

17

モルモット免疫グロブリンGサブクラス
の分離同定とその生物学的意義について

杉 浦 勉

モルモット免疫 グルブリン G サブクラス
の分離. 同定とその生物学的意義について

杉 浦 勉

目次

頁

緒論

1

第I章

IgG サブクラス (IgG1, IgG2) の単離,
精製と, ヤギ抗 IgG1, IgG2 特異抗体
の調製

8

1. 材料および方法

11

2. 実験結果

(1). DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによるモルモット
IgG1, IgG2 の分離

22

(2). DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーによるヤギ抗-
モルモット IgG1, 抗モルモット IgG2 の分離

23

(3). 免疫吸着剤による相互混入の除去

25

3. 考察および抄括

28

第II章

破傷風トキソイド免疫によって産生される IgG1, IgG2
抗体の分離. 同定と抗体産生におけるアルミニウムアジュ
バントの効果

34

| | |
|------------|----|
| 1. 材料および方法 | 38 |
| 2. 実験結果 | 43 |
| 3. 考察および抄括 | 47 |

第Ⅲ章

ウシ血清アルブミンによる免疫の初期に産生される

| | |
|----------------------|----|
| IgG1, IgG2 抗体の分離, 定量 | 53 |
|----------------------|----|

| | |
|------------|----|
| 1. 材料および方法 | 58 |
|------------|----|

2. 実験結果

| | |
|-----------------------------------------------|----|
| (1). 精製抗ウシ血清アルブミン・IgG1, IgG2抗体 によるアナサキシー反応 | 66 |
|-----------------------------------------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| (2). 放射免疫定量法の基礎条件の検討 | 70 |
|----------------------|----|

| | |
|-------------------------------------------------------|----|
| (3). ウシ血清アルブミンで免疫したモルモットにおける 全身性および局所性(皮膚)アナサキシー反応 | 73 |
|-------------------------------------------------------|----|

| | |
|-------------------------------|----|
| (4). 免疫の経過における各個体の血清抗体の 定量 | 75 |
|-------------------------------|----|

| | |
|----------------------------------------------|----|
| (5). 免疫の各時期での個体より得られた抗 血清による受動性皮膚アナサキシー反応 | 75 |
|----------------------------------------------|----|

| | |
|------------|----|
| 3. 考察および抄括 | 77 |
|------------|----|

總 括

89

謝 辭

98

參考文獻

99

緒 論

(145, 147)

約40年前, Tiselius, A., Kabat, E. A., らの功績によつて蛋白質化学の研究の対象として取り上げられるようになった血清 γ -グロブリンは, Porter, R. R., らによるペプシン分解, Nisonoff, A., らによるペプシン分解などの酵素処理による分子の部分水解の研究の成果に引き続き, 還元剤処理⁽²⁷⁾などの蛋白質化学的研究の結果から, 抗体分子が多重ポリペプチド鎖構造を持つ蛋白質であることが証明された。これらの基本構造に関する知見をもとに, 多くの精製標品について一次構造解析が行われ, 全アミノ酸配列⁽²⁸⁾が決まり, さらに最近X線結晶解析による立体構造⁽²²⁾の知見も得られるにあつて, 抗体分子の分子構造はほとんど確立したものと考えられる。

γ -グロブリンをはじめ, 骨髓腫患者に見いだされるミエローマ蛋白質, Bence-Jonse 蛋白質などの, 免疫応答の産物である抗体あるい

は、これと構造的に重要な関係をもつ蛋白質
に対し、免疫グロブリン (Immunoglobulin; Ig) ⁽¹⁵³⁾
という名称がつけられた。

(5)

すべての免疫グロブリンは、図 1 に示すよ
うに、 $\gamma\gamma$ = 重結合によって結ばれた H 鎖と
L 鎖 α = 本のポリペプチド鎖から構成される
基本構造をもち、 $\gamma\gamma$ の試料の H および L 鎖
についてのアミノ酸配列の決定の結果から、
免疫グロブリン分子のもつ構造的に重要な性質
が明らかとされた。

このペプチド鎖をとってもアミノ末端側の
配列は、試料ごとに不揃いで一定せず、これ
に反して H 鎖のカルボキシル末端側は、比較
的に一定の配列を示し、これによって免疫グロ
ブリンをクラスに分類することが出来る。
さらに、この部分のわずかな違いによってク
ラスの中にサブクラスが分類されている。例
えば、IgG クラスのヒト免疫グロブリンには
、IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, の四種類のサブ
クラスが存在し、構造上の違いに対応して、

(52)

補体結合能，細胞への親和性などの機能上の違いが知られている。モルモットでは，⁽¹⁰⁾ Ig G1, Ig G2 の異った機能をもつサブクラスが報告されている。このように各ポリペプチド鎖の一次構造解析の結果から明らかにされたアミノ末端側の部分をペプチド鎖の可変領域，また，カルボキシル末端側のアミノ酸配列の比較的一定した部分を定常領域と呼んでいる。

免疫応答反応は，有脊椎動物における特異的な異物排除機構の主要な役割りを担うものとして，生命維持のために欠くことの出来ないものであり，特に重要なのは，その作用が特異的であることである。これは，細菌，ウイルスなどの病原微生物に限らず，異種血球あるいは，同種の臓器細胞でも異物として排除することから，免疫反応は，生体の監視機構の一つとして細胞の悪性化の防禦にも役立っていると考えられる。免疫グロブリンは，こうした免疫応答機構の一つの終端産物で

あり、リンパ球を前駆細胞とする形質細胞によって合成され、分泌される。進化の進んだ哺乳動物では、多くの種類の免疫グロブリンが产生されているが、表 1 に示したごく
(10, 15, 18, 21, 29-31, 38, 39, 53, 54, 66, 83, 118, 121, 122, 144, 149, 155)
 , 動物種によって必ずしも同じではない。免疫によって产生される抗体、特に血清中の抗体は、その約 75% が Ig G クラスに属する。

この十数年間に、免疫グロブリンに関する研究が進み、その分子構造が明らかにされると共に、抗原に対する抗体の活性特異性は、可変部位のアミノ酸配列によって決まるものであることが示され、多くの種類の抗原に対するそれぞれの抗体は、個々の配列をもち、免疫グロブリンが、構造的に不均一なものであることの原因は、一つの個体において免疫応答系が対応しうる範囲の広さを反映しているものと結論されている。こういった研究成果は、また抗体が产生される機構の解明にあたっても、関連した重要な問題を提起している。

生体が示す免疫応答は、非常に複雑な機構
 の組み合わせから成り立っていることは、抗体
 産生が個体の遺伝的性質によつて強く支配さ
 れ、また産生された抗体分子の構造的多様性
 を見ても明らかである。それぞれの抗原に
 対する特異抗体は、抗原に適合するように合
 成されたものではなく、細胞自身の持つ潜在
 的能力として、先天的に与えられたもので、
 染色体上の核酸の配列によつてありに決定さ
 れていることが、細胞レベルでの生合成の実
 験から証明されている。^(43, 132) 同じアミノ酸配列の
 免疫グロブリンを作り出す細胞群は、細胞ク
 ローンと呼ばれ、免疫担当細胞は、これらの
 クローン細胞の集団から構成されている。し
 たが、抗体産生における抗原の役割は、特
 異的な抗体産生細胞クローンがいかにか識別さ
 れ、抗体産生細胞へと分化するかであり、こ
 の選択は、一つの抗原に対してただ一つとは
 限らず、一般には関連した多数のクローンが
 動員されていると考えられる。これは、抗体

產生のクローニン選択説⁽¹⁹⁾とわれ、現代の免疫学の基礎はすべてこの考えに立って説明されている。

免疫応答の様相は、単一の抗原で免疫としてその授与条件の違いによって様々に変化すると、生体はそれぞれに反応にかたまりで防禦機構を動員していると考えられ、產生された抗体分子の多様性は、このような意味から生体の対応範囲の広さをあらわしている。

產生されたそれぞれの抗体分子のもつ生物学的機能が、免疫グロブリンのクラス、サブクラスの分子構造上の特性とどのように関連しているかを明らかにすることは、実際に生体内で働いている防禦機構の仕組みを知る上に重要と思われる。例えば、生体に非常に不利な効果をもたらすと思われるアレルギー性抗体は、生体防禦の上でどのような意味をもっているかであらうか。こういった点については、まだ解決されていない多くの問題を残している。

この論文では、モルセットの IgG フラスの抗体の中で、同一抗原に対して産生される自己組織感作性（アレルギー性）の IgG 2 抗体に実験の主眼を置き、 IgG 2 抗体の生物学的機能の違いを分子論的立場から明らかにする目的で、免疫血清中の各抗体の分離同定を行い、実際に単離、精製した標品の特性の検討から始の（第 I 章）、破傷風トキソイド免疫において産生される抗体と、アジュバント効果（第 II 章）、さらにアレルギー性抗体 IgG 1 の持つ意味を明らかにするものにウシ結晶アルブミンを抗原として、免疫のきわめて初期に産生されるこれらのサブクラス抗体の分離同定を行った。（第 III 章）

第 I 章 IgG サブクラス ($IgG1$, $IgG2$)
 の単離, 精製と, ヤギ抗 $IgG1$, 抗 $IgG2$ 特異抗
 体の調製.

抗体蛋白質は, 抗原との特異的結合反応
 性と, 種々の生物学的機能を示す活性と
 の二つの異なった性質を持っていることは良
 く知られた事実である.

1963 年, Benacerraf, B. ⁽¹⁰⁾ らは, 高度に免疫
 されたモルモットの血清中に, 超遠心分析で
 沈降定数 7.5, 電気泳動的に移動度の異な
 る二種の 7.5 抗体を発見し, 陽極側に移動する
 速い成分を 7.581, 遅い成分を 7.582 と
 命名した. 現在では, これらはモルモット
 IgG のサブクラスとして $IgG1$, $IgG2$ の如く呼
 ばれているが, これらの抗体は共に同一抗原
 による免疫で, 血液中に産生されるもので,
 同じ抗原と反応するにもかかわらず, 生物学
 的機能の上では, 非常に対照的の性質をもつ
 ものとして知られている. すなわち, $IgG1$

(16, 106, 124~127)

抗体は、補体結合能をもたず、自己組織親和性抗体として IgE とは別のアレルギー性抗体で、 PCA 反応などで検出される齧歯類に特徴的な免疫グロブリンである。一方、 $IgG2$ 抗体は、補体結合性で、自己組織感作能は持たないが、異種動物の組織を感作し、 PCA 反応を惹起する。 $IgG1$ には、異種動物に対する組織感作能の強いことも対照的である。以上のような理由から、モルモットは、ユークレ例としてアレルギー性抗体の研究のための実験動物としてよく用いられている。

これらの IgG サブクラスは、電気泳動的な分布は異なるけれども両者の完全な分離は非常に困難であり、イオン交換クロマトグラフィー(99)、等電点分画法(136)などの方法が利用され、効果が上げられてはいるが、完全に相互の混入を除去するためには、免疫学的活性クロマトによる精製法によるほかはない。

この研究では、モルモットの免疫血清から物理化学的方法による精製と共に、これらの

抗体分子のもつ抗原的特異性の違いを利用した免疫化学的方法との組み合わせによる Ig G1, Ig G2 標品の精製およびこれらの Ig に特異的な試薬として、抗 Ig G1, 抗 Ig G2 抗体をやぎを免疫することによって調製し、抗原としてのモルモット Ig G1, Ig G2, これらに対するやぎ抗 Ig G1, 抗 Ig G2 を相互に組み合わせるように精製を行い、すべて相互に混入が検出されないような高純度標品を得ることを試みた。

第 I 章では、精製標品を得るための過程を方法論を主体に詳しく述べることにしたい。

なお、正常モルモットでは、血清中の Ig G1 レベルは極めて低く、実際に精製することが不可能であるために、性質の知れた高純度ウシアルブミンに対する抗体が効率よく Ig G1 を含むので、これを利用して、Ig G1 の特異的精製を行った。

1. 材料および方法

材料;

- (1). ウシ血清アルブミン: Nutritional Biochemicals Co. Cleveland, U.S.A. a 3 同結晶品 (Lot. # 3404)
- (2). カラムクロマトグラフィー: イオン交換体として, ジエチルアミノエチル (以下 DEAE と略) セルロース, Whatman. DE-32, Lot # 2432, capacity 1.0 meq/g, W & R Balston England および DEAE-Sephadex A-50, capacity 3.5 meq/g, Pharmacia Fine Chemicals, カルロ過剰として Sephadex G-150, Lot. # 928, Pharmacia Fine Chemicals, Sweden, Bio-gel P-300, control # 143412, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif. U.S.A.
- (3). 活性クロマトグラフィー用担体: CNBr acti-
(4.24)
vated Sepharose 4B, Lot. # 6867, Pharmacia Fine Chemicals. Sweden
- (4). 精製毒素: カル内 = 重拡散法, 免疫電気泳動法には, IEP 毒素, Lot # 42 E 349, Behring-werke, A.G., W. Germany, 一元免疫拡散法には, Special Agar Noble, Difco Laboratories, Michigan, U.S.A

方法；

(1). 免疫動物および免疫方法

モルモットの免疫：ハートレイ系，雌，平均体重 400g に対して，0.9% 塩化ナトリウム水溶液に溶解したウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin : BSA と略) 3.0 mg を Freund's complete adjuvant (以下 FCA と略) に 1 : 2 の割合で乳化し，総量 0.5 ml を後肢の筋肉内に注射し，3 週間後に同様の条件で追加免疫を行い，追加免疫後 20 日目に，エーテル麻酔下で心臓穿刺により全採血を行った。1 回の免疫には，約 20 匹のモルモットを使用し，得られた抗血清は，フールして IgG1, IgG2 の分離材料とした。

ヤギの免疫：後述あるモルモット血清のクロマトグラフ後には得られた IgG1, IgG2 を画分され，約 5.0 mg の蛋白質量を FCA に 1 : 2 の割合で乳化し，総量 1.5 ml を四肢筋肉内に注射し，4 週間後に同一条件で追加免疫を行い，約 2 週間後に頸動脈から全採血を行い

血清を分離した。IgG 1, IgG 2 に対してそれぞれ1頭づつのヤギを使用した。(# 34, 27 kg, 雄, IgG 1 免疫, # 35, 24 kg, 雄, IgG 2 免疫), これらの抗血清は, そのほとんどの抗体が免疫原に対するものであるが, 両抗原に対する抗体も明らかに存在するため, 後述する活性クロマトグラフィーによる, (相互の吸収を行った。

ウサギの免疫: モルモット全血清に対する抗体は, ニュージランドホワイト種ウサギ(雄約3.0kg)に蛋白質量2.0 mgをFCAと1:2の割合で混合乳化し, 四肢筋肉内に注射を行い, 4週間後に同一条件で追加免疫を行った, その後3週目に頸動脈から全採血し, 血清を分離した。

(2) 硫酸塩析法による血清 γ -グロブリンの分画:⁽⁹²⁾ 得られた抗血清は, おべて硫酸塩析法により, γ -グロブリン分画とした。抗血清を0.9%塩化ナトリウム水溶液で2倍に希釈し, 氷冷下で等量の飽和硫酸アンモニウム

ム, pH 7.2 を加えて, 50% 飽和とし, 1 時間ス
 ターラーで攪拌後, 冷却遠心機 (Sorvall, Model R.C.
 2-B) で 8000 rpm 20 分間遠心を行った。得ら
 れた沈澱は, 出発血清量の 1/2 量に, 0.9% 塩化
 ナトリウム水溶液を加えて溶解し, 再び飽和
 硫酸を加えて 45% 飽和とし, 同様の操作を行
 った。最終沈澱は, 少量の 0.9% 塩化ナト
 リウム水溶液に再溶解し, イオン交換クロマ
 トグラフィー用の出発緩衝液に充分透析 (70℃
 のクロマトタンバー内) を行, た。主成分不溶性
 物質は, 高速遠心 (15000 rpm, 30 分) によりセリ
 の γ -グロブリン分画とした。

(3). イオン交換体によるセルモット IgG1, IgG2
 の分離: Watman DE 32 は, 0.5 N 水酸化ナトリ
 ウムとし, 0.5 N 塩酸で循環処理, 水洗後,
 0.033 M トリスリン酸緩衝液, pH 8.2 に平衡化し
 、2.5φ × 45 cm のカラムに充填し, γ -グロブ
 リン分画 60 ml (総蛋白量約 3.8g) を展開した
 。出発緩衝液が溶出される非吸着成分を
 分画後, 0.035 M トリス塩酸緩衝液, pH 8.5 (

mixing buffer) と 0.5 M 塩化ナトリウムを含む 0.25 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.0 による pH および塩の gradient 法により吸着成分の溶出を行なった。得られた各分画は、溶出条件の塩化ナトリウム濃度を 0.25 M に変えて、DE-32 による再クロマトグラフィーを行なった。再クロマトグラフィー後の各分画は、Sephadex G-150 によるゲル濾過（ホウ酸緩衝液、pH 8.0、カラム：2.5φ × 40 cm, L.K.B.）により単一ピークをブールした、しかしながら、各分画には、微量であるが相互の混入が認められ、それ以上の精製には、後述する活性クロマトグラフィーによるねばならない。

(4). イオン交換体によるヤギ抗血清の精製：

0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.03 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.8 で洗浄、平衡化した DEAE-Sephadex A-50 を 3.0 φ × 60 cm のカラムに充填し、γ-グロブリン分画 45 ml（純蛋白質量約 2.3 g）を展開した。出発緩衝液で溶出する非吸着成分を分画後、0.2 M 塩化ナトリ

ウムを含む 0.03 M トリス塩酸緩衝液、 $\text{pH } 8.6$ による step wise 法により、吸着成分の溶出を行った。

(5). 免疫吸着剤の調整: $1.0 \sim 2.0\text{ g}$ の乾燥重量の CNBr activated Sepharose 4B を、 0.01 M 塩酸で膨潤、洗浄後、ホウ酸緩衝液、 $\text{pH } 8.0$ に溶解した蛋白溶液 (IgG1, IgG2, 抗 IgG1, 抗 IgG2 等) をゲル懸濁液と混ぜた。この時非特異的結合を減少させる意味で、 0.5 M 程度に塩化ナトリウムを加えた。CNBr activated Sepharose 4B 乾燥重量 1.0 g に対して蛋白量は、約 50 mg が最大結合量であった。蛋白液、CNBr activated Sepharose 4B ゲルの混合は、室温（夏期は、 7°C のフロートチャンバー内）で一晩回転攪拌を行った。一夜攪拌後、 3000 r.p.m. 15分間遠心沈殿後、上清中に残っている蛋白量を 280 nm の吸収から決定した。蛋白質を結合したゲルは、余分な蛋白質をホウ酸緩衝液 $\text{pH } 8.0$ で洗浄し、 1 M エタノールアミン $\text{pH } 8.0$ で残存活性基をブロックするため、

回転攪拌器で 2 時間室温で攪拌を行なった。

ブロック処理終了後、エタノールアミンをホウ酸⁽²⁾緩衝液 pH 8.0 で充分洗浄後、3 M ロガンソーダで洗浄し、ホウ酸緩衝液で再び充分洗浄してから活性吸着剤として各段階における精製に使用した。

(6)、ヤギ抗 IgG1, 抗 IgG2 抗体の活性コロストグラフィーによる精製：セルセクト IgG1 および IgG2 をそれぞれ不溶化した免疫吸着剤を、 $1.0 \phi \times 15 \text{ cm}$ の小カラムに充填し交叉的に抗 IgG2, 抗 IgG1 抗体を繰り返し通過させて単一特異性抗体を図 2 のごとく調製した。ホウ酸緩衝液 pH 8.0 及び吸着成分の溶出には、3 M ロガンソーダをすべての実験で使用した。

これらの抗体標品から、抗体蛋白質のみを取り出す特異精製は、(7) 項の精製 IgG1, IgG2 を免疫吸着剤として、単一特異性抗体を吸着させ、3 M ロガンソーダによる溶出後、ホウ酸緩衝液 pH 8.0 に対して充分透析を行い、不溶性物質は、遠心除去した。

(7). 精製抗 Ig G1, 抗 Ig G2 抗体を用いた活性フ
ロマトグラフィーによる Ig G1, Ig G2 の精製:

この操作は, 抗原としての Ig G1, Ig G2 標品
中に含まれる微量の相互混入の除去が目的で
ある。(6) 項の単一特異性抗体のそれぞれを用
いて微量の混入 Ig G を交叉的に吸収を繰り返
し, 図 3 に示した方法で, 単一特異性とした

。これらの精製抗原は, 一部不溶化し, (6)
項における抗体の特異精製用免疫吸着剤とし
た。

(58)
(8). 蛋白質濃度の測定: OD 280 nm の吸収に
より測定した。(日立 Model 181 spectrophotometer)
蛋白質の吸光係数は, $E_{1.0\%}^{1.0\text{cm}}$ でヤギ Ig G = 14.0,
ミルミット Ig G は, Ig G1, Ig G2 の平均値 = 14.1,
BSA = 7.0 を使用した。(73) (104)

(9). 抗体価の測定: 抗血清中の抗体価の測
定は, 次の三方法により行った。可溶性
分離前の抗血清については, a). 定量沈降反
応, 精製途中の抗体価は, 相互の混入のチェッ
クをも含めて b). 一元免疫拡散法, 最終標品

中の抗体価は量的制約があるため c). inhibition
による一元免疫拡散法を使用した。

(57)
a). 定量沈降反応: 適当に希釈した 0.3 ml
の抗血清に変化量の抗原 0.5 ml を混合し、37°C
で 1 時間インキュベーション後、4°C に一夜
静置した。形成した沈澱は、1.5 ml のホウ酸
緩衝液 pH 8.0 で 3 回洗浄し、最終的に 1% 水酸
化ナトリウム 0.1 ml に溶解し、総量を 1.0 ml
に蒸留水で調整した。蛋白濃度の測定は、OD
280 nm の測定により決定した。

(57)
b). 一元免疫拡散法: Mancini, G. の方法を
使用した。抗体量未知の試量を含む 1.0 mm
厚の 1.5% 硝基板に適當な間隔で 2.0 mm 直径
の抗原孔を開け、濃度既知の抗原を 2 倍希釈
系列にして 5.0 μ l づつマイクシリンジで注
入する。湿潤箱に入れて 2 日 ~ 3 日反応後、
最終沈降輪の直径を目盛付ルーペで測定し、
その目盛を抗原蛋白濃度の函数としてグ
ラフにプロットし、得られた検量線の勾配、
硝基板に含む未知抗体の含有パーセント算が

(8)

ら、Becker, W., の式に代入して抗体価を決定した。

C). inhibition による一元免疫拡散法: Mancini の変法であり、抗原溶液に抗体量未知の被検抗血清を添加することにより生じる最終沈降輪の減少量を測定する。抗原および抗体量既知試量により得られた標準検量線との比例関係から、被検抗血清中の抗体価を決定した。方法の詳細は、Sugiyama, T., らの別報を参照されたい。⁽³⁸⁾

(10). 精製抗体の純度の確認: 各段階における精製の確認は、以下の方法を適宜組み合わせで行った。

(39)

a). 免疫電気泳動法: バロナール緩衝液、 $\text{pH } 8.6$, $\mu: 0.05$ に、 1.0% 濃度に溶解した IEP 素天を使用した。泳動は、 160 V , 90 分 (Electrophoresis chamber, Gelman, U.S.A., 安定電源 Model SJ 1055. ミツミ科学) 行い、抗血清を $1 \sim 2$ 日反応後、 0.15 M 塩化ナトリウム水溶液で洗浄、乾燥し、 1.0% アミトブラック 10B (Lot #. 414400 B, E. Merck, Germany) による蛋白染色

を行，た。

b). ケル内 = 重拡散法 : ホウ酸緩衝液 pH 8.0
に、1.2% に溶解した IEP 寡糖を使用し、
(93)

Ouchterlony 法により行，た。
(94, 95)

c). リングテスト : 内径 2.0 mm の毛細試験
管に抗血清を入れ、一定濃度の抗原溶液を重
層後、出現する沈降線形成時間により一〜

冊に区分した。

2. 実験結果

(1). DEAE - セルロースカラムクロマトグラフィーによるモルモット $IgG1$, $IgG2$ の分離

B SA 免疫後, 45% 硫酸飽和沈澱により得られた γ -グロブリン分画の DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーの典型的な溶出パターンを図 4 に示した。出発緩衝液で溶出される非吸着成分は、その大部分が $IgG2$ である。非吸着成分を溶出し十分に同一緩衝液で洗浄後、gradient 法により溶出する最初のピーク (図 4, p-2) は、 $IgG1$ が主であるが、やはり $IgG2$ の混入が認められ、p-3 から p-4 になるにしたがい、抗体の含量は減少し、 α -グロブリンやアルブミンの増加が見られる。図 4 の p-2 および p-3 は、それぞれ同一出発緩衝液による DEAE セルロースの再クロマトグラフィーを行った。それを図 5 A, B に示した。クロマトグラ

フイ-後の各分画は、それぞれ Sephadex G-150 によるゲル濾過を行い単一ピークをポ-ルした。図 6 に Sephadex G-150 によるゲル濾過の一例を示した。DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー、Sephadex G-150 ゲル濾過後の最終的分画について、ウサギ抗モルモット全血清に対して、免疫電気泳動を行、結果を図 7 に示した。その結果から p-1 を IgG2, 2p-2 を IgG1 の出発材料としたが、図 7 から明らかなように、他成分の混入が認められ、後述する免疫吸着剤による吸収により単一特異性とした。

(2). DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーによるヤギ抗モルモット IgG1, 抗モルモット IgG2 の分離:

モルモットの免疫原である BSA は、ヤギアルブミンに対して交叉反応性があるため、IgG の分離よりも、アルブミンの分離に重点、

を置いた。セルロースイオン交換体と比べ Sephadex イオン交換体は、その取り扱い上で難点があるが、非特異的な吸着等が少ないことから DEAE Sephadex A-50 によるカラムクロマトグラフィーを行った。

図 8 に、ヤギ抗モルモット IgG 2 の分離パターンを代表例として示した。ヤギ抗モルモット IgG 1 のパターンもほぼ同様の傾向を示した。図 8 に示したごとく、主に 2 つの大きなピークに分離され、抗体活性は両ピーク共に存在したが、高い塩濃度での溶出分画に、より多くの抗体成分が含まれていた。しかし鎖などの共通抗原や微量の混入抗原に対する抗体の除去は、もちろん物理化学的方法では不可能であり、後述する免疫吸着剤による相互吸収によらねばならない。

(3). 免疫吸着剤による相互混入の除去

抗原および抗体は、図9に模式的に示した手順で吸収を行った。DEAEセルロースカラムフロート7" フロー。Sephadex G-150 ゲル濾過後の Ig G1, Ig G2 分画それぞれの蛋白質質量30 mg をそれぞれ 1.0g (乾燥重量) の CNBr activated Sepharose 4B に結合させた免疫吸着剤カラムにより、交叉的に抗血清をくり返し通過させて吸収を行った。蛋白質ビートの確認は、UV モニター (L.D.C. Co. S. A) により行、た。

Ig G1, Ig G2 分画には、相互の混入があるため、ごく微量の損失はあるが、それぞれの抗原に対する抗体は完全に除去することができた。吸収前後のそれぞれの抗体のゲル内=重拡散および免疫電気泳動の結果を図10および図11に示した。図のごく他成分は完全に吸収除去され、それぞれ対応する抗原とのみ沈降線を生じ、Ig G1, Ig G2 には異種反応性は見られは、ことを確認した。これらの抗体標、

品から抗体蛋白質のみをとりだす特異精製は、次項の精製 Ig G 1, Ig G 2 を免疫吸着剤として、単一特異性抗体を吸着させ、3 M ロガンソーブによる溶出により調製した。これらの抗体は、Ig G 1, Ig G 2 に対して単一特異性を示し、かつ特異的に精製されたものである。

以上のごとく精製したヤギ抗モルモット Ig G 1, 抗モルモット Ig G 2 を免疫吸着剤カラムとして、抗原としての Ig G 1, Ig G 2 の相互吸収を行った。精製したヤギの抗体それぞれを蛋白質量にして約 50 mg に対して 1.0 g の CNBr activated Sepharose 4B を使用し、それぞれ交叉的にくり返し吸収を行った。単離標品は、ゲル内二重拡散でそれぞれに対応する抗体とのみ沈降線を生じ、またモルモット全血清に対する免疫電気泳動分析により対応する抗原とのみ反応し一本の沈降線を生じることからその純度を確認した。また、Bio-gel P-300 のゲル濾過では、Ig G 1, Ig G 2 とともに単一ピーク

ヲを示し、比較のために用いた精製ヒトミエ
ローマ IgG とほぼ同じ位置に流出した。

以上の結果は、図12、図13および図14に示
す。また、生物学的機能の面から、補体結
合能、皮フ感作能（同種または異種）につい
て、表2に示したごく特性を満足するもの
であった。（予防衛生研究所第二細菌にて測定
是）

3. 考察および抄括

モルモット $IgG1$, $IgG2$ 抗体の単離精製は、物理化学的方法と、活性吸着による免疫化学的方法との併用により相互に混入のない標品、およびそれぞれに特異的アヤギ抗 $IgG1$, 抗 $IgG2$ 抗体を得ることができた。

免疫グロブリンは、5つのクラスに分類され、構造の特徴や生物学的機能のちがいが見出されている。各クラスには、特有の抗原性があり、アイソタイプ変異として知られ、一次構造上のちがいが示されている。さらにこれらのクラスの中には、サブクラスが存在し、Fc部分に相当するH鎖上のアミノ酸配列のちがいに対応している。(表1)

ヒトの発性骨髄腫患者に見出される単クローン性細胞から産生される構造的に均一なミエローマ蛋白質の発見は、それぞれのクラスの高純度標品として、構造や機能の特徴づけに重要な知見をもたらした。

とあり、各免疫グロブリンのクラスに特異的
な抗血清の作製や、特にサブクラス抗原とし
て、またそれぞれに特異的な抗血清の吸収精
製試薬として広く使用されているが、他の哺
乳動物では、マウスを除いてミエローマ蛋白
質は利用可能なものではない。

セルモットにおける IgG サブクラスは、次
のように二種類に分けられている。一つは
、電気泳動で陽極に速く移動度を持ち、同種
動物にアナフィラキシー反応を起すことのでき
(59)
る IgG1 で、他の一つは、電気泳動で遅く、補
(108)
体およびマクロファージに対して結合性をも
つ IgG2 である。

セルモット IgG サブクラスの分離は、Yagi,
(154) (10)
Y., Benacerraf, B., らのゾーン電気泳動による分離
(11, 36, 99, 104, 105)
や、イオン交換クロマトグラフィーによる分離
などが試みられているが、相互の混入が指摘
されている。また、比較的最近開発された等
電点分離法がセルモット IgG サブクラスの分
(106)
離に應用され、かなり純度の高い標品を得る

こゝが可能であると報告されているが、操作
 上および処理容量などに制約がある。一方
 免疫グロブリン分子の構造解析の結果は、モ
 ルモット IgG1, IgG2 のアミノ酸配列の比較に
 おいて、その類似性は約 60% であり、ヒトに
 おけるサブクラス内での類似性 90% 以上と、
 ヒトのクラス間での類似性 30% との中間に位
 置するものと報告されている。(82)
 また H 鎖 (Y 鎖) のパパイン、ペプシン^(67, 68, 81) での酵素分解
 により生じた分画、CNBr による分画、L 鎖^(72, 81, 101)
 での比較研究の結果が数多く報告されている
 (102)。
 これらによると IgG1, IgG2 の Fd 領域には
 (103) 共通の抗原性があり、Fc 領域で惹起のアミ
 ノ酸組成上の差異を生じており、IgG2 は IgG1
 に比べ塩基性アミノ酸残基数が少なく、L 鎖の
 比較では、ヒトで観察されているのと同様に
 、ヒトの比が 2:1 で存在すること⁽¹⁰⁴⁾ が
 示されている。

以上のごとく構造研究から、あらかは構
 造上の違いをもつものとして示される IgG サ

グロブリンをその物理化学的性質に基いた非特異的方法のみを利用して分離することは極めて困難であることが示唆される。

本研究で行った精製方法は、抗原および抗体のそれぞれに相対する微量の混入を相互に吸収をくり返す事により徐々に除去する手順で行うわけであるが、方法の基本的な原理は、免疫グロブリンの特徴の一つである抗原性を利用したことである。精製過程の初期では、微量の混入によるおそれがあるが、免疫グロブリンの共通部分（例えばL鎖）に対する他のグロブリン、IgMやIgAなどの微量の混入の除去も期待される。しかし、IgM抗体は、抗原刺激に応じて、もっとも早期にピークに達する抗体であり、その産生量は、一般にIgGグロブリンの抗体に比べ微量で、血中濃度は、IgG抗体の10%以下であり、分子量がIgGの約5倍も大きいこと、またIgA抗体は、抗原刺激に対する応答の様子が、IgG抗体とは異なっており、通常の非経口的免疫方法

では、ほとんど産生されたいことが報告
 (7.22.41)
 されている。　　ここでは、B S A の筋肉内注
 射によつて高度に免疫したエルモット血清を
 用いているので、Ig M や Ig A 抗体の混入の可
 能性は、ほとんど無視できるものと考えられる。
 。

ここで見られたそれぞれの標品が、初期の
 目的に適合した、高度に精製された標品であ
 ることは、図10～13に示した実験結果から証
 明するところができる。

免疫グロブリンに関する研究が進むにつれ
 て、免疫応答におけるこれらのクラス、サブ
 クラスの抗体の産生は、その遺伝的支配や、制
 禦の問題と重要な関係にあることが明らかにな
 されてきている。これらの研究には、出来
 る限り純度の高い標品について解析を進め
 ることが必要であると考えられる。

本章において得られたエルモット Ig G 1,
 Ig G 2、およびこれらに対する特異的ヤギ抗
 Ig G 1, 抗 Ig G 2 抗体は、第二章、第三章にお

いゝ欠くことの できは、試料として用ゐられ
てゐる。

第II章 破傷トキソイド免疫によつて産 生される $IgG1$, $IgG2$ 抗体の分離、同定と抗 体産生におよぼすアルミニウムアジュバント の效果

モルモットを抗原で免疫して産生される抗
体 $IgG1$, $IgG2$ サブクラスは、共に免疫原と特
異的に反応する抗体であるが、その物理化学
的性質や生物学的機能において明らかな差を
示す。免疫応答の経過において⁽²⁴⁾も産生される
 $IgG1$, $IgG2$ の量的比率⁽²⁵⁾は、免疫原の性質、抗
原による前処理や、アジュバントの種類、有
無⁽²⁶⁾などに大きく左右される。例えば抗毒素
免疫において血中抗体価を測定する場合に、
免疫の経過に伴う抗毒素抗体価が測定方法に
よつて一定の関係を示さばいいことが知ら
れている。例えば血球凝集価 (*in vitro*) と毒
毒中和価 (*in vivo*) との間に、免疫の経過と共に
その平行関係がたつてくること、あるいは、
血球凝集価と皮膚でのアトピー反応

(active cutaneous anaphylaxis) との間に関係が見られたいは、トキソイドのカ価検定に関し、重要な問題であり、これらがどのような原因によるのか未だ明らかでない。

本章は、これらの点を明らかにする目的で行なわれたもので、セルモットを送る理由は、トキソイドカ価の検定に用いられてゐることで、アナフィキシー反応に非常に敏感であること、そして一個体から採血できる血清量が、この実験の目的に充分であること等である。

齧歯類の産生する血清抗体は、主として IgG1, IgG2 の両サブクラスに分布する。このうち IgG2 抗体は抗原と結合して補体の活性化を導くが、IgG1 抗体では補体結合能を欠く反面、自己(同種)組織への親和性を持つ結果皮膚アナフィキシー反応を惹起する性質を持つてゐる。しかし IgG2 抗体は、同種組織親和能を欠くが、異種組織親和性を示す。

その生物学的機能上の差をもつ IgG1, IgG2

について両者の量的比率を免疫の経過を以て、アジュバントの効果の有無とあわせて検討を行った。IgG 以外に IgM, IgA, IgE フラスコ抗体の産生も考えられるが、血中抗体価のほとんどが IgG 型抗体であるために、ここでは、このフラスコの抗体にのみ主眼を置いた。量的には少ないが、IgE 抗体は、自己組織感作能が高く、アレルギー性反応には重要な役割りを果たしているが、本章で述べるように、この種の抗体は一般の蛋白抗原による免疫方法ではほとんど産生されず、また血清中の含有量などの関係から実際の単離精製が困難であるため除外した。

本章では、上記目的のために、これらのフラスコ抗体の分離同定を第I章のゴットク調製した特異的ヤギ抗体の免疫吸着剤を用いて、破傷風免疫血清中の IgG1, IgG2 を実際に単離し、その性状の確認とこれらの抗毒素抗体量を沈降反応、受身血球凝集反応、マウスに対する毒素中和反応等によって測定し、免疫系

件による影響を考慮しつつ、両者について比較検討を行った。(なおこれらの抗毒素価の測定の一部は、国立予防衛生研究所第二細菌科において行われた)

1. 材料および方法.

(1). 破傷風トキソイド : 国立予防衛生研究所第一細菌より分与されたる標品である。菌培養濾液から硫酸分画, Sephadex G-100 によるゲル濾過および DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにより得たる精製毒素を用い, L-リジンの存在下でホルマリンを少量づつ加え温和な方法でトキソイド化された 2700 Lf/mg. N. (ウマ標準抗毒素を基準として測定されたフロキュレーション単位で表示) の比活性をもつ標品である。

(2). 実験動物および免疫方法 : 体重 $300 \sim 400 \text{ g}$ のハートレイ系モルモットを1群10匹づつ使用し, 各群ごとに異常値を示した検体を除外して平均 $8 \sim 9$ 匹分の血清をプールし, 試験抗血清とした。免疫のスケジュールは、表3に示した。またアジュバントの有無, 種類は、実験結果の項の表4-1, 表4-2の左側に一括して示した。特に記載しないかぎり以下のス

種類を使用した。

a). 水酸化アルミニウム : 水酸化アルミニウム^(70.118)

沈降型を Levine, L., の方法を基に調整した。

アルミニウム濃度は, 0.9 mg/ml とした。

b). 百日咳菌内毒素 : 千葉県血清研究所製⁽¹⁵³⁾

百日咳菌ワクチン (2100 億/ml) を, Westphal, O., の方法により調製した標品である。

(3). 試験抗血清中の IgG1, IgG2 の分離:

図15 に示したように, 抗血清を2倍希釈後, 硫酸アンモニウム (pH 7.2) 45% 飽和沈澱によって γ -グロブリン成分を分画し, 水酸化緩衝液 pH 8.0 に充分透析してから, 各量を原血清の $1/2$ 量に正しく調整し, $OD_{280 \text{ nm}}$ の吸収から蛋白質量を測定した。これらの分画の一定量を第I章 1(b)項にしたがって作成したヤギ抗モルモット IgG1 および抗モルモット IgG2 単一特異性抗体より成る免疫吸着剤カラムに添加し, 非結合成分と結合成分に分離し, 結合成分は, 3M ケオシアン酸ナトリウム溶液により溶出後, 一昼夜水酸化緩衝液

pH 8.0 に透析してからそれぞれの OD_{280nm} と全
 量を測定した。単一特異性抗体より成る
 免疫吸着剤カラムは、CNBr activated Sepharose 4B
 乾燥重量 0.5 g 当り抗体量 10 mg で、Ig G 1,
 Ig G 2 に対する結合容量は、 ~ 4 mg であるこ
 とを精製 Ig G 1, Ig G 2 を用いた実験であら
 かの確かめた。

添加する全 Ig G 量は、免疫吸着剤の結合容
 量を考慮して、全 Ig G 量が約 2 mg 以下と
 するように制限した。Ig G 1, Ig G 2 の各含有量
 は、免疫吸着剤に非吸着成分を、添加全量
 から差し引くことにより求めた。この理由
 は、Ig G 抗体の損失を防ぐ意味で飽和度を上
 げた 45% 硫酸分画中には、 γ -グロブリン
 以外の成分をかたりの程度含み、蛋白質量の
 換算に同じ吸光係数 ($IgG : E_{1.0cm}^{1.0\%} = 14$) を用い
 られること、また吸着成分は、溶出、透析
 後に不溶性の沈澱を生じるため正確な定量が
 困難なこと为主要な理由である。したがっ
 て、吸着成分の量は、全添加量 (OD_{280nm}) よ

り非吸着量 (OD_{280nm}) の差を 1.4 で除して求めた。また分離後の各 IgG に含まれる抗体量もこれを非吸着成分についての定量値を用い、分離前の抗体量の差から全容量を補正して原抗血清 1.0 ml 当りの IgG 1, IgG 2 抗体量として算出した。

(4). 抗毒素価の測定：抗毒素価の測定は、

以下の 2 つの方法を用いた。

a). 受身赤血球凝集反応：⁽⁶⁰⁾ 被検抗血清及び分離した抗体の希釈は、マイクログリッド用トレイ（内径 1.5 cm, 8×10 穴、高永製作所製）で行った。希釈液をトレイの穴に 0.3 ml 宛分注し、つぎに適当に希釈した被検試料 0.3 ml を第 1 管に加えた。以後 0.3 ml の連続 2 倍希釈系を行い、⁽²⁰⁾ 希釈後、BDB 法により精製破傷風トキソイドで感作したホルマリン固定ヒツジ赤血球 0.03 ml を加えよく振盪混和し、室温に 1 夜静置後判定した。被検抗毒素の単位は、同時に行った対照（ウマ標準抗毒素：予研 Lot. # ST-AT, および市販ヒト破傷風

抗毒素)に対する相対価を求め HAU/ml で示した。

b). マウスによる中和価：^(89,128) 1希釈に2匹のマウスを用いて、死亡時間、症状を観察し、⁽⁹⁰⁾ Score 法により $L^{+}/1000$ 価で示した。

本研究は、国立予防衛生研究所との共同研究のため、項目(1)および(2)は、同研究所細菌第二部より分与されたものである。また、抗毒素価の測定(4)項も予防衛生研究所において行われたものである。

2. 実験結果

免疫原の量、アジュバントの有無、などの条件を変えて免疫したモルモットから異、に時期に採血した抗血清中の抗体量を、血球凝集反応 (H A U) および中和反応 (Mouse U) により測定し、特性の類似したものを選んでプールした抗血清を分析の対象とした。これらの値は、表 4-1, 4-2 に分離前の抗毒素価として示してある。特異的吸着剤抗 IgG1, 抗 IgG2 カラムに一定量の抗毒素グロブリン分画を添加し、非結合量の測定から全添加量 - 非結合量 = 特異結合量に従って求めた特異結合量を IgG1, IgG2 について表 4-1, 4-2 に示してある。これらの特異吸着剤法による分離が完全であることは、それぞれの抗 IgG1, 抗 IgG2 抗体に対し、非吸着成分が反応しないことを重層法によるリング試験法で確かめ、さらに免疫電気泳動分析で相当するそれぞれ単一の沈降線のみを示すことから確認し

た。その代表例を図16に示す。

分離後の抗毒素血清中の $IgG1$, $IgG2$ 含量及び各成分に含まれる抗毒素価を表4~1, 4~2に一括して記載してある。これらの値は比較を容易にするために、すべて原抗毒素血清1 ml 当りの含有量として換算したものである。

以上の結果から、アジュバントの効果は、産生抗体量の明らかな増加を示すが、 $IgG1$, $IgG2$ 相対量には顕著な影響は見られず、抗体価の上昇は、主として $IgG1$ の増加による。また免疫の初期の $IgG1 / IgG2$ 比は、後期に比べるとはるかに小さい値で、モルモットの免疫において一般に観察されるのと同様、トキソイド免疫においても主として $IgG2$ 抗体が初期に、 $IgG1$ 抗体が後期に産生されることが確認された。しかしながら、これらの抗毒素価の HAU と $Mouse U$ を比較した場合、抗体価の増加に伴って $HAU / Mouse U$ の比が減少する傾向が見られ、特にアジュバン

ト免疫においてその傾向が顕著であった。

これらの理由から表4-2に示した抗毒素血清を選び、アジュバントの効果または、抗毒素価における $HAU / Mouse U$ との比の変化と、 $Ig G1$, $Ig G2$ との量的割合とに相関があるか否かを検討した。これらの結果は、表4-2の右側のカラムに数値であらわしてあるが、全部に共通した傾向として、 $Ig G1$, $Ig G2$ 分離後の抗体価は、分離前に比べ HAU に関してほぼ等しいか、やや高い値を示すのに反し、 $Mouse U$ では、分離前に比して低い値を示した。また、分離後の $Ig G1$, $Ig G2$ の両者を再混合した場合の抗体価の測定を行った結果、両者単独での抗体価の和と、両者を再混合した場合の抗体価では、 HAU では前者が高く、また $Mouse U$ では後者が高くなる傾向を示した。

図17は、試験抗血清に含まれる $Ig G1$, $Ig G2$ 抗体の量的推移と免疫期間との関係をあわせたもので、その割合が免疫の後期に顕著に

変化することを示している。また抗体価の
 上昇とともに全 Ig G 量の増加することは、図
 18 に示したごとく明らかであり、これは特に
 Ig G1 の増加によるもので、Ig G2 はほぼ一定
 値を保っていることがわかる。

3. 考察および抄括

ワケケンによる予防接種では、アジュバントの使用によって免疫効果は著しく増強されることは衆知の事実である。しかしアジュバントの使用は、免疫の増強と同時にアレルギー性反応に対する過敏症をも誘発する。特に人体への応用面では重要な問題である。この点、アルミニウムアジュバントは副作用が少く、免疫増強効果も知られている。

アルミニウム化合物として、 $Al(OH)_3$, $AlPO_4$ ⁽⁷⁰⁾ などが知られているが、Levine, L., によるアルミニウム化合物の種類によりその効果に有意な差を生じ、Rethy, L., によると至適濃度が狭く、過剰になると効果が減少すること(91)が報告されている。一方、村田らのセルモットに対する結果からは、アルミニウム化合物の種類による有意差は認められず、 $Al(PO)_4$ は、長期保存中に沈澱や凝集塊を生じやすく、製法の容易さ、成績の再現性等を考慮して

場合アルミニウム沈降型が最も実用的であると報告している。本研究では、村田らの報告をもとに、水酸化アルミニウム沈降型が使われたが、破傷風トキソイド免疫に対するモルモットの免疫応答では、使用した群との間に明らかに抗体産生の時期的、量的効果率を高められていることが確認された。しかし、はばら IgG サブクラス抗体量における両者の相対比率には、大きな影響は見られず、実験例に見られる差異はむしろ個体差と考えられる。これらの結果は、雑種の動物集団に見られる遺伝的な分散性に起因するものであろう。しかし、はばら全体を通じて明らかにすることは、免疫の進行に伴う IgG 1 抗体の顕著な増加である。一方、モルモットのハプロラン抗原による免疫においてアジュバントとして FCA (Freund's Complete adjuvant) を使用すると、IgG 1, IgG 2 両抗体の産生が見られるが、FCA を FI A (Freund's incomplete adjuvant) に変えると IgG 1 抗体の産生が主体となることが知られ

(10, 42, 100)

ている。また、ハポテンキャリアーとして E. coli 由来の糖脂質を使用し F1 A と共に免疫を行うと、⁽³⁴⁾ Ig G 2 抗体の選択的産生を生じるという報告がある。アルミニウムアジュバントを用いたこの実験では、免疫の後期において Ig G 1 抗体の割合が殆んどを占める結果が得られている。アジュバントの種類と産生

される抗体の種類との関連についての機構は、まだ不明であるが、アジュバントに菌体または菌由来の糖脂質が含まれる場合との差は明瞭である。これらの結果は、免疫応答に関与する細胞群のうちのどれと関係しているものかと考えられる。

一方、産生される Ig G 1, Ig G 2 抗体は、抗原投与量に大きく影響され、卵アルブミン^(96, 97, 142-143) の例では、0.01 mg 程度の少量の投与では、Ig G 2 抗体が全抗体量の 80% を占めるけれども、3.0 mg の投与では、⁽³⁵⁾ Ig G 1 抗体の割合が約 90% に達する。これらことから抗体産生細胞の抗原認識やアフィニティーの違いによるものと推論

されている。

破傷風トキソイド免疫において産生された抗毒素の抗体価に関して、凝集価の測定は、結合抗体量に關係し、一方、マウス単位は、中和抗体量に關連している。したがって、これらの抗体価の間にくい違いの見出されることは、Ig G1, Ig G2 抗体の生物学的機能の差によるものであることを示唆している。すなわち、抗毒素血清の HA 単位は、Ig G1, Ig G2 に分離した後にもそれぞれ HA 単位の数とほぼ一致するが、Mouse 単位については、分離後の値が減少し、特に Ig G1 に著しい。これらの結果は、分離操作による変性のためか、あるいは Ig G1, Ig G2 へ分離したための必然的な結果によるものかも知れない。しかし特異吸着剤への非吸着成分を用いて抗体価の測定を行っていると、変性による効果よりもむしろ Ig G1, Ig G2 の分離の結果に由来する可能性が高い、また分離した Ig G1, Ig G2 による再混合の実験から、混合物の抗体価は、混合前

のそれらの値と一致しないことも、HA単位に
 対ける減少は、IgG2抗体がIgG1抗体の反応に
 拮抗的であり、Mouse単位に對ける増加は、IgG2
 抗体が相築的に作用すると考え、説明が可能
 である。実際に抗原の生物学的作用を抑制
 すると考えられる機能面での作用を持つ、抗
 体と、これに関与しない抗体の存在するこ
 とは、細菌毒素、酵素等々の生物学的活性を
 持つ抗原で免疫した場合に良く観察されるこ
 とであり、中和性および非中和性抗体と呼ば
 れ、抗血清の avidity をあらわすものとして
 知られている。中和抗体の作用機構は、抗
 原の種類および、その生物学的活性を示す機
 構により異なるが、一般に中和反応は、抗原決
 定基に対する拮抗的阻害あるいは立体障害に
 よるものと考えられ、抗体の作用は、抗原の
 機能を直接破壊するものではないことが知られて
 いる。抗原との反応で見られる両サブグル
 抗体間の干渉現象は、生体内に對けるこれらの
 サブグル抗体の生物学的機能とそれと

の役割りを考える場合に重要な意味をもつもの
に思われる。

第四章 BSA免疫の初期に産生される Ig G 1、Ig G 2 抗体の分離、定量。

蛋白質抗原によるモルモットの免疫血清液中に主として産生される抗体は、Ig G クラスであり、免疫の比較的初期に Ig G 2、そして後期に Ig G 1 に抗体が検出される。前章で述べた通り、これらの抗体は、Ig G クラスに属するもので、同一抗原に特異的の抗体でありながら、その持つ生物学的機能は著しく異っている。すなわち、Ig G 1 抗体は、同種組織感作能をもち、補体結合反応を示さず、また異種動物への感作能を持たない。いわゆるアレルギー性抗体として知られ、蜚蠊類に特徴的である。これとは対照的に、Ig G 2 抗体は、他の動物種に見られるのと同様の性質を持ち、自己組織感作能は持たないが、補体結合能を持ち、異種組織感作能を示す。

免疫の条件、すなわち抗原の種類や免疫量、アジュバントの種類はこれと、影響されるけれども、高度に免疫されるモルモットにおける主要抗体成分は、IgG1クラスである。このような抗体産生の様子から、IgG2→IgG1という産生の過程が推論されるけれども、免疫応答におけるこれらサブクラス抗体間の相互関係は不明であるし、免疫個体にとって感受性の高い状態をもたらすような自己組織感作性（親和性）抗体を多量に産生する意味についても今では、きりした結論が出されてはいない。

この章では、免疫の極めて早期における皮膚および全身性アナフィラキシーの検出と、この時点での血中に存在するごく微量のIgG1、IgG2抗体の分離同定を行い、生体防禦におけるIgG1抗体の役割りと、これらサブクラス抗体の免疫応答における相互の関係を明らかにすることを目的としている。

実際に免疫の経過をみて血中抗体の検出

が、おかしな程低レベルの時期に、皮膚での
 アナフィラキシー反応を行くと、明らかに陽
 性の群が出現してくる事実がある。こゝに
 は、抗原の刺激に反応した組織感作性抗体
 の産生を示唆しているものと思われる。

一見生体にとって是不利であるように思わ
 れる IgG 抗体の産生は、皮膚でのアナフィ
 ラキシーをあらわしたり、また全身性アナ
 フィラキシーのためのショック死の原因にもなる
 。免疫のごく初期に現われるサブワース抗体
 の産生の様子は、それなれが持つ生物学的
 機能の差にもとづいた防禦機構上にはたして
 いる役割の違ひと深く関連がある様に思わ
 れる。

前章では、破傷風トキソイド免疫後 4~8
 週頃の血中抗体量の変動を中心に検討を行っ
 たが、抗原としてのトキソイドの入手が容易
 ではないこと、標品間での変動が高く、完全に
 精製されたものではないこと、また、抗体量
 の測定においても若干の問題を残しているこ

と何故の理由から、ここでは、非常に純度が高
 く、一般的に入手し易い血清白蛋白(BSA)を抗原とし
 て使用し、モルモットに免疫を行い、免疫後
 の比較的早期に生じる局所および全身性アナ
 フィラキシー反応に関して、サブクラス抗体
 の持つ役割を自己組織感作性抗体 IgG 1 を中
 心に検討を行った。以上の目的から、第 I
 章のゾレク特異精製した IgG 1, IgG 2 抗 B-
 SA 抗体を使用した受動皮膚および全身性ア
 ナフィラキシー反応の基礎的、定量的な検討をはじめとし
 て、放射能標識抗 IgG 1, 抗 IgG 2 特異抗血清を
 用いた放射免疫定量法による血清中の微量抗
 体を直接測定する方法の考案、この方法によ
 り得られた免疫の初期での血中 IgG 1,
 IgG 2 抗体量に関する実験成績にもとづいて
 、アナフィラキシー反応とサブクラス抗体の
 相互関係について考察した。

ここでモルモットの免疫においては、もう
 一つのアレルギー性抗体である IgE 型抗体
 の存在が報告されているが、IgE 抗体は、一

般の免疫条件ではほとんど産生されないこと
、 IgG 抗体と IgE 抗体とは、生物学的活性
に違いがあること等から区別することがで
きる。

1. 材料および方法

材料

- (1). ウシ血清アルブミン : Lot. #. 3404, Nutritional biochemicals Co., Cleve land U.S.A., の同結晶品
(以下 BSA と略)
- (2). モルモット血清アルブミン : 正常モルモット血清より、硫酸塩析, DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーによって精製を行った。
(以下 GSA と略)
- (3). Bio-gel P-10 : control #. 108432, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., U.S.A.
- (4). ポリスチレンチューブ : Falcon # 2038 (10×75mm). Fibreboard Corporation, Buerapark, Calif., U.S.A.
- (5). Na^{125}I : Lot. No. 1774. (carrier free). New England, Nuclear, U.S.A.
- (6). Protein A : Lot. No. 1180. Pharmacia Fine Chemicals Sweden.

方法:

(1). 免疫: 一群 4~10 匹のハートレイ系モルモット、雌、体重 350~400 g を使用し、アルミニウムアジュバント (0.9 mg Al/ml、沈降型) と共に BSA (1 μ g, 10 μ g, 100 μ g) を総量 0.5 ml、腹腔内注射により、1 免疫を行った。1 μ g BSA 免疫群の 1 シリーズのみ 1 週間後に同一条件で追加免疫を行った他は、1 回注射である。

(2). アナフィラキシー反応:⁽¹⁰⁸⁾

a). 受動性皮膚アナフィラキシー反応 (Passive Cutaneous Anaphylaxis: 以下 PCA と略): 体重 300~400 g の正常モルモットの背部の毛を電気バリカンで刈りとり、脱毛クリームで処理後、両背部の皮下に適当な間隔で被検抗血清を 0.1 ml ずつ正確に注射する。この時間もしくは 24 時間放置後、BSA 溶液 1.0 mg / 0.5 ml (以下、BSA 溶液はすべて 0.9% 塩化ナトリウム溶液に溶解したものを使用した) と、1.0% エバンスブルー溶液 0.5 ml (以下すべて 0.9%

塩化ナトリウム溶液に溶解したものを使用した)を混合し、前肢もしくは後肢の静脈から静注する、注射30分後に、フロロホルムで動物を殺し、背面の皮膚を剥いで、皮膚内面、外面の反応青色斑を、ツベルクリン用ノギスで測定した。1検体について同一動物で2点、もしくは2匹のセルモットを使用した。判定は、Ovaryの基準であらわした。可憐の色素斑の直径が、無反応: 0, 5mm未満: $\frac{1}{2}$, 5mm以上10mm未満: 1, 10mm以上15mm未満: 2, 15mm以上20mm未満: 3, 20mm以上: 4 とした。

b). 能動性皮膚アナフィラキシー反応 (Active Cutaneous Anaphylaxis: 以下ACAと略): BS Aで免疫を行ったセルモットの背面の毛を電気バリカンで刈りとり、両側背部の皮内に、BS A溶液を蛋白質量で 1 mg, 100 μ g, 10 μ g. および対照として 0.9% 塩化ナトリウム溶液を各 0.1 ml ずつ注射を行う。抗原注射の直前に 0.5% エバンスブルー溶液 1.0 ml を静脈内注射してあり、抗原注射後の局所の色素斑の

直径を測定して反応の強度を観察した。判定は、PCA反応の基準と同一である。

c). 受動性全身アナフィラキシー反応 (Passive Systemic Anaphylaxis: 以下PSAと略): 体重300g前後の正常エルモット耳静脈より抗体を静注し、48時間放置後、前肢もしくは後肢の静脈よりBSA溶液1.0 ml (蛋白質量: 2.0 mg) を静注し、全身性アナフィラキシーの程度を観察し、致死: 4, 重症: 3, 中等度: 2, 軽症: 1, 無症状: 0と区分して判定した。

d). 能動性全身アナフィラキシー反応 (Active Systemic Anaphylaxis: 以下ASAと略):

BSAで免疫したエルモットに対して行う全身性アナフィラキシー反応で、抗原の静注量、方法および判定の基準は、PSAと同じである。

(141)

(3). 精製標品の放射能標識化: 精製 Ig G1, Ig G2, ヤギ抗マウス Ig G1, Ig G2 抗体, および BSA を ^{125}I を用いて放射能標識化を行った。操作法はすべて同一であるので、精製 Ig G1 の標識化を代表例として示す。

蛋白質量 1.0 mg に対して ^{125}I 20 μCi と酸化剤 (クロウニン D 水溶液) を加え (50 μg) よく攪拌混合する。氷冷下で 10 分反応後、還元剤 (ヒドロサルファイトナトリウム) を加え (50 μg) 反応を停止させる。反応終了後すぐに Bio-Gel P-10 (カラム: 1.2 ϕ \times 30 cm) のカラムを通過させ遊離の ^{125}I を除去した。以上の操作で標識化した各蛋白質標品の放射能比活性は、

Ig G1 : $4.67 \times 10^3 \text{ cpm} / \text{蛋白質 } \mu\text{g}$, Ig G2 : $5.03 \times 10^3 \text{ cpm} / \mu\text{g}$, ヤギ抗 Ig G1 抗体 : $14.1 \times 10^3 \text{ cpm} / \mu\text{g}$, ヤギ抗 Ig G2 抗体 : $19.4 \times 10^3 \text{ cpm} / \mu\text{g}$, BSA : $22.3 \times 10^3 \text{ cpm} / \mu\text{g}$ であり、また、それぞれの TCA (10% トリクロロ酢酸) 沈殿物中に含まれる放射能の割合は、98% 以上で、すべての放射能が蛋白質結合性であることを確認した。

(4). モルモット抗 BSA IgG および IgG 2 抗体の測定： ポリスチレン樹脂が蛋白質の良く吸着する性質を利用して固相活性クロマトグラフィーの担体として用いられている。

ここではポリスチレン試験管を用い、抗原を吸着させ、これに特異的な抗体を反応させる。この抗体に特異的な放射能標識した抗-抗体の結合量から中間の抗体の測定を行った。図 19 に操作法を示した。

反応の手順は以下に示す段階に正合である。

①. ポリスチレン試験管への BSA の結合：

Falcon # 2038, ティスポ-サガルポリスチレン試験管に、1% BSA 溶液を先端を引きのばした 1.0 ml のメスピペットで注意深く分注する。室温に 1 時間静置後、パスツールピペットで BSA 溶液をぬきとり、0.15 M 塩化ナトリウムを含む 0.005 M リン酸緩衝液 pH 7.2 (以下 PBS と略) で 3 回洗浄を行った。

次に試験管内の余分のスペースを完全にブロ

ッウするものに 1% GSA 溶液を試験管の口
 まで満たし、室温で 1 時間静置してから、G
 SA 溶液をぬきとり、PBS で 3 回洗浄し、
 PBS を満たして使用時まで 7°C で保存した。
 (以上のように処理した試験管を以降 BSA-tube と略す)

②. 1 次抗体 (抗 BSA IgG 1 および IgG 2)

反応: BSA 免疫を受けたモルモットの
 各免疫期間で採血した血清を PBS で希釈し、
 BSA-tube に 0.1 ml 加えた。

この時非特異的反応を阻止するために 1% G
 SA 溶液を 0.1 ml 共存させ、反応液を PBS で
 0.5 ml に調整した。室温で 24 時間回転攪拌
 を行い反応させたのち、PBS で 3 回洗浄を
 行った。BSA と結合した全抗体の中から
 抗-抗体 (2 次抗体) として、IgG 1, IgG 2
 抗体をそれぞれ分離測定するために、1 抗体
 1 希釈について 2 系列用意した。

③. 2 次抗体 (ヤギ抗 IgG 1, IgG 2 抗体) の

反応: 1 次抗体を反応させた後、 ^{125}I を標識
 した 2 次抗体をそれぞれ 2 系列に一定量づつ

分注し、1% GSA 0.1 ml を加え、PBS の
総量を 0.3 ml に調整した。室温で 24 時間回
転攪拌を行い反応後、PBS で 3 回洗浄を行
い、洗浄後試験管に残り、1 いる特異抗体の放
射能計数を Auto-gamma Scintillation Spectrometer (Model
5320, Packard, U.S.A.) で測定し、
cpm を算出した。被検抗血清中の IgG 1,
IgG 2 各抗体量は、精製 IgG 1, IgG 2 を使
って求めた標準曲線から算出した。

2. 実験結果

(1). 精製抗 BSA IgG 1, IgG 2 抗体によるア
ナフィラキシー反応:

①. PCA 反応.

第 I 章のジクロロ精製したモルモット抗 BSA
A IgG 1 抗体を使用して同種皮膚での PCA
反応を行った。抗体の变化量を背面皮内に
注射してから 3 時間後に、抗原およびエバン
スブルーを静注し、30 分後に動物を殺して、
皮膚の内面、外面の色素斑の直径を測定した。
その結果、抗体量 $0.1 \mu g$ まで陽性反応を
示した。また、同一の抗体希釈系を用いて
感作し、注射後 24 時間で抗原および色素の静
脈内注射を行うと、最低感作抗体量は、 $1/10$ に
減少し、 $0.01 \mu g$ であった。これらの結果
は、表 5 にまとめを示した。

②. 精製抗体標品の純度に関する検討:

第1章において精製抗体中の純度を物理化学的および抗原的性質の面から確認した。

しかし本章において IgG の自己組織感作能について検討するにあたり、同様に自己組織感作能を有する抗体として知られている IgE の混入に対して考慮する必要がある。

しかし、 IgG 抗体と IgE 抗体では、最低感作量において IgE 抗体は IgG 抗体の $1/1000$ であること、および IgE 抗体の $t_{1/2}$ が $56^\circ C$ の時間の加熱処理で活性を失うこと、さらに感作の持続が IgG では4日以内であるのに対し、

IgE は2~4週間以上であること等により区別される。精製 IgG を $56^\circ C$ 、2時間処理を行い、未処理の抗体と同時にPCA反応を行なった。その結果は、表6に示すように影響はほとんど見られなかった。また、

感作の持続に関しては、精製 IgG 抗体を抗体量で $0.1 \mu g$ および $0.5 \mu g$ 皮内注射した場合 $0.1 \mu g$ では、2日目までが反応陽性で、3日

目には、完全に陰性となつた。しかし、0.5 μ g まで抗体を増量すると反応は、さきほどで陽性を示すが、明らかな減退が認められた。

また、最近ブドウ球菌の細胞膜より単離された蛋白質である Protein A が、IgG 分子とのみ結合反応を呈することから報告されている。精製したセルモット IgG 1, IgG 2 サブクラスも Protein A を結合することから、組織親和性に対する Protein A の結合の影響を調べた。

室温で 1 時間 IgG と反応後、PCA 反応を行うと、IgG 蛋白質量に対して等量以上の領域で PCA 反応の完全阻止が見られた。これは

の阻止効果は、抗体注射後の時間、および 24 時間の PCA 反応においても全く同様であった。結果は表 7 に示した。また異種組

織感受性抗体に対しても Protein A の効果は、セルモットの皮膚に対するウサギ抗マウス A 抗体およびマウス皮膚に対するセルモット IgG 2 抗体の例においても完全阻害の成立することを確認した。これらの結果も表 7 に示した。

③. 受動性感作における全身性および局所（皮膚）反応：

精製 Ig G1 抗体 $0.3\text{mg} \sim 0.01\text{mg}$ の変化量を正常
 モルモット（体重 300g 前後）に静注し受動的
 に感作を行なった。48時間後に、これらの感
 作動物に対し BSA 100mg を皮内注射すると
 、局所皮膚反応を生じ、また、BSA 2.0mg
 を静注すると全身性アナフィラキシー反応を生
 じた。感作抗体量 0.01mg では、皮膚反応
 のみ陽性で感作抗体量を増量しても、反応の
 程度は顕著な変化を示さなかった。一方、
 全身性反応は、抗体量 0.02mg 以上で特徴的
 なアナフィラキシー性の症状を示すが、動物
 は死に付致らない。感作抗体量 0.05mg 以
 上では、動物は典型的なショックを起し死に致
 った。（反応の激しいものでは、BSA 静注
 後数分以内に死亡した。）能動性免疫では、
 Ig G1 抗体と Ig G2 抗体とが必ず共存するた
 めに、全身性および局所アナフィラキシー反
 応に対する Ig G2 抗体の影響を検討した。

表 8 に示したように過剰の IgG 2 抗体を混入してもこれらの反応に影響は認められなかった。また受動性全身性感作にも Protein A による完全阻止が認められた。

(2). 放射免疫定量法の基礎条件の検討.

①. BSA - tube ^ a 1 次抗体 (精製抗 BSA IgG 1 抗体, 精製抗 BSA IgG 2 抗体) の結合:

ポリスチレン試験管へ, 1.0 ml の ^{125}I -標識化した BSA 溶液を加えた場合に, 結合する BSA 量を ^{125}I -放射能から測定した結果, $2.2\mu\text{g}$ であった。

BSA - tube | に結合する 1 次抗体量を測定した結果, IgG 1 = 42%, IgG 2 = 16% の抗体を含むことがわかった。対照実験として BSA を結合した試験管に対する結合量は, IgG 1 = 0.4%, IgG 2 = 0.5% でありほとんど無視し得る値であった。

これらの反応系に過剰の BSA 1.0 mg を加えた場合、結合放射能がほとんど 100 % 阻害されることから、結合が BSA 抗体との特異的反応であることを確認した。以上のごとく基礎条件を確かめ、BSA - tube への結合量を抗 BSA 抗体の濃度を変えて調べたところ、図 20 に示すように両抗体とも 1 μ g ~ 2 μ g までほぼ直線的に増加し、それ以上では飽和することを確認された。

Ig G1, Ig G2 抗体の BSA - tube への結合の速度は、図 21 から明らかになるように、3 時間で抗体の約 85 % が結合し、12 時間以後は徐々に反応の増加が見られた。これらの結果から反応時間は、24 時間で行った。

②. 二次抗体 (125 I-標識抗 Ig G1, 抗 Ig G2 抗体) の反応:

125 I 標識化ヤギ抗 Ig G1, Ig G2 抗体を用いた予備実験の結果から、二次抗体が過剰であると、非特異的結合の増加によって測定精度の

低下をきたすか、不足すると反応が不完全となり、定量範囲が制限される。したがって、二次抗体量は、200 ng と決め、以下の実験はすべてこの条件を用いた。

1 次抗体を反応させた系の試験管への 2 次抗体の非特異的結合は、抗 IgG 1 抗体で、加えた全放射能の 0.1 %、IgG 2 抗体で 0.3 % であった。さらに、IgG 1 反応試験管へ抗 IgG 2 抗体および IgG 2 反応試験管へ抗 IgG 1 抗体を反応させた交叉実験の結果からも、結合量はそれぞれ 0.15 % および 0.07 % であり、これらの 2 次抗体がそれぞれ IgG 1 および IgG 2 にそれぞれ特異的抗体であること、およびこれを用いた放射免疫測定系の非特異結合は、實際上無視できるところを再確認した。

B S A - tube へ変化量の 1 次抗体を入れ、24 時間反応後、それぞれに対する 2 次抗体を反応させ、洗浄後試験管に結合した放射能活性を測定し、1 次抗体量に対してプロット

ットした結果を図22に示す。1次抗体量を30 μ g までの範囲で拡大してプロットしたのが、図23であり、B S A 免疫の初期に採血した血清中の Ig G 1, Ig G 2 抗体の分離定量のための標準曲線として用いた。

(3). B S A 免疫モルモットにおける A S A 反応および A C A 反応:

1.0 μ g B S A をアルミニウムアジュバントとともに腹腔内に注射後、1週毎に5週まで A S A 反応および A C A 反応を観察した。

その結果は、表9に示したように10日以後に A C A 反応が陽性となるが、A S A 反応はすべての群で陰性であった。また1週間後に同一条件で追加免疫を行ない、2週以降の A C A 反応および A S A 反応を行なったが、1回注射群との明らかな差は認められなかった。そこで、B S A 量を10 μ g まで増量し、同様の実験を行なったところ、約10日目から

A C A 反応は明らかに陽性であったが、A S A 反応では、軽いものや無症状の群に二分され、A S A 反応が完全に陽性となるのは、約15日であることが観察された。抗原量が微量であるため動物による個体差が大きく、結果の判定が難しいために、以後の実験では、B S A $100 \mu\text{g}$ を抗原量として行った。結果は表9に示したごとく免疫後10日目でのA C A 反応、A S A 反応では、 $10 \mu\text{g}$ B S A 群とほとんど差を認めないが、15日目での両反応では明らかに増強が認められ、反応性の高い動物ではショック死が観察された。また、これらの動物は、A C A、A S A 反応のための抗原注射直前に部分採血を行い、分離した血清中に含まれるIgG1、IgG2抗体量を表10に示した。この結果から、A C A 反応をあらわした個体では、IgG1量が約 $1 \mu\text{g}$ 程度であり、全身性のショックをあらわす個体ではIgG1量が約 $10 \mu\text{g}$ 以上であることが確認された。

(4). 免疫の経過における各個体の血清抗体の定量:

100 μ g BSA をアルミニウムアジュバントとともに、腹腔内に注射し、免疫の経過を追って各個体から経時的に部分採血を行い、それぞれの時期での血清中の IgG 1, IgG 2 抗体量を測定した。結果は、図 24 に示したごとくすでに 10 日目頃から IgG 1, IgG 2 抗体は、ともに血中に検出され、15 日以後では、急激な IgG 1 の増加が見られた。また 20 日目に、ACA 反応、ASA 反応を行った結果、すべて色素斑 13 \times 13 mm 以上の ACA 反応陽性を示し、また、ASA 反応ですべてがショック死した。

(5). BSA 免疫の各時期の個体より得られた抗血清による PCA 反応:

(4) 項において各時期で採血した各個体からの血清について同種動物での PCA 反応を行

この結果のいくつかを表 11 に示した。

2~3 の例外を除いて、抗体量にほぼ比例して PCA 反応が観察された。また、56℃、2 時間の加熱処理では、これらの血清の示す PCA 反応に影響は見られず、Protein A を加えることにし、完全に阻害されることが示された。

3. 考察および抄括.

アナフィラキシー反応に関する抗体の研究は、古くから行われており、セルモットが多く使用されているのは、この動物がアナフィラキシーに対して非常に感受性が高いことによる。しかし、感作抗体量や抗原による惹起までの時間については、研究者によりまちまちであり、一定していない。

免疫のごく初期における最低感作の様子を検討するためには、これらの基礎的条件を決定しなければならぬ。

(56.57)

受動性感作については、Kabat, E. A., により報告されているように、セルモット卵アルブミン抗体でセルモットを受動的に感作した場合、 0.2 mg の抗体量で感作が成立し、動物は 100% ショック死するが、たとえば 0.04 mg 程度の抗体でも、セルモットは軽度のアナフィラキシー症状を示すこと、また、感作抗体量が多ければ、抗原による惹起注射まで

(9)

の時間が短縮されることなどについて詳細に示されている。しかし、感作に用いた抗体が完全に単離された標品ではないために、真の IgG / 抗体による感作量を考察することは困難であった。ここでは、精製抗 BSA IgG / 抗体を用いて実験を行い、0.05 mg の抗体を静脈内に注射後、48時間おいて抗原による惹起注射を行うと、モルセットは、典型的なショックをおこし、また 0.01 mg の抗体量でも軽いアナフィラキシー症状を呈した。このことから、IgG / 抗体の最低感作量は、従来報告されていた抗体量の約 $1/4$ であることが分かった。

アナフィラキシー反応の定量的研究は、PCA 反応においても行われている。Ovary, Z. らは、0.02 μ g のウサギ抗卵アルブミン抗体を皮内に注射後 6 時間で、抗原による惹起注射を行えば、局所皮膚反応が起さることを認めている。ここに得られた 0.02 μ g という値は、PCA 反応で証明している最小量である

ことを示している。⁽¹⁰⁹⁾

また、Ovary, Z., らは、PCA反応においては、一般に抗原過剰の抑制はなく、一定の強さの反応を出現させるためには、感作抗体量が少なければ少ないほど、多量の抗原を必要とすることを報告している。ところが、モルモットに対するウサギ抗体を使用した異種感作性抗体によるPCA反応と、モルモットIgG1抗体のような同種組織感作性抗体では、一般的に用いられる感作量や、抗原による惹起までの時間がそのまゝ用いられないことが、本実験から確認された。すなわち、精製抗IgG1を皮内に注射後、3~6時間の反応では、0.1 μ gの抗体を必要とするが、抗原による惹起注射を24時間後にすると、約 $\frac{1}{10}$ の0.01 μ gまで最低感作抗体量の低下が見られた。この値は、PCA反応におけるIgG1抗体による感作の閾値であると考えられ、抗原による惹起注射までの時間を延長することにより、皮内の標的細胞への結合効率が上昇

いたためであると考えられる。このことは、同種感作性抗体 IgG 1 による PCA 反応では、少なくとも 24 時間程度の反応時間を必要とするところを示しているものと思われる。

一方、多くの動物種において、同種および異種感作性抗体の存在が報告されている。^(10, 30, 47, 50)

例えば、マウスでは、2つの異なる同種感作性抗体が存在し、その1つは、 IgG 1 サブクラスに属し、他の1つは、ヒトの IgE アーゲン抗体の特徴と類似した性質をもつ免疫グロブリンである。モルモットにおいても、マウスで証明された IgE 様抗体と同じアッファイニティー抗体の存在が報告されているが、現在ではまだ十分に精製された状態で分離されてはいない。^(26, 71, 78, 87, 113, 150)

しかし、ここで本研究に使用した精製抗BSA抗体への IgE 抗体の混入の問題が生じてくるが、 IgE 抗体の産生は、免疫の特殊な条件下、たとえば、多糖体をアジュバントとして使用したり、同虫の抽出液にハポテン

(DNP) を結合させたものを抗原とした場合のように、免疫の特異的条件下でのみ比較的初期に短期間、ごく微量產生されることを報告されている。^(13, 85, 116, 133, 134, 140) また、IgG 1 抗体と IgE 抗体のそれぞれが示す生物学的な活性に違いがあることも知られている。すなわち、56℃ 2 時間^(14, 48, 49) の加熱で IgE 抗体の感作能力は完全に失われ、また皮膚での感作の持続が IgE 抗体では 2~4 週以上であるのに対し、IgG 1 抗体では、2~4 日であることが区別^(17, 51) される。これらの生物学的性質について検討した結果、精製抗 BSA IgG 1、および免疫のさめ初めで採血した試験抗血清中に、加熱処理による活性の変化は見られず、感作の持続は、2~3 日であり、4 日目には感作が消失することも確認された。これらのことから IgE の混入による感作の成立ではなく、IgG 1 による反応であることが確かめられた。また最近、ブドウ球菌の細胞膜より単離された蛋白質である Protein A が、IgG 分

子とのみ結合反応を呈することから報告され、
 この反応は^(33, 65, 131) IgG 分子の Fc 部分であることを
 示されている。 IgG 以外の免疫グロブリン
 とは反応しないことから、 IgG による反応
 の阻止を調べたところ、蛋白質量で等量以上
 を混和すると、 PCA および $ASDA$ 反応共に
 完全阻害が観察された。このことから、
 精製抗 BSA IgG 1 および試験抗血清の両者
 に、 IgE 抗体の混入が無いことを強く示唆す
 るものと考えられる。 $Protein A$ との反応の
 具体的な機構についてはまだ明らかではないが
 、 IgG との反応では、その Fc 部位との結合が
 知られていることから、抗原、 IgG 分子、
 $Protein A$ の三者の複合体の形成による立体障
 害によるものか、あるいは PCA 反応では
 組織中の特に肥満細胞や好塩基球に IgG
 分子の Fc 部分で結合する^(46, 110) ので、その結合
 を直接阻止することによるものかどちらかであ
 るだろう。

一方、血中抗体の証明においては、従来か

に一般に行われている定量法では、免疫のごく初期での抗体の検出は、量的に困難であった。最も感度の高いPCA反応を利用しても、10 ng前後の抗体が必要であるし、絶対量を比較することは、その方法からいっても困難である。ここでは、検出感度が高く、また同一血清からのIgG1, IgG2の分離が可能である放射免疫定量法を利用し、間接測定法を考察して定量を行った。

ポリスチレン樹脂が蛋白質を良く吸着することから、その性質を利用した固相活性吸着剤による測定が報告されているが、本章では、抗原に結合した一次抗体に対し、放射能標識した二次抗体を反応させ、この結合量が、一次抗体量に比例することから、ごく微量のそれぞれのサブクラス抗体を直接測定する方法を検討し、約1~20 ngの抗体量の分離定量が可能であることを確認した。この方法を用いて、免疫のごく初期でのサブクラス抗体の血中濃度を測定した結果、BSA免疫において免疫のごく初期から、血液中には、IgG1, IgG2両サブクラス抗体の産生が認めら

れた。

モルモット の主要な免疫応答系である IgG 抗体の産生は、生物学的機能の著しく異なる IgG1, IgG2 サブクラス系に分けられ、免疫の条件により異なるが、これらの応答系は、互いに独立しており、クラス間の抗体産生で^(3, 63, 107, 151)考えられている IgM → IgG ほど、継次的関係はない。したがって、サブクラス抗体の選択的産生現象は、細胞相互作用も含めたこの応答経路の違い、あるいは、二次的制御の結果と考えることができる。

抗体の活性特異性は、分子を構成している H- および L- 鎖上の可変部位におけるアミノ酸配列によって決まっており、またクラス、サブクラスは、H- 鎖上の定常部位の配列上の変異として知られている。そして抗体産生においては、単一クローン細胞から作り出される免疫グロブリンのクラスが継次的に変化する^{こと}が、培養細胞系あるいは、リンパ系細胞膜表面免疫グロブリン^{ほど}で観察され

、その産生機構との関連から論議されている。

これは、リンパ系細胞の分化と成熟、あるいは免疫応答の遺伝的背景を明らかにする上で非常に重要な問題を提起している。

また、免疫グロブリン構成にペプチド鎖の可変部位(V-部位)の変異は、抗体の活性特異性の変異に関する遺伝的起源を明らかにする上に重要である。もしも同一抗原決定基に対して産生されるサブクラス、異なった抗体が、互いに独立した免疫応答系、産物であるとするならば、これらの抗体の特異性の異同が問題となる。例えば、二つのサブクラス抗体が全く同一のV-部位の組を持つならば、一つのV-遺伝子に二個のC-遺伝子が同等に対応していることになり、個体発生におけるこれらの細胞の分化の時期が問題である。一方、二つのサブクラスの抗体が異なったV-部位の組を持つならば、或るV-遺伝子群を、二つのC-遺伝子による特定の組み合わせによって分り持つことになり、サブクラス抗体の間では、C-部位の構造によってその

特異性が分離されることになる。ここでは、V-C-遺伝子間の接合が何によって決まるかが問題となる。

組織親和性は、抗体分子のC-部位の構造によることがすでに明らかであるから、アレルギー性抗体は、その産生細胞の分化のメカニズムに深く関連していると考えられる。

これらの産生を支配している遺伝子のC-部位標識として、免疫グロブリンのアロタイプ特異性、またV-部位標識としてそのイソオタイプ特異性が存在し、遺伝的背景を明らかにするための重要な示標として研究が行われる。V-C-遺伝子間にいくつかの連鎖現象^(6, 115)のあることが報告されている。これらを考慮するならば、サブクラス抗体では、異ったV-部位を持った、特異性の異った抗体群であることが示唆される。

ヒトIgGには、四種類のサブクラスが存在し、IgGミエロマのサブクラス分布と、正常免疫グロブリン中の含有比率はとから、こ

これらの産生細胞クローンは、互いに独立したものであると考えられており、各サブクラス
の IgG の一次構造や、生物学的機能も顕著な
差があることが示されている。動物種によ
り分類が同等ではないが、モルモット IgG サ
ブクラスもこれに類似したものと考えること
ができる。

IgG1, IgG2 サブクラス抗体の産生は、
それぞれが持つ生物学的性質の違いに深く
関連した生体防禦機構上の役割を担っている
として、例えば、IgA 抗体が、気管粘液、小腸
粘液などに多量に含まれ、主に粘膜の保護の
(1, 23, 69, 76, 147)
ための重要な機能を果たしているように、
IgG1 抗体のように同種組織に対して親和性
のある抗体は、単なる二次的過剰産生物で
はなく、特有の機能、例えば、細胞、組織レ
ベルにおける第一線の防禦の役割を持っている
こと、また、IgG2 は、循環血中に多量に存
在して、中核的防禦に関係していることなど
を推論することができる。

残る問題は、生体防禦の立場から、これらの
サブクラス抗体の産生細胞の生体内分布を明
らかにすることであり、その調節機構の解明
とともに、自己組織親和性抗体に課せられて
いる真の役割を求めらるゝのに重要な課題であ
る。

総 括

第I章、第II章、第III章について全体を総括する。

蛋白質抗原によるモルモットの免疫で産生されるIgGサブクラスの抗体には、二種類のサブクラスIgG1およびIgG2の存在が知られている。IgG1は、同種組織感作能をもつアレルギー性抗体で、IgG2抗体とは対照的な生物学的機能上のちがいが示されている。

しかしながら、実際に防禦機構におけるこれらの抗体の役割および免疫応答における相互関係についてはまだ明確な解答が得られていない。これらの問題の解析を目的として、この研究では、特に同種組織親和性抗体IgG1を中心にIgG2抗体と比較しつつ、より詳しい性質を分子論的立場から検討を行った。

研究を進めるにあたってモルモットIgG1、IgG2の基準となる高純度標品の精製および、抗血清中に共存するこれらのサブクラス抗体

と、それぞれ分離定量することが必要であり、このためには、抗原性のちがいに基つき、それぞれに特異的抗血清を試薬として用いなければならぬ。さらに免疫されたモルモット血清中には、抗体活性を持たない IgG1, IgG2 も存在するので、免疫原に対して特異的抗体のみを選択的に分離し、このうち IgG1 を定量する必要があり、しかも微量抗体の定量は多くの点で工夫が必要であった。

また、正常モルモット血清中の IgG1 量は、極めて低いので、基準標品としての IgG1 は、BSA で高度に免疫した血清から精製し、IgG2 もこれに用いた。

免疫の初期における極微量の抗体に関する分離定量は、生物学的機能が出現する前後における血中抗体を定量の対象とするために、生物学的活性測定法よりもさらに高感度な方法が必要で、同相活性吸着による間接放射免疫定量法を応用することを試み成功した。

それぞれで得られた実験結果は、次のように
に総括できる。

1. BSAで高度に免疫したモルモット血清
から、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、
およびゲル濾過法を併用して IgG 1, IgG 2
標品を分離した。これらを用いてそれぞれ
ヤギに免疫を行い、抗 IgG 1, 抗 IgG 2 抗血
清を作成したが、明らかに相互の抗原と部分
的な反応が認められた。これは、両抗原
に共通抗原の存在することと、物理化学的方
法のみでの精製が、抗原的にみて完全でな
いことを意味している。モルモット IgG 1,
IgG 2 の生物学的機能に関する解析にあたり、
これは、その性質が対照的であるために、相互
の混入はある程度無視できるけれども、実際
にこれらを物質的に分離し、その性質を調べ
るためには不都合である。したがって、本研
究の基準となる標品および特異的試薬として
のヤギ抗体は、活性吸着剤法を利用して、相

互に交叉的に吸収操作を繰り返す行い、より純度の高い抗原によつて抗体の精製を、また精製抗体を用いてさらに抗原を精製する方法により、免疫化学的に相互に混入が検出できない標品の調製に成功し、これを用いてモルソット血清中の $IgG1$ 、 $IgG2$ 抗体の分離定量法を確立した。

2. 第1章で確立した方法を用いて、破傷風トキソイド免疫血清中に産生される $IgG1$ 、 $IgG2$ 抗体を実際に分離定量し、それぞれの抗毒素価を測定した結果、免疫の比較的初期では、 $IgG2$ 抗体が優位に検出され、免疫の進行に伴つて $IgG1$ 抗体の急速な増加が見られ、二次あるいは高度免疫では、血中抗体価の約90%以上は、 $IgG1$ が占める結果を得た。 $IgG2$ 抗体は、免疫の全期間を通じてほぼ一定値を保つていた。助剤としてアルミニウム沈澱と百日咳菌体内毒素の効果を検討した結果、抗体産生の時期の短縮および、抗体価

の上昇が観察されたが、抗毒素抗体としての IgG 1, IgG 2 の相対比には大きな影響が見られず、実験条件に見られる質的差異は、むしろ個体差によるものが大きい結果を得た。

分離した抗体の抗毒素価については、受身血球凝集価、マウスにおける中和価に相対的な差異が見出され、IgG 1, IgG 2 の比率によってこれらの値が変化しうることを示唆する結果を得た。

また、免疫のさめぬ初期において、血中抗体価が実測できる限界にある時期において、アタフィラキシー反応（ACA 反応）が観察されることが知られている。これらの事実は、自己組織親和性抗体が免疫のごく初期に産生されていることを示すもので、サブグロブリン抗体との関連上、およびこれらの抗体の生体防禦機構上の役割を明らかにする上に、このような時期での微量の抗体を定量する必要があり、研究をこの方向に進展させた。

3. 極微量のサブクラス抗体 IgG_1 , IgG_2 の分離定量のための間接放射免疫定量法の基礎条件を検討した。その結果 $1 \sim 20 \text{ ng}$ (10^{-9} g) の抗体量を測定することが可能になった。

この研究では、破傷風トキソイドに代えて、抗原として純度の高いウシ血清アルブミン (BSA) を用いて解析を行った。

BSA の変化量をアルミニウム助剤と共にエムulsion に免疫し、日を追って皮膚反応 (ACR 反応), 全身性反応 (ASA) などのアレルギー性反応のあらわれる条件を検討した。

その結果、 $100 \mu\text{g}$ BSA の腹腔内注射により 10 日目において ACR 反応陽性を示した。

ASA 反応は、15 日目頃から陽性となり、20 日目では両反応とも完全に陽性で、全身性ショックにより動物はすべて死亡した。

この他 $10 \mu\text{g}$, $1 \mu\text{g}$ BSA についてあわせて検討したが、 $100 \mu\text{g}$ 免疫群に比してやや不安定な反応を呈し、個体による明らかな差異が認められたので除外した。

前記条件で免疫したモルモットにおいて抗 BSA IgG 1, IgG 2 抗体は、ともに ACA 反応の陽性であるような免疫応答の初期においてすでに検出された。個体によらず、多少異なるが、殆んどが $1 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ の抗体濃度を含み、これより明らかに遅れてあらわれる ACA 反応陽性の時期では、明らかに急速な増加を示した。

抗血清中の IgG 1 抗体量は、精製抗 BSA IgG 1 抗体（第 I 章参照）を用いた別の実験で決められた受動性全身アナフィラキシー反応に必要な量少抗体量とほぼ同一のレベルであることと確認した。

この実験の結果から、免疫のさめると初期における IgG 1, IgG 2 抗体は、ほぼ平行して産生されておき、従来報告されているようなこれらのサブクラス抗体間の継次的あるいは選択的産生は認められず、少なくともこれらの各抗体に対する免疫担当細胞クローンは、独立に抗原刺激に対して応答していることを

示唆するものである。しかしながら実際にモルモットの免疫では、二次応答あるいは高度免疫などの後期における抗体の分布は、抗原の種類や量、あるいは注射の方法、アジュバントの種類等によって大きく影響されることなどが知られていることから、免疫応答系の多量性を考慮すれば、異物処理系の経路のりがい、あるいは抗体産生系の制禦機構にもとづく二次的影響の結果としても説明できる。

この研究では、モルモットにおけるもう一つのアレルギー性抗体 IgE が BSA 免疫に関連しているか否かを検討する必要があった。幸い、 $IgG1$ および IgE 抗体は生物学的機能上の違いから区別しうるため、これらの性質の違いに対する対照実験を行い、ここで観察された反応が、 $IgG1$ 抗体によるものであること、また $IgG2$ 抗体の共存による $IgG1$ のアナフィラキシー性反応に対する影響は、精製抗体の混合系について $IgG1$ の約20倍量の $IgG2$ の共存でも影響が無視できることなどを

立証した。

謝 辞

本研究は、東京大学医科学研究所細菌研究部において行なわれたもので、直接指導を賜った中村弘助教授に対し、また本研究への参画を許され、終始貴重な助言を与えられた麻布獣医科大学医化学教室古泉巖教授に対し深く感謝の意を表します。また、破傷風トキソイド、免疫血清など試料の供与と実験結果に対する貴重な討論を賜った国立予防衛生研究所第二細菌部部長村田良介博士、山本昭夫博士に篤く感謝の意を表するとともに、本研究の遂行に多大の便宜を与えられた細菌研究部本間遜教授、ならびに研究上の御援助をいただいた同研究部助手西村義久博士に心から感謝の意を表します。最後に本研究における一部の試料の調製および精製法の基礎条件の決定などに関しては、村上和久理学修士、石川直樹獣医学士によって行なわれたものであることを付記します。

参考文献

1. Ammann, A.J. & Steihm, E.R. (1966) Immune globulin levels in colostrum and breast milk and serum from formula- and breast-fed newborns. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 122, 1098-1100
2. Askerson, G.L. & Stone, S.H. (1965) Selective and specific inhibition of 24 hour skin reactions in the guinea-pig. 2. Immune deviation: Description of the phenomenon and the effect of splenectomy. *Immunol.*, 9, 205-217
3. Askonas, B.A., Williamson, A.R. & Wright, B.E.G. (1970) Selection of a single antibody-forming cell clone and its propagation in syngeneic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 67, 1398-1403
4. Axen, R., Porath, J. & Ernback, S. (1967) Chemical coupling of peptide and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, 214, 1302-1304
5. 東隆親, 浜口浩三, (1977) 免疫グロブリンの構造と形成, 蛋白質・核酸・酵素, 22, 1-16.
6. Baumann, J.B., Girard, J. & Vest, M. (1969) Solid-phase radioimmunoassay for human growth hormone. Experience with antiserum-coated assay-tubes. *Immunochem.*, 6, 699-713
7. Bazin, H., Levi, G. & Doria, G. (1970) Predominant contribution of IgA antibody-forming cells to an immune response detected in extraintestinal lymphoid tissue of germ-free mice exposed to antigen by the oral route. *J.Immunol.*, 105, 1049-1051
8. Becker, W. (1969) Determination of antisera titers using the single radial immunodiffusion method. *Immunochem.*, 6, 539-546
9. Benacerraf, B. & Kabat, E.A. (1949) A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig. V. The latent period in passive anaphylaxis in its relation to the dose of rabbit antiovalbumin. *J.Immunol.*, 62, 517-522
10. Benacerraf, B., Ovary, Z., Bloch, K.J. & Franklin, E.C. (1963) Properties of guinea pig 7S antibodies. I. Electrophoretic separation of two types of guinea pig 7S antibodies. *J. Exp.Med.*, 117, 937-949
11. Benacerraf, B., Merryman, C. & Binaghi, R.A. (1964) Studies of the L chains of guinea pig and rat anti-2,4-dinitrophenyl antibodies. *J.Immunol.*, 93, 618-624
12. Bennich, H. & Johansson, S.G.O. (1971) Structure and function of human immunoglobulin E. *Advan.Immunol.*, 13, 1-55
13. Binaghi, R.A., Benacerraf, B., Bloch, K.J. & Kourilsky, F.M. (1964) Properties of rat anaphylactic antibody. *J.Immunol.*, 92, 927-933

14. Binaghi, R.A. & Sarandon, M. (1966) Characterization of rat IgA and its non-identity with the anaphylactic antibody. *Int. Arch. Allergy*, 30, 589-596
15. Bloch, K.J., Morse, H.C. & Austen, K.F. (1968) Biologic properties of rat antibodies. I. Antigen-binding by four classes of anti-DNP antibodies. *J. Immunol.*, 101, 650-657
16. Bloch, K.J., Kourilsky, F.M., Ovary, Z. & Benacerraf, B. (1963) Properties of guinea pig 7S antibodies. III. Identification of antibodies in complement fixation and hemolysis. *J. Exp. Med.*, 117, 965-981
17. Bloch, K.J. (1967) The anaphylactic antibodies of mammals including man. *Prog. Allergy*, 10, 85-150
18. Bristany, T.S. & Tomasi, T.B. (1970) Serum and secretory immunoglobulins of the rat. *Immunochem.*, 7, 453-460
19. Burnet, F.M. (1959) The clonal selection theory of acquired immunity. Vanderbilt Univ. Press, Nashville, Tennessee,
20. Butler, W.T. (1963) Hemagglutination studies with formalinized erythrocytes. Effect of bis-diazo-benzidine and tannic acid treatment on sensitization by soluble antigen. *J. Immunol.*, 90, 663-671
21. Coe, J.E. (1968) The immune response in the hamster. I. Definition of two 7S globulin classes: 7S γ 1 and 7S γ 2. *J. Immunol.*, 100, 507-515
22. Coe, J.E. (1972) Studies on IgA of the guinea-pig. *Immunol.*, 22, 333-345
23. Crandall, R.B., Cebra, J.J. & Crandall, C.A. (1967) The relative proportions of IgG-, IgA- and IgM-containing cells in rabbit tissues during experimental trichinosis. *Immunol.*, 12, 147-158
24. Cuatrecasas, P., Wilchek, M. & Anfinsen, C.B. (1968) Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 61, 636-643
25. Davey, M.J., Asherson, G.L. & Stone, S.H. (1971) Selective and specific inhibition of 24 hour skin reactions in the guinea pig. III. Depression of cytophilic and haemolytic antibodies by pretreatment with antigen and the effect of irradiation. *Immunol.*, 20, 513-522
26. Dobson, C., Norseth, D.J. & Soulsby, E.J.L. (1971) Immunoglobulin E type antibodies induced by ascaris suum infections in guinea pigs. *J. Immunol.*, 106, 128-133
27. Edelman, G.M. & Poulik, M.D. (1961) Studies on structural units of the γ -globulins. *J. Exp. Med.*, 113, 861-884
28. Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Gall, W.E., Gottlieb, R.U. & Waxdall, M.J. (1969) The covalent structure of an entire γ G immunoglobulin molecule. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 63, 78-85

29. Fahey, J.L., Wunderlich, J. & Mishall, R. (1964) The immunoglobulins of mice. I. Four major classes of immunoglobulins: 7S γ 2-, 7S γ 1-, γ 1A (β 2A), and 18S γ 1M-globulins. J.Exp. Med., 120, 223-242
30. Fahey, J.L., Wunderlich, J. & Mishell, R. (1964) The immunoglobulins of mice. II. Two subclasses of mouse 7S 2-globulins: γ 2a- and γ 2b-globulins. J.Exp.Med., 120, 243-251
31. Feinstein, D. & Franklin, E.C. (1966) Two antigenically distinguishable subclasses of human A myeloma proteins differing in their heavy chains. Nature(London), 212, 1496-1498
32. Feinstein, A., Munn, E.A. & Richardson, N.E. (1971) The three-dimensional conformation of γ M and γ A globulin molecules. Ann.N.Y.Acad.Sci., 190, 104-121
33. Forsgren, A. & Sjöquist, J. (1966) Protein A from S. aureus. I. Pseudo-immune reactions with human γ -globulin. J.Immunol., 97, 822-827
34. Furuichi, K., Kato, M., Nakamura, T. & Koyama, J. (1974) Preferential production of IgG2 anti-hapten antibody in guinea pigs immunized with 2,4-dinitrophenyld lipopolysaccharides of Escherichia coli. J.Biochem., 76, 1147-1149
35. Furuichi, K. & Koyama, J. (1976) The effect of antigen dose on the amounts and affinities of guinea pig IgG1 and IgG2 anti-hapten antibodies. Immunochem., 13, 807-812
36. Furuichi, K., Kato, M., Nakamura, T. & Koyama, J. (1976) Further evidence for preferential production of IgG2 anti-DNP antibody in guinea pigs immunized with DNP-Escherichia coli. Immunochem., 13, 455-459
37. Gitlin, D. (1949) Use of ultraviolet absorption spectroscopy in the quantitative precipitin reaction. J.Immunol., 62, 437-451
38. Grey, H.M. & Kunkel, H. (1964) H chain subgroups of myeloma proteins and normal 7S γ -globulin. J.Exp.Med., 120, 253-266
39. Grey, H.M., Hirst, J.W. & Cohn, M. (1971) A new mouse immunoglobulin: IgG3. J.Exp.Med., 133, 289-304
40. Grov, A., Myklestad, B. & Oeding, P. (1964) Immunochemical studies on antigen preparations from Staphylococcus aureus. I. Isolation and chemical characterization of antigen A. Acta Pathol.Microbiol.Scand., 61, 588-596
41. Halpern, M.S. & Coffman, R.L. (1972) Polymer formation and J chains synthesis in mouse plasmacytomas. J.Immunol., 109, 674-680
42. Harel, S., Liacopoulos, P. & Ben-Efraim, S. (1972) Inhibition of immunological components by antigenic competition and other immuno-depressing procedures. Immunol., 22, 515-524
43. Haurowitz, F. (1965) Antibody formation and coding problem. Nature(London), 205, 847-851

44. 平山千里, 福田 勉, (1970). 免疫ケロガリン. 免疫学叢書 6.
p.150, 医学書院
45. Hjelm, H., Sjödahl, J. & Sjöquist, J. (1975) Immunologically active and structurally similar fragments of protein A from *Staphylococcus aureus*. *Eur.J.Biochem.*, 57, 395-403
46. Ishizaka, K., Ishizaka, T. & Sugahara, Y. (1962) Biological activity of soluble antigen-antibody complexes. VII. Role of an antibody fragment in the induction of biological activities. *J.Immunol.*, 88, 690-701
47. Ishizaka, K., Ishizaka, T. & Hornbrook, M. (1966) Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic antibody. *J.Immunol.*, 97, 75-85
48. Ishizaka, K., Ishiazka, T. & Menzel, A.E.D. (1967) Physico-chemical properties of reaginic antibody. VI. Effect of heat on γ E-, γ G- and γ A-antibodies in the sera of ragweed sensitive patients. *J.Immunol.*, 99, 610-618
49. Ishizaka, K. & Ishizaka, T. (1969) Physicochemical properties of human reaginic antibodies. VIII. Effect of reduction and alkylation on γ E antibodies. *J.Immunol.*, 102, 69-76
50. Ishizaka, K., Ishizaka, T. & Hornbrook, M. (1970) A unique rabbit immunoglobulin having homocytotropic antibody activity. *Immunochem.*, 7, 515-528
51. Ishizaka, K. & Ishizaka, T. (1971) Immunoglobulin E and homocytotropic properties. *Progress in Immunol.*, 1, 859-874
52. Ishizaka, K. & Dayton, D.H, Jr, ed. (1972) "The biological role of immunoglobulin E system." N. I. H.
53. Johnson, J.S. & Vaughan, J.H. (1967) Canine immunoglobulins. I. Evidence for six immunoglobulin classes. *J.Immunol.*, 98, 923-934
54. Johnson, J.S., Vaughan, J.H. & Swisher, S.N. (1967) Canine immunoglobulins. II. Antibody activity in six immunoglobulin classes. *J.Immunol.*, 98, 935-940
55. Johanson, S.G.O., Berglund, A. & Kjellman, N.I.M. (1976) Comparison of IfE values as determined by different solid phase radioimmunoassay methods. *Clin.Allergy*, 6, 91-98
56. Kabat, E.A. & Boldt, M.H. (1942) A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig. *J.Immunol.*, 44, 69-74
57. Kabat, E.A. & Boldt, M.H. (1944) A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig II. *J.Immunol.*, 48, 181-183
58. Kabat, E.A. & Mayer, M.M. ed. (1961) "Experimental immunology." Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illi. p.704-710

59. Kabat, E.A. & Mayer, M.M. ed. (1961) "Experimental immuno-chemistry." Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illi. p.133-240
60. Kameyama, S. & Kondo, S. (1975) Titration of tetanus antitoxin by passive hemagglutination. I. Titration of guinea pig antitoxins by various period of immunization. Jap. J. Med. Sci. Biol., 28, 127-138
61. Kindt, T.J. & Lawrence, E.M. (1974) Immunoglobulin structure and rabbit allotypes. Progress in Immunol., II., vol. 1, 13-24
62. Kley, V. & Stahman, M.A. (1959) Further physicochemical studies on polypeptidyl bovine albumin. J. Amer. Chem. Soc., 81, 4374-4377
63. Kreth, H.W. & Williamson, A.R. (1973) The extent of diversity of anti-hapten antibodies in inbred mice: Anti-NIP (4-hydroxyl-5-iodo-3-nitrophenacetyl) antibodies in CBA/H mice. Eur. J. Immunol., 3, 141-147
64. Kronvall, G. & Williams, R.C. (1969) Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. J. Immunol., 103, 828-833
65. Krohval, G. & Frommel, D. (1970) Definition of staphylococcal protein A reactivity from human immunoglobulin G fragments. Immunochem., 7, 124-127
66. Kunkel, H.G. & Predergast, R.A. (1966) Subgroups of γ A immunoglobulins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122, 910-913
67. Lamm, M.E., Lisowska-Berstein, B. & Nussenzweig, V. (1967) Comparison of guinea pig γ 1 and γ 2 immunoglobulins by peptide mapping. Biochem., 6, 2819-2828
68. Lamm, M.E. (1969) Further comparison of guinea pig γ 1 and γ 2 immunoglobulins. Amino acid compositions of the polypeptide chains and papain fragments. Immunochem., 6, 235-240
69. Lawton, A.R., Asofsky, R. & Mage, R.G. (1970) Synthesis of secretory IgA in the rabbit. III. Interaction of colostral IgA fragments with T chain. J. Immunol., 104, 397-408
70. Levine, L., Stone, J.L. & Wyman, L. (1955) Factors affecting the efficiency of the aluminum adjuvant in diphtheria and tetanus toxoid. J. Immunol., 75, 301-307
71. Levine, B.B., Chang, H. & Vaz, N.M. (1971) The production of hapten-specific reaginic antibodies in the guinea pig. J. Immunol., 106, 29-33
72. Lisowska-Bernstein, B., Lamm, M.E., Nussenzweig, V. & Benacerraf, B. (1967) Differentiation of guinea pig κ and λ light peptide chains by peptide mapping. Immunochem., 4, 441-445
73. Little, R.J. & Donahue, H. (1968) Special properties of proteins and small molecules of immunological interest. Methods in Immunology and Immunochemistry, II, 343-364

74. Löfkqvist, T. & Sjöquist, J. (1963) Purification of staphylococcal antigens with special reference to antigen A. *Int. Arch. Allergy*, 23, 289-305
75. Löfkqvist, T. & Sjöquist, J. (1964) Immunochemical analysis of staphylococcal antigenic preparations. *Int. Arch. Allergy*, 24, 244-253
76. Mach, J.P. & Pahud, J.J. (1971) Secretory IgA, a major immunoglobulin in most bovine external secretions. *J. Immunol.*, 106, 552-563
77. Mancini, G., Carbonara, A.O. & Heremans, G.F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.*, 2, 235-254
78. Margni, R.A. & Hajos, S.E. (1973) Guinea pig reaginic antibody. I. Isolation and purification of an antibody proteins with characteristics of IgE. *Immunol.*, 25, 323-332
79. Margni, R.A. & Hajos, S.E. (1973) Guinea pig reaginic antibody. II. Physicochemical and biological properties. *Immunol.*, 25, 333-343
80. McVeigh, T. & Voss, E. (1969) Properties of purified mouse homocytotropic antibody. *J. Immunol.*, 103, 1349-1355
81. Melamed, M.D. (1976) Amino acid sequence of the pFc fragment of guinea pig IgG1. *Immunochem.*, 13, 271-279
82. Melamed, M.D. (1976) Classification of IgG1 and IgG2 isotypes. *Immunochem.*, 13, 281-283
83. Montgomery, P.C., Dorrigton, K.J. & Rocky, J.H. (1969) Equine antihapten antibody. The molecular weight of the subunits of equine immunoglobulins. *Biochemistry*, 8, 1247-1258
84. 欠番
85. Mota, I. (1964) The mechanism of anaphylaxis. I. Production and biological properties of mast cell sensitizing antibody. *Immunol.*, 7, 681-699
86. Mota, I. (1967) Biological characterization of mouse early antibodies. *Immunol.*, 12, 343-348
87. Mota, I. & Perini, A. (1970) A heat labile mercaptoethanol susceptible homocytotropic antibody in the guinea pig. *Life Science*, 9, 923-930
88. Mota, I. & Perini, A. (1972) Heterogeneity of guinea pig homocytotropic antibodies. *Immunol.*, 22, 915-923
89. 村田良介 (1964) 毒素・抗毒素反応, 臨床検査. 8, 31-35
90. 村田良介 (1966) 毒素・抗毒素の Bioassay について, メディアサークル, 81, 1-28.
91. 村田, 山本, 血藤, 広瀬貞, (1975). トキソイドに対する各種アジュバントの作用について, アジュバントによる免疫の増強と副作用発現の機構に関する研究報告. 10~44

92. 中村 弘, 尾上 薫, (1967) 免疫の生化学, 181~196, 共立出版.
93. 中村 弘, (1967). 生化学研究法 II, 658~660, 共立出版.
94. 中村 弘. (1973) 免疫実験操作法 III. 589~591, 日本免疫学会編
95. 中村 弘 (1974) 臨床検査, 18, 23-28,
96. Nakamura, T., Ofume, K., Tamoto, K. & Koyama, J. (1972) Immunochemical studies on guinea pig non-precipitating antibodies to ovalbumin. J.Biochem., 71, 245-256
97. Nakamura, T., Ohkawa, T. & Koyama, J. (1973) Effect of varying the immunizing dose of ovalbumin on the production of non-precipitating IgG1 and IgG2 antibodies in guinea pigs. J.Biochem., 74, 23-32
98. Nisonoff, A., Wissler, F.C. & Lipman, L.N. (1960) Properties of major component of peptic digest of rabbit antibody. Science, 132, 1770-1771
99. Nussenzweig, H.A., Franklin, E.C. & Benacerraf, B. (1964) Immunologic properties of products obtained by mild reduction of human and guinea pig γ -globulin. Immunol., 93, 1008-1014
100. Nussenzweig, V. & Benacerraf, B. (1964) Differences in the electrophoretic mobilities of guinea pig 7S antibodies of different specificities. J.Exp.Med., 119, 409-423
101. Nussenzweig, V. & Benacerraf, B. (1966) Quantitative variations in L chain types in guinea pig antihapten antibodies. J.Exp.Med., 124, 805-818
102. Nussenzweig, V., Lamm, M.E. & Benacerraf, B. (1966) Presence of two types of L polypeptide chains in guinea pig 7S immunoglobulins. J.Exp.Med., 124, 787-803
103. Nussenzweig, V. & Benacerraf, B. (1966) Presence of identical antigenic determinants in the Fd fragments of γ 1- and γ 2-guinea pig immunoglobulins. J.Immunol., 97, 171-176
104. Oettgen, H.F., Binaghi, R.A. & Benacerraf, B. (1965) Hexose content on guinea pig γ 1 and γ 2 immunoglobulins. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 118, 336-342
105. Oliveira, B., Osler, A.G., Siraganian, R.P. & Sandberg, A.L. (1970) The biological activity of guinea pig antibodies. I. Separation of 1 and 2 immunoglobulins and their participation in allergic reactions of the immediate type. J.Immunol., 104, 320-328
106. Osler, A.G., Oliveira, B., Shin, H.S. & Sandberg, A.L. (1969) The fixation of guinea pig complement by γ 1 and γ 2 immunoglobulin. J.Immunol., 102, 269-271
107. Oudin, J. & Michel, M. (1969) Idiotypy of rabbit antibodies. II. Comparison of idiotypy of various kinds of antibodies formed in the same rabbits against salmonella typhi.

- J. Exp. Med., 130, 619-642
108. Ovary, Z. (1958) Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. Prog. in allergy, 5, 459-508
 109. Ovary, Z. (1959) Passive cutaneous anaphylaxis in guinea pig: Degree of reaction as a function of the quantity of antigen and antibody. Int. Arch. Allergy, Applied Immunol., 14, 18-26
 110. Ovary, Z. & Karush, F. (1961) Studies on the immunologic mechanism of anaphylaxis. II. Sensitizing and combining capacity in vivo of fractions separated from papain digests of antihapten antibody. J. Immunol., 86, 146-150
 111. Ovary, Z., Benacerraf, B. & Bloch, K.J. (1963) Properties of guinea pig 7S antibodies. II. Identification of antibodies involved in passive cutaneous and systemic anaphylaxis. J. Exp. Med., 117, 951-964
 112. Ovary, Z., Barth, W.F. & Fahey, J. (1965) The immunoglobulins of mice. III. Skin sensitizing activity of mouse immunoglobulins. J. Immunol., 94, 410-415
 113. Parish, W.E. (1970) Homologous serum passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pigs mediated by two r_1 or r_1 type heat-stable globulins and a non- r_1 heat labile reagin. J. Immunol., 105, 1296-1298
 114. Pecec, M. & Voiculutz, N. (1974) An antibody sandwich method for the radioimmunoassay of human α -fetoprotein. Immunochem., 11, 771-775
 115. Penn, G.M., Kunkel, H.G. & Gray, H.H. (1970) Sharing of individual antigenic determinants between a rG and a rM protein in the same myeloma serum. Proc. Exp. Biol. Med., 135, 660-665
 116. Perini, A. & Mota, I. (1973) The production of IgE and IgG1 antibodies in guinea pigs immunized with antigen and bacterial lipopolysaccharides. Immunol., 25, 297-305
 117. Porter, R.R. (1959) Hydrolysis of rabbit r -globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem. J., 73, 119-126
 118. Potter, M., Apella, E. & Geiser, S. (1965) Variations in the heavy polypeptide chain structure of gamma myeloma immunoglobulins from an inbred strain of mice and a hypothesis as to their origin. J. Mol. Biol., 14, 361-372
 119. Rethy, L. (1965) The production of use of a stable aluminum hydroxide adjuvant. Prog. Immunobiol. Standard, 2, 80-85
 120. Revoltella, R., Adler, L.T. & Osler, A.G. (1971) Antibody weight estimates at the nanogram level. J. Immunol., 106 1507-1518
 121. Rockey, J.H., Klinman, N.R. & Karush, F. (1964) Equine anti-hapten antibody. I. 7S β_2A - and 10S r_1 -globulin components

- of purified anti- β -lactoside antibody. J.Exp.Med., 120, 589-609
122. Rodkey, L.S. & Freeman, M.J. (1969) Occurrence and properties of rabbit IgG1 antibody. J.Immunol., 102, 713-719
 123. Salmon, S.E., Mackey, G. & Fudenberg, H.H. (1969) Sandwich solid radioimmunoassay for the quantitative determination of human immunoglobulins. J.Immunol., 103, 129-137
 124. Sandberg, A.L., Oster, A.G., Shin, H.S. & Oliveira, B. (1970) The biological activity of guinea pig antibodies. II. Modes of complement interaction with γ 1 and γ 2 immunoglobulins. J.Immunol., 104, 329-334
 125. Sandberg, A.L., Oliveira, B. & Osler, A.G. (1971) Two complement interaction sites in guinea pig immunoglobulins. J.Immunol., 106, 282-285
 126. Sandberg, A.L. & Osler, A.G. (1971) Dual pathways of complement interaction with guinea pig immunoglobulins. J.Immunol., 107, 1268-1273
 127. Sandberg, A.L., Götze, O., Müller-Eberhard, H.J. & Osler, A.G. (1971) Complement utilization by guinea pig γ 1 and γ 2 immunoglobulins through the C3 activator system. J.Immunol., 107, 920-923
 128. 生物学的制剂基淮 (1971). P.75-86, 厚生省.
 129. Siskind, G.W., Poul, W.E. & Benacerraf, B. (1966) Studies on the effect of the carrier molecule on antihapten antibody synthesis. I. Effect of carrier on the nature of the antibody synthesized. J.Exp.Med., 123, 673-688
 130. Sjöquist, J., Meloum, B. & Hjelm, H. (1972) Protein A isolated from Staphylococcus aureus after digestion with lysostaphin. Eur.J.Biochem., 29, 572-578
 131. Sjöquist, J., Forsgren, A. & Gustafson, G.T. (1967) Interaction between gamma globulins and protein A from Staphylococcus aureus. Nobel Symposium, 3, 341-348
 132. Smihies, O. (1963) Gamma-globulin variability genetic hypothesis. Nature, 199, 1231-1236
 133. Strejan, G. & Campbell, D.H. (1968) Hypersensitivity to ascaris antigens. IV. Production of homocytotropic antibodies in the rat. J.Immunol., 101, 628-668
 134. Strejan, G. & Marsh, D.G. (1971) Hapten-carrier relationships in the production of rat homocytotropic antibodies. J.Immunol., 107, 306-308
 135. Steshshulte, D., Orange, R. & Austen, F. (1970) Immunochemical and biological properties of rat IgE. I. Immunochemical identification of rat IgE. J.Immunol., 105, 1082-1086
 136. Stewart-Tull, D.E.S., Arbuthnoff, J.P. & Freer, J.H. (1975) Some properties of IgG1 and IgG2 globulins from normal and adjuvant stimulated guinea pig. Immunochem., 12, 941-947

137. 久齋
138. Sugiura, T., Nishimura, Y. & Nakamura, H. (1976) Quantitative micro-determination of antibody by inhibition in single radial immunodiffusion. Jap.J.Exp.Med., 46, 235-243
139. 鈴木 恒雄, 平井秀松 (1963) 免疫電気泳動法, 153-165, 電気泳動学会編
140. Tada, T. & Okumura, K. (1971) Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. I. Feed-back regulation by passively administered antibody. J.Immunol., 106, 1002-1011
141. Talmage, D.W. & Radovich, J. (1967) Labeling of antigen and antibodies. Method in Immunology and Immunochemistry, I, 387-396
142. Tamoto, K., Nakamura, T. & Koyama, J. (1972) Further studies on guinea pig non-precipitating 7S γ 2 antibodies to ovalbumin. J.Biochem., 72, 261-268
143. Tamoto, K., Nakamura, T. & Koyama, J. (1974) Non-precipitating guinea pig antibodies production by administration of excessive dose of ovalbumin. Immunol., 26, 455-463
144. Terry, W.D. & Fahey, J.L. (1964) Subclasses of human γ 2-globulin based on differences in the heavy polypeptide chains. Science, 146, 400-401
145. Tiselius, A. (1937) Electrophoresis of serum globulin. II. Electrophoretic analysis of normal and immune sera. Biochem. J., 31, 1464-1477
146. Tiselius, A. & Kabat, E.A. (1938) Electrophoresis of immune serum. Science, 87, 416-417
147. Tomasi, T.B. & Grey, H.M. (1972) Structure and function of immunoglobulin A. Progr.Allergy, 16, 81-213
148. Tracey, D.E., Liu, S.H. & Cebra, J.J. (1976) Structure of the heavy chain from strain 13 guinea pig immunoglobulin G1: Isolation of cyanogen bromide fragments. Biochemistry, 15, 624-629
149. Vaerman, J.P. & Heremans, J.F. (1966) Subclasses of human immunoglobulin A based on differences in the alpha polypeptide chains. Science, 153, 647-649
150. VanEs, L., DanHarink, H. & Pondman, K.W. (1970) The specificity of skin-sensitizing antibodies in the guinea pig. Clin.Exp.Immunol., 6, 741-751
151. Wang, A.C., Wang, I.Y., McCoormick, J.N. & Fudenberg, H.H. (1969) The identity of light chains of monoclonal IgG and monoclonal IgM in one patient. Immunochem., 6, 451-459
152. Westphal, O. (1965) Method in carbohydrate chemistry. Academic press, New York, Vol., 5, 83-91

153. World Health Organization, Immunology. (1964) Nomenclature for human immunoglobulins. Bull. World Health Org., 30, 447-450
154. Yagi, Y., Mair, P. & Pressman, D. (1962) Immuno-electrophoretic identification of guinea pig anti-insulin antibodies. J. Immunol., 89, 736-744
155. Zvaifler, N.J. & Becker, E.L. (1966) Rabbit anaphylactic antibody. J. Exp. Med., 123, 935-950

表 1. 各動物種における免疫グロブリン
クラス、サブクラス

| Species | Immunoglobulin class and subclass | | | | | | | | |
|------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|------|------|-----|-----|-----|
| Man | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgA1 | IgA2 | IgM | IgD | IgE |
| Mouse | IgG2a | IgG1 | IgG2b | J606 | IgA | — | IgM | — | IgE |
| Rat | IgG2a | IgG1 | IgG2b | — | IgA | — | IgM | — | IgE |
| Rabbit | IgG2 | IgG1 | — | — | IgA | — | IgM | — | IgE |
| Guinea pig | IgG2 | — | IgG1 | — | IgA | — | IgM | — | IgE |
| Dog | IgG2a | IgG2b | IgG2c | IgG1 | IgA | — | IgM | — | IgE |
| House | IgG2a | IgG2b | IgG2c | IgG-T | IgA | — | IgM | — | IgE |
| Cow, Sheep | IgG2 | — | IgG1 | — | — | — | — | — | — |

* No relationship between human and other mammalian IgG subclass

代謝, Vol. 12, No. 5. 抗体の構造と機能
p. 148 以下

表 2. 抗 B S A Ig G 1, Ig G 2 抗体 の
抗体含量と生物学的活性の比較

| | | IgG 1 | IgG 2 |
|-----------------------|------------------|-------|-------|
| Serum (mg/ml) | Total protein | 3.2 | 5.6 |
| | Antibody content | 1.3 | 0.5 |
| PCA reaction | Homologous | + | - |
| | Heterologous | - | + |
| Complement fixability | | - | + |

表 3. 破傷風免疫のスケジュール

| Exp.No. | Serum No. | Antigen dose | Immunization period (weeks) | | | |
|---------|------------------------------------|--------------|----------------------------------|------------------------------------------|----------|---|
| | | | 0 | 4 | 6 | 8 |
| 1 | P(F-1-4) P(A1-1-4) | 10 Lf | 1st.inj. | bleeding | | |
| | P(F-1-6) P(A1-1-6) | 10 Lf | 1st.inj. | 2nd.inj. | bleeding | |
| | U-H,A-L. U-L,A-H. U1-10,A1-5 | 2 Lf | 1st.inj. | 2nd.inj. | bleeding | |
| | Exp.V-7.8.10 | 2 Lf | 1st.inj. | bleeding | | |
| | IV P-1 VI -3 VI -6 VI -17 | 2 Lf | 1st.inj. 1st.inj. 1st.inj. | bleeding bleeding 2nd.inj.bleeding | | |

文献 91.より

表 4-1. エルモッ ト破傷風抗毒素血清中
の IgG1, IgG2 の分離. 同定.

Exp.1

| Antiserum (Immunization) | | | Before isolation | | Isolated fraction | | | | | |
|-----------------------------|----------------------|------|-------------------------------|-----------|-------------------------|------|----------|-------------------------------|--------------|-----------|
| Serum # | Adjuvant | Week | Antibody titer in ml of serum | | Total mg in ml of serum | | | Antibody titer in ml of serum | | |
| | | | HA U* | Mouse U** | IgG1 | IgG2 | (Sum) | IgG1 HA U | IgG2 HA U | (Sum) |
| P(F-1-4) | — | 4 | 0.39 | 0.3 | 1.3 | 3.2 | (4.5)*** | 0.08 | 0.06 | (0.14)*** |
| P(A1-1-4) | A1 [†] | 4 | 0.44 | 0.5 | 1.0 | 3.4 | (4.4) | 0.4 | 0.2 | (0.6) |
| P(F-1-6) | — | 6 | 0.78 | 2.0 | 1.3 | 3.3 | (4.6) | 0.4 | 0.08 | (0.48) |
| P(A1-1-6) | A1 | 6 | 3.1 | 5.0 | 1.9 | 4.6 | (6.5) | 2.7 | 0.2 | (2.9) |
| U-H, A-L | A1 | 6 | 6.5 | 15-20 | 1.8 | 4.1 | (5.9) | 5.8 | 1.1 | (6.9) |
| U-L, A-H | A1 | 6 | 1.8 | 2.5 | 1.4 | 3.9 | (5.3) | 0.3 | 0.2 | (0.5) |
| U, A-M | A1 | 6 | 2.8 | 3.0 | 1.1 | 3.6 | (4.7) | 0.7 | 0.2 | (0.9) |
| U-1-10, A-1-5 | A1 | 6 | 3.1 | 4.0 | 0.9 | 3.2 | (4.1) | 0.9 | 0.2 | (1.1) |
| Exp-V-7 | — | 8 | 14.0 | 30.0 | 1.6 | 3.9 | (5.5) | 11.4 | 7.2 | (18.6) |
| Exp-V-8 | A1 | 8 | 39.0 | 30-50 | 2.5 | 4.8 | (7.3) | 3.3 | 7.8 | (11.1) |
| Exp-V-10 | F.I.A. ^{††} | 8 | 160.0 | 300.0 | 2.3 | 4.1 | (6.4) | 46.0 | 40.8 | (86.8) |

[†] Aluminum adjuvant

^{††} Freund Incomplete adjuvant

*Hemagglutination unit, **Neutralization unit, ***Sum of IgG1 and IgG2

文献 91, p 56 & 9

表 4-2 エルモット破傷風抗毒素血清中
の IgG1, IgG2 の分離, 同定.

Exp.2

| Antiserum (Immunization) | | Before isolation | | Isolated fraction | | | | | |
|-----------------------------|------|-------------------------------|-----------|-------------------------|----------------|-------------------------------|---------|------|---------|
| Serum # | Week | Antibody titer in ml of serum | | Total mg in ml of serum | | Antibody titer in ml of serum | | | |
| | | HA U* | Mouse U** | IgG1 | IgG2 | IgG1 | | IgG2 | |
| | | | | | | HA U | Mouse U | HA U | Mouse U |
| N P-1 (plain) | 4 | 0.25 | 0.12 | 0.5 | 1.9 (2.4)*** | 0.07 | — | 0.07 | — |
| | 6 | 0.5 | 0.9 | 1.3 | 2.5 (3.8) | 0.31 | — | 0.17 | — |
| | 8 | 14.0 | 15.8 | 0.7 | 1.8 (2.5) | 9.9 | 1.9 | 2.2 | 1.6 |
| VI - 3 (plain) | 4 | 0.07 | 0.06 | 0.4 | 2.4 (2.8) | 0.04 | — | 0.03 | — |
| | 6 | 0.4 | 0.53 | 0.9 | 2.4 (3.3) | 0.21 | — | 0.13 | — |
| | 8 | 25.0 | 26.6 | 1.0 | 3.0 (4.0) | 16.0 | 9.3 | 2.4 | 2.6 |
| VI - 6 (Al 0.9mg) | 4 | 0.6 | 0.31 | 0.5 | 2.7 (3.2) | 0.25 | — | 0.21 | — |
| | 6 | 1.7 | 1.7 | 0.8 | 2.2 (3.0) | 1.12 | — | 0.45 | — |
| | 8 | 20.0 | 59.5 | 1.1 | 2.8 (3.9) | 39.6 | 11.0 | 3.3 | 3.2 |
| VI - 17 (Et 52μg) | 4 | 0.2 | 0.31 | 2.2 | 2.5 (4.7) | 0.16 | — | 0.16 | — |
| | 6 | 0.8 | 1.9 | 2.0 | 2.6 (4.6) | 0.48 | — | 0.48 | — |
| | 8 | 24.0 | 66.8 | 2.1 | 2.6 (4.7) | 42.2 | 18.4 | 8.82 | 11.6 |

*Hemagglutination unit, **Neutralization unit, ***Sum of IgG1 and IgG2

文献 91, p 57 より

表 5. 抗 B S A Ig G 1 に よ る 同 種 P C A
反 応

| latent period (hr) | average value of reactions | | | | | | |
|--------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|------|------|-------|
| | Ab μ g / 0.1 ml | | | | | | |
| | 5.0 | 1.0 | 0.5 | 0.1 | 0.05 | 0.01 | 0.005 |
| 3 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 |

表 6. 抗 B S A Ig G 1 抗 体 の 加 熱 処 理 に よ る
影 響 お よ び 感 作 の 持 続

| | Dose Ab μ g / 0.1 ml. | hours | | days | | | | |
|-----------------------|------------------------------|-------|----|------|---|---|---|---|
| | | 3 | 24 | 2 | 3 | 4 | 7 | 9 |
| unheated | 0.1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 0.5 | | 4 | 3 | 2 | | | |
| heated (56°C. 2hr) | 0.1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 0.5 | | 4 | 3 | 2 | | | |

表 7. Protein A に よ る PCA 反応の阻止

| Recipient | μg of antibody / 0.1 ml | | | μg of Protein A | Latent period (hr) | PCA reaction |
|-------------|-------------------------|------------|------------|-----------------|--------------------|--------------|
| | G.p. IgG 1 | G.p. IgG 2 | Rabbit IgG | | | |
| Guinea pig | 5.0 | | | - | 3 | 3 |
| | 5.0 | | | 2.0 | | 2 |
| | 5.0 | | | 5.0 | | 2 |
| | 5.0 | | | 10.0 | | 1 |
| | 5.0 | | | 20.0 | | 0 |
| | - | | | 20.0 | | 0 |
| | 0.1 | | | - | 24 | 3 |
| | 0.1 | | | 0.05 | | 2 |
| | 0.1 | | | 0.1 | | 1 |
| | 0.1 | | | 0.2 | | 0 |
| | 0.1 | | | 0.4 | | 0 |
| | - | | | 0.4 | | 0 |
| | | | 0.1 | - | 3 | 1 |
| | | | 0.1 | 10.0 | | 0 |
| | | | 1.0 | - | | 3 |
| | | | 1.0 | 10.0 | | 0 |
| Mouse (CFW) | | 15.0 | | - | 3 | 3 |
| | | 15.0 | | 170.0 | | 0 |
| | | - | | | | 0 |

表 8. 抗 BSA IgG 1 による受動性全身
感作と IgG 2 抗体混入による感
作への影響.

| Antibody (mg) IgG 1 IgG 2 | | skin reaction | systemic anaphylaxis |
|------------------------------|-------|------------------|-------------------------|
| 0.3 | - | 2 | 4 |
| 0.1 | - | 2 | 4 |
| 0.08 | - | 2 | 4 |
| 0.05 | - | 2 | 4 |
| 0.02 | - | 2 | 2 |
| 0.01 | - | 1 | 1 |
| 0.05 | 0.5 | 2 | 4 |
| 0.05 | 0.25 | 2 | 4 |
| 0.05 | 0.05 | 2 | 4 |
| 0.05 | 0.025 | 2 | 4 |
| 0.02 | 0.5 | 2 | 2 |
| - | 0.5 | 0 | 0 |

表 9. BSA 免疫モルモットにおける
ACA 反応, ASA 反応

| Sensitizing dose in microgram BSA | Reaction | Degree of anaphylaxis | | | | | |
|--------------------------------------|----------|-----------------------|-------|-----|-----|-----|-----|
| | | 7 | 10 | 15 | 20 | 28 | 35 |
| 1.0 | ACA | 0 | 1 | 1 | 1 | 1/2 | 1/2 |
| | ASA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10.0 | ACA | 0 | 1 | 1 | 2 | | |
| | ASA | 0 | 0~1/2 | 1 | 2~4 | | |
| 100.0 | ACA | 0 | 1 | 2 | 3 | | |
| | ASA | 0 | 0~1/2 | 3~4 | 4 | | |

表 10 . BSA 免疫マウス血清中
に含れる IgG1, IgG2 抗体量.

| Guinea-pig | Amount of BSA injected, μ g | Day of bleeding* | Each concentration of subclass antibodies in serum** | |
|------------|------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------|-----------------|
| | | | IgG1 μ g/ml | IgG2 μ g/ml |
| #29 | 100 | 10th | 1.7 | 1.3 |
| #30 | | | 3.0 | 3.1 |
| #13 | 10 | 15th | 3.5 | 3.8 |
| #14 | | | 4.3 | 4.2 |
| #20 | 100 | | 6.1 | 3.2 |
| #21 | | | 12.4 | 8.4 |
| #15 | 10 | 20th | 4.2 | 5.6 |
| #16 | | | 11.2 | 6.0 |
| #22 | 100 | | 35.0 | 16.3 |
| #23 | | | 51.0 | 21.0 |

* equal to days after immunization

** average value in duplicate

表 11, 免疫各時期で採血した抗BSA
抗血清による同種PCA反応

| guinea pig No. | Days after immunization | Serum dilution | PCA activity | | |
|-------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------|------------|
| | | | Original serum | Heated serum (56°C 2hr) | Added P.A* |
| 29 | 10 | 1 | 1 | 1 | 0 (5)** |
| 30 | | 1 | 1/2 | 1/2 | 0 (5) |
| 41 | 15 | 10 | 3 | 3 | 0 (5) |
| 42 | | 10 | 2 | 2 | 0 (5) |
| 40 | 20 | 20 | 3 | 3 | 0 (50) |
| | | 50 | 3 | 3 | 0 (50) |
| | | 100 | 2 | 2 | 0 (50) |
| | | 200 | 2 | 2 | 0 (50) |
| 41 | | 10 | 4 | 3 | 2 (5) |
| | | 20 | 3 | ND | 0 (5) |
| 42 | | 10 | 3 | 3 | 1 (5) |
| | | 20 | 3 | ND | 0 (5) |

*Protein A

**μg of Protein A added

ND: not done

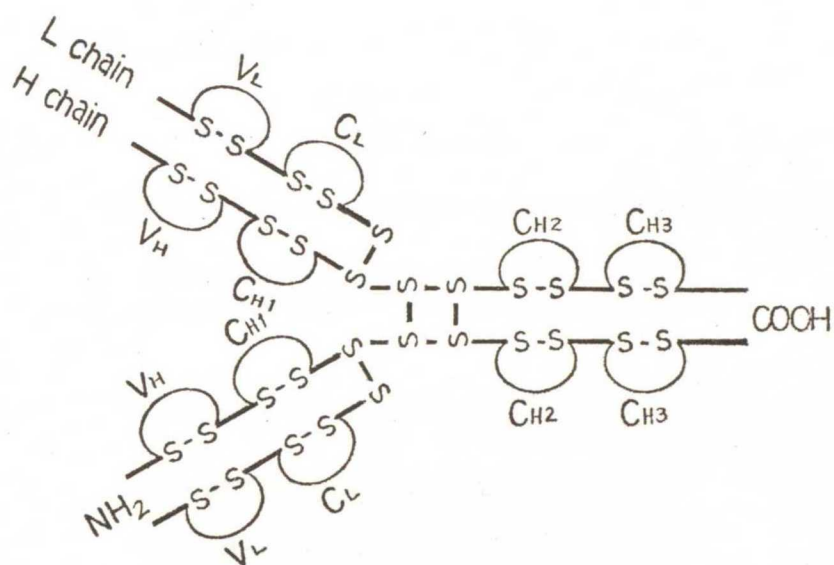


図 1. 免疫グロブリン分子の基本構造 (5)

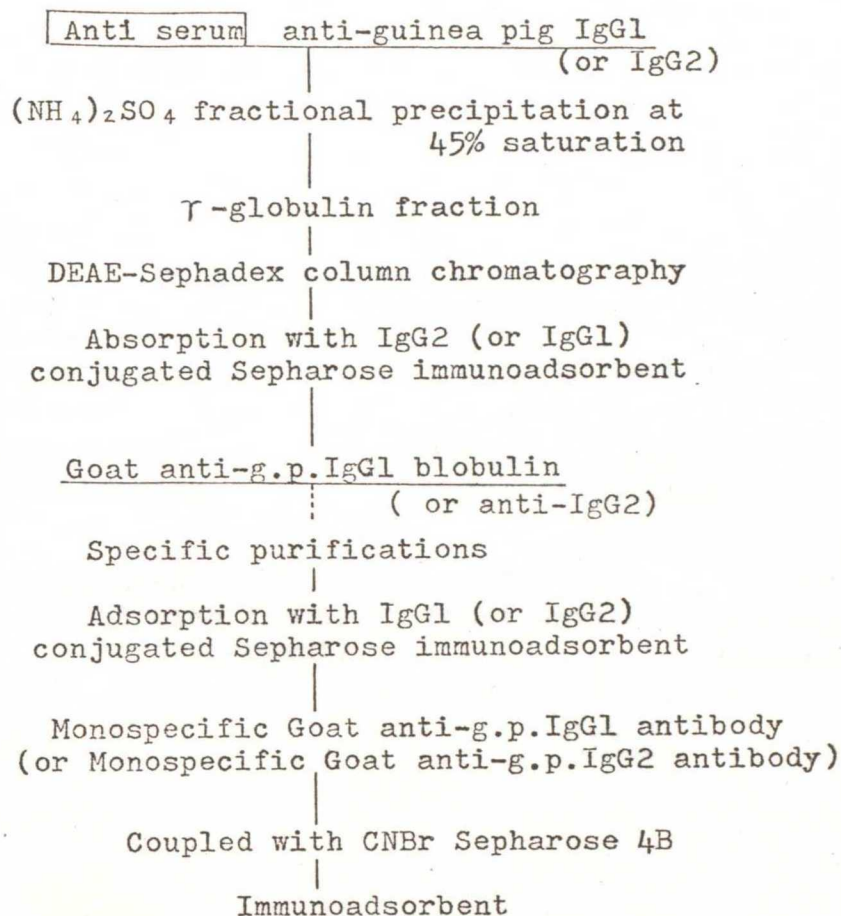


図 2 . ヤギ抗 Ig G 1 (または Ig G 2)
抗血清の分離と精製.

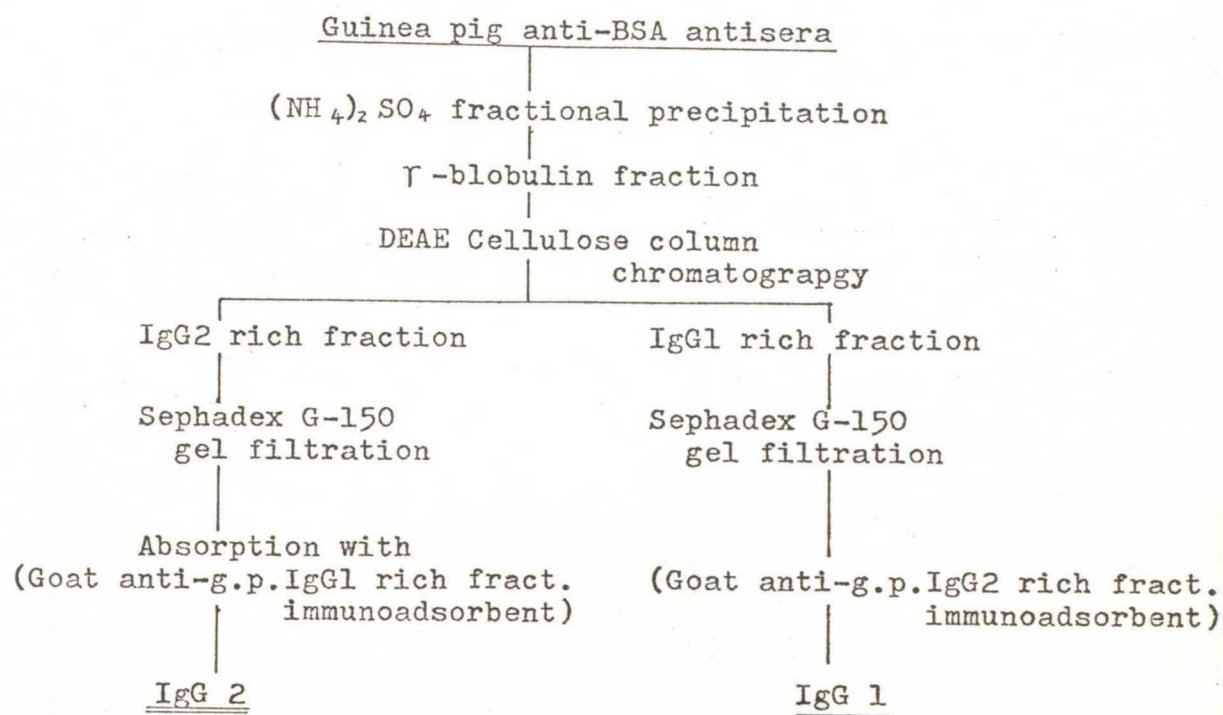


図 3. モルモット IgG 1, IgG 2 の分離と精製

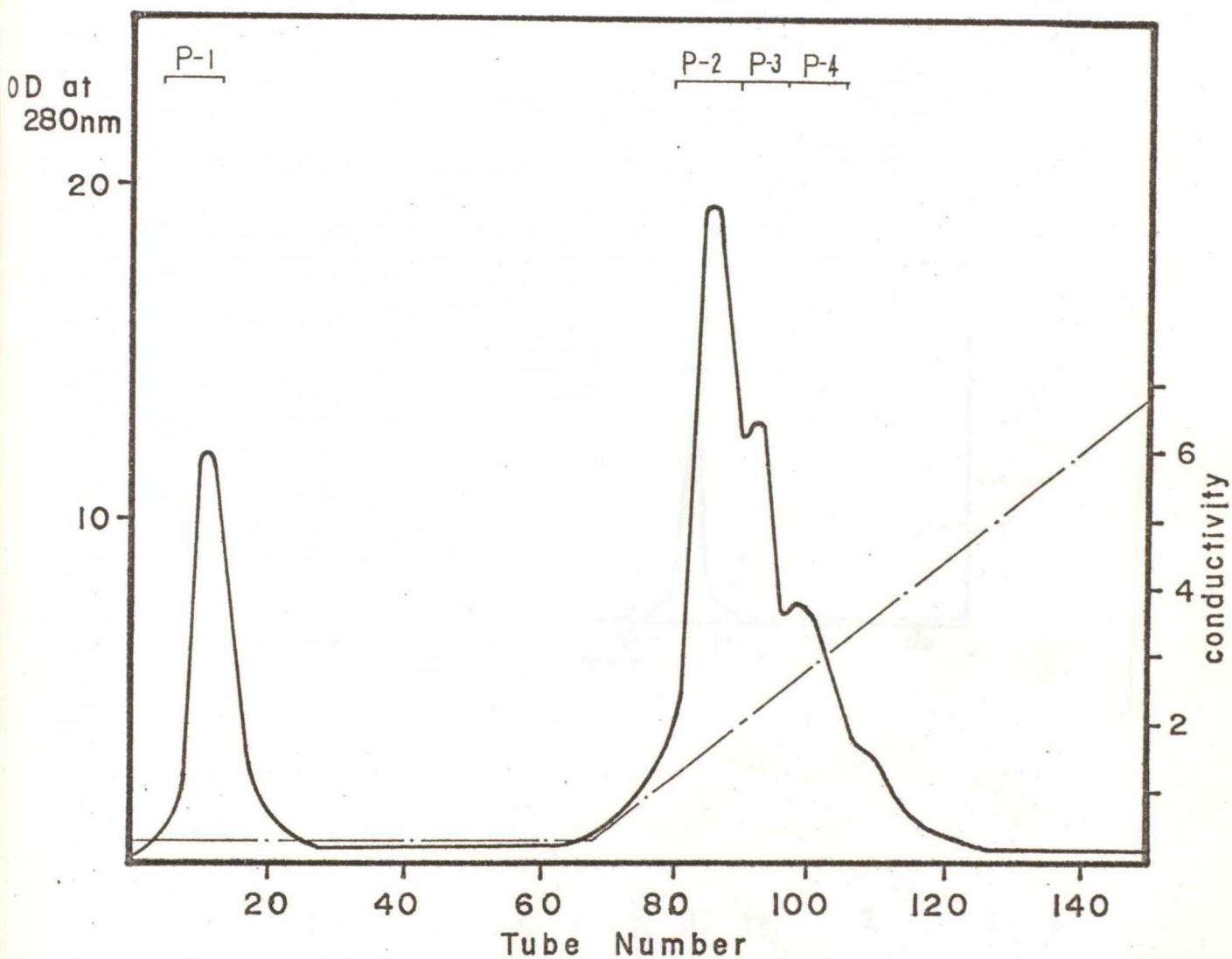


図4, モルモット抗B S A γ - グロブリン
 のDEAEセルロースによる分離

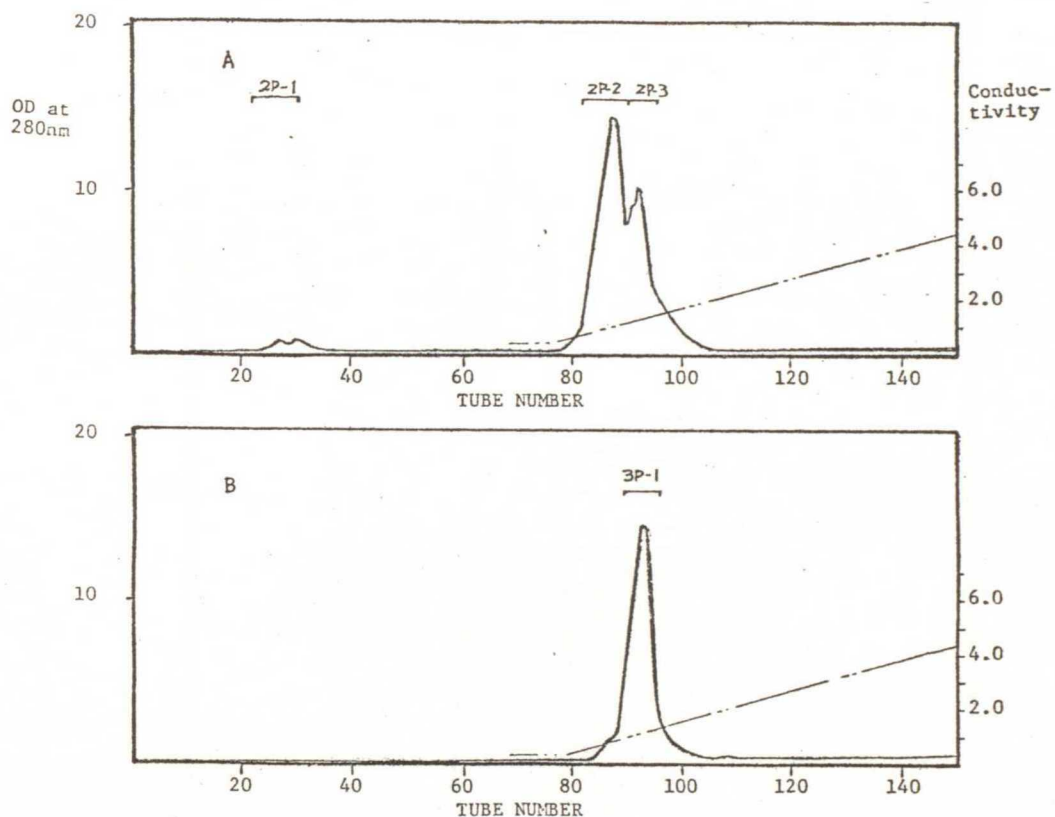


図5. DEAEセルロースによる
モルモット抗BSA IgG1分
画の再分離.

A: 図4のP-2, B: 図
4のP-3の再クロマトグ
ラフの溶出パターンを示す

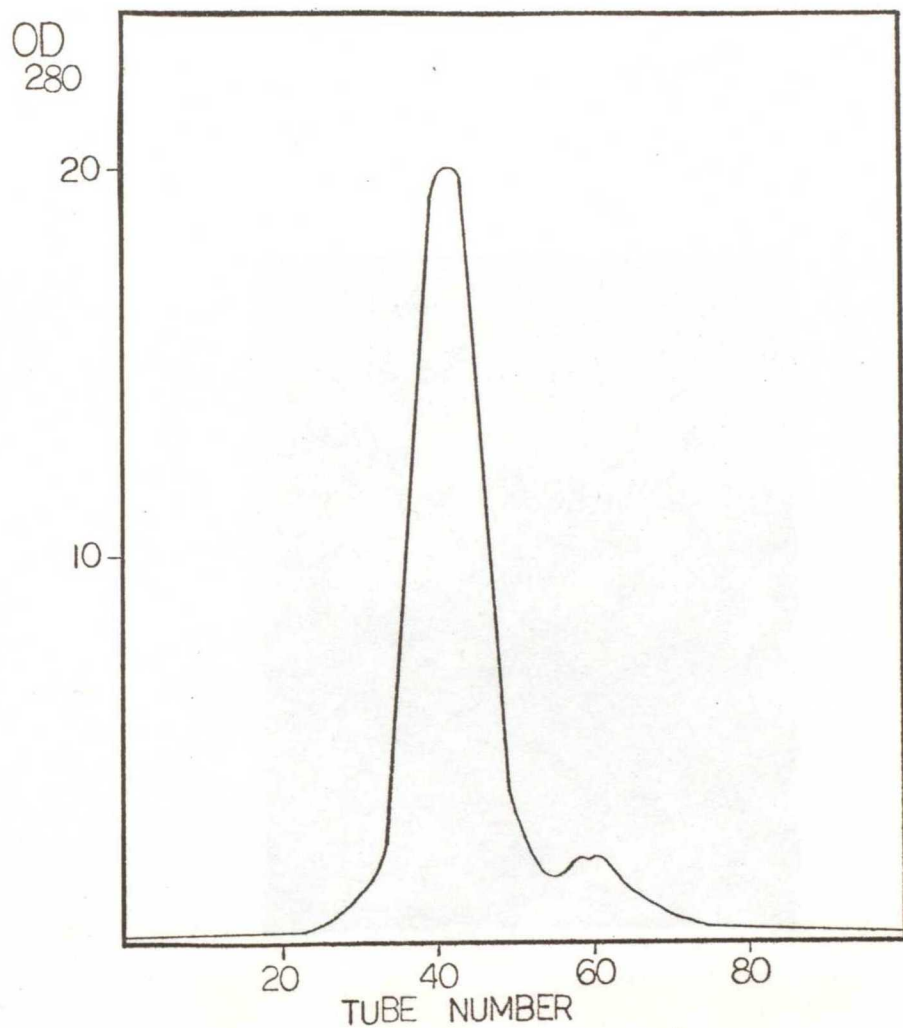


図 6、モルモット抗 BSA IgG 分画
の Sephadex G-150 によるゲル
濾過

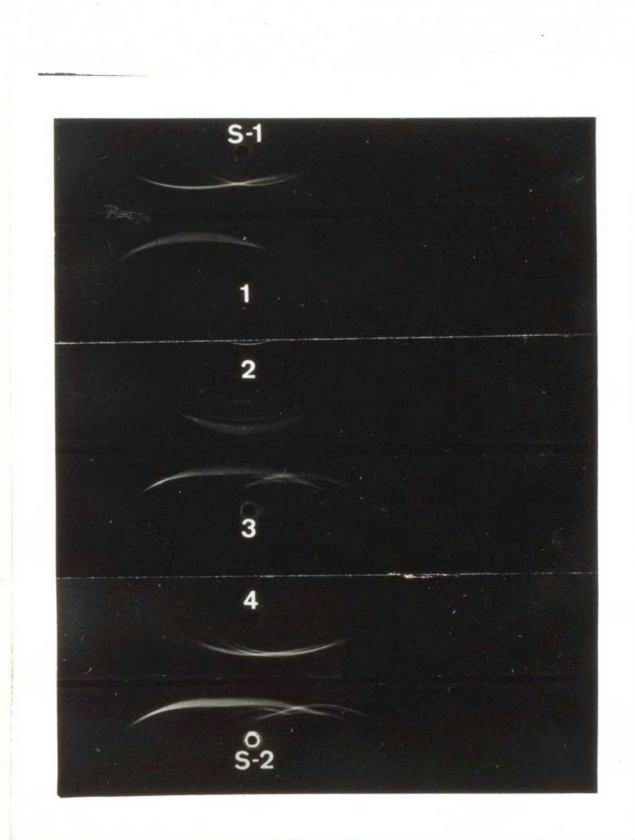


図7. モルモット抗BSA抗血清のDEAE-cellulose
フーマトグラフィーにより分離した各成分の免疫
電気泳動分析,

S-1: 正常血清, 1: p-1, 2: p-3

3: p-1, 4: p-4, S-2 原血清を
ウサギ抗モルモット全血清に対して反応させた。

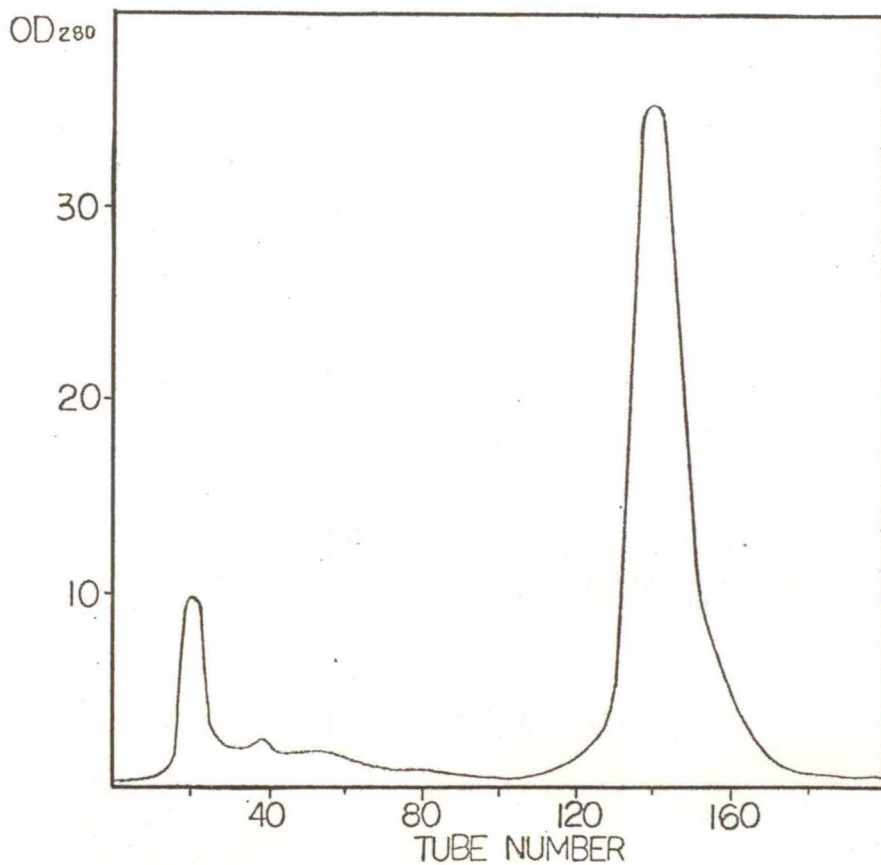
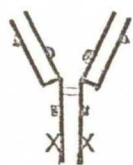


図 8 . ヤギ抗マウス IgG 2 抗体の DEAE
 Sephadex A-50 カラムクロマト
 グラフ

Guinea pig
IgG 1



—immunization→

Antiserum

{ anti-A
anti-B
anti-C
.
anti-X
(\gg anti-Y)

abs. \bar{c} . IgG2

(A.B.C...Y)

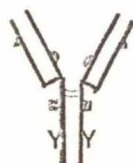
Anti-X *

= "Anti-IgG 1"

(Anti-IgG 2 \approx 0)

determinants
(A.B.C...X)

Guinea pig
IgG 2



—immunization→

Antiserum

{ anti-A
anti-B
anti-C
.
anti-Y
(\gg anti-X)

abs. \bar{c} . IgG1

(A.B.C...X)

Anti-Y *

= "Anti-IgG2"

(Anti-IgG 1 \approx 0)

determinants
(A.B.C...Y)

図 9. 抗原 (モルモット IgG1, IgG2) および抗体 (ヤギ抗-IgG1, 抗-IgG2) の精製

* 精製抗体は、免疫吸着剤として抗原の精製用にかかる。

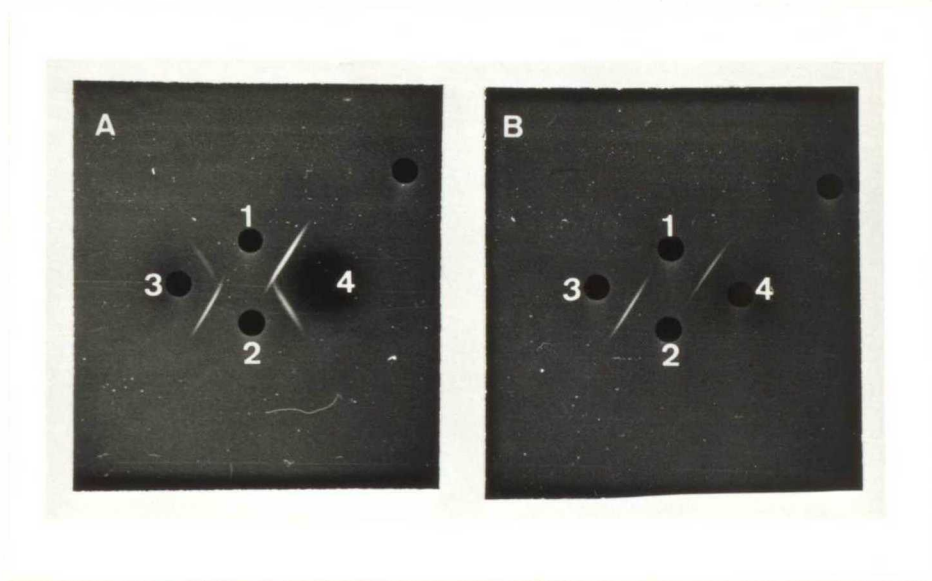


図 10. ヤギ抗マウス IgG1, IgG2 抗体の
ゲル内二重拡散法による分析

1: マウス IgG2 2: マウス IgG1

3: ヤギ抗マウス IgG1, A-吸収前, B-精製後

4: ヤギ抗マウス IgG2, A-吸収前, B-精製後

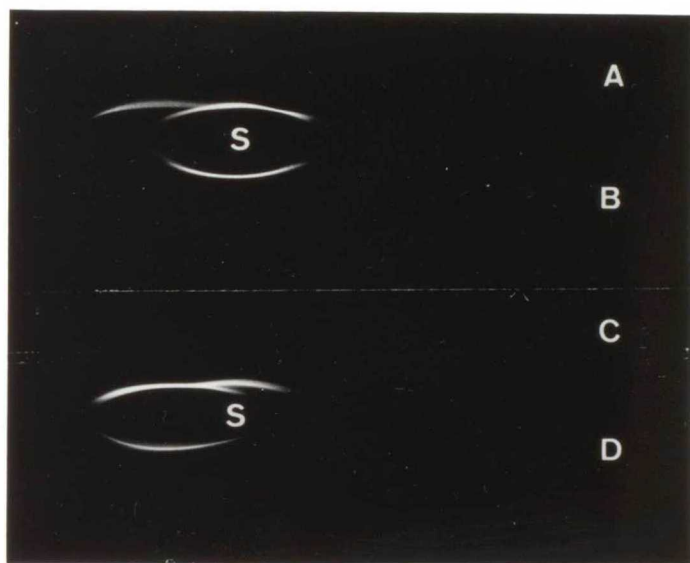


図11, ヤギ抗IgG1およびIgG2の免疫反応泳動分析
 A; 抗IgG1抗血清, B; 精製抗IgG1抗体
 C; 抗IgG2抗血清, D; 精製抗IgG2抗体
 S; 正常セルソット血清

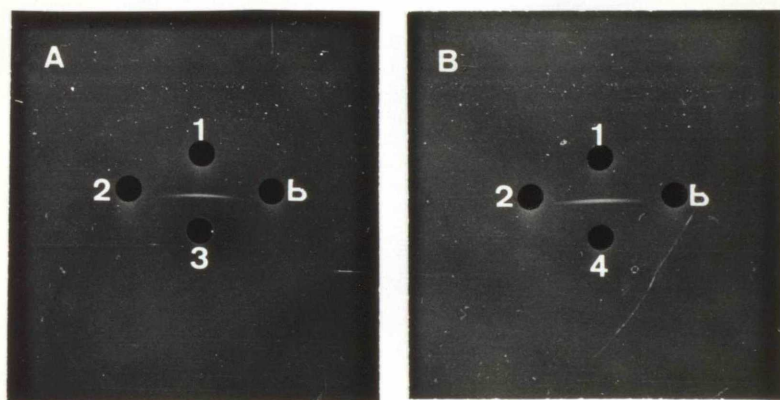


図12. ゲル内=重拡散法によるモルモノ IgG1, IgG2
の純度の確認
A-1: 精製ヤギ抗IgG1抗体, A-2: 精製ヤギ
抗IgG2抗体, B-1: 精製ヤギ抗IgG2抗体
B-2: 精製ヤギ抗IgG1抗体
3: 精製IgG1, 4: 精製IgG2.

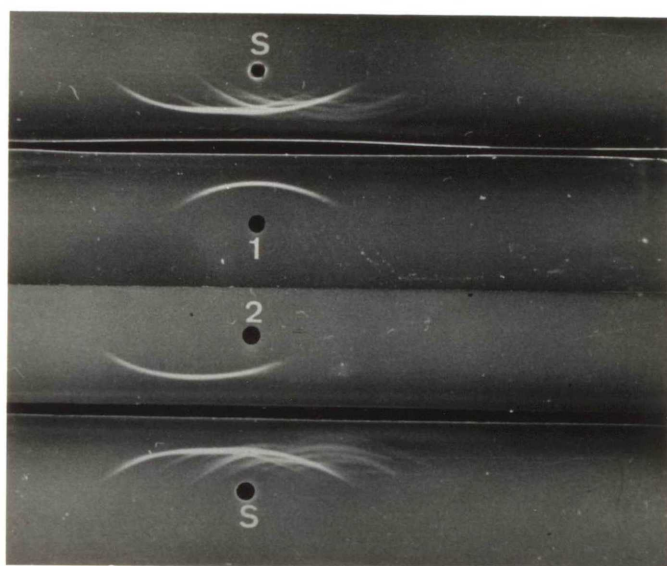


図13. モルモット精製 IgG1, IgG2 の
免疫電気泳動分析

S: 原血清, 1: 精製 IgG1, 2: 精製 IgG2, をウサギモルモット全血清
に対して反応させた。

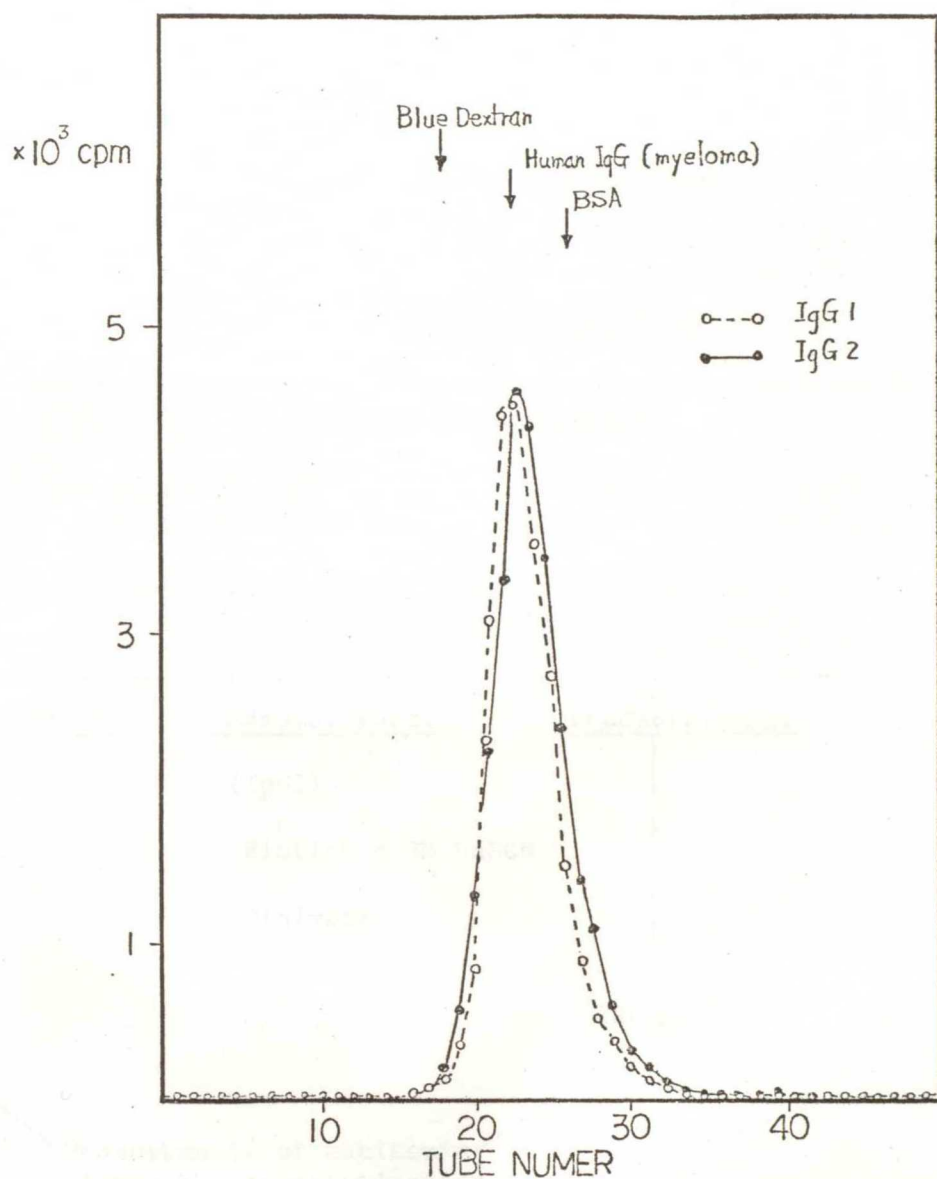


図14, 精製 IgG 1, IgG 2 の Bio-gel P-300
によるゲル濾過の流出パターン。
図中 ↓印は, それぞれ比較のため
に用いたものの流出位置を示
す。

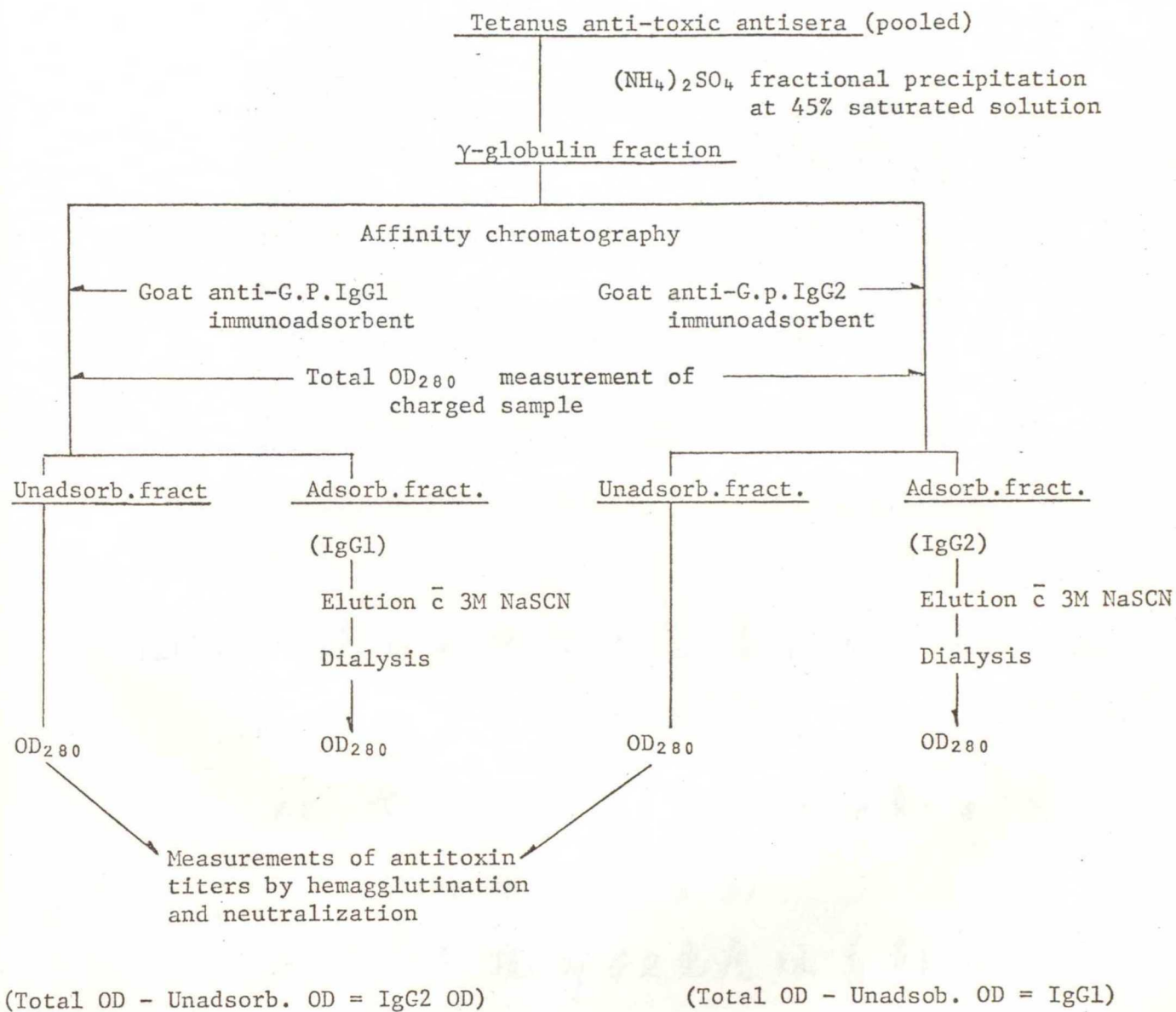


図15. エルモッ ト破傷風抗毒素血清の分離

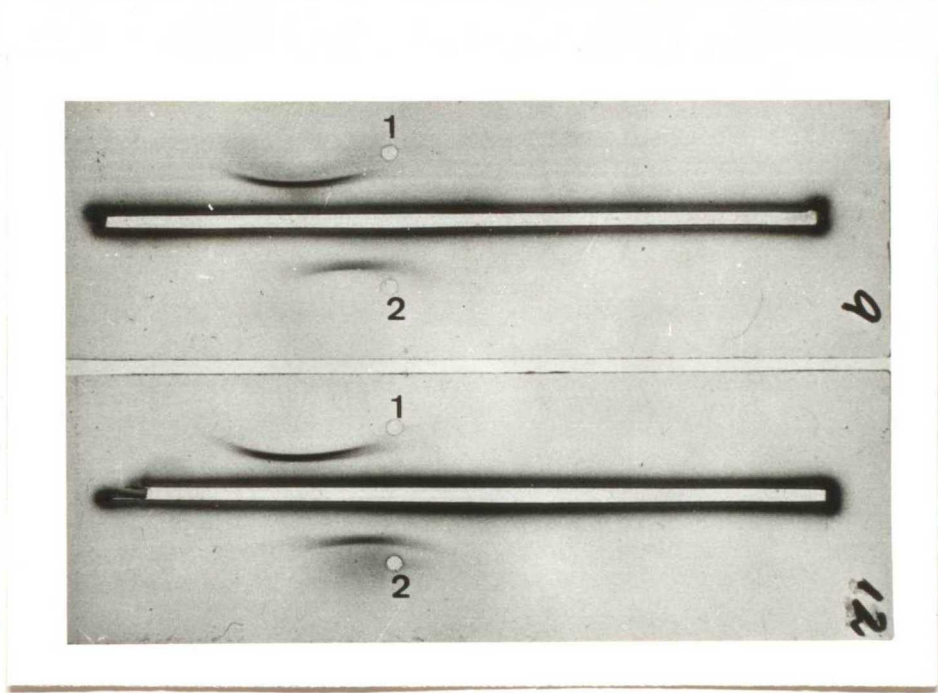


図 16. 破傷風抗毒素血清より単離した
分画の免疫電気泳動分析

1: ヤギ抗 Ig G / 免疫吸着剤カラム
で吸収した分画

2: ヤギ抗 Ig G 2 免疫吸着剤カラム
で吸収した分画 のそれぞれ
を、ウサギ抗モルモット全血
清に対して反応させた。

(写真は、染色後に撮影)

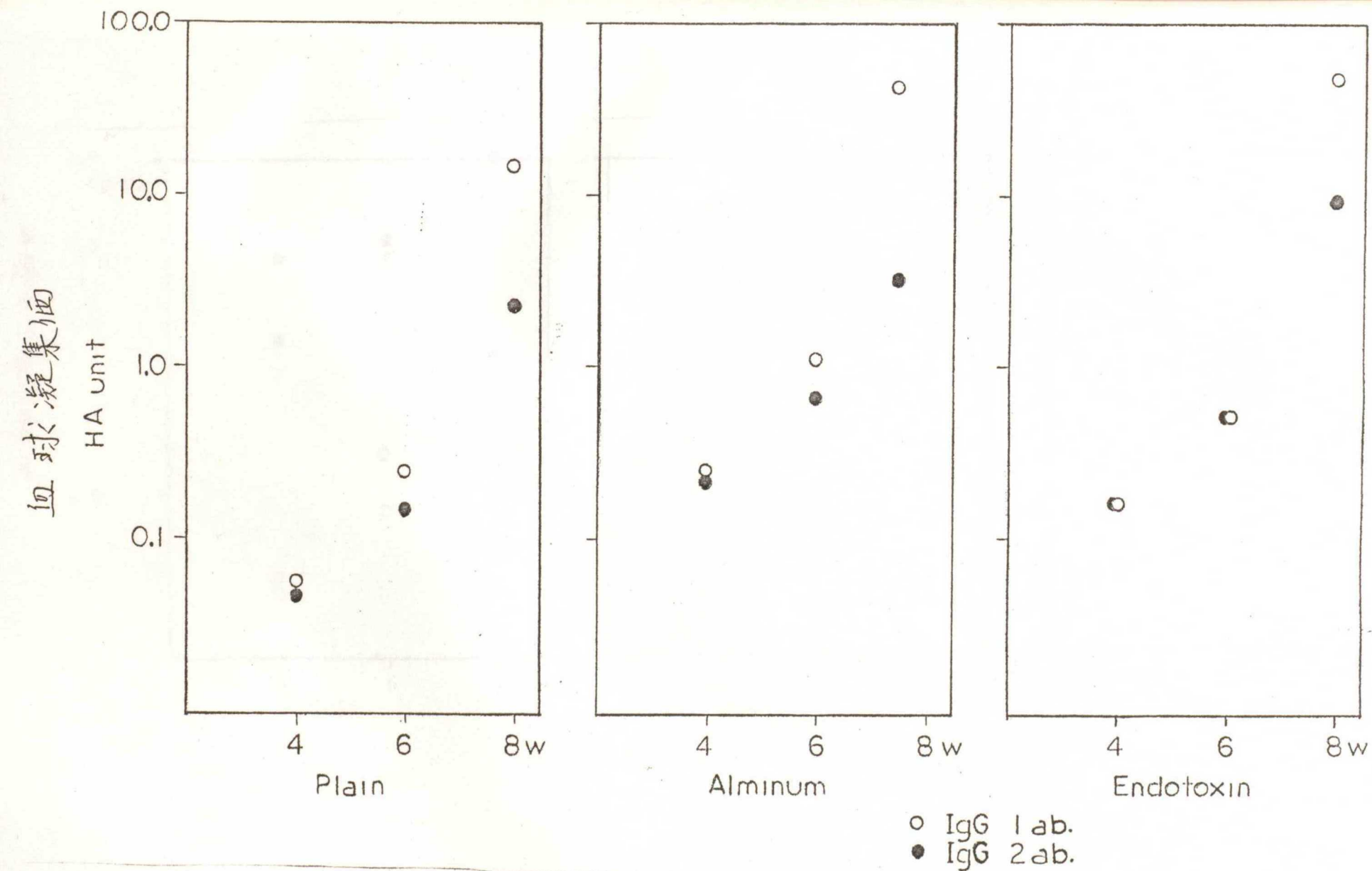


図 17. 免疫吸着剤により分離された抗毒素、血清中の IgG1, IgG2 抗毒素抗体の免疫の経過による推移.

血清中の蛋白濃度

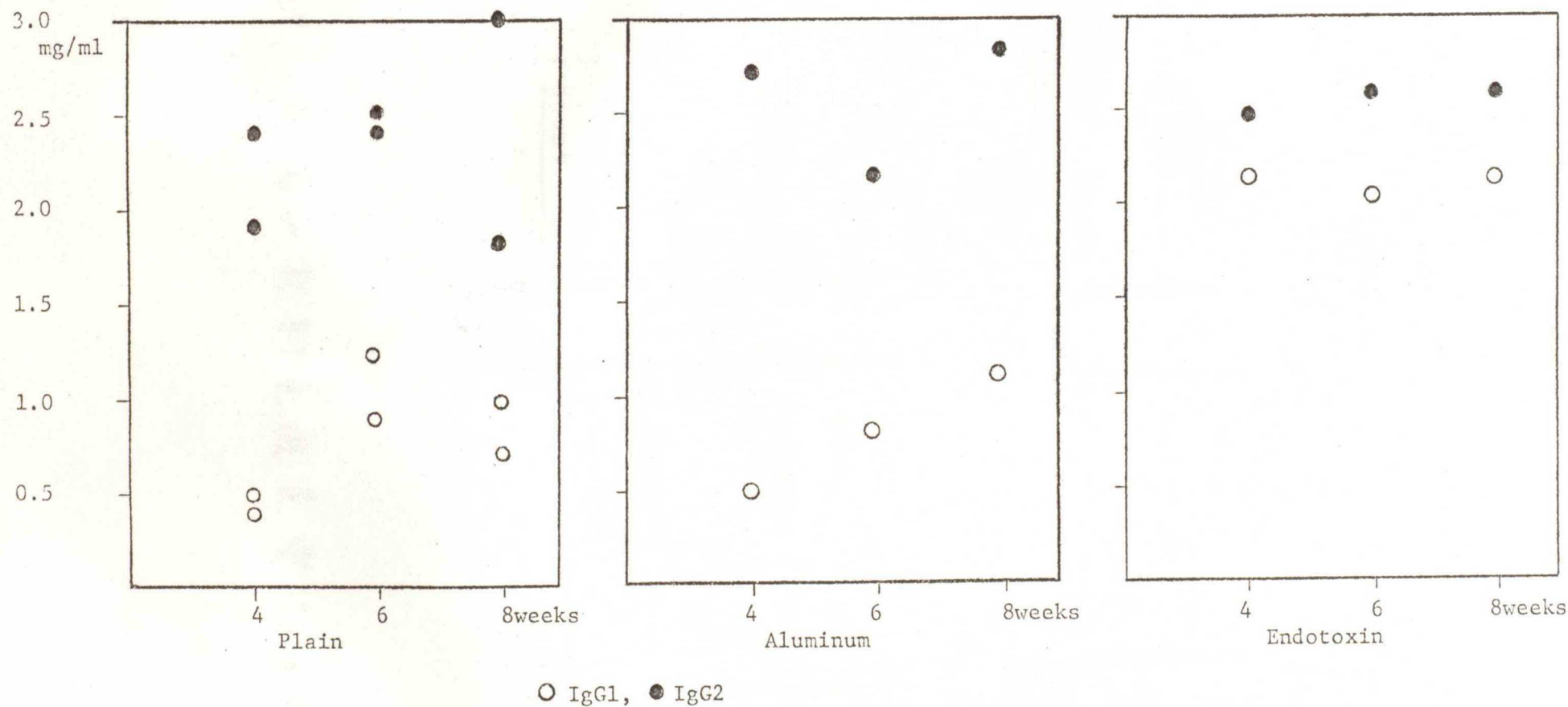


図 18, 免疫期間における血清中のIgG1, IgG2量の変動

"RADIOIMMUNO ASSAY SCHMATIC"

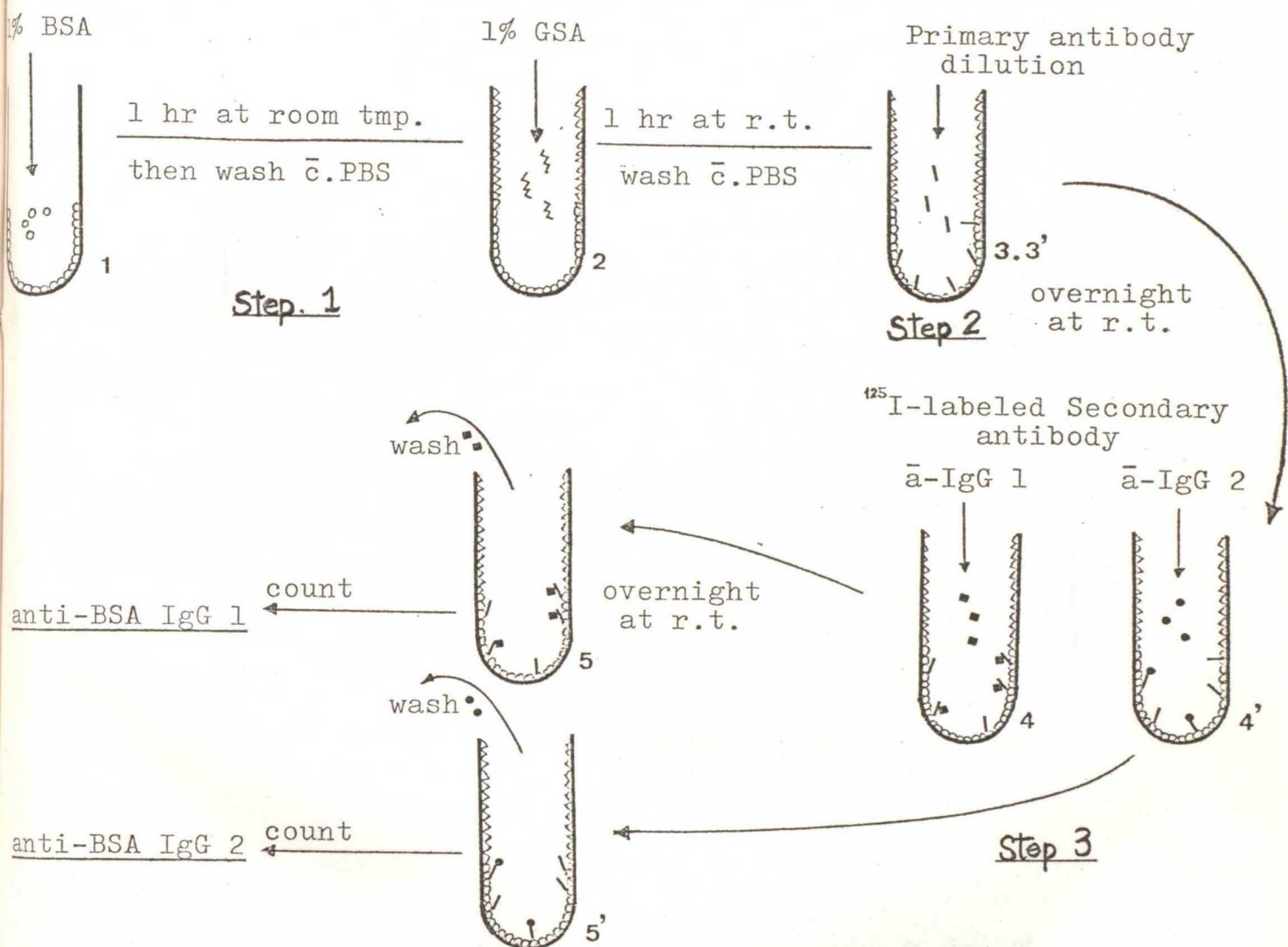


図 19. 間接-放射免疫定量法の操作手順.

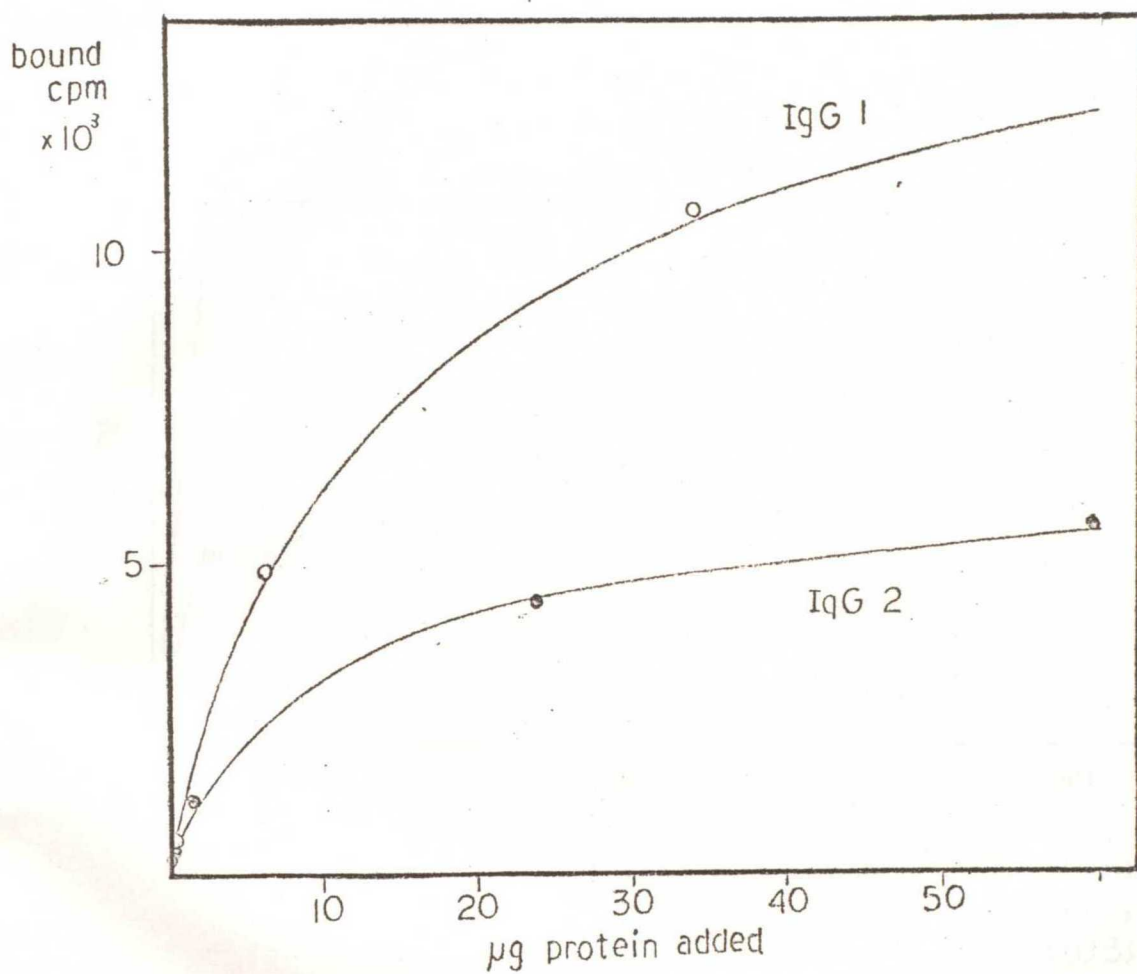


図 20. BSA-tube への 1 次抗体 (IgG 1, IgG 2) の結合.

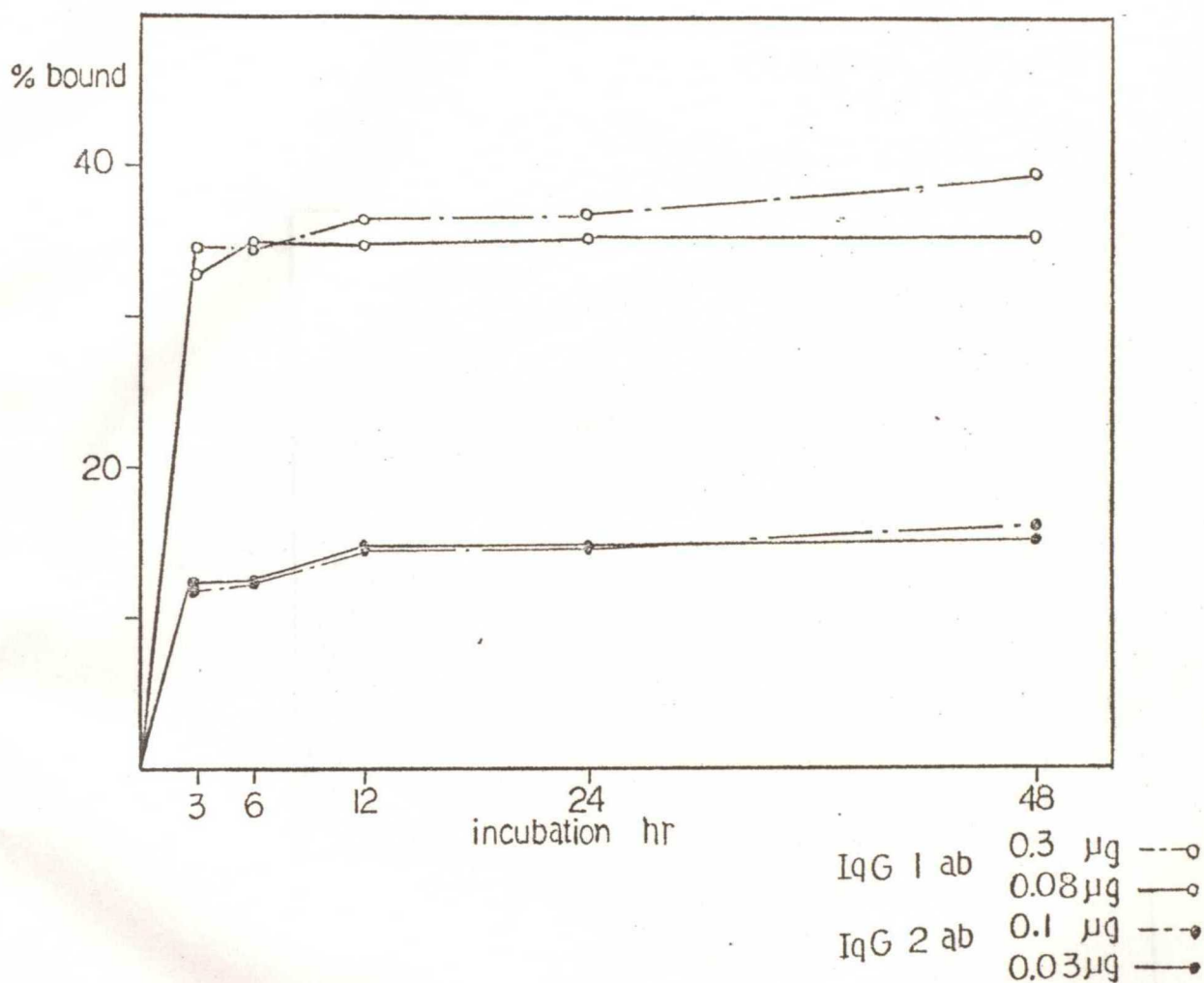


図 21. BSA tube への一次抗体の結合量の時間的变化。

% bound は、全添加量に対する

結合量の放射能計数値の百分率

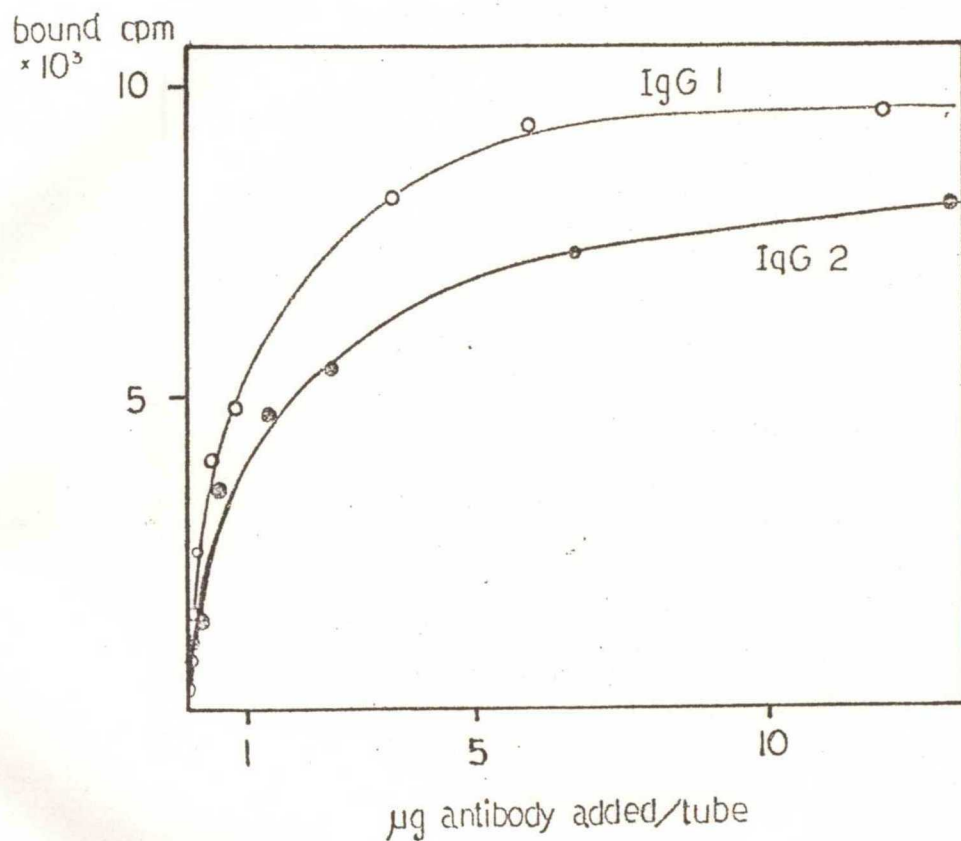


図 22. BSA-tube に加えた 1 次抗体
 の変化量に対する 2 次抗体の反
 応量 (過剰量での飽和値の
 測定)

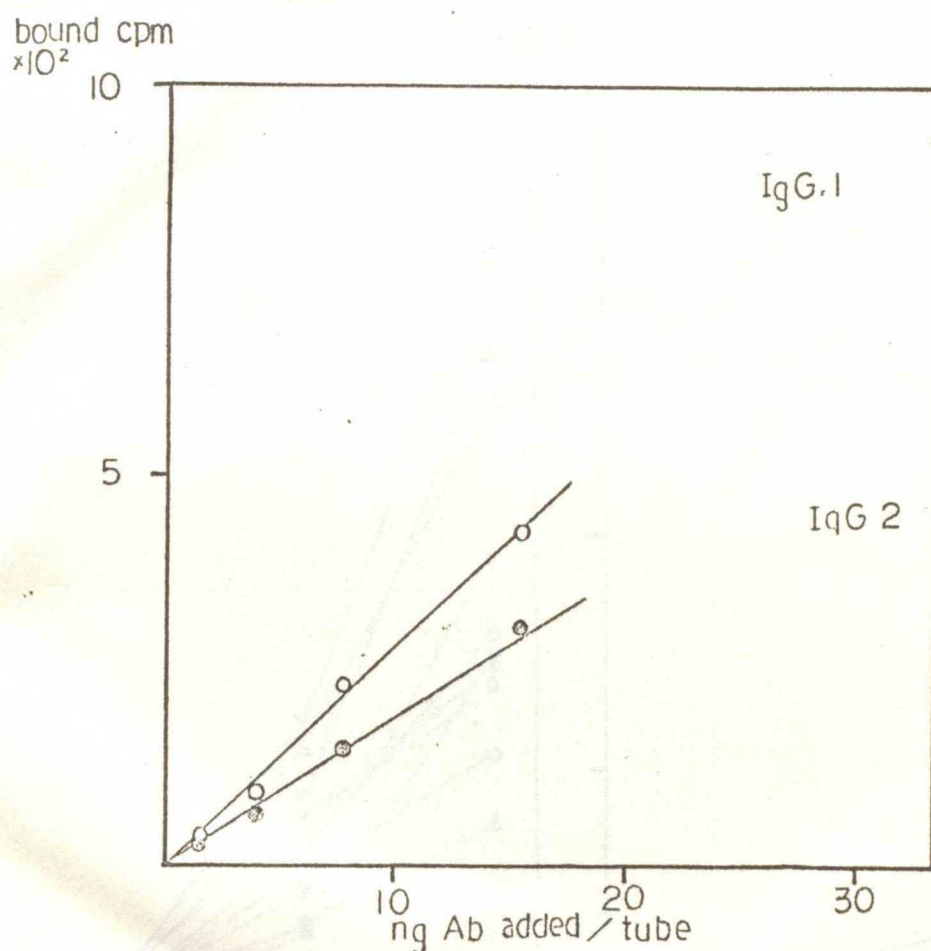


図 23. BSA - tube に加えた 1 次抗体
 の変化量に対する 2 次抗体の
 反応量 (低濃度における定量
 性の検討)

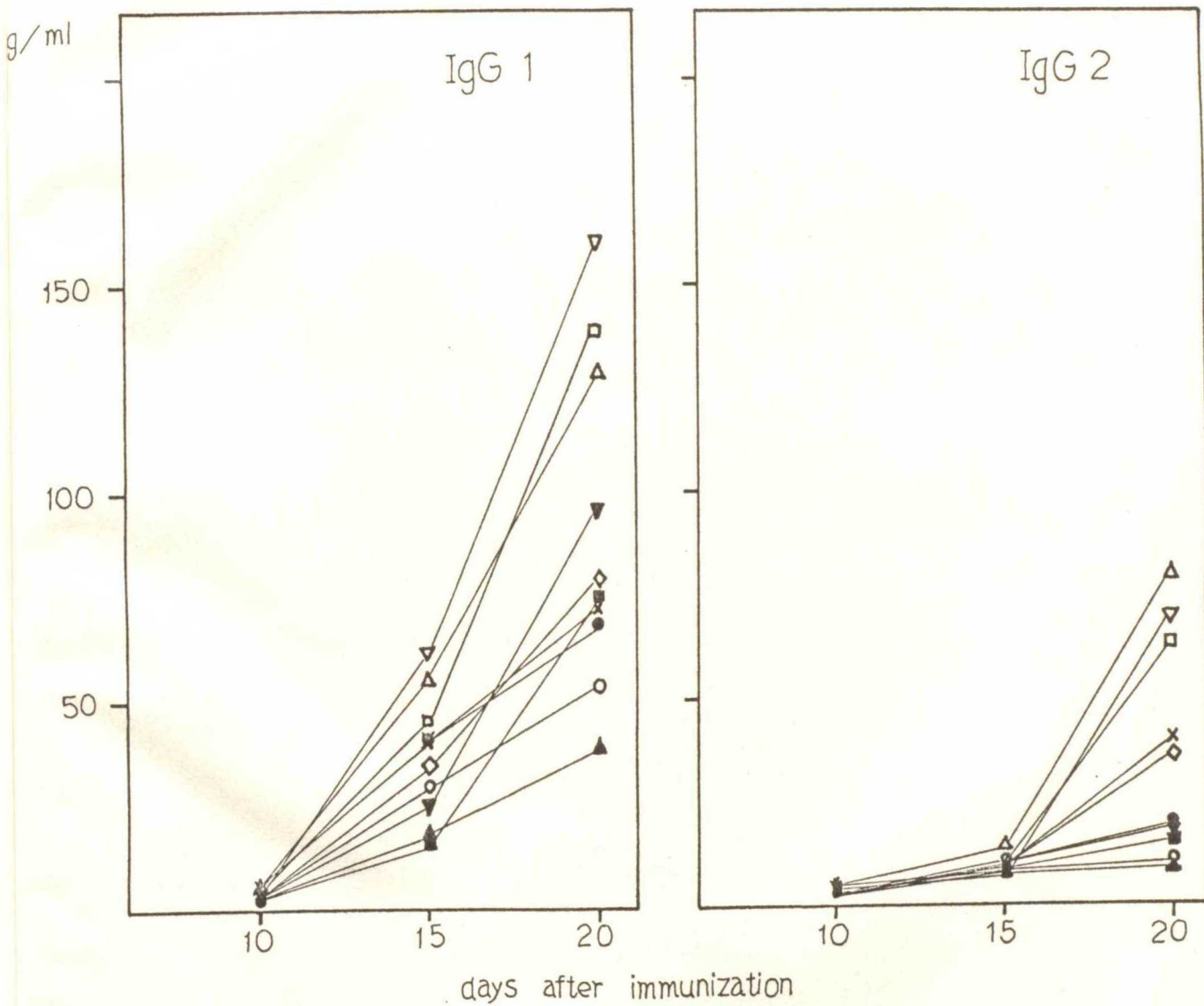


図 24. B S A 免疫の経過における
各個体の血清抗体量の推移
(間接放射免疫定量法による)