

# ラットにおける $\alpha_2$ - macroglobulin 生成に関する研究

*Production of  $\alpha_2$ -macroglobulin in rats with acute inflammation*

栗林尚志, 山本静雄

麻布大学生命・環境科学部免疫学研究室

Takashi Kuribayashi, Shizuo Yamamoto

Laboratory of Immunology, School of Life and Environmental Science, Azabu University

**Abstract:** The change of serum levels of  $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2$ M) after administration of fraction corresponded to interleukin (IL)-6 or cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) in rats were investigated. The serum levels of  $\alpha_2$ M increased fraction of corresponded of IL-6 or CINC-1 and peak levels 260.7  $\mu$ g/ml at 48 h and 357.5  $\mu$ g/ml at 24 h after administration, respectively. These results suggested that IL-6 and CINC-1 were presumed to be contributed production of  $\alpha_2$ M.

## はじめに

$\alpha_2$ -マクログロブリン ( $\alpha_2$ -macroglobulin:  $\alpha_2$ M) は、ラットにおける代表的な急性期蛋白である。健康なラットにおける  $\alpha_2$ M の血清濃度は低いが、急性炎症時には鋭敏に反応し、その血清濃度は著しく上昇する<sup>1,2)</sup>。そのため、 $\alpha_2$ M は、前臨床試験などにおいてラットにおける急性炎症の有用性が高い指標であると考えられている。また、ラットへテレピン油を投与し急性炎症を惹起したときの  $\alpha_2$ M 血清濃度は、テレピン油投与48時間後に最高濃度を示すと報告されている<sup>1,2)</sup>。さらに、このとき Interleukin-6 (IL-6) および Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) の血清濃度が、 $\alpha_2$ M に先立ち上昇し始め投与12時間後に最高濃度を示すことから、この両サイトカインが  $\alpha_2$ M の産生に寄与していると考えられている<sup>1,2)</sup>。しかし、 $\alpha_2$ M の産生に、これらのサイトカインがどのような関係で寄与しているかは未だ明らかにされていない。本研究では、それぞれのサイトカインが、 $\alpha_2$ M の生成にどのように作用してい

るかを明らかにするため、急性炎症を惹起したラットの血清から IL-6, CINC-1 の分子量に相当する分画をゲル濾過クロマトグラフィー法により分取した。これらの分画をそれぞれ単独でラットへ静脈内投与したときの  $\alpha_2$ M 血清濃度を測定し、これらが  $\alpha_2$ M の生成にどのように寄与しているかを検討した。

## 材料および方法

### 実験動物:

実験には、Sprague-Dawley (SD) 系リタイヤラットを15匹(埼玉実験動物株式会社, 埼玉)および6週齢SD系雄性ラットを10匹(チャールス・リバー株式会社, 横浜)それぞれ用いた。

### IL-6 および CINC-1 の分取:

SD系リタイヤラットの大腿部筋肉にテレピン油を0.4 ml/匹投与し急性炎症を惹起した。IL-6 および CINC-1 の血清濃度が最も高いと考えられる投与12時間後にエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血を行い、血清を分離した。この血清を FPLC を用いて Hiloal16/60Superdex75pg カラムによるゲル濾過クロ

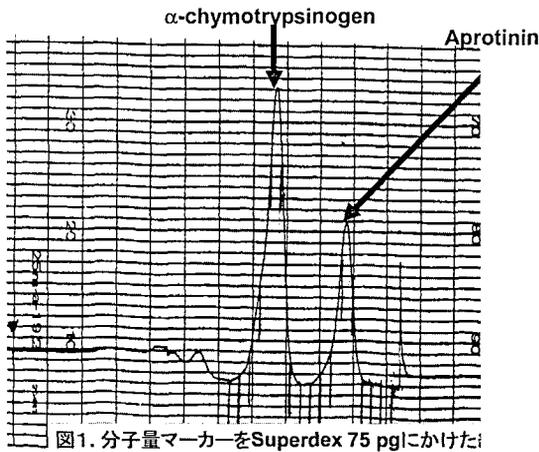


図1. 分子量マーカーをSuperdex 75 pgにかけた。

Fig. 1 Hiload16/60Superdex75pg gel filtration of acute phase serum.

マトグラフィー法により、IL-6 (分子量 22,000) あるいは CINC-1 (分子量 7,845) に相当する分画を採取した。なお、分子量マーカーとして IL-6 に相当する分子量を有する  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンを (分子量 22,400, 和光純薬株式会社, 大阪), CINC-1 に相当する分子量を有するアプロチニン (分子量 6,500, 和光純薬株式会社, 大阪) をそれぞれ用いた。

動物実験:

急性炎症を惹起したラットの血清よりゲル濾過クロマトグラフィー法により採取した IL-6 あるいは CINC-1 に相当する分画 0.1 ml を 6 週齢 SD 系雄性ラットの尾静脈へ投与した。採血は、投与前、投与後 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 時間にエーテル麻酔下で頸静脈より行った。分離した血清は、測定に供するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。

$\alpha_2\text{M}$  血清濃度の測定:

$\alpha_2\text{M}$  の血清濃度は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定した。すなわち、0.05M 炭酸重炭酸緩衝液 (pH9.6) で調製したヤギ抗ラット  $\alpha_2\text{M}$  抗体を 100 ml/ウェル固相にコーティングし、1%ウシ血清アルブミンを含む 0.05 M 炭酸重炭酸緩衝液 (pH9.5) で未吸着の結合基をブロックした。次に既知濃度の標準蛋白あるいは採取した血清を反応させた。次に一次抗体としてマウス抗ラット  $\alpha_2\text{M}$  抗体を 100 ml/ウェル、続いて二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体をそれぞれ 100 ml/ウェル反応させた。その後、2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-suphonic acid (ABTS,

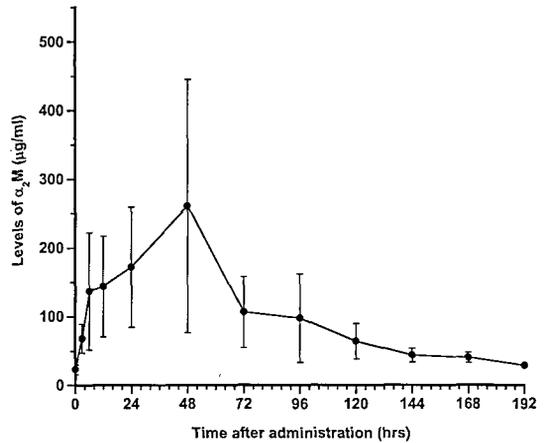


Fig. 2 Serum levels of  $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2\text{M}$ ) after administration of fraction corresponding to interleukin-6.

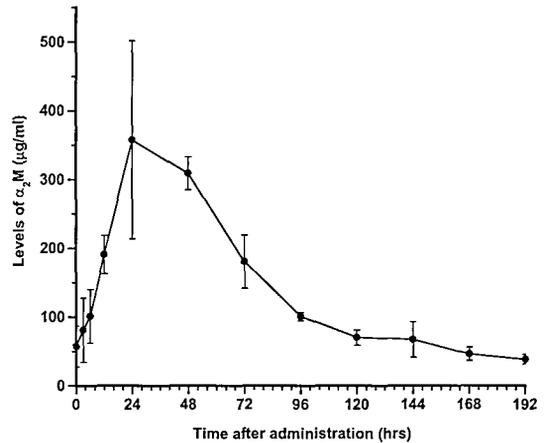


Fig. 3 Serum levels of  $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2\text{M}$ ) after administration of fraction corresponding to cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1(CINC-1).

ZYMED Laboratories, Inc., CA, USA) を加えて発色させた。吸光度はマイクロプレートリーダー用いて 415 nm の波長で測定した。

結果および考察

IL-6 あるいは CINC-1 それぞれの分子量に相当する分画をラットに静脈内投与したときの  $\alpha_2\text{M}$  の血清濃度推移を Fig. 2 および Fig. 3 にそれぞれ示した。IL-6 に相当する分画を投与したときの血清濃度は投与 48 時間後に最高濃度を示し、その平均値は  $260.7 \mu\text{g/ml}$  ( $59.0 \sim 500.2 \mu\text{g/ml}$ ) であった。また、CINC-1 の分子量に相当する分画を投与したときの血清濃度は、投与 24 時間後に最高濃度を示し、その平均値は

357.5  $\mu\text{g/ml}$  (231.4 ~ 544.3  $\mu\text{g/ml}$ ) であった。以上のように、IL-6あるいはCINC-1に相当する分画をそれぞれ単独でラットに静脈内投与した結果、いずれにおいても $\alpha_2\text{M}$ の血清濃度は上昇した。このことから、両サイトカインともに $\alpha_2\text{M}$ の肝臓における生成に寄与していると考えられた。

#### 参考文献

- 1) Honjyo T, Kuribayashi T, Seita T, Tamura K, Matsunoto M, Seguchi H, Ogihara K, Yamazaki S and Yamamoto S. 2006. Variations in  $\alpha_1$ -acid glycoprotein ( $\alpha_1$ -AG) and inflammatory cytokines (IL-6, CINC-1) in healthy rats following acute inflammation — $\alpha_1$ -acid glycoprotein and cytokines in rats—. *Vet. Biochem.* 43: 9-15.
- 2) Jinbo T, Sakamoto T and Yamamoto S. 2002. Serum  $\alpha_2$ -macroglobulin and cytokine measurements in an acute inflammation model in rats. *Lab Anim* 2002; 36: 153-157.