

- OVA 特異的抗体価の ELISA による測定について

各マウスの抗体価をグラフにまとめ、その結果を考察しなさい。ただし、考察には以下の key word を全て使用すること。

Key words : T 細胞、B 細胞、TCR、BCR、CFA、アジュバント、TD 抗原、自然免疫、PAMPS、PRR、MHC classII、共刺激分子、樹状細胞、クラススイッチング

解答のポイント

まず、採点していて一番目についたのは、実習に使ったマウスが抗原（OVA）を2回接種されたと勘違いしている人が非常に多くいたことです。つまり、「予め免疫されたマウス#2、#3は、OVA に2回目に接触して二次免疫応答を起こしたので抗体が沢山産生され、マウス#1 ははじめて OVA に遭遇したので自然免疫による応答が起きた。」と書いている人が沢山いました。実習書のどこをみてこんな風に勘違いしたのは判りませんが、どのマウスもたった一回しか処置をうけておりません。つまり、#1 は PBS しか投与されてなく、#2 と 3 は OVA に接触したのは1回きりです。当然、#1 は OVA に遭遇した事は一度もありませんので OVA 抗体が産生されなくて当たり前ということになります。「OVA が PAMPS となって自然免疫応答が起きた」と書いた人がいましたが、OVA（トリアルブミン）は単なるタンパク質なので PAMPS（微生物関連分子パターン）があるはずもなく、当然 PRR を刺激して自然免疫を活性化することはありません。じゃあ、どうして PBS 注射マウスでも OVA に結合する抗体反応が ELISA で検出されたの？と思うかもしれません。それは「自然抗体」とよばれる生来生体内に備わっている抗体が存在しているからです。「自然抗体」の形成は、おそらくある程度は、その個体が生まれてから過ごしてきた微生物環境で説明できると考えられています。すなわち、マウスの生育環境に存在していた微生物に対して作られた抗体が、OVA に対して「弱い交差反応」を起こしたと考えられます。しかし、「自然抗体」の特異性は、OVA 接種によって獲得免疫応答が働いて産生された抗 OVA 抗体のそれとは比べ物にならない程低いものであり、十分なエフェクター機能を発揮できるレベルにあるとは言えません。しかし、こういった「弱い」特異性を持つ自然抗体を体内に予め備えておくことは、はじめて遭遇した感染微生物の増殖をある程度食い止めるなどの効果があると考えられます。

多くの人が、アジュバントなしで OVA が接種されたマウス#2 で起こった反応に関して指定されたキーワードを駆使して長々と説明しておりました。しかし、残念ながらこれは設問の意図から外れた解答になっております。設問の狙いとしては、マウス#2 と#3 の抗体価の違いに関してキーワードを用いて説明して頂きたいと考えておりました。ここで重要だったのは、講義において再三説明した、「獲得免疫の活性化には自然免疫の活性化が必要である」という概念を思い出すことでした。この概念は、現代免疫学の中核を成す理論です。ここで考え方の鍵になる物質が、CFA に含まれる「結核菌」です。#1～#3 で使った試薬のうち、PAMPS を持

ち、自然免疫の PRR を刺激して活性化できるのは「結核菌」だけです。すなわち、#3 マウスでの免疫の説明において初めて「自然免疫」というキーワードが使われるべきなのです。つまり、「マウス#2 で既に十分な抗体産生応答が生じ、#3 はそれをただ増強したもの」と考えるのではなく、「マウス#2 では十分な獲得免疫の活性化が起きておらず、従って十分なレベルの抗体は産生されないが、マウス#3 では結核菌を含む CFA と共に免疫した事で自然免疫が活性化されて適切な獲得免疫応答が生じ、その結果、十分な量の抗体が産生された。」と考えるのが正しい解釈と言えます。次に考えるポイントは、「なぜ自然免疫が活性化しないと十分な獲得免疫応答が得られないのか」という点です。結核菌による「自然免疫」の活性化によって何が起こるのかというと、抗原提示細胞、特に、樹状細胞の活性化（成熟）が起きます。樹状細胞はナイーブ T 細胞のプライミングに中心的に働く細胞です。T 細胞のプライミングには TCR を介した刺激のみで不十分であり、樹状細胞が活性化して、T 細胞を分化させるのに必要なサイトカイン（IL-12 や IL-6 など）が産生されたり、抗原を提示する MHC 分子の発現量が上昇したり、CD28 のリガンドとなる CD80 や CD86 などの T 細胞共刺激分子の発現量が上昇したりすることが必要です。このような分子の発現が樹状細胞に誘導されなければ、樹状細胞はナイーブ T 細胞を十分に活性化することが出来ず、T 細胞は Th1 や Th2 などのエフェクター T 細胞に分化することができないのです。OVA はタンパク質であり、典型的な TD 抗原であるので、抗体産生にはエフェクター T 細胞のヘルプが必要です。T 細胞が十分に活性化しなければ、B 細胞を刺激してクラススイッチングを誘導する CD40L や IL-4 などが T 細胞から十分に供給されず、結果として抗体産生が十分に誘導されないということになります。アジュバントは、その性状によって、抗原を拡散しない様に長期間局所に留め（滞留効果）、抗原を徐々に放出する効果（徐放効果）をもつものもあります。しかし、アジュバントの働きの最も重要な点は自然免疫を活性化する成分を含んでいるということであり、滞留／徐放はその機能をより効果的にするためのものと考えて下さい。

（参考：結核菌が持つ PAMPS はいくつか考えられます。例えば、細胞壁のペプチドグリカン層には、TLR2 のリガンドであるリポ蛋白や NOD2 のリガンドとなる MDP が含まれています。また、細菌の DNA は TLR9 のリガンドとなります。また、細胞壁の TDM は C 型レクチン受容体の Mincle や MCL のリガンドとなり、この刺激は結核菌による肉芽腫形成に重要であるとされています。従って、CFA に含まれる結核菌死菌体には様々な PRR を活性化する PAMPS が含まれていると考えられます。）

- マウス脾臓細胞の FCM 解析について

- (1) 実験結果から、脾臓中の B 細胞、CD4 および CD8 T 細胞の数を算出してグラフにまとめなさい。

解答のポイント

殆どの人が計算法を間違っていました。おそらく正答率 5%くらいだと思います。少々この問題を舐めていたのではないのでしょうか？

解答のポイントは、チュルク液で染まるのは白血球であるということと、FCM 解析の forward scatter と side scatter の展開図において、R1 が白血球、すなわちチュルクで染まった細胞 (=カウントした細胞) を示し、R2 はリンパ球を示しているということ。さらに、CD4、CD8、CD19 の蛍光抗体染色を展開した図は、リンパ球、すなわち R2 の集団 100%として解析した数値であるということです。これを理解しないと正しい答えを導くことは出来ません。それと、「脾臓中の」と言っているので、脾臓液 1ml 中の数ではなく、脾臓 1 個あたりに含まれる総細胞数を示さなければなりません。最初に何 ml の BSA/PBS 液中で脾臓を潰したかを思い出してみましょう。

(2) 図 4 のデータは、ある分子の遺伝子欠損マウスの脾臓および胸腺細胞の FCM 解析の結果である。マウス A, B, C は、それぞれどのような分子の遺伝子が欠損していると考えられるか？ A, B, C それぞれについて考えられる分子を最低 1 つ挙げ、その理由を述べよ。ただし、マーカー分子自体の遺伝子の欠損は認めない。表 1 に白血球細胞のマーカーの発現を示す。

解答のポイント

全体を通してですが、「ある分子の遺伝子欠損」とは基本的に一つの遺伝子の欠損を指しております。複数の遺伝子が同時に欠損したように書いているものは減点いたしました。

マウス A:

T 細胞にはないが B 細胞の分化過程で重要な分子を挙げればよいでしょう。Btk、Ig α 、Ig β 、代替L鎖などが正解。「BCR」と書いている人が沢山いましたが、考え方は正しいですがやや不完全です。BCR は H 鎖と L 鎖の複合体であり、しかもそれぞれ沢山の遺伝子セグメントから形成されているので、1 つの遺伝子を欠損させて BCR の発現が無くなるようにするにはかなり細かい理解が本当は必要です。例をいうと、IgH 遺伝子の C μ 領域にある μ 膜結合部の遺伝子セグメントを欠損させると、膜結合型の IgM すなわち BCR 全体の発現がなくなります。L 鎖遺伝子を欠損させる場合でも、L 鎖は μ と κ の 2 つ存在しているので、一遺伝子欠損のみで BCR を消失させることは出来ません。従って、「BCR」とのみ書かれた方は 1 点引きました。

また、分子名や遺伝子名を書くだけでは解答として不十分であり、なぜその分子が B 細胞の分化に必要であるか、その理由をしっかりと書いていることが望ましい答です。例えば、「プレ BCR からシグナルは B 細胞分化の重要なチェックポイントであり、プレ B 細胞の段階でプレ BCR へのシグナルが入らないとそれ以降の B 細胞分化は進まない。Btk はプレ BCR や BCR のシグナル伝達に必要なキナーゼであり、Btk が欠損するとプレ BCR からシグナルが入力されず、その結果、プ

レ B 細胞の段階で B 細胞分化が停止してしまい、成熟した B 細胞が末梢から消失すると考えられる。」など。

マウス B:

CD8T 細胞の分化にのみ特異的に必要な分子、例えば、TAP などの ClassI 抗原提示に重要な分子が書ければよいでしょう。当然これもマウス A と同様、理由をしっかりと論ずる必要があります。MHC classI 遺伝子と答えた人が多数いました。考え方は良いですが、答えとしては不完全です。MHC classI 遺伝子と言った場合、それは ClassI の α 鎖のこと、つまり、マウスならば H-2K, H-2D, H-2L 遺伝子の 3 つがあります。それぞれ別の遺伝子ですので、一つの欠損で全ての ClassI の発現を無くす事はできません。しかし、全ての classI 分子が共有するコンポーネントである $\beta 2m$ を欠失させると全部の classI 分子の細胞表面への発現を無くす事ができるので、 $\beta 2m$ と書いた方は正解です。MHC classI 遺伝子領域が欠損したと書いている人がおりました。意図したものがどうかは判りませんが、H-2K, H-2D, H-2L を含む領域全体を欠損させたものと判断し、これは 1 点加点しました。

また、ネットでの検索結果を参考に答を書いて人が何人かおりました。例えば、最近の理研の谷内先生の論文発表のプレスリリースを元に書いていると思われる人が目につきました。そういった情報収集に関しては全く問題ありませんし、私自身も色々な執筆をする際にネットで得られた情報を利用する事はよくあります。しかし、レポートの書き方として、情報の引用先はしっかりと記載するようにしましょう。もう一つの問題は、プレスリリースの新聞記事を元に書いているため、当然詳しい情報は得られないわけですので、自分でその内容を消化しきれないまま間違った解釈でレポートをしているケースがありました。最新の研究をレポートしようとする姿勢はたいへん良いと思いますが、その場合は、その記事の元となった学術雑誌に掲載された論文（英文ですが）を読むなどしてしっかりと自分で学習する必要があるでしょう。しかし、今回の設問に関しては教科書を読み直して答えを探した方がずっと簡単だったと思います。

マウス C:

T 細胞と B 細胞の両方の分化に必要な分子が正解です。Rag 1, Rag2 などが挙げられます。IL-7 と解答している人が多かったです。考え方自体はよく、IL-7 は T 細胞の初期分化には確かに重要で、IL-7 欠損マウスでは T 細胞の数はかなり減少します。しかし、IL-7 欠損マウスでは骨髄 B 前駆細胞の数は減少するのですが、成熟 B 細胞は末梢に存在しており、全体の数もそんなに減少しないので、設問のような脾臓の染色パターンにはなりません。これは、実際に IL-7 欠損マウスの論文を読んで調べないとたぶん判らないことなので間違えて当然なのですが（必須と書いている教科書が悪い）、正解ではないので 1 点引きました。あしからず。