

平成 22 年度修士論文

IgA 腎症のための IgA 産生バランス制御法の開発



三重大学大学院工学研究科

博士前期課程 分子素材工学専攻

篠原紀子

## 目次

1. 緒言 .....	1
1-1 腎不全とIgA 腎症	
1-1-1 IgA 腎症のメカニズム	
1-1-2 IgA 腎症の診断方法	
1-1-3 IgA 腎症の治療方法	
1-2 IgA,IgA1 の構造	
1-2-1 免疫グロブリン	
1-2-2 IgA	
1-2-3 IgA1 と糖鎖不全 IgA1	
1-3 免疫におけるリンパ球の働き	
1-3-1 免疫のしくみ	
1-3-2 B 細胞の分化と抗体産生のしくみ	
1-3-3 B1 細胞とB2 細胞	
1-4 Jacalin (IgA1 特異結合性レクチン)	
1-4-1 レクチン	
1-4-2 Jacalin	
1-5 免疫と Jacalin の関係	
1-6 目的	
2. 方法 .....	15
2-1 Jackfruit からの Jacalin の抽出、精製	
2-1-1 Jacalin の抽出	
2-1-2 Jacalin の精製	
2-2 ヒト末梢血から PBMC の分離、培養、培地の回収	
2-3 B cell の分離、培養	
2-3-1 B cell の分離	
2-3-2 B cell の培養、培地の回収	
2-4 ELISA IgA・IgG 産生	
2-4-1 ELISA IgA	
2-4-2 ELISA IgG	
2-5 Flow Cytometry	
2-6 Fluoroscintin-Jacalin の作製	

## 2-7 末梢血の溶血

## 3. 結果 .....33

### 3-1 Jacalin

#### 3-1-1 Jacalin の回収率

#### 3-1-2 Jacalin の産生量や種の総重量などの相関

### 3-2 PBMC の IgA・IgG 産生

### 3-3 B cell の IgA・IgG 産生

### 3-4 CD4<sup>+</sup>PBMC の IgA・IgG 産生

### 3-5 Jacalin の結合能

### 3-6 リンパ球の表面抗原と IgA 発現の様子

#### 3-6-1 T 細胞表面の表面抗原

#### 3-6-2 培養後の PBMC 中の B 細胞の IgA 発現

### 3-7 健常者と患者の IgA 濃度・B1 cell と B2 cell の IgA 発現

#### 3-7-1 IgA 濃度

#### 3-7-2 B 細胞中の IgA 発現の割合

## 4. 考察 .....60

### 4-1 Jacalin の抽出・精製

### 4-2 IgA・IgG 産生

### 4-3 IgA 発現

### 4-4 IgA 産生部位

### 4-5 Jacalin の免疫系に与える影響について

### 4-6 今後の Jacalin の治療への応用

## 5. 結論 .....69

## 6. 今後の展望 .....69

## 7. 参考文献 .....70

## 8. 謝辞 ..... 72

## 1. 緒言

### 1-1 腎不全と IgA 腎症

腎不全は腎臓が機能低下または機能不全を起こす病気である。大きく2種類あり、数日から数週間という短いスパンで腎機能が急速に低下する急性腎不全と、数か月から数年という長いスパンで腎機能がじわじわ低下していく慢性腎不全がある。腎不全へと至る主な原因疾患の一つに腎臓の炎症、いわゆる腎炎によるものがあり、現在までに様々な症状が確認されている。腎炎を放置しておくで体内の毒を排出できなくなる尿毒症へと進行し、最終的に腎不全へと至る。

一方、IgA 腎症とは、糸球体メサンギウムに IgA を中心とする免疫複合体の沈着が認められるのが特徴で、メサンギウムに増殖性病変が見られる。大人の慢性腎炎の中で最も多い疾患である。原発性糸球体腎炎の 20-30% (成人の 30%、小児の 20%) を占める。発生率は、10-20 歳代が多い。多くの患者が健康診断などの偶然の機会に尿検査によって異常が発見されるケースが多い。<sup>(1)</sup> IgA 腎症は、いわゆる難病 (特定疾患) 難治性疾患克服研究事業の1つである。この難病といわれる病気は 121 種類あり、症例数が少なく、原因不明で治療方法も未確立であり、かつ生活面で長期にわたる特定疾患について研究班を設置し、原因不明、治療方法の確立に向けて研究を行うものである。IgA 腎症は、初期段階は無症状のために、症状が悪化するまで気が付かないことも多い。この病気の原因は未だ不明で、現在、炎症の原因・メカニズムが解明されつつあるものの、それに対する有効かつ安全な治療法が確立されていない。したがって、IgA 腎症患者に対して、より発症確認の確実性の高い診断方法、および有効かつ簡易で安価な治療方法の確立が望まれている。



### 1-1-1 IgA 腎症のメカニズム

原発性糸球体腎炎の多くは、免疫学的機序により発生する。液性免疫と細胞性免疫のいずれも関与するが、液性免疫が病因として関与する糸球体腎炎は免疫複合体腎炎と抗糸球体基底膜抗体腎炎の2つの発生機序が提唱される。前者では、流血中で抗原と抗体の免疫複合体が形成され、これがメサンギウムや糸球体基底膜の上皮下、内皮下、基底膜下に沈着する。あるいは、糸球体基底膜にまず抗原が沈着し、その抗原に血中の抗体が結合して、免疫複合体が形成される場合もある。

免疫複合体が Fig.1-1 のメサンギウムに沈着するとメサンギウム細胞の増殖が起こり、この結果、糸球体血管腔の減少、腎血流の減少、糸球体機能の減少を引き起こす。また、免疫複合体の沈着により、メサンギウムから Interleukin-1(IL-1)、Interleukin-6(IL-6)、Interleukin-8(IL-8)、Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)、Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、(TNF- $\alpha$ )などのサイトカインや (Monocyte Chemotactic Protein-1) MCP-1、(Regulated on Activation normal T cell Expressed and Secreted) RANTES などの走化因子が放出され、これらがメサンギウム細胞自体の増殖、基質の産生増加、炎症細胞の浸潤を引き起こす。

マクロファージやメサンギウム細胞からのタンパク質分解酵素の放出は糸球体基底膜の障害を起こし、血尿やタンパク尿の原因となっている可能性がある。増殖したメサンギウム細胞はコラーゲンフィブロネクチンなどのメサンギウム基質を産生し、メサンギウム領域を拡大させて、毛細血管やボーマン腔を狭め、ろ過能を低下させ、糸球体硬化を進行させる。

糸球体内の内圧はろ過を行うために 50mmHg 程度である。この内圧に対抗して糸球体の構造を維持しているのが、メサンギウム細胞である。メサンギウム細胞同士は繊維性タンパク質で固定しあっている。このメサンギウム間の繊維性タンパク質が存在する部分をメサンギウム基質という。メサンギウム細胞は平滑筋細胞のように収縮能を有する。また血液とメサンギウム細胞の間には基底膜のようなバリアがなく、血液中の物質がメサンギウム細胞に到達でき、作用することもできる。メサンギウム細胞は糸球体毛細血管に突起を伸ばし、メサンギウムの収縮は糸球体毛細血管径を変化させる。メサンギウム細胞は糸球体基底膜も固定している。したがって、メサンギウム細胞の異常は糸球体の構造、機能に大きな影響を与える。

糸球体障害によって機能している糸球体が減少すると残在している糸球体には糸球体高血圧、糸球体過剰ろ過が生じる。この結果、前述のさまざまなサイトカイン、走化性因子の産生が刺激され、糸球体硬化、尿細管間質の繊維化が引き起こされ、腎不全が進行していく。<sup>(2)</sup>

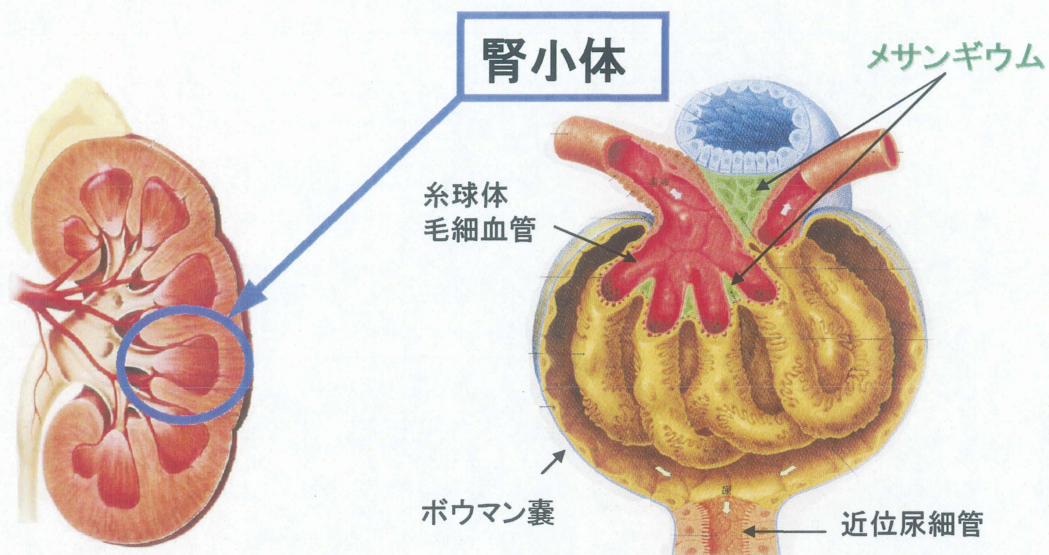


Fig. 1-1 腎臓と腎小体の図<sup>(3)</sup>

### 1-1-2 IgA 腎症の診断方法

現在の主流な診断方法にはいくつかあり、簡易的な方法では検尿と血液検査がある。この診断方法では、健康診断などで発見される尿タンパクが一日 1.0g 以上であることと、血液検査で成人の場合、血清 IgA 値 315mg/dl 以上であることで IgA 腎症の確立が高いと判断される。この方法はあくまで簡易的であり、さらに確実に発見するには腎生検による組織診断を行う。腎生検は trucut 針や silverman 針修飾型などを用いた針生検が主流で、この針で直接腎臓から組織を採取して腎糸球体のメサンギウム基質を観察し症状を判断する。腎生検では、生検後の針を刺した部位の圧迫止血、長時間の絶対安静や捕液による尿量の保持といったものにより 1～2 日間は、厳重な経過観察が必要であり、患者への身体的負担が非常に大きい。



### 1-1-3 IgA 腎症の治療方法

現時点では本症に対する根本的な治療法はなく、対症療法が行われている。具体的には、食事療法、運動制限による治療、薬物療法、扁桃腺摘出などがある。最近では、扁桃腺摘出とステロイドパルス療法の併用が良い成績をあげている。

薬物療法は高血圧には、アンジオテンシン変換阻害薬(ACE-I)、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬(ARB)やCa拮抗薬を用いる。<sup>(2)</sup>予後比較的不良群では抗血小板薬、ステロイド薬、抗凝固薬を投与する。しかし、このうち、副腎皮質ステロイドの副作用は多種多様であるうえに、一般の薬剤より高頻度に発現する。特に、大量投与中は感染症にかかりやすいことが問題となるため、外来管理できるようになるまでは入院管理が必要となる。加えてステロイド剤は、使用した期間が長ければ長いほど慎重に減量をしなければいけない。減量することによって、症状が再び現れるのを防ぐということが重要になるからである。

また、ステロイドを服用中に外科手術や抜歯などの治療を受ける時にはストレスなどで体内のステロイド必要量が増えるので、一時的な増量が必要である。<sup>(3)</sup>また、ステロイド投与が長期に渡る場合は骨粗鬆症、大腿骨頭腐性破壊、白内障、続発性副腎機能不全などにも注意が必要となる。ステロイド剤の使用が難しいのは、対処療法であり、治療効果と副作用のバランスをどう取るのかの判断が難しいからである。

このように副作用が強く、また全ての患者に薬物療法が有効ではないため、効果的な治療方法の開発が望まれる。

## 1-2 IgA,IgA1 の構造

### 1-2-1 免疫グロブリン

生体防御において重要な抗体の役割は、以下のような機能によって病原体の排除に寄与する。その機能とは、中和抗体は、病原体や様々な毒素を直接不活性化し、ヒト細胞と反応できないようにすることである。例えばウイルスに対する中和抗体は細胞への侵入に必要な部分と結合し、細胞への侵入を阻止する。

抗体は、定常領域と可変領域がある。可変領域は、抗体によってアミノ酸配列が異なる。この可変領域が抗原決定基を持ち、抗原と結合する。定常領域は、免疫系の他の細胞と結合する。

抗体は、IgA、IgD、IgG、IgM、IgE の 5 種類が存在するが、抗原との反応後に最初に産生されるのは、IgM である。免疫応答が進行するとクラススイッチと呼ばれる現象が起きて H 鎖の遺伝子の組み換えが起こり、IgA や IgG などの様々な抗体が産生される。

IgA は、単量体と二量体が存在する。単量体 IgA は、リンパ節や脾臓の形質細胞によって産生され、血液中にも分泌する。二量体 IgA は、J 鎖によって結合しており、粘膜下のリンパ組織で産生され、腸管内で重要な抗体である。腸管の粘膜は、口などから入ってきた抗原と接する機会が多いため、腸管などは表面積が広く、1 日の産生量も多い。1-2-2 でも詳しく説明をする。

IgG は、血液やリンパなどで1番多い抗体である。血液やリンパを循環している。

IgM は、病原体に対する免疫応答で最初に産生される抗体である。IgG と同じように血液やリンパを循環している。

IgE は、主に通常害のない抗原、例えば食物や花粉などに対してアレルギーや喘息を引き起こす。

IgD は、詳細については分かっていない。

### 1-2-2 IgA

IgA は外分泌液中の主要な免疫グロブリンで、浸入する病原体の抗原決定基に結合して上皮細胞に付着するのを防ぐ役割を担う。涙、唾液、鼻汁、腸や気管の分泌液中、あるいは初乳中に多く見られるが血清中にも存在する。また、1日の間に作られる量は、抗体の中でも一番多い。血清中の濃度は 1.4~4.0mg/ml で、単体は分子量約 160kDa である<sup>(5)</sup>。免疫グロブリンは 2 つの同じ M.W.23kDa 程度の軽鎖(L鎖)と M.W.53kDa~75kDa 程度の重鎖(H鎖)から成る。この 4 つのサブユニットはジスルフィド結合(S-S 結合)と非共有結合で集まって Y 字型の対照的な二量体構造をとる。この Y 字型の二つの先端部分には抗原認識部位がある。Y 字型の根幹部分には柔軟な構造を有するヒンジ部位と呼ばれる部位があり、Y 字の下部分は M.W.20kDa 程度の J 鎖と呼ばれる部位がある。IgA は J 鎖でジスルフィド結合を介して単量体~3 量体の構造を形成する。

### 1-2-3 IgA1 と糖鎖不全 IgA1

human IgA には IgA1 と IgA2 の 2 つのサブクラスが存在している。一般に糖タンパクとアミノ酸の結合様式は N-グリコシド結合であるが、IgA1 の場合は O-グリコシド結合で結合している。IgA1 のヒンジ部位の糖ペプチド部位はプロリン 9 残基、セリン 5 残基、スレオニン 4 残基から構成されており、Fig. 1-2-3 a のようにセリンもしくはスレオニンに O-グリコシド結合で糖鎖が結合している。結合している糖鎖の基本骨格はアミノ酸側から N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、ガラクトース(Gal)、シアラル酸(NANA)の順に外側に向かって結合している。その結合様式は、Gal-NAc はセリン又はスレオニンの残基と結合し、Gal は GalNAc と  $\beta$ -1,3 結合、NANA は GalNAc と  $\alpha$ -2,6 結合、Gal と  $\alpha$ -2,3 結合している<sup>(6)</sup>。Fig. 1-2-3 b のように、糖鎖が一部欠落している IgA1 を糖鎖不全 IgA1 という。<sup>(6)</sup>この糖鎖形成が何によって形成されているかまだ分かっていない。

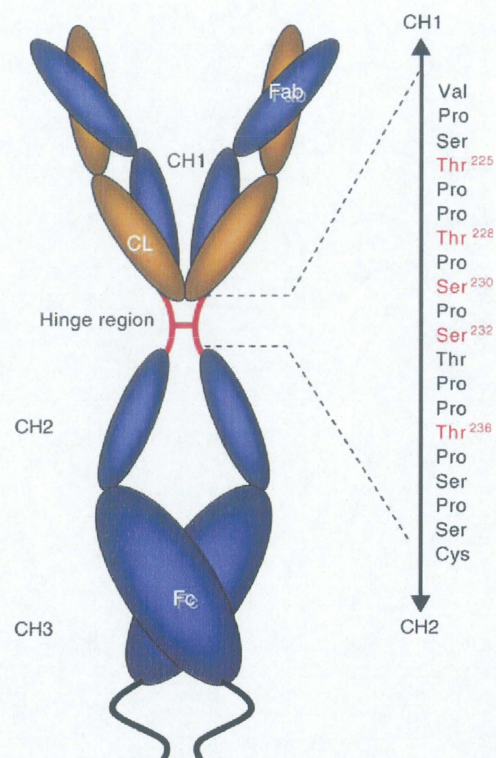


Fig. 1-2-3 a IgA1 の構造とヒンジ部位アミノ酸配列<sup>(7)</sup>

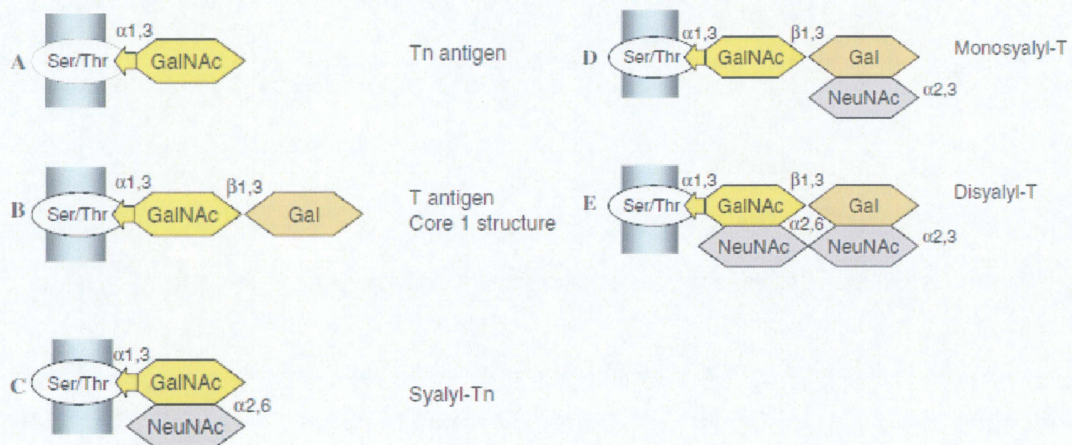


Fig. 1-2-3 b IgA1 に存在する糖鎖不全の種類<sup>(7)</sup>



## 1-3 免疫におけるリンパ球の働き

### 1-3-1 免疫のしくみ

免疫とは細菌やウイルスなどの侵入に対して抵抗性を獲得してこれを排除する機構のことをいう。免疫には抗原非特異的で免疫学的に記憶されない自然免疫、抗原特異的で免疫学的に記憶される獲得免疫に大別される。

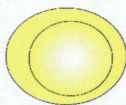
獲得免疫は免疫応答によって得られるが、抗体が主となる体液性免疫で、主に関与する細胞はマクロファージとリンパ球である。リンパ球には胸腺で作られる T 細胞と骨髄で作られる B 細胞とがあり、T 細胞はさらに働きの違うヘルパー T 細胞(Th)と細胞傷害性 T 細胞(CTL)に分類される。

免疫のはたらきは、抗原の刺激が引き金になってはじまる細胞間の連鎖反応的な情報(シグナル)交換をもとに現れ、あるいは抑えられる。また、免疫の最も特徴的で重要なはたらきは、自己と非自己を識別して非自己を選択的に攻撃することである。さらに、免疫の成り立ちの大きな特徴は、リンパ球の分化の様式の中に見られる。すなわち、細胞分化の最終のステップが外来の抗原との接触によって進むことにある。リンパ球はほかの血液細胞とともに、発生の過程と発生が終わって成熟した細胞となった段階のいずれにおいても、血管とリンパ管を通して活発に移動する。

### 1-3-2 B 細胞の分化と抗体産生の仕組み

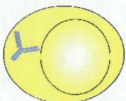
B 細胞の分化過程は、大きく6段階の過程を経て、抗体産生を行う。<sup>(8)</sup>

#### ・プロ B 細胞



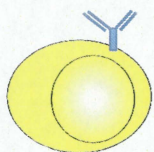
B細胞の初期の段階であり、H鎖の遺伝子の再編成が行われる。この段階で免疫グロブリン遺伝子の再編成は完了していない。

#### ・プレ B 細胞



L 鎖の遺伝子の再編成が行われる。この段階で、免疫グロブリンを作り、いったん細胞表面に発現するが、すぐにまた、細胞内に戻る。この時期から CD19 を発現し、これが、B 細胞マーカーとなる。

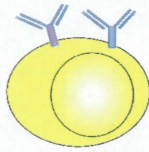
#### ・未熟 B 細胞



再編成が終了し、細胞表面に IgM(一部は、IgD も)を発現する。この段階で自己反応性 B 細胞はアポトーシス又は不活性化させられる。また、未熟 B 細胞の時に骨髄を離れ、二次リンパ組織に進入する。未熟 B 細胞のうち成熟できるのは約 20% にすぎない。

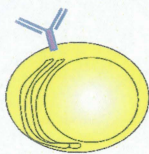


#### ・成熟 B 細胞



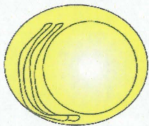
様々なサイトカインや免疫細胞との相互作用により、未熟 B 細胞が成熟する。リンパ・血液・二次リンパ組織を再循環する。再循環を繰り返し、T 細胞領域が存在する濾胞に入ることによって活性化できる。濾胞に入れないものは数日後には死んでしまう。また、再循環のとき 50~100 日の間に特異的抗原を見つけられないと死滅する。

#### ・活性化 B 細胞



抗原により活性化された B 細胞は、Ig 産生のためにクラススイッチが行われる。この活性化に、ヘルパー T (Th) 細胞が産生するサイトカイン (IL-4 や IL-5) の分泌や Th 細胞が発現する CD40L が B 細胞の CD40 に結合することが関与しているとされる。この B 細胞と T 細胞との相互作用が活性化やクラススイッチに必要な不可欠である。

#### ・形質細胞



抗体を産生し、現在の感染との戦いを行う。一部は記憶 B 細胞となり、将来の感染への準備を行う。この時今まで B 細胞に発現していた CD19 は消失し、CD38 を発現する。CD38 が形質細胞マーカーとなる。

### 1-3-3 B1 細胞と B2 細胞

前述した B 細胞は T 細胞の影響を受け、活性化をする T 細胞依存型 B 細胞 (B2 細胞) と呼ぶ。

その他に B 細胞には、表面に CD5 (Ly1) 抗原を持つタイプがあり、これは、T 細胞に依存しないため、T 細胞非依存型 B 細胞 (B1 細胞) と呼ばれている。この B1 細胞は、出生前期で最も活動的である。しかしやがて B1 細胞は骨髄で作られなくなり、成人では B1 細胞は末梢の中で自身の分裂により維持される。慢性リンパ球性白血病のほとんどは B1 細胞によって引き起こるとされている。<sup>(9)</sup> B1 細胞は全体的に単純な性質であり、主な B 細胞集団の中でも進化的に古い B 細胞であると考えられている。



## 1-4 Jacalin (IgA1 特異結合性レクチン)

### 1-4-1 レクチン

レクチンとは自然界に広範囲に存在し、細胞を凝集させたり、多糖類や糖タンパクを沈降させる活性を持ち、免疫反応の産物(抗体)ではない糖結合タンパクである。レクチンは認識分子として機能し、体液中や細胞上の特異的な糖鎖と結合することにより、特定の生命現象を発現する役割を担っていると考えられる。また、その潜在的有用性から糖タンパク・糖ペプチドの分離、組織の染色などに利用されている<sup>(10)</sup>。

### 1-4-2 Jacalin

Jacalin は植物性レクチンのひとつで、Jackfruit の種子のタンパク質の主要成分である。Jacalin は Galactose (Gal) および IgA1 を特異的に認識するレクチンであることが知られている。<sup>(10)</sup>

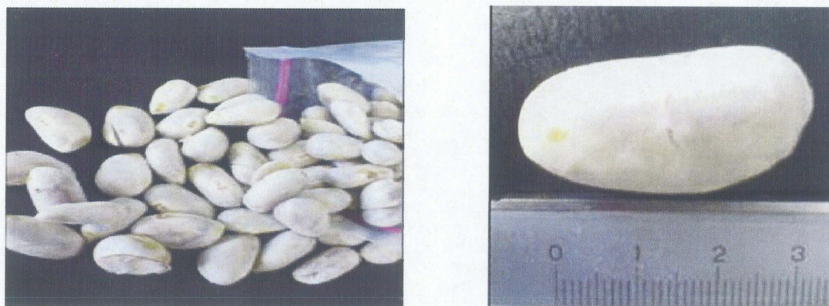


Fig. 1-4 a Jackfruit seed

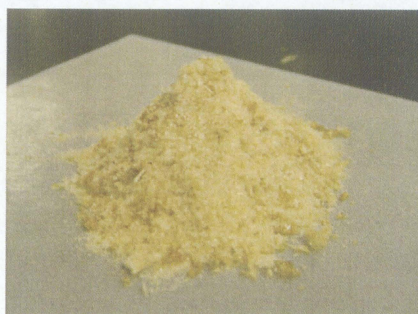


Fig. 1-4 b 抽出 Jacalin



#### 1-4-2-1 Jackfruit

インド原産のクワ科の熱帯性常緑高木。別名、波羅蜜(パラミツ)。木は 10~20m になる。その果実は世界最大級の大きさで、大きいものでは数十 kg の重さがある。果実は集合果で幹や太い枝から直接ぶら下がる。<sup>(10)</sup>



Fig. 1-3 c Jackfruit

#### 1-4-2-2 Jacalin の構造と特性

Jacalin の基本構造は  $\alpha$ -サブユニット(M.W.10~15kD、133 のアミノ酸残基から成る)4つが非共有結合にてそれぞれ対称的な位置で会合しており、その周りに  $\beta$ -サブユニット(M.W.2.1kD、20~21 のアミノ酸残基から成る)4つが非共有結合にて会合しているので、Jacalin のひとつの分子は  $\alpha_4\beta_4$  構造である。 $\alpha$ -サブユニットには  $\alpha$  と  $\alpha'$  の 2 種類あり、4つの  $\alpha$  サブユニットのうち3つが  $\alpha$ 、1つが  $\alpha'$  である。 $\alpha'$ -サブユニットは  $\alpha$ -サブユニットよりも若干分子量が大きい。また、 $\beta$ -サブユニットには  $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 、 $\beta_3$  の 3 種類がある。<sup>(11)</sup>

Jacalin の IgA1 を認識し、結合する結合サイトは  $\alpha$ 、 $\alpha'$ -サブユニットにあるといわれおり、この2つのサブユニットが IgA1 にあるヒンジ部分の O 結合 Gal  $\beta$  1-3GalNAc を認識し、結合すると考えられている。<sup>(11)(12)</sup>



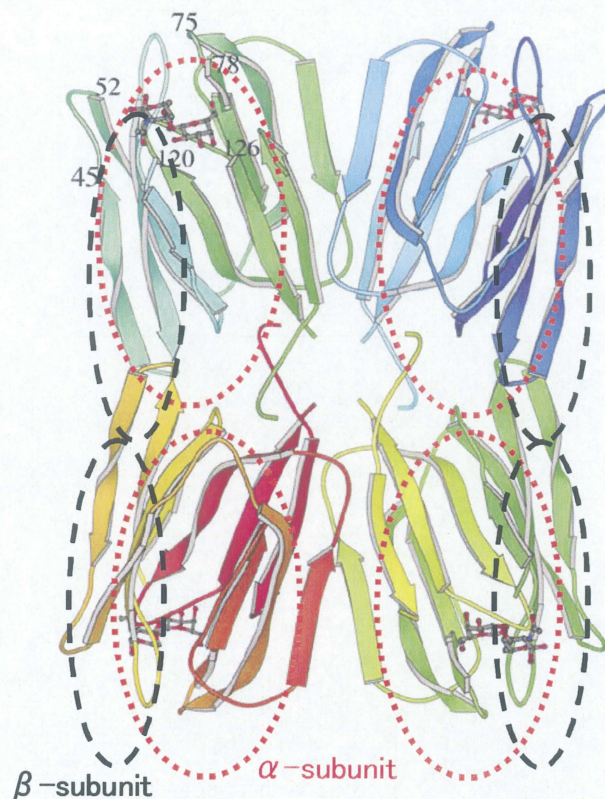


Fig. 1-4-c Jacalin の構造(12)

10 20 30  
 GKAFDDGAFTGIREINLSYNKETAIGDFQVVYD  
 40 50 60  
 LNGSPYVGQNHKSFITGFTPVKISLDFPSEYIME  
 70 80 90 100  
 VSGYTGNVSGYVVVRSLTFKTNKKTYGPYGVTS  
 110 120 130  
 GTPFNLPIENGLIVGFKGSIGYWLDYFSMYLSL

Fig. 1-4-d  $\alpha$ -サブユニットのアミノ酸配列(13)

10 20  
 $\beta$ 1 NEQSGKSQTVIVGSWGAKVS  
 $\beta$ 2 NEQSGKSQTVIVGPWGAQVS  
 $\beta$ 3 DEQSGISQTVIVGPWGAKVS

Fig. 1-4-e  $\beta$ -サブユニットのアミノ酸配列(13)



## 1-5 免疫と Jacalin との関係

本研究室での以前の研究において、IgA を多く産生する IgA 腎症モデルであるマウス(HIGA マウス)を用いた、Jacalin の投与実験が検討された。

この HIGA マウスは IgA を多く産生するので、成長につれて血中での IgA 濃度が高くなる。この HIGA マウスの飼料に Jacalin を混ぜて経口投与したところ、Fig. 1-5 に示されているように、IgA 濃度が抑制され、IgG に対する IgA の割合も抑制された。<sup>(14)</sup>

この結果から、Jacalin により、IgA 濃度が抑制されたのではないかとことが示唆された。

しかしながら、この詳しいメカニズムに関しては不明である。

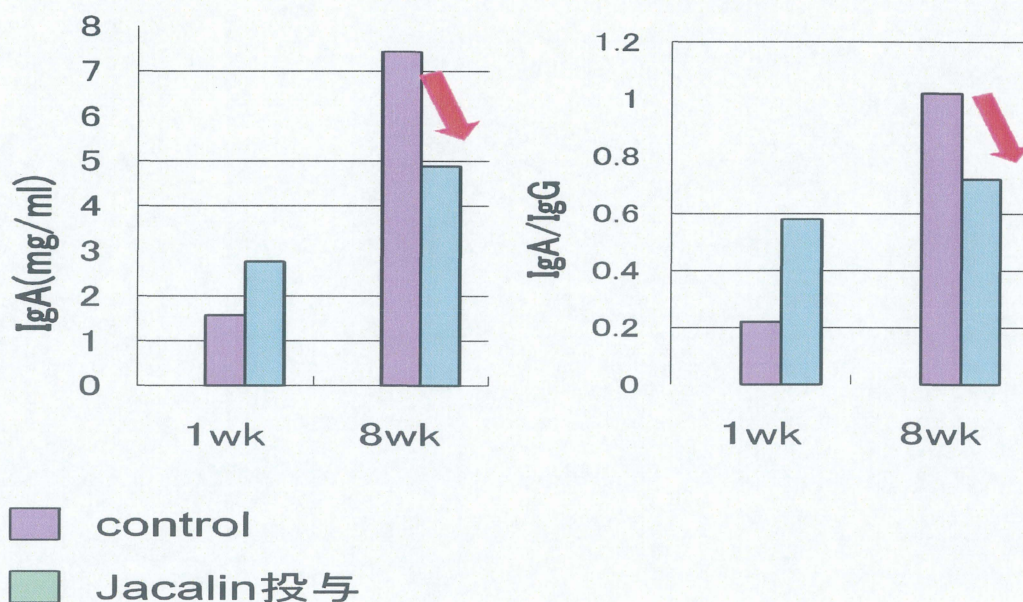


Fig. 1-5 HIGA マウスへの Jacalin 投与への影響  
平成 15 年度 田縁 万里 卒業論文より

## 1-6. 目的

現在、IgA 腎症の原因は不明であるが、何らかの理由で IgA が血液中に大量に産生されることにより引き起こされると考えられている。

また、本研究室での以前の研究において、IgA 腎症のモデルとされている HIGA マウスの飼料に Jacalin を混ぜて経口投与したところ、体内の IgA 濃度が抑制された結果があり、Jacalin により、IgA 産生が抑制されているのではないかとことが考えられた。

抗体を産生しているのは B 細胞であるから本研究では、B 細胞を用いて IgA を多く産生する IgA 腎症モデルを構築し、その上で Jacalin の添加による B 細胞への影響を調査することを目的とした。

また、B 細胞の中でも、IgA 腎症患者は、B1 細胞の割合が高いことが報告されているため、本研究では、B1細胞のみを活性化した系での IgA 産生量や患者の血液における健常者との違いについても調査することを目的とした。

- ① IgA を多く産生する IgA 腎症モデルを構築
- ② IgA 腎症モデルに対する Jacalin の影響
  - Jacalin の B 細胞への影響
  - Jacalin の B1 細胞への影響
- ③ 健常者と患者の IgA 発現の割合

以上について検討した。

まず①では IgA を多く産生する系を完成させるために、B 細胞に様々な刺激を与えた。具体的には、Th 細胞がもっている CD40L を添加することで B 細胞の活性化を図り、Th 細胞が産生する IL-4 を添加することで増殖を促進させた。

さらに②ではこの系に Jacalin を加えることで B 細胞の IgA 産生への影響を検証した。B 細胞全体の Jacalin への影響を見て、さらに B1 細胞活性化条件での Jacalin の影響を調査した。

そして③では、溶血させることで赤血球を取り除き、B 細胞に発現する IgA を Flow Cytometry によって測定を行った。

## 2. 方法

### 2-1 Jackfruit からの Jacalin の抽出、精製

#### 2-1-1 Jacalin の抽出

##### 装置・器具・試薬

- ・ ホモジナイザー (JANKE&KUNKEL IKALaborteknik)
- ・ 遠心分離機 (HITACHI)
- ・ 凍結乾燥装置 (ASAHI LIFE SCIENCE)
- ・ 真空ポンプ
  
- ・ メス (FEATHER)
- ・ ミキサー (小泉成器株式会社)
- ・ ビーカー
- ・ ろ紙 (NO,5A) (Toyo Roshi Kaisha)
- ・ ヌツチェ
- ・ 吸引ビン
- ・ アスピレーター (AS ONE)
- ・ 遠沈管 (BIOLOGIX)
- ・ 0.22  $\mu$  m フィルター (MILLIPORE)
- ・ 凍結乾燥瓶
  
- ・ Jackfruit の種子
- ・ milliQ

##### 方法

- ① Jackfruit を解体し、種子を取り出した。
- ② Jackfruit の種子の皮を白い実が見えるまではがし取った。
- ③ 皮を取った種子 100g をミキサーに入れた。
- ④ milliQ を 200ml 加えミキサーのスイッチを ON にした。このとき水温が上がらないように約 5 秒に 1 回ミキサーを止めた。
- ⑤ 粉々になったのを確認後、ビーカーに移し、ホモジナイザーにてさらに細かく粉砕した。
- ⑥ 粉砕後、ヌツチェを用いて吸引濾過し、濾液と沈殿物に分けた。
- ⑦ 濾液を遠沈管に移して 3000rpm で遠心分離 10 分した。

- ⑧ 遠心分離後、上澄み液を  $0.22\ \mu\text{m}$  のフィルターを用いて滅菌した。
- ⑨ 滅菌した溶液を凍結乾燥瓶に入れ冷凍し、凍結乾燥した。
- ⑩ 乾燥して得られた粉末の重量を測定した。

## 2-1-2 Jacalin の精製

### 装置・器具・試薬

- ・ 凍結乾燥装置 (ASAHI LIFE SCIENCE)
- ・ 真空ポンプ
  
- ・ ビーカー
- ・ メスシリンダー
- ・ 透析用セルロースチューブ (三光純薬株式会社)
- ・ 凍結乾燥瓶
  
- ・ Jacalin (3-1-1 の Jackfruit 抽出物)
- ・ MilliQ

### 方法

- ① 透析用セルロースチューブを脱イオン水に浸し、透析用セルロースチューブについているグリセリンを抜き準備しておいた。
- ② 3-1-1 で抽出した Jacalin 5g を milliQ 25ml に溶かした。
- ③ 準備しておいた透析用セルロースチューブに 2. の溶液を入れ、そのチューブを脱イオン水で満たしたビーカーに浸し、 $4^{\circ}\text{C}$  で 3 日間透析した。  
1 日 2 回脱イオン水を交換した。
- ④ 透析を終えた溶液を凍結乾燥瓶に入れ冷凍し、凍結乾燥した。
- ⑤ 乾燥して得られた粉末の重量を測定した。

## 2-2 ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)の分離、培養、培地の回収

### 装置・器具・試薬

- ・ シリンジ (50ml TERUMO)
- ・ 翼付静注針 (TERUMO)
- ・ 注射針 (TERUMO)
- ・ lymphoprep tube (AXIS-SHIELD)
- ・ 10ml メスピペット (AS ONE)
- ・ ピペットマン (GILSON)
- ・ ピペットマン用チップ (理科研)
- ・ 50ml tube (BIOLOGIX)
- ・ 0.22 $\mu$ m フィルター (MILLIPORE)
- ・ heparin (Scientific Protein Laboratories)
- ・ ヒト血液
- ・ 生理食塩水
- ・ 氷
- ・ 遠心分離機 (KUBOTA)
  
- ・ 24 well plate (SUMILON)
- ・ RPMI MEDIUM 1640 1X + L-Glutamine (invitrogen)
- ・ IL-4 (R&D Systems)
- ・ anti CD40 (R&D Systems)
- ・ Jacalin
- ・ milliQ
- ・ heparin (Scientific Protein Laboratories)
- ・ PBS (SIGMA)
- ・ 遠心分離機 (KUBOTA)
- ・ CO<sub>2</sub> インキュベーター (池本理化工業)

### 溶液

- ・ RPMI-1640  
1% FCS、ペニシリン、ストレプトマイシン添加
  
- ・ IL-4  
10 $\mu$ g を 500 $\mu$ l の PBS で希釈し、その希釈した原液を 4 倍希釈し 5 $\mu$ g/ml とした。



- ・ anti CD40

原液(500 $\mu$ g/ml)をPBSで10倍希釈した(0.5 $\mu$ g/ml)。

- ・ Jacalin

10mgをPBS 2mlに溶かし、0.22 $\mu$ m フィルターで滅菌し(5 $\mu$ g/ml)、PBSで1.0 $\mu$ g/mlに希釈した。

## 方法

- ① heparin 40mgを生理食塩水 2mlに溶かし、0.22 $\mu$ m フィルターで滅菌ろ過し、ヒト抹消血 35mlをシリンジ 2本で採血したシリンジでそのまま 500 $\mu$ l 取り混ぜた。
- ② lymphoprep tubeを2300rpmで1min遠心し、仕切りより上のlymphoprepを下に落とした。
- ③ 抗凝固処理した血液を4本のtubeに15mlずつ入れた。
- ④ 血液と等量の生理食塩水を加え、転倒混和させた。
- ⑤ 室温、3200rpm、10minで遠心分離した。
- ⑥ 血漿をメスピペットで除去し、ピペットで単核球のフラクションを採取し 50ml tubeに入れた。
- ⑦ ⑤のtubeに等量の生理食塩水を入れ希釈し、室温、1800rpm、10minで遠心し、細胞をペレット化した。
- ⑧ ⑥の上澄みを再度遠心し、ペレット化した細胞を⑥とあわせた。
- ⑨ 培地 4mlに懸濁した。
- ⑩ 細胞数をカウントした。
- ⑪ 細胞懸濁液を室温、1800rpm、10minで遠心し、 $1.7 \times 10^6$  cell/mlとなるように、培地で再懸濁した。
- ⑫ 細胞懸濁液を 1ml/well で入れ antiCD40L、IL-4、Jacalin をそれぞれ添加した。
- ⑬ 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>で培養した。
- ⑭ 7日目に培養液を採取し、4 $^{\circ}$ C、1800rpm、10minで遠心し、上澄みを取り -80 $^{\circ}$ Cで保存した。

培養条件

Table 2-2-1 PBMC 培養条件

	sample	antiCD40	IL-4	Jacalin
PBMC	Control	-	-	-
	Stimulation	○	○	-
	Stimulation + Jacalin	○	○	○

## 2-3 B細胞の分離、培養、培地の回収

### 2-3-1 CD19+ B cell の分離

#### 装置・器具・試薬

- ・ ヒト CD19 マイクロビーズ (ミルテニーバイオテク)
- ・ ヒト CD3 マイクロビーズ (ミルテニーバイオテク)
- ・ LS カラム (ミルテニーバイオテク)
- ・ MACS Separator (ミルテニーバイオテク)
- ・ ピペットマン (GILSON)
- ・ ピペットマン用チップ (理科研)
- ・ 1.5ml アシストチューブ (アシスト)
- ・ 0.22 $\mu$ m フィルター (MILLIPORE)
- ・ PBS (SIGMA)
- ・ BSA (Wako)
- ・ EDTA 2Na $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O (Wako)
- ・ NaCl (Wako)
- ・ Na<sub>2</sub>HPO $\cdot$ 12H<sub>2</sub>O (Wako)
- ・ KCl (Wako)
- ・ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Wako)
- ・ HCl (Wako)
- ・ NaOH(固体)
- ・ 5N NaOH (Wako)
- ・ milliQ
- ・ pH メーター

#### 溶液

- ・ 10X PBS

1. NaCl 40g、Na<sub>2</sub>HPO $\cdot$ 12H<sub>2</sub>O 14.5g、KCl 1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g を milliQ に溶解した。
2. HCl、NaOH で pH7.2 に調整した。
3. 500ml にメスアップし、フィルター滅菌した。

- ・ 0.5M EDTA

1. EDTA 2Na $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O 93.06g を 400ml の milliQ に加え、NaOH を少量ずつ加え EDTA を溶解した。

2. 5N NaOH で pH 8.0 に調整した。
3. 500ml にメスアップし、フィルター滅菌した。

- ・ 10% BSA

1. BSA 1g を milliQ 9g に溶解し、フィルター滅菌した。

- ・ buffer (0.5%BSA and 2mM EDTA in PBS)

1. milliQ 80ml に 10X PBS 10ml と 0.5M EDTA 0.4ml を混合した。
2. pH7.2 に調整し、95ml にメスアップした。
3. フィルター滅菌し、10% BSA を 5ml 加え冷却保存した。

## 方法

※ 抗体のキャッピングと非特異的吸着を防ぐため、操作は手早く、細胞を常に冷却しながら行う。buffer は予めよく冷やしておく。

- ① 方法 2-2 で分離した PBMC を用いる。
- ② アシストチューブ 4 本に細胞懸濁液を移し、4℃、2000rpm、10min で遠心。
- ③ 上澄みを除き、buffer に再懸濁する。(80μl/ 10<sup>7</sup> cells)
- ④ CD19 マイクロビーズを加える。(20μl/ 10<sup>7</sup> cells)
- ⑤ よく混和し、4-8℃で 15min インキュベート。
- ⑥ buffer を加える。(1ml/ 10<sup>7</sup> cells)
- ⑦ 4℃、2000rpm、10min で遠心。
- ⑧ 細胞を buffer に再懸濁する。(500μl/ 10<sup>8</sup> cells)
  
- ⑨ LS カラムを MACS Separator の磁場に挿入。
- ⑩ LS カラムを buffer 3ml で洗浄する。
- ⑪ ネガティブフラクション回収用 tube をセットし、カラムに懸濁液をアプライする。
- ⑫ カラムを buffer 3ml で 3 回洗浄。
- ⑬ カラムを磁石からはずし、ポジティブフラクション回収用 tube の上に置く。
- ⑭ buffer 5ml を加え、添付のプランジャーで押し出す。
- ⑮ 細胞数をカウント。

なお同じ要領で、CD4 マイクロビーズでも行い、CD4<sup>+</sup>PBMC を採取した。

### 2-3-2 CD19+ B cell の培養、培地の回収

#### 装置・器具・試薬

- 24 well plate (SUMILON)
- RPMI MEDIUM 1640 1X + L-Glutamine (invitrogen)
- IL-4 (R&D Systems)
- anti CD40 (R&D Systems)
- Jacalin
- Gal-Jacalin
- milliQ
- PBS (SIGMA)
- 遠心分離機 (KUBOTA)
- CO<sub>2</sub> インキュベーター (池本理化工業)

#### 溶液

- RPMI-1640  
1% FCS、ペニシリン、ストレプトマイシン添加。
- IL-4  
10 $\mu$ g を 500 $\mu$ l の PBS で希釈し、その希釈した原液を 4 倍希釈し 5 $\mu$ g/ml とした。
- anti CD40  
原液 500 $\mu$ g/ml を 10 倍希釈した。(0.5 $\mu$ g/ml)
- Jacalin  
Jacalin 10mg を PBS 2ml に溶かし、0.22 $\mu$ m フィルターで滅菌し(5 $\mu$ g/ml)、PBS で 0.1 $\mu$ g/ml、1.0 $\mu$ g/ml にそれぞれ希釈した。

## 方法

- ① 細胞懸濁液を室温、1800rpm、10min で遠心し、 $2.0 \times 10^5$  cell/ml となるように、培地で再懸濁した。
- ② CD19+ B cell を 1ml/well で入れた。
- ③ antiCD40L、IL-4、Jacalin をそれぞれ添加した。
- ④ 37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。
- ⑤ 7 日目に培養液を採取し、4°C、1800rpm、10min で遠心し、上澄みを取り-80°Cで保存した。

## 培養条件

Table 3-2-3 CD419 B cell 培養条件

condition	anti CD40	IL-4	Jacalin
Control	-	-	-
Stimulation	○	○	-
Stimulation+Jacalin	○	○	10

## 2-4 ELISA

### 2-4-1 ELISA : IgA の測定

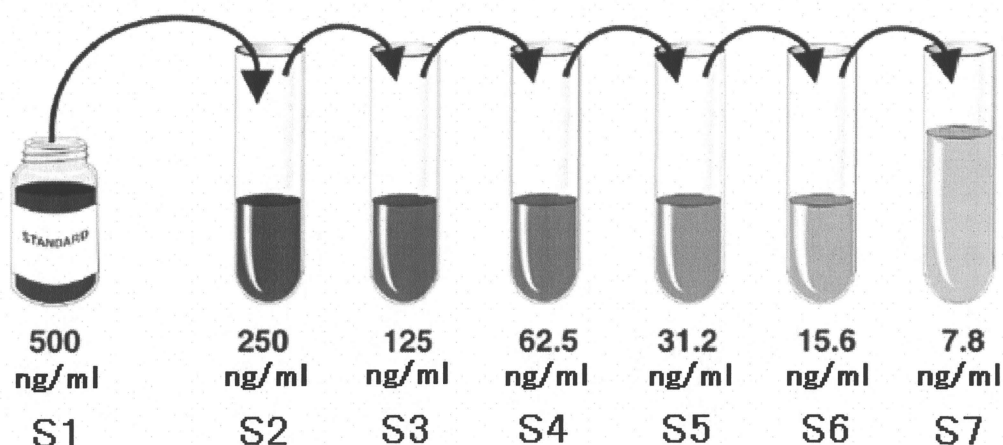
#### 装置・器具・試薬

- ・ 96well plate (SUMILON)
- ・ Human IgA ELISA Quantitation Kit (コスモ・バイオ)
- ・  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Wako)
- ・  $\text{NaHCO}_3$  (Wako)
- ・  $\text{NaCl}$  (Wako)
- ・  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Wako)
- ・  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Wako)
- ・  $\text{HCl}$  (Wako)
- ・  $\text{NaOH}$  (Wako)
- ・ Tween 20 (片山化学工業)
- ・ BSA (Wako)
- ・  $\text{H}_2\text{O}_2$  (三菱瓦斯化学)
- ・ OPD tablet (Wako)
- ・ 1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Wako)
- ・ クエン酸一水和物 (Wako)
- ・ ピペットマン (GILSON)
- ・ ピペットマン用チップ (理科研)
- ・ アシストチューブ (アシスト)
- ・ 脱イオン水
- ・ マイクロプレートリーダー (日本バイオ・ラッド  
ラボラトリーズ)

#### 溶液

- ・ PBS  
NaCl 8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g を脱イオン水 1l に溶解した。
- ・ Wash buffer (PBST)  
PBS 1000ml に 0.05% となるように 500 $\mu\text{l}$  の Tween 20 を加えた。

- Coating buffer  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59g、NaHCO<sub>3</sub> 2.93g を脱イオン水 1l に溶解した。これを 1N HCl/NaOH で pH 9.6 に調整した。
- Coating solution  
Goat anti-Human IgA-affinity purified を Coating buffer で 10 倍希釈した。
- Blocking solution (0.5% BSA)  
BSA 1g を PBS 200ml に溶解した。
- Standard  
Human Serum Calibrator を PBST で次のように希釈した。



- Conjugate solution  
Goat anti-Human IgA-HRP Conjugate を PBST で 10000 倍希釈。
- Substrate solution  
発色緩衝液 12ml に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5μl、OPD tablet を 1 錠加え、すぐに使った。
- 発色緩衝液  
クエン酸一水和物 3.8279g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 4.7350g を脱イオン水 500ml に溶解。
- Stop solution (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)



## 方法

- ① 96well プレートに anti-human IgA を 100 $\mu$ l/well でコーティングし、1 h インキュベートした。
- ② Wash buffer 200 $\mu$ l/well で 5 回洗浄。
- ③ 0.5%BSA 100 $\mu$ l/well でブロッキングし、室温、30 min インキュベート(mixing)。
- ④ Wash buffer 200 $\mu$ l/well で 5 回洗浄。
- ⑤ Standard、Sample を入れ、4 $^{\circ}$ C、1h インキュベート(mixing)。
- ⑥ Wash buffer 200 $\mu$ l/well で 5 回洗浄。
- ⑦ Conjugate solution 100 $\mu$ l/well でいれ、室温、1h インキュベート(mixing)。
- ⑧ Wash buffer 200 $\mu$ l/well で 5 回洗浄。
- ⑨ Substrate solution 100 $\mu$ l/well でいれ、遮光、10min インキュベート。
- ⑩ Stop solution 100 $\mu$ l/well をいれ、490nm で測定。

## 2-4-2 ELISA : IgG の測定

### 装置・器具・試薬

- ・ 96well plate (SUMILON)
- ・ Human IgG ELISA Quantitation Kit (コスモ・バイオ)
- ・  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Wako)
- ・  $\text{NaHCO}_3$  (Wako)
- ・  $\text{NaCl}$  (Wako)
- ・  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Wako)
- ・  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Wako)
- ・  $\text{HCl}$  (Wako)
- ・  $\text{NaOH}$  (Wako)
- ・ Tween 20 (片山化学工業)
- ・ BSA (Wako)
- ・  $\text{H}_2\text{O}_2$  (三菱瓦斯化学)
- ・ OPD tablet (Wako)
- ・ 1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Wako)
- ・ クエン酸一水和物 (Wako)
- ・ ピペットマン (GILSON)
- ・ ピペットマン用チップ (理科研)
- ・ アシストチューブ (アシスト)
- ・ 脱イオン水
- ・ マイクロプレートリーダー (日本バイオ・ラッド  
ラボラトリーズ)

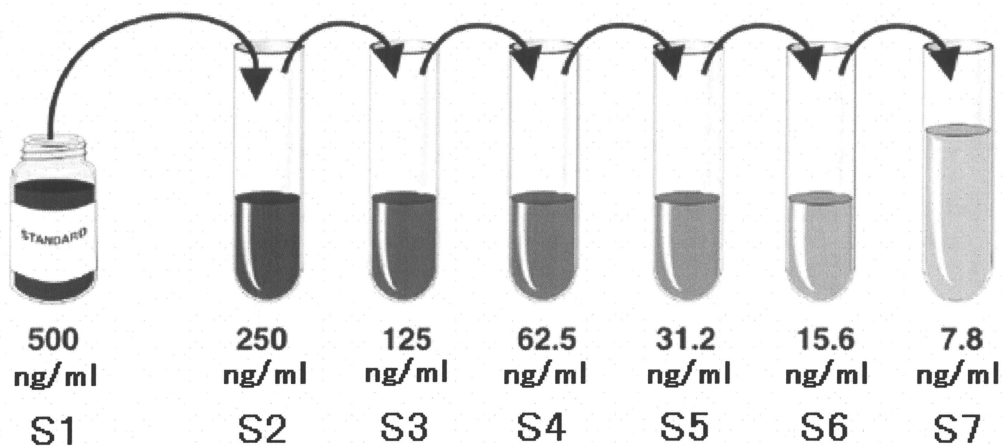
### 溶液

- ・ PBS  
 $\text{NaCl}$  8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g を脱イオン水 1l に溶解した。
- ・ Wash buffer (PBST)  
PBS 1000ml に 0.05% となるように 500 $\mu\text{l}$  の Tween 20 を加えた。
- ・ Coating buffer  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59g、 $\text{NaHCO}_3$  2.93g を脱イオン水 1l に溶解し、これを 1N  $\text{HCl}/\text{NaOH}$  で pH 9.6 に調整した。
- ・ Coating solution

Goat anti-Human IgG-affinity purified を Coating buffer で 10 倍希釈した。

- Blocking solution (0.5% BSA)  
BSA 1g を PBS 200ml に溶解した。

- Standard  
Human Serum Calibrator を PBST で次のように希釈した。



- Conjugate solution  
Goat anti-Human IgA-HRP Conjugate を PBST で 10000 倍希釈。
- Substrate solution  
発色緩衝液 12ml に  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 $\mu\text{l}$ 、OPD tablet を 1 錠加え、すぐに使った。
- 発色緩衝液  
クエン酸一水和物 3.8279g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  4.7350g を脱イオン水 500ml に溶解。
- Stop solution (1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

## 方法

- ① 96well プレートに anti-human IgG を 100 $\mu$ l/well でコーティングし、1h インキュベートした。
- ② Wash buffer 200 $\mu$ l/well で 5 回洗浄した。
- ③ 0.5%BSA 100 $\mu$ l/well でブロッキングし、室温、30min インキュベート(mixing)した。
- ④ Wash buffer 200 $\mu$ l/well で 5 回洗浄した。
- ⑤ Standard、Sample を入れ、4℃、1h インキュベート(mixing)した。
- ⑥ Wash buffer 200 $\mu$ l/well で 5 回洗浄した。
- ⑦ Conjugate solution 100 $\mu$ l/well でいれ、室温、1h インキュベート(mixing)した。
- ⑧ Wash buffer 200 $\mu$ l/well で 5 回洗浄した。
- ⑨ Substrate solution 100 $\mu$ l/well でいれ、遮光、10min インキュベートした。
- ⑩ Stop solution 100 $\mu$ l/well をいれ、490nm で測定した。

## 2-5 Flow cytometry

### 装置・器具・試薬

- |                |                           |
|----------------|---------------------------|
| ・ FBS          | (GIBCO)                   |
| ・ PBS          | (D-8537, SIGMA)           |
| ・ IgG1-FITC    | (A07795, BECKMAN COULTER) |
| ・ CD19-APC     | (AbD serotec)             |
| ・ CD5-PECy7    | (SANTA CRUZ)              |
| ・ IgA-PE       | (AbD serotec)             |
| ・ ピペットマン       | (GILSON)                  |
| ・ ピペットマン用チップ   | (理科研)                     |
| ・ FACSCanto II | (Becton&Dicknson)         |
| ・ セルストレーナー     | (Becton&Dicknson)         |

### 溶液

- ・ 2% FBS / PBS  
FBS 1ml を PBS 49ml に希釈した。

### 方法

- ① 培養後の細胞懸濁液を 1800rpm・5min で遠心分離した。
- ② 上澄みを回収後 2% FBS / PBS 1ml に懸濁し、抗体を各 10 $\mu$ l ずつ加えて 4℃ で 30min incubate した。
- ③ 1800rpm・5min で遠心分離し、2% FBS / PBS 1ml で洗浄後再度遠心した。
- ④ 上澄みを除去し、2% FBS / PBS 1ml に再懸濁し FACSCanto II で測定した。

## 2-6 Fluorescein-Jacalin の作製

### 装置・器具・試薬

- ・ Fluorescein Labeling Kit - NH<sub>2</sub>
- ・ DMSO
- ・ Jacalin
- ・ PBS
- ・ ピペットマン (GILSON)
- ・ ピペットマン用チップ (理科研)
- ・ 遠心分離機 (KUBOTA)

### 方法

- ① Jacalin 200μg が溶液 100μl 中に含まれるように、Jacalin 40mg を PBS 2ml に溶解した。
- ② Jacalin 溶液 100μl と WS Buffer 100μl を Filtration Tube に入れた。
- ③ 8000xg、10min で遠心した。
- ④ NH<sub>2</sub>-Reactive Fluorescein に DMSO 10μl を加えた。
- ⑤ Reaction Buffer 100μl を加えた後、④の溶液全量 10μl を Filtration Tube の膜上に加え 37℃で 10min incubate した。
- ⑥ WS Buffer 100μl を加え 8000xg、10min で遠心した。
- ⑦ 上澄みを除去し、再度 WS Buffer 100μl を加え 8000xg、10min で遠心した。
- ⑧ 上澄みを除去し、WS Buffer 200μl を加え標識体を回収し 0.5ml Tube に移し 0-5℃で保存した。

## 2-7 末梢血の溶血

### 装置・器具・試薬

- ・ シリンジ (TERUMO)
- ・ 翼付静注針 (TERUMO)
- ・ 注射針 (TERUMO)
- ・ ピペットマン (GILSON)
- ・ ピペットマンチップ (理科研)
- ・ ヒト血液
- ・ アシストチューブ (アシスト)
- ・ Pharmlyse 溶血剤 (Becton&Dicknson)
- ・ 脱イオン水
- ・ PBS (SIGMA)
- ・ 遠心分離機 (KUBOTA)

### 溶液

#### ・PBS

NaCl 8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g を脱イオン水 1l に溶解した。

#### ・Pharmlyse 溶血剤

脱イオン水で 10 倍希釈になるように、Pharmlyse 溶血剤を 2ml、脱イオン水を 18ml 加えた。

### 方法

- ①全血 100 $\mu\text{l}$  の入ったチューブに脱イオン水で 10 倍に希釈した PharmLyse1.0ml を加えた。
- ②穏やかに攪拌し、暗所、室温 (20～25℃) で 15 分反応させた。
- ③200xg で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。
- ④非動化した 1%FBS と 0.1%アジ化ナトリウムを含む PBS (FBS-PBS) を 1.0ml 加えた。
- ⑤200xg で5分間遠心分離し、上清を除去した。
- ⑥ペレットに 0.5ml の PBS を加えて、FACS により測定を行った。



### 3. 結果

#### 3-1 Jacalin の抽出

##### 3-1-1 Jacalin の回収率

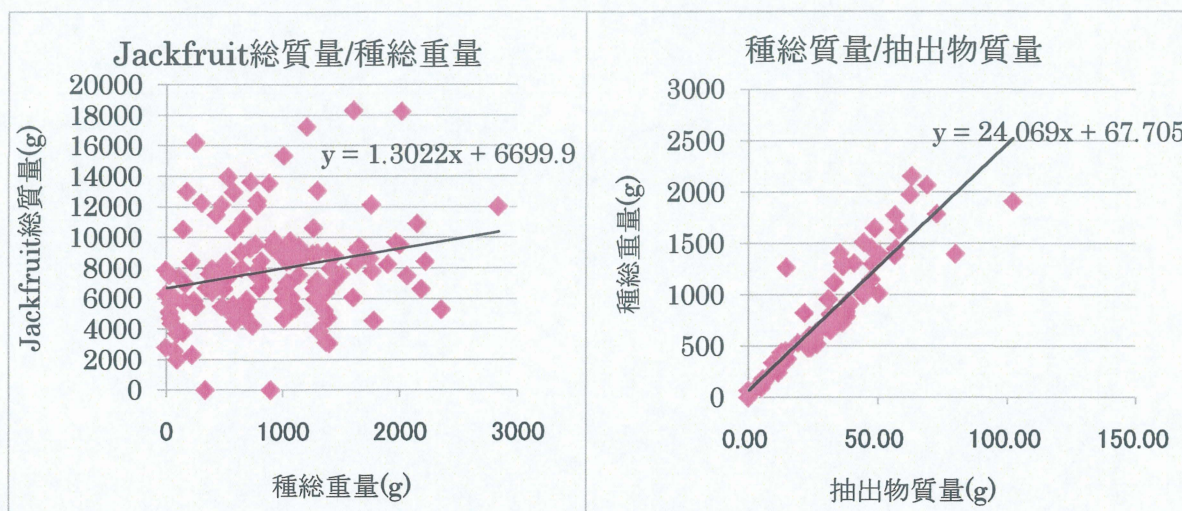


Fig. 3-1-1-a Jackfruit 総重量と種総重量との関係図

Fig. 3-1-1-b 種総重量と抽出物質質量との関係図

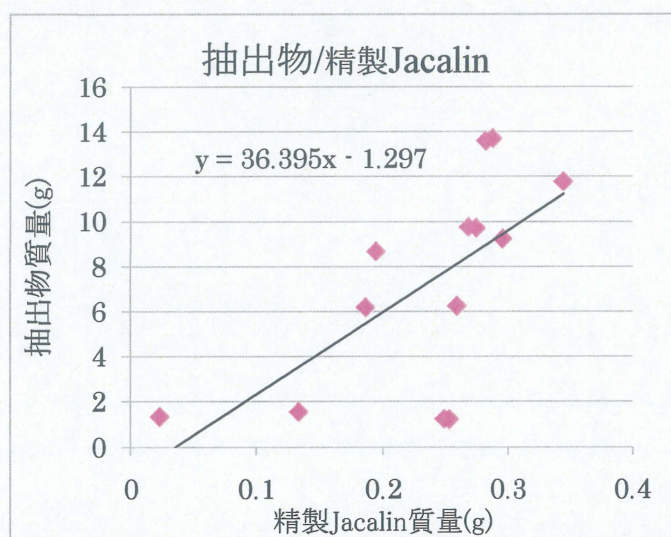


Fig. 3-1-1-c 抽出物質質量と精製 Jacalin との関係図

Fig 3-1-1 は、過去に本研究室が入手した Jackfruit とそれから取れた種、種を抽出した後の抽出物、抽出物と精製 Jacalin との関係を示した。



ここで、Jackfruit が 10kg あったとき Jacalin の質量の簡単な計算を行った。

Fig. 3-1-1-a の式より、 $y=10000$  を代入すると、約  $x$  は 2500 を示す。

さらに、Fig. 3-1-1-b の式より種の質量  $y=2500$  を代入すると、 $x$ =約 94 を示す。

さらに、Fig. 3-1-1-c の式より、抽出物の質量  $y=94$  を代入すると、 $x=24$  を示す。

以上より熟れ具合 60% で計約 10kg の Jackfruit から抽出物が約 94g 得られ、さらに精製 Jacalin は、24g を得られたことになる。

### 3-1-2 Jacalin の産生量や種の総重量などの相関

Jackfruit からより多くの Jacalin を抽出するため、Jackfruit の熟れ具合や総重量で種の重量や Jacalin 質量を効率よく回収するため、それぞれの相関性について調べた。調べた項目は、熟れ具合・Jackfruit 総重量・種総重量・抽出物質量である。年号は、その年に収穫した Jackfruit を示した。

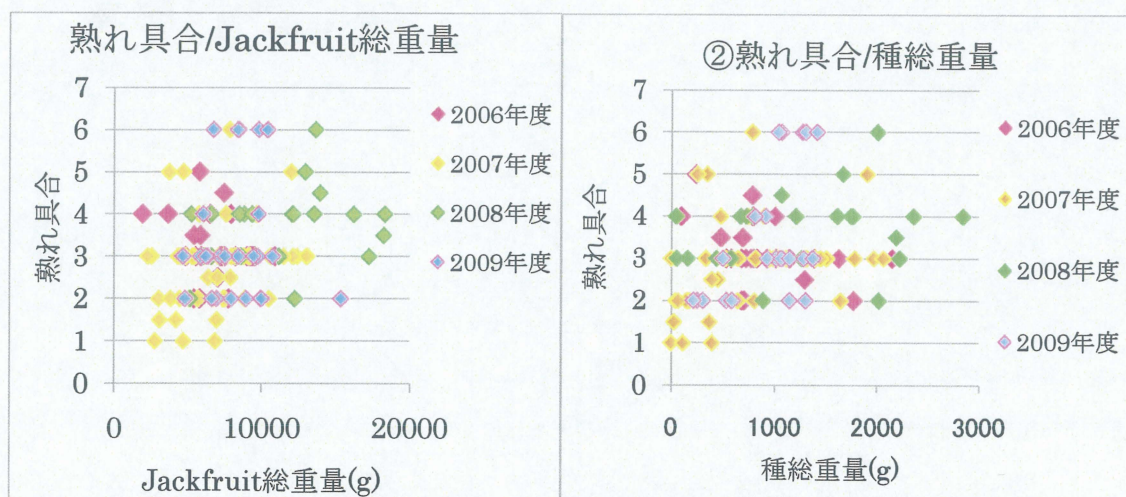


Fig.3-1-2-1 熟れ具合と Jackfruit・種の総重量の相関

Fig.3-1-2-1 は、2006 年度から 2009 年度に本研究室が入手した Jackfruit のデータになる。

左のデータは、縦軸が熟れ具合、横軸が Jackfruit 総重量を示している。熟れ具合



は、本研究室が独自に判定をしたもので、完熟を5として、熟れ具合を5段階で表わしたものである。熟れ具合6は、完熟を越して一部腐敗がみられるものである。2007年度には熟れ具合1や2が多いが、これは、完熟していないものも収穫してもらうように生産者に頼んでいたからであるが、あまり熟していないものは種も小さいなどがあったため、2008年度以降は熟したものを優先的に収穫してもらうように頼んだ。全体を通して2008年は熟していて Jackfruit としても大きいものが収穫できた。

右のグラフは、縦軸に熟れ具合、横軸に種総重量を示している。熟れ具合が1のものは、種総重量が少ないことが分かった。

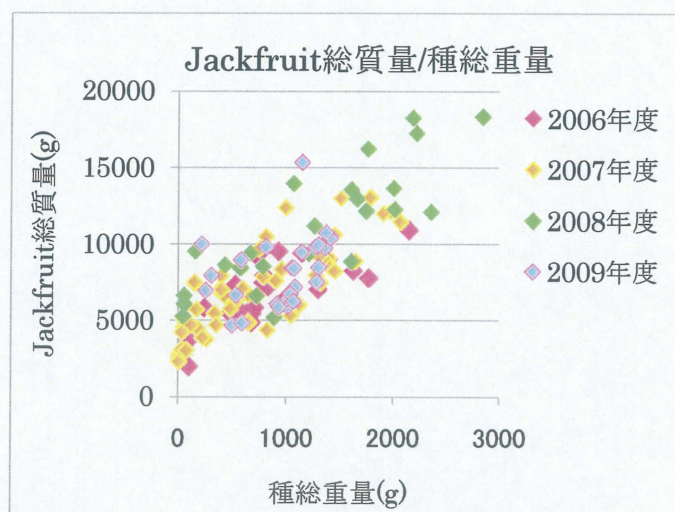


Fig.3-1-2-2 Jackfruit 総重量と種総重量の相関

Fig.3-1-2-2 は、縦軸を Jackfruit 総重量、横軸に種の総重量をとったものである。Jackfruit は、かたいとげのような外殻の中に種が果実の房のようなものに包まれているような構造をしているため、種のみを合わせて質量を測定したものを種総重量としている。Jackfruit 4kg 以下のものは、種総重量も低く、ほとんど種が入っていないことが分かった。





Fig 3-1-2-3 Jackfruit 総重量・種総重量と抽出物質量の相関

Fig 3-1-2-3 左のグラフは、縦軸に Jackfruit 総重量で横軸は種から方法 2-1-1 で示したように Jackfruit の種から Jacalin 成分の抽出を行ったものの質量を示したものである。この段階ではまだ Jacalin ではないが、Jacalin を精製するための途中産生物である。

右のグラフは、縦に種総重量を横に抽出物質量を示したものである。種総重量が増加すると抽出物もそれに応じて増加した。

## 3-2 IgA・IgG 産生 PBMC

### 3-2-1 PBMC の分離

細胞数は以下のとおりだった。

- ・ 単核球フラクション単離後 (PBMC) の細胞数  $\cdots 4.0 \times 10^7$  cells
- ・ 播種細胞数  $\cdots 1.7 \times 10^6$  cells/well

#### 培養条件

Table 3-2-1 PBMC 培養条件

PBMC	condition	anti-CD40	IL-4	Jac
	Control	-	-	-
	Stimulation	○	○	-
	Stimulation+Jacalin	○	○	○

Stimulation=AntiCD40+IL-4

CD40L は T 細胞が発現している蛋白で、B 細胞に結合することで活性化が行われる。これの疑似的刺激として Anti-CD40 を用いる。

また、IL-4 は T 細胞などが産生するサイトカインの一種で、B 細胞の抗体産生には、増殖刺激として働く。

### 3-2-2 ELISA ; IgA

Table 3-2-2 IgA 産生量

Condition	測定値 (ng/ml)				Average (ng/ml)	SD
Control	359.4	355.6	446.8	390.6	388.1	42.16
Stimulation	397.1	393.4	444.2	415.6	412.6	23.21
Stimulation+Jacalin	357.1	330.9	453.3	421	390.6	56.4

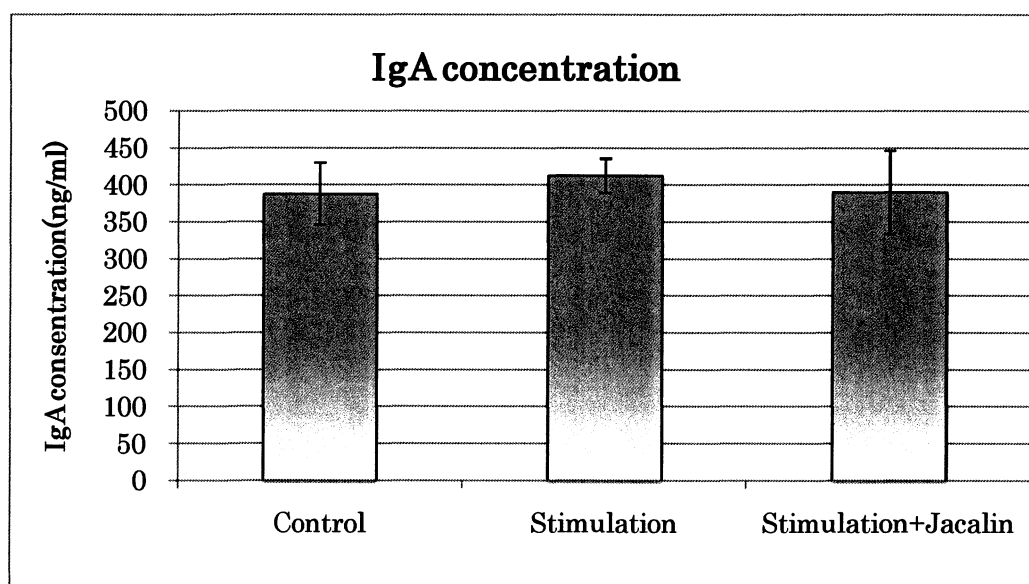


Fig.3-2-2 IgA 産生量

Fig.3-2-2 は、縦軸に ELISA 測定による IgA 濃度、横軸に培養条件を示した。  
Control では、 $388 \pm 42 \text{ ng/ml}$  であった。  
Stimulation では、 $412 \pm 23 \text{ ng/ml}$  であった。  
Stimulation + Jacalin では、 $390 \pm 56 \text{ ng/ml}$  であった。

### 3-2-3 ELISA ; IgG

Table 3-2-3 IgG 産生量

Condition	IgG (ng/ml)				average	SD
Control	4348.8	4479.9	3698.1	3986.8	4128.4	354.6
Stimulation	4201.8	4291.6	3607.4	3789.1	3972.5	327.3
Stimulation+Jacalin	3876.8	4226.3	3441.5	3622.5	3791.8	340.3

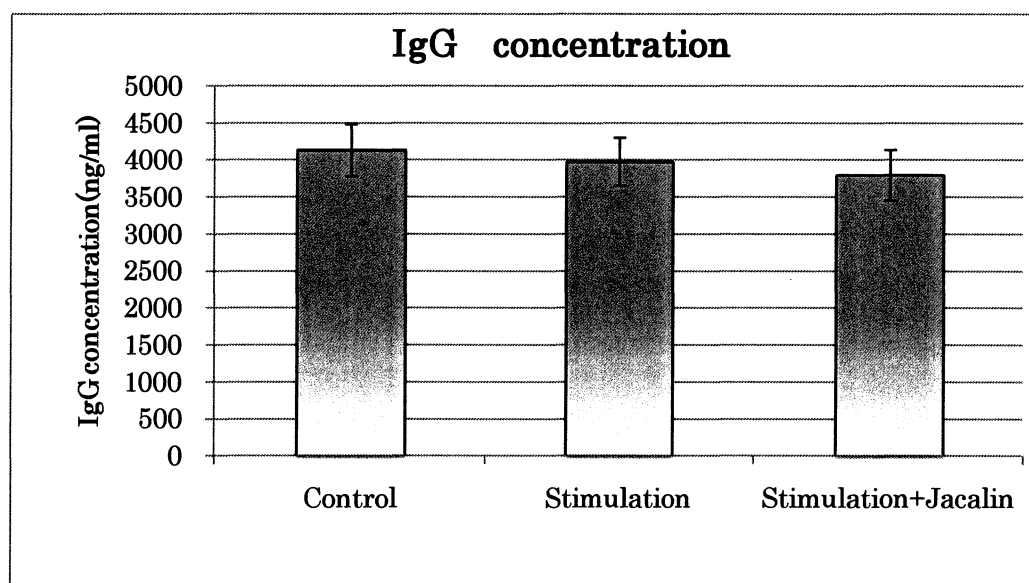


Fig .3-2-3 IgG 産生量

Fig.3-2-3 は、縦軸に ELISA 測定による IgG 濃度、横軸に培養条件を示した。  
Control では、 $4128.4 \pm 354.6 \text{ ng/ml}$  であった。  
Stimulation では、 $3972.5 \pm 327.3 \text{ ng/ml}$  であった。  
Stimulation+Jacalin では、 $3791.8 \pm 340.3 \text{ ng/ml}$  であった。  
Control と Stimulation における IgG 産生量に変化はなかった。

### 3-2-4 ELISA ; IgA/IgG

Table 3-2-4 IgA/IgG

Condition	IgA	IgG	Ratio	SD
Control	388.1	4128.4	0.094	0.018
Stimulation	412.6	3972.5	0.104	0.014
Stimulation+Jacalin	390.6	3791.8	0.103	0.023

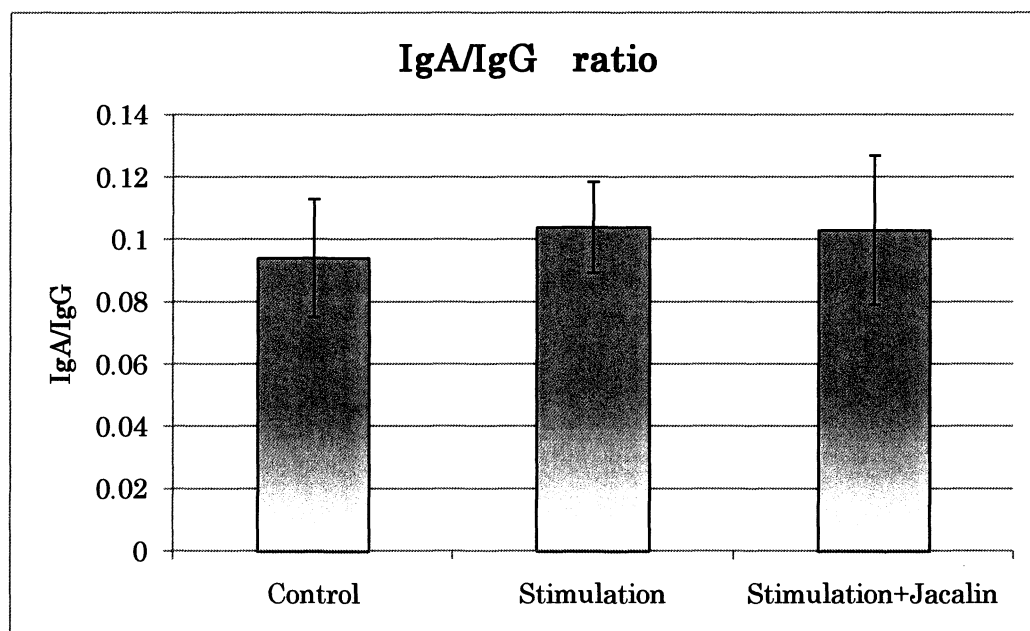


Fig.3-2-4 IgA/IgG

Fig.3-2-4 は、縦軸に ELISA 測定による IgA に対する IgG の濃度、横軸に培養条件を示した。

Control では、 $0.094 \pm 0.018 \text{ ng/ml}$  であった。

Stimulation では、 $0.104 \pm 0.014 \text{ ng/ml}$  であった。

Stimulation + Jacalin では、 $0.103 \pm 0.023 \text{ ng/ml}$  であった。

### 3-3 IgA・IgG 産生 B cell

#### 3-3-1 B cell の分離

細胞数は以下のとおりだった。

- ・ 単核球フラクション単離後 (PBMC) の細胞数 …… $4.4 \times 10^7$  cells
- ・ B cell の細胞数 …… $4.6 \times 10^6$  cells
- ・ 播種細胞数 …… $2.0 \times 10^5$  cells/well

#### 培養条件

Table 3-3-1 B 細胞 培養条件

condition	anti CD40	IL-2	IL-4	Jacalin
Control	-	-	-	-
Stimulation	○	○	○	-
Stimulation + Jacalin	○	○	○	○



### 3-3-2 ELISA ; IgA

Table 3-3-2 IgA 産生量

Condition	IgA(ng/ml)				average	SD
Control	1.7	1.9	2.4	2.4	2.1	0.36
Stimulation	9.0	8.7	12.3	12.3	10.6	2.00
Stimulation + Jacalin	9.1	9.2	7.2	7.2	8.2	1.13

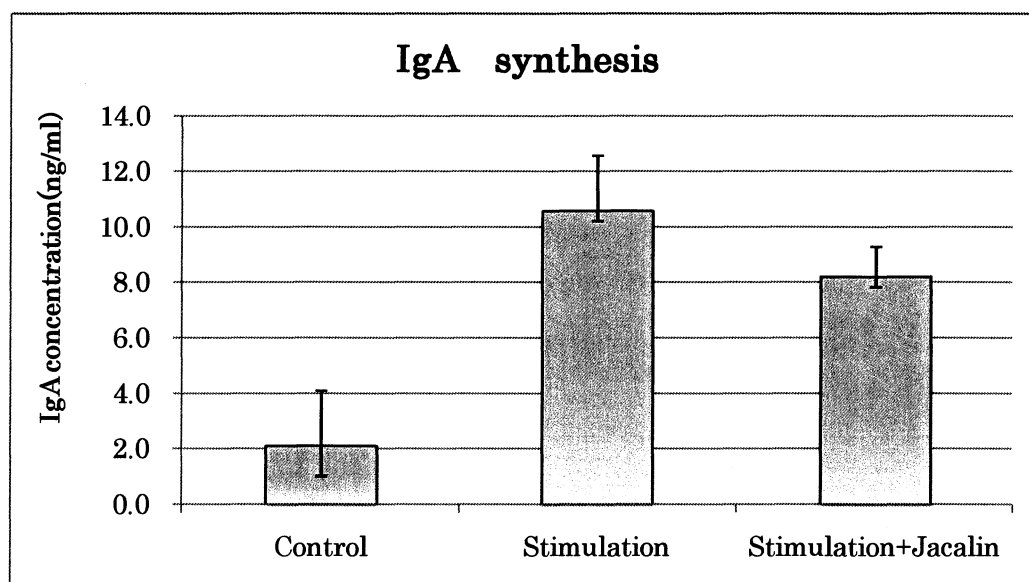


Fig .3-3-2 IgA 産生量(ng/ml)

Fig.3-3-2 は、縦軸に ELISA 測定による IgA 濃度、横軸に培養条件を示した。  
Control では  $2.1 \pm 0.36 \text{ ng/ml}$  であった。  
Stimulation では、 $10.6 \pm 2.0 \text{ ng/ml}$  であった。  
Stimulation + Jacalin では、 $8.2 \pm 1.13 \text{ ng/ml}$  であった。

### 3-3-3 ELISA ; IgG

Table 3-3-3 IgG 産生量

Condition	IgG(ng/ml)				average	SD
Control	26.9	28.8	32.7	40	32.1	5.79
Stimulation	47.1	47.1	38.2	45.3	42.2	4.66
Stimulation+Jacalin	38.2	40	34.5	38.2	37.7	2.30

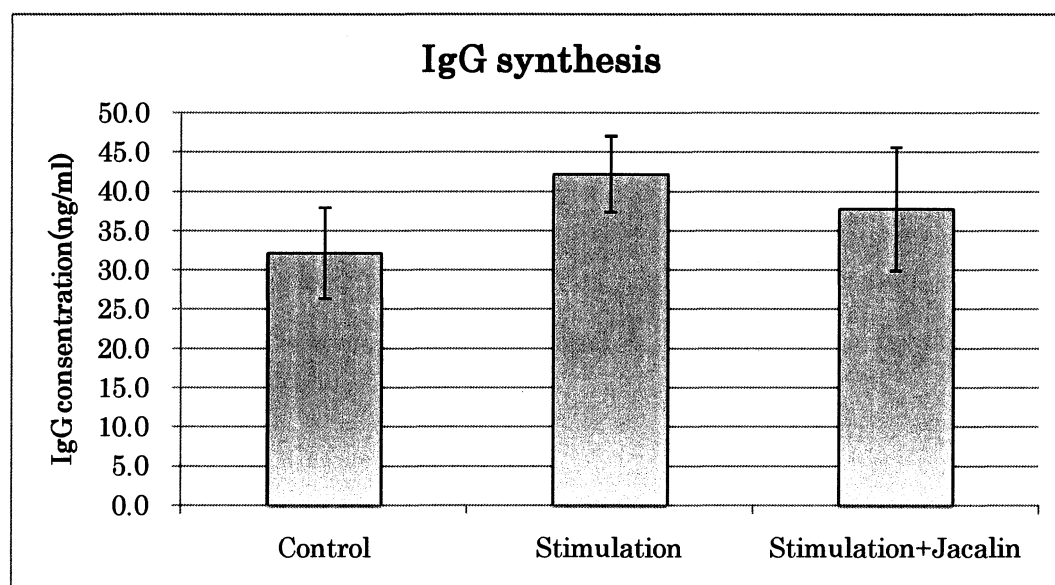


Fig .3-3-3 IgG 産生量 (ng/ml)

Fig.3-3-3 は、縦軸に ELISA 測定による IgG 濃度、横軸に培養条件を示した。  
Control では  $32.1 \pm 5.79$  ng/ml であった。  
Stimulation では、 $42.2 \pm 4.66$  ng/ml であった。  
Stimulation+Jacalin では、 $37.7 \pm 2.3$  ng/ml であった。

### 3-3-4 ELISA ; IgA/IgG

Table 3-3-4 IgA/IgG

Condition	IgA	IgG	ratio	SD
Control	2.1	32.1	0.065	0.00506
Stimulation	10.6	42.2	0.2505	0.04922
Stimulation+Jacalin	8.2	37.7	0.2171	0.02084

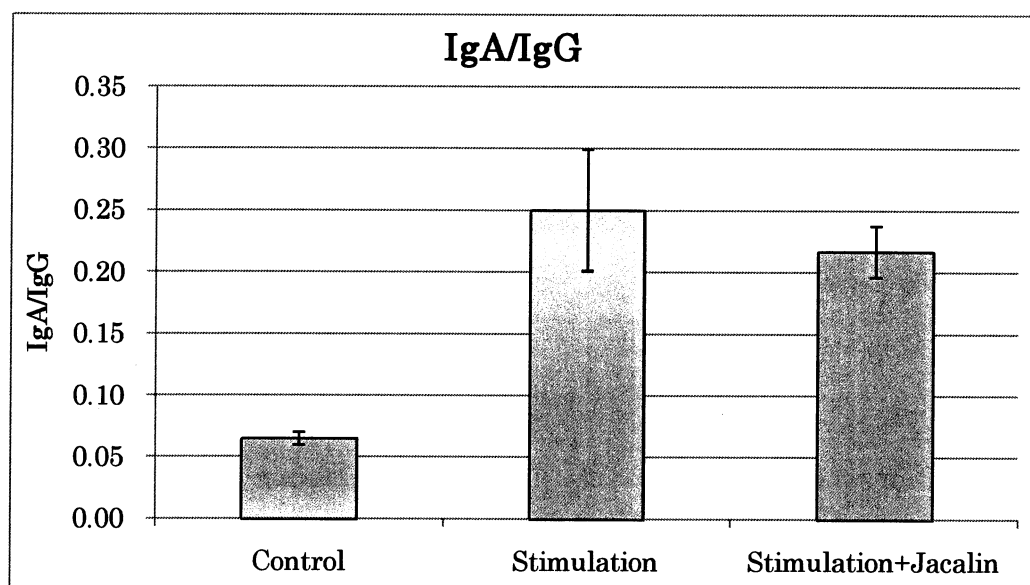


Fig.3-3-4 IgA/IgG 割合

Fig.3-3-4 は、縦軸に ELISA 測定による IgA に対する IgG の濃度、横軸に培養条件を示した。

Control では  $0.065 \pm 0.00506 \text{ ng/ml}$  であった。

Stimulation では、 $0.2505 \pm 0.04922 \text{ ng/ml}$  であった。

Stimulation+Jacalin では、 $0.2171 \pm 0.02084 \text{ ng/ml}$  であった。

Control と比較し、Stimulation は、約5倍の産生量があった。

### 3-4 CD4-PBMC による IgA・IgG 産生

#### 3-4-1 CD4<sup>+</sup>T cell を除いた PBMC の分離

細胞数は以下のとおりだった。

- ・ 単核球フラクション単離後 (PBMC) の細胞数 …… $4.4 \times 10^7$  cells
- ・ PBMC から CD4<sup>+</sup>T cell の細胞数 …… $4.6 \times 10^6$  cells
- ・ 播種細胞数 …… $2.0 \times 10^6$  cells/well

#### 培養条件

Table 3-4-1 細胞培養条件

	condition	anti-CD40	IL-4	Jac
PBMC not T	Control	-	-	-
	Stimulation	-	○	-
	Stimulation + Jacalin	-	○	○

※T 細胞依存性 B 細胞 (B2 細胞) は、CD4+T cell が発現している antiCD40 と結合することで活性化した後、増殖し、抗体産生に向かうので、CD4+T cell を除き、antiCD40 を加えない系は、T 細胞依存型 B 細胞 (B2 細胞) に刺激を与えないことになり、必然的に T 細胞非依存型 B 細胞 (B1 細胞) のみを増殖させ、抗体産生を促進させる系となる。

### 3-4-2 ELISA ; IgA

Table 3-4-2 IgA 産生量

condition	IgA (ng/ml)				average	SD
Control	124.8	167.3	157.9	181.7	157.9	24.16
Stimulation	161.4	172.1	200.5	242.0	194.0	36.00
Stimulation +Jacalin	189.1	205.0	161.7	182.7	184.6	17.93

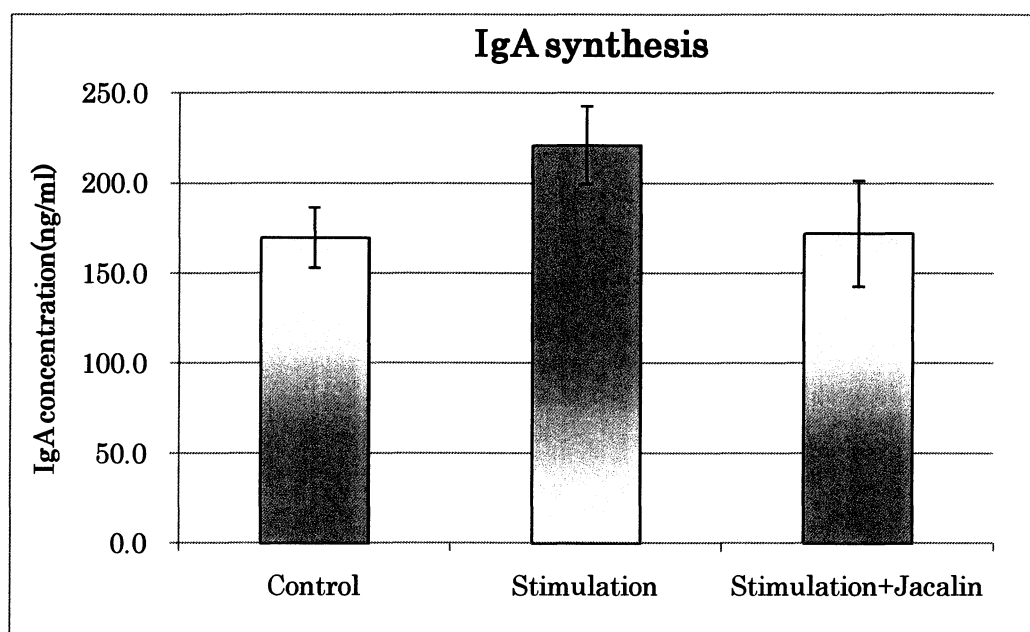


Fig .3-4-2 IgA 産生量 (ng/ml)

Fig.3-4-2 は、縦軸に ELISA 測定による IgA 濃度、横軸に培養条件を示した。  
Control では、 $157.9 \pm 24.16 \text{ ng/ml}$  であった。  
Stimulation では、 $194 \pm 36.00 \text{ ng/ml}$  であった。  
Stimulation + Jacalin では、 $184.6 \pm 17.93 \text{ ng/ml}$  であった。



### 3-4-3 ELISA ; IgG

Table 3-4-3 IgG 産生量

condition	IgG (ng/ml)				average	SD
Control	1851.1	1851.1	1356.0	1437.2	1623.8	264.50
Stimulation	1857.7	1900.5	1392.8	1429.8	1645.2	271.06
Stimulation +Jacalin	1837.9	1893.9	1608.3	1503.9	1711.0	185.30

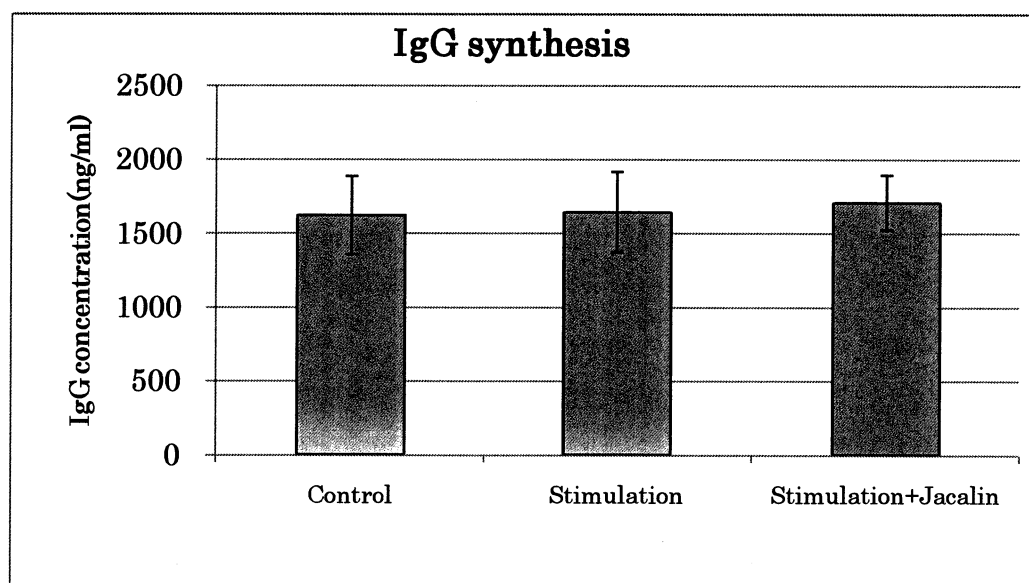


Fig .3-4-3 IgG 産生量 (ng/ml)

Fig.3-4-3 は、縦軸に ELISA 測定による IgG 濃度、横軸に培養条件を示した。  
Control では、 $1623.8 \pm 264.5 \text{ ng/ml}$  であった。  
Stimulation では、 $1645.2 \pm 271.06 \text{ ng/ml}$  であった。  
Stimulation + Jacalin では、 $1711.0 \pm 185.30 \text{ ng/ml}$  であった。  
Contol と Stimulation、Stimulation + Jacalin における IgG 産生量に変化は見られなかった。

### 3-4-4 ELISA ; IgA/IgG

Table 3-4-4 IgA・IgG 産生量

番号	IgA	IgG	ratio	SD
Control	157.9	1623.8	0.097	0.0266
Stimulation	194	1645.2	0.118	0.0405
Stimulation +Jacalin	184.6	1711	0.108	0.0093

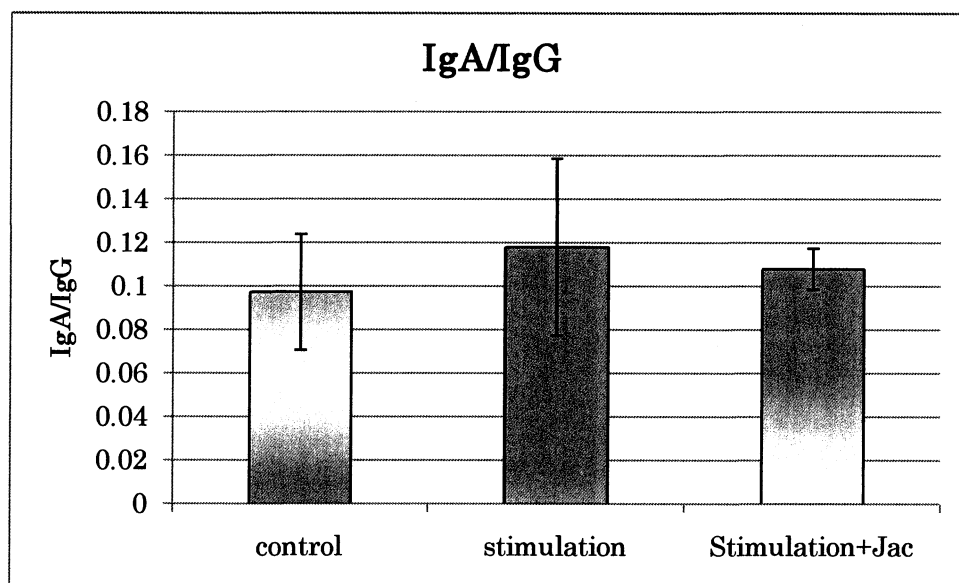


Fig.3-4-4 IgA/IgG 割合

Fig.3-4-4 は、縦軸に ELISA 測定による IgA に対する IgG の濃度、横軸に培養条件を示した。

Control では、 $0.097 \pm 0.0266 \text{ ng/ml}$  であった。

Stimulation では、 $0.118 \pm 0.0405 \text{ ng/ml}$  であった。

Stimulation + Jacalin では、 $0.108 \pm 0.0093 \text{ ng/ml}$  であった。

### 3-5 Jacalin の結合能試験

細胞表面に Jacalin が結合するのかを Fluorescein Jacalin を用い、確認を行った。それぞれの条件において B 細胞の FACS 解析での蛍光強度を示した。

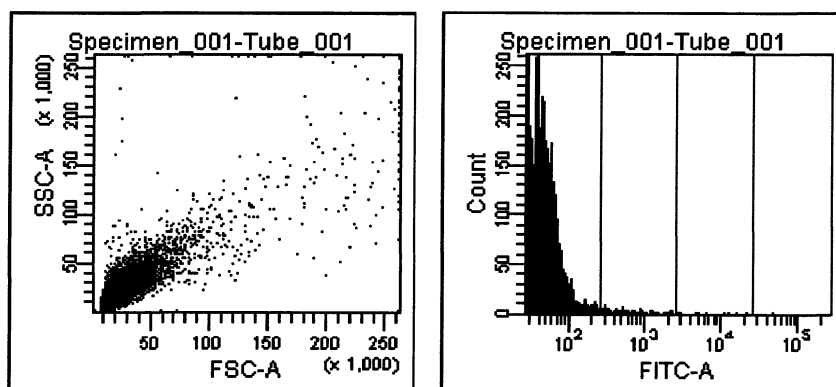


Fig 3-5-1 FITC-培地

FITC-培地を添加しても、蛍光はみられなかった。

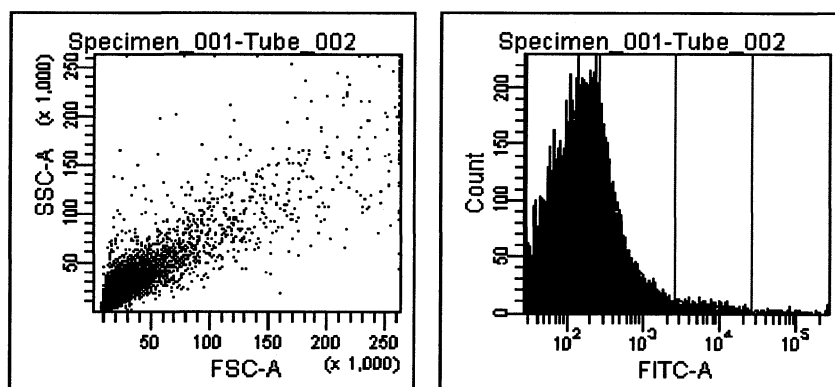


Fig 3-5-2 FITC-Jacalin

FITC-Jacalin を添加すると、Control と比較し、蛍光が見られた。

Control や FITC 培地には、蛍光が見られず、Fluorescein-Jacalin には、高い発現が見られた。これより、細胞表面に Jacalin が結合していることが分かった。

### 3-6 リンパ球の表面抗原と IgA 発現の様子

#### 3-6-1 T 細胞の表面抗原

T 細胞のみを分離して、細胞表面の抗原についての調査を行った。  
PECy7 についての発現を調べた。

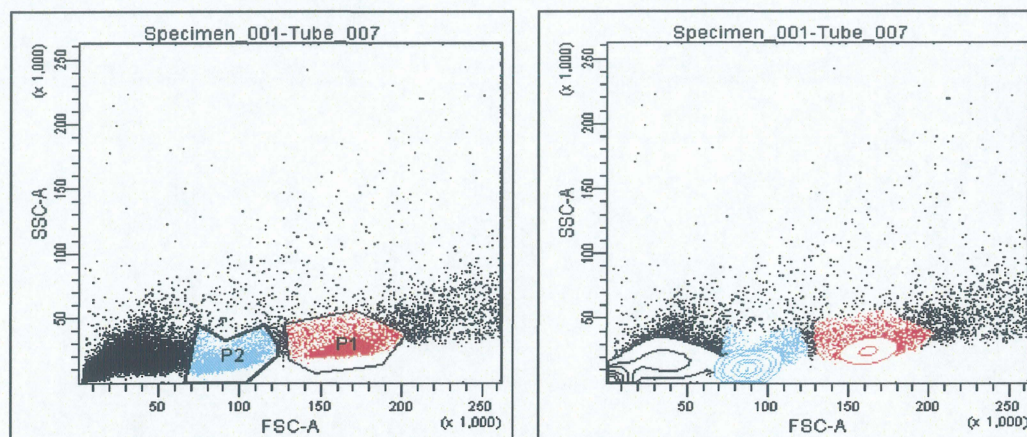


Fig.3-6-1 T 細胞の細胞集団

Fig 3-6-1 は、T 細胞のみを Flow Cytometry 測定を行ったものである。  
縦軸が SSC-A (内部構造)を示し、FSC-A (細胞の大きさ)を示している。  
T 細胞には、2つの細胞分布があり、P1 が活性化 T 細胞で、P2 が未分化 T 細胞である。

さらにこの2つの T 細胞に対し、CD5 の発現の様子について調べた。

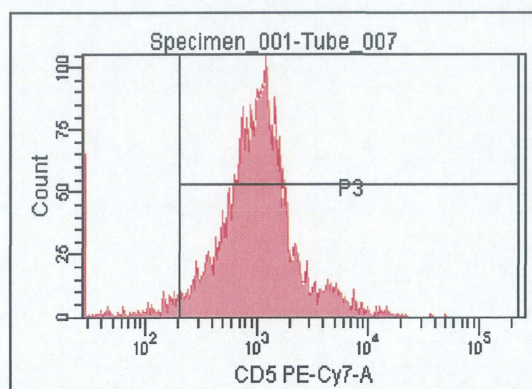


Fig 3-6-2 は、縦軸は活性化 T 細胞の CD5 発現のカウント数を示しており、横軸は蛍光強度を示している。

P3 は、FACS canto II によって positive の範囲を設定した。活性化 T 細胞は、CD5 を高発現していた。

Fig.3-6-2 活性化 T 細胞の CD5 の発現



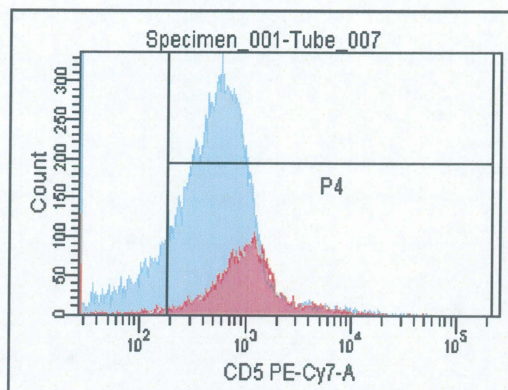


Fig 3-6-2 は、赤色が活性化 T 細胞で、水色が見分化 T 細胞を示している。縦軸は未分化 T 細胞ののカウント数発現を示しており、横軸は蛍光強度を示している。

P4 は、FACS canto II によって positive の範囲を設定した。未分化 T 細胞においても CD5 の高発現が見られた。

Fig.3-6-2 未分化 T 細胞の CD5 の発現

### 3-6-2 培養後の PBMC 中の B 細胞の IgA 発現

培養後の PBMC の細胞表面の IgA の発現量は、Flow cytometry によって測定を行った。

以下のように PBMC を測定に用いて、PECy7-CD5 と APC-CD19 の染色により、B 細胞を分離後、PE-IgA の染色により、IgA の発現量について調べた。

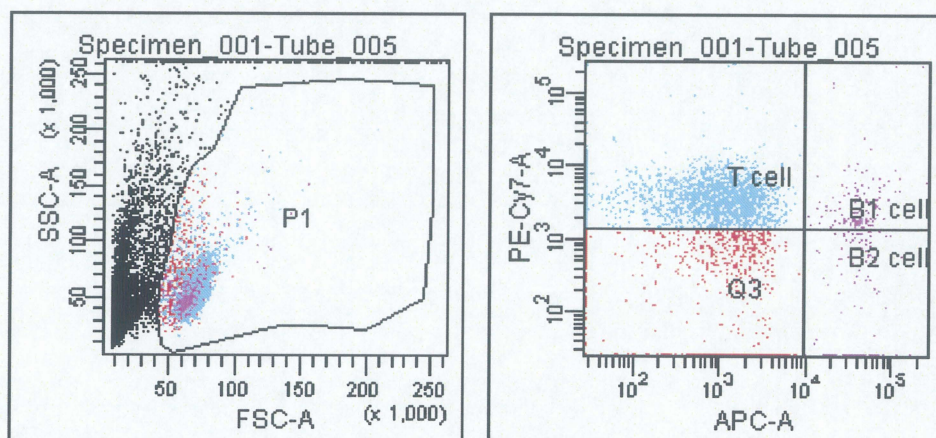


Fig.3-6-1 PBMC の測定分布 (Control)

Fig.3-6-2 二重染色によるリンパ球の分離

Fig.3-6-1 は、縦軸は、SSC-A(内部構造)を示し、横軸は、FSC-A(細胞の大きさ)を示している。P1 で示した部分が PBMC 細胞集団であった。

Fig.3-6-2 は、Fig 3-7-1 で PBMC 細胞集団と設定した細胞集団を PECy7-CD5 と



APC-CD19 によって二重染色したもので、縦軸は PECy7-CD5 の細胞のカウント数を示し、横軸は、APC-CD19 の細胞のカウント数を示している。

細胞の発現の設定は、FACS canto II によって positive・negative の範囲を設定した。

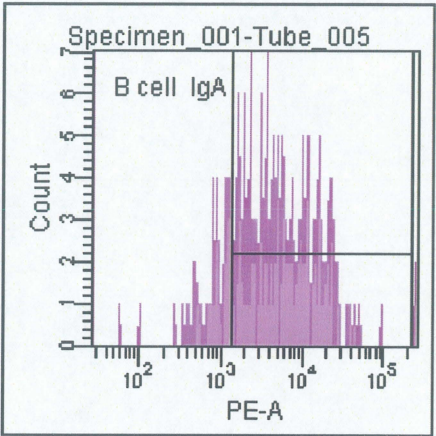


Fig.3-6-3 B 細胞による IgA 発現

Fig.3-6-3 は、Fig 3-6-2 において APC-CD19 を positive で設定した B 細胞の IgA 発現について示した。細胞における positive の設定は、FACS canto II によって行った。B 細胞は IgA を高発現していた。

Table3-6-1 PBMC における各細胞の IgA 発現量

Tube: Tube_005			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	30,000	####	100.0
■ P1	4,510	15.0	15.0
■ T cell	3,239	71.8	10.8
☒ T cell IgA	971	30.0	3.2
■ B1 cell	146	3.2	0.5
☒ B1 cell IgA	108	74.0	0.4
☒ Q3	977	21.7	3.3
■ B2 cell	148	3.3	0.5
☒ B2 cell IgA	114	77.0	0.4
■ B cell	294	6.5	1.0
☒ B cell IgA	226	76.9	0.8

Table3-7-1 は、全体の細胞におけるそれぞれの細胞の割合を示している。B 細胞において、IgA を発現しているものは、約 77%を示した。

Control だけでなく、antiCD40 と IL-4 の刺激を加えたもの、さらに、刺激に jacalin を加えたものを同様に B 細胞における IgA 発現を調査した。

その平均をグラフ化したものを示した。

Control

Table 3-6-2

Control 条件の  
B 細胞の IgA 発現量

con	
IgA(vs B1・B2)	
B1	B2
0.74	0.77

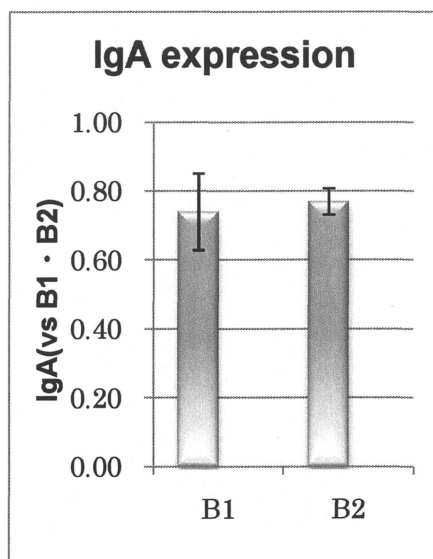


Fig.3-6-4 Control 条件の B 細胞の IgA 発現量

Table 3-6-2 は、Control 条件で培養したときのそれぞれの B 細胞の IgA 発現量について示しており、それをグラフ化したものが、Fig.3-6-4 である。

縦軸が B1 細胞・B2 細胞それぞれの細胞数における IgA 発現量の割合を示している。横軸は、B1 細胞・B2 細胞の条件を示している。IgA 発現の様子は B1 細胞は 0.74 を示し、B2 細胞は 0.77 を示した。

B1 細胞と B2 細胞で IgA 発現の様子には差はなかった。

## Stimulation

Table3-6-3  
stimulation 条件の  
B 細胞の IgA 発現量

stimu	
IgA(vs B1・B2)	
B1	B2
1.0	1.0

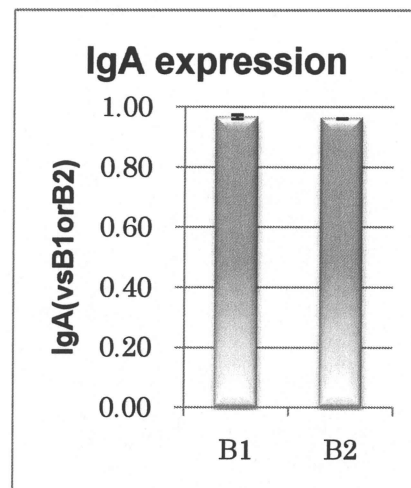


Fig.3-6-5 stimulation 条件の B 細胞の  
IgA 発現量

Table3-6-3 は、Control 条件で培養したときのそれぞれの B 細胞の IgA 発現量について示しており、それをグラフ化したものが、Fig.3-6-5 である。

縦軸が B1 細胞・B2 細胞それぞれの細胞数における IgA 発現量の割合を示している。横軸は、B1 細胞・B2 細胞の条件を示している。IgA 発現の様子は B1 細胞は 1.0 を示し、B2 細胞は 1.0 を示した。

B1 細胞と B2 細胞で IgA 発現の様子には差はなかった。



## Stimulation + Jacalin

Table 3-6-4  
stimulation 条件の  
B 細胞の IgA 発現量

Jac	
IgA(vs B1・B2)	
B1	B2
0.97	0.95

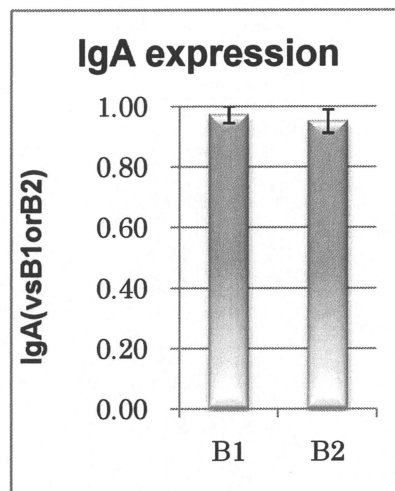


Fig.3-6-6 stimulation 条件の B 細胞の IgA 発現量

Table3-6-3 は、Control 条件で培養したときのそれぞれの B 細胞の IgA 発現量について示しており、それをグラフ化したものが、Fig.3-6-5 である。

縦軸が B1 細胞・B2 細胞それぞれの細胞数における IgA 発現量の割合を示している。横軸は、B1 細胞・B2 細胞の条件を示している。

IgA 発現の様子は B1 細胞は 0.97 を示し、B2 細胞は 0.95 を示した。  
B1 細胞と B2 細胞で IgA 発現の様子には差はなかった。

Contol と比較したところ、Stimulation やさらに Jacalin を加えたものは、B1 細胞や B2 細胞ともに、IgA の発現が高かった。

しかし、B1 細胞と B2 細胞を比較しても、その違いはなく、どちらも同じ割合で、IgA が発現していることが分かった。

### 3-7 健常者と患者の IgA 濃度・B 細胞中の IgA 発現量

#### 3-7-1 IgA 濃度

健常者と患者での IgA 濃度と、B 細胞中の IgA 発現量の測定を行った。  
結果は、以下のようになった。

Table3-7-1-a 健常者の IgA 濃度

Control Sample	IgA(mg/dl)
1	279
2	242
3	265
4	283
Aver	267

Table3-7-1-b 患者の IgA 濃度

Patients Sample	IgA(mg/dl)
1	435
2	407
3	283
Aver	375

Table3-7-1-a は、本研究室の被験者の IgA 濃度について調べたもので、平均値は、267mg/ dl であった。

Table3-7-1-b は、三重大学病院腎臓内科に通院している IgA 腎症患者についての結果であたり 375mg/ dl であった。

血液検査で成人の場合、血清 IgA 値 315mg/dl 以上であることで IgA 腎症の確立が高いと判断される。

今回の IgA 腎症患者の平均値も 375mg/dl を示した。

### 3-7-2 B 細胞中の IgA 発現の割合

健常者と患者の末梢血から赤血球を溶血させることにより、細胞数が大幅に減少し、それにより、Flow Cytometry による測定を容易にした。

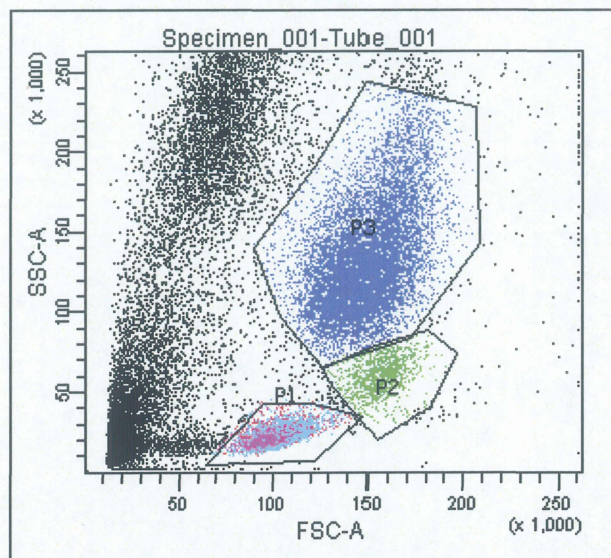


Fig.3-7-2-a ヒトの末梢血の分布

Fig.3-7-2-a は、溶血作業を行い赤血球を除去し、残った細胞サンプルを FlowCytometry によって測定したときのデータを示した。

縦軸は SSC-A (細胞の内部構造)を示し、横軸は、FSC-A (細胞の大きさ)を示した。細胞サンプルを測定すると、大きく 5 種類くらいに細胞が分布した。

P1 は、リンパ球を示しており、P2 は単球、P3 は顆粒球を示している。蛍光試薬を用いなくても、細胞の情報のみで末梢血に存在する細胞を分離することができた。



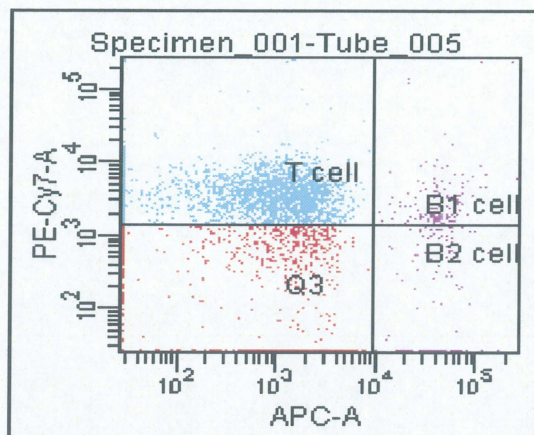


Fig.3-7-2-b 末梢血中の  
リンパ球の分離

Fig.3-7-2-b は、Fig.3-7-2-a の P1 のリンパ球部分の細胞を APC-CD19 と PECy7-CD5 によって二重染色を行った。

縦軸は PECy7-CD5 の細胞カウント数を示し、横軸は APC-CD19 を示している。  
2 つの染色における positive と negative の設定は FACS canto II で行った。

Fig 3-7-2-b により、T 細胞と、B 細胞の分離を行うことができた。

健常者と患者の B 細胞のうち、B1 細胞と B2 細胞の中での IgA の発現量を  
示した。

Table3-7-2-a B1 細胞の中での IgA 発現量

IgA 発現量	
健常者	患者
33.6	60.6

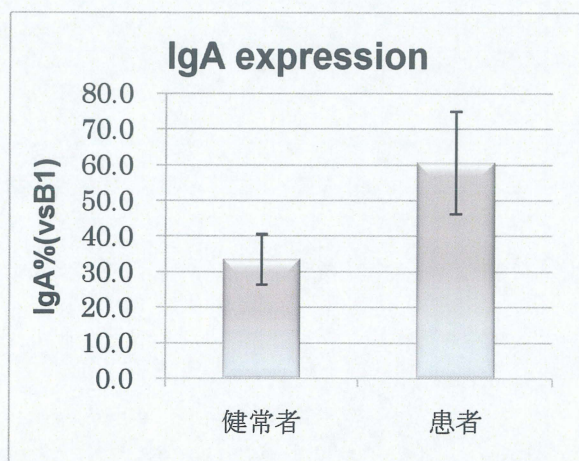


Fig.3-7-2-c B1 細胞中の  
IgA 発現量



Table3-7-2-a は B1 細胞の中での IgA 発現量を表に表わしたもので、グラフを数値化したものが、Fig.3-7-2-c になる。

B1 細胞における IgA 発現量は、健常者では約 34%で、患者では約 61%で、患者の方が、約2倍の IgA 発現量を示した。健常者と患者を比較すると、患者の方が、B1 細胞における IgA 発現が高いことが分かった。

Table 3-7-2-b B2 細胞の中での IgA 発現量

IgA発現量	
健常者	患者
19.7	39.6

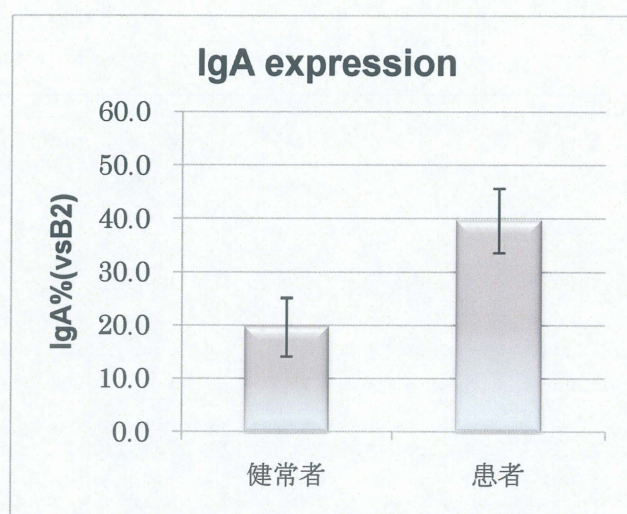


Fig.3-7-2-d B2 細胞中の IgA 発現量

Table3-7-2-b は B2 細胞の中での IgA 発現量を表に表わしたもので、グラフを数値化したものが、Fig 3-7-2-d になる。

B2 細胞における IgA 発現量は、健常者では約 20%で、患者では約 40%で、患者の方が、約2倍の IgA 発現量を示した。

## 4. 考察

### 4-1 Jacalin の抽出・精製

3-1-1 の結果から Jackfruit 約 10kg の中には、約 2.3kg の種が含まれており、その種から抽出される抽出物は、約 100g である。また、その抽出物中に含まれる精製された jacalin の質量は、約 24g であることが分かった。しかし、今回は、過去に届いた Jackfruit 全ての平均を取り、計算を行ったものなので、計算から算出できた Jackfruit から精製 Jacalin の収率はおよそその値である。

3-1-2 の結果から、Jackfruit の熟れ具合と Jackfruit の重さには関係が見られず、種の総重量と熟れ具合にも関係は見られなかった。しかし、Fig 3-1-2-2 をみて、Jackfruit 総重量と種総重量の関係について考えると、Jackfruit の重さが増加すると種の重さも増加することが分かった。しかし、より詳細な関係について分からず、今回使用した Jackfruit は、小さいものでは 3kg ぐらいのものから大きいものでは 13kg に達するような質量による個体差もあり、種がたくさんあるものや全くないもの、種の大きさがとても大きいものや種が小さくて回収も困難な程であるものまで、ばらばらであった。

このように、Jackfruit を入手したとしても入手できる Jacalin の量はとても少ないため、安定的かつ効率的に Jacalin を供給するための検討が必要である。また入手段階においても、Jackfruit の樹齢なども種の大きさなどに影響があると考えられており、現在入手しているルートにおける樹齢が低い樹木から採取される Jackfruit が果実が成熟していても種が小さく種の成熟ができていないことがある。今後入手する Jackfruit についても検討が必要であると考えられる。また、Jackfruit は果実が1つ1つの房状になっており、その1つ1つの房を区切る繊維状のものがあるが、この繊維状の成分が Jackfruit の成熟度合いによって粘度が大きく異なり、この粘度によって Jackfruit から種を取り出す作業効率が変わるため、今後この作業改善も検討する余地があると考えられる。また、Jackfruit からとれる種の質量は限られており、Jackfruit の大部分は、果実が占めているため、この果実の有効利用についても検討していく必要がある。

また、抽出した Jacalin も、精製段階で、透析中に沈殿物ができるなど、性質に違いがある可能性もあり、Jacalin 自体の含有量や構造・糖鎖認識能などの違いがある可能性もある。また S.Kabir などによると、Jackfruit から抽出した Jacalin の中にも例えば早熟の段階の種子は分子量分布に完熟のものと比較し、違いがみられるものもあるといった報告もある。<sup>(13)</sup> さらに、Jackfruit から抽出できるレクチンを等電点で5つの isolectin に分類することができるという報告<sup>(15)</sup>もあり、Jacalin がいくつかの分類分けを

することができることを示唆しているため、今後は、Jacalin の精製段階の検討や精製物の分類分けを行うことで、より細胞に効果のある jacalin 成分のみを精製することができると考えられる。

また、Jackfruit から抽出されるレクチンは、Jacalin ではなく、アルトカルピンも存在する。<sup>(17)</sup>これは、リンパ球を活性化させるものであるとされるが、これについても検証してみる価値があると考えられる。

## 4-2 IgA・IgG 産生

Fig 3-2-2 の IgA 産生について、Control、Stimulation、Stimulation+Jacalin の3条件において、変化があまりなかったことは、以下のような誤差によることが考えられる。

まず1つに、PBMC の細胞数自体の細胞数の問題である。PBMC に分離を行うとき、末梢血から PBMC fraction を分離する段階における操作は全て手作業であり、またその PBMC fraction と血漿部分の境界線はとても見にくい。さらに Lymphoprep Tube で赤血球も分離させているが、PBMC fraction をピペットマンでとるときに赤血球も混入してしまう。これは、この分離した PBMC fraction を遠心分離することで、細胞塊が赤くなっていることから混入してしまっていることが確認でき、赤血球が混入することによって、本来の PBMC の細胞数が減少し、細胞カウントの信頼性が低くなる。実際に PBMC に含まれるリンパ球は 6~15 $\mu\text{m}$ 、単球は 20~30 $\mu\text{m}$ 、赤血球は 7~8 $\mu\text{m}$  と細胞の大きさで区別することはできない。<sup>(17)</sup>このため実験における操作は、細胞をより多く確保することも大切であるが、他の細胞が混入しないように注意を払うことも必要である。

2つ目に、各条件において、SD が大きく出たことが考えられる。今回 ELISA 測定を行う上で sample を調整するのに様々な濃度で測定を行ったため、Sample の希釈における誤差が含まれる。これによって SD が大きく出てしまっている可能性があるため、測定値において差がないように見えてしまうことは十分に考えられる。

3つ目に、PBMC 中の B 細胞数が少なかったため、数字として変化がでるほどの抗体産生が行われなかった可能性が考えられる。今回各条件で培養時に播種した PBMC の細胞数は、 $1.7 \times 10^6$  cells/well であり、さらに今回の細胞カウントには赤血球が多く混入していることもあり、この中での予測 B 細胞数は、B 細胞を分離した時の割合を考慮した  $1.7 \times 10^5$  cells/well よりはるかに少なくなることから、IgA 産生において変化が出るほど、抗体産生が行われなかった可能性がある。

IgG の産生量においても、上記の誤差が考えられる。さらに、IgA と IgG の割合を見ても、差はでなかった。これは、PBMC においては、刺激を添加しなくても、PBMC で B 細胞が T 細胞と一緒に存在するために、刺激の重要性が薄れるからではないかという

ことが示唆される。IgA においては、SD が大きい、Control と比較し Stimulation は IgA 産生量は増加し、さらに Stimulation と比較し Stimulation+Jacalin で IgA 産生は抑制傾向にあるため、今後再現性を増すことで傾向はつかめられると思われる。

さらに、B 細胞における結果についても、上記と同じ誤差が考えられる。B 細胞の細胞確保については、MACS システムによって、PBMC 時に赤血球が混合していたとしても、磁気ビーズの使用によって、CD19 ビーズに結合できる B 細胞のみを分離することで赤血球の混入は防ぐことができる。また B 細胞の IgA、IgG 産生においても、SD の誤差があるため、同じ希釈率での測定を行うことで、SD の差は小さくすることができると思われる。全体として B 細胞については、Stimulation によって抗体産生が促進され、stimulation+Jacalin によって、抑制効果が見られた。

また、CD4-PBMC における IgA・IgG 産生についても、PBMC と同じような誤差が考えられる。CD4-PBMC は Fig 3-4-2 のように IgA については、今後再現性を増やすことで差が認められると思われる。Fig 3-4-4 の IgG に対する IgA の割合を考えると Stimulation における抗体産生促進と Stimulation+Jacalin による抑制効果は見られなかった。

また全体として考えられる考察として、今回使用したのは1人の被験者からの血液サンプルであったので、個体差による細胞応答の違いについては検証できていない。このため、今後被験者の数を増やすことや実際に IgA 腎症患者の血液サンプルでも行い本当に患者の血液サンプルで行っても Jacalin による IgA 産生抑制の効果が見られるのか検証する必要がある。さらに、一般的にリンパ球は体調や体質(風邪をひきやすい体質か風邪をひきにくい体質か)などによって変化するため、毎回同じ細胞数を確保することができない。回収細胞数によって播種密度の変更や培養条件の変更などを行ってきたため、再現性が低くなっている。また、この体質によるリンパ球の変化はとても大きく、風邪をひきにくい人は白血球におけるリンパ球の割合が 50%を占めるのに対し、風邪をひきやすい人は、白血球におけるリンパ球の割合が 30%程になる。これより、被験者の体調や体質によって細胞数が限られるため、今後は、患者の血液サンプルを検証していく前段階として、健常者の様々な人の血液での研究を積み重ねることが必要になると考えられる。

本研究の IgA 腎症をモデルにした Stimulation 条件における IgA の過剰産生についての考察を行う。

IgA が産生されるためには、成熟 B 細胞が活性化し、形質細胞になることが必要条件となる。本研究では、T 細胞の刺激や T 細胞存在下などで T 細胞との相互作用を



狙い、活性化を誘導した B2 細胞に注目した系と T 細胞の刺激や存在なしで B 細胞の増殖因子として知られる IL-4 の刺激のみで B 細胞を増殖させた B1 細胞に注目した系の2つについて注目した。しかし、この B1 細胞における抗体産生のしくみは未だ研究段階である。

また、Jacalin によって IgA が抑制されたメカニズムを考えるためにも、B 細胞がどのような反応・刺激によって抗体産生を行っているのかについて考える。

患者では、健常者と比較し血中での IgA 濃度が高いことが分かっていることから、IgA 腎症には、抗体の中でも IgA が過剰に産生されるしくみが存在すると考えられる。

IgA が産生される機構は、大きく2種類ある。

第一に、T 細胞依存型の B2 細胞による IgA 産生である。

通常 B 細胞は、膜型免疫グロブリンを介して抗原刺激を受け、それとともにヘルパーT(Th)細胞の介助を受けて増殖し、さらに抗体産生細胞へと分化する。B2 細胞の活性化には以下のような経路があると考えられている。①Th 細胞による B 細胞上の主要組織適合遺伝子複合体、②MHC 遺伝子産物(主にクラス II 抗原)の認識を介したものの、③Th 細胞の可溶性因子(サイトカインなど)による介助である。

また、今回も T 細胞刺激として、AntiCD40 を使用したが、この B 細胞の CD40 に結合する抗原で T 細胞が発現している CD40L も B 細胞の活性化として知られている。B 細胞の CD40 と T 細胞の CD40L が結合することにより、B 細胞に T 細胞との接触依存性の活性化シグナルを伝達し、他のサイトカインと協力して、B 細胞の増殖・分化を誘導する。CD40 は、静止期 B 細胞に発現しており、CD40L は休止期 T 細胞には発現しておらず、活性化 T 細胞、特に CD4+T 細胞に高頻度に発現している。この CD40L は、抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示を行うと発現する抗原であり、B 細胞の活性化に重要な役割をしている。このように IgA の産生は Th 細胞からの刺激である AntiCD40 によって B 細胞が活性化され、IL-4 によって増殖することによって引き起こると考えられる。

本研究での実験においても、AntiCD40 と IL-4 による Stimulation によって IgA 産生が促進されたことが分かる。これにより、疑似的に IgA 腎症患者の IgA を過剰に産生する系を作成することができたことがいえる。

第二に、T 細胞非依存型の B1 細胞による IgA 産生について考える。しかし、現在でも B1 細胞の分化や活性化の機能については分かっていない。

Fig 3-4-2 の CD4-PBMC による IgA 産生を見ると、Stimulation で IgA 産生量の増加が見られ、Stimulation+Jacalin で Stimulation と比較し、抑制が見られた。これは、AntiCD40 がなく、T 細胞もないため、B2 細胞は活性化できないため、IL-4 の B1 細胞の増殖による IgA 産生の増加であると示唆される。

### 4-3 IgA 発現

次に患者と健常者の IgA 濃度について考える。健常者による IgA 濃度測定は、本研究室の被験者のサンプルによって行った。Table 3-7-1-a で示すように、被験者は、平均で 267mg/dl の IgA 濃度であり、IgA 濃度の血液中の正常値は、70~312mg/dl であるため、正常範囲内であった。Table 3-7-1-b より IgA 腎症患者の平平均 IgA 濃度は、375 mg/dl であったが、これは平均にしても IgA 腎症の診断指針である成人の場合、血清 315mg/dl 以上を超えている。また、IgA 腎症患者の被験者番号3の IgA 濃度 283mg/dl の患者は、治療を行っているため、血中の IgA 濃度が低くなっている可能性がある。被験者番号1と番号2の患者は、未治療の IgA 腎症患者のため、血中 IgA 濃度も高くなっていることが考えられる。

Fig 3-7-2-a は、末梢血における細胞分布を示した。P1~P3 までの Gate (枠) の設定は人による設定のため細胞集団を分離に多少の誤差が生じると考えられる。また、Fig 3-7-2-a における左上の方の細胞集団は、溶血作業によって溶血しきれなかった赤血球ではないかと考えられる。また、左下の細胞集団は、溶血作業時に混入したごみや、赤血球の溶血によって破壊された赤血球の破片などではないかと考えられる。

また、Fig 3-7-2-b 末梢血中のリンパ球の分離の図においても、FACS canto II によって設定を行い、線を引く位置を指定されるが、自分で設定するため、多少の誤差が考えられる。

Table 3-7-2-a と Fig 3-7-2-c での B1 細胞中の IgA 発現については、健常者が 30%、患者が 60% の発現量を示したが、これは患者の B1 細胞が IgA を作る能力が健常者よりも高いことが示唆される。今回は末梢血における B 細胞の観察を行っているが、扁桃腺の胚中心の B 細胞の B1 細胞は、特に IgA1 を産生している報告もあるため<sup>(20)</sup>、末梢血においても同じことが言える可能性もある。しかし、今回の実験は健常者の被験者も患者の被験者も人数が少なく、今後人数を増やすことで再現性を高める必要がある。

Table 3-7-2-b と Fig 3-7-2-d での B2 細胞中の IgA 発現についても同じ傾向が見られ、患者の B2 細胞の方が、IgA 産生能力が高いことが分かった。また、B1 細胞と B2 細胞で比較を行うと、B2 細胞より B1 細胞の方が、IgA を多く発現していることが示唆される。一般的に、B 細胞の割合はほとんどが B2 細胞のため、B1 細胞の IgA 産生能力なども今後注目していく必要がある。

3-6-1 の T 細胞の分布を観察した Fig 3-6-1 は、2 つの細胞集団が存在した。T 細胞は、活性化すると細胞が大きくなることが分かっているので、

P1 が活性化 T 細胞を示し、P2 が未分化 T 細胞を示している。T 細胞は、CD5 を発現していることが分かった。成熟 T 細胞は、CD5 を発現していることも知られていることから (FACS のページ) リンパ球における CD5+CD19-細胞集団は T 細胞であることが示唆される。

3-6-2 の培養後の B 細胞による IgA 発現の様子は、Table 3-6-1 から分かるように、Control では、B1 細胞も B2 細胞も 74%と 77%となっているが、Stimulation では、100% IgA 発現が見られ、Stimulation+Jacalin でも B1 細胞も B2 細胞も 95%以上を示した。この結果から示唆されることは、Stimulation と Stimulation+Jacalin は、B 細胞に対する IgA の発現量は等しいことである。

また、Fig 3-7-2-c や Fig 3-7-2-d など示した溶血させた末梢血サンプルの IgA 発現量と Fig 3-6-4 などの培養後の IgA 発現量を比較すると、培養後の Control の条件でも IgA 発現量が高い。これは Control 条件での培養などによっても、生体内の状態より、抗体産生が活発に行われた可能性がある。また、Fig 3-6-5 の Stimulation 条件での IgA 発現量や Fig 3-6-6 の Stimulation+Jacalin 条件での IgA 発現量がほぼ 100%を示しており、これが意味するのは、B 細胞のほぼ全てが IgA を発現していることになり、このような実際には起こらないことであり、実際 IgG も産生していることから、IgA 抗体が IgA のどこを認識しているものなのかを検討する必要がある。今後は、IgA の選択を検証するとともに、IgA だけでなく、IgM や IgG の抗体についても同時に測定を行うことで解消できると考えられる。

#### 4-4 IgA 産生部位

本研究では、健常者の末梢血を用いてリンパ球の観察を行ったので、体内で IgA 産生をするしくみについて考える。IgA が主に産生される場所は、粘膜部位であると考えられている。また、IgA 腎症の患者の体内での過剰な IgA 産生の場所、病巣感染部位の代表的な場所として扁桃腺があげられる。<sup>(18)</sup> また、扁桃腺は最初の抗原侵入部位である口や鼻の近くにあり、抗原侵入部位の近くで抗原に対し、即座に抗体を産生して抗原侵入を防ぐなど免疫の中でも重要な部分でもある。この扁桃腺が扁桃腺炎を起こしている IgA 腎症患者の扁桃腺では、IgA を発現している形質細胞が増加しており<sup>(19)</sup>、IgA を発現している B 細胞が扁桃腺のリンパ球活性化部位である胚中心に入り、多量体 IgA の産生が増加する。<sup>(20)</sup> このような過程により過剰に産生された IgA が血中にも流れ込むことで、IgA 腎症患者の血清における IgA 濃度が高くなると考えられている。

また IgA 腎症患者の扁桃腺は健常者と比較し、T 細胞非依存 B 細胞 (B1 細胞) の割合が高いことも報告されている。<sup>(20)</sup> また、B1 細胞は特に IgA 腎症の腎臓のメサンギウム領域に沈着する IgA1 を産生する B 細胞が多いことも分かっている。<sup>(20)</sup>

これから末梢血の B 細胞の観察を続けるとともに健常者と IgA 腎症患者の扁桃腺の B 細胞を検証していく必要がある。

免疫反応は、大きく2か所で行われている。粘膜部位と全身部位で、異なる抗体産生が行われている。<sup>(21)</sup> 大部分の IgA は粘膜部位で産生されており、循環 (血管やリンパ管など) に入るのはごく少量である。

粘膜 IgA は多量体がほとんどで IgA1 と IgA2 のどちらも産生されているが、粘膜部位の場所によっても割合は変化するとされている。<sup>(21)</sup> また粘膜部位の場所によって IgA の糖形成の形も変化するとされている。

また、この粘膜部位には、粘膜誘導組織と粘膜実行組織の2種類がある。粘膜誘導組織とは、粘膜組織の中でも抗原を体内に取り込みやすい組織である。粘膜誘導組織で体内に取り込まれた抗原に対する IgA を作る能力を持った B 細胞が粘膜免疫循環帰巣経路を通り、再び異なる粘膜部位で IgA を分泌する。この分泌される粘膜部位を、粘膜実行組織と呼ぶ。この粘膜免疫帰巣経路を通り、実行組織による IgA の分泌はホーミングレセプターと呼ばれる B 細胞表面分子の発現などの反応によって行われる。

これに対し、全身 IgA はほとんどが単量体で、血清に含まれる IgA は全身 IgA であるとされる。

粘膜 IgA と全身 IgA のシステムのバランスは、ホーミングレセプターによって調節されている。ホーミングレセプターのインテグリンの種類によって粘膜部位に移動し抗体産生を行うものと、全身部位に移動し抗体産生を行うものが調節される。さらに、IgA 腎症は、この粘膜免疫システムの異常や、粘膜抗原からの全身免疫の異常が原因とも考えられているため、この粘膜免疫と全身免疫における関係性を考えていく必要がある。実際に粘膜抗原と全身抗原を体内に入れることで、IgA1 産生反応を確認したところ、粘膜抗原を体内に入れると、末梢血 (全身免疫) での IgA1 産生量が増加することがわかっているから、粘膜免疫と全身免疫は関連性があることが示唆される。<sup>(22)</sup>

これらより、粘膜部位に侵入した粘膜抗原に対する全身免疫の異常な反応によって IgA 腎症患者の IgA1 過剰産生がおきている可能性が考えられている。

血清は免疫反応で分類すると全身部位に所属し、扁桃腺などは、粘膜部位に所属する。IgA 腎症患者と健常者で全身部位である血液中の血清と粘膜部位における IgA の性質についての研究も行われており<sup>(21)</sup>、患者と健常者で粘膜部位と全身部位での



IgA が異なることから今後健常者の全身部位である末梢血のみでなく、患者の末梢血、健常者の粘膜部位である扁桃腺、患者の扁桃腺を観察することが示唆される。<sup>(21)</sup>

また IgA 腎症患者の IgA は結合している糖鎖が不完全である、糖鎖不全であるとも言われており、この研究についても本研究室での実験において研究が進んでいる。実際に IgA 腎症患者の血清を調査したところ、糖鎖不全 IgA が多いことが分かっている。<sup>(23)(22)(24)</sup>

このように IgA 腎症患者では IgA 産生のシステムに異常があることが示唆される。

#### 4-5 Jacalin の免疫系に与える効果について

本研究において、IgA が過剰産生する条件に Jacalin を添加することにより IgA 産生抑制効果が見られたのは、いくつかの可能性が考えられる。

1つめは、Fig 3-3-2 や Fig 3-3-4 の Stimulation+Jacalin のものは、Stimulation の細胞数と比較し、B 細胞数の減少が起きた可能性である。IgA 産生では、Stimulation+Jacalin は Stimulation の産生量より減少傾向にあった。しかし、培養後の B 細胞の IgA 発現量に変化はなかった。これは、細胞に対する IgA 発現の割合は変化がないのに、実際の IgA 産生量に違いが見られることから、播種時には同じ細胞数であるはずの条件に Jacalin が加わることで、B 細胞の活性化の抑制、または、細胞のアポトーシスが起きていることが考えられる。実際に Jacalin が B 細胞に結合することによるアポトーシスの誘導が引き起こることが報告されている。<sup>(25)</sup>

B 細胞の活性化の抑制の場合を考える。Fig 3-3-2 のように、B 細胞のみの実験の場合、活性化には、T 細胞刺激が関連しているため、T 細胞と B 細胞の相互作用に Jacalin の影響が考えられる。Jacalin を添加することによって、CD40L-CD40 間の結合の抑制作用が働いている可能性もある。しかし、Fig 3-4-2 の T 細胞の刺激がない環境でも IgA 産生抑制が働いているようなので、T 細胞による B 細胞の活性化を考えるより、B 細胞自身の細胞数の変化にも注目するべきであると考えられる。今後は培養中の細胞数の変化にも注目していくべきだと思われる。

2つめは、Stimulation+Jacalin と比較し、Stimulation のものは、既に形質細胞となっている B 細胞が多いため、抗体産生が活発に行われている可能性がある。形質細胞は、B 細胞のマーカーとして利用している CD19 を発現しないため、Fig 3-6-4 から Fig 3-6-6 までの IgA 発現量を測定したデータには含まれない。これより、Fig 3-6-4 から Fig 3-6-6 で示した IgA の割合は、B 細胞に限定される話であり、形質細胞の細胞数や形質細胞の抗体産生の様子は現段階では観察することができない。今後形質細胞のみに発現している表面抗原の観察によって B 細胞との存在比や B 細胞とあわせた割合を検証していくことで追求できると考えられる。

さらに、今回の Fig 3-6-4 から Fig 3-6-6 で示した IgA の割合で特に Stimulation は全ての B 細胞に IgA を発現していることを示唆するデータとなっているが、実際には、IgG なども産生しており、1つの B 細胞は1種類の抗体しか産生することはできないため、このデータにおける信憑性は高くない。

このため、もし、Stimulation 条件より、Stimulation+Jacalin 条件の方が、IgA 発現が高かったとしたら、B 細胞中の膜型免疫グロブリンが形質細胞になり、分泌するまでの過程に Jacalin が作用した可能性も示唆される。膜型免疫グロブリンが分泌型免疫グロブリンになるためには、形質細胞に分化する段階で、B 細胞がそれまで膜型免疫グロブリンの産生を中心に行っていたのを分泌型免疫グロブリンの産生を行うことに切り替えるのだが、膜型と分泌型は免疫グロブリンの H 鎖の C 末端が違う。<sup>(8)</sup>この違いは、DNA の再編成ではなく、RNA のスプライシングのパターンと一次 RNA 転写物のプロセシングによるものであると考えられているため、この過程に jacalin が作用する可能性もある。

さらに、本研究では、IgA を過剰に産生させるモデルを IgA 腎症モデルとしたが、IgA 腎症は IgA が多く産生され、腎臓に沈着して引き起こる疾患であるが、IgA とともに IgA と IgG の複合体の沈着も考えられているため、IgA 腎症と IgG との関連性についても調査されている。<sup>(26)(23)</sup>また、クラススイッチによって、IgA や IgG が作られることからこの過程にも注目されている。

#### 4-6 今後の治療への Jacalin の応用

本研究においては、 $2.0 \times 10^5$  cells で Jacalin  $1.0 \mu\text{g}$  で効果があったため、Jacalin を今後治療に応用するためには、全身の B 細胞に Jacalin が効果的に作用するために、静脈注射でどのくらいの Jacalin が必要になるのかについて検証を行った。

今回は、60ml の血液によって  $4.6 \times 10^6$  cells の B 細胞が回収できた。

したがって体重 60kg 成人でやく 4000ml の血液が流れている計算として、4000ml の血液中には、約  $3.07 \times 10^8$  cells の B 細胞が存在する計算で Jacalin は、約  $66.7 \mu\text{g}$  必要になる計算になる。また、平均 10kg の Jackfruit から 2500g の種がとれ、その中から 24g の精製 Jacalin が回収できることから、 $66.7 \mu\text{g}$  は、種を平均 69.8mg から入手できると考えられる。この精製 Jacalin  $66.7 \mu\text{g}$  を静脈注射によって患者の血液に直接入れることで、経口による Jacalin の吸収を考慮に入れず、直接の効果を想定できる。

しかし、Jacalin の品質の安定性の向上や、Jacalin の中でも効率的にリンパ球に作用があるものを分画できると、治療としての効果がより期待できると考えられる。

## 5. 結論

- ・ antiCD40・IL-4 の添加により IgA が優先的に産生された。
- ・ Jacalin 添加により抗体 IgA の産生が抑制された。
- ・ IgA 腎症患者と健常者との血液中の B 細胞の IgA 発現量を比較すると IgA 腎症患者の方が高く、B 細胞の IgA 産生能が高いことが分かった。

これより、in vitro で、IgA 腎症をモデルとした系において、Jacalin を投与させると IgA 産生が抑制され、治療つながるのではないかとということが示唆された。

## 6. 今後の展望

今後の展望として、Jacalin が患者の B 細胞にも効果があるのかを検証する必要がある。

また、Jacalin が、B 細胞のどのレセプターに結合し、IgA を抑制させるための刺激を与えたのか、どの段階の B 細胞に刺激を与えたのかについても明らかにしていきたい。そのためには、各分化段階の B 細胞を取り出し、それぞれに Jacalin を添加していくなどが必要であると考えられる。

さらに、Jacalin 自体の構造や、細胞に対する効果の違いについても検証していくべきであると思われる。

7. 参考文献

1. <http://www.nanbyou.or.jp/sikkan/001.htm>
2. 器官別 病態生理と治療薬 第2版
3. 人体の正常構造と機能 □腎・泌尿器 日本医事新報社
4. <http://homepage3.nifty.com/KO-GEN/kyoto/Hukujin.htm>
5. 奥村康 橋本博史 カラー図解 臨床に役立つ免疫学 2006年
6. Alice C.Smith, *et al* O-glycosylation of serum IgA1 Antibodies against Mucosal and Systemic Antigens in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* .2006.17.3520-3528
7. Itiei Narita *et al* Pathogenetic significance of aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. *Clin Exp nephrol*. 2008.12 .332-338
8. エッセンシャル免疫学 メディカル・サイエンス・インターナショナル
9. 矢田純一 医系免疫学 改訂9版 中外医学社
10. レクチン 歴史・構造・機能から応用まで 第2版 シュプリンガー・フェアラーク東京
11. Emmanuel Ruffet, *et al* Structural and electron-microscopic studies of jacalin from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) show that this lectin is a 65kDa tetramer. *Biochem.J* .1992.286 131-134
12. A.Arockia Jeyaprakash, *et al* Crystal Structure of the Jacalin-T-antigen Complex and a Comparative Study of Lectin-T-antigen Complexes.
13. S. Kabir. Jacalin: a jackfruit(*Artocarpus heterophyllus*)seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *Journal of Immunological Methods*.1998.212.193-211
14. 田縁 万里 平成15年度 卒業論文 Jacalin の経口投与による IgA 腎症の予防効果
15. Hafiz Ahmed *et al* Further Characterization and Immunochemical Studies. *The Journal of Biological Chemistry* .1989.264. 16 .9365-9372
16. De Miranda-Santos *et al* Activation of T and B cells by a crude extract of *Artocarpus integrifolia* is mediated by a lectin distinct from Jacalin. *J Immunol Methods*. 1991.140.2.197-203
17. 岩堀修明 管理栄養士を目指す学生のための解剖生理学テキスト 文英堂
18. J Ejido *et al* Immunological abnormalities in the tonsils of patients with IgA nephropathy:inversion in ratio of IgA: IgG bearing lymphocytes and increased polymeric IgA synthesis. *Clin exp Immunol* .1984.57.101-106
19. Satoru Suzuki *et al* Synthesis of immunoglobulins against *Haemophilus par*



- parainfluenzae by tonsillar lymphocytes from patients with IgA nephropathy.  
*Nephrol Dial Transplant* 2000 .5.619-624
20. Komada S *et al* Increase in tonsillar germinal centre B-1 cell numbers in IgA nephropathy(IgAN)patients and reduced susceptibility to Fas-mediated apoptosis.  
*Clin Exp Immunol*.2001.123.301-308.)
  21. Jonathan Barratt, *et al* Immunopathogenesis of IgAN, Semin Immunopathol.2007.29. 427-443
  22. Alice C *et al* O-glycosylation of serum IgA1 Antibodies against Mucosal and Systemic Antigens in IgA nephropathy.*J Am Soc Nephrol*. 2006.17.3520-3528
  23. Akihito Itoh *et al* Tonsillar IgA1 as possible source of hypoglycosylated IgA1 in the serum IgA nephropathy patients.*Nephrol Dial Transplant*.2003.18.1108-1114
  24. Iwase hitoo *et al* Incompleteness of Mucin Type Sugar Chain of Human Serum IgA1 as Possible Cause of IgA Nephropathy.Trends in Glycotecnology. 1999. 11.59.113-118
  25. Bruce Young *et al* The Lectin Jacalin induces human b-lymphocyte apoptosis through glycosylation-dependent interaction with CD45. *immunology*. 2008. 127.477-488
  26. Bene Mc *et al* Immunoglobulin A nephropathy. *J Clin Invest* .1983.71.1342-1347

## 8. 謝辞

本研究を進めるにあたり御指導、御助言を頂きました三重大学工学部生体材料化学研究室の堀内 孝教授、宮本 啓一准教授、生物工学研究室の富田先生、さらに、生体材料化学研究室内の学生の皆様方に対し、深く感謝いたします。

特に宮本 啓一准教授には貴重な時間の中で沢山の相談や指導、助言をいただき、研究に対してまっすぐ向き合う姿勢を学ぶことができ、学問の楽しさを初めて体験することができました。ここまでの理解と研究ができたことに本当に感謝します。この研究を行ったことが今後の人生において様々なことに役立ち、またきっかけを与えてもらえたと感じており、とても感謝しています。

また研究室の皆様には Jackfruit の解体作業やその他研究室生活においてなども助けて頂き、本当にありがとうございました。

協力していただいた全ての皆様へ心から感謝の気持ちと御礼を申し上げたく、謝辞にかえさせていただきます。