

学位論文題名

Human Serum Mannose Binding Protein(MBP):  
Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent  
Assay(ELISA) and Determination of Levels in Serum  
from 1085 Normal Japanese and in Some Body Fluids.

(ヒト血清マンノース結合蛋白 (MBP) : 酵素抗体法 (ELISA)

の開発と日本人正常血清1085例ならびに他の体液の測定)

学位論文内容の要旨

I 緒言

マンノース結合蛋白 (MBP) は、マンノース、N-アセチルグルコサミンに特異的に結合するC型レクチンである。ヒトの MBP は 32kDa のホモオリゴマーの 9-18 量体で、分子形態は補体成分 C1q と構造が類似している。補体の古典経路を活性化したり、それ自身がオプソニンとして働き、また C3b を介してオプソニン作用を発揮し異物排除に働く。近年、感染症を反復する小児でオプソニン不全があるといわれ、その小児の血清 MBP 値が低いことが示された。この MBP 低値は遺伝子変異に基づくもので変異遺伝子を homo あるいは hetero に持つものは正常値よりも低値を示すため、MBP 低値に関しては常染色体優性遺伝とされている。MBP は生体防御において重要な役割を担うことが示されているが、その作用機序や生理的役割についてはまだ不明な点が多い。我々はヒト MBP を精製し、抗ヒト MBP 抗体を作製して ELISA 法を確立し、各種検体の MBP 値を測定した。

II 方法

1. ヒト血清からの MBP 精製

D-mannose を Sepharose 6B に化学的に結合し、mannose-affinity column を作製した。Ca イオン存在下で血清を column に通し、十分洗浄後、EDTA 加緩衝液で結合蛋白を溶出した。溶出液に再び Ca イオンを加え、生じた沈澱 (主に serum amyloid P component [SAP] からなる) を除去後、上清を次いで無処理の Sepharose-6B column に通し、洗浄後、mannose 加緩衝液で蛋白を溶出した。このレベルでの精製では  $\alpha_2$ -マクログロブリンが混在するため、さらに溶出蛋白を Fast protein liquid chromatography system (FPLC) で Superose 6 カラムおよび Mono Q カラムを用いて精製した。精製した蛋白は還元剤下の SDS-PAGE 上、32kD の単一バンドを示した。

2. 抗 MBP 抗血清の作製

精製 MBP を Freund complete adjuvant と共にウサギの膝蓋窩リンパ節に直接免疫し、polyclonal 抗体を作製した。この抗体はそのままでは血清の  $\alpha_2$ -マクログロブリンとも反応するため、正常ヒト血清で吸収し、MBP 特異

抗血清とした。Monoclonal抗体は精製MBPをmouseに免疫し作製した。

### 3. 酵素免疫測定法(ELISA)

ELISAはポリクローナルの抗MBP抗体をマイクロプレートに固定化し、これにサンプルを添加、ついで固相化抗体に結合したMBPをビオチン化したモノクローナルのMBP抗体およびアビジン化ペルオキダーゼで検出するサンドイッチ法により行った。スタンダードは精製MBPを用いた。

### 4. 対象

各種体液：尿12、髄液19、腹水34、胸水12例で、腹水と胸水はほぼ全例が癌性である。

健常者血清：3歳から100歳までの健康診断で得られた日本人健常人血清、計1085例を用いた。

## III 結果

MBP測定用のELISAはMBPの0.1ng/mlから30ng/mlまで直線性がみられ、変動係数(CV)は測定間変動9.6%および日差変動3.6%であった。

各種体液と正常血清のMBP値を比較した。尿と髄液は血清の約1/100~1000で、胸水や腹水では血液成分の混在の程度により血清の値に近いものもあった。

健常者血清1085例の濃度分布をみると、0.07から6.4  $\mu\text{g/ml}$ まで幅広く分布しているが、比較的 low 値に多く集まっており対数正規型の分布傾向がみられた。算術平均(±標準偏差)で表すと1.72(±1.14)、幾何平均は1.37、中央値は1.39  $\mu\text{g/ml}$ であった。

各年齢別に算術平均と標準偏差を表すと、平均値は小児期から成人に達するまで加齢とともに減少する傾向がみられた。0-19歳の未成年者と20-100歳の成人のMBP平均値を比較すると、未成年者(2.30 ± 1.30  $\mu\text{g/ml}$ )の方が成人(1.56 ± 1.04  $\mu\text{g/ml}$ )より高く、明らかな有意差がみられた。

未成年者と成人とに分けて分布をみると、未成年者は二峰性分布となり、成人では、対数正規型分布を示した。二峰性分布から対数正規型分布への移行は20歳代まで加齢とともに進行し、30歳代以降からは対数正規型の分布であった。

## IV 考察

今回開発したMBP測定用のELISA法では、MBPの0.1ng/mlから30ng/mlまで直線性がみられ、変動係数(CV)は測定間変動および日差変動ともに10%以下で、定量性は優れていた。

各種体液と対照に示した健常成人血清と比較すると尿や髄液中にはMBPはほとんど検出されず、また癌性腹水で血液が混じると検出されることから、MBPは血液以外にはほとんど存在しないものと考えられた。

健常者血清のMBP平均値を他の研究者の結果と比べてみると、Superらの値より約10倍高く、Ezekowitzらの値より約10倍低かったが、RIAで測定した川寄らの値とほぼ同じであり、後にSuperとEzekowitzは以前の報告の誤りを認めたことより、我々の測定値は正確であると考えた。

MBPの正常平均値は年齢によって大きく変わる。一生のうち、最も高値を示すのは若年期(3-9歳)で、年齢と共に減少し、30歳以降でほぼ一定となる。子供のMBP値が成人よりも高い理由としては、感染防御機構の個体発生からみて、原始的免疫系の一つとしてMBPが生体防御の第一線で活躍することが考えられる。これが若年者における二峰性分布の高値群を反映している可能性がある。二峰性の低値群の方はMBP遺伝子変異のhomoあるいはheteroが多数含まれるものと考えられる。MBPの正常平均値は1.4-2.4  $\mu\text{g/ml}$ と年齢によって大きく変わる。今後、各種疾患でMBP値の高低を論ずる際には年齢構成を考慮しなければならない。

## 学位論文審査の要旨

主査 教授 小林 邦彦  
副査 教授 小池 隆夫  
副査 教授 皆川 知紀

### 学位論文題名

Human Serum Mannose Binding Protein(MBP):  
Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent  
Assay(ELISA) and Determination of Levels in Serum  
from 1085 Normal Japanese and in Some Body Fluids.

(ヒト血清マンノース結合蛋白 (MBP) : 酵素抗体法 (ELISA)  
の開発と日本人正常血清1085例ならびに他の体液の測定)

マンノース結合蛋白 (MBP) は、マンノース、N-アセチルグルコサミンに特異的に結合する動物レクチンで、ヒトのMBPは32kDaのホモオリゴマーの9~18量体で、分子形態は補体成分 C1q と構造が類似している。この分子は補体の古典経路を活性化したり、それ自身がオプソニンとして働き、またC32を介してオプソニン作用を発揮し、異物排除に関わる原始的な生体防御の一つとされているが、その作用機序や生理的役割についてはまだ不明な点が多い。本研究はヒトMBPを精製し、抗ヒトMBP抗体を作製して免疫学的測定法(ELISA)を確立し、各種検体の MBP 値ならびに正常ヒト血清における値と年齢変化をしらべ、その臨床的意義を検討したものである。

**[方法]** ヒト血清からのMBP精製はD-mannoseをSepharose 6Bに化学的に結合したmannose-affinity column、ゲル濾過法およびイオン交換法で行った。精製した蛋白は還元剤下のSDS-PAGE上、32kDの単一バンドを示した。

polyclonalおよびmonoclonal抗MBP抗体は精製MBPを用いウサギおよびマウスに免疫し作製した。

ELISA はpolyclonalの抗 MBP 抗体を固相化し、二次抗体としてビオチン標識抗MBP monoclonal抗体を用い、アビジン標識ペルオキシダーゼで検出するサンドイッチ法で行った。スタンダードは精製MBPを用いた。

**[対象]** 体液：尿12例， 髄液19例， 腹水34例， 胸水12例と健常者血清（3歳から100

歳までの日本人健常人血清1085例) および新生児期 (日令0:61例と日令5:51例) を測定した。

### [ 結果 ]

(1)本測定法はMBPの0.1ng/mlから30ng/mlまで直線性がみられ、測定間変動および日差変動係数(CV)は何れも10%以下で良好であった。

(2)MBPは尿と髄液は血清の約1/100~1000であり、胸水や腹水では血液成分の混在で検出可能となることから、血清以外にはほとんど存在しない物質であると推定した。

(3)健常人血清の濃度分布は0.07 から 6.4  $\mu$ g/ml まで幅広く、低値に多く集まる対数正規型の分布を示した。算術平均 (±標準偏差) は 1.72(±1.14)であったが、年齢別平均値は小児期から成人に達するまで加齢とともに減少した。このことより、MBPは主に小児期に活躍する物質であると推定した。

(4)生下時からの変化は日令0で既に約1  $\mu$ g/mlを示すが、日令2から急激に上昇し、日令5には生涯最高値に達することから、MBPは胎生期に既にその産生準備があり、出生とともに外界の変化に対応して産生が起こる防御因子であると推定した。

本研究では原始的免疫系の一つであるMBP-補体系に関してヒトにおける変化とその意義について検討するため、ヒト血清MBPを精製し、その抗体を作製、ついでそれによるサンドイッチ酵素免疫測定法(ELISA)を開発した。本法はMBP値が0.1ng/ml~30ng/mlまで直線性を示し、測定感度および変動係数(測定間ならびに日差)が優れていた。

この方法により、健常ヒト血清における値と年齢変化、各種体液における値、新生児期の変化などを検索し、この分子は主として血液中に存在するもので、他の体液中には通常存在しないこと、この分子は胎生期にすでにある程度作られており、生後5日以内に生涯の最高値に達し、その後加齢とともに減少する性格の物質であることが明らかになった。この現象は、個体発生上、高等な感染防御機構に属する抗体の出現と対比的な動態である。このことからMBPは出生後、自ら抗体を産生するまでの期間、感染防御因子として働くことに存在意義があるものと推測された。

以上、本研究はMBPをヒト血清から精製、その測定法を開発し、これを用いて新生児から高齢者に至るまでの血清MBP値の測定およびその年齢別正常値、年齢的变化を検討したこと、またこの結果、ヒトに於けるMBPの存在意義は出生後、自ら抗体を産生するまでの期間、血液内で最初に働く原始的防御因子であることを推測したもので、論文内容はオリジナリティがあり、博士(医学)に値すると判定した。