OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	メンケス病モデルマウスの免疫能に関する研究
Author(s)	中川, 晋作
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3070515
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

メンケス病モデルマウスの
免疫能に関する研究

中　川　晋　作

メンケス病モデルマウスの
免疫能に関する研究

中川晋作

目　次

緒　論　1

本　論　5

第一章　mlマウスと正常マウスのリンパ球機能解析と免疫応答　5

第一節　mlマウスおよび正常マウスのマイトジェンに対するリンパ球増殖反応　5

第二節　mlマウスおよび正常マウスのリンパ球混合培養(MLR: mixed limphocyte reaction)によるリンパ球増殖反応　8

第三節　mlマウスおよび正常マウスの一次免疫での抗体産生能　9

第四節　mlマウスおよび正常マウスのＴ細胞依存性抗原に対する二次免疫抗体産生能に関する検討　１１

第五節　小括　１４

第二章　mlマウスの抗原特異的抗体産生能低下に関する細胞レベルでの検討　１５

第一節　mlマウスおよび正常マウスの非特異的抗体産生能に関する検討　１５

第二節　mlマウスのＴ細胞およびＢ細胞の機能解析　１７

第三節　フローサイトメーターによるmlマウスおよび正常マウスのリンパ球亜集団の解析　１９

第四節　小括　２１

第三章　マウス血清中のセルロプラスミン活性および銅濃度とセルロプラスミンの精製　２２

第一節　mlマウスおよび正常マウス血清中のセルロプラスミン活性と銅濃度　２２

第二節　マウスセルロプラスミンの精製　２４

第三節　小括　２７

第四章　セルロプラスミンおよび銅の抗体産生能におよぼす影響　２８
第一節　セルロプラスミンおよび銅投与による抗体産生能への影響　２８
第二節　in vitro 抗体産生系におけるセルロプラスミンおよび銅(Cu^{2+})添加の影響　３１
第三節　小括　３４

第五章　セルロプラスミンにより調節される抗体産生能回復因子および抗体産生能抑制因子に関する検討　３５
第一節　正常マウス血清の抗体産生能におよぼす影響　３５
第二節　mlマウス血清の抗体産生能におよぼす影響　３７
第三節　セルロプラスミンを投与したmlマウス血清の抗体産生能におよぼす影響　３９
第四節　各種マウス血清の抗体産生能におよぼす影響　４０
第五節　抗体産生能回復因子および抗体産生能抑制因子の化学的性質　４２
第六節　血清の投与による抗体産生能への影響　４３
第七節　小括　４６

総　括　４７

結　論　５１

謝　辞　５２

参考文献　５３

緒　論

メンケス病は1962年、Menkesら[1]により初めて報告され、特徴的な縮れ毛からMenkes' Kinky-hair diseaseと呼ばれている。このメンケス病は毛髪異常と色素形成異常にとどまらず、重い知能障害、遅鈍、皮膚引張力低下、低体温症、発育不全、骨形成異常、痙攣および易感染傾向など多彩な臨床像をもって発症し、3歳までに出血あるいは感染症などの合併症にて死亡[2,3]する。この症患は典型的な劣性伴性遺伝形式に従い母親は保因者となり、男児のみが発症する。また、新生児35000人に1人とかなり高い発症頻度を示す[4]。

Dankesら[5-15]の研究によりメンケス病患者では腸管における銅の吸収障害が原因とされているが、生体内における細胞膜の銅転送異常も推定され、銅代謝障害の新しい疾患として、近年注目されてきた。生体内における銅は、細胞のミトコンドリアやミクロソームの酸化還元に関与し、銅イオンをコファクターとするセルロプラスミン、リシルオキシダーゼ、ドーパミン-β-ヒドロキシラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ等の諸酵素の活性が銅欠乏により低下する。これら酵素活性の低下により上記症候群がもたらされると推定されている。しかしながら、現在のところ銅の分布異常という一致した見解が認められているにすぎない。

Brindledマウス[9]がメンケス病モデル動物としてよく知られているが、1973年近交系のC3Hfマウスにおいて自然突然変異により生じたmacular(ml)マウス[16]がBrindledマウスに似ており、メンケス病モデル動物として優れていることがわかった[17-20]。mlマウスはメンケス病と同様の銅分布異常を示し、脳、肝臓および血中では銅含量の低下、逆に腎臓および小腸では蓄積する[21]。また、mlマウスはメンケス病の多くの類似した症状を呈し、典型的な劣性伴性遺伝形式をとる。表現形としては黒眼白毛でヒゲがカールし、体毛が縮れて体表に密着しており、まだ毛の生えない時期でも黒眼と白い体色とのコントラストから生後3日令で他と識別がつく特徴を有している（Fig. 1）。また、体重は生後10日目までは正常に増加するが、以後急激に体重減少し、ついに3～6gとなり平均15.8日令で死亡に至る（Fig. 2）。 約10日令から死亡するまでの間、四肢をもつれさせながら走り回り、しばしば横転、痙攣を繰り返し、メンケス病の特徴である中枢神経性行動異常を示す。 以上の所見のうち痙攣はヒトでの重要な初発症状であるが

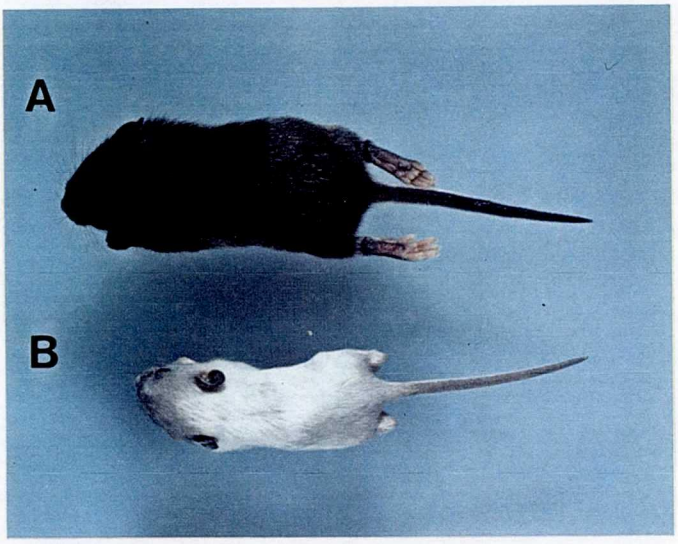

Fig. 1. The male normal mouse (A) and male macular mouse (B) on postnatal day 14.

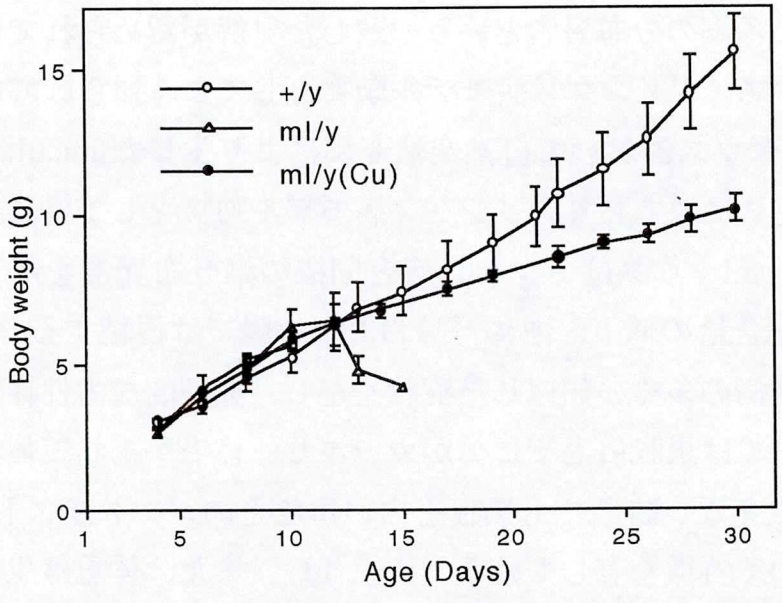

Fig. 2. The body weight gain of normal (+/y) and macular (ml/y) mice. ml/y (Cu); ml/y mouse was treated with 10 μg of copper 7 days after birth

Brindledマウスでは認められない。14日令の体重当りの各臓器重量比を調べると、ほとんど全ての臓器は正常と差がないかあるいは逆に上昇する臓器ばかりであり、これらは体重低下に付随した変化に過ぎない（Fig. 3）。しかし、胸腺と脾臓のみは有意に重量が減少し、そのため体重比においても脾臓は正常の約1/2、胸腺は約2/3以下と、著しい減少を示した。これら免疫担当臓器に特異的な萎縮は重症複合免疫不全症、ataxia telangiectasia[22)]（毛細血管拡張性失調症）、およびWiskott-Aldrich症候群、等の免疫異常症にも見られる。さらに、前述したごとくメンケス病は死亡の際に、感染症などの合併症を伴うことから、mlマウスについても免疫機能の低下が予想される。近年、さらに銅の代謝異常に関連した免疫不全の報告が多く、その中に銅欠乏食で飼育したマウスが種々の免疫応答低下を示す報告がある[23-30)]。 しかし、メンケス病患者への銅の経口および非経口

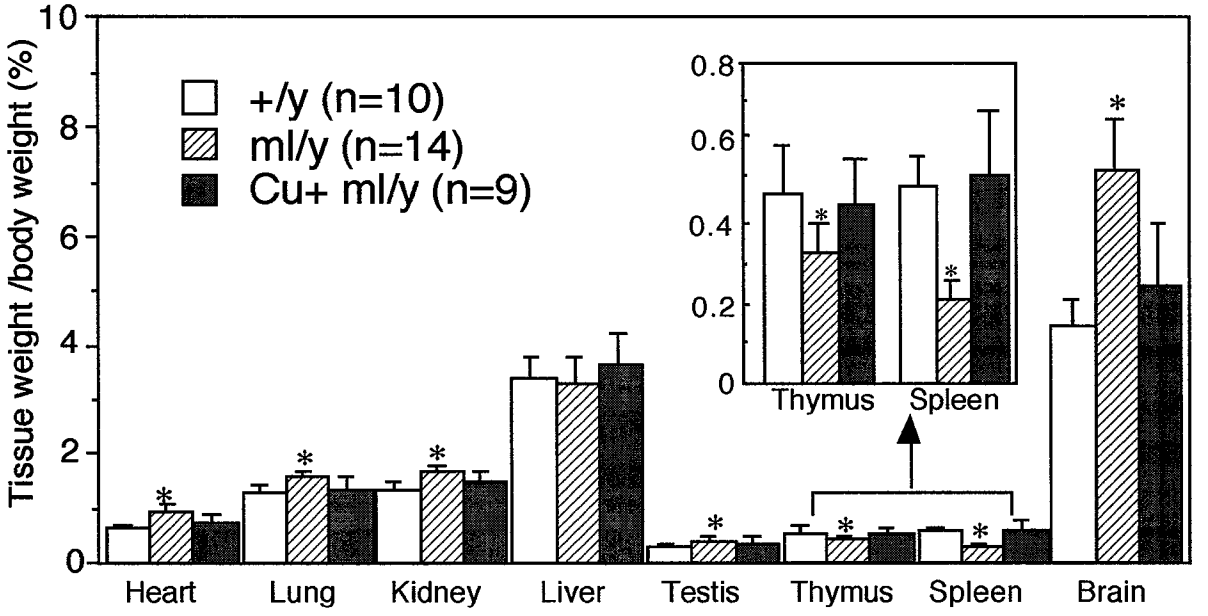

Fig. 3. Tissue weight of normal and macular mice at 14 day after birth.
Cu+ ml/y; ml/y mice were treated with copper (10 μg/g body weight) at the 7 day after birth. The number in parenthesis indicates the animal number and vertical bar represent the mean ± S.D.
* Significantly different from normal mouse ($p<0.01$).

投与においても治療効果が十分上がらないことから、ただ単に栄養素的に銅を欠乏させた場合とメンケス病が同じでないことは容易に判断できる。従ってmlマウスの免疫応答を検討することは銅の新しい生理的機能解明とともに新しい免疫応答調節物質の発見につながる可能性がある。

本論文は、新しく免疫応答の観点からmlマウスの病態を解析し、なおかつこのモデル動物を用いて免疫応答の調節機構を解明することを試み、これらを通じて新しい免疫応答調節物質を見いだす試みを行ったものである。

本　論

第一章　mlマウスと正常マウスのリンパ球機能解析と免疫応答

mlマウスが死亡する際には著明な体重減少を示し、全ての臓器において体重減少に比例した臓器重量の減少を示した。しかし、脾臓と胸腺のみは体重減少の程度以上に著しい萎縮を示した。さらにメンケス病の第一の特徴である銅の分布異常に関連して、銅欠乏食で飼育したマウスの免疫応答が低下していることを示した報告[23-30]がある。これらのことよりmlマウスの新しい病態として免疫不全が予想される。

本章では、mlマウスと正常マウスの免疫応答についてリンパ球増殖反応および抗体産生能を中心に比較検討した。

第一節　mlマウスおよび正常マウスのマイトジェンに対するリンパ球増殖反応

リンパ球増殖反応は各種の刺激に対するリンパ球の応答性やその機構を研究するのに盛んに用いられている。中でもマイトジェンによる刺激は、各種リンホカインの産生、抗原非特異的ヘルパーT細胞、サプレッサーT細胞、細胞障害性T細胞などが誘導されることや、B細胞を刺激すると多くの場合免疫グロブリン産生[19]と結びつくことから、生体の免疫能検索の手段として重要な位置を占めている。そこでmlマウスと正常マウスのマイトジェンに対するリンパ球増殖反応について検討した。

実験材料と方法

（1）実験動物

メンケス病モデルマウスとしてmlマウス(C3Hf系)6～8週令の雄(ml/y)を用いた。延命させるため生理食塩水に塩化第二銅を2mg/mlになるように溶解し、生後7日目のmlマウスに50μg/g body weightとなるように皮下投与した[21]。正常マウス

としてC3Hfマウス6～8週令の雄(+/y)を用いた。

（2）培養液

脾細胞の培養液はRPMI1640(日水製薬)に5%牛胎児非働化血清(GIBCO)、50μM 2-メルカプトエタノール、40μg/mlゲンタマイシンを加えて用いた。

（3）マウス脾細胞の調製

マウス脾細胞はScheme 1に示すように、脾臓をホモジナイザーで軽く圧迫しながら砕き、細胞を遊離させた。混入している赤血球は低張処理により除去し、培養液で調製後マウス脾細胞として用いた。

Scheme 1. Preparation of a spleen cell suspension.

Mice
- sacrificed by cervical dislocation.
- disinfected the skin with ethanol.

Spleen
- washed with the Hanks' solution
- homogenized.

Cell suspension
- centrifuged at 1000rpm for 5min.
- washed with Hanks' solution
- added 4.5ml of distilled water and 0.5ml of x10PBS(-) with stirring.
- centrifuged at 1000rpm for 5min.
- washed with RPMI1640 containing 5%FCS.

Spleen Cells

（4）マイトジェンに対するリンパ球増殖反応

マイトジェンに対するリンパ球増殖反応はBlakleyとArcherの方法[32]に準じ、T細胞マイトジェンとしてコンカナバリンA (Con A, Sigma)[33,34]、B細胞マイトジェンとしてリポポリサッカライド (LPS, *S. typhosa*, Difco)[35,36]を用いて行なった。脾細胞(5x10^5cells/200μl/well)を96穴マ

ルチプレート(Corning)に播種した後、各濃度のマイトジェンを添加し48時間培養した。なお、培養は以後すべての実験において37℃、飽和蒸気圧下、5％炭酸ガス気相下で行った。培養終了の16時間前に[^{3}H]-Thymidine([^{3}H]-TdR:0.1μ Ci/well,Amersham)を添加しパルス標識を行った。細胞はMultiple Semiautomatic Sample Harvester (アベ科学)を用いてグラスフィルター (GF/C,Whamman)上に回収し、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

実験結果および考察

mlマウスおよび正常マウスの脾細胞はConAおよびLPS刺激により、濃度依存的に[^{3}H]-TdRの取込みを促進した(Fig. 4)。ConAについては0.4μ g/mlで両マウス脾細胞は最大の[^{3}H]-TdRの取込みを示し、スティミュレイションインデック

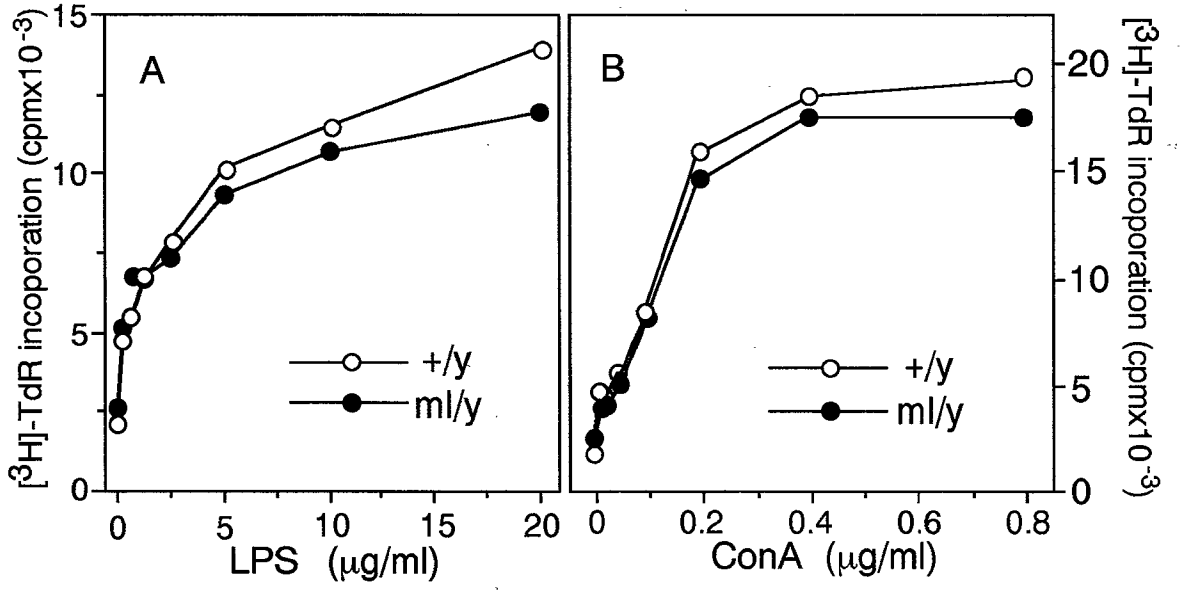

Fig. 4. Reactivity of normal and macular mice to the standard mitogen array of lipopolysaccharide (A) and concanavalin A (B). Spleen cells were cultured with the indicated doses of the designated mitogens for 48 hours. The cultured cells were pulsed with ^{3}H-TdR(0.1 μCi/well) 16 hours before cell harvest. The data represent the mean ± S.D. (n=3)

スは約10倍であった。LPSについては20μg/mlでスティミュレイションインデックスが正常マウスで約7倍、mlマウスで約6倍であった。しかし、両マウス間に有意な差は認められなかった。以上の結果より、これらマイトジェンに対するリンパ球の増殖反応については、正常マウスとmlマウスは同程度であることが判明した。

第二節　mlマウスおよび正常マウスのリンパ球混合培養(MLR: mixed limphocyte reaction)によるリンパ球増殖反応

前節の結果よりマイトジェン刺激に対する応答性については正常マウスとmlマウスにおいて有意差は認められなかった。さらに詳細にリンパ球の機能を調べるためにアロ(非自己)抗原に対するリンパ球増殖反応を検討した。

実験材料と方法

（1）リンパ球混合反応

リンパ球混合培養はPeckとBachら[37]の方法に準じて行った。+/y、ml/yおよびBalb/cマウス(日本ＳＬＣ)を6～8週令で使用した。刺激細胞として50μg/mlのマイトマイシンC(協和発酵)で37℃、60分間処理した脾細胞を、応答細胞として主要リンパ節細胞(膝脾、鼠径、および旁腹部大動脈リンパ節)を各々用いた。刺激細胞および応答細胞を5x10^{6}cells/mlに調製し、それぞれ100μlずつ96穴マルチプレート(Corning)に播種し、72時間培養した。培養終了の16時間前に[^{3}H]-TdR(0.1μCi/10μl/well)を添加しパルス標識を行った。培養終了後、細胞内の放射能を前節と同様に液体シンチレーションカウンターで測定した。

（2）有意差検定

有意差検定はStudent's t-testによった。

実験結果および考察

刺激細胞としてmlマウスおよび正常マウスの脾細胞を用いた時、Balb/cマウスリンパ節細胞の応答性は同程度であった(Table 1)。しかし、Balb/cマウスのアロ抗原に対する応答性はmlマウスの方が正常マウスよりも有意に低値を示した。このアロ抗原に対する応答は非自己を認識したT細胞の増殖反応によって起こることから、mlマウスにおいて非自己を認識するT細胞の機能低下が示唆された。

Table 1. Proliferative response of lymphocytes stimulated by allogenic cells in MLR

Responder	Stimulater(mean cpm ±S.D.)		
	+/y	ml/y	BALB/c
+/y	924 ± 95	———	14787 ± 1454
ml/y	———	962 ± 300	11334 ± 603 *
BALB/c	12438 ± 916	12669 ± 1357	———

Responder cells (lymph node cells; 5 x 10^5 cells/well) were cultured with mitomycin C-treated spleen cells (5 x 10^5cells/well) for 72 hours. The cultured cells were pulsed with ^{3}H-TdR (0.1 μCi/well) 16 hours before cell harvest. Data represent the mean ± S.D. (n=3)
*; Significantly different from normal mouse ($p<0.05$).

第三節　mlマウスおよび正常マウスの一次免疫での抗体産生能

これまでは免疫担当細胞の増殖機能に関する検討を行ったが、さらに生体の免疫機能として非常に重要でかつイムノネットワークを反映している抗体産生機能について検討した。抗原にはT細胞依存性抗原およびT細胞非依存性抗原を用い、特に一次免疫による抗原特異的抗体産生細胞数を測定した。

実験材料と方法

（1）使用抗原および免疫方法

T細胞依存性抗原としてヒツジ赤血球(SRBC: Sheep Red Blood Cell, 日本生物材料センター)、T細胞非依存性抗原としてDinitrophenyl-Ficoll(DNP-Ficoll)を用いた。DNP-Ficollの合成はInmanの方法[38]に準じた。各マウスにSRBCは$5x10^8$cells/250μlを、DNP-Ficollは100μg/200μlを腹腔内投与した。

（2）抗体産生細胞数の測定

抗体産生能はCunninghamのプラーク形成細胞測定法[30]に準じた。抗原感作の4日後に脾細胞を調製し($2.5x10^6$cells/0.2ml)、SRBC(最終濃度4%)あるいはTrinitrophenyl-SRBC(TNP-SRBC, 最終濃度4%)およびモルモット補体(最終濃度10%, Rockland)を加え、カニンガムチャンバーにセットした。37℃で1時間反応させた後、溶血斑(プラーク)を倒立顕微鏡下で数え、抗体産生細胞数(Plaque-forming cell : PFC)とした。この方法による抗体産生細胞数は主にIgM産生細胞である。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作方法に従った。

実験結果および考察

SRBC(T細胞依存性抗原)に対するmlマウスの抗体産生細胞数は正常マウスの約1/2と低値を示した(Table 2)。一方、T細胞非依存性抗原であるDNP-Ficollに対する抗体産生細胞数は正常マウスとmlマウスで同程度であり、有意な差は認められなかった。以上の結果は抗原特異的なT細胞依存性の抗体産生系におけるmlマウスの機能低下を示唆するものである。一方、T細胞非依存性抗原であるDNP-Ficollはその抗原性を示すのにB細胞を直接活性化して抗体産生細胞へと分化させる[40]。この経路は正常マウスとmlマウスが同程度であることから、mlマウスのB細胞機能は正常マウスレベルであると考えられた。

Table 2. Primary immune response[a] in normal and macular mice.

mouse	T-cell dependent antibody response (PFC/10^6 spleen cells)[b]	percentage of control	T-cell independent antibody response (PFC/10^6 spleen cells)	percentage of control
+/y	2303 ± 109 (9)[c]	100	291 ± 33 (6)	100
ml/y	1158 ± 359 (9)*	50.3	287 ± 23 (6)	98.6

a; IgM against sheep red blood cells (T-lymphocyte dependent response) or DNP-Ficoll (T lymphocyte independent response).
b; Plaque-forming cells (antibody-producing cells) per 10^6 spleen cells.
c; Mean ± S.D. (number of animals).
*; Signifficantly different from +/y ($p<0.05$).

第四節　mlマウスおよび正常マウスのT細胞依存性抗原に対する二次免疫抗体産生能に関する検討

前節の結果はT細胞依存性抗原に対する一次免疫抗体産生能に関してmlマウスの機能低下を示した。そこでT細胞の免疫記憶機能に関与した二次免疫抗体産生能について検討した。本節では抗原にT細胞依存性抗原であるTNP-Keyhole Limpet Hemocyanin (TNP-KLH)を用い、特異的抗体量をELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)法で測定した。

実験材料と方法

（1）TNP-KLHの合成[41)]

KLH(Calbiochem Corporation)を0.12M NaClを含む0.17M ホウ酸緩衝液(pH8.0)(BBS)で一晩透析した後、蛋白濃度を約20mg/mlに調整した。トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(TNBS)を15mg/mlの濃度でBBSに溶解し、1mgのKLHに対し88μgのTNBSの割合で滴下した。遮光下で撹拌しながら室温で2時間

反応後、Sphadex G-25 カラム (PD-10カラム, Pharmacia)の素通り(黄色を呈する画分)を回収した。PBS(-)で2日間、4℃で透析後、濾過滅菌して遮光保存した。

（２）抗TNP抗血清の調製

TNP-KLH溶液(0.2mg/250μl)と完全フロイントアジュバント(和光純薬)を1:1で混合しエマルジョンを作製した。正常マウスにTNP-KLH(最終濃度0.1mg/250μl エマルジョン)を腹腔内投与し、その8日後マウスの血清を採取し、抗TNP抗血清の標準品として用いた。

（３）培養方法

各マウスを(２)で示した方法で免疫し、3週間後、脾細胞を調製した。脾細胞は24穴マルチプレート(Corning)に$6x10^6$cells/ml/wellとし、種々の濃度のTNP-KLHを添加して培養した。2日後に細胞を回収し、洗浄により抗原を除去した後、細胞を1mlの細胞培養液に懸濁した。この細胞浮遊液を200μlずつ、96穴マルチプレート(Corning)に播種し、4日間培養した後、培養上清を採取し抗体価を測定した。

（４）ELISAによる抗体価の測定[41)]

（ａ）固相の準備

固相抗原として50μg/mlのDNP-Ficollを96穴ELISA用マルチプレート(Corning)に50μlずつ分注し、4℃で一晩放置した。非特異的吸着を抑えるため1.5%ゼラチンでブロッキングを行った。

（ｂ）培養上清の添加と反応

抗原固定済みプレートは0.05% Tween20と0.15M NaClを含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.6)(TTBS)で洗浄した。培養上清(50μl/well)をこのプレートに加え1.5時間、室温で反応させた。TTBSで洗浄後、horse radish peroxidaseで標識したRabbit anti-Mouse IgM (1:2000希釈, Zymed) を室温で1.5時間反応させた。

（ｃ）発色

10ml酢酸緩衝液(pH5.5)に55mM3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(N,N-Dimethyl-formamide) を100μl、33% H_2O_2を5μl溶解し発色試薬とした。TTBSで洗浄したプレートに発色試薬を100μl/wellずつ加え、室温で10分～60分間反応させた。2N-硫酸(50μl/well)で反応を停止した後、測定波長450nm、参照波長655nmで測定した。

（d）抗体価の換算

検体の抗体価は抗TNP抗血清の原液を1ユニットとし、その希釈倍率より表示した。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作方法に従った。

実験結果および考察

正常マウス脾細胞の抗TNP抗体分泌量はTNP-KLHの濃度に依存して増加し、1 μg/mlで最大の抗体価を示した(Fig. 5)。この時の抗体価はTNP-KLH無添加の時と比較して約5倍の上昇であった。一方、mlマウスの二次応答も同様TNP-KLH濃度に依存したが、その応答性は正常マウスよりも低かった。両マウスの抗体価における差はTNP-KLH 0.1 μg/mlの時に最大となり、mlマウスは正常マウスの約1/3であった。このように抗原特異的なT細胞依存性の二次免疫抗体産生系においてもmlマウスの機能は正常マウスと比較して低下していることが明かとなった。

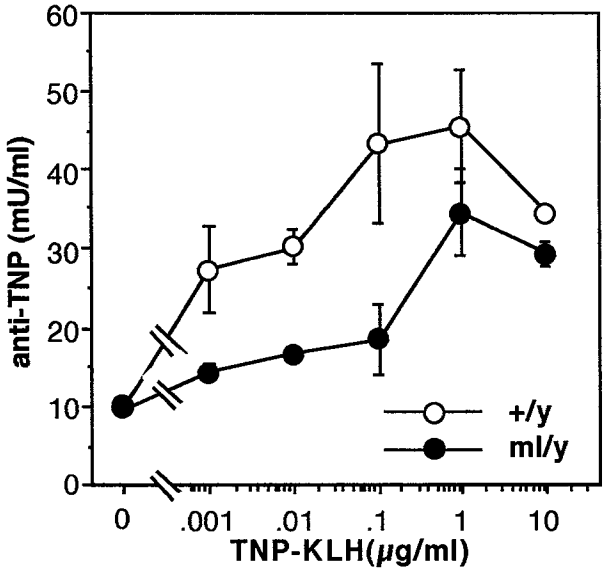

Fig. 5. Secondary antibody responses of normal and macular mice. TNP-KLH (0.1mg)-primed mouse spleen cells ($6x10^6$) were cultured with the indicated amounts of TNP-KLH for 2 days, washed and cultured for an additional 4 days in the antigen-free culture medium. Culture supernatants were harvested and assayed for the concentrations of anti-TNP IgM. The data represent the mean ± S.D.

第五節　小括

mlマウスの免疫担当臓器の萎縮、および銅欠乏食で飼育したマウスの免疫応答能の低下に関する報告[23-30]よりmlマウスの免疫不全が予想され、本章では種々の免疫応答を検討した。マイトジェンに対するリンパ球増殖反応についてはmlマウスおよび正常マウス脾細胞の応答性は同程度であった。しかしMLRによるアロ抗原に対する反応性はmlマウスで低下していた。アロ抗原に対して反応する細胞はT細胞であることから、mlマウスのT細胞機能低下が示唆された。一方、アロ抗原性についてはmlマウスと正常マウスの間に有意な差は見られなかった。

抗体産生能に関してはT細胞依存性抗原に対してmlマウスは正常マウスの1/2と低値であった。一方、T細胞非依存性抗原に対する抗体産生能は両マウス間に有意な差を認めなかった。さらに二次応答能においてもmlマウスは正常マウスと比較して低値を示した。

メンケス病患者は易感染性であり、その疾患モデル動物であるmlマウスに認められた抗原特異的抗体産生能の低下はその病態と矛盾しない。よってmlマウスの抗体産生能低下機構の解明はその病態の解明に重要な手がかりを与えると期待される。そこで、mlマウスの抗原特異的抗体産生能低下機構をより詳細に検討すべく、次章より細胞レベルおよび液性因子レベルの検討を生化学的に進めることにした。

第二章　mlマウスの抗原特異的抗体産生能低下に関する細胞レベルでの検討

mlマウスの免疫担当臓器の萎縮および銅欠乏食で飼育したマウスにおいて種々免疫応答が低下することから、mlマウスの免疫応答について前章で検討した。その結果、mlマウスには抗原特異的な抗体産生能低下およびMLRでの非自己に対する応答性の低下を明らかにした。抗体産生系にはT細胞依存性経路とT細胞非依存性経路が存在しており、この低下はT細胞依存性の経路に限り認められた。従ってmlマウスの抗体産性能低下はT細胞機能低下に起因していると推測される。

そこで本章ではmlマウスの抗体産生能低下の原因細胞を追求すべく、抗体産生系における個々の細胞機能について種々比較検討した。

第一節　mlマウスおよび正常マウスの非特異的抗体産生能に関する検討

免疫応答において、B細胞の主たる役割は抗体産生である。この抗体産生には抗原特異的抗体産生と抗原非特異的抗体産生がある。LPSは抗原非特異的にB細胞を活性化し抗体分泌、特にIgMの産生誘導を引き起こすことが知られている。そこでB細胞の抗体産生能を検討するため、LPSで処理した脾細胞から分泌されるIgM量を測定した。

実験材料と方法

（1）培養方法

脾細胞は48穴マルチプレート(Costar)に$3x10^5$cells/0.6ml/wellとし、LPSを最終濃度10μg/mlとなるよう添加して培養し、経時的に培養上清を採取した。

（2）サンドイッチELSAによる抗体量の測定

固相抗体として50μg/mlのRabbit anti-Mouse Immunoglobulinを96穴ELISA用マルチプレート(Corning)に50μlずつ分注し、4℃で一晩放置した。ブロッキング、培養上清の添加、第一抗体の添加および発色は前章に記載の操作法に従った。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

非特異的抗体産生の結果をFig. 6に示す。脾細胞のLPS刺激により経時的に抗体は産生され、培養7日間では正常マウスが約20μg/ml、mlマウスはその約2.5倍の50μg/ml産生された。産生誘導比においても同様の結果が得られ、培養7日間では正常マウスは約20倍に対しmlマウスは約50倍と高値を示した。以上の結果よりmlマウスは抗原非特異的な抗体産生能が逆に亢進していることが明らかとなった。

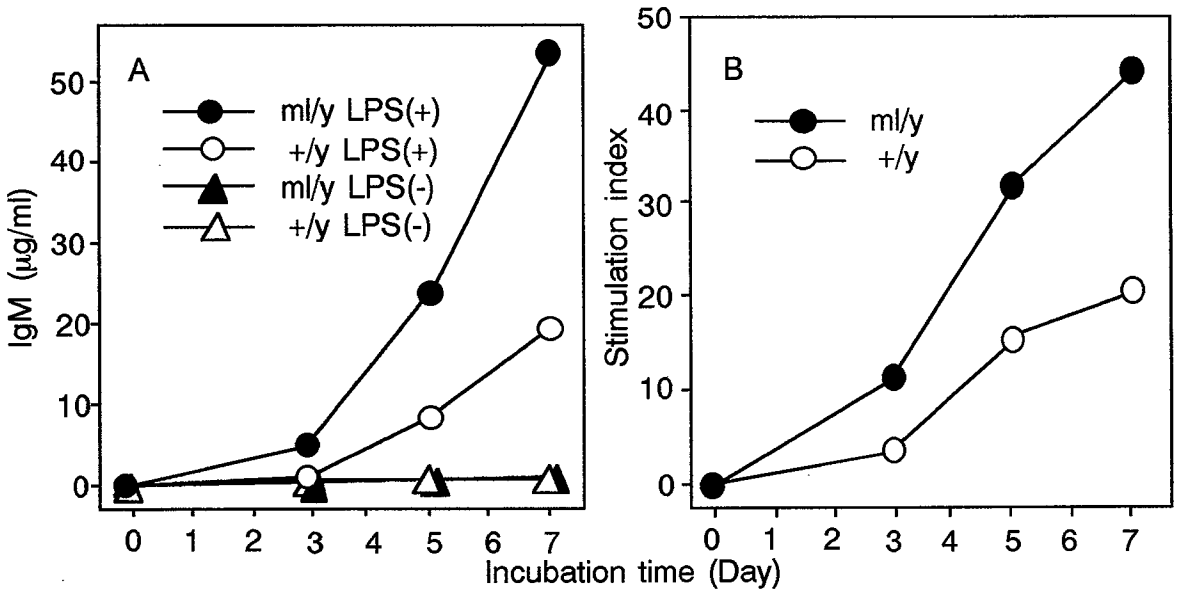

Fig. 6. In vitro antibody production of LPS-stimulated spleen cells in normal and macular mice. Spleen cells ($3x10^5$) were stimulated with 10μg/ml LPS or medium for indicated days. A, Culture supernatants were assayed for increased presence of IgM antibody using isotype-specific sandwich ELISA. B, Ratios of IgM production in LPS-treated to that in non-treated spleen cells were expressed as the stimulation index. Each point represents the mean of three experiments.

第二節　mlマウスのＴ細胞およびＢ細胞の機能解析

Ｔ細胞依存性の抗体産生系は、マクロファージやＴ細胞、Ｂ細胞等の個々の細胞機能が正常であり、なおかつそれぞれが相互作用することにより成立する。前章で示唆されたmlマウスのＴ細胞機能低下が抗体産生能低下の原因となるのか否かを検討すべく、正常およびmlマウスのＴ細胞およびＢ細胞の豊富な分画を脾細胞から得て、それぞれの分画を入れ換えることによる抗体産生能の変化を調べた。

実験材料と方法

（１）Ｔ細胞の濃縮方法

Ｔ細胞の分離はJuliusらのナイロンカラム法[42)]を用いて行った。脾細胞をナイロンカラムに流入し、ナイロンウール非付着性の細胞をＴ細胞豊富な分画として用いた。

（２）Ｂ細胞の濃縮方法

Ｔ細胞を除去することにより、Ｂ細胞の純度の高い細胞分画を得る方法として知られている抗体と補体による細胞障害処理法を用いた。$1x10^7$cells/mlに調製した脾細胞にThy-1.2抗体(Cedarlane)を添加した後、37℃の水浴中で45分間放置した。細胞はHanks' solutionで３回洗浄して抗体を除いた。さらに$1x10^7$cells/mlにHanks' solutionで調製した後モルモット補体を最終濃度が5%となるように添加し、37℃の水浴中で45分間反応させた。細胞は3回洗浄して補体を除いた後、細胞培養液に浮遊させたものをＢ細胞豊富な分画とした。

（３）培養方法

in vitro抗体産生系はMishellとDuttonの方法[43)]に準じて行なった。35mmシャーレ(Falcon)にＴ細胞分画は$0.3x10^7$cells/1.5ml、Ｂ細胞分画は$0.7x10^7$cells/1.5mlとなるように播種し、SRBC($1x10^7$cells/1.5ml)を添加して4日間培養した。培養期間中毎日2～3回ゆっくりと振盪した。培養終了後に細胞を回収し、抗体産生細胞数を測定した。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

in vitro系においても、mlマウスの抗体産生細胞数は正常マウスと比較して低値を示した(Fig. 7)。 mlマウスのT細胞分画を正常マウスのものに入れ換えることにより、抗体産生細胞数は有意に増加したが、正常マウスレベルの抗体産生細胞数までには回復しなかった。一方、mlマウスのB細胞分画を正常マウスのものと入れ換えても全く回復は認められなかった。すでに述べてきたようにT細胞非依存性抗原に対する抗体産生能においては、mlマウスと正常マウスの間に有意な差が認められなかったこと、および抗原非特異的な抗体産生能は正常マウス以上に認められたことから、B細胞に機能異常があるとは考えにくい。従って、mlマウスの抗体産生能低下は、少なくとも一部はT細胞の機能低下に起因したものであると考えられる。

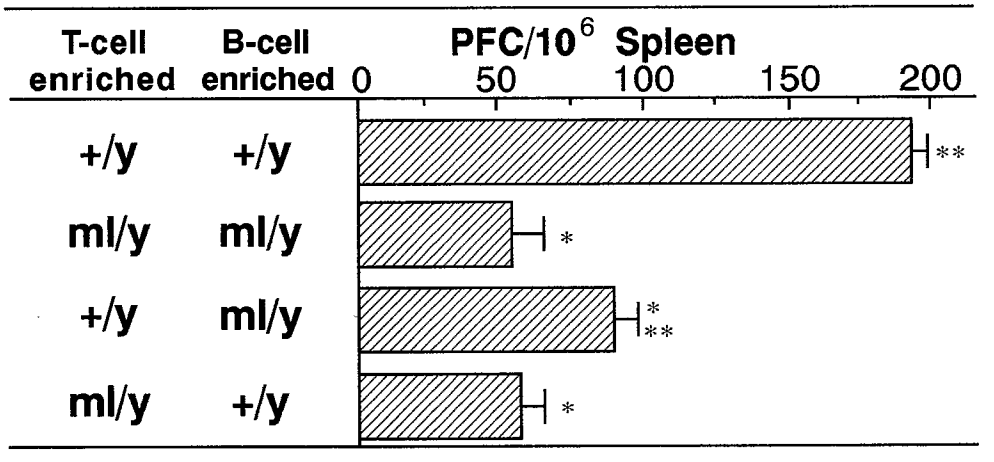

Fig. 7. Cellular characterization of SRBC-induced antibody production. B cell-enriched (T cell-depleted) cells were prepared by treatment of spleen cells with anti-Thy 1.2 plus complement. Nylon-nonadherent spleen cells were used as a T cell-enriched fraction. B cell-enriched spleen cells (7×10^6) and T cell-enriched spleen cells (3×10^6) were mixed and cultured with SRBC (10^7) for 4 days. The data represent the mean ± S.D. (n=4)

*; Significantly different from the antibody response of normal mouse ($p<0.01$).

**; Significantly different from the antibody response of macular mouse ($p<0.01$).

第三節　フローサイトメーターによるmlマウスおよび正常マウスのリンパ球亜集団の解析

リンパ球の表面にはそれぞれの亜集団に応じたマーカー抗原があり、これは各種抗体を用いることにより分別可能である。特にＴ細胞分化過程でのマーカー抗原の変移が明らかとなり、かつこれらマーカー抗原の免疫応答過程での役割も解明されつつある。従って、Ｔ細胞のサブセットをはじめとする種々のリンパ球のマーカー抗原に対する抗体を利用して、リンパ球の量的変化を追跡することにより免疫系の異常を知ることができる。これまでの結果より、mlマウスの抗体産生能低下は少なくとも一部はＴ細胞の機能低下によるものであることを明らかにした。一方、Ｔ細胞は機能的に多様な細胞の集団である。つまり、Ｔ細胞集団はいくつかのサブセットから構成されており、大きくは、免疫応答に促進的なヘルパーＴ細胞、抑制的なサプレッサーＴ細胞に分けられる。従って、相反する機能を持つ細胞集団を個々に検討する必要があり、本節においては脾臓を構成する種々の免疫担当細胞の割合をフローサイトメーターにより解析した。

実験材料と方法

（１）抗体

Ｂ細胞に対する抗体として抗Ly5(B220)-Phycoerythrin (PE, 日科機)、Ｔ細胞に対する抗体として抗Thy1.2-Fluorescein Isothiocyanate (FITC, 日科機)、ヘルパー／インデューサーＴ細胞に対する抗体として抗Ｌ３Ｔ４(ＣＤ４)-ＰＥ（Organon Tecnika-Cappel)、キラー／サプレッサーＴ細胞に対する抗体として抗Ly2-FITC (日科機)を用いた。

（２）フローサイトメトリー

脾細胞(1x10^6cells/ml)を各種抗体で染色後、フローサイトメーター（Epics 750 Series, Coulter)を用い488nmで励起し、FITCは520nm、PEは580nmの蛍光強度を測定し、MDADSII UNIT(Coulter)により解析した。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

フローサイトメトリーによる脾細胞のリンパ球亜集団の解析結果をFig.8に示した。mlマウスおよび正常マウス脾細胞の各種抗体に対するヒストグラムのパターンは、どれもほぼ同じでり、各細胞のマーカー抗原量には差が認められなかった。各細胞の割合について調べると、Ly-5陽性細胞(B細胞)の割合はmlマウスの方が正常マウスより多かった。一方、Thy-1.2陽性細胞(T細胞)およびL3T4陽性細胞(ヘルパーT細胞)の割合は共にmlマウスの方が正常マウスより減少した。しかし、Ly-2陽性細胞(キラー/サプレッサーT細胞)はmlマウスと正常マウスの間で有意な差は認められなかった。従って、Thy-1.2陽性細胞の減少はL3T4陽性細胞の減少に付随したものであることが明らかとなった。以上の結果より、mlマウスのT細胞機能低下の原因の一部はT細胞、特にヘルパーT細胞の割合の減少に起因していると考えられる。

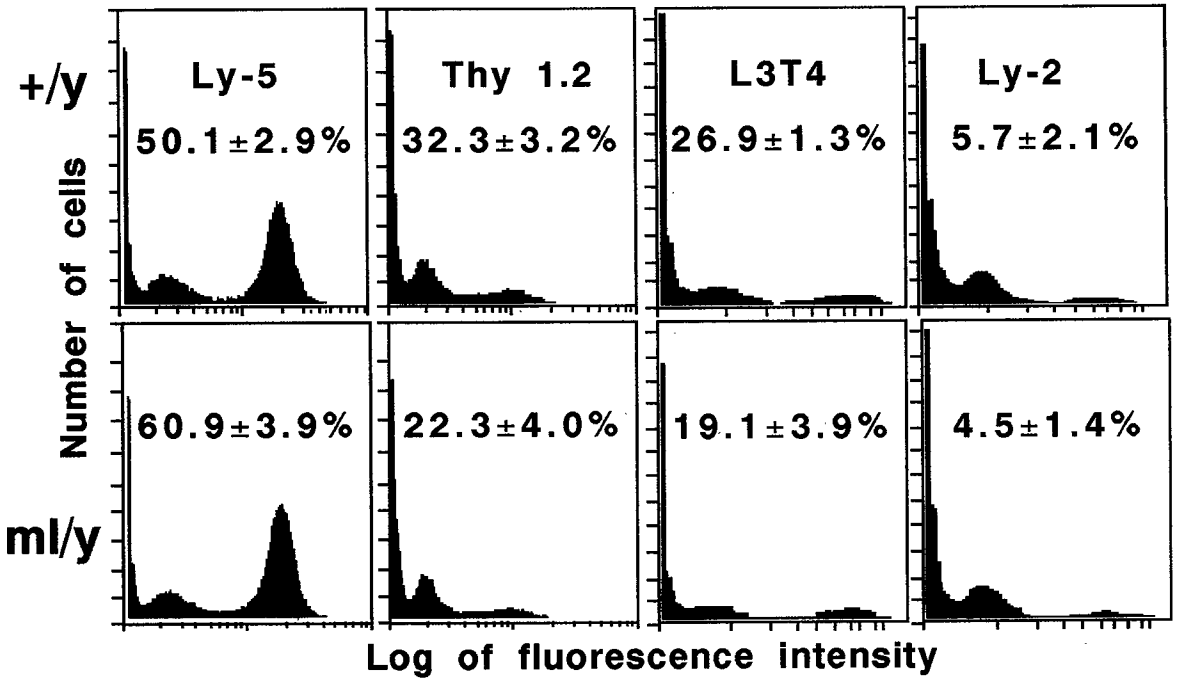

Fig. 8. Flow cytometric analysis of various antigens on the spleen cell surface. Spleen cells were treated with labeled various antibodies and analysed by flow cytometer. The percentages given in each panel represent the proportion of positive cells. Values are the mean ± S.D. of 4 mice.

第四節　小括

mlマウスの抗原特異的抗体産生についてT細胞非依存性抗原に対しては機能低下は認められなかったが、T細胞依存性抗原に対しては機能低下を示した。この原因細胞を明らかにすべく、抗体産生系における個々の細胞機能について種々検討した。SRBCに対する抗原特異的抗体産生能はmlマウスで低下していたが、B細胞を直接刺激し、抗原非特異的な抗体産生を促進させるLPS刺激ではmlマウスのIgM産生量は増加していた。正常およびmlマウス脾細胞のT細胞およびB細胞分画をそれぞれ交換し、SRBCに対する抗体産生能の変化を調べた結果、mlマウスのT細胞分画を正常マウスのものと交換すると、抗体産生能は一部回復した。しかしmlマウスのB細胞分画を正常マウスのものと交換しても、抗体産生能は回復しなかった。また両マウス脾細胞のリンパ球亜集団についてセルソーターを用いて解析した結果、各細胞のマーカー抗原量には差は認められなかった。しかし、各細胞の比率を比較するとmlマウスではB細胞の占める割合が多く、逆にT細胞の割合は減少しそれは特にヘルパーT細胞の減少に起因することが判明した。従って、これまで示してきたT細胞の機能低下はこのヘルパーT細胞の減少が関与していると考えられた。

第三章　マウス血清中のセルロプラスミン活性および銅濃度とセルロプラスミンの精製

セルロプラスミンは銅を含む血清糖タンパク質であり、アミンオキシダーゼ活性を有している[46)]。ヒトの場合、セルロプラスミンは高純度に精製され、その性状も明らかにされつつある[47, 48)]。ヒト血清セルロプラスミンは分子量が134,000[49)]でその一分子中に6～8個の銅原子を含んでいる[50, 51)]。血清銅の90%以上はセルロプラスミンと結合していることから銅の輸送に関与していると考えられている。

一方、メンケス病患者では血清中の銅濃度やセルロプラスミン活性が低下していることが知られている[5、6)]。mlマウスについても銅の分布異常については報告されており、小腸や腎臓では高値を示し、脳や肝臓、血清では明らかな低値を示す[21)]。

そこでmlマウス血清中のセルロプラスミン活性および銅濃度を測定し、抗体産生能との相関について検索した。その結果、セルロプラスミン活性と抗体産生能に高い相関性が見られた。従ってセルロプラスミンの抗体産生におよぼす影響を検討するに当り、マウスセルロプラスミンの精製を試みた。

第一節　mlマウスおよび正常マウス血清中のセルロプラスミン活性と銅濃度

メンケス病患者は血清中のセルロプラスミン活性および銅濃度が非常に低い。そこで、まずmlマウス血清中のセルロプラスミン活性および銅濃度を調べた。

実験材料と方法

(1)セルロプラスミンの活性測定法[43)]

血清中のセルロプラスミン活性はLehmanらの方法に準じo-dianisidine dihydrochlorideを基質として用い、540nmによる吸光度を測定し、下記の式により算出した。

Cp oxdase activity (mU/ml) ＝ (absorbance x 60) / (9.6 x incubation time)

60 ：血清の希釈倍率　　9.6 ：酸化型基質のモル吸光係数

(２)銅濃度の測定

検体に有害金属測定用硝酸(ナカライテスク)を適量加えて湿性灰化を行い、原子吸光度計(208型、日立)により測定した。

実験結果および考察

マウス血清中の銅濃度およびセルロプラスミン活性をTable 3に示す。mlマウス血清中の銅濃度およびセルロプラスミン活性は共に正常マウスの約1/3と低値であり、この現象はヒトメンケス病の臨床像と一致する。また、血清中の銅濃度とセルロプラスミン活性の相関性を見ると、相関係数0.986と非常に高い正の相関を示した(Fig. 9)。さらにSRBCに対する抗体産生能とセルロプラスミン活性との相関をFig. 10に示す。抗体産生細胞数はセルロプラスミン活性に伴って増加し相関係数は0.874であった。

Table 3. Serum ceruloplasmin activity and copper concentration in +/y and ml/y mice

	Cu (μg / ml)	Ceruloplasmin (mU / ml)
+/y	1.379 ± 0.097	21.40 ± 1.59
ml/y	0.419 ± 0.087 *	6.93 ± 1.35 *

The data represent the mean ± S.D. (n=6)
*; Significantly different from +/y mouse ($p<0.01$).

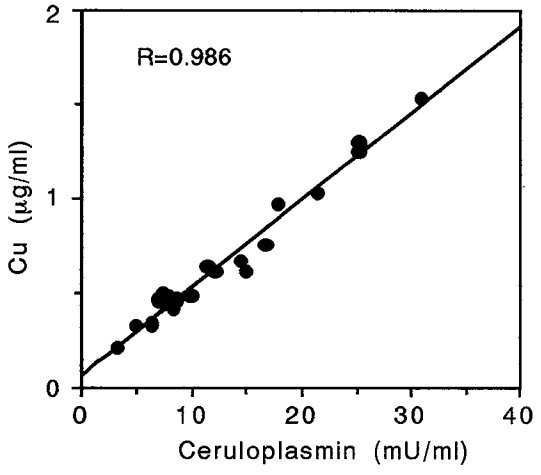

Fig. 9. Relation between copper and ceruloplasminconcentration in mouse serum.

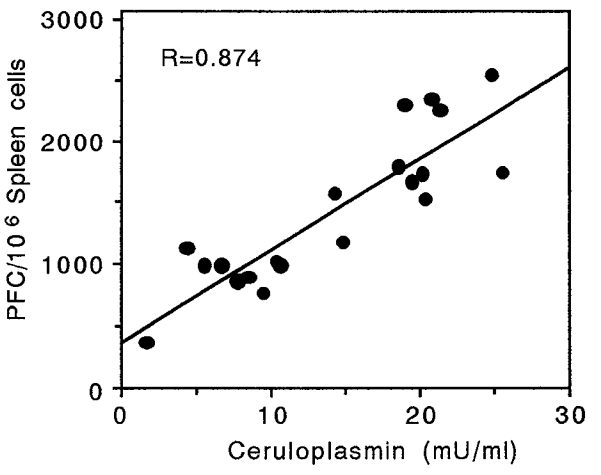

Fig. 10. Relation between antibody production and ceruloplasmin concentration.

第二節　マウスセルロプラスミンの精製

マウスの抗体産生系におけるセルロプラスミンの役割を明らかにするためにはマウスのセルロプラスミンを用いるのが賢明である。そこでマウス血清よりセルロプラスミンの精製を試みた。

実験材料と方法

（1）精製操作

セルロプラスミンはScheme 2に示す方法により精製した。マウス血清を硫酸アンモニウムで分画し、25%-50%飽和の分画を回収し、５０ｍＭ　ＮａＣｌを含む10mM トリス-酢酸緩衝液 pH7.0 (Buffer A) に対して透析した。この透析内液をBlue Sepharose CL-6B (Pharmacia)カラムに添加し、吸着しなかった分画をBuffer Aで平衡化したDEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia)カラムに添加した。洗浄後50mMから250ｍＭ　ＮａＣｌによる直線濃度勾配で溶出した。活性分画を10mM トリス-酢酸緩衝液 pH5.0(Buffer B)で希釈し50mMのNaclを含むBuffer B

で平衡化したDEAE-Sepharose CL-6B(Pharmacia)カラムに添加し、Buffer Bを用いて前段階と同様に洗浄後溶出した。活性分画は硫酸アンモニウム60%飽和溶液中で保存した。

Scheme 2. Purification of Mouse Ceruloplasmin

Mouse serum
├$(NH_4)_2SO_4$ 25%-50%
ppt
├dialyzed against Buffer A containing 50mM NaCl
├15000rpm,20min
sup
▼
Blue Sepharose CL-6B
├washed with Buffer A containing 50mM NaCl
DEAE Sepharose CL-6B
├washed with Buffer A containing 50mM NaCl
├eluted with 50-250mM NaCl gradient
DEAE Sepharose CL-6B
├washed with Buffer B
├eluted with 50-250mM NaCl gradient
▼
Mouse ceruloplasmin

（2）その他

ドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)はゲル濃度7%でLaemmliの方法[44]によって行った。泳動終了後ゲルをクマーシーブリリアントブルーG-250で染色した。

タンパク質濃度の測定はウシγ-グロブリンを標準として用い、Bradfordの方法[45]で行った。

実験結果および考察

精製の結果をTable 4にまとめる。セルロプラスミンをマウス血清から4段階の操作で約260倍に精製し、収率は約8%であった。精製したセルロプラスミンの均一性はSDS-PAGEで確認した。Fig. 11に示すように、セルロプラスミンは分子量135,000の明確なバンドが認められた。なお、この分子量は還元条件下および非還元条件下で変化しなかった。

Table 4. Purification of mouse ceruloplasmin from mouse serum.

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (m unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Serum	5208	1.43	0.275	100	1
Ammonium sulfate precipitation	1010	1.13	1.12	79	4
DEAE-Sepharose CL-6B (pH7.0)	21.8	0.65	29.8	45	109
DEAE-Sepharose CL-6B (pH5.0)	1.53	0.11	71.9	8	262

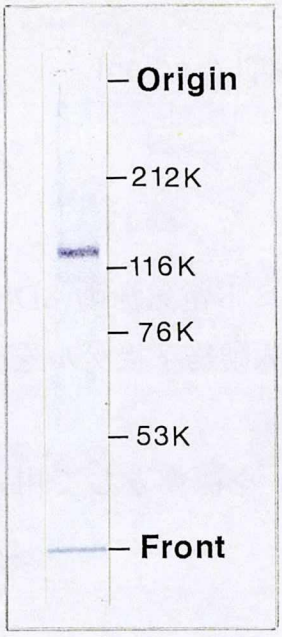

Fig. 11. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of purified mouse ceruloplasmin. Purified ceruloplasmin (2μg) were electrophoresed and atained by Coomassie Brilliant Blue R-250.

第三節　小括

マウス血清中のセルロプラスミンおよび銅濃度と抗体産生能との相関について検索した。mlマウス血清中の銅濃度およびセルロプラスミン活性は共に正常マウスの約1/3と低値であり、この現象はヒトメンケス病の臨床像と一致する。また、血清中の銅濃度とセルロプラスミン活性の相関性を見ると、相関係数0.986と非常に高い正の相関を示した。さらにSRBCに対する抗体産生能とセルロプラスミン活性との相関係数は0.874であった。従って、抗体産生能と血中セルロプラスミン活性あるいは銅濃度とは非常に高い相関性があることが示され、これらの抗体産生に与える影響に興味が持たれた。そこでマウスのセルロプラスミンの精製を試みた。マウスセルロプラスミンは血清から4段階の操作で約260倍に精製した。精製したマウスセルロプラスミンはSDS-PAGEによりその分子量は135,000であった。この精製したマウスセルロプラスミンを用い、次章において抗体産生におよぼす影響について検討した。

第四章　セルロプラスミンおよび銅の抗体産生能におよぼす影響

メンケス病は腸管における銅の吸収障害により血中の銅含量やセルロプラスミン活性が低下している[5、6]。さらには生体内での銅輸送障害にも原因があり、経口にしろ非経口にしろ、銅の治療投与では血清中の銅濃度やセルロプラスミン活性が上昇することはほとんどない。治療は銅の非経口的投与およびエチレンジアミン四酢酸-銅等のキレート剤との併用が試みられているが、治療効果に疑問が持たれている。また、セルロプラスミン投与による治療の報告もない。

セルロプラスミンの生理的役割は１）そのフェロオキシダーゼ活性により、Fe^{2+}をFe^{3+}とし、これをアポトランスフェリンに結合させる触媒作用[52, 53]、２）銅の運搬[54－56]と組織（特に肝臓）内における銅の平衡維持[57, 58]、３）スーパーオキシドジスムターゼ様活性による活性酸素の産生抑制もしくは除去[64]等が上げられるが真の生理的役割についてはいまだ明確でない。

前章で示したようにmlマウス血清中の銅濃度およびセルロプラスミン活性は低下しており、銅とセルロプラスミンおよびセルロプラスミンと抗体産生能に高い相関性が見られた。このことは銅あるいはセルロプラスミンが免疫応答、特に抗体産生において重要な役割を担っている可能性がある。そこで本章では、銅やセルロプラスミンの抗体産生能におよぼす影響を検討した。

第一節　セルロプラスミンおよび銅投与による抗体産生能への影響

前章で精製したマウスのセルロプラスミンおよび銅投与の抗体産生におよぼす影響を検討した。

実験材料と方法

(１)セルロプラスミンおよび銅投与

マウスにセルロプラスミンおよび銅(Cu^{2+})を4日間尾静脈投与した。最終投与

日にSRBC(0.5x10^9cells/250μ l)を腹腔内投与し、４日後抗体産生細胞数を測定した。

セルロプラスミンの熱処理は100°C、5分間行い、アミンオキシダーゼ活性を失活させた。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

セルロプラスミンの抗体産生能に与える影響をFig.12に示す。mlマウスの抗体産生細胞数はセルロプラスミン投与により用量依存的に上昇し、40mU投与（10mU/day; 4日間投与）で正常マウスレベルにまで完全に回復した。一方、正常マウスの抗体産生能は同量投与でも全く変化しなかった。^{64}Cuを用いた実験より、セルロプラスミンの血中での半減期は1～2日[5 9)]であることが報告されている。また、マウスの全血清量を約1ml と概算すると、正常マウス一匹当りの総

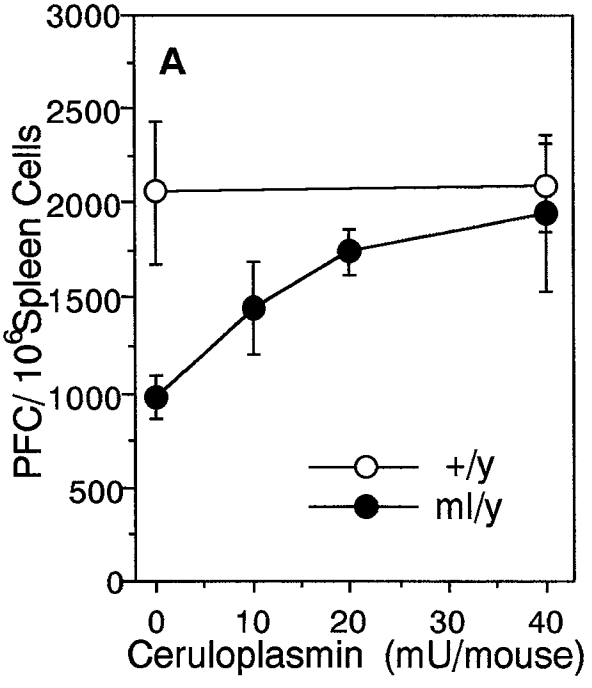

Fig. 12. Effect of ceruloplasmin on antibody response against SRBC in +/y and ml/y mice. Mice were injected i. v. with the total indicated amounts of ceruloplasmin once a day for 4 days and then were injected i. p. with SRBC (5 x 10^8). Four days later, the PFC assay was performed. The data represent the mean ± S.D. (n=4). The background responses of +/y and ml/y mice were under 20 PFC/10^6 spleen cells.

Table 5. Effect of Ceruloplasmin on the Restration of Antibody Production in ml/y Mice

Mouse	Treatment (dose; at)	PFC/10^6 spleen cells
+/y	PBS(-)	2303 ± 109
ml/y	PBS(-)	1158 ± 359
ml/y	Cp (5 mU x 4 ; days -3, -2, -1, 0)	1744 ± 119
ml/y	Cp (20 mU x 1 ; day -3)	2517 ± 209
ml/y	Cp (20 mU x 1 ; day 0)	1242 ± 374

The mice were immunized with SRBC on day 0, and 4 days later the number of PFC were determined.
Data represent the mean ± S.D. for the three experiments.

セルロプラスミン活性は約20mUである。これらのことから、セルロプラスミンは生理的投与量および投与間隔でmlマウスの抗体産生能を上昇させた。また抗原感作3日前にセルロプラスミン20mUの単回投与ではmlマウスの抗体産生細胞数は正常マウスレベルまで増加するが、抗原との同時投与ではその作用は認められなかった（Table 5）。即ち、mlマウスの抗体産生能を回復させるためには抗原感作までにセルロプラスミンが必要であることが明らかとなった。

熱処理したセルロプラスミンおよび銅の抗体産生能に対する影響を調べた結果をFig.13に示す。40mUのセルロプラスミン投与により抗体産生細胞数は有意に増加したが熱処理したセルロプラスミンでは増加しなかった。セルロプラスミン一分子中にはCu^{2+}が4分子とCu^{+}が3分子[60-62]含まれている。そこでCu^{2+}投与による影響を検討したがmlマウスの抗体産生細胞数は全く増加しなかった。逆に多量のCu^{2+}は両マウスの抗体産生細胞数を減少させた。また、データーには示していないがCu^{+}でも同様の結果であった。なお、40μgの銅投与でも脾臓の形態学的異常や脾細胞の生存率低下は認められなかった。以上の結果から、mlマウスへのセルロプラスミン投与による抗体産生細胞数の増加はセルロプラスミンそのものの作用であり、セルロプラスミンに含まれる銅の作用によるものではないことが明らかとなった。

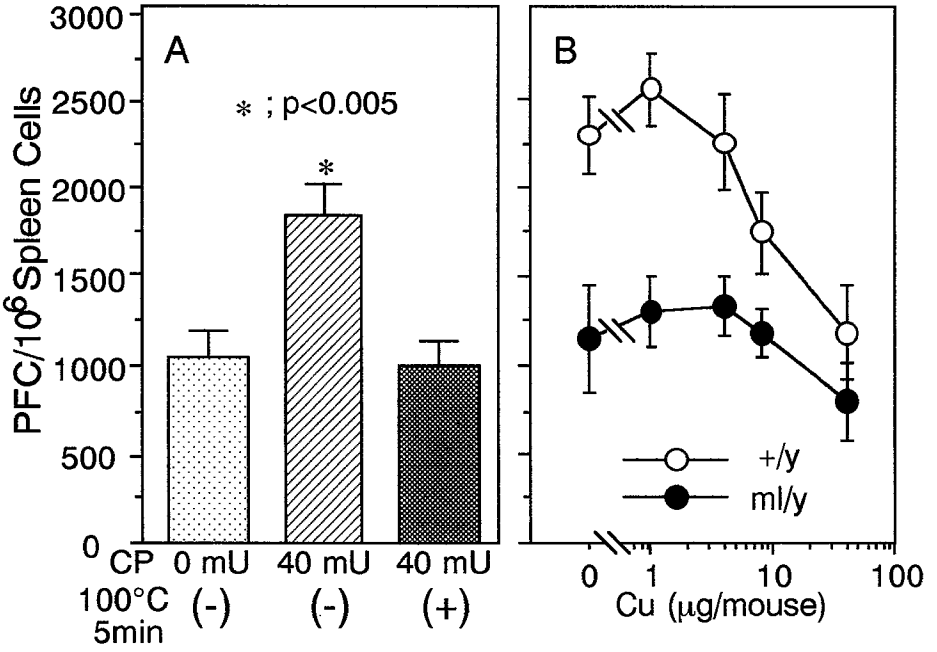

Fig. 13. Effect of denaturated ceruloplasmin (Cp) and copper on antibody responses in mice. A; ml/y mice were injected i.v. with denaturated mouse ceruloplasmin or ceruloplasmin once a day for 4 days and then were injected i.p. with SRBC (5×10^8). B; Mice were injected i.v. with the indicated amounts of copper once a day for 4 days and i.p. with SRBC (5×10^8). Four days later, the PFC assay was performed. The data represent the mean ± S.D. (n=4).
* ; Significantly different from the antibody response of ml/y mouse ($p<0.01$).

第二節　in vitro 抗体産生系におけるセルロプラスミンおよび銅(Cu^{2+})添加の影響

前節においてセルロプラスミンがmlマウスの抗体産生能を生理的投与量で正常マウスレベルにまで回復させることを明らかにした。また、このセルロプラスミンの作用がセルロプラスミンに含まれる銅による作用ではないことを示した。そこでセルロプラスミンによる抗体産生能回復作用が脾細胞に対し直接的か否かを検討した。

実験材料と方法

（1）培養方法

脾細胞(1x10^{7}cells/1.5ml)は35mmシャーレ(Falcon)で培養した。抗原感作はSRBC (1x10^{7}cells/1.5ml)を添加し、4日間培養により行った。培養を行なう間、1日に2～3回振盪した。

（2）培養方法

セルロプラスミンおよび塩化第二銅を脾細胞培養系に添加し、3日間培養した。さらにSRBC(1x10^{7}cells/1.5ml)を添加し4日間培養後、抗体産生細胞数を測定した。

なお、その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

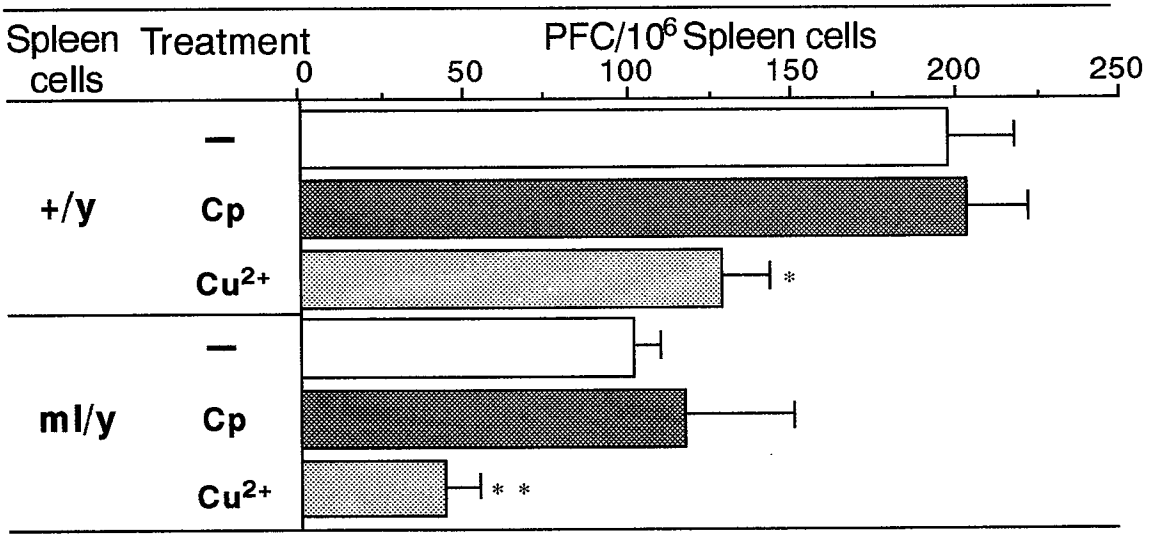

Fig. 14. Effect of ceruloplasmin (Cp) and copper on antibody responses. Spleen cells were cultured with 20 mU/ml of ceruloplasmin or 1 μg/ml of copper for 3 days and SRBC (1 x 10^7) were added. Four days later, the PFC assay was performed. The data represent the mean ± S.D. (n=4). * ; Significantly different from the antibody response of control ($p<0.01$). The background responses of +/y and ml/y mouse spleen cells were under 5 PFC/10^6 spleen cells.

in vitro の脾細胞培養系における抗体産生細胞数の測定結果をFig.14に示す。20mU/mlのセルロプラスミンは正常マウスおよびmlマウスの抗体産生細胞数を変化させなかった。このことは、セルロプラスミンが抗体産生系に直接作用しているのではなく、間接的に作用していることを示唆している。なお、データーには示していないがセルロプラスミン活性はSRBC添加時にも80%以上残存していた。

一方、1μg/mlのCu^{2+}添加では両マウスの抗体産生細胞数が有意に減少し、in vivoを反映した結果となった。なお、データーには示していないが1μg/mlのCu^{2+}添加では細胞の生存率への影響は認められなかった。

第三節　小括

マウスの抗体産生能における銅およびセルロプラスミンの作用を検討した。セルロプラスミンは正常マウスの抗体産生能に対しては全く変化させなかったが、mlマウスに対しては生理的投与量で正常マウスレベルにまで回復させた。この作用はセルロプラスミンとSRBCとの同時投与では認められなかった。さらに銅(Cu^{2+},Cu^{+})や熱処理を行ったセルロプラスミンの投与はmlマウスの抗体産生能を回復させなかった。以上のことは、mlマウスの抗体産生能低下がセルロプラスミン活性の低下に起因した現象であり、さらにセルロプラスミンの抗体産生系への作用は単純な銅の供給に起因したものではないことを示している。

他方、in vitro系においては、セルロプラスミン添加は正常マウスのみならずmlマウスに対して抗体産生能を回復させなかった。このことは、セルロプラスミンが脾細胞に直接作用しているのではないことを示す。また、Cu^{2+}(1μg/ml)添加は抗体産生細胞数を有意に減少させ、この結果はin vivoおよびYamauchiらの報告[63]と一致する。

以上のことより、セルロプラスミンによる抗体産生能回復作用は、セルロプラスミンそのものの作用であり、また脾細胞への直接作用ではないことが明らかとなった。セルロプラスミンの抗体産生系における作用の検討は非常に重要で免疫応答調節機構の解明につながると考える。そこで次章においてセルロプラスミンが引き起こす免疫応答調節系の検討を進めた。

第五章　セルロプラスミンにより調節される抗体産生能回復因子および抗体産生能抑制因子に関する検討

前章までの結果より、生理的濃度のセルロプラスミン投与によりmlマウスの抗体産生能が正常マウスレベルにまで回復することを明らかにした。しかし、この作用はin vitro系では認められないことから脾細胞に対する直接作用ではないと考えられる。このセルロプラスミンがおよぼす免疫調節機構を解明することによりセルロプラスミンによる新しい免疫応答調節機序並びにメンケス病の病態解析につながると考えられる。それではどのような機構によりセルロプラスミンはmlマウスの抗体産生能を回復させるのかが問題である。そこで次のような仮説をたてることが出来る。

1．セルロプラスミンは抗体産生を調節する未知の因子を誘導し、この因子が脾細胞に作用する。
2．この因子が血清中に誘導されるとすれば、セルロプラスミン活性の高い正常マウスの血清中にこの因子は存在するはずである。

この仮説にもとづいて抗体産生系におけるマウス血清の影響を検討した。

第一節　正常マウス血清の抗体産生能におよぼす影響

上述の仮説に基づき、セルロプラスミン活性の高い正常マウス血清の抗体産生におよぼす影響を検討した。

実験材料と方法

（1）脾細胞培養系のタイムスケジュール

脾細胞培養系にマウス血清を添加した後、3日間あるいは図中に示す期間培養した。SRBC($1x10^7$cells/1.5ml)を添加し、さらに4日間培養した後抗体産生細胞数を測定した。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

mlマウスの脾細胞培養系に正常マウス血清を添加した結果をFig.15Aに示す。mlマウスの抗体産生細胞数は正常マウス血清の濃度に依存して上昇し、1%で正常マウスレベルまで上昇した。この正常マウス血清の作用は1%でプラトーになり、mlマウスの抗体産生細胞数は正常マウス以上の値を示すことはなかった。一方、正常マウス脾細胞の培養系に正常マウスの血清を添加しても全く変化は認められなかった。さらに抗原添加までの脾細胞と血清との前培養時間について検討した。正常マウス血清の作用は1日あるいは2日の前培養では充分表れず、3日間の前培養でmlマウスの抗体産生細胞数を正常マウスレベルにまで完全に回復させた。

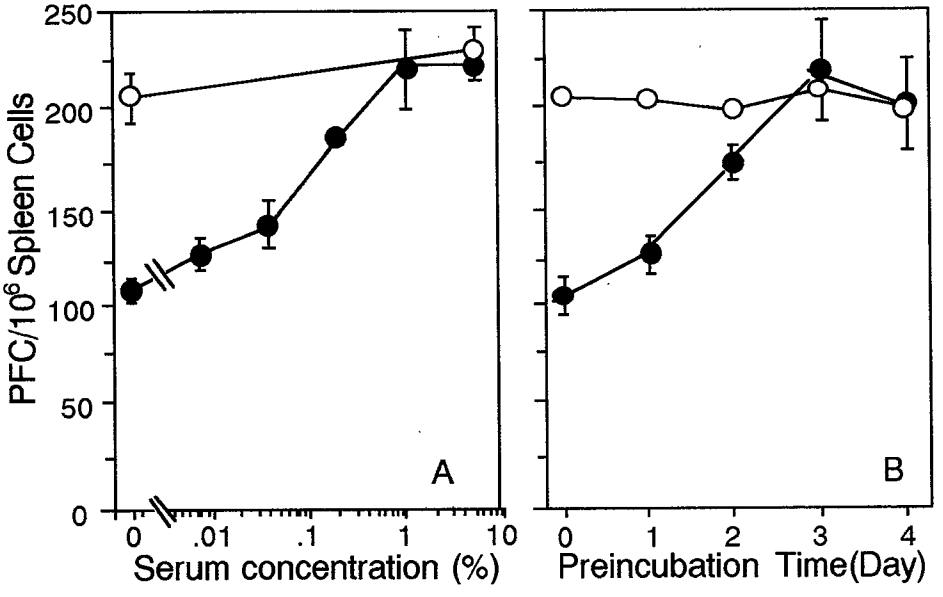

Fig. 15. Effect of +/y mouse serum on antibody responses in ml/y mouse spleen cells. A, Spleen cells were cultured with the indicated concentration of +/y mouse serum for 3 days and then SRBC (1×10^7) were added. B, Spleen cells were cultured with a 1 % concentration of +/y mouse serum for the indicated number of days and then SRBC (1×10^7) were added. Four days later, a PFC assay was performed. The data represent the mean ± S.D. (n=4)
(○); +/y mouse (●); ml/y mouse

以上の結果より正常マウスの血清中には抗体産生能を正常マウスレベルに回復させる因子が存在していることが判明した。さらにこの因子の作用発現には抗原感作の前に細胞との前培養を必要とすることから、細胞の機能を変えることによって回復作用を発現していることが考えられる。以後、正常マウス血清中のこの因子を回復因子と略称することにする。

第二節　mlマウス血清の抗体産生能におよぼす影響

前節において正常マウスの血清中における抗体産生能回復因子の存在を明らかにした。次いでmlマウス血清の抗体産生におよぼす影響について同様に検討した。

実験材料と方法

（1）脾細胞培養系のタイムスケジュール

脾細胞培養系にマウス血清を添加した後、3日間あるいは図中に示す期間培養した。SRBC($1x10^7$cells/1.5ml)を添加し、さらに4日間培養した後抗体産生細胞数を測定した。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

mlマウス血清の抗体産生能におよぼす影響について調べた結果をFig.16A に示した。mlマウスの血清は正常マウスの抗体産生細胞数を減少させた。この作用は用量依存的で1%添加でmlマウスレベルにまで減少した。しかし、この作用は1%でプラトーになり、正常マウスの抗体産生細胞数はmlマウスのそれ以下には減少しなかった。他方、mlマウスの血清はmlマウスの抗体産生能に影響しなかった。以後、mlマウス血清中に存在するこの因子を抑制因子と略称することにする。さらにmlマウス血清添加による正常マウスの抗体産生能に対する経時変

化をFig. 16B に示す。mlマウス血清の作用発現には1日では不充分で、2日以上作用させることで正常マウスの抗体産生細胞数をmlマウスレベルにまで抑制した。従って、mlマウス血清が正常マウスの抗体産生能をmlマウスレベルにまで抑制するためには少なくとも2日以上必要であることが明らかとなった。以上の結果よりmlマウス血清中には正常マウスの抗体産生を抑制する因子が存在し、さらにその作用発現は細胞の機能を変えることによって引き起こされていることが明らかとなった。

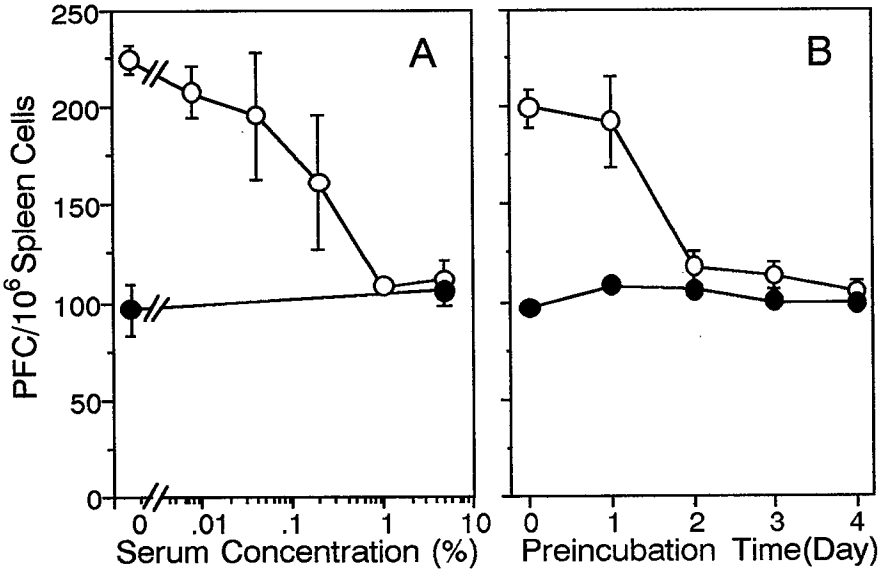

Fig. 16. Effect of ml/y mouse serum on antibody responses in +l/y mouse spleen cells. A, Spleen cells were cultured with the indicated concentration of ml/y mouse serum for 3 days and then SRBC (1 x 10^7) were added. B, Spleen cells were cultured with a 1 % concentration of ml/y mouse serum for the indicated number of days and then SRBC (1 x 10^7) were added. Four days later, a PFC assay was performed. The data represent the mean ± S.D. (n=4) (○); +/y mouse (●); ml/y mouse

第三節　セルロプラスミンを投与したmlマウス血清の抗体産生能におよぼす影響

これまでの結果よりmlマウスおよび正常マウスの血清中に抗体産生系を調節する因子が存在していることを明らかにした。これらの因子を研究するに当り、セルロプラスミン投与によるmlマウスの抗体産生能の回復とこれら因子との関係を明らかにする必要がある。もしセルロプラスミンがこれら因子を調節しているならばmlマウスへのセルロプラスミン投与によりmlマウス血清の抗体産生抑制作用が変化すると予想される。この点について検討した。

実験材料と方法

（1）mlマウスへのセルロプラスミン投与方法

mlマウスにセルロプラスミン(10mU/mouse)を4日間連続的に尾静脈より投与し、翌日マウスから血清を採取した。

（2）脾細胞培養系のタイムスケジュール

脾細胞培養系にマウス血清を添加した後、3日間培養した。SRBC ($1x10^7$cells/1.5ml)を添加し、さらに4日間培養した後抗体産生細胞数を測定した。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

セルロプラスミンを投与したmlマウスの血清は、1%添加でmlマウスの抗体産生細胞数を正常マウスレベルにまで回復させた(Fig. 17)。さらにこの血清は正常マウスの抗体産生細胞数は変化させず、mlマウスの抗体産生細胞数だけを回復させた。すなわち、セルロプラスミンを投与したmlマウスの血清は回復作用を持つようになり、逆に抑制作用が消失した。なお、mlマウスの脾細胞培養系にセルロプラスミンとmlマウス血清を同時に添加しても、mlマウスの抗体産生能は全く回復しないことを確認している。以上のことよりセルロプラスミンがmlマウス血清中に存在する抑制因子の直接的な阻害因子ではないことを示している。

以上の結果よりセルロプラスミンは少なくとも回復因子および抑制因子を調節し免疫応答を調節することが示唆された。

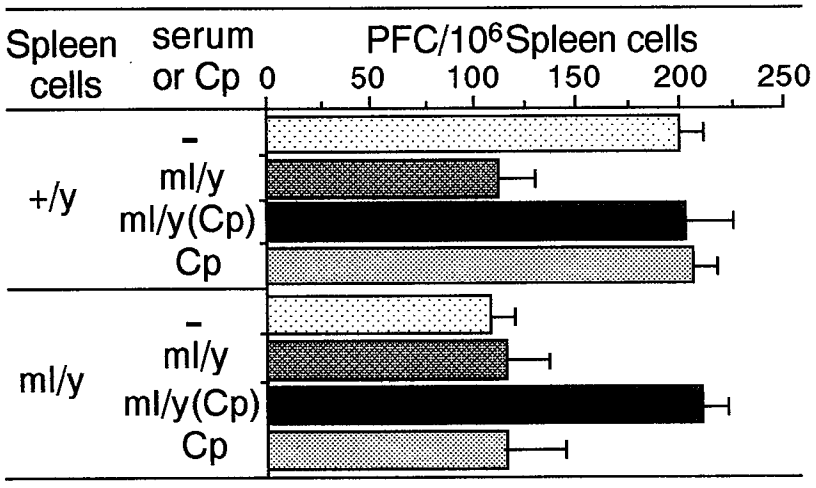

Fig. 17. Effect of sera from a ceruloplasmin-injected ml/y mouse on antibody responses. A total 40 mU of mouse ceruloplasmin was injected into a ml/y mouse once a day for 4 days. 24 hr after the last injection, serum was taken from the ml/y mouse. Spleen cells were cultured with the serum (final concentration of 1%) or ceruloplasmin (20mU/ml) for 3 days and then SRBC (1×10^7) were added. Four days later, a PFC assay was performed. The data represent the mean ± S.D. (n=4)
ml/y(Cp); ceruloplasmin-injected ml/y mouse serum
Cp; ceruloplasmin

第四節　各種マウス血清の抗体産生能におよぼす影響

抗体産生能回復因子および抗体産生能抑制因子はこれまで示してきたようにmlマウスの免疫応答を調べることにより見いだされた。しかし、両因子の役割および調節系を知る上で、両因子はmlマウスに特異的な作用か、それとも広く免疫応答に関与しているのかを検討する必要がある。そこでこれら抗体産生能調節因子のマウス特異性(MHC拘束性)について検討した。

実験材料と方法

（1）実験動物

実験動物としてBalb/cおよびC57BL/6Nマウス(日本ＳＬＣ)を6～10週令にて実験に供した。

（2）脾細胞培養系のタイムスケジュール

脾細胞培養系にマウス血清を添加した後、3日間培養した。ＳＲＢＣ(1x10^7cells/1.5ml)を添加し、さらに4日間培養した後抗体産生細胞数を測定した。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

Balb/cおよびC57BL/6マウス血清は1％添加でmlマウス脾細胞の抗体産生細胞数を正常マウスレベルにまで回復させた(Fig. 18)。他方、mlマウス血清はBalb/cマウスおよびC57BL/6マウス脾細胞の抗体産生細胞数を有意に減少させた。従って、抗体産生能抑制因子の作用はmlマウスのC3Hf系マウスにのみ作用するのではなく、他の系統のマウス脾細胞にも同様に抑制的に作用する。またmlマウス抗体産生能を回復させる維持因子は他系のマウス血清にも存在し、抗体産生過程において広く一般的に関与していると考えられる。以上の結果より、これら抗体産生能調節因子は抗体産生過程においてMHC拘束性を示さないことが明らかとなった。

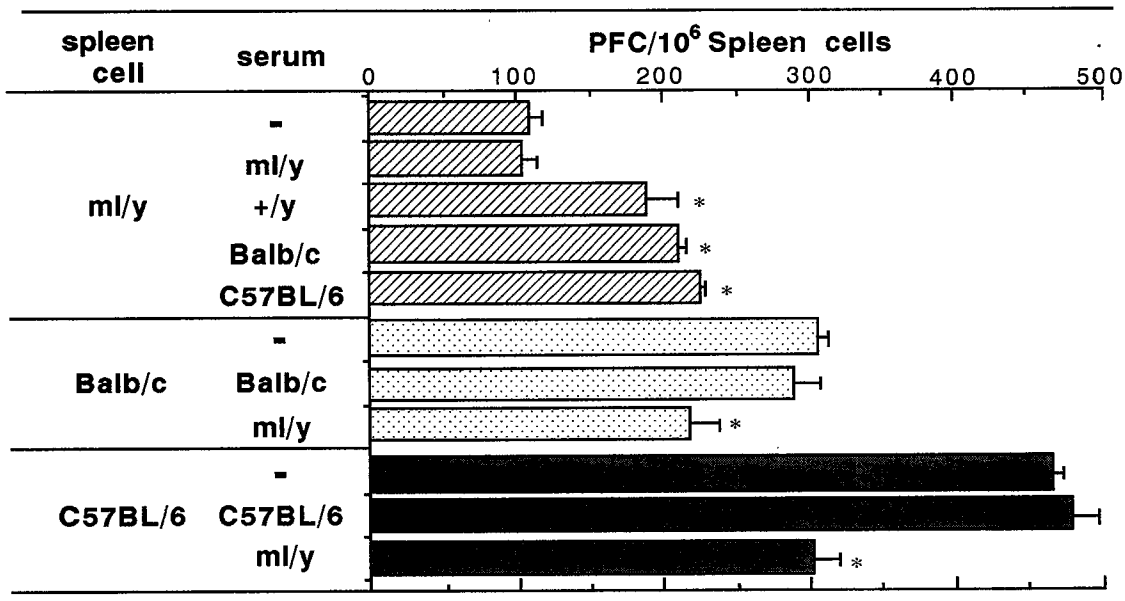

Fig. 18. Effect of various mouse sera on antibody responses in vitro.
Spleen cells were cultured with a 1 % concentration of serum for 3 days and then SRBC (1×10^7) were added. Four days later, a PFC assay was performed. The data represent the mean ± S.D. (n=4)
* ; Significantly different from the antibody response of the control ($p<0.01$).

第五節　抗体産生能回復因子および抗体産生能抑制因子の化学的性質

両因子のセルロプラスミンによる調節系および作用機構を解明するためには両因子の精製が今後必要となる。さらにこれら両因子が非常に低濃度で作用発現することにより既知のサイトカインであることが予想されるが、これらのことを検討するためにはまず化学的性質に関する情報が必要である。そこで種々の物理化学的性質について予備的検討を行なった。

実験材料と方法

(1)血清の分子量カットによる分取

血清は分画分子量50,000および10,000の限外濾過器(セントリカット、クラボウ)を用いて分画した。

(２)血清の熱処理

血清は56℃,30分あるいは100℃、5分の処理を行い、実験に供した。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

抗体産生能回復因子および抗体産生能抑制因子の化学的性質についてTable 6に示す。抗体産生能回復因子は分子量は約10,000、一方、抗体産生能抑制因子は分子量10,000～50,000であった。また、抗体産生能回復因子および抗体産生能抑制因子は共に56℃,30分および100℃,5分の熱処理に対して不安定であった。しかし、-20℃での保存においては少なくとも3カ月間安定であった。

Table 6. 抗体産生系における回復因子と抑制因子の化学的性質

因子	回復因子	抑制因子
分子量	10,000	10,000～50,000
熱安定性 56°C, 30分	不安定	不安定
100°C, 5分	不安定	不安定
-20°Cでの保存	安定	安定

第六節　血清の投与による抗体産生能への影響

これまでの検討により正常マウス血清中およびmlマウス血清中には抗体産生系をそれぞれ正および負に調節する因子が存在していることを明らかとした。さらに両因子の分子量はともに50,000以下であるため限外濾過器を用いることによりセルロプラスミンの影響を受けることなく両因子の作用を調べることが可能である。そこで本節では血清中に見いだされたこれらの因子をマウスに投与しin vivo系における作用について検討した。

実験材料と方法

(1)血清の調製

マウス血清は分子量50,000の限外濾過器(クラボウ)を用い、分子量50,000以下の分画を使用した。なお、この分子量50,000以下の分画にはセルロプラスミン活性がないことを別途確認した。

(2)マウスへの投与

各マウスに血清(分子量50,000以下の分画)を200μl/mouse/dayで4日間連続的に尾静脈より投与した。血清の最終投与日に抗原であるSRBC($0.5x10^9$cells/250μl)を腹腔内投与し、さらに4日後抗体産生細胞数を測定した。

その他の実験操作については、前節までに記載の操作法に従った。

実験結果および考察

mlマウスにセルロプラスミンを除去した正常マウス血清を投与することにより抗体産生能は正常マウスレベルにまで回復した(Table 7)。一方、mlマウスの血

Table 7. Effect of +/y and ml/y mouse sera on antibody responses in vivo.

Mouse	Serum		
	—	+/y	ml/y
+/y	2057 ± 374	N.D.	1562 ± 264 *
ml/y	939 ± 153 *	2206 ± 116	N.D.

Mice were injected i. v. with ceruloplasmin-free sera (200μl/mouse) for 4 days and then were injected i. p. with SRBC. Four days later, the PFC assay was performed. The data represent the mean ± S.D. (n=4). N.D. ; Not done
* ; Significantly different from the antibody response of the control ($p<0.01$).

清を投与することにより正常マウスの抗体産生細胞数は抑制された。この抑制はmlマウスレベルにまで達していなかったが、有意な抑制が認められた。以上の結果は、抗体産生能回復因子および抗体産生能抑制因子はin vivo系においても抗体産生を調節する因子として作用することを示している。従って、両因子は抗体産生能を調節する重要な因子であることが示唆され、今後この因子の作用機序、調節機構およびセルロプラスミンとの関連性を解明することにより免疫応答調節の機構およびメンケス病の病態解析につながると考えられる。

第七節　小括

セルロプラスミンはmlマウスの抗体産生能を正常マウスレベルにまで回復させる作用を有しているが、この作用は脾細胞に対する直接作用でない。従って、このセルロプラスミンによる抗体産生能の回復機構はセルロプラスミンによって調節されている別の因子が存在し、その因子が脾細胞に作用しているという仮説をたてた。この仮説にもとづいて抗体産生系におけるマウス血清の作用を調べた。その結果、正常マウス血清中にはmlマウスの抗体産生能を正常マウスレベルにまで回復させる因子が存在していることが判明した。一方、mlマウスの血清中には正常マウスの抗体産生能をmlマウスレベルにまで抑制する因子の存在が認められ、抗体産生能抑制因子と称することにした。抗体産生能抑制因子はmlマウスには影響をおよぼさず正常マウスに対してその抑制作用を示した。両因子の抗体産生能に対する経時的変化においては両因子とも抗原感作の3日前までに細胞との前培養を必要とした。このことは両因子が細胞の機能を変え抗体産生能を調節していることをうかがわせる。現在抗体産生系において促進的に作用する因子としてはIL-1,IL-2,IL-5およびIL-6等が知られている。しかしこれらサイトカインはその作用発現に細胞との前培養を必要としないことから今回の因子は既知のサイトカインではないと考えられる。他方、免疫応答を抑制的に調節する因子としてTGF-βが知られているが、両マウス血清中のTGF-β活性は検出感度以下であり(データーには示していない)、抑制因子がTGF-βであるとも考えにくい。

さらにセルロプラスミンとこれら因子との関係を明らかにすべくセルロプラスミンを投与したmlマウスの血清について検討した。その結果、セルロプラスミンを投与したmlマウスの血清にはmlマウスの抗体産生を回復させる作用が表れ、逆に正常マウスの抗体産生を抑制させる作用が消失していた。従ってこれら両因子はセルロプラスミンによって調節されていることが示された。両因子の特徴としてはMHC拘束性を示さず、またin vivoにおいても両因子の作用は認められた。限外濾過の実験より分子量は抗体産生能回復因子が約10,000、抗体産生能抑制因子が10,000～50,000であった。また、両因子は共に56℃、30分および100℃、5分の熱処理に対して不安定であった。これら両因子は作用発現および種々の化学的性質より既知のサイトカインではなく新規の因子であることが強く示唆された。

総　括

1．mlマウスでの免疫能低下

メンケス病モデル動物であり、銅分布異常を第一の特徴とするmlマウスは免疫担当臓器(脾臓と胸腺)の萎縮を示した。また銅欠乏食で飼育したマウスにおいて種々の免疫応答低下が報告されている。これらのことはmlマウスの免疫不全を示唆し、さらには免疫応答に関する新しい病態を解析することが免疫応答調節の機構解明にもつながると考えた。その基礎的研究として抗体産生能を始めとする種々の免疫応答を検討し、その病態解析を試みた。

まずmlマウスのConAおよびLPSに対する応答性は正常マウスと同程度であった。従って、抗原非特異的な刺激に対して個々の細胞は充分応答する能力を有することが示唆された。しかし、MLRによるリンパ球の応答性についてはmlマウスのアロ抗原性は正常マウスと同程度であったがアロ抗原に対する応答性が低下していた。このことはアロ抗原に対して反応するＴ細胞の機能低下を示唆する。抗体産生能については、mlマウスはＴ細胞依存性抗原であるSRBCに対して機能低下を示し、Ｔ細胞非依存性抗原のDNP-Ficollに対しては正常マウスと同程度であった。SRBCに対する免疫応答は機能を異にするＢ細胞、Ｔ細胞および抗原提示細胞と呼ばれるマクロファージなどの協同作用により引き起こされる。この応答系はSRBCに限らず外界から細菌、ウィルス、真菌あるいは異種蛋白質等の異物(抗原)により誘導され、生体内の恒常性が保たれる。このＴ細胞依存的な抗体産生機能は生体の恒常性維持に重要であり、どの細胞の機能が低下しても抗体産生能は低下する。そこで、mlマウスのＴ細胞依存性抗原に対する抗体抗体産生能低下についてその原因細胞について検索した。Ｂ細胞の機能についてはDNP-Ficollに対する抗体産生能はＢ細胞に対する直接作用であることが報告されており[31]、抗体産生系におけるＢ細胞に機能異常はないと考えられる。さらにＢ細胞を直接刺激し、抗原非特異的に抗体産生を促進させるLPS刺激に対しmlマウスのIgM産生量は増加していた。また正常およびmlマウス脾細胞のＴ細胞およびＢ細胞分画をそれぞれ交換し、SRBCに対する抗体産生能の変化を調べた結果、mlマウスのＴ細胞分画を正常マウスのものと交換すると、抗体産生能は一部回復した。しかしmlマウスのＢ細胞分画を正常マウスのものと交換しても、抗体産生

能は回復しなかった。また、両マウス脾細胞のリンパ球亜集団についてセルソーターを用いて解析した結果、各細胞のマーカー抗原量には差は認められなかったが、各細胞の比率を比較するとmlマウスではＢ細胞の占める割合が多く、逆にＴ細胞の割合は減少していた。この減少は特に免疫系に促進的に働くヘルパーＴ細胞の減少に起因することが判明した。従って、mlマウスの抗体産生能低下の原因は少なくともヘルパーＴ細胞の減少を含むＴ細胞の機能低下にもとづくことを明らかにした。ＴおよびＢ細胞の交換実験よりＴ細胞以外にも機能低下をきたす細胞が存在していることが推測されたが、この点については今後の検討が必要となろう。ただ、Ｔ細胞非依存的な抗体産生能が低下していないこと、およびＢ細胞を非特異的に活性化するLPSに対する免疫グロブリンの産生誘導能はmlマウスの方が亢進していることから、Ｂ細胞の機能異常は考えられず、おそらく、抗原提示細胞であるマクロファージ、樹枝状細胞、等が原因細胞であろうと予想される。

2．セルロプラスミン活性と抗体産生

メンケス病患者は銅代謝異常にともないセルロプラスミン活性の低下が報告されている[5、6]。今回、mlマウスでも血清中の銅濃度とセルロプラスミン活性が低下していることを確認し、両者に高い相関性があることを認めた。さらに今回、mlマウスで抗体産生能が低下していることを明らかにし、この抗体産生能とセルロプラスミンの間に正の相関があることを認めた。そこでmlマウスの免疫応答におけるセルロプラスミンや銅の作用を検討する必要があると考え、マウスのセルロプラスミンの精製を試みた。セルロプラスミンはマウス血清より4段階の操作で約260倍に精製し、分子量は135,000であった。この精製したセルロプラスミンをmlマウスに投与したところ用量依存的に抗体産生能は上昇したが、正常マウスへの投与では全く影響しなかった。しかし、銅および熱処理したセルロプラスミン投与はmlマウスの抗体産生能に影響をおよぼさなかった。このことはmlマウスの抗体産生能回復作用がセルロプラスミンそのものを必要とし、単にセルロプラスミンに含まれる銅の供給によるものではないことを示している。

一方、in vitro系においてはセルロプラスミンによる回復作用は認められなかった。またセルロプラスミン投与による回復作用発現は少なくとも抗原感作の3

日前に投与する必要があった。これらのことはセルロプラスミンが何等かの二次的因子を介して間接的に回復作用を現すとの考えを支持する。

3．セルロプラスミンによる抗体産生調節機構

セルロプラスミンの抗体産生系への作用は脾細胞への直接作用ではないことからセルロプラスミンの間接的な作用による抗体産生調節系を想定した。まずセルロプラスミンによる抗体産生能の回復機構はセルロプラスミンによって調節されている別な因子が存在し、その因子が脾細胞に作用しているという仮説をたてた。この仮説にもとづいて抗体産生系におけるマウス血清の作用を調べた。まずセルロプラスミン活性が常に一定レベル存在する正常マウス血清が抗体産生系におよぼす影響について検討した。正常マウス血清はmlマウスの抗体産生能を用量依存的に上昇させ、非常に低濃度で正常マウスレベルにまで回復させた。他方正常マウスの抗体産生能には影響しなかった。

一方、mlマウス血清中には抗体産生能を抑制する因子(抗体産生能抑制因子)が存在していることを明らかにした。両因子とも作用発現には抗原添加前に細胞との前培養を必要としたことから、両因子は細胞の機能を変えている可能性が考えられた。セルロプラスミンを投与したmlマウスの血清の抗体産生能におよぼす影響を検討すると、抗体産生能回復作用が現れ、さらに抑制因子の作用は消失した。このことはセルロプラスミンが回復因子および抑制因子を調節していることを示している。

両因子について予備的検討を行なったところ、分子量は抗体産生能回復因子が約10,000、抗体産生能抑制因子が10,000～50,000であった。また、両因子は共に56℃,30分および100℃,5分の熱処理に対して不安定であった。これら両因子は作用発現および種々の化学的性質より既知のサイトカインではなく新規の因子であることが強く示唆された。現在抗体産生系において促進的に作用する因子としてはIL-1、IL-2、IL-5およびIL-6等が知られているが、これらサイトカインはその作用発現に細胞との前培養を必要としない。他方、免疫応答を抑制的に調節する因子としてTGF-βが知られているが、両マウス血清中のTGF-β活性は検出感度以下であった(データーには示していない)ことより、TGF-βが抑制因子であるとは考えられない。現在のサイトカインの定義の一つに、"正常血清中には認め

られず、微量で作用発現するもの"と言われているが、両因子は定常的に存在している。従って、この点に関しては定義から外れるが、微量で作用発現し他の因子により調節されていることから、新しいタイプのサイトカインとして分類されると考えている。さらに両因子は各種マウスに共通の作用であることが判明し、広く普遍的に免疫応答に関与していることが示された。

以上、mlマウスの免疫応答、特に抗体産生能について検討した。そしてセルロプラスミン活性の低下がmlマウスの抗体産生能低下に関与していることを示した。今回、mlマウスの免疫応答を検討する上でセルロプラスミンによる免疫応答調節の手がかりを得ることができ、セルロプラスミンにより調節される因子が免疫応答過程で非常に重要な役割を演じている可能性を新しく見いだした。

結　論

Menkes病モデル動物であるmlマウスの免疫能に関する研究の結果、以下の結論を得た。

1．　mlマウスはT細胞の機能低下に起因した抗原特異的抗体産生能が低下している。
2．　mlマウスでの抗体産生能低下は銅投与では回復しないが、セルロプラスミン投与で正常マウスレベルに回復する。
3．　セルロプラスミン投与によるmlマウスの抗体産生能の回復は脾細胞に対する直接作用ではなく、血中に存在する因子を介した作用である。
4．　正常マウス血清中にはmlマウスの抗体産生を回復させる因子が、mlマウス血清中には正常マウスの抗体産生を抑制させる因子が存在する。
5．　これら両因子はセルロプラスミンにより調節されている。

以上、mlマウスの新たなる病態を解析し、それらを介して新しく免疫調節因子としてのセルロプラスミンの免疫学的意義を明かにした。さらに、このセルロプラスミンにより調節される新しい免疫応答調節因子の存在を明らかにした。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、終始暖かい御指導、御鞭撻を賜りました、神戸学院大学薬学部教授、濱 尭夫先生、三宅正治先生に深く感謝致します。

本論文の発表に際し、種々御指導と御鞭撻を御図り下さいました、大阪大学薬学部教授、真弓忠範先生に心から感謝致します。

また、本研究の遂行は次の多くの方々の御協力のもとになしえたものである。mlマウスの御譲渡ならびに銅含量の定量に御協力下さいました大阪大学薬学部教授、田中慶一先生。抗体産生細胞数測定に関して御指導下さいました大阪大学薬学部助手、伊藤徳夫先生。大学院生として実験に際し種々御協力いただきました深田有理子、西田圭吾の両氏、ならびに川野博子講師、河合裕一助手、濱田美知子助手を始めとする神戸学院大学薬学部生理化学講座の諸氏、以上の方々に深く感謝致します。

参考文献

1) Menkes, J. H., Alter, M., Steigleder, G. K., Weakley, D. R. and Sung, J. H., Prediatrics, 29, 764 (1962)
2) 西村正彦、疾患モデル動物ハンドブック
3) 青木継稔、先天性代謝病.免疫病ハンドブック　eds.by　山村雄一、萩田善一、大浦敏明
4) Danks, D. M., Campbell, P.E., Stevens, B. J., Mayne, V. and Cartwright, E., Prediatrics, 50, 188 (1972)
5) Danks, D. M., Stevens, B. J., Campbell, P. E., Gillespie, J. M., Walker-Smith, J., Bromfield, J. and Turner, B., Lancet, 1, 1103 (1972)
6) Danks, D. M., Stevens, B. J., Campbell, P. E., Gillespie, J. M., Walker-Smith, J., Bromfield, J. and Turner, B., Lancet, 1, 1100 (1972)
7) Danks, D. M., Inorg. Perspect. Biol. Med., 1, 73 (1977)
8) Hunt, D. M. and Johnson, D. R., J. Neurochem., 19, 2811 (1972)
9) Hunt, D. M., Nature, 248, 852 (1974)
10) Hunt, D. M., Comp. Biochem. Biophysiol., 57, 79 (1977)
11) Rowe, D. M., McGoodwin, E. B., Martin, G. R., Sussman, M. D., Grahn, D., Faris, B. and Franzblau, C., J. Exp. Medicine, 139, 180 (1974)
12) Rowe, D. M., McGoodwin, E. B., Martin, G. R. and Grahn, D., J. Biol. Chem., 252, 939 (1977)
13) Royce, P. M., Camakaris, J., Mann, L. R. and Danks, D. M., Biochem. J., 202, 369 (1982)
14) Phillips, M., Camakaris, J. and Danks, D. M., Biochem. J., 238, 177 (1986)
15) Wenk, G. and Suzuki, K., J. Neurochem., 41, 1648 (1983)
16) 西村正彦, 実験動物の遺伝的コントロール(1983)
17) Yamano, T., Shimada, M., Kawasaki, H., Onaga, A. and Nishimura, M., Acta. Neuropathol. (Berl), 72, 256 (1987)
18) Yamano, T., Shimada, M., Onaga, A., Kawasaki, H., Iwane, S. and Nishimura, M., Acta. Neuropathol. (Berl), 76, 574 (1988)

19) Onaga, A., Kawasaki, H., Yamano, T., Shimada, M. and Nishimura, M., Brain Dev. (Tokyo), 9, 265 (1987)

20) Kawasaki, H., Shimada, M., Yamano, T. and Nishimura, M., Acta. Neuropathol. (Berl), 72, 349 (1987)

21) Tanaka, K., Kobayashi, K., Fujita, Y., Fukuhara, C., Onosaka, S. and Min, K., Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol., 69, 217 (1990)

22) Biggar, W. D. and Birth Defects, 11, 271(1975)

23) Newberne, P. M., Hunt, C. E. and Young, V. R., Br. J. Exp. Pathol., 49, 448 (1968)

24) Prohaska, J. R., Downing, S. W. and Lukasewycz, O. A., J. Nutr., 113, 1583 (1983)

25) Prohaska, J. R. and Lukasewycz, O. A., J. Nutr., 119, 922 (1989)

26) Lukasewycz, O. A. and Prohaska, J. R., Science, 213, 559 (1981)

27) Lukasewycz, O. A. and Prohaska, J. R., J. Natl. Cancer Inst., 69, 489 (1982)

28) Lukasewycz, O. A. and Prohaska, J. R., Nutr. Res., 3, 335 (1983)

29) Lukasewycz, O. A., Prohaska, J. R., Meyer, S. G., Schmidtke, J. R., Hatfield, S. M. and Marder, P., Infection and Immunity, 48, 644 (1985)

30) Lukasewycz, O. A., Kolquist, K. L. and Prohaska, J. R., Nutr. Res., 7, 43 (1987)

31) Parkhouse, R. M. E., Janossy, G. and Sreaves, M. F., Nature New Biol., 235, 21 (1972)

32) Blakley, B. R. and Archer, D.L., Toxicol. Appl. Pharmacol., 62, 183 (1982)

33) Parker, J. W., Steiner, J., Coffin, A., Lukas, R., Burr, K. and Brillianetine, L., Experientia, 25, 187 (1969)

34) Stobo, J. D., Rosenthal, A. S. and Paul, W. E., J. Immunol., 108, 1 (1972)

35) Boivin, A. and Mesrobeani, L., Comp. Rend. Soc. Biol., 113, 490 (1933)

36) Webster, M. R., Sagin, J. F., Landy, M., Johnson, A., J. Immunol., 74, 455 (1955)

37) Peck, A. B. and Bach, F. H., J. Immunol. Methods, 3, 147 (1973)

38) Inman, J. K., J. Immunol., 114, 704 (1975)

39) Cunningham, A. J. and Szenberg, A., Immunology, 14, 599 (1968)

40) Boswell, H. S., Sharrow, S. O. and Singer, A., J. Immunol., 124, 989 (1980)
41) 今井康之,新生化学実験講座12　分子免疫学1
42) Julius, M. H., Simpson, E. and Herzenberg, L. A., Eur. J. Immunol., 3, 645 (1973)
43) Lehmann, H. P., Schosinsky, K. H. and Beeler, M. F., Clin. Chem., 20, 1564 (1974)
44) Laemmli, U. K., Nature, 227, 680 (1970)
45) Bradford, M., Anal. Biochem., 72, 248 (1976)
46) Jamieson, G. A., J. Biol. Chem., 265, 2019 (1965)
47) Deutsch, H. F., Kasper, C. B., Walsh, D. A., Arch. Biochem. Biophys., 99, 132 (1962)
48) 福山和美、船越哲、須山忠和，日本輸血学会雑誌，22, 68 (1976)
49) Ryden, L., Eur. J. Biochem., 26, 380 (1972)
50) McKee, D. J., Frieden, E., Biochemistry, 10, 3880 (1971)
51) Morell, A. G., van Den Hamer, C. J. A., Schinberg, I. H., J. Biol. Chem., 244, 3494 (1969)
52) Curzon, G. and Vallet, L., Biochem. J., 74, 279 (1960)
53) Osaki, S., Johnson, D. A. and Frieden, E., J. Biol. Chem., 241, 2746 (1966)
54) Shokeir, M. H. and Shreffler, D. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 62, 867 (1969)
55) Marceau, N., Aspin, N. and Sass-Kortsak, A., Can. Fed. Biol. Soc. Abstr., 13, 127 (1970)
56) Hsieh, H. S. and Freiden, E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 67, 1326 (1975)
57) Holzman, N. A., Elliot, D. A. and Heller, R. H., New Engl. J. Med., 275, 347 (1966)
58) Evans, G. W., Cornatzer, N. F. and Cornatzer, W. E., Am. J. Physiol., 218, 613 (1970)
59) Mcardle, H. J., Mercer, J. F. B., Sargeson, A. M. and Danks, D. M., J. Nutr., 120, 1370 (1990)

60) Kasper, C.B. and Deutsch, H.F., J. Biol. Chem., 238, 2325 (1963)
61) Magdoff-Fairchild, B., Lovell, F. M. and Low, B. W., J. Biol. Chem., 244, 3497 (1969)
62) Deinum, J. and Vanngard, T., Biochim. Biophys. Acta., 310, 321 (1973)
63) Yamauchi, T. and Yamamoto, I., Japan. J. Pharmacol., 54, 455 (1990)
64) Bannister, J. V., Bannister, W. H., Hill, H. A. O., Mahood, J. F., Willson, R. L. and Wolfenden, B. S., FEBS Lett., 118, 127 (1980)