

ヒト血清中のマンナン結合タンパク質のラジオイムノアッセイ による定量法の確立とその臨床化学的意義の検索

川 寄 伸 子, 山 本 真理子, 田 中 洋 子
西 村 和 司, 植 村 宗 弘

Determination of the Mannan-Binding Protein in Normal and Patients' Sera by Radioimmunoassay

Nobuko KAWASAKI, Mariko YAMAMOTO, Yoko TANAKA,
Kazushi NISHIMURA and Munehiro UEMURA

ABSTRACT: In an attempt to know the physiological roles of the serum mannan-binding protein (MBP), a lectin specific for mannose and N-acetylglucosamine, a radioimmunoassay system for the human serum MBP was developed. Human serum (30 μ l) was incubated with rabbit anti-human serum MBP-IgG in the presence of human serum MBP labeled with 125 I-Bolton-Hunter reagent, and the separation of bound and free antigen was carried out by the 2nd antibody method. By this procedure, \sim 10 ng of the MBP in human sera could be assayed. The MBP in control sera dispersed in the range of 0~4.14 μ g/ml serum at the 95% confidence level and the mean value was 1.82 μ g/ml serum. The MBP level decreased slightly with ages. More than a half of cancer patients showed the levels lower than 1.0 μ g/ml serum. The levels of patients with lysosomal storage diseases dispersed as widely as those of the controls. Total mannan-binding activity of the controls which includes the activity of MBP and that of carbohydrate-binding IgG was in the range of 238~4107 ng mannan bound/ml serum and the mean value was 988 ng mannan bound/ml serum. The ratio of the mannan-binding activity of IgG to that of the MBP varied markedly (0.1~0.9). Some cancer patients' sera showed markedly high mannan-binding activity which was ascribed to the carbohydrate-binding IgG.

Key words: lectin, serum lectin, carbohydrate-binding protein, mannan-binding protein, mammalian lectin, cancer, lysosomal storage disease, radioimmunoassay.

はじめに

マンナン結合タンパク質(以下, MBP と略す)は酵母マンナンなどの高マンノース型糖タンパク質の糖鎖非還元末端に存在するマンノースあるいはN-アセチルグルコサミン残基を特異的に認識し, Ca^{2+} 存在下でこれと結合する糖結合タンパク質すなわち動物レクチンの一つである。このタンパク質は種々の動物組織のほか, ヒトをはじめとする哺乳動物の血清中にも広く存在している。動物レクチンは糖タンパク質の血流中からのクリアランス機構や, リソソーム酵素のエンドサイトーシス機構に関与しているなど, その生物学的意義が注目され, 近年, 急速に研究が発展しつつある分野である^{1,2)}。

著者らはすでにヒト血清中より, はじめてMBPを単離精製し, その生化学的性質およびレクチン様性質を明らかにしている³⁾。このタンパク質は血清中の既知の多糖結合性タンパク質であるC-反応性タンパク質(CRP)やアミロイドP-成分(SAP)とは異なる, 新しいタンパク質である³⁾。MBPはその結合特異性より, 血液中に侵入してきた細菌の細胞壁多糖, 酵母のマンナン, 炎症時に細胞内リソソーム顆粒から漏出してきた種々の加水分解酵素などに結合することが考えられる。そこで著者らはこのタンパク質を生体内に侵入した微生物多糖に対する生体反応あるいは血液中に遊離したリソソーム酵素による有害な分解反応を防ぐなど, 生体防禦反応の指標となりうるのではないかと考え, 種々の生理的, 病理的状态における血清中のMBPの動態を調べることを目的として, 本研究を開始した。しかし, ヒト血清中には, MBPによる, Ca^{2+} 依存性のマンナン結合活性のほか, 他の動物血清中にはほとんど見られなかった, Ca^{2+} 非依存性の, IgG 性抗体由来のマンナン結合活性が存在する³⁾ため, MBPの定量を活性測定により行なうことが不可能であることがわかった。そこで, 血清中の, これら2種の結合活性を分別して, MBPを特異的に定量するために, まずMBPのラジオイムノ

アッセイ(RIA)法を確立した。これにより, 種々のがん患者およびリソソーム酵素欠損症を中心とする複合糖質代謝異常症患者の血清中のMBP量の変動を調べ, 健常者血清のそれと比較することにより, 血清レクチンの生理的, 臨床化学的意義の検索を試みた。

実験材料と方法

1. 実験材料

1) 酵母マンナンはパン酵母(オリエンタル酵母工業社)より調製し, Sephadex G-100とDEAE-Sephadex A-50のクロマトグラフィーにより精製した⁴⁾。

2) ウシ血清アルブミン(BSA)(Fr. Vおよび結晶), およびウサギIgGはMiles社(USA)より, ヤギ抗ウサギIgG抗体(IgG画分)はMBL社(日本), Na^{125}I および $[\text{I}^{125}]$ -Bolton-Hunter 試薬はRadiochemical Centre (Amersham, 英国), Sepharose 4B, Sepharose CL-6B, Sephadex G-25, Sephadex G-100 および DEAE-Sephadex A-50 は Pharmacia 社(スウェーデン)よりそれぞれ購入した。

2. Sepharose 4B-マンナンの調製

BrCNにより活性化したSepharose 4Bにマンナンを固定化した³⁾。

3. ヒト血清MBPの精製

すでに確立した方法³⁾により行なった。すなわち健常者プール血清(1,000ml)をSepharose 4B-マンナンカラムを用い, 結合の Ca^{2+} 依存性を利用したアフィニティクロマトグラフィー(AFC)と, Sepharose CL-6Bのゲルろ過にかけ, 電気泳動的, 免疫化学的に均一な精製標品(1,030 μg)を得た。この精製MBP標品を, RIAにおいて, 標識抗原および非標識抗原(標準抗原)として用いた。

4. 抗ヒト血清MBP-IgGの作製

ヒト血清MBPを, ウサギ1匹あたり, 100 μg ずつ, 4回筋肉注射したのち, 得られた抗血清を, 硫酸アンモニウムによる塩析, DEAE-セルロースカラムにより精製し, IgG画分とした³⁾。この抗体はOuchterlony法で, 精製MBP

と単一沈降線を示し, 精製 MBP のマンナン結合活性を完全に中和した³⁾。

5. タンパク質の ¹²⁵I-標識

1) ¹²⁵I-標識マンナンの調製

Greenwood ら⁵⁾の方法に従い, クロラミンTを用いて, Na¹²⁵I (1~2mCi)により精製マンナンを標識した後, Sephadex G-25 カラム (1.0×30cm) で精製した。得られた ¹²⁵I-標識マンナンの比放射活性は 1~3 μ Ci/ μ g であった。

2) ¹²⁵I-標識 MBP の調製

標識条件は Bolton ら⁶⁾の方法に従った。ヒト血清 MBP 15 μ g (0.5 MNaCl, 2mMEDTAを含む 0.1Mイミダゾール塩酸緩衝液, pH 8.2の 50 μ l に溶解)を, [¹²⁵I]-Bolton-Hunter 試薬 (N-succinimidyl 3-(4-hydroxy 5-[¹²⁵I]iodophenyl) propionate) 1mCi と, 4 $^{\circ}$ C, 2時間反応させた後, 0.2Mグリシンを 0.5ml 加えて, 反応を停止した。反応液を 0.5MNaCl, 1mMEDTA, 0.1%Triton X-100, 0.2%ゼラチンを含む 0.02M イミダゾール塩酸緩衝液, pH8.2 で平衡化した Sephadex G-25 (1.2×20cm) カラムにかけ, 過剰の試薬を除いた。得られた ¹²⁵I-標識タンパク画分を, 次に示すように, Sepharose 4B-マンナンの小カラム (ゲル量 1.0ml) を用いた AFC で, 精製した。すなわち, 試料を 0.5MNaCl, 0.05M CaCl_2 , 0.2%ゼラチンを含む 0.02Mイミダゾール塩酸緩衝液, pH7.8 で平衡化したカラムにかけ, カラムを同溶液で洗浄し, さらに 0.5MNaCl, 0.05M CaCl_2 , 0.1%BSA を含む 0.02Mイミダゾール塩酸緩衝液, pH7.8 で洗浄し, 次に, カラムに結合した ¹²⁵I-標識 MBP を 0.5MNaCl, 2mMEDTA, 0.1%BSA を含むイミダゾール塩酸緩衝液, pH7.8 で溶出した。得られた標品の比放射活性は約 4 μ Ci/ μ g であった。

6. マンナン結合活性の測定法

すでに述べた方法⁹⁾で測定した。概略は次のようである。結合活性測定用反応液 (50mM トリス塩酸緩衝液, pH7.8, 1MNaCl, 50mM CaCl_2 , 0.1%Triton X-100, 0.6% BSA) 200 μ l に, ¹²⁵I-標識 マンナン (1.5 μ g/50 μ l) および 試料

(検体血清の場合, 通常 30 μ l), 水を加えて全量 500 μ l とし, 室温で15分放置した。pH7.8 の飽和硫酸アンモニウム液 500 μ l を加えて反応を停止し, 結合タンパクに結合した ¹²⁵I-マンナンを沈殿させ, 沈殿物をろ過により, ガラス繊維ろ紙 (ワットマン社製, グレード GF/C) 上に分離し, オートガンマカウンターで計測した。ブランクは上記測定系より結合タンパク質を除いた系により測定し, 各測定値より差し引いた。この値は通常, 全放射活性の 1%程度であった。結合活性 1 unit は結合した ¹²⁵I-マンナン 1 ng と定義した。

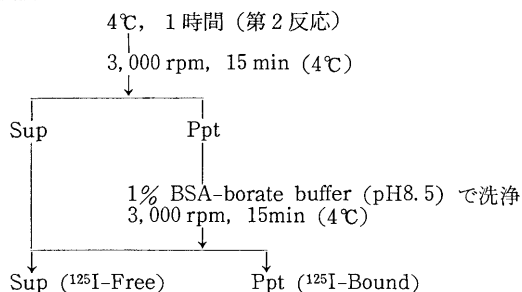
7. MBP の RIA による定量 (表 1 参照)

抗体と結合した標識抗原 (Bound) を結合しなかったもの (Free) と分離する方法 (以後, B・F分離と略す) は 2 抗体法によった。¹²⁵I-標識 MBP 10,000cpm 程度 (計数効率 50%として約 0.01 μ Ci, 2.5ng MBP に相当) を RIA 用プラスチックスピッツ試験管に入れ, 標準曲線作製用のものには, 非標識 MBP を 0~250ng の範囲で 6~7 点, 量を変えて加えた。次に, MBP を除いた (Sephacrose 4B-マンナンカラムの AFC により) 健常者プール血清 (血清の濃度の 2 倍に希釈されている) を 60 μ l 加えた。検体血清用の試験管にはこの血清を加えずに, 検体を 30 μ l 加えた。次いでウサギ抗ヒト血清 MBP-IgG (第 1 抗体) を加え, よく攪拌した。ブランクとして, 抗体の代わりに, 正常 (非免疫) ウサギ IgG を加えたものを作製し, 非特異的結合量をみた。抗原, 抗体, 正常 IgG の希釈にはいずれも 5% BSA を含む pH 8.5 の 0.13Mホウ酸緩衝液を用い, すべて重複測定とした。5%BSA-ホウ酸緩衝液を加えて, 反応液全量を一定にしたのち, 転倒混和式の緩速試験管振とう機 (24rpm) に取りつけ, 4 $^{\circ}$ C で 20~24 時間反応させた (第 1 反応)。次に, 転倒混和中, フタに付着した反応液をふり落とすため, 3,000rpm, 5 分間, 4 $^{\circ}$ C で遠心したのち, これにキャリアタンパク質として正常ウサギ IgG (0.02%) を 200 μ l 加え, よく攪拌後, ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (第 2 抗体) 20 μ l を加え,

表1 2抗体法によるヒト血清 MBP の標準測定系

	Standard [Cold MBP (ng)]						Blank	Sample serum
	0	37.6	75.2	112.8	150.4	188.0		
¹²⁵ I-MBP (μl)	20	20	20	20	20	20	20	20
Cold MBP (18.8 ng/10 μl) (μl)	0	20	40	60	80	100	60	0
Serum* (μl)	60	60	60	60	60	60	60	0
Sample serum (μl)	0	0	0	0	0	0	0	30
Rabbit anti-MBP-IgG (0.0004%) (μl)	30	30	30	30	30	30	0	30
Normal rabbit IgG (0.0004%) (μl)	0	0	0	0	0	0	30	0
5% BSA-borate buffer (pH8.5) (μl)	100	80	60	40	20	0	40	130
Total (μl)	210	210	210	210	210	210	210	210

4℃, 20~24時間 (第1反応) 転倒混和式振とう機								
Normal rabbit IgG (0.02%) (μl)	200	200	200	200	200	200	200	200
Goat anti-rabbit IgG-IgG (μl)	20	20	20	20	20	20	20	20



* ; AFC により MBP を除いた serum

さらによく攪拌後、4℃で1時間、静置した。その後、4℃で、3,000rpm, 15分間遠心して、免疫沈降物を沈殿させ、上清を分離した。沈殿は1% BSA-ホウ酸緩衝液、pH8.5の0.5mlで洗い、上記同様に遠心分離し、上清(洗液)を1回目の上清に合した。沈殿(¹²⁵I-Bound)と上清(¹²⁵I-Free)の放射能をそれぞれオートガンマカウンターで計測した。Total cpmに対する Bound cpm (ブランクの cpm を差し引いたもの)の割合(%Bound)を求め、加えた。

8. タンパク質の定量法

Fluorescamine を用いる 蛍光光度法⁷⁾により、結晶 BSA を標準として定量した。

9. 使用機器

¹²⁵I の放射能測定には Packard オートガンマカウンター (PRIAS, CGD240) を使用した。

10. 検体血清

がん患者血清は国立がんセンターより、複合糖質代謝異常症患者血清は、東京大学医学部小児科より、提供されたものを用いた。健常者血清としては、京都大学保健管理センター検査室より提供していただいたものおよび京都大学医療技術短期大学部教職員および学生の有志からの献血によるものを用いた。

結 果

1. RIA による、ヒト血清中の MBP の特異的定量法の確立

MBP の RIA による標準測定系を確立するために、以下のような測定条件を検討した。

1) MBP の ¹²⁵I による標識

MBP は高分子量タンパク質で標識方法によっては変性失活し、抗原性を失いやすい。事実、クロラミンT法では、Na¹²⁵I で標識後、反応停

止を還元剤の代りに過剰のチロシンの添加により行なうなど検討したが, 得られた ^{125}I -標識 MBP は抗体過剰においても 50% 以下の結合量を示し, 重複測定でのバラツキが大きく適切な抗原は得られなかった。 ^{125}I -Bolton-Hunter 試薬による方法は, 標識効率劣るが, 得られた標識抗原はよい抗原性を保ち, 抗体過剰で 90% 程度沈降した (図 1 参照)。

2) 第 1 抗体量

標識抗原 10,000cpm 程度 (約 2.5ng の MBP に相当) を用いて, 非標識抗原を添加しない時の, 第 1 抗体 (ウサギ抗ヒト血清 MBP-IgG) 希釈曲線を求めた (図 1)。抗体過剰 (0.0006% 以上の抗体添加) で, ^{125}I -標識 MBP は 89~92% 沈降した。健常者血清 30 μl の MBP 量範囲 (20~200ng) の非標識抗原の添加により, 適当な競合のみられる第 1 抗体の量としては, 原液 (2.4% タンパク濃度) の 6,000 倍希釈 30 μl が適当であった。

3) 血清添加の影響

2 抗体法の場合, 血清中の被験物質以外の非特異的因子によって, 結合量が影響を受けることが多いことが知られている⁸⁾。したがって, 非標識抗原の希釈系列のみによって作製した標準曲線と, Sepharose 4B-マンナンの AFC に

より, MBP を除いた健常者プール血清を添加して作製した標準曲線とを比較した (図 2)。結合量を一定方向に増減させるような変化は見られないが, 両者に差が見られたので, 標準曲線作成時には常にこの血清を添加して, その影響を補正した。

4) 第 1 反応の時間

第 2 反応の時間を一定 (1 時間) にして, 第 1 反応の時間を 1 日, 2 日, 4 日および 9 日と変えて, 結合量を測定した (図 3)。ブランクはそれぞれについて作製した。標識 MBP のみの場合, これに非標識 MBP, あるいは検体血清を添加した場合, いずれの場合も反応時間は 1 日でほぼ平衡に達していることがわかった。

5) 第 2 抗体量

0.02% 正常ウサギ IgG 200 μl に対する第 2 抗体 (ヤギ抗ウサギ IgG-IgG, 抗体価 10mg/ml) の量を 10 μl , 20 μl , 40 μl , 100 μl と変えて, 結合量を測定した (データ省略)。10 μl では沈殿の生成に時間がかかり, 沈殿量も少ないので分離操作が困難であった。100 μl ではブランク値が 20% にまで上昇し, 非標識 MBP の添加量の変化による結合量の差が出なかった。B・F 分離の操作に適当な沈殿が得られ, 非特異的沈殿量の最も少なかった 20 μl を標準とした。

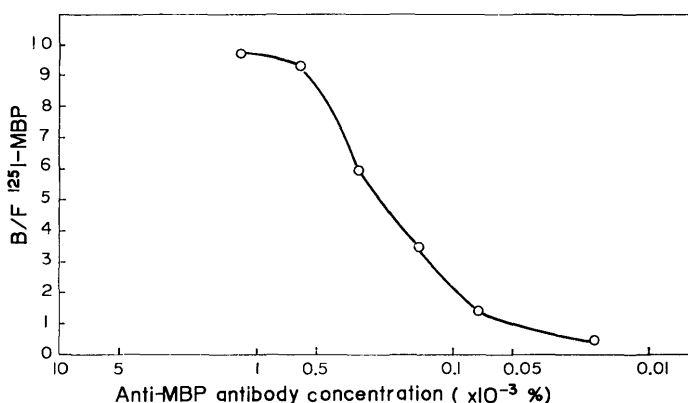


図 1 第 1 抗体希釈曲線

第 1 抗体 (2.4% タンパク濃度) を 2,000, 4,000, 8,000, 16,000, 32,000, 128,000 倍希釈して, 標準測定系 (表 1 参照) に加えた。B/F; ^{125}I -結合型 (沈殿) と ^{125}I -遊離型 (上清) の比

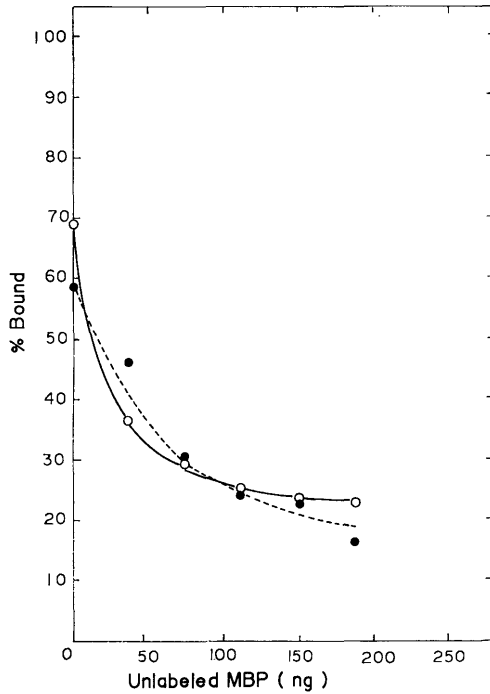


図2 RIAによるMBP定量の標準曲線

—○— ; 非標識MBPの希釈液のみによる標準曲線 (他の条件は表1に示した通り)
 -●- - ; ヒト血清 (MBPを除いてあるもの) を添加した場合の標準曲線

6) 第2反応の時間

第1反応の時間を一定 (24時間) にして、第2反応を1, 2, 4時間と変化させ、結合量を調べたところ、1時間で平衡に達していた (データ省略)。

以上の検討の結果、MBPの標準測定系を表1のプロトコールに示したように定めた。

この条件で、非標識抗原を加えない時の結合量は70%前後、非特異的結合量 (ブランク) は2~3%であった。この系で、10~200ngのMBP (健康人血清量にして通常30μlに相当) の特異的定量が可能となった。標準曲線は測定毎に求めたが、その1例を図1に示した。標準曲線の定量性のよい範囲外の結合量 (50%以上、20%以下の%Bound) を示した検体については検体量を変えて、再測定した。1.8μg/ml血清の健康者血清を用いて、8回同時測定の変動係

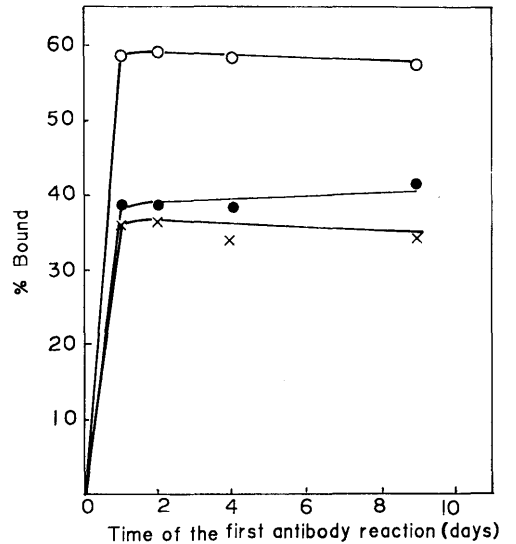


図3 第1反応の時間の検討

—○— ; ¹²⁵I-標識MBPのみの測定系
 —●— ; ¹²⁵I-標識MBP+非標識MBP (113ng)の測定系
 —×— ; ¹²⁵I-標識MBP+健康者血清 (50μl)の測定系

数 (coefficient of variation, C.V. と略す) は1.7%であり、きわめて良好な同時再現性を示した。また、同一の検体を、測定のパッチ毎に、コントロールとして測定し、その時の標準曲線よりMBPを定量したが (日差再現性)、C.V.は6.5%であり、安定した結果が得られた。

測定試料側の保存状態等の検討の結果をまとめると以下のようであった。

1) 試料の冷蔵と凍結保存

血清分離後、1日冷蔵保存した検体と、-70℃に1日凍結後、融解した検体について、同時にMBP量を測定したが、差は見られなかった (表2)。また、試料を-70℃に凍結し、3日目、7日目、11日目、18日目に融解してMBP量を測定したが、同試料の保存前 (採血後、3時間で血清分離し、直ちに測定) の値と比較して、変化は見られず、比較的長時間の凍結保存に対しても安定であることがわかった (表3)。

2) 試料の凍結融解

血清を-70℃に凍結し、1回融解したものと、

表2 検体の保存状態と非働化処理の影響

処 理	%Bound*	MBP ($\mu\text{g/ml}$ serum)
1. 4°C, 24 h	43.9	2.17
2. 56°C, 45 min→4°C, 24 h	55.0	0.95
3. -70°C, 24 h→1 回融解	45.0	2.01
4. 56°C, 45 min→-70°C, 24h→1 回融解	57.1	0.74
5. -70°C, 24 h→3 回凍結融解	44.0	2.16
6. 56°C, 45 min→-70°C, 24 h→3 回凍結融解	58.0	0.53

いずれも重複測定, 標準測定系(表1参照)により定量。

* 検体量 30 μl 当たりの % Bound.

表3 検体の長時間凍結保存の影響

処 理	%Bound*1	MBP*2 ($\mu\text{g/ml}$ serum)
1. コントロール*3	46.8	1.87
2. -70°C, 3 days (1 回融解)	43.6	1.78
3. -70°C, 7 days (2 回融解)	43.5	1.80
4. -70°C, 11 days (3 回融解)	48.0	1.64
5. -70°C, 18 days (4 回融解)	40.0	1.96

いずれも重複測定, 標準測定系(表1参照)により定量。

*1. 検体量 30 μl 当たりの % Bound.

*2. その時の検量線より, それぞれ算出。

*3. 採血後, 3 時間後に血清分離し, 直ちに測定。

3 回凍結融解をくり返したものについて同時に測定した MBP 量に差は見られなかった(表2)。凍結融解による変化が見られないことは長時間保存試料についての結果からも示された(表3)。

3) 試料の非働化処理

56°C, 45 分間非働化した血清の MBP 量は冷蔵, 凍結融解のいずれの場合も, 非働化しないものの MBP 量の 40% 前後に減少した(表2)。また, 非働化血清は凍結融解のくり返してさらに MBP 量の減少が見られた。変性がより進み, 抗体との反応性が低下するものと考えられる。

4) 血漿と血清の比較

検体がヘパリン加血漿として提供されることがあるので, 同一健常者から採血した血液を, 血清とヘパリン加血漿に分けて調製し, MBP 量を比較したところ, 全く差は見られなかった(表4)。

以上の結果に基づき, 検体血清は非働化せず, -70°C で保存した。

表4 血清とヘパリン加血漿の比較

検 体	%Bound*	MBP ($\mu\text{g/ml}$)	
健常者 A	血清	33.0	2.92
	血漿	32.3	3.03
健常者 B	血清	33.9	2.78
	血漿	34.7	2.65
健常者 C	血清	42.0	1.84
	血漿	44.7	1.58

いずれも重複測定, 標準測定系(表1参照)により定量。

* 検体量 50 μl 当たりの % Bound.

2. RIA による患者血清および健常者血清中の MBP の定量

MBP は微生物多糖やがんを含めた生体内異物に対する生体内防禦反応をあらわすものではないかと考え, またリソソーム病を中心とする複合糖質代謝異常症においても MBP 量に何らかの変動が見られるのではないかと考え, がん患者血清 105 検体, 複合糖質代謝異常症患者血清 25 検体について, RIA により MBP 量を定

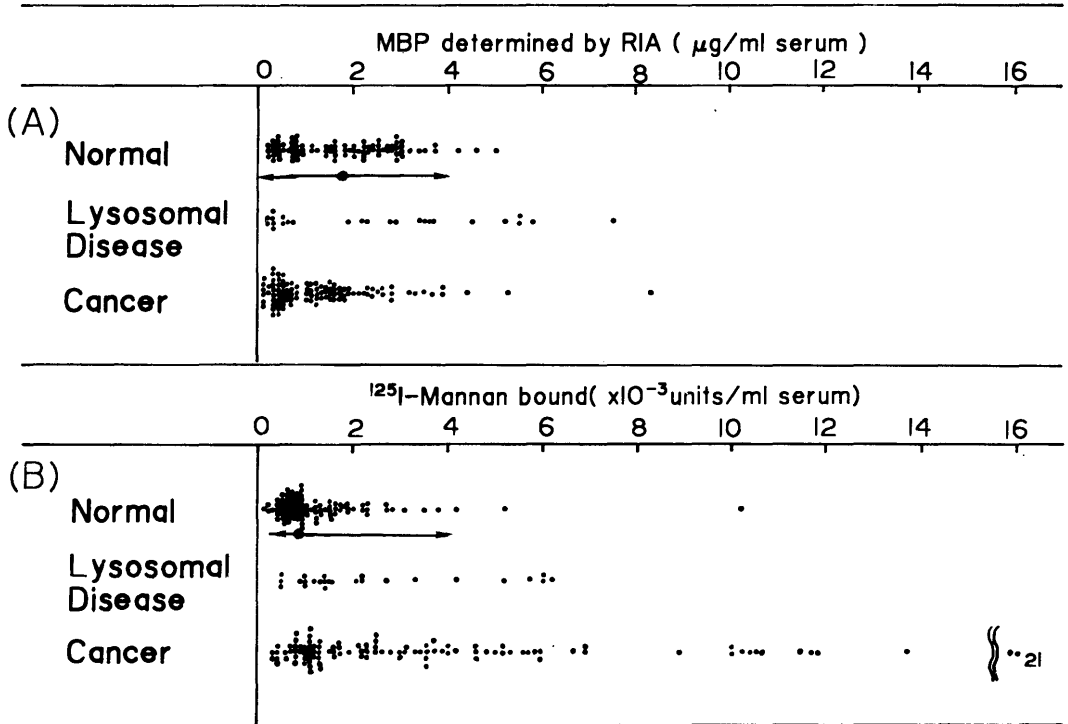


図4 健常者，複合糖質代謝異常症患者およびがん患者血清中の MBP 量(A)とマンナン結合活性(B)
 MBP 量は RIA により定量，マンナン結合活性は ¹²⁵I-標識マンナンの結合量を測定（実験方法
 および表1を参照）。
 ←→；平均値（●）および正常範囲（95%信頼区間）を示す。（MBP 量は正規分布，マンナン結合
 活性は対数正規分布としてそれぞれ求めた）。

量した。比較検討のため，健常者血清88検体についても定量した。図4(A)に示すように，健常者血清中の MBP はかなり幅広い分布を示したが，正規分布するとして，平均値（±標準偏差）は $1.82(\pm 1.16)\mu\text{g/ml}$ 血清となった。また，この平均値は加齢と共に，わずかながら減少傾向を示した（図5(A)）。リソソーム病患者は検体数が少ないが，健常者と同様の幅広い分布を示した。MBP の正常範囲は，健常者の平均値 ± 2 標準偏差として表わすと， $0\sim 4.14\mu\text{g/ml}$ 血清であるが，リソソーム病患者検体の25例中，この範囲を超えるものが6例存在したが，顕著な高値を示すものではなく，一定の明らかな変動は見い出されなかった。一方，がん患者血清の場合は上記の正常範囲を超えるものは3例であったが，全体として低値を示し， $1\mu\text{g/ml}$ 血

清以下の値を示すものが50%以上を占めているのが特徴的であった。リソソーム病のうち， $7.5\mu\text{g/ml}$ 血清を示すのは Sanfilippo 病（リソソーム酵素欠損によるムコ多糖蓄積症）であり，がん患者中の $8.3\mu\text{g/ml}$ 血清を示すのは前立腺がんであった。とくに，前立腺がリソソームに富む組織であることと，MBP の増加とを考えあわせると興味もたれるが，1例のみであるので，この点についてはさらに検討が必要である。

表5に複合糖質代謝異常症の疾患別の MBP 量のデータを示した。このうち，4～5例ある疾患（Fabry 病，GM₁-ガングリオシドーシス，およびガラクトシダーゼ，シアリダーゼとともに低下している場合）について，MBP 量の分布を表わしてみたのが図6(A)である。同一疾患内

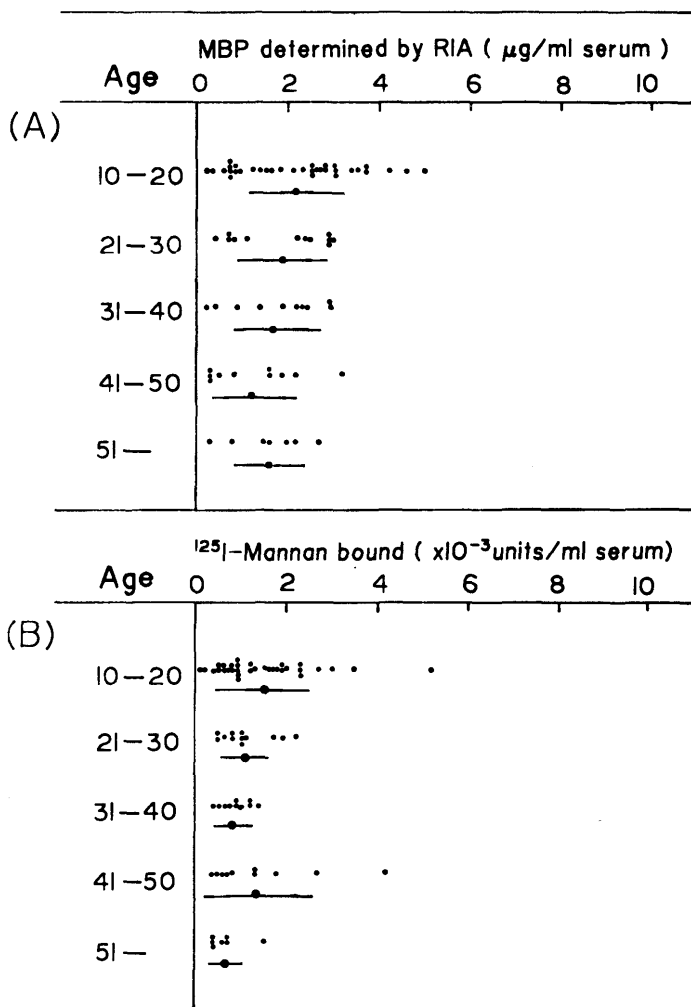


図5 年齢別にみた健康者血清中の MBP 量(A)とマンナン結合活性(B)
 定量法は図4の説明と同様である。
 —●—; 平均値±標準偏差をあらわす。

でも広い分布範囲を示し, 一定の明らかな傾向は見い出されなかった。

3. 患者血清および健康者血清のマンナン結合活性の測定

RIA による MBP の定量と並行して, それぞれの検体のマンナン結合活性を測定した。結合活性は Ca^{2+} 依存性の MBP 由来の活性と, Ca^{2+} 非依存性の IgG 由来の活性を合わせた全活性を示している。図4(B)に示すように, 健康者血清におけるマンナン結合活性は, 対数正規

分布を示し, 平均値は 988 units/ml 血清であった。また, マンナン結合活性も, MBP 量と同様, 加齢と共にわずかな減少傾向を示した(図5(B))。

次に, リソソーム病患者血清の結合活性は健康者同程度の広い分布範囲を示し, とくに明らかなかたよりを示さなかった。このことはリソソーム病の疾患別にまとめてみた結合活性についても同様であった(図6(B))。一方, がん患者血清の結合活性は, 図4(B)に見られるように,

表5 複合糖質代謝異常症患者の血清中の MBP 量とマンナン結合活性

Disease	MBP determined by RIA ($\mu\text{g/ml}$ serum)	Mannan binding activity ($\times 10^{-3}$ units/ml serum)		MBP/MBP+IgG (%)
		MBP+IgG	MBP*	
Fabry	0.34	0.51	0.04	7.8
	0.18	1.37	0.005	0.4
	0.77	1.50	0.10	6.7
	2.78	1.20	0.36	30.0
	0.23	1.01	0.03	3.0
{ Galactosidosis	0.36	1.41	0.04	3.0
	{ Sialidosis	0.27	2.74	0.03
		5.15	1.29	0.67
	2.78	1.02	0.36	35.3
Gaucher	0.35	n. d.	0.04	—
GM ₁ -gangliosidosis	2.26	5.65	0.29	5.1
	2.18	1.34	0.28	20.9
	3.74	2.24	0.48	21.4
	4.47	4.22	0.58	13.7
	3.39	0.48	0.44	91.7
β -Galactosidosis	0.32	2.24	0.05	2.2
Hurler	0.49	2.06	0.06	2.7
I-cell disease	5.50	0.46	0.55	119.6
MLD	0.60	5.20	0.08	1.5
Sandhoff	5.80	6.15	0.75	12.2
Sanfilippo	7.54	5.96	0.98	16.4
Scheie	0.39	3.27	0.04	1.2
	0.47	6.00	0.06	1.0
Tay-Sachs	3.60	1.04	0.47	45.2
	5.51	0.89	0.72	80.9

n. d. ; not detectable.

* ; 精製 MBP 標品のタンパク当たりの比結合活性が 130 units/ μg であることと, MBP量より, 計算によって求めた。

正常範囲 (95%信頼区間) の, 238~4,107 units/ml 血清を超える場合が全体の28%を占め, このうちの約50%は, 正常範囲の2倍以上の増加を示した。高値を示した29例のうち, 主なものは肺がん (8例), 急性骨髄性白血病 (5例), 胃がん (4例) であった。

表5において, リソソーム病の場合を示したように, MBP 量と全マンナン結合活性との間に, 相関は見られなかった。このことは健常者, がん患者の場合も同様で, MBP と糖結合性 IgG は互いに独立して増減していると考えられる。次に, MBP 由来のマンナン結合活性と全

マンナン結合活性 (実測した結合活性, すなわち MBP 由来結合活性+IgG 由来結合活性) の比を求めた。なお, MBP 由来のマンナン結合活性は, 精製 MBP 標品のタンパク当たりの比結合活性が, 130 units/ μg であることと, RIA により求めた MBP 量とから, 計算により求めた。表5に示すように, この比は1~90%と大きく変動した。また, 全結合活性が高い場合は, 健常者, がん患者, リソソーム病患者のいずれの検体でも, ほとんどの場合, IgG 性の結合活性の増加によることが判明した。

一方, 1例しかないが, I-cell 病においては,

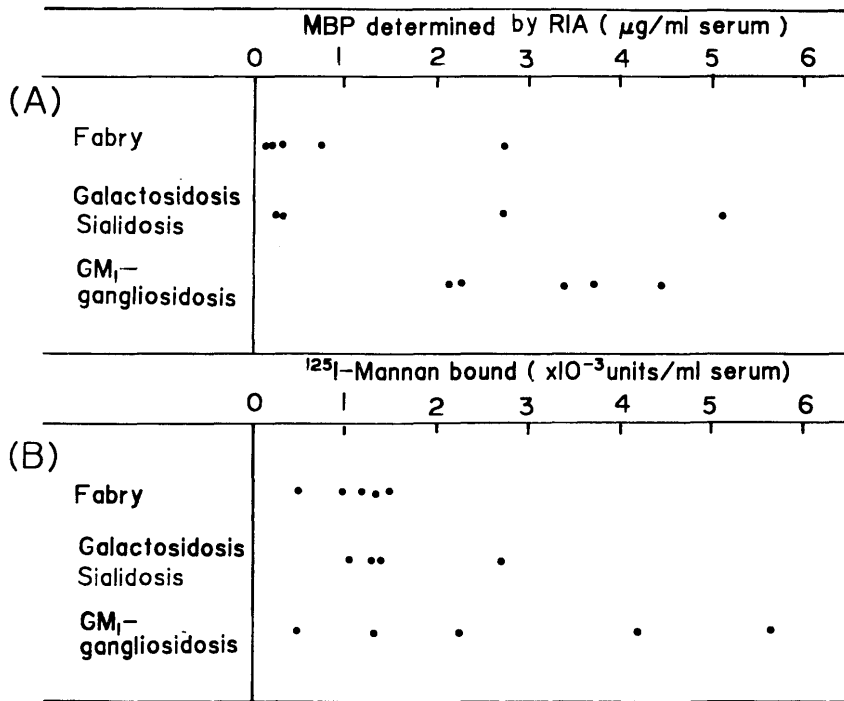


図6 疾患別にみた複合糖質代謝異常症の患者血清中の MBP 量(A) とマンナン結合活性(B) 定量法は図4の説明と同様である。

その結合活性はほとんどすべて MBP に由来し, IgG 性の結合活性が検出されなかった。GM₁-gangliosidosis のうちの 1 例, Tay-Sachs 病のうちの 1 例がこれと同様のパターンを示した。

健常者血清について, MBP 量, 結合活性ともに平均の値を示すものにおいて, 全結合活性中に占める, MBP 由来の結合活性の割合を算出すると, 平均20~30%であった。

考 察

血清中の MBP は肝臓の MBP と, 分子サイズ, 結合の動力学的性質などの点で異なるものの, 糖結合特異性, アミノ酸組成, サブユニットの分子量などの性質では区別がつかず, 免疫化学的交叉反応を示す¹⁾。肝 MBP は細胞内の主に粗面小胞体に存在し, 糖タンパク質の細胞内輸送に役割を果たしていることが示唆されている²⁾。血清 MBP は現在のところ, 肝 MBP

のうちの一部がいくつかのプロセッシング反応により修飾されたのち, 血流中に分泌されたものではないかと考えられるが, その生理的機能についてはまだ明らかにされていない。リソソーム病のうち, α -マンノシダーゼ, β -ガラクトシダーゼ等の欠損症である I-cell 病については, Neufeld ら³⁾は患者の培養線維芽細胞を用いた実験より, リソソーム酵素のリソソーム顆粒内への局在化に, マンノース 6-リン酸に特異的なレクチンが重要な役割を果たしていることを明らかにしている。しかし, このマンノース 6-リン酸認識系は肝臓では機能していない可能性が高く, 代って, MBP が関与しているものと思われる。MBP は α -マンノシダーゼ, β -グルクロニダーゼなど高マンノース型糖鎖をもつ糖タンパク質であるリソソーム酵素に高い親和性をもって結合するため, リソソーム病に対する MBP の何らかの関与に興味をもたれる。しかし, 複合糖質代謝異常症の検体数が少なく,

十分な解析に至らなかったものの、MBPの血清中での役割を示唆するような、明らかな結果は得られなかった。

健常者血清中のMBP量の分布範囲はかなり幅広く、このことは診断的指標として用いにくい、一方、何らかの生理的な変動を反映しているのではないかと考えられる。また、がん患者の血清中のMBP量は、正常範囲のうちでも低値を示すものが多かったが、その意味については不明である。

血清中のMBPは、他のCa²⁺依存性の既知の多糖結合性タンパク質であるCRPやSAPとは異なるものであるが³⁾、事実、がん患者血清についてはCRP値が測定されているが、これと、MBP量およびマンナン結合活性はいずれも相関しなかった(データ示さず)。

また、がん患者血清のいくつかにおいて、マンナン結合活性が明らかな高値を示した。RIAによってMBPの特異的定量が可能となった結果、MBP由来の結合活性と、Ca²⁺非依存性の結合活性を分別することができ、これらの高結合活性血清においては、Ca²⁺非依存性の活性が増加していることが判明した。この、おそらくheterophileな自然抗体と考えられる^{3,10,11)}ところの、多糖結合性IgGが診断の指標となり得るかどうかを検索することはきわめて興味あることで、今後の新たな研究課題である。

要 約

血清レクチンの生理的役割の解明への手がかりを得るために、また診断的指標としての応用の可能性を探ることを目的として、血清中のMBP量を特異的に定量することのできるRIA法を確立した。ヒト血清(30 μ l)を、¹²⁵I-Bolton-Hunter試薬により、¹²⁵I-標識したMBPと共に、ウサギ抗ヒト血清MBP抗体(IgG)と反応させたのち、2抗体法でB・F分離した。この測定系により、ヒト血清中の10ng以上のMBPが再現性よく、定量可能となった。

健常者血清のMBP量はかなり幅広い分布範囲を示し、その平均値(±標準偏差)は、1.82

(±1.16) μ g/ml血清であり、この値は加齢と共にわずかに減少する傾向を示した。

これに対して、がん患者血清中のMBP量は1.0 μ g/ml血清以下の低値を示すものが、約50%を占めた。リソソーム酵素欠損症を中心とする複合糖質代謝異常症患者の血清中のMBP量は健常者の場合と同程度の広い分布範囲を示し、一定の明らかな変動を示さなかった。

一方、血清中のマンナン結合活性は、健常者において平均988 units/ml血清であり、正常範囲(95%信頼区間)は238~4,107 units/ml血清であった。がん患者血清においては明らかに高い結合活性を示すものが多く、正常範囲を超えるものが28%を占めた。マンナン結合活性にはMBPに由来する活性と、糖結合性IgGに由来するCa²⁺非依存性の活性の二つのタイプのものが含まれるが、この活性の比は0.1~0.9と大きく変動した。また、高結合活性を示す血清では、ほとんどの場合、IgG性の結合活性が増加していることが明らかとなった。このことは、多糖結合性のIgGが診断の指標となり得ることを示唆した。

謝 辞

複合糖質代謝異常症の血清をご提供下さいました東京大学医学部小児科鈴木義之博士およびがん患者血清をご提供下さいました国立がんセンター向島達博士に深謝いたします。また、健常者血清をご提供下さいました京都大学保健管理センター検査室の方々に謝意を表します。

本研究の一部は京都大学放射性同位元素総合センターにおいて、行なわれたものである。

本研究は文部省科学研究費試験研究(2)補助金(昭和58, 59年度)および第3回エッソ女性のための研究奨励制度研究奨励金の援助を受けたものである。

文 献

- 1) Kawasaki, T., Mori, K., Oka, S., Kawasaki, N., Kozutsumi, Y., & Yamashina, I.: Binding protein specific for mannose and N-acetylglu-

- cosamine (Mannan-binding protein, MBP).
In *Vertebrate Lectins*, ed. Olden, K. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1985, in press.
- 2) 川崎敏祐, 山科郁男: 肝レクチン, 「細胞認識と動物レクチン」大沢利昭編, p. 81-108, 講談社, 東京, 1982.
 - 3) Kawasaki, N., Kawasaki, T. & Yamashina, I.: Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J. Biochem.* 94(3) : 937-947, 1983.
 - 4) Nakajima, T. & Ballou, C. E.: Characterization of the carbohydrate fragments obtained from *Saccharomyces cerevisiae* mannan by alkaline degradation. *J. Biol. Chem.* 249(23) : 7679-7684, 1974.
 - 5) Greenwood, F. C., Hunter, W. M. & Glover, J. S.: The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89(1) : 114-123, 1963.
 - 6) Bolton, A. E.: Conjugation labelling methods for the iodination of proteins and polypeptides. In *Radioiodination techniques*, p. 34-36, Amsterdam International Limited, Buckinghamshire, England, 1977.
 - 7) Nakai, N., Lai, C. Y. & Horecker, B. L.: Use of fluorescamine in the chromatographic analysis of peptides from proteins. *Anal. Biochem.* 58(2) : 563-570, 1974.
 - 8) 熊原雄一, 宮井潔: Radioimmunoassay の基礎, 結合型(B)と遊離型(F)の分離法. *最新医学*, 26(6) : 1041-1048, 1971.
 - 9) Hasilik, A. & Neufeld, E. F.: Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 255(10) : 4946-4950, 1980.
 - 10) Sela, B-A., Wang, J. L. & Edelman, G. M.: Antibodies reactive with cell surface carbohydrates. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*: 72(3) : 1127-1131, 1975.
 - 11) Snyder, H. W., Jr. & Fleissner, E.: Specificity of human antibodies to oncovirus glycoproteins: recognition of antigen by natural antibodies directed against carbohydrate structures. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 77(3) : 1622-1626, 1980.