



The changes of cytosolic aminopeptodase activities on mitogen-stimulated T and B lymphocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 東, 祐太郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/969

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 116号	学位授与年月日	平成 3年 3月31日
氏 名	東 祐太郎		
論文題目	The changes of cytosolic aminopeptodase activities on mitogen-stimulated T and B lymphocytes (マイトジェン刺激 T および B リンパ球における可溶性アミノペプチダーゼ活性の変化)		

医学博士 東 祐太郎
論文題目

The changes of cytosolic aminopeptidase activities on mitogen-stimulated T and B lymphocytes

(マイトジェン刺激 T および B リンパ球における可溶性アミノペプチダーゼ活性の変化)

論文の内容の要旨

《はじめに》

ヒト血清中のアミノペプチダーゼのうち cytosol aminopeptidase (c-AP; EC 3.4.11.1) は肝細胞の可溶性分画とリンパ球に多量に含まれ、血清中では肝疾患のみならず種々のウイルス感染症やリンパ球増多症患者血清での増加が観察される。リンパ球由来 c-AP 活性の血清中での上昇に関してはリンパ球の活性化と密接な関係が示唆されており、T cell マイトジェンである Phytohaemagglutinin (PHA) を用いた *in vitro* の実験でリンパ球における蛋白あたりの c-AP 比活性上昇が報告されている。しかしながら、これらの報告はすべて全リンパ球についてのものであり、T cell, B cell 各分画についての詳細な検討はいまだ報告されていない。

本研究ではウイルス感染症における c-AP 活性上昇の機序を明らかにすることを目的とし、その基礎的検討として PHA に加え B cell マイトジェンである *Staphylococcus aureus* cowan I (SAC) により刺激したリンパ球中蛋白あたりの c-AP 比活性を測定、比較検討した。さらに、リンパ球をヒツジ赤血球を用いたロゼット形成法により T cell rich および B cell rich 分画に分離し、各分画リンパ球の反応を検討し、T cell 活性化とリンパ球由来血清 c-AP 活性上昇との関係について考察した。

《材料及び方法》

22才から53才までの健常成人男性37人よりヘパリン加採血した血液からシリカ粒子を用いて混在する単球を除去後、リンパ球を比重遠心分離法により採取した。10% FCS-RPMI 1640にて細胞数を 1×10^6 cells/ml に調製し24時間前培養後、マイトジェンを添加し5% CO₂にて72時間培養した。ついでヒツジ赤血球によりロゼット形成を行い、比重遠心分離法でロゼット形成細胞 (T cell rich 分画) と非形成細胞 (B cell rich 分画) に分離、各リンパ球分画中の c-AP 活性を測定した。培養後のリンパ球を PBS(-) に懸濁後 -70°C で凍結、37°C で融解させ遠心後 ($\times 105,000g, 40min$) 上清中の c-AP 活性をロイシンアミドを基質とした測定法により測定した。この上清タンパク濃度を Lowry らの方法に従って測定し、c-AP 比活性を算出した。

《結果及び考察》

PHA 刺激では [H^3]-thymidine 取り込みの上昇と共に c-AP 比活性の上昇がみられたのに対し、SAC による刺激では [H^3]-thymidine の取り込みが上昇したにもかかわらず c-AP 比活性は上昇しなかった。このことから c-AP 比活性の上昇はリンパ球活性化、特に T cell の活性化と関係があることが示唆された。しかし、通常 B cell はヒトリンパ球中に10-15%しか含まれないため、この条件では活性化された B cell 中の c-AP 活性上昇を検出することが困難と考えられた。そこで活性化させたリンパ球を T cell rich および B cell rich 分画に分離し、それぞれの c-AP 比活性を測定した。ヒツジ赤血球によるロゼット形成法で分離した T cell rich および B cell rich 分画中の c-AP 比活性は PHA 刺激による T cell rich 分画で比活性の上昇が認められたのみで、SAC 刺激により活性化された B cell rich 分画においては比活性の上昇は認められなかった。この結果から c-AP 比活性の上昇は B cell ではなく T cell の活性化との関係が強く示唆され、リンパ球由来の血清中 c-AP 活性上昇は活性化された T cell の反応によることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

血清中にみられるロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) と総称される酵素のうち、cytosolic aminopepti-

dase(C-AP)は肝炎、リンパ造血系悪性腫瘍、およびウイルス感染症の際に上昇することが知られている。このC-APの血清中の上昇はリンパ球の活性化に密接に関連していることが報告されているが、リンパ球のうちT細胞亜群かB細胞亜群かはまだ明らかでない。

そこで申請者は、これまでに確立したleucine amide(LA)を基質とし1,10-phenanthrolineを添加してC-APを特異的に測定する方法を用い、ヒト、リンパ球亜群のマイトゲン刺激時における細胞増殖反応とC-AP活性の相関について検索した。

申請者が本研究で用いた材料および方法は、研究目的を解明するうえでおおむね適切である。すなわち、年齢22才〜53才の37名の健康男性の末梢血からフィコールパーク法にて分画した単核細胞を5%シリカ粒子を添加して貪食性細胞(単球)を除去したのち、リンパ球群を準備した。ついで、E・ロゼット法(Kasahara法)でT細胞rich分画とB細胞rich分画に分離した。ついで、マイトゲンに対するリンパ球芽球化反応は、T細胞とB細胞の特異的なマイトゲンであるPHA(phytohem-agglutinin)とSAC(staphylococcus aureus cowan I)をそれぞれ用い、72時間目の³H-thymidine摂取能を測定して検索した。血清中のC-AP活性は申請者らが独自に確立した方法(LAを基質とした方法)により測定した。

得られた結果の特徴と評価すべき点は次のごとくである。

1. Rubella や Measles 等のウイルス感染症患者において、潜伏期に lactate dehydrogenase 活性の上昇を伴って血清中の C-AP 活性が上昇しはじめ、発疹の出現と共にさらに急上昇し、経過と共に下降した。肝由来の諸酵素の上昇は伴わないので C-AP の上昇は活性化リンパ球由来であることが示唆された(副論文)。
2. T細胞マイトゲンであるPHA刺激に対するリンパ球増殖反応時に一致してC-AP活性の上昇が見られ、一方、B細胞マイトゲンであるSACに対しては増殖反応が見られたにもかかわらずC-AP活性の上昇は認められなかった。
3. マイトゲン刺激したT細胞rich分画とB細胞rich分画に分離しそれぞれの分画のC-AP活性をみると、PHA刺激によるT細胞rich分画にC-AP活性の上昇がみられたが、SAC刺激によるB細胞rich分画のC-AP活性は変化が見られなかった。

これらの結果から、申請者はウイルス感染症などにおいてみられるC-AP活性の上昇は、B細胞ではなくT細胞の活性化と密接に関係することが示唆されることを主張している。

リンパ球(とくにT細胞)活性化とC-AP活性との相関を明らかにしたことは、ウイルス感染症患者の血清中のC-AP活性上昇の機構を解明する上で示唆に富むものであるとして、高い評価が与えられた。

以上の発表に対し下記の様な質問と若干の問題点が提示され、質疑がおこなわれた。

1. C-AP活性測定法の分析精度と測定範囲について、また従来法との相関について
2. 分離したT細胞rich分画とB細胞rich分画の純度と生存率をどのような方法で検索したか
3. PHAおよびSACに対するリンパ球の芽球化反応の至適条件の設定法と、その他のマイトゲンに対する反応
4. C-AP比活性を蛋白量単位から細胞数単位へ変換した場合の結果について
5. T細胞とB細胞のblastoid cell lineでC-AP活性を測定したか
6. リンパ球のマイトゲン刺激における膜抗原表現型の変化や、各種リセプターの発現について
7. 血液単球のC-AP活性に与える影響について
8. 統計的処理と表記法の妥当性について

以上の点について申請者はおおむね適切な解答を行ない、残された問題については今後更に追及する旨の解答がなされた。

以上の審査の結果、本審査委員会は本論文が学位授与に値するものと、全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 山下 昭

副査 教授 瀧 川 雅 浩 副査 教授 吉 田 孝 人

副査 助教授 佐 藤 篤 彦 副査 講師 池 田 靖