

令和3年度  
基礎科学研究  
研究報告

滋賀医科大学

医学部医学科生命科学講座

## 目 次

### <生理学>

1. カニクイザルの KLF4,KLF5 の研究 ----- 1  
伊原荘太郎

### <生物学>

2. 関節リウマチ合併間質性肺炎の病態形成に関与する抗シトルリン化フィブリノーゲン抗体の産生機序の解明 ----- 8  
中島花音
3. リンパ球における moesin の機能解析 ----- 17  
西野詩織
4. 免疫方法の違いによる IgD 抗体産生の解析 ----- 30  
村木津希子

### <薬理学>

5. ナルディライジンの酵素活性阻害薬に関する研究 ----- 38  
田原利桜

### <物理学>

6. 実空間高分解能観察法によるタンパク質オリゴマーの構造評価 ----- 44  
篠原陽平

### <情報総合センター>

7. 感染症数理モデルの数値シミュレーション —COVID-19 の実データとの比較— ----- 54  
三澤佑太
8. 感染症数理モデルの数値シミュレーション —COVID-19 と他の感染症との比較— - 63  
亀田隼大

### <化学>

9. 近年の人工乳の進歩 ----- 85  
伊藤亜友加
10. 神経管閉鎖障害発症リスク低減のための葉酸摂取について ----- 91  
日比野愛来

- 令和3年度基礎科学研究発表会プログラム ----- 98

## カニクイザルの KLF4、KLF5 の研究

滋賀医科大学 2年

112009 伊原荘太郎

### 1. 研究背景

#### 1-1. KLF ファミリー

Krüppel-like factor (Klfs) ファミリーの遺伝子制御タンパク質は、増殖、アポトーシス、分化、発生などの多くの生物学的プロセスに関与する転写因子である。Krüppel 様因子ファミリーの特徴は、3本の Krüppel 様亜鉛指が存在することであり、これらの亜鉛指は、DNA の CACCC 要素や GC リッチ領域に結合し、転写の活性化や抑制を媒介する。[1]

#### 1-2. KLF4

KLF4 は亜鉛フィンガーを含む転写因子であり、様々な組織で発現し、増殖、分化、発生、炎症、アポトーシスなど多くの生物学的プロセスを制御している。最初に同定されたのは腸や皮膚の上皮で、その成長と分化に関与していた[2]。KLF4 は、様々な組織で発現しており、増殖、分化、発生、炎症、アポトーシスなどの多くの生物学的プロセスを制御し、生体の恒常性維持に役立っている。KLF4 は転写因子として、細胞内の状況に応じてさまざまな遺伝子の転写を活性化したり抑制したりする。[3]

#### 1-3. KLF5

KLF5 も多くの遺伝子プロモーターの GC ボックスに結合し、その転写を制御する基本的な転写因子である。KLF5 は、発生過程で発現し、成人では増殖中の上皮細胞でより高いレベルで発現している。KLF5 の発現と活性は、Ras/MAPK、PKC、TGFbeta などの複数のシグナル伝達経路と、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化、などの様々な翻訳後修飾によって制御されている。KLF5 は、環境刺激に応じて遺伝子の発現を制御することで、細胞増殖、細胞周期、アポトーシス、移動、分化、幹細胞などのシグナル伝達機能を媒介していることが明らかになっている。KLF5 の発現は、がんや心血管疾患の血管平滑筋細胞 (VSMC) で頻繁に異常が見られる。[4]

#### 1-4. 神経幹細胞と KLF

発達過程および分化した神経幹細胞での KLF4 の過剰発現は、神経幹細胞の増殖と分化を阻害することが分かってきた[5]。加えて KLF5 も共に発現しており、KLF4 と協調して神経幹細胞に働きかける。これは神経幹細胞の未分化維持に関与している。神経

幹細胞の未分化性維持は脳の正常な機能にとって非常に重要で、この機能のお陰で生涯に渡りニューロンを新生することができる。KLF4の抑制機能が異常になれば人の場合でも記憶障害やうつ病などの精神疾患の原因になる可能性も指摘されている[6]。そのためKLF4、KLF5が神経幹細胞でどのように機能しているのかが詳細に解明出来たらこれらの疾患を治療できる手掛かりなり得る。このような点でKLF4,KLF5は重要な遺伝子である。

そこでKLF4,KLF5の機能解明をめざし、マウスより人に近縁なカンクイザルを用いて研究を行う。

## 2.目的

当面の目的は、サルの幹細胞でKLF4・KLF5をそれぞれ過剰に発現させ、どのような挙動を示すのかを観察し、そのうえでKLF4・KLF5の機能の詳細を明らかにすること。今回の実験は上記の目的の第一歩としてカンクイザルのcDNAからKLF4・KLF5を取り出すことを目的として行った。

## 3.材料と方法

### 3-1 テンプレート

カンクイザルのES細胞から作製した合成cDNAを使用。

### 3-2.プライマー

KLF4・KLF5それぞれのForwardプライマーには制限酵素EcoRIの認識サイトの塩基配列acgaatを、Reverseプライマーには制限酵素NotIの認識サイトの塩基配列ccgcgccを付加しプライマーを作成。これらの配列はPCR産物をプラスミドに導入する際ののりしろを作るために組み込んだ。

### 3-3.PCRクローニング PCR

3-1のテンプレートを3-2のプライマーを用いてPCRを行い、コーディング領域を増幅した。用いた酵素はTOYOBO社のKOD-plus-neo。

### 3-4.PCRクローニング ライゲーション

3-3のPCR産物を制限酵素で切り出し、それをプラスミドに導入する(16°Cで30分反応させる)。使用したプラスミドはBlueScript(マルチクローニングサイトにEcoRI・NotIの認識サイトを持つ)。

### 3-5.PCR クローニング トランスフォーメーション

3-4 で作成した KLF4/KLF5 導入プラスミドを competent cell に導入（42°Cで30秒反応させる）。その後、培養を行う。

## 4. 結果

PCR クローニングによって作成した KLF4 または KLF5 が導入された細胞から DNA を取り出し、クローニングを行った。その結果を以下に示す。

### KLF5 のシーケンス結果

```

M A T R V L S M S A R L G P V P Q P P A P Q D E P V F A Q L K P V
1 atggctacgpgggtgctgagcatgagcgcggcctgggaccctggcccagccgcccggagagagccctgttccggcagctcaagccctg
79 ---GTCACCGGGTCTGAGCATGAGCCCGGCTGGGACCCGTGCCACGCCCGCGCCGCGAGGACGCCCGTGTTCGCGAGCTCAAGCCCGTGC
*
*
*
L G A A N P A R D A A L F P G E E L K K H A H H R S Q A Q P A P A Q A
101 tggggccgcgaatccggccgcagcggcgctctccctggcgagagctgaagcaagcgcaccaccgctgcagggcgcagccgcccggcgagc
200
176 TGGGCGCCGCAAAATCCGGCCCGACGCGGGCTCTCCCTGGCGAGGAGCTGAGCAACGCGCACACCGCTCGAGGCCAGCCCGCGCCGCGAGGC
*
*
*
P Q P A Q P P A A G P R L P P E E L V Q T R C E M E K Y L T P Q L
201 cccgcagccggccagcgcggcctgcccggcgggctgctcccgagagctagtcagacagaatgtgaaatggagaagtatctgacacctcagctt
300
276 CCGGACGCCCGCCAGCCCGCTGCCGCCCGGGCTGCTCCGAGGAGCTAGTCCAGACAAGATGTGAAATGGAGAAGTATCTGACACCTCAGCTT
*
*
*
P P V P I I P E H K K Y R R D S A S V V D Q F P T D T E G L P Y S
301 cctccagttcctataatccagagcataaaaagatagacagacagctgctcagtcgtagaccagttcttccactgacactgaaggttacctacagta
400
376 CTTCCAGTTCCTATAAATCCAGAGCATAAAAGTATAGACGAGCAGTGCCTCAGTCTGAGACCAGTTCCTACTGACACTGAAGGGTTACCTTACAGTA
*
*
*
I N M N V F L P D I T H L R T G L Y K S Q R P C V T H I K T E P V A
401 taaacatgaactctctccctgacatcactcactcactgagaactggcctctacaatcccagagaccgtgcttaacacacatcaagacagaacctgtgc
500
476 TGAACTGACACTCTCTCCCTGACCTCAGTCACTGAGACTGGCTCTCAAAATCCAGAGCCGCTGACACTGACACTGACACTGACACTGACACTGAC
*
*
*
I F S H Q S E T T A P P P A P T Q A L P E F T S I F S S H Q T A A
501 cattttgacccagagtgaaagactgcccctcctccgcccagcccagcccctccctgagttaccagatatttccactcaacacagccagcagct
600
576 CATTTCAGCCACGAGCTGAAGACTGCCCCCTCCCGGCCGAGCCGAGCCCTCCCTGAGTTCACCAATATATTCAGCTCACACAGACCCCACT
*
*
*
F E V N N I F I K Q E L P T P D L H L S V P P Q Q G H L Y Q L L N
601 ccaggggtgaacaatatttcaacaacaagaacttctcaacaagactctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
700
676 CCAGAGGTGAAATAATTTTCATCAACAAGAATCTCTACACAGATCTTCACTTTCTGTCCTCCCCAGGAGGCCACTGTGACAGCTACTGAAATA
*
*
*
T P D L D N P S S T N Q T A A M D T L N V S M S A A M A G L N T H T
701 caccgatcagatagccactctcaacaacagacagcagcaatggcactcttaatttctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
800
776 CACCGATCTAGATATGCCAGTCTACAAACAGCAGCAGCAATGACACTCTAAATGTTCTATGTCAGCTGCCATGGCAGGCTTAACACACAC
*
*
*
S A V P Q T A V K Q F Q G M P P C T Y T M P S Q F L P Q Q A T Y F
801 ctctcgtgcttcgcagactgagtgaaacactccagggcagcgcctctgcaatacacatgccaagtcagttcttccacaacagccacttatttt
900
876 CTCTGCTGTCGCGAGACTGCAAGTAAACAATTCAGGGCATGCCCTTGACATACCAATGCCAAGTCAAGTTCCTCCACAACAGGCCACTTATTTT
*
*
*
P P S P P S S E P G S P D R Q A E M L Q N L T P P P S Y A A T I A
901 ccccctcaccacaagctcagagcctggaagtcagatagacaagcagagagctcagcaatttaaccccactccactctatgctcacaattgctt
1000
976 CCCCCGTACCACCAAGCTCAGAGCCTGGAAGTCCAGATAGACAAGCAGAGATGCTCCAGAAATTAACCCCACTCCACTCTATGCTGACAAATGCTT
*
*
*
S K L A I H N P N L P T T L P V N S Q N I Q P V R Y N R R S N P D L
1001 ctaaacctggcaattcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaat
1100
1076 CTAACCTGGCAATTCACAATCCAAATTTACCCACCACTGCGCAGTTAATCACAACAATCAACCTGTCAGATACAAATGAGGAGTAAATCCCGATTT
*
*
*
E K R R I H Y C D Y P G C T K V Y T K S S H L K A H L R T H T G E
1101 ggagaacagcagcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcact
1200
1176 GGGAACAGCAGCTCAGTCTGCGATACCTGGTTCACAAAGTTTATCAAAAGTCTTCTCATTAAAAGTCACTGAGGACTCACACTGGTGA
*
*
*
K P Y K C T W E G C D W R F A R S D E L T R H Y R K H T G A K P F
1201 aagccatcaaatgcaactgggaagctggcagctggaggttcggcagctggatgagctgaccgocactacgggaagcagcagcagcagcagcagcagc
1300
1276 AAGCCATCAAGTCACTGCGAGGCTGCGAGGCTTCCGCGATGCGATGAGCTGACCCCACTACCGGAGCCACAGGCGCCAGCCCTTC
*
*
*
Q C G V C N R S F S R S D H L A L H M K R H Q N *
1301 agtgggggtgcaaacagcttctcggctccgacacactggccctgcacatgaagagcaccagaactga 1374
1376 AGTGGGGGTGCAACCGAGTTCTCGCGCTCCGACCACTGGCCCTGCACATGAAGGGCCACAGAACTGA 1449
*
*
*

```

### サル KLF5 との比較

今回の実験でテンプレートから取り出し、導入した KLF5 はデータベース (NCBI) の

サル KLF5 の塩基配列と完全に一致したことが分かった。

## KLF4 のシーケンス結果

```
1>A---GBCAGCACCCTGGCGAGTCTGACATGGCTGTGACGCAAGCTGTGCTCCCGTCTCTCTCCACAGTTGCGCTCCGCGCCGCGGAGGGGAGAGACAC>97
707>A<img alt="red highlight" data-bbox="153 201 175 211"/>Ggcgacacacgtggcgagcttgacatggctgtcagcagcgc<img alt="red highlight" data-bbox="485 201 507 211"/>gtgtcc<img alt="red highlight" data-bbox="515 201 537 211"/>tc<img alt="red highlight" data-bbox="545 201 567 211"/>ttctccagcttcygcgc<img alt="red highlight" data-bbox="575 201 597 211"/>ggccggcgagggaagggagaagacac>106

98>TGGCTCCAGCAGTGGCCCCGATAACCGTTGGGCTGAGGAACTCTCTCACATGAAGCGACTTCCCCC---ACTTCCCGGGCGCCCTACGACCT---GGC>191
807>tgctc<img alt="red highlight" data-bbox="153 221 175 231"/>gagcagtgcccga<img alt="red highlight" data-bbox="215 221 237 231"/>taaccg<img alt="red highlight" data-bbox="245 221 267 231"/>ggcg<img alt="red highlight" data-bbox="275 221 297 231"/>agga<img alt="red highlight" data-bbox="305 221 327 231"/>ctctc<img alt="red highlight" data-bbox="335 221 357 231"/>acatgaagcgacttcccc<img alt="red highlight" data-bbox="365 221 387 231"/>ttc<img alt="red highlight" data-bbox="395 221 417 231"/>cttccggcgccc<img alt="red highlight" data-bbox="425 221 447 231"/>ta<img alt="red highlight" data-bbox="455 221 477 231"/>gacct<img alt="red highlight" data-bbox="485 221 507 231"/>ggc>906

192>GGCGACCGTGGCCACAGACCTGGAGAGTGGGGAGCTGGTGCAGCTTGCAGCAGTAAACAACCGCCCTCCTAGCCCGAGGGAGACCGAGGATTCAC>291
907>ggcgac<img alt="red highlight" data-bbox="153 251 175 261"/>gtggccacagac<img alt="red highlight" data-bbox="215 251 237 261"/>ggagag<img alt="red highlight" data-bbox="245 251 267 261"/>ggcg<img alt="red highlight" data-bbox="275 251 297 261"/>ag<img alt="red highlight" data-bbox="305 251 327 261"/>ggctgc<img alt="red highlight" data-bbox="335 251 357 261"/>gtc<img alt="red highlight" data-bbox="365 251 387 261"/>gtc<img alt="red highlight" data-bbox="395 251 417 261"/>caacc<img alt="red highlight" data-bbox="425 251 447 261"/>ggc<img alt="red highlight" data-bbox="455 251 477 261"/>tcta<img alt="red highlight" data-bbox="485 251 507 261"/>g<img alt="red highlight" data-bbox="515 251 537 261"/>ggag<img alt="red highlight" data-bbox="545 251 567 261"/>gagacggagaggttcaac>1006

292>GAGCTCCGGAGCTAGCTTTATCTTCTTCCAACTCGCTAAGCCAG--C--CAGGATCGGTGGCCCGCCGCTGACCACTCGCGCTCAGCTTCACTCCGCT>388
1007>ga<img alt="red highlight" data-bbox="153 271 175 281"/>tctctggacct<img alt="red highlight" data-bbox="215 271 237 281"/>gactttatcct<img alt="red highlight" data-bbox="245 271 267 281"/>ccaa<img alt="red highlight" data-bbox="275 271 297 281"/>tcgct<img alt="red highlight" data-bbox="305 271 327 281"/>accca<img alt="red highlight" data-bbox="335 271 357 281"/>ct<img alt="red highlight" data-bbox="365 271 387 281"/>ggag<img alt="red highlight" data-bbox="395 271 417 281"/>ct<img alt="red highlight" data-bbox="425 271 447 281"/>gtggccgccacctc<img alt="red highlight" data-bbox="455 271 477 281"/>cc<img alt="red highlight" data-bbox="485 271 507 281"/>tt<img alt="red highlight" data-bbox="515 271 537 281"/>cgtaag<img alt="red highlight" data-bbox="545 271 567 281"/>tc<img alt="red highlight" data-bbox="575 271 597 281"/>tccctegt>1106

389>GTTCGCCCGGCGAGCAGCGCGCTCGCGAGCGGCGCCCTCCACTCGAGCTTCACTATCCGATCCGGCCCGGGGTGACCCGGCGCTGCGTGC--AGCAACA>487
1107>c<img alt="red highlight" data-bbox="153 301 175 311"/>tcccc<img alt="red highlight" data-bbox="215 301 237 311"/>cgagcagcgccctcgacggegccctccacctgagatcca<img alt="red highlight" data-bbox="245 301 267 311"/>tatccgatccggcgccggg<img alt="red highlight" data-bbox="275 301 297 311"/>g<img alt="red highlight" data-bbox="305 301 327 311"/>gaccgggctggc<img alt="red highlight" data-bbox="335 301 357 311"/>ggc<img alt="red highlight" data-bbox="365 301 387 311"/>ggc<img alt="red highlight" data-bbox="395 301 417 311"/>ca>1205

488>GAGGTGGAGGGCTCCTCTAAGCGGAGAAATGCGCCACTCCACGGGCCCTTCAACTGGCGGACATCAATGAGCTGAGCCCTCGGGCGGCTTGGT>587
1206>g<img alt="red highlight" data-bbox="153 321 175 331"/>gg<img alt="red highlight" data-bbox="215 321 237 331"/>ggagg<img alt="red highlight" data-bbox="245 321 267 331"/>ctctcctac<img alt="red highlight" data-bbox="275 321 297 331"/>ctga<img alt="red highlight" data-bbox="305 321 327 331"/>cc<img alt="red highlight" data-bbox="335 321 357 331"/>ctcc<img alt="red highlight" data-bbox="365 321 387 331"/>ctcc<img alt="red highlight" data-bbox="395 321 417 331"/>gaggg<img alt="red highlight" data-bbox="425 321 447 331"/>ccctcaacctggcgacatcaa<img alt="red highlight" data-bbox="455 321 477 331"/>gactgagccctcggggcctcgt>1305

588>GGCTGAGCTCCTCGCGCGGATGTGAGCCAGTATAGACTTCCGCCACAGCCCTCAGGTGGCGGGCTGATGGCGAAGTTTGTGCTGAA--GC>686
1306>ggc<img alt="red highlight" data-bbox="153 341 175 351"/>ttagt<img alt="red highlight" data-bbox="215 341 237 351"/>ctc<img alt="red highlight" data-bbox="245 341 267 351"/>ggcc<img alt="red highlight" data-bbox="275 341 297 351"/>ctga<img alt="red highlight" data-bbox="305 341 327 351"/>cc<img alt="red highlight" data-bbox="335 341 357 351"/>acattccg<img alt="red highlight" data-bbox="365 341 387 351"/>cc<img alt="red highlight" data-bbox="395 341 417 351"/>gagcag<img alt="red highlight" data-bbox="425 341 447 351"/>cc<img alt="red highlight" data-bbox="455 341 477 351"/>ggcgccaggtggcggtgatgggcaagt<img alt="red highlight" data-bbox="485 341 507 351"/>gtgctga<img alt="red highlight" data-bbox="515 341 537 351"/>ggc>1404

687>GTCTCGACCCCTTCCGCGAGGTACAGCAG--CCTTCGCTCATCAGTGTAGc<img alt="red highlight" data-bbox="485 371 580 381"/>[Blue&#x27E9;KLF4:1469]GCCACCCCTGATGTCGCGCCCTAC>785
1405>gtc<img alt="red highlight" data-bbox="153 381 175 391"/>tgc<img alt="red highlight" data-bbox="215 381 237 391"/>ccctggcagcgatgac<img alt="red highlight" data-bbox="245 381 267 391"/>cag<img alt="red highlight" data-bbox="275 381 297 391"/>cc<img alt="red highlight" data-bbox="305 381 327 391"/>t<img alt="red highlight" data-bbox="335 381 357 391"/>cggtcatcag<img alt="red highlight" data-bbox="365 381 387 391"/>gt<img alt="red highlight" data-bbox="395 381 417 391"/>agcaagg<img alt="red highlight" data-bbox="425 381 447 391"/>agccc<img alt="red highlight" data-bbox="455 381 477 391"/>gacgc<img alt="red highlight" data-bbox="485 381 507 391"/>agccacc<img alt="red highlight" data-bbox="515 381 537 391"/>gtggt<img alt="red highlight" data-bbox="545 381 567 391"/>gtggc<img alt="red highlight" data-bbox="575 381 597 391"/>ccctac>1504

786>AGCGGTGGCGCCCGCAGTGTGCCCAAGATTAAGCAAGAGGCGGCTCCCGTCCGCAAGGTCAAGCGGTCCCTAGAGGCCCATTTGAGGGCTGAGCCCG>885
1505>a<img alt="red highlight" data-bbox="153 401 175 411"/>gg<img alt="red highlight" data-bbox="215 401 237 411"/>tgg<img alt="red highlight" data-bbox="245 401 267 411"/>cccgccg<img alt="red highlight" data-bbox="275 401 297 411"/>ag<img alt="red highlight" data-bbox="305 401 327 411"/>tggcccaagat<img alt="red highlight" data-bbox="335 401 357 411"/>taagc<img alt="red highlight" data-bbox="365 401 387 411"/>gagcggt<img alt="red highlight" data-bbox="395 401 417 411"/>c<img alt="red highlight" data-bbox="425 401 447 411"/>t<img alt="red highlight" data-bbox="455 401 477 411"/>c<img alt="red highlight" data-bbox="485 401 507 411"/>gca<img alt="red highlight" data-bbox="515 401 537 411"/>ccca<img alt="red highlight" data-bbox="545 401 567 411"/>ctg<img alt="red highlight" data-bbox="575 401 597 411"/>gctgga<img alt="red highlight" data-bbox="605 401 627 411"/>cccc>1583

886>AGCTCAGCAACCGCCACCGGCCCAACAGCAGCACTTCCCGCTGGGGCGGAGCTCCCGCACAGGACTACCCCTACAGTCCCGAGGAACTGCTGAA>985
1584>g<img alt="red highlight" data-bbox="153 421 175 431"/>ctcagaa<img alt="red highlight" data-bbox="215 421 237 431"/>ggccacggc<img alt="red highlight" data-bbox="245 421 267 431"/>ggcag<img alt="red highlight" data-bbox="275 421 297 431"/>gacttccccctggggcgagctcccc<img alt="red highlight" data-bbox="305 421 327 431"/>gagga<img alt="red highlight" data-bbox="335 421 357 431"/>ctcccc<img alt="red highlight" data-bbox="365 421 387 431"/>ac<img alt="red highlight" data-bbox="395 421 417 431"/>ctg<img alt="red highlight" data-bbox="425 421 447 431"/>ggc<img alt="red highlight" data-bbox="455 421 477 431"/>gagaa<img alt="red highlight" data-bbox="485 421 507 431"/>tgct<img alt="red highlight" data-bbox="515 421 537 431"/>g<img alt="red highlight" data-bbox="545 421 567 431"/>cc<img alt="red highlight" data-bbox="575 421 597 431"/>g<img alt="red highlight" data-bbox="605 421 627 431"/>cc>1683

986>CAGCAGGAGCTGCGCCCTCGCGCTCTTCCCGCAGGATTCGATCCCGCTCGCGCGCCAGCTACCC--TCCTTCCGCGAGCAGATGCTGCTCAG>1084
1684>cagcagggactgtcacctc<img alt="red highlight" data-bbox="153 441 175 451"/>ctcgt<img alt="red highlight" data-bbox="215 441 237 451"/>cttcccc<img alt="red highlight" data-bbox="245 441 267 451"/>gg<img alt="red highlight" data-bbox="275 441 297 451"/>tccatcccc<img alt="red highlight" data-bbox="305 441 327 451"/>cggggccc<img alt="red highlight" data-bbox="335 441 357 451"/>atacc<img alt="red highlight" data-bbox="365 441 387 451"/>ctc<img alt="red highlight" data-bbox="395 441 417 451"/>tccctg<img alt="red highlight" data-bbox="425 441 447 451"/>gaccagatgac<img alt="red highlight" data-bbox="455 441 477 451"/>ca>1782

1085>AGTCCCTCTCTCCATTATCAAGAGCTGATGCCACCGGTTCCGCTGCGCTGCGAGGAGGCCAAGCCAAAGAGGGGAAAGTCTGTCGCGCCCGGAAAGA>1184
1783>agtccc<img alt="red highlight" data-bbox="153 461 175 471"/>g<img alt="red highlight" data-bbox="215 461 237 471"/>ctccatta<img alt="red highlight" data-bbox="245 461 267 471"/>caagactatgccc<img alt="red highlight" data-bbox="275 461 297 471"/>gg<img alt="red highlight" data-bbox="305 461 327 471"/>tctctg<img alt="red highlight" data-bbox="335 461 357 471"/>g<img alt="red highlight" data-bbox="365 461 387 471"/>ccg<img alt="red highlight" data-bbox="395 461 417 471"/>gagagcccaagccaagaggggaa<img alt="red highlight" data-bbox="425 461 447 471"/>g<img alt="red highlight" data-bbox="455 461 477 471"/>ctg<img alt="red highlight" data-bbox="485 461 507 471"/>gccccggaaaa<img alt="red highlight" data-bbox="515 461 537 471"/>g>1882

1185>ACAGCCACCCACACTTGTGACTATGAGGCTGTGGCAAAACCTTACCAAGATTTGATCTCAAGGCACACCTGCGAACTCACACAGGGGAGAAACCTT>1284
1883>ac<img alt="red highlight" data-bbox="153 481 175 491"/>ggccaccacactt<img alt="red highlight" data-bbox="215 481 237 491"/>gtga<img alt="red highlight" data-bbox="245 481 267 491"/>ta<img alt="red highlight" data-bbox="275 481 297 491"/>gg<img alt="red highlight" data-bbox="305 481 327 491"/>ggctg<img alt="red highlight" data-bbox="335 481 357 491"/>ggcaaacct<img alt="red highlight" data-bbox="365 481 387 491"/>ac<img alt="red highlight" data-bbox="395 481 417 491"/>aagagtt<img alt="red highlight" data-bbox="425 481 447 491"/>ctctcaaggcacacctgogaa<img alt="red highlight" data-bbox="455 481 477 491"/>ccacag<img alt="red highlight" data-bbox="485 481 507 491"/>ggagaa<img alt="red highlight" data-bbox="515 481 537 491"/>acctt>1982

1285>ACCACTGTGACTGGGACGGCTGTGGTGGAAATTCGCCCTCGATGAACTGACCGAGGCACTCCGAAACACAGAGGGACCGCCCTTTCAGTGCAG>1384
1983>accactgtgactgggacggctgtg<img alt="red highlight" data-bbox="153 501 175 511"/>ggaaat<img alt="red highlight" data-bbox="215 501 237 511"/>ggccgct<img alt="red highlight" data-bbox="245 501 267 511"/>gatga<img alt="red highlight" data-bbox="275 501 297 511"/>ctgaccagcactacc<img alt="red highlight" data-bbox="305 501 327 511"/>aaacac<img alt="red highlight" data-bbox="335 501 357 511"/>gggac<img alt="red highlight" data-bbox="365 501 387 511"/>cc<img alt="red highlight" data-bbox="395 501 417 511"/>tt<img alt="red highlight" data-bbox="425 501 447 511"/>gagtgcca>2082

1385>GAAGTGTGACAGGGCTTTTCCAGCTCGGACCACTTGCCTTACAGATGAAGAGGCAATTTTAA>1448
2083>aa<img alt="red highlight" data-bbox="153 521 175 531"/>t<img alt="red highlight" data-bbox="215 521 237 531"/>g<img alt="red highlight" data-bbox="245 521 267 531"/>ac<img alt="red highlight" data-bbox="275 521 297 531"/>tttccaggtcggaccact<img alt="red highlight" data-bbox="305 521 327 531"/>g<img alt="red highlight" data-bbox="335 521 357 531"/>cttaccatgaagagcatttttaa>2146
```

## KLF4 とサル KLF4 との比較

データベース (NCBI) のサル KLF4 の塩基配列と異なる箇所が多くみられ (図の赤いハイライトは不一致を示す)、今回の実験でテンプレートから取り出し、導入した KLF4 はサル KLF4 ではない可能性が高い。そこで NCBI のデータベース上で、この塩基配列と一致する遺伝子を調べ、比較した。すると一致する遺伝子が見つかった。それはマウス KLF4 であった。

```

* * * * *
1>~::~AGGCAGCCAGCTGGCCGACTAACCGTTGGCGTGCAGCGCTCTGCTCCCGTCCCTTCTCCACGTTCCGCTCCGGCCCGGGGAAAGGGAAGACAC>97
1>ATGAGGAGCCAGCTGGCCGACTAACCGTTGGCGTGCAGCGCTCTGCTCCCGTCCCTTCTCCACGTTCCGCTCCGGCCCGGGGAAAGGGAAGACAC>100

* * * * *
98>TGCCTCCAGCAGTGGCCGACTAACCGTTGGCGTGCAGCGCTCTGCTCCCGTCCCTTCTCCACGTTCCGCTCCGGCCCGGGGAAAGGGAAGACAC>197
101>TGCCTCCAGCAGTGGCCGACTAACCGTTGGCGTGCAGCGCTCTGCTCCCGTCCCTTCTCCACGTTCCGCTCCGGCCCGGGGAAAGGGAAGACAC>200

* * * * *
199>GTGGCCACAGCAGTGGAGAGTGGCGAGCTGGTGCAGCTTGCAGCAGTAAACAACCCGGCCCTCCTAGCCGGAGGGAGACCAGGAGTTCACAGCCTC>297
201>GTGGCCACAGCAGTGGAGAGTGGCGAGCTGGTGCAGCTTGCAGCAGTAAACAACCCGGCCCTCCTAGCCGGAGGGAGACCAGGAGTTCACAGCCTC>300

* * * * *
298>CTGGACCTAGACTTTATCCTTTCCAACCTGCTAAACCCAGGAAATCGGTGGCCGCCAGCTGACCACCTCGGCGTCAGCTTCATCCTCGTCTCCCGG>397
301>CTGGACCTAGACTTTATCCTTTCCAACCTGCTAAACCCAGGAAATCGGTGGCCGCCAGCTGACCACCTCGGCGTCAGCTTCATCCTCGTCTCCCGG>400

* * * * *
398>CGAGCAGCGCCCTGCCAGCGCCCTCCACCTGCAGCTTCAGCTATCCGATCCGGCCCGGGGTGACCCGGCCCTGGCTGCCAGCAACACAGGTGGAG>497
401>CGAGCAGCGCCCTGCCAGCGCCCTCCACCTGCAGCTTCAGCTATCCGATCCGGCCCGGGGTGACCCGGCCCTGGCTGCCAGCAACACAGGTGGAG>500

* * * * *
498>GCTCCTTACAGCCGAGAAATCTGGCCACCTCCACCGCCCTTCAACCTGGCGGACATCAATGACGTTGAGCCCTCGGCGGCTTCTGCTGCTGAGCTC>597
501>GCTCCTTACAGCCGAGAAATCTGGCCACCTCCACCGCCCTTCAACCTGGCGGACATCAATGACGTTGAGCCCTCGGCGGCTTCTGCTGCTGAGCTC>600

* * * * *
598>CTGGCCCGGGGTTGGACCCAGTATACCTTCCGCCACAGCAGCTCAGCCGCCAGTGGCGGGCTGATGGGCAAGTTTGTGCTGAA-SCGCTCTGACC>696
601>CTGGCCCGGGGTTGGACCCAGTATACCTTCCGCCACAGCAGCTCAGCCGCCAGTGGCGGGCTGATGGGCAAGTTTGTGCTGAA-SCGCTCTGACC>699

* * * * *
697>ACCCCTGGCAGGAGTACAGCAG-CCTTCGCTCATCAGTGTAGCAAAAGGAGCCAGAGCCGACCCCGTGGTGGCCGCTACAGCGGTGGCC>795
700>ACCCCTGGCAGGAGTACAGCAG-CCTTCGCTCATCAGTGTAGCAAAAGGAGCCAGAGCCGACCCCGTGGTGGCCGCTACAGCGGTGGCC>799

* * * * *
796>CGCCGCGCATGTGCCCAAGATTAAGCAAGAGCGGTCCCGTCTGCAGGTCAGCCGCTCCCTAGAGGCCATTGAGCGCTGGACCCCAAGCTCAGCAA>895
800>CGCCGCGCATGTGCCCAAGATTAAGCAAGAGCGGTCCCGTCTGCAGGTCAGCCGCTCCCTAGAGGCCATTGAGCGCTGGACCCCAAGCTCAGCAA>899

* * * * *
896>CGGCCACCGGCCAACAACACAGACTTCCCGCTGGGGCGGAGCTCCCGCAGGACTACCCCTACACTGAGTCCCGAGGAACTGCTGAACAGCAGGGAC>995
900>CGGCCACCGGCCAACAACACAGACTTCCCGCTGGGGCGGAGCTCCCGCAGGACTACCCCTACACTGAGTCCCGAGGAACTGCTGAACAGCAGGGAC>999

* * * * *
996>TGTCAACCTGGCCCTGCCTCTTCCCGCAGGATTCATCCCGATCCGGGCCCCAATACCTCCTTTCTGCCAGACCAGATGCAAGTCCCTCTC>1095
1000>TGTCAACCTGGCCCTGCCTCTTCCCGCAGGATTCATCCCGATCCGGGCCCCAATACCTCCTTTCTGCCAGACCAGATGCAAGTCCCTCTC>1099

* * * * *
1096>TCCATTATCAAGAGCTCATGCCACCGGGTCTTCCGCTGCCAGAGGAGCCCAAGCCAAAGAGGGGAAAGGTCGTGGCCCGGGAAAAGAACGCCACCCA>1195
1100>TCCATTATCAAGAGCTCATGCCACCGGGTCTTCCGCTGCCAGAGGAGCCCAAGCCAAAGAGGGGAAAGGTCGTGGCCCGGGAAAAGAACGCCACCCA>1199

* * * * *
1196>CACTTTGTGACTATGCAAGCTGTGGCAAACCTATACCAAAGTCTCTCATCTCAAGGACACCTGCGAACTCACACAGGCGAGAAACCTTACCCTGTGAC>1295
1200>CACTTTGTGACTATGCAAGCTGTGGCAAACCTATACCAAAGTCTCTCATCTCAAGGACACCTGCGAACTCACACAGGCGAGAAACCTTACCCTGTGAC>1299

* * * * *
1296>TGGGACCGCTGTGGTGGAAATTCGCCCGCTCCGATGAACTGACCGGCACTACCGCAAACACACAGGGCACCGGCCCTTTCAGTCCAGAACTGTGACA>1395
1300>TGGGACCGCTGTGGTGGAAATTCGCCCGCTCCGATGAACTGACCGGCACTACCGCAAACACACAGGGCACCGGCCCTTTCAGTCCAGAACTGTGACA>1399

* * * * *
1396>GGGCTTTTCCAGGTCGGACCACTTGCCTTACACATGAAGAGGCATTTTTAA>1448
1400>GGGCTTTTCCAGGTCGGACCACTTGCCTTACACATGAAGAGGCATTTTTAA>1452

```

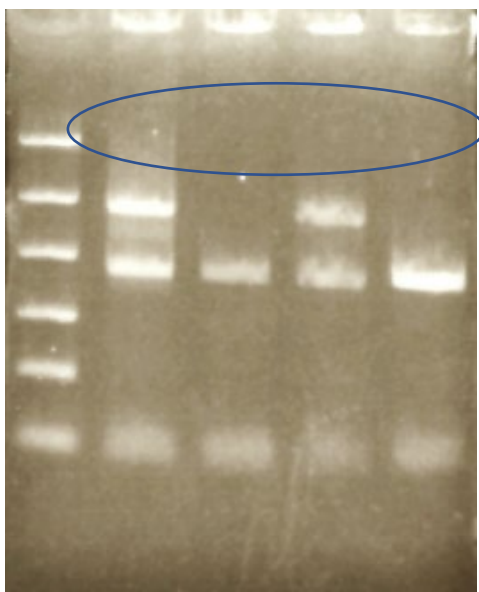
## マウス *Klf* との比較

### 5. 考察

今回の実験で *Klf5* のクローニングには成功した。しかし *Klf4* に関してはマウスの *Klf4* をクローニングしてしまっていた。どうしてテンプレートはカニクイザルなのにクローニングした *Klf4* はマウス由来なのか。それは ES 細胞の培養の段階に原因があると考えた。というのも、ES 細胞を樹立する際、線維芽細胞の上で培養を行うが、この線維芽細胞にはマウス由来のものを用いる。今回サルの *Klf4* が取れなかったのはこの線維芽細胞のマウス *Klf4* がクローニングされていたからだと考えた。この線維芽細胞のマウス *Klf4* が優先してクローニングされてしまったのはテンプレートのマウス *Klf4* の発現量が影響していると予測している。用いたテンプレートは合成 cDNA であったため、元の遺伝子の発現量が少なければ合成される cDNA 量も少なくなるためである。

## 6.再実験

サル KLF4 を取り出すために再実験を行う。先の実験ではマウスの KLF4 をクローニングしてしまった。この原因は PCR の際プライマーがマウス線維芽細胞の KLF4 に結合してしまったことが考えられる。これを解消するためマウス KLF4 には結合せず、サル KLF4 にのみ特異的に結合するプライマーの再設計を試みた。コーディング領域は塩基配列が同じなので、コーディング領域よりさらに上流、下流の塩基配列が異なる箇所を選択し、さらに Forward プライマーには制限酵素 Cla I の認識サイト atcgat、Reverse プライマーには Sac II の認識サイト ccgagg を付加させた。このプライマーを用いて PCR を行った。



PCR の結果、サル KLF4 と思われるバンド（青枠に囲まれている部分）が出現。今後このバンドを対象にクローニングを行い、サル KLF4 を取り出すことを目指す。

1. Richard Pearson, Jacqueline Fleetwood, Sally Eaton, Merlin Crossley, Shisan Bao, "Krüppel-like transcription factors: A functional family", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* Volume 40, Issue 10, 2008, 1996-2001
2. Song Qin, Menglu Liu, Wenzhe Niu, and Chun-Li Zhang, "Dysregulation of Kruppel-like factor 4 during brain development leads to hydrocephalus in mice", *PANS*, December 27, 2011, 21117-21121
3. Hima V. Vangapandu and W. Ai, 2009, Kruppel like factor 4 (KLF4): a transcription factor with diverse context-dependent functions
4. Dong JT, Chen C. , "Essential role of KLF5 transcription factor in cell proliferation and differentiation and its implications for human diseases." *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009 Aug;66(16):2691-706.



5. Song Qin, Menglu Liu, Wenzhe Niu, and Chun-Li Zhang<sup>1</sup>, " Dysregulation of Kruppel-like factor 4 during brain development leads to hydrocephalus in mice" ,*PANS*, December 27, 2011, 21117–21121

6. Ziqian Cheng<sup>1</sup>, Xiaohan Zou<sup>1</sup>, Yang Jin<sup>1</sup>, Shuohui Gao<sup>2</sup>, Jiayin Lv<sup>3</sup>, Bingjin Li<sup>1\*</sup> and Ranji Cui<sup>1</sup> , " The Role of KLF4 in Alzheimer's Disease" , 02 June 2018

関節リウマチ合併間質性肺炎の病態形成に関与する抗シトルリン化フィブリノーゲン抗体  
の産生機序の解明

生命科学講座生物学  
滋賀医科大学 医学部医学科2年  
112049 中島 花音

## 1. 研究背景

### 1-1. 免疫応答

免疫応答は体内の非自己を認識して排除する仕組みである。免疫系には、好中球やマクロファージによる迅速な応答を行う自然免疫とT細胞・B細胞が中心となる獲得免疫があり、獲得免疫では、T細胞・B細胞の活性化を介して抗原に対して特異的な抗体が産生される。一方で、生体では自己を構成する物質に対しては応答しないメカニズムがあり、これを自己寛容という。この免疫応答と自己寛容のバランスが崩れ、自己に対して応答する病態が自己免疫疾患である。

### 1-2. 関節リウマチ

関節リウマチは、自己免疫疾患のひとつで、関節に自己反応性の炎症を呈す。関節リウマチの患者では、間質性肺炎を併発しやすいことが報告されているが、関節リウマチに併発する間質性肺炎の病態発症のメカニズムは解明されていない。これまでの報告で、関節リウマチ患者の血清中に抗シトルリン化タンパク抗体が多く存在することが明らかになっており<sup>1)</sup>、関節リウマチのマーカーになっている。シトルリン化は、タンパクのアルギニンがシトルリンに変換されるタンパク質修飾であるが、その機能は、免疫系だけでなく、皮膚・生殖機能などにおいて様々な生理的役割を果たしている。これまでの報告で、マウスの関節リウマチのモデルであるCollagen Induced Arthritis (CIA) マウスで、抗シトルリン化タンパク抗体 (ACPA) のひとつである抗シトルリン化フィブリノーゲン抗体 (抗Cit-Fib抗体) が上昇し、関節炎の悪性化に関与することが判明している。<sup>2)3)</sup>

### 1-3. CIA マウスにおける抗シトルリン化フィブリノーゲン抗体

我々の研究室では、CIA マウスを用いて間質性肺炎の病態形成を研究している。初回免疫から21日目に追加免疫を行い、49日目にサンプル解析を行う。これまでの研究で、コラーゲンの投与により関節炎が発症するCIA マウスにおいて、関節炎に伴って肺の間質に炎症が起こることが明らかになっている (図1-B)。また、CIA マウスの血清および肺では、抗Cit-Fib抗体が増加する (図1-C)。興味深いことに、この抗シトルリン化タンパク抗体は関

節炎の発症よりも早く 7 日間で上昇する (図 1-D, E)。つまりコラーゲンを免疫することで、抗コラーゲン抗体が産生されることにより関節炎が引き起こされるが、このコラーゲン免疫では、抗 Cit-Fib 抗体も産生される。この抗 Cit-Fib 抗体は、関節炎を悪性化することがこれまでに報告されている。これまでの報告より抗 Cit-Fib 抗体が、肺に沈着することで間質性肺炎を誘導しうると考えられるが、抗 Cit-Fib 抗体の産生メカニズムは明らかではない。<sup>4)</sup>

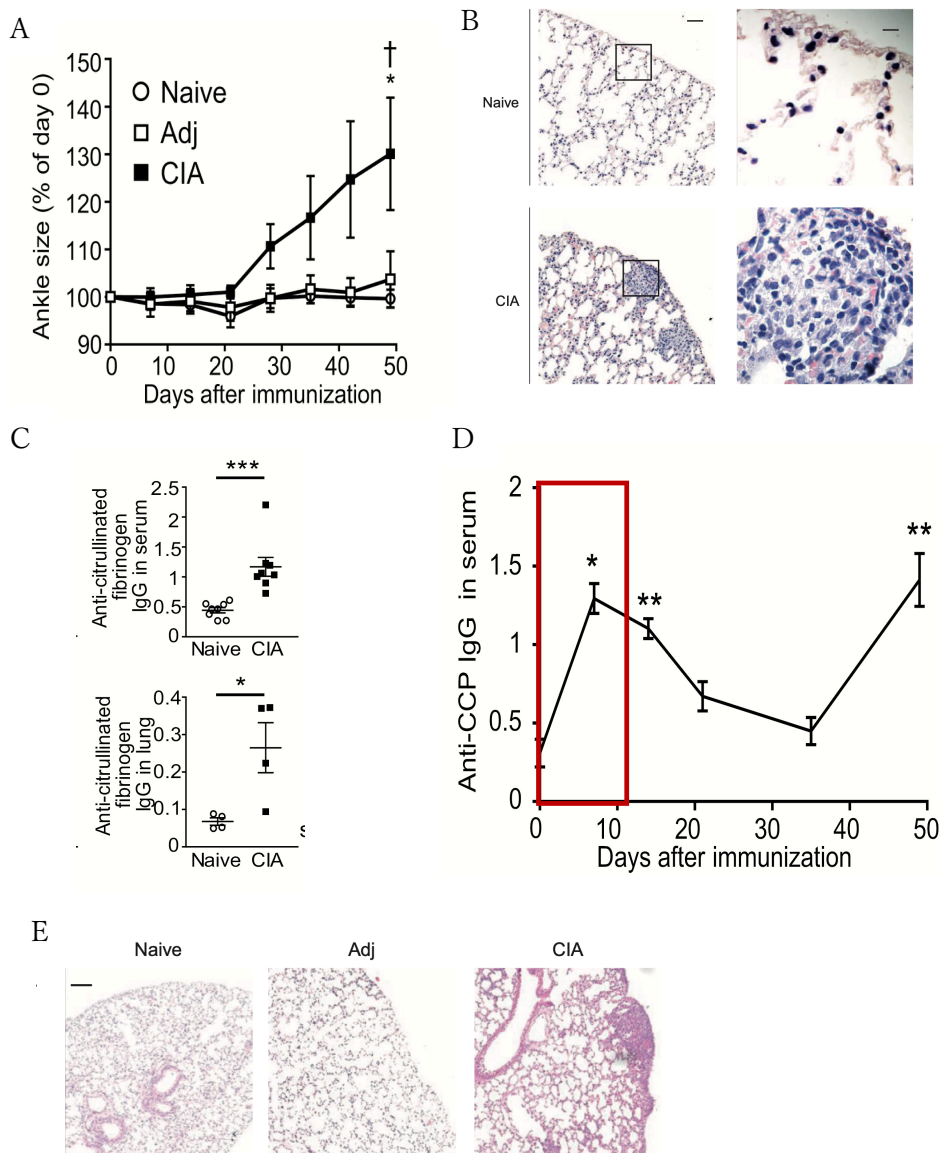


図 1. (A) II型コラーゲンを免疫してから 0 日-49 日後のマウスの踵の厚さ。(B) 非免疫マウス (NV) と CIA マウス (CIA) の肺の HE 染色。(C) NV マウスと CIA マウスの肺・血清中の抗 Cit-Fib 抗体 (IgG) の量。(D) II型コラーゲンを免疫してから 0 日-49 日後のマウスの血清中の抗シトルリン化タンパク抗体の量 (E) NV マウス (NV)、アジュバントのみを投与したマウス (Adj)、CIA マウス (CIA) の肺の HE 染色。<sup>4)</sup>

## 2. 目的・仮説

CIA マウスにおいて抗 Cit-Fib 抗体が産生される機序は解明されていない。そこで本研究では、「CIA マウスにおいて、抗 Cit-Fib 抗体が産生される機序を解明する。」ことを目的とする。

### 仮説 1

CIA マウスでは、コラーゲンを免疫するため、コラーゲンに対する抗体が産生される。一方で、CIA マウスではコラーゲンを免疫しているにもかかわらず、抗 Cit-Fib 抗体が産生される (図 1C)。獲得免疫の原則には、「抗原に対して特異的な抗体が産生される」という抗原特異性がある。そのため、コラーゲンを免疫して抗 Cit-Fib 抗体が産生されるという現象は獲得免疫の原則に反していると考えられる。CIA マウスでは、コラーゲンを免疫することで抗コラーゲン抗体が産生されるが、この抗コラーゲン抗体の産生および関節炎の発症が抗 Cit-Fib 抗体の産生に関与するかは明らかではない。仮説 1 では、コラーゲンの免疫により関節炎が発症することで、抗 Cit-Fib 抗体が産生され、それが原因で間質性肺炎を発症するという仮説を考えた。この仮説では、関節リウマチの発症と間質性肺炎の発症が 1 つのライン状にある (図 2)。

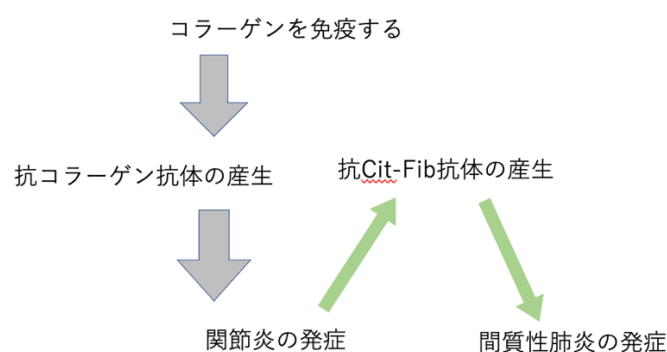


図 2. 仮説 1

### 仮説 2

一方で仮説 2 には、抗コラーゲン抗体の産生および関節炎の発症が、抗 Cit-Fib 抗体の産生に関与しない場合、コラーゲンを免疫すると抗 Cit-Fib 抗体が産生され、その後に関節リウマチと間質性肺炎が別の経路によって発症するというメカニズムが考えられる (図 3)。

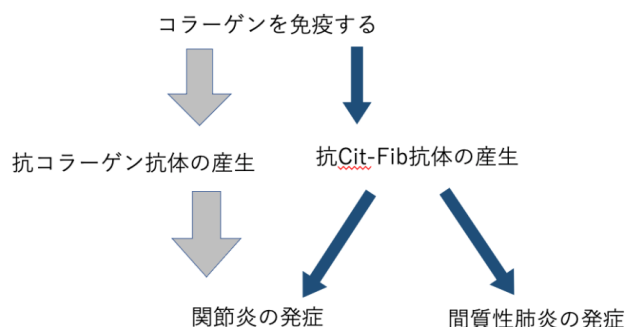


図3. 仮説2

これら二つの仮説を検証するため、以下の実験を計画・実施した。

### 3. 実験方法

#### 3-1. マウスへの免疫

抗 Cit-Fib 抗体産生メカニズムを解明するため、今回の実験ではⅡ型コラーゲン (CⅡ) 以外のタンパク抗原を免疫した際に、抗 Cit-Fib 抗体が産生されるかを調べた。そこで免疫原として CⅡ、フィブリノーゲン (Fib)、卵白アルブミン (OVA) , 節足動物に含まれるタンパク質ヘモシアニン (KLH) を用いた。アジュバントには、結核菌を含む Complete Freud's Adjuvant (CFA) を用いた。免疫原にこれらを選んだ理由としては、抗 Cit-Fib 抗体産生にはシトルリン化フィブリノーゲンが抗原である必要があると考えられるため、シトルリン修飾されていない Fib を抗原として選択した。さらに、関節リウマチの病態形成に関連がないとされる抗原として OVA, KLH を選択した。比較対照群として、CFA のみの群と何も処置をしないナイーブマウス (NV) の群を作成した。

使用したマウスは8週齢の雄の DBA/1 マウスである。免疫をしてから2日後、6日後、8日後に 300 μL を採血し、8日後には灌流をして肺をサンプリングした。免疫原は、マウス尾部の動静脈を避けた部分に皮下注射した。抗原 (250 μL) に CFA (250 μL) を加えたものを投与し、注射した部分付近が白く腫れたことを確認した。(図4)<sup>5)</sup>

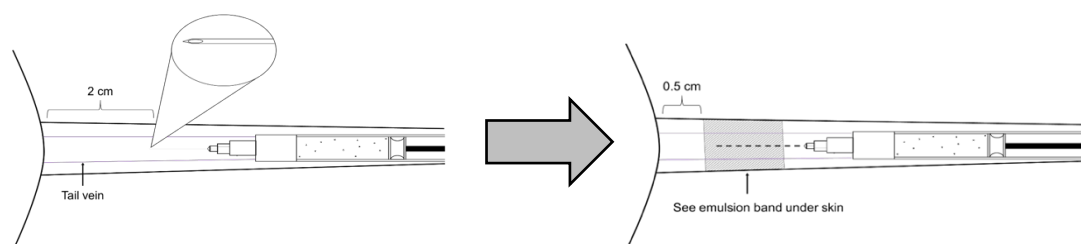


図4. 皮下注射<sup>5)</sup>

### 3-2. サンプル採取

麻酔には、三種混合麻酔薬およびメデトミジン拮抗薬を使用した。三種混合麻酔薬は必要原液量がドミトール 1.875 mL、ミダゾラム「サンド」 2 mL、ベトルフェール 2.5 mL、生理食塩水 18.625 mL の割合で混合した。メデトミジン拮抗薬はアンチセダン 0.15 mL を生理食塩水 9.85 mL に混合した。三種混合麻酔薬を注射器にとり、マウスの腹腔に注射した。採血したのち、同様にメデトミジン拮抗薬も注射器にとり、マウスの腹腔に注射した。両方ともマウス 1 g あたり 10  $\mu$ L を投与した。

### 3-3. ELISA 法

ELISA 法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) は、試料溶液中に含まれる目的のタンパク質を、抗原特異性を利用して検出・定量する方法である。今回の実験では、肺と血清中の抗体量を測定するために用いた。本実験では抗フィブリノーゲン抗体、抗シトルリン化フィブリノーゲン抗体量を調べるため、Fib, Cit-Fib, OVA, KLH を固相化抗原として使用した。その後、肺、血清のサンプルを加えた。洗浄後、酵素標識抗体、基質を加え酵素反応により発色する吸光度 ( $OD_{450}$ ) を測定することで、抗体量を測定した。

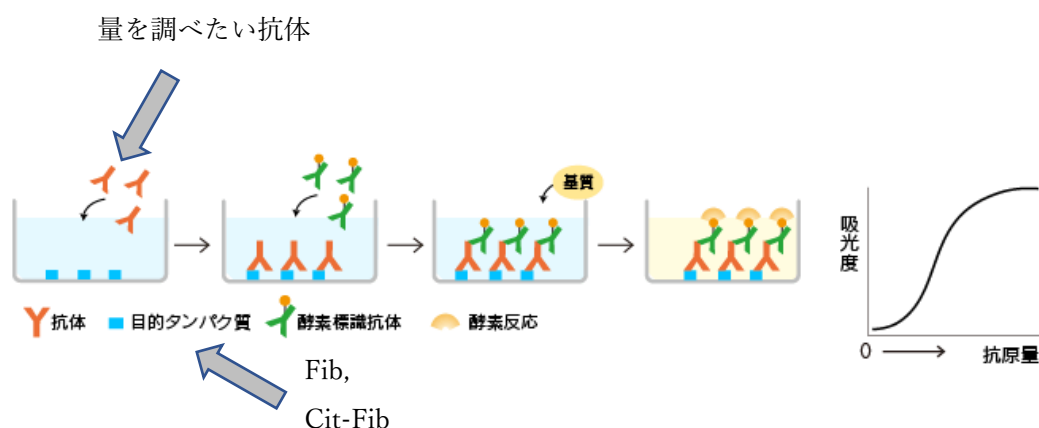


図 5. ELISA 法<sup>6)</sup>

### 3-4 定量 PCR

定量 PCR では、1 サイクルごとに 2 倍に増幅される DNA をモニターし、増幅された DNA が任意の量に達するまでのサイクル数を測定する。98°C で二本鎖 DNA を分離させ、60°C でプライマーを結合させた後、68°C でポリメラーゼによって伸長させる。このサイクルが繰り返されるが、1 サイクルが終わるごとに蛍光強度の測定を行うと、DNA の増幅を測定することができる。

肺における炎症のを調べるため、肺の中の炎症性サイトカインの mRNA の発現量を測定した。定量 PCR をするために、まず肺から total RNA を抽出し、reverse transcriptase

を用いて逆転写を行い complementary DNA (cDNA) を合成した。その後、合成した cDNA を鋳型として定量 PCR で目的のサイトカインの発現量を測定した。

#### 4. 結果

##### 4-1. ELISA day 49

まず先行研究では、免疫してから 49 日後の CIA マウスで抗 Cit-Fib 抗体の増加が示されているため、Day 49 のサンプルの抗 Cit-Fib 抗体の量を ELISA 法を用いて解析して実験結果の再現性を確認した。CIA マウスの肺のサンプルで確かに抗 Fib 抗体、抗 Cit-Fib 抗体の両方が増加していた。(図 6, 7)

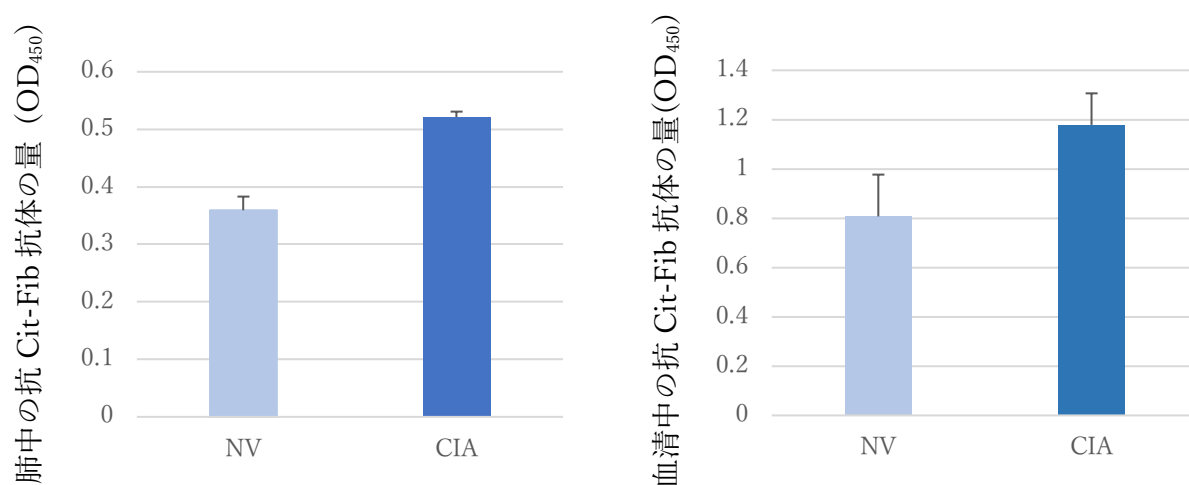


図 6. 49 日後の肺および血清における抗シトルリン化フィブリノーゲン抗体の量

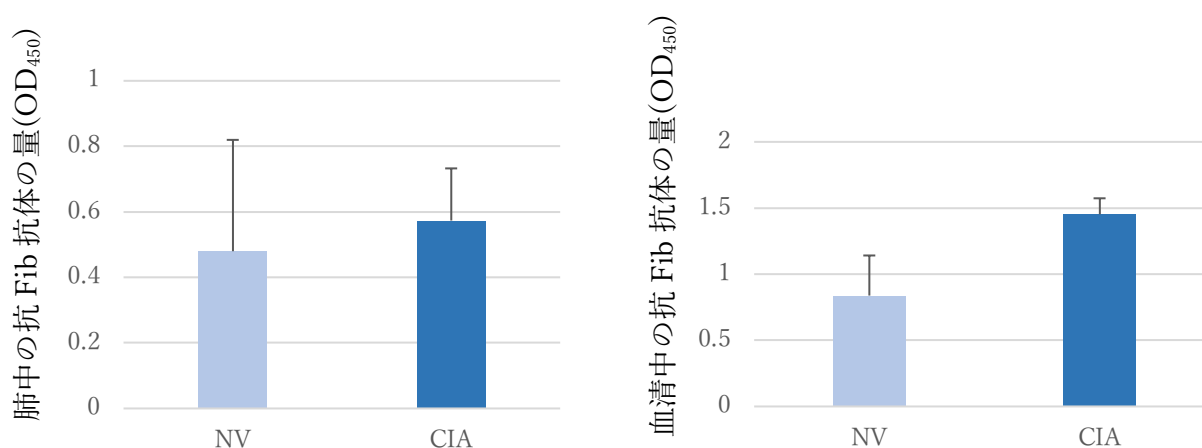


図 7. 49 日後の肺および血清における抗フィブリノーゲン抗体の量

#### 4-2. ELISA day 8

次に、免疫抗原を変えた Day 8 のサンプルを用いて、抗 Cit-Fib 抗体および抗 Fib 抗体の産生量を測定した。肺では、CII の免疫だけでなく、OVA および KLH の免疫で抗 Cit-Fib 抗体が増加していた。この増加は、血清では見られなかった。(図 8) また、Fib に対する抗体は若干 CIA マウスで高いものの他のタンパク抗原では増加しなかった。(図 9)

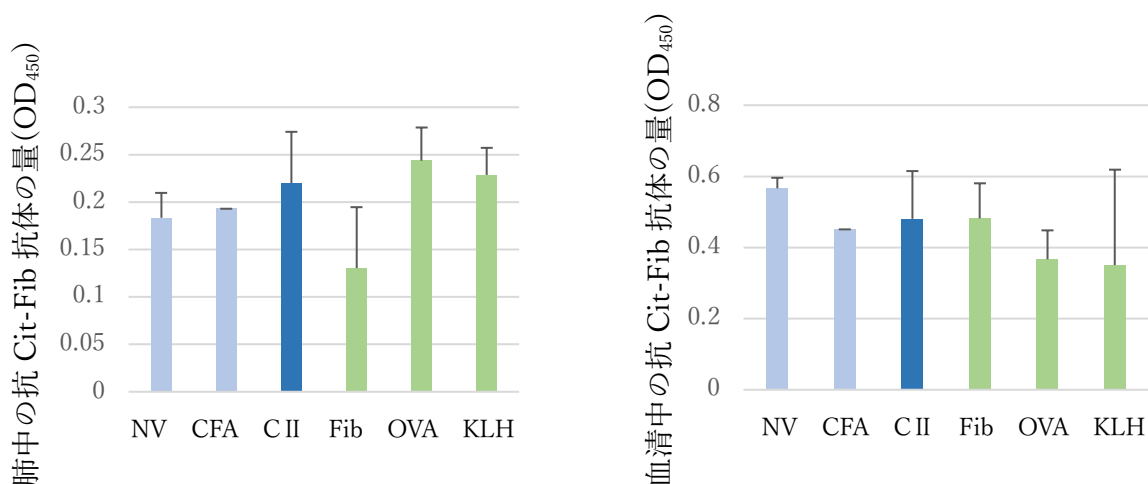


図 8. 8 日後の肺および血清における抗シトルリン化フィブリノーゲン抗体の量

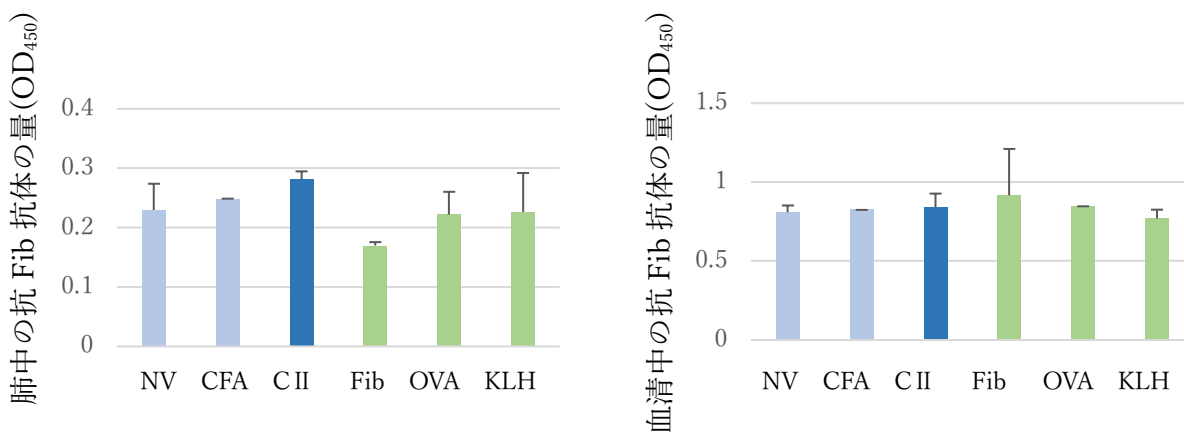


図 9. 8 日後の肺および血清における抗フィブリノーゲン抗体の量

#### 4-3. 定量 PCR

炎症の程度を測るために炎症性サイトカインの量を測定した。IL-1 $\beta$ , IL-6 および TNF- $\alpha$  の発現がナイーブマウスと比較して CIA マウスで高くなっており、さらに Fib および OVA を免疫したマウスでもこれらのサイトカインの発現が高くなっていた。



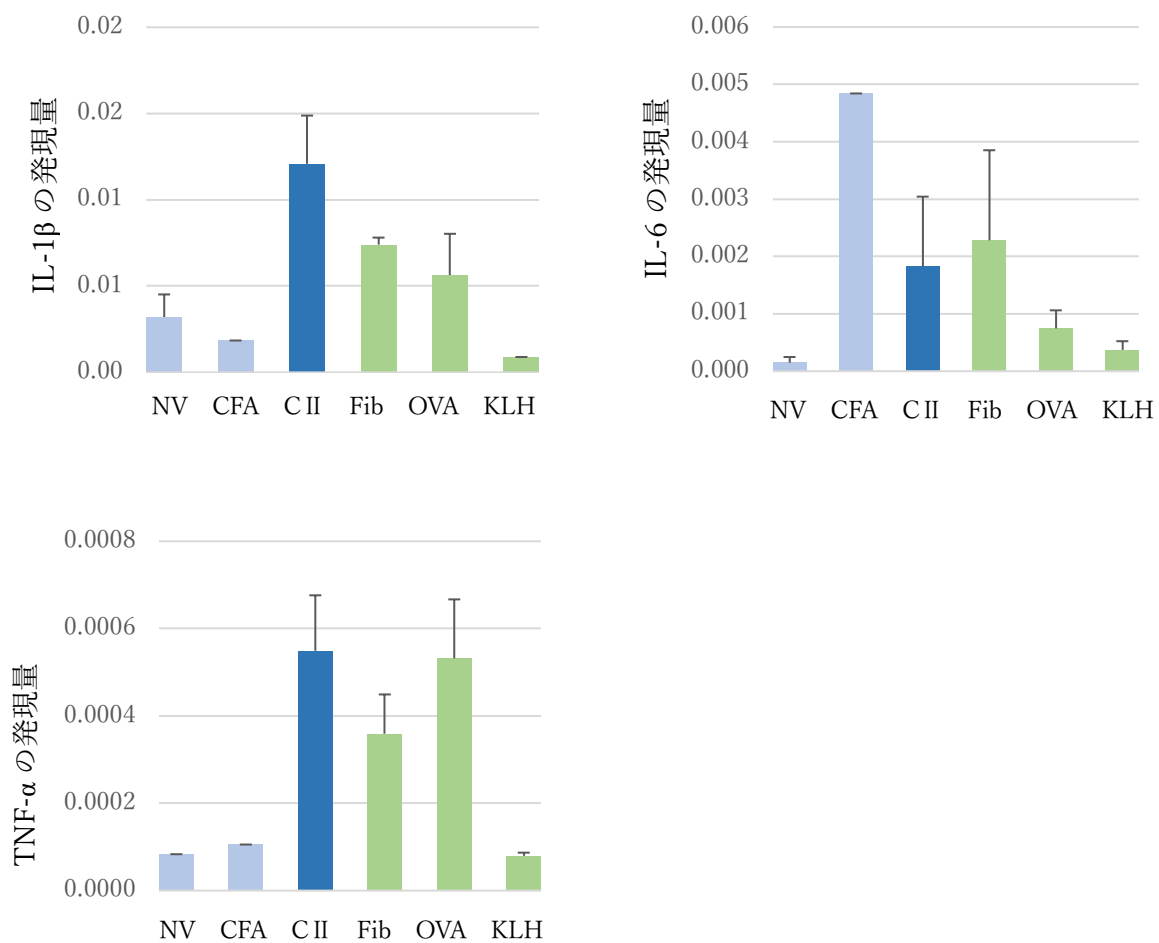


図 10. IL- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  の発現量

## 5. 考察

今回の結果から、コラーゲン以外のタンパク抗原の免疫においても、抗 Cit-Fib 抗体が産生され、肺に炎症をきたすことが明らかになった。関節リウマチの発症に関連のない抗原である OVA や KLH でも抗 Cit-Fib 抗体が産生されたことから、抗 Cit-Fib 抗体の産生は関節リウマチの発症とは関係がないことが示唆された。

今回の研究結果より、抗 Cit-Fib 抗体が産生された後、関節リウマチおよび間質性肺炎の発症へとつながっていると考えられる。この抗 Cit-Fib 抗体が産生されるメカニズムは獲得免疫だけでなく自然免疫の関与も考えられるが、その詳細は不明であり、今後の研究課題である。

実験ではマウスを 2 匹ずつ 6 種類の条件で用い、合計 12 匹分をサンプルとして収集したが、今後はそのサンプル数を増やし、データの信憑性を高める予定である。また、通常の CIA マウスの作成プロトコールと同じように 0 日目に今回用いた種々の抗原を免疫し 21 日目に再免疫を行い、49 日目に解析を行う。これにより、コラーゲンを免疫したときと同様に他

の抗原においても、抗 Cit-Fib 抗体が増えるのかを検討する予定である。この実験結果より、より詳細な抗 Cit-Fib 抗体産生のメカニズムおよび抗 Cit-Fib 抗体の病態への関与にアプローチできると考えられる。

本実験では CFA を用いたが、アジュバントをアルミニウム塩、Incomplete Freud's Adjuvant などに変えて実験を行う。これにより、抗 Cit-Fib 抗体産生への自然免疫の関与を検討する。さらに、本実験では尾部に皮下注射を行ったが、血中もしくは腹腔に免疫を行うことで、抗 Cit-Fib 抗体の産生がどのように変化するかも検討していきたいと考えている。

## 6. 結果

本研究では CIA マウスにおいて、抗 Cit-Fib 抗体が産生される機序を調べた。コラーゲンだけでなく、関節炎を引き起こさないタンパク抗原を免疫しても抗 Cit-Fib 抗体が産生され、肺に炎症を引き起こすことから、関節炎の発症が原因となって抗 Cit-Fib 抗体を産生しているのではないとわかった。つまり、抗 Cit-Fib 抗体が産生された後に、別の経路で関節炎と間質性肺炎が引き起こされる。今後は、抗 Cit-Fib 抗体が産生される機序を自然免疫の観点から解明し、疾患の治療につなげたいと考えている。

## 参考文献

- 1) Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J. *et al.* (2010) 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* 69:1580.
- 2) Fox, D. A. (2015) Citrullination: a specific target for the autoimmune response in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 195:5.
- 3) England, B. R., Thiele, G. M. and Mikuls, T. R. (2017) Anticitrullinated protein antibodies: origin and role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 29:57.
- 4) Sato T, Satooka H, Ichioka S, *et al.* (2020) Citrullinated fibrinogen is a target of auto-antibodies in interstitial lung disease in mice with collagen-induced arthritis. *Int. Immunol.* 32:533.
- 5) Chondrex, Inc. Mouse CIA-A Visual Guide, 閲覧日 2021 年 8 月 17 日, <https://www.chondrex.com/documents/Mouse-CIA---Visual-Guide.pdf>
- 6) MBL ライフサイエンス, ELISA の原理と方法, 閲覧日 2021 年 8 月 17 日, <https://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/elisa.html>

## リンパ球における moesin の機能解析

滋賀医科大学 医学部医学科 2年

112057 西野 詩織

### 1. 背景

#### 1-1 moesin

moesin は、細胞皮質における細胞膜とアクチンフィラメントのリンカーである Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) タンパク質ファミリーの一つである。ERM タンパク質は、その C 末端ドメインを介して結合した皮質アクチンフィラメントを、N 末端にある FERM ドメインを介して細胞膜に連結し、細胞骨格、細胞皮質の構造、シグナル伝達など多くの基本的な細胞機能を制御している (図 1-1)。moesin は特に造血細胞に強く発現し、リンパ球の増殖、遊走、接着に重要な役割を持つ[1]。moesin 欠損マウスでは、リンパ臓器におけるリンパ球の分化に異常は認めないが、リンパ臓器からの細胞の移動が障害され、末梢血とリンパ節において T 細胞と B 細胞が減少することが確認されている[2]。また moesin 欠損マウスは、CD8<sup>+</sup> 制御性 T 細胞 (Treg) の減少と全身性エリテマトーデス (SLE) 様の自己免疫疾患を呈することが明らかになっている[3]。

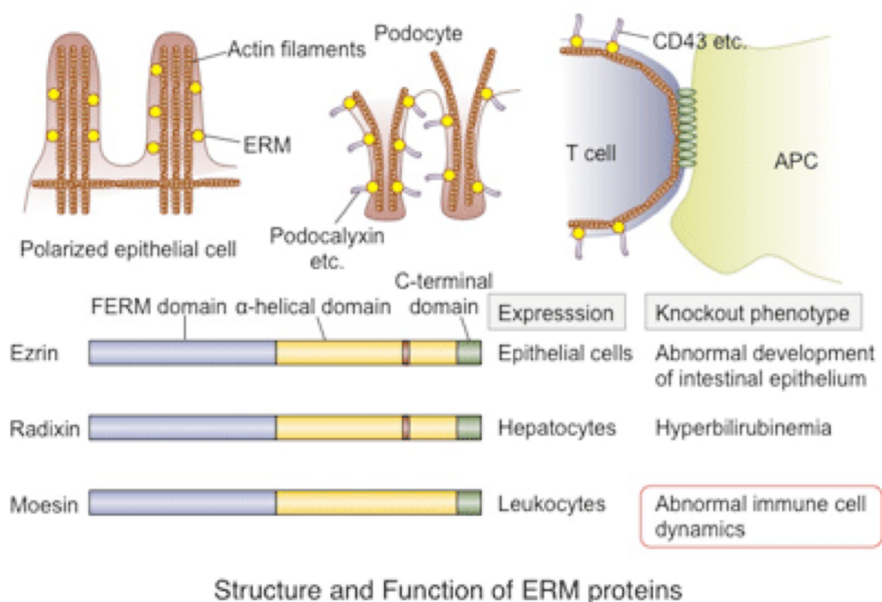


図 1-1 : ERM タンパク質の構造と機能

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbio/research-e.html>

## 1-2 ヒトにおける moesin 変異

近年、ヒトの X 染色体上の moesin (*MSN*) 遺伝子における遺伝子変異によって、原発性免疫不全症を来した 7 症例が報告された[4]。7 症例のうち 6 症例では *MSN* 遺伝子の FERM ドメインにヘミ接合型のミスセンス変異 (c.511C>T) が、残りの 1 症例では C 末端にあるアクチン結合部位である F-アクチン結合ドメインにヘミ接合型のナンセンス変異 (c.1657C>T) が認められた (図 1-2)。c.511C>T の変異では、171 番目のアルギニンがトリプトファンに置換し(p.R171W)、c.1657C>T の変異では 553 番目に終止コドンが出現している (p.R553X)。

上述の *MSN* 変異をもつ患者では、幼少期からのリンパ球減少、低ガンマグロブリン血症、好中球減少などを認め、細菌や水痘・帯状疱疹ウイルスに対する易感染性を示す。T、B、NK 細胞のいずれのリンパ球でも減少が確認され、T 細胞についてはナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞、ナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞の減少が顕著であった (図 1-3)。moesin タンパク質の発現は、好中球や単球、血小板においては正常で、T 細胞と B 細胞において低下していたと報告されているが、ヒトにおけるこれらの *MSN* 変異が、具体的にリンパ球の機能にどのような影響を与えているかは明らかでない[4]。



図 1-2 : moesin タンパク質の模式図

[4]より引用

TABLE I. Blood cell counts and immunophenotypes

Blood cell characteristic	P3	P4	P5	Normal values at 2-6 y of age	P2	Normal values at 6-12 y of age	P1	P6	P7	Normal values at >12 y of age
Age at recent evaluation (y)	4	5*	3.5		9		18	39	69	
Platelets ( $\times 10^9$ )/L	388	386	432	250-600	226	250-600	208	317	327	155-346
Neutrophils/ $\mu$ L	300	1380†	280	1200-6200	1600†	1300-6300	1100	1140	2210	1500-7000
Monocytes/ $\mu$ L	0	200	80	200-600	60	200-800	0	190	190	200-800
Lymphocytes/ $\mu$ L	100	700	470	2300-5400	330	1900-3700	600	1270	780	1400-3300
CD19 <sup>+</sup> cells/ $\mu$ L	12	7	16	390-1400	30	270-860	8	31	100	110-570
Naive B cells (%)	72	ND	ND	59.7-88.4	62.5	58.5-84.6	75	ND	ND	61.6-87.4
Memory B cells (%)	5.8	ND	ND	8.1-33.3	19.5	9-35	13.8	ND	11.9	7-29
Class-switched memory B cells (%)	4.7	ND	ND	2.9-17.4	9.5	4.4-20.5	2.9	ND	ND	4-21.2
Natural killer cells/ $\mu$ L	6	56	13	130-720	7	100-480	4	190	400	70-480
T cells/ $\mu$ L	55	660	181	1400-3700	270	1200-2600	570	961	280	1000-2200
CD4 <sup>+</sup> cells/ $\mu$ L	35	203	104	700-2200	150	650-1500	171	218	80	530-1300
CD8 <sup>+</sup> cells/ $\mu$ L	14	469	58	490-1300	80	370-1100	274	701	170	330-920
Naive CD4 <sup>+</sup> T cells (%)	25	ND	22.1	50-85	19.2	42-74	5.4	25.1	1.7	48-55
Naive CD8 <sup>+</sup> T cells (%)	12.4	ND	5.5	52-68	6	52-68	0.9	0	0.1	38-50
CD57 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T cells (%)	70.6	ND	44.3	<5	70.6	4-20	53.6	33.5	41.7	25

図 1-3 : 細胞数と免疫表現型

[4]より引用

## 2. 目的

本研究では、moesin のリンパ球における機能解析と、moesin の免疫系への関与の解明、特にヒトの *MSN* 変異の一つである R171W がリンパ球の機能にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的としている。

## 3. 方法

### 3-1 細胞培養

ヒト白血病 T 細胞由来の細胞株である Jurkat 細胞株を、10% ウシ胎児血清 (FCS)、100 units/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール (2-ME) を添加した RPMI 培地で増殖させ、4 日ごとに 1/5 量を継代した。

### 3-2 PCR

Jurkat 細胞由来の mRNA から逆転写により cDNA を合成し、これをテンプレートとして両端に設定したプライマー (CL-Forward、CL-Reverse) を用いて PCR を行い、野生型 *MSN* 遺伝子を増幅した。変異型 *MSN* 遺伝子は、オーバーラップ伸長と呼ばれる手法を用いて増幅した。オーバーラップ伸長では、目的の変異を導入したプライマー (R171W-Forward、R171W-Reverse) と両端の配列に相補的なプライマー (CL-Forward、CL-Reverse) を用いて二度 PCR を行うことにより、変異 DNA を増幅できる (図 3-1)。PCR 反応液の組成は、KOD One<sup>®</sup> PCR Master Mix -Blue- (TOYOBO) 10  $\mu$ L、10  $\mu$ M forward primer 0.6  $\mu$ L、10  $\mu$ M reverse primer 0.6  $\mu$ L、Nuclease-Free Water 7.8  $\mu$ L、cDNA 1  $\mu$ L の計 20  $\mu$ L である。用いた 4 種類のプライマーの配列を表 3-1、PCR サイクルを図 3-2 に示した。PCR で増幅後、野生型、変異型ともに 170 V でアガロースゲル電気泳動を行い、目的の 1746 bp のバンドを切り出した。その後、FastGene<sup>™</sup> ゲル /PCR 抽出キット (NIPPON Genetics) を用いてゲル抽出を行った。

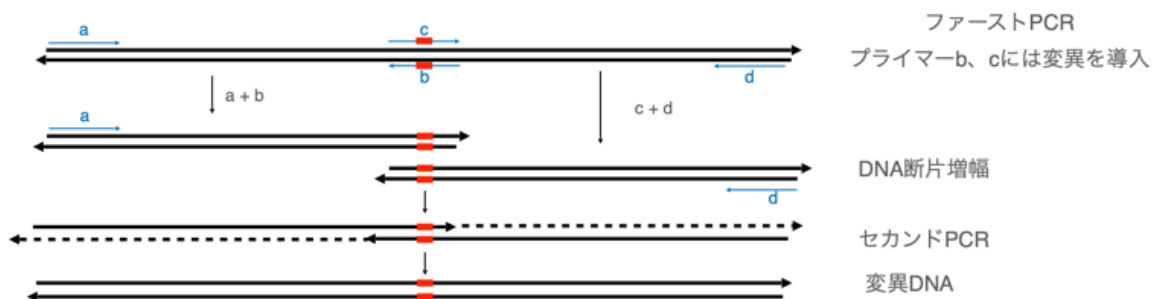


図 3-1 : オーバーラップ伸長による変異導入

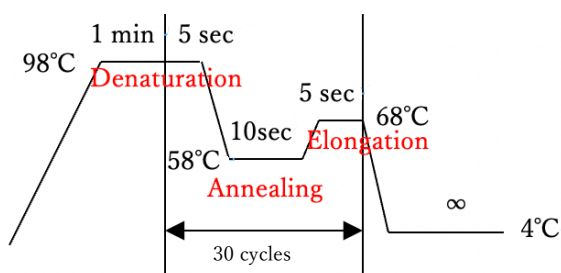


図 3-2 : PCR サイクル

a; CL-Forward	5'-GAATTCGCCACCATGCTGCTGGTGGCTGCTGCT-3'
d; CL-Reverse	5'-TCTAGACATAGACTCAAATTCGTCAATGCGCTG-3'
c; R171W-Forward	5'-CAGTGGGAAGAGTGGATCCAGGTG-3'
b; R171W-Reverse	5'-CACCTGGATCCACTCTTCCCCTG-3'

表 3-1 : PCR に用いたプライマー

### 3-3 クローニング

クローニングで用いた pCR-Blunt ベクターは、目的の遺伝子を持った組換え体をスクリーニングするためのカナマイシン耐性遺伝子と *ccdB* 致死遺伝子を含んでいる (図 3-3)。クローニングの手順の概要は、1. ライゲーション→2. 形質転換→3. コロニースクリーニング→4. miniprep である。まず、

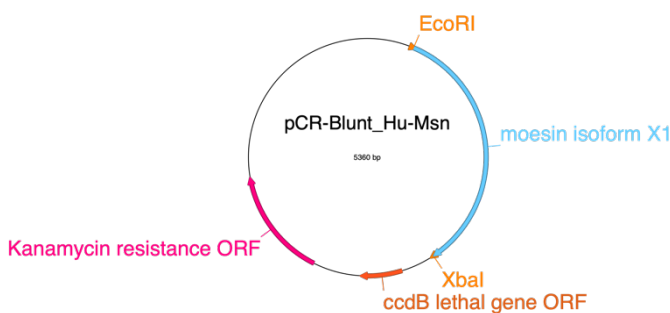


図 3-3 : 簡略化したクローニングベクターのマップ

インサートとベクターのモル比が 3 : 1 になるように混合した DNA 溶液に、インサートとベクターの合計と同量の Ligation High ver.2 (TOYOBO) を加えて 16°C で 30 分間反応させた (1. ライゲーション)。続いて、氷上で融解した Competent Quick DH5  $\alpha$  (Takara bio) 30  $\mu$ L と Ligation mixture 3  $\mu$ L を混合して氷上で 5 分間静置した後、42°C の水浴で 30 秒間ヒートショックを与えた (2. 形質転換)。その後、氷上で 2 分間静置し、SOC 培地 225  $\mu$ L で 1 時間回復培養を行った。回復培養後にカナマイシンを濃度が 50  $\mu$ g/mL になるように添加した LB 培地に大腸菌を播種し、37°C で一晩震盪培養して得られたコロニーを数個ピックアップして、カナマイシンを添加した 2 mL の LB 培地で一晩拡大培養した (3. コロニースクリーニング)。インサートは致死遺伝子を破壊する形で導入され、かつベクターはカナマイシン耐性遺伝子を含むため、カナマイシン添加培地上でコロニーを形成するのはインサートが導入されたプラスミドのみということになる (図 3-4)。最後に、FastGene Plasmid Mini Kit (NIPPON genetics) を用いて大腸菌からプラスミドの抽出を行った (4. miniprep)。

DNA シーケンスを Eurofins Genomics に委託し、インサート配列のエラーの有無を確認した。この時、シーケンスプライマーを両端と中央の3カ所に設定することで、インサートの全塩基配列を決定することができた。

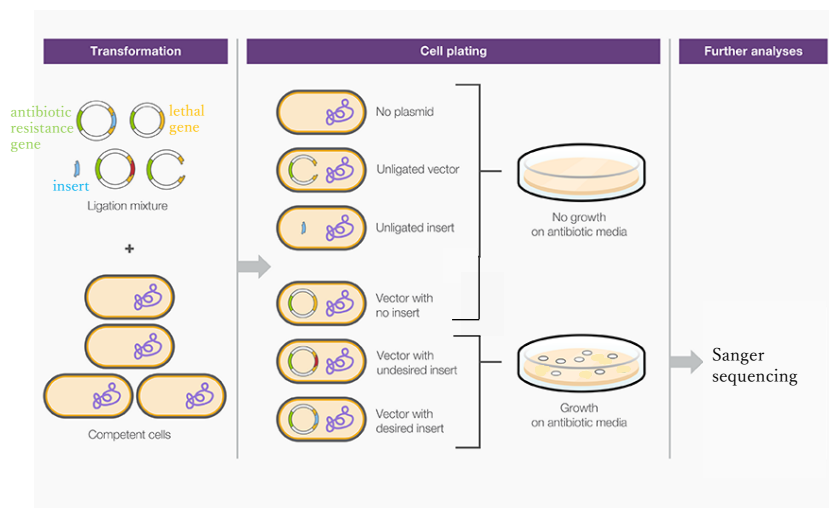


図 3-4：コロニースクリーニングの原理

Thermo Fisher Scientific HP より改変

### 3-4 サブクローニング

サブクローニングはプラスミド断片を別のプラスミドに導入する操作である。今回は pCR-Blunt にクローニングしたインサートを発現ベクター（図 3-5）に導入した。発現ベクターは、スクリーニングのためのアンピシリン耐性遺伝子に加え、発現解析のための GFP 遺伝子と細胞内の強力な発現プロモーターである CMV プロモーターなどを含んでいる。ネオマイシン耐性遺伝子は、今後安定遺伝子発現細胞を選択するための

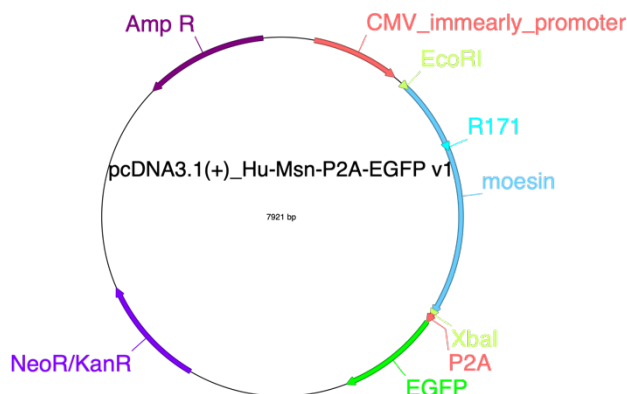


図 3-5：簡略化した発現ベクターのマップ

のマーカーとして用いる。MSN 遺伝子は CMV プロモーターのすぐ下流に導入され、その下流には 2A ペプチド (P2A) 配列を挟んで GFP 遺伝子が配列する。P2A は、その前後にある 2つの遺伝子を 1本の mRNA から発現させることができる配列である。つまり、P2A の下流にある GFP 遺伝子の発現を確認することで、MSN 遺伝子の発現を確かめることができる。

サブクローニングの手順としてはまず、インサートが導入されたクローニングベクターを EcoR I と Xba I という制限酵素で処理し、インサートを切り出した。同時に、発現ベクタ

一も同じ制限酵素で処理して線状化した。制限酵素処理は、表 3-4 に示した組成の溶液を 37°C で 1 時間反応させを行った。電気泳動により目的の DNA 断片を確認した上で、ゲル抽出を行った。精製したインサートと線状化発現ベクターをモル比 3:1 で混合し、Ligation High ver.2 を加えてライゲーションし、大腸菌 20  $\mu$ L と Ligation mixture 2  $\mu$ L を混合して再び形質転換を行った。プロトコールは先ほどと同じであるが、形質転換後、回復培養はせずにアンピシリンを 100 ng/mL になるように添加した LB 培地にそのまま播種した。一晚培養後、コロニーを数個ピックしてアンピシリンを添加した LB 培地 2 mL で拡大培養した。その後、培養液を 1.5 mL 残してプラスミドの抽出を行い、精製したプラスミドを EcoR I と Xba I で処理して電気泳動によりインサートの導入を確認した。残しておいた培養液を 5 つに分けて、アンピシリン添加培地を 40 mL ずつ分注した 5 本の 50 mL チューブにそれぞれ加え、24 時間拡大培養した。合計 200 mL の培養液から NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Takara bio) を用いてプラスミドを抽出した。

1 $\mu$ L	EcoR I
1 $\mu$ L	Xba I
2 $\mu$ L	10×M buffer
xxx $\mu$ L	Plasmid vector (1000 ng)
xxx $\mu$ L	Nuclease-Free Water
20 $\mu$ L	total

表 3-4 : 制限酵素反応液の組成

### 3-5 トランスフェクション

80%コンフルエント状態の Jurkat 細胞に、エレクトロポレーション法によりトランスフェクションを行った。エレクトロポレーションは、電気パルスで細胞膜に穴を開け、核酸を細胞内に取り込ませる手法である。導入した DNA は、GFP が組み込まれたコントロールとしての pMax-GFP プラスミドと、野生型および変異型 *MSN* 遺伝子が組み込まれたプラスミドである。プラスミドを 10  $\mu$ g、細胞を  $1 \times 10^6$  個含む全量 100  $\mu$ L の細胞懸濁液をエレクトロポレーションキュベット

(NEPA GENE) に加え、NEPA GENE の遺伝子導入装置 (図 3-6) を用いて表 3-5 に示す 9 条件でエレクトロポレーションを行った。その後、細胞懸濁液をそれぞれ 1 mL の RPMI 培地に加えて 37°C で 48 時間培養し、フローサイトメトリーによる解析を行った。解析の結果、トランスフェクション効率が最高とな



図 3-6 : NEPA GENE の遺伝子導入装置  
NEPA GENE 社 HP より引用



ったサンプル 8 の条件で、*MSN* 遺伝子が組み込まれたプラスミドを用いて同様にエレクトロポレーションを行い、37°Cで 48 時間培養後、フローサイトメトリーによる解析を行った。

サン プル	設定値											
	Poring Pulse (Pp)						Transfer Pulse (Tp)					
	電圧 V	パルス 幅 ms	パルス 間隔 ms	回数	減衰 率 %	極性	電圧 V	パルス 幅 ms	パルス 間隔 ms	回数	減衰 率 %	極性
1	コントロール (no electroporation)											
2	275	2.5	50	2	10	+	20	50	50	±5	40	+/-
3	275	2.0	50	2	10	+	20	50	50	±5	40	+/-
4	275	1.5	50	2	10	+	20	50	50	±5	40	+/-
5	275	1.0	50	2	10	+	20	50	50	±5	40	+/-
6	250	2.5	50	2	10	+	20	50	50	±5	40	+/-
7	250	2.0	50	2	10	+	20	50	50	±5	40	+/-
8	250	1.5	50	2	10	+	20	50	50	±5	40	+/-
9	250	1.0	50	2	10	+	20	50	50	±5	40	+/-
10	300	1.0	50	2	10	+	20	50	50	±5	40	+/-

表 3-5 : pMAX-GFP のエレクトロポレーション条件

### 3-6 フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは、蛍光抗体や蛍光色素を用いることで、シングルセルレベルで細胞の計数、選別、特性解析を行うための技術である (図 3-7)。本研究では、蛍光タンパク質である GFP の蛍光を測定することで、細胞における GFP 遺伝子と *MSN* 遺伝子が組み込まれたプラスミドの有無を確認した。トランスフェクション後、48 時間培養した細胞を FACS buffer で洗浄・溶解した溶液を用いた。

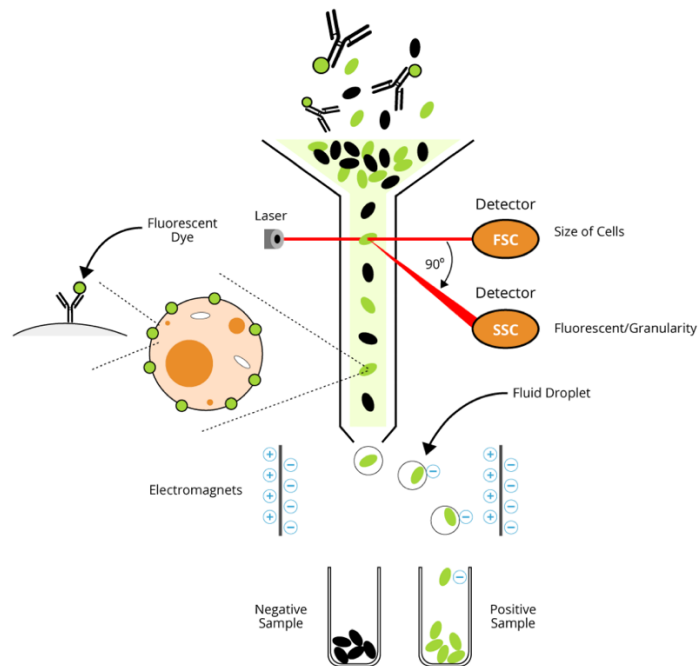


図 3-7：フローサイトメトリーの原理

[https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/Introduction-flow-cytometry.asp?entry\\_id=35004](https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/Introduction-flow-cytometry.asp?entry_id=35004)

## 4. 結果

### 4-1 電気泳動

#### 4-1-1 PCR

野生型 *MSN* 遺伝子の増幅を目的として行った最初の PCR 後の電気泳動では、目的の 1746bp のバンドが確認できた (図 4-1-a)。変異導入時のファースト PCR 後の電気泳動では、長さの異なる 2 種類の DNA 断片が確認され、セカンド PCR 後では野生型と同じ長さの DNA 断片が見られた (図 4-1-b, 図 4-1-c)。

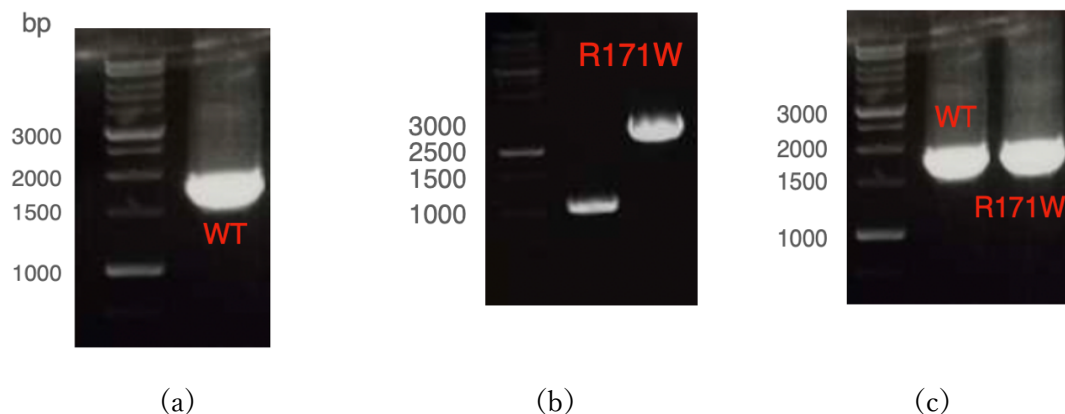


図 4-1：(a) 野生型 (WT) PCR 産物、(b) R171W のファースト PCR 産物、(c) R171W のセカンド PCR 産物の電気泳動結果。

#### 4-1-2 制限酵素処理

インサートが導入されたクローニングベクターの制限酵素処理後の電気泳動では、目的の 1746 bp のインサートが確認された (図 4-2-a)。線状化した発現ベクターでは 6175 bp、最後に行ったインサートの導入の確認では 1746 bp の目的のバンドが確認できた (図 4-2-b, 図 4-2-c)。

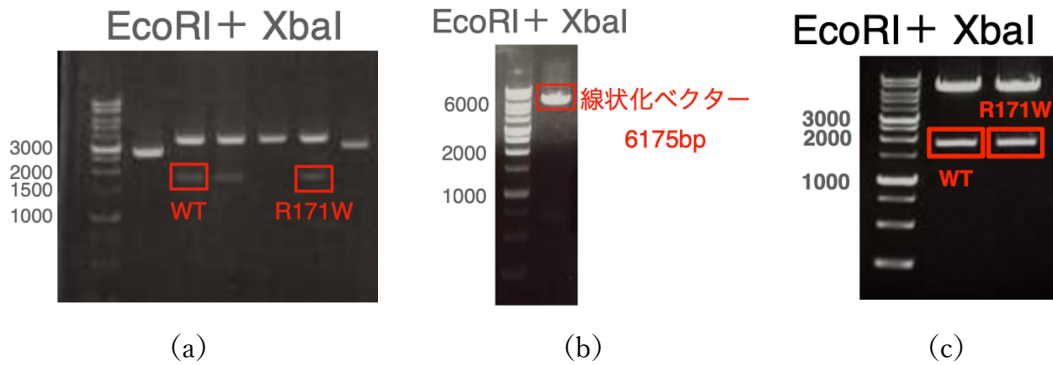
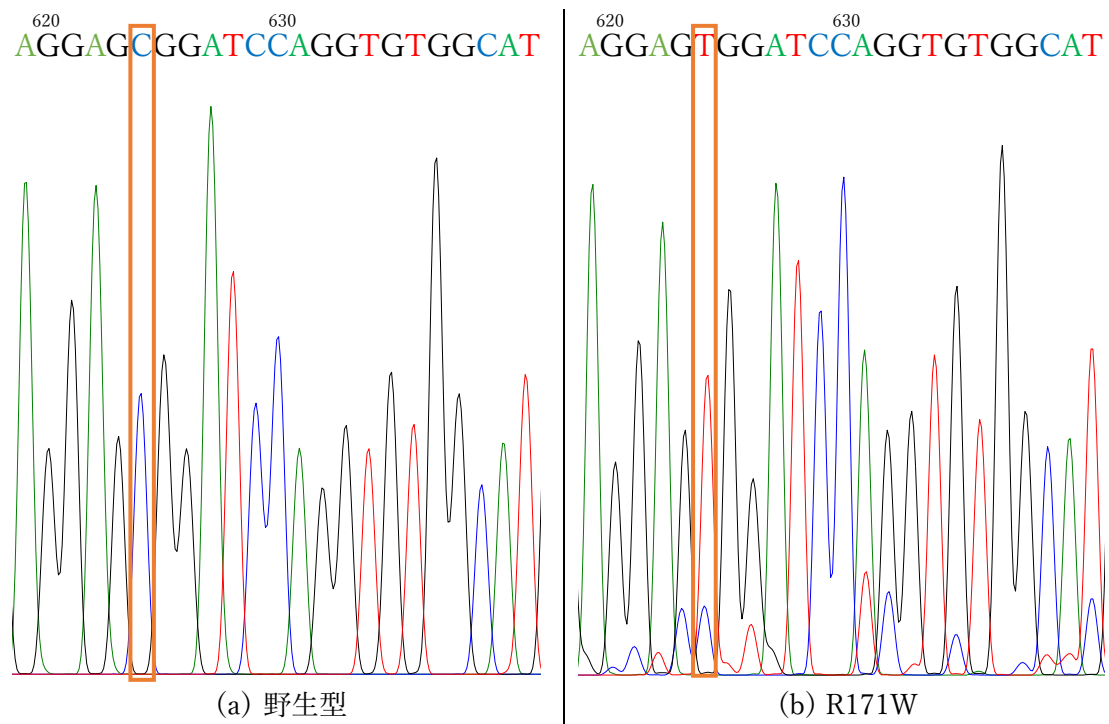


図 4-2 : (a) クローニングベクターから切り出したインサート、(b) 線状化発現ベクター、(c) 発現ベクターに導入されたインサートの電気泳動結果。

#### 4-2 DNA シーケンス

シーケンスの結果、インサートの配列はテンプレートと一致し、塩基の置換や欠失などのエラーは検出されなかった(図 4-3)。



#### 図 4-3：変異箇所のシーケンスデータ

##### 4-3 フローサイトメトリー

pMAX-GFP プラスミドによる条件検討を行ったのは、Jurkat 細胞へのトランスフェクションで推奨されている条件（電圧 270 V、パルス幅 2.5 ms）では、死細胞が多すぎたためである。条件検討の結果、電圧 250 V、パルス幅 1.5 ms で最も高いトランスフェクション効率を得た（図 4-4）。この条件で *MSN* 遺伝子が組み込まれたプラスミドを用いてトランスフェクションを行ったところ、約 10%の細胞が生存し、GFP の発現を確認した（図 4-5）。

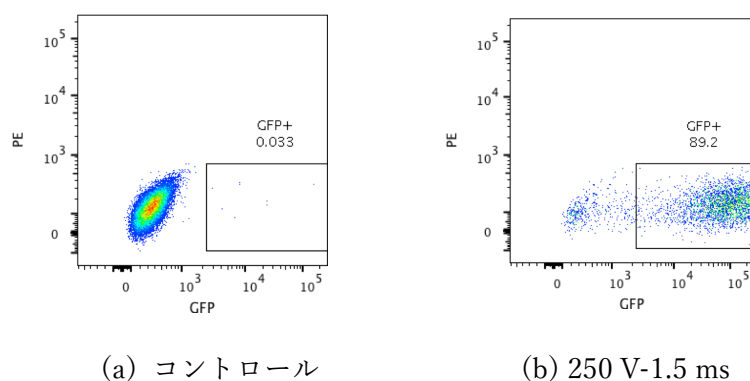


図 4-4：pMAX-GFP プラスミドを導入した細胞の FACS 結果。

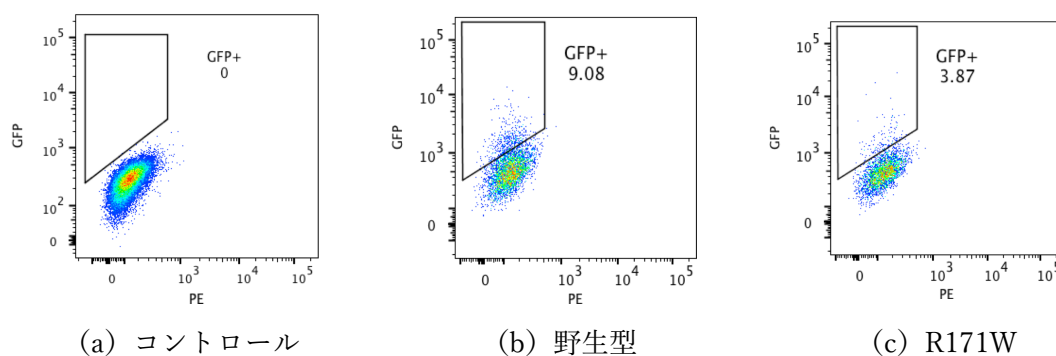


図 4-5：最適条件における moesin+GFP プラスミドを導入した細胞の FACS 結果。

## 5. 考察

### 5-1 トランスフェクション効率の向上

図 4-4 と図 4-5 に示す FACS の結果を比較すると、moesin+GFP プラスミドのトランスフェクションは、最適条件でもなお効率が低いことがわかる。効率を向上させるために、トランスフェクション時の細胞数や細胞の種類、DNA 量を変えるなど、更なる条件の検討が必要である。

#### 5-2 moesin ノックアウト細胞の作製

本研究で使用した Jurkat 細胞は野生型で、もともと正常な moesin を発現している。これは変異 moesin の機能解析の障害になり得るため、moesin をノックアウトした細胞にトランスフェクションした方がより厳密な結果が得られると考えられる。ノックアウトの手法は、CRISPR/Cas9 法によるエクソンの欠失が考えられる。ゲノム上の狙った箇所を認識する sgRNA と Cas9 スクレアーゼによりゲノム上の *MSN* 遺伝子のエクソン部分に二本鎖切断を誘導すると、非相同性末端結合の修復エラーによって遺伝子の挿入・欠失によるフレームシフトが起こり、遺伝子がノックアウトされる。

#### 5-3 安定遺伝子発現細胞株の作製

目的遺伝子を安定的に発現させるためには、遺伝子導入される細胞の核内でゲノムにプラスミドが直接組み込まれる必要がある。しかし多くの場合プラスミドは細胞から段階的に失われ、宿主染色体への組み込みは起こりにくいため、安定遺伝子発現細胞を選択し培養する必要がある。ベクターにはネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれている (図 3-5) ため、遺伝子導入後ネオマイシン添加培地で細胞を培養すると、ネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドが組み込まれた細胞のみが生き残る。このようにして選択された細胞から、安定遺伝子発現細胞株を作製することができる。安定細胞株の作製は、今後の機能解析で安定した結果を得るために必要である。

#### 5-4 機能解析

moesin の変異により病態として見られたリンパ球減少の原因として、リンパ球の増殖の抑制、アポトーシスの増加、リンパ臓器からの移出の障害などが考えられる。この原因を特定するため、CFSE アッセイ、アネキシン V による染色、Transwell 移行アッセイを行う。

##### 5-4-1 増殖能：CFSE アッセイ

CFSE アッセイは、リンパ球の増殖能を調べるために行う。カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (CFSE) は生細胞蛍光染色色素であり、細胞内に取り込まれると細胞内タンパク質と反応して細胞内に固定化される。その後、細胞が分裂するごとに蛍光が半減していくため、細胞の蛍光強度を測定することで増殖能を調べることができる。増殖の刺激剤として、IL-2 および IL-15 を用いる。*MSN* 遺伝子に R171W の変異をもつ原発性免疫不全症の患者から採取した細胞を用いた CFSE アッセイでは、刺激剤として抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を用いて、患者の細胞でリンパ球の増殖が障害されていることが確認されている [4]。抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体による刺激は、生体内での抗原提示細胞からの T 細胞活性化を模倣しているため、この結果は TCR の機能不全を示唆している。本研究では、サイトカインの受容体の機能を調べることを目的として IL-2 と IL-15 による増殖の誘導を行う。

#### 5-4-2 アポトーシスの検出：アネキシン V による染色

アネキシン V による染色は、アポトーシスを起こしている細胞を検出するために行う。アネキシン V は、リン脂質の成分であるホスファチジルセリンに結合する蛍光色素である。ホスファチジルセリンは通常、フリッパーゼにより細胞膜の内膜に留められているが、アポトーシスが起これるときには細胞の表面に露出するようになる。つまり、アポトーシスの過程にある細胞がアネキシン V により染まり、蛍光を発する。この蛍光をフローサイトメトリーにより解析することで、アポトーシスを起こしている細胞の計数を行うことができる。

#### 5-4-3 遊走能：Tranwell 移行アッセイ

Transwell 移行アッセイは、リンパ球の遊走能を調べるために行う。Transwell 移行アッセイでは、小孔が開いたメンブレンの上部に挙動を調べる細胞を播種し、下部にケモカインなどの化学誘因物質の溶液を配置する。遊走細胞は孔を通り抜けて下部に移動し、非遊走細胞は上部にとどまるため、細胞の動きを定量化することができる。

#### 5-5 ノックイン細胞の作製

ノックイン細胞の作製は CRISPR/Cas9 法を利用する。Cas9 による二本鎖切断後に、R171W 変異をもつ *MSN* 遺伝子を含むドナー DNA を相同組み換えにより切断部位に挿入し、ノックインを行う。

### 6. 結論

moesin の変異により、ヒトではリンパ球減少を伴う原発性免疫不全を発症する。そこで、ヒトの moesin 変異の一つである R171W がリンパ球の機能にどのような影響を与えるかを明らかにするため、R171W 変異をもつ *MSN* 遺伝子を導入したベクターを作製し、ヒトのリンパ球にトランスフェクションした。この細胞を用いて今後、機能解析を行う予定である。また、ゲノム上の *MSN* 遺伝子に R171W 変異を導入したノックイン細胞を作製し、より生体に近い状態の細胞を用いた機能解析も行いたい。

moesin 欠損マウスでリンパ球の減少と自己免疫疾患の発症が確認された[2,3]ことから、ヒトでも moesin 変異により自己免疫疾患を発症する可能性がある。そのため、本研究はリンパ球における moesin の機能を明らかにするとともに、自己免疫疾患の病態解明にもつながると考えられる。

### 7. 参考文献

1. Shchebina A, et al: Moesin, the major ERM protein of lymphocyte and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. FEBS Lett 443: 31-36, 1999.

2. Hirata T, et al: Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte homeostasis. *Int Immunol* 24: 705-717, 2012.
3. Satooka H, et al: The ERM Protein Moesin Regulates CD8<sup>+</sup> Regulatory T Cell Homeostasis and Self-Tolerance. *J Immunol* 199: 3418-3426, 2017.
4. Lagresle-Peyrou C, et al: X-linked primary immunodeficiency associated with hemizygous mutations in the moesin (MSN) gene. *J Allergy Clin Immunol* 138: 1681-1689. e8, 2016.

## 免疫方法の違いによる IgD 抗体産生の解析

滋賀医科大学医学科二年

112080 村木津希子

### 1. 研究背景

#### 1-1. 獲得免疫系

体内に侵入した病原体などの異物は、生体内の免疫系によって排除される。免疫系は大きく二種類の機構に分類することができ、病原体に共通する特徴を幅広く認識し主に貪食細胞の食作用によって病原体を排除する機構を自然免疫系、リンパ球によって病原体を特異的に認識して排除する機構を獲得免疫系という。

#### 1-2. 抗体のクラスとクラススイッチ

獲得免疫系の液性免疫を担う抗体は、免疫グロブリンというタンパク質からなる。免疫グロブリンは抗原と結合する可変部と機能を決定する定常部からなり、定常部の構造の違いによりいくつかの種類に分類できる。それらの種類はクラスと呼ばれ、IgM、IgG、IgA、IgE、IgD の 5 つのクラスが存在する。感染への免疫応答の初期に作られる抗体は IgM であり、その他のクラスの抗体はクラススイッチと呼ばれる機構を経て IgM より遅れて産生される。B細胞は、抗原に応答すると胚中心と呼ばれる二次免疫組織内の微小環境に移動し、クラススイッチを引き起こす。クラススイッチは抗体の可変部は改変せず、抗原特異性を保持したまま定常領域のみを IgM から IgE などへと変換する。クラススイッチを経た B細胞は、その後形質細胞に分化することで抗体を産生する。(図1)

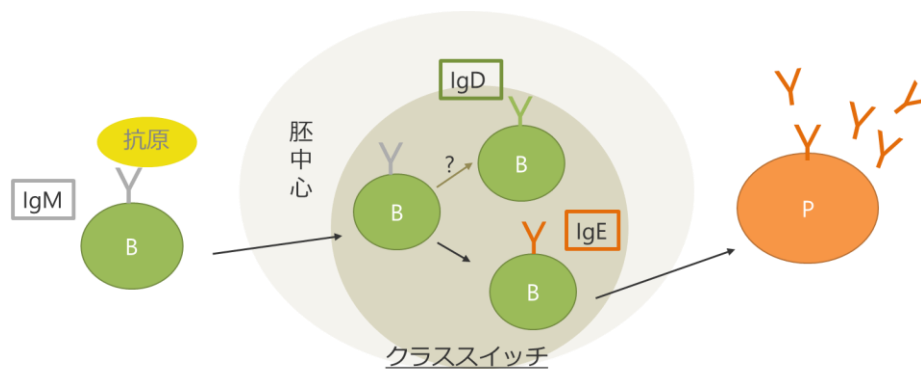


図1：クラススイッチ



### 1-3. I型アレルギーと IgE

このように作られる抗体の中で、IgE 抗体は現在多くの人を悩ませている花粉症に代表される I 型アレルギーにおいて重要な役割を演じる。I 型アレルギーは即時型アレルギーで、アレルゲン特異的 IgE 抗体がマスト細胞と結合した状態で再びアレルゲンに反応することが起因となり、ヒスタミンなどの炎症メディエーターの放出によって引き起こされる。

### 1-4. I 型アレルギーと IgD の関連

これまでに生物学研究室ではアレルギー性鼻炎モデルマウスを用いた I 型アレルギーの研究を行ってきており、その結果、IgD 抗体が I 型アレルギーの発症に何らかの関与をしていることが示唆された(図 2-A,B)。しかし、IgD の産生機序や生理学的機能については、そのほとんどがわかっていない。

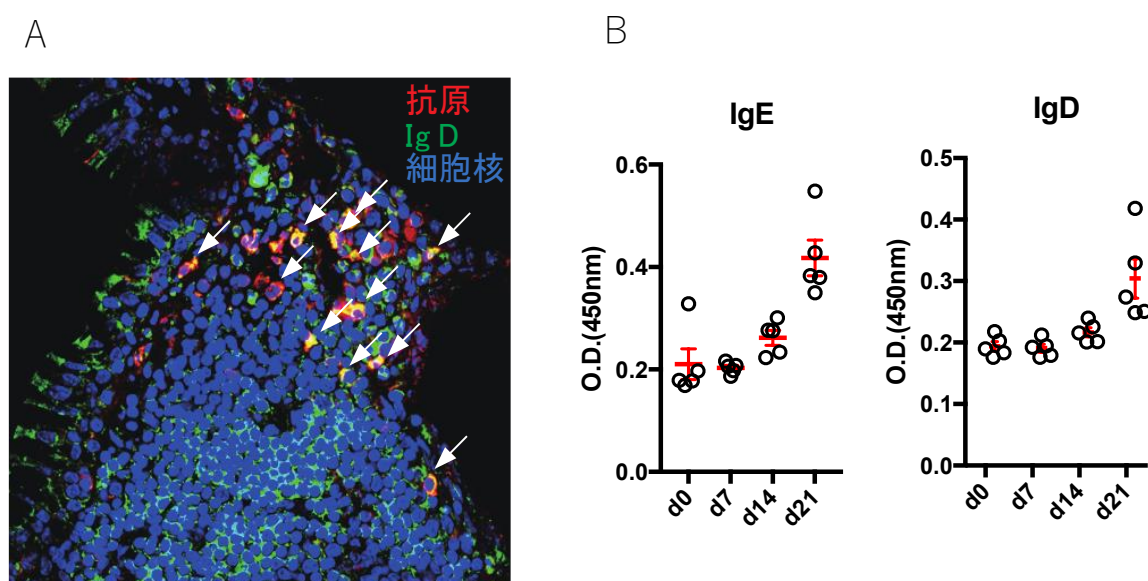


図 2-A：アレルギー性鼻炎モデルマウスの鼻咽腔関連リンパ組織 (NALT)画像

図 2-B：アレルギー性鼻炎モデルマウスの血中 IgD・IgE 抗体価の経時的変化

## 2. 研究目的

本研究では、I 型アレルギーの発症への関与が示唆される IgD 抗体について、その産生メカニズムを解明することを目的として実験解析を行った。

種々の免疫応答は、抗原の侵入経路の違いにより、排除の行われる免疫組織や応答する免疫細胞の種類などが異なり、引き起こされる免疫反応の機序は変化する。そこで、今回は抗原がどのような侵入経路を辿った時に IgD 抗体の産生が促進されるかを調べることを目的とし、抗原投与部位をさまざまに変化させることでその際の免疫応答の違いを測定した。

### 3. 材料と方法

#### 3-1.免疫抗原

タンパク分子には通常抗原エпитープが複数存在しているために、これらに対する免疫応答を正確に測定するのは煩雑である。そこで抗原に対する正確な免疫応答を測定するために、ハプテンと呼ばれるそれ単独では免疫原性を持たない低分子有機化合物をタンパク分子に結合させ、ハプテンに対する免疫応答を測定することで、タンパク分子への免疫応答を擬似的に測定する手法が用いられる。そこで本実験では、鶏卵の白身の主タンパク質である卵白アルブミン (OVA) に 4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニルアセチル (NP) を結合させた NP-OVA (図3) を免疫抗原として使用した。

また OVA のような精製タンパク質のみの免疫では一般的に免疫応答は誘導されないため、本実験では、Alum (水酸化アルミニウム) をアジュバントとして用いた。アジュバントは自然免疫応答を強く誘導する病原体関連分子パターンを含み、抗原とともに投与されることによって免疫応答が活性化される。

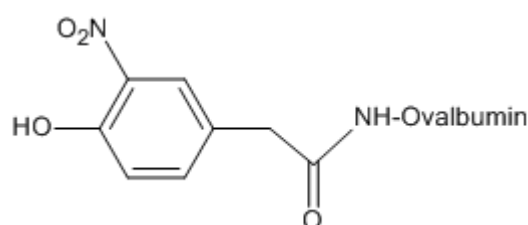


図 3. NP-OVA

#### 3-2.免疫スケジュール

9 匹の C57BL/6 マウスをそれぞれ皮下投与 (subcutaneous, s.c.) 群、腹腔内投与 (intraperitoneal, i.p.) 群、投与なしの 3 群に分け、抗原を免疫した後、一週ごとに採血を行った。また最終 49 日目には各種臓器から細胞のサンプルを採取した。

腹腔内および皮下投与群は一週間おきに計 5 回 NP-OVA 100  $\mu$ g を alum 100  $\mu$ l と混合し投与した。二週間の期間をあけたのち、コントロール (投与なし) を含む 3 つの群のすべてのマウスについて、7 日間続けて NP-OVA 500  $\mu$ g を鼻に免疫し、アレルギー性鼻炎モデルマウスを作成した。(図 4)



図 4：免疫スケジュール

### 3-2. 抗原特異的 ELISA 法

ELISA 法は、試料中の目的物質に酵素標識した抗体を結合させ、発色性基質を用いて酵素活性を測定することで、目的の物質の存在量を定量的に検出する方法である。本実験では NP-BSA と IgE、IgD に結合する抗体を組み合わせて用いることで、坑 NP-IgE 抗体と坑 NP-IgD 抗体のそれぞれの量を測定した。

Goat anti-mouse IgE antibody (Bethyl Laboratories, A90-115A) あるいは Rat anti-mouse IgD antibody (BioLegend, 405702) を 96 ウェルプレートに固相化したのち、0.2% BSA/PBS 溶液によりブロッキングした。サンプルを 0.1% BSA/PBS で 5 倍希釈して抗体を固相化したウェルに加え、その後 biotinylated NP-BSA (Biosearch Technologies, N-1026-5)、Streptavidin-HRP (BioLegend, 405210) と順番に反応させ、最後に TMB 基質を加えた。マイクロプレートリーダーを用いて、基質を加えた溶液の吸光度を測定した。

### 3-3. qPCR

qPCR (quantitative PCR) は、ポリメラーゼ連鎖反応を利用し、測定する DNA を増幅・サイクル毎に検出することで DNA 量を定量する方法である。本研究では二次リンパ器官の代表として脾臓 (spleen, Spl)・顎下リンパ節 (cervical lymph node, cLN) の細胞から RNA を抽出した。RNA は cDNA に逆転写し、その cDNA の増幅および検出をリアルタイム PCR 装置で行った。β アクチンの発現量を対照とし ΔΔCt 法という相対定量法により RNA レベルでの IgD 抗体、IgE 抗体の発現を調べた。

FastGene™ RNA Premium Kit (日本ジェネティクス株式会社, FG-81250) により組織から RNA を精製し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, FSQ-301) によってゲノム DNA の除去・RNA から cDNA への逆転写を行った。その後、cDNA サンプル 12 μl、滅菌水 7.2 μl、5 μM プライマー 0.8 μl、KOD-SYBR® qPCR Mix (TOYOBO, QKD201) 10 μl を調製し、プレートへ分注した。使用したプライマーの配列は以下のとおりである。

sIgD: CAAAGACAAAGCTTAATGCCAGC / CCTGGAAGGACCGTCTGACTC

IgE: CTCTGGCCCTGCTTATTGTTG / CCAGGGTCATGGAAGCAGTG

β-actin: GGCTGTATTCCCCTCCATCG / CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

### 3-4. フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは、蛍光抗体で標識された細胞を 1 列に並べてレーザーの前を通過させることで検出、計数、および選別を行う方法である。フローサイトメーターに同定細胞の分離装置をつけたものはとくにセルソーターと呼ばれる。今回は脾臓・顎下リンパ節の胚中心 B 細胞の割合を調べることを目的として、それぞれの臓器から単離した細胞を抗マウス B220 抗体/抗マウス Fas 抗体/抗 GL7 抗体を用いて染色し、B 細胞、胚中心 B 細胞の割合を測定した。

#### 4. 結果

抗原免疫による経時的な抗原特異的な血中抗体価の推移を調べるため、それぞれのタイムポイントで回収した血液サンプルを抗原特異的 ELISA 法によって解析した。先行研究と同様に、全体的に抗原特異的な血中 IgD 抗体価と IgE 抗体価はどちらも上昇傾向にあった。IgD、IgE のどちらにおいても、腹腔内投与群ではその上昇のピークが早くそのあと停滞・下降しているのに対して、皮下投与群では上昇のピークが腹腔内投与群と比べ遅い傾向を示した。またどちらの群も共に、IgD 抗体価の上昇ピークからある程度時間が経過してから IgE の発現ピークがみられた。さらには、鼻への免疫前後における抗原特異的 IgE 抗体価の増加は、皮下投与群において最も大きくなっていった。(図 5)

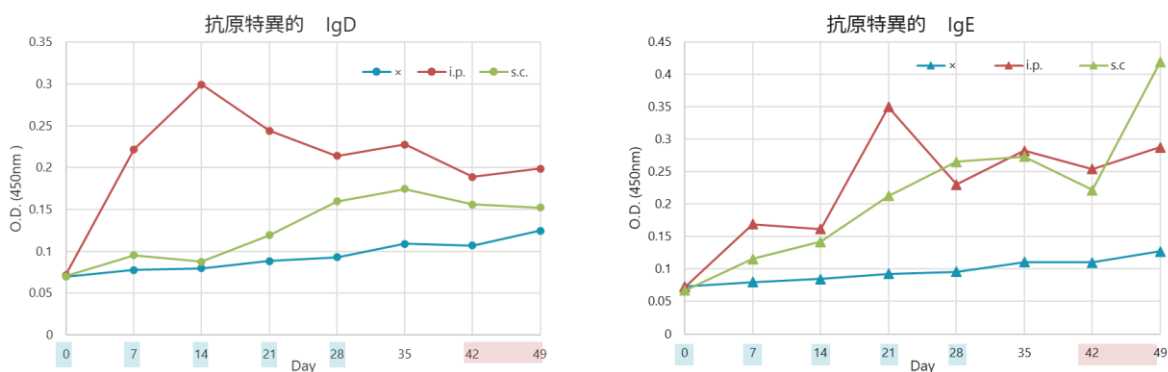


図 5：ELISA 解析による血中抗体量の推移

左・抗原特異的 IgD 抗体、右・抗原特異的 IgE 抗体

次に、qPCR 法によって、脾臓と顎下リンパ節における、IgD、IgE 抗体の RNA レベルでの発現量を調べた。免疫方法に関わらず、IgD 抗体は脾臓に比べ顎下リンパ節で高く発現していた (図 6 -A)。IgD 抗体とは対照的に IgE 抗体の発現量は脾臓の方が高かった (図 6 -B)。それぞれ高い発現を示した顎下リンパ節の IgD 抗体、脾臓の IgE 抗体について、免疫方法の違いによって抗体発現を比較したところ、IgD は腹腔内投与群で、IgE は皮下投与群でそれぞれ高く発現していた。これは ELISA 法で調べた最終 49 日目での抗体価の結果と一致していた (図 6 -C,D)。

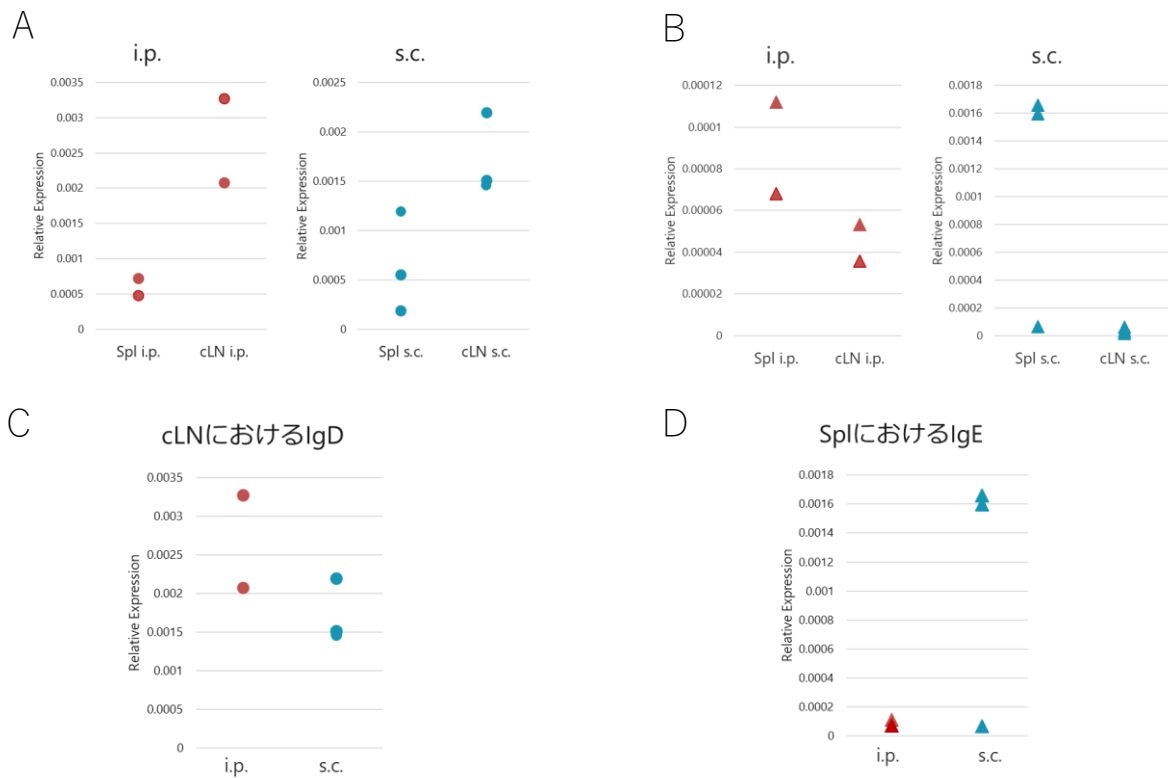


図 6-A：脾臓と顎下リンパ節における IgD 発現量の比較。左・腹腔内投与、右・皮下投与  
 図 6-B：脾臓と顎下リンパ節における IgE 発現量の比較。左・腹腔内投与、右・皮下投与  
 図 6-C：免疫方法の違いによる顎下リンパ節における IgD 発現量の変化  
 図 6-D：免疫方法の違いによる脾臓における IgE 発現量の変化

そこで、実際にどのリンパ器官で免疫応答が引き起こされているかを検討するために、フローサイトメトリーにより、脾臓と顎下リンパ節の胚中心 B 細胞の割合を調べた。その結果、脾臓、顎下リンパ節のどちらにおいても、皮下投与群のほうが胚中心 B 細胞の割合が多く、免疫応答がより活発に起きていた。(図 7 -A,B)

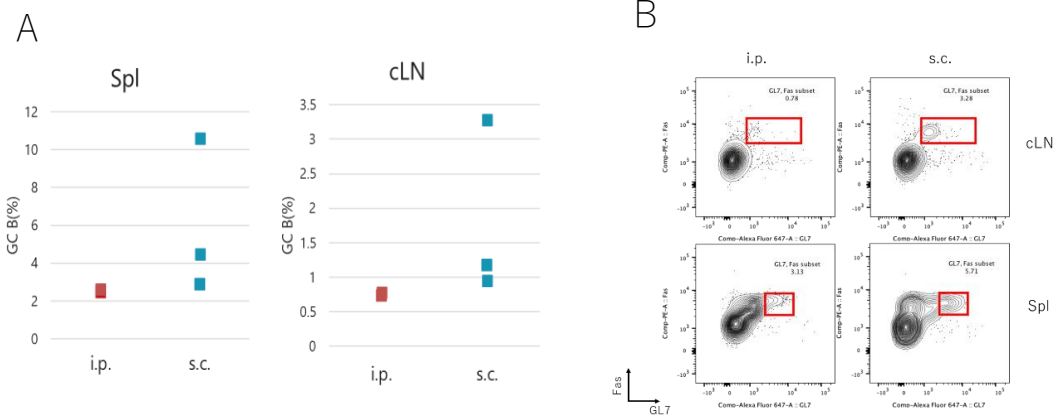


図 7-A：免疫方法による B 細胞全体における胚中心 B 細胞の割合の変化  
左・脾臓、右・顎下リンパ節

図 7-B：フローサイトメトリー結果

## 5. 考察

ELISA 解析による血中抗体量の推移から、皮下投与の方が腹腔投与に比べて IgD および IgE の免疫応答が遅いことが示唆された。またそれぞれのクラスの抗体の血中抗体価は、IgD の上昇ピークの後に IgE の上昇ピークが少し遅れる傾向があった。さらには皮下投与群において、鼻への免疫後に大きく血中 IgE 抗体価が上がっており、IgE の産生が活発化していることが明らかとなった。これは、最後に皮下投与を行ってから一週間後の 35 日目に IgD のピークが来ることに関連していると考えられる。これらの結果から、IgD は IgE に先行して産生され、IgE 産生において何らかの働きを持つのではないかと考えられる。皮下投与群において免疫応答が強かった理由としては、一般的にさまざまな免疫方法の中で皮下に抗原を投与した時が最も強い免疫反応が得られるとされているため、今回の結果もその傾向に沿っているものと思われる。

qPCR の結果から、いずれの免疫方法においても脾臓よりも顎下リンパ節で IgD 抗体の発現が高かったことから、IgD 抗体産生は主に顎下リンパ節で行われていると考えられる。さらに、IgD の主な産生部位と考えられる顎下リンパ節では腹腔投与により、IgE の主な産生部位と考えられる脾臓では皮下投与により、発現量が高くなっていた。これは同じ日のサンプルにおける ELISA の結果とも一致したことから、得られた結果は信頼できるものであると考えられる。

FACS の結果から、胚中心 B 細胞の割合は皮下投与群で腹腔投与群に対して大きくなっていった。胚中心 B 細胞は抗体産生細胞の分化ステージの前段階にあることから、解析を行った 49 日目以降、皮下投与群では腹腔投与群よりも抗体産生が活発に起こることが予想でき、皮下投与によってより IgE 産生が活発化されていることを裏付けている。

## 6. 結論

本研究では、免疫方法の違いがアレルギー性鼻炎モデルマウスの IgD 抗体産生に与える影響を調べた。免疫後の血液サンプルの ELISA 解析から、IgD の応答は腹腔内投与で速く、皮下投与で遅いことが明らかになった。また、IgE 産生のピークよりも IgD 産生のピークの方が早く来るというピークの位置関係から、IgD 抗体は IgE 抗体産生に関して何らかの働きをもっているのではないかと考えられる。さらに、脾臓と顎下リンパ節との発現量の比較から、IgD の産生は顎下リンパ節で活発に起きていることが示唆された。

今後の展望として、皮下投与群での鼻への免疫後の期間をより長くすることで、IgE 抗体価が上がり続けていくかどうかを確かめたいと考えている。また、今回は経時的な変化の確認の際に測定したのは血中抗体価のみであったが、今後はそれぞれのタイムポイントで細胞サンプルを採取し FACS・PCR 解析を行うことで、細胞や RNA のレベルでも発現の経時変化を確かめたいと考えている。

## 7. 参考文献

- [1] 松本洋介”五訂版スクエア最新図説生物 neo”, 第一学習社(2017)
- [2] Kenneth Murphy, “免疫生物学”, 南江堂(2019)
- [3] MBL ライフサイエンス HP, “ELISA の原理と方法”, 株式会社医学生物学研究所 <https://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/elisa.html> (参照 2021-09-25)
- [4] Thermo Fisher Scientific HP, “リアルタイム PCR の基礎” <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html> (参照 2021-09-25)

## ナルディライジンの酵素活性阻害薬に関する研究

田原利桜

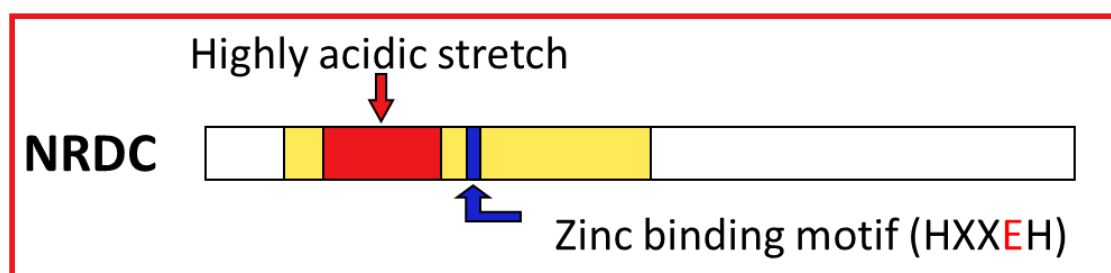
滋賀医科大学医学部医学科 2年

### 1. はじめに

ナルディライジン(以下、NRDC または Nrdc と表記)は、増殖因子である HB-EGF の受容体の一つとして、2001年に薬理学講座の西先生らによって同定された分子である(1)。今回、私はこの NRDC の機能について興味を持ち、研究を行った。

### 2. NRDC について

NRDC は亜鉛結合モチーフを持つメタロプロテアーゼの一つであり、その中でも M16 ファミリーに属する。

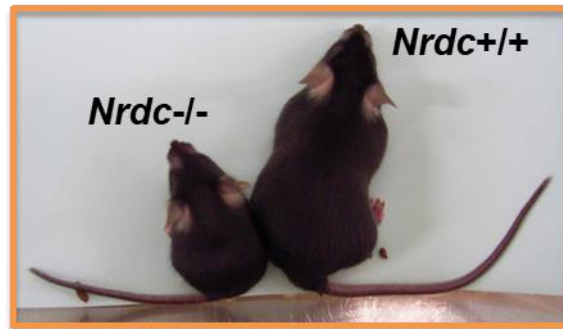


NRDC の性質として、dibasic site のアルギニン残基のアミノ基側を特異的に切断する。また、in vitro において Dynorphin-A や somatostatin-28、 $\alpha$ -neoendorphin、などの神経ペプチドを切断することも確認されている。組織レベルで生体内に広く発現することは確認されているものの、生体内での基質は同定されておらず、未だ不明である。

### 3. 全身性 NRDC 欠損マウス

先行して、全身性 NRDC 欠損マウスの表現型に関する研究が行われている。全身性 NRDC 欠損マウスの表現型として、成長遅延、軸索・髄鞘低形成、低体温、インスリン分泌不全、炎症抵抗性・がん抵抗性などが認められた。





(Nat Neurosci 2009, Neurobiol Aging 2013, PLOS One 2014, Nat Commun 2014, Diabetes 2016, Sci Rep 2017, RMD Open 2017, JCI Insight 2018, Gut 2018, FASEB J 2020 and unpublished)

しかしながらこれらの表現型と、NRDC の酵素活性の関係については明らかにされていない。

#### 4. 酵素活性欠失型変異 NRDC ノックインマウス

##### <当該マウスの作成>

全身性 NRDC 欠損マウスの表現型を踏まえ、NRDC の酵素活性について研究するために酵素活性欠失型変異 NRDC ノックインマウスの作製が試みられている。

亜鉛結合モチーフのグルタミン酸をアラニンに置換することで酵素活性欠失型変異 NRDC ノックインマウスを作製した。しかしながら、遺伝子背景が BL6 のマウスでは、全個体が生後 2 日齢までに死亡することが確認された。

そこで ICR に戻し交配し、遺伝子背景を BL6 と異なるマウスにおいて酵素活性欠失型変異 NRDC をノックインしたところ、一部は成体まで生存することが確認された。以後このマウスを用いて個体における酵素活性の意義について検討が進められている。

##### <マウスの表現型>

酵素活性欠失型変異 NRDC ノックインマウスの表現型を検討したところ、これまでに解析を行った範囲では全身性 NRDC ノックインマウスと非常によく似た表現型を示すことが確認された。

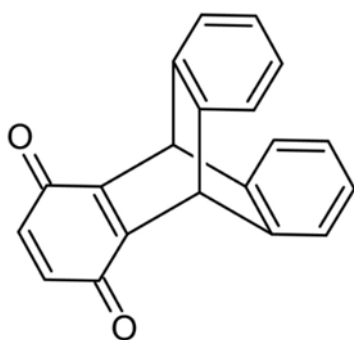
これにより、炎症抵抗性・がん抵抗性に関しても、酵素活性欠失型変異 NRDC ノックインマウスが全身性 NRDC 同様炎症抵抗性・がん抵抗性を示す可能性が浮上した。酵素活性欠失型変異 NRDC ノックインマウスが炎症抵抗性・がん抵抗性を示すことが確認されれば、NRDC 酵素活性阻害薬が炎症やがんの治療薬として有効となる可能性が示唆される。

## 5. NRDCの酵素活性阻害薬

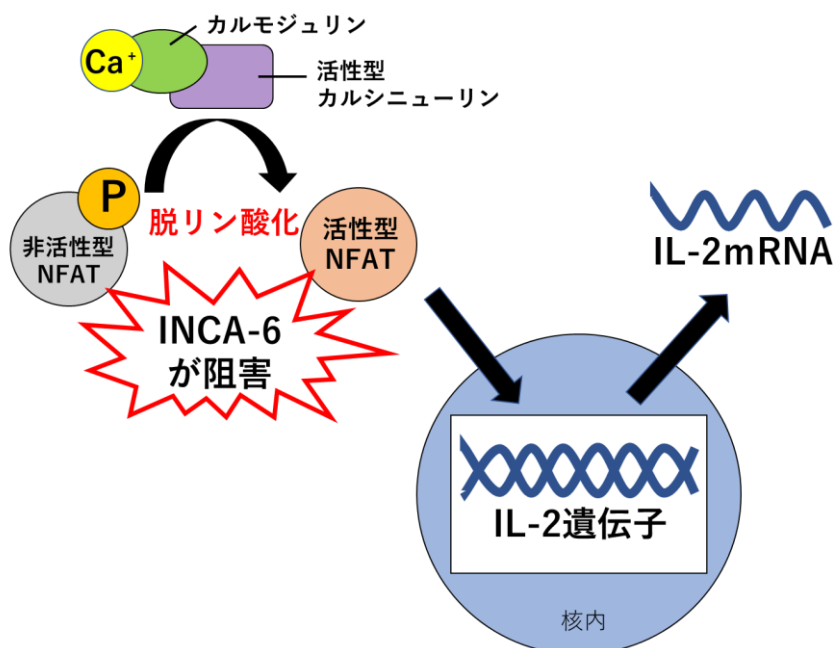
上記の理由から、NRDCの酵素活性の阻害薬の同定を試みた。先行する理化学研究所との共同研究で、既存薬ライブラリーからNRDC酵素活性阻害薬のスクリーニングが行われている。

ところで、インスリン分解酵素はNRDCと同じM16ファミリーに属し、NRDCと有意なホモロジーを有する。スクリーニングで得られた陽性化合物のうち、インスリン分解酵素の活性は阻害せず、NRDCの酵素活性のみを阻害する薬を選択した。その中で今回は、INCA-6とSU3327という2つの阻害薬を用いて実験を行った。以下、2種の阻害薬に関して簡単な説明を行う。

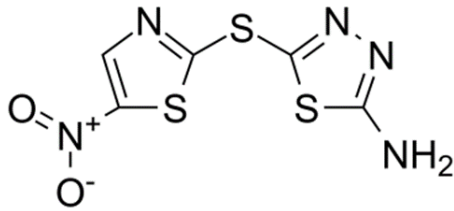
### <INCA-6>



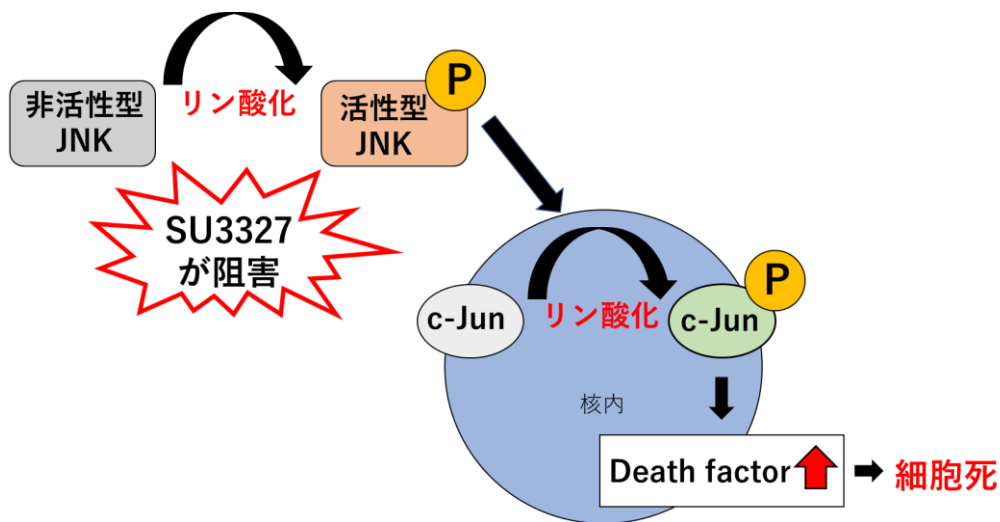
INCA-6は、NFATの脱リン酸化を抑制する作用を持つ。脱リン酸化を抑制されたNFATは活性型NFATになることができず、非活性型NFATのままである。そうすると、核輸送が抑制されてしまうため、IL-2などをはじめとするサイトカインの発現が抑制される。これによってTリンパ球の活性化が抑えられ、免疫反応の抑制が生じる(2)。



### <SU3327>



SU3327 は、JNK のリン酸化を抑制する作用を持つ。リン酸化を抑制された JNK は活性型 JNK になることができず、非活性型 JNK のままである。これによって核輸送が抑制され、c-JUN のリン酸化が抑制されて活性型 c-JUN になることができず、結果 Death factor の上昇が抑制される。Death factor の上昇抑制に伴い、アポトーシスが抑制されることとなる (3)。

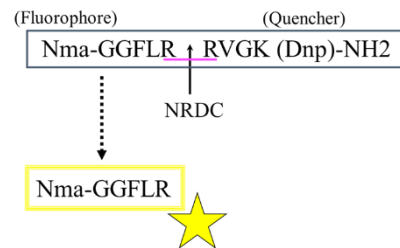


## 6. 実験手法

INCA-6 と SU3327 の 2 種類の阻害薬において、消光性基質を用いた *in vitro* の NRDC 酵素活性測定を行った。実験手法は以下の通りである。

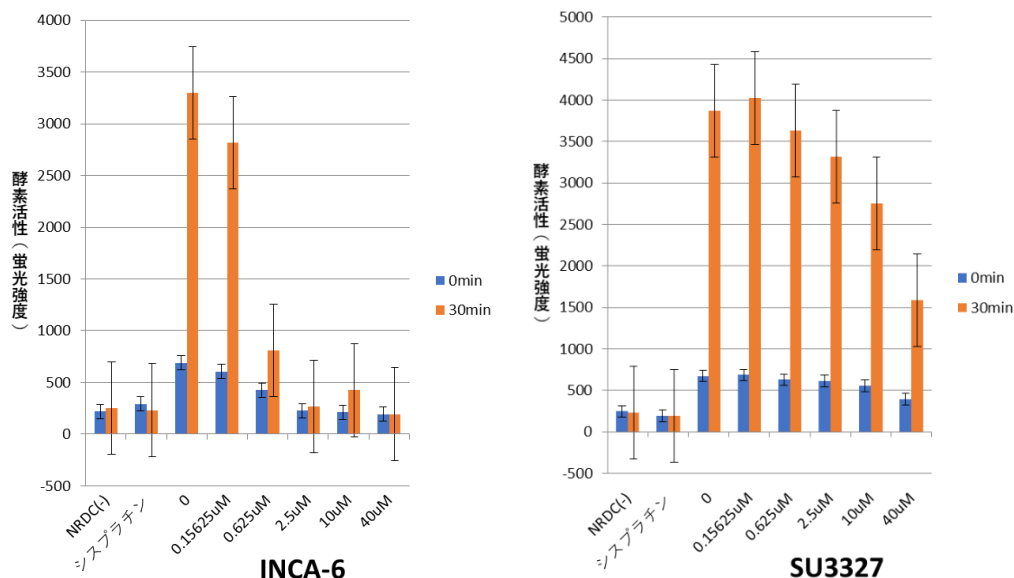
阻害薬を段階的に希釈し、マウスの NRDC に添加してそれぞれの濃度における蛍光強度を測定・比較した。濃度はそれぞれ 40 $\mu$ M、10 $\mu$ M、2.5 $\mu$ M、0.625 $\mu$ M、0.15625 $\mu$ M である。前述のように NRDC は dibasic site のアルギニン残基のアミノ基側を特異的に切断する。したがって、酵素活性を持つ NRDC の存在下では消光性基質の切断が起こり、クエンチャー部分が外れる。クエンチャー部分が外れフルオロフォール部分のみになった基質は、蛍光を呈す。

すなわち、この実験においては NRDC の酵素活性が高い場合、強い蛍光強度を示す。阻害薬の効果検討という観点から言い換えると、酵素活性阻害効果が高ければ高いほど、低い蛍光強度を示すということである。



## 7. 実験結果

以下が実験の結果である。



INCA-6、SU3327 とともに一番左のデータは NRDC 酵素活性ノックインマウスの NRDC を用いたもので、低い蛍光強度を示している。また、先行研究によってシスプラチンの NRDC 酵素活性阻害作用が認められている。したがって本実験において、ポジティブコントロールとしてシスプラチンを使用した。

### <INCA-6>

0.625μM 時点において蛍光強度が大きく低下、すなわち酵素活性が大きく阻害されていることが分かる。阻害薬濃度を 2.5μM より大きくすると、酵素活性欠失マウスの NRDC や、シスプラチンを添加した場合と同程度まで酵素活性が低下した。

### <SU3327>

INCA-6 同様に酵素活性の低下、すなわち阻害効果が認められた。しかしながらその阻害効果は INCA-6 に比べて小さいことが確認できる。

いずれの阻害薬においても濃度依存的な NRDC の酵素活性阻害作用が認められた。また、INCA-6 は SU3327 に比べて強い阻害作用を持つことが明らかとなった。

## 8. 考察と今後の展望

INCA-6 の作用として、これまでに T リンパ球の活性化阻害による免疫抑制が認められていた。更に今回の実験により、NRDC 酵素活性阻害作用を持ち合わせていることが確認された。

また、先行研究により NRDC 欠損マウスの炎症抵抗性・がん抵抗性が認められている。

以上より、これまで INCA-6 の効果は NFAT の活性化阻害作用によると認識されていたが、その効果の一部は NRDC 酵素活性阻害作用による可能性が浮上した。

したがって今後の展望として、野生型及び NRDC 欠損 T リンパ球を用いて INCA-6 の T リンパ球活性化抑制効果について測定し、上記考察を検証していくこととする。この測定により INCA-6 の効果の NRDC 依存性を検討していきたいと考える。

## 9. 参考文献

(1) Nishi E, Prat A, Veronique H, Elenius K, and \*Klagsbrun M.

N-arginine dibasic convertase is a specific receptor for heparin-binding EGF-like growth factor that mediates cell migration

**EMBO J.** 20: 3342-50, 2001.

(2) Roehrl MH, Kang S, Aramburu J, Wagner G, Rao A, Hogan PG.

Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules.

**Proc Natl Acad Sci U S A.** 2004 May 18;101(20):7554-9.

(3) Design, synthesis, and structure-activity relationship of substrate competitive, selective, and in vivo active triazole and thiadiazole inhibitors of the c-Jun N-terminal kinase.

De SK, Stebbins JL, Chen LH, Riel-Mehan M, Machleidt T, Dahl R, Yuan H, Emdadi A, Barile E, Chen V, Murphy R, Pellecchia M.

**J Med Chem.** 2009 Apr 9;52(7):1943-52.

# 実空間高分解能観察法による タンパク質オリゴマーの構造評価

医学科2年 篠原陽平

## 1. 研究背景

日本において認知症患者は年々増加し、大きな社会問題となっている。認知症の疾患原因として60%以上を占めるアルツハイマー病(AD)は、2021年現在においても詳細な発症メカニズムが明らかではなく、メカニズムベースの根本的な治療法は存在していない<sup>[1],[2]</sup>。よって、AD発症メカニズムを明らかにすることは重要な課題である。ADは従来、線維化したアミロイド $\beta$ ( $A\beta$ )が脳内に蓄積することで神経の機能障害が起こると考えられていた(アミロイド仮説)。そのため、 $A\beta$ に対する抗体医薬品の臨床試験が国際的な規模で行われきた。しかしながら、脳内のアミロイド除去に成功しても、患者の症状には改善が見られないことが明らかになってきた<sup>[3]</sup>。以上より、発症後から治療を開始するのでは既に遅く、発症前、あるいは、脳内の線維状のアミロイド凝集が起きる以前に生じる脳内状態変化を分子レベルで解明して、新たな治療を開発する必要があると考えられるようになってきた。

最近、線維状アミロイドの前駆段階の凝集体である、 $A\beta$ のn量体( $A\beta$ オリゴマー)自体に神経毒性作用があり<sup>[4]</sup>、さらに、それらの過剰な蓄積が、 $\tau$ タンパクを異常リン酸化し、大脳皮質へ拡散することによって広範な神経障害( $\tau$ 病理)を促進するとの報告がある(オリゴマー仮説)<sup>[5]</sup>。このため $A\beta$ オリゴマーの凝集メカニズムや詳細な構造を知ることができれば、ADの治療法開発に向けて重要な知見となる。ところが、過去の研究から、 $A\beta$ オリゴマーは、繊維化して凝集作用の大きな重合過程(on-pathway)と、繊維化しない重合過程(off-pathway)を経る多種のオリゴマーが混在するため、 $A\beta$ を結晶化することが難しいことが報告されている<sup>[6]</sup>。このため有力な構造解析手法であるX線回折法が適用できないばかりか、凝集力が非常に高いため液中計測中に凝集が進んでしまうことにより分光法による構造解析が困難になっている。このことから、 $A\beta$ オリゴマーの構造を明らかにするためには高い空間分解能での実空間直接観察が重要な手法の一つとなる。

## 2. 研究目的

高分解能の実空間観察法には、透過型電子顕微鏡法(TEM)、と走査型プローブ顕微鏡法(SPM)が存在するが、本研究ではSPMによる直接観察法に注目する。SPMには原子間力顕微鏡法(AFM)と走査型トンネル顕微鏡法(STM)があるが、AFMでは原子レベルで平坦

な雲母基板の上にばらまいた A $\beta$  オリゴマーの高さを 0.1nm の分解能で観察することはできて、基板に水平方向の分解能が足りず、十数 nm の大きさのオリゴマーの詳細な構造を観察するのが困難であることが知られている<sup>[7]</sup>。一方、STM を用いた場合、一般的に常導電性試料しか観察できない制約が知られていたものの、非導電性であるペプチドであっても 3nm 以下の高さであれば、高い空間分解能で基板水平方向の観察も可能であることがわかってきた<sup>[8]</sup>。

本研究では、最終的には、A $\beta$  オリゴマーの 2-6 量体を STM により観察し、構造評価することを目的とする。ただし、適切な基板の選定、および A $\beta$  オリゴマーの基板への散布法、また基板の観察像への影響がわからない現状で未知のペプチドの構造を STM により明らかにするのが難しいことが想定される。そこで、同じくタンパク質の異常凝集によって引き起こされる疾病であるアミロイドーシスの原因物質のインスリンを STM により高分解能観察することを本研究における最初の目的とした。

インスリンのモノマーは A $\beta$  と同程度の大きさであり、かつオリゴマーの構造も既によくわかっている。特にそのモノマーは、 $\alpha$  ヘリックス、 $\beta$  ストランド構造を含み、かつ鎖内にジスルフィド結合を有しており、それらがどの程度の分解能で像観察できるかが、STM による構造評価法の確立の指標となりうる。インスリンのオリゴマーの STM による構造評価法が確立できれば、A $\beta$  オリゴマーの構造評価へと直接応用できる知見が得られる。

### 3. 研究手法

#### 3.1 走査トンネル顕微鏡(STM)の原理

本研究で用いる走査トンネル顕微鏡(STM)の原理を述べる。図 1 に示すように探針と試料が数 nm の真空のギャップを隔ててバイアス電圧が印加されると、トンネル電流  $I$  は、 $A$  を定数、 $\phi$  を試料の仕事関数として探針と試料間の距離  $z$  に指数関数的に変化する(1)式として表される。

$$I \propto \exp(-A\sqrt{\phi}z) \quad (1)$$

図 2 には STM の装置の構成を示している。図 2 に示すように探針で試料の表面を走査し、2次元マッピングを行う。走査時の探針と試料間の距離に指数関数的に変化するトンネル電流を検出することにより、トンネル電流の強度変化をコントラストの変化として像を描く像コントラストを出力として得る。

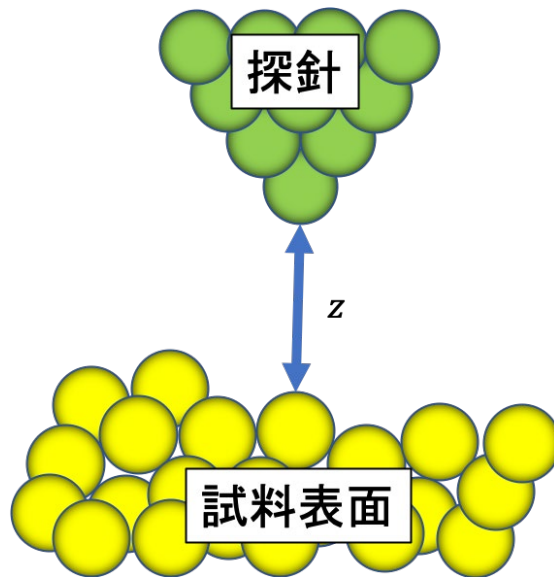


図 1 STM の原理

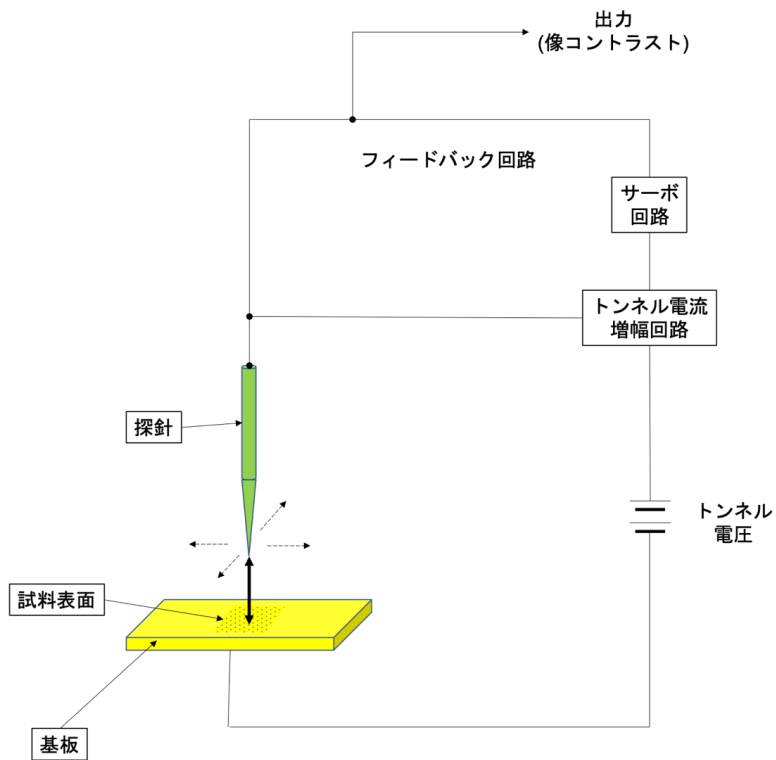


図 2 STM の構成

### 3.2 本研究で用いた基板

本研究では高配向性熱分解グラファイト (HOPG: Highly Oriented Pyrolytic Graphite) を基板に用いて STM によるインスリンの観察を行った。図 3 は HOPG 基板のグラファイトの構造を示している。グラファイトは炭素が六員環を作って結合し、層構造を作っている。



る。HOPG は原子レベルで平坦な表面をしており、容易に剥離することが可能である。基板の表面を剥離することによって、清浄で平坦な表面を得た。

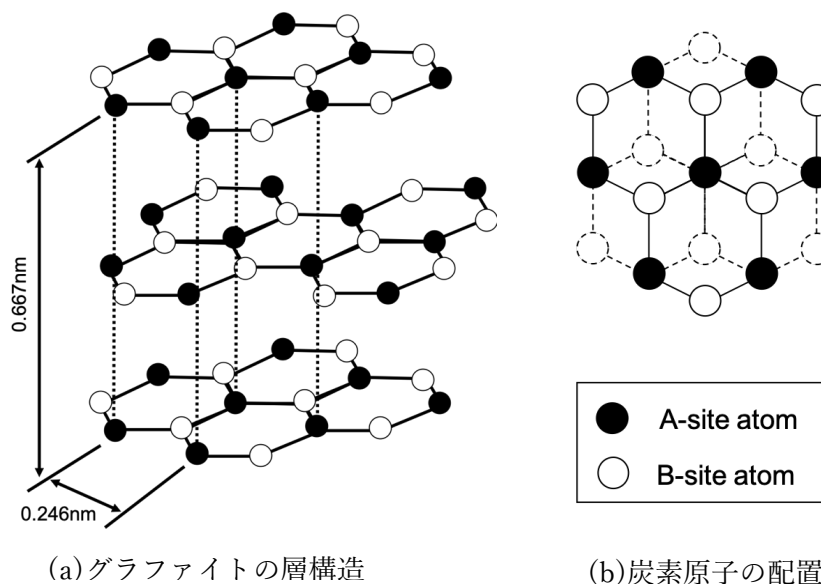


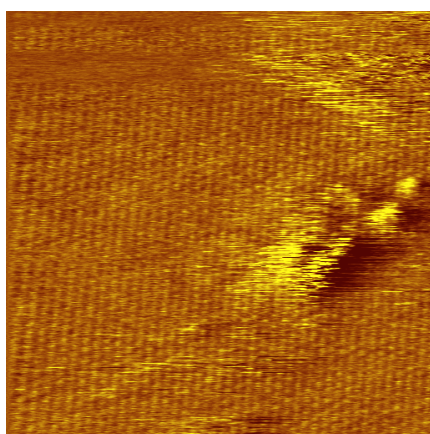
図 3 HOPG 基板の構造

### 3.3 インスリン溶液の作製及び HOPG 基板上への散布

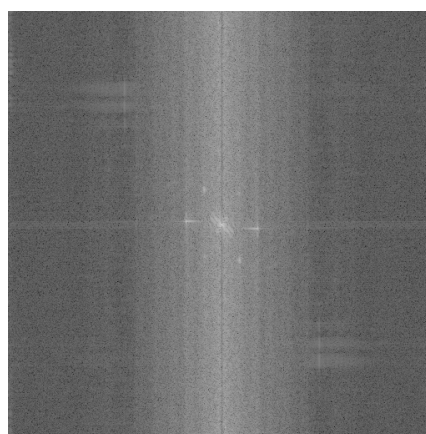
本研究ではインスリン(分子量 5807.57)を用いて、インスリン溶液試料の作製を行った。電子天秤を用いて計量した 1mg の粉末状のインスリンを 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールに溶解させ、この溶液を液体窒素で急速冷凍、凍結乾燥させて溶媒を除去した。溶媒除去後の粉末状のインスリンに対して 5.94mL の milliQ に溶解させ、まず、 $2.9 \times 10^{-5}$  mol/L 濃度の溶液を作製する。このインスリン溶液に対して 4 回 10 分の 1 の希釈し STM 観察用インスリン溶液( $2.9 \times 10^{-9}$  mol/L)とする。STM 観察用インスリン溶液を HOPG 基板の清浄な表面に  $4 \mu\text{L}$  滴下し、乾燥させる。この HOPG 表面上のインスリンを STM で観察を行なった。

### 3.4 高速フーリエ変換(FFT)を用いた画像処理

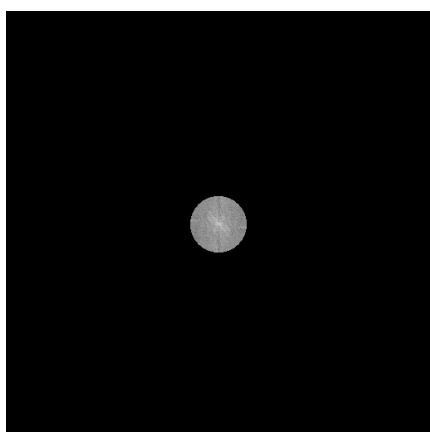
本研究では STM によって得られた像コントラスト画像において、ノイズ低減を目的とした高速フーリエ変換(FFT)を用いた画像処理を行なった。得られた像コントラスト画像(図 4.a)を白黒の 16bit 画像に変換した上で、FFT を行い周波数次元に変換した FFT 画像(図 4.b)を得る。得られた FFT 画像上において基板に用いた HOPG の炭素原子の周期構造が輝点として現れる。フィルター処理として HOPG の炭素原子の周期構造の輝点より高周波成分をカットする(図 4.c)。高周波成分をカット後の FFT 画像を逆フーリエ変換(IFFT)することで、周期構造をカットしたノイズ処理後の画像を得た(図 4.d)。



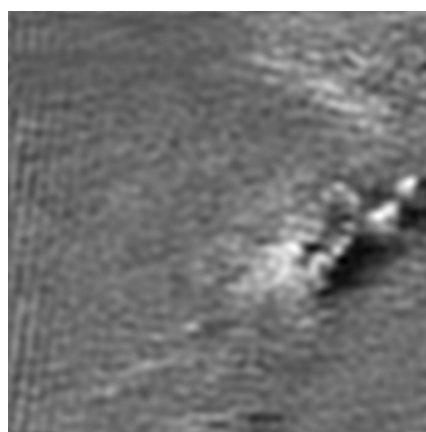
(a) raw 画像



(b) FFT 画像



(c) 高周波成分カット



(d) ノイズ処理後画像

図 4 FFT を用いた画像処理

## 4. 結果と考察

### 4.1 HOPG 基板の観察による STM 像の評価

図 5 に本研究で用いた HOPG 基板の像コントラストを示す。炭素原子による周期構造が観察できる。これより、STM を用いた本観察が原子分解能を持つことが確認できた。

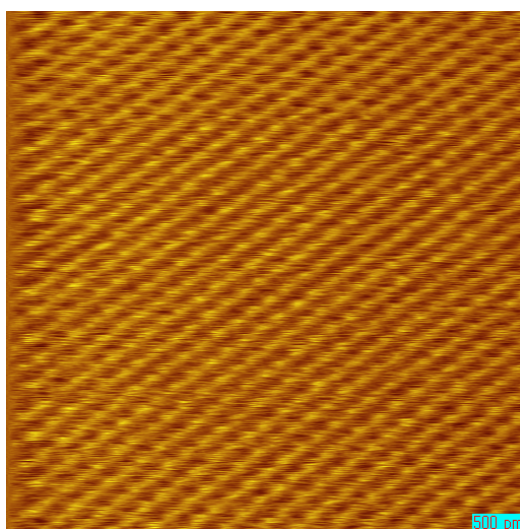


図5 観察に用いた HOPG 基板の STM 像

#### 4.2 インスリンモノマーの構造評価

図6に観察されたインスリンのモノマーと類推される像コントラストの raw 画像を示す。基板に用いた HOPG による炭素原子の像コントラストが確認できることから、原子分解能を持って観察することができたことが確認できた。

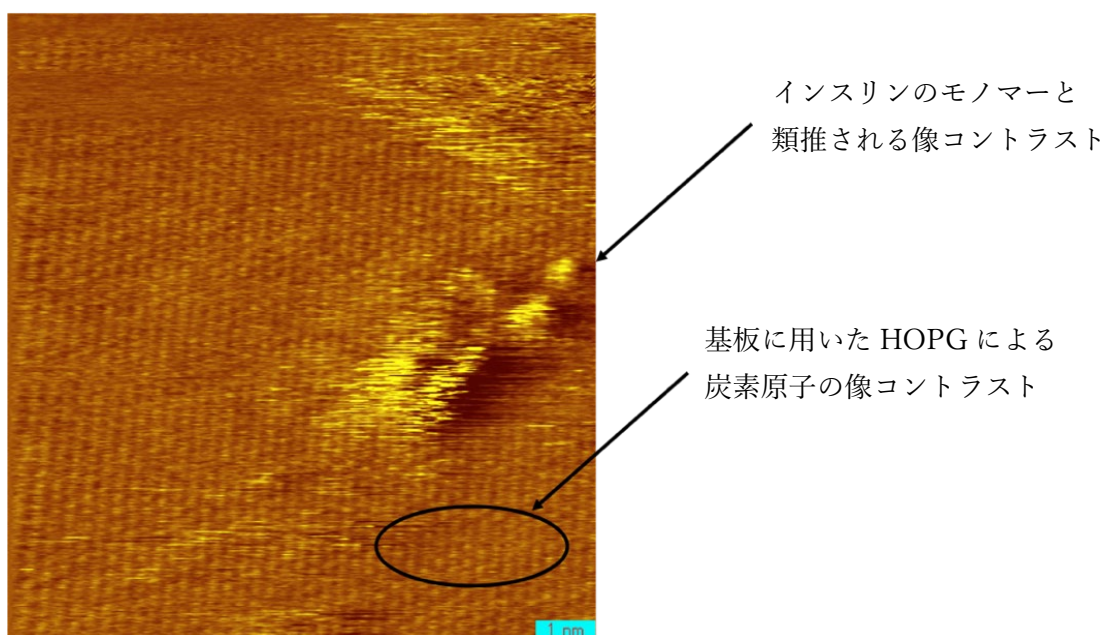


図6 インスリンモノマーの raw 画像

図7にノイズ処理後のインスリンのモノマーと類推される像コントラストを、図8に過去に報告されたインスリンの立体構造モデルを示す [9],[10]。

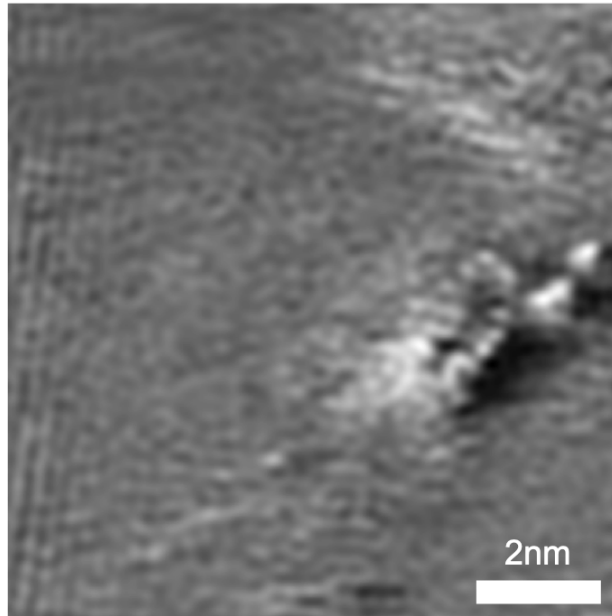


図7 インスリンモノマー

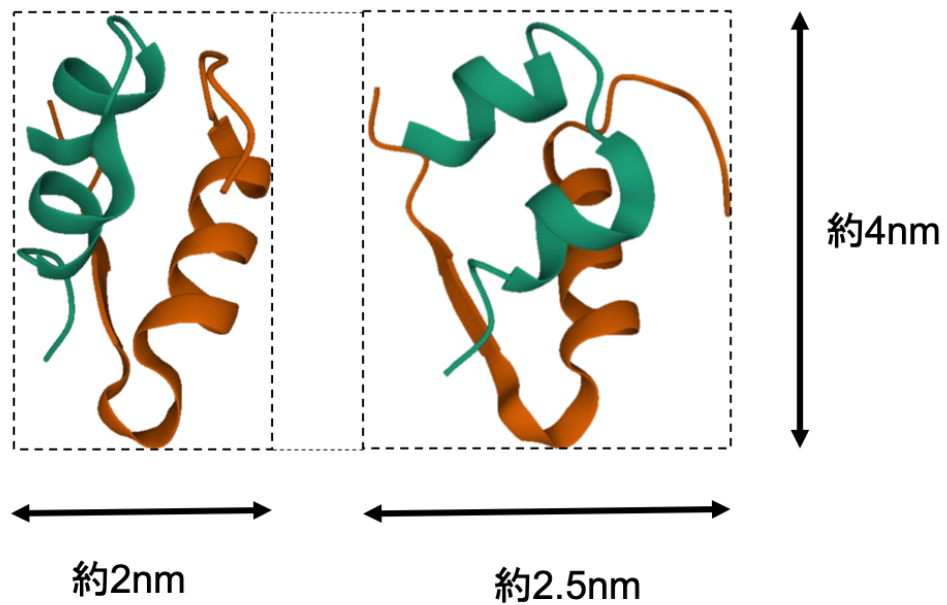


図8 インスリンモノマーの構造モデル

得られたインスリンのモノマーと類推される像コントラストの詳細な構造を明らかにするため、直線上の強度変化をグラフに表したラインプロファイルを求めた。図9に点線部における断面のラインプロファイルを示す。

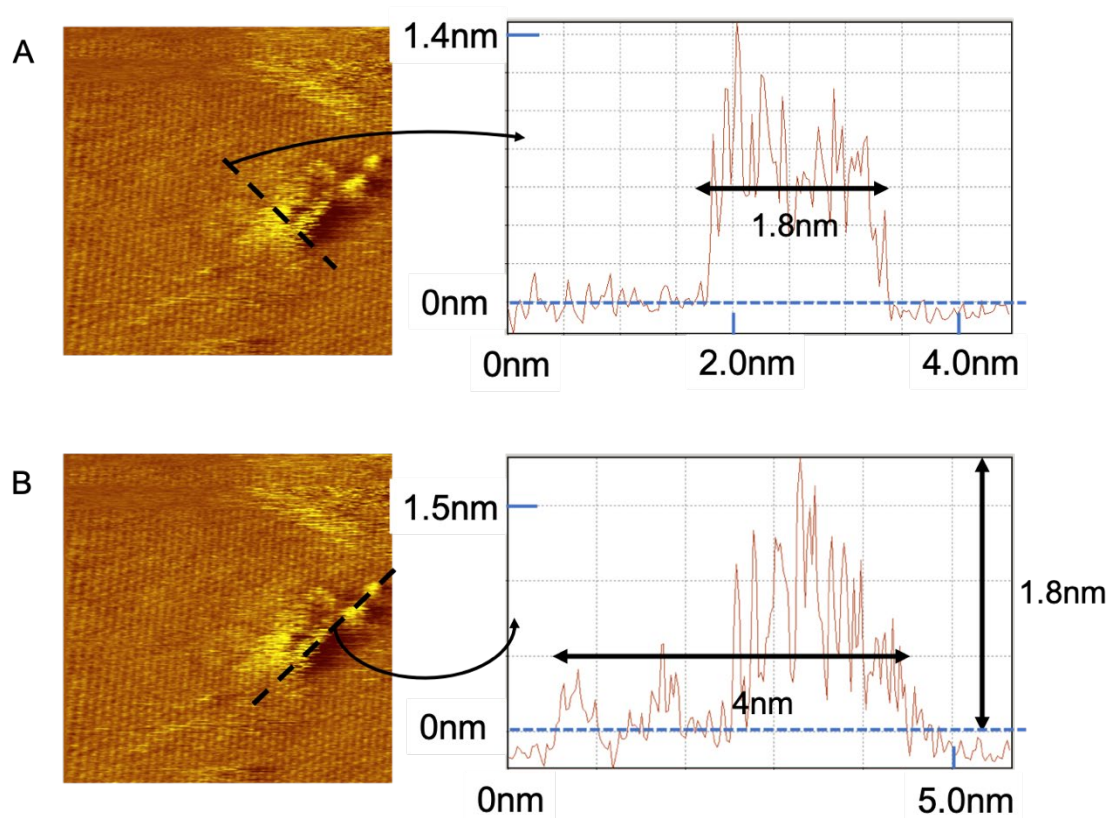


図9 インスリンモノマーのラインプロファイル

図9のラインプロファイルからインスリンのモノマーと類推される像は $1.8\text{nm} \times 4\text{nm}$ の大きさで高さが最大 $1.8\text{nm}$ の構造であることが分かった。図8に示した過去の報告から得られたインスリンの構造と比較すると類似していることがわかる。これより、得られた像コントラストはインスリンのモノマーであると推定した。

図10に得られた像コントラストから推定されるインスリンモノマーのと構造モデルの対応を示す。

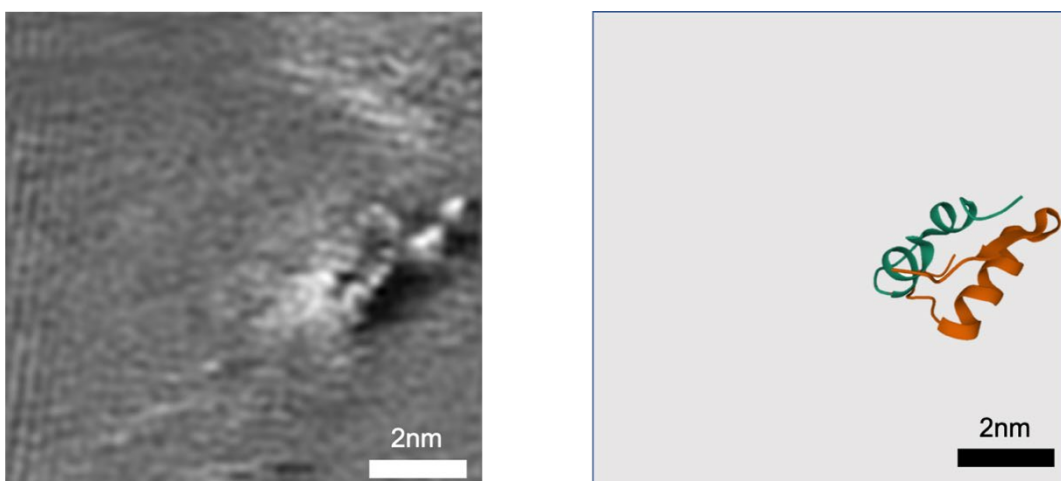


図10 観察結果とインスリン構造モデルとの対応

#### 4.3 インスリンオリゴマーの構造評価

図11に本観察で得られたインスリンのオリゴマーと類推される像コントラストのノイズ処理後画像を示す。図11からインスリンのオリゴマーと類推される像コントラストは約8nm×4nmの大きさの像コントラストが二つ並んでいることがわかる。このことから図8の過去の報告のインスリンモノマーの構造モデルと比較して、インスリンのダイマーが二つ並んでいると推定される。

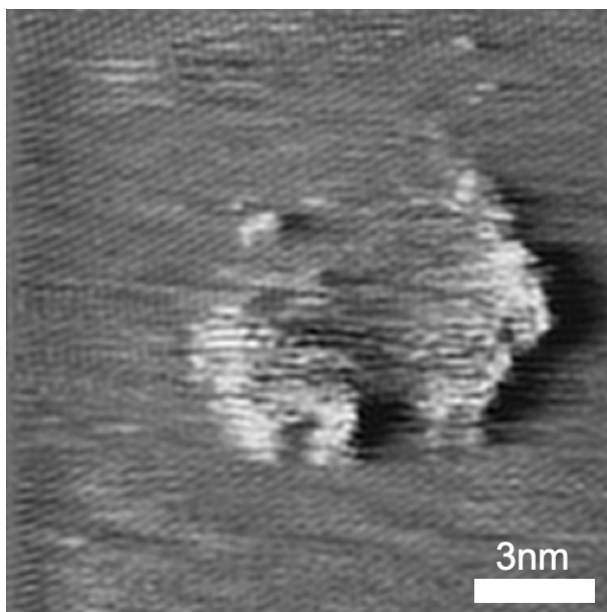


図11 インスリンオリゴマー

## 5. 結言

本研究では、タンパク質のオリゴマーをSTMにより高分解能観察する方法、及び、その構造評価法を確立するための第一歩として、アミロイドーシス関連タンパクのインスリンをHOPG基板上でSTM観察を行った。

基板の HOPG の炭素の六員環の像コントラストが観察された状態で、1.8nm × 4nm の大きさの像コントラストの観察に成功した。また、その高さは最大で 1.8nm であり、過去に報告された、インスリンの結晶構造から類推されるモノマーに相当していることがわかった。

また、インスリンのダイマーと思われる構造のコントラストを得ることにも成功した。オリゴマーを STM 観察するための濃度、基板などに目処がたったので、今後、多数の像観察と適切な画像処理から詳細な構造モデルと対応させ結合状態評価を行うことが課題である。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるお力添えを頂きました指導教員の目良裕先生、成瀬延康先生、中西章夫先生(生命科学講座物理学)に心より深く感謝いたします。また、医学部医学科 4 年の松井温哉さんにも実験するにあたり多くのご助力を頂きました。深く感謝申し上げます。最後にお世話になりました皆様に心より深く感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。

## 参考文献

- [1] 厚生労働省老健局, 認知症施策の総合的な推進について (参考資料), 令和元年.  
<https://www.mhlw.go.jp/content/12300000/000519620.pdf>
- [2] Anthony W. P. Fitzpatrick, et al., Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease, *Nature*, 547, 185 (2017).
- [3] Kenjiro Ono, Alzheimer's disease as oligomeropathy, *Neurochemistry International*, 119, 57-70 (2018)
- [4] Mahiuddin Ahmed, et al., Structural conversion of neurotoxic amyloid- $\beta$ <sub>1-42</sub> oligomers to fibrils, *Nature Structural & Molecular Biology*, 17, 561-567 (2010)
- [5] 小野賢二郎, オリゴマー仮説に基づいたアルツハイマー病の予防・治療薬の開発, *神経化学*, vol.55(No.3), 42-51 (2016)
- [6] 徳田隆彦, アルツハイマー病の病態発現仮説: その Paradigm Shift, *京府医大誌* (2016).
- [7] Peter Niraj Nirmalraj, et al., Complete aggregation pathway of amyloid  $\beta$  (1-40) and (1-42) resolved on an atomically clean interface, *Science Advances*, eaaz6014 (2020).
- [8] Nobuyasu Naruse, et al., Oligomers imaging of amyloid- $\beta$ <sub>1-42</sub> by scanning tunneling microscopy, *Japanese Journal of Applied Physics* (2019).
- [9] Tom Blundell et al., *Insulin: The Structure in the Crystal and its Reflection in Chemistry and Biology*
- [10] PDB:1TRZ

## 感染症数理モデルの数値シミュレーション

### -COVID-19 の実データとの比較-

滋賀医科大学医学科2年

112075 三澤佑太

## 1. 序論

### 1-1. 研究背景と目的

世界的な COVID-19 の流行の中、感染症にはいまだ予防・治療手段が限られたものも少なくないため、感染症の予防や治療方法の確立に加え、流行という現象を解明し予防や制御することが重要である。そこで役立つのが、流行動態を数式化して数理科学的に捉える数理モデルである。本研究では、感染症数理モデルの内 1920 年代に提案された Kermack-McKendrick による SIR モデルに基づいた近似計算をコンピュータ・シミュレーションを用いて行い、その結果を COVID-19 における感染拡大の実データと比較し、シミュレーションの妥当性を検証した。また、微分方程式を用いたシミュレーションの理解を深めるため、毎回の基礎科学研究のコマを用いて微分方程式の数値解法及びプログラミング言語 Python の学習を行った。

## 2. 微分方程式とシミュレーションツール

### 2-1. 微分方程式の数値解法

非線形微分方程式は、求積法による一般的な解法が存在しない。こういった場合に用いられる解法が数値解法であり、以下で紹介する方法は、ある範囲を更に細かい区分に分割し解を区分ごとに近似して求める区分近似解法である。ここでは研究コマ中の学習で取り上げられた4つの解法について紹介する。

#### 2-1-1. オイラー法

関数 $y$ の導関数が $\frac{dy}{dx} = f(x, y)$  で表される時、刻み幅を $h$ として次の式で順次解を求める方法である。

$$y_{i+1} = y_i + f(x_i, y_i)h$$



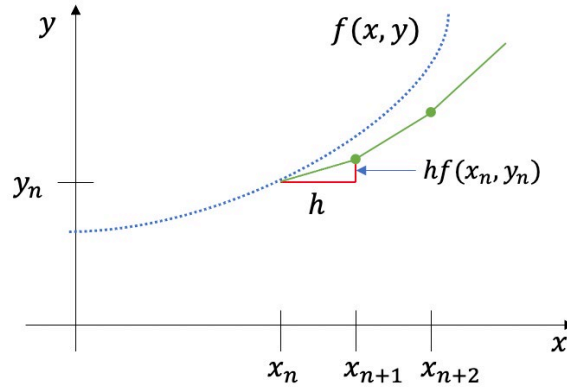


図 1 オイラー法の図形的表現

オイラー法は最も簡単な近似解法であると言える。この時、刻み幅を大きく取りすぎると解が収束せずに不安定になる。既知の情報 $(x_i, y_i)$ を利用して次のステップの解を求める解法を陽解法と呼ぶ。

### 2-1-2. 後退オイラー法

オイラー法と違い、既知の情報だけでなく次のステップの情報 $(x_{i+1}, y_{i+1})$ も用いて解を求める陰解法である。関数 $y$ の導関数が $\frac{dy}{dx} = f(x, y)$  で表される時、刻み幅を $h$ として次の式で順次解を求める。

$$y_{i+1} = y_i + f(x_{i+1}, y_{i+1})h$$

$f(x_{i+1}, y_{i+1})$  に具体的な関数を代入して代数的に  $y_{i+1}$  を求めなければならないため、オイラー法に比べて計算の手間は増えるが、刻み幅 $h$ を大きくとっても解が収束しやすく、数値的に安定である。

### 2-1-3. ホイン法(2次のルンゲ・クッタ法)

微小区間の開始点と終了点での微分値の平均を用いることで計算の精度を上げる。

$$k_1 = hf(x_i, y_i)$$

$$k_2 = hf(x_i + h, y_i + k_1)$$

$$y_{i+1} = y_i + \frac{1}{2}(k_1 + k_2)$$

### 2-1-4. ルンゲ・クッタ法 (4次)

微小区間の開始点と終了点だけではなく、更に中間点の微分値も使って重み付きの平均を取る。1 ステップあたりの計算量は多いが、刻み幅を大きくとってもその精度は高い。

$$k_1 = hf(x_i, y_i)$$

$$k_2 = hf\left(x_i + \frac{h}{2}, y_i + \frac{1}{2}k_1\right)$$

$$k_3 = hf\left(x_i + \frac{h}{2}, y_i + \frac{1}{2}k_2\right)$$

$$k_4 = hf(x_i + h, y_i + k_3)$$

$$y_{i+1} = y_i + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4)$$

流体力学や天文学などで大規模な時間発展方程式を数値シミュレーションする際によく使われる。

## 2-2. シミュレーションツールについて

本研究のコンピュータ・シミュレーションに用いた言語は Python である。科学技術計算に用いられるライブラリ Scipy に含まれる積分パッケージ integrate の odeint 関数を用いたシミュレーションを行った。これは関数、初期値、解を出力するリストや変数を与えると、2-1. で触れたような近似計算法の中から適切な計算手法を自動選択してくれる関数である。

## 3. 感染症数理モデルの数値シミュレーション

### 3-1. 感染症数理モデルの考え方

1-1. でも触れたように、感染症数理モデルはある集団における感染症の流行動態を数式を用いて記述したものである。感染症数理疫学の起源は、18 世紀のダニエル・ベルヌーイによる天然痘死亡率の寿命への影響に関する研究に遡る。

### 3-2. SIR モデルとシミュレーション例

#### 3-2-1. SIR モデルの概要

実データとの比較に用いる数理モデルとして、最も基本的といえる Kermack-McKendrick による SIR モデルを採用した。SIR モデルは、人口集団を S:感受性人口 (Susceptible), I:感染性人口 (Infectious/Infective), R:回復・隔離人口 (Recovered/Removed) の 3 つの集団に分類(人口の流入・流出はないものとする)し、それぞれを時間の関数として数式化して微分方程式を用いて動態を追うモデルである。SIR モデルは、感染症に応じた定数、単位時間のあたりの感染率を表す係数  $\beta$  と単位時間あたりの回復や隔離による除去率  $\gamma$  (ここで、その逆数  $\gamma^{-1}$  は感染から回復もしくは隔離までの平均感染性期間である。)を用いて以下の 3 式で表す。

$$\frac{dS}{dt} = -\beta SI \quad (1)$$

$$\frac{dI}{dt} = \beta SI - \gamma I \quad (2)$$

$$\frac{dR}{dt} = \gamma I \quad (3)$$

#### 3-2-2. 基本再生産数と実効再生産数

(2)式の左辺は感染者数の単位時間当たりの増加率を表す。従って、(2)式が正の値を取る時、感染者数は増加する。右辺を変形して  $(\beta S - \gamma)I > 0$  が感染拡大の条件であり、この時  $\frac{\beta S}{\gamma} > 1$  と変形できる。

ここで、 $S$ の $t = 0$ における初期値を $S(0)$ とすれば、 $\frac{\beta S(0)}{\gamma}$  は 1 人の感染者が回復するまでに感染させる平均

の人数であり、これを基本再生産数  $R_0 = \frac{\beta S(0)}{\gamma}$  と呼び、感染拡大の指標として用いる。

また、マスクの着用やワクチンの接種などの対策により、感染症の実質的な再生産数を低下させることができ、これを実効再生産数と呼ぶ。対策による低下率を $p$ とすれば、実効再生産数 $R_t$ は、 $R_t = (1 - p)R_0$  で表せる。

### 3-2-3. シミュレーション例

以下はPythonを用いたシミュレーションのソースコード及び描画したグラフである。このシミュレーションでは条件を表1の通り設定し、150日間のシミュレーションを行った。

表1. シミュレーション例における各条件

パラメータ	数値
人口 $N$	10000
初期感染者人口 $I(0)$	10
初期回復者人口 $R(0)$	0
初期感受性人口 $S(0)$	9990
基本再生産数 $R_0$	2.5
隔離率 $\gamma$	1/10

```

In [6]: import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.integrate import odeint
plt.rcParams['font.family'] = 'Hiragino Sans'

#初期条件—人口N,初期未感染者S, 初期感染者I, 初期回復者R,感染確率beta,回復率gamma
N = 10000
I_0 = 10
S_0 = N - I_0
R_0 = 2.5
p = 0.2
R_t = (1-p)*R_0
gamma = 1/10
beta = gamma*(R_t/S_0)

##微分方程式の定義
def f_diff(var,t, beta, gamma):
    S = var[0]
    I = var[1]
    R = var[2]
    dSdt = -beta*S*I
    dIdt = beta*S*I - gamma*I
    dRdt = gamma*I
    return [dSdt,dIdt,dRdt]

# varの初期値
var_ini=[S_0,I_0,R_0]

#シミュレーション期間
t_end = 150

#刻み幅(dt)を一日あたりに設定
dt = 1
t = np.arange(0.0, t_end, dt)

results = odeint(f_diff, var_ini, t, args=(beta,gamma))

S_result = results[:,0]
I_result = results[:,1]
R_result = results[:,2]

fig = plt.figure(figsize=(10,5))
ax = fig.add_subplot(111)

ax.plot(t,S_result,label='Susceptible', color = 'orange')
ax.plot(t,I_result,label='Infectious', color='r')
ax.plot(t,R_result,label='Recovered', color='green')
ax.set_xlabel('時間(日)')
ax.set_ylabel('人数')
ax.legend()
plt.show()

```

図 2 シミュレーションのソースコード

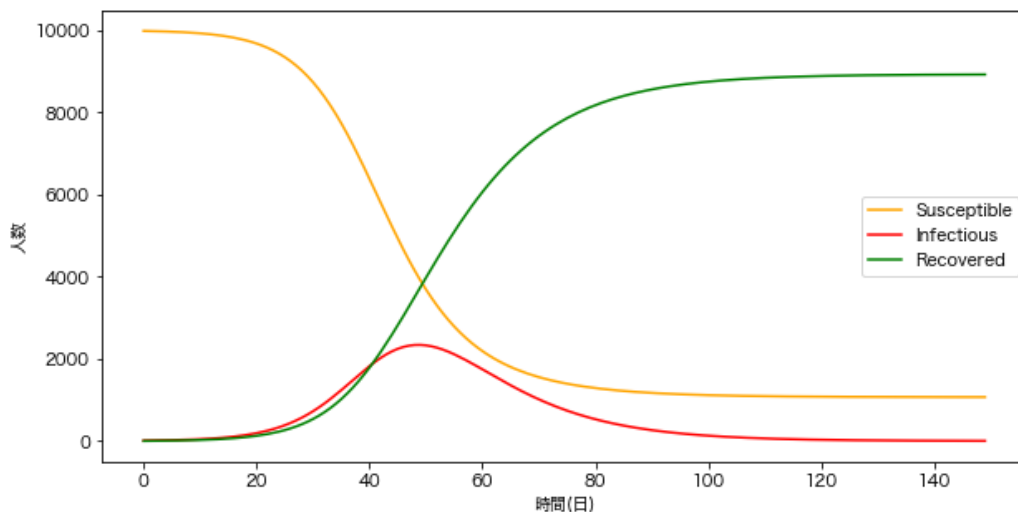


図 3 シミュレーション例のグラフ

赤で示される感染者人口のグラフに着目すると、40日過ぎに感染者数はピークの2000人強を迎え、その後収束に向かうことが読み取れる。

また、感染対策により  $t = 0$  の時点で  $p = 0.2$  であったとすると、流行動態は図 4 のように変化する。

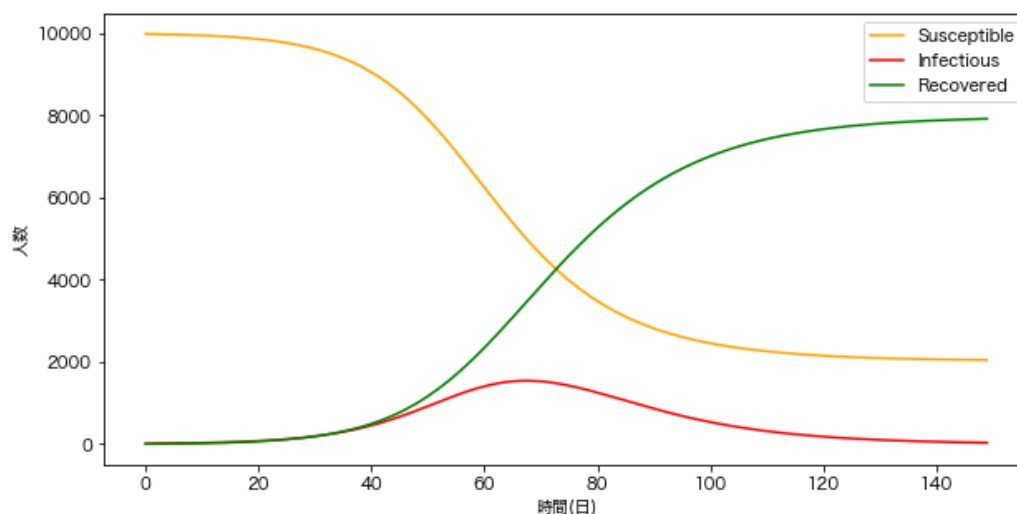


図 4  $p = 0.2$  とした場合のグラフの変化

同じく感染者数に注目すると、感染のピークは 60 日過ぎへと遅れ、更にピークの人数も 2000 人を下回るように変化している。

#### 4. 実データとの比較

本研究では、大阪府と NHK 提供のオープンデータを用いて、2020/5/22 から 150 日間の大阪府における新型コロナウイルス感染症の感染状況の実データと同 5/22 を  $t=0$  とするシミュレーションの結果を比較した。

5/22 は 1 度目の緊急事態宣言が明けた日であり、ここから 150 日間は行政による感染拡大のコントロールはなかった期間である。以下のシミュレーションでは特に感染者数と回復・隔離者数の推移に着目している。

表 2. 実データ比較の初期値

パラメータ	値	文献
$N$ (大阪府の人口)	8798545	[1]
$I(0)$ (現在陽性者数)	270	[2]
$R(0)$ (退院・療養者数+累計死者数)	1781	[2],[3]
$S(0)$ ( $N - I(0) - R(0)$ )	8796764	
基本再生産数 $R_0$	2.5	[4]

また、あらかじめパラメータのフィッティングを行い、 $p = 0.42$ ,  $\gamma = 1/20$ とした。

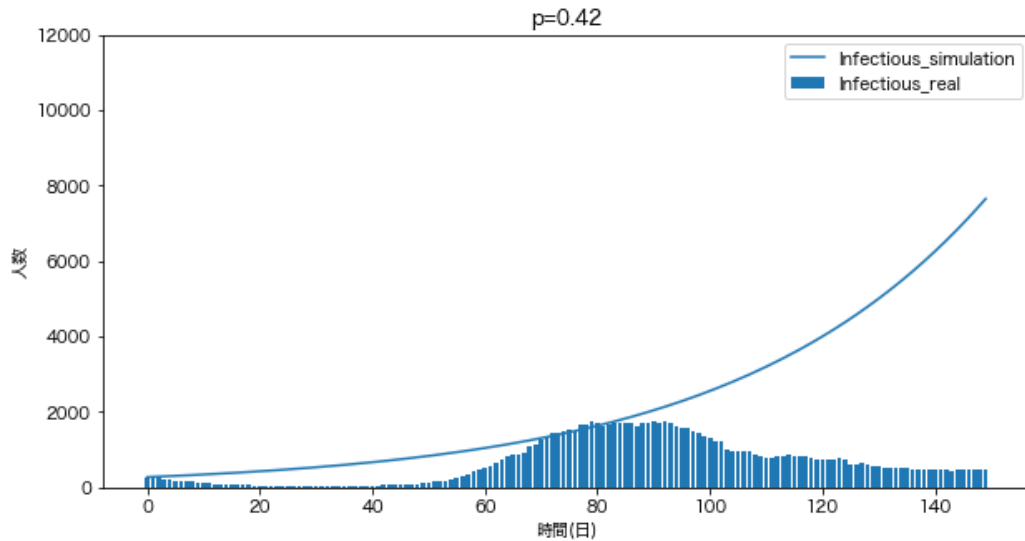


図 5 感染者数のシミュレーション結果と実データの比較

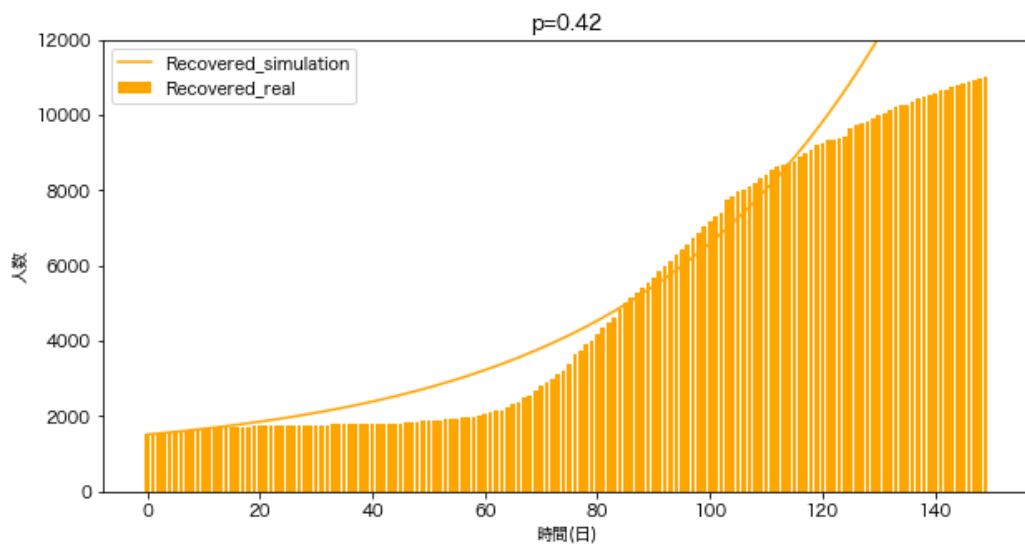


図 6 回復・隔離者数のシミュレーション結果と実データの比較

図 5, 図 6 での棒グラフが実データ, 曲線がシミュレーション結果である. この結果を比較すると, 現実の感染拡大状況に比べてシミュレーションの方が圧倒的に大きな感染爆発を起こしている. 実データにおける感染者数の推移は途中でピークを迎え減少に転ずるという SIR モデルにおける流行動態の特徴に当てはまるが, これ以上  $R_0$  や  $\gamma$  の数値を変化させてもフィッティングさせることができなかった. そこで, 感染者数が減少に転ずる時刻  $t = 85$  以降では  $p = 0.8$  となるように条件を変更し再度シミュレーションを行った. 図 7, 8 がその結果である.

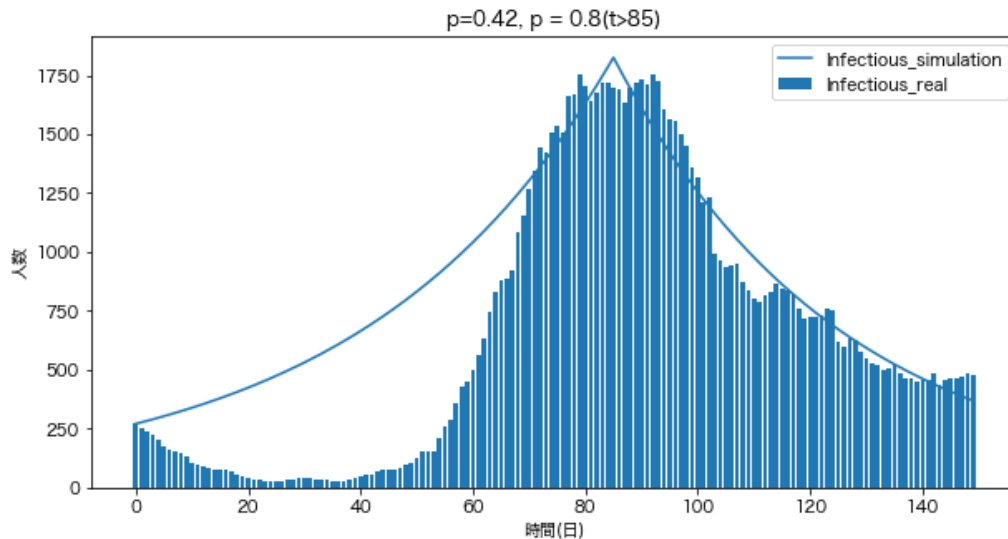


図 7 感染者数のシミュレーション結果と実データの比較(条件変更後)

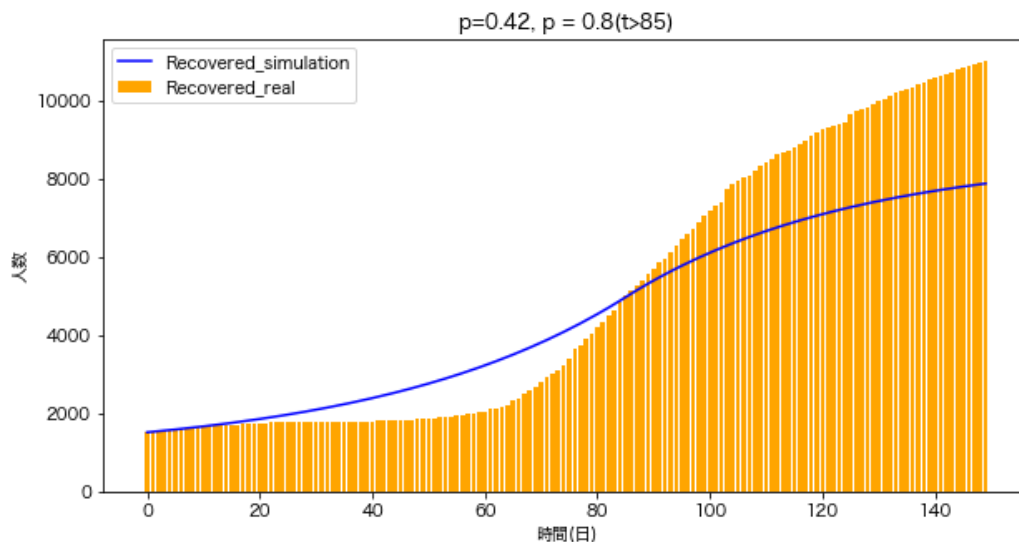


図 8 回復・隔離者数のシミュレーション結果と実データの比較(条件変更後)

この時、シミュレーション結果は実データと近い流行動態を示した。先述したように本研究は行政による介入のない期間を指定したため、85 日前後に人々に何らかの行動変容があったと考えられる。

## 5. 結論

### 5-1. 考察

実データとその初期値を元にしたシミュレーション結果を比較すると、適切なパラメータを設定すれば SIR モデルでもおおよその感染拡大傾向を予測することは可能だということが分かった。しかし、この数理モデル上で扱うことのできるパラメータ自体が少ないため実データにマッチさせることは難しい。例えば、陽性者の内無症状者と有症状者が異なる感染力を持っているとすれば、人口集団に新たに別の区分を設ける必要がある。また、SIR モデルに代表される数理モデルは人口集団をマクロに捉えているた

め、個々人の行動をシミュレーションに入れ込むことができない。集団を構成する個体に各々に違う属性を与えられるマルチエージェントシミュレーションなどを目的に応じて使い分けてシミュレーションを行う必要がある。

## 5-2. 今後の展望

本研究では感染症の数理モデルとしては最も基本的な SIR モデルを扱ったが、提唱から 100 年近くたった今でも流行動態の傾向分析には有用であることが分かった。医学よりも数理科学としての側面が強い感染症数理疫学であるが、研究の中で我々医学生もマクロな感染症対策の理解を深める上で習得しておいて損はない分野だと言うことを実感した。

未知の感染症についてもまずは既知のデータの分析が肝要である。以前から WEB スクレイピングやビッグデータの活用に興味を持っているので、次はその分野も更に学習して医療への応用を考えていきたい所存である。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり指導教員の本山一隆先生(情報総合センター)には多大なお力添えを頂きました。感謝の意を表します。

## 引用文献

- [1] 大阪府 . 2021. 『推計人口 (6 月)』 (最終閲覧日 :2021 年 9 月 20 日)  
<https://www.pref.osaka.lg.jp/toukei/jinkou/jinkou-xlslist.html>
- [2] 大阪府. 2021. 『大阪府新型コロナウイルス感染症対策サイト』(最終閲覧日:2021 年 9 月 20 日)  
<https://covid19-osaka.info/>
- [3] NHK. 2021. 『新型コロナウイルス 感染者数や NHK 最新ニュース』(最終閲覧日:2021 年 9 月 20 日)  
<https://www3.nhk.or.jp/news/special/coronavirus/data-widget/>
- [4] 鈴木絢子, 西浦博『感染症の数理モデルと対策』,日本内科学会雑誌, 2020 年, 109 卷 11 号, 2276-2280

## 参考文献

- 稲葉寿『感染症の数理モデル 増補版』, 培風館, 2020 年
- 水島二郎, 柳瀬眞一郎, 石原卓 『理工学のための数値計算法 第 3 版』, 数理工学社, 2019 年
- 岩見真吾, 佐藤圭, 竹内康博『ウイルス感染と常微分方程式』, 共立出版, 2017 年
- 鈴木絢子, 西浦博『感染症の数理モデルと対策』,日本内科学会雑誌, 2020 年, 109 卷 11 号, 2276-2280



## 感染症数理モデルの数値シミュレーション ～COVID-19 と他の感染症との比較～

医学部医学科2年 132103 亀田隼大

### 目次

研究背景 .....	1
研究目的 .....	1
理論 ～感染症数理モデル～ .....	1
実験内容 .....	3
結果、考察 .....	4
結論 .....	9
参考文献 .....	9
実行コード .....	10

## 研究背景

感染症数理モデルは、ある集団における感染症の広がりを数式を利用して記述したものである。感染症数理疫学は 18 世紀にさかのぼる歴史の長い研究分野であるが、近年は計算機の処理能力や計算統計学の発展に伴って、その社会実装のための計算手法が飛躍的に進歩している。また新型コロナウイルス感染症 (coronavirus disease 2019 : COVID-19) の世界的流行により、注目を集めている分野である。

## 研究目的

本研究では、コンピューターシミュレーションを用いることで、感染症数理モデルの理解に務めた。コンピューターシミュレーションでは現実には起こりえないことについて、検証を行うことができる。この利点を活用し、感染症数理モデルにおける変数である平均感染性期間 ( $\gamma^{-1}$ )、平均潜伏期間 ( $\varepsilon^{-1}$ )、基本再生産数  $R_0$  の数値が感染者の増加にどのような意味をもたらすかを調査した。また、COVID-19 をより正確に記述する数理モデルを作成し、そのモデルが基本的な SIR モデルとどのように異なるかを確認した。

## 理論 ～感染症数理モデル～

### 1. SIR モデル

SIR モデルとは、ある感染症について、S(susceptible)の状態の人が感染症への免疫がない人々(感受性人口)、I(infected)の状態の人が感染症に現在かかっている人々(感染性人口)、R(recovered)の状態の人が感染症から回復して感染症への免疫が生じた人々(隔離人口)を指す。I 状態の人が S 状態の人と接触すると、S 状態の人は一定の確率で I 状態へと変化し、R 状態の人は二度目の感染をすることはない。以下ではそれぞれの人数を S、I、R で表す。ある集団全体の人数を N とすると、以下の式(1)がなり立つ。

$$N = S + I + R \dots(1)$$

SIR モデルにおける S、I、R についての微分方程式は以下の式(2)～(4)の通り定義される。

$$dS(t)/dt = -\beta S(t)I(t) \dots(2)$$

$$dI(t)/dt = \beta S(t)I(t) - \gamma I(t) \dots(3)$$

$$dR(t)/dt = \gamma I(t) \dots(4)$$

ここで、S(t)、I(t)、R(t)、は集団のなかである時刻における S 状態、I 状態、R 状態の人々の人数を表している。 $\beta$  は単位時間当たりの感染率を表す係数であるが、 $\beta I(t)$  は時刻 t における感染力を与える。つまり、人口が一定である分、ハザードである感染力は集団内の感染者数に比例することがわかる。 $\gamma$  は単位時間当たりの回復や隔離による除去率であり、この逆数  $\gamma^{-1}$  は感染から回復もしくは隔離されるまでの平均感染性期間を与える。

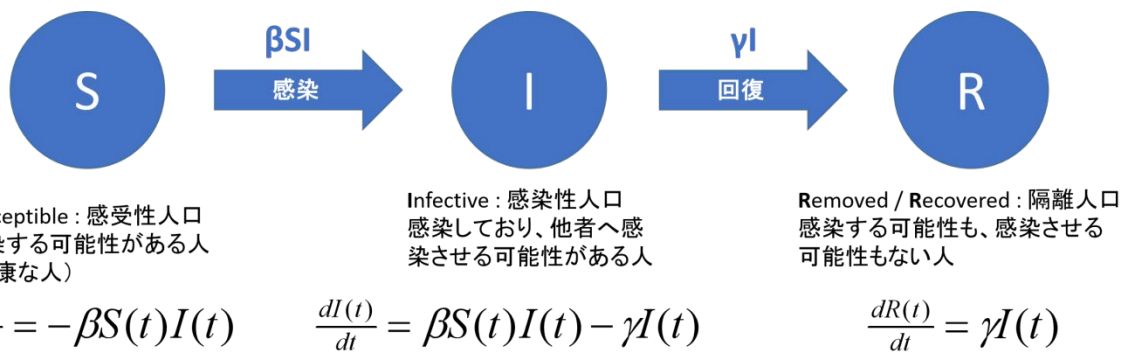


図 1 SIR モデル

ここで式(3)を変形すると、式(5)が得られる。

$$dI(t)/dt = (\beta S(t) - \gamma)I(t) \dots(5)$$

新規感染者が増加している場合は  $\beta S(t) - \gamma > 0$  となり、これが感染症流行の条件となる。さらに、この式は  $\beta S(t)/\gamma > 1$  と変形することができる。時刻 0 における  $\beta S(0)/\gamma$  が感染症流行の閾値となる。この値は基本再生産数と呼ばれ、 $R_0$  で表される。

基本再生産数( $R_0$ )は、感染症疫学で最も基本となる感染性の指標であり、ある感染症に対して全員が感受性を持つ集団のなかで、典型的な 1 人の感染者が感染性を有する期間に再生産する二次感染者数の平均値と解釈される。基本再生産数が 1 より大きい場合は大規模な流行が発生し得るが、1 より小さい場合には流行は自然消滅する。基本再生産数の値は、人口密度や社会構造、個体間の接触様式に関係しているため、分析を行う地域の状況により推定値に変動があるが、COVID-19 の基本再生産数は中国の流行初期のデータから 1.5~3.5 と推定されてる。

対策実行下における再生産数は、実効再生産数(effective reproduction number)と呼ばれ、実効再生産数を 1 以下にすることが感染症制御の目安となる。ここで基本再生産数と実効再生産数について数式を用いて表すと、実行再生産数( $R_t$ )は基本再生産数( $R_0$ )をもちいて数式(6)のように表すことができる。このとき、マスク着用、手洗いや接触削減等の感染症対策による感染力の低下率を  $p$  で表している。

$$R_t = (1 - p)R_0 \dots(6)$$

## 2. SEIR モデル

SEIR モデルとは、前項で紹介した SIR モデルに、感染してから感染性を持つまでの感染性待ち時間(latent period)の状態(exposed)を加えたモデルである。SEIR モデルは式(7)~(10)で表される。ここで、 $\varepsilon$  は平均潜伏期間の逆数である。

$$dS(t)/dt = -\beta S(t)I(t) \dots(7)$$

$$dE(t)/dt = \beta S(t)I(t) - \varepsilon E(t) \dots(8)$$

$$dI(t)/dt = \varepsilon E(t) - \gamma I(t) \dots(9)$$

$$dR(t)/dt = \gamma I(t) \dots(10)$$

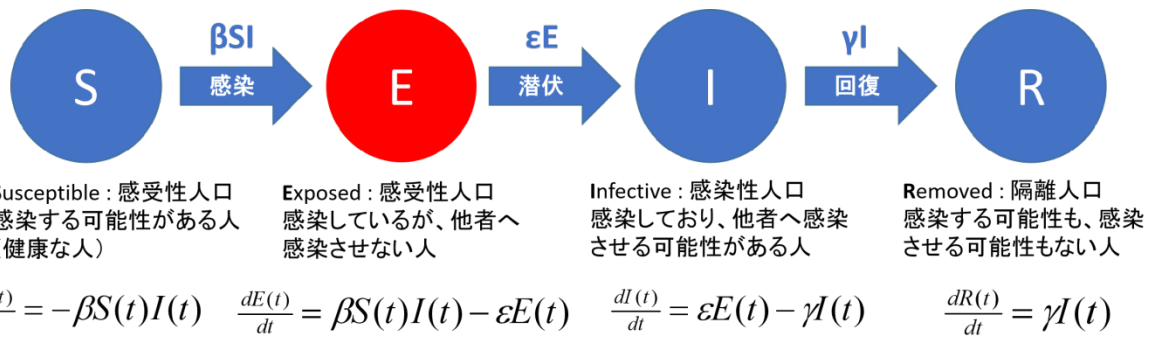


図 2 SEIR モデル

## 実験方法

### 1. SEIR モデルの各変数が感染者数に与える影響の調査

10 万人の集団の中で 1000 人が感染者になっている初期条件において、SEIR モデルで各変数を変化させるとどのように感染者数と総感染者数が推移するかを確認した。リファレンスデータは総人口 100000 人、初期感受性 (S 状態、E 状態) 人口 (S(0))99000 人、初期感染性 (I 状態) 人口 1000 人、初期隔離 (R 状態) 人口 0 人、 $R_0=2.5$ 、 $R_t=2.5$ (介入なし)、 $\gamma=0.1$ (感染期間 10 日間、 $\varepsilon=0.2$ (潜伏期間 5 日間)、 $\beta=R_0 \times \gamma / S(0)$ 、期間=250 日に設定した。この値は新型コロナウイルスのアルファ株の感染力をもとに設定している。そして、その結果が図3のようにグラフでわかりやすく確認できる人数と期間を設定した。

また、この条件で麻疹、天然痘、インフルエンザ、COVID-19 の各  $\gamma$ 、 $\varepsilon$ 、 $r$ 、 $R_0$ を用いて感染状況の推移を確認し、各感染症の特徴を考察した。

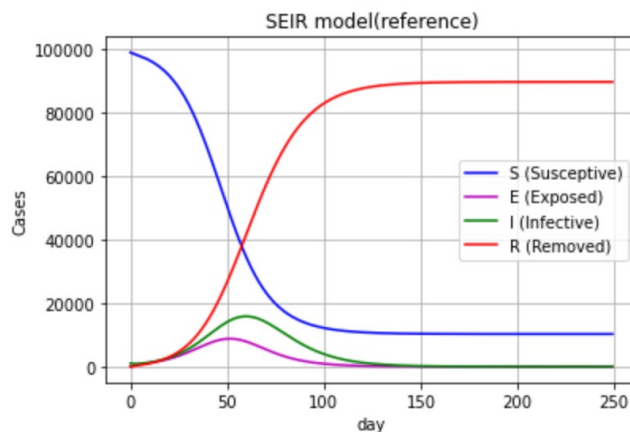


図3 リファレンスデータ

### 2. SEIR モデルの拡張実験

新型コロナウイルスでは発症間隔が平均 4.8 日 (95%信用区間: 3.8, 6.1), 標準偏差は 2.3 日 (95%信用区間: 1.6, 3.5)と推定されている。新型コロナウイルスの潜伏期間の推定値は平均 5.6 日であり、発症前から感染性を持つことが疫学モデルを用いた研究でも示されている。

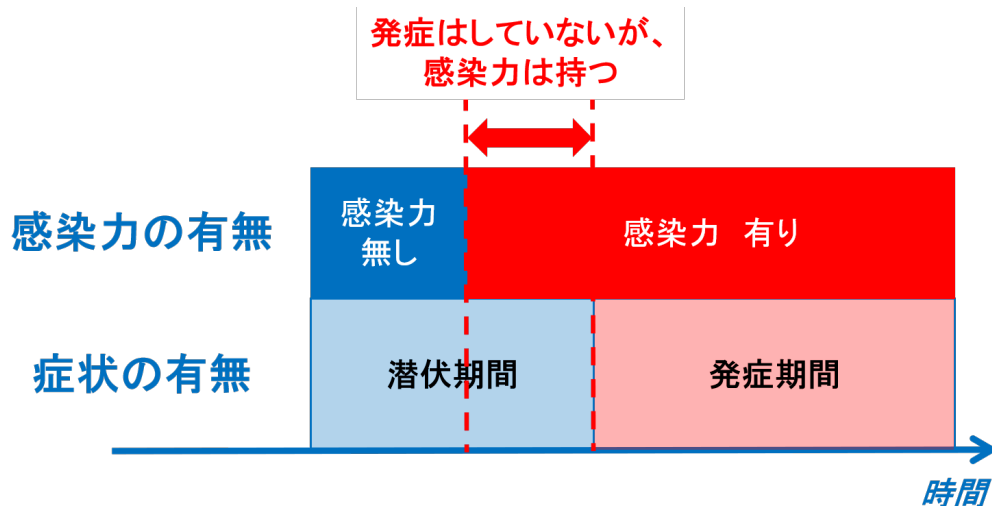


図 4 潜伏と発症

そこで、潜伏期間を示す E 状態を感染性を持たない期間(潜伏-非感染性期間)と感染性を持つ期間(潜伏-感染性期間)に分けたモデルを作ること、より現実に近いモデルとなると考えた。潜伏-非感染性期間を  $E_u$  (Exposed(uninfective))状態とし、潜伏-感染性期間を  $E_i$ (Exposed(infective))とした  $SE_uE_iIR$  モデルを考えた。 $SE_uE_iIR$  モデルを式(11)~式(15)に示す。

$$dS(t)/dt = -\beta S(t)(I(t) + E_i(t)) \dots(11)$$

$$dE_u(t)/dt = \beta S(t)(I(t) + E_i(t)) - \varepsilon E_u(t) \dots(12)$$

$$dE_i(t)/dt = \varepsilon E_u(t) - \delta E_i(t) \dots(13)$$

$$dI(t)/dt = \delta E_i(t) - \gamma I(t) \dots(14)$$

$$dR(t)/dt = \gamma I(t) \dots(15)$$

ここで、 $\delta^{-1}$ は潜伏期間から発症期間を引いた値となる。

## 結果、考察

### 1. SEIR モデルが各変数の感染者数に与える影響の調査

#### 1.1 $\varepsilon$ が与える影響

まず、 $\varepsilon$  の値を変化させてシミュレーションを実施した。 $\varepsilon = 1/2, 1/5, 1/10$  のそれぞれの条件でシミュレーションを実施した際の、感染者人口の推移を図 5 に、隔離人口の推移を図 6 に示す。

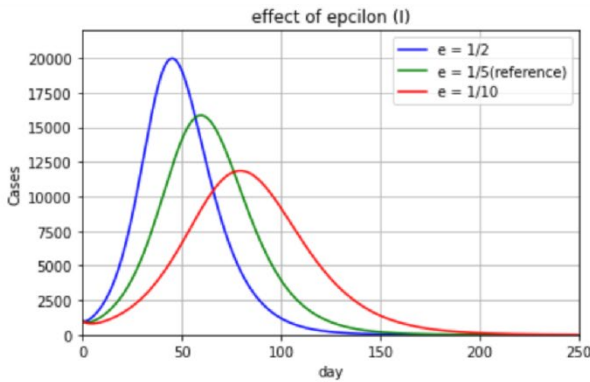


図 5 感染者人口の推移 ( $\epsilon = 1/2, 1/5, 1/10$ )

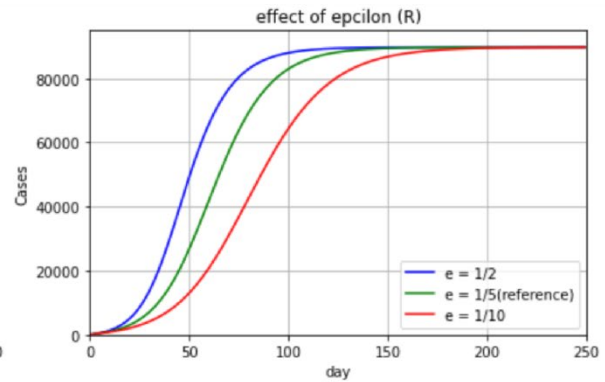


図 6 隔離人口の推移 ( $\epsilon = 1/2, 1/5, 1/10$ )

$\epsilon$  が低下する、つまり潜伏期間 ( $\epsilon^{-1}$ ) が増大すると、感染者人口のピークが遅く、小さくかつブロードになる。一方で、最終的な隔離人口 (感染した人口) は変化しない。ここから、潜伏期間が短い感染症は急激に感染者が増加するため、医療機関への影響が大きいことがわかる。

### 1.2 $\gamma$ が与える影響

次に、 $\gamma$  の値を変化させてシミュレーションを実施した。 $\gamma = 1/5, 1/10, 1/20$  のそれぞれの条件でシミュレーションを実施した際の、感染者人口の推移を図 7 に、隔離人口の推移を図 8 に示す。

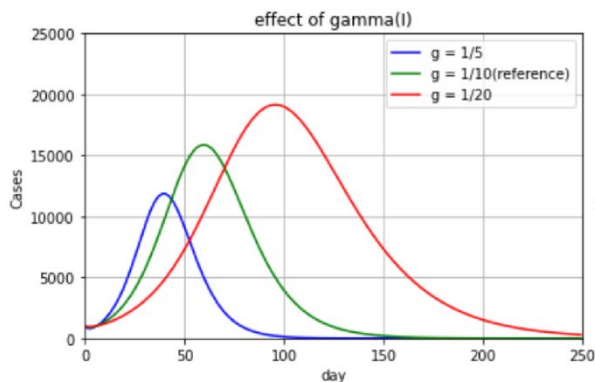


図 7 感染者人口の推移 ( $\gamma = 1/5, 1/10, 1/20$ )

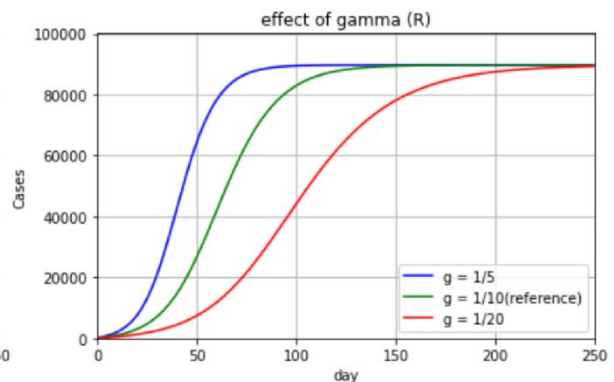


図 8 隔離人口の推移 ( $\gamma = 1/5, 1/10, 1/20$ )

$\gamma$  が低下する、すなわち  $\gamma^{-1}$  が増加すると、感染者人口のピークが遅く、大きくかつブロードになる。一方で、最終的な隔離人口 (感染した人口) は変化しない。ここから、発症期間 ( $\gamma^{-1}$ ) が長い感染症は患者が長期にわたって感染状態を維持するため、それらの患者が入院を要する場合、医療機関の資源を圧迫する可能性が高いと考えることができる。COVID-19 は感染期間が比較的に長いため、医療機関の資源を圧迫すると考えられる。また、医療機関の負担を軽減するためには、この発症期間を短くするために、感染を早期に確認し、隔離する政策が重要だということがわかる。

### 1.3 $R_0$ が与える影響

さらに、 $R_0$  の値を変化させてシミュレーションを実施した。 $R_0 = 1.5, 2.5, 3.5$  のそれぞれの条件でシミュレーションを実施した際の、感染者人口の推移を図 9 に、隔離人口の推移を図 10 に示す。

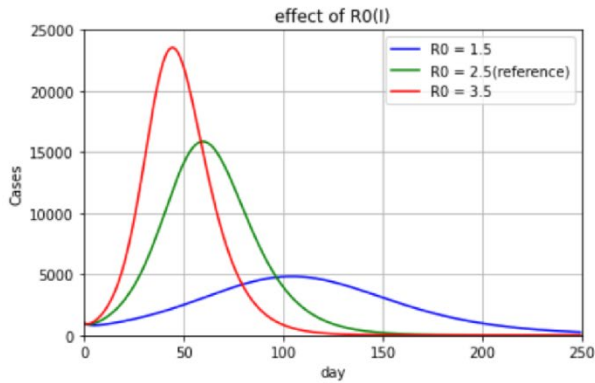


図 9 感染者人口の推移( $R_0=1.5, 2.5, 3.5$ )

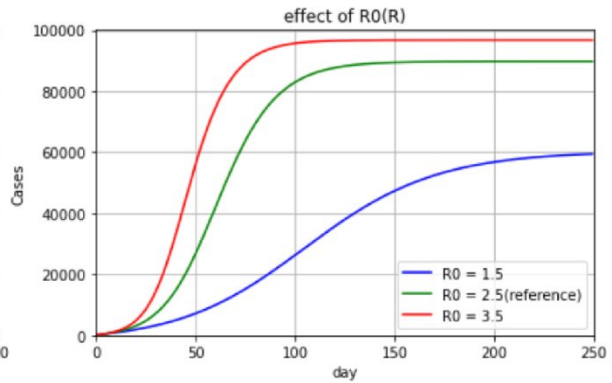


図 10 隔離人口の推移( $R_0=1.5, 2.5, 3.5$ )

$R_0$ が低下すると、感染者人口のピークが遅く、小さかつブロードになる。また、最終的な隔離人口も変化する。つまり  $R_0$  が大きい感染症は感染が広がる速度は早いですが、その分一気に多くの人が感染し早く収束する。最近話題となっている新型コロナウイルスのデルタ株は、アルファ型の 1.95 倍の  $R_0$  を持つことが明らかとなっており、8月の急激な感染拡大の説明がつく。

#### 1.4 $R_t$ が与える影響

さらに、 $R_t$  の値を変化させてシミュレーションを実施した。 $R_t = R_0(1-x)$  として、 $x=0, 0.3, 0.6$  のそれぞれの条件でシミュレーションを実施した際の、感染者人口の推移を図 11 に、隔離人口の推移を図 12 に示す。

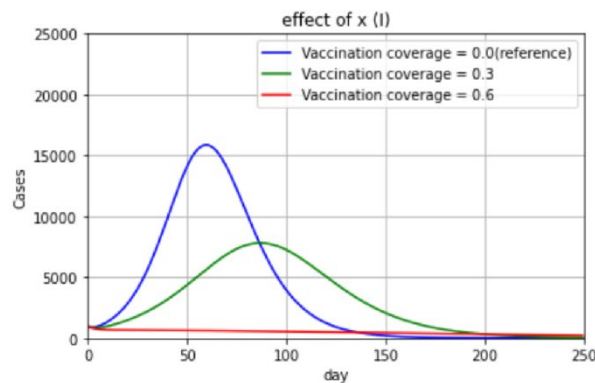


図 11 感染者人口の推移 ( $x = 0, 0.3, 0.6$ )

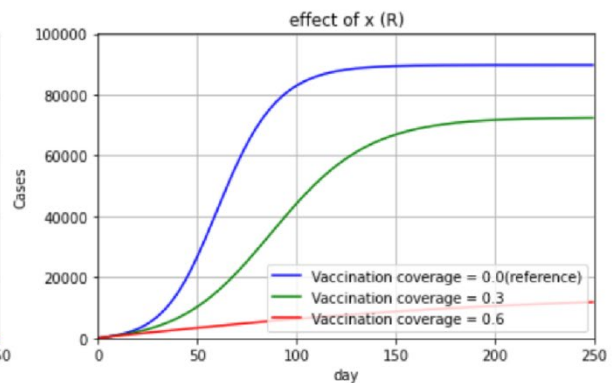


図 12 隔離人口の推移 ( $x = 0, 0.3, 0.6$ )

$R_t$  が低下すると、感染者人口のピークが遅く、小さかつブロードになる。また、最終的な隔離人口も低下する。 $x=0.6$  の場合では、感染者数は減少し続けていることもわかる。今回設定した  $x$  は、ワクチン接種率と同様に考えることができる。今回は  $R_0=2.5$  の条件でシミュレーションを実施している。1人の感染者が 2.5 人に移す場合、60%以上の人が免疫を有しており感染しないと仮定すると、1人の感染者は 1人以上に感染症を移さなくなる。そのため感染拡大を抑えるために必要なワクチン接種率は理論上  $x \geq 0.6$  ということになる。このグラフはその理論に則した結果が出ており、シミュレーションが正しく実行されていることが確認できる。

#### 1.5 様々な感染症の数値

麻疹、天然痘、インフルエンザ、COVID-19 の各  $R_0, \gamma, \varepsilon$  を表 1 に示す。この数値を代入してシミュレーションを実施した。感染性人口を示した結果を図 13 に示す。

表 1 各感染症の  $R_0$ 、 $\gamma^{-1}$ 、 $\varepsilon^{-1}$

	Measles	Smallpox	Influenza	COVID-19
$R_0$	12	6	2.5	2.5
$\gamma^{-1}$	5	7	5	10
$\varepsilon^{-1}$	10	12	2	5

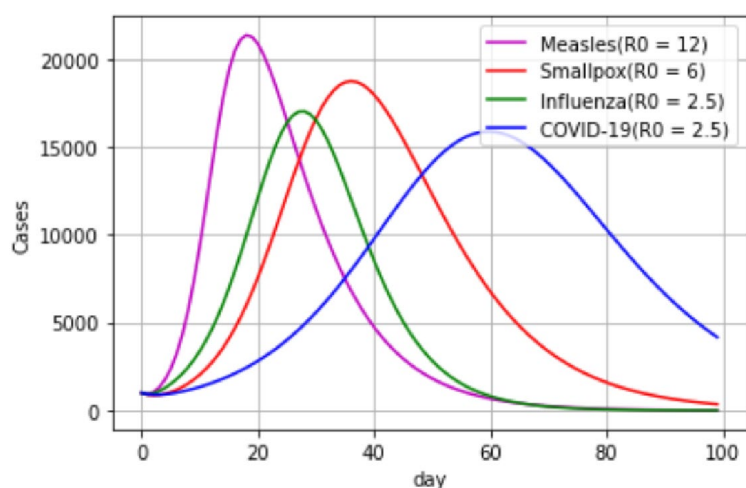


図 13 各感染症の感染性人口の推移

表 1 と図 13、およびこれまでの結果から、各感染症の特徴を考察する。まず、麻疹について考えると、麻疹は他の感染症よりも  $R_0$  が大きいいため、非常に感染拡大が早く、かつ多くの人に感染することがわかる。潜伏期間が 10 日と長いにもかかわらず、最も早くピークアウトするのは  $R_0$  が他と比べて明らかに大きいためだと予想できる。

次に、天然痘について考えると、潜伏期間が非常に長いため、インフルエンザの倍以上の  $R_0$  を示しているにもかかわらず、ピークアウトはインフルエンザよりも遅い。しかし、致死率が高く、かつ感染力が  $R_0=6$  と高いため、感染拡大時には大きな影響を社会に与えることが予想される。また、感染期間が 7 日と長いため、ピーク時の感染者人口はかなり多くなっている。医療機関の多くのリソースを使用する必要がある感染症であると考えられる。

インフルエンザに関していうと、潜伏期間が比較的短いため、 $R_0$  は 2.5 と比較的低いにもかかわらず、感染が急拡大することがわかる。インフルエンザによって学校が学級閉鎖などに追い込まれるのは、潜伏期間が短いため急に発症者が増加し、その結果感染者数が短期間に急増するからだと考えられる。高齢者が発症すると致死率の高い感染症であることから、院内感染にも気を付けたいウイルスだと考えられる。



COVID-19 は他の感染症と比較して発症期間が長い。そのため、 $R_0$ は比較的低いにもかかわらず感染者人口は長期にわたって高い値を示すことがわかる。これが医療機関のリソースを圧迫し、2021年8月のような感染爆発が起こった場合には、医療崩壊が起きてしまうのだと考えられる。

このように各数値が意味している部分を理解すると、感染症の特徴について論じることが可能となる。

## 2. $SE_uE_iIR$ モデル

$SE_uE_iIR$  モデルと SEIR モデルの感染性人口の推移を比較したグラフを図 14 に、隔離人口の推移を比較したグラフを図 15 に示す。図 14,15 の通り、 $SE_uE_iIR$  モデルでは、感染者人口の増加のピークが早くなり、かつ感染者人口のピークが大きくなる。このデータでは  $\varepsilon=4.6$ ,  $\delta=0.8$  で計算を行っている。

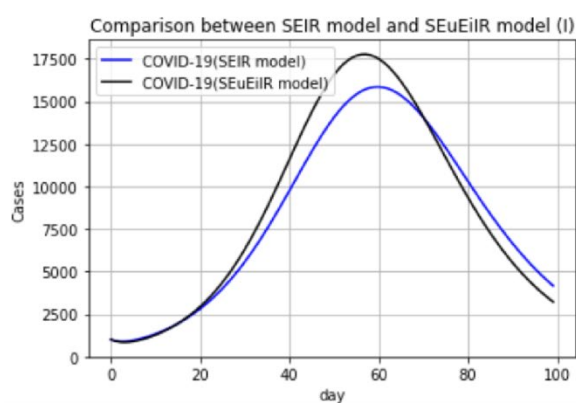


図 14 SEIR モデルと  $SE_uE_iIR$  モデル

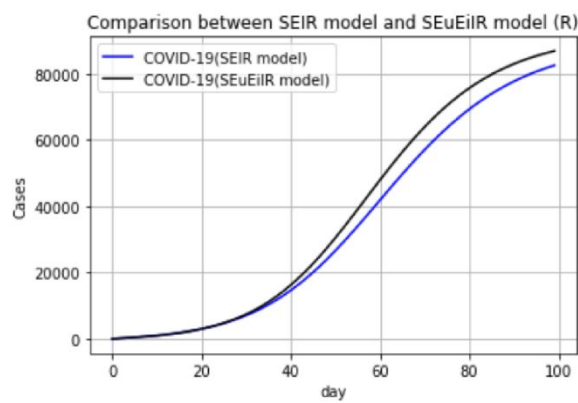


図 15 SEIR モデルと  $SE_uE_iIR$  モデル

このモデルでは、感染者人口 (I 状態) のみを隔離した場合のシミュレーションを行うこともできる。感染者人口 (I 状態) のみ、発症後すぐに 60%、および 75% 隔離した場合のシミュレーションを行ったグラフを図 16、図 17 に示す。

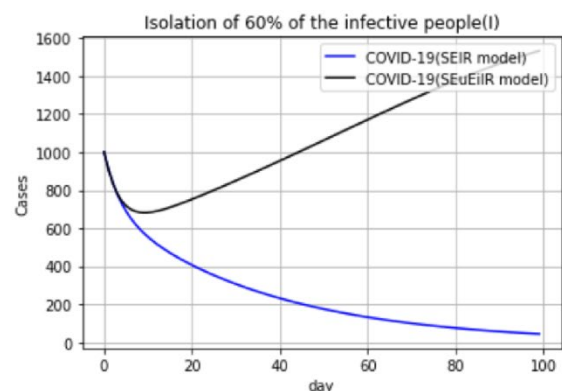


図 16 I 状態の人を 60% 隔離し S 状態の人に移さない場合

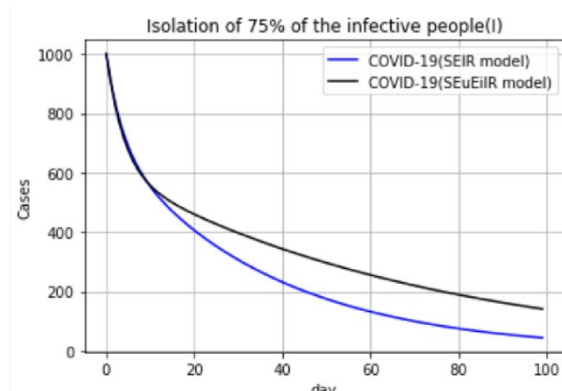


図 17 I 状態の人を 75% 隔離し S 状態の人に移さない場合

図 16 では SEIR モデルでは感染者が減少しているものの、 $SE_uE_iIR$  モデルでは感染者人口は増加している。また図 17 では感染者が両方のモデルで減少しているものの、 $SE_uE_iIR$  モデルでは減少率が低い。潜伏期間中に感染性を示すことが感染対策を講じても COVID-19 の感染者が急激に低下せず、高止まり等を示す一つの要因だと考えることができる。つまり、感染性人口 (I 状態) の

みならず潜伏-感染性人口( $E_i$ 状態)との接触機会を減少させる対策が感染症の拡大防止のためには必要となることが明らかとなった。これを目的とした対策が、緊急事態宣言などによる人流制限であると考えられる。このように新しいモデルを設定することで、コンピューターシミュレーションから様々な情報が得られることがわかる。

## 結論

コンピューターシミュレーションは現実には起こりえない現象や試行回数が多すぎて確認が難しいことに対し、有効な方法である。コンピューターシミュレーションに感染症数理モデルを用いると、感染症の拡大において漠然と理解されているものを視覚的に、定量的に理解できるようになる。

具体的には、 $R_0, R_t$ が大きくなると感染拡大が早く起こり、なおかつ最終的な感染者数(隔離人口)が増加することがわかった。潜伏期間が長く(つまり $\varepsilon$ が小さく)なると、感染拡大のピークは遅くなり、感染者人口は、ブロードで小さいピークを示すようになる。また、発症期間が長く(つまり $\gamma$ が小さく)なると、感染拡大のピークは遅くなり、感染者人口はブロードで大きなピークを示すことがわかった。COVID-19は潜伏期間がインフルエンザよりも長く、発症期間が長いため、長期にわたって医療機関に大きな影響を与えることが確認できた。これらが具体的にわかると、様々な感染症において、 $R_0$ や $\gamma$ 、 $\varepsilon$ が明らかになれば感染拡大のイメージをつかむことができる。

シミュレーションは現実には起きている事象の何を確かめたいかによってモデルを変えるべきであり、今回は感染症発症前に感染能を有することがどのように感染者数に影響を与えるのかについて調査した。この結果、潜伏期間に感染能を有することによって、発症者の隔離が十分に行われないうち、感染者人口が増加しない場合があることが明らかとなった。つまり、感染性人口( $I$ 状態)のみならず潜伏-感染性人口( $E_i$ 状態)との接触機会を減少させる対策が感染症の拡大防止のためには必要となることが明らかとなった。人流制限はこれを目的とした政策だと考えることができる。

## 参考文献

- ・鈴木絢子、西浦博、「感染症の数理モデルと対策」、日本内科学会雑誌、2020年、109巻11号、2276-2280
- ・駒瀬勝啓、麻疹排除計画における検査診断の重要性について  
([http://idsc.nih.gov.jp/training/22kanri/22pdf/sep16\\_01.pdf](http://idsc.nih.gov.jp/training/22kanri/22pdf/sep16_01.pdf))
- ・厚生労働省、「新型インフルエンザ」  
(<https://www.mhlw.go.jp/kinkyu/kenkou/influenza/dl/infu090828-01.pdf>)
- ・WHO、「Coronavirus disease (COVID-19)」、(<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19>)
- ・NHK、インドで確認の変異ウイルス「デルタ株」感染力は1.95倍と推定。  
(<https://www.nhk.or.jp/shutoken/newsup/20210625a.html>)

## 実行コード

```
# 必要モジュールのインポート
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.integrate import odeint

# 初期条件
S_int = 99000
E_int = 0
I_int = 1000
R_int = 0
R0 = 2.5
x0 = 0
Rt = R0 * (1 - x0)
g = 0.1
e = 1/5
b = Rt*g/S_int

# SEIR model の微分方程式の関数の定義
def f_diff(var,t,b,g,e):
    S = var[0]
    E = var[1]
    I = var[2]
    R = var[3]
    dSdt = -b*S*I
    dEdt = b*S*I-e*E
    dIdt = e*E-g*I
    dRdt = g*I
    return[dSdt,dEdt,dIdt,dRdt]

# SEIR model でのグラフ化の関数定義
def plot(t,S,E,I,R,title):
    fig = plt.figure()
    ax = fig.add_subplot(111)

    ax.plot(t,S,color = "b",label = "S (Susceptive)")
    ax.plot(t,E,color = "m",label = "E (Exposed)")
    ax.plot(t,I,color = "g",label = "I (Infective)")
    ax.plot(t,R,color = "r",label = "R (Removed)")
    ax.set_ylabel("Cases")
    ax.set_xlabel("day")
    ax.set_title(title)
```

```

ax.grid()
ax.legend(loc=5)

# 微分方程式を解く準備
var_ini = [S_int,E_int,I_int,R_int]
dt = 1
day = 250
t = np.arange(0.0,day,dt)

# odeint メソッドで微分方程式を解く
result = odeint(f_diff,var_ini,t,args=(b,g,e))

# 結果を出力
S = result[:,0]
E = result[:,1]
I = result[:,2]
R = result[:,3]

# plot 関数でデータを可視化
plot(t,S,E,I,R,"SEIR model(reference)")

# R0 変化(2.5 -> 1.5)
R0 = 1.5
x0 = 0.0
Rt = R0 * (1 - x0)
g = 0.1
b_R01 = Rt*g/S_int

result_R01 = odeint(f_diff,var_ini,t,args=(b_R01,g,e))
S_R01 = result_R01[:,0]
E_R01 = result_R01[:,1]
I_R01 = result_R01[:,2]
R_R01 = result_R01[:,3]
plot(t,S_R01,E_R01,I_R01,R_R01,"R0=1.5")

# R0 変化(2.5 -> 3.5)
R0 = 3.5
x0 = 0.0
Rt = R0 * (1 - x0)
g = 0.1
b_R02 = Rt*g/S_int

```

```

result_R02 = odeint(f_diff,var_ini,t,args=(b_R02,g,e))
S_R02 = result_R02[:,0]
E_R02 = result_R02[:,1]
I_R02 = result_R02[:,2]
R_R02 = result_R02[:,3]
plot(t,S_R02,E_R02,I_R02,R_R02,"R0=3.5")

```

```
#  $\varepsilon$  の変化(epsilon = 1/2)
```

```

R0 = 2.5
x0 = 0
Rt = R0 * (1 - x0)
g = 0.1
b = Rt*g/S_int
e1 = 1/2 # 潜伏期間 2 日間

```

```

result_e1 = odeint(f_diff,var_ini,t,args=(b,g,e1))
S_e1 = result_e1[:,0]
E_e1 = result_e1[:,1]
I_e1 = result_e1[:,2]
R_e1 = result_e1[:,3]
plot(t,S_e1,E_e1,I_e1,R_e1,"epsilon = 1/2")

```

```
#  $\varepsilon$  の変化(epsilon = 1/10)
```

```

e2 = 1/10 # 潜伏期間 10 日間
result_e2 = odeint(f_diff,var_ini,t,args=(b,g,e2))
S_e2 = result_e2[:,0]
E_e2 = result_e2[:,1]
I_e2 = result_e2[:,2]
R_e2 = result_e2[:,3]
plot(t,S_e2,E_e2,I_e2,R_e2,"epsilon = 1/10")

```

```
#  $\gamma$  の変化(gamma = 1/5)
```

```

R0 = 2.5
g1 = 1/5 # 発症期間 5 日間
x0 = 0
Rt = R0 * (1 - x0)
b = Rt*g1/S_int

```

```

result_g1 = odeint(f_diff,var_ini,t,args=(b,g1,e))
S_g1 = result_g1[:,0]
E_g1 = result_g1[:,1]

```

```

I_g1 = result_g1[:,2]
R_g1 = result_g1[:,3]
plot(t,S_g1,E_g1,I_g1,R_g1,"gamma = 1/5")

#  $\gamma$  の変化(gamma = 1/20)
R0 = 2.5
g2 = 1/20 # 発症期間 20 日間
x0 = 0
Rt = R0 * (1 - x0)
b = Rt*g2/S_int

result_g2 = odeint(f_diff,var_ini,t,args=(b,g2,e))
S_g2 = result_g2[:,0]
E_g2 = result_g2[:,1]
I_g2 = result_g2[:,2]
R_g2 = result_g2[:,3]
plot(t,S_g2,E_g2,I_g2,R_g2,"gamma = 1/20")

# Rt 変化 (x = 0.3)
R0 = 2.5
x0 = 0.3
Rt = R0 * (1 - x0)
g = 0.1
b_Rt01 = Rt*g/S_int

result_Rt01 = odeint(f_diff,var_ini,t,args=(b_Rt01,g,e))
S_Rt01 = result_Rt01[:,0]
E_Rt01 = result_Rt01[:,1]
I_Rt01 = result_Rt01[:,2]
R_Rt01 = result_Rt01[:,3]
plot(t,S_Rt01,E_Rt01,I_Rt01,R_Rt01,"Vaccination coverage = 0.3")

# Rt 変化(x = 0.6)
R0 = 2.5
x0 = 0.6
Rt = R0 * (1 - x0)
g = 0.1
b_Rt02 = Rt*g/S_int

result_Rt02 = odeint(f_diff,var_ini,t,args=(b_Rt02,g,e))
S_Rt02 = result_Rt02[:,0]
E_Rt02 = result_Rt02[:,1]

```

```

I_Rt02 = result_Rt02[:,2]
R_Rt02 = result_Rt02[:,3]
plot(t,S_Rt02,E_Rt02,I_Rt02,R_Rt02,"Vaccination coverage = 0.6")

```

# 各変数を比較するために、I と R だけ出力する関数を設定。

```

def IR_compare(I_ref,I1,I2,R_ref,R1,R2,IR_ref_name,IR1_name,IR2_name,title1,title2):

```

```

    fig1 = plt.figure(figsize = (14,4))
    ax1 = fig1.add_subplot(121)
    ax1.plot(t,I_ref,color = "b",label = IR_ref_name)
    ax1.plot(t,I1,color = "g",label = IR1_name)
    ax1.plot(t,I2,color = "r",label = IR2_name)
    ax1.set_xlabel("day")
    ax1.set_ylabel("Cases")
    ax1.legend(loc = 1)
    ax1.set_title(title1)
    ax1.set_xlim(0,250)
    ax1.set_ylim(0,25000)
    ax1.grid()

```

```

    ax2 = fig1.add_subplot(122)
    ax2.plot(t,R_ref,color = "b", label = IR_ref_name)
    ax2.plot(t,R1,color = "g", label = IR1_name)
    ax2.plot(t,R2,color = "r", label = IR2_name)
    ax2.set_xlabel("day")
    ax2.set_ylabel("Cases")
    ax2.legend(loc = 4)
    ax2.set_title(title2)
    ax2.set_xlim(0,250)
    ax2.set_ylim(0,100100)
    ax2.grid()

```

# 潜伏期間( $\varepsilon$ )についての比較データを出力

```

IR_compare(I_e1,I,I_e2,R_e1,R,R_e2,"e = 1/2","e = 1/5(reference)","e = 1/10","effect of epcilon (I)","effect of epcilon (R)")

```

# 発症期間( $\gamma$ )についての比較データを出力

```

IR_compare(I_g1,I,I_g2,R_g1,R,R_g2,"g = 1/5","g = 1/10(reference)","g = 1/20","effect of gamma(I)","effect of gamma (R)")

```

# 基本再生産数(R0)についての比較データを出力

```
IR_compare(I,R01,I,I,R02,R,R01,R,R,R02,"R0 = 1.5","R0 = 2.5(reference)","R0 = 3.5","effect of R0(I)","effect of R0(R)")
```

```
# ワクチン接種率(x)についての比較データを出力
```

```
IR_compare(I,I,Rt01,I,Rt02,R,R,Rt01,R,Rt02,"Vaccination coverage = 0.0(reference)","Vaccination coverage = 0.3","Vaccination coverage = 0.6","effect of x (I)","effect of x (R)")
```

```
# ここからすこしテーマを変えていきます。
```

```
# 感染症の種類別にデータを出力
```

```
# 結果を見やすくするために 横軸を t = 100 に変更
```

```
# コロナウイルス
```

```
COV_R0 = 2.5 # 基本再生産数
```

```
COV_gamma = 1/10 # 回復まで 10 日
```

```
COV_epsilon = 1/5 # 潜伏期間 5 日
```

```
COV_b = COV_R0*COV_gamma/S_int
```

```
# 麻疹(Measles)
```

```
Mea_R0 = 12
```

```
Mea_gamma = 1/5
```

```
Mea_epsilon = 1/10
```

```
Mea_b = Mea_R0*Mea_gamma/S_int
```

```
# (インフルエンザ)
```

```
Inf_R0 = 2.5
```

```
Inf_gamma = 1/5
```

```
Inf_epsilon = 1/2
```

```
Inf_b = Inf_R0*Inf_gamma/S_int
```

```
# 天然痘(smallpox)
```

```
Sml_R0 = 6
```

```
Sml_gamma = 1/7
```

```
Sml_epsilon = 1/12
```

```
Sml_b = Sml_R0*Sml_gamma/S_int
```

```
var_ini = [S_int,E_int,I_int,R_int]
```

```
dt = 1
```

```
day_100 = 100
```

```
t100 = np.arange(0.0,day_100,dt)
```

```
COV_result = odeint(f_diff,var_ini,t100,args=(COV_b,COV_gamma,COV_epsilon))
```

```
Mea_result = odeint(f_diff,var_ini,t100,args=(Mea_b,Mea_gamma,Mea_epsilon))
```



```

Inf_result = odeint(f_diff,var_ini,t100,args=(Inf_b,Inf_gamma,Inf_epsilon))
Sml_result = odeint(f_diff,var_ini,t100,args=(Sml_b,Sml_gamma,Sml_epsilon))

COV_S = COV_result[:,0]
COV_E = COV_result[:,1]
COV_I = COV_result[:,2]
COV_R = COV_result[:,3]

Mea_S = Mea_result[:,0]
Mea_E = Mea_result[:,1]
Mea_I = Mea_result[:,2]
Mea_R = Mea_result[:,3]

Inf_S = Inf_result[:,0]
Inf_E = Inf_result[:,1]
Inf_I = Inf_result[:,2]
Inf_R = Inf_result[:,3]

Sml_S = Sml_result[:,0]
Sml_E = Sml_result[:,1]
Sml_I = Sml_result[:,2]
Sml_R = Sml_result[:,3]

fig = plt.figure(figsize=(6,4))
ax = fig.add_subplot(111)

# 各種感染症について SEIR を適用し、その結果を出力
ax.plot(t100,Mea_I,color = "m",label = "Measles(R0 = 12)")
ax.plot(t100,Sml_I,color = "r",label = "Smallpox(R0 = 6)")
ax.plot(t100,Inf_I,color = "g",label = "Influenza(R0 = 2.5)")
ax.plot(t100,COV_I,color = "b",label = "COVID-19(R0 = 2.5)")
ax.set_ylabel("Cases")
ax.set_xlabel("day")
ax.grid()
ax.legend(loc=1)

# COVID-19 は潜伏期間中(発症前)に感染力を持つ。
# これを考慮した SEuEiIR model の関数を定義し、結果を見してみる。

# 初期条件
COV_epsilon2 = 1/4.8 # 発症しておらず、感染力も持たない期間( $\epsilon$ )は 4.8 日

```

COV\_delta2 = 1/0.8 # 発症していないが、感染力を持つ期間( $\delta$ )は 0.8(5.6-4.8)日

# SEuEiIR model の関数を定義

```
def f_COVmodel(var,t,b,d,g,e):  
    S = var[0]  
    Eu = var[1]  
    Ei = var[2]  
    I = var[3]  
    R = var[4]  
    dSdt = -b*S*(I+Ei)  
    dEudt = b*S*(I+Ei)-e*Eu  
    dEidt = e*Eu-d*Ei  
    dIdt = d*Ei-g*I  
    dRdt = g*I  
    return[dSdt,dEudt,dEidt,dIdt,dRdt]
```

# SEuEiIR model の出力用関数を定義

```
def plot2(t,S,Eu,Ei,I,R,title):  
    fig = plt.figure()  
    ax = fig.add_subplot(111)  
  
    ax.plot(t,S,color = "b",label = "S (Susceptive)")  
    ax.plot(t,Eu,color = "m",label = "Eu (Exposed phase1)")  
    ax.plot(t,Ei,color = "black",label = "Ei (Exposed phase2)")  
    ax.plot(t,I,color = "g",label = "I (Infective)")  
    ax.plot(t,R,color = "r",label = "R (Removed)")  
    ax.set_ylabel("Cases")  
    ax.set_xlabel("day")  
    ax.set_title(title)  
    ax.set_ylim(0,140000)  
    ax.grid()  
    ax.legend(loc=1)
```

# SEuEiIR model 用初期条件

```
S_int = 99000  
Eu_int = 0  
Ei_int = 0  
I_int = 1000  
R_int = 0  
R0 = 2.5  
x0 = 0  
Rt = R0 * (1 - x0)
```

```

g = 0.1
e = 1/5
b = Rt*g/S_int

var_ini_SEuEiIR = [S_int,Eu_int,Ei_int,I_int,R_int]
t = np.arange(0.0,day_100,dt)

# SEuEiIR model の微分方程式を解く
result2 =
odeint(f_COVmodel,var_ini_SEuEiIR,t,args=(COV_b,COV_delta2,COV_gamma,COV_epsilon2))

COV_S2 = result2[:,0]
COV_Eu2 = result2[:,1]
COV_Ei2 = result2[:,2]
COV_I2 = result2[:,3]
COV_R2 = result2[:,4]

# 結果を見える化
plot2(t,COV_S2,COV_Eu2,COV_Ei2,COV_I2,COV_R2,"SEuEiIR model(  $\varepsilon=4, \delta=1$ )")

# SEIR model と SEuEiIR model での比較
fig = plt.figure(figsize=(6,4))
ax = fig.add_subplot(111)

# Infective people について
ax.plot(t,COV_I,color = "b",label = "COVID-19(SEIR model)")
ax.plot(t,COV_I2,color = "black",label = "COVID-19(SEuEiIR model)")
ax.set_ylabel("Cases")
ax.set_xlabel("day")
ax.set_title("Comparison between SEIR model and SEuEiIR model (I)")
ax.grid()
ax.legend(loc=2)

# Removed people について
fig = plt.figure(figsize=(6,4))
ax = fig.add_subplot(111)

ax.plot(t,COV_R,color = "b",label = "COVID-19(SEIR model)")
ax.plot(t,COV_R2,color = "black",label = "COVID-19(SEuEiIR model)")
ax.set_ylabel("Cases")
ax.set_xlabel("day")
ax.set_title("Comparison between SEIR model and SEuEiIR model (R)")

```

```
ax.grid()
ax.legend(loc=2)
```

# SEIR model において、I の人が発症後 75%隔離されると考えたモデル

```
def f_diff3(var,t,b,g,e):
    S = var[0]
    E = var[1]
    I = var[2]
    R = var[3]
    dSdt = -b*S*(I*0.25)
    dEdt = b*S*(I*0.25)-e*E
    dIdt = e*E-g*I
    dRdt = g*I
    return[dSdt,dEdt,dIdt,dRdt]
```

# SEuEiIR model において、I の人が発症後 60%隔離されると考えたモデル

```
def f_diff4(var,t,b,d,g,e):
    S = var[0]
    Eu = var[1]
    Ei = var[2]
    I = var[3]
    R = var[4]
    dSdt = -b*S*((I*0.4)+Ei)
    dEudt = b*S*((I*0.4)+Ei)-e*Eu
    dEidt = e*Eu-d*Ei
    dIdt = d*Ei-g*I
    dRdt = g*I
    return[dSdt,dEudt,dEidt,dIdt,dRdt]
```

# SEuEiIR model において、I の人が発症後 75%隔離されると考えたモデル

```
def f_diff5(var,t,b,d,g,e):
    S = var[0]
    Eu = var[1]
    Ei = var[2]
    I = var[3]
    R = var[4]
    dSdt = -b*S*((I*0.25)+Ei)
    dEudt = b*S*((I*0.25)+Ei)-e*Eu
    dEidt = e*Eu-d*Ei
    dIdt = d*Ei-g*I
    dRdt = g*I
```

```

return[dSdt,dEudt,dEidt,dIdt,dRdt]

# 隔離モデルを解いてみる。
COV_result = odeint(f_diff3,var_ini,t,args=(COV_b, COV_gamma,COV_epsilon))
COV_result2 = odeint(f_diff4,var_ini_SEuEiIR,t,args=(COV_b,COV_delta2,
COV_gamma,COV_epsilon2))
COV_result3 = odeint(f_diff5,var_ini_SEuEiIR,t,args=(COV_b,COV_delta2,
COV_gamma,COV_epsilon2))

COV_S_iso = COV_result[:,0]
COV_E_iso = COV_result[:,1]
COV_I_iso = COV_result[:,2]
COV_R_iso = COV_result[:,3]

COV_S2_iso = COV_result2[:,0]
COV_Eu2_iso = COV_result2[:,1]
COV_Ei2_iso = COV_result2[:,2]
COV_I2_iso = COV_result2[:,3]
COV_R2_iso = COV_result2[:,4]

COV_S3_iso = COV_result3[:,0]
COV_Eu3_iso = COV_result3[:,1]
COV_Ei3_iso = COV_result3[:,2]
COV_I3_iso = COV_result3[:,3]
COV_R3_iso = COV_result3[:,4]

# 可視化する。
# 隔離モデルでの感染者数(I)を比較してみる。
# 60%
fig = plt.figure(figsize=(6,4))
ax = fig.add_subplot(111)

ax.plot(t,COV_I_iso,color = "b",label = "COVID-19(SEIR model)")
ax.plot(t,COV_I2_iso,color = "black",label = "COVID-19(SEuEiIR model)")
ax.set_ylabel("Cases")
ax.set_xlabel("day")
ax.set_title("Isolation of 60% of the infective people(I)")
ax.grid()
ax.legend(loc=1)

# 75%
fig = plt.figure(figsize=(6,4))

```

```
ax = fig.add_subplot(111)
ax.plot(t,COV_I_iso,color = "b",label = "COVID-19(SEIR model)")
ax.plot(t,COV_I3_iso,color = "black",label = "COVID-19(SEuEiIR model)")
ax.set_ylabel("Cases")
ax.set_xlabel("day")
ax.set_title("Isolation of 75% of the infective people(I)")
ax.grid()
ax.legend(loc=1)
```

近年の人工乳の進歩

看護学科2年 学籍番号 252005

伊藤 亜友加

1. はじめに

現在、世界的に母乳育児が推奨されており、日本では母乳を用いる母親の割合が増加している。(図1参照)しかし、母乳を用いる母親の割合が増えるということは、人工乳だけを用いて育児をする人の割合が少なくなるということである。母乳が出ない等の理由で人工乳育児を行うことになった母親や家族が、周りとは違うことに不安になるのではないかと考え、なぜ母乳が推奨されているのか、人工乳では何が足りないのか気になる、本研究を行うことにした。

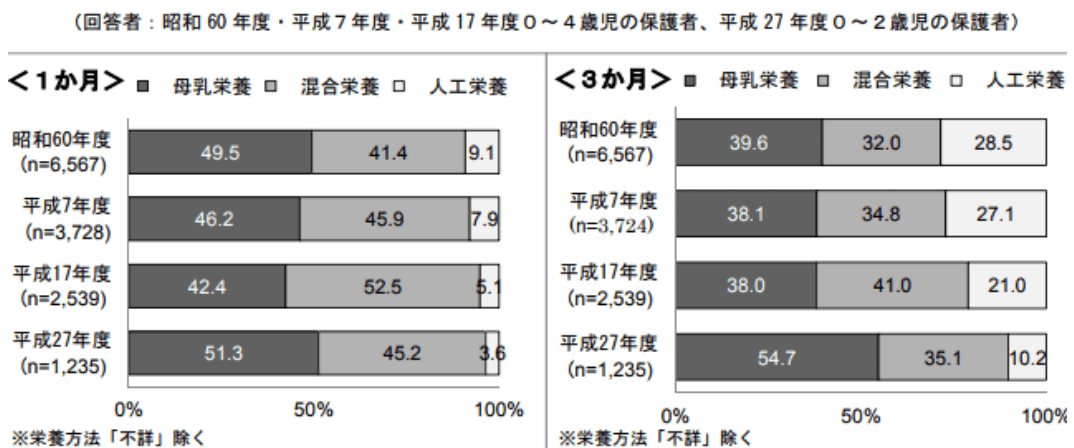


図1 授乳期の栄養方法(1ヵ月、3か月)の推移<sup>1)</sup>。 ※混合栄養：母乳と人工乳両方を用いること。

2. 母乳と人工乳

人工乳は母乳を代替する乳のことをいうが、母乳育児と人工乳育児で全く同じメリット、デメリットがあるというわけではない。そのため、それぞれにどのような違いがあるのか、栄養・成分面と、子育て、児の成長面で比較して調べた。

3. 栄養・成分の比較<sup>2)</sup>

母乳のうち産後10日まで出る初乳は、天然のワクチンや黄金の液体と呼ばれることがあり、抗体や白血球、ミネラルやビタミンが豊富に含まれている。また、母乳には免疫物質が非常に豊富に含まれているというメリットがあり、肺炎のような感染症を予防する働きを持つ。アメリカでは、母乳を飲んだ児は、飲まなかった児に比べて20%死亡率が低かったという報告もある。しかし、母乳だけでは必要な量のビタミンD、ビタミンK、鉄を摂ることができない。また、母乳育児では母乳を介して児にムンプスウイルスやHIVを感染させてしまうというデメリットがある。

母乳の成分は母親の食事や体調に左右されるが、人工乳育児では毎回栄養のあるミルクを与えることが出来る。しかし、母乳に多く含まれている免疫物質は人工乳には含まれていないというデメリットがある。

表1 母乳(100 ml)と明治、雪印の人工乳(100 ml)あたりの成分表<sup>3)</sup>

	母乳	明治ほほえみ	雪印びゅあ
カロリー	65.0 kcal	68.3 kcal	66.9 kcal
タンパク質	1.1 g	1.5 g	1.5 g
脂質	3.5 g	3.5 g	3.6 g
炭水化物	7.2 g	7.7 g	7.1 g
ビタミンD	0.3 $\mu$ g	0.8 $\mu$ g	1.1 $\mu$ g
ビタミンK	1.0 $\mu$ g	3.3 $\mu$ g	2.7 $\mu$ g
鉄	0.03 mg	0.80 mg	0.80 mg

表1より、カロリーや三大栄養素であるタンパク質、脂質、炭水化物は母乳と人工乳ではほとんど差がないことが分かる。しかし、上記で述べた通りビタミンDやビタミンK、鉄は人工乳に比べて母乳に含まれる量が非常に少ない。今回は、母乳のデメリットであるビタミンKが少ないという点に着目した。体重4kgの児の場合には、母乳だけでは1日に必要なビタミンKの量の半分しか摂ることができていない。ビタミンKは血液凝固因子を作り出血を止める働きがあるため、不足すると主に消化管から出血をきたす新生児メレナという病気になってしまう。ではどうすれば予防できるのだろうか。その方法として3つあげられる。1つ目は、人工乳との併用である。表1である通り人工乳には多くのビタミンKが含まれているため、母乳と人工乳両方を用いることで、母乳由来の免疫を得ながらビタミンKも得ることが出来る。2つ目は、出生時、出生1週間、1か月のときに児にビタミンKシロップというビタミンK欠乏性出血症の予防をするための薬剤を飲ませることである。3つ目は、母親が積極的に納豆のようなビタミンKが多く含まれている食品を摂ることである。母親が多くのビタミンKを摂ることで、母乳中に含まれるビタミンKを多くすることが出来る。このような方法により、ビタミンKが少ないという母乳のデメリットは改善することが出来る。<sup>4)</sup>



#### 4. 子育てのしやすさ、児の成長の比較<sup>5)</sup>

通常母乳を飲むときは、哺乳瓶を飲む時より児の口は1.3倍大きく開き、口周囲の筋肉や下顎が大きく動くことになる。そのため、母乳育児は児の顎の発達に効果的である。その他にも、母乳を飲ませるときは母親と児の身体が密着するため必然的にスキンシップをとることが出来る、人工乳育児と比べて母親の産後の回復が早い、といったメリットがある。デメリットとしては、母乳を上げる際に母親の乳首が傷ついてしまうこと、外出時は授乳室に行かないと授乳することができないなどが挙げられる。

それに対し、人工乳はいつでもどこでも誰でも授乳できるというメリットがある。また、哺乳瓶を用いるため、児がどれだけの量のミルクを飲んだのか把握することができる。しかし、母乳育児と同様の口周りの筋肉や骨格の発達が見込まれないため、不正咬合のリスクが高くなってしまう。さらに、粉ミルクを溶かす際にはお湯を使うが、災害などで断水が起こるとミルクが作れなくなるということも考えられる。

では、これらの人工乳育児のデメリットはどのように改善されているのだろうか。まず、不正咬合のリスクを低減させるためには、様々な哺乳瓶が開発されている。図1は雪印ビーンスターク株式会社が開発したビーンスタークニプルの構造を示している。ビーンスタークニプルは顎周りの筋肉や骨格を発達させるために、大きく口をあけて乳首の部分のを啜られるような構造になっている。また、乳首の先端をクロスカットすることで、児の口の動きに合わせてミルクが出るようになっている。



図2 ビーンスタークニプルの構造<sup>6)</sup>

上記のビーンスターク咬合型乳首を使用したときの口周りの筋肉は実際にどのように動いているのだろうか。図3は、授乳時の児の咬筋活動の様子をグラフ化したものである。Bは母乳を吸うときの咬筋活動の様子を表しており、Cは従来の哺乳瓶を用いて授乳したときの児の咬筋活動の様子を表している。見ての通り、従来の哺乳瓶では母乳を飲むときのような咬筋活動が行われていないことが分かる。つまり、従来の哺乳瓶では、母乳育児と同様の口周りの筋肉や骨格の発達ができないため、不正咬合のリスクが高くなっていったのだ。図のAは図2のビーンスターク咬合型乳首を使用した哺乳瓶を用いたときの咬筋活動の様子を表している。従来の哺乳瓶に比べて咬筋活動が活発になっており、母乳を吸うときの口の動きとほとんど差がないことが分かる。このように哺乳瓶の乳首の構造が工夫されることで、人工乳育児における、不正咬合のリスクが高くなるといったデメリットは改善されつつある。

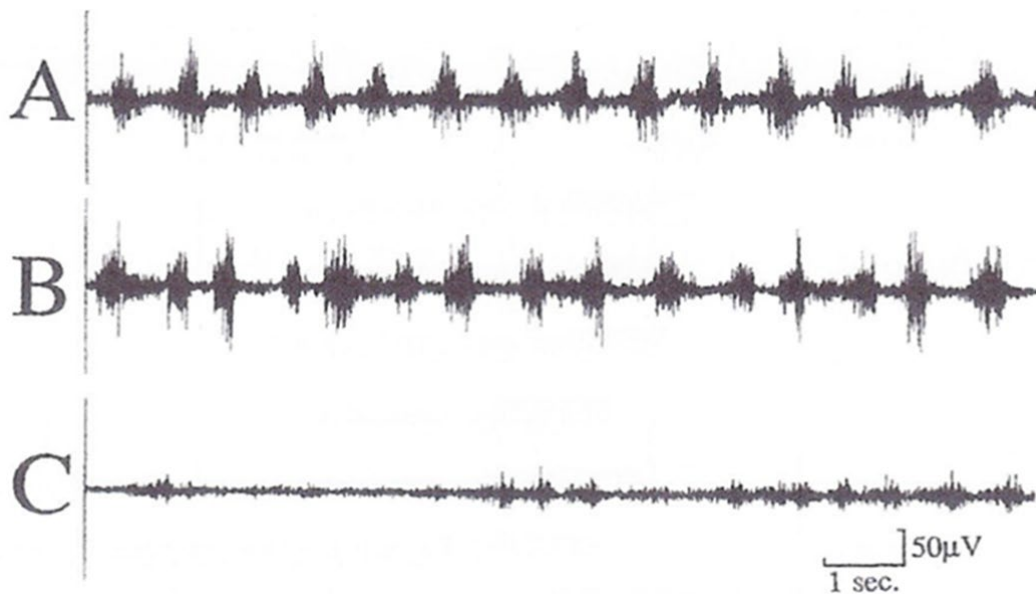


図3 哺乳時の咬筋活動の違い<sup>7)</sup>. A ビーンスターク咬合型乳首使用, B 母乳哺乳, C 従来型の人工乳首使用

では、災害などで断水が起こると粉ミルクを溶かすことが出来なくなるというデメリットはどのように改善されているのだろうか。海外には入れ物から出してそのまま児に与えることが出来る液体ミルクが普及している国がある。しかし、日本では粉ミルクが一般的なため食品安全法に基づく安全基準が設けられておらず、個人輸入以外では手に入れることができなかった。そのため、2011年の東日本大震災では断水により粉ミルクを溶かすための安全な水を求めて苦労した家庭が多くあった。2016年の熊本地震ではフィンランドから支援物資として液体ミルクが届き、多くの母子を救うこととなった。その後液体ミルクに注目が集まり、なぜ日本にはないのかと批判が高まった。

そして、法律が改正され、2019年に日本初の液体ミルクが販売された。<sup>8)</sup>

粉ミルクはお湯で溶かす必要があるため、準備に手間がかかり、面倒くさいと感じる人も少なくはないだろう。しかし、液体ミルクは粉ミルクと異なり準備に時間がかからない。そのため母親だけでなく、父親の育児参加が活発になるのではないかと考える。少しではあるがミルクの準備の時間が少なくなることで、家事と育児の両立で時間に迫られている人の負担も減らすことができるだろう。

しかし、液体ミルクは粉ミルクに比べ2倍ほどコストがかかってしまうというデメリットがある。8割弱の人は液体ミルクについてよく知らず(図4参照)、使用したいと考える人は4割しかいない。(図5参照)熱をかけずにそのまま飲ませることに不安を感じる人が多いようだ。普及率が向上し、液体ミルクの需要が高まることでコストは低減すると考えられるため、液体ミルクとその安全性について広めていくべきである。

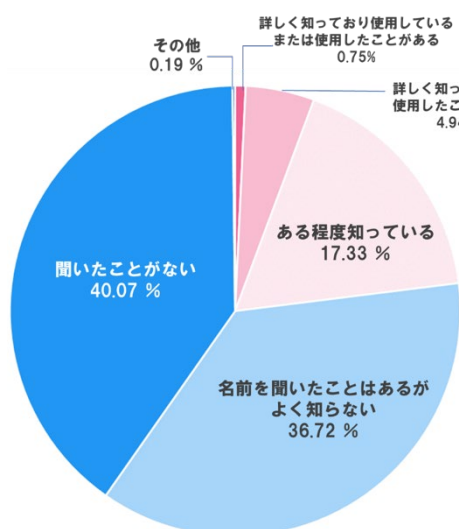


図4 液体ミルクの認知度<sup>9)</sup>

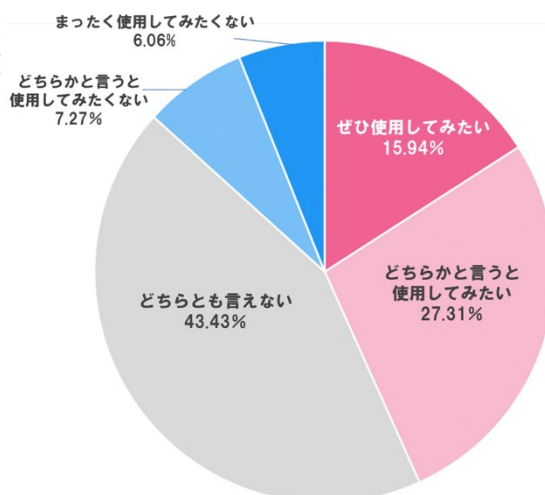


図5 液体ミルクの使用意向<sup>9)</sup>

## 5. まとめ

今回の研究を通して、母乳、人工乳それぞれのメリット、デメリットを知ることが出来た。母乳は、免疫物質が多く含まれており、児の成長に効果的であるというメリットがあるが、完全母乳育児に捉われないことも大切である。母乳だけでは足りない栄養を補ったり、外出時の負担を減らしたりするために人工乳を用いた混合育児も選択肢の一つである。また、母乳を用いることができないため人工乳だけで育児を行う人は、周りとは違うことに大きな不安を抱える必要はないと考える。もちろん母乳育児でしか得られないメリットはあるが、最近では哺乳瓶が工夫されたり液体ミルクが販売されたりと、人工乳育児のデメリットがカバーされつつある。しかし、免疫面でのカバーができないことは課題として残るため、今後人工乳育児でも免疫が得られるような技術

が開発されていけば良いなど考える。

## 6. 参考文献

- 1) <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11900000-Koyoukintoujidoukateikyoku/0000134460.pdf>
- 2) 水野克己/母乳 育児 感染-赤ちゃんとお母さんのために-/南山堂/2012年7月発行
- 3) <https://food-drink.pintoru.com/formula/>
- 4) <https://192abc.com/39864>
- 5) <https://mamanoko.jp/articles/28674>  
<https://mamanoko.jp/articles/29433>
- 6) [https://www.beanstalksnow.co.jp/babymom/nipple\\_w/](https://www.beanstalksnow.co.jp/babymom/nipple_w/)
- 7) <https://www.masuta-dental.com/baby/03-2/>
- 8) <https://chocoa.me/blog/liquid>
- 9) <http://www.cozre.co.jp/blog/2170/>

令和3年度 基礎科学研究〈化学〉

神経管閉鎖障害のリスク低減のための葉酸摂取について

看護学科2年 学籍番号252045

日比野 愛来

1. 妊婦の葉酸摂取について

妊娠した人や、妊娠しようとしている人に対して、葉酸を摂ると良いとよく聞く。妊婦の葉酸不足が胎児の神経管閉鎖障害発症のリスクに関係することは知られているし、厚生労働省も積極的に葉酸を摂取することを推奨している。この授業では葉酸と神経管閉鎖障害がどのように関係しているのかを調べた。

2. 神経管閉鎖障害とは

神経管閉鎖障害は子宮内の赤ちゃんの脳や脊髄のもととなる神経管に障害が起こる先天異常である。神経管は板状のものの両端がくっついて閉鎖し、管状の形ができて、赤ちゃんの成長とともに頭の方は脳、お尻の方は脊髄になる。その一部がうまく閉じないために起こる病気である。神経管閉鎖障害には2種類あり、神経管の頭側に障害が起こった場合、脳が形成不全となって無脳症となり、流産や死産の割合が高くなってしまふ。お尻側に障害が起きると二分脊椎となり、さまざまな神経障害が起こる可能性が出てしまふ。発症率は1万人に6人前後だと公表されており、胎児に起こる神経管閉鎖障害のほとんどは二分脊椎である。

3. 神経管が形成される時期

これは胎児の器官がどの時期に発達するか示した図である(図1)。この濃いピンクの時期に、特にその器官の発達が活発であることを示しており、この時期に栄養不足や薬の影響を受けると正常に発達しにくくなる。今回のテーマである神経に注目すると、とても早い時期に形成されることが分かる。

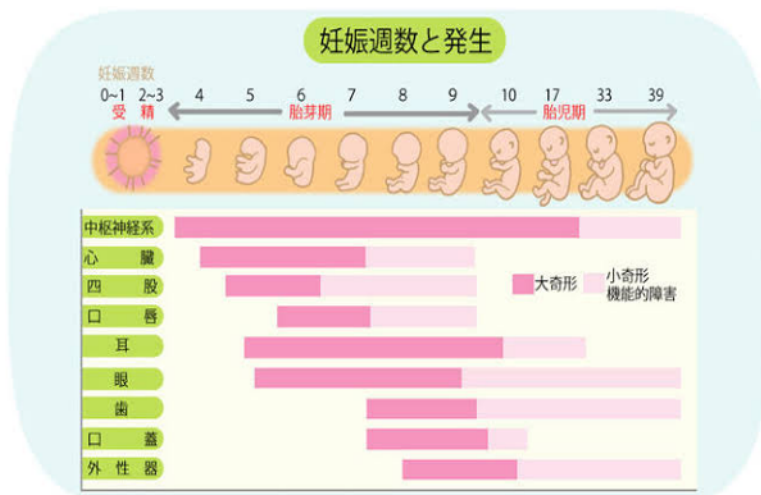


図1. 妊娠週数と発生<sup>1)</sup>

4. 葉酸とは

葉酸は、ジヒドロ葉酸レダクターゼによってプテリン環が還元されて、さまざまなタイプのテトラヒドロ葉酸THFに変換される。核酸であるプリンヌクレオチドやチミジル酸の合成に必要となる。葉酸が欠乏するとビタミンB12欠乏と同様に巨赤芽球性貧血になる。腸内細菌はパラアミノ安息香酸から葉酸を合成している。抗菌薬であるサルファ剤はパラアミノ安息香酸と構造が似ているのでサルファ剤の処置により、腸内細菌の葉酸合成が抑制されることで葉酸欠乏がおきることがある。

葉酸はビタミンB群の一種で代謝に関係し、DNA・RNAやたんぱく質の生合成を促進する栄養素である。主にホウレンソウやブロッコリー、イチゴに多く含まれている。体内の蓄積性は低く、毎日摂取することが必要である。細胞の生産や再生に大きく関わるため、特に胎児にとっては重要な成分である。妊娠前から十分に摂ることで、胎児の脳や脊髄の発達異常である神経管閉鎖障害のリスクを減らすことができるとされている。

## 5. 葉酸の代謝

食品に含まれる葉酸は調理や加工により酵素たんぱく質と遊離する。また体内でも胃酸環境下で酵素たんぱく質と遊離する。次に小腸の一部である空腸の刷子縁膜にある葉酸コンジュガーゼと呼ばれる酵素によりプテロイルモノグルタミン酸へと変換される。小腸粘膜細胞内に取り込まれたプテロイルモノグルタミン酸は還元されジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸となり、さらにメチル化されてメチルテトラヒドロ葉酸となる。還元とはここでは水素を与える反応のことである。まず二つの水素が与えられてジヒドロ葉酸となり、さらに二つの水素が与えられてテトラヒドロ葉酸となる。「ジ」や「テトラ」というのは数詞のことで、ジは2つ、テトラは4つという意味を表す。メチル化というのはプテロイルモノグルタミン酸の水素の一部がメチル基(-CH<sub>3</sub>)と入れ替わる反応のことである。葉酸はこうして受け取ったメチル基などをほかの物質に受け渡すことで様々な生理反応と関わる。メチルテトラヒドロ葉酸は葉酸輸送たんぱく質(FBP)と結合して血管内を輸送され、各細胞組織まで運ばれる。このため血漿中の葉酸は主にメチルテトラヒドロ葉酸となる。各細胞組織に取り込まれた葉酸はまずは葉酸輸送たんぱく質が遊離し、さらにメチオニン合成酵素により脱メチル化されテトラヒドロ葉酸となる。テトラヒドロ葉酸はポリグルタメート合成酵素により再びポリグルタミン酸型のテトラヒドロ葉酸となり細胞内で保持される。サプリメントに含まれる葉酸は主にプテロイルモノグルタミン酸である。サプリメントに含まれる葉酸はすでにモノグルタミン酸なので、胃酸や空腸なのでポリグルタミン酸からモノグルタミン酸への変換を経る必要がない。そのため生体内での利用効率も食品中の葉酸が平均して50%なのに対し、その率は85%と約1.7倍高いのが特徴である<sup>2,3)</sup>。このことからサプリメントを利用すると葉酸の摂取が容易であることがわかる。

## 6. 葉酸と神経管閉鎖障害の関係

葉酸は経口摂取されるとメチル化されてテトラヒドロ葉酸、5,10-メチレントラヒドロ葉酸となり、ここにMTHFRが酵素として作用し、メチルテトラヒドロ葉酸が生成されることは前に述べた。さらに、このメチルテトラヒドロ葉酸がメチル基をホモシステインへ与えて、メチオニンへの代謝を進める。このメチルテトラヒドロ葉酸の生成量が減少すると、血清ホモシステイン濃度が上昇する(図2)。この高ホモシステイン血症が神経管閉鎖障害の発症リスクを高くすることが動物実験で明らかになっている。この高ホモシステイン血症は神経管閉鎖障害ばかりでなく、動脈硬化、脳卒中、アルツハイマー型認知症などの発症リスクも高くすると報告されている。他にはビタミンB12の欠乏も高ホモシステイン血症の要因だと考えられている。しかし、ビタミンB12は葉酸と比較すると摂取しやすく、極端に偏った食生活でない限りビタミンB12が欠乏することは稀だとされている。

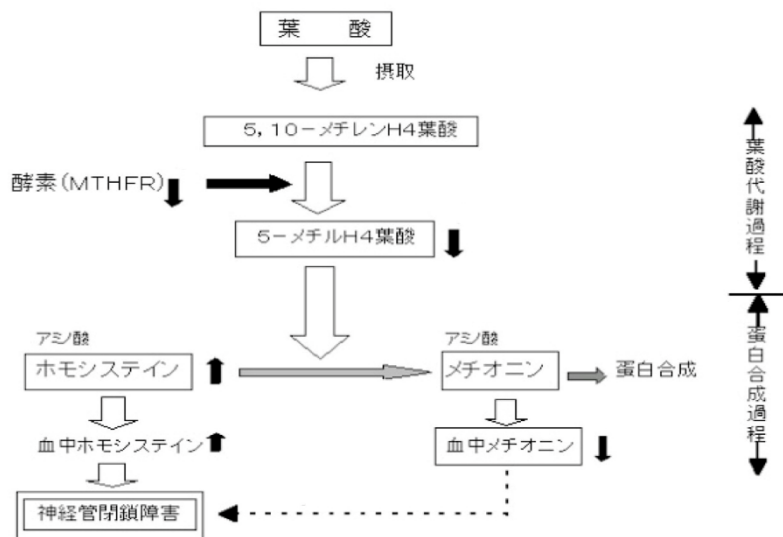


図2. 葉酸の代謝<sup>4)</sup>

### 7. リスクの低減

それでは葉酸の摂取はどれくらい神経管閉鎖障害のリスクを減らすのだろうか。葉酸を摂取することで胎児の神経管閉鎖障害の発症リスクが低減することは海外のいくつかの研究で明らかになっている。中国北部で行われた研究では、神経がもっとも発達する時期である妊娠3か月までの間に葉酸を摂取していた場合、発症のリスクはかなり低減している(図3)。葉酸摂取により神経管閉鎖障害の減少効果があると報告されているこれまでの欧米の疫学研究の多くは、比較的高い発症率であった地域におけるものである。神経管閉鎖障害のような多因子によって発症すると考えられている疾病は発症頻度が異なる場合その発症要因も異なることが予測され、また、人種差もあることから、これまで二分脊椎の発症率が比較的低い水準で保たれている日本に直接当てはめることはできないが、中国南部における介入研究での発症率の変化を参考にし、厚生労働省が日本の場合のリスク低減率を計算した結果、日本では28%低減するらしい(図4)。

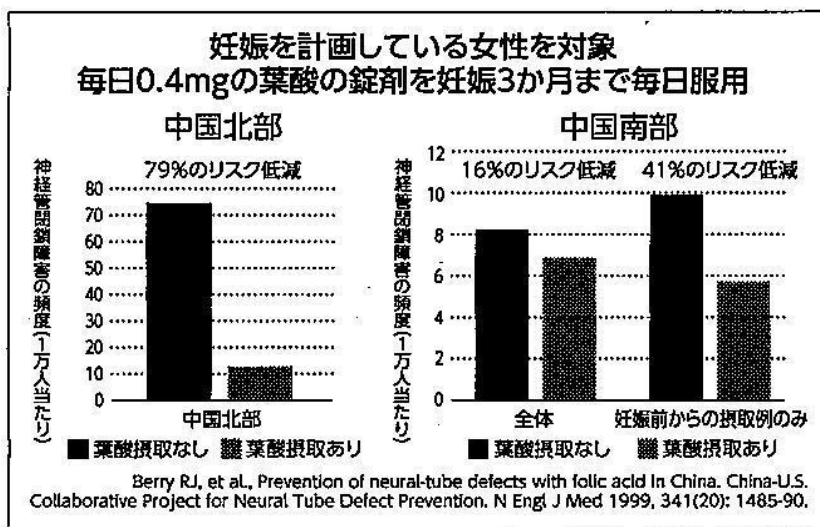


図3. 中国における葉酸のサプリメントと神経管閉鎖障害のリスクに関する介入研究<sup>5)</sup>

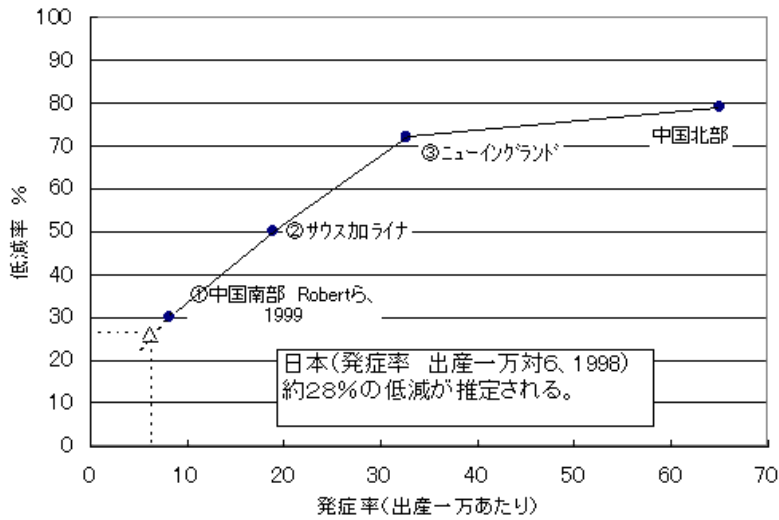


図4. 神経管閉鎖障害の発症率と発症リスクの低減率<sup>5)</sup>

#### 8. 神経管閉鎖障害の増加

葉酸の摂取が推奨されているのに関わらず、日本では神経管閉鎖障害のひとつである二分脊椎の発症が増加傾向にある(図5)。海外と比較してもアメリカやカナダが減少しているのに対して、日本では徐々に増加している(図6)。それはなぜだろうか(同じ神経管閉鎖障害でも無脳症は流産する率も高く、出生前検査の普及により無脳症とわかった胎児を中絶することも増えたため、減少している)。

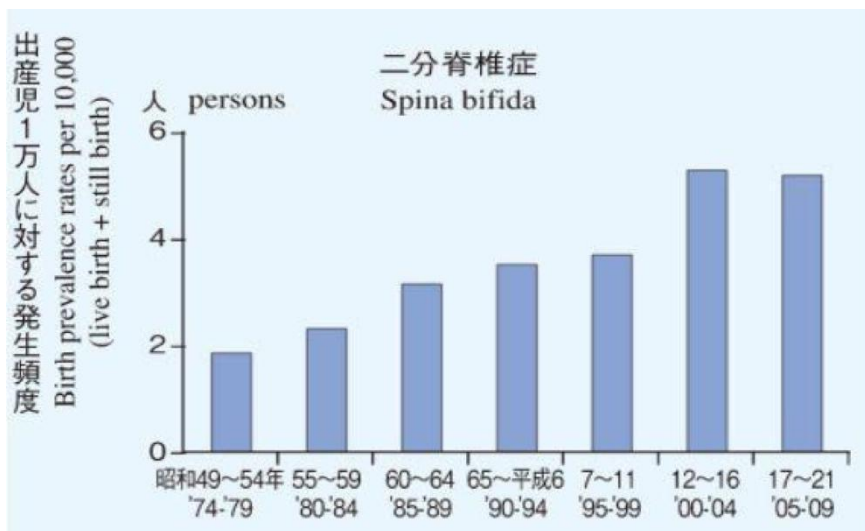


図5. 日本における二分脊椎症の発生頻度の推移<sup>6)</sup>



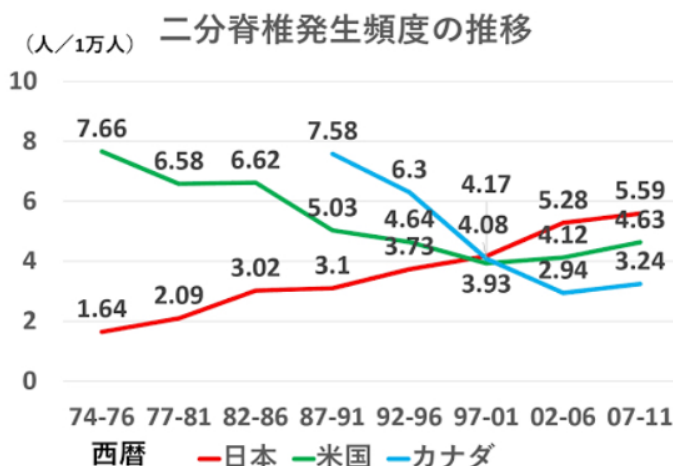


図6. 日本、米国、カナダにおける二分脊椎症の発生率推移の比較<sup>7)</sup>

## 9. 理由

理由の1つ目にメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子の塩基置換がある。MTHFR(メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) には三つの遺伝子多型があり、その一つであるホモ接合体遺伝子型(C677T)は温度に影響され、かつ酵素活性が低下している。この遺伝子多型を保有する人ではメチルテトラヒドロ葉酸の生成量が減少し、その結果、血清ホモシステイン濃度が上昇する。その結果、この遺伝子多型をもたない人より葉酸が欠乏するリスクが高まる。日本人にはこの遺伝子多型をもつ人が多く、海外と比較して二分脊椎が多い一因だと考える。しかしこの酵素の遺伝子多型がある女性でも妊娠前から葉酸サプリメントを十分に内服すれば、二分脊椎の赤ちゃんの発生リスクはこの遺伝子多型をもたない女性と変わらないことが分かっている。2つ目は葉酸を摂取する時期が正しく知られていないことである。2002年4月からは母子手帳にも葉酸摂取の必要性が記載されるようになった。前にも述べた通り、神経系の発達はとても早い時期であり、この時期に葉酸を摂取する必要がある。また脊髄神経は妊娠6週ごろに完成するとも言われている。しかし胎児の心音が確認できるのも妊娠6週目ごろで、この時期に妊娠が判明する妊婦が約60%である。つまり妊娠が判明してから葉酸を摂取しても遅いということがわかる。妊娠期にある女性、妊娠を計画している女性は日頃から積極的に葉酸を摂取することが良い。3つ目は食生活の欧米化、多様化による葉酸摂取の個人差が大きくなったことである。

## 10. 海外の取り組み

海外では葉酸の摂取を促す取り組みがある。1998年に米国ではパンやパスタなどの穀類100グラム中に140マイクログラムの葉酸を添加しないといけないとする法律が、世界で初めて制定された<sup>8)</sup>。その後、40か国以上で同様の葉酸添加が義務化されている。その結果、神経管閉鎖障害発生率が、米国(2004年)では約50%、カナダ(2007年)では46%、南アフリカ(2008年)では30.5%、それぞれ減少したと報告されている。日本では義務化はされていないが、いくつかの食品会社が、葉酸を自主的にシリアルやビスケット、ジュースなどの食品へ添加している。

## 11. 要因は環境的・遺伝的なものもある

最後に、神経管閉鎖障害は葉酸の不足だけでなく、環境や遺伝的な要因も関わる。環境要因としては、抗てんかん薬の内服、糖尿病にかかっている女性、母体の高度肥満、妊娠初期に高熱にかかること、喫煙すること、ビタミンAの過剰摂取、放射線照射などが挙げられる。先述した葉酸を代謝する酵素の遺伝子多型も要因としてある。また、二分脊椎の発症は人種や地域によって大きく異なり、これは遺伝的因子が明らかに関与している証拠であると考えられる。

## 12. 最後に

今回の授業を通して、葉酸の不足が神経管閉鎖障害に関わることが生化学の視点から理解することができた。また、神経管閉鎖障害予防のための葉酸の摂取が、妊娠が分かってからでは遅いことや、それが広く知られていないことも分かった。このことから、学校で教えるなどのような方法で、妊娠を考えている女性が日ごろから意識して葉酸を摂取しようと思えるような取り組みが必要だと考えた。また、医療者は神経管閉鎖障害の発症には複数の因子があり、必ずしも母体の栄養不良が原因であるわけではないことや、葉酸を摂るだけで予防できるという言い方ではなく、葉酸を摂取することであくまでも集団としてのリスクが低減するというふうに正しく伝える必要があると思った。

#### 参考文献

- 1) 妊娠とくすり情報センター作成
- 2) 『生化学』医学書院
- 3) 『葉酸の臨床』荒川雅男
- 4) 母子保健改善のための微量栄養素欠乏に関する援助研究  
[https://www.jica.go.jp/jica-ri/IFIC\\_and\\_JBICI-Studies/jica-ri/publication/archives/jica/field/pdf/2003\\_05m.pdf](https://www.jica.go.jp/jica-ri/IFIC_and_JBICI-Studies/jica-ri/publication/archives/jica/field/pdf/2003_05m.pdf)
- 5) 厚生労働省「神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な年齢の女性等に対する葉酸の摂取に係る適切な情報提供の推進について」
- 6) 環境省 子どもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)
- 7) 1 more baby 応援団 <https://www.bing.com/search?q>
- 8) <https://aska-la.jp/healthcare/02043>

## 令和3年度「基礎科学研究」発表会

日時：7月15日(木) 14:30~17:00

場所：B 講義室

### — プログラム —

生理学 14:30~14:45

1. 伊原荘太郎  
カニクイザルの KLF4, KLF5 の研究

生物学 14:45~15:30

2. 中島花音  
関節リウマチ合併間質性肺炎の病態形成に關与する  
抗シトルリン化フィブリノーゲン抗体の產生機序の解明
3. 西野詩織  
moesin のリンパ球における機能解析
4. 村木津希子  
免疫方法の違いによる IgD 抗体產生の解析

～ 休憩 15:30~15:40 ～

薬理学 15:40~15:55

5. 田原利桜  
ナルディライジンの酵素活性阻害薬に関する研究

物理学 15:55~16:10

6. 篠原陽平  
実空間高分解能観察法によるタンパク質オリゴマーの構造評価

情報総合センター 16:15~16:35

7. 三澤佑太  
感染症数理モデルの数値シミュレーション  
—COVID-19 の実データとの比較—
8. 亀田隼大  
感染症数理モデルの数値シミュレーション  
—COVID-19 と他の感染症との比較—

化学 16:40~17:00

9. 伊藤亜友加  
近年の人工乳の進歩
10. 日比野愛来  
神経管閉鎖障害発症リスク低減のための葉酸摂取について