



Title	Vibrio vulnificusの金属プロテアーゼ：血管透過性亢進とその制御の機構ならびに感染症における役割
Author(s)	三好, 伸一
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3085283
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Vibrio vulnificus の金属プロテアーゼ

血管透過性亢進とその制御の機構
ならびに感染症における役割

三 好 伸 一

Vibrio vulnificus の金属プロテアーゼ

血管透過性亢進とその制御の機構
ならびに感染症における役割

三 好 伸 一

目次

緒論	-----	1
本論	-----	5
第 1 章	<u>V. vulnificus</u> protease による血管透過性 亢進の機構 -----	5
第 1 節	序論 -----	5
第 2 節	ラットの皮膚における血管透過性亢進の機構 -----	7
第 3 節	モルモットの皮膚における血管透過性亢進の機構 --	1 1
第 4 節	小括 -----	2 1
第 2 章	<u>V. vulnificus</u> protease によるブラジキニンの 分解と不活性化 -----	2 2
第 1 節	序論 -----	2 2
第 2 節	ブラジキニンの分解と不活性化 -----	2 2
第 3 節	小括 -----	2 6
第 3 章	生体内の <u>V. vulnificus</u> protease に対する 不活性化因子 -----	2 7
第 1 節	序論 -----	2 7
第 2 節	ウシ血漿 α_2 -マクログロブリンによる <u>V. vulnificus</u> protease の不活性化 -----	2 9

第3節	モルモット血漿マクロアルブミンによる <u>V. vulnificus</u> protease の作用の制御 -----	3 4
第4節	小括 -----	4 1
第4章	<u>V. vulnificus</u> 感染症におけるプロテアーゼの 役割 -----	4 3
第1節	序論 -----	4 3
第2節	生菌の浮腫形成作用におけるプロテアーゼの役割 --	4 3
第3節	小括 -----	4 9
総括	-----	5 0
結論	-----	5 7
謝辞	-----	5 9
参考文献	-----	6 0
略語表	-----	6 4

系 論

Vibrio 属の細菌は、淡水から海水までの水域に広く棲息し、水中での有機物分解の一翼を担っているグラム陰性の従属栄養細菌である。この属の細菌の多くは非病原性の菌種であるが、ヒトの疾患の原因となる病原性の菌種も一部には含まれている。1970 年代の半ばまでは、ヒトの疾患の原因細菌として認められていた菌種は、V. cholerae ならびに V. parahaemolyticus のわずか 2 菌種であった。すなわち、V. cholerae は、何世紀にもわたり人類に驚異を与え続けているコレラ症（激しい水様性の下痢症）の原因細菌で、この細菌に汚染された輸入海産物による発症例が我国でも時折報告されている。ただし、コレラ症を引き起こすのは V. cholerae のすべての菌株ではなく、特定の菌体抗原（O1 抗原）を持つ菌株（V. cholerae O1）のみである。もう一方の V. parahaemolyticus は、Fujino らによりシラス食中毒の原因細菌として発見された。そして、我国においては、発見以来食中毒の原因細菌としては常に上位にランクされ、腸炎ビブリオという和名で広く知られている菌種である。しかし、この 2 菌種以外に、最近の研究により次々と新種の病原性 Vibrio 属細菌が発見され、現在ではヒトの疾患の原因となる菌種は 10 菌種にのぼっている（Table 1）¹⁾。これらの中で、V. cholerae non-O1（O1 以外の菌体抗原を持つ V. cholerae の菌株）、V. mimicus、V. parahaemolyticus および V. fluvialis の 4 菌種は食中毒原因菌に指定されている。

前述のように、Vibrio 属の細菌は水系に広く棲息している。したがって、ほとんどの感染が、創傷部位の海水等への接触（創傷感染）、あるいは、細菌に汚染された魚介類の生食（経口感染）により起こっている。経口感染では、細菌が消化管内にとどまり、そこで病原因子を産生し胃腸炎を引き起こす場合

Table 1. Diseases caused by pathogenic *Vibrio* species

Species	Primary disease	Other disease
<i>V. alginolyticus</i>	Wound infections	Septicemia
<i>V. cholerae</i> O1 non O1	Otitis	None
	Cholera	Wound infections
	Gastroenteritis	Septicemia
<i>V. cincinnatiensis</i>	Meningitis	None
<i>V. fluvialis</i>	Gastroenteritis	None
<i>V. furnissii</i>	Gastroenteritis	None
<i>V. hollisae</i>	Gastroenteritis	Septicemia
<i>V. metschnikovii</i>	Cholecystitis	None
<i>V. mimicus</i>	Gastroenteritis	Wound infections
		Otitis
<i>V. parahaemolyticus</i>	Gastroenteritis	Wound infections
<i>V. vulnificus</i>	Septicemia	Gastroenteritis
	Wound infections	Pneumonia

がほとんどである。しかしながら、宿主の健康状態によっては、細菌が消化管壁を破壊し、血液中もしくはリンパ液中へと侵入し、重篤な敗血症を招き死亡する場合もある。とくに最近では、高齢化社会の到来、ならびに、医療技術の進歩により immunocompromised host（易感染性宿主）が増加してきているので、日和見感染症として *V. vulnificus* などの菌種による敗血症の症例の報告が増えてきている。

1970 年に Roland²⁾ は、海水浴とハマグリ拾いのあと左下肢に壊疽が起こった症例から *Vibrio* 属の細菌を分離した。そして、この報告以降、ヒトの創傷部位あるいは血液から類似の性状を持った細菌があいついで分離された。これらの *Vibrio* 属細菌は、*V. parahaemolyticus* として当初は分類されていたが、ラクトースを遅れて分解する点で *V. parahaemolyticus* とは区別されることより、1976 年に Hollis ら³⁾ がこの vibrio を lactose-positive vibrio と呼称した。その後、Farmer⁴⁾ が *V. vulnificus* と命名し現在に至っている。

なお、V. vulnificus という名称は創傷 (vulnus=wound) に由来している。

V. vulnificus は、創傷感染症と敗血症の 2 つのタイプの感染症を引き起こす^{1, 5, 6, 7, 8)}。創傷感染症では、海水等にさらされた創傷部位に、腫脹、発赤、紅斑がまず現われ、やがて激痛を訴えると共に、水疱、壊死性潰瘍の形成へと進行する。敗血症型の感染症は、日和見的な疾患であり、肝疾患あるいは糖尿病などの基礎疾患を持ち、生体の感染防御能力が低下している高齢の男性における症例がほとんどである。そして、症状は重篤な場合が多く、致死率は 50 % と高い。敗血症型では、多くの症例において、悪寒、発熱、低血圧などの敗血症の症状に引き続いて、四肢に紅斑、水疱、出血斑の形成など、創傷感染症と類似した皮膚の 2 次病変が出現する。我国においては、1978 年に最初の症例が報告されて以来、毎年年間に数症例が報告されている⁸⁾。そして、そのほとんどが敗血症型の感染である。

一方、実験動物を使った感染モデル実験^{9, 10, 11)}も行われている。ヒトにおける感染症の場合と同じように、生きた菌体を皮下に接種した場合には、血管透過性の亢進によって血漿成分が血管外へ漏出し、浮腫の形成と極端な血液濃縮 (ヘマトクリット値は、70 % にまで上昇する) が起こる。さらに、組織の破壊、菌体の血液中への侵入によって菌血症も起こるので、動物は数時間以内に死亡する。また、腸管内に投与した場合には、腸管壁の破壊、菌体の生体内への侵入によって菌血症が起こり、2 次的な皮膚障害は出現しないが、動物は 24 時間以内に死亡している。しかし、これに対して死菌を投与した場合には、いかなる病変も出現していない。

Vibrio 属の細菌による非消化器系疾患 (創傷感染、敗血症など) は、もっとも頻度の高い V. vulnificus による感染症でも、年間数症例が報告されているにすぎない (ただし重症例や珍しい症例のみが症例報告として公表され、一般的な軽症例は全く調査されていないのでその実態は不明である)。しかし、

海産物を生食する習慣のある我国では、水系に広く棲息する Vibrio 属の細菌と接触する機会は多いと考えられる。よって、immunocompromised host の増加に伴い、これらの細菌による感染症（とくに日和見的な疾患である敗血症）が今後さらに増加するものと予想される。そこで著者は、代表的な非消化器系疾患の原因となる Vibrio 属細菌である V. vulnificus の病原性を解明するため、その病原因子に着目した。特に、この細菌による感染症の特徴である皮膚病変の発現に関係している因子に焦点を絞り研究を行った。その結果、菌体外に分泌される金属プロテアーゼ（VVP）が、血管透過性亢進作用を持つ炎症のケミカルメディエーターを遊離させ、皮膚病変の発現（とくに浮腫の形成）に深く関与していることを明らかにした。さらに、生体内（血漿中）に VVP の不活性化因子が存在していることも見出し、この因子による VVP 不活性化の機構に関しても検討した。

本 論

第1章 V. vulnificus protease による血管透過性亢進の機構

第1節 序論

緒論で述べたように V. vulnificus 感染症の特徴は、浮腫、壊死性潰瘍などの皮膚病変の発現である^{1, 5, 6, 7, 8)}。一方、感染モデル実験¹⁰⁾では、生菌接種後数時間以内に浮腫が形成され、極端な血液濃縮が起こり動物が死亡している。しかし、死菌を接種した場合には血液濃縮は観察されていない。つまり、V. vulnificus の生菌は、血管透過性を亢進させて浮腫の形成を引き起こす因子を分泌しており、この因子が重要な病原因子であると考えられる。

V. vulnificus が分泌する因子としては、cytolysin (細胞溶解毒素)、プロテアーゼ、スルファターゼ、ホスホリパーゼなどの種々の加水分解酵素、そして、 Fe^{3+} に特異的な低分子のキレート化合物であるシデロフォアなどが知られている。この細菌が cytolysin を分泌することは、1981 年に Kreger と Lockwood¹²⁾ により報告された。Cytolysin は分子量 56 kDa の疎水性の高い蛋白質で、細胞膜のコレステロールと結合したのち、膜上で数分子が会合して直径 3 nm 前後の穴をあけ多種類の細胞を破壊する^{13, 14, 15, 16)}。この毒素をマウスの皮膚に接種すると、組織が破壊され蜂巣炎が形成されるので、菌体の生体内への侵入に cytolysin が関与していると考えられている¹⁷⁾。スルファターゼは、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を無機硫酸と水に不溶性のドデシルアルコールに分解する。したがって、V. vulnificus は SDS を添加した培

地上では、そのコロニーの周囲にドデシルアルコールの蓄積により halo を形成する。この性状を利用して、SDS を含んだ選択培地が考案され、環境分離株の簡便な同定に利用されている^{18, 19)}。しかし、この酵素は精製されていないので、生化学的性状あるいは病原因子としての役割などは不明である。プロテアーゼは 1985 年 Kothary と Kreger²⁰⁾ により部分精製され、一部の性状が報告されている。

さて、生体の生理機能の調節ならびに恒常性の維持に、プロテアーゼとその阻害因子が重要な役割を担っていることは周知の事実である。したがって、病原微生物のプロテアーゼなどの外来性プロテアーゼの侵入によって、生体内のプロテアーゼープロテアーゼ阻害因子のバランスがくずされると、生体は危機的な状態に陥ると考えられる。ところで、日和見病原細菌である Pseudomonas aeruginosa や Serratia marcescens は菌体外にプロテアーゼを分泌している。これらの分泌性プロテアーゼは、生体に備わっている種々の感染防御機構を破壊するので、細菌の病原性と深く関係していると考えられている^{21, 22)}。しかも、S. marcescens の分泌性プロテアーゼにおいては、ハーゲマン因子ー血漿カリクレインーキニン系を活性化し、血管透過性を亢進させることも報告されている^{23, 24)}。V. vulnificus の場合にもすべての菌株がプロテアーゼを分泌しているので、著者は V. vulnificus の病原因子として、分泌性プロテアーゼ (V. vulnificus protease : VVP) に着目した。そして、VVP を精製しその性状に関して研究した結果、VVP が P. aeruginosa や S. marcescens の分泌性プロテアーゼ同様、Zn 1 分子を含む金属プロテアーゼであることを明らかにした²⁵⁾。最近、Kothary と Kreger²⁶⁾ も V. vulnificus の他の菌株から、著者の報告したプロテアーゼと性状がよく一致する金属プロテアーゼを精製した。さらに、著者はこの VVP が血管透過性を亢進させる因子であることを見出したので、この章では VVP による血管透過性亢進の機構について検討した

結果を報告する。

第2節 ラットの皮膚における血管透過性亢進の機構

【実験材料および実験方法】

1) VVP

VVP は敗血症患者の血液から分離された *V. vulnificus* L-180 株の培養上清から精製した²⁵⁾。L-180 株を PY 培地 (1 % bacto pepton、0.5 % yeast extract、2 % NaCl、pH 7.5) で 37 °C、24 時間振とう (140 cycles/min) 培養したのち、7,000 X g、50 分間の遠心操作を行い培養上清を回収した。次に、培養上清を YM 30 メンブレン (Amicon、Lexington、Mass.、U.S.A.) で濃縮後、20 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.5) で平衡化しておいた Sephacryl S-200 カラム (2 by 95 cm) でゲルろ過を行った。得られた各分画について、azocasein に対する分解活性を測定し活性のあった分画を回収した。この回収した分画を 20 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.5) で平衡化しておいた Mono Q HR 5/5 カラム (Pharmacia LKB、Uppsala、Sweden) に添加した。そして、同じ緩衝液でカラムを洗浄したのち、0 M から 0.5 M の NaCl の直線型濃度勾配をかけ、活性のあった NaCl 濃度 0.3 M 付近の分画を回収した。得られた最終標品は高度に精製されており、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)²⁷⁾ ならびに SDS 存在下での PAGE (SDS-PAGE)²⁸⁾ で 1 本のバンドを示したので、この標品を精製 VVP として使用した。

2) 血管透過性の亢進作用に対する抗ヒスタミン剤の効果

0.9 % NaCl 溶液で希釈した 60 pmol (3.0 μ g)、20 pmol (1.0 μ g) および 6 pmol (0.3 μ g) の VVP (100 μ l) を単独、あるいは、1 μ g のジフェ

ンヒドラミン（興和、名古屋、愛知）と混合して、予め 5 % のエバンスブルー（1 ml/kg）を静注しておいた Wistar 系雄性ラット（180—220 g）の背部皮内に接種した。15 分後皮膚を剥ぎとり、血管透過性が亢進したことにより血管系から漏出してきた、エバンスブルー—アルブミン複合体によって形成された青色斑の直径を測定した。

3) 肥満細胞

肥満細胞は Sugiyama のアラビアゴム重層比重法²⁹⁾に従って Wistar 系雄性ラットの腹腔から分離した。分離した細胞は、0.01 % ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水（154 mM NaCl、2.7 mM KCl、0.9 mM CaCl₂、6.7 mM k₂HPO₄-Na₂HPO₄、pH 7.2）に 10⁵ cells/ml の濃度になるように懸濁し使用した。

4) ヒスタミンと乳酸脱水素酵素（LDH）の定量

肥満細胞の懸濁液（0.5 ml）に、20—80 pmol の VVP（10 μ l）を加え 37 $^{\circ}$ C で保温した。3 分後、4.5 ml の氷冷した生理食塩水を加え反応を停止させ、4 $^{\circ}$ C で 3,000 X g、15 分間遠心操作を行った。そして、得られた上清と沈渣のヒスタミン量を Shore らの蛍光法³⁰⁾で定量し、ヒスタミンの遊離率（全ヒスタミン量に対する上清のヒスタミン量）を算出した。さらに、上清と沈渣の LDH 活性を Roy らの方法³¹⁾に従って測定し、LDH の漏出率を算出した。なお、沈渣の場合には、予め 0.01 % Triton X-100 で細胞を破壊したのち、LDH の活性を測定した。

【実験結果】

ラットの皮内に VVP を投与すると、数分以内に、VVP の濃度に依存して青色斑が形成され（Fig. 1）、VVP に血管透過性を亢進させる作用のあることが示された。血管透過性を亢進させ、炎症を引き起こすメディエーターとしては、

ヒスタミン、ブラジキニンが知られている。そこで、VVP の血管透過性亢進作用におけるこれらのメディエーターの関与を検討するため、まず、抗ヒスタミン剤であるジフェンヒドラミンの効果を調べた。その結果、 $1.0 \mu\text{g}$ のジフェンヒドラミンの同時投与で、血管透過性の亢進作用が強く抑えられ (Fig. 1)、ヒスタミンの関与が示唆された。

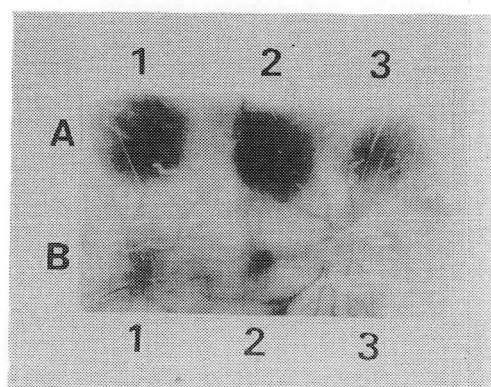


Fig. 1. Effect of diphenhydramine on the permeability reaction of VVP. (A) VVP alone. (B) VVP mixed with $1 \mu\text{g}$ of diphenhydramine. VVP amounting to 60 (1), 20 (2), or 6 pmol (3) was injected into the dorsal skin of a rat, and the blueing spot was measured at 15 min postinjection.

ヒスタミンは、肥満細胞の顆粒中に局在しており、肥満細胞がある刺激に反応して顆粒を放出した場合、あるいは、肥満細胞が破壊された場合に細胞外に出てくる。そこで次に、ヒスタミンの貯蔵細胞である肥満細胞をラットの腹腔から分離し、VVP と 37°C で保温し、遊離ヒスタミン量を測定した。その結果、Fig. 2 に示したように、30 秒以内に脱顆粒が起こりヒスタミンが細胞外へ分泌された。しかし、細胞質酵素である LDH の細胞外への漏出は観察されなかったため、細胞は破壊されていないと判断された。

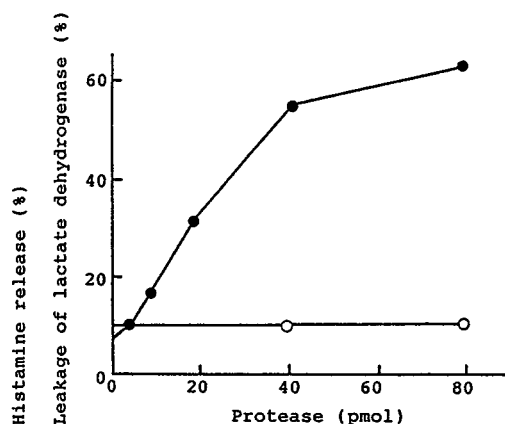


Fig. 2. Histamine release and LDH leakage from isolated rat mast cells induced by VVP. Mast cells were incubated at 37 C for 3 min with VVP, and then histamine release (●) and LDH leakage (○) were determined.

したがって、ラットの皮膚においては、VVP の肥満細胞に対する直接作用によって、開口分泌によるヒスタミン遊離が誘発され、遊離されたヒスタミンの作用により血管透過性が亢進したと考えられた。

【考察】

V. vulnificus による感染症においては、血管透過性を亢進させる因子が、疾患と深く関係していると考えられている。既に、S. marcescens の分泌するプロテアーゼに血管透過性を亢進させる作用があることが知られている^{23, 24)}ので、著者もこの細菌が分泌する VVP に着目した。そして、この VVP をラットの皮内に接種したところ、短時間の内に血管透過性が亢進し血漿中のアルブミンが血管外へ漏出した。そこで、この血管透過性亢進の機構について解析した。その結果、透過性の亢進作用が、抗ヒスタミン剤で強く抑制されたこと、および、ラットの腹腔より分離した肥満細胞を VVP と保温すると 30 秒以内

に開口分泌によるヒスタミン遊離が起こったことから、VVP が肥満細胞に直接作用し、ヒスタミン遊離を誘発し、遊離されてくるヒスタミンの作用によって、血管透過性を亢進させているという機構が考えられた。

肥満細胞に直接作用し、ヒスタミンの遊離を誘発する因子は、多数知られている。しかし、プロテアーゼに関する報告はわずか数例しかない^{32, 33, 34}。しかも、そのすべてが、哺乳動物由来のセリンプロテアーゼ（セリン残基が活性の発現に必須のプロテアーゼ）である。これに対して、VVP は細菌から分離された金属プロテアーゼ（Zn が活性発現に必須のプロテアーゼ）であり、異質な存在である。今日まで、いずれのプロテアーゼにおいても、ヒスタミン遊離を誘発する機構はほとんど明らかにされていない。したがって、VVP が多くのプロテアーゼに共通した機構で、あるいは、全く異なる独自の機構で、ヒスタミン遊離を誘発しているのかは興味のもたれる点である。

第3節 モルモットの皮膚における血管透過性亢進の機構

【実験材料および実験方法】

1) 試薬および材料

ジフェンヒドラミンは興和（名古屋、愛知）より購入した。SQ 20881（テプロチド：pGlu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro）および大豆トリプシンインヒビター（SBTI）は、Sigma Chemical（St. Louis, Mo., U.S.A.）の製品を使用した。Carbobenzoxymethyl-phenylalanyl-arginine-4-methyl-coumaryl-7-amide（Z-Phe-Arg-MCA）と prolyl-phenylalanyl-arginine-MCA（Pro-Phe-Arg-MCA）は、ペプチド研究所（箕面、大阪）より入手した。モルモットのハーゲマン因子および血漿プレカリレインは、それぞれ Yamamoto と Cochrane の方法³⁵、

Imamura らの方法³⁶⁾に従って、Hartley 系モルモット (300—700 g) の血漿より精製した。コーントリプシンインヒビター (CTI) は Hojima らの方法³⁷⁾に基づいて精製した。これらの蛋白質は、SDS-PAGE²⁸⁾によって均一に精製されていることを確認した。

2) 血管透過性の亢進作用

V. vulnificus L-180 株の培養上清より精製²⁵⁾した VVP (6—60 pmol) を予め 5 % のエバンスブルー (1 ml/kg) を静注しておいた Hartley 系雄性モルモット (400—500 g) の背部皮内に接種した。15 分後皮膚を剥ぎとり、血管透過性が亢進したことにより血管系から漏出してきた、エバンスブルー—アルブミン複合体によって形成された青色斑の直径を測定した。

ジフェンヒドラミン (1 μ g)、SQ 20881 (5 nmol) および SBTI (5 nmol) の効果を検討する場合には、これらの試薬を VVP と混合して皮内に接種した。

3) VVP による血漿プレカリクレインの活性化

血漿プレカリクレインの活性型への変換つまり血漿カリクレインの産生は、Uchida らの方法³⁸⁾を改良して測定した。150 mM NaCl および 0.05 % polybrene (Sigma) を含む 20 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 8.0) 1.8 ml に、モルモットの血漿 (200 μ l) と 0—200 pmol の VVP (100 μ l) を加え、さらに、血漿カリクレインに対する基質である Z-Phe-Arg-MCA (最終濃度 0.2 mM) を添加し 30 $^{\circ}$ C で保温した。そして、血漿カリクレインの作用によって、基質から遊離されてくる 7-amino-4-methyl-coumarin (AMC) の量を 370 nm における吸光度を測定することにより経時的に定量した。

4) 精製したハーゲマン因子および血漿プレカリクレインの活性化

200 pmol の VVP (50 μ l) を 150 mM NaCl、0.02 % NaN₃ および 0.01 % ウシ血清アルブミンを含む 20 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) 950 μ l と

混合した。この混合液に、ハーゲマン因子の活性化を調べる場合には、ハーゲマン因子 (200 pmol) と Pro-Phe-Arg-MCA (最終濃度 0.1 mM)、血漿プレカリクレインの活性化を調べる場合には、血漿プレカリクレイン (180 pmol) と Z-Phe-Arg-MCA (0.1 mM) を加え、37 °C で保温した。そして、これらの基質から遊離されてくる AMC の量を Kato らの蛍光光度法 (励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm) ³⁹⁾ に従って経時的に測定した。

【実験結果】

モルモットの皮膚に VVP を投与した場合にも、ラットの皮膚の場合と同様に、数分以内に VVP の濃度に依存して血管透過性が亢進し青色斑が形成された。しかしながら、ラットの皮膚の場合とは異なり、この作用に抗ヒスタミン剤はほとんど効果がなかった。そこで、もう一つのメディエーターであるブラジキニンの関与が考えられた。

ブラジキニンは、ハーゲマン因子—血漿カリクレイン—キニン系の活性化により産生される (Fig. 3)。この系の活性化の最初の段階は、内因系の血液凝固の開始段階でもあるハーゲマン因子の活性型への変換である。次に、活性型ハーゲマン因子が、血漿プレカリクレインを限定分解し、活性のある血漿カリクレインに変換する。この血漿カリクレインは、positive-feedback 的にハーゲマン因子を活性型に変換する一方で、高分子型キノーゲンからブラジキニンを切り出す。この切り出されたブラジキニンが強力な血管透過性亢進因子であり、血漿蛋白質の血管外への漏出を引き起こす。しかしながら、ブラジキニンは、短時間の内に、アンジオテンシン変換酵素ならびにカルボキシペプチダーゼ N によって、不活性なペプチドに分解される。一方、活性型ハーゲマン因子、血漿カリクレインおよびアンジオテンシン変換酵素の特異的な阻害剤として、それぞれ、CTI、SBTI ならびに SQ 20881 が知られている。

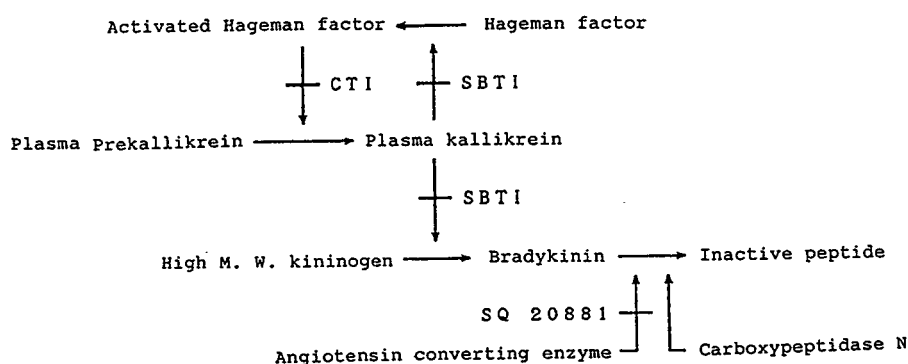


Fig. 3. Schema of Hageman factor—plasma kallikrein—kinin system.

CTI、SBTI ならびに SQ 20881 は、いずれも VVP の蛋白質を分解する活性 (azocasein に対する分解活性)²⁵⁾ には全く影響を与えなかった。そこで、モルモットの皮膚における血管透過性の亢進作用に、ブラジキニンが関与しているのか検討する最初の方法として、これらの阻害剤を VVP と混合して皮内に接種しその効果を調べた。Fig.4 に示したように、VVP の血管透過性亢進作用は、ブラジキニンを活性のないペプチドに分解する酵素であるアンジオテンシン変換酵素の働きを阻害する SQ 20881 (5 nmol) の同時投与によって 3 倍以上増強された。逆に、透過性の亢進作用は、ブラジキニンを産生する酵素である血漿カリクレインの働きを阻害する SBTI (5 nmol) によってほぼ完全に抑えられ (Fig. 5)、活性型ハーゲマン因子に対する阻害因子である CTI の同時投与では 50 % 抑制された。

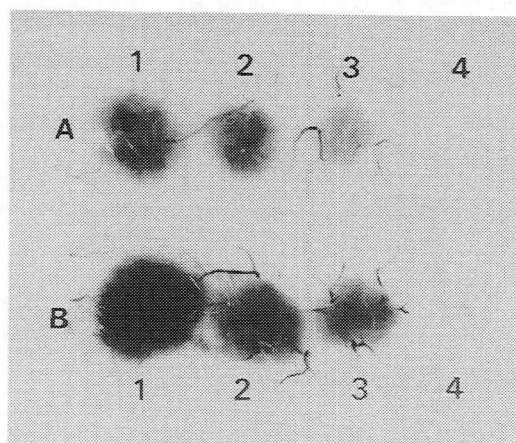


Fig. 4. Effect of SQ 20881 on the permeability reaction by VVP. (A) VVP alone. (B) VVP mixed with 5 nmol of SQ 20881. VVP amounting to 60 (1), 20 (2), or 6 pmol (3) or saline (4) was injected into the dorsal skin of a guinea pig, and the blueing spot was measured at 15 min postinjection.

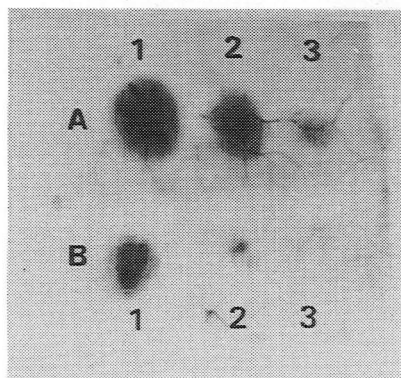


Fig. 5. Effect of SBTI on the permeability reaction by VVP. (A) VVP alone. (B) VVP mixed with 5 nmol of SBTI. VVP amounting to 60 (1), 20 (2), or 6 pmol (3) was injected into the dorsal skin of a guinea pig, and the blueing spot was measured at 15 min postinjection.

次に、モルモットの血漿に、VVP と血漿カリクレインに対する特異的な基質 (Z-Phe-Arg-MCA) を加え、血漿プレカリクレインの活性型への変換を酵素的な手法で調べた。VVP を添加しない場合、基質からの AMC の遊離量はわずかであった。しかし、VVP を添加すると、VVP 自身にはこの基質を分解する作用がないにもかかわらず、多量の AMC が基質から遊離し、VVP の添加によって血漿プレカリクレインが活性のある血漿カリクレインに変換されていることが示された (Fig. 6)。なお、この血漿カリクレインの産生作用は、血漿プレカリクレインに対する抗体で 90 %、ハーゲマン因子に対する抗体で 70 % 阻害された。よって、モルモットの皮膚においては、血管透過性の亢進が、ハーゲマン因子—血漿カリクレイン—キニン系の活性化に基づいていることが強く示唆された。

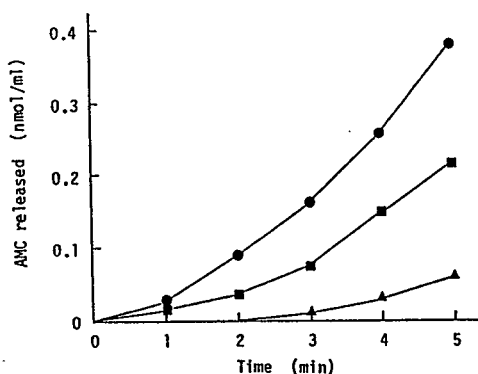


Fig. 6. Activation of plasma prekallikrein by VVP *in vitro*. Guinea pig plasma (0.2 ml) was incubated with VVP amounting to 200 (●) or 100 (■) or with saline (▲) in the presence of Z-Phe-Arg-MCA, a substrate of plasma kallikrein. The amount of AMC released by degradation of the substrate was then measured.

そこで、透過性亢進の機構をより明確にするため、モルモットの血漿からハーゲマン因子と血漿プレカリクレインを精製し、これらの前駆体が VVP の作用により活性型に変換されるか検討した。ハーゲマン因子あるいは血漿プレカリクレインを VVP と保温し、前駆体の活性型への変換を活性型に対する特異的な基質の分解量を定量することによって調べた。その結果、両方の前駆体とも VVP の添加によって基質を分解できるようになった (Fig. 7, Fig. 8)。しかし、VVP 単独ではどちらの基質も分解されなかった。したがって、この結果は、ハーゲマン因子と血漿プレカリクレインの両方が、VVP によって活性型に変換されたことを示している。

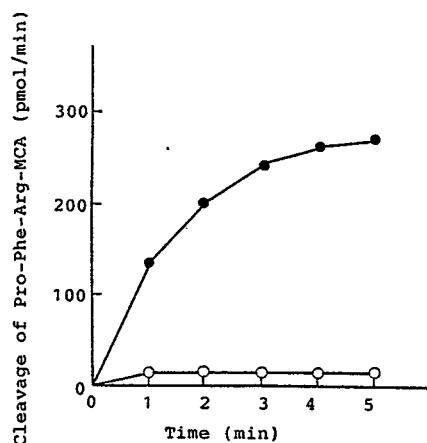


Fig. 7. Activation of Hageman factor by VVP. VVP (200 pmol) was added to 200 pmol of purified guinea pig Hageman factor in a total volume of 1 ml in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl and 0.01 % bovine serum albumin. Immediately after addition of Pro-Phe-Arg-MCA, a substrate of activated Hageman factor, AMC liberation was measured continuously at 37 C. (●) Hageman factor mixed with VVP. (○) Hageman factor alone.

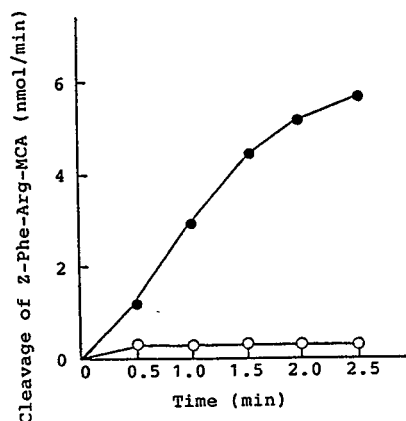


Fig. 8. Activation of plasma prekallikrein by VVP. VVP (200 pmol) was added to 180 pmol of purified guinea pig plasma prekallikrein in a total volume of 1 ml in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl and 0.01 % bovine serum albumin. Immediately after addition of Z-Phe-Arg-MCA, a substrate of plasma kallikrein, AMC liberation was measured continuously at 37 C. (●) Plasma prekallikrein mixed with VVP. (○) Plasma prekallikrein alone.

これらの結果から、モルモットの皮膚においては、VVP は一般的なハーゲマン因子の活性型への変換に加え、血漿プレカリクレインも活性型に変換させるという新しい機構によって、ハーゲマン因子-血漿カリクレイン-キニン系を活性化させ、その結果として産生されてくるブラジキニンの作用によって、血管透過性を亢進させていると考えられる (Fig. 9)。

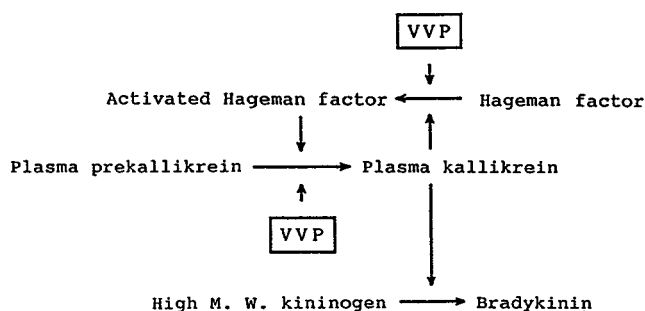


Fig. 9. Activation scheme of Hageman factor—plasma kallikrein—kinin system by VVP.

【考察】

VVP をモルモットの皮膚に投与した場合にも、ラットの皮膚の場合と同様に、短時間の内に血管の透過性が亢進した。しかし、ラットの皮膚の場合とは異なり、透過性亢進作用は抗ヒスタミン剤では抑えられなかった。モルモットの皮膚の場合、この作用は血漿カリクレインの阻害剤である SBTI で完全に抑えられ、逆にアンジオテンシン変換酵素の阻害剤では 3 倍以上増強された。さらに、モルモットの血漿に VVP を添加すると、血漿プレカリクレインが活性型である血漿カリクレインに変換された。そこで、ハーゲマン因子—血漿カリクレイン—キニン系の活性化による血管透過性亢進の機構が考えられた。既に、*S. marcescens* の金属プロテアーゼ (56 kDa プロテアーゼ) が、この系を活性化して血管透過性を亢進させることが知られている^{23, 24)}。56 kDa プロテアーゼの場合、ハーゲマン因子—血漿カリクレイン—キニン系の活性化は、ハーゲマン因子を限定分解して活性型ハーゲマン因子を産生することに基づいている²³⁾。したがって、活性型ハーゲマン因子に対する阻害剤である CTI を混合して投与すると、56 kDa プロテアーゼの血管透過性亢進作用は完全に抑え

られる^{23, 24)}。VVP の場合にも CTI の効果を検討したが、血管透過性亢進作用は部分的にしか抑制されず、VVP が 56 kDa プロテアーゼとは異なる機構によってこの系を活性化していると考えられた。そこで、モルモット血漿より精製したハーゲマン因子ならびに血漿プレカリクレインに VVP を作用させた。その結果、VVP は両方の前駆体を活性型に変換した。したがって、モルモットの皮膚における VVP の血管透過性亢進の機構としては、ハーゲマン因子と血漿プレカリクレインの両方を活性型へ変換させることによって、ハーゲマン因子-血漿カリクレイン-キニン系の活性化を引き起こし、産生されてくるブラジキニンの作用で血管透過性を亢進させるという機構が考えられる。つまり、今日まで一般に、ハーゲマン因子-血漿カリクレイン-キニン系の活性化の開始機構は、ハーゲマン因子の活性型ハーゲマン因子への変換であるといわれていたが、VVP は血漿プレカリクレインも活性型に変換させるという新しい機構によってこの系を活性化することが示された。

ヒスタミンの貯蔵細胞である肥満細胞の各種刺激に対する応答性には種差がある³²⁾。すなわち、ラットの肥満細胞は応答性がよく、数多くの因子による刺激に対して応答し、脱顆粒を起こしヒスタミンを遊離する。これに対して、モルモットの肥満細胞は応答性が悪い。一方、ハーゲマン因子-血漿カリクレイン-キニン系を構成している因子（ハーゲマン因子、血漿プレカリクレイン、高分子型キニンノーゲン）の血漿濃度にも種差がある⁴⁰⁾。すなわち、モルモットの血漿中にはいずれの因子も高濃度に含まれているが、ラットの血漿ではこれらの因子の濃度は低い。したがって、VVP はヒスタミンの遊離を誘発する機構、ならびに、ブラジキニンの産生系を活性化させる機構とによって血管透過性を亢進させるけれども、ラットとモルモットでは 2 つの機構の発達の程度がそれぞれ異なっているため、観察された透過性亢進の機構が一方に偏ったのであろう。

第4節 小括

VVP をラットあるいはモルモットの皮内に接種すると、直ちに血管の透過性が亢進し血漿成分が血管外へ漏出した。この VVP による血管透過性亢進の機構を解析した。その結果、VVP は肥満細胞に直接刺激を与え、ヒスタミンの遊離を誘発する機構、および、ハーゲマン因子と血漿プレカリクレインの両方の前駆体を活性型に変換させることによりハーゲマン因子—血漿カリクレイン—キニン系の活性化を引き起こすという新しい機構とによって、血管透過性を亢進させることが示された。

第2章 V. vulnificus protease によるブラジキニンの分解と不活性化

第1節 序論

第1章で述べたように、モルモットの皮膚においては、VVP はハーゲマン因子ならびに血漿プレカリクレインを、それぞれ活性型ハーゲマン因子と血漿カリクレインに変換させることにより、ハーゲマン因子-血漿カリクレイン-キニン系を活性化して血管透過性を亢進させる。この活性型ハーゲマン因子あるいは血漿カリクレインをモルモットの皮膚に投与した場合、これらの因子による血管透過性の亢進は、生体内のブラジキニン分解酵素であるカルボキシペプチダーゼ N と類似した基質特異性を持っているブタ膵臓由来のカルボキシペプチダーゼ B (CPB) 1.8 U の同時投与で 90 % 以上抑制される^{41, 42)}。そこで、VVP についても CPB の効果を検討したが、CPB (1.8-8.7 U) は VVP の血管透過性亢進作用には全く影響を与えなかった。また、VVP に CPB を不活性化する活性も認められなかった。よって、この矛盾の原因として、VVP が自らの作用でブラジキニンを分解し不活性化していることが予想されたので、この章ではこの点に関して検討を行った。

第2節 ブラジキニンの分解と不活性化

【実験材料および実験方法】

1) 試薬

ブラジキニンはペプチド研究所の製品を使用し、サーモリジンとセラチオペ

ブチダーゼは Sigma Chemical より購入した。

2) ブラジキニンの分解

ブラジキニン (100 nmol) と VVP (0.3–10 pmol すなわち 15–500 ng) を 50 mM トリス–塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で 30 °C、30 分間保温し、分解の程度をニンヒドリン法⁴³⁾で測定した。さらに、ブラジキニンの分解を薄層クロマトグラフィー (TLC) で確認した。すなわち、反応液 (5 μ l) をシリカゲルプレートにスポットし、n-ブタノール : 酢酸 : 水 = 2 : 1 : 1 で展開し、ニンヒドリンスプレーで分解物を検出した。

サーモリジンとセラチオペブチダーゼのブラジキニン分解作用を調べる場合には、1 μ g のプロテアーゼを 100 nmol のブラジキニンと 30 °C、30 分間保温した。

3) ブラジキニンの血管透過性亢進活性に対する VVP の効果

ブラジキニン (5–20 nmol) と VVP (10 pmol) を 10 mM トリス–塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で 30 °C、30 分間保温し、予め 5 % エバンスブルーを静注しておいた Hartley 系雄性モルモット (400–500 g) の背部皮内に接種した。15 分後皮膚を剥ぎとり、ブラジキニンの血管透過性を亢進させる活性により形成された青色斑の直径を測定した。

【実験結果】

ブラジキニンを VVP と保温すると、VVP の濃度に依存してブラジキニンが分解された (Fig. 10)。さらに TLC で解析したところ、ブラジキニン (R_f = 0.33) 以外の物質 (R_f = 0.46) が検出された。次に、VVP と保温後のブラジキニンをモルモットの皮膚に投与した。Fig. 11 に示したように、ブラジキニンの血管透過性を亢進させる活性は著しく減少しており、VVP との保温によってブラジキニンが不活性化されたことが示された。

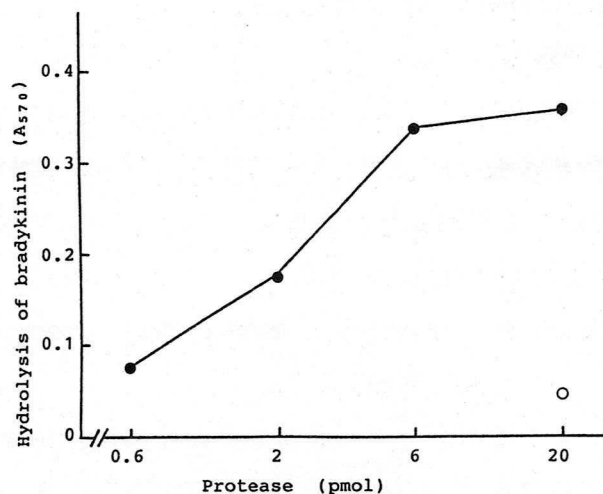


Fig. 10. Hydrolysis of bradykinin by VVP. VVP (0.6–20 pmol) was incubated with 100 nmol of bradykinin at 30 C for 30 min, and the degree of hydrolysis was measured by ninhydrin method. (●) Bradykinin incubated with VVP. (○) Bradykinin incubated with phosphoramidon-inactivated VVP.

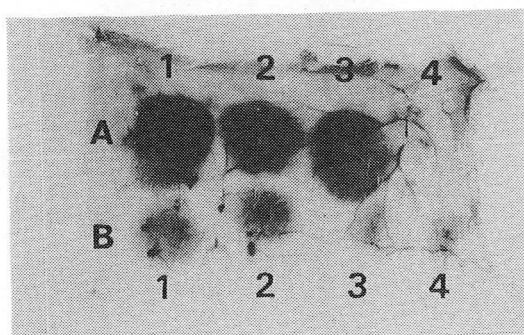


Fig. 11. Effect of VVP on the permeability reaction by bradykinin. (A) Bradykinin alone. (B) Bradykinin incubated with 10 pmol of VVP. Bradykinin amounting to 20 (1), 10 (2), or 5 nmol (3) or saline (4) was injected into the dorsal skin of a guinea pig, and the blueing spot was measured at 15 min postinjection.

以前 Miyata ら^{44, 45)} は、*Serratia* 属細菌の産生する金属プロテアーゼ（セラチオペプチダーゼ）にブラジキニンを分解する作用があることを報告している。そこで、セラチオペプチダーゼ、ならびに、細菌由来の金属プロテアーゼの“prototype”であるサーモリジンについても、ブラジキニンの分解作用を調べその分解物を TLC で解析した。これらの金属プロテアーゼもブラジキニンを分解したが、分解産物は異なっていた。すなわち、TLC 分析において、サーモリジンの分解産物は VVP の分解産物と同じ位置 ($R_f=0.46$) に移動したが、セラチオペプチダーゼの分解物は移動度が異なっていた ($R_f=0.55$)。

【考察】

VVP はブラジキニン産生系を活性化し血管透過性を亢進させるプロテアーゼであるが、産生されたブラジキニンを不活性なペプチドに分解し、血管透過性の亢進作用を負に調節していることも示された。このことは、VVP が抗炎症薬として利用できる可能性を示している。例えば、VVP にポリエチレングリコールなどの高分子化合物を結合させると、立体的な障害によってハーゲマン因子や血漿プレカリクレインなどの高分子量の蛋白質に対しては作用できないけれども、立体的な障害が少ない低分子量のペプチドであるブラジキニンに対しては作用できる酵素に修飾できるかもしれない。

金属プロテアーゼは、基質特異性に基づいて 2 つのグループに大別できる。すなわち、サーモリジンに代表される基質特異性が狭く、疎水性アミノ酸のイミノ基側のみを分解するグループ⁴⁶⁾と、セラチオペプチダーゼに代表される基質特異性が広いグループ^{44, 47)}である。VVP は、サーモリジンの属するグループに対する競合的な阻害剤である phosphoramidon で阻害され^{20, 25)}、このグループに特異的な合成基質を分解した。そして今回、ブラジキニンに対する分解作用に関しても VVP とサーモリジンに違いは認められなかった。したがっ

て、VVP はサーモリジンと同じグループに属する金属プロテアーゼであると考えられる。

第3節 小括

ブラジキン産生系を活性化させるプロテアーゼである VVP には、反対の作用、すなわち、炎症の重要なメディエーターであるブラジキニンを分解し、その血管透過性亢進活性を消失させる作用もあった。つまり、VVP は血管透過性の亢進作用を負に調節する因子としても機能していることが示された。

第3章 生体内の *V. vulnificus* protease に対する不活性化因子

第1節 序論

既に述べてきたように、VVP は炎症のメディエーターを遊離させ、血管透過性を亢進させるプロテアーゼである。しかしながら、ラットとモルモットいずれの動物の皮内に接種した場合にも、VVP は短時間の内に不活性化されてしまい、皮内接種後 10 分を経過した時点では、VVP に血管透過性を亢進させる活性は認められなかった。このように VVP が短時間で失活したことより、血漿中に VVP に対する不活性化因子が存在しており、VVP の作用によって血管の透過性が亢進すると、この因子が血管外に漏出してきて VVP を不活性化していると考えられた。

哺乳動物の血漿中には、多種類のプロテアーゼ不活性化因子が存在している。しかし、細菌の産生する金属プロテアーゼに対する特異的な不活性化因子は、いずれの哺乳動物の血漿からも単離されていない。さて、ヒトの血漿中に高濃度 (2-4 mg/ml) に存在している α_2 -マクログロブリン (α_2 M) は、分子量 180 kDa の同一サブユニット 4 個から構成されている 700 kDa の巨大な糖蛋白質である^{48, 49, 50)}。この蛋白質は、内因性のプロテアーゼ (トリプシン、キモトリプシンなどの消化酵素、線溶系-凝固系-キニン系に関連した血漿中のプロテアーゼ、リソゾームのプロテアーゼなど) だけでなく、数多くの外来性プロテアーゼ (微生物プロテアーゼなど) も 1 : 1 のモル比で不活性化する万能な因子である^{45, 48, 51, 52)}。 α_2 M によるプロテアーゼの不活性化には、まず、各サブユニットの中央付近に位置している bait region と呼ばれている部分が、プロテアーゼにより切断される必要がある。この切断が引き金とな

り、 $\alpha_2 M$ 分子の構造が変化し、プロテアーゼ分子が $\alpha_2 M$ 分子内に取り込まれ不活性化される^{48, 49, 50}。つまり、 $\alpha_2 M$ によるプロテアーゼの不活性化は立体的な障害に基づいており、プロテアーゼの活性中心がブロックされてしまうわけではない。したがって、不活性化されている状態（ $\alpha_2 M$ に取り込まれている状態）でも、プロテアーゼは立体障害を受けない低分子量の基質はよく分解できる。一方、他の多くの哺乳動物の血漿からも、ヒトの $\alpha_2 M$ と性状がよく似ている一群の蛋白質が単離されており、 α -マクログロブリンファミリー（ α -macroglobulins : αMs ）と総称されている^{49, 53, 54}。これらの蛋白質もヒト血漿の $\alpha_2 M$ と同様の機構によって多種類のプロテアーゼを不活性化できる。

予試験的に、ヒト、モルモットおよびラットの血漿を用いて、血漿中の VVP 不活性化因子を検索した結果、いずれの動物種においても分子量 700 kDa の高分子量の成分のみが VVP の活性を抑制した。しかも、ヒト血漿の場合には、 $\alpha_2 M$ に対する抗体で血漿を予め処理すると、VVP を不活性化する作用が失われた。よって、血漿中に存在し、皮内で機能している VVP の不活性化因子が、 αMs である可能性が強く示唆された。この章では、 αMs が VVP の不活性化因子であることを明らかにするため、まず、ウシ血漿中の αMs に属する蛋白質（ α -macroglobulin : αM ）である $\alpha_2 M$ を用いて、VVP の不活性化とその機構に関して検討を行った。次に、モルモットにおいて、モルモット血漿中の αM であるマクロアルブミン（MA）が、皮内に接種された VVP を不活性化し、VVP の作用を生体内で制御していることを明らかにした。

第2節 ウシ血漿 α_2 -マクログロブリンによる *V. vulnificus* protease の不活性化

【実験材料および実験方法】

1) 試薬および材料

ウシ血漿 α_2 M は Boehringer-Mannheim (Germany) より購入し、使用時に活性のある α_2 M の濃度を Swenson と Howard の方法⁵⁵⁾に従って定量した。Azocasein と elastin-Congo red は Sigma Chemical、carbobenzoxy-glycyl-phenylalanine amide (Z-Gly-Phe-NH₂) はペプチド研究所よりそれぞれ入手した。

2) VVP の活性測定

ラットおよびモルモットの皮膚における血管透過性亢進活性は、第1章で述べた方法により測定した。Z-Gly-Phe-NH₂ に対する分解活性 (peptidase 活性) は Morihara と Tsuzuki の方法⁴⁶⁾に従って測定した。VVP と Z-Gly-Phe-NH₂ (最終濃度 2.5 mM) を 300 μ l の 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で 30 $^{\circ}$ C、30 分間保温したのち、700 μ l の氷冷したクエン酸緩衝液 (pH 5.0) を加えて反応を停止させ、基質の分解の程度をニンヒドリン法⁴³⁾で定量した。Azocasein に対する分解活性 (proteinase 活性) は Kreger と Lockwood の方法¹²⁾を一部改良して²⁵⁾測定した。すなわち、VVP と azocasein (1 mg) を 600 μ l の 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で 30 $^{\circ}$ C、15 分間保温したのち、5 % トリクロル酢酸 (1.4 ml) を加え反応を停止させた。次に、この反応液を 1,000 X g で 5 分間遠心操作し、得られた上清に等量の 0.5 N NaOH を加え 440 nm における吸光度を測定した。Elastin-Congo red に対する分解活性 (elastase 活性) は Kothary と Kreger の方法²⁰⁾に従って測定した。VVP と elastin-Congo red (2 mg) を 200 μ l の 50 mM トリス-塩酸

緩衝液 (pH 8.0) 中で 30 ℃、3 時間振とう (180 cycles/min) しながら保温した。そして、氷冷した緩衝液を加え反応を停止させたのち、1,000 X g で 5 分間遠心操作を行ない得られた上清の 495 nm における吸光度を測定した。

3) ウシ血漿 α_2 M による VVP 活性の阻害

VVP (100 pmol) と α_2 M (0—150 pmol) を 0.2 M NaCl を含む 30 mM トリス—塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で 30 ℃、30 分間保温後、残っている VVP の活性を測定し活性の阻害率を算出した。

4) α_2 M-VVP 複合体の形成

等モル量の VVP と α_2 M を 0.2 M の NaCl を含む 30 mM トリス—塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で 30 ℃、30 分間保温した。そして、複合体の形成を確認するため、反応液の一部 (200 μ l) を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化しておいた TSK G-4000 SW カラム (東ソー、東京) に添加してゲルろ過を行った。そして、各分画の 280 nm における吸光度および Z-Gly-Phe-NH₂ に対する分解活性を測定した。

【実験結果】

1) ウシ血漿 α_2 M による VVP 活性の阻害

高分子量の基質である elastin と casein に対する分解活性 (elastase 活性と proteinase 活性) は α_2 M の濃度に依存して阻害され、VVP と α_2 M のモル比 1 : 0.9 で阻害効果はプラトーに達した (Fig. 12)。この濃度比において elastase 活性はほぼ完全に抑えられたが、proteinase 活性は 15 % 程度残っていた。これに対して、Z-Gly-Phe-NH₂ に対する peptidase 活性は過剰量の α_2 M でも全く阻害されなかった。第 1 章で述べたように、VVP はラットの皮膚においてはヒスタミンを遊離させ、モルモットの皮膚においてはブラジキニン産生系を活性化させることによって血管透過性を亢進させる。VVP の

血管透過性亢進活性も、ラット、モルモットどちらの皮膚の場合にも、等モル量の α_2 M で 90 % 以上阻害された (Fig. 13)。

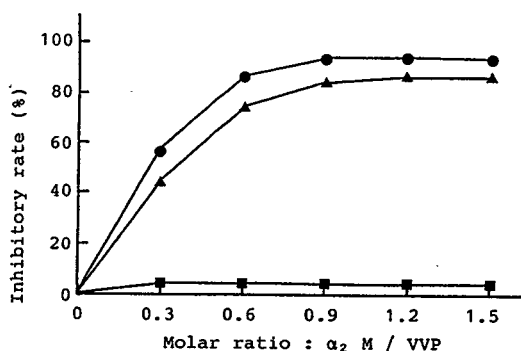


Fig. 12. Effect of α_2 M on the protease activity of VVP. VVP (100 pmol) was incubated with various concentrations of α_2 M at 30 C for 30 min, the residual proteolytic and peptidase activities were assayed, and the inhibitory rate of elastase(●), caseinase (▲), and peptidase (■) activities were calculated.

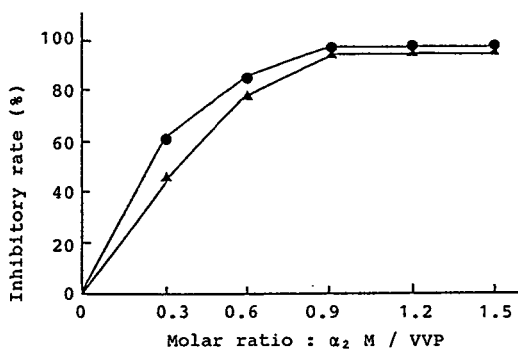


Fig. 13. Inhibitory effect of α_2 M on the permeability activity of VVP. VVP (100 pmol) was incubated with various concentrations of α_2 M at 30 C for 30 min, the residual permeability activity was measured, and the inhibitory rate of the activity in rat skin (●) and guinea pig skin (▲), were calculated.

次に、VVP と α_2 M を 1 : 1 あるいは 1 : 4 のモル比で 30 °C で保温し、残っている VVP の proteinase 活性を経時的に測定した。その結果、どちらのモル比の場合にも、VVP の活性は 1 分以内に阻害され、 α_2 M と VVP の相互作用が極めて速いことが示された。

2) α_2 M-VVP 複合体の形成とその性状

VVP と α_2 M を 1 : 1 のモル比で混合して、30 °C、30 分間保温したのち、TSK G-4000 SW カラムに添加してゲルろ過を行った。Fig. 14 に示したように、 α_2 M (280 nm における吸光度が最大となる位置) と VVP (peptidase 活性が最大となる位置) が同じ分画に溶出したので、 α_2 M-VVP 複合体が形成されていることが示された。また、複合体の保持時間 (32.1 分) は native な α_2 M の保持時間 (31.4 分) よりも少し遅く、 α_2 M-VVP 複合体が native な α_2 M 分子よりも少しコンパクトな形状をしていることも示された。

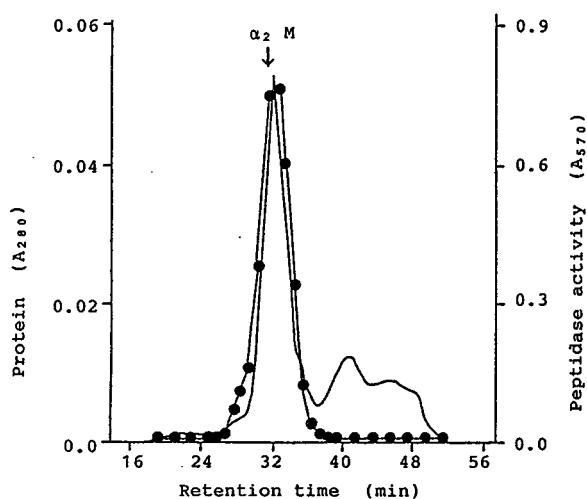


Fig. 14. TSK G-4000 SW column chromatogram of α_2 M incubated with VVP. The α_2 M (500 pmol) and VVP (500 pmol) were incubated at 30 °C for 30 min. The mixture was applied to a TSK G-4000 SW column equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8), and the column was eluted with the same buffer. Five hundred microliter fractions were collected, and peptidase activity toward Z-Gly-Phe-NH₂ was measured. Symbols : (—) absorbance at 280 nm, (●) peptidase activity.

次に、SDS の存在下で α_2 M-VVP 複合体の電気泳動を行った。 α_2 M の各サブユニットは中央付近（おそらく bait region）で切断されており、 α_2 M のサブユニット（185 kDa）に相当するバンドが消出し、90 kDa 付近に新しいバンドが形成された。さらに、 α_2 M-VVP 複合体の peptidase 活性の阻害実験を行った。複合体の peptidase 活性は、低分子量のペプチド性の阻害剤である phosphoramidon では阻害されたが、高分子量の IgG 抗体では抑えられなかった。

【考察】

哺乳動物の血漿中に高濃度（1-4 mg/ml）に存在している α Ms は、プロテアーゼを分子内に取り込むことにより、多種類のプロテアーゼを 1 : 1 のモル比で不活性化する万能な因子である^{48, 49, 50}。つまり、 α Ms による不活性化の場合には、プロテアーゼの活性中心はブロックされていないので、不活性化されていても低分子量の基質や阻害剤とは反応できる^{48, 49, 50, 51, 53, 54}。しかしながら、高分子量の基質や抗体に対する反応性は立体的な障害により著しく低下している^{48, 49, 50, 51, 53, 54}。今回、ウシ血漿中の α Ms のメンバーである α_2 M を用いて、VVP との相互作用を検討した結果、高分子量の基質（elastin と casein）に対する VVP の分解活性は等モル量の α_2 M で阻害されたが、低分子量の基質である Z-Gly-Phe-NH₂ に対する分解活性は阻害されなかった。さらに、 α_2 M と複合体をつくっている VVP の Z-Gly-Phe-NH₂ に対する分解活性が、ペプチド性の阻害剤である phosphoramidon では抑えられたが、高分子量の IgG 抗体では中和されなかった。これらの結果は、VVP も他の多くのプロテアーゼと同じように、 α_2 M 分子内に取り込まれて不活性化されたことを示している。

α M によるプロテアーゼの取り込みには、 α M の各サブユニットの bait

region の切断と、その後に起こる α M 分子の構造の変化が必要である^{48, 49, 50)}。ウシ血漿 α_2 M と VVP の複合体の場合にも、 α_2 M 分子に同様の変化が観察されたので、ウシ血漿 α_2 M による VVP 不活性化の機構も他のプロテアーゼの場合と同じであると考えられる。

第3節 モルモット血漿マクロアルブミンによる V. vulnificus protease の作用の制御

【実験材料および実験方法】

1) モルモット血漿中の VVP に対する不活性化因子の精製

Hartley 系モルモット (400–500 g) より回収した血漿を XM 300 メンブレン (Amicon) で濃縮した。この濃縮物を 20 mM トリス–塩酸緩衝液 (pH 8.5) で平衡化しておいた Sephacryl S-400 カラム (2 by 95 cm) に添加してゲルろ過を行った。各分画について VVP の azocasein に対する分解作用を阻害する活性 (VVP 不活性化因子活性) を測定し、分子量 700 kDa の不活性化因子活性があった分画を回収した。この回収した分画を 20 mM トリス–塩酸緩衝液 (pH 8.5) で平衡化しておいた Mono Q HR 10/10 カラム (Pharmacia LKB) に添加した。カラムを同じ緩衝液で洗浄後、0 M から 0.5 M の NaCl の直線型濃度勾配をかけ、溶出してきた不活性化因子の分画を回収した。次に、この分画を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化しておいた Mono Q HR 5/5 カラム (Pharmacia LKB) に添加した。そして、カラムを洗浄したのち、0 M から 0.5 M の NaCl の直線型濃度勾配をかけ、不活性化因子活性のあった NaCl 濃度 0.3 M 付近の分画を回収した。

得られた最終標品は、免疫電気泳動では全モルモット血漿蛋白質に対する抗

体 (Sigma) に対してアルブミン領域に沈降線を形成し、SDS-PAGE²⁸⁾ では 180 kDa の位置に 1 本のバンドを形成した。したがって、精製したモルモット血漿中の VVP に対する不活性化因子は、 α Ms に属するマクロアルブミン (MA)⁵³⁾ であることが明かとなったので、この標品を精製 MA として使用した。

2) MA に対する抗体の調製

精製した MA (1.0 mg) を等量の Freund 完全アジュバント (Difco Laboratories) と混合して、ウサギの背部皮下に接種した。2 週間後と 4 週間後にも同様の方法で皮下に接種し、初回接種の 5 週間後に抗血清を得た。この抗血清に 40 % 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、IgG 分画を部分精製し、MA に対する IgG 抗体として使用した。さらに、得られた IgG 抗体の一部は Fab 抗体調製のために使用した。すなわち、IgG 抗体を 20 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.5) で平衡化しておいた Protein A superose HR 10/2 カラム (Pharmacia LKB) に結合させ、100 mM クエン酸緩衝液 (pH 3.0) で溶出させた。次に、10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に対して透析を行ったのち、パパイニン (1 mg/100 mg of IgG) と 37 °C で 4 時間保温し、IgG を Fab 断片に消化した。この消化物をもう一度 Protein A superose HR 10/2 カラムに添加し、未消化の IgG と IgG の Fc 断片を取り除いた。こうして得られた標品を MA に対する Fab 抗体として使用した。

コントロール IgG と その Fab 断片を調製する場合には、0.9 % NaCl 溶液を等量の Freund 完全アジュバントと混合してウサギの背部皮下に接種した。

3) MA による VVP 活性の阻害

VVP (50 pmol) と MA (0–75 pmol) を 25 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) 中で 30 °C、5 分間保温した。そして、残っている VVP のモルモットの皮膚における血管透過性亢進活性、azocasein に対する分解活性 (proteinase 活性)、および、Z-Gly-Phe-NH₂ に対する分解活性 (peptidase 活性) を測定し

た。

4) VVP の作用に対する MA の抗体の効果

血管透過性亢進作用に対する効果を検討する場合には、VVP (0.6–20 pmol) を MA に対する Fab 抗体 (20 μ l) と混合し、予めエバンスブルーを静注しておいたモルモットの背部皮内に接種した。そして、30 分後に青色斑の直径を測定した。

血漿カリクレインの産生作用に対する効果を調べる場合には、モルモットの血漿 (100 μ l) を MA に対する IgG 抗体 (30 μ l) と 4 $^{\circ}$ C で 20 分間保温して MA の活性を抑えたのち、0.9 % NaCl と 0.05 % polybrene (Sigma) を含む氷冷した 20 mM トリス–塩酸緩衝液 (pH 8.0) 900 μ l と混合した。この混合溶液に VVP (20–60 pmol) と血漿カリクレインに対する特異的な基質である Z-Phe-Arg-MCA (最終濃度 0.2 mM) を加え、37 $^{\circ}$ C で 10 分間保温した。そして、血漿カリクレインの作用によって基質から遊離した AMC の量を 370 nm における吸光度を測定することにより定量した。

5) 血管外漏出液の回収

VVP (200 pmol) をモルモットの背部皮内に接種し、15 分後に皮膚を剥ぎとり、血管外に漏出してきた液体を回収した。そして、一次元放射状免疫拡散法により漏出液中の MA の濃度を定量した。

6) 血管外漏出液の TSK G-4000 SW カラムによる分画

血管外漏出液 200 μ l を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化しておいた TSK G-4000 SW カラムに添加してゲルろ過を行った。そして、VVP に対する不活性化因子を検索する場合には、各分画 (100 μ l) を 10 μ l の MA に対する IgG 抗体、あるいは、コントロール IgG と 30 $^{\circ}$ C で 10 分間保温したのち、VVP の azocasein 分解活性に対する阻害作用を測定した。さらに、血管外液の MA 分画についてはアセトン処理も行った。つまり、外液の MA 分

画を回収したのち、60 % アセトン、さらに、20 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.5) に対して透析を行い、そして、MA-VVP 複合体を検出するため VVP に対する抗体とゲル内沈降反応を行った。

【実験結果】

1) In vitro での VVP 不活性化

ウシ血漿 α_2 M と同様に、モルモット血漿 MA も VVP を 1 : 1 のモル比で不活性化した。すなわち、VVP の血管透過性亢進活性 (ブラジキニン産生系の活性化作用) と azocsein に対する分解活性は、ほぼ等モル量の MA で 90 % 以上抑えられたが、Z-Gly-Phe-NH₂ に対する分解活性は過剰量の MA でも全く阻害されなかった (Fig. 15)。また、MA と保温した VVP の peptidase 活性は phosphoramidon では完全に阻害されたが、VVP に対する IgG 抗体では中和されなかった。したがって、モルモットの血漿 MA も VVP を分子内に取り込み不活性化したと考えられた。

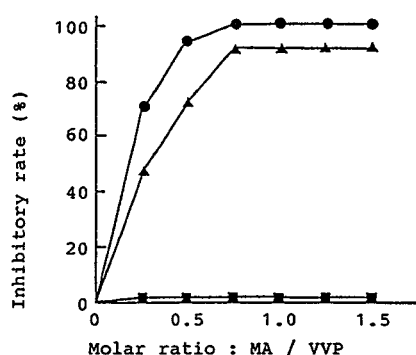


Fig. 15. Effect of MA on the activity of VVP. VVP (50 pmol) was incubated with various concentration of MA at 30 C for 5 min, the residual activities were assayed, and the inhibitory rates of peptidase (■), proteinase (▲), and permeability (●) activities were calculated.

以前 Miyata ら⁵¹⁾は、ヒトの血漿 α_2 M と複合体をつくっているセラチオペプチダーゼの抗原性が、アセトン処理を行うと回復することを報告した。そこで、VVP についてもアセトン処理の効果を調べたところ、MA に取り込まれ不活性化された状態では消失していた VVP の抗原性が、60 %アセトンに対して透析を行うと回復し、ゲル内沈降反応で VVP に対する抗体と沈降線を形成した。

2) In vivo での VVP 不活性化

MA に対する Fab 抗体 (20 μ l) は、ブラジキニンの血管透過性亢進作用には影響を与えなかったが、ブラジキニン産生系を活性化する VVP の血管透過性亢進作用は 10 倍増強させた (Fig. 16)。

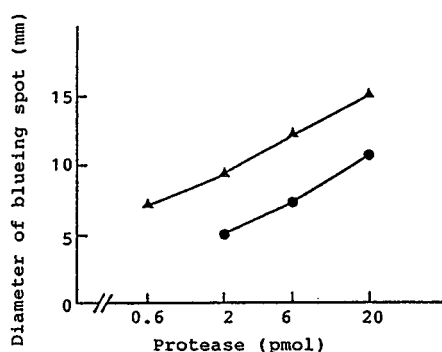


Fig. 16. Enhancement of permeability action of VVP by antibody against MA. VVP was mixed with 20 μ l of anti-MA Fab antibody (▲) or control Fab fragment (●) and was injected into the dorsal skin of a guinea pig. At 30 min postincubation, diameter of the blueing spot was measured.

また、モルモット血漿 (100 μ l) を MA に対する IgG 抗体 (30 μ l) で処理して MA の作用を抑えたのち、VVP を添加するとブラジキニン産生酵素である血漿カリクレインの産生量が著しく増加した (Fig. 17)。よって、MA が皮内に投与された VVP を短時間の内に不活性化していることが強く示唆された。

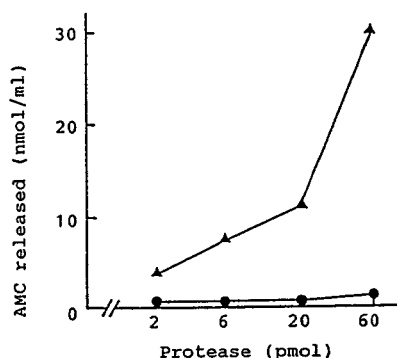


Fig. 17. Enhancing effect of antibody against MA on *in vitro* activation of plasma prekallikrein by VVP. Guinea pig plasma (0.1 ml) was pretreated with 30 μ l of anti-MA IgG antibody (▲) or control IgG (●) and was incubated with VVP in the presence of Z-Phe-Arg-MCA, a substrate of plasma kallikrein. At 10 min after the incubation, the amount of AMC released by hydrolysis of the substrate was measured.

MA はモルモットの皮膚には含まれていない⁵³⁾ので、MA が皮内で VVP を不活性化するためには、VVP 接種後活性のある MA が血管外へ漏出し、その場で VVP を分子内に取り込む必要がある。そこで、VVP の皮内接種後血管外に漏出してきた液体を回収した。この漏出液には MA が血漿中の濃度の約 80 % の濃度で含まれていた。次に、漏出液を TSK G-4000 SW カラムでゲルろ過し各分画の VVP 不活性化活性を測定した。その結果、分子量 700 kDa の高分子量の成分のみが VVP を不活性化した (Fig. 18)。しかも、この成分を MA に対する抗体で予め処理すると VVP 不活性化作用が完全に中和された (Fig. 18) ので、血管外漏出液中の VVP 不活性化因子が MA であることが明かとなった。

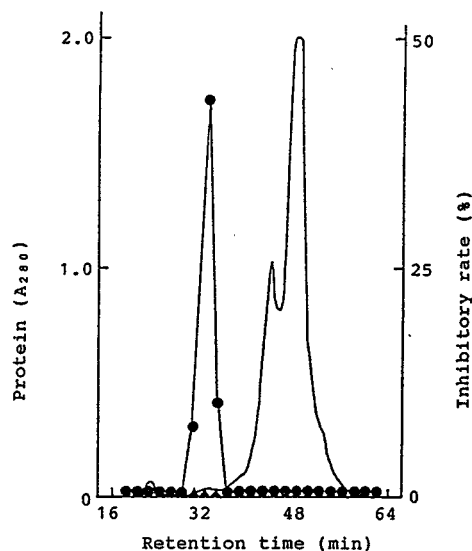


Fig. 18. TSK G-4000 SW column chromatogram of the extravascular fluid collected after the injection of VVP. The fluid (0.2 ml) was applied to a TSK G-4000 SW column, one milliliter fractions were collected, and VVP inactivating activity (inhibitory rate of proteinase activity) of each fraction was calculated. Symbols : (—) absorbance at 280 nm, (●) VVP-inactivating activity of the fraction preincubated with control IgG, (▲) VVP-inactivating activity of the fraction preincubated with anti-MA IgG antibody.

さらに、皮内における MA-VVP 複合体の形成を調べるために、血管外漏出液の MA 分画 (VVP を不活性化した分画) を回収し、VVP に対する抗体とゲル内沈降反応を行った。MA 分画はそのままでは抗体と反応できなかったが、60 % アセトンに対して透析を行うと VVP に対する抗体と反応し沈降線を形成した。しかも、この沈降線は精製 VVP のものと完全にヒューズした。これらの結果は、VVP 接種後活性のある MA が血管外に漏出し、漏出した場所で VVP を分子内に取り込んでいることを示している。

【考察】

モルモットの皮内に接種された VVP は、その血管透過性を亢進させる作用の結果、血管系から MA の漏出を引き起こし、この漏出してきた MA 分子内に取り込まれて不活性化された。このことは、皮内に接種された VVP の血管透過性亢進活性が極めて短時間で消失した事実とよく一致している。モルモットの MA と類似した一群の蛋白質 (α Ms) が、哺乳動物の血漿中に広く存在している^{48, 49, 50, 54)}。この α Ms は多数の内因性プロテアーゼを直ちに不活性化できる^{50, 53, 54)} が、あまりにも多種類のプロテアーゼが α Ms で不活性化されるので、 α Ms の真の標的となっている内因性プロテアーゼは不明である。したがって、 α Ms の生体内における生理的役割もはっきりしていない。一方、 α Ms は病原微生物の産生するプロテアーゼなどの多くの外来性プロテアーゼも短時間の内に不活性化できる^{45, 48, 51, 52)}。これらの事実を考え合わせると、 α Ms の第一の役割は、生体内の恒常性を乱して生体を危機的狀態に陥れる可能性がある外来性プロテアーゼ、特に病原微生物の産生するプロテアーゼを直ちに不活性化し、生体を保護することにあるのかもしれない。換言するならば、この不活性化因子は、病原微生物に対する生体の構成的な生体防御機構として発達したのかもしれない。

第4節 小括

VVP を皮内に接種すると、血管の透過性が亢進し血管系から α M が漏出してきた。そして、VVP は他の多くのプロテアーゼと同様に、 α M の各サブユニットの bait region を切断し、 α M 分子の構造を変化させ、1 : 1 のモル比で α M 分子内に取り込まれて不活性化された。すなわち、哺乳動物の血漿

中には、予め外来性プロテアーゼに対する不活性化因子が存在しており、侵入してきたプロテアーゼの作用を制御し、生体を保護していることが明らかになった。

第4章 V. vulnificus 感染症におけるプロテアーゼの役割

第1節 序論

V. vulnificus 感染症の特徴は、発赤、腫脹、浮腫形成などの皮膚病変の発現である^{1, 5, 6, 7, 8)}。そして、ヒトの感染症の場合と類似した皮膚病変は、動物を使った感染モデル実験でも観察されている^{9, 10)}。しかも、皮膚病変の発現に深く関与している因子が菌体外に分泌されている因子であることも示唆されている¹⁰⁾。そこで、この章では、炎症のメディエーターを産生させ血管透過性を亢進させる分泌性因子である VVP が、生菌を接種した場合に現われる皮膚病変、特に浮腫形成に関与しているのか検討を行い、本菌感染症における VVP の役割を調べた。

第2節 生菌の浮腫形成作用におけるプロテアーゼの役割

【実験材料および実験方法】

1) 試薬および材料

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) はナカライテスク (京都) より購入し、SBTI は Sigma Chemical の製品を使用した。

VVP に対する IgG 抗体は、以下の手順で調製した。VVP (1.2 mg) を等量の Freund 完全アジュバント (Difco Laboratories) と混合し、Hartley 系モルモットの footpad に接種した。2 週間後と 4 週間後にも同様の方法で footpad に接種し、初回接種の 5 週間後に抗血清を得た。この抗血清に 40 % 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、IgG 分画を部分精製し、VVP に対す

る IgG 抗体として使用した。

コントロール IgG を調製する場合には、0.9 % NaCl 溶液を等量の Freund 完全アジュバントと混合し、モルモットの footpad に接種した。

2) 菌株

V. vulnificus L-180 株 (VVP の精製に使用した菌株) と CDC B2828 株は、ともに敗血症患者の血液から分離された菌株である。これらの菌株の産生するプロテアーゼは、免疫学的にも生化学的にも区別できなかったが、L-180 株のプロテアーゼ産生量は CDC B2828 株の 3 倍以上であった。また、どちらの菌株も cytolysin も産生していた。

プロテアーゼの産生量が低下した変異株は L-180 株を NTG で処理することによって作成した。すなわち、1.5 % NaCl を加えた heart infusion broth (HIB) 中で一晚培養した L-180 株を 2 % NaCl を加えた 20 mM リン酸緩衝液 (PBS : pH 7.0) で洗浄したのち、0.01 % NTG を加えた PBS に懸濁し 37 °C で 1 時間保温した。この NTG 処理菌体を 2 % NaCl 溶液に再び懸濁させ、1 % skim milk と 2 % NaCl を含む普通寒天培地に接種し 37 °C で培養した。24 時間後、skim milk を分解していない (コロニーの周囲に透明なゾーンが形成されていない) コロニーを釣菌した。そして、安定な変異株を得るために、同じ培地で何代か継代培養を行った結果、2 株 (L-180-1 株と L-180-2 株) の変異株が得られた。これらの変異株は、cytolysin の産生量は野生株 (L-180 株) と同程度であったが、プロテアーゼの産生量は 10 % 以下であった。

3) V. vulnificus の浮腫形成作用

1.5 % NaCl を加えた HIB 中で一晚培養した菌体を 2 % NaCl 溶液で洗浄したのち、 5×10^7 — 5×10^9 CFU/ml の濃度になるように 2 % NaCl 溶液に懸濁した。この懸濁液を予めエバンスブルーを静注しておいた Wistar 系雄性

ラット (180—200 g) もしくは Hartley 系雄性モルモット (400—500g) の背部皮内に接種し、6 時間後に浮腫の大きさ、すなわち、血管透過性が亢進したことによって血管外に漏出してきた、エバンスブルー—アルブミン複合体により形成された青色斑の直径を測定した。

VVP に対する IgG 抗体 (100 μ l) あるいは SBTI (10 nmol) の浮腫形成作用に対する効果を検討する場合には、各々を菌体 (5×10^8 CFU) と混合して皮内に接種した。なお、使用した抗体ならびに SBTI には殺菌効果はなく、菌体 (5×10^8 CFU) と 37 $^{\circ}$ C、6 時間保温しても生菌数は減少しなかった。

ホルマリン死菌による浮腫の形成作用を調べる場合には、菌体を 1.5 % ホルマリンを含む PBS 中で 25 $^{\circ}$ C、30 分間保温したのち、2 % NaCl 溶液で洗浄し動物の皮内に接種した。

【実験結果】

V. vulnificus の生菌 (10^7 — 10^9 CFU) を皮内に接種すると、数時間以内に接種した菌の量に依存して血管透過性が亢進し浮腫が形成された (Fig. 19)。一方、ホルマリン死菌を接種した場合にも高濃度 (10^9 cells) では浮腫が形成された。しかし、浮腫を形成する活性は弱く生菌の活性の 5—10 % にすぎなかった。次に、プロテアーゼの産生量が低下した変異株についても浮腫形成作用を調べた。どちらの変異株もホルマリン死菌の活性は野生株と同程度であったが、生菌の浮腫をつくる活性は野生株よりも明らかに ($P < 0.01$) 劣っていた (Fig. 19)。このように、生菌接種による浮腫形成に VVP が関与していることが示唆されたので、より明確にするために次の実験を行った。

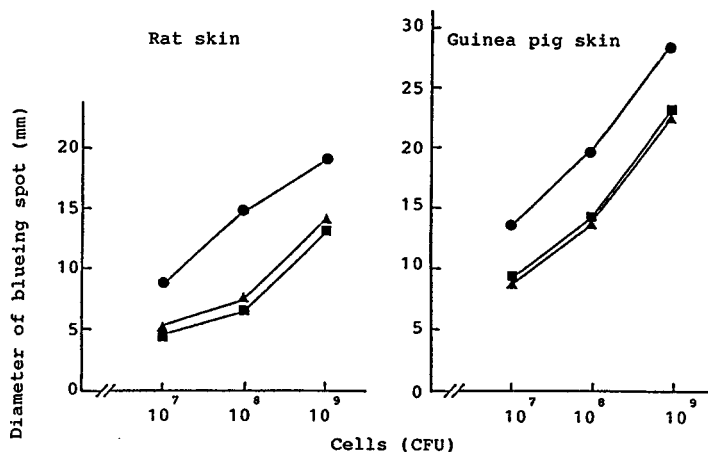


Fig. 19. Enhancement of vascular permeability by *V. vulnificus* living cells. Living cells were injected intradermally into the dorsal skin of a guinea pig or a rat. At 6 hr postinjection, the diameter of the blueing spot caused by extravasation of Evans blue was measured. Each plot represent the mean of five experiments. The standard deviation was within 10 to 15 % of the mean. Symbols : (●) L-180, (▲) L-180-1, (■) L-180-2. Blueing spot formed by each of both mutants (L-180-1 and L-180-2) were statistically smaller ($P < 0.01$) than that by the wild-type strain (L-180).

まず、VVP に対する IgG 抗体を生菌と混合して皮内に接種し、浮腫の形成作用に対する効果を調べた。Table 2 に示したように、L-180 株においても、そしてプロテアーゼの産生量が L-180 株よりずっと少ない CDC B2828 株においても、100 μ l の IgG 抗体を菌体と同時投与することによって、生菌の浮腫形成作用が 70 % 以上抑えられた。第 1 章で述べたように、モルモットの皮膚の場合、VVP はハーゲマン因子-血漿カリクレイン-キニン系を活性化させ血管透過性を亢進させる。そこで次に、血漿カリクレインの特異的な阻害剤である SBTI (10 nmol) の浮腫形成作用に及ぼす効果について調べた。その結果、どちらの菌株の場合にも生菌の浮腫を形成する作用が、SBTI の混合投与によって有意に抑えられた (Table 3)。

Table 2. Inhibitory effect of anti-VVP IgG on the permeability enhancement by *V. vulnificus* cells^{a)}

Strain	Diameter of the blueing spot formed by living cells mixed with		Inhibitory rate (%) ^{c)}
	Control IgG (mm) ^{b)}	Anti-VVP IgG (mm) ^{b)}	
L-180	25.5±3.0	20.6±3.2	73.0
CDC B2828	22.5±3.7	18.3±2.4	71.4

^{a)} Living cells (5×10^8 CFU) were mixed with control IgG (100 μ l) or anti-VVP IgG (100 μ l) and injected into the dorsal skin of a guinea pig. At 6 hr postinjection, the diameter of the blueing spot was measured.

^{b)} Numbers represents the mean±s.d. of eleven experiments. Permeability enhancement by living cells was significantly inhibited by anti-VVP IgG ($P<0.01$).

^{c)} The number of cells (CFU), which was equivalent to the diameter of the blueing spot, was estimated from the dose-response curve, and inhibitory rate was determined as follows : $(1 - \text{CFU equivalent to anti-VVP IgG and cells mixture} / \text{CFU equivalent to control IgG and cells mixture}) \times 100$.

Table 3. Inhibitory effect of SBTI on the permeability enhancement by *V. vulnificus* cells^{a)}

Strain	Diameter of the blueing spot formed by living cells mixed with		Inhibitory rate (%) ^{c)}
	Saline (mm) ^{b)}	SBTI (mm) ^{b)}	
L-180	23.2±1.7	19.3±1.2	65.3
CDC B2828	20.8±1.8	18.0±1.4	58.3

^{a)} Living cells (5×10^8 CFU) were mixed with saline (100 μ l) or SBTI (100 μ l) and injected into the dorsal skin of a guinea pig. At 6 hr postinjection, the diameter of the blueing spot was measured.

^{b)} Numbers represents the mean±s.d. of eight experiments. Permeability enhancement by living cells was significantly inhibited by SBTI ($P<0.01$).

^{c)} The number of cells (CFU), which was equivalent to the diameter of the blueing spot, was estimated from the dose-response curve, and inhibitory rate was determined as follows : $(1 - \text{CFU equivalent to SBTI and cells mixture} / \text{CFU equivalent to saline and cells mixture}) \times 100$.

したがって、動物の皮内に接種された V. vulnificus によって引き起こされる浮腫の形成は、その大部分が生体内で産生された VVP の血管透過性亢進作用に基づいていると考えられた。

【考察】

第1章において、VVP がヒスタミンの遊離を誘発する機構とブラジキニンの産生系を活性化する機構とによって血管透過性を亢進させることをラットとモルモットの皮膚において示した。つまり、ヒスタミンとブラジキニンがヒトにおいても血管透過性を亢進させ浮腫を形成させるメディエーターであること、および、ヒトの感染症において発現する皮膚病変と類似した病変が動物の感染モデル実験^{9, 10)}でも発現していることから、VVP が V. vulnificus 感染症の特徴である皮膚病変（発赤、腫脹、浮腫）の形成に関与している可能性が示唆された。そこでこの章において、VVP に対する IgG 抗体、ならびに、VVP の血管透過性亢進作用を阻害する SBTI が、生菌の浮腫形成作用を抑制するか検討した。その結果、生菌の作用はこれらの因子の同時投与により有意に抑えられた。さらに、VVP の産生量が低下した変異株では、浮腫をつくる能力も野生株より明らかに劣っていた。よって、VVP が本菌感染症において発現する皮膚病変、少なくとも浮腫形成に深く関与していると考えられた。

V. vulnificus が産生する cytolysin は、肥満細胞を破壊してヒスタミンを漏出させる⁵⁶⁾。そして、この毒素を動物の皮内に接種した場合にも血管透過性が亢進する^{12, 13, 57)}。しかし、cytolysin の血管透過性亢進作用は、VVP よりもずっと弱く、同程度の青色斑を形成するためには VVP の 10 倍以上の用量が必要である。しかも、この毒素は生体内に多量に存在しているコレステロールで完全に失活する^{13, 15, 16, 58)}。さらに、VVP の産生量が低下した変異株では、cytolysin の産生量が変化していないのにもかかわらず、浮腫をつく

る能力は著しく低下していた。したがって、cytolysin は浮腫形成の原因因子としてはそれほど重要ではないと考えられた。

今までに、補体に依存した生体防御機構や食細胞の作用に対して抵抗する因子である莢膜^{59, 60, 61, 62, 63}、細菌の増殖に必須の栄養素である鉄を血漿中の鉄輸送蛋白質であるトランスフェリンから奪い取るのに必要であるシデロフォア^{64, 65}、および、組織を破壊して菌体の生体内への侵入を促進させる因子である cytolysin¹⁷ が、V. vulnificus の病原因子として報告されている。これらに加えて、血管透過性を亢進させ浮腫の形成を引き起こす因子である VVP もまたこの細菌の病原因子として重要であることが示された。

第3節 小括

V. vulnificus の生菌をラットあるいはモルモットの皮内に接種すると、数時間以内に血管透過性が亢進し浮腫が形成された。この生菌の浮腫形成作用における VVP の関与を検討した。まず、VVP の産生量が低下した変異株をつくり浮腫形成作用を野生株と比較した結果、その作用は野生株よりも明らかに劣っていた。さらに、野生株の浮腫形成作用は、VVP に対する IgG 抗体、ならびに、VVP の血管透過性亢進作用を抑える阻害剤の同時投与で有意に抑えられた。よって、V. vulnificus の生菌による浮腫形成作用に VVP が深く関わっていることが示された。

総括

V. vulnificus は、まっすぐあるいはやや湾曲した桿菌で、汽水域から海水域に棲息しているグラム陰性の従属栄養細菌である。この菌種による感染症は2つの型に大別されている^{1, 5, 6, 7, 8)}。すなわち、海水等にさらされた傷口周辺に細菌が感染し、浮腫や壊死性潰瘍などの皮膚病変が現われる創傷感染型と、この細菌に汚染された海産物の生食後敗血症に至る経口感染型である。そして、経口感染型では多くの症例において、創傷感染型と類似した皮膚の2次病変が発現する。なお、経口感染症は日和見的な疾患であり、肝疾患などの基礎疾患を持ち、生体の感染防御能力が低下している高齢の男性における症例がほとんどである。一方、感染モデル実験^{9, 10, 11)}では、生菌の皮下投与後数時間以内に浮腫が形成され、極端な血液濃縮が起こり、感染動物が死亡する。しかし、死菌投与では浮腫の形成は起こらない。したがって、V. vulnificus は、血管透過性を亢進させて浮腫の形成を引き起こす因子を分泌しており、この因子が重要な病原因子であると考えられる。

さて、プロテアーゼとその阻害因子は、生体の生理機能の調節および恒常性の維持に重要な役割を担っている。ゆえに、病原微生物の産生するプロテアーゼなど外来性プロテアーゼが侵入し、生体内のプロテアーゼープロテアーゼ阻害因子のバランスがくずされると、生体は危機的状态に陥ると考えられる。ところで、日和見病原細菌である P. aeruginosa や S. marcescens は、菌体外にプロテアーゼを分泌している。これらの細菌においては、分泌性のプロテアーゼが、種々の生体の感染防御因子を分解できるので、病原性と深く関係していると考えられている^{21, 22)}。しかも、S. marcescens のプロテアーゼの場合には、ハーゲマン因子ー血漿カリクレインーキニン系を活性化して血管透過性

を亢進させることが報告されている^{23, 24)}。V. vulnificus の場合にも、全ての菌株がプロテアーゼを分泌しているので、著者は V. vulnificus の病原因子として分泌性プロテアーゼ (VVP) に着目した。

VVP は分子量 50 kDa の Zn を含む金属プロテアーゼで、活性の至適 pH は 7.5 付近である²⁵⁾。この VVP をラットあるいはモルモットの皮内に投与したところ、数分以内に血管透過性が亢進して血漿蛋白質が血管外に漏出した。ラットの皮膚においては、この作用は抗ヒスタミン剤であるジフェンヒドラミンの同時投与でほぼ完全に抑えられた。さらに、ラットの腹腔からヒスタミンの貯蔵細胞である肥満細胞を分離し、VVP と 37 °C で保温した結果、30 秒以内に細胞が破壊されることなく脱顆粒が起こりヒスタミンが遊離された。よって、ラットの皮膚では、VVP は直接肥満細胞に作用してヒスタミンの遊離を誘発させ、遊離されてきたヒスタミンの作用により血管透過性が亢進していると考えられた。今日まで、細菌由来の金属プロテアーゼがヒスタミン遊離を誘発するという報告はなく、VVP はユニークな存在であり、ヒスタミン遊離を誘発する機構についても興味もたれる。これに対して、モルモットの皮膚においては、透過性の亢進作用は、血漿カリクレインに対する阻害剤である SBTI でほぼ完全に抑えられ、アンジオテンシン変換酵素の阻害剤である SQ 20881 では逆に 3 倍以上増強された。次に、モルモットの血漿に VVP を添加し 37 °C で保温した結果、血漿プレカリクレインが活性型へ変換された。つまり、VVP にブラジキニンを切り出す酵素である血漿カリクレインを産生する作用があることが示された。さらに、モルモットの血漿からハーゲマン因子と血漿プレカリクレインを精製し、これらの前駆体が VVP によって活性型へ変換されるか検討したところ、VVP は両方の前駆体に作用しどちらも活性型へと変換させた。したがって、モルモットの皮膚においては、VVP は一般的なハーゲマン因子の活性型への変換に加え、血漿プレカリクレインも活性型に変換させるという新しい

機構によって、ハーゲマン因子-血漿カリクレイン-キニン系を活性化させ、その結果産生されてくるブラジキニンの作用により血管透過性の亢進を引き起こしていると考えられた。なお、VVP はヒトの血漿に添加した場合にも血漿ブレカリクレインを活性型に変換させたので、ヒト血漿のハーゲマン因子-血漿カリクレイン-キニン系も活性化できると思われる。VVP が、ヒト血漿においても、モルモットの血漿と同じ新しい機構に基づいてこの系を活性化しているのかは、今後の研究による説明が期待されるところである。

ヒスタミンの貯蔵細胞である肥満細胞の各種刺激に対する応答性には種差がある³²⁾。すなわち、ラットの肥満細胞は応答性がよくモルモットの細胞は応答性が悪い。また、モルモットの血漿においては、ハーゲマン因子-血漿カリクレイン-キニン系を構成している因子の濃度がとても高い⁴⁰⁾。したがって、VVP はヒスタミンの遊離を誘発する機構とブラジキニンの産生系を活性化させる機構の両方によって血管透過性を亢進させるけれども、これらの機構の発達の程度が動物種により異なるため、ラットとモルモットでは観察された透過性亢進の機構が一方に偏ってしまったと考えられる。

ブタ脾臓由来の CPB は、生体内のブラジキニン不活性化酵素であるカルボキシペプチダーゼ N と基質特異性が類似した酵素である。ゆえに、活性型ハーゲマン因子あるいは血漿カリクレインを CPB と混合して投与すると、産生されたブラジキニンが CPB で直ちに不活性化されるので、これらの因子の血管透過性亢進作用は強く抑えられる^{41, 42)}。しかし、活性型ハーゲマン因子と血漿カリクレインを産生するプロテアーゼである VVP の血管透過性亢進作用に対しては、CPB は全く効果がなかった。これには、VVP が自らの作用でブラジキニンを不活性化していることが考えられ、この点に関しても検討を行った。その結果、モル比で 1000 倍以上のブラジキニンが、VVP と 30℃ で 30 分間保温するとほぼ完全に分解され不活性化された。ブラジキニンは炎症の重要

なメディエーターであるので、この結果より、VVP に適当な修飾を施せば、炎症を引き起こすプロテアーゼである VVP が逆に抗炎症薬として利用できる可能性が示唆された。

VVP は動物の皮膚の血管透過性を亢進させたが、活性の持続時間はわずか数分間であったので、生体内（おそらくは血漿中）に VVP の不活性化因子が存在している可能性が示唆された。動物の血漿中には数多くのプロテアーゼ不活性化因子が存在しているが、細菌由来の金属プロテアーゼに対する特異的な不活性化因子は、いずれの動物の血漿からも発見されていない。よって、多くの哺乳動物の血漿中に存在し、多種類のプロテアーゼを 1 : 1 のモル比で不活性化できる α Ms が、VVP の不活性化因子であろうと推測された。そこで次に、この点に関して検討を行った。まず、ウシ血漿中の α M である α_2 M と VVP を種々の濃度比で保温して、残っている VVP の活性を測定した。VVP の血管透過性亢進活性は、ラットとモルモットいずれの皮膚の場合にも、等モル量の α_2 M で 90 % 以上阻害された。VVP の蛋白質基質（エラスチン、カゼイン）を分解する活性も等モル量の α_2 M で抑制されたが、低分子量のペプチド基質を分解する活性は過剰量の α_2 M でも阻害されなかった。分子量 700 kDa の巨大な蛋白質である α Ms は、プロテアーゼの活性中心に直接作用して、競合的な阻害によりプロテアーゼを不活性化するのではなく、その分子内にプロテアーゼ分子を取り込むことによりプロテアーゼを不活性化する^{48, 49, 50}。つまり、 α Ms による不活性化は立体障害に基づいており、プロテアーゼの活性中心はブロックされていない。そのため不活性化されている状態でも、プロテアーゼは立体障害のない低分子量の基質はよく分解できる。よって、 α_2 M と VVP の作用において観察された阻害スペクトルは、VVP も他の多くのプロテアーゼと同様に、 α_2 M 分子内に取り込まれ不活性化されたことを示している。さらに、 α Ms が生体内で VVP の不活化因子として機能しているのか検討し

た。モルモット血漿中の α M である MA を Sephacryl S-400 カラムによるゲルろ過と Mono Q カラムによるイオン交換によって精製した。この MA に対する抗体を VVP と混合してモルモットの皮内に接種した結果、VVP の血管透過性亢進作用が 10 倍増強された。また、モルモットの血漿を MA に対する抗体で処理して MA の働きを抑えたのち、VVP を添加すると、VVP の血漿カリクレイン産生作用が大きく促進された。MA はモルモットの皮膚には含まれていない⁵³⁾ので、MA が皮内に接種された VVP を不活性化するためには、VVP 接種後活性のある MA が血管外へ漏出し、その場で VVP を分子内に取り込む必要がある。この点を明らかにするため、VVP の接種後血管外に漏出してきた液体を回収し、TSK G-4000 SW カラムによるゲルろ過を行った。その結果、血管外漏出液中の VVP を不活性化する因子は MA のみであり、しかも、血管外漏出液中で VVP が MA 分子内に取り込まれていることが示された。したがって、生体内に接種された VVP は、その血管透過性亢進作用の結果、 α M の血管外への漏出を引き起こし、この巨大な蛋白質に取り込まれて不活性化されてしまうことが明らかになった。

V. vulnificus 感染症の特徴は、浮腫形成などの皮膚病変の発現である^{1, 5, 6, 7, 8)}。そして、この皮膚病変と類似した病変は、動物を使った感染モデル実験でも観察されている^{9, 10)}。そこで、血管透過性亢進作用を持つ VVP が、生菌の浮腫形成作用に関与しているのか検討した。生菌をラットあるいはモルモットの皮内に投与すると、数時間以内に血管透過性が亢進し浮腫が形成された。この生菌の浮腫形成作用は VVP に対する抗体および SBTI の同時投与で有意に抑制された。さらに、NTG 処理により得られた VVP の産生能力が低下した変異株では、その浮腫形成能力も野生株より明らかに低下していた。よって、VVP は生菌接種時に形成される浮腫の重要な原因因子であり、本菌感染症の特徴である皮膚病変の発現と深く関係していると考えられた。

本研究によって、VVP が V. vulnificus の病原因子として重要であり、肥満細胞からのヒスタミン遊離を誘発する機構とブラジキニン産生系を活性化する機構の両方によって血管透過性を亢進させ、V. vulnificus 感染症の特徴である浮腫形成に深く関わっていること、ならびに、血管透過性が亢進したことによって血管系から漏出してきた、 α M 分子に取り込まれて直ちに不活性化されることが明らかになった。これらの知見は、生体の生理機能の調節に重要な役割を担っているプロテアーゼ-プロテアーゼ阻害因子のバランスが、外来性のプロテアーゼの侵入でくずされると生体にとって重大な危機が訪れること、ならびに、生体は外来性のプロテアーゼに対する不活性化因子を生体防御機構の一つとして保持していることを示しており、細菌感染症におけるプロテアーゼの病原因子としての役割に重要な位置付けを与えたものと考えられる。

また、本論文ではふれなかったが、VVP には血管透過性亢進作用に加えて、組織を破壊し出血を引き起こす作用もある^{25, 26)}。さらに著者は、細菌に必須の栄養素である鉄をヘム蛋白質（ヘモグロビンなど）から獲得する場合には、VVP によるヘム蛋白質の分解が必要であることも見出した。したがって、VVP は V. vulnificus が消化管壁から血液中あるいはリンパ液中へと侵入し、さらに、全身の各組織内へ拡散して敗血症が成立する過程にも関与していると考えられる。この過程における VVP の役割を解明するためには、 α M による不可性化を受けず、活性が長時間持続できる型に VVP を修飾する必要がある。おそらく、VVP を高分子量の物質と結合させ巨大な分子にすれば、目的にあった修飾酵素になると予想される。

今日まで、病原性細菌の病原因子としては、一般に“毒素”と呼称されている特殊な成分が主な因子であり、ごくありふれた酵素であるプロテアーゼは、毒素の活性化作用^{66, 67)}、あるいは、組織を破壊し毒素や菌体の侵入を促進させる作用を持った補助的な因子であった。例えば、コレラ症の原因細菌である

V. cholerae 01 においては、“コレラ毒素”が重要な病原因子であり、プロテアーゼは、コレラ毒素を限定分解し活性化する作用⁶⁸⁾、および、消化管壁の表面に存在しているムチンを分解し毒素の上皮細胞への結合を促進する作用^{68, 69)}によって、コレラ毒素の働きを助ける役割を担っているにすぎない。しかし、日和見感染症の原因細菌である P. aeruginosa や S. marcescens の場合には、分泌性のプロテアーゼが、生体内の感染防御因子を分解して破壊するので、重要な病原因子であると考えられている^{21, 22, 23, 24)}。本研究により、日和見的に敗血症を引き起こす V. vulnificus においても、分泌性のプロテアーゼが病原性と深く関係していることが示された。したがって、本研究の結果は、近年問題となっている日和見感染症の原因細菌の病原因子に関する研究にある一つの方向性を与えるものと思われる。

Vibrio 属の細菌による疾患としては、コレラ症あるいは胃腸炎といった消化器系感染症が注目され、非消化器系感染症（創傷感染症、敗血症など）はあまり注目されていない。これは、非消化器系感染症が稀な疾患であり、もっとも頻度の高い V. vulnificus による感染症でも、年間数症例が報告されているにすぎないこと、しかも、消化器系感染症とは異なり集団感染が起こらないことによるものと思われる。しかしながら、海産物を生食する習慣のある我国では、水系に広く棲息している Vibrio 属の細菌と接触する機会は多く、しかも、高齢化社会の到来や医療技術の進歩により、immunocompromised host が増加し続けている現状においては、Vibrio 属の細菌による非消化器系感染症が今後さらに増加するものと考えられる。したがって、非消化器系感染症を引き起こす Vibrio 属細菌の代表的な菌種である V. vulnificus の病原因子として VVP を同定し、その作用ならびに制御の機構を解明したことは意義深いと考えられる。

結 論

非消化器系疾患の原因となる Vibrio 属の細菌である V. vulnificus の分泌するプロテアーゼ (VVP) に関して研究を行い以下の結論を得た。

- 1) 汽水域から海水域にかけて広く棲息し、ヒトに創傷感染症あるいは敗血症を引き起こす V. vulnificus が分泌する金属プロテアーゼ (VVP) を動物の皮内に接種すると、数分以内に血管の透過性が亢進し血漿蛋白質が血管外へ漏出した。
- 2) VVP は、肥満細胞に直接作用して開口分泌によるヒスタミン遊離を誘発させ、遊離されたヒスタミンの作用によって血管透過性を亢進させる機構、ならびに、ハーゲマン因子と血漿プレカリクレインの両方を活性型に変換させるという新しい機構でハーゲマン因子-血漿カリクレイン-キニン系の活性化を引き起こし、産生されてくるブラジキニンの作用によって血管透過性を亢進させる機構の 2 つの様式により血管透過性を亢進させることが明らかになった。
- 3) ブラジキニン産生系を活性化させる VVP には、その産物であるブラジキニンを不活性化する働きもあり、負の調節因子としての機能もあることが示された。
- 4) ヒスタミンとブラジキニンがヒトにおいても血管透過性を亢進させるメディエーターであること、V. vulnificus の生菌の浮腫形成作用が、VVP に対

する抗体あるいは VVP の血管透過性亢進作用を阻害する因子の投与で有意に抑えられたこと、さらに、VVP の産生量が低下した変異株の浮腫を形成する能力も低下していたことから、VVP が V. vulnificus 感染症の特徴である皮膚病変特に浮腫の形成と深く関与していることが強く示唆された。

5) 多数の動物の血漿中に多量に存在し、多くの種類のプロテアーゼを不活性化できる α -マクログロブリンファミリー (α Ms) は、他の多くのプロテアーゼの場合と同様に、その分子内に VVP 分子を取り込み 1 : 1 のモル比で VVP を不活性化した。

6) α M は VVP の作用により血管透過性が亢進すると血管外に漏出してきた。そして、その場で VVP を直ちに不活性化し VVP の作用を制御した。このように、動物の血漿中に外来性のプロテアーゼである VVP に対する不活性化因子が存在することが明らかになり、プロテアーゼが病原微生物の病原因子として重要であることが示唆された。

謝 辞

本研究において、終始御熱心な御指導、御鞭撻を賜りました岡山大学薬学部篠田純男教授に厚く御礼申し上げます。

また、研究途上有益な御指導、御助言を賜りました岡山大学薬学部小野文一郎助教授、岡山大学歯学部古田裕昭教授ならびに杉山勝三助教授、熊本大学医学部前田浩教授に深く感謝します。

実験上御協力頂きました岡山大学薬学部三好典子元助手をはじめ、岡山大学薬学部環境衛生化学教室の諸氏に感謝致します。

最後に、本稿を纏めるに当たり、有益な御助言と御指導を賜りました大阪大学薬学部西原力教授に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Janda JM, Powers C, Bryant RG and Abbot SL : Clin Microbiol Rev, 1, 245 (1988).
- 2) Roland FP : N Engl J Med, 282, 1306 (1970).
- 3) Hollis DG, Weaver RE, Baker CN and Thornsberry C : J Clin Microbiol, 3, 425 (1976).
- 4) Farmer J J III : Lancet, 2, 903 (1979).
- 5) Blake PA, Weaver RE and Hollis DG : Ann Rev Microbiol, 34, 341 (1980).
- 6) Howard RJ and Lied S : Arch Surg, 123, 245 (1988).
- 7) Tacket CO, Brenner F and Blake PA : J Infect Dis, 149, 558 (1984).
- 8) 東 逸男, 北浦 敏行, 原田 七寛, 道家 直, 藪内 英子 : メディヤサークル, 29, 465 (1984).
- 9) Poole MD and Oliver JD : Infect Immun, 20, 126 (1978).
- 10) Bowdre JH, Poole MD and Oliver JD : Infect Immun, 32, 1193 (1981).
- 11) Dellinger JB and Oliver JD : J Elisha Mitch Sci Soc, 98, 105 (1982).
- 12) Kreger A and Lockwood D : Infect Immun, 33, 583 (1981).
- 13) Gray LD and Kreger AS : Infect Immun, 48, 62 (1985).
- 14) Yamanaka H, Satoh T, Katsu T and Shinoda S : J Gen Microbiol, 133, 2859 (1987).
- 15) Yamanaka H, Katsu T, Satoh T, Shimatani S and Shinoda S : FEMS Microbiol Lett, 44, 253 (1987).
- 16) 篠田 純男, 山中 浩泰 : 臨床と微生物, 16, 27 (1989).

- 17) Gray LD and Kreger AS : J Infect Dis, 155, 236 (1987).
- 18) Kitaura T, Doke S, Azuma I, Imaida M, Miyano K, Harada K and Yabuuchi E : FEMS Microbiol Lett, 17, 205 (1983).
- 19) Bryant RG, Jarvis J and Janda JM : Appl Environ Microbiol, 53, 1556 (1987).
- 20) Kothary MA and Kreger AS : Infect Immun, 50, 534 (1985).
- 21) Maeda H and Molla A : Clinica Chemica Acta, 185, 357 (1989).
- 22) Wretling B and Pavlovskis OR : Rev Infect Dis, 5, S998 (1983).
- 23) Matsumoto K, Yamamoto T, Kamata R and Maeda H : J Biochem, 96, 739 (1984).
- 24) Kamata R, Yamamoto T, Matsumoto K and Maeda H : Infect Immun, 48, 747 (1985).
- 25) Miyoshi N, Shimizu C, Miyoshi S and Shinoda S : Microbiol Immunol, 31, 13 (1987).
- 26) Kothary M and Kreger AS : J Gen Microbiol, 133, 1783 (1987).
- 27) Davis BJ : Ann N Y Acad Sci, 121, 404 (1964).
- 28) Laemmli UK : Nature, 227, 680 (1970).
- 29) Sugiyama K : Jpn J Pharmacol, 21, 209 (1971).
- 30) Shore PA, Burkhalter A and Chor VH Jr : J Pharmacol Exp Ther, 127, 182 (1959).
- 31) Roy D, Moran DM, Bryant V, Stevenson R and Stanworth DR : Biochem J, 191, 233 (1980).
- 32) 佐伯 清美 : 蛋白質 核酸 酵素, 28, 543 (1983).
- 33) Schick B : Immunol, 69, 423 (1990).
- 34) Ishizaka T, Iwata M and Ishizaka K : J Immunol, 134, 1880 (1985).

- 35) Yamamoto T and Cochrane CG : Am J Pathol, 105, 164 (1981).
- 36) Imamura T, Yamamoto T and Kambara T : Am J Pathol, 115, 92 (1984).
- 37) Hojima Y, Pierce JV and Pisano JJ : Thromb Res, 20, 149 (1980).
- 38) Uchida Y, Tanaka K, Harada Y, Ueno A and Katori M : Inflammation, 7, 121 (1983).
- 39) Kato H, Adachi N, Iwanaga S, Abe K, Takada K, Kimura T and Sakakibara S : J Biochem, 87, 1127 (1980).
- 40) 加藤 久雄, 岩永 貞昭 : 凝固 線溶 キニン (青木岩永編), p389, 中外医学社, 東京 (1979).
- 41) Yamamoto T, Kozono K, Kambara T and Cochrane CG : Biochim Biophys Acta, 966, 196 (1988).
- 42) Imamura T, Yamamoto T and Kambara T : Am J Pathol, 115, 92 (1984).
- 43) Yemm EW and Cocking EC : Analyst, 80, 209 (1955).
- 44) Miyata K, Tomoda K and Isono M : Agr Biol Chem, 34, 1457 (1970).
- 45) Miyata K, Nakamura M and Tomoda K : J Biochem, 89, 1231 (1981).
- 46) Morihara K and Tsuzuki H : Arch Biochem Biophys, 146, 291 (1971).
- 47) Morihara K, Tsuzuki H and Oka T : Biochim Biophys Acta, 309, 414 (1973).
- 48) Barret AJ : Method Enzymol, 80, 737 (1980).
- 49) Sottrup-Jensen L : J Biol Chem, 264, 11539 (1989).
- 50) Travis J and Salvesen GS : Annu Rev Biochem, 52, 655 (1983).
- 51) Miyata K, Tsuda M and Tomoda K : Anal Biochem, 101, 332 (1980).
- 52) Molla A, Oda T and Maeda H : J Biochem, 101, 199 (1987).
- 53) Ishimatsu T, Yamamoto T, Kozono K and Kambara T : Am J Pathol, 115, 57 (1984).

- 54) Abe K, Yamamoto K and Sinohara H : J Biochem, 106, 564 (1989).
- 55) Swenson RP and Howard JB : J Biol Chem, 254, 4452 (1979).
- 56) Yamanaka H, Sugiyama K, Furuta H, Miyoshi S and Shinoda S : J Med Microbiol, 32, 39 (1990).
- 57) Shinoda S, Miyoshi S, Yamanaka H and Miyoshi N : Microbiol Immunol, 29, 583 (1985).
- 58) Miyoshi S, Yamanaka H, Miyoshi N and Shinoda S : FEMS Microbiol Lett, 30, 213 (1985).
- 59) Amako K, Okada K and Miake S : J Gen Microbiol, 130, 2741 (1984).
- 60) Kreger AS, Gray LD and Testa J : Infect Immun, 45, 537 (1984).
- 61) Shinoda S, Kobayashi M, Yamada H, Yoshida H, Ogawa M and Mizuguchi Y : Microbiol Immunol, 31, 393 (1987).
- 62) Simpson LM, White VK, Zane SF and Oliver JD : Infect Immun, 55, 269 (1987).
- 63) Yoshida S, Ogawa M and Mizuguchi Y : Infect Immun, 47, 446 (1985).
- 64) Simpson LM and Oliver JD : Infect Immun, 41, 644 (1983).
- 65) Wright AC, Simpson LM, Richardson K, Maneval DR Jr and Oliver JD : FEMS Microbiol Lett, 35, 255 (1986).
- 66) Booth BA, Boesman-Finkelstein M and Finkelstein RA : Infect Immun, 45, 558 (1984).
- 67) Howard SP and Buckley JT : J Bacteriol, 163, 336 (1985).
- 68) Crowther RS, Roomi NW, Fahim REF and Forstner JF : Biochim Biophys Acta, 924, 393 (1987).
- 69) Schneider DR and Parker CD : J Infect Dis, 138, 143 (1978).

略語表

略語については、本論文中においてもその都度表記したが、主な略語についてここに付記した。

略語	用語
α Ms	α -macroglobulins α -マクログロブリンファミリー。分子量 180 kDa 程度の同一サブユニット 4 個から構成されている万能なプロテアーゼ不活性化因子。またこのファミリーに属する個々の蛋白質は、本論文においては α M と略した。
α_2 M	α_2 -macroglobulin α M の中で、免疫電気泳動を行なった場合に、 α_2 領域に移動する蛋白質。ヒトやウシの血漿中の α M は α_2 M である。
AMC	7-amino-4-methyl-coumarin
CPB	carboxypeptidase B 蛋白質、ペプチドの C 末端から塩基性アミノ酸を遊離させる酵素。本研究では、ブタ脾臓の酵素を使用した。

略語	用語
CTI	corn trypsin inhibitor
LDH	lactate dehydrogenase 肥満細胞では、ヒスタミンが顆粒中に局在している のに対し、細胞質に局在している。
MA	macroalbumin モルモット血漿中の α M。この蛋白質は、免疫電気 泳動でアルブミン領域に移動する。
MCA	4-methyl-coumaryl-7-amide
SBTI	soybean trypsin inhibitor
SQ 20881	pGlu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro テプロチドとも呼ばれている。
VVP	<u>V. vulnificus</u> protease
Z-	carbobenzoxym-

