎、IgA 腎症、紅斑等が報告されている。SLE または SLE 様症状は欧米では少ないが、本邦では自験例を含め 5 例(3 家系)中 4 例(3 家系)が SLE または SLE 様症状を呈している。日本人は C3 欠損症により、SLE を発症しやすい遺伝的背景を有している可能性がある。自験例は、26 歳男性、22 歳時日光過敏症、蝶形紅斑、白血球減少、抗核抗体陽性等より SLE と診断。両親はいとこ婚。補体系検査では C3 は蛋白濃度、溶血活性いずれも著明低値であった。本例ではイントロン 38 の 3'スプライス部位の

臨床補体- 3

AG-GG 置換によるエクソン 39 のスキッピングが原因で C3 の分泌が障害されていた²。

5. 後期成分

SLE との関連は指摘されていないが、SLE の合併例は散見される。

6. 補体制御因子

特に SLE との関連は報告されていない。

[文献]

1)Horiuchi T. et al., Genes Immun 1: 464, 2000

2)塚本 浩他, 第 38 回補体シンポジウム講演集.
pb-3(2001)

消化器疾患における補体制御因子発現異常とその臨床的意義

水野元夫、那須淳一郎、岡咲博昭、水野将克、堀伸一郎、平岡佐規子、横殿知穂、豊川達也、
竹中龍太、武 進、高岡伸行、富田淳子、岡田裕之、山本和秀、藤田禎三 1)、白鳥康史
岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科学、1)福島県立医大・生化学

Altered expression of complement regulatory proteins in gastrointestinal diseases

Motowo Mizuno, Jyunichirou Nasu, Hiroyuki Okada, Hiroaki Okazaki, Masakatsu Mizuno, Shinichirou Hori,
Sakiko Hiraoka, Chiho Makidono, Tatsuya Toyokawa, Ryuta Takenaka, Susumu Take, Nobuyuki Takaoka,
Jyunko Tomita, Kazuhide Yamamoto, Teizou Fujita1), and Yasushi Shiratori

Department of Medicine and Medical Science, Okayama University Graduate School of Medicine and
Dentistry, 1)Department of Biochemistry, Fukushima Medical College

<はじめに>

消化管内腔には常に食物成分や腸内細菌など外来性の異物が存在するが、消化管は粘液による物理的バリアーや粘膜免疫機構により病原性細菌の進入を防御している。粘膜免疫における初期反応として自然免疫の果たす役割は大きく、消化管内腔に放出される補体は重要なエフェクターのひとつであり、活性化補体の消化管粘膜での沈着も観察される¹⁾。消化管粘膜上皮細胞は、活性化補体からの傷害を制御するため decay-accelerating factor (DAF)、membrane cofactor protein (MCP)、homologous restriction factor 20 など種々の膜性補体制御因子を発現する。我々はこれまで様々な消化器疾患におけるこれら補体制御因子の発現について検討してきたので、DAF の発現の変化を中心にその概略と臨床的意義について解説する。

1. 大腸疾患

1) 大腸癌

大腸癌は便潜血検査によるスクリーニングが一般的であるが、便潜血は大腸癌に特異的なマーカーではなく、また進行癌でも便潜血陰性癌がみら

れる。したがって、便潜血とは独立した大腸癌スクリーニング法の開発は重要な課題である。大腸癌では DAF の強い発現亢進を観察され^{2,3)}、大腸癌患者便中で発現の増強した DAF が検出できる^{4,5)}。便中 DAF は、便潜血陰性例でも検出され、便潜血とは独立したマーカーとして、大腸癌スクリーニングに有用性の高い検査法と考えられる⁶⁾。

細胞増殖因子 EGF は MAP キナーゼカスケードを介したシグナル伝達経路により培養大腸上皮細胞の DAF 発現を誘導し⁷⁾、大腸癌における DAF の発現増強の機序の一つと考えられる。また、大腸癌患者の便中に検出される大部分の DAF は、癌細胞表面の DAF が GPI アンカー部分で切断され放出されているものと思われる⁸⁾。

2) 潰瘍性大腸炎

大腸の慢性炎症性疾患である潰瘍性大腸炎の治療の方針決定、効果判定には腸炎の病勢判定は不可欠であり、非侵襲的かつ簡便な活動性のマーカーの研究が積極的になされている。潰瘍性大腸炎粘膜でも、腸炎の活動性に関連して DAF の発現の亢進⁹⁾、便中 DAF の増加が認められ、便中 DAF 量は大腸炎の病勢をよく反映し、潰瘍性大腸炎の非侵襲的かつ簡

便な活動性マーカーとして有用と考えられる¹⁰⁾。

潰瘍性大腸炎病変局所では種々のサイトカインの増減が示され、培養大腸上皮細胞を用いた検討では、IL-4 と IL-1 β などのサイトカインが DAF の発現と放出に関与している可能性が示唆される¹¹⁾。

3) 大腸癌と、潰瘍性大腸炎患者便中 DAF の違い

大腸癌、潰瘍性大腸炎粘膜とも DAF の発現が亢進し、いずれの疾患の患者便中に高値の DAF が検出される。潰瘍性大腸炎は、大腸癌発症の高危険群であり、大腸癌と潰瘍性大腸炎で検出される DAF の判別は重要な課題である。組織および便中に検出される DAF 分子の構造上の差異につきレクチンを用いて解析し、糖鎖構造上の違いを認めた。

2. 胃癌における補体制御因子の発現¹²⁾

分化型胃癌および、その前癌病変と考えられる胃腺腫、腸上皮化生粘膜では、DAF の発現亢進がみられる。各種補体制御因子の発現パターンでは、分化型胃癌では、腸上皮化成細胞に類似の、一方未分化型胃癌では、胃底腺細胞に類似の発現パターンを示し、分化型胃癌と未分化型胃癌の発生母地の相異を示唆する所見と考えられる。

3. 食道疾患における補体制御因子の発現変化

1) 食道癌

扁平上皮細胞で構成される食道組織では、食道癌で正常食道粘膜の基底細胞層に類似の膜性補体制御因子の発現パターンを示し、食道癌の発生母地を基底層細胞とする考えと合致する所見と考えられる。

2) バレット食道

近年増加傾向にある逆流性食道炎に発生するバレット粘膜は食道腺癌の発生母地となり、特に腸上皮

化生型の粘膜（いわゆる特殊円柱上皮細胞）が悪性化の危険因子とされている。バレット粘膜の特殊円柱上皮細胞では、胃の腸上皮化生と同様に DAF タンパク質、mRNA とも発現の増加を認めた。DAF は、特殊円柱上皮細胞の管腔側面に強発現することから、内視鏡下の特殊円柱上皮の同定、イメージングの標的分子など、特殊円柱上皮に特異的な分子マーカーとして有用と考えられる。

<文献>

- 1) Ueki T. et al., Clin Exp Immunol, 104:286 (1996)
- 2) Inoue H. et al., Acta Med Okayama, 48:271 (1994)
- 3) Nakagawa M. et al., J Gastroenterol Hepatol, 16:184 (2001)
- 4) Mizuno M. et al., Gastroenterology, 110:A559 (1996)
- 5) Mizuno M. et al., Gastroenterology, 109:826 (1995)
- 6) Iwagaki N. et al., J Immunoassay Immunochem, in press (2002)
- 7) Takeuchi K. et al., J Lab Clin Med, 138:186 (2001)
- 8) Mizuno M. et al., Gastroenterology, 118:A280 (2000)
- 9) Uesu T. et al., Lab Invest, 72:587 (1995)
- 10) Inaba T. et al., Clin Exp Immunol, 112:237 (1998)
- 11) Nasu J. et al., Clin Exp Immunol, 113:379 (1998)
- 12) Kiso T. et al., Histopathology, 40:339 (2002)

発作性夜間血色素尿症の発症メカニズム

井上徳光

大阪府立成人病センター研究所

Molecular Mechanism for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria

Norimitsu Inoue

Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases

発作性夜間血色素尿症(PNH)は、補体制御因子 DAF、CD59 の欠損により、溶血性貧血を起こす後天性の疾患として知られている。DAF、CD59 は、Glycosylphosphatidylinositol (GPI)アンカー型蛋白で、PNH では、GPI アンカー合成に関わる酵素複合体の 1 構成要素である PIG-A の異常により GPI アンカーが合成されず、発現できない。この PIG-A の異常は造血幹細胞でおこり、その細胞は、何らかの機序によりクローナルに拡大し、すべての血球系において GPI アンカー欠損細胞が認められるようになる。現在までに、約 150 の症例が解析され、すべてにおいて PIG-A 遺伝子に変異が同定された。しかし、PIG-A のマウスホモログ Pig-a を破壊したマウスでは GPI アンカー欠損細胞のクローナルな拡大は見られないこと^{1,2)}、正常者にも微量な GPI アンカー欠損細胞が高頻度に見つかるにも関わらず、それらは拡大しないことより、何らかの第 2 の異常が PNH 発症に関わっていることが示唆されている。

以前より、PNH は、免疫学的機序の関与が示唆されている再生不良性貧血と高頻度にオーバーラップして発症することが知られている。最近、PNH と HLA-DR2 との関連も指摘され³⁾、クローナル

な拡大に免疫学的な機序に関わる選択説が提案されている。しかし、ほぼ 100%の細胞が GPI アンカー欠損細胞でしめられる症例が存在することや、1 症例の中に存在するクローンのすべてが拡大したりしないことなどから、免疫学的な機序以外の因子が関与している可能性も考えられる⁴⁾。

我々は、最近、PNH 症例に、通常はあまり認められない染色体異常を伴う症例を経験した⁵⁾。この症例では、染色体異常は、GPI アンカー欠損細胞のみに認められた。つまり、この染色体異常が、GPI アンカー欠損造血幹細胞のクローナルな拡大に関与しているのではないかと考えられる。

今回、我々がこの症例の染色体異常より同定した間様系良性腫瘍の発症に深く関与する HMGI-C (HMGA2)遺伝子⁶⁾に注目し、PNH 発症のメカニズムを考察したい。

<文献>

- 1) Murakami Y et al., Blood 94:2963 (1999)
- 2) Tremml G et al., Blood 94:2945 (1999)
- 3) Maciejewski JP et al., Blood 98:3513 (2001)
- 4) Kinoshita T et al., Int. J. Hematol. 75: 117 (2002)
- 5) Nishimura J et al., Am. J. Hematol. 62: 175 (1999)
- 6) Ashar HR et al., Cell 82:57 (1995)

教育講演：補体学への招待

1. 生体防御における補体系のオリエンテーション

岡田 秀親

名古屋市立大学分子医学研究所 生体高分子部門

Hidechika Okada

Department of Molecular Biology, Nagoya City University School of
Medicine

生体内への病原微生物の侵入に対しては、皮膚や粘膜等の体表面を覆う上皮組織が物理的障壁を形成するとともに、脂肪酸や抗菌ペプチドなどの殺菌性因子によって、第一次の防御線を形作っている。そこを突破されて、上皮内あるいは上皮下に侵入した微生物に対しては、その侵入を直ちに感知して能動的に生体防御反応を始動しなければならない。しかし、それに先立ち、多くの場合は咬傷などによる上皮等の組織損傷が起こっていることが多い。そのような場合時は、上皮下の組織が、破壊された組織の毛細血管等から漏出して血液にさらされることになる。上皮直下の組織は補体第2経路を活性化する作用を持つので、咬傷局所や刺傷局所で補体活性化反応が起こることは生体防御反応における補体系の最初の役割であろうと考えている。

補体は生体内の体液にくまなく存在し、異物反応性のレクチンや自然抗体の反応に従って、直ちに補体反応が開始されるだけでなく、補体第2経路は自動活性化を継続しており、補体制御膜因子を持たない進入異物は補体活性化の場を提供し補体活性を始動することになる。補体活性化はアナフィラトキシンなども生成し、血管内皮の活性化や好中球の誘引活性化を起こし炎症巣を形成して生体防御反応を固める。Innate Immunityにおける種々のシステムの中でも補体は特異的に標的と反応する分子を介さずにも自己と異物とを識別することが出来、排除すべき異物の識別を極めて効率的に行えるので極めて重要なキャスティングボードを握っていることになる。例えば、自己細胞に対する自然抗体があっても、補体制御膜因子が補体反応を防いでしまうので、異物に対するような補体反応に引き続く免疫応答が引き起こりにくい仕組みとしても働いている。最近、Toll like receptors (TLRs)なども注目されているが、補体反応が細菌などを貪食細胞に持ちこんでからTLRsは異物処理システムと生体防御の組織的活性化システムとして働くと理解することも出来るだろう。

2. 3つの補体経路：補体活性化因子と初期反応

藤田 禎三

福島県立医科大学大学生化学第二講座

Teizo Fujita

Department of Biochemistry, Fukushima Medical University School of
Medicine

<はじめに>

免疫系の機能を簡潔に言い表すと異物（非自己）を識別する認識能力とそれを排除する能力である。高等動物における免疫系は、初期感染防御において重要な働きをする自然免疫または先天性免疫（innate immunity）と、特異的な認識機構とその記憶に特徴を持つ獲得免疫（acquired or adaptive immunity）に分けることができる。自然免疫は本来生体に備わっており、生体に侵入した病原微生物にただちに働くという特徴を持つ。そして、引き続き起こる獲得免疫の反応を確実なものとする。自然免疫は、原始的であるため、獲得免疫を持たない無脊椎動物においても普遍的に生体防御に機能している¹⁾。そして、自然免疫は、貪食作用を中心とした異物排除システムで非特異的に働くと考えられていたが、近年、この自然免疫が注目される大きな理由は、獲得免疫とは異なった認識機構と異物排除機構が明らかになったためと考えられる。特に、自然免疫において生体に侵入した病原体を非自己と認識する機構は、パターン認識と呼ばれ、微生物上に保存されている pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) に対する認識機構であると考えられている。このパターン認識分子は、胚細胞(germ line)にコードされ、獲得免疫の認識分子（抗体とT細胞レセプター）が遺伝子の再構成によって多様性を得ていることとときわだった違いを示している。このようなパターン認識分子として補体系蛋白のマンノース結合レクチン(mannose-binding lectin;MBL)と最近明らかにされたフィコリン（ficolin）が存在する。

<免疫系における補体の役割>

補体系は、抗体を認識分子として機能する古典的経路が先に発見されたため、抗体を補うという意味で補体と名付けられた。補体系が活性化されるとその第3成分(C3)が、侵入した病原微生物上に結合し、オプソニンとして機能し、食細胞に微生物を貪食させる。さらに、ある種の細菌を溶かすことができる（溶菌作用）。更に

教育-2

補体系は、アジュバントとして機能し、獲得免疫における抗体産生を増強することやアポトーシス細胞の排除に働くなどの新たな機能が明らかとなった²⁾。これらの結果は、補体欠損マウス(C1q,C3,C4,補体レセプターCR2 欠損マウス)によって得られ、特に、C3 フラグメント(C3d)の結合した抗原が補体レセプターと反応することが抗体産生には重要であるということを示している。

免疫の初期反応における補体系の活性化は、次の示す3経路で起こると考えられている。(1) 自然抗体としての IgM 抗体が古典的経路を活性化する。(2) 最近明らかにされたレクチン経路が微生物上の糖鎖を認識して活性化される。(3) C3 の沈着により、認識分子が関与しない第二経路が活性化される。この経路は、2つの経路の活性化に伴い、増幅経路としても機能する。

<補体活性化の認識分子>

古典的経路は、抗体が抗原を認識し、その結果構造的変化を起こした IgM と IgG 分子の Fc 部分に、C1 の亜成分 C1q が結合する。レクチン経路に関与する MBL と最近レクチン経路を活性化することが判明したフィコリン⁶⁾は、いずれも古典的経路の C1q と同様にコラーゲン様構造を持つ特徴がある。また、構造的にも機能的にも、ともにレクチンとして異物を多価認識するという点では IgM にも類似している。MBL (マンナン結合蛋白質 MBP と呼ばれる) は糖鎖結合にカルシウムを必要とし、マンノースや N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)などに結合特異性を示す。分子量 32 kD のサブユニットのからなり、主としてコラーゲン様ドメインと糖鎖認識ドメイン(CRD)から構成される。一方、フィコリンはコラーゲン様ドメインとフィブリノーゲン様ドメインを持つ蛋白質のファミリーで、ヒト血清には二種類のフィコリン (ficolin/P35 と博多抗原) がある。フィコリンの糖鎖結合部位はフィブリノーゲン様ドメインにある。C1q、MBL、フィコリンとも三つのサブユニットがジスルフィド結合で架橋して一つのユニットとなり、さらにユニット間の架橋でオリゴマーを形成する。

<認識分子に結合するセリンプロテアーゼ>

古典的経路の C1 分子は、C1q のコラーゲン様ドメインにセリンプロテアーゼの C1r と C1s が結合した複合体である。レクチン経路では、MBL とフィコリンに MASP(MBL-associated serine protease)と呼ばれる C1r/C1s 類似のセリンプロテアーゼが結合している。今まで3種類の MASP-1、2、3 が同定され^{10,11)}、C1r、C1s とともに一つのセリンプロテアーゼのファミリーを形成している。これらのセリンプロテアーゼは、血清中で一本鎖ポリペプチドの未活性型で存在しており、認識分子が異物などに結合すると、二本のポリペプチド(H鎖とL鎖)の活性型に転換

教育—2

する。古典的経路では抗体に C1q が結合することにより、まず C1 中の C1r の自己活性化が誘発され、引き続き C1s を活性化する。活性型 C1s は C4 と C2 を限定分解し、C4b2a から成る C3 転換酵素ができる。レクチン経路の活性化機構はいまだ不明の点が多いが、C1s に類似した MASP-2 に C4、C2 分解活性がある。一方、MASP-1 には直接 C3 を分解し、引きつづき第二経路（増幅経路）を活性化するという特徴がある。

＜補体系の起源とその役割＞

抗体やリンパ球や主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）などの獲得免疫の基本形と補体古典的経路は、サメやエイに代表される軟骨魚類で完成したと考えられている。最も原始的な脊椎動物の円口類（ヤツメウナギなど）と多くの無脊椎動物には、獲得免疫は存在せず、生体防御レクチンがパターン認識分子として機能し、自己と非自己を識別し、自然免疫に機能していると考えられる。一般的に生体防御レクチンは、自己の糖鎖と結合することではなく、侵入異物の糖鎖を認識すると考えられている。一方、補体 C3 は、棘皮動物のウニと原索動物のマボヤにおいて発見され、オプソニンとして機能していることが判明している。上述のように、原索動物のマボヤとにおいてはレクチンを認識分子として機能するレクチン経路の原型の存在が確認されている。この原型をもとに、遺伝子重複などを重ね、哺乳類の存在するレクチン経路に進化したと考えられる。また、レクチン経路を原型として、古典的経路が進化したものと思われる。このことは、抗体と補体古典的経路が出現するまで、補体レクチン経路が生体防御の中心的役割を果たしてきたことを意味し、無脊椎動物の自然免疫を高等動物の獲得免疫に橋渡しをしているということができる。

文献

1. Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, and R. A. B. Ezekowitz. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313.
2. Walport, M. J. 2001. Complement. *N. Engl. J. Med.* 34, 1058.

3. 臨床からみた補体活性

遠藤 守人

日本大学医学部内科学講座内科 2

Morito Endo

Department of Internal Medicine II, Nihon University School of
Medicine

補体系は異物の排除という点から生体防御機構として重要な役割を担っており、その活性化の欠如は様々な感染症あるいは免疫複合体病といった疾患と関連することが知られている。しかしながら一方では、過度に補体活性化が生じた場合には自己の組織をも傷害し、これもまたある種の疾患を惹起することとなる。現在、補体による組織障害が考えられる代表的な疾患として、糸球体腎炎、自己免疫疾患および虚血・再灌流傷害などを挙げることができ、実際、臨床の場においては血清補体価、補体成分の測定が行われており、さらに組織での補体成分の沈着の有無が検討されている。Classical pathway、Alternative pathway あるいは Lectin pathway が引き金となって補体活性化は開始され、その結果として細胞と補体分子との間に新たな生体反応が生じて組織・細胞の傷害すなわち疾患へと繋がるわけであるが、今回、主に糸球体腎炎について補体活性化メカニズムの面から、疾患の病因・病態への補体系の関与を考察する。

4. 補体の後期反応

岡田 則子

名古屋市立大学大学院医学研究科生体防御学

Noriko Okada

Department of Molecular Biology, Nagaya City University School of
Medicine

補体の溶解活性は最も最初に明らかにされた機能である。5種類の血漿中糖蛋白 C5, C6, C7, C8, C9 が関与し、いずれも親水性であるが、複合体形成により疎水的な構造が顕れて両親媒性となる。この複合体は分子量 $1 \sim 2 \times 10^3$ kD の膜貫通性のチャネルを形成し、細胞膜機能を破壊するので膜侵襲複合体(membrane attack complex: MAC)と呼ばれる。細菌細胞壁や赤血球膜上での MAC 形成は膜破壊を引き起こすが、有核細胞においては MAC 結合部位の細胞内取り込みや細胞外放出などの細胞機能が作動するので細胞溶解は起こりにくい。さらに、同種細胞膜上には CD59/HRF20 などの種特異的 MAC 形成阻止蛋白が存在しており MAC 形成を制御している。しかし、継続的な補体活性化による不完全な MAC 形成は細胞を活性化し病態形成に関与する。また、アナフィラトキシン C5a の生成も炎症ショック病態のファクターであり、その制御機構の解明も重要である。

5. 補体制御因子とその生体機構

瀬谷 司

大阪府立成人病センター研究所

Tukasa Seya

Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and
Cardiovascular Diseases

C3 ステップの補体制御因子 regulator of complement activation (RCA) proteins と呼ばれ、H 因子 (factor H, fH), C4b-binding protein (C4bp), complement receptor type 1 (CR1), complement receptor type 2 (CR2), decay-accelerating factor (DAF, CD55), membrane cofactor protein (MCP) の順に機能蛋白質として同定された。

これら制御因子が gene cluster (RCA cluster) を形成することが間もなく示され [1984-5]、ヒトでは chromosome 1q32 にマップされることが判明した。1次構造解析からこれらは全て short consensus repeat (SCR) と呼ぶアミノ酸 60 個余りのタンデムリピートを基本構造とすることが示された。CR1, CR2 は C3b, C3dg multimer (またはそれらの標識異物) とそれぞれ強く結合し、結合レセプターとして機能する。この 2 つと DAF, MCP は膜蛋白質であるが、全てに可溶型も存在する。一方、fH と C4bp は可溶型制御因子であるが、fH には膜型分子が報告されている。

RCA 蛋白質の機能的共通性は補体制御活性、ウィルスレセプター、細菌レセプター、受精・生殖関連因子として指摘されてきた。補体制御は C3b 又は C4b の C3 コンバーターゼ形成を阻害し、C3b/C4b の増幅的活性化を抑えることである。2つのモードが知られており、

C3b/C4b から Bb/C2a の解離を促進し、C3 コンバーターゼの安定寿命を縮める (decay-accelerating activity), 又は C3b/C4b を I 因子 (factor I) のコファクターとして不活性型に限定分解する (cofactor activity), ことで後続補体経路の活性化を抑える。前者は阻害が可逆的 (C3b/C4b は機能的に復活しうる) であるのに対し後者は不可逆的である。CR2 以外の全ての RCA 蛋白質が C3b, C4b に解離促進かコファクター活性を発揮する。液担の fH, C4bp の生理機能は C3b/C4b の機能を抑えることで補体の消耗を防ぐことである。一方、MCP, DAF は同一膜上の C3b/C4b を機能阻害して補体から自己細胞を守るように働く。

RCA 蛋白質の微生物レセプター機能は Table 1 にまとめた。それぞれが特有な取込み（細胞骨格系の再構成）とシグナル伝達を誘起する。これらは現在も推進中の研究テーマである。DAF, MCP と CD59 が精子・胎盤に高発現し特有な構造を示すことが報じられてきた。胎盤は feto-maternal junction なので補体の allo-activation を防ぐために高発現すると考えられている。精子の MCP は O 型糖鎖修飾を欠き、高発現するが inneracrosome に限局するなど DAF と分布は異なる。その意義は未だ不明である。RCA 蛋白質の gene cluster はヒト、マウス、ニワトリで証明されている。サカナでは未だ見出されていない。本稿ではヒトの制御因子を主に解説する。

Table 1. RCA proteins and their receptor function for microbial infection

Receptors	Viruses	Bacteria	Diseases
CR1	HIV, opsonin receptor	opsonin receptor	I.C diseases
CR2	EBV		Burkitt's lymphoma
DAF	Enterov, Coxsackiev, Echov	E. coli	Protein-losing enteropathy?
MCP	Measles V, HHV6	Neisseria, Streptococcus	SSPE?

I.C, immune complex; SSPE, subacute sclerosing panencephalitis

6. 補体系よりみた治療の可能性

南学 正臣

東京大学医学部附属病院 腎臓内分泌内科

Masaomi Nangaku

Division of Nephrology and Endocrinology, University of Tokyo School
of Medicine

補体の不適切な活性化の役割は、糸球体腎炎を含む種々の免疫疾患から、虚血再
環流障害、移植に至る幅広い疾患における重要性が再認識されている。このような
ことに注目して、補体系を対象とした治療が開発され、徐々に臨床応用されつつあ
る。現在注目されているのは可溶型C R 1を中心とした遺伝子組替え補体調節蛋白
を用いる方法と、ヒト型にした抗補体成分モノクローナル抗体を利用した方法であ
る。また、これとは別に、transgenic animal の手法を用いて補体調節蛋白を高発
現させた動物の臓器を、異種移植に用いる、という試みもなされている。この他に
も、低分子化合物を用いた補体系へのアプローチ、補体調節蛋白を mimic する抗
イディオタイプ抗体を用いた癌のワクチン療法なども開発されており、今後の展開
と発展が期待される。

7. 遺伝子からみた補体系の成り立ち

野中 勝

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

Masaru Nonaka

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science,
University of Tokyo

補体系は多数の成分からなる高度に組織化された生体反応系であるが、各成分の遺伝子には多様な起源のものが混在しており、その成立過程は進化学的に極めて興味深い。ここでは近年の多彩な生物種におけるゲノムサイエンスの進展により明らかになりつつある、補体系遺伝子の起源と進化についてまとめてみたい。先ず、補体系の中心成分である C3 は α 2-macroglobulin (α 2M)と呼ばれるプロテアーゼインヒビターから遺伝子重複により生じたと考えられるが、C3 遺伝子はウニ、ホヤ、ナメクジウオなどの無脊椎後口動物から見つかっている。一方、ゲノムプロジェクトが一応の完結を見ている前口動物の線虫、ショウジョウバエなどのゲノム中には、 α 2M 様遺伝子は認められるものの、C3 様遺伝子は認められず、補体系は後口動物の出現初期に成立したことが示唆される。また、哺乳類の他の補体成分に認められる各ドメインが、進化上何時出現したかを調べてみると、ほとんどのドメインはヒト、ショウジョウバエ、線虫には存在するもののシロイヌナズナ、酵母には存在せず、多細胞動物に固有のものであることが分かる。以上の結果は、補体系は後口動物が出現したころ α 2M から遺伝子重複により C3 が生じたことをきっかけに確立され、その後当時すでに存在していた様々なドメインのリクルートと遺伝子重複により成分を増やし、今日哺乳類に見られるような高度に組織化された生体反応系へと進化したと思われる。

補体研究会（補体シンポジウム）会則

I 総則

- (1) 本会は補体研究会（The Japanese Association for Complement Research）という。
- (2) 本会は補体研究会ならびにこれに関連する分野の進歩発展を図ることを目的とする。
- (3) 本会は前条の目的を達成するため、次に定める事業を行う。
 - 1) 年1回以上にわたる総会ならびに学術集会（補体シンポジウム）の開催。
 - 2) 内外の関連学術団体との連絡及び協力。
 - 3) その他の必要な事業

II 会員

- (4) 本会は、補体研究ならびにこれに関連する分野の学問の研究を志す人々、及びそれに賛同する賛助会員を以て組織される。
- (5) 本会に会員として入会を希望する者は、所定の申込書に必要事項を記入し、会費を添えて本会事務局に提出するものとする。
- (6) 本会の会費については細則で定める。
- (7) 会員は学術集会に於て、その実績を発表できると共に、その抄録集の配布を受ける。
- (8) 会員で故なくして2年間会費を滞納したものは退会とみなす。
- (9) 本会の名誉を著しく毀損した会員は、運営委員会の議を経て除名することが出来る。
- (10) 本会に特に功勞のあった方で、細則に定める規定により推薦された方を名誉会員とする。

III 役員

- (11) 本会に次の役員をおく。

会長	1名
運営委員	若干名
監事	2名
補体シンポジウム当期および次期集会長	2名

- (12) 会長は、本会を代表し、運営委員会を召集する。会長の選出は運営委員会が行い、総会での承認を得て決定する。任期は4年とし、2期を限度とする。ただし再任後の任期は2年とする。
- (13) 運営委員は会員から選挙により選出し、任期は4年とし連続の再任は認めない。細則で定めるところの選挙規定に従って2年毎に選挙を行い、半数ずつ交代するものとする。
- (14) 監事は、運営委員経験者の中から運営委員会が選出し、総会での承認を得て決定する。
- (15) 監事は会計および選挙等を監査する。監事の任期は4年とし、連続の再任は認めない。任期中監事を辞退するものが生じた際には、所定の手続きを経て速やかに後任を補充するものとし、その際の任期は前任者の残留期間とする。
- (16) 運営委員会の構成員は運営委員、補体シンポジウム集会長（当期および次期）および会長とする。
- (17) 運営委員会は、構成員の過半数の出席を要する。
- (18) 運営委員会は、会務の審議、本会の運営に当たる。
- (19) 補体シンポジウムの集会長は、運営委員会が選出決定する。

- (20) 補体シンポジウム集会長は、補体シンポジウムを主宰する。
- (21) 補体シンポジウム集会長の任期は、前期補体シンポジウム開催時に始まり、主宰補体シンポジウム終了時に終る。

IV 学術集会・総会

- (22) 年次集会（補体シンポジウム）を行う。時宜に応じて必要な集会を開催することが出来る。
- (23) 運営委員会は、補体シンポジウム開催中または必要に応じて会長がこれを召集する。
- (24) 総会は年1回、補体シンポジウム開催中に当期集会長が召集し、運営委員会決定事項の報告と必要な討議を行い、承認を求める。

V 会計

- (25) 経理会計は事務局において行うほか、必要に応じてシンポジウム集会長もこれにたずさわる。
- (26) 本会の経費は、会費・寄付金・その他の収入および利子をもってこれにあてる。
- (27) 補体シンポジウムにおいては、出席会員から参加費を徴収することが出来る。
- (28) 本会の会計年度は1月1日に始まり、12月31日に終わり、総会において会計報告を行う。
- (29) 監事は会計の監査を行い、その結果を総会において報告する。

VI 会則変更

- (30) 本会の会則を変更する場合は、総会出席会員の3分の2以上の賛成を必要とする。

付則

この会則は昭和60年3月1日より施行する。

平成2年8月7日 一部改訂

平成4年7月23日 一部改訂

平成5年7月21日 一部改訂

細 則

I 会費

- (1) 本会の年会費は当分の間年額 5,000 円とする。但し学生会員（学部学生および大学院生）は 3,000 円とする。学生会員は、学生証の写し等を毎年事務局へ提出し、確認を受けるものとする。賛助会員の会費は年間 1 口 30,000 円とする。

II 選挙規定

運営委員の選出は当分の間次の規定に従って行う。

- (2) 運営委員の定数は 6 名を原則とする。
- (3) 選挙事務は事務局において行う。
- (4) 運営委員の選挙にあたり、運営委員候補者名簿を作成する。
- (5) 運営委員候補者として、任期満了の運営委員は 3 名、運営委員経験者は 1 名を推薦することが出来る。
- (6) 事務局は、運営委員候補者名簿および投票用紙を、会員に総会開催 2 ヶ月前までに郵送し、会員はそれにもとづき、所定の日時までに 3 名連記で投票を行う。ただし、候補者以外のものに投票しても差し支えない。
- (7) 開票には、少なくとも監事 1 名の立会いを必要とする。監事は、開票結果にもとづいて、得票数の上位 3 名の運営委員と次点 1 名を定め、運営委員会および総会に報告する。
- (8) 次点者は運営委員に欠損が生じた場合に、その任に当たる。

III 事務局

- (9) 本会の事務局は会長の指名する事務局長のもとに置く。

IV 名誉会員

- (10) 名誉会員の候補者の推薦は、運営委員 2 名以上の推薦によって成立する。名誉会員候補者は運営委員会において選考され、総会の承認を得て名誉会員に決定される。

付則

細則 (1) は昭和 62 年度より、賛助会員については平成 5 年度より施行する。

平成 2 年 8 月 7 日 一部改訂

平成 4 年 7 月 23 日 一部改訂

平成 5 年 7 月 21 日 一部改訂

謝辞

下記の諸社から、補体シンポジウムへのご理解とご支援を頂きました。本会開催へのご協力を心から御礼申し上げるとともに、社名を記して深謝致します。

第 39 回補体シンポジウム

集会長 大井 洋之

ウェルファイド（株）、藤沢薬品工業（株）、富士レビオ（株）、
エーザイ（株）、塩野義製薬（株）、山之内製薬（株）、
三共（株）、興和（株）、日本ベーリンガーインゲルハイム（株）
バイエル薬品（株）、協和発酵工業（株）、持田製薬（株）
旭化成（株）、田辺製薬（株）、第一製薬（株）、
ノバステイスファーマ（株）

補体研究会賛助会員

(50音順)

トーアエイヨー (株)

日本ハム (株)

明治製菓 (株)

和光純薬工業 (株)

補体研究会

会長 藤田禎三

運営委員 岡田則子
木下タロウ
北村 肇
堀内孝彦
松尾清一
松下 操
松本美佐子
山本哲郎

監事 天野哲基
大井洋之

事務局長 松下 操

集会長 大井洋之

第13回日本生体防御学会

生体防御学会参加案内

受付 第1日 7月11日(木) 午前11:00より
講演会場 日本大学会館 (受付は2階です)
参加費 一般 5,000 円
学生 3,000 円
教育講演のみ参加 1,000 円
懇親会費 1,000 円

年会費 年会費を未納の方および新たに入会される方は、当日受付にてご納入ください。

発表方法 全て口頭で発表を行います。一般演題は討論を含めて約15分を予定しています。進行は座長の指示に従ってください。スライドプロジェクターは35 mm スライド用を一台設置いたします。スライド枚数制限はありませんが、発表時間内に終了するように準備し、発表30分以上前にスライドを受付にお渡しください。

生体防御学会理事会 第1日 7月11日(木) 12:00~13:00

生体防御学会総会 第2日 7月12日(木) 13:30~14:00

懇親会 第2日 7月12日(金) 18:30~20:30
アルカディア市ヶ谷(補体シンポジウムと合同)

プログラム

第1日 7月11日(木) 午後

原索動物及び魚類の免疫学

座長：中西 照幸 13:10～13:40

a-1. マボヤ血球における Contact Reaction 阻害抗体を用いたアロ認識機構の解明

小川 明子、松本 緑、星 元紀(慶應大・理工学)

a-2. フグの Toll-Like Receptor(TLR)遺伝子群

押海 裕之¹⁾、信田 京子¹⁾、辻田 忠志¹⁾、池尾 一穂²⁾、
松本 美佐子¹⁾、瀬谷 司¹⁾ (¹⁾大阪府立成人病センター、²⁾国立遺伝学研究所)

ヒト補体

座長：岡田 則子 13:40～13:55

a-3. Human Clg 受容体の再検討

赤津 裕康^{1) 2)}、Eamon P. McGreal³⁾、池脇 信直⁴⁾、
B. Paul Morgan³⁾、Philippe Gasque³⁾

(¹⁾福祉村病院、²⁾名古屋市立大学：医、³⁾ウェールズ医大、
⁴⁾九州保健福祉大)

細菌感染とサイトカイン

座長：鈴木 和男 13:55～14:25

a-4. リステリア由来 cytolysin のサイトカイン誘導能における N 末端配列の重要性

木本 てるみ、河村伊久雄、幸田 力、光山 正雄(京大院・医)

a-5. *Listeria monocytogenes* 感染に対する防御免疫誘導における IL-18 の役割

野村 卓正、河村 伊久雄、土屋 晃介、光山 正雄(京大院・医)

座長：桂 義元 14:25～14:55

a-6. IL-12/IL-23 及び IL-18 に依存しない結核感染防御機構の解析

金城 雄樹¹⁾、川上 和義¹⁾、上江洲 香織¹⁾、宮城 一也¹⁾、
屋良 さとみ¹⁾、高口 善信¹⁾、竹田 潔²⁾、審良 静男²⁾、
岩倉 洋一郎³⁾、斉藤 厚¹⁾

(¹⁾琉球大・一内、²⁾阪大微研、³⁾東大医科研)

a-7. 結核感染防御における IL-18 の役割：トランスジェニックマウスを用いた解析

宮城 一也¹⁾、川上 和義¹⁾、金城 雄樹¹⁾、上江洲 香織¹⁾、
星野 友昭²⁾、岡元 昌樹²⁾、川瀬 裕介³⁾、吉野 公一郎³⁾、
斉藤 厚¹⁾

(¹⁾ 琉球大・一内、²⁾ 久留米大・一内、³⁾ 日本オルガノン)

コーヒーブレイク 15:00~15:20

サイトカインとシグナル伝達

座長：岩倉 洋一郎 15:20~15:50

a-8. エリスマイシン (EM) 生体内代謝産物 EM201 の IL-2 レセプターシグナル伝達への影響

大澤 瑞穂¹⁾、²⁾、砂塚 敏明³⁾、澤井 哲夫²⁾、大村 智³⁾、
赤川 清子¹⁾

(¹⁾ 国立感染症所、²⁾ 東京理科大学・薬学、³⁾ 北里研)

a-9. インターフェロン γ によるシトクロム b558 大鎖遺伝子発現機構の解析

熊取 厚志、Yang Dan、鈴木 章一、中村 三千男 (長崎大・熱帯医研)

第2日 7月12日 (金) 午前

リンパ球と生体防御

座長：関根 輝彬 10:00~10:45

a-10. 低用量 MMC 処理による AFP 産生胃癌細胞の活性化リンパ球に対する感受性の増強

三浦 裕¹⁾、浅井 清文¹⁾、岡田 則子²⁾、岡田 秀親²⁾

(¹⁾ 名古屋市・医・分子神経生物、²⁾ 同生体防御)

a-11. ケモカイン CCL19 および CCL21 を欠損するリンパ節環境では活性化かれた CD4⁺T 細胞の多くが memory 細胞になる

安田 琢和、中野 英樹、垣内 史堂 (東邦大、医)

a-12. クリプトコツカス感染防御と $\gamma\delta$ T 細胞

上江洲 香織、川上 和義、金城 雄樹、宮城 一也、斉藤 厚
(琉球大・一内)

ウイルス感染と生体防御

座長：甲斐 知恵子 10:45～11:15

a-13. インフルエンザウイルス防災モデルにおけるニトログアニン生成とニトロ化ストレス

田村 文雄¹⁾、赤池 孝章¹⁾、岡本 真一郎¹⁾ 村上 恵理²⁾、
宮崎 公德²⁾、佐々木 一美²⁾、前田 浩¹⁾

(¹⁾ 熊本大・医、²⁾ 同仁)

a-14. マウス感染系を用いたオーエスキー病ウイルス粘膜免疫の試み

松本 安喜、高島 康弘、大塚 治城

(東大院・農学生命科学、)

カルボキシペプチダーゼ

座長：瀬谷 司 11:15～12:00

a-15. カルボキシペプチダーゼ R の Sandwich ELISA 方の再検討

赤津 裕康¹⁾、²⁾、石川 泰成¹⁾、William Campbell¹⁾、
谷 さゆり¹⁾、岡田 則子²⁾、岡田 秀親²⁾

(¹⁾ 福祉村病院、²⁾ 名市大・医)

a-16. 好中球から放出されたエラスターゼによるカルボキシペプチダーゼ R の活性化

河村 剛至、岡田 則子、岡田 秀親

(名市大・医)

a-17. 実験動物におけるカルボキシペプチダーゼ R の熱安定性

幸村 英文¹⁾、²⁾、下村 泰代²⁾、勝屋 弘忠¹⁾、岡田 則子²⁾、
岡田 秀親²⁾

(¹⁾ 名市大・医・麻酔・蘇生学、同・分子医学)

第2日 7月12日(金) 午後

リンパ球による治療

座長：海老名 卓三郎 14:00～14:15

a-18. 胞状軟部肉腫肺転移症例に対する自己活性化リンパ球療法

石黒 雅江¹⁾、赤津 裕康¹⁾、瀬戸 正史²⁾、内田 淳正²⁾、
山本 孝之¹⁾、岡田 秀親³⁾

(¹⁾ 福祉村病院、²⁾ 三重大・医、³⁾ 名市大・医)

オートプロテクション及び自然免疫

座長：岡田 秀親 14:15～14:45

a-19. オートプロテクション機構を介した四塩化炭素肝障害抵抗性の誘導

平良 全栄、矢部 一憲、三宅 清加、入江 理恵、乾 由佳、
橋田 真衣、山田 神嗣、上田 ゆかり（徳島文理大・薬学）

a-20. SPF ブタ血清中に存在するナチュラル抗ウサギ細胞 IgM 抗体について

林 砂緒、大塚 治城（東大院・農学生命科学）

原虫と生体防御

座長：渡辺 直熙 14:45～15:15

a-21. ウシヘルペスウイルス 1 型ベクターを用いた *Cryptosporidium parvum* P23 抗原の発現

高島 康弘¹⁾、玄学 南²⁾、木俣 勲³⁾、井関 基弘⁴⁾、児玉 義勝⁶⁾、長澤 秀行²⁾、松本 安喜¹⁾、見上 彪⁵⁾、大塚 治城¹⁾

(¹⁾東大院・農学生命科学、²⁾帯広畜産大・原虫病研、³⁾大阪市立大・医、⁴⁾金沢大・医、⁵⁾日本大、⁶⁾ゲン・コーポレーション)

a-22. *Toxoplasma gondii* に非感染の動物血清中に存在するナチュラル IgM 抗体による補体依存性 *Toxoplasma gondii* 中和作用

金子 陽輔¹⁾、高島 康弘¹⁾、玄学 南²⁾、長澤 秀行²⁾、見上 彪²⁾、大塚 治城¹⁾

(¹⁾東大院・農学生命科学、²⁾帯広畜産大・原虫病研)

座長：松本 芳嗣 15:15～15:45

a-23. マラリア原虫感染マウスへの脾臓における CD4+T 細胞の移動とケモカイン

早野 真史¹⁾、米山 博之²⁾、斉藤 三郎³⁾、松島 綱治²⁾、渡辺 直熙¹⁾

(¹⁾東京慈恵医大・熱帯医学、²⁾東大院・医、³⁾東京慈恵医大・DNA 研)

a-24. 熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 感染リスザルに見られた重症マラリア病態

片貝 裕子¹⁾、新垣 奈々¹⁾、Sukumawati Baski¹⁾、服部 正策²⁾、甲斐 知恵子²⁾、小野寺 節¹⁾、松本 芳嗣¹⁾

(¹⁾東大院・農学生命科学、²⁾東大・医科研)

プリオンおよび自己抗原

座長：金ヶ寄 史朗 15:45～16:15

a-25. ウイルス感染細胞におけるプリオン蛋白質の機能関与

中村 優子、金子 智美、佐伯 圭一、松本 芳嗣、小野寺 節
(東大院・農学生命科学)

a-26. 1型糖尿病自己抗原 IA-2 の各組織における発現およびその利用

竹山 夏実、坂本 毅治、佐伯 圭一、松本 芳嗣、小野寺 節
(東大院・農学生命科学)

『シンポジウム』

座長：吉開 泰信

「植物ワクチン」 15:50～17:00

新川 武

(琉球大・遺伝子実験センター)

「プリオン蛋白遺伝子の機能について」

佐伯 圭一

(東大院・農学生命科学)

『特別講座』

座長：佐藤 譲

「糖尿病自己免疫の進歩」 16:30～18:00

Abner Louis Notkins (米国、NIH)

『市民講座』

座長：小野寺 節

「プリオン、牛海綿状脳症、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病」

13:30～15:30

金子 清俊

(国立精神・神経センター神経研究所 疾患研究第七部)

追加発言：

「日本の BSE に対する政府の対策」

小野寺 節

マボヤ血球における Contact Reaction 阻害抗体を用いたアロ認識機構の解明

小川明子、松本緑、星元紀

(慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻発生生殖生物学教室)

[目的] 2 個体のマボヤの血球を接触させると崩壊する現象が観察され、この現象は Contact Reaction と名付けられた¹⁾。Contact Reaction の観察からマボヤの血球表面には自己と非自己を認識している仕組みが存在すると予想される。ホヤは脊椎動物に最も近いが無脊椎動物であるため、特異性や記憶といった免疫システムはないものの、この Contact Reaction を観察していると脊椎動物の細胞性免疫システムの原型が備わっていると考えられる。そこで、本研究室で作製されたマボヤの血球膜に対するモノクローナル抗体で Contact Reaction を阻害する ku-4-96²⁾を用いて、自己と非自己の認識に関わる分子の同定を行うべく、以下の実験を進めた。

[材料] マボヤ(*Halocynthia roretzi*)—青森県青森市浅虫で養殖された C 型個体。

[方法] ku-4-96 を結合させた異個体の血球どうしを接触させた場合、血球から放出されるフェノールオキシダーゼを定量し³⁾、コントロールと比較した。またこのときの顕微鏡観察を行った。つぎに ku-4-96 を用いた間接蛍光抗体法を行い、この抗体が認識する分子を発現している血球種を同定した。さらに血球膜を 0.2% コール酸と 0.4% デオキシコール酸の混合液で可溶化し、アフィニティーカラムを用いて ku-4-96 が認識する分子を精製した。

[結果] フェノールオキシダーゼの活性が十分認められた 2 個体の組み合わせで、それらに対し ku-4-96 を結合させた後に接触させたところ、Contact Reaction に特徴的な細胞の崩壊は観察されず、異個体の血球が存在しない場合とほとんど変化はなかった。一方コントロールでは細胞どうしが凝

集・崩壊していた。間接蛍光抗体法により、ku-4-96 が認識する血球種は、vacuolated cells と fusogenic phagocytes で、ほかの種に対しては認識しないことがわかった。ウェスタンブロット法では ku-4-96 が認識する分子の大きさは約 190 kDa、175 kDa および 145 kDa であることがわかった。

[考察] 以上の結果から、ku-4-96 が認識する分子を発現している細胞は 2 種類あり、特に全血球の半数以上を占める vacuolated cells は積極的に Contact Reaction に参加している様子が観察できるため、この血球種が主に自己と非自己の認識を担っていることが示唆された。また、過よう素酸化を行った血球膜分子に対してウェスタンブロット法を行うと、ku-4-96 が認識する分子は検出されず、このことから ku-4-96 のエピトープは糖鎖であることが示唆された。マボヤの Contact Reaction は脊椎動物の初期の免疫応答と類似している。そして脊椎動物の自己と非自己の認識に関わる分子と関連を調べるべく、ku-4-96 が認識する分子の一次配列の決定を現在行っている。

[引用文献] 1) M. Fuke, (1980) "Contact Reaction" between xenogenic or allogenic coelomic cells of solitary ascidians. Biol Bull 158: 304-315

2) 熊野 真弥 (1999) : マボヤ血球のアロ認識機構 東京工業大学 修士論文

3) N. Akita and M. Hoshi, Hemocytes release phenoloxylase upon contact reaction, allogenic interaction, in the ascidian *Halocynthia roretzi*. Cell Strc. Func. 20: 81-87

フグの Toll-Like Receptor (TLR) 遺伝子群

押海裕之¹⁾ 信田京子¹⁾ 辻田忠志¹⁾ 池尾一穂²⁾ 松本美佐子¹⁾ 瀬谷司¹⁾

¹⁾大阪府立成人病センター研究所免疫学部門

²⁾国立遺伝学研究所遺伝情報分析研究室

<はじめに>

自然免疫系での微生物構成成分の認識には、Toll-like receptor (TLR) 分子が必須である。哺乳類では TLR は、約 10 種類存在するが、それぞれの分子は異なる成分を認識する。このような認識機構がどのように進化してきたかを明らかにする目的で、公開されているフグゲノムのドラフト配列¹⁾を用い、魚類とヒトの TLR 遺伝子群の比較を行った。

<方法>

相同性検索：ヒトの TLR 分子のアミノ酸配列を用い、フグゲノムに対し BLAST で検索した。遺伝子予測：GeneMark, GeneScan の予測ソフトを用いイントロン/エクソン構造を予測し、ヒト TLR 遺伝子の配列と比較し修正を行い決定した。系統樹作成：近隣結合法または、最尤法 (ProtML) を用い作成した。

<結果>

相同性検索の結果、フグゲノムには 10 種類の TLR 分子が存在し、この中には、TLR1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 に対応するホモログ遺伝子が存在し、これらの遺伝子はヒトとフグ分岐以前に既に存在していたことが明らかとなった。しかし、TLR4, 6, 10 に相当するものは発見できず、反対に、ヒトのゲノムや EST データベース上にホモログが存在しないフグ特異的な TLR21, 22 遺伝子が存在した。ヒトとは異なり、ゼブラフィッシュでは FuguTLR21 と相同性を示す EST 配列が存在することから、TLR21 は、魚類のみ存在する TLR 分子であると推測される。

興味深いことに、フグでは、膜型の TLR5 遺伝子とは別に、細胞内領域を持たず可溶型と推測される TLR5s (TLR5 soluble) 遺伝子が存在した。我々は最近ニジマスからも可溶型の TLR5s 遺伝子を単離しており²⁾、このことは、魚類全般で可溶型の TLR5s 遺伝子が存在し、機能し

ていることを示唆する。

近隣結合法を用い作成した系統樹では、興味深いことにフグ TLR1 の枝はヒトの TLR1, 6, 10 が分岐する以前の枝から分岐していた。これは、TLR1, 6, 10 はヒトが魚類から分岐した後に形成されたことを意味する。そこで、我々は、TLR6, 10 がいつ現われたかを明らかにする目的で、他種から TLR の単離を試みたところ、ニワトリから TLR1 遺伝子の約 200 bp の部分配列を縮重プライマーを用い単離できた。この配列を用いた系統樹から、鳥類と分岐した後に、TLR6, 10 が現われたことを示唆する予備的結果を得ており、現在、遺伝子の全長の単離を試みている。

<考察>

フグに TLR1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 が存在したことから、リボ蛋白、ペプチドグリカン、ウイルス由来の二重鎖 RNA、フラジェリン蛋白質、バクテリアゲノム上の CpG DNA 等を認識する機構の起源は、従来考えられた年代³⁾よりもより古く、ヒトが魚類から分岐する以前に既に存在していたと考えられる。系統樹からは、TLR4, 21, 22 は、他の TLR と古い年代で分岐していると考えられることから、ヒトとフグの共通祖先では、TLR1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 21, 22 の 10 種類存在し、ヒトでは、TLR21, 22 を、フグでは TLR4 を進化の過程で失った可能性が考えられる。また、魚類に可溶型 TLR5s、哺乳類で TLR6, 10 が特異的に存在することから、それぞれの分岐後も、各系統で遺伝子重複が起き、新たな固有の認識機構を獲得していると考えられる。

<参考文献>

- 1) <http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk/Analysis/>
- 2) Xiu Du, et.al., Eur.Cytokine Netw.11: 362 (2000)
- 3) Tsukada, et.al., submitted. (2002)

Human C1q 受容体の再検討

赤津裕康 1、2、Eamon P. McGreal 3、池脇信直 4、B. Paul Morgan 3、Philippe Gasque 3

1. 福祉村病院・長寿研、2. 名古屋市大・医・生体高分子、3 ウェールズ医大・医・医化学、4 九州保健福祉大・保健・作業療法学

【 目的 】

ヒト C1q 受容体(C1qRp)は補体 C1q の受容体と考えられていたが、これまで直接的な interaction を示す報告はなされていない。その rodent の homolog である AA 4 抗原はマウスでは胎児幹細胞のマーカーとしてクローニングされておりその構造は C-type lectin domain と EGF 様 domain を有し接着因子を思わせる構造である。このため我々はヒト C1qRp に対する monoclonal 抗体 (mAb) を作製し、C1q を coat しての C1q との binding assay および組織分布を検討した。

【 方法 】

ヒト C1qRp cDNA を THP-1 細胞より RT-PCR にて作製し CHO 細胞に発現させるとともに、ヒト C1qRp cDNA にヒト IgG1 Fc 部分を含むキメラ分子の cDNA を作製し CHO 細胞に transfect し培養上清から protein A にて C1qRp-Ig fusion 蛋白を精製し、mAb の抗原とした。これにより BIIG-3 と BIIG-4 の 2 つの mAb 産生ハイブリドーマクローンを得た。

またこれまでに報告されていた抗 CD93 抗体、mNI-11 抗体も用いた。

【 結果 】

C1qRp-Ig は plate coat された C1q との反応において特異的結合を検出する事はできなかった。human C1qRp 抗原はこれまでに報告されてる抗原未知の抗 CD93 抗体と細胞接着を誘導する未知抗

原からクローニングされた mNI-11 抗体で認識される事が判明した。さらに組織分布の検討において C1qRp は血管内皮細胞に広く発現しておりマクロファージでは検出できなかった。

【 考察 】

これまで C1qRp とされていた抗原はヒトにおいては C1q との interaction は検出できなかった。またその組織分布も血管内皮細胞特異的で、C1q により活性化されるマクロファージ等での発現は検出できなかった。これまでに C1q の受容体として他に CRI/CD35 の報告もあり、C1qRp として認識されていた抗原は CD93 とすべきでその主な生理活性は接着因子としての機能を持つようである。

【 文献 】

1. E. P. McGreal, N. Ikewaki, H. Akatsu, B. P. Morgan, P. Gasque. Human C1qRp is identical with CD93 and the mNI-11 antigen but does not bind C1q. J Immunol. 2002; in press.
2. Y. D. Dean, E. P. McGreal, H. Akatsu, P. Gasque. Molecular and cellular properties of the rat AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor with structural homology to thrombomodulin. J Biol Chem 2000; 275: 34382-92.

リステリア由来 cytolysin のサイトカイン誘導能における N 末端配列の重要性

○木本てるみ、河村伊久雄、幸田力、光山正雄

京大院・医・微生物感染症学

酸を LLO 型に置換したキメラタンパク

【目的】

我々は、*Listeria monocytogenes* (Lm) 由来の listeriolysin O (LLO) がサイトカイン誘導能を有し、その活性には第 1-3 ドメインが重要であることを報告してきた。(1、2) 一方、同じリステリア属の *L. ivanovii* (Li) 由来の ivanolysin O (ILO) は LLO とアミノ酸相同性が高いものの、サイトカイン誘導能は低いことが明らかになった。そこで LLO のサイトカイン誘導能に必須な領域を特定するため、LLO と ILO のアミノ酸配列を比較したところ、N 末端の 13 アミノ酸配列の相同性が特に低いことが分かった。今回この N 末端領域が LLO のサイトカイン誘導能に必須であるか否かを明らかにするため、その部位のアミノ酸を置換したキメラタンパクを作製し、そのサイトカイン誘導能を解析した。

【方法】

L. monocytogenes EGD 株の *hly* 遺伝子および *L. ivanovii* ATCC 19119 株の *ilo* 遺伝子を PCR 法にて増幅し、PCR 産物を pQE31 発現ベクターに組み込んだ。このプラスミドを *E. coli* に導入してリコンビナントタンパクを作製した。リコンビナントタンパクは Ni-NTA アガロースカラムで精製し、Detoxi gel カラムで LPS を除去した後、実験に用いた。同様に、LLO の第 4 ドメインを ILO 型に置換したキメラタンパク (LLO1-3/ILO4)、ILO の第 4 ドメインを LLO 型に置換したキメラタンパク (ILO1-3/LLO4)、LLO の N 末端より 13 アミノ酸を ILO 型に置換したキメラタンパク (ilo13/LLO)、ILO の N 末端より 13 アミノ

(ilo13/ILO) を作製した。

精製したリコンビナントタンパクを各種濃度 (0.01 nM~25 nM) に調製し、等量の 1% ヒツジ赤血球浮遊液を加えて 37°C で 1 時間反応させた後、それぞれのタンパクの溶血活性を調べた。また、リコンビナントタンパクの膜傷害活性を阻害するためコレステロールで処理をした後、J774.1 細胞を 24 時間刺激し、その培養上清中の IL-6 の産生量を ELISA 法にて測定した。

【結果・考察】

rLLO は強い溶血活性を示したが、rILO の溶血活性はさらに強く、rLLO の約 8~10 倍比活性が高いことがわかった。また作製したいずれのキメラタンパクも強い溶血活性を示した。

J774.1 細胞からの IL-6 産生は LLO で刺激した場合には認められたが、ILO 刺激では低値であった。一方 LLO1-3/ILO4 刺激では強い IL-6 産生が誘導されたが、ILO1-3/LLO4 にはその活性が認められなかった。ilo13/LLO にも IL-6 産生が誘導能が認められなかったことから、LLO の N 末端から 13 アミノ酸配列がサイトカイン産生誘導能に重要であることが示唆された。

【文献】

- 1) Kohda C. et al., Infect. Immun. 70: 1334, 2002.
- 2) Nomura T. et al., Infect. Immun. 70:1049, 2002.

Listeria monocytogenes 感染に対する防御免疫誘導における IL-18 の役割

○ 野村卓正、河村伊久雄、土屋晃介、光山正雄

(京大・院医・微生物感染症学)

【目的】 *Listeria monocytogenes* (LM) 感染に対する初期防御および特異的防御免疫の誘導には宿主内因性 IFN- γ が重要な役割を果たしている。また、この IFN- γ 産生には IL-12 及び IL-18 が関与することが知られている。一方、LM 感染実験から特異的防御免疫誘導における IL-12 の重要性は明らかにされているが、IL-18 の役割については明確ではない。そこで今回、LM 感染防御における IL-18 の役割を明らかにするため、IL-18 欠損マウスに LM を感染させ、臓器内菌数の変化および各種サイトカイン産生を調べた。

【材料と方法】 C57BL/6 野生型及び IL-18 欠損マウスに *L. monocytogenes* EGD 株 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ CFU を腹腔内接種し、感染後の生存率を調べた。また 5×10^3 CFU (0.1 LD₅₀) を腹腔内接種し、脾臓及び肝臓における菌数の変化と各種サイトカイン産生を ELISA 法で測定した。さらに、 1×10^3 CFU を腹腔内接種して免疫したマウスの脾細胞を LM 加熱死菌で再刺激し、抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数を ELISPOT 法で、IFN- γ 産生量を ELISA 法で測定した。

【結果】 C57BL/6 野生型および IL-18 欠損マウスにおける LM の LD₅₀ は、それ

ぞれ 1×10^5 CFU、および 5×10^4 CFU であった。LM 感染後の IL-18 欠損マウスの脾内生菌数は野生型マウスと同様、感染 3 日目をピークとして減少したが、菌の排除は野生型より遅れる傾向にあった。脾臓中の IFN- γ 量は、野生型マウスのそれと比較して低値ではあったが感染 5 日後まで産生が持続していた。野生型マウス脾細胞の IFN- γ 産生は、抗 IL-12 抗体あるいは抗 IL-18 抗体により抑制された。免疫マウスに LM を再感染させた場合の生存率、臓器内菌数および抗原特異的な IFN- γ 産生応答は、両マウス間で大きな差はなかった。

【考察】 これらの結果より、LM 感染に対する初期防御において IL-18 は、IFN- γ 産生を誘導することで食細胞を活性化し、菌の排除を亢進すると考えられた。一方、LM 特異的 TH1 細胞の誘導に IL-18 は必須ではなく、さらに誘導された LM 特異的 TH1 細胞は、抗原刺激に対し IL-18 非依存的に十分な量の IFN- γ を産生できると考えられた。

【結論】 IL-18 は、*Listeria* 感染に対する初期防御においては IFN- γ 産生を介して宿主の感染抵抗性に寄与しているが、特異的防御免疫の誘導およびその発現には

必ずしも必要ではないと考えられた。

【引用文献】

TNF- α を介した NO 産生への関与については現在検討中である。

【考察】

IL-18 は、IL-12 と協調して作用することで NK 細胞のみならず未分化な T 細胞(TH0)にも IFN- γ 産生を誘導することができることが報告されている。

しかしながら、一旦誘導された LM 特異的 TH1 細胞は、再感染の際に抗原刺激のみで十分な IFN- γ を産生することができ、もはや IL-18 の助けを必要としない。だから、特異的防御免疫の発現フェイズ(Effector phase)には IL-18 を欠損していても IFN- γ 産生応答に影響がでない。

抗原特異的 T 細胞の分化誘導には、一般には抗原提示細胞が産生する IL-12 が Type1 への分化を方向づけ(polarization)、自身が産生する IL-2 および IFN- γ が増殖を促進すると考えられている。

IL-18 は、未分化な T 細胞に IL-12 と共に作用して IFN- γ 産生を誘導させうるが、TH1 への分化には、IL-12 があれば十分なのだと考えられる。

それは、両者のレセプター下流のシグナル伝達経路の特異性を考慮すれば説明できる。すなわち、IL-12R 下流のシグナル経路は、STAT4、Tbet の活性化を介し

て

これは IL-12 に独特な経路である。

一方、IL-18R は IL-1R family に属し、これらが共通して活性化すると考えられている NF- κ B の活性化を介して、IFN- γ 遺伝子や iNOS 遺伝子の転写を増強する。

BALB/c 系で観察された IL-18 の重要性との conflict について

一般に C57BL/6 系マウスには TH1 に偏向性があり、BALB/c 系マウスには TH2 偏向性があるといわれている。(これは、IL-12 下流の応答性の強弱によって説明されうる?)

しかしながら、BALB/c 系マウスであっても、*L. monocytogenes* で免疫すれば、強い細胞性免疫が誘導される。

刺激に対する IL-12 の産生量は、これらのマウスの間に大きな差がないことから、この現象は、IL-12 下流の応答性の強弱によって説明されうる?

BALB/c 系マウスでは、IFN- γ 産生誘導のための IL-12 のシグナルが不十分であるため、IL-18 による増強作用の有効性の比重が C57BL/6 系マウスと比較してより大きくなると考えれば矛盾しない。

IL-12/IL-23 及び IL-18 に依存しない結核感染防御機構の解析

◎金城雄樹¹, 川上和義¹, 上江洲香織¹, 宮城一也¹, 屋良さとみ¹, 高口善信¹, 竹田 潔²,
審良静男², 岩倉洋一郎³, 斎藤 厚¹

(¹琉球大・一内, ²阪大微研・癌抑制遺伝子, ³東大医科研・ヒト疾患)

[目的]

結核感染防御において IFN- γ は重要なサイトカインである。IFN- γ 誘導性サイトカインである IL-12 及び IL-18 の結核感染防御における役割は、それぞれの遺伝子欠損マウス (KO マウス) を用いた報告があるが、未だ十分には理解されていない。これまでに我々は、IL-12, IL-18 及び IL-23 を共に欠損した状態においても、IFN- γ を欠損した状態との比較で結核菌に対する感染防御能を有することを見出し報告してきた。本研究は、IL-12/IL-23 及び IL-18 に依存しない感染防御能についてその機序を明らかにすることを目的に実施した。

[方法]

8~14 週齢の IL-12p40/IL-18doubleKO (DKO) マウス, GKO マウス及び C57Bl/6 マウスを用いた。これらのマウスに経静脈的にヒト型結核菌 H37Rv (約 $1\sim3\times10^5$ CFU) を接種し、生存日数、臓器内菌数及びサイトカインの産生量を測定した。次に肺、肝及び脾臓の病理組織像を検討した。感染 2 週後に脾細胞を精製し in vitro で PPD 刺激を行い、培養上清中のサイトカインの産生を比較した。感染後の脾臓内における iNOS 及び IFN- γ mRNA の発現を RT-PCR で調べ、比較した。また DKO マウスに抗 IFN- γ 抗体または抗 TNF- α 抗体を投与し、生存率への影響を調べた。

[結果]

GKO では生存日数が DKO と比較して有意に短く、臓器内菌数が多く認められた。

血清中の IFN- γ は GKO, DKO 共に検出されなかった。病理組織像では GKO で中心部壊死を伴う肉芽腫性病変を多数認め、多数の結核菌が観察されたが、DKO では肉芽腫性病変の数及び結核菌の数も少なかった。GKO では野生型と比較して、PPD 刺激に対する感染脾細胞からの IL-10 及び IL-13 の産生が増強していた。DKO では、これらのサイトカインの産生増強は認められなかった。感染後の脾臓内における iNOS mRNA の発現は、感染 7 日目に野生型のみで認められたが、感染 21 日目には DKO においても強く発現していた。GKO では 21 日目に軽度の発現が認められる程度で、DKO と GKO の間には iNOS mRNA の発現に明らかな差が認められた。また DKO においても IFN- γ mRNA の発現が認められた。DKO に抗 IFN- γ 抗体を投与してコントロール IgG 投与群と生存率を比較したところ、生存日数の短縮が認められた。

[考察]

以上の結果より、DKO と GKO の間には結核感染防御に明らかな違いが認められた。DKO では IL-12, IL-18, IL-23 (IL-12 p40/p19) といった現在知られている 3 つの IFN- γ 誘導性サイトカインが存在しないにも関わらず、わずかながら IFN- γ が産生され、感染防御に寄与していることが示唆された。その IFN- γ 産生に関して解析を進めているところである。

結核感染防御における IL-18 の役割：トランスジェニックマウスを用いた解析

◎宮城一也¹, 川上和義¹, 金城雄樹¹, 上江洲香織¹, 星野友昭², 岡元昌樹², 川瀬裕介³,
吉野公一郎³, 斎藤 厚¹

(¹琉球大第一内科, ²久留米大・一内, ³日本オルガノン)

[目的]

結核感染防御において IFN- γ は重要なサイトカインである。IFN- γ 誘導性サイトカインである IL-12 及び IL-18 の結核感染防御における役割も、それぞれの遺伝子欠損マウス (KO マウス) を用いた報告がある。我々は今までに IL-18 の遺伝子を欠損した (IL-18 KO) マウスでは、野生型と比較して結核感染防御が減弱していることを確認した (Y. Kinjo et al. J. Immunol. in press, 2002)。今回結核感染防御における IL-18 の役割をさらに解析するために、IL-18 トランスジェニック (IL-18Tg) マウスを用いて検討を行った。

[方法]

8~12 週齢の IL-18Tg 及びリッターメイトコントロールマウス (C57Bl/6 バックグラウンド) を用いた。これらのマウスに経静脈的にヒト型結核菌 H37Rv $1\sim3\times10^5$ CFU/匹を接種し、感染 2 週後及び 5 週後の肺、肝臓及び脾臓内菌数及びサイトカインの産生量を測定した。また特異的 Th1 反応の誘導を調べるために、感染 2 週後に脾細胞を精製し in vitro で PPD 刺激を行い、培養上清中のサイトカインの産生を比較した。

[結果]

感染 2 週後では IL-18Tg においてコントロールと比較して、脾臓内生菌数の減少を認めた。また感染 5 週後では IL-18Tg においてコントロールと比較して、脾臓及

び肺内菌数の減少を認めた。血清 IFN- γ

の値は IL-18Tg で結核感染前から検出されたが、感染後著明な産生増強が認められ、コントロールと比較して有意に高かった。また IL-18Tg では血清 IL-4 及び IL-13 共に感染前から検出されたが、感染後は野生型と比較して有意な差は認められなかった。脾細胞からの PPD 刺激による IFN- γ 産生は、IL-18Tg では野生型と比較して有意に増強していた。また IL-13 の産生増強も認められたが、IL-4 は検出されなかった。

[考察]

IL-18Tg マウスは spontaneous に Th1 及び Th2 サイトカイン産生が共に亢進し、IgE 及び IgG1 産生が高まっていることが報告されている (T. Hoshino et al. J. Immunol. 166: 7014-7018, 2001)。

今回の我々の結果から、IL-18Tg マウスでは結核感染により Th1-Th2 サイトカインバランスが Th1 側にシフトし、感染防御能が亢進していた。我々は今までに IL-18KO マウスを用いた解析から、IL-18 が結核感染防御に寄与しているという結果を得ていたが、今回の結果はそのことを指示するものであった。

今後は、結核感染によって如何にして Th1 側にポラライズするのか、その詳細なメカニズムについて解析していく必要があると考えられる。

エリスロマイシン (EM) 生体内代謝産物 EM201 の IL-2 レセプターシグナル伝達への影響

大澤瑞穂¹⁾、²⁾、砂塚敏明³⁾、澤井哲夫²⁾、大村智³⁾、赤川清子¹⁾

- 1) 国立感染症研究所・免疫部 2) 東京理科大学大学院薬学研究科 微生物薬品化学研究室
3) 北里研究所

【目的】

14 員環マクロライド抗生物質の EM は抗菌作用の他、リンパ球や好中球の増加抑制や炎症性サイトカイン産生抑制など抗炎症作用を示すことが知られている。EM の T 細胞増殖抑制機構の一つとして、IL-2 依存性活性化 T 細胞の抑制が知られているが、その分子機構は未だ明らかにされていない¹⁾。EM201 は、EM 由来の生体内代謝産物で抗菌活性を持たないが、EM よりも強く IL-2 依存性活性化 T 細胞の増殖を抑制する²⁾。そこで本研究では、EM201 による IL-2 依存性活性化 T 細胞増殖抑制機構を解明するため、IL-2 レセプター (R) の発現及び IL-2R の下流のシグナル伝達として知られている ERK1/2 の活性化に対する EM201 の影響を検討することにした。

【方法】

ヒト末梢血単核球から磁気細胞分離システム (MACS) にて CD4⁺T 細胞を回収し、PHA (1/100) 刺激後、IL-2 (50U/ml) を加え 37℃、5%CO₂ にて培養して IL-2 応答性の活性化 T 細胞を得た。この活性化 T 細胞を、数時間 IL-2 非存在下で培養し、再度 IL-2 で刺激した状態で、薬剤による影響を検討した。薬剤は IL-2 で刺激する 1 時間前に添加した。IL-2R の発現は CD25 抗体を用い FACS にて解析した。IL-2 の刺激による ERK1/2 の活性化は、そのリン酸化を認識する抗体を用い Western Blot で調べた。

【結果】

1. IL-2 依存性増殖への影響 : EM、EM201 は濃度依存的に増殖を抑制したが、EM202 は高濃度においてのみわずかに増殖抑制が見られた。

2. IL-2R 発現への影響 : EM、EM201、EM202 どの薬剤も、活性化 T 細胞の CD25 発現を抑制しなかった。

3. IL-2 シグナル伝達への影響 : EM201 は ERK1/2 のリン酸化を抑制した。EM も同様の結果を得たが EM201 よりリン酸化の抑制が弱かった。EM202 はほとんど抑制しなかった。

【結論・考察】

EM201 は、活性化 T 細胞上に既に発現している IL-2R の発現には影響しなかったが、IL-2 刺激による ERK1/2 のリン酸化を抑制した。また、EM は EM201 よりも作用が弱い IL-2 刺激による ERK1/2 のリン酸化を抑制した。IL-2 依存性の増殖抑制を認めなかった EM202 は ERK1/2 のリン酸化も抑制しなかった。これらの結果より、EM201 は活性化 T 細胞の IL-2R のシグナル伝達を抑制することで、T 細胞の増殖を抑制することが明らかになった。他の IL-2R 下流のシグナル STAT5、p38 については、現在検討中である。

【引用文献】

- 1) Naoto Keicho, Shoji Kudoh, Hideki Yotsumoto, and Kiyoko S. Akagawa, et al. : Antilymphocytic activity of erythromycin distinct from that of FK506 or cyclosporin A. J. Antibiotics 46 : 1406-1413, 1993
- 2) 稲澤浩子、赤川清子、大堀雅子、砂塚敏明、乙黒一彦、大村智 : ヒト末梢血由来の免疫担当細胞に対するマクロライド系抗生物質の作用。マクロライド新作用研究会 - 2000 年 -。Jpn. J. Antibiotics 54 suppl. A : 139-142

熊取厚志、Yang Dan、鈴木章一、中村三千男
(長崎大学熱帯医学研究所炎症細胞機構分野)

【目的】

シトクロム b558 重鎖 (CYBB) は、食細胞内殺菌に重要な活性酸素を産生する NADPH オキシダーゼの必須構成成分である。1986 年に CYBB の cDNA が単離されて¹⁾以来、本遺伝子の発現調節機構の研究が進み、転写因子 PU.1 (骨髄系細胞及び B リンパ球での遺伝子発現に重要な転写因子) 及び HAF-1 (造血器細胞に普遍的に発現し未だ構成成分が明確にされていない転写因子) による遺伝子上流-53 塩基に存在する結合部位 (-53PU.1/HAF-1) を介した調節機構²⁾等の基本的発現に関わる転写調節機構が見い出されてきた。同時に CYBB 遺伝子発現が、インターフェロン- γ (IFN- γ) によって著しく誘導される事も明らかされてきた³⁾。この IFN- γ による誘導の分子機構として HAF-1 による-53PU.1/HAF-1 を介した転写促進機構が示唆されている⁴⁾ものの、十分には明らかにされていない。私たちは、本誘導にかかわる新たな機構を見出すため、以下の実験を行った。

【材料および方法】

ヒト単球系細胞株 U937 を用い本機構の解析を行った。IFN- γ による内在性 CYBB mRNA の発現誘導解析は、ノーザンブロット法により行った。プロモーター活性は、CYBB プロモーター領域を上流に挿入したルシフェラーゼレポータープラスミドを電気穿孔法により導入した U937 を IFN- γ (100U/ml) で 5 時間処理した後に溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定することにより行った。DNA 結合蛋白質の解析は、核抽出液及び各種 DNA 結合蛋白質に対する特異抗体を用いて、ゲルシフトアッセイ法にて行った。細胞内蛋白質発現の解析は、ウエスタンブロット法により行った。

【結果】

U937 において CYBB mRNA 量は IFN- γ 処理後 1 時間から 5 時間まで急激に、その後 48 時間まで徐々に増大する事が確認された。CYBB 遺伝子の +12 から-487 塩基をもつレポータープラスミドを用い IFN- γ の効果を調べたところ約 8 倍プロモーター活性が増大される事が示された。上流側より連続的にプロモーター領域を欠失させその影響を解析したところ、-115 から-96 塩基の領域の欠失により IFN- γ によるプロモーター活性の増大がほとんど無くなる事が示された。本領域内の-100 塩基には γ -activated sequence(-100GAS)が存在する事から、CYBB 遺伝子の +12 から-115 塩基を

持つレポータープラスミド (p-115/+12) を用い-100GAS 破壊の影響を調べたところ、-100GAS 破壊により IFN- γ によるプロモーター活性の増大がほとんど無くなる事が示された。ゲルシフトアッセイ法により-100GAS に結合する転写因子を解析したところ、STAT-1 α が IFN- γ 処理後 15 分以内に本シスエレメントに結合する事が示された。-88 塩基に IFN-stimulated response element (-88ISRE)が存在することが示されていた⁵⁾ので、p-115/+12 を用い-88ISRE 破壊の影響を調べたところ、IFN- γ による誘導が著しく阻害される事が示された。ゲルシフトアッセイ法並びにウエスタンブロット法により解析を行った結果、-88ISRE には IFN- γ 処理後に新たに合成される IRF-1 が結合する事が示された。

【考察および結論】

以上の結果より IFN- γ による CYBB 遺伝子発現誘導には、-100GAS が極めて重要であると考えられた。また、欠失実験で-88ISRE は含むが-100GAS は含まない p-95/+12 では、IFN- γ 誘導がほとんど認められなかったが、破壊実験で両者を含む p-115/+12 の-88ISRE 破壊により IFN- γ 誘導が著しく阻害された事から、-88ISRE はそのみでは不十分であるが、-100GAS と協調することにより IFN- γ による CYBB 遺伝子発現誘導に関与すると考えられた。また、-100GAS には STAT-1 α が、-88ISRE には IRF-1 が IFN- γ 処理後に結合する事から、STAT- α と IRF-1 が協調して CYBB 遺伝子転写を促進すると考えられた。

【引用文献】

- 1) Royer-Pokora, B., Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Goff, S. C., Newburger, P. E., Baehner, R. L., Cole, F. S., Curnutte, J. T., and Orkin, S. H., *Nature* 322, 32, 1986
- 2) Suzuki, S., Kumatori, A., Haagen, I. A., Fujii, Y., Sadat, M. A., Jun, H. L., Tsuji, Y., Roos, D., and Nakamura, M., *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6085, 1998
- 3) Newburger, P. E., Ezekowitz, R. A., Whitney, C., Wright, J., and Orkin, S. H., *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5215, 1988
- 4) Eklund, E. A., and Kakar, R., *J Immunol* 163, 6095, 1999
- 5) Luo, W., and Skalknik, D. G. *J Biol Chem* 271, 23445, 1996

低用量 MMC 処理による AFP 産生胃癌細胞の活性化リンパ球に対する感受性の増強

三浦 裕¹、浅井清文¹、岡田則子²、岡田秀親²(¹名古屋市立大学大学院医学研究科分子神経生物学、²同生体防御学)

【目的】AFP 産生胃癌は胃癌の 1-15%を占め、臨床的には通常の胃癌と比較して肝転移が頻発して外科的療法が困難である特徴を持ち、極めて予後不良であることが知られている¹⁾²⁾。AFP 産生胃癌の臨床的特徴の背景には転写因子の変異³⁾、AFP による免疫抑制効果⁴⁾などが考えられている。AFP 産生胃癌細胞の特異的な性質によって、たとえ原発巣が小さい症例でも外科的治療効果が少ないために全身の治療法を確立する意味がきわめて大きい。胃腺癌は化学療法に対する感受性が低いので活性化自家リンパ球療法を患者の了解のもとに実施した。低用量の化学療法剤は癌細胞の免疫反応感受性を高める可能性があるとする我々の仮説のもとに化学療法剤と活性化リンパ球の患者培養癌細胞に対する相乗作用について検討した。

【材料および方法】55 歳男性の胃癌原発巣から内視鏡的に得られた生検材料を collagen coated flask (Sumilon Cell-tight, Sumitomo Bakelite Col Lit.)に播種し RPMI1640 に 20%FBS を加えて初代培養を開始した。培養開始時点では fibroblast が多く混在して、それを正常細胞の内部対照として用いた。170 日間継代培養をすることに成功し、最終的には多角形の癌細胞由来の純粋細胞株として樹立することができた。抗癌剤は Fluorouracil(5-FUTM, Kyowa Hakko Col Ltd, 0.5~50 μ g/ml), Cisplatin (CDDP, RandaTM Nippon Kayaku Co. Ltd. 0.025~2.5 μ g/ml), Mitomycin-C(MMC, Kyowa Hakko, 0.6~100 μ g/ml)を培養液へ加えて 24 時間作用させて検討した。LAL(lymphokine-activated lymphocytes)は患者の抹消血 20ml から分離した単核球を抗 CD3 モノクローナル抗体で 3 日間刺激後、50 u/ml の IL-2 で増殖させ、2 週間後には活性化リンパ球の約 80% が CD8+であった。1000 倍に増殖した活性化リンパ球を実験に用いた。

【結果】胃癌細胞の臨床検体を培養開始してから 108 日目の培養状態は、80%は fibroblast であり、癌細胞は島状となって増殖する様相を呈していた。その時点での化学

療法剤の効果は 5-FU 50 μ g/ml, CDDP 2.5 μ g/ml を単独で用いた場合はほとんど影響が認められなかったが、MMC(10~100 μ g/ml)投与で著しい細胞障害が出た。ただし、MMC を 10 μ g/ml 以上投与した場合には胃癌細胞のみならず正常 fibroblast までも著しく細胞障害した。活性化自家リンパ球と培養細胞の濃度比を 1:1 で作用させた場合には、活性化自家リンパ球による細胞障害性は著明ではなかった。しかし活性化自家リンパ球の濃度比を 16:1 まで上げた条件では、著しい抗腫瘍効果を呈し、付着している培養細胞の apoptosis の誘導が観察された。培養 140 日目の細胞を用いた実験で、低用量 MMC (0.6 μ g/ml) の前処理をした培養細胞に対して活性化自家リンパ球を 1:1 の濃度比で加えて処理した場合には、胃癌細胞特異的な著しい細胞障害性が出る事が判明した。この相乗的細胞障害効果は 5-FU や CDDP での前処置によっては認められなかった。

【考察および結論】低用量 MMC (0.6 μ g/ml) 単独投与または活性化自家リンパ球の単独投与では、AFP 産生胃癌細胞への抗腫瘍効果は見出せなかったが、低用量 MMC と癌細胞と 1:1 比の活性化自家リンパ球を併用することによって正常 fibroblast への障害なしに AFP 産生胃癌細胞への特異的抗癌効果を高めることができた。

【引用文献】

- 1) Y. C. Chang, N. Nagasue, H. Kohno *et al*, *Am. J. Gastroenterol.* 85, 1480-5 (1990)
- 2) M. Mori, K. Ambe, Y. Adachi *et al*, *Cancer* 62, 534-40 (1988)
- 3) H. Kataoka, Y. Miura, T. Joh *et al*, *Oncogene* 20, 869-873 (2001)
- 4) T. Yamashita, N. Kasai, I. Miyoshi *et al*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 715-20 (1993)
- 5) T. Sekine, H. Shiraiwa, T. Yamazaki *et al*, *Biomed. Pharmacother.* 47, 73-8 (1993)

ケモカイン CCL19 および CCL21 を欠損するリンパ節環境では 活性化された CD4⁺ T 細胞の多くが memory 細胞になる

安田琢和、中野英樹、垣内史堂

(東邦大学医学部免疫学教室)

【目的】memory 細胞は 2 度目の抗原刺激に対して速やかな 2 次免疫応答を引き起こせる点で生体防御に重要であるが、その細胞数の適切な制御も欠かせない。抗原により活性化された T 細胞は一旦増殖し、effector 機能を発揮した後、多くはアポトーシスを誘導され、memory 細胞となる細胞は少数であると考えられている¹⁾。我々は、T 細胞や樹状細胞の遊走を誘導する CCL19 および CCL21 を 2 次リンパ組織に欠損する *plt* マウスで、免疫後に所属リンパ節の T 細胞反応性が長期間増加したままであることを既に発表している²⁾。本研究では、この現象を、*plt* マウスのリンパ節内において、活性化された CD4⁺ T 細胞にアポトーシスが誘導されず、memory 細胞が多数生存しているためではないかと考え、その可能性について検討を行った。

【材料および方法】BALB/c および BALB/c-*plt/plt* (*plt*)マウスの footpad ヘニワトリ卵白アルブミン(OVA)を抗原とし、Complete Freund's Adjuvant (CFA) と乳化し、免疫した。免疫後 9 日から 20 日の所属リンパ節中の CD4⁺ T 細胞の数および細胞表面マーカーについて解析した。アポトーシス細胞は、Annexin V で染色し、flowcytometer で解析した。所属リンパ節細胞の反応性は、*in vitro* で OVA とともに培養し T 細胞増殖反応を [³H]Thymidine の取り込みで測定した。

【結果】① OVA/CFA の免疫により、BALB/c では、所属リンパ節の CD4⁺ T 細胞数が、免疫後 16 日目までは増加し、以後は急激に減少した。一方 *plt* では、CD4⁺ T 細胞数は、免疫により 12 日目まで増加し、以降、20 日目にも減少せず増加したままであった。T 細胞抗原レセプター(TCR)を構成する V β 鎖のうち、OVA 特異的とされる V β 8 および V β 14 を発現する CD4⁺ T 細胞も同様な経過をとり、これらは抗原 OVA に反応した CD4⁺ T 細胞の経過を示しているものと考えられた。

② 免疫後 20 日目で、CD44^{high}、CD45RB^{low}、CD62L^{low} の memory CD4⁺ T 細胞数をリンパ節当たりでみると、*plt* で BALB/c でよりも多くなっていた。また、免疫後 20 日目の所属リンパ節細胞を *in*

vitro で抗原刺激したときの T 細胞増殖反応が、BALB/c では低下し、*plt* では高い反応性を保っていた。さらに、その培養上清中の IFN- γ および IL-4 の産生量も *plt* で BALB/c でよりも多かった。免疫後 20 日目の所属リンパ節では、*plt* で BALB/c でよりも memory T 細胞が多くなっていると考えられた。

③ 免疫後の所属リンパ節で、アポトーシス細胞の割合の変化を調べた。BALB/c では、18 日目をピークとしてアポトーシス CD4⁺ T 細胞の割合の増加が見られた。しかし、*plt* でアポトーシスを誘導された CD4⁺ T 細胞の割合は、免疫前に比べ、減少していた。免疫後 18 日目に、TCR-V β 8 および V β 14 を発現したアポトーシス CD4⁺ T 細胞の比率をみても BALB/c の方が *plt* よりも高値であった。しかし、*in vitro* でアポトーシスを誘導すると、*plt* の T 細胞も BALB/c のそれと同程度に誘導された。

【考察】*in vitro* では、*plt* の T 細胞にも BALB/c のと同様にアポトーシスが誘導された。また、CCL19、CCL21 には細胞に対しアポトーシス誘導能よりも活性化能が知られているので、*plt* 所属リンパ節の CD4⁺ T 細胞に見られたアポトーシスの低下は、T 細胞自身の欠陥や、CCL19、CCL21 の直接作用の欠如によることではないと思われる。免疫後の所属リンパ節の CD4⁺ T 細胞におけるアポトーシス誘導は抗原提示細胞による刺激の繰り返しによるとされている³⁾。CCL19、CCL21 を欠損する *plt* では、所属リンパ節へ遊走する T 細胞と抗原提示細胞である樹状細胞の数や局在に異常があることから^{2,4)}、抗原提示における頻度や相互作用の強さに BALB/c でと違いがあり、そのことが *plt* でのアポトーシス低下の原因ではないかと考えている。

【引用文献】1) Kawabe, Y. and A. Ochi. *Nature* 349, 1644 (1991)

2) Mori, S., H. Nakano, K. Aritomi, C.R. Wang, M.D. Gunn, and T. Kakiuchi. *J. Exp. Med.* 193, 207 (2001)

3) Russel, J. H. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 382 (1995)

4) Gunn, M.D., S. Kyuwa, C. Tam, T. Kakiuchi, A. Matsuzawa, L.T. Williams, and H. Nakano. *J. Exp. Med.* 189, 451 (1999)

クリプトコッカス感染防御と $\gamma\delta$ T 細胞

◎上江洲香織, 川上和義, 金城雄樹, 宮城一也, 斎藤 厚
(琉球大第一内科)

[目的]

クリプトコッカス感染防御において抗原特異的 Th1 細胞の誘導が極めて重要である。最近我々は、自然免疫細胞の NKT 細胞が初期感染防御のみならず、獲得免疫の質にまで影響を与え、クリプトコッカス感染防御に重要な役割を担うことを明らかにした (K. Kawakami et al. J. Immunol. 167: 6525-6532, 2001)。しかし、感染初期防御における NK 及び $\gamma\delta$ T 細胞といったその他の自然免疫細胞の役割は十分には理解されていない。

今回我々は、クリプトコッカス感染防御における $\gamma\delta$ T 細胞の役割についてマウスモデルを用いて解析した。

[方法]

8-12 週令の C57Bl/6 マウスに *Cryptococcus neoformans* 1×10^6 を経気道的に感染させ、経時的に肺内白血球を精製し、 $\gamma\delta$ TCR⁺CD3⁺細胞 ($\gamma\delta$ T 細胞)の割合をフローサイトメトリで解析した。次に、感染後経時的に肺内の V γ 1, V γ 6 及び V δ 1, V δ 6 mRNA の発現を調べた。また $\gamma\delta$ T 細胞の遊走に MCP-1 が関与するかどうか調べるため、MCP-1KO マウスに *C. neoformans* を感染させ、感染後経時的に肺内の $\gamma\delta$ T 細胞の割合を調べた。最後にマウスに抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体またはコントロール IgG を投与して $\gamma\delta$ T 細胞

を除去し、*C. neoformans* を感染させ、感染 7 日及び 21 日後の肺内菌数を比較した。

[結果]

感染 3 日後には $\gamma\delta$ T 細胞の割合が増加し、感染 6 日後にピークに達した後、感染 10 日後には減少した。このような $\gamma\delta$ T 細胞の割合の変化は、NKT 細胞や NK 細胞の場合と同様であった。感染後肺内に V δ 1, V δ 6 mRNA の発現増強が認められた。しかし、V γ 1, V γ 6mRNA の発現増強は認められなかった。また、MCP-1KO マウスの肺内では *C. neoformans* 感染後の NK 及び NKT 細胞の集積が障害されたが、 $\gamma\delta$ T 細胞の集積には影響が認められなかった。

一方、抗 $\gamma\delta$ TCR 抗体投与群における肺内菌数はコントロール IgG 投与群と比較して増加することはなく、むしろ減少傾向が認められた。

[考察]

以上の結果から、クリプトコッカス感染により $\gamma\delta$ T 細胞、特に V δ 1 または V δ 6+ $\gamma\delta$ T 細胞が感染局所に集積することが明らかとなり、菌排除への影響と考え併せ、この細胞が感染防御に何らかの役割を担っている可能性が示唆された。現在、 $\gamma\delta$ T 細胞の機能的役割についてさらに解析を進めているところである。

インフルエンザウイルス肺炎モデルにおけるニトログアニン生成とニトロ化ストレス

田村文雄¹, 赤池孝章¹, 岡本真一郎¹, 村上恵理², 宮崎公徳², 佐々本一美², 前田 浩¹

(1 熊本大・医・微生物, 2 同仁化学研究所)

【目的】我々はこれまで、ウイルス感染病態において過剰に産生される活性酸素・酸素ラジカルが病原因子として作用することを報告してきた¹⁾⁵⁾。例えば、マウスのインフルエンザウイルス感染に対する感染防御反応のひとつとして、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) が誘導され、局所に過剰な NO が産生されるが、NO はパーオキシナイトライトなどの活性酸化窒素種生成を介して、生体内で様々な生体分子をニトロ化し、その機能を損なうことにより感染病態の増悪の要因となる。我々は、この様な NO による生物効果をニトロ化ストレスと呼んでいる。今回我々は、NO によりニトロ化ストレスの発現メカニズムを解明するため、核酸塩基の一つであるグアニンの活性酸化窒素種によるニトロ化産物である 8-ニトログアニンの抗体を作製し、インフルエンザウイルス感染モデルにおける 8-ニトログアニン生成を検討した。

【方法】8-プロモグアニシンと亜硝酸ナトリウムより、8-ニトログアニシンを合成し、HPLC にて精製した。さらに、8-ニトログアニシンとウシ血清アルブミンのコンジュゲートを作製し、これを抗原としてウサギを免疫し、得られたウサギ抗血清から特異的抗 8-ニトログアニン (抗 8-ニトログアニシン) 抗体を精製した。また、抗体の特異性は ELISA 法にて確認した。8-ニトログアニン (8-ニトログアニシン) の生体内生成を証明するため、既報に準じてマウスインフルエンザウイルス肺炎モデルを作製し²⁾、マウスの肺組織について、本抗体による免疫染色を行った。

【結果】抗 8-ニトログアニン抗体による免疫染色により、インフルエンザウイルス感染モデルマウスの肺組織において、iNOS の発現に

ともなって、気管支・細気管支上皮細胞と一部の滲出マクロファージに濃染像が認められた。一方、正常マウス肺では、染色像は確認出来なかった。また、本抗体による染色像は、合成した 8-ニトログアニシンにより強く抑制され、iNOS 欠損マウスでは、ウイルス感染後の強い 8-ニトログアニン染色は認められなかった。

【考察および結論】以上より、ウイルス感染病巣において過剰に産生されるパーオキシナイトライトをはじめとする活性酸化窒素種が、宿主細胞の塩基核酸損傷をもたらし、生体内でニトロ化ストレスを発揮していることが示唆された。最近、感染・炎症においてほぼ普遍的に発現誘導される iNOS は、NO さらには、パーオキシナイトライトの過剰生成を介して、細胞の分化・増殖の異常や遺伝子損傷をもたらし、がん発生のメカニズムにおいて重要な役割を演じることがわかってきた。実際我々は、パーオキシナイトライトがその強力な変異原性効果を介して、ウイルスゲノムの変異を促進することを明らかにしている^{4) 5)}。今後さらに、NO によるニトロ化ストレスの分子メカニズムを解明することにより、発がん予防法の開発に貢献できるだけでなく、病原体の分子進化のしくみの一端を解き明かすことができるかもしれない。

【引用文献】1) Oda, T., Akaike, T. et al.: *Science* **244**: 974-976, 1989.

2) Akaike, T. et al.: *J. Clin. Invest.*, **85**: 739-745, 1990.

3) Akaike, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 2448-2453, 1996.

4) Akaike, T. et al.: *FASEB J.*, **14**: 1447-1454, 2000.

5) Akaike, T.: *Rev. Med. Virol.*, **11**: 87-101, 2001.

マウス感染系を用いたオーエスキー病ウイルス粘膜免疫の試み

松本 安喜, 高島康弘, 大塚治城

(東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻国際動物資源科学研究室)

【目的】オーエスキー病¹⁾は、アルファヘルペス亜科に属するオーエスキー病ウイルス(PrV)の感染により発症するブタの感染症であり、日本においても1981年に発症が認められて以来常在化している。本疾患は、幼齢豚ではしばしば致死性であり、成豚では、一過性症状を示した後回復するが、そのほとんどは、ウイルスキャリアーとなり汚染源となる。また、妊娠豚では死産・流産となる。オーエスキー病に対する経口免疫法の確立を目的とし、PrV感染細胞の経胃投与による免疫効果を検討した。

【材料と方法】PrVウイルスは、マウスに致死性感染するPrV インディアナ株を用いた。マウスは、C3H/HeN 雌 7, 8 週のものを用いた。免疫抗原としては、フォルマリンによりウイルス不活化処理をしたPrV感染CPK細胞を用い、胃カテーテルにより6回経胃投与した。抗原最終免疫の7日後に20xLD₅₀のPrVを経鼻接種し、粘膜免疫による感染防御効果を検討した。血清中の抗PrV抗体価をELISA法により測定した。また、フォルマリン処理PrV50 μ lをマウス足蹠に接種し、DTH反応を行った。免疫抗原にコレラトキシン(CT; 10 μ g/head)およびコレラトキシンBサブユニット(CTB; 80 μ g/head)を添加した際のアジュバント効果についても検討した²⁾。

【結果】PrV感染細胞を免疫したほとんどのマウスにおいてPrV特異的IgGおよび

IgAが検出されたが、PrV感染細胞のみを投与したマウスに比べ、CTまたはCTBを添加したマウスにおいて、IgG, IgA抗体価が上昇していた。PrVの経鼻接種により、PrV感染細胞のみを投与した群は、全頭死亡したが、CTおよびCTBを添加した群では、6割程度生存した。PrV経鼻接種により生存したマウスでは、IgG2a/IgG1比の上昇が認められた³⁾。CTおよびCTBを添加した群では、殆どのマウスにおいてDTH反応が認められたが、PrV感染細胞のみを投与したマウスでは認められなかった。

【考察および結論】抗原蛋白の経口免疫により、PrV感染に対する防御免疫の誘導が可能であることが示唆された。また、コレラトキシンなどのアジュバントの有用性も示された。近年、免疫抗原とCTBを融合させることによりアジュバント効果が得られることが示されている^{4), 5), 6)}。今後、PrVの1抗原分子をCTBと融合させその感染防御免疫誘導能を検討したい。

【引用文献】

- 1) S. Chinsakchai and T. W. Molitor, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 43, 107-116 (1994)
- 2) C. O. Elson and W. Ealding, *J. Immunol.*, 132, 2736-2741, 1984
- 3) L. V. Rizzo, R. H. DeKruyff, D. T. Umetsu, and R. R. Caspi, *Eur. J. Immunol.* 25, 708-716 (1995)
- 4) C. Rask, M. Fredriksson, M. Lindblad, and C. Czerkinsky, *J. Holmgren, A. P. M. I. S.*, 108, 178-186 (2000)
- 5) S. J. McKenzie and J. F. Halsey, *J. Immunol.*, 133, 1818- (1984)
- 6) C. Czerkinsky, M. W. Russell, N. Lycke, M. Lindblad, and J. Holmgren, *Infect. Immun.*, 57, 1072- (1989)

カルボキシペプチダーゼ R の Sandwich ELISA 法の再検討

赤津裕康 1、2、石川泰成 1、William Campbell 1、谷さゆり 1、岡田則子 2、岡田秀親 2

1.福祉村病院・長寿研、2.名古屋市・医・生体高分子

【 目的 】

カルボキシペプチダーゼ R (CPR) はアナフィラトキシン、キニン等の C 末端アミノ酸を切除する酵素である。この働きにより、炎症時に活性化されたケミカルメディエーターは不活性型になり過度の生体反応を制御する働きがあるものと考えられる。また CPR は昨今 Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) として線溶を抑え血栓を存続させる作用のある物質として注目されている。これまでも我々は CPR の活性測定の開発、Sandwich ELISA 法の開発とその疾患別の臨床的な意義について報告してきた。

今回我々は 1999 年に報告した ELISA 法を再検討しそれが inactivate CPR を認識せず、生理的に意味のある pro 体を主に認識する事を発見したので報告する。

【 方法 】

ヒト新鮮クエン酸血漿 (pro CPR 血漿) で、従来の Sandwich ELISA 法のプロトコールを用いた。カルシウム、Thrombin/Thrombomodulin (T/TM) を添加し 25℃ 10 分処理したものを active CPR 血漿、37℃ 2 時間処理したものを inactive CPR 血漿とした。Sandwich ELISA で用いているモノクローナル抗体 2A16、10G1(detector)は 2A16 を plate coat(catcher)とし、10G1 を HRP ラベルし detector とした。これを従来の OPD 基質で発色させ OD 490 nm で定量した。

さらに 2A16 と 10G1 の各種血漿との反応性を検

討するため

- 1) 2A16 plate に pro CPR 血漿を反応させ、各種処理血漿と 10G1 を preincubation したものを加えた系
 - 2) 2A16 plate に各種処理血漿を反応させ、10G1 を pro CPR 血漿で吸収しておいたものを加えた系
- で検討した。

【 結果 】

2A16 を plate に coat して各種 plasma を従来の ELISA 法で検出すると T/TM 処理を行なったいずれの血漿も HRP 標識 10G1 の結合が抑えられ OD 値は極度に低下した。このためこの系は pro CPR を主に認識する事が示唆された。

2A16 plate に pro CPR 血漿を反応させ、各種処理血漿と 10G1 を preincubation したものを加えるといずれも HRP 標識 10G1 による OD 値は低下したので 10G1 は total CPR を認識する事が示唆された。逆に 2A16 plate に各種処理血漿を反応させた後 10G1 を pro CPR 血漿と preincubation を行なったものを加えると inactive CPR 血漿での OD 値は全く低下しなかったので 2A16 は inactive CPR を全く認識しない事が示唆された。

【 考察 】

我々が開発した CPR ELISA システムの再検討を行なった結果、生理的に意味のある pro CPR を特異的に detect できる系である事が確認できた。

Active CPR を検出できるか否かについては完全な

結論にいたっていないが、active CPR 自体が非常に不安定なものでありかつ活性化反応状態では pro CPR と active CPR が混在する可能性が高くかつ ELISA 反応中にも active CPR が分解されてしまう可能性も考えられる。このため pro CPR と active CPR を厳密に区別して検出する事は極めて難しい問題である。

これまでの CPR の検出は活性を間接的に測定するか ELISA でも polyclonal 抗体での検出で不活性化されたものまで検出してしまう系しか存在しなかった。今後この系を用いて生理的に意義のある pro CPR の定量をすすめて各種病態と pro CPR との関連性を検討していきたい。

【 文献 】

1. Guo X, Okada N, Okada H. CPR-Total (TAFI and activated TAFI) levels in plasma/serum of hemophiliacs. *Microbiol Immunol* 2000;44:77-8.
2. Tsuboi Y, Takahashi M, Ishikawa Y, Okada H, Yamada T. Elevated bradykinin and decreased carboxypeptidase R as a cause of hypotension during tryptophan column immunoabsorption therapy. *Ther Apher* 1998;2:297-9.
3. Watanabe R, Wada H, Watanabe Y, Sakakura M, Nakasaki T, Mori Y, Nishikawa M, Gabazza EC, Nobori T, Shiku H. Activity and antigen levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 2001;104:1-6.
4. Wu KK, Matijevic-Aleksic N. Thrombomodulin: a linker of coagulation and

fibrinolysis and predictor of risk of arterial thrombosis. *Ann Med* 2000;32 Suppl 1:73-7.

好中球から放出されたエラスターゼによるプロカルボキシペプチダーゼ R の活性化

河村剛至、岡田則子、岡田秀親

(名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体高分子部門)

[目的] カルボキシペプチダーゼ R (CPR) は、トロンビンやプラスミン等のトリプシン様酵素によって前駆体のプロカルボキシペプチダーゼ R (proCPR) から生成される新鮮血清で見つかった不安定な酵素であり¹⁾、アナフィラトキシン等の炎症ペプチドの C 末端の塩基性アミノ酸を除去して不活性化する²⁾。proCPR は実験動物に LPS を投与すると消費と発現の増強が観察されるので、炎症反応期に産生される酵素も proCPR 活性化に関わる可能性があると考えられる。そこで、炎症部位に集積活性化される好中球から放出される酵素も proCPR を CPR に活性化する作用を持ち、過剰な炎症反応を制御するネガティブフィードバックシステムとして働くことを想定した。

[材料および方法] proCPR 画分の調製はヒト血漿から硫酸 3.3% 飽和上清に続き、6.7% 沈殿操作を行い、透析後 DEAE カラムクロマトグラフィーを用いて分画した。ProCPR の検出はトリプシン処理によって hippuryl-L-arginine 加水分解活性が現れることを指標とした。ProCPR 濃度は ELISA で測定した。好中球単離と刺激は Ficoll-Metrizoate 混合溶液を用いて好中球と単核白血球を分画採取し、混入した赤血球を溶解し、Hanks' buffered salt solution で各々 $2 \times 10^7/\text{ml}$ に浮遊懸濁した。サイトカラシン B を添加した後、FMLP を作用させて活性化した。ProCPR から CPR への変換は ProCPR 画分と検体とを混合し、室温で 20 分反応させる。CPR 生成活性の測定は検体と基質 hippuryl-L-arginine と酵素反応を行い、生成した馬尿酸を塩化シアヌルと混合し、405 nm の吸光度を測定した。エラスターゼ活性の測定は好中球培養上清と合成基質 suc-Ala-Ala-Ala-NA を混合して 37 °C, 1 hr 反応させた後、405 nm の吸光度を測定した。

[結果] ヒト血液より単離した好中球と単核白血球にサイトカラシン B を添加した後、FMLP で刺激した。刺激、1, 2, 4 時間後の好中球培養上清に CPR 生成活性 (CPR 生成活性化能) が検出された。刺激なしの上清にはその活性はなかった。単核白血球刺激後の上清における CPR 生成活性は低かった。種々の酵素阻害剤を好中球刺激後上清に加えたところ、エラスターゼ特異的阻害剤 MSAAPVCK が CPR 生成活性を完全に阻害した。

さらに、精製したエラスターゼを用いて CPR 生成活性を測定したところ、CPR 生成活性はエラスターゼ濃度依存的であり、MSAAPVCK により完全に阻害された。カテプシン G には CPR 生成活性はみられず、エラスターゼによる活性と協調的に働くこともなかった。トロンビン特異的阻害剤 pNP-pAPMS を好中球刺激後の上清に加えたところ、16% の阻害がかかったため、好中球刺激後の上清における CPR 生成活性にトロンビン、トロンボモジュリンも若干関与していると考えられた。しかし、トロンボモジュリン添加はトロンビンによる CPR 生成活性を高めるが、proCPR 分画へのトロンボモジュリン添加による CPR 活性はなかったので proCPR にトロンビンが混入している可能性は除外できた。また、好中球刺激後の上清による CPR 生成活性もトロンボモジュリン添加で上昇しなかった。

[結論および考察] 微生物の侵入時に活性化した補体は、好中球の局所集積や活性化を司るアナフィラトキシン C5a を生成する。カルボキシペプチダーゼ R (CPR) は、トロンビンやプラスミン等のトリプシン様酵素によって前駆体のプロカルボキシペプチダーゼ R (proCPR) から生成され、アナフィラトキシン等の炎症ペプチドの C 末端の塩基性アミノ酸を除去して不活性化する。今回、サイトカラシン B の添加後に FMLP で好中球を刺激すると、その培養上清中に proCPR を活性化する酵素を見い出した。その活性化酵素として、微生物排除機構やエンドトキシンショックと深く関わりをもつエラスターゼ³⁾が同定された。炎症部位の活性化好中球は、放出するエラスターゼの働きにより proCPR を活性化し過剰な炎症反応の抑制に働くと思われる。この機序の異常は多臓器不全等での深刻な過剰炎症を誘導する可能性もある。

[引用文献]

- 1) Campbell, W., and Okada, H. 1989. Biochem Biophys Res Commun. 162: 933-939.
- 2) Campbell, W., Lazoura, E., Okada, N., and Okada, H. 2002. Microbiol. Immunol. 46(2): 131-134
- 3) Tkalecic, J., Novelli, M., Phylactides, M., Iredale, J.P., Segal, A.W., and Roes, J. 2000. Immunity. 12: 201-210

実験動物におけるカルボキシペプチダーゼ R の熱安定性
幸村英文^{1,2}, 下村泰代², 勝屋弘忠¹, 岡田則子², 岡田秀親²

¹名古屋市立大学医学部 麻酔・蘇生学教室

²名古屋市立大学医学部 分子医学研究所 生体高分子部門

目的: Kinin や, C3a, C5a といった anaphylatoxin 等の C 末端に Arginine や lysine を持った生理活性 peptide は carboxypeptidase N(CPN)や carboxypeptidase R(CPR)により不活化される。CPN は血漿中に活性化状態で存在するが, CPR は血漿中には前駆体(proCPR)として存在し, 凝固の際や, 炎症反応により活性化する。ProCPR は carboxypeptidase U の前駆体(proCPU), 血漿 carboxypeptidase B(plasmaCPB), トロンビン活性化性線溶阻害因子(TAFI)と同一物質である。また CPR は fibrin の C 末端の lysine を切断し線溶を抑制する。生体内におけるこの複雑な CPR の機能を解明するためには, 実験動物モデルを確立することが必要である。しかし動物モデルにおける CPR の報告は限られている。このため, 我々はモルモット, ラット, ウサギ CPR の熱安定性を検討した。

方法: 血液はヒト健常ボランティア, モルモット, ラット, ウサギから採血し, それぞれ血清と, 3.8% クエン酸化血漿を調製し使用した。クエン酸化血漿中の carboxypeptidase 活性(CP 活性), 血清中の CP 活性, クエン酸化血漿の proCPR をトロンビン-トロンボモデュリン複合体(T-TM)で活性化させたものの CP 活性を測定した。CP 活性の測定には塩化シアヌルを用いた比色法を使用した。クエン酸化血漿中の CP 活性を CPN 活性, 血清中の CP 活性から CPN 活性を減じたものを血清 CPR 活性(serum CPR), T-TM により活性化させた試料の CP 活性から CPN 活性を減じたものを T-TM CPR 活性とした。

結果: T-TM CPR を作成するための T-TM の至適比率はすべての実験動物でヒトと同じであった。しかし, トロンボモデュリンのみでも実験動物ではやや活性化された。またモルモットではトロンビンのみでも活性化が見られた。また使用した T-TM の濃度は proCPR を活性化させるのに十分量であった。CPN 活性は調べたすべての実験動物でヒトと同程度の値であった。serum CPR 活性はヒトと比較して, 実験

動物で高値であった。特にモルモットの serum CPR 活性はヒトの 6 倍程度高値であった。T-TM CPR 活性はモルモット以外ではヒトと同程度であった。37℃と 25℃における熱安定性を検討した。CPN 活性はすべての実験動物でヒトと同様に 37℃においても 25℃においても失活しなかった。serum CPR 活性と T-TM CPR 活性の半減期はヒトでは 37℃でそれぞれ 6.3 分と 9.1 分, 25℃では T-TM CPR は 139 分であったが, serum CPR は 60 分では失活を認めなかった。モルモットの serum CPR と T-TM CPR 活性の半減期は 37℃でそれぞれ 11 分と 8.3 分, 25℃では 53 分と 29 分であった。ラットでは 37℃で 16 分と 13 分, 25℃では 36 分と 27 分であった。ウサギでは 37℃で 18 分と 10 分, 25℃では T-TM CPR の半減期は 47 分であった。

考察: 炎症反応時の補体の活性化の際, C3a は CPN が優位に不活化するが, C5a は CPR により優位に不活化される。また proCPR は TAFI とも呼ばれ, 線溶を抑制する。このように CPR の機能は複雑であり, 多臓器不全や播種性血管内凝固などを引き起こす炎症と血栓といった生体反応時における CPR の役割を理解するためには実験動物による解析が必要である。今回の実験でヒトと同様の測定方法が使用できることが判明した。ラットとウサギの proCPR はヒトと同様の傾向であったが, モルモットは他と比較して serum CPR 活性が高かった。これは血中のトロンビン濃度が高値の可能性が示唆された。モルモットでは, proCPR の濃度も他と比較して高値と思われた。Serum CPR と T-TM CPR の比率は動物種で違いが見られたが, これは凝固の際の proCPR の活性化の違いが考えられた。半減期は serum CPRの方が T-TM CPR より短かったが, serum CPR では阻害薬を用いてないことにより新たな活性化が進行している可能性が示唆された。25℃ではヒトと比較して実験動物では半減期が短いため, その取り扱いに注意が必要である。

胞状軟部肉腫肺転移症例に対する自己活性化リンパ球療法

石黒雅江¹ 赤津裕康¹ 瀬戸正史² 内田淳正² 山本孝之¹ 岡田秀親³

(福祉村病院長寿医学研究所¹ 三重大学医学部整形外科² 名古屋市立大学医学部生体高分子³)

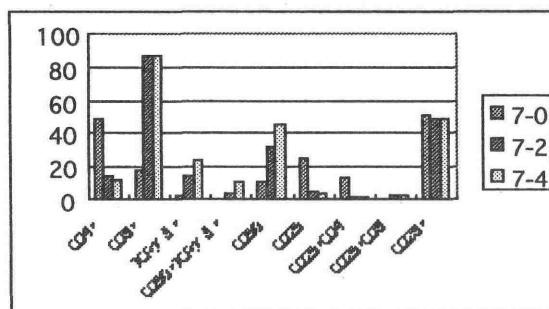
〔目的〕現在、悪性腫瘍に対して行われている、手術・放射線治療・化学療法は、外的に取り除く治療であり、これに対して免疫療法の、生体の持つ治癒力を利用して治療を行うものである。今までの免疫療法が悪性腫瘍の中心的な治療法の一つになってこなかった理由は、費用、労力のかかる割に有効な症例が少なかったということである。一方、副作用の強い化学療法の限界も明らかになりつつあり、高いQOLを保ちつつ行うことができる免疫療法が注目されている。我々は、腫瘍広範囲切除術施行後も、多発性肺転移のmass, numberとも増大していた、胞状軟部肉腫肺転移症例に対し、術後2ヶ月より、自己活性化リンパ球療法を施行した患者の経過、及び投与時リンパ球表面蛋白抗原の解析結果を報告する。

〔材料・方法〕活性化Tリンパ球は、患者末梢血40mlより、リンホセパール-Iを用いて、リンパ球を分離し、患者と同型FFP 10%およびIL-2 900JRU/mlを含むRPMI-1640+9培養液に浮遊させ、CD3抗体を底面に吸着(固層化)させたフラスコ内で培養開始、7日目にgas-permeable 1L bagに移し、FFP 1%および、IL-2 175 JRU/mlを含む養子免疫リンパ球培養培地で培養した。培養14日目に8bagまで活性化大量培養したうち、4bagを回収、点滴投与し、残りを継代培養した。週2回、合計4回投与を1クールとし、1クール総リンパ球、約 3.5×10^{10} 個を投与した。投与前日に、エンドトキシンアッセイ、及び羊血液寒天培地による無菌試験を行い、安全確認をした。

3クール目より、隔回、活性化リンパ球投与前日にMMC2mgを患者に投与した。点滴投与リンパ球表面蛋白抗原は、FACSscanにて解析した。

〔結果〕臨床経過は、8クール投与、1年後の現在、

時々、胸部の痛み、精神不安を生じるものの、肺に転移している腫瘍の増殖や、他臓器への転移もなく、



高いQOLを維持している。

図1. FACS測定結果の1例(7クール目)

〔考察〕加藤らは、胞状軟部肉腫肺転移症例に対して、切除後3年目より、3年半投与を行い、転移性肺腫瘍の最大腫瘍径の増大を認めたが、高いQOLで本疾患による症状、この治療による副作用はなく、転移性肺腫瘍発症患者の平均生存より長い延命を報告¹⁾している。岡田らは、低容量化学療法の併用での免疫療法の効果を示唆している²⁾。Liebmanは、胞状軟部肉腫切除後転移肺腫瘍は、20歳以上の症例では、予後は極めて不良であると、報告³⁾しているが、増殖の遅い難治腫瘍である本症例に対し、活性化自己リンパ球療法は、QOLが高く、副作用もほとんどなく、なんらかの併用療法により長期延命、治癒を期待できるのではないかとと思われる。また、FACSscan解析の結果も、我々が経験した予後の良い症例と同様な傾向を示しており、今後のより良い経過を期待している。

〔引用文献〕1)Y.Kato, T.Sekine, M.Fujii Biotherapy 12(5):685-687 May 1998

2)H.Okada, H.Miura The 5 th Annual Meeting of the Society of Biotherapeutic Approaches

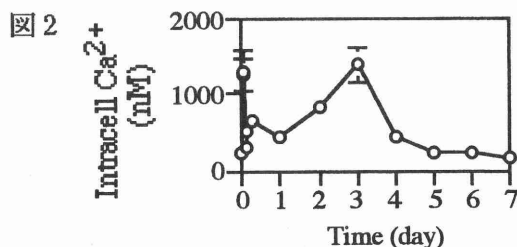
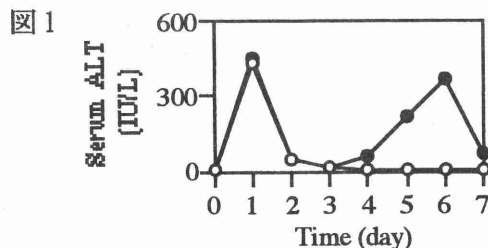
3)Lieberman, P.H. Cancer 63: 1-13, 1989

オートプロテクション機構を介した四塩化炭素肝障害抵抗性の誘導

平良全栄、矢部一憲、三宅清加、入江理恵、乾 由佳、橋田真衣、山田紳嗣、上田ゆかり

(徳島文理大学薬学部臨床薬学科薬剤学教室)

【目的】四塩化炭素の肝障害モデル動物は肝機能の研究や肝臓病の医薬品の効果を評価するために、古くから使用されている。しかし、最近、四塩化炭素やチオアセトアミドによって誘導されるオートプロテクション(自家毒抵抗性)が関心を持たれている。オートプロテクションとは、ある医薬品や毒物の致死量を投与した場合でも、その24時間前に少量の医薬品や毒物を前投与しておく、それらに致死しないという現象、あるいは、その作用をいう。この現象は、生体の防御機能の1つと見なすことができる。あるいは、医薬品の脱感作や適応現象の1つである可能性もあるが、脱感作には、医薬品の受容体の感受性の変化が関与するが、オートプロテクションは細胞分裂機構の関与が指摘されており、両者は異なる機構により起こっていると考えられている¹⁾。また、生物は外界からの光や酸素、毒物など、さまざまなストレスからの防御機構として、グルタチオンやSOD、メタロチオネインなどを介した系があるが、オートプロテクションと酸化ストレスの関係も明白でない。本研究では四塩化炭素肝障害に対するラットのオートプロテクション機構を検討した。



【実験方法】8週令のDonryu系雄性ラット(ca.250g)に四塩化炭素0.2mL/kgを1回のみ、又は毎日腹腔内投与した後、血液及び肝臓サン

プルを用いて、次の解析を行った。

- 1) 血清ALT値、2) 遊離肝細胞を調製し、Fura2-AMによる肝細胞内Ca²⁺濃度、3) 肝全RNAのRT-PCRによるカルモジュリンなどカルシウム結合性タンパク質の発現量、

【結果】四塩化炭素の低毒性の量である0.2mL/kgを腹腔内から1回投与したとき、血清ALT値(白丸)は図1のように、1日後にピーク値となり、3日後には正常値まで回復し、その後も正常値で推移した。一方、四塩化炭素0.2mL/kgを腹腔内から毎日規則的に投与した場合(黒丸)でも、1日後にピーク値になり、3日後には正常値まで回復するが、毎日投与を続けると、血清ALT値は再び上昇して、6日目にはピークになり、8日後には正常値レベルまで回復した。このことは、四塩化炭素肝毒性に対するラットの感受性には、肝障害を起こす感応期と肝障害を起こさない不感期が存在することを示している。すなわち、0、4、5日は感応期で、1、2、3、6、7日は不感期である。不感期は、オートプロテクション機構を介して肝毒性が回避されている時期である。そこで、オートプロテクションに関わる細胞内情報系を検討する目的で、四塩化炭素0.2mL/kgを腹腔内から1回投与した後の肝細胞内Ca²⁺濃度を測定したところ、1時間と3日にピークを持つ図2が得られた。二相的に変化する肝細胞内Ca²⁺濃度の規則性を明らかにするため、関連の実験を行った。また、この肝細胞内Ca²⁺に結合するタンパク質をRT-PCRにより探索する目的で、s100A4などのカルシウム結合性タンパク質を検討した。

【考察および結論】1) 四塩化炭素毎日投与では、肝障害のマーカーである血清ALT値に応答する時期と、応答しない時期、すなわち、感応期と不感期が周期的に繰り返される。2) 四塩化炭素の1回投与で、その3日後に細胞内Ca²⁺濃度がピークになることがセットされ、2~4回投与まで固定されている。4回投与後にピーク位置がリセットされる。3) この細胞内Ca²⁺を調節するカルシウム結合タンパク質はs100A4である可能性が示唆された。

【引用文献】1) EJ Calabrese, H M Mehendale (1996), Food Chem. Toxicol; 34(3): 301-11

SPF ブタ血清中に存在するナチュラル抗ウサギ細胞 IgM 抗体について

林 砂緒、大塚 治城

(東京大学大学院 農学生命科学研究科 農学国際専攻 国際動物資源科学教室)

【背景と目的】我々は以前に、ウサギ由来の細胞を SPF ブタ血清にさらすと、ウサギ細胞は損傷を受けるが、56℃30 分間非動化したブタ血清ではこの細胞損傷効果が失われることを報告した¹⁾。これはブタ血清中の補体が非自己であるウサギ細胞を認識して排除する機構によるものと考えられる。補体系には抗体により活性化される古典経路、抗体を介さない第二経路、及び酵母菌などの特殊な抗原により活性化される MBlectin 経路が報告されている²⁾。EGTA 存在下において同様の実験を行い、古典経路のみを阻害すると、ウサギ細胞はブタ血清によって損傷を受けない。このことから、ブタ血清中の何らかの因子が古典経路を活性化することが推測される。本研究ではブタ血清中に存在する古典経路を活性化する因子について調べた。

【材料と方法・結果】ウサギ腎由来 RK13 細胞はブタ血清により損傷を受けるが、EGTA 存在下では損傷を受けないことをトリパンブルー染色法により確認した。またブタ血清に予め抗 C1q 抗体を加えて古典経路を阻害すると、RK13 細胞は損傷を受けなかった。ブタ血清をゲル濾過して得られた各フラクションにおいて、RK13 細胞に損傷を与える分画の主成分は IgM であ

った。確認のためにブタ血清に予め抗ブタ IgM 抗体を加えておくと、RK13 細胞は損傷を受けなかった。生後数週間の子ブタ血清は RK13 細胞に損傷を与えないが、古典経路を活性化できる量の補体は存在した。予め RK13 細胞と 4℃でインキュベートしたブタ血清では、RK13 細胞に対する損傷効果が消失した。しかし、異種の細胞（本来ブタ血清により損傷を受けるイヌ腎由来 MDCK 細胞）に対する損傷効果は失われなかった。またブタ血清を 56℃30 分間熱すると、RK13 細胞に対する一連の損傷効果はなくなった。

【考察と結論】ブタ血清中では、生育過程においてナチュラル抗ウサギ細胞 IgM 抗体が形成され、この IgM が補体分子 C1 を介して、補体系古典経路を活性化させることが示唆された。またこの IgM 抗体は熱不安定性であり、種特異性を持つということが分かった。

【引用文献】1) K. Maeda, S. Hayashi, Y. Tanioka, Y. Matsumoto and H. Otsuka, *Virus Res.* 84,79-87 (2002)

2) K. Ikeda, T. Sannoh, N. Kawasaki, T. Nawasaki and I. Yamashina, *J. Biol. Chem.* 262, 7451-7454 (1987)

ウシヘルペスウイルス 1 型ベクターを用いた *Cryptosporidium parvum* p23 抗原の発現高島康弘¹、玄学南²、木俣勲³、井関基弘⁴、児玉義勝⁶、長澤秀行²、松本安喜¹、見上彪⁵、大塚治城¹

(¹.東京大学大学院農学生命科学研究科国際動物資源科学研究室、².帯広畜産大学原虫病研究センター、
³.大阪市立大学医学部医動物、⁴.金沢大学医学部寄生虫、⁵.日本大学 ⁶.ゲン・コーポレーション免疫
 免疫研究所)

【目的】*Cryptosporidium parvum* はさまざまな種の哺乳類に感染し下痢の原因となる原虫で獣医学領域では子牛の下痢が主な問題となっている。有効なワクチンは開発されていないが本原虫のスποロゾイト表面抗原である p23 に対する抗体が原虫の感染性を低下させることが知られている。またこの抗原で母ウシを免疫し、移行抗体によって子牛のクリプトスポリジウム感染症を防ぐ試みもなされており、部分的な成功をおさめている^{1) 2) 3)}。本研究では子牛の感染防御のために母ウシに接種するワクチンの候補として、p23 抗原を発現するウシヘルペスウイルス 1 型 (BHV-1) 組換え体を作製し、その免疫原性などを検討した。BHV-1 はウシ伝染性気管支炎の原因となるが、すでに弱毒生ワクチンが実用化されている⁴⁾。

【材料および方法】p23 タンパクを発現する組換えウイルスは BHV-1,TF7-6 株を親株として相同組換えによって作製した⁵⁾。組換え体のセレクションを容易にするため p23 遺伝子とともに Green Fluorescent Protein(GFP)遺伝子も同時に組み込み、蛍光を発するプラークをクローニングした。得られたクローンによる p23 の発現はウエスタンブロット法により確認した。またこの組換え体 (GFP、p23 とともに発現する組換え体)、および GFP のみを発現するコントロールの組換え体をウサギに腹腔接種し抗 p23 抗体価の上昇を ELISA によって確認した。10%の感染血清で

サスペンドしたオーシストを HCT-8 細胞に感染させ 24 時間後に細胞内に侵入した原虫の数を数えることで、抗血清の原虫中和力価を測定した。

【結果】得られた組換え体が p23 を発現すること、この組換え体を接種したウサギにおいて接種後 1 週間後から抗 p23 抗体の抗体価上昇がみられることが確認された。また得られた血清が、本原虫の感染を 40%以上抑制することを確認した。

【考察および結論】今回作製した組換え BHV-1 が誘導する抗体が原虫中和活性を有することが明らかになった。さらにウシを用いた実験が必要である。

【引用文献】1) Fayer, R., Andrews, C., Unger, B.L., and Blagburn, Journal of parasitology 75:393-397(1989)

2) Riggs, M.W., Stone, A.L., Yount, P.A., Langer, R.C., Arrowood, M.J., and Bently, D.L Journal of Immunology 158: 1787-1795 (1997)

3) Riggs, M.W., Schaefer, D.A., Kapil, S.J., Barley-Maloney, L., and Perryman, L.E. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46:275-282 (2002)

4) Kit, S., Qavi, H., Gaines, J.D., Billingsley, P., and McConnell, S. Archives of Virology 86:63-83 (1985)

5)Otsuka, H.,and Xuan, X. Archives of Virology 141, 57-71 (1996)

Toxoplasma gondii に非感染の動物血清中に存在するナチュラル IgM 抗体による補体依存性 *Toxoplasma gondii* 中和作用

金子陽輔¹、高島康弘¹、玄学南²、長沢秀行²、見上彪²、大塚治城¹

(1、東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻国際動物資源科学研究室 2、帯広畜産大学
原虫病研究センター)

〔目的〕 *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) はネコおよびネコ科の動物を終宿主とし、ほとんど全ての温血動物が中間宿主となる原虫である。血清中に存在する宿主の防御機構である補体系は、その主要な機構として微生物膜上に膜侵襲複合体を形成し細胞溶解を引き起こす。補体の活性化経路には第二経路、古典経路、MB レクチン経路が知られている。*T. gondii* は非感染のヒト血清による補体攻撃により中和されないことが知られているが^{1,2)}、その広い宿主域にもかかわらず他の宿主の補体との関係は知られていない。本研究においては数種の宿主の血清を用いて、補体による *T. gondii* 中和作用について調べた。また、中和作用を示したものに関しては、その中和メカニズムを解析した。

〔材料と方法〕 原虫は RH 株に GFP を発現させたものを用いた。原虫は Vero 細胞を用いて継代した。補体源としての血清は、*T. gondii* に非感染の動物から得られた血清を用いた。血清の中和作用を判断するための実験では、精製した原虫を血清とともにインキュベートした後に、増殖能力のある原虫の数を、蛍光ブランク法によりカウントした。

〔結果〕 *T. gondii* に非感染のネコ、マウス血清は原虫に対する中和作用を示さなかった。用いたネコ血清に抗体源として感染血清を加えると、中和作用を示した。マウス血清においては、同様して感染血清を加えても中和作用を示さなかった。一方、非感染のウサギ、ブタ血清は *T. gondii*

を中和した。これらの血清においては、56℃で 30 分処理する非働化処理、また、EDTA、EGTA を加えることにより、中和作用は見られなくなった。また、これらの血清に抗 IgM 抗体を加えると、中和作用を示さなくなった。

〔考察および結論〕 ネコ、マウス血清は *T. gondii* を中和せず、ウサギ、ブタ血清は中和したことから、宿主により血清の *T. gondii* 中和作用に差があることが明らかになった。また、中和作用を示したウサギ、ブタ血清においては、ナチュラル IgM が古典経路を活性化し、原虫を攻撃していることが示唆された。非感染動物血清によるナチュラル IgM を介した補体依存性 *T. gondii* 中和作用は、宿主の感染初期における防御機構において重要な知見をもたらすものであろう。

〔引用文献〕 1) Fuhrman SA, Joiner KA., in J Immunol 1989 Feb 1;142(3):940-7

2) Schreiber RD, Feldman HA., in J Infect Dis 1980 Mar;141(3):366-9

マラリア原虫感染マウスの脾臓における CD4⁺T 細胞の移動とケモカイン早野真史¹、米山博之²、斎藤三郎³、松島綱治²、渡辺直照¹(¹ 東京慈恵会医科大学熱帯医学、² 東京大学大学院分子予防医学、³ 東京慈恵会医科大学 DNA 研)

【目的】マラリア原虫感染マウスにおいて CD4⁺T 細胞が防御に重要な役割をはたす事は、抗体による細胞の特異的除去や、遺伝子改変マウスでの実験により良く知られている。自然治癒するマウスの系統では、感染赤血球が急激に減少する数日前に脾臓において IFN- γ の発現が認められ、CD4⁺T 細胞によるとされる¹⁾。マラリア感染赤血球の排除には CD4⁺T 細胞によるマクロファージ活性化が重要とされるが、脾臓のどの場所でそれがおこなわれ、それらの細胞がどのような分子機序によって適切な位置に移動するのかといったことの詳しい検索はなされていない。最近、ケモカイン・ケモカインレセプターが細胞の移動の制御に重要な役割を示すことが明らかになってきた。IFN- γ を分泌する CD4⁺T 細胞 (Th 1 細胞) は CXCR3 や CCR5 といったケモカインレセプターを選択的に発現し、IP-10/CXCL10・Mig/CXCL9 や、MIP-1 α /CCL3・MIP-1 β /CCL4・RANTES/CCL5 といったケモカインに向かって遊走することがわかってきた²⁾。今回、マラリア原虫感染マウスの脾臓での CD4⁺T 細胞の動態を経時的に調べ、その移動におけるケモカイン・ケモカインレセプターの関与について明らかにすることを目的とした。

【方法】1 \times 10⁴ 個のマウスマラリア原虫 (*Plasmodium chabaudi* AS) 感染赤血球を 6-8 週令の C57BL/6 マウス♀に経静脈的に感染させた。毎日尾静脈より採血し、血液薄層塗末標本作製しギムザ染色の後、原虫密度を測定した。また経時的に脾臓を摘出し、IFN- γ 、CXCR3、CCR5、IP-10/CXCL10、Mig/CXCL9、MIP-1 α /CCL3、MIP-1 β /CCL4、RANTES/CCL5 の発現を RT-PCR により調べた。さらに、CD4⁺T 細胞、Mac-1⁺細胞の局在や IP-10/CXCL10、Mig/CXCL9 タンパクの局在を免疫組織染色法により調べた。

【結果】マラリア原虫は感染後 4 日目より末梢血中にみとめられるようになり、5 日目より急激に原虫密度は増大し、9 日目には最大となり約 50% となった。そ

の後急速に原虫密度は低下し、13 日目には 5% となり、その後再度上昇し、15 日目には約 30% となり、また減少して 21 日目には末梢血中にはみとめられなくなった。CD4⁺T 細胞は感染後 3 日目まで白脾髄の T 細胞領域に限局していたが、5 日目より赤脾髄にもみられるようになり、マラリア原虫感染赤血球が急激に減少する直前の感染後 7 日目にはかなりの数の CD4⁺T 細胞が赤脾髄にみられるようになった。また、その時期に脾臓で IFN- γ の発現がみられ、Th1 細胞に選択的に発現する CXCR3 や CCR5 といったケモカインレセプターの発現の増強がみられた。CXCR3 のリガンドである IP-10/CXCL10・Mig/CXCL9 は同時期に発現の増強がみられた。しかし、CCR5 のリガンドである MIP-1 α /CCL3・MIP-1 β /CCL4・RANTES/CCL5 の発現は恒常的でその時期に発現は増強しなかった。感染後 7 日目の脾臓で、IP-10/CXCL10、Mig/CXCL9 は赤脾髄の髄索の血管内皮と思われる位置にタンパクの局在が認められた。二重染色により感染後 7 日目の赤脾髄で CD4⁺T 細胞と Mac-1⁺細胞が近接している像がみられた。

【考察および結論】赤脾髄に発現した IP-10/CXCL10・Mig/CXCL9 が CXCR3 を発現する Th1 細胞を赤脾髄に遊走させ、Th1 細胞から分泌された IFN- γ により赤脾髄のマクロファージが活性化し、マラリア原虫感染赤血球が排除されると考えられる。

【引用文献】

- 1) Meding SJ. et al., Infect Immun 58: 3671(1990)
- 2) Lanzavecchia A. and Sallusto F., Science, 290:92(2001)

熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 感染リスザルに見られた重症マラリア病態片貝祐子¹、新垣奈々¹、Sukumawati Baski¹、服部正策²、甲斐知恵子²、小野寺節¹、松本芳嗣¹¹東大・院・農・応用免疫、²東大・医科研・実験動物

【目的】熱帯熱マラリアは脳性マラリア等重篤な合併症を併発することが知られており、脳症状を呈した場合は適切な処置がなされなければ致死性である。脳性マラリアで死亡した患者の脳では、赤内型マラリア原虫感染赤血球 (PRBC) による毛細血管の栓塞像 (sequestration) 及び輪状出血斑 (ring hemorrhage) がしばしば見られることが知られている¹⁻⁴⁾ が、熱帯熱マラリアの病態形成機構については未だ不明な点が多い。熱帯熱マラリア原虫は宿主特異性が強く、チンパンジーなど高等類人猿を除くとリスザル *Saimiri sciureus* 及びヨザル *Aotus trivirgatus* の2種の新世界ザルで実験感染が成立するにすぎず、適切な重症病態モデルは知られていない。本研究では、リスザルを用いた熱帯熱マラリア原虫感染による重症マラリアの病態の再現に初めて成功した。

【材料及び方法】原虫は熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* Indochina-I/CDC 株、動物はボリビア由来リスザル *Saimiri sciureus boliviensis* を用いた。感染リスザルより採取した血液から血漿および白血球を除去し、PRBC 数として 1×10^9 個を非感染リスザルに静脈内接種した。この方法で感染させたリスザル6頭について、臨床症状を観察し、赤血球感染率の変動をモニターした。感染8～12日目に全身20臓器組織を採取し、光学顕微鏡により病理組織学的に検索し、一部は透過型電子顕微鏡による超微形態的検索を行った。

【結果】接種されたリスザルでは、赤血球感染率は接種8～9日目に22～51%に達し、熱帯熱マラリアに典型的な48時間周期の体温変動、血色素尿の排出、沈鬱・痙攣・意識障害・嗜眠等の神経症状等重篤な症状が引き起こされ、同様の方法で感染させた6頭のうち3頭が死亡した (他の3頭は瀕死と判定し麻酔死させ剖検に供した)。何れのサルにおい

ても著明な貧血、脾腫、及び肺の混濁化等が認められ、脳の断面には点状出血が観察された。病理組織学的検索では、全頭の脳組織において ring hemorrhage が多数確認された。透過型電子顕微鏡による観察を行ったところ、血管内皮細胞の細胞質が薄くなり、基底膜が一～四層になり波状を呈した像がしばしば認められた。なお、このような出血像は他の臓器組織では認められなかった。一方、観察した全ての組織において sequestration が確認され、特に心筋、骨格筋、腎の傍皮質、皮下織等の微少血管において高率に観察された。脳の毛細血管でも sequestration が見られたが、その程度は心筋などに比べ低頻度であった。

【考察及び結論】以上の結果より、リスザルに熱帯熱マラリア原虫感染リスザルの血液を接種することにより、昏睡を来す重篤なマラリアを発症させることができ、ヒトと同様の病理組織学的変化を再現できることが示された。また神経症状を現わしたリスザルの脳組織の解析から、sequestration よりもむしろ ring hemorrhage が脳性マラリアの発症に深く関与することが示唆された。以上、熱帯熱マラリア原虫感染リスザルモデルが重症ヒト熱帯熱マラリアの実験動物モデルとなることが初めて示された。

【引用文献】1) Riganti, M., Pongponratn, E., Tegoshi, T., Looareesuwan, S., Punpoowong, P., Aikawa, M. Immunol. Lett., 25: 199-206, 1990

2) Sein, K.K., Maeno, Y., Thuc, H.V., Anh, T.K., Aikawa, M. Am. J. Trop. Med. Hyg., 48(4): 504-511, 1993

3) Maneerat, Y., Pongponratn, E., Viriyavejakul, P., Punpoowong, B., Looareesuwan, S., Udomsangpetch, R. Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health, 30(4): 643-9, 1999

4) White, V.A., Lewallen, S., Beare, N., Kayira, K., Carr, R.A., Taylor, T.E. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 95(6): 618-21, 2001

ウイルス感染細胞におけるプリオン蛋白質の機能関与

中村優子、金子智美、佐伯圭一、松本芳嗣、小野寺節

(東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻応用免疫学教室)

【目的】ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に属するコクサッキーウイルス B 群 (Coxsackievirus B: CVB) は、髄膜脳炎¹⁾、急性膵臓炎²⁾、乳児期、幼児期における糖尿病^{3, 4)}、あるいは心筋炎⁵⁾の主な原因ウイルスであるとされる。我々は第 12 回生体防御学会にて、プリオンノックアウトマウス胎児の海馬より分離、不死化された細胞株が CVB 感染に対し高感受性を示すことを報告し、本細胞株が CVB 分離に非常に有用な細胞株であることを示した。また、我々はこの細胞株を用い、正常型プリオン蛋白質 (cellular isoform of Prion Protein: PrP^C) の神経細胞におけるアポトーシスへの関与を示唆する結果を既に発表している⁶⁾。CVB は感染細胞にアポトーシスを誘導することが示唆されており、本実験にて CVB 感染時に PrP^C の機能が関与するかどうか検討を行ない、PrP^C 機能の探索を目的とした。

【材料および方法】まず、プリオン遺伝子 (prion protein gene: *Prnp*) 欠損細胞株 HpL3-4 を用いて *Prnp* 再導入株を樹立し、*in vitro* の PrP^C 機能解析系の確立を試みた。*Prnp* ORF を組み込んだベクターをリポフェクション法にて HpL3-4 にトランスフェクションし、薬剤選択により *Prnp* 安定発現細胞株をクローニングした。さらにこれら *Prnp* 欠損、再導入株での CVB3 感染実験を試みた。各細胞株でのウイルス増殖は抗 CVB3 抗体を用いた間接蛍光抗体法および細胞上清・細胞のウイルス力価により評価した。また、CVB3 感染初期の Type I Interferon (IFN) 産生を mRNA の転写レベルおよび vesicular stomatitis virus に対する増殖阻害活性にて比較検討した。さらに、感染細胞のエチジウムブロマイド、アクリジンオレンジ染色による形態学的観察、抽出 DNA の電気泳動を用いた生化学的解析による DNA 断片化の検出、ローダミン染色によるミトコンドリア内膜電位の測定を行なった。

【結果】樹立された *Prnp* 再導入株は、神経細胞で報告されたと同様、PrP の細胞表面における産生局在および糖鎖付加パターンを示すことを確認した。また、*Prnp* 欠損、再導入株は共に神経細胞様の性質を保持していると考えられた。両細胞株に CVB 感染を試みたところ、感

染は両細胞株とも成立したが、再導入細胞株においては CVB 増殖の抑制および細胞変性効果の軽減が確認された。また、CVB 感染初期において、Type I IFN は mRNA への転写およびその活性ともに再導入株において高い傾向が認められた。さらに、感染細胞の形態学的観察において、欠損細胞株でのみ凝集、断片化した核が観察され、これらの抽出 DNA は電気泳動像において典型的なラダーを示した。また、欠損細胞株では CVB 感染時にミトコンドリア内膜電位の低下が顕著に検出された。

【考察および結論】PrP^C は種間において高度に保存されていることが判明しており、重要な役割を担っていることが予想される。また、神経細胞や免疫系細胞などに産生が認められることから、神経系におけるシグナル伝達や免疫システムにおける機能が予想される。その正常機能については十分な解明がなされていないが、本研究において、PrP^C 存在下では CVB 増殖抑制、およびミトコンドリア膜電位の低下を伴うアポトーシスシグナル伝達が抑制されることが示唆された。PrP が Type I IFN 産生やミトコンドリアを経由するアポトーシスシグナル伝達にどのようなカスケードを経て関与するか現段階では明らかではないが、ウイルス感染時における PrP^C の機能関与を示唆する新たな知見を得たと考えられる。

【引用文献】1) J. L. Melnick, in *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds. (Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996), vol. 2, pp. 655-712.

2) C. W. Imrie, J. C. Ferguson, R. G. Sommerville, *Gut* 18, 53 (1977)

3) J. W. Yoon, M. Austin, T. Onodera, A. L. Notkins, *N. Engl. J. Med.* 300, 1173 (1979)

4) G. B. Clements, D. N. Galbraith, K. W. Taylor, *Lancet* 346, 221 (1995)

5) N. R. Grist and D. Reid, in *Viral Infections of the Heart*, J. Banatvala, Ed. (Arnold, London, 1993), pp. 23-31

6) C. Kuwahara, T. Onodera et al, *Nature* 6741, 225 (1999)

1 型糖尿病自己抗原 IA-2 の各組織における発現およびその利用

竹山夏実¹ 坂本毅治¹ 佐伯圭一¹ 松本芳嗣¹ 小野寺節¹

(1: 東大 院農 応用免疫)

マウス組織における IA-2 mRNA が、中枢神経系 (大

【背景】インスリン依存性糖尿病 (1 型糖尿病)

は、膵島ランゲルハンス島β細胞の破壊によって引き起こされる自己免疫疾患の一種と考えられている。1 型糖尿病の自己抗原となる分子は、これまでもインスリンや GAD65 分子などが主に挙げられてきたが、近年新たにインスリン分泌顆粒膜に存在する PTP ファミリーに属する IA-2 が発見された¹⁾。IA-2 は種間相同性が高く、そのマウスゲノムは 23 個のエクソンより構成されている²⁾。IA-2 の mRNA 発現は脳の神経細胞、膵島の細胞で既に発現が確かめられているが、IA-2 の生体内における機能については未知のままである³⁾。IA-2 ノックアウトマウスを用いた研究により、インスリン分泌に異常を持つことが示唆されている⁴⁾。

【目的】IA-2 の機能を解明することは、糖尿病発症における IA-2 の関与を明らかにしていく手がかりとなると期待できる。そこで、①マウスにおける IA-2 mRNA 局在を検証し、この蛋白の組織別発現を解析すると共に②IA-2 と EGFP (Enhanced type of green fluorescent protein) の融合蛋白を作製し、細胞内における IA-2 分子の分布、動向を解析することを目的とした。

【方法】①C57BL/6J マウスより各組織を摘出し、total RNA からの RT-PCR 法およびパラフィン切片を用いた *in situ* hybridization 法により、IA-2 mRNA の細胞内、組織内局在を確認した。②IA-2 と EGFP の融合蛋白を、マウス膵島β細胞株 MIN6 で発現させ細胞内局在について調べた。

【結果】①RT-PCR, *in situ* hybridization 法により、

脳・小脳・延髄・脊髄)、内分泌系 (下垂体・甲状腺・副腎・膵臓)、消化器系 (胃・小腸・直腸) の各組織において発現していることが確認された。②MIN6 において IA-2-EGFP 融合蛋白は細胞内の分泌顆粒に局在することが示唆された。

【考察】①IA-2 mRNA は、神経内分泌系の組織に局在して発現していることが明らかとなり、IA-2 がホルモンや神経伝達物質の分泌に関与する蛋白であることが示唆された。②IA-2-EGFP 融合蛋白はホルモン分泌顆粒の可視化に利用できると考えられた。

【文献】1) Notkins, A.L., Lan, M. S., Leslie, D. G. (1998) IA-2 and IA-2 β : the immune response in IDDM Diabetes/Metab. Rev. 14, 85-93.

2) Saeki, K. Xie, J., Notkins, A. L. (2000) Genomic structure of mouse IA-2: comparison with its human homologue. Diabetologia 43, 1429-1434.

3) Shimizu, S., Saito, N., Kubosaki, A., Sungwook, S., Takeyama, N., Sakamoto, T., Mastumoto, Y., Saeki, K., Mastumoto, Y., Onodera, T., (2001) Developmental expression and localization of IA-2 mRNA in mouse neuroendocrine tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 228, 165-171

4) Saeki, K. Zhu, M., Kubosaki, A., Xie, J., Lan, M. S., Notkins, A. L. (2002) Targeted disruption of the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 results in alternations in glucose tolerance tests and insulin secretion. Diabetes 51. (in press)

植物ワクチン

新川武

(琉球大学遺伝子実験センター)

植物ワクチンとは組換え技術により植物に外来遺伝子としてのワクチン遺伝子を導入し、その植物体にワクチン抗原を産生させたものである。1980年代中ごろから米国を中心に研究が進められてきており、現在、日本では機能性タンパク質の植物による産生という意味で「分子農業 (plant molecular farming)」の一部として研究開発が進められている。植物ワクチンはヒトや家畜動物、野生動物を対象としており、従来のワクチンよりも低価格化が期待できるところに最大の魅力があると考えられている。組換え植物によるワクチンの生産は大きく分けて2つに分類できる。ひとつは、植物をワクチン抗原の「生産工場」として利用し、そこから抽出・精製するワクチンを接種する方法である。二つ目の方法は、植物をワクチン工場として利用するだけでなく、その植物を食べることで経口免疫する「食べるワクチン」の開発である。しかし、食べるワクチンの場合、幾つかの報告を除いては、単にワクチン蛋白質を含む植物を食べるだけでは免疫原性が低いことが分かっていたため、我々は腸管毒素のひとつであるコレラ毒素のB鎖(CTB)をワクチンの運搬体として利用することを試みた。まず、ジャガイモやタバコはCTB本来の5量体を形成し、レセプター(GM1 ガングリオシド)に対する親和性を保った状態で産生されることが分かった¹⁾。また、最近では酵母も同様にB鎖遺伝子を高発現し、その培養上清や酵母の経口投与でsystemic IgG抗体の産生を誘導できることが分かった(未発表)。

次に、CTBタンパク質のワクチン抗原の運搬機能を調べるため、CTBとインスリン遺伝子やロタウイルス由来遺伝子との融合遺伝子を構築し、ジャガイモを形質転換した結果、融合タンパク質は5量体を形成し、レセプターに対する親和性を保っていた。また、そのジャガイモの経口投与によってインスリン特異的IgG(特にIgG1)が誘導されていることを確認した^{2,3)}。以上のような結果に基づき、我々は現在、組換えタンパク質特異的な液性免疫の誘導により感染防御が可能な病原体に対する家畜動物やヒト向けの食べるワクチンの開発に関する基礎研究を行っている。しかし、植物ワクチンの大きな課題は、経口免疫寛容をいかに回避し、感染防御効果を得るかであると思われる。考えられるひとつの方法は、粘膜を介して誘導されるsystemicな抗体のみで効くワクチン抗原を選択することである。もうひとつは、組換え植物の経口投与によって細胞性免疫を効率よく誘導できる方法を見出すことであるが、現時点ではこれは極めて困難であると考えている。今回、これまでの植物ワクチン研究の紹介と、第一番目の方法に関して、マラリア伝搬阻止ワクチンの免疫実験を例に、粘膜を介して進入しない病原体に対する粘膜ワクチンの可能性を紹介したい。

参考文献

- 1) Arakawa T, Chong DK, Merritt JL, Langridge WH. (1997) Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res.* 6:403-13.
- 2) Arakawa T, Yu J, Chong DK, Hough J, Engen PC, Langridge WH. (1998) A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nature Biotechnol.* 16:934-8.
- 3) Arakawa T, Yu J, and Langridge WH. (2001) Synthesis of a cholera toxin B subunit-rotavirus NSP4 fusion protein in potato. *Plant Cell Report* 20:343-348.

プリオン蛋白遺伝子の機能について

佐伯圭一

(東京大学・大学院農学生命科学研究科・応用免疫学研究室)

スクレイピー病原体についてはスローウイルス、非通常ウイルスと様々な仮説がこれまでに提唱されてきた。1970年後半から1980年に入ると感染脳から感染価のきわめて高いスクレイピー病原体画分が精製された。この分画はDNAやRNAなどの遺伝物質を破壊する操作には感染力を失わず、蛋白分解および修飾操作によって感染力を消出した。1982年、プルシナー博士によってプリオン(蛋白質性病原因子)仮説が提唱されたが当初疑問視されていた。(1)

[プリオン蛋白質]

精製病原体画分の主要な蛋白質が同定されプリオン仮説にちなんでプリオン蛋白質と命名された。1985年半ばヒト、ハムスター、マウスと次々にプリオン蛋白質 cDNA が報告されるが、一方でプリオン蛋白質は正常個体の遺伝子上に存在することも明かとなった。この後、感染個体からのみ精製される蛋白分解酵素抵抗性のプリオン蛋白質をスクレイピー型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})、正常個体が持っている蛋白分解酵素感受性のプリオン蛋白質を正常細胞型プリオン蛋白質(PrP^C)と呼ぶようになった。

[PrP 遺伝子ノックアウトマウス]

1992年 Bueler らによって PrP 遺伝子ノックアウトマウスが作製され Nature に発表されて以来、これまでに世界で6系統のノックアウトマウスが作製され報告されている。(2) 我々も理研の糸原博士らが作製した Rikn 型 PrP 遺伝子ノックアウトマウスを維持し研究に用いて

いる。PrP^C を持たないマウスは共通して病原体プリオンの接種に対してプリオン病を発症せず抵抗性である。このことからプリオンの複製には PrP^C が必要であることが証明され、こんにちではプリオン仮説が病原体および病原体の複製機構を説明する上で支持されよく用いられている。

[プリオン蛋白質の機能]

PrP 遺伝子ノックアウトマウスが作製され解析が進んではいるが、哺乳動物が本来持っている PrP^C の生理機能については決着がついていない。我々は1999年 Nature に PrP^C がアポトーシス抑制に関与していることを報告した。(3) また、PrP^C は2価の金属特に銅イオンと結合しすることが報告されている。PrP^C と酸化ストレスとの関係を研究していくことによって、本疾患に特徴的な神経細胞死発現機構が明らかになっていくのかもしれない。今回、我々が行なってきた PrP 遺伝子および PrP^C の機能解析について紹介したい。

参考文献

- 1) Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 216:136-144.
- 2) Bueler H et al. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature 356: 577-582
- 3) Kuwahara C et al. (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. Nature 400: 255-256

Autoantibodies as Predictors of Disease

Abner Louis Notkins, M.D.

National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Serum autoantibodies have been used for the last 100 years to diagnose recent and past bacterial and viral infections. Serum autoantibodies also have been used to diagnose autoimmune diseases, but now it is becoming clear that the presence of certain autoantibodies can be used to predict the development of clinical disease in otherwise asymptomatic individuals. I will discuss this concept in the context of type 1 diabetes and the autoantigen IA-2.

Based on sequence analysis the autoantigen IA-2 is a member of the protein tyrosine phosphatase family. It is a transmembrane protein located in secretory granules and expressed in neuroendocrine cells, particularly in pancreatic islets and the brain. Because of two critical amino acid substitutions in its catalytic domain, IA-2 is enzymatically inactive. IA-2 belongs to ancient gene family. It is expressed in most mammalian species and homologs have been found in zebra fish, *Drosophila* and *C. elegans*. The function of this protein is not known, but recent knock out experiments suggest that it plays a role in insulin secretion.

By use of a sensitive radioimmune assay, autoantibodies to IA-2 have been found in the sera of nearly 70% of newly diagnosed patients with type 1 diabetes. These autoantibodies react exclusively with the intracellular domain of the molecule and recognize primarily conformational epitopes. Approximately the same percentage of patients with type 1 diabetes, but not always the same individual, also have autoantibodies to a second major autoantigen, glutamic acid decarboxylase (GAD 65). Taken together, nearly 90% of newly diagnosed patients have autoantibodies to one or the other or both autoantigens. Thus, autoantibodies to these two proteins have become diagnostic markers to identify individuals with autoimmune type 1 diabetes.

Perhaps even more important, these autoantibodies appear years before the development of clinical disease and have become predictive markers for identifying individuals at high risk of developing type 1 diabetes. Based on studies from a number of laboratories it is now estimated that the presence of autoantibodies to both IA-2 and GAD carries nearly a 50% risk of developing type 1 diabetes within 5 years and an even higher risk within 10 years. As a result, populations are now being screened for autoantibodies to IA-2 and GAD to identify high-risk subjects for entry into therapeutic intervention trials.

Autoantibodies also have provided new insight into patients classified as having type 2 diabetes. Approximately 5% to 10% of these patients have antibodies to IA-2 and/or GAD. Thus, either a number of patients originally classified as having type 2 diabetes have been misclassified and really have type 1 diabetes or some of these individuals have a combination of type 1 and type 2 diabetes. Although these numbers seem small, since about 16 million people in the United States have type 2 diabetes, if only 5% of these have been misclassified, the number of patients with type 1 diabetes would be almost doubled.

Finally, what we have learned from the studies on IA-2 and GAD in regard to autoantibodies as predictors of disease might be applicable to many of the other chronic autoimmune diseases. In fact, in some of these diseases, it already is known that autoantibodies appear years before clinical symptoms. If, in the future, prospective studies validate the predictive value of these autoantibodies, high throughput procedures for measuring these autoantibodies and identifying individuals at high disease risk will almost certainly become an integral part of the routine medical examination.

「プリオン、牛海綿状脳症、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病」

金子清俊

(国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第七部)

[はじめに]

平成 13 年 9 月 10 日に千葉県で日本第一頭目のいわゆる狂牛病、正式名称牛海綿状脳症 (以下 BSE) に罹患した牛が発見された。さらにその後も、BSE 罹患牛の発見が相次ぎ、日本中にプリオン病に対する懸念が広がっている。その一因は、英国における変異型 **Crutzfeldt-Jakob disease (variant CJD)** と呼称されるヒトのプリオン病が、BSE に由来すると考えられているからである(1)。プリオン病は、ヒト及び動物における神経変性疾患の一群の呼称であり、プリオン蛋白がその病因に関与することが明らかにされている(2, 3)。

[プリオンとは]

プリオンは "**proteinaceous infectious particles**" (感染性を持つ蛋白質粒子) から作られた造語である(4)。その命名者であるスタンレイ＝プルシナー博士 (1997 年度ノーベル医学生理学賞受賞) は、それまで猿等を用い年余の単位でしか判定が不可能であったプリオン感染性の評価に、ねずみなどの小動物を用いると同時に潜伏期間と感染力価とを相関させることで、本疾患の解析の能率を一挙に月の単位にまで飛躍的に向上させることに成功した。その結果、彼は感染力価がプロテアーゼ抵抗性の蛋白質と相関し核酸画分とは関連がないこと、感染性は蛋白質不活化条件により消失するが、核酸不活化条件下では変化しないことなどより、本疾患の原因として蛋白質のみが関与するという前例のない疾患概念を提唱した。当初、この概念は生物学のセントラルドグマに反するものとして疑問視され、1985 年、正常個体にもプリオン蛋白が存在すること (正常プリオン蛋白 (PrP^{C}))、及び病的感染性プリオン (前述のごとく PrP^{Sc}) とはアミノ酸の一次構造上相同であることが判明するにいたって頂点に達した(5)。しかしその後、(1) PrP^{Sc} は宿主ゲノムにコードされている PrP^{C} のアイソフォーム蛋白であり、両者にアミノ酸一次構造上の差異は認められないが、タンパク質分解酵素に対する部分抵抗性、界面活性剤への不溶性及び感染性の有無により両者は区別されることが、(2) PrP^{C} の β -シート型構造が 3%以下

であるのに対し PrP^{Sc} では 40%以上と著増しており、蛋白高次構造の変化がその背景にあると考えられること、などが明らかになり、 PrP^{Sc} が鋳型となった PrP^{C} の高次構造変換が PrP^{Sc} 複製機構そのものである、との概念は現在では広く受け入れられている(2, 3)。実際、 PrP^{C} をノックアウトしたマウスには PrP^{Sc} は伝播しないことや(6)、アミノ酸変異を持つ PrP^{C} を発現するトランスジェニックマウスが伝播性プリオン病を自然発症する事実(7)は、この概念を支持する。

[変異型 CJD の診断]

BSE に由来するとされるヒト変異型 CJD は、従来から見られる古典的な孤発性 CJD とはその臨床像にかなりの隔たりが認められる。図-1 に変異型 CJD と孤発性 CJD の臨床症状の比較、図-2 に変異型 CJD の診断基準を示す(8)。詳しい理由は不明であるが、変異型 CJD は平均発症年齢が 20 歳代と若年層にみられるのが特徴であり、さらに平均罹病期間の延長が認められる。検査所見としては、PSD などの脳波異常も認められないが、いわゆる **pulvinar sign** と称される頭部 MRI 所見が非常に有効である。また、扁桃腺生検が有効な場合がある。変異型 CJD の診断は、基本的には除外診断であるが、これらの詳細は別項に譲る。

ここで一番注目すべきは、初発症状の違いである。従来の孤発性 CJD とは大きく異なり、変異型 CJD は、10 代から 20 代において様々な精神症状と異常感覚から初発するケースが多いという点である。これらの症状を認めた場合、まず精神科を初診するケースが多いと予想される。つまり、第一線の精神科医こそが、変異型 CJD の患者さんを初診する可能性が最も高いのである。では、本邦における変異型 CJD 発症の可能性はどうか？図-3 に今までの BSE 罹患牛頭数の年度別推移を示す。英国に始まった BSE が、いわゆる肉骨粉の輸出に数年遅れてヨーロッパ諸国、さらには日本を含めた国々に拡散していく様子が見てとれる。また、例えば香港の変異型 CJD の患者さんのように、英国在住歴の長い日本人が数年から数十年

と予想される潜伏期間を経た後、帰国後に発症される可能性も否定できない。今後の日本において、とりわけ精神科の先生方には若年層の精神疾患の鑑別診断のひとつとして、変異型CJDを疑う目を持っていただくことも必要ではないかと考える次第である。

[プリオン病の治療に向けて]

現在のプリオン病治療・予防法開発の試みは、大きく2つのアプローチに分けられる。一つは、基礎実験の積み重ねから理論的に導かれてきたアプローチ、もう一つは、理論はともかく現在医薬品として承認されている薬を幅広く調べることで、プリオン病に効果のある薬を見つけ出そうというアプローチである。

前者のアプローチとしては、(1) PrP^{Sc}の鋳型となるPrP^Cを分解してしまう方法(標的1)、(2) 前述のドミナントネガティブ効果を持つ防御型プリオン蛋白を利用する方法(標的2)、(3) 抗プリオン抗体を用いる方法(標的3)などがある。第一の方法に関しては、PrP^{Sc}の材料となるPrP^Cを分解しても異常が現れないことは、PrPノックアウトマウスの実験が既に知られている(9)。しかし、この実験結果は、人間で副作用が表れない事を保証しない。ねずみでは異常が現れなくとも、ヒトがヒトである所以の、ヒト脳の繊細な知能、感覚などに異常が出る可能性が無いとは断言できない。第二の防御型プリオン蛋白質による、自らのみならず共存する変異を持たない野生型PrP^Cにも防御効果が発揮される現象は、ドミナントネガティブ効果と呼称されている(10)。実際に、この防御型プリオン蛋白を発現させたtransgenic miceによる実験では、プリオン病の発症予防が可能であることが既に確認されている。今後の問題はこれらの防御型プリオン蛋白を、いかにして体細胞レベル、すなわち小児や成人の成熟脳に大量に発現させるかといった点である。第三の方法は、PrP^Cを認識する抗プリオン抗体を先にPrP^Cと反応させることで、PrP^{Sc}とPrP^Cとの反応を阻害し、結果的にPrP^{Sc}の増殖を抑制しようとするアプローチである(11)。実際に培養細胞を用いた実験では、抗プリオン抗体によってPrP^{Sc}の増殖が押さえられ、最終的にはPrP^{Sc}が消滅してしまうことが確認された。またin vivoにおいても、既に抗プリオン抗体を発現するリンパ球を増殖させる事での感染予防効果が確認されている。

別のアプローチとして、作用機序や薬の効く仕組みはともかく、今ある医薬品の中からとにかく有効な薬物を見つけようという観点から同定されてきた薬物としては、抗マalaria薬、抗精神病薬、泌尿器系の薬剤、クロロフィル誘導体、といった薬物が既に同定されている(12, 13)。これらの中の複数の薬剤に関しては、カリフォルニア大学サンフランシスコ校、九州大学や福岡大学等で、近々臨床治験が予定されている。これらは、既に医薬品として認可を受けているため、倫理問題等がクリアされ、実際に効果が確認されれば、そのまま治療にすぐ使える可能性がある一方で、まだ患者さんの数が少なく効果を確認するのが難しいという問題がある。平成13年夏、変異型CJDの患者さんにマalariaの薬が試され、その患者さんが歩けるようになり、ご親族と会話が交わせるようになったと言うセンセーショナルな話題が世界を駆け巡ったが、本当にこれらの薬剤がCJDに有効と言えるのかという問いに対しては、結論を出すには時期早尚といわざるを得ない。今後の慎重な検討結果に期待したい。

[文献]

1. R. G. Will, et al., *Lancet* **347**, 921-925 (1996).
2. S. B. Prusiner, *Science* **252**, 1515-1522 (1991).
3. S. B. Prusiner, et al., *Cell Biology of Prions*. P. S. B., Ed., Prion Biology and Diseases (Cold Spring Harbor, New York, 1999).
4. D. C. Bolton, M. P. McKinley, S. B. Prusiner, *Science* **218**, 1309-1310 (1982).
5. B. Chesebro, et al., *Nature* **315**, 331-333 (1985).
6. H. Bueler, et al., *Cell* **73**, 1339-1347 (1993).
7. K. K. Hsiao, et al., *Science* **250**, 1587-1590 (1990).
8. R. G. Will, et al., *Ann Neurol* **47**, 575-82 (2000).
9. H. Bueler, et al., *Nature* **356**, 577-582 (1992).
10. K. Kaneko, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10069-74 (1997).
11. D. Peretz, et al., *Nature* **412**, 739-43 (2001).
12. K. Doh-Ura, T. Iwaki, B. Caughey, *J Virol* **74**, 4894-7. (2000).
13. C. Korth, B. C. H. May, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, *PNAS* **98**, 9836-9841 (2001).

生体防御学会設立の趣旨

生物は外来性の異物や自己成分の一部を適切に処理して、個体の独立性、恒常性を維持する生体防御機構を備えている。この防御機構を生命体の種を超えて把握するため、生体防御学会を設立する。

平成2年2月3日

研究対象

本学会では研究対象として下等生物からヒトに至る生体防御系を広く取り上げる。また防御因子としては、凝集素群、殺菌性・殺ウイルス性などの活性因子、原始的ならびに分化の進んだ食細胞系細胞、原始的免疫現象などが主な研究対象となる。リンパ球による抗原特異的免疫現象は脊椎動物防御系の一つの因子としてこれに含む。

予想される効果とその成果の活用

進化の段階での種々の生命体について各防御因子の研究が進み、その役割と位置が明らかになると共に、それぞれの要素が発展していく様相を把握できる。また生命体個体における防御因子の受け渡しの時間的経過と進化によって獲得した要素の関係が体系的に理解できる。寄生体や体内外異物の処理機構とその限界が明らかになる。

これらの成果によりヒトの疾患の治療、予防、健康の維持について新しい局面が開かれることが期待される。またバイオインダストリーを含む畜産学、水産学などの高い生産性の維持に多大の影響があるものと予測される。

研究領域

【個体レベルでの研究】

系統発生の各段階における各動物種に見られる生体防御系の特性
各防御因子の役割とその重要性の度合、各防御因子の時間的受け渡し
個体発生における防御系の発達、その系統発生との関係

外来性異物（寄生体、化学物質など）の処理機構

自己成分（老廃成分、損傷細胞、不要活性物質、変態前組織など）の処理機構

外的環境（放射線、光、温度、酸素などの物理化学的要因、ストレスなど）による自己変性とその修復
寄生体などのエスケープ機序

【器官レベルでの研究】

- ・生体防御系のネットワーク（単核食細胞、リンパ系、未発達のもの）の解析、その相互作用および調節（情報伝達、増幅、制御）
- ・系統発生・個体発生における発達の様相
- ・環境とネットワーク



【集団レベルでの研究】

- ・疾患の予防、健康維持 集団での健全さの維持
- ・生体防御機構異常の遺伝学的把握
その制御



【細胞レベルでの研究】

- ・防御系細胞の異物・変性自己成分の識別
- ・受容体、情報伝達、応答、異物排除機構、各細胞間の相互作用
- ・メディエーターとその受容体、情報伝達応答、体液性防御因子との関わり
- ・これらの個体発生、系統発生、寄生体のエスケープ機序



【生態学的レベルの研究】

- ・動物種間の相互関係（共存と排除）
- ・環境変化と生体防御
- ・生体防御の比較生物学

【分子レベルでの解析】

- ・細胞レベルでの問題の無細胞系での解析（例えば、防御に関する受容体、情報伝達、応答、損傷とその修復など）
- ・遺伝子レベルでの解析、人工生産

日本生体防御学会会則

第1章 総 則

- 第1条 本学会は日本生体防御学会 (Japanese Society for Bio-Defence Research; JSBDR)と称する。
- 第2条 本学会は生体防御学会およびその関連分野の進歩発展を図ることを目的とする。
- 第3条 本学会の目的を達成するために、次の事業を行う。
- 1 学術集会ならびに総会の定期的開催
 - 2 シンポジウムやセミナーの開催
 - 3 国内外の諸学術団体との連絡および協力活動
 - 4 その他必要な事業

第2章 会 員

- 第4条 本学会は正会員および賛助会員をもって組織する。
正会員は、生体防御研究に関連する領域の研究者またはこれに学問的関心を有するもの、賛助会員は本会の目的に賛同し、その事業を援助しようとする個人または団体を、その資格要件とする。
- 第5条 正会員および賛助会員になろうとする者は、入会金ならびに当該年度の会費を添えて事務局に申し込むものとする。
- 第6条 入会金、正会員会費、賛助会員会費の額は別途定める。年会費は毎年12月末日までに翌年度分を納入することとする。

第3章 役 員

- 第7条 本学会に次の役員をおく。
- | | |
|------|------------|
| 会長 | 1名 |
| 理事 | 運営委員数の概ね2割 |
| 運営委員 | 正会員の1割以内 |
| 監事 | 2名 |
- 第8条 会長は、理事会により推薦された候補者のうちから正会員の投票により選出する。理事および監事は、運営委員のうちから運営委員の投票により選出する。投票により選出された理事のほかに、理事会が必要と認める者若干名を理事に指名することができる。運営委員は正会員の投票により選出するものとし、選出方法は執行細目により別に定める。理事、運営委員の定数は改選毎に理事会で定める。何れの役員も任期は3年とする。
- 第9条 会長は本学会を代表して会務を総括するとともに、理事会ならびに運営委員会を招集しその議長を務める。理事は会長とともに理事会を構成し、本学会の重要事項を審議々決し会務を執行する。監事は本学会の会計業務を監査する。運営委員

は理事、監事の選挙権を持ち、会長の委嘱に応じて各種委員会に参加することができる。

第10条 理事会は本学会活動の必要に応じた委員会を設置することができる。委員は運営委員の中から理事会が選出する。

第4章 総会、学術集会

第11条 総会ならびに学術集会は年1回開催する。

第12条 本学会の事業、予算・決算、役員、会則の変更、その他理事会において必要と認めた事項は総会において承認を得るものとする。

第13条 年次総会、学術集会に総会長をおく。総会長は理事会の推薦により会長が委嘱する。

第14条 理事会の議決を経て、必要に応じたシンポジウム、セミナーを適宜開催することができる。

第5章 会則の改訂

第15条 本学会会則を改正するには、理事会の議決を経た後、総会の承認を得るものとする。

附 則

本会則は平成6年7月12日からこれを施行する。

役員選出施行細則

第1条 役員の選出は、会則第8条に規定するものを除き本細則によって施行する。

第2条 役員選出における管理運営は理事会が設置する選挙管理委員会が行う。

第3条 運営委員の選出においては、改選毎に理事会で定める定数以上の候補者名簿を理事会が作成する。正会員2名以上の推薦を受けた正会員が候補者となることができ、このなかから正会員の直接無記名投票により得票上位のものから選出する。

会費ならびに事務局に関する規定

第1条 新入会の際の入会金は1千円とする。

第2条 正会員の年会費は3千円とする。

第3条 賛助会員の年会費は1口3万円とする。

第4条 本学会は事務局を名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1 名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体高分子部門内におく。

附 則

本規定は平成6年7月12日からこれを実施する。

日本生体防御学会役員

(平成12年～14年)

(会長) 岡田 秀親 (名古屋市立大学)

(理事) 赤川 清子 (国立感染症研究所)

安保 徹 (新潟大学)

小野寺 節 (東京大学)

桂 義元 (日本大学)

木下 タロウ (大阪大学)

中村 三千男 (長崎大学)

藤田 禎三 (福島県立医科大学)

光山 正雄 (京都大学)

吉開 泰信 (九州大学)

和合 治久 (埼玉医科大学)

道家 紀志 (名古屋大学)

川畑 俊一郎 (九州大学)

(監事) 成内 秀雄 (緒方医学化学研究所)

森 勝義 (東北大学)

運営委員

赤池 孝章	熊本大・医	内藤 眞	新潟大・医
赤川 清子	国立感染研	中西 照幸	日大・生物資源
安保 徹	新潟大・医	中根 明夫	弘前大・医
上出 利光	北大・遺伝子病制御研	中村 三千男	長崎大・熱帯研
内山 竹彦	東女医大	名倉 宏	東北大・医
海老名 卓三郎	宮城県がん研	成内 秀雄	緒方医学化学研究所
奥田 研爾	横浜市大・医	能勢 真人	愛媛大・医
小野寺 節	東京大・農	藤田 禎三	福島医大
甲斐 智恵子	東大・医科研	古田 恵美子	獨協医大
垣内 史堂	東邦大・医	前田 浩	熊本大・医
笠原 忠	共立薬科大	松崎 吾朗	琉大・遺伝子実験センター
桂 義元	日大・医	光山 正雄	京大・医
神谷 久男	北里大・水産	森 勝義	東北大・農
川上 和義	琉大・医	山崎 正利	帝京大・薬
川畑 俊一郎	九大・理	山下 昭	浜松医大
北 潔	東京大・医	山下 優毅	産業医大
木下 タロウ	阪大・微研	横沢 英良	北大・薬
熊沢 義雄	北里大・理	吉開 泰信	九大・生防研
小林 邦彦	北大・医	吉田 真一	九大・医
島村 忠勝	昭和大・医	米原 伸	京大・ウィルス研
鈴木 和男	国立感染研	和合 治久	埼玉医大短大
多田隈 卓史	防衛医科大	渡辺 直熙	慈恵医大
田中 邦男	日大・医	渡部 久実	新潟大・医
道家 紀志	名大・農		

賛 助 会 員 (五十音順)

味の素株式会社中央研究所
川崎市川崎区鈴木町 1-1

東レ株式会社医薬事業部
東京都中央区日本橋室町 2-2-1

エーザイ株式会社医薬事業部
東京都文京区小石川 5-5-5

中外製薬株式会社臨床業務部
東京都中央区京橋 2-1-9

株式会社エスアールエル
八王子ラボラトリー
東京都八王子市小宮町 51

日水製薬株式会社診断薬企画開発部
東京都豊島区巢鴨 2-11-1

鐘紡株式会社漢方ヘルスケア研究所
高岡市鐘紡町 3-1

福祉村病院長寿医学研究所
愛知県豊橋市野依町字山中 19-14

呉羽化学工業株式会社医薬品部
東京都中央区日本橋堀留町 1-9-11

藤沢薬品工業株式会社研究推進部
大阪市淀川区加島 2-1-6

クロレラ工業株式会社
福岡県筑後市久富 1343

富士レビオ株式会社商品開発部
東京都八王子市小宮町 51

ゼリア新薬工業株式会社
東京都中央区日本橋小舟町 10-11

明治製菓株式会社薬品総合研究所
横浜市港北区師岡町 760

第一化学薬品株式会社試薬統括部
東京都中央区東日本橋 2-8-3

株式会社ヤクルト本社中央研究所
東京都国立市谷保 1796

武田薬品工業株式会社福岡支店
福岡市博多区下川端町 9-12

和光純薬工業株式会社試薬本部
大阪市中央区道修町 3-1-2

