HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ウサギ抗ヒト血清アルブミン(HSA)抗体のavidityに及ぼすサルモネラ菌の影響について
Author(s)	木村, 卓郎
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 39, 52-57
Issue Date	1979-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26525
Type	departmental bulletin paper
File Information	39_P52-57.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ウサギ抗ヒト血清アルブミン (HSA) 抗体の avidity に及ぼすサルモネラ菌の影響について

木村卓郎
(北海道大学免疫科学研究所血清学部門)

(昭和53年11月20日受付)

抗原刺激を受けた個体は，一般に免疫の経過と共に次第に affinity (avidity) の高い抗体を産生することが知られている[1]。この現象は免疫の“maturation”と呼ばれ，最初に用いられた抗原量が少ない場合，affinity の昂進は特に著しい。かかる affinity の強弱は，抗体の結合定数を測定することによって求められるが，相対的な比較を行うには Celada ら[2]によって報告された方法が簡便であろうと思われる。Celada らは，ヒト血清アルブミン (HSA) の50%と結合する抗 HSA 血清量が，抗原の 3 log unit 以上に亘る変量に対して直線関係を示し，この直線の slope は各血清に特有であり，且この slope (s で表わす) は各血清の avidity を示すものであることを観察した。s は0から1までの値を取る index で，s の値が小さいほど抗原稀釈の影響を強く受けること，換言すれば affinity が低いことを意味し，s が1に近づけば抗原稀釈の影響が少ないこと，すなわち affinity が高いことを意味する。Celada らの研究は whole serum (分画しない血清) について avidity の変化を求めたものであるが，われわれは，抗血清を IgM 画分と IgG 画分に分画した後，IgM と IgG のそれぞれについて彼らの方法で avidity を調べ，併せて IgM 抗体産生増強作用を持つサルモネラ菌が抗体の affinity にどのような影響を持つかを調べようと試みた。先にわれわれは[3,4]，IgM 抗体の Farr test における抗原結合能が IgG 抗体のそれに比し極めて低いことを報告したが，今回の実験においては，適当に濃縮した IgM 画分が免疫初期において IgG 画分と比較し得べき値を示すこと，S. typhimurium に結合させた HSA は免疫初期より avidity の高い抗体を産生せしめることを観察したので，ここにその成績を報告する。

実験材料並びに方法

抗原： 免疫原として用いた HSA は ICN pharmaceuticals Inc (U.S.A) の製品で，Likhite ら[5]の記載する赤血球感作の方法 (BDB 法) をサルモネラ菌に準用して，これに S. typhimurium を結合せしめた。すなわち，560 mμ において吸光度 1.000 を与える濁度の菌浮遊液を作り (この濁度は別に求めた標準曲線によると，菌乾燥重量 20 mg/mℓ に相当する)，その 10 mℓ に対し 10 mg/mℓ の HSA 溶液を同量加え，更に冷燐酸緩衝液で15倍に稀釈した BDB 4 mℓ を加えて室温に15分放置した後これを PBS で洗滌，最後にこれを PBS 10 mℓ に浮遊せしめたものを免疫原とした (以下 HSA-S. tm)。この標品は放射性ヨード標識 HSA を用いた実験によると，菌浮遊液 1 mℓ につき乾燥菌重量 19 mg 当り HSA 1.2 mg の結合比を示すものである。なお BDB 処理の HSA に及ぼす影響をチェックするため，10 mg/mℓ の HSA 10 mℓ を BDB で処理し，反応終了時にチロシン 2 mg を添加後セファデックス G 100 を通過せしめ，溶出した蛋白部分を集めて HSA-S. tm の対照とした (以下 BDB-HSA)。

免疫法： 免疫動物には体重 2.5～3 kg の白色アルビノ家兎を用い，HSA-S. tm は adjuvant なしに，BDB-HSA は水酸化アルミニウムゲルに混じて，それぞれ足蹠皮下に注射した。接種した HSA の量は HSA-S. tm 群では1頭あたり 1.2 mg，BDB-HSA 群では 1.0 mg である。免疫後 day 7, 11, 15, 70 に耳静脈から採血して抗血清を得たほか，day 70 に初回免疫と同量の抗原で追加免疫を行いその6日目 (day 76) に二次抗血清を採取した (以下 B 6)。

IgM, IgG 抗体の分離： Sephadex G 200 を用い，Flodin and Killander[6] の方法によって IgM 抗体と IgG 抗体の分離を行った。両抗体の purity をチェックするためには immunoelectrophorisis によってそれぞれ所定の位置に1本の沈降線しか生じないことを観察したほか，IgM 抗体は 2 ME によって失活するのに反し，IgG 抗体には影響がないことを確かめた。

間接赤血球凝集反応による抗体価 (HA 価) の測定： Stavitsky[7] の方法に従い，彼の criteria における 2 plus pattern を endpoint として成績を判定した。

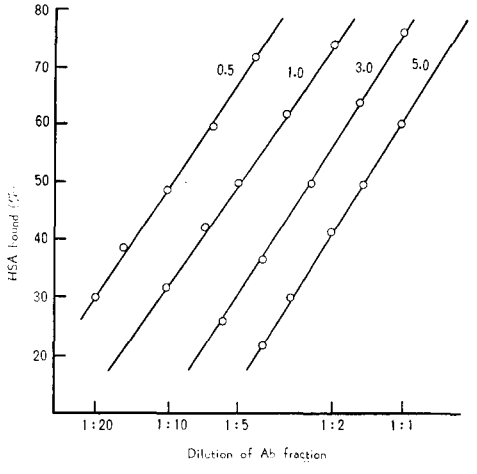
Antigen-binding capacity (ABC) の測定： Farr の方法[8]に従った。

avidity index の測定: Celada ら[2] の方法を IgM 画分, IgG 画分に適用した。すなわち倍数稀釈した両画分について種々な抗原濃度で ABC 測定を行い, 抗原の 50% を結合する抗原画分濃度の対数をその時の抗原濃度の対数に対してプロットすると直線が得られるが, この直線の slope, s をもって avidity index とした。

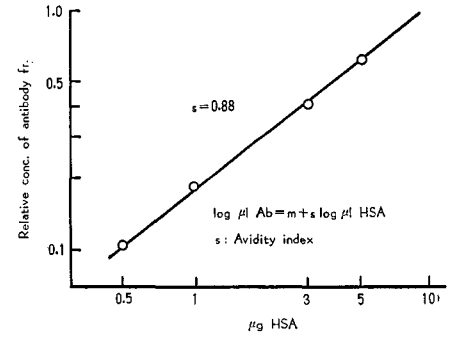
実験成績

実験 1. avidity 測定における抗原, 抗体の量的関係

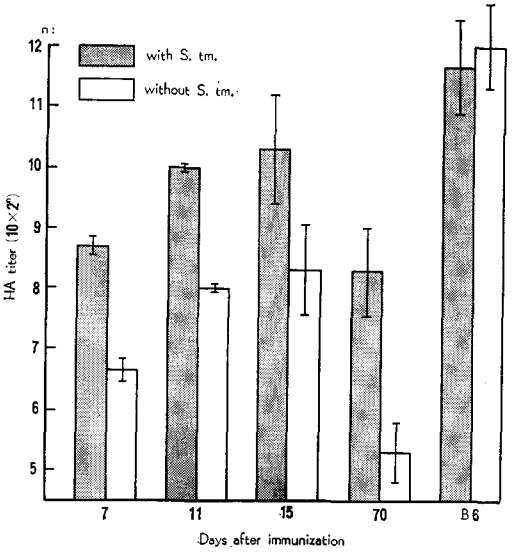
分画された IgM 及び IgG 画分はゲル濾過によって, 稀釈され, 特に IgM 抗体は量的に乏しいため, 正確に avidity を測るには, ある程度これを濃縮する必要がある。そのため titration に当っては pressure dialysis によって両画分を原量のほぼ 1/10 量まで concentrate して用いた。従ってわれわれは先ず予備試験として抗体濃度の影響を調べると共に色々な濃度(量)の抗原に対して titration を行い, 結合 pattern がどのような形をとるかを観察した。図-1 はその 1 例を示したものである。用いた抗血清はウサギ #2 の IgM fraction を約 10 倍に濃縮したものでこれを 1 として 2 倍, 3 倍…と 20 倍に至るまで稀釈し, HSA 量 0.5, 1.0, 3,0, 5.0 μg の 4 段階に対する binding pattern を求めた。横軸は対数目盛による抗血清濃度, 縦軸は抗原の結合パーセントを表わす。図から明らかなようにいろいろな血清稀釈に一定量の抗原を加えて titrate した場合, 各 reaction mixture における結合抗原のパーセントはほぼ一直線上に並び, 且結合曲線はどの抗原濃度で調べた場合にも同じ傾斜を示した。いま図-1 の curve から抗原の 50% を結合するに必要な抗血清量 ($\mu\ell$) を, 両対数紙上で reaction mixture 中の HSA 量 (μg) に対してプロットすると, 図-2 に示すような直線が得られる。この直線の傾斜 s が小さな値を取るときは, reactant の濃度が減少するにつれて結合の効率が悪くなることを意味し, s の値が大きく 1 に近ければ稀釈の影響がないことを意味する。従ってs は, 血清間 (ないし fraction 間) の avidity を比較するための相対的な指標として用い得る。なおs を求める直線を得るには 3 点以上の測定が望ましいけれども, 図-1 に示した如く, 各測定点はほとんど例外なく一直線上に並ぶので (他の sample についても同様), 以下の測定は抗原量 1 μg 及び 10 μg の 2 点のみについて行った。少なくとも本実験に用いた狭い濃度範囲に関する限り, かかる測定と数点を結ぶ測定の間にさしたる誤差のないことは予備段階において確かめられている。



図—1 抗原および抗体の量比変化による抗原結合 pattern



図—2 反応液中の抗原量と抗体 ABC の関係 (avidity index, s の求め方)



図—3 抗 HSA 抗体産生に及ぼす *S. typhimurium* の影響

実験 2. 抗 HSA 抗体産生に及ぼす S. tm の影響

抗原をそのまま与えた場合とこれを S. tm に結合させて与えた場合とでは抗体産生能に差違が認められるか否かを調べるため，両抗原に対する抗体価を間接赤血球凝集反応によって比較した。図-3は HSA-S. tm 免疫群と BDB-HSA 免疫群の平均 HA 価を経時的に示したものである。これによると，免疫後7日から70日に亘って，S. tm を結合させた抗原は然らざるものに較べ，どの時期においても強い抗体応答を示した。すなわち HSA-S. tm による平均抗体価は対照に比して4倍ないし8倍の高値を示し，その差は推計学的に有意である。しかし booster 後6日目に調べた二次応答においては，両群の間にほとんど差を認めなかった。

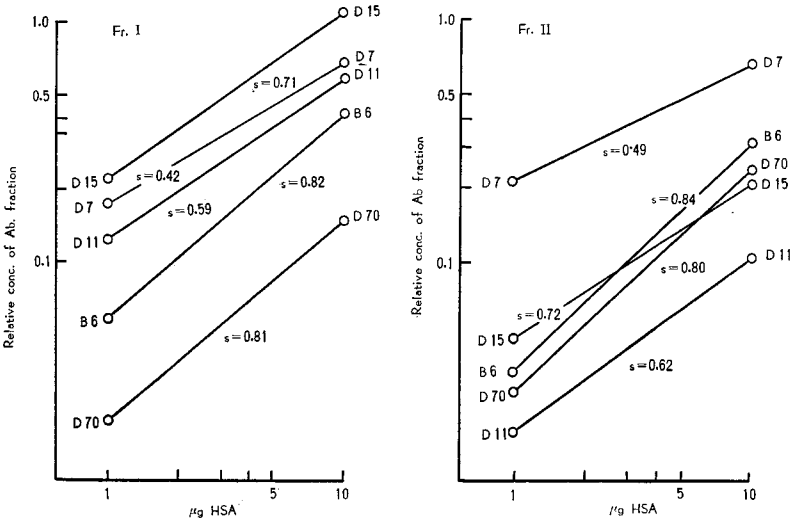
実験 3. S. tm の avidity に及ぼす影響

前実験において S. tm は抗体応答特に，その一次応答を増強せしめる働きを持つことが分ったので，この菌は抗体の avidity にもまた影響を与えるかどうかを次に調べた。この場合，もし影響を与えるとすれば免疫グロブリンのクラスによる差がみられるか否かを併せて検討するため，抗血清を IgM 画分と IgG 画分に分けた後それぞれについて avidity の測定を行った。結果は纏めて表-1に掲げたが，両群についてその1例 (HSA-S. tm 群：#412，BDB-HSA 群：#434) を図-4 及び図-5に示す。図から明らかなように，HSA-S. tm で免疫されたウサギ (#412) は免疫の初期から比較的高い avidity を示しているのに対し (図-4)，S. tm の結合していない抗原で免疫されたウサギは免疫7日目において指標を測定できず (表-1においては0と表示)，免疫11日目に至っても avidity は極めて低い (図-5)。すなわち S. tm は抗体の量に影響を与えるばかりでなく，その質 (avidity) にも大きな影響を与える。各 fraction の avidity は，これを経時的に追ってみると，表-1にみる如く両群とも

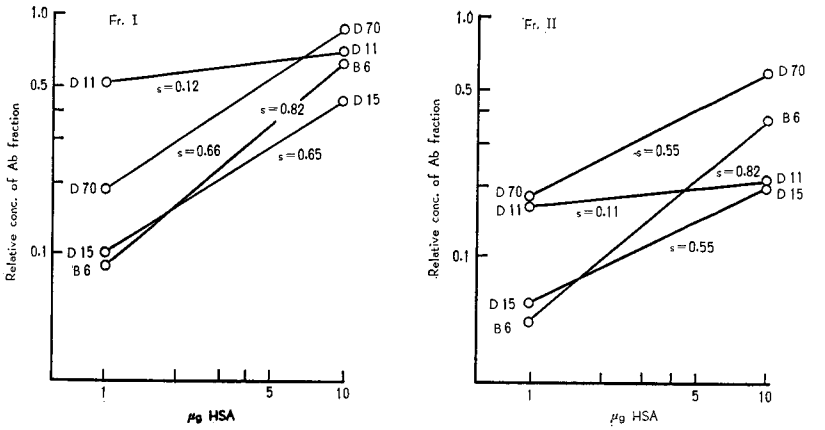
表—1 免疫経過に伴う avidity の経時的変化* と S. tm の影響

Days after antigen	Anti-HSA-S. tm						Anti-BDB-HSA					
	#412		#415		#417		#434		#440		#445	
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
7	.42	.49	.58	.44	.32	0	0	0	0	0	0	0
11	.59	.62	.55	.63	.48	.40	.12	.11	.12	.14	.13	.10
15	.71	.72	.82	.88	.80	.72	.65	.55	.62	.48	.55	.48
70	.81	.80	.89	.82	.83	.82	.66	.55	.58	.55	.61	.58
76	.82	.84	.81	.84	.83	.80	.82	.82	.90	.81	.84	.82

* 表中の数字は avidity index, s の値を示す。



図—4 HSA-S. tm 免疫ウサギ (#412) における avidity の経時的変化



図—5　BDB-HSA 免疫ウサギ (#434) における avidity の経時的変化

免疫の経過と共に次第に高くなって行くことが分る。興味ある点は，抗体量が初回注射後 70 日に至るとかなり減少するのに反し，avidity はこの時期においてなお最高値を維持していることである。ただし抗体の抗原結合能は大体この時期までに頂点に達し，追加免疫によってそれ以上 avidity の増大は認められなかった。一方 IgM 画分と IgG 画分の avidity を比較してみるに両者の間に有意の差はみられない。このことは HSA-S. tm 免疫群と BDB-HSA 免疫群のいずれにおいても同様で，S. tm は全体的に avidity 増強作用を持つけれども，特定の免疫グロブリンクラスに選択的に働くことはないようである。

考　　察

抗 HSA 抗体応答において，抗原に結合せしめた S. tm は抗体産生量の増大と avidity の増強をもたらすことが，今回の実験によって明らかにされた。サルモネラ属菌ないしこれより抽出した lipopolysaccharide (LPS) が選択的に IgM 抗体産生を促すことは既に知られているが，avidity に与える影響については，従来ほとんど報告を見ない。この点われわれのデータは甚だ興味あるものと言ってよかろう。サルモネラ属菌の LPS は B cell mitogen であり，且 polyclonal B cell activator でもあるから，S. tm 結合によって抗体産生が増大することは容易に予想がつく。しかもわれわれの今回用いた抗体測定法が HA であり，この方法はサルモネラに特有な IgM 抗体の検出に対して特に鋭敏である[3]ことを考えれば，免疫初期からの抗体価上昇は不思議でない。しかし同時に avidity も上昇するメカニズムはどのように考えるべきであろうか？一般的に言うと avidity の上昇は抗原に対して親和性の高い細胞ないしクローンが選択されることに帰因し，このような細胞は少量の抗原によって刺激され得る。従って免疫の maturation が起る理由は (i) 抗原に応答する細胞集団が免疫の過程中に select されて行き免疫が進んだ後期には "high affinity" を持つ細胞だけが存在するのか，(ii) 既につくられた体液性ないし細胞鉤着性抗体によって抗原量は次第に減少し，免疫後期に残存する微量の抗原は "high affinity cell" のみによって捕捉されるため，のいずれかであろう。そのいずれであるにせよ，S. tm によって抗体の avidity が免疫初期から既に高い価を示すことのメカニズムは分らない。今後に残された問題と考える。

IgM と IgG 間における avidity の比較に関しては，本実験において格別な差違は見いだせなかった。元来 IgM 抗体と IgG 抗体の avidity は一般にいずれが強いか，という点に関して諸家の報告は甚だまちまちである。先ず IgM の方が IgG より強いという成績を得たものを文献的に拾ってみると，Finkelstein ら[9]はバクテリオファージ ϕX174 抗体について，Greenbury[10]，Goodman ら[11]はヒトまたはヒツジ血球に対するウサギ抗体について，Taliaferro ら[12]は Forssman 抗体について，また Webster[13]はインフルエンザ抗体について，いずれも IgM 抗体の方が avidity の強いことを観察している。これと反対に，Raynaud[14]はジフテリア抗毒素について，Robbins ら[15]は S. typhimurium 抗体について，Svehag[16]はポリオ中和抗体について，それぞれ IgG 抗体の方が IgM 抗体より avidity が強いのを認めた。われわれと同じく両者の間に差を認めない報告としては Grey のものがあり，BSA に対するウサギ抗体について彼が調べたところによると，同時期の IgM 抗体と IgG 抗体は dissociation constant が同じであり，従って両者の avidity は等しいものとみなされる。

これら成績の不一致が抗原の差によるものか，手技的なもの，或いはその他の理由によるものか遽かに判断することは難かしい。ここでは先人の意見が分れていることを記すると共に，われわれのデータではS.tmの有無に拘らずIgM, IgG両画分のavidityはcomparableなものであったことを記するに止める。

最後にavidity測定の方法論について言及しよう。Celadaらの報告[2]に従った本実験の方法は，抗体（又はその画分）のavidityを稀釈しない抗血清1 mℓの結合する抗原量（Farrの原法）として表わしたものでもなく，またこれより結合定数を求めたものでもない。図-2の如くプロットした直線からその傾斜sを求めてavidityの指標としたもので，この意味で相対的な比較である。Celadaらはこの図によって経験的に次の関係式を導き出した。

$$\log \mu\ell\ \mathrm{Ab} = \mathrm{m} + \mathrm{s} \log \mu\mathrm{g\ Ag}.$$

ここに$\mu\ell$ Abは加えられた抗原（μg Ag）の50%を結合するに要する抗血清量，mはAg=0（すなわち1 μg HSA）における縦軸のintercept, sはこの直線のslopeである。Celadaらの方法は1969年に発表されたものであるが，彼らの経験式は限定された狭い濃度範囲にしかあてはまらない。Celadaらの報告に啓発されてか，1975年にPaul and Elfenbein[17]はハプテン・抗ハプテン系において抗体の全結合部位を測ることなしに結合定数を計算する簡単な方法を発表し，更に最近（1977）Nahmら[18]もこれと違ったアプローチでaffinity constantを求める方法を紹介している。後者によると抗原（彼らの用いたのはDNP-L-lysine）の広い範囲に亘ってtitrationを行った場合，ligand濃度Hが1/Kより濃い部分と1/K以下の部分とでは異ったslopeが得られnonlinear portionから平均のaffinity constantが求められる。HSAのような多価の抗原と抗体の反応は極めて複雑であるから，Celada及びわれわれがここに行った方法は，たとえ一価のligandを用いたとしても，不均一な抗体のpopulationに対し明白なavidityの価を与えたとは断言できないかも知れない。われわれの測定はNahmらにおけるintersection pointより左側のslope，すなわちややavidityの高いantibody populationについて相対的な比較を行ったもので，個々の値に多少の誤差はあろうとも，それが結論に影響を与えるほど大きなものでないことは確かである。

結　論

HSAに対するウサギの抗体応答において，S. typhimuriumは抗体産生量及びavidityにどのような影響を与えるかを経時的に調べ，次の結論を得た。1) HSAと結合したS.tmは抗体産生を増強せしめ，免疫初期からavidityの高い抗体を作らせる働きを持つ。すなわちS.tmは抗体の量ばかりでなく，質に対しても影響を示した。2) S.tmの存否に拘らず，抗体のavidityは免疫の経過と共に上昇し，免疫のmaturationと呼ばれる現象が確かめられた。3) IgM抗体とIgG抗体との間に，HSAに対する親和性の差は認められなかった。

引用文献

1) Eisen, H. and Siskind, G. W.: Biochemistry, **3**, 996, 1964.
2) Celada, F., Schmidt, D. and Strom, R.: Immunology, **17**, 189, 1969.
3) 大原　達，木村卓郎：結核の研究，27-28集，35，昭43，1698.
4) 大原　達，木村卓郎，清水正秀：結核の研究，31，集39，昭46，1971.
5) Likhite, V. and Sehon, A.: In "Methods in Immunology and Immunochemistry" (Williams, C. A. & Chase, M. W. eds), Vol. 1, p. 164, Academic Press, 1967.
6) Flodin, P. and Killander, J.: Biochem. Biophys. Acta., **63**, 403, 1962.
7) Stavitsky, A. B.: J. Immunology, **72**, 360, 1954.
8) Farr, R. S.: J. Inf. Dis., **103**, 239, 1958.
9) Finkelstein, M. S. and Uhr, J. W.: J. Immunol., **97**, 565, 1966.
10) Greenbury, C. L., Moore, D. H. and Num, L. A. C.: Immunology, **6**, 421, 1961.
11) Goodman, H. S. and Masaitis, L.: J. Immunol., **85**, 391, 1960.
12) Taliaferro, W. H. and Taliaferro, L. G.: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **47**, 713, 1961.
13) Webster, R. G.: Immunology, **14**, 39, 1968.
14) Raynaud, M.: "Mechanisms of Hypersensitivity" (Shaffer, J. H. et al., Eds.), Little, Brown & Co., Boston. pp. 27-46, 1959.
15) Robbins, J. B., Kenny, K. and Suter, E.: J. Exp. Med., **122**, 385, 1965.
16) Svehag, S.: Virology, **18**, 508, 1962.
17) Paul, W. E. and Elfenbein, G. J.: J. Immunol., **114**, 261, 1975.
18) Nahm, M. H. Herzenberg, L. A., Little, K. and Little, J. R.: J. Immunol., **119**, 301, 1977.

Effect of Salmonella typhimurium on the Avidity of the Anti-Human Serum Albumin (HSA) Antibody in the Rabbit

Takuro KIMURA

1) S. typhimurium bound to HSA showed a marked enhancing effect for anti-HSA antibody formation in rabbits. In addition, animals stimulated by Salmonella-coupled antigen produced very high avidity antibodies consecutively from early stage of immunization. That is, S. typhimurium exerts a great influence not only on the quantities of antibodies but also qualities as well.

2) Avidities of the antibody increased progressively with the process of immunization, irrespective of the presence or absence of Salmonella, thus being confirmed the phenomenon referred to as "maturation of immunity".

3) No difference of avidities against HSA was observed between IgM and IgG fractions of the antibody.