

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 人血清IgG由来アルキル化L鎖の抗炎症活性   |
| Author(s)    | 辻川, 和丈  |
| Citation     | 大阪大学, 1989, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/36692">https://hdl.handle.net/11094/36692</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|         |                       |         |         |                   |
|---------|-----------------------|---------|---------|-------------------|
| 氏名・(本籍) | つじ<br>辻               | かわ<br>川 | かず<br>和 | たけ<br>丈           |
| 学位の種類   | 薬                     | 学       | 博       | 士                 |
| 学位記番号   | 第                     | 8509    | 号       |                   |
| 学位授与の日付 | 平成元年                  | 3月      | 10日     |                   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当          |         |         |                   |
| 学位論文題目  | 人血清IgG由来アルキル化L鎖の抗炎症活性 |         |         |                   |
| 論文審査委員  | (主査)                  |         |         |                   |
|         | 教授                    | 三村      | 務       |                   |
|         | (副査)                  |         |         |                   |
|         | 教授                    | 近藤      | 雅臣      | 教授 岩田平太郎 教授 三浦 喜温 |

### 論文内容の要旨

蛋白質を医薬品として開発、利用するには、安全性や抗原性の面で問題があった。そこで、蛋白質を化学修飾することによりこれらの問題を解決し、さらには、新機能を発現させるといった試みがなされるようになった。三村らは、市販人血清IgG (Native IgG) の鎖間disulfide 結合を還元し、遊離したSH基をカルボキサミドメチル化するという新しい観点から化学修飾蛋白質を作り、この化学修飾IgGのサブフラグメントが、Native IgGには認められない抗潰瘍作用を発現させることを報告した。胃潰瘍は、防御系と攻撃系のバランスの破綻により起るとされており、一種の炎症状態とも考えられる。そこで著者は、新しい抗炎症薬開発の基礎的研究を行なう目的で、この人血清IgG由来還元・アルキル化サブフラグメントの抗炎症作用について検討するとともに、その作用機作を解明することを試みた。

ヒト血清IgG由来還元・アルキル化heavy chainとlight chainの分離・精製は、三村らの方法に従った。原料として市販・筋注用ヒト血清免疫グロブリンG (グロブリンミドリ, Native IgG) を使用した。これをDEAE-celluloseカラムにかけ、素通り画分 (Fr. I) とlinear gradientで溶出される画分 (Fr. II) に分離した。得られたFr. I, Fr. IIの鎖間disulfide 結合を、dithiothreitolで還元し、iodoacetamideでカルボキサミドメチル化後、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下Sephadex G-200カラムによりheavy chainとlight chainに分離した。SDSをDowex 1-X8カラムにより除去後、各サブフラグメントを透析、凍結乾燥して検体とした。なおFr. I, Fr. II由来還元・アルキル化heavy chainをFr. I-H, Fr. II-H, light chainをFr. I-L, Fr. II-Lと命名した。

抗炎症作用のスクリーニングは、rat carrageenin paw edema 法を用いて行なった。その結果、

Native IgG, Fr. I, Fr. II 各25 mg/kgの腹腔内投与により、この浮腫は全く抑制されなかった。Fr. I, Fr. IIの鎖間 disulfide 結合を還元後アルキル化しただけのものも同様に抗浮腫作用を示さなかった。しかし、還元・アルキル化後 heavy chain と light chain に分離して得られた Fr. I-H, Fr. II-H, Fr. I-L, Fr. II-L を各25 mg/kgの用量で腹腔内投与すると、有意な抗浮腫作用が発現した。そこで、これらのサブフラグメントの中で浮腫抑制作用が最も強く、より低分子であり、糖鎖を含まない事等を考慮し、以後 Fr. I-L につきさらに検討を進めた。

炎症過程は、第一期反応として血管透過性の亢進、第二期反応として白血球の浸出遊走、第三期反応として肉芽の形成から組織の再生と大きく三期に分けられている。そこで、この各段階反応に沿って Fr. I-L の抗炎症作用を検討した。第一期反応の血管透過性亢進に対する Fr. I-L の効果を mouse xylene ear 法で検討した結果、25 mg/kgの腹腔内投与により、この透過性は51%抑制された。第二期反応の白血球遊走に対する効果は、rat carboxymethylcellulose pouch 法により検討した。Fr. I-L は、炎症部位である pouch 内への白血球の浸出遊走を2時間目より6時間目まで有意に抑制した。第三期反応の肉芽形成に対する効果を、felt-pellet 法、croton oil granuloma pouch 法で検討した。その結果 Fr. I-L は、肉芽の形成をも有意に抑制した。

急性炎症での主たる作動細胞は白血球、特に多形核白血球である。この白血球は、刺激が加わった部位に遊走し、異物を認識してこれを貪食する。この時活性酸素を放出する。しかし、過度の刺激によりこれらの機能が過剰に発現されると正常組織も傷害を受けるようになる。そこで、Fr. I-L の抗炎症作用メカニズムを解明するため白血球の機能に対する効果を in vivo, in vitro で検討した。遊走能に対する効果は、rat carrageenin pleurisy モデルを使用し、胸腔中に遊走した白血球を数えることにより判定した。その結果 Fr. I-L は、胸腔中への白血球の遊走を有意に抑制した。しかし、Boyden chamber 法を用いた fMLP による白血球遊走を全く抑制しなかった。貪食能に対する効果は、マウスの腹腔内へ遊走した白血球による yeast 菌貪食効率により判定した。Fr. I-L は有意ではないが、白血球によるこの菌の貪食能を増加させた。しかし、モルモット白血球による in vitro での yeast 菌の貪食には無効であった。Fr. I-L は、serotonin 誘発足蹠浮腫を有意に抑制した。この浮腫の発生原因の1つとして、活性酸素の関与が報告されている。この活性酸素は、刺激された白血球により産生されるが、異物を攻撃するだけでなく、生体にも障害をもたらす分子種である。そこで、Fr. I-L の活性酸素除去作用を chemiluminescence 法により検討した。モルモット多形核白血球を fMLP, zymosan で刺激すると、chemiluminescence の急激な増加が認められた。Fr. I-L は、superoxide anion radical scavenger の SOD と同様にこの chemiluminescence を強く抑制した。

以上のように、市販人血清 IgG 由来還元・アルキル化サブフラグメントである Fr. I-H, Fr. I-L, Fr. II-H, Fr. II-L は、もとの IgG には全く認められないカラゲニン足蹠浮腫抑制作用を新たに発現した。この抗浮腫作用の発現には、IgG の鎖間 disulfide 結合を還元・アルキル化後 heavy chain light chain に分離することが必須であった。特に強いカラゲニン足蹠浮腫抑制作用を示した Fr. I-L は、血管透過性亢進、白血球浸出遊走、肉芽の形成という炎症の一連の過程をすべて抑制した。また Fr. I-L は、in vitro において刺激された白血球が産生する活性酸素を除去することを明らかとした。

In vivo においても、活性酸素がその炎症の発生原因とされるセロトニン誘発足蹠浮腫を有意に抑制したので、このFr. I-Lの抗炎症作用メカニズムの1つとして活性酸素の除去作用が考えられた。

## 論文の審査結果の要旨

人血清IgGの鎖間disulfide結合を還元し、遊離したSH基をcarboxamide-methyl化したH鎖、L鎖をそれぞれ単離して得られる化学修飾蛋白質が、もとのIgGには全くみとめられない抗消化性潰瘍作用を発現することが知られている。

本研究は、IgG由来のアルキル化L鎖（Fr. I-L）が胃の防御機構を増強することにより抗潰瘍活性を発現するという知見に基づき、Fr. I-Lが、抗炎症活性を示す可能性について考察したものである。

その結果、Fr. I-Lは、強いカラゲニン足蹠浮腫抑制作用を示し、種々の実験炎症モデルにも有効で、①血管透過性亢進、②炎症部位への白血球浸出遊走、③肉芽腫の過形成という一連の炎症過程をすべて抑制した。さらに炎症部位でのリソゾーム内酵素の放出を抑制し、白血球の炎症局所への遊走を抑えるが、異物の貪食能は促進した。またin vitroにおいて刺激された白血球が産生する活性酸素をsuperoxide dismutase（SOD）と同様に除去した。

以上の業績は、不活性なnative proteinを化学修飾することにより新しい機能を与え、医薬品として開発利用できる可能性を明確にしたものであり、学位論文に値するものと考えられる。