

現在、抗サル IgE 単クローン抗体を作出中である。

計画12-3:

各種サル免疫グロブリンの精製と特異抗血清の作成

藤本浩二 (社団法人・予防衛生協会)
寺尾恵治 (予研・筑波霊長類センター)
中井 裕 (茨城大・農)

サル類をアレルギー研究のモデル動物として開発するに当たり、これらサル類の各種免疫グロブリンに対する特異抗血清を作製しておくことは必須な条件となる。本研究は、アレルギー研究に多用されているマカカ属サルの各免疫グロブリンクラス (IgG, IgA, IgM, IgE) に特異的な抗血清あるいはモノクローナル抗体を作製することを目的とする。

本年度は、IgG, IgA, IgM については、カンクイザルからこれらを分離精製し、これをウサギに免疫して特異抗血清を作製した。IgE については、ニホンザルのプール血清から分離された阻精製分画をマウスに免疫し、モノクローナル抗体の作製を進めた。

IgG はプールした成体血清から硫酸塩析法および DEAE-セルロース、セファクリル S-300 によるクロマトグラフィーを組合せて精製した。IgA, IgM は抗ヒト IgA あるいは抗ヒト IgM を conjugate したセファロース 4B とセファクリル S-300 によるクロマトグラフィーを組合せて精製した。抗血清は精製した免疫グロブリンを完全アジュバントと共にウサギに免疫して作製した。抗 IgA 血清については、臍帯血清蛋白を conjugate したセファロース 4B で吸収した後特異抗血清とした。抗 IgM 血清は、成体プール血清からセファクリル S-300 ゲル濾過での最初の分画を除いた分画を conjugate したセファロース 4B で吸収した。作製した抗血清のクラス特異性は免疫電気泳動で確認した。また本抗血清を用いてのオクタロニーテストでは、カンクイザル、ニホンザル、アカゲザルの血清による沈降線はよく融合し、これらの抗血清が3種のサルに対し、高い種特異性を持つことが明らかとなった。なおこれらの抗血清から分離した抗体には酵素あるいは蛍光色素をラベルし、各種のアレルギー反応の測定に

利用する。

ニホンザル由来の IgE については、阻精製分画であること、回収蛋白量が少いことを考え合せて、マウスに免疫し、常法に従いモノクローナル抗体の作製を進めている。

計画12-4:

スギ花粉症ニホンザルの疾患モデルの作出

横田 明 (名古屋市立東市民病院)

本研究ではニホンザルにスギ花粉抗原による態動感作を行い、花粉症の実験モデルの作出を試みた。

宮島群由来の成獣ニホンザルを用いて部分精製標品のスギ花粉抗原による実験的感作条件を検討した。1群 (2頭) にスギ抗原とアジュバント効果のあるアルムの混合物を4週毎に6回皮内投与した。他の群 (2頭) にはスギ抗原のみを同様に投与し、両群の感作状態は、スギ特異的 IgE 抗体の産生及び皮内アレルギー反応性を指標にしてモニターした。感作はスギ抗原+アルムを投与した群にのみ認められ、スギ抗原だけを投与した群では特異的 IgE 抗体産生や皮内アレルギー反応は認められなかった。この結果より、スギ花粉抗原による実験的感作条件として、花粉抗原に加えアジュバント因子の共存が不可欠である事が明らかになった。

課 題 13

計画13-1:

霊長類大脳皮質におけるドコサヘキサエン酸の蓄積とその生合成能について

藤本健四郎・金沢文子 (東北大)

膜脂質に多く存在するドコサヘキサエン酸 (DHA) は、生体膜の機能を維持する上で重要な役目を持つと考えられており、特に神経系で含有量が高い。神経系の形成期である出生の前後には DNA の著しい蓄積が観察される。生体内での供給源は主として肝臓であるが、合成系の確立していない胎児や新生児のころには、外部からの補給に依存する度合いが大きい。本研究においても、ニホンザルを用いた実験で、新生動物の脳における DHA 合成能が低いことを確認した。そこで、

DHAを含めたポリエン酸の蓄積の度合や体内分布が加齢によって変化するのではないかと考え、以下の実験を行なった。

カニクイザルの新生仔、および成獣の肝臓、大脳皮質の脂質を改良 Folch 法で抽出した後、脂質クラスおよびリン脂質サブクラスに薄層クロマトグラフィーで分別し、ガスクロマトグラフィーで脂肪酸分析を行なった。

新生仔の肝臓では、成獣に比べ、主要リン脂質のひとつであるホスファチジルコリン (PC) の含有率が低かった。しかし、PC およびホスファチジルエタノールアミン (PE) のいずれにおいてもポリエン酸含有率は新生仔で高く、特にアラキドン酸 (n-6系) でその傾向が強かった。

大脳皮質では、PC/PE の値に年令による差異を認めなかったが、リン脂質サブクラス (PC, PE, PS) の脂肪酸組成には差を認めた。リン脂質サブクラスによって脂肪酸分布のパターンが異なるが、いずれのサブクラスでも、新生仔でアラキドン酸含有率が高く、オレイン酸 (n-9系) 含有率が著しく低いことが共通していた。

以上の結果から、生理活性を持つエイコサノイドの前駆体としてのアラキドン酸の重要性が、新生直後には特に高いこと、DHA の蓄積がそれに次いで起こることが示唆された。新生直後にアラキドン酸含有率が高いのは、胎児期に母体から供給されたものを蓄積した結果である可能性と、ポリエン酸合成酵素、リン脂質合成酵素の基質選択性がこの時期には n-6系脂肪酸に傾むく可能性について考えられた。

計画13-2:

サル各組織におけるアブシジン酸の局在とその生理的意義に関する研究

手塚修文 (名古屋大)

動物の組織 (細胞) 中に植物ホルモンが、また植物組織 (細胞) 中には動物細胞における生理活性物質が、存在していることが報告されつつある。その内でも植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) やインドール酢酸 (IAA) は脳や血液中に特に多く局在していることも認識されつつある。しかし動物細胞内におけるこれらの植物ホルモンの生理作用および合成系の重要性についての研究報告はほとんど無い。この研究ではニホン

ザルの組織・細胞内における植物ホルモンの一種である ABA の局在様式とその生理的意義を解明するのが目的である。今回は ABA 抽出精製について、まず植物と動物を実験材料とした場合の ABA の抽出・精製効率を比較検討したのち、実験材料として霊長類の血液を用いて ABA の抽出・精製法をさらに効率よくすることを試みたのでこれについて報告する。

前回 (1989年度) に一応確立した抽出・精製法をさらにより良くするために工夫・改善を試みた。ABA および IAA (これは植物では ABA の反対の作用) の定性定量測定のためにガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) を用いて同定・定量を行う必要がある。そこでサル血液より分離した ABA の検出のためにはガスクロマトグラフによる解析法がすぐれているので、ジアゾメタンを用いた ABA のメチルエステル化が必要である。このステップ後に未反応のジアゾメタンの除去が問題となったのでメチルエステル化した ABA だけを特異的に精製するときの活性化処理したシリカゲルカラムを通して有機溶媒の組成をいろいろ組合せて行った結果、IAA はベンゼンで、ABA はエーテルでそれぞれ分離溶出されることが明らかとなり且つこのステップの収率は90% (これ以上の収率はシリカゲルの性質上困難) であった。ひきつづき血液・脳の ABA の存在意義とその作用機構などについて検討中である。

計画13-3:

霊長類におけるシトクロム P-450 のポリモルフィズムに関する研究

大森 栄 (千葉大)

ニホンザル肝マイクロソーム (Ms) 中のシトクロム P-450 (P-450) のポリモルフィズムの有無に関し、今年度用いた3検体を含め15検体の結果を報告する。

肝 Ms 中の P-450 比含量には、個体差、性差は認められなかった。

P-450 依存の薬物代謝活性の個体差、性差を、テストステロン (Ts)、イミプラミン、デシプラミンを用いて検討した。Ts 水酸化活性は、ラット、ヒト同様、ニホンザルでも 6β 水酸化活性が最も高かった。本活性は、約2.1倍の個体差が認められたにすぎず、かつ性差も認められなかった。