



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト血清アルブミン(HSA)に対するウサギ γ M抗体の抗原結合能, 特に補体結合反応における態度について
Author(s)	大原, 達; OHARA, Tohru; 木村, 卓郎 他
Description	
Citation	結核の研究, 32, 1-7
Issue Date	1972
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26815
Type	departmental bulletin paper
File Information	32_P1-7.pdf



ヒト血清アルブミン(HSA)に対するウサギ γ M抗体の抗原結合能、特に補体結合反応における態度について

大原 達・木村卓郎・清水正秀

(北海道大学結核研究所細菌部)

(受付・11月27日, 1971)

われわれはヒト血清アルブミン(HSA)と anti-HSA の系において、ウサギ γ M抗体と γ G抗体の抗原に対する反応性を比較し、両クラスの抗体間には抗原結合能にかなりの差異があるのを見て来た。前回¹⁾はFarrの方法²⁾によって両抗体の antigen-binding capacity(ABC)を測定したところ、 γ M抗体はこれを高度に濃縮した場合ですら、殆んどABCを示さないことが観察された。すなわち γ M抗体は溶血反応および凝集反応、並びに後者の1つの形式である間接赤血球凝集反応(以下HA)において高い感度を示すにも拘らず、Farr test においては γ Gに比し格段に感度が低い。

凝集・沈降両反応の如く、抗原抗体結合の結果起ってくる二次現象を観察する方法に較べると、Farr test はむしろより直接的に両者の結合を判定し得る方法であり、且 combining site の数が γ Gより γ Mが多い事を考えれば、Farr test における γ M抗体の弱反応性ないし無反応性は甚だ奇異な現象と考えられる。前報においては、その mechanism の一端を解明すべく色々な実験を行ったが、真の機序に関してはまだ不明の部分が多過ぎる。今回は同じくHSA-anti HSA の系において、 γ M抗体は補体結合反応(以下CFT)を呈しない事実を報告し、併せて γ M抗体の抗原結合能に関し若干の考察を加えてみたいと思う。

実験材料並びに方法

1) 免疫方法、両クラス抗体の分離法：すべて前報³⁾と同じ。ごく簡略に述べれば、HSA20mgに水酸化アルミニウム・ゲルを混じて体重2.5~3kgの白色ウサギの足蹠皮下に注射して免疫、Sephadex G200 column を通して γ M抗体と γ G抗体を分画した。分離した両クラスの抗体が互に他の成分を含まない事は、immunoelectrophoresis によって所定の位置に1本の沈降線しか生じないことを観察したほか、 γ M抗体は2MEによってHA活性を失うのに反し、 γ G抗体はその影響を受けない事によって確めた。

2) HA価の測定：Stavitsky⁴⁾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。

3) 溶血系及び補体：溶血系としては Alsvær 液に保存した市販のヒツジ赤血球とこれに対する溶血素を用い、補体は極東製薬工業株式会社製乾燥補体を使用、予備試験において型の如く溶血素の至適濃度と補体の50%溶血単位(1K)を定め、これを本試験に用いた。

4) 補体結合反応実施法：Stein & Ngu⁵⁾の方法に準じ、上記の如く50%溶血を指標として力価の判定を行った(詳細に関しては、われわれの教室で発表した文献⁶⁾参照のこと)。その大略は次の如くである。i) 試験管立に同じ数の test tube を前後2列に並べ、可検血清を56°C 30分加熱して非動化した後適宜の濃度まで倍数稀釈してその0.8mlを前・後列各 tube に分注し、後列にはこれに抗原0.8mlと2Kの補体0.8mlを加え、前列に対しては抗原を加えず、代わりに稀釈液0.8mlと補体1Kを入れてこれを一夜氷室に放置する。ii) 翌日各試験管に1.6mlずつの溶血系(感作血球)を加え、37°Cの water bath に1時間 incubate した後、それぞれの optical density (OD) を spectrophotometer によって読みこれを記録する。iii) もし最初の試験管において後列の OD が前列のそれより小さい場合には第2, 第3, …の試験管について前後列の pair を比較して行き、遂にこれが逆になる点、すなわち後列の OD が前列の OD より大になる点を探してこの pair の OD の差 b を求める。次にそれより1つ前の試験管(lower dilution)における前後列の OD の差を求めこれを a とする。

いま前後列の OD が逆転する1つ前の試験管の血清稀釈を d とすれば、被検血清の力価は $d \times \text{anti-log} \frac{a}{a+b} \times 0.301$ として求められる。

またもし最初から後列の OD が前列のそれより大きければ、その反応は陰性である。

実験成績

実験1. Soluble HSAを反応原とするrM, rG fractionの補体結合反応。先に報告³⁾した如く、ウサギ血清をSephadex G 200 によってゲル濾過した場合、elution patternは3つの主要 peak より成り、最初の分画からこれをFr I, Fr II, Fr III, と名付けると、Fr IはrM, Fr IIはrG (rAの一部も含まれる), Fr IIIはアルブミンをそれぞれ主な成分として含むものである。このうちFr IとFr IIは中央の狭い部のみを集めて再濾過を行い、免疫電気泳動によって純粋な rM, rG である事を確かめた後、HSA濃度 1 μ g/mlを反応原としてCFTにおけるそれぞれの titer を測定した。数多くの sample について反応は20回以上も繰り返し行われたが、陽性成績を示したのはrG fractionのみで、如何なる場合にもrM fractionに陽性の反応が認められた事はなかった。表1はその1例を示したものである。表中の sample は20倍から320倍に至るまで倍数稀釈した場合の、後列 (rear) および前列 (front) のODの読みを示したもので、H₀(非溶血), H₁₀₀(完全溶血)の reference set から溶血度を計算する事は出来るが、われわれはODの読みだけから実験方法の項に記載した如くして titer を求めた。表の如く、ウサギ No. 1019の12日目血清について行ったCFTでは、rG 抗体の力価が79であるのに対して、rM fractionは抗体活性を示さず、ウサギNo. 3, 7日目血清においてもrGが112の力価を示したのに、rM 画分は同じく陰性に終わっている。後者の血清画分はかなり濃縮したもので、rM 画分の濃度は normal level のそれを遙かに上廻るものであるにも拘らず、CFT 力価は陽性にならない。

なお、この反応に用いた抗原は、whole serum について行った予備実験での至適濃度を用いたが、rM 抗体と

rG 抗体は抗原要求量に違いのあることが可能性として考えられる。例えばMurray⁷⁾らは、発疹チフスにおいてrM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事のあるのを観察して、これを high antigen requirement phenomenon と名付けている。よってわれわれは、rM fraction に対して rG の際に用いた濃度の1000倍に及ぶ5 μ g/mlのHSAを反応に使ってみたが、依然として陽性成績は得られなかった。更にrM抗体のCFTは、4°Cで行うよりも37°Cで成績を調べる方が高い力価を示す^{8)~11)}とされているので、この点も確かめたが、われわれの用いたすべてのrM fractionは何れも negative の成績に終わっている。またCFTの成績に対して、抗原の形状が関係を持つことも指摘されている。この点を調べる目的でわれわれはHSAを稀塩酸と熱で処理して aggregated HSA を作り、同様なCFTを行ってみたが、結果はこれまでと同じく、すべての場合にrM抗体は反応陰性であった(これら一連の実験成績は全例 negative のため表省略)。

実験2. Soluble HSA によるrM抗体のHA反応阻止試験。上記の実験成績から次の2つの事が考えられる。

- (i). HSA-anti HSAの系に関する限り、rM抗体はsolubleな状態にあるHSA抗原とは結合出来ないのか、或いは
- (ii). rM抗体-HSAの結合は起るが、この抗原抗体複合物は補体を結合する能力を欠くのか、と云う2つの可能性である。rM抗体が赤血球表面にcoatしたHSAに対しrG抗体の50倍ないし350倍高い sensitivity をもって反応することが事実である以上、この抗体がHSAに対する combining site(s) をもっている事は明らかであり且特異抗体である限りこれが該当する抗原と結合し得ないと云う事は考えにくい事である。然しながら前報²⁾

表1 rM, rG 画分の CFT.

Sample			Row of Tubes	Dilution					Titer
Rab. No.	Fraction	Protein mg/ml		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	
#1019 day 12	Fr I (rM)	0.30	rear	680	700	710	710	710	0
			front	520	560	580	580	580	
	Fr II (rG)	0.24	rear	55	140	630	730	710	79
			front	600	620	620	600	600	
#3 day 7	Fr I (rM)	13.00	rear	480	600	660	700	700	0
			front	270	380	485	580	565	
	Fr II (rG)	19.00	rear	40	70	450	680	710	112
			front	450	540	550	580	580	

の Farr test においては、恰かもこの系においては抗原と rM 抗体との結合は起っていないかの如き成績が得られており、rM 抗体と結合するためには抗原側に一定の conformation を必要とするのではないかと云う推測も一応成り立たない事もない。そこで rM 抗体に色々な量の soluble HSA を加えた後に型の如き HA 反応を行って力価の titration を行い、HSA 添加以前の titer に比し、添加後 titer の低下、すなわち inhibition reaction が起るか否かを検する事により、液状 HSA と rM 抗体の結合が成立したか否かを判定せんと試みた。言うまでもなくあとから行われた HA 反応の力価が低下すれば、その分だけ液状 HSA が rM 抗体に結合したと考えるべきであり、力価に変動がなければ rM 抗体は soluble HSA とは結合しなかったと判定すべきである。得たる結果は表 2 の如くであった。rM 抗体に 150 μ g までの液状 HSA を加

えても visible な沈降物は生じなかったが、soluble な抗原抗体 complex を形成していること、換言すれば可溶性 HSA も rM 抗体と結びつくことだけは確実である。すなわち通常の HA 反応において HA 力価 20480 倍を示したウサギ No. 2 の rM 抗体は、これに 0.5 μ g の HSA を予め加えても反応は何の影響も受けなかったが、10 μ g の HSA によっては反応が高度に阻止されて titer は 320 倍まで低下し、150 μ g の HSA 添加によって反応は完全に阻止され、陰性になっている。

ウサギ No. 1016 の rM 抗体も同様に、もとの力価は 40960 倍あったのに 0.5 μ g の HSA によって力価は 1/4 に低下し、10 μ g によって完全に反応は陰性化した。すなわち HSA-anti HSA の系において rM 抗体が補体結合能を示さないのは、抗原抗体の結合が起らないのではなくて、両者の complex が、soluble な状態にあるため何らか

表 2 Soluble HSA による間接血球凝集反応阻止試験

	HSA(μ g) as Inhibitant	10 \times 2 ⁿ										
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
# 2 Fr I (rM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	75	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fr II (rG)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
	0.5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
# 1016 Fr I (rM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fr II (rG)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Positive Control (whole ser.)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

の理由により補体を結合し得ないものと解釈すべきであろう。この事は表2のHSA量を遙かに越える5000 μ gのHSAを用いた前項実験からも同様に言い得る事である。

実験3. HSA-rM抗体 complexのゲル濾過パターンについて。

実験2の成績から、液状HSAとこれに対するrM抗体とは外見上無反応の如く見えるけれども、solubleなcomplexの作られている事が推測されたので、この事がgel filtrationによっても証明されないかどうかを調べてみた。この目的からrM画分(0.23mg/ml)に、 131 Iで標識したHSA(0.5 μ g/ml)の等量を加えて一夜氷室に放置し、反応液を1.8 \times 32cmのSephadex G200カラムにかけて濾過を行った。2mlずつ集めたeluateについてradioactivityを測定した結果は図1に示す如くである。図の上半部はHSAを単独に流した場合のelution patternを示したもので、大体アルブミン所定の位置にradioactivityのpeakが認められている。これに反し、特異抗体であるrM画分を加えた反応液は、外見上visibleな沈降物を全く示さないけれども、HSAに標識された放射能の50%以上がrM溶出の位置に見いだされる。この事実は、HSAの一部がsolubleな状態でrM抗体とcomplexを作っていることを示すものと言って差支えなからう。

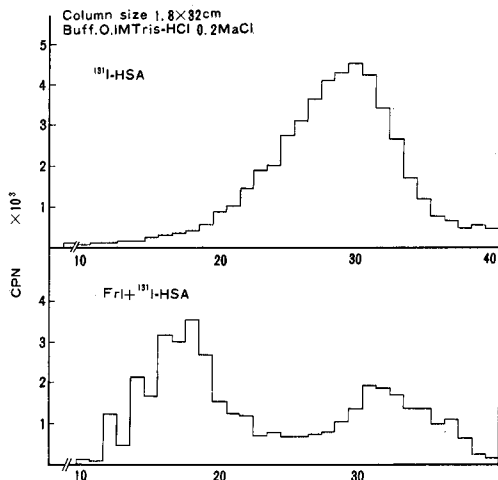


図1 HSA及びこれとFrI画分反応物のSephadex G200によるElution pattern

考 察

われわれは前回の報告¹⁾において、Farrの方法によるrM抗体のantigen-binding capacityを調べた結果、HSAの反応系に関する限り、抗原とrMとは少くとも外見上、反応しないかの如き成績を得た。実験操作を要約すると次の如くである。すなわち(i)今回と同じ方法で免疫したウサギ抗HSA血清を分画してrM fractionと

rG fractionに分け、前者に 131 I-HSAを加えて両者を反応せしめた後、更にこの反応物にanti-rM(ウサギrMでヒツジを免疫した抗血清)を加えて沈降物を生ぜしめる。(ii)rM抗体と抗原のcomplex(HSAとanti-HSAが結合することを前提として)はanti-rMによって確実な沈降物を作るから、これを数滴の0.5N NaOH添加によって溶かし、更に蒸留水を加えて適当量の水溶液とする。(iii)この水溶液のradioactivityを測る。

上記の実験操作においてHSAとこれに対する特異的rM抗体の結合がどんな状態であるにせよ(soluble complexであってもinsoluble complexであっても)、もしHSAが結合さえていれば(iii)の水溶液中に、ラベルされた 131 Iの放射能が検出される筈である。しかし前報¹⁾の結果によれば、この沈降物にはradioactivityが認められない。言い換えれば抗原であるHSAがこれに対するrM抗体と結合している証拠は見られなかった。この成績から見ると、HSAの反応系においてそもそも抗原とrM抗体とは初めから結合しないのであろうか、それとも一旦結合したHSAがanti-rMによって解離を起すのであろうか?いずれにしても甚だ解釈に苦しむ現象と言わなければならない(なおrG抗体を以てする同様な実験では、常に強いradioactivityが証明された事を附記しておく)。

しかしながら、今回のHA阻止試験およびgel filtrationにおけるeluateの放射能測定からみると、rM抗体はHSAとvisibleな結合物(言い換えればinsoluble complex)を作らないけれども、soluble complexを作ることは明らかである。ただし前回の報告は、実験方法も異なり、用いた抗原量も異っているから、これから直ちに両者の不結合を結論する事は軽率であろう。前回観察した範囲に限るならば、この系においてrM抗体に抗原の結合する証拠は見られなかった、と言うに止めたい。

今回の実験は、至適結合状態におけるantibody/antigen ratioについて何も調べていない。かかるratioは反応系によって違うものであり、この事は抗原抗体complexがinsolubleの状態にならない事とも関係しているから、補体結合反応におけるrM抗体の不反応性は、勿論すべての反応系にあてはまるものではない。ここに述べたHSAをはじめとして限られた系にのみ見られるものであるが、その理由については明らかでない。

ここでCFTにおけるrM抗体の態度、ことにrG抗体の活性との比較に関して、先人諸家の成績を振り返ってみよう。本反応の場合には、特に抗原の種類、性状や反応実施の条件等がdataに多大の関係を持つようであるから、諸家の報告は甚だ区々である。

今回の成績とは逆に、CFTにおいてrM抗体の方がrG

抗体より活性が強いと言う報告から先に紹介してみたい。補体を必要とする抗体の代表的なものに hemolysin があるが、*rM*-hemolysin は *rG*-hemolysin に比し、溶血能が遙かに強い事は多くの研究者によって指摘されている。2, 3 の文献を挙げてみると, Stelos & Talmage¹²⁾ はヒツジ赤血球に対するウサギ *rM* 抗体が *rG* 抗体より 50 倍ないし 100 倍強い活性を有する事を観察し, Wigzell¹³⁾ は molecular basis で計算して, マウスの *rM*-hemolysin が *rG* の 100 倍から 1000 倍の効率を示したと述べている。また電子顕微鏡を使った Humphrey¹⁴⁾ によると, 血球は damage を受けると細胞膜に hole を生ずるが, 1 つの hole を作るために, *rM* 抗体ならば 2, 3 個で十分であるのに, *rG* 抗体はその 1000 倍もの分子が必要であると言う。このほか Greenbury¹⁵⁾ Shulman¹⁶⁾, Borsos¹⁷⁾ も同様に, *rM* 抗体の方が *rG* 抗体よりも補体結合能が強いと言う成績を得ている。

これに対して, *rM* 抗体には補体結合能がない, と言う今回のわれわれと同様な報告もまた幾つか挙げる事が出来る。Cowan¹⁸⁾, Bellanti¹⁹⁾ は, いろいろな arbovirus を接種されたモルモットの *rM* 抗体は補体を結合しないと報告し, Rose²⁰⁾ も thyroglobulin に対する初期 *rM* 抗体は HA で証明し得るのに, CFT では証明することが出来なかったと述べている。Graves²¹⁾ は直接 *rM* 抗体の補体結合性を見てはいないが, モルモットに口蹄疫ウイルス・ワクチンを接種した場合, 中和抗体は 1 週で現われるのに対して, 補体結合性抗体は 16 日以後になって初めて現われる事を観察し, この遅れは初期抗体が主として *rM* 抗体である事に帰因すると説明した。このような補体結合能欠除の原因として, 責任の一半は抗原の性状にあるようにも思えるが, この点に触れたのは Cunniff⁹⁾ の研究である。彼らによれば, *rM* 抗体が補体を結合するか否かは, 専ら用いられた免疫原, 反応原の種類および形状に左右されるものであるとし, 補体結合能を有する *rM* 抗体を産生せしめる抗原として bacterial lipopolysaccharide, 変性 DNA, カルジオライピン, adenosine-poly-L-lysine, adenosine-lysine rich histone 等を挙げ, 逆に補体結合性 *rM* 抗体を産生せしめない抗原としては, hemocyanin, adenosine-HSA, adenosine-ribonuclease 等を挙げている。免疫原の種類ばかりでなく, 彼らは反応原として用いる抗原の conformation も同様に重視している。この意味で, 彼らの観察した次の事実は注目に値する。すなわち, adenosine-HSA で免疫したウサギの *rM* 抗体について, いろいろに形を変えた抗原(反応原)で CFT を行ってみると, 免疫原そのものである homologous な adenosine-HSA を反応の抗原に使った場合全く陽性成績が得られないのに, heterologous な抗原であ

る adenosine-poly-L-lysine や変性 DNA に対して陽性反応を呈すると言う不思議な現象がみられ, 同じく heterologous な adenosine-KLH に対しても軽微ながら陽性成績が得られた。この成績からみて, 抗原の分子量が大きいことは必ずしも反応成立の必要条件ではないらしい。何となれば, 分子量 100 万以上の adenosine-KLH がさほど有効でなかったからである。従って Cunniff⁹⁾ は分子量の大きい事よりも分子形態の大きい事を *rM* における補体結合反応成立のための抗原側の条件としている。恐らく HSA や分子量の大きい hemocyanin (KLH) は比較的 compact な形をしているために反応原として有効でなく, 変性 DNA や polylysine は physiologic な pH において random coil の形をとるため有効に働くのであろうと想像される。

更にまた, *rM* 抗体の CFT 活性に影響を与える因子として, 実験 1 の項でも述べた如く, 反応温度の問題がある。Stollar¹⁰⁾, Sandberg¹¹⁾ の観察によれば, DNA に対する *rM* 抗体は, 37°C で CFT を行なった場合, 4°C で行なった場合の力価よりも 10 倍から 20 倍高い価が示された。

以上通覧したところからも明らかなように, *rM* 抗体の CFT における態度は種々なる factor がこれに関係して甚だ複雑な成績を示し, 活性の強さに関しても, *rG* 抗体のそれより強いとするもの, 弱いとするものから, 全く活性を認めないものに至るまでいろいろな報告がなされている。これは主として反応系の違いによるものであるが, HSA の系においてなぜ *rM* 抗体は抗原と insoluble な complex を作らないのか, その機構については全く分らない。combining site を 1 個しか持たない所謂 univalent の抗体が, visible な Ag-Ab complex を作らない事は十分理解する事が出来る。然るに *rM* 抗体の valence は学者によって違いはあるけれども 5²²⁾~28) ないし 10²⁹⁾~31) である事が証明されている。このように多くの combining site を持つ抗体が, 2 価の *rG* 抗体よりも antigen-binding capacity が弱く(或いは無く), 抗原との間に insoluble な complex を作らない理由が明らかにされれば Farr test ならび CFT における無反応性の機序はかなり明確になるものと考えられる。HSA の反応系においても反応原の形状を粒子状にすれば(例えば血球表面に coat する), 明らかに visible な complex を作り, 且 HA において *rG* 抗体の 50 倍ないし 350 倍³⁾ 高い感度で反応する事をみても, 反応原の形状がこれに関与している事は疑いない。しかしながら液状の HSA を aggregated の状態にしただけでは CFT 陰性であり, 抗原の形状だけですべてが解明されるとも思えない。われわれは今後抗原の状態をいろいろに modify して *rM* 抗

体の補体結合能を調べると共に、更に他の要因についても追究してみたいと考えている。

結 論

- 1) ヒト血清アルブミン(HSA)で免疫したウサギの γ M 抗体は、補体結合能を欠く。 γ M 抗体画分を高度に濃縮した場合にも、反応原の HSA を aggregated の状態にした場合にも、また補体を 37°C で作用させた場合にも、かかる無反応性は変らなかつた。
- 2) しかしこの場合、 γ M 抗体は HSA と結合しないのではなく、両者は invisible な状態の complex を作っていることが、HA 反応阻止試験の結果明らかになった。すなわち γ M 血清に HSA 水溶液を加えた後、HSA 感作赤血球によって型の如き HA 反応を行ってみると、原血清の力価に著明な低下が認められる。この事は液状 HSA が γ M 抗体と soluble な complex を作る事を示すものである。
- 3) γ M 抗体に I^{131} でラベルした HSA を加えて一夜氷室に放置し、これを Sephadex G200 カラムにかけて濾過を行なうと、 γ M の溶出される位置に radioactivity が証明される。この事もまた HSA の一部が γ M と結合して soluble complex が作られた事を示している。 γ M にどのような量の HSA を加えても何ら visible な沈降物は生じないから、両者の結合物は常に soluble な状態にあると考えられる。
- 4) HSA 溶液と γ M 抗体との間に insoluble な complex を生じない事の理由は分らないが、この事が同抗体の補体不結合性に何らかの関係をもつものと想像される。

引 用 文 献

- 1) 大原 達, 木村卓郎, 清水正秀: Farr test における γ M 抗体の抗原結合能について, 結核の研究, 31, 39-43, 昭46.
- 2) Farr, R.S.: A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I*—BSA and antibody. J. inf. Dis. 103, 239, 1958.
- 3) 大原 達, 木村卓郎: γ M, γ G 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, 27/28集, 35-40, 昭43.
- 4) 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.

- 5) Stein, G. J. & Ngu, D. V.: A quantitative complement fixation test; Titration of luetic sera by the unit of 50 per cent hemolysis. J. Immunol. 65(1), 17, 1950.
- 6) 大原 達, 池端 隆, 荻田友雄, 谷野政次: 50% 溶血単位による結核補体結合反応の研究. 第1報. Stein and Ngu 法による結核血清力価測定法の実際. 日本細菌学雑誌 10(1), 41-8, 1955.
- 7) Murray, E. S., Gaon, J. A., O' Counor, J. M. & Mulahasanovic, M.: Serologic studies of primary epidemic typhus and recrudescence typhus (Brill-Zinsser disease). I. Differences in complement-fixing antibodies: High antigen requirement and heat lability. J. Immunol., 94(5), 723-33, 1965.
- 8) Jaton, J-C., Ungar-Waron, H. & Sela, M.: Comparison of IgG and IgM antibodies specific for uridine. European J. Biochem., 2, 106-14, 1967.
- 9) 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.
- 10) Stollar, B.D. & Sandberg, A.L.: Comparisons of antibodies reacting with DNA. I. Systemic lupus erythematosus sera and rabbit antibodies induced by DNA-methylated bovine serum albumin complexes. J. Immunol., 96, 755-63, 1966.
- 11) Sandberg, A.L. & Stollar, B. D.: Comparisons of antibodies reacting with DNA. II. Rabbit antibodies induced by nucleoside-protein conjugates. J. Immunol., 96, 764, 1966.
- 12) Stelos, P. & Talmage, D.W.: The separation by starch electrophoresis of two antibodies to sheep red cells differing in hemolytic efficiency. J. inf. Dis. 100, 126-35, 1957.
- 13) Wigzell, H., Möller, G. & Anderson, B.: Studies at a cellular level of the 19S immune response. Acta Path. Microbiol. Scand. 66, 530-40, 1966.
- 14) Humphrey, J.H. & Dourmashkin, R.R.: Electron microscope studies of immune cell lysis. pp. 175-89 in G.E.W. Wolstenholm & J. Knight (Editors), Ciba Found. Symp. Complement, 1964.
- 15) Greenbury, C.L., Moore, D.H. & Nunn, L.A.C.: Reactions of 7S and 19S components of immune rabbit antisera with human group A and AB red cells. Immunology, 6, 421, 1963.

- 16) Shulman, S, Hubber, L. & Witebsky, E. : Antibody responses to immunization by different routes. *Science*, 145, 815-7, 1964.
- 17) Borsos, T. & Rapp, H.J. : Complement fixation on cell surfaces by 19S and 7S antibodies. *Science*, 150, 505, 1965.
- 18) Cowan, K.M. & Trautman, R. : Antibodies produced by guinea pigs infected with foot-and-mouth disease virus. *J. Immunol*, 94, 858-67, 1965.
- 19) Bellanti, J.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.
- 20) 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.
- 21) Graves, J.H., Cowan, K.M. & Trautman, R. : Characterization of antibodies produced by guinea pigs inoculated with inactivated foot-and-mouth disease antigen. *J. Immunol.*, 92, 501-6, 1964.
- 22) Onoue, K., Yagi Y., Grossberg, A.L. & Pressman, D. : Number of binding sites of rabbit macroglobulin antibody and subunits. *Immunochemistry*, 2, 401, 1965.
- 23) Onoue, K., Tanigaki, N., Yagi, Y. & Pressman, D. : IgM and IgG anti-hapten antibody : hemolytic, hemagglutinating and precipitating activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 120, 340, 1965.
- 24) Clem, L.W. and Small, P.A. Jr. : Phylogeny of immunoglobulin structure and function 1. Immunoglobulins of the lemon shark. *J. Exp. Med.*, 125, 893, 1967.
- 25) Metzger, H. : Characterization of a human macroglobulin. V. A Waldenström macroglobulin with antibody activity.
- 26) Frank, M.M. and Humphrey, J.H. : The subunits in rabbit anti-Forsman IgM antibody. *J. Exp. Med.*, 127, 967, 1968.
- 27) Onoue, K., Kishimoto, T. & Yamamura, Y. : Papain fragmentation of the subunits of human macroglobulin. *J. Immunol.*, 98, 303, 1968.
- 28) Lingqvist, K. & Bauer, D.C. : Precipitin activity of rabbit macroglobulin antibody. *Immunochemistry*, 3, 373, 1966.
- 29) Cooper, A.G. : Hemagglutinating 7S subunits of 19S cold agglutinins. *Science*, 157, 933, 1967.
- 30) Merler, E., Karlin, L. & Matsumoto, S. : The valency of γ M immunoglobulin antibody. *J. Biol. Chem.*, 243(2), 386, 1968.
- 31) Ashman, R.F. & Metzger, H. : A Waldenström macroglobulin which binds nitrophenyl ligands. *J. Biol. Chem.*, 244, 3405, 1965.