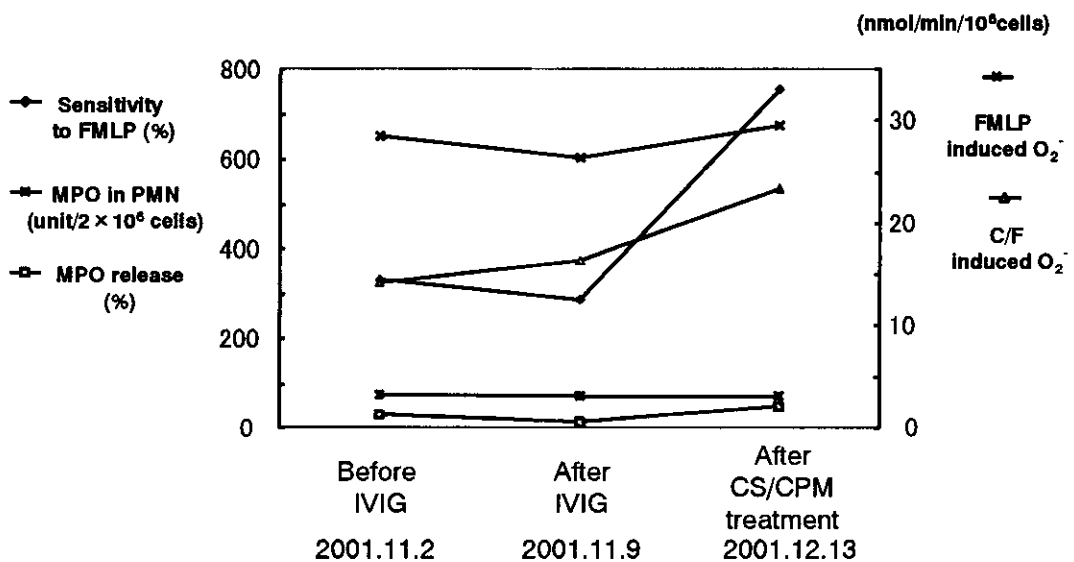


Table 12
Neutrophil function before and after treatment
Patient 7



厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
人工ポリクローナルFv グロブリン製剤の開発に関する研究班
分担研究報告書

分担研究課題

小児臨床におけるガンマグロブリン治療の評価

分担研究者：岡崎富男 広島市民病院副院長

研究概要

広島市民病院における川崎病の臨床的検討をおこなった。対象期間は、平成元年1月—11年8月の10年7ヶ月である。発症は266例で、その内、診断基準を満たす症例は220例であった。その内訳は、男128、女92例で、発症年齢1ヶ月～10歳5ヶ月（平均27.0 ± 21.3ヶ月、中央値22ヶ月）。治療は、206例についてガンマグロブリンを施行し、全症例アセチルサルチル酸あるいはフルルビプロフェンを併用した。初回ガンマグロブリン治療無効例となった26例については、ガンマグロブリン再投与、ウリナスタチン投与、ステロイド投与を施行した。ガンマグロブリン無効例の19%は冠動脈病変を認めた。以上から、急性期治療に難渋したガンマグロブリン無効例では、冠動脈病変が多いと言える。このようなガンマグロブリン無効例になるケースは、どのような原因によっているかは検討されはじめたばかりであり、Fcγレセプターの多型が関与している可能性も挙げられている。

A. 研究目的

血管炎やリウマチなど生体防御異常による自己免疫疾患が増加しており、その対応が急務になっている。これらの疾病は、他の自己免疫性疾患と同様に、炎症性細胞の活性化により慢性化し、重篤な病態へと進展する。しかし、その発症機構や治癒機転は明確になっていない。治療は、ステロイドパルスなどによっているが、新たな治療法の開発が強く望まれている。最近、ヨーロッパにおいて、血管炎においてガンマグロブリン製剤治療（IVIg）が好成績を得ている。その導入要因として、好中球自己抗体MPO-ANCA（Myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody）関連血管炎のように、自己抗体の対応抗原が解明され、ガンマグロブリン療法とMPO-ANCA抗体との関連を解明する手がかりが明らかになるというのも背景にある。

一方、血管炎におけるガンマグロブリン療法は、川崎病やヨーロッパの血管炎での治療が好成績

であり、MPO-ANCA関連血管炎は、ヨーロッパより日本で発症数が多いことから、日本での血管炎でのガンマグロブリン治療が望まれているところである。川崎病では、すでにガンマグロブリン製剤の大量療法が功を奏し、重篤な病態の治療に成功しているが、血液製剤であることや高価であるなど、他の自己免疫疾患・血管炎への応用が進展しない状況である。しかし、「国際ANCAワークショップ」など国際的な研究交流が進展している分野では、すでに本製剤による治療試験が開始され、治癒機転は不明ではあるが良好であると報告されている。国内でも、本研究班において、武曾らにより血管炎・腎炎でのガンマグロブリン製剤による治療が検討され、有効な成績が得られている。しかし、一方で、川崎病において、ガンマグロブリン製剤による治療でも無効の場合もあり、ステロイド治療や好中球エラスターゼ阻害剤の併用やその単独投与も検討されはじめている。日本に症例の多い川崎病、MPO-ANCA関連血管炎に関

連したガンマグロブリン治療の要請が、臨床サイドからもあり、人工型の IVIG 治療法の開発を進める状況になっている。

そこで、本調査において、広島市民病院における約10年間の治療成績の「まとめ」を紹介することにした。

B. 対象

【対象患者】

広島市民病院に入院患者を対象とした。対象症例は、平成元年1月—11年8月の10年7ヶ月である(表1)。

C. 結果

広島市民病院における川崎病の臨床的検討をおこなった。対象期間は、平成元年1月—11年11月の10年7ヶ月であり、発症は266例で、その内、診断基準を満たす症例は220例であった(表1)。毎年コンスタントに発症している。

表1. 広島市民病院における川崎病の臨床的検討

	総発症数	定型例	非定型例
平成1年	21	14	7
2年	20	18	2
3年	24	23	1
4年	23	21	2
5年	25	20	5
6年	26	24	2
7年	25	22	3
8年	25	22	3
9年	36	27	9
10年	20	12	8
11年	21	17	4
total	266	220	46

平成1年1月-11年8月(10年7ヶ月間)

発症数：266例(診断基準を満たす症例220例)

うち再発症例3(2)例

その内訳は、男128、女92例で、発症年齢1ヶ月～10歳5ヶ月(平均27.0±21.3ヶ月、中央値22ヶ月)であり、2歳までが75%を占めている(表2)。

表2. 発症の分布

0歳	54
1歳	64
2歳	48
3歳	21
4歳	15
5歳	8
6歳	2
7歳	5
8歳	2
9歳	0
10歳	1

*性別 男：128 女：92

発症年齢 1ヵ月～10歳5ヶ月

27.0±21.3ヶ月 中央値22ヶ月

治療は、206例においてガンマグロブリンを施行し、全症例アセチルサルチル酸あるいはフルビプロフェンを併用した(表3)。

表3. 治療法・治療経過

2g	53人(平成9年～)
400mg	55人(平成2～9年)
200mg	98人(平成1～8年)

*γグロブリン治療 206人

*全症例アセチルサルチル酸あるいはフルビプロフェンを併用。

初回ガンマグロブリン治療無効例となった26例については、ガンマグロブリン再投与、ウリナスタチン投与、ステロイド投与を施行した。治療法による差はない。逆にいえばγグロブリン治療自体に抵抗する症状があった(表4)。

表4. 初回γグロブリン治療無効例

投与量/Kg	症例数	追加投与	例
2g	9 (17%)	γグロブリン再投与	8
		ウリナスタチン投与	5
		ステロイド投与	1
400mg	6 (11%)	γグロブリン再投与	5
		ステロイド投与	1
200mg	11 (11%)	γグロブリン再投与	9
total	26 (12%)	γグロブリン再投与	22
		ウリナスタチン投与	5
		ステロイド投与	2

*2g 投与開始48時間以内に解熱しないもの

*200,400mg 5日間投与後24時間経過時に解熱

しないもの

*急性治療に他の要素を追加したもの

ガンマグロブリン無効例の19%は冠動脈病変を認めた(表5)。

表5. 冠動脈病変: 第30病日以降に問題を残した症例

投与	軽度~4mm	中等度4~8	高度8~
2g		2(2)	
400g	1(1)	2(1※)	
200g		1 2(1)	
total	2(1)	6(4)	

※(うちγグロブリン無効例)

※狭窄病変を伴うもの

以上から、急性期治療に難渋したガンマグロブリン無効例では、第30病日以降に冠動脈病変が多い。ガンマグロブリン治療全体の3.9%に冠動脈病変が認められ、ガンマグロブリン無効例では、19%に冠動脈病変が認められた。γグロブリン治療を要さなかった例には冠動脈病変の合併は認められなかった。また、全霊において心筋梗塞の発症はなかった。

D. 考察

広島市民病院における平成元年から約10年間の川崎病の臨床的検討をおこなった。発症は266例で、206例にアセチルサルチル酸あるいはフルルビプロフェンを併用して、ガンマグロブリン治療を施行した。しかし、26例では、初回ガンマグロブリン治療無効であった。ガンマグロブリン無効例の19%は冠動脈病変を認め、ガンマグロブリン無効例では、冠動脈病変が多いといえる。このようなガンマグロブリン無効例になるケースは、どのような原因によっているかは検討されはじめたばかりであり、Fcγレセプターの多型が関与している可能性も挙げられている。

E. 結論

血管炎におけるガンマグロブリン療法は、川崎病や日本で発症数が多いMPO-ANCA関連血管炎出の治療が好成績である。国内でも、本研究班にお

いて、武曾らにより血管炎・腎炎でのガンマグロブリン製剤による治療が検討され、有効な成績が得られている。広島市民病院での初回ガンマグロブリン治療無効26例のうち19%は冠動脈病変を認め、冠動脈病変が多いといえる。また、血液製剤であることによる安全性の問題や高価であるなど、他の自己免疫疾患・血管炎への応用が進展しない状況である。新たな視点にたった人工型のIVIG治療法の開発が望まれるところである。

研究発表

学会発表

1) Kazuo Suzuki, Tomio Okazaki

The 7th International Kawasaki Disease Symposium, Hakone, Japan, December, 2001.

F.健康危険情報

なし

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究課題

***Candida albicans* (C. albicans) 菌体抽出物マウス系統的血管炎誘発モデル
を用いた免疫グロブリン投与による血管炎発生への影響**

分担研究者：高橋 啓 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座助教授
研究協力者：大原関利章 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座助手
研究協力者：直江史郎 東邦大学医学部附属大橋病院病理学講座教授

研究要旨

C. albicans 菌体抽出物接種によるマウス系統的血管炎モデルを用い、ヒト免疫グロブリンが血管炎発生に与える影響を検討した。ヒト免疫グロブリンはマウス冠状動脈炎を抑制し、炎症を軽減化させる傾向を示したが、投与時期、投与量など、より詳細な検討が必要と思われた。

A. 研究背景・目的

我々は、川崎病罹患児糞便から分離培養した *C. albicans* 菌体抽出物をマウス腹腔内に接種することで、系統的血管炎を惹起させることに成功した。本実験系では冠状動脈が最も高頻度に侵される他、腎動脈や大動脈などが侵襲される。一方、血管炎の組織像は他の多くの血管炎動物モデルとは異なる増殖性肉芽腫性炎症である。これら病変分布、組織像は川崎病と類似する。

この血管炎誘発モデルを用い免疫グロブリン投与における血管炎発生に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

本実験は、実験第1週および第5週目に菌体抽出物をマウス腹腔に接種、第9週目に屠殺。剖検後、病理組織学的に血管炎発生、その組織像を検討するものであるが、本実験では以下の群を設け各群間で比較検討した。

実験1：

菌体抽出物接種時、ヒト免疫グロブリン(㈱日本製薬より供与)を投与した時の血管炎発生効果について組織学的検索を加えた。

a 群：ヒト免疫グロブリンを第1週目菌体抽出物接種時に腹腔内投与

b 群：ヒト免疫グロブリンを第5週目菌体

抽出物接種時に腹腔内投与

c 群：ヒト免疫グロブリンを第1週、第5週目菌体抽出物接種時に腹腔内投与

実験2：

a 群：ヒト免疫グロブリン、b 群：high MPO-ANCA titer ヒト血清由来精製 IgG を3%含有するヒト免疫グロブリンをいずれも第5週目菌体成分接種時に腹腔内投与した。

C. 研究結果

実験1：

1. 血管炎発生頻度は a 群 6/10, b 群 7/10, c 群 4/10 匹であった。
2. a 群に比して b 群、c 群の病変では炎症細胞浸潤は軽く線維化が目立つ傾向にあった。

実験2：

1. 血管炎発生頻度は、a 群 7/13 に対して、b 群 7/14 匹であった。
2. 両群間で明確な組織学的差異を見出せなかった。
3. 屠殺時に採取した血清の MPO-ANCA 値は a, b 群間で差異がなく、さらに血管炎発生の有無においても差異はなかった。

D. 考察

我々は、川崎病剖検例の病理組織学的検索

を続ける一方で、川崎病罹患児糞便由来の *C. albicans* アルカリ抽出物を用いたマウス系統的動脈炎作製実験を続けている。本実験系で惹起される動脈炎は病変分布や組織像など川崎病動脈炎に類似点が多く、川崎病動物モデルとして評価されている。本実験モデルは当施設で独自に開発したものであり、当施設においてのみ検索が成されている。

これまでの検討で本実験系にヒトあるいはマウス免疫グロブリンを投与すると血管炎の抑制傾向が得られること。本実験系の血管炎発生と血清 MPO-ANCA 値とは密接に関連することが判明している。今回、免疫グロブリンの投与方法を変更、および MPO-ANCA を高力価に含む免疫グロブリンを菌体抽出物接種時に同時投与した時の血管炎発生に及ぼす影響を検討した。その結果、免疫グロブリンを投与する事で、血管炎の発生頻度および炎症の程度は軽減化される傾向にあったが、血管炎の発生を完全に抑制することは出来なかった。また、MPO-ANCA を高力価に含む免疫グロブリンを用いても血管炎発生を抑制する事はできなかった。

この様に、本実験系は免疫グロブリン投与の効果を評価する系として応用可能であると考え、今後、最も適当な免疫グロブリン投与時期、投与量、投与期間などをさらに検討する必要がある。ついで、菌体抽出物の如何なる成分が血管炎発生に関与しているのか、解析を進めると共にマウス MPO 特異的抗体を本実験系に適用した時の血管炎発生に及ぼす影響をも検討する必要がある。



本実験でみられる冠状動脈炎

E. 結論

より詳細な条件設定の必要があるが、本実験系は免疫グロブリン治療評価の動物モデルとなりうる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okawara IA, Oharaseki T, Takahashi K, Hashimoto Y, Aratani Y, Koyama H, Maeda N, Naoe S, Suzui S: Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis with MPO-ANCA production, *Inflammation* 25(6): 381-387, 2001

2. 学会発表

1) 大原関利章、橋本ゆき、亀岡洋介、倉文明、高橋 啓、山田仁美、鈴木和男、直江史郎：川崎病類似マウス冠状動脈炎モデルにおける血管炎抑制遺伝子の染色体マッピング。第 24 回日本分子生物学会、横浜、2001.12

2) Oharaseki T, Takahashi K, Miura N, Wakayama M, Shibuya K, Okawara A, Suzuki K, Ohno N, Naoe S: Analysis of Component of *Candida albicans* Cell Wall Inducing Vasculitis in Mice. The 7th International Kawasaki Disease Symposium, Hakone, Japan, 2001.12

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
人工ポリクローナル Fv グロブリン製剤の開発に関する研究班
分担研究報告書

分担研究課題

MPO-ANCA および好中球機能異常を示す
血管炎動物モデルの検討

分担者： 鈴木 和男 国立感染症研究所生物活性物質部室長
研究協力者： 大川原明子 国立感染症研究所生物活性物質部研究員

研究要旨：血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究が必須である。血管炎発症に伴い血中に MPO-ANCA が上昇するモデルマウスにおいて、血管炎の発症に関連する血清中の MPO-ANCA 値、その対応分子 MPO の性状および好中球機能を解析した。腎炎や血管炎を自然発症する NZB/WF1、MRL/lpr、SCG/Kj、IRF-8/ICSBP マウスや *Candida albicans*-derived substances (CADS) 接種によって冠状動脈炎を誘発するマウスがある。CADS が誘発する冠状動脈炎マウスを用いてガンマグロブリン治療の予備的治療を行ったが、血管炎、腎炎を自然発症するマウスのガンマグロブリン治療モデルを作製する目的で、半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する SCG/Kj マウスの好中球機能、MPO-ANCA 産生と、腎炎の発症、進行との相関を検討した。腎炎の発症、進行の初期段階（尿たんぱく 300mg/dl 以下）の末梢好中球が無刺激で MPO の易放出性を示し、活性化状態になっていることを示した。また、ヒト好中球ライソゾーム酵素 MPO 放出を阻害するアセアノスタチンをマウスの好中球に作用させたところ無刺激 MPO 放出を阻害したことから、腎炎の治療評価として応用できる可能性が示唆された。尚、これらのモデルマウスにおける MPO および MPO-ANCA の役割を解明するため、リコンビナントマウス MPO (rmMPO) およびマウス MPO (mMPO) 特異的抗体を作製した。rmMPO は、ヒトと同様 mMPO を *E. coli* に発現・精製し、native mMPO はマウス腹腔より調整した。

尚、本研究は、武曾恵理（北野病院）、猪原登志子（京都大学院医）、小野孝彦（同）、根本久一（日本化薬）、雑賀寛（同）、橋本ゆき（国立感染研）の各博士の協力のもとに行なわれた。

A. 研究目的

Microscopic polyangiitis (MPA) などの顕微鏡所見では多くの好中球浸潤が認められることがあるなど、血管炎の病態に炎症細胞が関与していることが病理所見から観察されている。しかし、これらの細胞がどのように関与しているかについては、ほとんど推定の範囲を越えていない。血管炎の組

織には、マクロファージ、好中球、リンパ球の炎症細胞の浸潤が観察される。本来、炎症細胞は外来異物などを排除する生体防御機能を担っているが、血管傷害もひきおこしていると推定されている。これと関連して、血管炎患者には血清中に好中球抗体 ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody) が上昇することや、好中球抗体と

好中球が血管炎に関与していることが明らかになっている。したがって、好中球がその抗体ANCAとともに血管炎に関与していることが容易に想像できるようになってきた。

これまで、血管炎の病因がかかわるリスク因子としては、ANCA および、それ以外の自己抗体、IL-8 や TNF α などの炎症性サイトカイン、内皮細胞の活性化、接着分子、血管内膜・中膜・外膜あるいは細胞外マトリックスの反応系などがあり、それらの因子がトリガーとして連鎖していると推定されている。一方、血管炎の患者の血中には、高い MPO の酵素活性とともに、活性化された好中球が血液中を循環していることが明らかになっている。その活性化好中球が、血管炎の発症と病態の進行に関与していると推定されている。この際、好中球は、Fc γ レセプターを介して活性化されていることが示されており、Fc γ レセプターが関与して自己抗体 MPO-ANCA 抗体が好中球を活性化しているのではないかと考えられている。この様にして、生体側に不利な細胞傷害を引き起こす好中球の活性化には、その抗体 ANCA が深く関わっていることが報告されてきている。特に、MPO-ANCA の関与についての解析が進んでいる。

MPO-ANCA を筆頭に、好中球抗体 ANCA が疾患誘導にかかわっていることが推定されているが、血管炎疾患の患者の血清中の MPO-ANCA の抗体価変動は、必ずしも疾患の病態と連動していないことがわかってきており、病態と密接に関与する MPO-ANCA について検討することが重要になってきていた。MPO-ANCA は、その抗原分子 MPO と抗体の反

応、つづく免疫複合体によって、好中球を活性化する。その状態が持続することによって、病態の重篤化を招くのではないかと考えられている。この病態と関連した MPO-ANCA の関与を解明するには、抗体による MPO 分子との反応部位 (エピトープ) を特定することと、反応性、血管傷害に関わる抗体を特定することが重要であった。このため、我々は、血管炎の病態を判定するための MPO-ANCA エピトープ解析用パネルを作成して本研究班員の協力を得て検討してきた。特に、PN および MPA 患者の血清は、H鎖の N および C 末端に単独で反応するエピトープをもつモノ (あるいはオリゴ) クロナル抗体が関わっており、他の血管炎の血清の MPO-ANCA は、末端ではない部位のエピトープ、2つ以上、すべてに反応するエピトープを示した。以上から、MPO-ANCA のクロナリテイは、血管炎疾患および病態と関連があることを示唆している。これらの結果は、治療による病態の評価基準作成や血管炎の重症度の評価に重要であると考えられる。

一方、血管炎の治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究が必須である。加齢に伴って腎炎や血管炎を発症する NZB/WF1、MRL/lpr、SCG/Kj、IRF-8/ICSBP マウスや *Candida albicans* - derived substances (CADS) 誘導の冠状動脈血管炎マウスなど血管炎モデルマウスを用いて血管炎発症に関与する MPO-ANCA や好中球機能について解明する必要がある。

そこで、これまで検討してきた CADS の接種によって誘発される冠状動脈炎を発症す

るモデルマウスで、血管炎発症と好中球抗体 MPO-ANCA の誘導との関係を調べた。さらに、CADs 誘導の血管炎に高値に認められる MPO-ANCA の抗原が MPO であるか、血管炎発症に MPO および MPO-ANCA が関与しているかを MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADs を接種することで検討してきた。また、半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する SCG/Kj マウスを用い、腎炎の発症、進行への好中球機能および MPO-ANCA の関与について解析した。さらに、好中球異常を示す転写因子 IRF-8/ICSBP の欠損マウスでの好中球異常が MPO-ANCA 産生に関与するかを検討した。尚、これらのモデルマウスにおける MPO および MPO-ANCA の役割を解明するため、rmMPO および mMPO 特異的抗体を作製した。rmMPO は、ヒトと同様 mMPO を *E. coli* に発現・精製し、native mMPO もマウス腹腔より調整した。

B. 研究方法

1) 血管炎モデルマウス

半月体形成性糸球体腎炎発症の SCG/Kj マウス：20 週齢までの本マウスの尿たんぱく質を測定し 100 mg/dl 未満 (腎炎発症前)、300 mg/dl 以下 (腎炎初期段階)、それ以上 (腎炎後期段階) に分け、血清 MPO-ANCA 値、好中球機能を解析した。

2) 尿たんぱく質測定

SCG/Kj において腎炎発症と病期を尿たんぱく質検出により判定した。尿生化学検査用スティックで尿たんぱく、潜血を経時的に測定し腎炎の発症、病態の指標とした。

3) 好中球の分離

SCG/Kj マウス：雌 SCG/Kj マウス、C57BL/6 マウス (コントロール) の腹部大動脈よりヘパリン採血し、比重法によって末梢好中球画分を単離した。

4) 好中球機能解析

4-1) MPO 放出活性：終濃度 10^{-5} M の FMLP および $5 \mu\text{g/ml}$ の サイトカラシン B で好中球を刺激して脱顆粒し、 H_2O_2 を基質として細胞外への MPO 放出率を求めた。

4-2) 活性酸素産生：活性酸素産生は、チトクローム c の還元能により求めた。

5) マウスのリコンビナント MPO の調整
rmMPO は、ヒトと同様 mMPO を *E. coli* に発現・精製し、native mMPO はマウス腹腔にカゼインを接種し、調整した。

6) マウス血清中の MPO-ANCA 値の測定

ヒト MPO-III を抗原とし ELISA により測定した。Positive control には高 MPO-ANCA 値を示す腎炎患者血清を用いた。

7) 腎炎および血管炎発症の検討

屠殺後、定法に従って病理標本を作製し腎炎および血管炎の評価をした。糸球体への好中球浸潤数を測定すると共に、活動性所見として Activity Index、Crescent formation Score を、慢性化所見として Chronicity Index を測定した。

C. 研究結果

1) SCG/Kj マウスの糸球体腎炎の発症と進行における活性化好中球の役割の解析

腎炎の発症、進行のすべての時期を通じて FMLP 誘導の MPO 放出が亢進し、差が見られなかったが、無刺激の好中球からの MPO 放出は、尿たんぱく 300mg/dl 以下の腎炎発

症初期で高値を示し MPO の易放出性を示した (図 1)。一方、同時期の好中球活性酸素産生能、血清中 MPO-ANCA 値はむしろ低値であった。さらに、ヒト好中球ライソゾーム酵素 MPO 放出を阻害するアセアノスタチンをマウスの好中球に作用させたところ無刺激好中球の MPO 放出を阻害したことから (表 1)、腎炎の治療薬の開発に応用できる可能性が示唆された。また、末梢血中、糸球体中の好中球数の増加が認められた。さらに、腎臓傷害と好中球浸潤、無刺激 MPO 放出が相関性を示した。

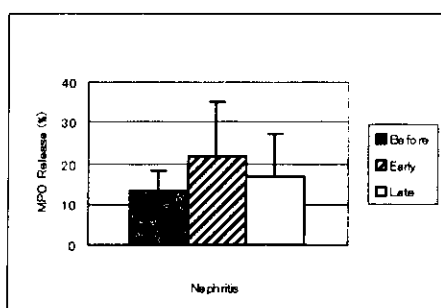


図 1. SCG/Kj マウスの好中球無刺激 MPO 放出活性

	Inhibition of Spontaneous MPO Release(%)	Inhibition of FMLP-induced MPO Release(%)
SCG/Kj		
Nephritis Phase		
Before	26.0±3.0	68.3±10.5
Early	14.4±10.9	74.2±12.9
Late	23.5±21.2	68.1±33.1
Normal		
C57BL/6 (9W)	0	50
C57BL/6 (14W)	0	55.1±19.5

表 1. アセアノスタチンによる SCG/Kj マウス無刺激好中球の MPO 放出阻害効果

4) rmMPO の作製

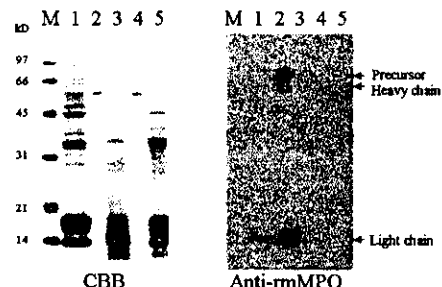


図 2 Anti-rmMPO 抗体による MPO 検出 (ウェスタンブロッティング) M:マーカー、1:マウス好中球、2:精製マウス MPO、3:ヒト好中球、4:精製ヒト MPO、5:ヒトリンパ球

rmMPO の特異的抗体を作成するため、rmMPO に対する抗体を作成し、mMPO 特異的抗体を得た (図 2)。これにより抗体の標準化が確認された。

D. 考察

1) SCG/Kj マウスの糸球体腎炎発症における活性化好中球の役割

SCG/Kj マウス腎炎の発症に無刺激の好中球からの MPO 放出が関与していることが示唆された。特に、尿たんぱく 300mg/dl 以下の腎炎発症初期に MPO の易放出性を示した。また、末梢血中、糸球体中の好中球数の増加が認められ、腎臓傷害と糸球体への好中球浸潤、無刺激 MPO 放出が相関した。以上のことから腎炎の発症、進行に好中球の活性化が関与している可能性が示された。また、ヒト好中球ライソゾーム酵素 MPO 放出を阻害するアセアノスタチンを SCG/Kj マウスの好中球に作用させたところ無刺激好中球の MPO 放出を阻害したことから、腎炎の治療薬の開発に応用できる可能性が示唆さ

れた。

2) 糸球体腎炎発症 SCG/Kj マウスのガンマグロブリン治療へのモデルマウスとしての有用性

3) rmMPO 分子作製

rmMPO 分子を作製し、これを用いてポリクローナル抗体を調整できたことによって、ガンマグロブリン治療に利用可能になった。

E. 結論

血管炎のガンマグロブリンをはじめとする治療や、病因を解析する上で、モデルマウスを用いた研究が必須であり、血管炎誘導マウスの CADS 誘発の冠状動脈炎マウスに加え、本研究において、半月体形成性糸球体腎炎を高率かつ急速に自然発症する SCG/Kj マウスの有用性を検討した。本マウスを用いて解析し、腎炎の発症、進行の初期段階の末梢好中球は無刺激で MPO の易放出性を示し、活性化状態になっていることを示した。本マウスにおける MPO および MPO-ANCA の役割の解明およびガンマグロブリン治療法を検討する。そのための、マウスリコンビナント MPO およびマウス MPO 特異的抗体を作製した。また、ヒト好中球ライソゾーム酵素 MPO 放出を阻害するアセアノスタチンをマウスの好中球に作用により無刺激好中球の MPO 放出を阻害が確認されたことは、ガンマグロブリン治療の評価に利用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Yuki Hashimoto, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation*. 25, 381-387, 2001.

2) K. Suzuki Neutrophil functions of patients with vasculitis related to MPO-ANCA. *International Journal of Hematology* 74, 134-143, 2001.

3) Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda, M. Koyama: Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J. Infectious Diseases* 182, 1276-1279, 2000.

4) Y. Kameoka, S. Yamagoe, Y. Hatano, T. Kasama, K. Suzuki: Val58Ile polymorphism of the neutrophil chemoattractant LECT2 and rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Arthritis and Rheumatism* 43, 1419-1420, 2000.

5) Fujii, A., Tomizawa, K., Arimura, Y., Nagasawa, T., Y-Ohashi, Y., Hiyama, T., Mizuno, S. and K. Suzuki. Epitope analysis of myeloperoxidase-specific anti-neutrophil Cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated glomerulonephritis. Clin. Nephrology 53, 242-252, 2000.

6) 鈴木和男 特集「6)血管炎の基礎と臨床」血管炎と自己抗体—抗好中球細胞質抗体を中心に— 最新医学 55; 2636-2646, 2000

2. 学会発表

1) Toshiyuki Matsuoka, Yuki Hashimoto, Akiko Ishida-Okawara, Keiko Matsuo, Takuro Iwasaki, Hideki Kajiwara, Takao Arai, Keiko Ozato, and Kazuo Suzuki. Genetic inactivation of interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP/IRF-8) is associated with a marked suppression of neutrophil and eosinophil function Gordon Research Conference-Phagocytes, 2001.

2) Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Yuki Hashimoto,

3) Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associate with MPO-ANCA production induced by

Candida albicans-derived substances Gordon Research Conference-Phagocytes, 2001.

4) K. Suzuki. Arteritis related with Myeloperoxidase. Geneva Biology of Ageing Workshop 2001-Cardiac ageing, heart failure and cell therapy Geneva, Switzerland Coronary. Sept. 27-29, 2001, Geneva, Switzerland.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請：

- 1) ミエロペルオキシダーゼ欠損マウス
- 2) LECT2 欠損マウス

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
人工ポリクローナル Fv グロブリンの開発に関する研究
分担研究報告書

真菌由来多糖による自己抗体の産生誘導機構の解析
分担研究者 大野尚仁 東京薬科大学 薬学部 教授

研究要旨：

Candida albicans のアルカリ抽出物 (CADS) をマウスに腹腔内投与すると川崎病類似の冠状動脈炎を誘発することが報告されている。本研究では、完全合成液体培地で *C. albicans* を培養し、その培養上清から得られた mannoprotein- β -glucan 複合体である CAWS をマウスに接種し、冠状動脈血管炎の発症を CADS と比較すると共に、発症機序を解析した。また、抗 MPO 抗体を *in vitro* 培養系に添加し、その効果を評価した。

CADS と CAWS の冠状動脈血管炎の発症率を比較すると、C3H マウスにおいて、CADS は約 60% の発症率であるのに対し、CAWS ではほぼ全例に発症した。また、CBA/J 並びに DBA/2 マウスは CADS による血管炎の誘導には抵抗性を示したが、CAWS は DBA/2 マウスに対して高率に血管炎を発症させ、誘発物質ごとに系統間の感受性に差のあることが明らかとなった。

血管炎誘発の機序を解析するために、様々な活性スクリーニングを行ったところ、培養細胞に対する直接障害作用、サイトカイン産生抑制作用、血小板凝集促進作用、血管内皮細胞からの・・・を示した。一方、脾細胞の培養系にポリクローナル抗 MPO 抗体を添加し活性化能を比較したが、対照として用いた抗体添加群との間に顕著な差を見出すことはできなかった。

モノクローナル抗 MPO 抗体 (佐々木次雄先生より分与) の特異性をスクリーニングしたところ、マンナンに対して特異性を示すクローンが見出され、MPO と CAWS が免疫化学的に共通抗原構造を有していることが強く示唆された。

以上、本研究において、CAWS の冠状動脈血管炎誘発活性の特徴を明確にすると共に、抗 MPO 抗体の活性修飾作用について検討した。

A. 研究目的

人工ポリクローナル Fv グロブリン (人工 Ig) の有用性評価には、種々の実験モデルでの基礎的研究が必要である。川崎病の治療には高濃度 γ グロブリン製剤が使用され、効果をあげていることから、川崎病類似の血管炎モデルを用いることは有用であると考えられる。東邦大学の直江教授らは、川崎病患者から分離された *Candida albicans* のアルカリ抽出多糖画分 (CADS) を用いることで、マウスに川崎病類似の血管炎を誘発できることを報告しており、本モデルを人工 Ig の評価法に応用することは、川崎病治療法の向上の面からも重要であると考えられる。しかし、CADS の血管炎誘発活性は必ずしも高くはないので、*Candida albicans* の培養外液から得られる mannoprotein- β -glucan 複合体であり、致死活性を有する物質である

CAWS を用いて、誘発率、誘発機序について解明すると共に、抗 MPO 抗体の有用性について検討した。

B. 研究方法

菌体外多糖 (CAWS) の調整 *C. albicans* を完全合成培地で培養し、培養外液をエタノール沈殿することで、菌体外多糖画分 (CAWS) を得た。

血管炎誘発の評価 (東邦大学大橋病院に依頼) 1 週目に、誘発画分 (4mg/mouse) を腹腔内より C3H/HeN, DBA/2, CBA/J マウスに 5 日間連続投与した。更に 5 週目に、同画分 (4mg/mouse) を 1 週目と同様に投与し、9 週目にマウスを屠殺し、心冠状動脈の組織切片を HE 染色した。

細胞培養 脾臓細胞, 血管内皮細胞, 株化細胞はいずれも常法に従って培養した。一定時間培養後, 上清を回収し, サイトカイン産生を評価した。細胞の増殖は WST-1 を添加し比色によって行った。細胞数はトリパンブルーにて染色し血球計算板で数えた。

免疫・炎症パラメーター解析のための CAWS 投与計画 CAWS (0, 2, 4mg/mouse) を腹腔内より DBA/2, C3H/HeN マウスに 1,3,5 日に隔日投与した。最終投与 1 週間後に, 各臓器を取りだし, 細胞懸濁液を調整 (1×10^7 cells/mL) し, 24 穴プレートにて 37°C, 5%CO₂ インキュベーターにて 24~72 時間培養した。

サイトカインの測定 サイトカインは 2 抗体を利用したサンドイッチ ELISA 法を用いた。抗体, 標準品は全て Pharmingen 社より購入し, 同社の標準プロトコールに従った。トロンボモジュリン抗体は帝京大学薬学部, 堀江修一博士より分与を受けた。

血小板凝集試験 ヒトクエン酸処置多血小板血漿を健常人から採取し, 凝集は常法に従いアグリコメーターにて測定した。陽性対照としてコラーゲン溶液を用いた。

抗 MPO 抗体 ポリクローナル抗 MPO 抗体は MPO-KO マウスを MPO で免疫した血清から精製した。本抗体は総括者の鈴木和男博士より分与を受けた。単クローン抗体は分担者の佐々木次雄博士から分与を受けた。マンナン結合タンパク質(MBL)は市販品を用いた。

有意差検定 本研究における有意差検定は, すべて Student's *t* test によって行い, $P < 0.05$ のものを「有意差あり」と判定した。

C. 研究結果

(1) CADS と CAWS の血管炎誘発活性の比較

昨年度までの本プロジェクト研究において, CADS による血管炎の誘発にはマウスの系統差があり, C3H は高感受性, CBA/J, DBA/2 は低感受性であることが明らかとされ, それに基づき, 血管炎誘発に関わる遺伝子解析が行われてきた(鈴木, 直江ら)。我々もこの系統差を基本とし, 更に CAWS の致死活性の系統差において DBA/2 が最も低感受性の系統であることから, 昨年度の本プロジェクト研究においては C3H と DBA/2 間の炎症・免疫応答を比較することによって, 血管炎の誘発機序に迫ろうと考え, 一定の成果を得ることができた。しかし, これらの解析は CAWS による血管炎誘発の系統差が CADS と同一であるとの

作業仮説に立脚したものであり, 直接の実験成績はなかった。そこで, 更に研究を進展させるためには, この点について直接解析する必要があると考え, 東邦大学病理部の直江史郎教授らのグループの協力のもとで, CAWS の血管炎誘発の感受性について, CADS と同一の投与量, 投与スケジュールを用いて比較した。

(図 1)

カンジダ画分による冠状動脈血管炎の惹起率の系統差の比較

	C3H/HeN	DBA/2	CBA/J
CADS	~6/10	~2/10	~0/10
CAWS	10/10	3/3	2/4

CADS: cell extract, calcium, protein, dextran, gelatin.
CAWS: extracellular fraction, mannoprotein-β-glucan complex

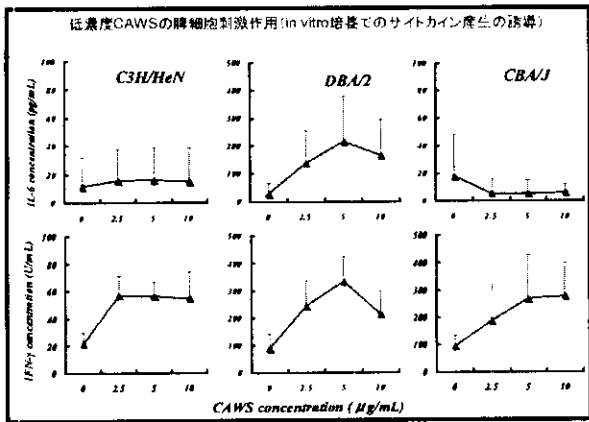
その結果, 図 1 に示したごとく, DBA/2 に対する血管炎誘発率は CADS と CAWS で著しく異なり, 誘発物質によって感受性系統にも差の生じることが明らかとなった。一方, CBA/J では数の上では若干高率に血管炎が惹起されているように見受けられるが組織像は極めて軽微であり, 両物質ともに低感受性であると判断した。これまでの発症機序解析は CADS の系統差に基づき計画立案されたものであるため, 従来の結果の解釈を若干修正し, 今後の実験では CBA/J を合わせて検討する必要性が生じた。

(2) CAWS による血管炎誘発機序の解析

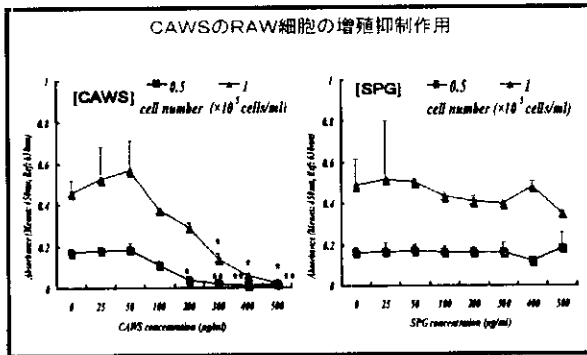
CAWS によって誘発される血管炎の発症機序を明らかにするために, *in vitro* において種々の評価系(脾細胞刺激作用, マクロファージ様細胞 RAW264.7 の増殖抑制作用並びにサイトカイン産生抑制作用, 血小板凝集作用, トロンボモジュリン産生抑制作用)を行い, 結果を考察した。

その結果, ①低濃度において, 脾細胞からサイトカイン産生を誘導すること(図 2), ②高濃度において細胞障害性を示し, サイトカイン産生作用も消失させること(図 3, 4), ③血小板凝集促進作用を有すること(図 5), ④凝固抑制物質トロンボモジュリン(TM)の産生を低下させ, 凝固傾向を高めること(図 6)がわかった。これらの事実から, CAWS は複数の生体成分は細胞に対して作用することがわかり, 血管炎誘発過程には複数の因子が炎症の惹起に関わっている可能性のあることが示唆された。

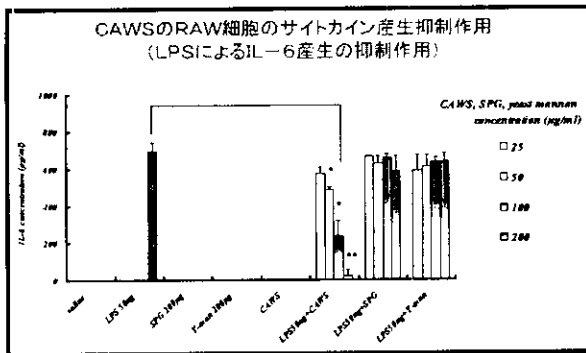
(図 2)



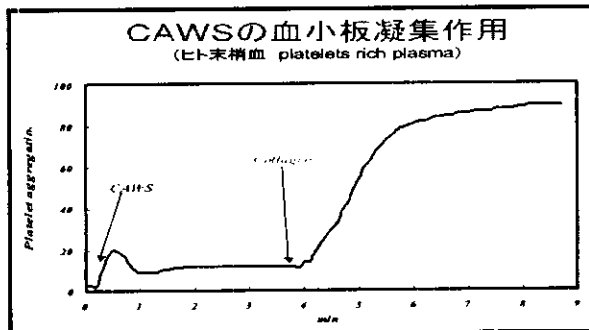
(図 3)



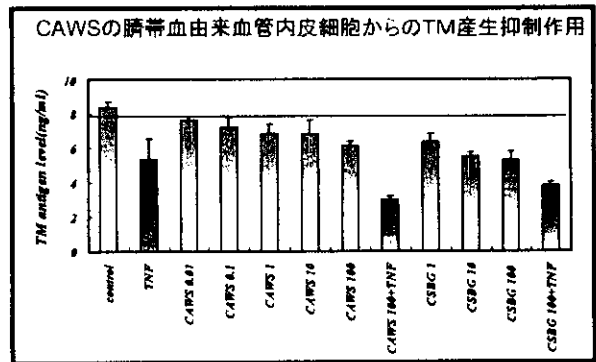
(図 4)



(図 5)

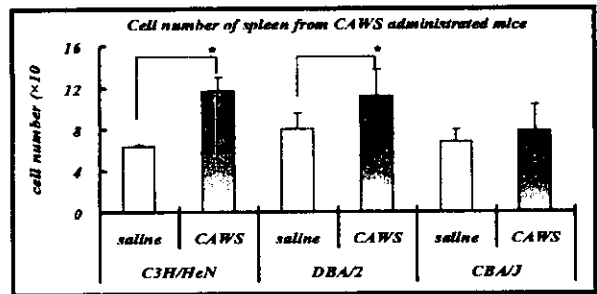


(図 6)

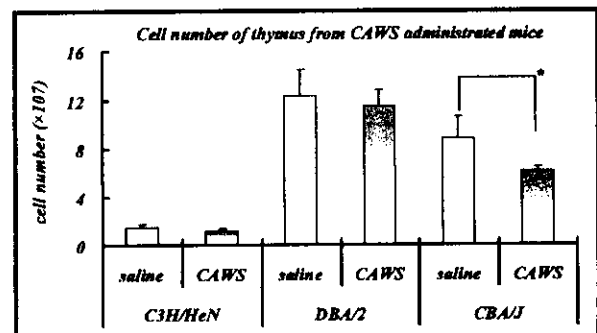


更に、CAWS を感受性を異にするマウスに投与することによって、脾臓細胞、胸腺細胞の数の変化を比較すると共に、CAWS に対する二次応答をサイトカイン産生を指標に評価した。その結果、脾臓細胞は高感受性群(C3H, DBA/2)で増加傾向が強く、胸腺細胞数は低感受性群(CBA/J)群で低下傾向が強かった (図 7, 8)。また、二次応答性では低感受性群では反応性が著しく低下している傾向にあった (図 9, 10)。これらのことを総合して考えると、低感受性系統では、CAWS によって誘発される炎症・免疫応答も低下している可能性のあることが示唆された。免疫応答は神経系・内分泌系とも密接に関わっており、胸腺の萎縮も強かったことから、低感受性系統ではホルモン分泌が鋭敏に反応した可能性もあろう。今後、in vivo に関する更なる解析が必須である。

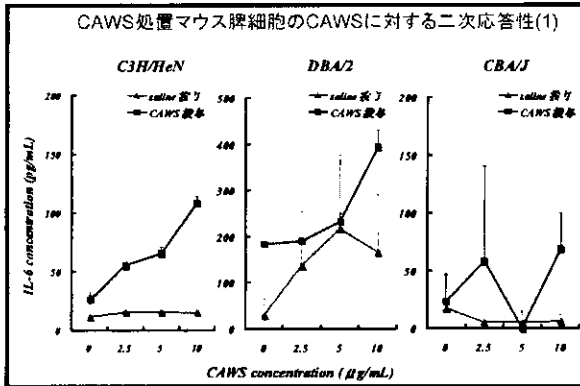
(図 7)



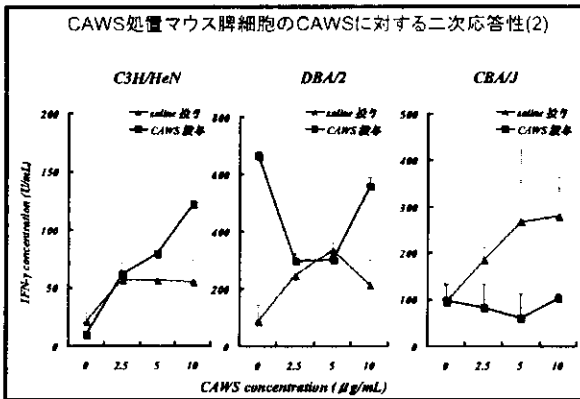
(図 8)



(図 9)



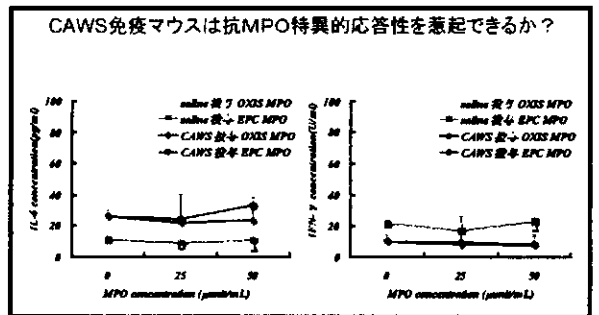
(図 10)



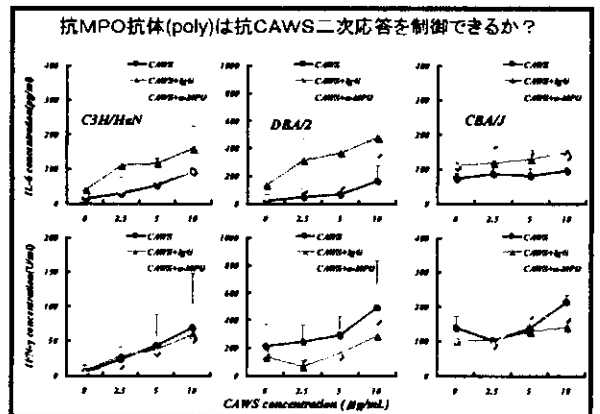
(3) ポリクローナル抗 MPO 抗体の免疫修飾作用

血管炎における MPO-ANCA の病態への関与をモデルマウスで確認し、さらに人工グロブリン製剤の治療効果を評価するために、MPO-ノックアウトマウスに MPO を免疫することによって作成したポリクローナル抗 MPO 抗体 (IgG) の免疫応答への関与を評価した。まず、CAWS の投与によって血管炎を誘発したマウスの脾臓細胞を用い、MPO の添加によってリンパ球がクローン増殖ならびにサイトカイン産生するか否かを検討した (図 11)。しかし、MPO に対する細胞増殖ならびにサイトカイン産生は認められず、CAWS の起炎作用が直ちに自己抗体の産生並びにそれに関わるヘルパー T 細胞の活性化につながる可能性は低いものと考えられた。そこで次に、CAWS 免疫マウスを CAWS で二次刺激し、サイトカイン産生を誘導する過程に、抗 MPO 抗体が影響を与えるか否かを検討した (図 12)。しかし、コントロール抗体でも活性の増減が見られ、単純には影響を評価できなかった。この点に関しては、今後、単クローン抗体を用いて評価を継続する予定である。

(図 11)



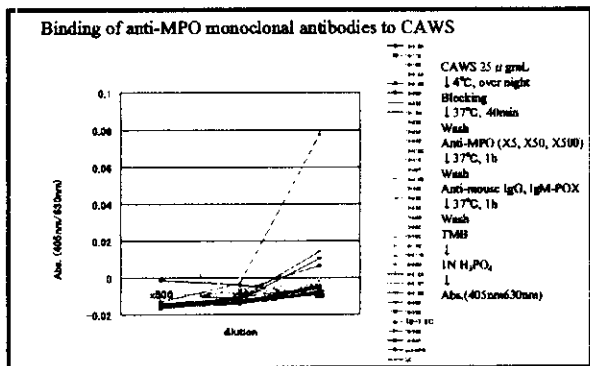
(図 12)



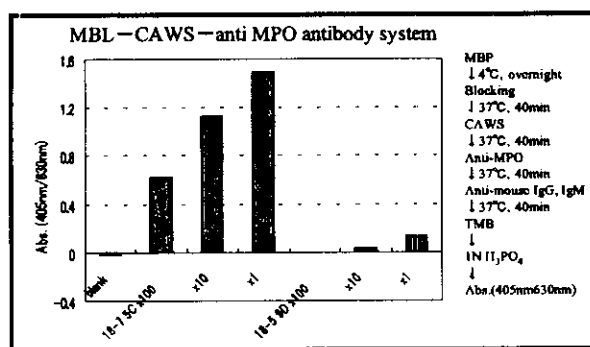
(4) モノクローナル抗 MPO 抗体の特異性の解析

分担研究者の佐々木次雄博士より抗 MPO 単クローン抗体の培養上清の分与を受け、スクリーニングを行った。はじめに MPO 活性を阻害できるクローンを検索したが、現在のところ見出されていない (結果は示していない)。次に、CAWS によって血管炎が誘発されることとの関連性から、CAWS に対して反応性を示すクローンを検索した。CAWS は mannoprotein-β-glucan 複合体であるので、MPO の糖鎖を認識するクローンが CAWS と類似性を示す可能性もあろうとの作業仮説に基づき検討である。評価系としては、CAWS を ELISA プレートの固相として用い、各クローンの培養上清を添加し、吸着量を抗マウス Ig-POX で検出することにした。その結果、クローン 18-7 5C は CAWS と強く反応することがわかった (図 13)。更に、マンナン糖鎖が炎症のカスケードを動かすことを明確にするために、マンノース結合タンパク質 (MBL) を併用し、MBL-CAWS-[18-7 5C] が相互作用を起こすことを明らかにした (図 14)。この結果は、補体系レクチン経路が血管炎誘発過程に何らかの役割を示すことを強く示唆した。

(図 1 3)



(図 1 4)



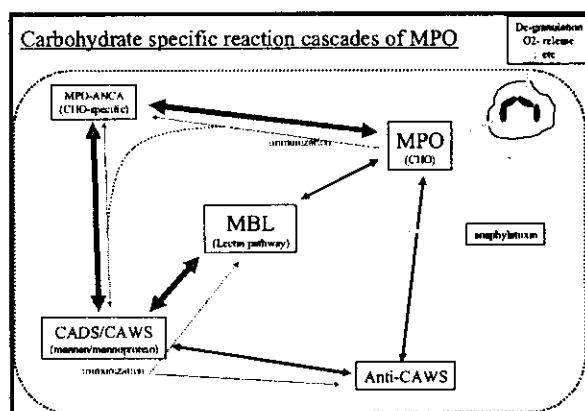
D. 考察

血管炎誘発の系統差：血管炎の原因遺伝子を明らかにすることは、新たな治療法を開発する上で重要なことである。これまで CADS で明らかにされてきた系統差が CAWS では異なっていた (DBA/2) ことは、非常に興味深い成果である。すなわち、ヒトにおいても HLA などを異にする状況にあっては、異なる原因遺伝子が関与する可能性を示唆するものである。既に CADS での遺伝子解析が進行しているので、これらの成果を CAWS に応用することで効率よく原因遺伝子を特定できる可能性がある。

血管炎の誘発機序：上述のごとく CAWS によって誘発される血管炎の感受性系統は CADS と異なっていた。昨年度行った C3H と DBA/2 マウスを用いた炎症・免疫パラメータの比較実験の結果は直接的な血管炎誘発の原因究明には繋がらなくなった。今年度はあらためて、C3H vs CBA/J での解析を開始した。全体的な傾向としては CBA/J は反応性が低い傾向にあり、このことが血管炎を惹起できない原因になっている可能性がある。今後、更に多くの評価系を用いて比較検討する必要がある。また、DBA/2 と CBA/J の比較は CAWS 特異的に関与する遺伝子の特定に重要な意味をもつであろう。

抗 MPO 抗体：抗 MPO 抗体が治療に使用できる、あるいは、増悪因子になっていることを明確にするために、ポリクローナル並びにモノクローナル抗体を作成し (鈴木博士, 佐々木博士より分与)、それらの作用を比較検討した。血管炎誘発物質である CAWS に対するクローンが MPO を免疫することによって生じたことは、微生物抗原が自己抗原と類似性を示し、交差反応性のクローンの活性化あるいはアフィニティマチュレーション過程での遺伝子変異を通じて自己抗体を誘発している可能性があることを強く示唆した (図 1 5)。一方、細胞機能への影響を認めるには至らなかったため、来年度以降に積極的に取り組みたい。

(図 1 5)



E. 結論

本年度は CAWS の血管炎誘発の系統差が CADS とは異なり、多因子が関与している可能性のあることを示唆すると共に、抗 MPO 抗体が CAWS と反応することを明らかにした。自己抗体産生は巧みにコントロールされているので、病気の原因を探ることは容易ではない。しかし、微生物多糖が自己免疫疾患を惹起している可能性を示唆したことは、今後の研究の方向付けにおいて極めて重要な知見となろう。この成果はグロブリン製剤の人工化においても役立つものと思われる。

F. 健康危険情報

C. albicans は常在菌であり、健康人に対する病原性は問題とならない。生物試験は全て動物試験であり、本学の倫理規定に則って行った。

G. 研究発表

1. 論文発表,

① N. Ohno, T. Miura, N. N. Miura, Y. Adachi, and T. Yadomae: Structure and Biological Activities of Hypochlorite Oxidized Zymosan, *Carbohydr. Polymers*, 44, 339-349 (2001)

② K. Tokunaka, N. Ohno, Y. Adachi, N. N. Miura and T. Yadomae: Application of *Candida* solubilized cell wall β -glucan in antitumor immunotherapy against P815 mastocytoma in mice, *Int. Immunopharmacol.*, 2, 59-67 (2002)

③ K. Kurihara, Y. Shingo, N. N. Miura, S. Horie, Y. Usui, Y. Adachi, T. Yadomae, N. Ohno : Effect of CAWS, a mannoprotein- β -glucan complex of *Candida albicans*, on leukocytes, endothelial cells, and platelets functions *in vitro*, 投稿中

2. 学会発表

日本薬学会 第121年会, 札幌, 平成13年3月28日~30日, 二形性真菌 *Candida albicans* による *in vivo* での MIP-2 産生, 三浦典子, 小林健, 大野尚仁, 安達禎之, 宿前利郎 (東京薬大・薬・免疫)

第22回 関東医真菌懇話会, 東京, 平成13年6月2日, *Candida albicans* 細胞壁 β -glucan の物性とマクロファージ活性化作用, 石橋健一, 三浦典子, 伊藤大明, 落合航, 安達禎之, 宿前利郎, 大野尚仁, 田村弘志, 田中重則 (東京薬大・薬・免疫, 生化学工業)

第37回 日本小児循環器学会, 静岡, 平成13年7月4日, 川崎病冠状動脈炎モデルにおける *Candida albicans* 菌体成分の関与, 大原関利章, 高橋啓, 直江史郎, 三浦典子, 大野尚仁 (東邦大学大橋病理, 東京薬大・薬・免疫)

第74回 日本生化学会, 京都, 平成13年10月25日~29日, *Candida albicans* 菌体外多糖による免疫担当細胞からのサイトカイン産生の抑制, 大野尚仁, 栗原清, 新郷裕子, 三浦典子, 安達禎之, 大川原明子, 鈴木和男, 大原関利章, 高橋啓, 直江史郎 (国立感染症研, 東邦大学大橋病理, 東京薬大・薬・免疫)

第42回 日本脈管学会総会, 大阪, 平成13年11月20日, 川崎病冠状動脈炎モデルにおける

Candida albicans 菌体成分の関与, 大原関利章, 高橋啓, 直江史郎, 三浦典子, 大野尚仁 (東邦大学大橋病理, 東京薬大・薬・免疫)

第7回 川崎病国際シンポジウム, 箱根, 平成13年12月4日~7日, Analysis of leukocyte functions *in vitro* elicited by mannoprotein- β -glucan complex of *Candida albicans*, an inducer of murine coronary arteritis, Y. Shingo, K. Kurihara, N.N. Miura, Y. Adachi, and N. Ohno (東京薬大・薬・免疫)

第7回 川崎病国際シンポジウム, 箱根, 平成13年12月4日~7日, Immune reaction of *Candida albicans* soluble polysaccharide fraction CAWS developing coronary arteritis in mice, N.N. Miura, K. Kurihara, Y. Shingo, Y. Adachi, T. Yadomae, N. Ohno, K. Takahashi, T. Oharaseki, S. Naoe, A. Okawara, and K. Suzuki (国立感染症研, 東邦大学大橋病理, 東京薬大・薬・免疫)

H. 知的財産権の出願・登録状況, なし

分担研究課題

MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究

分担研究者 新井 孝夫 東京理科大学理工学部教授

分担研究者 佐々木次雄 国立感染症研究所安全性研究部室長

(研究要旨)

ヒト MPO を免疫した正常マウスとマウス MPO を免疫した MPO ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を材料として、それぞれ 1 種類と 32 種類の抗 MPO モノクローナル抗体を作製した。そのうち、MPO に対する親和性の特に高かった 2 種類の抗体、3G7 と 18-7/5C について、それらの性質を解析した。両抗体ともに未変性の MPO と反応したが、18-7/5C のみが MPO 活性を阻害した。また、競合 ELISA により、両抗体の認識するエピトープは異なっていることを明らかにした。

以上のことは、MPO 阻害活性と競合 ELISA の測定することで、抗 MPO モノクローナル抗体が分類可能なことを示している。さらに、この分類により得られる知見は、MPO-ANCA 自己免疫疾患モデルマウスに対する抗 MPO 抗体の治療効果を評価する際に有用と思われる。

A. 研究目的

本研究は、MPO-ANCA 自己免疫疾患のモデルマウスの治療に有効な人工グロブリン製剤を開発するプロジェクトの一環として行なわれている。昨年度は、人工グロブリン作製の基礎を確立するとともに、マウス MPO と反応するマウス由来のモノクローナル抗体作製法の確立に重点を置いて実施された。市販のヒト MPO を正常マウスの足蹠に免疫する方法（通常法）と MPO ノックアウトマウスにマウスリコンビナント MPO を免疫する方法（MPO-KO 法）の 2 つの方法が試みられた。ヒト MPO でコートしたプレートを用いた ELISA 法によるスクリーニングの結果、得られる陽性クローン数と抗体の親和性の両者において、

MPO-KO 法が通常法よりもすぐれていることが明らかにされている。

本年度は、MPO-KO 法を中心にできるだけ多くの抗 MPO モノクローナル抗体を作製し、それらの性質を解析するための簡便な方法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

モノクローナル抗体は、2 つの方法により作製した。第一は市販のヒト MPO を足蹠に 3 日毎に 3 回注射する方法で、第二は MPO ノックアウトマウスに鈴木主任研究者が作成したマウスリコンビナント MPO を注射する方法である。前者からはリンパ節と脾臓を、後者からは脾臓のみを採取し、これらから調製した B 細胞とミエローマ細

胞 PAI をポリエチレングリコール法で融合した。ハイブリドーマは、ヒト MPO でコートしたプレートを用いた ELISA 法によりスクリーニングした。

得られた抗体の性質は、未変性 MPO との反応性、MPO 活性の阻害能、エピトープの相違について、96 ウェルプレートを用いた簡便な方法を開発し、解析した。

(倫理面への配慮)

実験動物の動物愛護上の配慮は、本大学実験施設の指針に基づいて行った。

C. 研究結果

はじめに、通常法により得た 1 クローン (新井が取得) と MPO-KO 法により作製した 32 クローン (佐々木が取得) のヒト MPO に対する反応性を調べた。MPO を固相に吸着させたプレートを用いた ELISA 法により、通常法より得た 3G7 と MPO-KO 法より得た 18-7/5C が、MPO と特に強く反応することを見だし、以下の実験に用いることとした。なお、3G7 (IgM) は腹水、18-7/5C (IgG3) の培養上清である。

次に、未変性 MPO との反応性と MPO の阻害活性を測定する簡便な系の開発を行った。未変性 MPO との反応性は、(1)固相に抗マウス IgG(H 鎖と L 鎖の両者)抗体、(2)抗 MPO モノクローナル抗体、(3)ヒト MPO 溶液の順で加え、プレートに吸着する MPO 活性の増加あるいは上清に残存する MPO 活性の減少で測定することにした。図 1 に、96 ウェルプレートに結合した MPO 活性を示した。両抗体ともに、未変性 MPO と反応した。なお、18-1/7C はネガティブコントロールのハイブリドーマ培養上清で

ある。

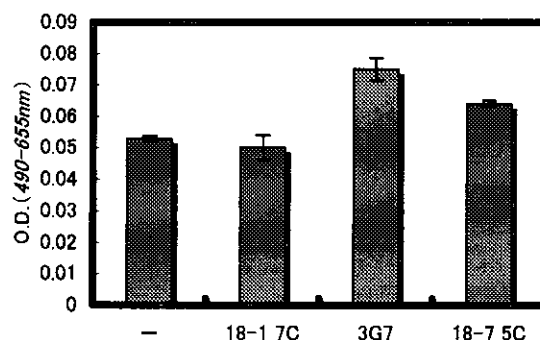


図 1 未変性 MPO との反応性

MPO の阻害活性は、(1)ブロッキング溶液、(2)MPO 溶液、(3)測定するモノクローナル抗体、(4)MPO 活性測定溶液の順に加える系を開発して、測定した (図 2)。この結果は、18-7/5C は活性を阻害するが、3G7 は阻害しないことを示している。

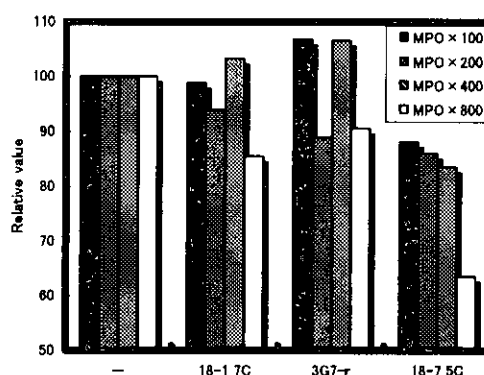


図 2 MPO 阻害活性

図 2 の結果は、2 つの抗体のエピトープが異なることを示唆している。そこで、競合 ELISA により、エピトープの異同を調べた。18-7/5C は培養上清、3G7 は腹水であることから、3G7 による 18-7/5C の結合阻害を測定するために、検出用二次抗体として、抗マウス IgM 抗体を用いた。図 3 に