HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Farr testにおけるγM抗体の抗原結合能について
Author(s)	大原, 達; 木村, 卓郎; 清水, 正秀
Description	
Citation	結核の研究, 31, 39-43
Issue Date	1971
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26812
Type	departmental bulletin paper
File Information	31_P39-43.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Farr test における γM 抗体の抗原結合能について

大原達
木村卓郎
清水正秀
(北海道大学結核究研所細菌部)

γM 抗体と γG 抗体は，いろいろな immunoassay に対して異った態度を示すことが知られている。その詳細に関しては著者らの1人大原の綜説[1]に譲るが，1例を挙げれば，γM 抗体は凝集反応や溶血反応において極めて鋭敏に反応するにも拘らず，沈降反応や PCA においては感度が甚だ低いかあるいは全く活性を有せず，γG 抗体はこれと概ね反対の成績を示す。更にわれわれは，先の実験[2]において HSA に対する γM 抗体と γG 抗体の antigen-binding capacity (以下 ABC) を Farr の方法によって比較し，前者は Farr test における感度が極めて低い事を観察した。すなわち間接赤血球凝集反応 (以下 HA) において高力価を示した γM 抗体も，Farr test においてはこれを高度に濃縮した場合ですら反応陰性に終ることが多く，γG 抗体は HA 価が低いものでも Farr test では高い力価を示す事が多い。これを数字的に見ると，γM 抗体は HA において γG の 50 倍から 350 倍の sensitivity を有するのに，Farr test における感度は γG の 100 分1以下に過ぎなかった。HA に較べて Farr test は抗原・抗体の結合をより直接的に観察する方法であり，γM 抗体は combining site の数が γG 抗体よりも多い事を考えれば，γM の ABC が γG のそれより遙かに劣る事は興味ある事実と言わなければならない。そのメカニズムは不明であるが，次の3点を考えてみる必要があると思われる。

先ず第1に，抗 HSA-γM 抗体は steric hindrance その他の理由により，combining site が有効に使われず，分子全体として十分量の抗原を結合し得ないのではないか，と言う可能性が考えられよう。第2に，γM 抗体と抗原との complex が，Farr の原法における 50 %硫安によって，γG 抗体の場合と同じ効率で沈降を起すか否かが問題になる。第3には，γM 抗体の場合抗原に対する avidity が低く，一旦生じた complex が反応の途中で解離を起し，その結果陰性の成績に終るのではないか，と言う可能性を考え得る。

われわれは Farr test における γM 抗体の non-reactivity について，そのメカニズムの一端を明らかにする目的で以下の如き実験を行った。結果的には，negative な data しか得られず，機序の解明に関しては依然として不明の部分が多いけれども，ここに得たる成績を報告したいと思う。

実験材料並びに方法

免疫血清の調製，分画，精製ならびに反応実施法等はすべて以前の報告と同じなので，ここではごく簡単な記載に止める。

1) 免疫法：水酸化アルミニウム・ゲルに混じた 20 mg の HSA を体重 2.5～3 kg の白色ウサギ (雌雄混合) の足蹠皮下に注射，免疫7日，9日，12日，15日後の血清を採取した。

2) γM 抗体および γG 抗体の分離：抗血清はすべて非働化し寒冷飽和によって正常血球凝集素を除いた後，蔗糖密度勾配超遠心法および Sephadex G 200 によるゲル濾過によって両クラスの分画を行った。なお特に抗体を濃縮する心要のある時は，pressure dialysis によって原量の略々 $1/10$ 量までこれを concentrate した。

3) 両クラス抗体の確認：分離した γM 抗体，γG 抗体が互に他の成分を含まぬ純粋なものである事を調べる為，immunoelectrophoresis 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確かめたほか，γM 抗体は 2-mercaptoethanol によって HA 活性を完全に失うのに反し，γG 抗体は影響を受けない事を観察した。

4) anti-γM, anti-γG の調製：ウサギ血清の γM fraction または γG fraction をそれぞれ Freund の adjuvant と共にヒツジの足蹠内に2回ないし3回接種，最後の注射より 10 日後に採取した免疫血清を実験に用いた。anti-γM, anti-γG は共に全血清のまま使用したが，互に他の counterpart を含まない事は immunoelectrophoresis によって確かめた。

5) HA 価の測定：Stavitsky[3] 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。

6）ABC 価の測定：大体 Farr の原法[4] に準じたが，ABC の測定は本論文の主要目的であるから，その方法を稍詳しく次に記述する。

i）分画した血清試料を適宜に倍数稀釈（多くの場合2倍，5倍，10倍，25倍，50倍の5段階。濃縮した試料については1250倍まで稀釈）して0.5 ml ずつ試験管に分注し，各 tube に ^{131}I でラベルした HSA の同量を加える。通常同じ倍数稀釈の set を3組用意し，第1の set には1 γN/ml の抗原を0.5 ml，第2の set には同じく0.1 γN/ml，第3の set には 0.01 γN/ml の抗原をそれぞれ加えた。使用した ^{131}I-HSA は市販のもの（第一化学薬品株式会社製）で，アルブミン濃度は10 mg/ml，放射能濃度は0.5～1.0 mc/ml である。血清稀釈には正常ウサギ血清を $^1/_{10}$ 量加えた borate buffer (pH 8.3)，抗原稀釈には正常ウサギ血清を $^1/_{100}$ 量加えた同じ buffer を用いた。ii）0～1°C に冷却した飽和硫安 (SAS) 1 ml をすべての試験管および10倍稀釈正常ウサギ血清のみを入れた control tube に加え，注加1分以内に全部を強く振盪混和する。iii）最後の SAS 注加が終ってから4°C に30分放置，次いで2000 rpm 30分遠沈して上清を捨てる。iv）沈渣を3 ml の50 % SAS に再浮游，2000 rpm 30分間遠沈して沈渣を洗い，この操作を更に2回繰り返す。v）最後の沈渣に0.5 N の NaOH を数滴加えてこれを溶かし，蒸溜水を加えて各試験管の容量を2.0 ml にする。vi）各試験管ごとにその放射能をカウントし，background および非特異的沈降による修正を施した後，すべての試験管について加えられた抗原のうち特異的に沈降した部分の percentage を計算する。vii）片対数グラフの整数軸に前項のパーセント，対数軸にその時の血清稀釈の逆数を plot し，これらの点を結んで得た直線から，加えられた抗原の33 % を沈降せしめる血清稀釈を求める。viii）前項で得た血清稀釈の逆数を Dil-33%，加えられた抗原量を Ag とすれば，求める ABC＝Dil 33 % × Ag × 0.33 × 2 (γ/ml) である。

なお抗原・抗体 complex を沈降せしめるにあたって，上記原法の SAS に代り，γM 抗体の complex に対しては anti-γM，γG 抗体のそれに対しては anti-γG をそれぞれ用いて，全く同様の方法で ABC 力価を測定した。

実験成績

1. 同一抗原に対する両クラス抗体競合の有無について

前述の如く，われわれは先の報告において γM 抗体に富む初期免疫血清の ABC を測定し，殆んどの場合 Farr test 陰性である事を報告した。この場合量的な問題が考えられるので，濃縮血清について測定を繰り返したが結果は同じであつた。すなわち Farr test に関する限り，γM 抗体と対応抗原の間には結合が行われないかの如き成績が得られる。しかしながら特異抗体である以上，これが抗原結合能を欠くものとは考え難い。一方 Turner ら[5] は最近ファージ中和において，γM, γG 両抗体間に競合の見られることを観察しているので，われわれはこの現象を利用して γM 抗体と抗原 (HSA) との結合の有無を調べようと試みた。すなわち一定量の γG 抗体に特異性を同じくする γM 抗体を増量的に加えて行き，γG 抗体の ABC titer に低下が起るか否か，換言すれば競合が見られるか否かを観察し，competition が起れば γM 抗体に抗原結合能のあることを間接的に推定しようと考えた。よって表1に示す如く，5 mg/ml の γG 抗体 (Fr. II) のみ (Sample A)，5 mg/ml の抗体1量に対して γG 抗体 γM (Fr. I) 0.2 量を加えたもの (Sample B)，同じく γM 抗体 0.5 量を加えたもの (Sample C)，および γG に γM を等量加えたもの (Sample D) の4種の混合物を作り，これをそのまま，あるいは4倍ないし32倍に稀釈したものにラベルした HSA を加え，γG 抗体の持つ ABC 活性が混在する γM 抗体によって影響を受けるか否かを調べた。表1はその成績の1例を示すもので，表中の数字は沈降物中に含まれる count

表 1　γM-, γG 抗体間における competition の有無について

Mix. & Ppt. \ Sample			A	B	C	D
Mixture	FrI. ml (5 mg/ml)		0	0.2	0.5	1
	FrII. ml (5 mg/ml)		1	1	1	1
Precipitation (%)	Dilution	4 X	90.6	90.7	90.8	91.4
		8 X	67.7	67.5	68.4	73.4
		16X	39.7	40.1	41.6	42.9
		32X	21.2	19.3	20.0	23.3

を，加えた抗原の count で割って百分率で表わしたものである。γG 抗体は原液（5 mg/ml）は勿論，4倍稀釈までは加えられた HSA の90 %以上を沈降せしめるが，それ以上に稀釈すると抗原沈降能は次第に減少し，8倍では67.7 %，16倍では39.7 %，32倍では21.2 %であった。しかしこの percentage は，γM 抗体をこれに加えた場合にも有意と認め得る変化を示さなかった。この実験において，方法自体は Turner らが行ったものと原理的に全く同じであるが，得たる結果は著るしく異な

る。Turner らは一定量の γG 抗体に γM 抗体を増量的に加える事により，ファージ中和能力は著明に減弱するのを見た。すなわち γM 抗体は自身の中和能力は低いけれども，その higher valence によって γG 抗体の持つ中和能力を明らかに inhibit する。しかるにわれわれの成績では，γM 抗体の存在が γG 抗体の ABC に何らかの影響を与えたような成績は得られなかった。われわれと Turner らの実験は，抗体の種類，性状，測定方法等がすべて違っているから，その成績は直接比較すべき性質のものではない。ただここで言える事は，ファージ中和試験において見られたような γM, γG の competition が Farr test においては認められなかった事と，血清の正常状態が示す割合以上に γM 抗体を加えても γG 抗体の ABC が上昇も低下もしなかつた事から，この system に関する限り，γM 抗体に明らかな抗原結合能のある事は証明されなかった，と言う事である。

2. γM 抗体 subunit の ABC について

γM 抗体は，これを 2-mercaptoethanol によって還元すると 5 個の subunit に分れる。γM 全体としての valence は学者により 5 または 10 と唱えられて一致を見ないけれども，これら多数の combining sites が抗原を結合するに当って有効に使われないとするならば，steric hindrance ないしはこれに近い機構の存在が想定される。そこでわれわれは γM 抗体を還元して各 combining site を抗原に曝露した後各 subunit の ABC を測り，これらの総和がもとの γM 抗体の持つ ABC（この実験においては ABC≒0 であったが）より増大するか否かを調べた。その結果によれば増大しないのは勿論のこと，各 subunit に抗原結合能を認めなかった（すべて negative のため表省略)。

3. Farr test における硫安沈澱法と特異沈澱法の比較。γM 抗体が Farr test 陰性に終る理由の 1 つとして，方法論，すなわちこの test の technique そのものに問題がないか否かを検討してみる必要があると思われる。Farr は最初に BSA-anti BSA の系を用いたのであるが，そもそもこの test の原理は，free の BSA が 50 %硫安によって沈降しないのに対し，抗体と結びついた BSA はこれによって沈澱することを見いだしたのに始まる。彼が用いたのは whole serum であって，これを分画した場合，γM 抗体-抗原 complex が 50 % 硫安によって γG 抗体の complex と同じ効率で沈降するかどうかは疑問である。よってわれわれは前者を確実に沈降せしめる reagent として anti-γM, 後者に対する reagent として anti-γG を用い，50 % 硫安による非特異沈降の場合と結果を比較してみた。表 2 はその 1 例を示すもので，γG 抗体は硫安沈澱法によっても anti-γG による特異沈澱法によってもその成績に変りなく，抗原の 33 % を結合する抗体の稀釈濃度 (Dil-33%) は共に 80 倍，ABC =52.8γ/ml であったが，γM 抗体はいずれの方法によっても陽性成績が得られなかった。従って Farr test における γM 抗体の無反応性は，硫安沈澱以前にその原因があると考えられる。なおここで Farr test 陰性に終った γM 抗体も，その HA titer は非常に高く，表にみるように 20480 倍の高値を示すものであった。

表 2 γM-,γG 体の硫安沈澱法および anti-globulin 沈澱法による ABC 活性の比較

Assay / Fraction	Protein (mg/ml)	HA	Dil-33%		ABC33	
			AS*	Ab**	AS	Ab
Fr. I (γM)	13	20480	0	0	0	0
Fr. II (γG)	19	640	80	80	52.8	52.8

* precipitated by ammonium sulfate
** precipitated by anti-γM or anti-γG

考　　察

われわれは Farr test における γM 抗体の弱反応性ないし無反応性の原因に関し，その機序の一端を追求すべく，緒言に述べたような観点から本実験を行った。

先ず competition の実験をみるに，γG 抗体の抗原結合能は γM 抗体の存在によって格別の影響を受けなかった。γM 抗体と γG 抗体の混合物に抗原を加えた場合，もし γM 抗体に少しでも抗原と結合する能力があるならば，その分だけ γG 抗体の結合し得る抗原量は減る筈である。かかる減少の見られなかった本実験の成績から推すと，γM 抗体は一見抗原結合能を欠くかの如く見えるが，勿論この実験のみからかく結論するのは早計と言わねばなるまい。常識的に解釈すれば，この場合にもやはり何らかの形で結合は行われていると考えるべきであろう。またこのような無反応性はすべての抗原抗体反応系に見られるものではなく，特定の system に限局されている事も事実である。本論文の範囲ではないが，HSA-anti HSA の system において γM 抗体に補体結合反応の起らないことが報告されており，Cunniff ら[6] は抗原の conformation にその原因を求めんとしている。恐らく Farr test の場合にも同様なことが考えられるのではあるまいか？ ただし抗原の形状が何故 γM 抗体においてのみ問題になるのか，その理由は不明である。この実験においてもう 1 つ問題になるのは加えられた γM

抗体の量であろう。この実験に用いた量では抗原結合能が認められなくても，更に大量を用いれば結合を証明し得るかも知れないと言う疑問は当然起つてくる。しかしながらわれわれがここで求めたのは Farr test における γM 抗体無反応性の機序である。すなわち HSA-anti HSA の system において γM 抗体が Farr test 陰性に終る理由は，そもそも抗原と抗体とが結びつかないのか，または結合が行われた上での他の機序によるものであるかを調べようとしたものである。従って通常の免疫過程では起り得ないような大量の γM 抗体を用いる事は意味がない。このような場合，当然非特異的な吸着が起り得るからである。この意味でわれわれが調べたのは γM, γG 間の competition であって，大量の γM による inhibition の有無ではなかった。この実験において γM と γG を1：1の ratio に混合した場合にも significant なcompetition は認められなかったが，この場合の γM 抗体の量は，生理的な血清中に含まれる γM 量の約10倍である事を付け加えておく。

実験2において調べたのは，conformational な理由により，γM 抗体が抗原と反応するに当ってその combining sites を有効に利用し得ないような状態に置かれているのではないか，と言う可能性である。よって γM 抗体を2-mercaptoethanol によって5つの subunit に還元し，すべての combining sites を抗原に対し expose してみた。得たる subunit は univalent のものと考えられる。一般に1価の fragment は，凝集反応・沈降反応の如き visible な二次反応は起さないけれども抗原を結合する能力は失われないとされている。しかしながら Farr test において，γM 抗体の subunit は ABC 活性を示さなかった。この事は必ずしも steric hindrance の可能性を否定するものではないが，γM 抗体の Farr test における無反性の原因はもつと根本的な所にあると思われる。

第3の実験は，γM 抗体の50％硫安による被沈降性を問題にしたものである。特異性を同じくする抗原・抗体 complex であっても，抗体が γM である場合と γG である場合とでは complex の物理化学的性状は違うものと考えられる。従って，Farr test で用いられた50％硫安は後者の complex を沈降せしめるのに十分であるとしても，前者に対しては不十分または全く不適であったかも知れない。そのためには γM に働らかせる硫安の濃度，作用条件をいろいろに変えてみるのも1つの方法であるが，ここでは γM 抗体と抗原との complex (両者が結合することを前提として) を確実に沈降せしめるものとして anti-γM を作用させてみた。γG の場合には予期した如く，50％硫安で沈降させても anti-γG を用いても同じ成績が得られたのに反し，γM の場合は anti-γM によって沈降物が生じているにもかかわらず，この沈降物には radioactivity が認められない。言い換えればラベルされた抗原がこれに結合している証拠は得られなかった。この事から見ると，γM 抗体の Farr test における無反応性は硫安沈澱以前にその原因があると考えられる。

以上の如くここに得られた data はいずれも消極的なもので，何故 γM 抗体はこの反応系において ABC 活性を示さないか，と言う問いに積極的に答える data はまだ得られていない。従って本論文で行った実験のほかに，なお追求すべき点は幾つも残されている。例えば γM, γG 抗体間における抗原要求量の相違も考えなければならない問題であろう。Murray ら[7] は補体結合反応においてこの事を報告している。すなわち発疹チフスの γM 抗体は通常 CFT 陰性であるが，非常に大量の抗原を用いると反応が陽転することを観察し，これを high antigen requirement phenomenon と名付けた。ただし著者らが予備的に行った実験，すなわち抗原量を γG の場合の10倍から $^1/_{10}$ まで広げて行った範囲では，依然として γM に ABC 活性は認められていない。また緒言で述べた両抗体の avidity も検討してみる必要があろう。γM 抗体は HSA-anti HSA の系において抗原に対する avidity が弱く，一旦生じた complex が極めて容易に解離してしまうため，結果として Farr test が陽性にならない，と言う可能性は考えられない事ではない。その為には γM 抗体の dissociation rate を測れば良い。これにはかなり大量の抗体を要するので今回は行い得なかったけれども，今後に残された課題と考えている。

本実験において特に注目すべき事実は，γM 抗体が抗原と結合しないかの如き印象が得られたことである。この事は甚だ奇妙に感ぜられるが，同様な事実は補体結合反応において既に報告されている。例えば Cowan ら,[8] Bellanti ら[9] はいろいろな arbovirus を接種したモルモットにおいて，Rose ら[10] は thyroglobulin に対して，Cunniff ら[6] は HSA その他 compact な形態の蛋白質に対して，いずれも γM 抗体は補体結合反応を示さない事を観察した。しかしながら本実験における γM 抗体は強い HA 活性を持つものであること，換言すればHSA 感作赤血球を γG 抗体の数十倍も強く凝集する能力を有する事からみて，この抗体が HSA に対する combining site を持っている事は否定し得ない。Farr test の如き結合を直接観察し得る方法のもとで，γM 抗体に抗原結合能が見いだされないのは，恐らく生じた

complex の状態 (例えば insoluble になり難いこと) に原因があるのではあるまいか？ この意味から抗原の分子形態を modify (aggregation, 他の物質との coupling 等) してみる事も研究の1つの方向であると考える。

結　　論

1) HSA に対する γG 抗体の一定量に同じ特異性の γM 抗体を色々な量に加えた混合液を作り，これに HSA を作用せしめて両クラス抗体間に同一抗原に対する競合が見られるか否かを，Farr test によって調べた。その結果によれば Farr test において抗原と反応するのは γG 抗体のみであり，γG 抗体単独の示す ABC 活性は混在する γM によって何の影響も受けなかった。すなわち Farr test においては Turner らがファージ中和において観察した如き γM, γG 抗体間の competition は見られなかった。

2) γM 抗体を2-mercaptoethanol によって還元し，すべての combining sites を抗原に expose せしためが，各 subunit は ABC 活性を示さなかった。この事から，γM 抗体の Farr test における無反応性を steric hindrance によると考える可能性はうすいように思われる。

3) Farr test の原法に用いられた50%硫安に代えて，抗原と γM 抗体との complex を沈降せしめるために anti-γM を用いたが，生じた沈降物は radioactivity を示さなかった。すなわちこの沈降物中にはラベルされた抗原が含まれていない。従って γM 抗体の Farr test における無反応性は，硫安沈澱以前にその原因があるものと考えられる。

引 用 文 献

1) 大原　達：血清学的諸活性における γM 抗体と γG 抗体の比較——特に両抗体の avidity と γM 抗体の補体結合能を中心に。結核の研究，第30集，1—9，昭 45.

2) 大原　達・木村卓郎：γM, γG 両抗体の赤血球凝集反応および Farr test における反応性，特にその感度について，結核の研究，第27/28集，35—40，昭 43.

3) Stavitsky, A. B : Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. J. immunol. 72 (1), 360-7, 1954.

4) Farr, R. S. : A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I* BSA and antibody J. inf. Dis., 103, 239, 1958.

5) Turner, K. J. & Krishnapillai, V. : The influence of IgM antibody on the neutralisation of T4 r bacteriophage by IgG antibody. Immunochemistry, 5 (1), 9-16, 1968

6) Cunniff, R. V. & Stollar B. D. : Properties of 19S antibodies in complement fixation. I. Temperature dependence and role of antigen structure. J. immunol., 100 (1), 7-14, 1968

7) Murray, E. S., Gaon J. A., O'Counor, J. M. & Mulahasanovic, M : Serologic studies of primary epidemic typhus and recrudescent typhus (Brill-Zinsser disease). I. Differences in complement-fixing antibodies : High antigen requirement and heat lability. J. Immunol., 94 (5), 723-33, 1965.

8) Cowan, K. M. & Trautman, R : Antibodies produced by guinea pigs infected with foot-and-mouth disease virus. J. Immunol., 94, 858-67, 1965

9) Bellanti, T. A., Russ, S, B., Holmes, G. E. & Buescher, E. L. : The nature of antibodies following experimental arbovirus infection in guinea pigs. J. Immunol., 94, 1-11, 1965.

15) Rose, N. R., Kite, J. H., Doebber, T. K., Spier, R., Skelton, F. R. &Witebsky, E. : Studies on experimental thyroiditis. Ann. N. Y. Acad. Sci., 124, 201, 1965.