



Title	エゾキウサギが生成した抗ウサギIgG抗体の特異性
Author(s)	柿沼, 光明; KAKINUMA, Mitsuaki; 佐々木, 孝之 他
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 36, 34-42
Issue Date	1976-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26501
Type	departmental bulletin paper
File Information	36_P34-42.pdf



エゾユキウサギが生成した抗ウサギ IgG 抗体の特異性

柿沼光明 佐々木孝之 大原 達

(北海道大学免疫科学研究所 血清学部門)

(昭和50年11月21日受付)

ウサギ(イエウサギ・rabbit・*Oryctolagus cuniculus*)の免疫グロブリンの抗原性には個体差が認められる。この抗原性は共優性に遺伝し、一般にアロタイプと呼ばれる¹⁾。表1は現在知られているウサギ免疫グロブリンのアロタイプをまとめたものである。遺伝子座として、*a*, *b*, *c*, *de*, *fg*, *n*, *x* および *y* 座が報告されている^{2),3)}。*a* 座では *a*¹, *a*² および *a*³ の対立遺伝子が位置し⁴⁾, *a*₁, *a*₂ および *a*₃ と名づけられた H 鎖の可変部構造を支配している^{5)~7)}。*b* 座には *b*⁴, *b*⁵, *b*⁶ および *b*⁹ の複対立遺伝子が知られ^{4),8)}, κ 型 L 鎖の主として定常部にある抗原構造 *b*₄, *b*₅, *b*₆ および *b*₉ をそれぞれ支配している^{9),10)}。*c* 座は単一の遺伝子座ではなく *c*₂₁ 座と *c*₇ 座とに分かれると思われるが、抗原決定基としては *c*₂₁(+)、*c*₇(+) のみが知られ、これらの対立構造は *c*₂₁(-)、*c*₇(-) であろうと言われる^{10)~12)}。*de* 座はもともと *d* 座、*e* 座として記載されたものであるが IgG の H 鎖の定常部の 2 カ所に見出された点変異(1個のアミノ酸残基の置換)によるもので、遺伝子が連続したポリペプチドを支配する DNA 断片と考えると *d* 座、*e* 座は同一遺伝子内の亜遺伝子座と考えられる。いずれにしても *d* 座は IgG の H 鎖のちょうつがい部に発現される *d*₁₁, *d*₁₂ の抗原決定基を支配し^{13),14)}, *e* 座は *e*₁₄, *e*₁₅ の対立抗原を支配す

る^{15),16)}。*fg* 座は IgA の H 鎖の定常部を^{17)~19)}, *n* 座は IgM の H 鎖の定常部を支配する²⁰⁾。*x* 座および *y* 座は H 鎖の可変部を支配する遺伝子座で、*a* 座、*x* 座および *y* 座の関係はヒトの免疫グロブリンの H 鎖の可変部に認められるサブグループと同じであろうと推測されている^{21)~23)}。

a 座、*x* 座、*y* 座のように免疫グロブリンの可変部を支配する遺伝子座が同定できたのはウサギに関してのみであり、この事実が過去 20 年間の免疫グロブリン研究の過程でウサギに関する実験結果が目ざされてきた理由の一つと言えよう。ウサギに近縁な動物種においてもウサギ免疫グロブリンのアロタイプ抗原が見出されるか否かについて少数の研究グループによる報告がなされてきた^{24)~29)}。Landucci-Tosi ら²⁵⁾ は *b*₄, *b*₅, *b*₆, *e*₁₅ のアロタイプ抗原を Hare(ノウサギ)が持っていたという。しかしウサギにおいては対立遺伝子の支配下にあるこれら *b*₄, *b*₅, *b*₆ 抗原は Hare においては全個体が *b*₄, *b*₅, *b*₆ を持っていたという。一方 Rodkey ら^{26)~29)} は blacktail jackrabbit および cottontail rabbit では *a*₂, *a*₃, *b*₄, *b*₅ のアロタイプ抗原と似た抗原が存在していると述べた。Rodkey らも *e*₁₅ 抗原がこれらの動物種に存在することを認めている。

表1 ウサギ免疫グロブリンのアロタイプ

遺伝子座	対立遺伝子	表現型	分子上の局在	検出法
<i>a</i>	<i>a</i> ¹ , <i>a</i> ² , <i>a</i> ³	<i>a</i> ₁ , <i>a</i> ₂ , <i>a</i> ₃	H 鎖の可変部	沈降反応
<i>x</i>	<i>x</i> ³¹ , <i>x</i> ⁻	<i>x</i> ₃₁ , <i>x</i> ⁻	"	"
<i>y</i>	<i>y</i> ³² , <i>y</i> ⁻	<i>y</i> ₃₂ , <i>y</i> ⁻	"	"
<i>b</i>	<i>b</i> ⁴ , <i>b</i> ⁵ , <i>b</i> ⁶ , <i>b</i> ⁹	<i>b</i> ₄ , <i>b</i> ₅ , <i>b</i> ₆ , <i>b</i> ₉	L 鎖 (κ 鎖)	"
<i>c</i> ₇	<i>c</i> ₇ , <i>c</i> ₇ ⁻	<i>c</i> ₇ , <i>c</i> ₇ ⁻	L 鎖 (λ 鎖)	"
<i>c</i> ₂₁	<i>c</i> ₂₁ , <i>c</i> ₂₁ ⁻	<i>c</i> ₂₁ , <i>c</i> ₂₁ ⁻	" (")	"
<i>d</i> }	<i>d</i> ¹¹ , <i>d</i> ¹²	<i>d</i> ₁₁ , <i>d</i> ₁₂	IgG の H 鎖の定常部	赤血球凝集反応
<i>e</i> }	<i>e</i> ¹⁴ , <i>e</i> ¹⁵	<i>e</i> ₁₄ , <i>e</i> ₁₅	"	"
<i>f</i> }	<i>f</i> ⁷¹ , <i>f</i> ⁷² , <i>f</i> ⁷³	<i>f</i> ₇₁ , <i>f</i> ₇₂ , <i>f</i> ₇₃	IgA の H 鎖	沈降反応
<i>g</i> }	<i>g</i> ⁷⁴ , <i>g</i> ⁷⁵	<i>g</i> ₇₄ , <i>g</i> ₇₅	"	"
<i>n</i>	<i>n</i> ⁸¹ , <i>n</i> ⁸²	<i>n</i> ₈₁ , <i>n</i> ₈₂	IgM の H 鎖	"

われわれは2羽のエゾユキウサギ (*hare*, *Lepus timidus*) を飼育する機会に恵まれた。そこでこれまで試みられている方法とは逆に、ウサギ免疫グロブリンでこれらの *Hare* を免疫し、抗血清を作成した。この抗血清はウサギのL鎖のアロタイプおよび isotype を判別しうるものと考えられたので、これら抗血清の特異性について報告する。

実験方法

Hare は北海道札幌市豊平区月寒で捕獲した2羽を本研究所動物実験室で飼育した。ウサギ繁殖用ケージ内で固形飼料と水道水で容易に飼育しえた。注射、採血等の処置は補助者が *Hare* を固定し、筋肉内注射および心臓穿刺による採血を術者が行った。免疫スケジュール終了後の全採血はウサギの場合と同じく頸動脈より行った。

ウサギは市販ウサギおよび本研究所内で繁殖したニュージーランドホワイト種を用いた。ウサギの番号にNをつけた個体は後者、数字のみの番号は前者である。

ウサギ免疫グロブリン IgG, IgG の Fab および Fc は既報に従って調製した³⁰⁾。IgG の H 鎖および L 鎖は Fleischman の方法³¹⁾ により 0.3 M 2-メルカプトエタノールで IgG を還元, 0.36 M モノヨード酢酸により遊離 SH 基をアルキル化した後にセファデックスカラムで分離精製した。

ヒツジ抗ウサギ IgG およびヒツジ抗ウサギ Fc 抗血清はそれぞれ 20 mg の IgG および Fc を完全フロインドアジュバントとともに3度2週間隔で筋注免疫し、5週目に全採血して得た。

Hare の免疫: 2 mg の IgG を完全フロインドアジュバントとともに下肢筋肉内に注射し、2および4週目に同じ免疫原を追加して5週目に全採血した。*Hare* #1 は a3 b9 のアロタイプを持つ IgG (ウサギ 1025 由来) で、*Hare* #2 は a1 b4 のアロタイプを持つ IgG (ウサギ 65 羽の血清各 1 ml をプール) で免疫した。

抗アロタイプ抗血清の作成、免疫電気泳動法、ゲル内拡散法は既報の通りに行った^{30), 32)}。

定量沈降反応は *Hare* 抗血清 0.2 ml とウサギ IgG (1 mg/ml ~ 16 μg/ml) 0.2 ml を pH 8.0 ほう酸緩衝化生理食塩水 (以下 pH 8.0 生食と略す) 中で混合し、37°C 30 分インキュベート後 4°C の低温室に一夜放置した。生成した沈降物は水冷した pH 8.0 生食で3回洗滌し、2.5 ml の 0.1 N NaOH に溶解し、280 nm の吸光度を測定した。沈降物の量は1%の IgG の吸光係数=15として計算した。

赤血球凝集反応および凝集阻止反応はタンニン酸によ

りウサギ IgG をヒツジ赤血球に結合し、マイクロタイターにより行った。非特異的凝集を防ぐために1% ウシ血清アルブミンを含む pH 8.0 生食中で反応を行った。凝集阻止反応は抗血清を最終凝集価の4倍の濃度まで稀

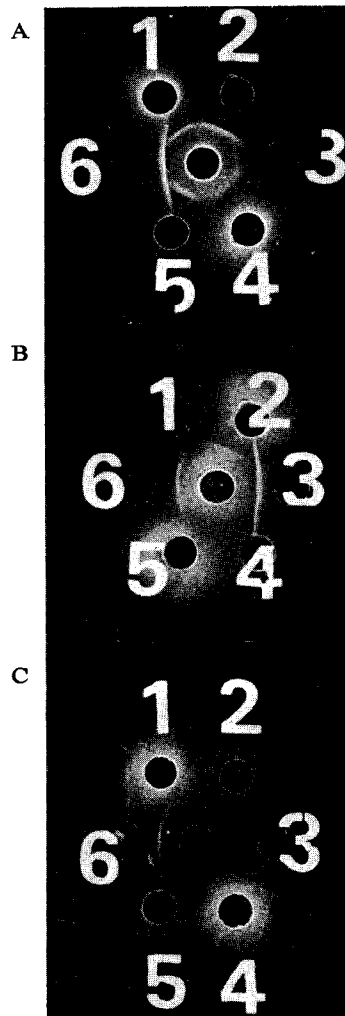


図1 ウサギと hare の IgG の交叉反応

A. 中心にヒツジ抗ウサギ IgG, 1, 4に *Hare* #2 正常血清, 2, 5に *Hare* #1 正常血清, 6にウサギ IgG (a1 b4), 1.0 mg/ml, 3にウサギ Fab (a2 b4) 1 mg/ml を入れた。

B. 中心に Fc で吸出したヒツジ抗ウサギ IgG を入れ, 1にウサギ Fc 1 mg/ml, 2, 5に *Hare* #2 正常血清, 4に *Hare* #1 正常血清, 3にウサギ IgG (a1 b4), 1 mg/ml, 6にウサギ Fab (a3 b4) 1 mg/ml を入れた。

C. 中心にヒツジ抗ウサギ Fc を入れた。1~6 までは図1 A と同じ。

積し、抗原感作赤血球との凝集をさせるときに阻止抗原を加え、凝集阻止をおこす抗原の稀釈価で示した。阻止反応は抗血清、抗原感作赤血球、阻止抗原のいずれも 0.025 ml で行った。

実験結果

1. Hare 免疫グロブリンとウサギ免疫グロブリンの交叉反応

図 1 A にヒツジ抗ウサギ IgG に対するウサギ IgG, Fab, Fc と Hare 血清の交叉反応を示す。正常 Hare 血清はウサギ IgG の抗原の一部を保有していた。Hare 血清とウサギ Fab との間には spur が形成され、Hare IgG がウサギ Fab よりも抗原が多い(恐らくは Fc の共通抗原による)ようにみられたが、量的関係は定かではなく、Fab 間に共通抗原が存在することのみは明らかであろう。このヒツジ抗ウサギ IgG 抗血清をウサギ IgG の Fc で吸収したところ、図 1 B に示すように Hare 血清は Fab 抗原の一部を保有していることが知られた。図 1 C はヒツジ抗ウサギ Fc との反応を示す。この抗血清はウサギ IgG とのみ反応し、Hare 血清とは沈降線を形成しなかった。図 1 B の結果は免疫電気泳動により確認された。図 2 に示すように、Fc で吸収したヒツジ抗ウサギ IgG はウサギ Fab とは反応したが Fc とは反応しなかった。正常 Hare 血清とは γ -領域に沈降線を形成し、

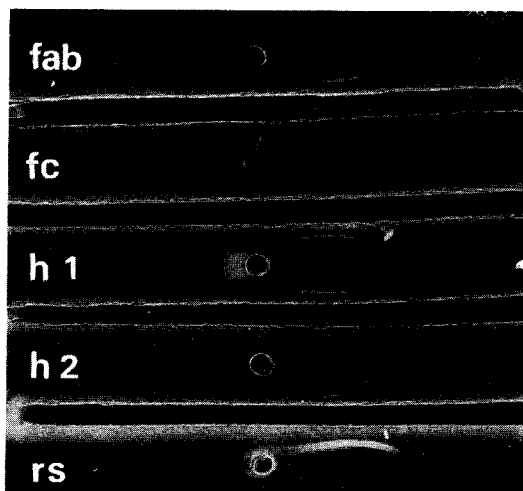


図 2 Fc で吸収したヒツジ抗ウサギ IgG と hare 血清との免疫電気泳動

fab: ウサギ IgG の Fab

fc: ウサギ IgG の Fc

h1: Hare #1 正常血清

h2: Hare #2 正常血清

rs: 正常ウサギ血清

この沈降線は Hare の IgG によることを示していた。

2. Hare 正常血清によるウサギ抗アロタイプ血清の阻止

ゲル内沈降反応によりウサギアロタイプ抗原と抗アロタイプ血清との間に形成される沈降線が正常 Hare 血清の添加により阻止されるか否かを調べたが、抗 a1, 抗 a2, 抗 a3, 抗 b4, 抗 b5, 抗 b9 の全ての抗血清の活性は阻止されなかった。この結果はウサギ IgG のアロタイプ抗原は、Hare IgG に表現されていないことを示唆している。しかしこれら抗原の一部が Hare に表現されているか否かについては情報を与えてくれない。より感度の高い方法を使用すれば Landucci-Tosi ら、Rodkey らのように Hare にもウサギ IgG のアロタイプ抗原と交叉反応する抗原が見出されるかもしれない。

3. Hare #1 抗ウサギ IgG (a3 b9) のアロタイプ特異性

Hare #1 をウサギ IgG (a3 b9) で免疫し、5 週目に抗血清を得た。この抗血清を Hare 抗 a3 b9 と略す。表 2 に示すようにこの抗血清は b9 抗原を持つ血清とのみ沈降線を形成した。この沈降線は b9 抗原で Hare 抗 a3 b9 を吸収すると消失したが、b9 抗原を含まない正常ウサギ血清には吸収能がなかった。したがって Hare 抗 a3 b9 はウサギのアロタイプ抗原 b9 に対応する抗体を含んでいると考えられた。

4. Hare #2 抗ウサギ IgG (a1 b4) の特異性

Hare #2 抗ウサギ IgG (a1 b4)……以下 Hare 抗 a1 b4 と略す……は全てのウサギ血清と沈降線を形成した(表 3)。したがってこの抗血清は Hare 抗 a3 b9 と異なりウサギ IgG の種特異抗原に対応する抗体と思われた。

5. 定量沈降反応

Hare 抗 a3 b9 および Hare 抗 a1 b4 とウサギ IgG (a1 b4, a2 b4, a3 b5, a1 b9) との定量沈降反応を図 3 A, B に示す。Hare 抗 a3 b9 は a1 b9 IgG とのみ強く反応し(沈降物 > 3.7 mg/ml), 他の IgG とは 0.7 mg/ml 以下の沈降物を形成したに止った。この結果は表 2 の結果と一致し、Hare 抗 a3 b9 は b9 抗原に対応する抗体が主成分であるようにみえた。

他方 Hare 抗 a1 b4 は何れの IgG とも 1.2mg/ml 以上の沈降物を形成したが a1 b4 および a1 b9 の IgG との反応における沈降物量が多かった。この結果は表 3 の結果と一致している。

6. Hare 抗ウサギ IgG (a1 b4 および a3 b9) の対応抗原に関する実験

以上の結果から Hare 抗 a1 b4 はウサギの全個体の IgG が持つ種特異抗原に対応していることが考えられた。ゲル内沈降反応により Hare 抗 a1 b4 とウサギ IgG,

表 2 Hare #1 抗ウサギ IgG (a3 b9) 抗血清とウサギ血清のゲル内拡散法

ウサギ 番号	ウサギの 遺伝子型	抗 a1	抗 a2	抗 a3	抗 b4	抗 b5	抗 b9	Hare #1 抗血清	N49で吸 収した Hare #1 抗血清	404で吸 収した Hare #1 抗血清 ¹⁾
N49	$a^1 a^3 b^4 b^9$	+		+	+		+	+		+
N50	$a^1 a^1 b^9 b^9$	+					+	+		+
N51	$a^1 a^3 b^4 b^9$	+		+	+		+	+		+
N52	$a^1 a^3 b^4 b^9$	+		+	+		+	+		+
N53	$a^1 a^3 b^4 b^9$	+		+	+		+	+		+
N54	$a^1 a^3 b^4 b^4$	+		+	+					
N55	$a^3 a^3 b^9 b^9$			+			+	+		+
N73	$a^1 a^1 b^9 b^9$	+					+	+	ND	ND ²⁾
N84	$a^1 a^1 b^4 b^4$	+			+				ND	ND
N90	$a^1 a^1 b^4 b^4$	+			+				ND	ND
N95	$a^1 a^1 b^4 b^5$	+			+	+			ND	ND
305	$a^1 a^1 b^5 b^9$	+				+	+	+	ND	ND
419	$a^3 a^3 b^4 b^9$			+	+		+	+	ND	ND
422	$a^3 a^3 b^4 b^4$			+	+				ND	ND
424	$a^3 a^3 b^4 b^9$			+	+		+	+	ND	ND
524	$a^3 a^3 b^4 b^4$			+	+					
525	$a^3 a^3 b^4 b^5$			+	+	+				
526	$a^3 a^3 b^4 b^9$			+	+		+	+		+
527	$a^3 a^3 b^4 b^5$			+	+	+				
528	$a^3 a^3 b^4 b^9$			+	+		+	+		+
529	$a^3 a^3 b^4 b^9$			+	+		+	+		+
530	$a^3 a^3 b^4 b^4$			+	+					
531	$a^1 a^3 b^4 b^5$	+		+	+	+				
532	$a^1 a^3 b^4 b^9$	+		+	+		+	+		+
533	$a^3 a^3 b^4 b^4$			+	+					
534	$a^1 a^3 b^4 b^4$	+		+	+					
535	$a^3 a^3 b^4 b^5$			+	+	+				
536	$a^3 a^3 b^4 b^5$			+	+	+				
537	$a^1 a^3 b^4 b^5$	+		+	+	+				
538	$a^1 a^3 b^4 b^5$	+		+	+	+				
539	$a^3 a^3 b^9 b^9$			+			+	+		+
540	$a^3 a^3 b^4 b^5$			+	+	+		+		
541	$a^3 a^3 b^5 b^9$			+		+	+	+		+
542	$a^3 a^3 b^4 b^4$			+	+					
615	$a^3 a^3 b^4 b^4$			+	+				ND	ND
616	$a^1 a^2 b^9 b^9$	+	+				+	+	ND	ND
S14	$a^1 a^1 b^4 b^4$	+			+					
S24	$a^2 a^2 b^4 b^4$		+		+					
S35	$a^3 a^3 b^5 b^5$			+		+				
S149	$a^1 a^1 b^4 b^9$	+			+		+	+		
S36	$a^3 a^3 b^6 b^6$			+					ND	ND

1) 404は $a^1 a^2 b^4 b^4$ のウサギの血清

2) 検査しなかった

表3 Hare #2 抗ウサギ IgG (a1 b4) 抗血清とウサギ血清とのゲル内拡散法

ウサギ番号	ウサギの遺伝子型	Hare #2 抗血清
N73	a ¹ a ¹ b ⁹ b ⁹	+
N84	a ¹ a ¹ b ⁴ b ⁴	+
N90	a ¹ a ¹ b ⁴ b ⁴	+
N95	a ¹ a ¹ b ⁴ b ⁵	+
305	a ¹ a ¹ b ⁵ b ⁹	+
419	a ³ a ³ b ⁴ b ⁹	+
422	a ³ a ³ b ⁴ b ⁴	+
424	a ³ a ³ b ⁴ b ⁹	+
615	a ³ a ³ b ⁴ b ⁴	+
616	a ¹ a ² b ⁹ b ⁹	+
S14	a ¹ a ¹ b ⁴ b ⁴	+
S24	a ² a ² b ⁴ b ⁴	+
S35	a ³ a ³ b ⁵ b ⁵	+
S149	a ¹ a ¹ b ⁴ b ⁹	+
S36	a ³ a ³ b ⁶ b ⁶	+

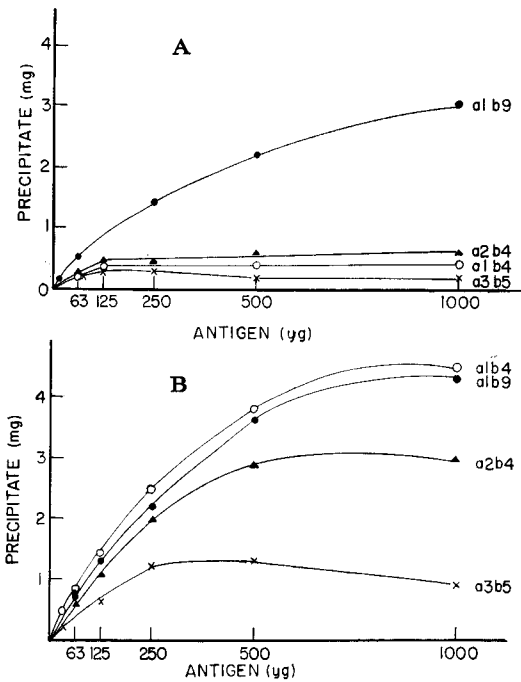


図3 Hare 抗ウサギ IgG とウサギ IgG の定量沈降反応

A. Hare #1 抗ウサギ IgG (a3 b9) 0.2 ml と、ウサギ IgG 0.2 ml とを 37°C 1 時間ついで 4°C に 1 夜放置し、生じた沈降物を 1 ml の生食で 3 回洗滌した後に 1N NaOH 2.5 ml に溶解して 280 nm における吸光度を測定した。

B. Hare #2 抗ウサギ IgG (a1 b4) 0.2 ml と、ウサギ IgG 0.2 ml との間に生じた沈降量。

- a1 b4 IgG ● a1 b9 IgG
- ▲ a2 b4 IgG × a3 b5 IgG

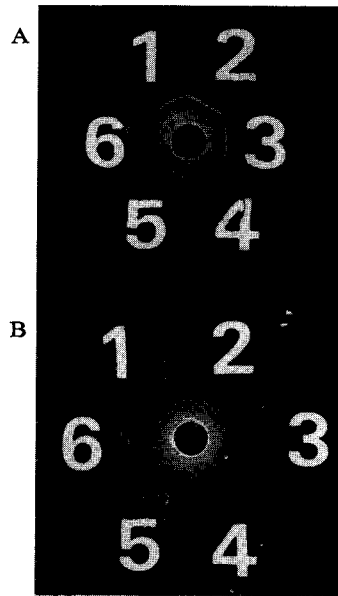


図4 Hare #2 抗ウサギ IgG (a1 b4) とウサギ IgG との反応

A. 未吸収 Hare #2 抗血清を中心に、1, 3, 5 は a2 b4 の精製抗体、2 は a1 b9 の IgG、4 は a3 b4 の Fab、6 は Fc、いずれも 1 mg/ml を入れた。

B. 抗原は A と同じ。中心は Fc で吸収した Hare #2 抗血清。

Fab, Fc との反応をみると Fab (a3 b4) とは反応せず Fc とは弱い沈降線を形成し、IgG (a1 b9) とは強い沈降線を形成した (図 4 A)。ここで用いた IgG (a2 b4) は Dr. Kindt より提供された 3 種の均一抗 Streptococcus 抗体であるが、IgG (a1 b9) は不均一な IgG 画分である。IgG (a1 b9) には IgG (a2 b4) にも不均一な IgG (a3 b4) 由来の Fab にも存在していない抗原が含まれていることを示している。Fab が沈降線を形成しなかった理由は Fab の形になると抗原決定基数が半減して沈降線を生じ難くなることも一因と考えられるが、そのような場合には IgG (a1 b9) の沈降線が阻止されて短くなるはずで、そのような現象は見出されなかったことから Fab (a3 b4) には充分量の抗原が存在していないと考えられた。Hare 抗 a1 b4 をウサギ IgG の Fc で吸収すると IgG (a1 b9) と IgG (a2 b4) 間の spur は著明になった (図 4 B)。

以上の結果から Hare 抗 a1 b4 は次の 3 種の抗体を含むことが知られた。(1) ウサギ IgG の Fc に対する抗体、(2) 全ての IgG おそらくは Fab 部分に共通する抗体、および (3) IgG (a1 b9) に特異な抗体。

次いで Hare 抗 a1 b4 に対する免疫電気泳動実験を行

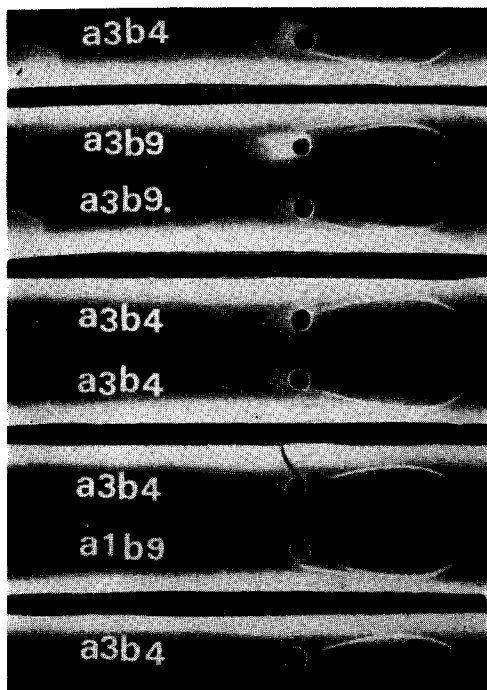


図5 Hare #2 抗ウサギ IgG (a1 b4) とウサギ正常血清との免疫電気泳動

溝には Hare #2 抗血清を入れた。正常血清のプロタイプは図中に示した通りである。

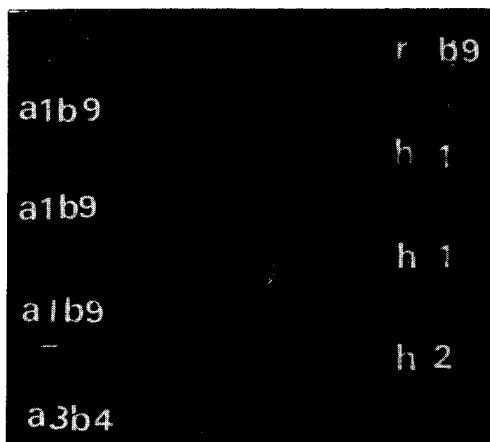


図6 ウサギ同種免疫による抗 b9 抗体, hare 免疫血清 #1, #2 の比較

- rb9: ウサギ抗 b9 抗血清
 h1: Hare #1 抗ウサギ IgG (a3 b9)
 h2: Hare #2 抗ウサギ IgG (a1 b4)
 a1 b9: a1 b9 の正常血清
 a3 b4: a3 b4 の正常血清

った。代表的な泳動図を図5に示す。この抗血清に対する沈降線は用いた抗原(ウサギ全血清)が b9 を含んでいる場合と含んでいない場合とでは明らかに異なっていることが示された。b9 抗原陽性の血清の場合には、抗原の穴よりも陽極側まで沈降線が伸びこれに加えて比較的均一な沈降線が陰極側に認められた。b9 陰性の血清との反応では主成分は逆になり陽極側に出る沈降線は出現しないかあるいは出現しても極めて弱かった。これらの結果を図4の結果と関係づけると、(3)のカテゴリーの抗体は b9 陽性の血清との反応の際の主な沈降線を形成し、(2)のカテゴリーの抗体は b9 陰性の血清との反応の際に主成分となる沈降線を形成することになる。したがって Hare 抗 a1 b4 中の(2)のカテゴリーに属する抗体は Hare 抗 a3 b9 の主成分と同一か否かが問題になろう。

そこでウサギ同種免疫により生成した抗 b9 抗血清, Hare 抗 a3 b9, および Hare 抗 a1 b4 の比較を行った。図6に示すようにウサギ抗 b9 と Hare 抗 a3 b9 は, a1 b9 を示す全血清と幅広い沈降線を形成し, 両抗血清に対応する IgG は幅広い電気泳動度を持っていた。Hare 抗 a1 b4 は a1 b9 血清とは2本の沈降線で反応し, そのうち1本は Hare 抗 a3 b9 およびウサギ抗 b9 と同一の不均一性を示したが, 他の1本は a3 b4 の血清と同じ移動度であった。

7. ウサギ抗 b9 抗体と hare 抗 a3 b9 抗体の対応抗原の異同

Hare 抗 a3 b9 は b9 を持つ IgG と特異的に反応するように見えたがこの点を更に検討するために a1 b5 b9 の

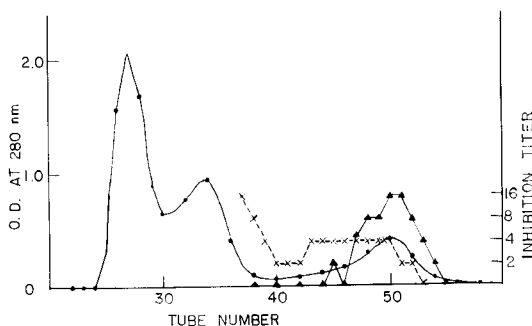


図7 ウサギ同種抗 b9 抗体と Hare #1 抗ウサギ IgG (a3 b9) の対応抗原の違い

175 mg のウサギ IgG (a1 b5 b9) を 0.3M 2-メルカプトエタノール還元, モノヨード酢酸にてアルキル化して 1M プロピオン酸中でセファデックス G-100 のカラムにかけた。

- 280 nm における吸光度
 ▲—▲ ウサギ同種抗 b9 の阻止活性
 ×—× hare #1 抗 IgG (a3 b9) の阻止活性

アロタイプを持つ IgG を還元アルキル化し、セファデックス G100 のカラムで分画した。得られたフラクションを pH 8.0 生食で透析し、タンニン酸法で a3 b9 IgG を吸着したヒツジ赤血球と抗血清との反応を阻止するか否かを調べた。ウサギ同種免疫による抗 b9 抗体は L 鎖の部位 (ここは K_B 鎖を含む) に一致して阻止されたが、Hare 抗 a3 b9 のとの反応は K_B 鎖より早く溶出する部位に阻止活性が認められた。したがってウサギ抗 b9 抗体と Hare 抗 a3 b9 の対応抗原は異なるといえよう。

考 察

ウサギとノウサギは同じ科に属する動物であるが、ウサギ科はアナウサギ属、ノウサギ属などを含み、いわゆるウサギ (rabbit) は前者、エゾユキウサギは後者に属する。

Hare の免疫グロブリンの抗原性はウサギの免疫グロブリンのそれとよく似ており、ことに Fab 部分の共通性が著明であった (図 1)。本研究において、エゾユキウサギ血清中にウサギのアロタイプ抗原と交叉反応する抗原は見出されなかったが、より敏感な方法を用いれば今後検出可能であるかもしれない。事実 Landucci-Tosi ら²⁵⁾、Rodkey ら^{26)~29)} は a 座、b 座、de 座のアロタイプ抗原と交叉反応する抗原をノウサギに見出している。しかし Hare においては対立形質として存在しては *isotype* の形をとっているという²⁵⁾。

本研究では Hare を a 座、b 座のアロタイプ既知のウサギ IgG で免疫し、生成された抗ウサギ IgG の性質を調べた。ウサギ IgG を構成するペプチド鎖 (H 鎖、L 鎖) の遺伝的多形性については多くの事実が知られているのでまずそれらをまとめて述べ、それに基づいて Hare の抗ウサギ IgG 抗体の特異性を考察したい。

ウサギ IgG の H 鎖 (γ 鎖) の定常部は一つの遺伝子座があるのみで、IgG のサブクラスは存在しないと考えられている。この遺伝子座に de 座と呼ばれる突然変異部位が存在する。これに対し H 鎖の可変部は互いに連関した 3 つの遺伝子座 (a 座、x 座および y 座) によって支配され、この 3 つの遺伝子座がどれほど重複しているかは謎である^{21)~23)}。これら a 座、x 座および y 座はヒト免疫グロブリンの可変部にみられるサブグループと同じものと言われる。すなわち正常ウサギの IgG を通常の方法で分離精製すると 70~90% の IgG は a 座の抗原を持ち、残りは a 座の抗原を持たず x 座あるいは y 座の抗原を持つ。L 鎖はより複雑な遺伝支配を受けており、L 鎖の中の κ 鎖と λ 鎖は独立した遺伝子の支配を受けている。この事実は b 座と c 座の遺伝解析から証明され

た^{11),12)}。さらに κ 鎖は構造上 K_A 鎖 K_B 鎖とに分かれ K_A 鎖は 5 個の 1/2 シスチンを持つが K_B 鎖は 7 個の 1/2 シスチンを持つ^{33),34)}。正常 IgG 中の K_A 鎖、K_B 鎖、λ 鎖の比率は個体により異なり、しかも κ 鎖のアロタイプ (b 座のアロタイプ) 遺伝子により制御される³⁴⁾。b 座が b⁴、b⁵ あるいは b⁶ の対立遺伝子を持つときは K_B の比率が高く、70~90% になるが、b 座が b⁹ の対立遺伝子を持つときは K_B 鎖の比率は低く b⁹ のウサギでは λ 鎖: K_A 鎖: K_B 鎖の比は 1:1:1 に近い。K_A 鎖と K_B 鎖はウサギ同種免疫による抗 b₄、抗 b₅、抗 b₆、抗 b₉ 抗体では抗原性の区別がつかない。

以上の事実から a3 b9 のウサギ IgG の L 鎖は λ 鎖 (b9(-)), K_A 鎖 (b9(+)), K_B 鎖 (b9(+)) が似た量づつ存在していることが推測される。これに対し a1 b4 のウサギ IgG の L 鎖は殆んどが K_B 鎖 (b4(+)) で λ 鎖 (b4(-)), K_A 鎖 (b4(+)) の占める割合は少ない。これに対し、精製した均一抗体は K_A 鎖か K_B 鎖の何れかにより構成されているはずで、本実験で用いた a2 b4 の IgG は恐らくは K_B 鎖と思われる。

Reisfeld のグループの報告によると^{33),34)} λ 鎖と K_A 鎖は通常の物理的分析法では区別し難いという。すなわち、電気泳動的に λ 鎖と K_A 鎖を持つ IgG は酸性側から塩基性側へ幅広い易動度を持ち不均一性が高いが K_B 鎖は比較的低い不均一性を持ち塩基性が高い。また還元アルキル化などによって H 鎖から分離した L 鎖はゲル内拡散法により 2 つのピークとして得られ、通常 L 鎖の位置と呼ばれるピークは K_B 鎖のみが溶出し、λ 鎖と K_A 鎖は K_B 鎖の前に小ピーク又は台状に存在している。

Hare 抗 a3 b9 の抗体は抗 Fc 抗体も少量含んでいるが (赤血球凝集阻止反応で Fc による阻止を認めた) その主成分は L 鎖の抗原決定基に対応している。しかし図 6、図 7 の結果からこの抗 L 抗体は抗 λ かあるいは抗 K_A の何れかであろうと考えられる。b9(-) の IgG と沈降線を形成しなかったのは b₄、b₅ の IgG は λ 鎖および K_A 鎖の比率が低いためと考えることができる。

Hare 抗 a1 b4 は (1) 抗 Fc、(2) 抗 K_B、(3) 抗 K_A 又は抗 λ の 3 群の抗体に分けて考えることができる。ここで注目したいのは K_B に対応する沈降線が図 5 ではっきりと見出され、Hare #2 は K_A 鎖と K_B 鎖の抗原を区別したと考えられることである。もし K_A 鎖と K_B 鎖が同じ抗原構造であるならばもっとも陰極側に寄った幅狭い沈降線は出現しないであろう。

Hare #1 が K_B 鎖に対する抗体を生成しなかった理由は免疫に用いた IgG (a3 b9) 中の K_B 鎖の比率が比較的少量 (恐らくは IgG、a1 b4 の半分以下) であり K_B 鎖の

抗原性は余り強くないことによるであろう。また Hare 抗 a1 b4 の (3) のカテゴリーに属する抗体の特異性を決定するためには λ 鎖, K_A 鎖を精製する必要があるであろう。

結 語

1. エゾユキウサギの IgG はウサギ IgG と共通抗原を持ち, Fc 部分, Fab 部分に共通抗原が見出された。

2. エゾユキウサギをウサギ IgG で免疫したところ 3 種類の抗体が生成された。(1) 抗ウサギ Fc 抗体, (2) 抗ウサギ K_B 鎖, (3) 抗ウサギ K_A 鎖か 抗ウサギ λ 鎖の何れか。

3. 第3のカテゴリーに属する抗体は λ 鎖に対応するか K_A 鎖に対応するか決定できなかつた。しかし第2のカテゴリーに属する抗 K_B 鎖抗体の存在はエゾユキウサギがウサギ λ 鎖のサブタイプを識別できることを示唆している。

本研究を行なうにあたりエゾユキウサギを提供された農林省家畜衛生試験場札幌支場横溝祐一氏, エゾユキウサギを飼育された本研究所動物実験室田中正氏および精製抗体を提供された Dr. T. D. Kindt に深謝する。

文 献

- 1) Oudin, J.: *J. Cell Physiol.*, **67**, Suppl. **1**, 77, 1966.
- 2) Mage, R., Lieberman, R., Potter, M. and Terry, W. D.: *Immunoglobulin Allotypes*, in "The Antigens I" p. 299, Sela, M. editor, Academic Press, 1973.
- 3) Kindt, T. J.: *Adv. Immunol.*, **21**, 35, 1975.
- 4) Oudin, J.: *J. Exper. Med.* **112**, 107, 1960., *ibid.*, **112**, 125, 1960.
- 5) Koshland, M. E.: *Cold Spring Harbor, Symp.* **32**, 119, 1967.
- 6) Wilkinson, J. M.: *Biochem. J.*, **112**, 173, 1969.
- 7) Mole, L. E., Jackson, S. A., Porter, R. R. and Wilkinson, J. M.: *Biochem. J.*, **124**, 301, 1971.
- 8) Dubiski, S. and Muller, P. J.: *Nature*, **214**, 696, 1967.
- 9) Reisfeld, R. A., Dray, S. and Nisonoff, A.: *Immunochem.*, **2**, 155, 1965.
- 10) Appella, E., Mage, R., Dubiski, S. and Reisfeld, R. A.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.*, **60**, 975, 1968.
- 11) Dray, S., Young, G. O. and Gerald, L.: *J. Immunol.*, **91**, 403, 1963.
- 12) Gilman-Sachs, A., Mage, R. G., Young, G. O., Alexander, C. and Dray, S.: *J. Immunol.*, **103**, 1159, 1969.
- 13) Mandy, W. J. and Todd, C. W.: *Vox Sang.*, **14**, 264, 1968.
- 14) Kindt, T. J., Mandy, W. J. and Todd, C. W.: *Biochemistry*, **9**, 2028, 1970.
- 15) Dubiski, S.: *J. Immunol.*, **103**, 120, 1969.
- 16) Appella, E., Chersi, A., Mage, R. G. and Dubiski, S.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, **68**, 1341, 1971.
- 17) Conway, T. P., Dray, S. and Lichter, E. A.: *J. Immunol.*, **102**, 544, 1969.
- 18) Conway, T. P., Dray, S. and Lichter, E. A.: *J. Immunol.*, **103**, 662, 1969.
- 19) Hanly, W. C., Lichter, E. A., Dray, S. and Knight, K. L.: *Biochemistry*, **12**, 733, 1973.
- 20) Gilman-Sachs, A. and Dray, S.: *Eur. J. Immunol.*, **2**, 505, 1973.
- 21) Vice, J. L., Gilman-Sachs, A., Hunt, W. L. and Dray, S.: *J. Immunol.*, **104**, 550, 1970.
- 22) Knight, K. L., Gilman-Sachs, A., Fields, R. and Dray, S.: *J. Immunol.*, **106**, 761, 1971.
- 23) Kim, B. S. and Dray, S.: *Eur. J. Immunol.*, **2**, 509, 1972.
- 24) Kelus, A. S. and Gell, P. G. H.: *Progresses Allergy*, **11**, 141, 1967.
- 25) Landucci-Tosi, S., Tosi, R. and Perramon, A.: *J. Immunol.*, **111**, 286, 1973.
- 26) Rodkey, L. S. and Conrad, A. H.: *J. Immunol.*, **109**, 342, 1972.
- 27) Conrad, A. H. and Rodkey, L. S.: *J. Immunol.*, **110**, 613, 1973.
- 28) Rodkey, L. S. and Hansen, E.: *J. Immunol.*, **110**, 943, 1973.
- 29) Mandy, W. J. and Rodkey, L. S.: *Immunochem.*, **11**, 29, 1974.
- 30) Kakinuma, M.: *J. Immunol.*, **106**, 1095, 1971.
- 31) Fleischman, J. B., Pain, R. H. and Porter, R. R.: *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.*, **1**, 174, 1962.
- 32) Kakinuma, M.: *J. Immunol.* **112**, 830, 1974.
- 33) Rejnek, J., Mage, R. G. and Reisfeld, R. A.: *J. Immunol.*, **102**, 449, 1969.
- 34) Rejnek, J., Appella, E., Mage, R. G. and Reisfeld, R. A.: *Biochemistry*, **8**, 2712, 1969.

Specificity of antisera against rabbit IgG produced in hares

Mitsuaki KAKINUMA, Takayuki SASAKI and Tohru OHARA

1. Common antigenic determinants of IgG shared by rabbit and hare were studied by gel diffusion and immunoelectrophoresis. Cross-reactivity was observed in both Fc and Fab fragments between the two species.

2. Upon immunization of two hares with rabbit IgG three kinds of antibodies were obtained; (a) anti-K_B (a subtype of rabbit kappa chain), (b) anti-Fc and (c) an unidentified antibody class which was directed against either K_A chain or λ chain.

3. The evidence that K_B chain was distinguished from K_A chain by antibodies produced in a hare suggests that K_A and K_B chains may have distinct antigenic specificities.