

氏名(本籍)	杉浦勉(東京)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	甲第17号
学位授与の日付	昭和52年3月14日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 教授 古泉 巖 (副査) 教授 田中享一 教授 藤岡富士夫

### 論文内容の要旨

モルモットを蛋白質抗原で免疫した場合には、主として IgG クラスの抗体が産生され、IgG 抗体は、さらにサブクラス IgG1, IgG2 に分類される。両者は、生物学的な機能に関して著しく異った性質を示し、特に IgG1 抗体は IgE クラスの抗体と同様に、自己組織感作能を持つアレルギー性抗体であることが知られている。生体防禦の立場から、この種の抗体が実際に果している役割、あるいは、免疫応答におけるこれらサブクラス抗体相互の関係は非常に重要な問題と思われるが、まだ十分な知見が得られていない。

本論文は、これらの問題へのアプローチとして、自己組織感作性抗体 IgG1 を中心に、IgG2 抗体と比較しつつ、免疫応答における血中抗体の産生の様子、特異抗体としての抗原との反応性、IgG1 抗体産生の時期とアレルギー性反応との関係について分子論的立場から研究を行った結果である。

この研究における第一の問題点は、同じ抗原に対して血液中に産生される特異抗体のみについてそのサブクラスを分離定量しなければならないことである。このためには、免疫原との抗原抗体反応による特異抗体の定量を行うのと同時に、これらサブクラスを定量的に分離同定する必要がある。そのためには試薬としてモルモットサブクラス IgG にそれぞれに特異的な抗体を用いるほかに方法がない。しかも生物学的活性のみを示標とした解析と異り、物質的な分離を基盤とする本研究では、これらの試薬が完全なものでなければならぬ。こうした理由のもとに、まずモルモット IgG1, IgG2 を同定するための基準として用いる高純度標品の精製と、これらのサブクラス抗体をそれぞれ分離定量するための試薬として、それぞれに特異的な抗血清の調製を行った。

BSA で高度に免疫したモルモット血清から、物理化学的方法によって IgG1 および IgG2 を単離し、これらを用いてそれぞれヤギを免疫して、抗 IgG1 抗 IgG2 抗血清を得た。しかしながら、これらの抗血清は、相互の抗原と部分的な反応を示した。これは、両者の共通抗原性と、物理化学的方法のみでは、完全な精製が不可能であることを意味している。したがって、活性吸着法を利用して、相互に交叉的に吸収操作を繰り返して、より純度の高い抗原を得て、これにより抗体の精製を、そしてこの精製抗体を用いてさらに抗原を精製するといった方法で、免疫学的に相互に混入が認められない標品を調製することに成功した。これらを用いることによって、モルモット血清中の微量の IgG1, IgG2 抗体をそれぞれ分離定量することが可能となり、第Ⅱ、第Ⅲ章における研究の重要な基礎となっている。

第Ⅱ章においては、破傷風トキソイド免疫における血中抗毒素抗体に関する研究結果である。市販トキソイドの力価検定には、モルモットの能動免疫での抗毒素産生能による方法が用いられているが、一定の免疫方法を用いても個体差があり、また抗体価の測定方法によっても変動が見られ、さらにアジュバンドの添加条件も抗毒素価や、動物の感作状態に大きく影響することが知られている。

この研究では、破傷風免疫モルモット血清中の主要抗体である IgG に関して、それぞれの免疫の条件、および異った時期における抗毒素抗体 IgG<sub>1</sub> の実際の分離定量を行い、それぞれの抗毒素価、および抗原との反応性の測定とから、上記力価検定における諸問題および過敏症反応との関係の有無などを主体に検討を行った。その結果、他の蛋白抗原による免疫と同様に、トキソイド免疫においても、その比較的初期では、IgG<sub>2</sub> 抗体が優位に検出され、免疫の進行に伴って IgG<sub>1</sub> 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%は、IgG<sub>1</sub> によって占められていることが示された。

また、分離した各抗毒素抗体価、受身血球凝集反応、マウスでの毒素中和反応により測定した結果、IgG<sub>1</sub> と IgG<sub>2</sub> との間には、これらの抗体価の相対量に差が見出され、免疫の経過における IgG<sub>1</sub> 抗体の優位な産生とから抗毒素価の変動は、これらのサブクラス抗体の相対量によるものであることを明らかにすることができた。また *in vivo* における中和反応ではサブクラス間に明らかな差が認められ、IgG<sub>1</sub> のもつ自己組織感作能との関連が推論された。

第Ⅲ章においては、BSA を抗原としたモルモット抗体について、免疫の極めて初期に観察される皮フおよび全身性アナフィラキシー反応に IgG<sub>1</sub> 抗体が実際に関与していることの証明であり、得られた結果から、この種の抗体の持つ生体防禦上での役割り、および、抗体産生におけるサブクラス抗体間の関連について考察を行った。

この研究を進めるに当たっての第一の問題点は、従来の研究では生物学的活性が、各サブクラス抗体の実際量として求められていない点であり、第二の問題点は、もう一つの自己組織親和性抗体である IgE の混入である。

最後の問題点は、生物学的反応が検出できる前後での微量抗体量の測定をしかもサブクラスごとに定量する方法の選択であった。

このため第Ⅰ章で得られた精製標品を用いて PCA 反応、受動全身性アナフィラキシー反応を惹起するのに必要な IgG<sub>1</sub> 抗体の最小量の決定を行い従来示されていた値よりはるかに少量であること、IgG<sub>2</sub> 抗体の共存の影響は、IgG<sub>1</sub> 抗体の約20倍量でも無視し得ること、また感作時間についても明らかな延長が見られることなどを明らかにした。これらのデータをもとに、能動感作条件を抗原量を変えて求めた結果、BSA 100 $\mu$ g、アルミニウムアジュバンドと共に腹腔内注射後10~15日の間に皮フアナフィラキシー反応の感作が成立し、全身性ショックはこれよりも2~3日間おくてあらわれる結果が得られ、これらの様相は、受動性感作において観察されたと同じであった。この時期における血中抗体の測定は、放射免疫定量法を基本とした IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub> 抗体をそれぞれ分離定量できる間接法を用いて行い、その定量範囲は IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub> の重量にして 1~20ng ( $10^{-9}$  グラム)であることを確認した。測定結果は、アナフィラキシー反応の出現する時期においてすでに両サブクラス抗体の産生が認められ、個体により異なるが、血清の ml 当りに換算して 1~4 $\mu$ g の抗体を含んでおり、この濃度は、精製 IgG<sub>1</sub> 抗体による受動感作最少量と同じレベルであった。

また、IgE 抗体の関与を除外するために、加熱処理、持続時間、あるいはブドウ球菌の膜成分である

Protein A によるアナフィラキシー反応の阻害などの効果等を検討し、免疫初期の反応が IgG1 抗体によるものであることを証明することができた。

以上の実験結果は、免疫の極めて初期において、IgG1, IgG2 サブクラス抗体が平行して産生されていることを示すもので、これらの抗体産生を担当する細胞が、一つの抗原物質に対し独立に応答していることを意味している。したがってモルモットの高度免疫血清中に見られる IgG1 抗体の選択的産生は、制薬機構をも含めた、免疫応答の二次的効果によるものと考えられ、またクラス間の抗体産生で知られているような継次的な関係は、サブクラス間には存在しないことを示すものと考えられる。

上記3章にわたる研究結果は、主として齧歯類に特徴的である自己組織親和性 IgG1 サブクラス抗体を中心に IgG2 抗体と比較しつつ、分子性状と生物学的機能についての基礎を明らかにしてきたものであるが、これらをもとに、その生体防禦上の意義および免疫応答の遺伝的背景についても考察を加えた。

### 論文審査の結果の要旨

ヒト免疫グロブリン (Immunoglobulin : Ig) の Ig クラスには、IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 の4種のサブクラスが存在し、構造上の違いに対応して補体結合能、細胞への親和性などの機能上の違いが知られている。

またモルモットでは、IgG1, IgG2, の異った機能をもつサブクラスが報告されている。モルモットに結晶 BSA (ウシ血清アルブミン) を抗原として免疫したきわめて初期に産生されるこれらサブクラス抗体の分離同定を行い、実際に単離精製した標品の特性検討から始め、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、またモルモットの IgG ク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) 抗体について、IgG1 抗体を実験のモデルとして、IgG2 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した。

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 IgG1, IgG2, 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 IgG1, 抗 IgG2 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。これらは、両抗原に共通抗原の存在すること、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 IgG1, IgG2, の生物学的機能に関する解析にあたっては、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、この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、活性吸着法を利用して相互に交叉的に吸収操作を繰り返し行い、より純度の高い抗原によって抗体の精製を、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、モルモット血清中の IgG1, IgG2 抗体の分離定量法を確立した。

2. 以上の方法で破傷風トキソイド免疫において産生されるモルモットの血中抗体量の分離同定を行ったところ免疫の初期には IgG2 抗体、そして後期には IgG1 抗体の増加が見られ、IgG2 抗体は、免疫の期間を通して、ほぼ一定の値を示した。

また、アジュバントとして使用した、アルミニウム沈澱と、百日咳菌内毒素の添加効果は抗体産生の時期的、量的効果を高めているが、IgG 型抗体のサブクラスに関しては両者の比率に大きな影響はみられなか

った。

3. IgG1 (アレルギー性) 抗体の産生は、従来免疫の後期に著しい増加を示すものとして知られており、これは破傷風免疫においても同じ傾向を持つことを確認することができたが、免疫のきわめて早期においても、IgG1 抗体が IgG2 抗体と別個に産生されていることを、BSA を抗原とした免疫において見出すことができた。

精製した抗 BSA IgG1 IgG2 抗体を使用した受動皮フ、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 IgG1, 抗 IgG2 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を考案しこの方法にしたがって得られた免疫の初期での血中 IgG1, IgG2 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などについて考察した。

産生された IgG1 抗体が低い場合には皮フ反応のみが見られ、ある値をこえると全身性のショックが起きるようになる。

この現象は精製 IgG1 抗体を受動的に正常モルモットに投与した場合でも、まったく同様であり、IgG1 抗体の産生は、IgG2 抗体の二次的産物ではなく、それ自身免疫応答の一次的産物であることを示唆している。

以上の結果から、モルモットの免疫におけるアレルギー性抗体 IgG1 の産生は、IgG2 抗体とは独立しており互いに直接の関連を持たず、アルミニウムアジュバントの効果は、これらの血中抗体価を上昇させるけれども、相対比などの質的な影響を与えないこと、また、IgG1, IgG2, 抗体が毒素の中和などの作用で異なった性質を示すことが結論できる。

IgG1 抗体が免疫のきわめて早期に IgG2 と平行して出現すること、および血液中に抗体が検出できる時期では皮フ反応が先行し、次いで全身性ショックが見られることは、IgG1 を産生する細胞クローンは、IgG<sub>2</sub> 産生細胞クローンとは別個に存在し、抗原の投与によって両者が同時に活性化される可能性を示している。

以上 IgG のサブクラス IgG1, IgG2 抗体の単離、精製による高純度物質が獲得できたこと、また得られた IgG1 (アレルギー性) 抗体と IgG2 抗体との比較からそれぞれの性質と生物学的意義についての研究成果は高く評価し、免疫化学の発展に期待するところがきわめて大なることから、本論文は獣医学博士の学位を授与するに値するものと考えられる。