



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト血清アルブミン(HSA)に対するウサギIgM抗体, IgG抗体の抗原結合能, 特にavidityの変動について
Author(s)	木村, 卓郎; KIMURA, Takuro; 清水, 正秀 他
Description	
Citation	結核の研究, 34, 50-55
Issue Date	1974-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26834">https://hdl.handle.net/2115/26834</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	34_P50-55.pdf



# ヒト血清アルブミン (HSA) に対するウサギ IgM 抗体, IgG 抗体の抗原結合能, 特に avidity の変動について

木村卓郎 清水正秀

(北海道大学結核研究所細菌部)

(昭和48年10月1日受付)

ヒト血清アルブミン (HSA) に対するウサギ抗血清をゲル濾過によって分画し IgM 抗体画分, IgG 抗体画分を得, 両画分の HSA 感作赤血球凝集反応 (以下 HA), 補体結合反応 (CFT), 抗原結合能 (ABC) に対する態度を比較し, その相違点について既に報告した<sup>1)</sup>。IgM 抗体と IgG 抗体がいろいろな immunoassay に対し異なった態度を示すことは他に多くの報告がなされており, 特に大原の綜説<sup>2)</sup>に詳しい。一般的に, IgM 抗体は凝集反応や溶血反応において鋭敏に反応するが, 沈降反応や CFT においては感度が低く, IgG 抗体は逆の態度を示すことが知られている。しかし報告の個々についてみれば多くは特定の抗原に対し特定の immunoassay の適用から判断したものであり, 従って抗原・抗体系の違いにより互に逆の成績が得られることも稀ではない。

われわれの行った HSA-抗 HSA の系において, IgM 抗体画分は HA に対し高い反応性を示したが, CFT は陰性であり, ABC は低い値しか示さず, IgG 抗体画分はこれと逆の態度を示した。

かかる点を両抗体の抗原に対する avidity の違いから説明できないかという実験を試みた<sup>3)</sup>が結論は得られていない。

今回上述と同様の系において, 初回免疫後 70 日目に追加免疫を行い, 得られた追加免疫血清について同様の比較を行った。併せて IgM 抗体産生の増強作用を示すことが知られているサルモネラ菌<sup>4),5)</sup>ないしサルモネラ菌から抽出したりポ多糖体<sup>6)</sup> (LPS) を HSA と共に免疫することにより, HSA に対する応答に及ぼす影響を明らかにすかを調べた。

## 実験材料並びに方法

実験材料並びに方法の要は前報<sup>1),2),3),12)</sup>に準じたが本報で付記すべき点は次の通りである。

**抗原:** LPS 北大医学部細菌教室から分与され教室に保存されている *Salmonella typhimurium* から Westphal のフェノール法<sup>7)</sup>によって抽出を行った。その精製度は検討しなかったが後に得た Difco の製品を用い

チェックしたところ血清学的な差はなかった。

**サルモネラ菌結合 HSA (以下 HSA-Stm):** BDB 法による赤血球感作の方法<sup>8)</sup>をサルモネラ菌に準用した。即ちサルモネラ加熱死菌浮遊液 (湿重 35 mg) に 10 mg の HSA を加え型通り BDB 結合を行った。

**免疫法:** HSA 及び上記抗原を水酸化アルミニウムゲルに混じり体重 2~2.5 kg の白色ウサギの足蹠皮下に注射した。60 日ないし 70 日に初回免疫と同じ量の追加免疫を行った。抗血清はそれぞれの免疫後一定の日数で耳静脈から採取した。

**HA の測定:** Stavitsky<sup>9)</sup>の方法に従った。

**ABC の測定:** Farr<sup>10)</sup>の方法に従った。

**Avidity の測定と avidity index の適用** Celada<sup>11)</sup>らの方法を IgM 抗体画分, IgG 抗体画分に適用した。

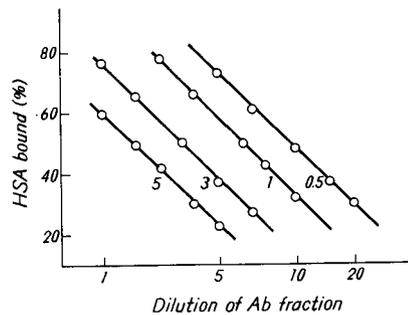


図1 ABC against different HSA conc.

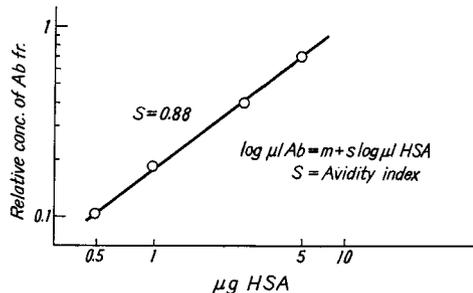


図2 Effect of HSA concentration on the amount of Ab fraction.

即ち IgM 抗体画分, IgG 抗体画分のそれぞれについて種々の抗原濃度における ABC 測定を行ない (図 1) 抗原 50% を結合する抗体画分濃度の対数をその時の抗原濃度の対数に対しプロットし (図 2) 得られた直線から傾斜 S を求める。

傾斜 S は 0 から 1 までの値を示す指標で, 抗体濃度に関係なく抗体の avidity を表わすものである。

**実験成績**

**1. 免疫法と応答の関係**

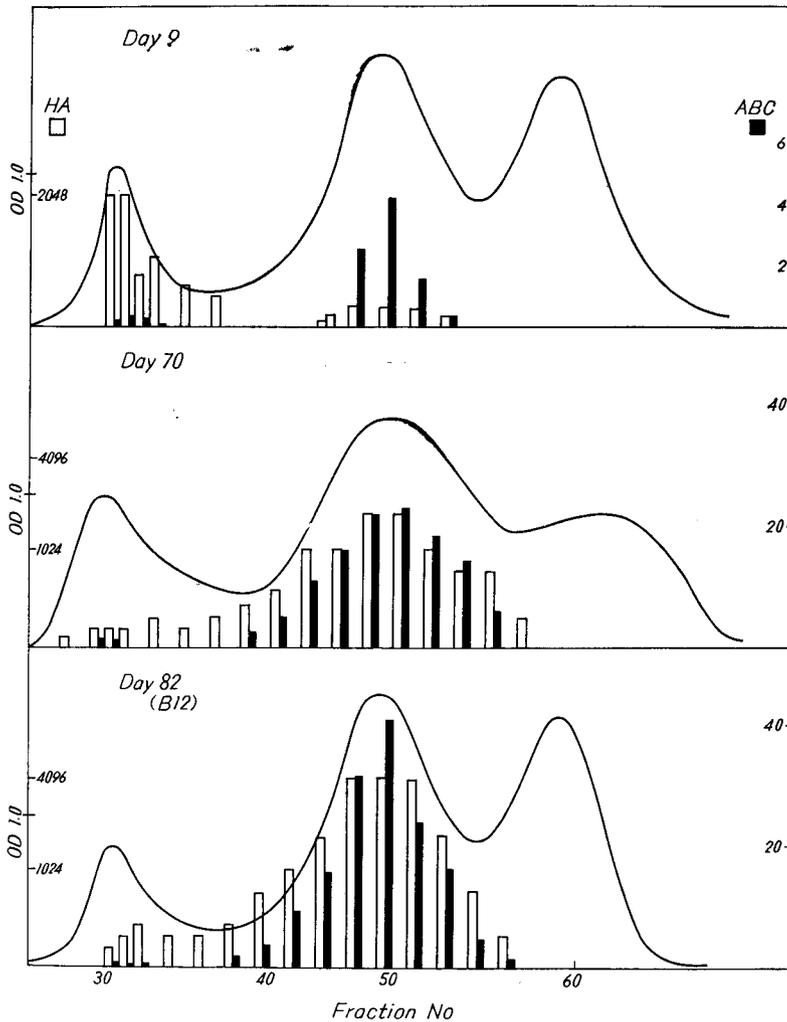
おのおの一個体当たり 20 mg, 4 mg, 0.04 mg の HSA で免疫したウサギから経時的に採取した抗血清について HA でその titer を比較した (表 1)。

HSA の免疫量が少ない群において抗体出現の遅延が

**表 1 HSA 免疫群の HA 価の変動**

Rabbit No.	mg HSA injected	Day 9	Day 12	Day 70	Day 82 (B-12)
1	20	6	10	10	14
2		4	11	11	14
3		8	11	11	14
4	4	4	8	11	14
5		4	9	11	13
7		9	12	14	14
8	0.04	—	—	9	14
9		—	4	14	14
10		—	—	—	14

表中の数字は  $10 \times 2^n$  に於ける n の値を示す



**図 3 #3 免疫血清の HA 及び ABC 活性の分布**

みられたが、一頭を除き70日目までに応答はかなりの増大を示す。titer に多少の変動はあるにせよ免疫量と titer の間に関連性は見いだせなかった。70日目に行われた初回免疫と同じ量の二次免疫によって、免疫量には関係なくすべての個体の titer は一致して高い値を示した。

次に同じ抗血清標品を Farr の方法に従って ABC の測定を行った(表2)。ここで用いたテスト抗原量は1 $\mu$ g/mlであり、数字はこの抗原濃度における原抗血清1mlが結合するHSA $\mu$ g量で表わされている。全体的な傾向はHAのtiterに平行する。

応答がIgM抗体とIgG抗体のいずれに由来するかを調べるためセファデックスG200を用い抗血清の分画を行い、その溶出画分のおのおのについてHAとABCを測定した。

図の例(図3, 4)からわかる様に各標品が示す両抗体のHAとABCに対する態度は前報の通りであった。

ハプテンに対する抗体の産生に際して、サルモネラ菌をアジュバントとして用いることによりIgM抗体に対する増強作用があること、また肺炎双球菌・腸内細菌のリポ多糖体抗原は撰択的にIgM抗体のみを産生することなどが知られている。ここでHSA-抗HSAの系にサルモネラ菌ないしその菌体LPSが同様の影響をもたらすかどうか、その応答の様子をHAを用いHSA単独免疫の場合と比較した(表3)。

抗原として用いたHSA-S. tmについて、菌体に対す

表2 HSA 免疫群の ABC 価の変動

Rabbit No.	Day 9	Day 12	Day 70	Day 82
1	42	600	—	—
2	2.3	26.5	38.2	237
3	550	500	594	396
4	5.3	90	30.1	124
5	6.6	140	30.2	196
7	49.5	600	152.0	112
8	—	—	5.3	171
9	—	—	17.8	264
10	—	—	—	—

表3 HSA+LPS 及び HSA. S. tm 免疫群の HA 価の変動

Rabbit No.	Antigen	Day 9	Day 12	Day 60	Day 72 (B-12)
370	HSA + LPS	9	8	10	11
374		9	9	11	ND
376		9	8	11	14
367	HSA-S. tm	5*	8**	9	ND
368		—	9	10	11
369		5	9	10	11

\* この欄の血清は day 8, \*\* この欄の血清は day 11

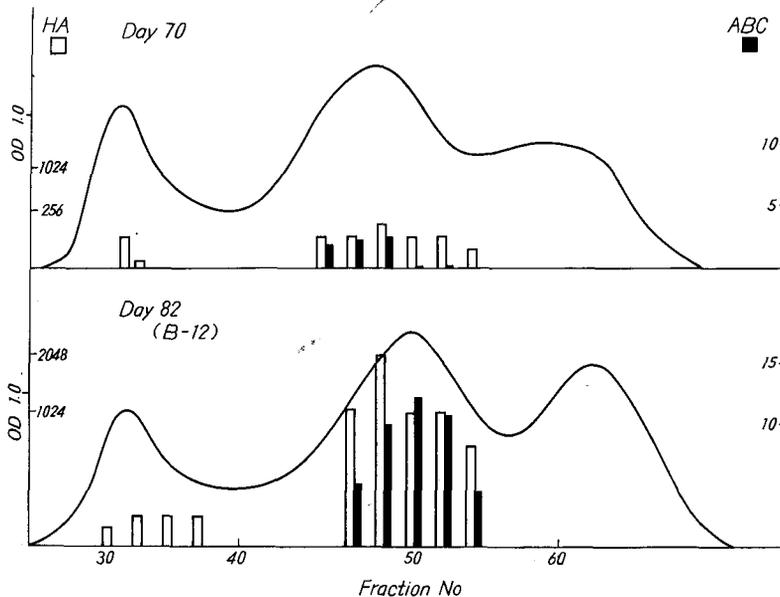


図4 #2免疫血清のHA及びABC活性の分布

る HSA の結合量は実測しなかったが、放射性標識 HSA を用い結合比を求めた他の実験（未発表）の条件を比較すると、一頭当りの免疫量は菌体湿重量 12 mg に対し HSA 50  $\mu\text{g}$  の結合量で免疫されていると推定され、HSA 0.04 mg 免疫群にはほぼ匹敵する。HSA+LPS 免疫群では HSA 量は 4 mg である。表にみられるように HSA-S. tm の系では明らかに血中抗体出現の時期に促進がみられる。HSA+LPS 群の応答を HSA 4 mg 群と比較してみても免疫の初期 9 日目において高い titer を示すことからサルモネラ菌ないしその菌体 LPS の増強作用が認められた。この増大が優先的に IgM 抗体に由来するかどうかは未確認であるが 2 ME 処理による HA の titer 低下から一部は IgM 抗体に由来すると考えられる。

経時的な応答の様子は、相対的に titer は低いながら、HSA 単独免疫と同一の経過をたどるようである。

## 2. avidity の変動

図 3 は、IgG 抗体画分が追加免疫によって ABC の増大を示し、一方 IgM 抗体画分は HA の増強は著明には認められなかったが ABC の力価は初回免疫のそれと同程度に存在する事を示している。これらの画分について Celada らの方法に従って avidity Index を求め、変動の様子を検討した。

この方法は元来抗血清の relative avidity を指標に用いたものであり三ケタにわたる抗原濃度差が要求されるが、ここではゲル濾過によって分画した各画分をプール、濃縮し最適な濃度に調整することによって比較的せまい抗原濃度幅で適用できる事がわかった（図 2）。

avidity の変動の様子を、HSA-抗 HSA の系では #3 の例、HSA-S. tm-抗 HSA-S. tm の系では #368 の例について、それぞれ図 5、図 6 に示した。

図から明らかなように、HSA 単独で免疫した場合、

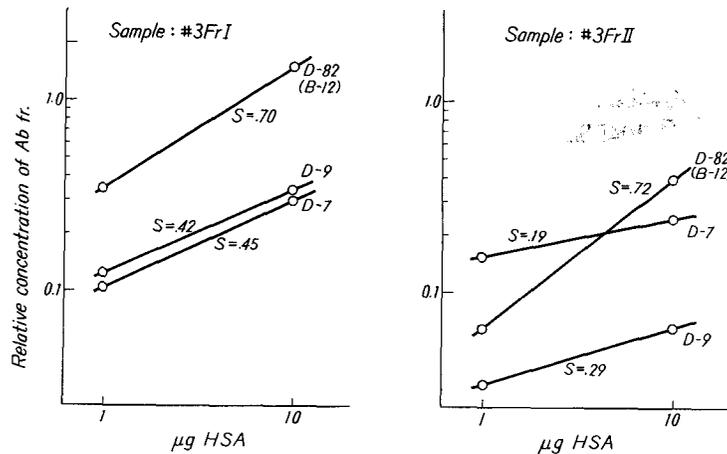


図 5 #3 Ant: HSA 免疫血清の Avidity の変動

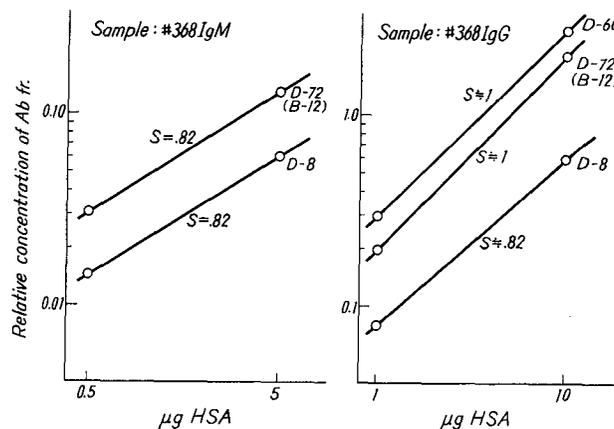


図 6 #368 Ant: HSA-S. tm に於ける Avidity の変動

一次免疫血清における IgG 抗体画分の avidity は比較的弱かったが ( $S=0.29$ ), 二次免疫血清のそれは明らかな増大を示した。一方 IgM 抗体画分の avidity は一次免疫血清でも比較的高い値を示し ( $S=0.42$ ), 二次免疫血清では IgG と同様な avidity の増大が認められる。

HSA-S. tm-抗 HSA-S. tm の系では IgM 抗体画分, IgG 抗体画分共に初回免疫において高い avidity を示した。

## 考 察

われわれはこれまでに, HSA に対する, ウサギの IgM 抗体画分が極めて低い ABC 力価しか示さないことを見, その原因を avidity の低さに由来するものであるという推定の下に実験を行って来た。これを要約すると, HSA 20 mg に対するウサギ抗血清を IgM 抗体画分, IgG 抗体画分に分離し, 両画分を高度に濃縮して反応を行ったが, IgM 抗体画分では期待された程, ABC 力価の増大はみられなかった。しかし  $I^{131}$  標識 HSA と IgM 抗体画分を混してゲル濾過を行うと, 放射能活性は抗原-抗体結合物の溶出画分に検出されることから IgM 抗体は抗原結合活性をもつことに間違いはない<sup>12)</sup>。

また IgG 抗体画分の一定量に, 同じ特異性を持ついろいろな量の IgM 抗体画分を加えた混合液をつくり, これについて, HSA に対する競合の有無を Farr test で調べたが, その結果は IgG 抗体画分単独の ABC と変わらなかった<sup>3)</sup>。このことは HSA に対する IgM 抗体の avidity の低さを示すものと考えられる。

今回は, HSA の免疫量を変えてその一次免疫血清と, 二次免疫血清について血清学的態度を調べた。HA 及び ABC に対する応答の様子は前回得られた結果と大差ない。HSA 免疫群についてみると, HSA 0.04 mg の少量では一次免疫の際血中抗体出現に遅滞がみられたが, 70 日目までに titer が増大すること, 二次免疫において大量免疫のそれと同程度の titer を示す事から, 応答に質的な差があったとは考えられない。データを示していないが, 初回免疫では応答の検出できなかった #10 の例において, 70 日目血清は免疫電気泳動による判定では IgM, IgG 両抗体活性が示唆される結果を得ている。

各免疫群において HA の titer は大略一致を示すのに反し, ABC の titer で order の差がみられたのは immunoassay の違いを反映したものであろう。換言すれば, HA が相対的な抗体量を比較するものであるに対し, ABC は avidity の大小を比較するものであることによるものであろうか?

免疫の経過に伴い IgG 抗体の avidity が増大するこ

とは良く知られた事実であるが, IgM 抗体でも同じことがみられるか否かについては, 未だ定説がない。HSA-抗 HSA の系において, IgM 抗体は前述の様に ABC に対する感度が低いことに加えて量的に少ないことが, この点の解析を困難にしている。

IgM 抗体を多量に得る試みのひとつとして, HSA をサルモネラ加熱死菌に BDB を用い結合し免疫に用いた。また IgM 抗体に対するアジュバント効果を期待して HSA を LPS に混じて免疫を行った。

表にみるごとく初回免疫において応答の増大がみられ, この増大は 2 ME による HA titer の低下から IgM 抗体によるものと推定されるが, 定量的な確認は行っていない。

ここで HSA-抗 HSA の系と HSA-S. tm-抗 HSA S. tm の系で IgM 抗体画分, IgG 抗体画分の avidity の変動を比較した。

測定された avidity index; S 値は結合定数の様な抗体そのものの物理定数を示すものでないが, これによって相対的な avidity の大小と変動を比較することはできる。

こうしてみると, IgM 抗体画分の avidity はわれわれが先に推定したことに反し, IgG 抗体画分のそれよりもむしろ高く, この点予想外の結果であり, 先の競合実験は両抗体画分の量的な組み合わせを変え再度検討する必要があると思われる。avidity の経時的な変動をみると, IgM 抗体画分 IgG 抗体画分共に増大が認められる。即ち HSA-抗 HSA の系においても, 免疫の経過に伴う avidity の増大は, 定説に従うと同時に IgM 抗体にも適用できると云える。

HSA-S. tm-抗 HSA S. tm の系では免疫の初期にすでに avidity は高い値を示す。

菌体の作用は増大を早める様に働くのか撰択的に高い avidity の抗体のみを産生させる様に働くのかこの実験からは不明であり今後の実験に待たなければならない。

## 結 論

ヒト血清アルブミン (HSA) を変量し或はサルモネラ加熱死菌に結合させ又は菌体リポ多糖体と混合しウサギを免疫し応答の検討を行い次の結果を得た。

1) 抗原量が少ない場合には, 抗体出現時期に遅れがみられた。抗原にサルモネラ菌を結合するか菌体リポ多糖体を混じて免疫した場合には HSA 単独免疫時に比し応答の増大が認められ, 抗体は最初から高い avidity を示した。

2) IgM 抗体画分の avidity は, IgG 抗体画分のそ

れに比し、むしろ高い価を示した。

#### 文 献

- 1) 大原 達, 木村卓郎, 清水正秀: 結核の研究, 第 27/28 集, 35, 昭 43.
- 2) 大原 達: 結核の研究, 第 30 集, 1, 昭 45.
- 3) 大原 達, 木村卓郎, 清水正秀: 結核の研究, 第 31 集, 39, 昭 46.
- 4) T. Kishimoto and K. Onoue: *J. Immunol.*, **106**, 536 (1971).
- 5) T. Kishimoto and K. Onoue: *J. Immunol.*, **106**, 536 (1971).
- 6) M. E. Lamm and P. A. Small Jr.: *Biochemistry* **5**, 267 (1966).
- 7) 山村雄一編: 免疫化学, p. 332, 朝倉書房, 昭 38.
- 8) C. A. Williams et al. ed. *Methods in Immunology and Immunochemistry* vol. 1 p. 164. Academic Press (1967).
- 9) A. B. Stavitsky: *J. Immunol.*, **72**, 360 (1954).
- 10) F. Celada: *J. Exp. Med.*, **124**, 1 (1966).
- 11) F. Celada: *Immunol.*, **17**, 189 (1969).
- 12) 大原 達, 木村卓郎, 清水正秀: 結核の研究, 第 32 集, 1, 昭 47.
- 13) H. N. Eisen and G. W. Siskind: *Biochemistry*, **3**, 996 (1964).