HOKUGA 北海学園学術情報リポジトリ
学校法人北海学園
北海学園大学
北海商科大学

| | |
|---|---|
| タイトル | 動物モデルを使った、人病態の研究 ： 人チェダク・ヒガシ症候群モデル動物(ベイジュ・マウス)の好中球プロテアーゼと阻害物質の生体制御機構を探る |
| 著者 | 竹内，潔 |
| 引用 | 北海学園大学人文論集，4：29-50 |
| 発行日 | 1995-03-31 |

Hokkai-Gakuen Organization of Knowledge Ubiquitous through Gaining Archives.

# 動物モデルを使った、人病態の研究
## ── 人チェダク・ヒガシ症候群モデル動物（ベイジュ・マウス）の好中球プロテアーゼと阻害物質の生体制御機構を探る ──

竹　内　　潔

遺伝病をはじめ，人の病気治療の研究のために，様々な動物が使われている。

また，こうした研究では研究対象に合わせた動物の選択の良否が，人治療の運命を担っている場合が，じつに多い。当然のことだが，動物実験で得られた結果が，すぐに治療に応用されることは少ない。しかし，多くの病気が，人の健常者を実験モデルとして，治療のための医療研究に適用できないことを考えると，人類の病気を克服するためには，状況に合致したモデル動物の有用さは計り知れないものがある。

ここでは，常染色体劣性遺伝の疾患である，人チェダク・ヒガシ症候群(Chediak-Higashi Syndrome,CHS)[1-4]をベイジュ・マウスという動物モデルを使い，人治療に向けて，どのような科学的アプローチで問題へ迫っていくのかをこの病気の最初の報告[1-4]から，竹内らによるチェダク・ヒガシ病の好中球エラスターゼ阻害因子発見[5-7]までを含めて紹介する。とくに血液細胞の一種で，好中球という，人免疫を司る重要な血液細胞内でのタンパク生成異常を発見し，本来信じられていたその部分での遺伝的異常に，竹内[5-7]らによりはじめてメスがいれられた部分については，詳説してみた。

人チェダク・ヒガシ症候群の日本での発見は，東北大学の若き研究者，東音高が，大学病院に勤務していた1950年に遡る。生後11カ月の男の子が彼の診断で，とりわけ気になる存在として報告されたことが，この病気を，のちにまで伝えることになった。

The Tohoku Journal of Experimental Medicine, vol.59 ,315－332, 1954[1] の冒頭で，

The present case is, I believe, worthy of report because of a monstrous malformation of peroxidase granules of blood leucocytes. The peroxidase reaction I used is that sensitive method of Sato-Sekiya's peroxidase stain. In spite of the fact that this method is now widely used,— many books on hematology and diagnostics recommend the use of it,— such a case has not been reported within my knowledge. I presume the present case will be the very first case ever reported of qualitative peroxidase abnormality.

彼のケースレポートは，報告した。

彼の報告は，血液細胞の中の一つで，好中球（neutrophils, PMN）と呼ばれているリンパ球の細胞内に分布する，ある特別の顆粒が，この患者の好中球では異常に巨大化していると言うものであり，現在でもこの病気を判断するためのまず最初の診断基準の一つである。さらに，このレポートの中で，この子の家族の遺伝的背景に焦点を当て，この病気がアルビノをも含む遺伝病である可能性を示唆した。この家族では，7人の子供の内4人までが，3歳になるまでに死んでいる。

彼のレポートの結論を一部紹介すると，

A case with photophobia, xerodermia pigmentosum-like pigmentation of the skin, albinismus fundi oculi utrisque, albinism of hair and pancytopenia was presented in the present paper. The most characteristic feature is congenital gigantism of peroxidase granules in myeloid leucocytes. It is a very fatal disease. The name of "Congential Giantism of Peroxidase Granules" is suggested for this new clinical entity.

この患者の，好中球中の巨大顆粒存在は，この病気の特長であり，今後の診断基準として採用すべきある，と結論している。

1950年という時期を考えれば，これは世界的な発見であった。しかし，発見と言うのは，えてして時を同じくして報告されるものである。1949年，

ハーバード大学医学部付属のマサチューセッツ州立病院へキューバから研究のため訪れていたチェダク博士のもとへ，7歳で死んだキューバ人の子供の血液標本が送られてきた。当時，チェダク博士の研究指導をしていたのは，ハーバード大学医学部付属子供病院のスミス博士であった。その指導のもとで，死んだ子供の血液標本を分析したところ，白血球に巨大顆粒が存在していることを，健常者の血液との比較により確認できた。この論文は，フランス語で書かれており，Rev. Haematol. 7, 362－367, 1952[2] に発表された。これは，東論文の2年も前のことであった。ところが，Beguez-Cesar は，1943年にすでに，Bol. Soc. Cubana Pediatr. vol. 15, 900－922, 1943[3] に，彼らの発見と同様の報告をしている。東論文の10年前のことである。この3つの論文が，同じ病気についての記述であることを発見したのは，東博士の恩師でもあり，白血球中での巨大顆粒をある特別な方法――ペルオキシダーゼという酵素を検出――で染色する技術を創始した，佐藤彰博士で，この病気を，Chediak-Higashi Syndrome[4] と名付けた。

現在では，この病気の研究のために，マウス，キツネ，ウシ，ミンク，ネコ等の動物モデルが開発されている[8]。ここではまず，本症の特長を記載し，その後，モデル動物としてベイジュ・マウスを使い，血液細胞の異常に対する細胞生化学的アプローチを紹介する。

人チェダク・ヒガシ病の主要症状として，皮膚，眼，毛髪の部分的白子症，感染に対する抵抗の減弱，憎悪期における臓器腫大，および種々の神経症状をあげることができる。また，患者は，好中球減少を示すのが普通であるが，リンパ節，肝，脾の腫大が顕著になる accelerated phase（憎悪期）になると，貧血，血小板減少，出血素因などの症状をも呈する。患者の多くは，乳幼児期から，易感染性を示し，皮膚，気道，肺，中耳などの化膿性感染を繰り返し，次第に憎悪期に入る。また，近年になり注目されている神経症状としては，歩行障害，抹梢神経麻痺，痙攣，感覚障害，自律神経機能障害，知能低下などが上げられる。発現時期は，1－20歳頃までの間に分散している。従って，ある期間までなんだ自覚症状もなく，歩行障害などの神経症状を発症してから，血液検査により，本症と診断され

る症例もある[9]。

実は，近年になりこの研究をも含めて，現代の様々な医療問題にタンパク分解酵素（プロテアーゼ）というものの関与がクローズアップされている。今回紹介する，血液細胞の一つである好中球内タンパク分解酵素の代表格であるエラスターゼ研究の方向は，神経細胞をも含む，細胞の機能と病態を考えるモデルとして，エイズ，アルッハイマー病，さらに気管支喘息をも含む人病態研究の最先端の分野である[10-12]。ここでは，チェダク・ヒガシ病（CHS）の易感染症性の病態について，ベイジュ・マウスをモデル動物に使い，この病気の原因解明[5-7,13]への一つのアプローチを，実験データーをもとに，出来るだけ平易に解説してみる。

## 竹内によるチェダク・ヒガシ症候群(Chediak-Higashi Syndrome)研究

人好中球は，体外から侵入したバクテリアを攻撃し，人の生体防御機構を考える上で，重要な役割を果たすことで知られている。ところで，人の遺伝病の一つとして知られている人チェダク・ヒガシ病（CHS）の易感染性の原因は，まず好中球の量的および質的異常にあると考えられていた。CHS好中球は，外から侵入した細菌を貪食する殺菌力が弱く，それは巨大顆粒（ライソゾーム）内のペルオキシダーゼをはじめとする，その他の殺菌性因子が放出され難いことに起因するとされていた。また，本症での好中球の減少は，血液細胞産生の要である骨髄内で，好中球の前駆細胞が破潰するために本来の成熟好中球の生産が減少すると想像されていた。近年，CHSは好中球内に存在するプロテアーゼの活性欠損に大きく起因する病気であり，CHS患者の多くは20歳を迎えることなく死に至る，ということが報告されている[5,9,13]。本研究は，CHSのモデル動物であるベイジュ・マウスを使い，マウス好中球由来のプロテアーゼを測定し，好中球内でのプロテアーゼの分布を正常なマウス（コントロール）と比較分析する。さらに，骨髄移植によりベイジュ・マウスのプロテアーゼ欠損が正常に戻せるのかを試みCHS治療法への適用の可能性を検討した。また，骨髄内での成

熟好中球と好中球前駆体を組織化学的，酵素生化学的に定量分析し，CHS好中球の実質機能を有する細胞自体のLife-cycleと，各成熟段階での機能タンパク質の存在を検証した。最後に，最近になって筆者により発見された，好中球の2つの重要なプロテアーゼに対する特異的な阻害物質がCHSマウスの同じ好中球内に存在する事実を紹介し，CHSとの具体的な関係を議論してみる。

## 研究材料と方法

実験動物として，正常マウスC57BL/6J（＋/＋），ベイシュ・マウスC57BL/6J（$bg^J$/$bg^J$）それに$F_1$と呼ばれる，C57BL/6J（＋/$bg^J$）を購入し，本研究者の開発した，動物腹腔内への銅線の挿入により，成熟好中球を腹腔内に誘導する。腹腔内に誘導された細胞は，Ficoll-Paqueによる密度勾配遠心で，細胞の種類により分離される。この方法で集められた好中球は，超音波破砕により細胞内容物を抽出するための処理が施され，この抽出物を用いてプロテアーゼをはじめとする様々な酵素活性，およびプロテアーゼの阻害活性を定量する。

腹腔中に誘導された成熟好中球と，その前駆細胞として骨髄中に存在している未成熟の好中球，および血液中の成熟好中球のエラスターゼ活性についても，正常マウスとベイジュ・マウスとの各々の好中球を取り出し，活性量を比較した。さらに，銅線により骨髄内に誘導された，成熟好中球と，その前駆細胞として骨髄中に存在している未成熟の好中球の割合を定量的に検証し，0日から6日までの時間経過の中でのエラスターゼの活性を，正常マウス，CHSマウスについて調べた。また，エラスターゼの酵素活性を，ナフトール・クロロアセテートを基質に用い，酵素組織化学的に染色することで，骨髄中の好中球内でのエラスターゼ活性の定量化を図り，さらに好中球を5つの成熟段階に分け，各々の段階での酵素量を調べた。

ベイジュ・マウス（CHSマウス）での，エラスターゼ活性の回復を検証するため，骨髄移植を正常マウスとベイジュ・マウスの間で行ない，ベイ

ジュ・マウスの好中球での，エラスターゼを含む酵素の正常レベルへの回復の有無を調べた。

さらに，ベイジュ・マウス好中球抽出物が，正常マウスの好中球のエラスターゼ活性阻外の作用を示すことから，ベイジュ・マウスの好中球抽出物を，人好中球エラスターゼ（HNE）に対しても作用させ，阻害効果を調べた。

人好中球エラスターゼを，ベイジュ・マウス好中球に存在する阻害物質を検証するためのマーカーとして用い，正常マウス及びベイジュ・マウス好中球の抽出物を高速液体クロマトグラフィーを用い，ゲル濾過し，ベイジュ・マウス好中球より阻害物質を分離し，その分子の大きさと，性状を検討した。

人好中球エラスターゼを放射性ヨウ素[$^{125}$I]で標識し，正常マウス及びベイジュ・マウスの好中球の抽出物と混ぜ，タンパク質を変成処理し，SDS－ポリアクリルアミドゲルにより分離した個々のタンパク質について，[$^{125}$I]で標識された反応物を検出し，[$^{125}$I]-HNE* Inhibitor Protein (s)（[$^{125}$I]-HNE* 阻害因子タンパク）の存在を変性剤存在下で予測し，その分子性状を考察した。

## 結果

### ベイジュ・マウス好中球でのエラスターゼ活性低下

生化学的な分析を行うためには，まず多量の材料を集めることから出発するのが常である。正常マウス，ベイジュ・マウス（図1）より多量の好中球を採取するため，マウス腹腔内に銅線を手術で挿入する。24時間後に腹腔内に誘導された成熟好中球の数は，誘導前（約$10^5$個）に比べて100倍近くまで増加している(図2)。なお，誘導された好中球数は，正常マウス，$F_1$マウスとベイジュ・マウスで違いがみられない。腹腔内より回収された好中球は，密度勾配遠心法により，細胞の大きさ，重さにより，他の細胞――マクロファージ，リンパ球，単球など――と，分離され，その後膜成分

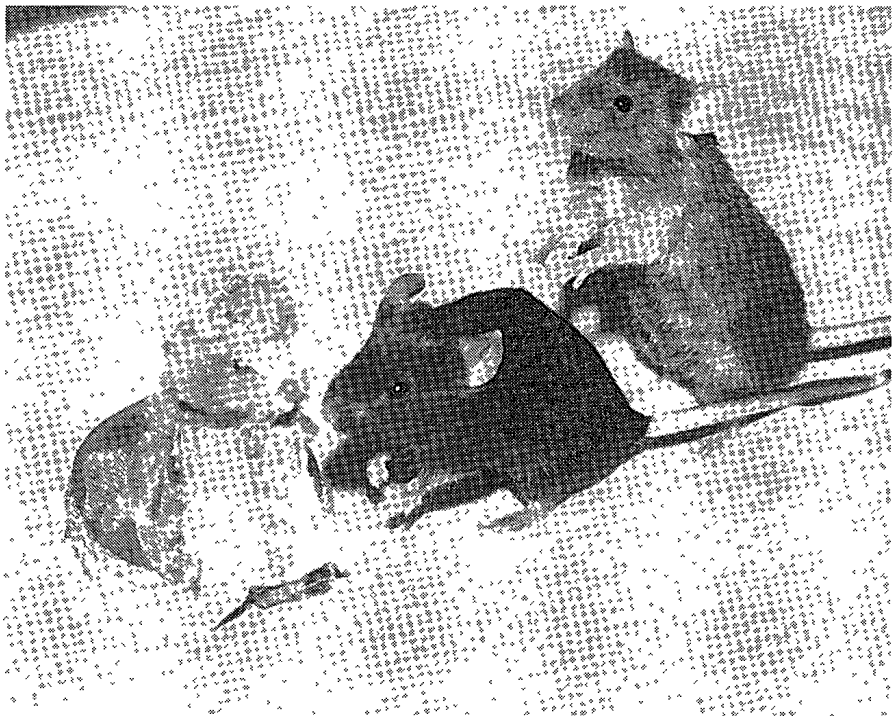


**図1　正常マウス，ベイジュ・マウス**

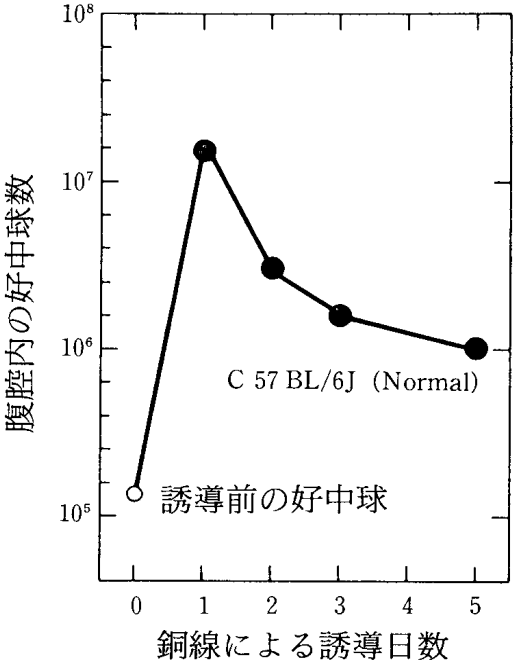



**図2　マウス腹腔内へ銅線による好中球の誘導**

を可溶化するためのトリトンX-100を含む溶液中で，低温下において破壊され，細胞内の内容物が抽出される(図3)。図4で示したように，マウス好中球のエラスターゼ活性は，MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-MCAという4個のアミノ酸を人工的に合成した蛍光の基質を用いて測定された。この基質は，好中球由来のエラスターゼにより，特異的に水解される。これより，等量のタンパク質（タンパク量で，0－100 μg）を加えても，ベイジュ．マウス好中球抽出液では，ほとんどエラスターゼの活性が検出できないことがわかる（図4）。なお，$F_1$マウスの値は，

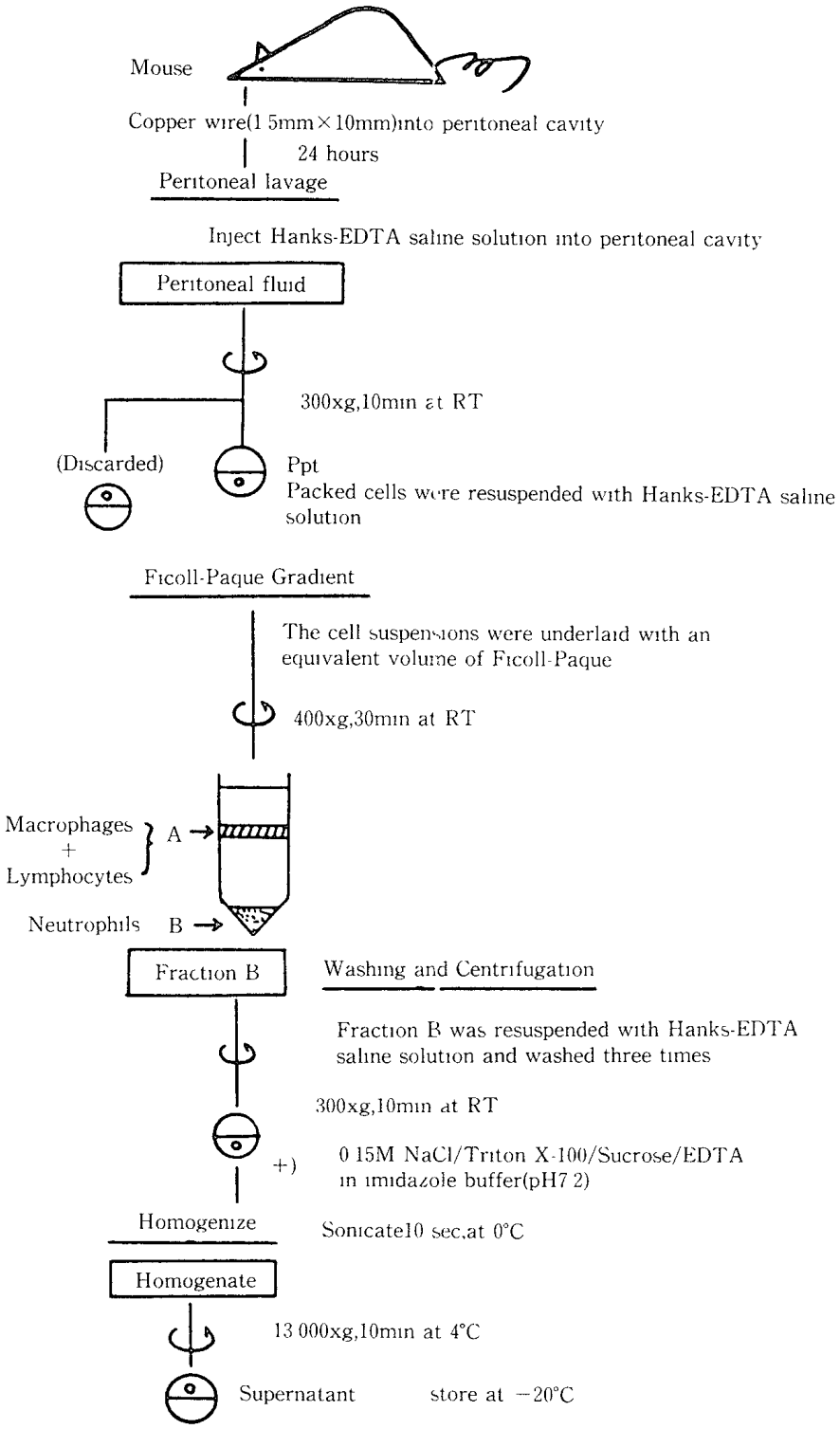
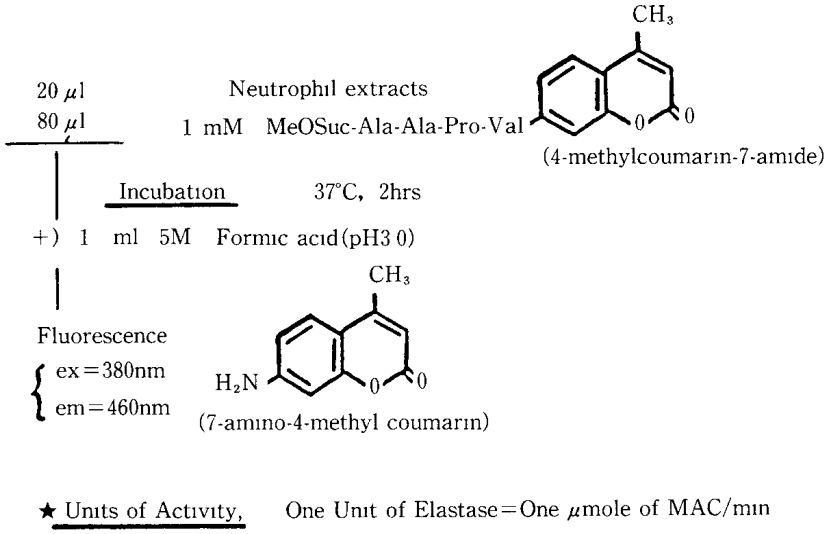



**図3　マウス好中球の精製と抽出物作成**

好中球エラスターゼの測定



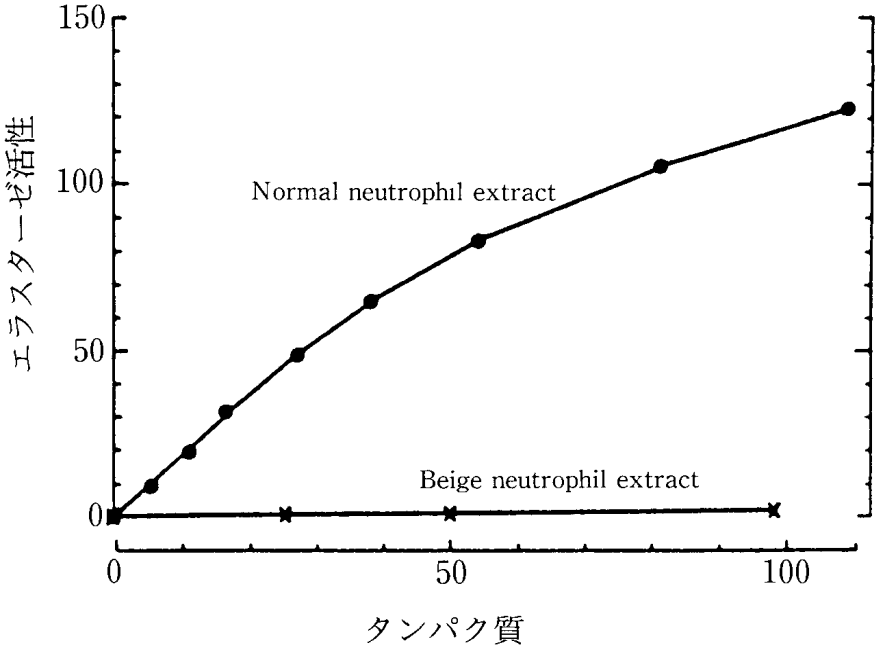




**図 4　平常マウスとベイジュ・マウスの好中球エラスターゼ活性のタンパク量依存性**

正常マウスに近い。

さらに，正常マウス，$F_1$及びベイジュ・マウス好中球抽出液より，エラスターゼを含む様々な酵素を測定した。測定に際しては，特に，好中球中の顆粒の一つであるリソゾーム中に存在が確認されている酵素を対象にし

**表1　正常及びベイジュ・マウス好中球内の酵素活性**

| 酵　　素 | 正常マウス | ベイジュ・マウス |
|---|---|---|
| エラスターゼ | 4.3 | 0.11 |
| カテプシンG | 4.1 | 0.3 |
| カテプシンD | 3.3 | 3.8 |
| β－グルクロニダーゼ | 7.2 | 10.0 |
| マイロパーオキシダーゼ | 2.5 | 3.2 |

た。カテプシンD,β－グルクロニダーゼ，マイロパーオキシダーゼの活性は，正常マウス，ベイジュ・マウスとも変わらないが，エラスターゼ，それにエラスターゼとよく性質の似ているカテプシンGの活性が，ベイジュ・マウスでは正常値に比べて，それぞれ1/40，1/14と，きわめて低い値を示した（表1）。

**ベイジュ好中球の成熟過程でのエラスターゼ活性**

腹腔内に誘導されたベイジュ・マウス好中球は，エラスターゼ活性を欠くが，成熟した好中球は，骨髄中でまず前駆体として現われ，ながい時間をかけて成熟過程を経て，やがて血流に入り，組織へと流れていくのである(図5)。ベイジュ・マウス好中球よりエラスターゼ活性が検出されなかったことより，タンパク分解酵素としての，好中球エラスターゼが成熟前の前駆体好中球を含むベイジュ・マウス骨髄中で，タンパク質として合成されていたのかどうかを調べた(表2)。これによると，正常マウスに比べて，ベイジュ・マウス骨髄中の好中球エラスターゼ活性は，58%ほどと低い値を示したが，それでも，腹腔中に誘導されたベイジュ・マウス好中球は，骨髄中ではエラスターゼ活性を保持していることが明らかになった（表2）。

そこで，銅線で誘導された正常及びベイジュ骨髄中で，成熟好中球と，その前駆細胞として骨髄中に存在している未成熟の好中球の割合を定量的に検証し，0日から6日までの時間経過の中でのエラスターゼの活性を，

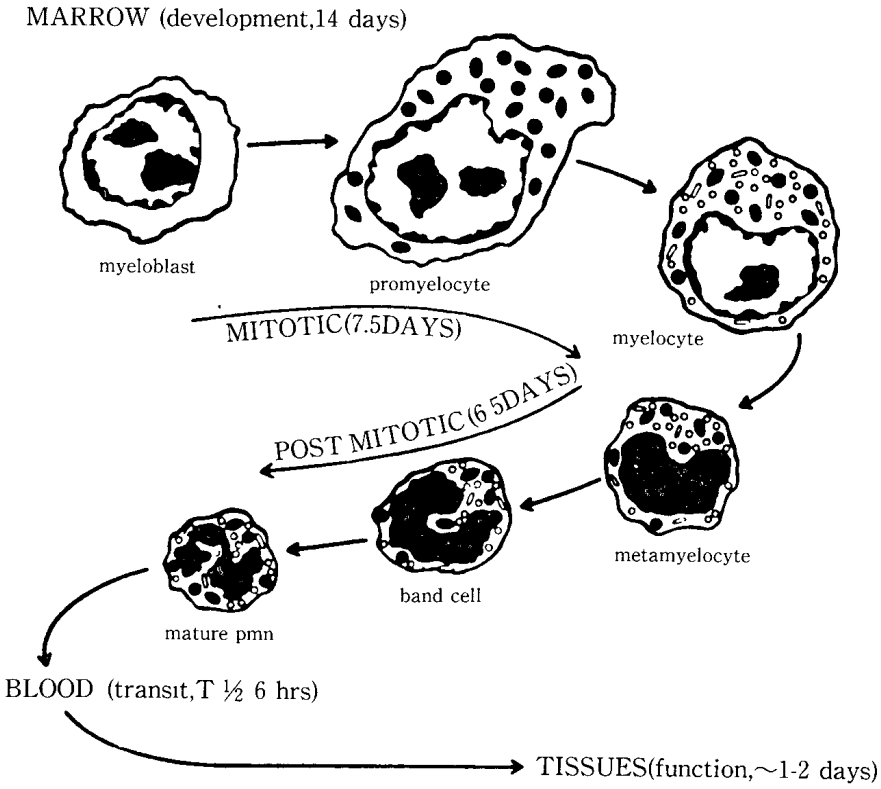



**図 5　好中球の一生**

好中球は，骨髄内 (marrow) で成熟し，やがて血流中に放出され，様々な組織の中へ移動していく。血液細胞として成熟してからの寿命は，短く～2日間にすぎない。

好中球は，骨髄芽球 (myeloblast)，前骨髄球 (promyelocyte)，好中性骨髄 (myelocyte)，好中性後骨髄球 (metamyelocyte)，さらに初期の成熟段階である，バンド・ステージ (band cell) を経て，好中球 (mature neutrophil,polymorphonuclear neutrophil,PMN) として血流中に放出される。

細胞の大きさは成熟過程を通じて，直径 10－20 $\mu$m であり，前骨髄球 (promyelocyte) で最も大きい。

**表 2　正常及びベイジュ・マウスの腹腔中，骨髄中の好中球エラスターゼ活性**

| 好中球の存在場所 | 正常マウス | ベイジュ・マウス |
|---|---|---|
| 腹腔中 | 4.3 | 0.11 |
| 骨髄中 | 4.4 | 2.5 |

**表3　正常マウス，ベイジュ・マウスの骨髄内に誘導された好中球前駆体，および成熟好中球の，細胞分布の変動とエラスターゼ活性の時間的変化**

| Exp. | Marrow | n | Day | Neutrophils | | Elastase | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Immature | Mature | U/mg protein | Units per neutrophil×$10^7$ |
| | | | | % | | | |
| A | Normal | 5 | 0 | 8 8±0 9 | 40.5±1 8 | 5.25±0.23 | 4.35±0.17 |
| | | 5 | 3 | 16.3±0.8 * | 62.2±1.3 ‡ | 8.05±0.71 § | 4 20±0.32 |
| | | 4 | 6 | 7 7±2.2 | 74 1±2.8 ‡ | 13 00±0 78 ‡ | 6 28±0 53 § |
| B | Beige | 6 | 0 | 6.3±1.2 | 45.6±2.7 | 2.57±0 29 | 2 54±0 14 |
| | | 5 | 3 | 18 6±1.3 ‡ | 60.5±0.7 * | 3 29±0 25 | 2 28±0 27 |
| | | 5 | 6 | 3 9±0 5 | 78 4±1 0 ‡ | 1 84±0 07 | 1.03±0.05 ‡ |

Percent immature neutrophils=100×(immature neutrophils/total marrow cells). Percent mature neutrophils=100×(mature neutrophils/total marrow cells). Immature (Promyelocyte, myelocyte) and mature (metamyelocyte, band, PMN) neutrophils were differentiated under the light microscope after Stat staining Total bone marrow extracts were assayed for elastase activity using the fluorogenic substrate MeO-Suc-Ala-Als-Pro-Val-MCA on the indicated days after implantation of a copper-rod (see Materials and Methods for detail) Total cells per femur were not different on the 3 d Values represent the mean ±SEM.

*$p \leq 0\ 005$
‡ $p \leq 0.001$
§ $p \leq 0.05$

正常マウス，ベイジュ・マウスについて調べ，骨髄中の成熟，未成熟好中球の存在比と酵素量を比較してみた(表3)。これによると，正常骨髄中の好中球エラスターゼ量は，成熟好中球の数に比例して増加がみられるが，ベイジュ骨髄中の好中球エラスターゼ量は，骨髄内成熟好中球数が80%に近い6日目の時点では，0日目に比べて，1/2近くに減少している(表3)。さらに，骨髄中で好中球を5つの成熟段階に分け，各々の段階での酵素量と好中球数の割合を，ナフトール・クロロアセテートを基質に用い，酵素組織化学的にエラスターゼを検出することで定量化した（図6)。

正常マウスでは，myeloblastsという好中球成熟過程を除く残りの4段階で，エラスターゼ活性は3.11−3.35という一定の値を示した。一方，ベ

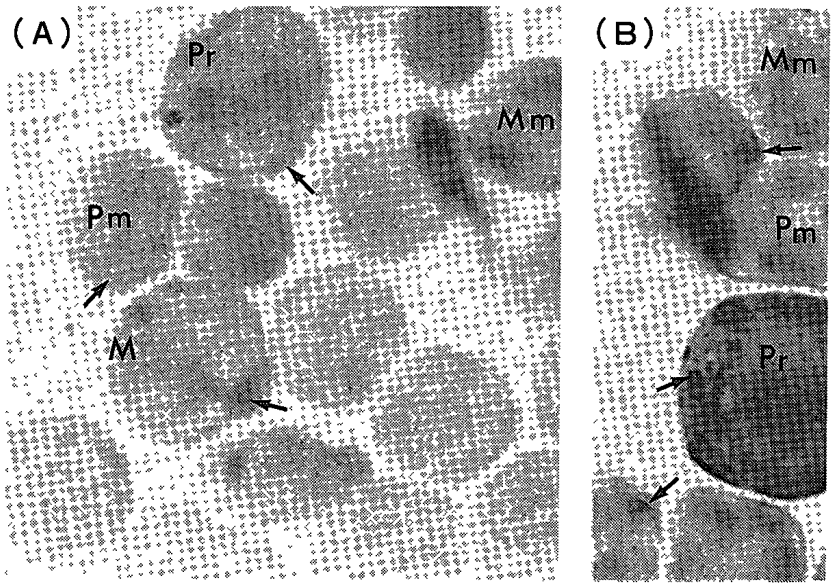



**図 6　正常マスス，ベイジュ・マウスの骨髄好中球エラスターゼ活性**

(A)Normal bone marrow. Marrow cells stained for elastase activity with naphtho AS-D chloroacetate as substrate as described in Materials and Methods. All stages of neutrophil maturation (Pr, promyelocyte; M, myelocyte; Mm, metamyelocyte; Pm, PMN) demonstrate evenly dispersed enzyme activity in very small granules (arrows). (B) Beige bone marrow. Immature neutrophils promyelocytes [Pr] have intense reaction products in giant granules (arrows). Later stages of neutrophil maturation (metamyelocyte [Mm] and PMNs [Pm] ), however, have completely negative or very weak activity.

**表 4　Bone Marrow Enzyme Histochemistry With Naphthol AS-D Chloroacetate Activity Scores**

| Bone marrow | Activity | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Myeloblasts | Promyelocytes | Myelocytes | Metamyelocytes | PMNs |
| Normal | 1 00±0.52 (10) | 3.35±0.25(68) | 3 24±0.07(127) | 3 12±0.04(249) | 3 11±0.05(300) |
| Beige | 0 88±0.30 (8) | 3 28±0.11(74) | 3 28±0.07(118) | 2 89±0.08(299)*‡ | 0 73±0 05(401)§ |

Bone marrow smears from four normal and four beige mice were prepared and naphthol AS-D chloroacetate hydrolytic activity was examined as described in Materials and Methods. The activity score in normal and beige marrow smears was determined microscopically by identifying neutrophil developmental stages and visually grading the intensity of each cell from O to 4+(lowest intensity to highest). Values represent the mean score ± SEM for the number of neutrophils indicated in parentheses.

* Beige myelocytes vs. Beige metamyelocytes, $p \leq 0.01$.

‡ Beige metamyelocytes vs. normal metamyelocytes, $p \leq 0.025$.

§ Beige PMNs vs. Normal PMNs, $p \leq 0.001$.

表5　Percent Distribution of Neutral Proteinase Scores in Bone Marrow PMNs

| Score | Percent with corresponding score | |
|---|---|---|
| | Normal | Beige |
| 0 | 1 | 57 |
| 1+ | 4 | 29 |
| 2+ | 6 | 10 |
| 3+ | 9 | 3 |
| 4+ | 80 | 1 |

Bone marrow smears from normal and beige mice were histochemically stained for neutral proteinase activity (see Materials and Methods and 表4 for details). Individual PMNs were scored for neutral proteinase activity as described in 表4. Numbers indicate the percent of normal or beige PMNs in each score category. 78 normal PMNs and 124 beige PMNs were scored. The values in this table are a representative result form three separate experiments.

イジュ・マウスでは正常マウスに比べ，好中球前駆体 myelocytes のステージですでに，7％のエラスターゼ量の減少がみられ，mature neutrophils では，正常マウスに比べて77％の減少がみられた(表4)。また，正常およびベイジュ・マウスの骨髄中での成熟好中球のうち，78個の正常成熟好中球，124個のベイジュ成熟好中球それぞれについてエラスターゼの定量化を試みたところ，ベイジュ好中球では成熟好中球の86％が酵素保有率で0または，1＋という低い値を示し，平常好中球での値，3＋あるいは，4＋を測定できたベイジュ好中球は，4％にすぎないことがわかった（表5)。

**血流中，腹腔内および骨髄中のベイジュ好中球エラスターゼ**

骨髄で成熟した好中球は血流に出て，それぞれの落ち着き先へ移動する(図5)わけだが，この血流中での好中球エラスターゼを正常マウスとベイジュ・マウスの間でくらべてみた（図7)。血流中でのベイジュ好中球は，正常値に比べて，4％以下のエラスターゼの値を示している(図7)。先の，骨髄中でのベイジュ成熟好中球のエラスターゼの分布を，このデーターに

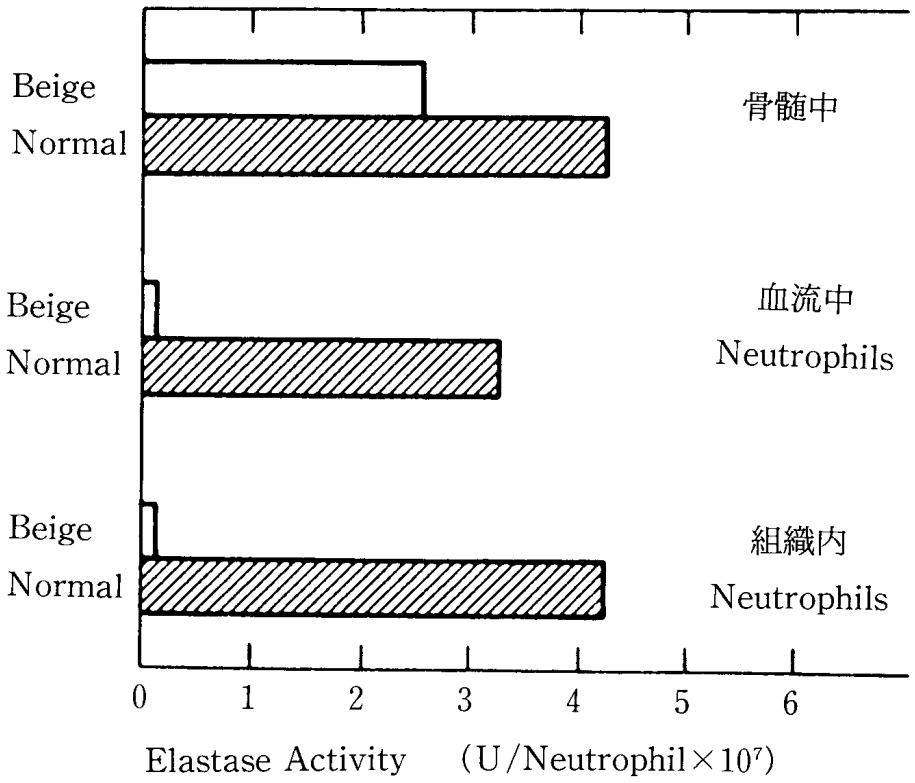



**図7　正常マウス，ベイジュ・マウスの好中球エラスターゼ活性**

加味すると，ベイジュ・マウスでは，骨髄中での好中球前駆体では確かにエラスターゼが産生されているが，成熟段階が進む度に活性は低くなり，完全に成熟した，いわゆる好中球では，エラスターゼの活性は，ほぼ完全に失われ，エラスターゼ活性の喪失は，ベイジュ成熟好中球に究めて特徴的である（表4，表5，図7）。

**ベイジュ好中球内に存在するエラスターゼ活性阻害物質**

これまでの実験結果を総合的に考えると，ベイジュ好中球にエラスターゼの特異的阻害物質存在の可能性が示唆される。そこで，正常マウス好中球抽出液に対して，ベイジュ好中球抽出液を加え，正常マウス好中球エラスターゼの活性を測定した。抽出液の量を変え測定したところ，100 μg のベイジュ抽出液は 18 μg の正常抽出液の持つエラスターゼ活性を 90%除去する効果を示した(図8)。さらに，ベイジュ好中球抽出物の人好中球エラスターゼに対する阻害効果を調べた（図9）。1.2 μg のベイジュ抽出物

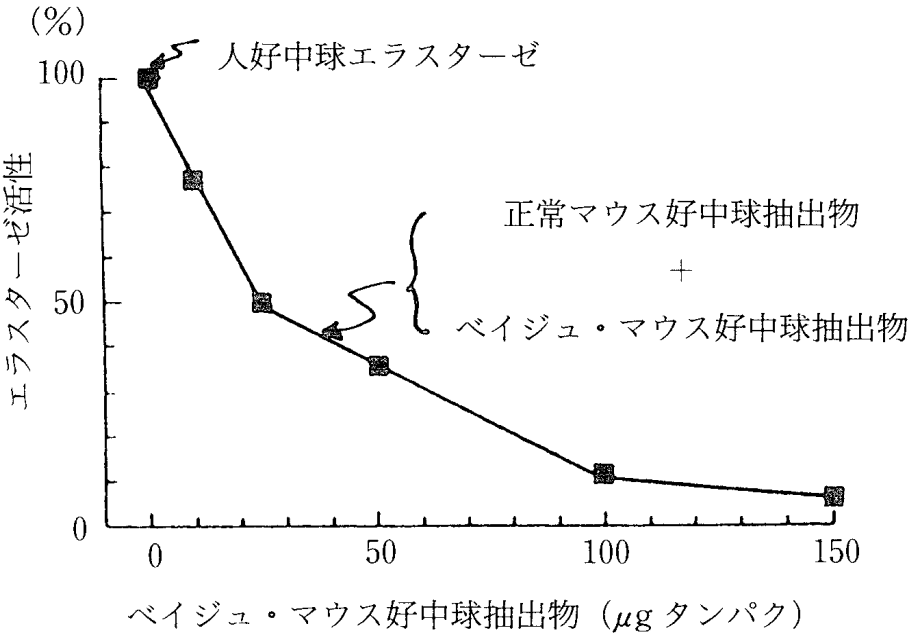



**図8　ベイジュ・マウス好中球抽出画分による正常マウス好中球エラスターゼの活性阻害**

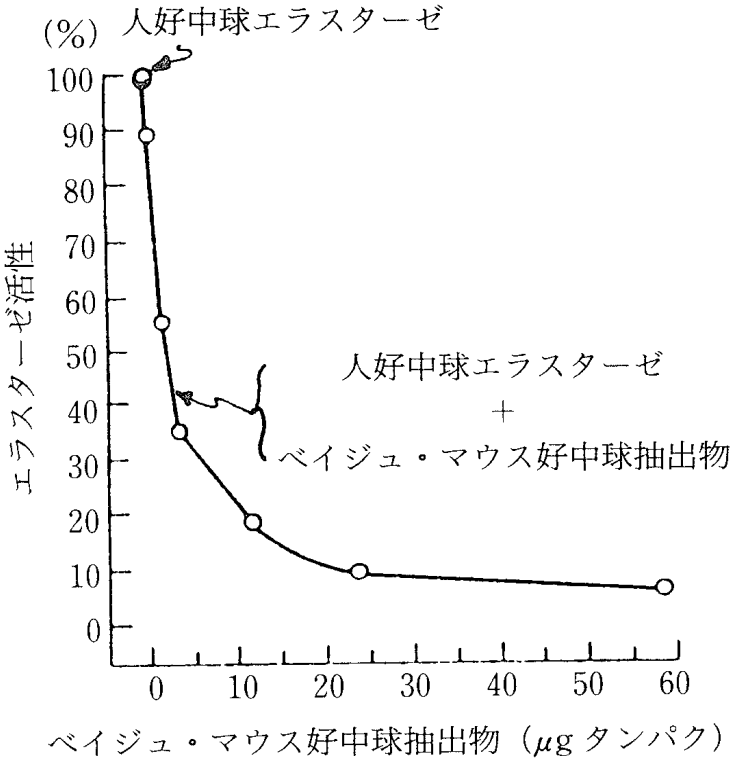



**図9　ベイジュ・マウス好中球抽出画分による人好中球エラスターゼの活性阻害**

は，0.02 μg の人エラスターゼ活性を 50%抑制する効果を示し，20 μg のベイジュ抽出物を加えることで，90%の活性が失われた（図 9）。ところが，このベイジュ抽出物を数分間煮沸すると，エラスターゼに対する阻害効果は失われる。さらに，牛血清アルブミンなどの特異性の低いタンパク質でもエラスターゼの活性阻害は起きないことから，ベイジュ好中球抽出物には，タンパク性のエラスターゼ阻害因子が含まれていると推論できる。これらのデーターに基づき，阻害因子の分子性状，および量的なことを推理してみる。

1.2 μg のベイジュ抽出物が，0.02 μg の人エラスターゼを 50%阻害するという事実と，阻害因子とエラスターゼは，1：1 に対応し複合体を形成と考えれば，分子量およそ 3 万の人エラスターゼと対応する阻害因子の平均分子量は 3 万前後が妥当であろう。これを踏まえて，
約 $10^7$ 個のベイジュ好中球（タンパク量でおよそ 1 mg）で約 10 μg の阻害因子の存在が推定できる。

**人好中球エラスターゼと阻害因子の複合体**

成熟したベイジュ好中球にエラスターゼ活性が検出されず，それでいてベイジュ骨髄中にはエラスターゼ活性が認められ，しかもベイジュ好中球より，人エラスターゼ阻害活性を検出することが出来たことで，ベイジュ好中球内での［エラスターゼ＊阻害因子］複合体の存在が疑われた。そのために，人エラスターゼを[$^{125}$I]－で標識し，[$^{125}$I]－HNE を作り，マウス好中球の抽出物と反応させ，反応物の性状を SDS－PAGE で解析した（図 10）。

[$^{125}$I]－HNE は，分子量 28,000 で検出されたが，[$^{125}$I]－HNE＋ベイジュ好中球では，分子量 64,000 と 52,000 の二つの複合体が，電気泳動後のゲルをX線フィルムの上に感光させることで検出された（図 10）。人好中球エラスターゼは [$^{125}$I]－HNE として処理後も活性を維持し，分子量も 28,000 と同定されることより，ベイジュ好中球の，分子量 36,000 と 24,000 の二つのタンパク質が HNE との複合体形成に関与する阻害因子であると

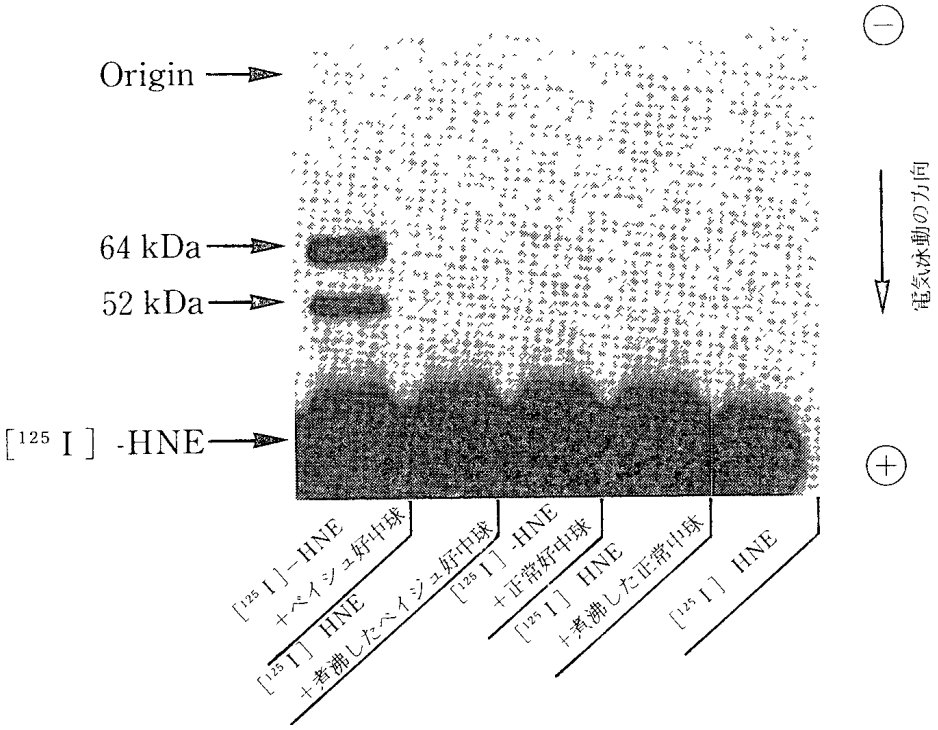
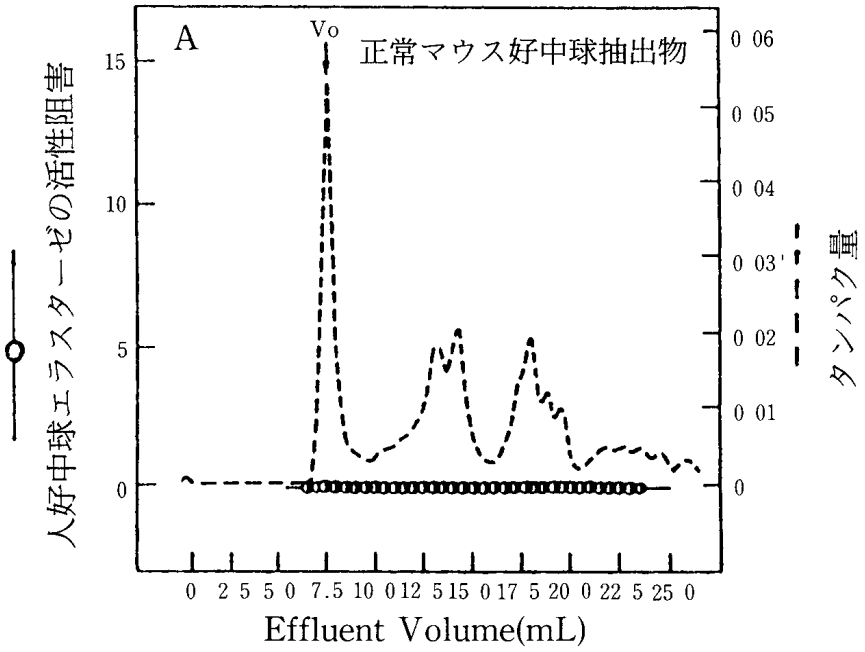



**図10　マウス好中球内容物と［$^{125}$I］−HNEの複合物のSDS−PAGEによる解析**

推定できる（図10)。

## ベイジュ好中球の人エラスターゼ活性阻害

ベイジュ好中球の抽出物を，タンパク質非変成下で，Superose 12というカラムの上でゲルろ過を行った（図11)。溶出された各分画は，人エラスターゼ活性阻害を指標に，活性への阻害効果が分析定量された(図11)。また，コントロール実験として行った正常マウス好中球抽出物のカラムから溶出された分画にたいしても，同様な処理がなされた(図11)。ゲルろ過による分子量推定標準物を基準に，このカラムから溶出されたベイジュ好中球のエラスターゼ阻害因子の分子量を推定すると，分子量36,000と24,000の二つのエラスターゼ阻害物を分離同定することが出来た(図11)。



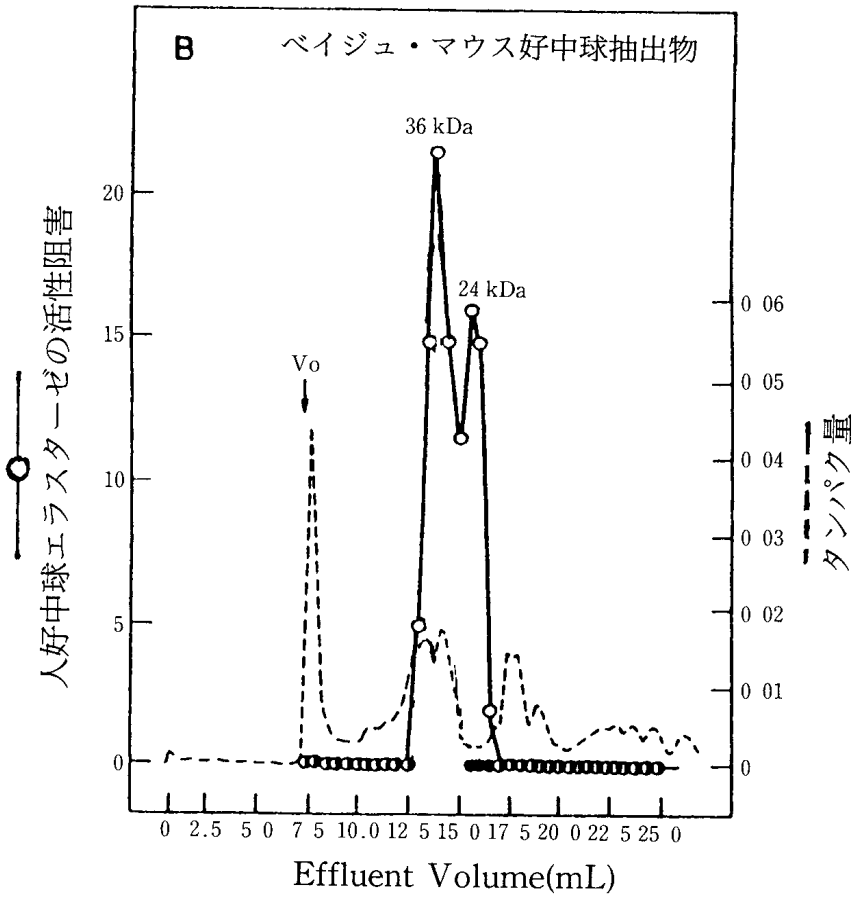




**図 11　Superose 12　クロマトグラフィーによる**
**ベイジュ・マウス好中球由来のエラスターゼ阻害物質の分析**

## 結果の考察

人チェダク・ヒガシ病（CHS）のモデル動物としてしられているベイジュ・マウスの好中球では、生体防御機構に重要な役割を担うタンパク分解酵素のエラスターゼ活性が選択的に欠損している。しかし，この種の好中球エラスターゼは，骨髄中で検出可能であることが解り，エラスターゼはベイジュ好中球の前駆体でタンパク質として合成されていることが今回，確認された。さらに，ベイジュ好中球抽出物は，正常マウスの好中球エラスターゼばかりでなく，人好中球エラスターゼに対しても阻害効果を示す。このことは，ベイジュ好中球には，エラスターゼに対する阻害物質が存在し，これらの結果を合わせると，ベイジュ・マウスでは好中球の活性部位が，この阻害物質でブロックされており，そのためエラスターゼの活性発現が起こらない可能性が考えられる。事実，今回はじめて確認されたベイジュ成熟好中球での，36,000と24,000の二つの阻害因子の存在は，タンパク分解酵素とその阻害物質が同じ細胞内に存在しており，必要なときに制御機構が働くという視点から注目に値する。先に指摘した，このチェダク・ヒガシ病の特徴である様々な細胞内での巨大顆粒存在は，各々の顆粒を保護する膜の異常が原因でお互いが非常に融合しやすい状態を作り出し，そのために通常の制御機構が働かず，本来別々の機能を有する二つのタンパク質を共存させる結果になったのかもしれない。従来この病気は遺伝病であるが，今回報告した好中球エラスターゼ欠損に関していえば，次の二点から，第一義的な意味での遺伝子欠損をあてはめることは出来ない。

まず第一に，エラスターゼ，カテプシンGという二つのタンパク分解酵素がベイジュ・マウスでは選択的に欠損している。

第二には，$F_1$・マウスでのエラスターゼの値は，正常値である。

この事実に基づくと，まずなされるべき今後の研究課題は骨髄中でのエラスターゼ産出時期と阻害因子形成のタイミングの検討，および各々の遺伝子発現時期の検討ということになろう。

ここでは，血液細胞の一つである好中球に焦点を合わせ，人遺伝病であ

るチェダク・ヒガシ病の原因解明のための医学生化学的な実験の実例をモデル動物であるベイジュ・マウスにより紹介した。我々の研究方法は，エイズ，アルッハイマー病の研究分野にも影響を与えており，実際にその方面からの報告も最近多くなってきている[10,11]。

## 謝辞

この研究のための実質的な研究費は，アメリカ NIH の研究助成（HL－31698）による。今回まとめをするにあたり，平成5年度北海道研究開発支援事業，さらに，平成5年度，平成6年度北海学園学術研究助成に感謝する。また，研究継続への理解と，研究室の提供，さらに研究費の提供を申し出て下さった，北海道大学薬学部，横沢英良教授，サッポロ産機社長，出口吉孝氏にお礼申し上げる。

最後に，アメリカでの13年間の研究生活を支えてくれた妻と2人の娘に，心から感謝する。

## 参考文献

(1) Higashi, O. 1954. Congenital gigantism of peroxidase granules. The first case ever reported of qualitative abnormality of peroxidase. Tohoku. J. Exp. Med. 59: 315- 332.

(2) Chediak, M. 1952. Nouvelle anomalie leucocytaire de caractere consistitutionnel et familial. Rev. Hematol. 7: 362- 367.

(3) Beguez-Cesar, B.A. 1943. Neutropenia cronica maligna familiare con granulaciones atipicas de los leucocitos. Bol. Soc. Cuban Pediatr. 15: 900- 922.

(4) Sato, A. 1955. Chediak and Higashi's disease. Probable identity of "a new leucocytal anomaly (Chediak)" and "congenital giantism of peroxidase granules (Higashi). " Tohoku J. Exp. Med. 61: 201- 210.

(5) Takeuchi, H.K., Wood, H., and Swank, R.T. 1986. Lysosomal elastase and cathepsin G in beige mice. Neutrophils of beige (Chediak-Higashi) mice selectively lack lysosomal elastase and cathepsin G. J. Exp. Med.

163: 665- 677.

(6) Takeuchi, H.K., McGarry, M.P., and Swank, R T. 1987. Elastase and cathepsin G activities are present in immature bone marrow neutrophils and absent in late marrow and circulating neutrophils of beige (Chediak-Higashi) mice. J. Exp. Med. 166: 1362- 1376.

(7) Takeuchi, K.H., and Swank, R.T 1989. Inhibitors of elastase and cathepsin G in Chediak-Higashi (beige) neutrophils. J. Biol. Chem. 264: 7431- 7436

(8) Penner, J.D., and Prieur, D.J. 1987. Interspecific genetic complementation analysis with fibroblasts from humans and four species of animals with Chediak-Higashi syndrome. Am. J. Med. Genet. 28: 455- 470.

(9) Barak, Y., and Nir, E. 1987. Chediak-Higashi Syndrome. Am.J. Pediatr. Hematol. Oncol. 9: 42- 55.

(10) Gougeon, M-L., and Montagnier, L. 1994. Apoptosis in AIDS. Science 260: 1269- 1270.

(11) Bush, A.I., Pettingel, W.H., Multhaup, G., Paradis, M.d., Vonsattel, J-P., Gusella, J.F., Beyreuther, K., Masters, C L., and Tanzi, R.E. 1994. Rapid induction of Alzheimer's Ab amyloid formation by zinc. Science 265: 1464- 1467.

(12) Snider, G.L., Lucey, E.C., and Stone, P H. 1986. Animal Models of Emphysema Am. Rev. Respir. Dis. 133: 149- 169.

(13) Vassalli, J.D., Granelli-Piperno, A., Griscelli, G., and Reich, E. 1978 Specific protease deficiency in polymorphonuclear leukocytes of Chediak-Higashi syndrome and beige mice. J. Exp. Med 147: 1285- 1290.