肺炎球菌C多糖体に対する抗体応答におよぼすヒトCRPの効果

The Effects of Human C-reactive Protein on the Antibody Response to Pneumococcal C-polysaccharide

中 山 秀 英*
SHUEI NAKAYAMA, M.D.

肺炎球菌C多糖体(CPS)に対する抗体応答に及ぼすヒトCRPの影響について検討した。肺炎球菌3型ワクチンで免疫されたBALB/CマウスにおけるCPSに対する抗体応答が血清凝集抗体価で評価された。免疫に先だつCRPの投与はCPSに対する抗体応答を有意に阻止した。この阻止に必要なとされる最少CRP量は50 μ gであった。CRPの効果がparticulate抗原の処理に関係しているかどうか決定するため、マウスはCPSでコートされたウマ赤血球(HE)で免疫され、HEあるいはCPSのそれぞれに特異的な抗体応答が測定された。CRP投与はHEに対する抗体応答に影響を及ぼすことなく、CPSに対する応答のみを阻止した。これらの所見は、細菌上に存在する抗原決定基へのCRP結合がこの基による有効な免疫を妨げることによりもたらされることを示唆している。

索引用語：C反応性タンパク(CRP)、肺炎球菌C多糖体(CPS)。

Key words：C-reactive protein (CRP),
cell wall C-polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* (CPS)。

緒 言

C反応性タンパク(CRP)は感染、炎症あるいは外傷などに反応し肝で急速に合成される急性期血清蛋白の一種である。CRPはCa⁺⁺存在下で肺炎球菌細胞壁C多糖体(CPS)に含まれるphosphocholine(PC)との特異的な結合¹⁾を介してCPSを沈降させる²⁾ことから、炎症や組織壊死などの程度を押しはかる診断的指標として臨床的に繁用されてきた。CRPは抗体とは異なる分子ではあるが、抗体と類似する生物学的活性を有することが近年示めされ³⁾生体防御におけるCRPの役割が再認識されている。たとえば、CRPは①CPSと複

合体化することにより抗原抗体複合物と同様にclassical pathwayを介して補体を活性化しうる⁴⁾、②*in vitro*でCPS結合血球に対しオプソニンとして機能しうる⁵⁾ことなどが知られている。これらのCRPの機能特性は感染、炎症などに対する生体防御の上で重要であると考えられる。事実、著者らは以前の研究でCRPが致死性肺炎球菌3型および4型感染よりマウスを防御しうることを見出した⁶⁾。またこれに引き続く研究においてCRPが肺炎球菌やCPS結合自家血球の脾によるクリアランスを増加させることをマウス*in vivo*モデルで明らかにした⁷⁾。本論文では肺炎球菌多糖体に対する*in vivo* IgM 応答に及ぼすCRPの影響について検討した。

材料と方法

I 動 物

* 順天堂大学医学部内科学教室・腎臓

Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine.

(Oct. 15, 1983受付)

BALB/c マウス (♀, 8~12週令) は Cumberland 社 (Tenn.) より購入した。

II コブラ毒因子によるマウスの処理

コブラ毒因子 (CVF: *Naja naja kouthia*, Cordis, Fl.) は 6 単位をマウス腹腔内に投与し C3欠損状態を作製した。投与後 3 日目の血清 C3溶血活性は正常状態の 2% を示すにすぎなかった⁸⁾。実験には CVF 処理後 3 日目のマウスを使用した。

III 肺炎球菌多糖体結合血球と免疫

肺炎球菌 3 型 (*S. pneumoniae* serotype 3: Pn 3) は臨床検体より分離し, 以前記載したように維持した⁹⁾。ワクチンは Pn 3 を 0.5% フォルマリンで処理し作製した¹⁰⁾。このワクチンを 1mM CaCl₂ を含むベロナール緩衝液 (VBS-Ca⁺⁺) で洗浄したのち 10⁹ 個/ml の濃度に浮遊させ, これを 0.2ml マウス尾静脈に投与し免疫した。肺炎球菌 3 型莢膜多糖体 (S III) は New York State Department of Health より得た。CPS は Liu らの方法¹¹⁾ に準じて非莢膜型肺炎球菌株である R36a より抽出した。これらの多糖体を CrCl₃ 存在下でウマ赤血球 (HE) あるいはヒツジ赤血球 (SE) に結合させ^{8,12)}、CPS・HE、CPS・SE、SIII・HE あるいは SIII・SE を作製した。免疫には CPS・HE あるいは SIII・HE を生食水に 4 × 10⁹ 個/ml の濃度に浮遊させ, これを 0.2ml マウス尾静脈に投与した。一方、血球凝集反応には CPS・SE あるいは SIII・SE を指示細胞として使用した。

IV CRP と血清 amyloid P-component

ヒト CRP は腹水より、ヒト血清 amyloid P-component (SAP) は血清より Affinity Chromatography およびゲル濾過を使用して精製した^{13,14)}。

V 血清抗体価の測定

眼窩静脈叢より採血し、血清を分離したのち非働化 (56°C, 30分) した。また血清の一部はさらに 0.1M 2-Mercaptoethanol (ME) で室温、1 時間処理された¹⁵⁾。これらの血清における CPS、S III、HE あるいは SE に対するそれぞれの抗体価は以前記載したように 0.2% BSA を含む VBS-Ca⁺⁺ に 0.15% の濃度に浮遊させた CPS・

SE、S III・HE、SE あるいは HE を指示細胞に使用してマイクロプレート上で血球凝集反応により決定した⁹⁾。

結 果

I CPS に対する抗体応答に及ぼす CRP の阻止効果

マウスに 200 μ g CRP あるいは生食水を投与し、30分後に Pn 3 ワクチンで免疫した。免疫後 10 日目まで血清抗 CPS 抗体価を測定した。その結果を図 1 に示した。CRP 処理マウスにおける免疫後 3 日目での CPS に対する抗体価は対照マウスにおけるそれと比較し有意に低下していた。CRP によるこの抗体価の阻止は検討した免疫後 10 日まで認められた。

II CPS に対する抗体応答の阻止に及ぼす CRP 量の影響

図 1 CPS に対する抗体応答の time course. Pn 3 ワクチンによる免疫の 30 分前に 200 μ g の CRP (○—○) または生食水 (●—●) がマウス (各グループ 24 匹) に投与された。

その結果を表1に示した。投与CRP量と抗CPS抗体価低下との間にはdose responseが認められ、50 μ gのCRPによっても抗CPS抗体応答が阻止された。これに対し、12.5 μ gのCRPは有意な阻止を示さなかった。CRPによる同様な阻止は200 μ gのCRPを*in vitro*で免疫源に反応させマウスに投与した場合にも認められた。一方、SAPは200 μ gの量でも抗CPS応答を阻止することはできなかった。CPSに結合したCRPはマウス補体を活性化しうる⁸⁾、またマウスのCVF処理は肺炎球菌14型莢膜多糖体に対する抗体応答を変化させる¹⁶⁾ことが示されている。そこで抗CPS抗体応答に及ぼすCRPの影響をCVF処理マウスで検討した。その結果、C3欠損状態においても正常マウスで観察されたと同様なCRPによる阻止が認められた。

表1 CPSに対する抗体応答の阻止に及ぼすCRP量の影響

処 理 ^a	抗CPS抗体価 (log ₂)	
	ME未処理	ME処理
正常マウス		
生 食 水	9.9(9-12) ^b	2.3(2-3)
12.5 μ g CRP	9.2(8-10)	2.5(2-3)
50 μ g CRP	5.9(4-7)	2.5(2-3)
200 μ g CRP	2.8(1-4)	0.5(0-1)
200 μ g SAP	10.2(9-11)	2.0(1-3)
CVF処理マウス		
生 食 水	11.6(9-13)	N.D. ^d
CRP ^c	5.8(4-7)	N.D.
生 食 水	9.3(8-11)	N.D.
200 μ g CRP	4.3(2-5)	N.D.

- a. Pn3ワクチンによる免疫の30分前に全量0.1mlに調整されたCRP, SAPあるいは生食水がマウス(各グループ12匹)に投与された。
 b. 免疫後4日目での抗体価の範囲を示す。
 c. Pn3ワクチンは 2×10^8 個あたり200 μ gのCRPあるいは生食水と37℃, 30分反応させたのち、洗浄しマウスに投与された。
 d. 検討せず。

III 複合体CPS抗原に対する抗体応答に及ぼすCRPの効果

CRPによる阻止のメカニズムを明らかにする目的で複合体抗原を作製した。HEに結合させたCPSをparticulate抗原として使用し、HEあるいはCPSに対する抗体応答に及ぼすCRPの効果を調べた。その結果を表2に示した。CRPはHEに対する抗体応答に影響を及ぼすことなく、CPSに対する抗体応答のみを阻止した。この選択的阻止はCVF処理マウスにおいても観察された。

IV S IIIに対する抗体応答に及ぼすCRPの影響

GRPによる抗体応答の阻止がCPSに特異的であるかどうか検討した。S III・HEでマウスを免疫し、HEあるいはS IIIに対する抗体応答を測定した。免疫に先だつCRPの投与は血清抗HEおよび抗S III抗体価に対してもまったく影響を及ぼさなかった(表3)。

表2 複合体CPS抗原に対する抗体応答に及ぼすCRPの効果

処 理 ^a	抗体価 (log ₂)		
	抗HE	抗CPS	抗SE
正常マウス			
生 食 水	9.3(7-10) ^b	8.0(7-10)	0.6(0-1)
CRP	9.0(7-10)	4.0(3-5)	0.4(0-1)
CRP ^c	8.8(7-11)	3.8(2-5)	0.5(0-1)
CVF処理マウス			
生 食 水	10.3(8-12)	7.6(7-9)	0.5(0-1)
CRP	10.6(9-12)	4.3(3-5)	0.6(0-1)

- a. CPS・HEによる免疫の30分前に全量0.1mlに調整された200 μ gのCRPあるいは生食水がマウス(各グループ6匹)に投与された。
 b. 免疫後5日目での抗体価の範囲を示す。
 c. CPS・HEは 4×10^8 個あたり200 μ gのCRPと4℃, 30分反応させたのち、洗浄しマウスに投与された。
 CPS・SEを指示細胞に使用し、抗CPS抗体価の決定がなされたためSEに対する抗体も同時に測定された。

表3 S IIIに対する抗体応答に及ぼすCRPの影響

処 理 ^a	抗体価 (log ₂)		
	抗HE	抗S III	抗SE
生 食 水	10.0(9-11) ^b	5.5(5-7)	0.5(0-1)
CPR	11.0(10-12)	5.3(5-6)	0.6(0-1)

a. S III・HE による免疫の30分前に全量0.1mlに調整された200 μ gのCRPあるいは生食水がマウス (各グループ6匹) に投与された。

b. 免疫後5日目での抗体価の範囲を示す。

S III・SE を指示細胞に使用し, 抗 S III抗体価の決定がなされたため SE に対する抗体も同時に測定された。

考 案

本研究により得られた結果はヒト CRP が CPS に対する *in vivo* IgM 応答を阻止しうることを示している。Pn 3ワクチンによりマウスが免疫された場合, 免疫に先だつ200 μ g の CRP 投与は抗 CPS 抗体価の上昇を阻止した。有効阻止量の検討では投与 CRP 量と抗 CPS 抗体価の低下との間には dose response が認められ, CRP は50 μ g の微量でも抗 CPS 応答を阻止しうることが明らかにされた。CRP による同様な阻止は *in vitro* で CRP を Pn 3 に反応させ, これでマウスを免疫した場合にも得られた。このほかに SAP の抗 CPS 抗体応答に及ぼす影響も比較された。SAP はアミノ酸配列および構造の点で CRP と類似性を有するが, CPS 結合能をもたない糖蛋白である¹⁷⁾。検討の結果, SAP は阻止効果を全く示さなかった。これらの所見は CRP による阻止が Pn 3 に含まれる CPS と CRP との結合によりもたらされていることを示唆している。

CPS 結合 HE でマウスが免疫された場合, C3 の存在あるいは非存在にかかわらず CRP は CPS に対する抗体応答を阻止したが, HE に対する抗体応答は阻止することはなかった。すなわち, その阻止は CPS・HE という particulate 全体に特異的ではなく, carrier (HE) 上に存在する CPS という基に対して特異的であった。これに引き

続く実験において S III が HE にコートされマウスに免疫された。この場合は carrier あるいはその上に存在する S III のいずれに対する抗体応答も CRP は阻止しなかった。S III は CRP と反応しえない肺炎球菌多糖体である。以上の結果は, CRP 阻止の本体が HE 上に存在する CPS への CRP 結合によることを裏づけていると同時に, この阻止には補体の活性化が必要とされないことを示している。

受動的に投与された抗体による *in vitro* あるいは *in vivo* での抗体応答阻止については報告があり, 2つのメカニズムが提唱されている^{18,19)}。その1つはFc依存性阻止であり, 抗原基に非特異的なものである。このタイプの阻止は helper T細胞の代用となるようなある factor によって消失することから投与された抗体による T-B細胞共同作用への影響によると考えられている。第2のものはFc非依存性阻止である。この阻止は投与された抗体が particulate 抗原上の抗原基と反応し, これを mask することによりこの基に対する抗体応答のみを阻止する。この意味で抗原基に特異的であるとされている。著者がこの研究で観察したCRPによる阻止は carrier 上に存在している CPS に対して特異的であった。したがって CRP 阻止は後者のメカニズムに類似していると考えられる。著者らは CRP のオプソニン活性に関する以前の研究⁸⁾でマウスに CPS 結合自家赤血球が投与された場合, 投与に先だつマウスの CRP 処理がこの血球の脾局在増加と肝局在減少を起こすことを示した。しかし, 今回観察された CRP による阻止は CRP 存在下でもたらされる抗原のこのような局在部位の変化やそこでの抗原処理に起因しているものではなく, むしろ応答細胞への抗原提示の障害により起こっていると考えられる。

CRP の炎症部や壊死部の組織への沈着がヒトにおいては慢性関節リウマチ²⁰⁾や血管炎²¹⁾例に, また実験的心筋硬塞²²⁾やアレルギー性脳脊髄炎²³⁾などで認められている。このような部位に結合した CRP が抗体形成を阻止しうることが出来るならば, CRP のその沈着は炎症過程に変化を受け発

現する自己抗原に対する autosensitization を防ぐ役割を果しうのではないかと推測される。

結 語

CRP は CPS に対する抗体応答を特異的に阻止する。この阻止は CRP による CPS の masking により起こる。

本論文は多くの教育機会を授けていただいた恩師大野丞二教授の64回目の誕生日を祝して発表された。論文作成および印刷には順天堂大学医学部同窓会58年度学術奨励賞賞金の一部が活用された。

文 献

- 1) Volanakis, J. E. & Kaplan, M. H. : Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **136**, 612~614, 1971.
- 2) Tillett, W. S. & Francis, T. Jr. : Serological reaction in pneumoniae with a nonprotein fraction from pneumococcus. : J. Exp. Med., **52**, 561~571, 1930.
- 3) Gewurz, H. Mold, C. Siegel, J. & Fiedel, B. : C-reactive protein and the acute phase response. : Adv. Int. Med., **27**, 345~372, 1982.
- 4) Siegel, J. Rent, R. & Gewurz, H. : Interaction of C-reactive protein with the complement system. I. Protamin-induced consumption of complement in acute phase sera. : J. Exp. Med., **140**, 631~647, 1974.
- 5) Mortensen, R. F. & Duszkiwicz, J. : Mediation of CRP-dependent phagocytosis through mouse macrophage Fc-receptors. : J. Immunol., **119**, 1611~1616, 1977.
- 6) Mold, C. Nakayama, S. Gewurz, H. & Du Clos, T. W. : C-reactive protein is protective against *Streptococcus pneumoniae* infection. : J. Exp. Med., **154**, 1703~1708, 1981.
- 7) Nakayama, S. Gewurz, H. Holzer, T. Du Clos, T. W. & Mold, C. : The role of the spleen in the protective effect of C-reactive protein in *Streptococcus pneumoniae* infection. : Clin. Exp. Immunol. **54**, 319~326, 1983.
- 8) Nakayama, S. Mold, C. Gewurz, H. & Du Clos, T. W. : Opsonic properties of C-reactive protein *in vivo*. : J. Immunol., **128**, 2435~2438, 1982.
- 9) 中山秀英 : マウスにおける肺炎球菌感染に対するヒトCRPの防御効果. : 日本細菌学雑誌, **38**, 557~563, 1983.
- 10) Du Clos, T. W. & Kim, B. S. : Suppressor T cells : Presence in mice rendered tolerant by neonatal treatment with anti-receptor antibody or antigen. : J. Immunol., **119**, 1769~1772, 1969.
- 11) Liu, T.-Y. & Gotschlich, E. C. : The chemical composition of pneumococcal C-polysaccharide. : J. Biol. Chem., **238**, 1928~1934, 1963.
- 12) Baker, P. J. Stashak, P. W. & Prescott, B. : Use of erythrocytes sensitized with purified pneumococcal polysaccharides for the assay of antibody and antibody-producing cells. : Appl. Microbiol., **17**, 422~426, 1969.
- 13) Mold, C. Rodgers, C. P. Richards, R. L. Alving, C. R. & Gewurz, H. : Interaction of C-reactive protein with liposomes. III. Membrane requirements for binding. : J. Immunol., **126**, 856~860, 1981.
- 14) Pepys, M.B. Dash, A. C. Munn, E. A. Feinstein, A. Skinner, M. Cohn, A. S. Gewurz, H. Osmand, A. P. & Painter, R. H. : Isolation of amyloid P component (Protein AP) from normal serum as a calcium-dependent binding protein. : Lancet., **1**, 1029~1031, 1977.
- 15) Braley-Mullen, H. : Regulatory role of T cells in IgG antibody formation and immune memory to type III pneumococcal polysaccharide. : J. Immunol., **113**, 1909~1920, 1974.
- 16) Markham, R. B. Nicholson-Weller, A. Schiffman, G. & Kasper, D. L. : The presence of sialic acid on two related bacterial polysaccharides determines the site of the primary immune response and the effect of complement depletion on the response in mice. : J. Immunol., **128**, 2731~2733, 1982.
- 17) Osmand, A. P. Friedenson, B. Gewurz, H. Painter, R. H. Hofman, T. & Shelton, E. : Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent Clt homologous protein displaying

- cyclic pentameric symmetry (pentraxins) . : Proc. Natl. Acad. Sci., **74**, 739~743, 1977.
- 18) Wason, W. M. & Fitch, F. W. : Suppression of the antibody response to SRBC with F(ab')₂ and IgG in vitro. : J. Immunol., **110**, 1427~1429, 1973.
- 19) Hoffmann, M. K. & Kappler, J. W. : Two distinct mechanisms of immune suppression by antibody. : Nature., **276**, 64~65, 1978.
- 20) Gitlin, J. D. Gitlin, J. I. & Gitlin, D. : Localization of C-reactive protein in synovium of patients with rheumatoid arthritis. : Arth. Rheum., **20**, 1491~1499, 1978.
- 21) Parish, W. E. : Studies on vasculitis. VII. C-reactive protein as a substance perpetuating chronic vasculitis. Occurrence in lesions and concentration in sera. : Clin. Allergy., **6**, 543~550, 1976.
- 22) Kushner, I. Rikita, L. & Kaplan, M. H. : Studies on acute-phase protein. II. Localization of Cx-reactive protein in heart in induced myocardial infarction in rabbit. : J. Clin. Invest., **42**, 286~292, 1963.
- 23) Du Clos, T. W. Mold, C. Paterson, P. Y. Alroy, J. & Gewurz, H. : Localization of C-reactive protein in inflammatory lesion experimental allergic encephalomyelitis. : Clin. Exp. Immunol., **43**, 565~573, 1981.
- 21) Parish, W. E. : Studies on vasculitis. VII. C-reactive protein as a substance perpetuating

Summary

The Effects of Human C-reactive Protein on the Antibody Response to Pneumococcal C-polysaccharide

C-reactive protein (CRP) is an acute serum protein that binds to the cell wall C-polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* (CPS). I have previously shown that CRP treatment of mice alters splenic and hepatic clearance of *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 (Pn 3) and increases resistance to fatal pneumococcal infection. In this study, the effects of CRP on the antibody response to CPS were examined. Mice were immunized by i. v. injection of formalinized Pn 3, and the antibody response to CPS measured as serum hemagglutinating antibody. Administration of 200 µg of CRP per mouse i. v. 30 minutes prior to immunization reduced the antibody response to CPS. Inhibition was observed on Days 3 through 10.

CRP was inhibitory at a minimum dose of 50 µg per mouse. To determine whether the effects of CRP were related to altered processing of particulate antigen, mice were immunized with horse erythrocytes (HE) coated with CPS and the antibody response to CPS and HE determined. CRP treatment inhibited the antibody response to CPS without affecting the response to HE.

These results suggested that CRP binding to antigenic determinants on bacterial surfaces may prevent effective immunization by these determinants.

Key words : C-reactive protein (CRP), cell wall C-polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* (CPS)

SHUEI NAKAYAMA, M. D.

*Division of Nephrology, Department of Internal Medicine,
Juntendo University School of Medicine*