
研究報文

モノクローナル IgA の作製とその利用

木津久美子, 廣瀬 潤子*, 山口 (村上) 友貴絵, 成田 宏史

Production and Application of IgA Monoclonal Antibody

Kumiko Kizu, Junko Hirose*, Yukie Murakami-Yamaguchi, and Hiroshi Narita

We hypothesize that IgA immune complex in mother's milk functions for the prevention of food allergy through oral immune tolerance. To prove this hypothesis and to establish the allergic cure by using IgA immune complex as vaccine, a mass preparation of mouse IgA was performed. We established monoclonal antibody producing hybridomas with mesentery lymph nodes and got three kinds of monoclonal IgA. Their Light chains were all κ and the molecular weight was about 280 kDa, suggesting their dimer form. The antigen specificity of these antibodies was unidentified, but they did not react with major food allergens. Monoclonal IgA was effectively purified with a Protein L column from the culture supernatant of the hybridoma. Ovalbumin was coupled to the monoclonal IgA with a hetero-bifunctional crosslinking reagent, Sulfosuccinimidyl 6-[3' (2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate. Formation of the pseudo IgA immune complex was confirmed by a sandwich type of Enzyme Linked Immunosorbent Assay with the anti-ovalbumin antibody and the anti-mouse IgA (α) antibody.

(Received September 7, 2009)

I. 緒 言

抗体はウイルスや微生物毒素の不活性化や、侵入した病原体を殺す補体系や種々の白血球の動員によって、脊椎動物を感染から防御する一群のタンパク質である。典型的な抗体分子は同一の H 鎖 2 本と同一の L 鎖 2 本からなる 4 本のポリペプチド鎖で構成され、H, L 両鎖の一部の組み合わせにより抗原結合部位が形成される。抗体には 5 つのクラス (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) があり、それぞれ異なる H 鎖 ($\alpha, \delta, \epsilon, \gamma, \mu$) を持つ。H 鎖は抗体の尾部 (Fc 領域) も形成する。この Fc 領域によってその抗体が抗原以外のどんなタンパク質に結合するかが決定され、その結果、そのクラスの抗体が持つ生物学的性質 (機能) が決定される¹⁾。

このような抗体の機能解析や基礎・臨床研究への応用を計るためには均質な抗体を大量に得ることが必要となる。このため、現在ではモノクローナル抗体作製法^{2,3)}が確立され、様々な分野で応用されている。通常、確立しやすさ、使いやすさからモノクローナル IgG (IgM) が作製されるが、近年ではアレルギー研究においてモノクローナル IgE^{4,5)}や粘膜免疫研究においてモノクローナル IgA^{6,7)}の作製も報告されるようになってきた。しかしながら、特に IgA の場合、他の抗体とは感作系が異なるために免疫方法や感作リンパ球原として用いる組織が特殊である上、得られた抗体の精製方法などがまだ確立されたとはいえない。

我々はこれまでに、ヒト母乳中に主要食物アレルゲンである卵白オボムコイドが特異的分泌型 IgA との免疫複合体として存在していることを発見し⁸⁾、「授乳を介した離乳あるいは経口免疫寛容」なる母乳の新たな生理機能の可能性を示唆してきた⁹⁾。一方、

京都女子大学家政学部食物栄養学科

* 滋賀県立大学人間文化学部生活栄養学科

表1 細胞融合に用いたマウスの飼育条件

融合番号	マウス週齢	匹数	食餌	免疫	リンパ球**
1	5	2	通常食, Egg 10mg/day×7*	Egg 10μg+FCA	L, S
2	5	2	通常食, Egg 10mg/day×7*	—	L, S
3	7	4	通常食, Egg 10mg/day×7*	—	L, S
4	13	3	通常食, Egg 10mg/day×7*	—	L, S
5	13	3	卵白食	—	L, S
6	11	4	通常食	—	L, PP

* 卵白タンパク質を1日あたり10mg, 7日間経口投与

** 細胞融合に使用したリンパ組織 L:腸管膜リンパ節, S:脾臓, PP:パイエル板

Mantisらは、腸管M細胞はIgA受容体を発現しており、IgA免疫複合体を積極的に取り込んで抗原特異的IgA産生を誘導することを報告している^{10,11)}。これらの結果から我々は、「母乳にはアレルゲンをIgA免疫複合体として積極的に取り込ませることにより乳児に経口免疫寛容を誘導し、授乳中に離乳を始める機能がある」換言すれば、「母乳は食物アレルギー予防の天然の飲むワクチンである」という独創的な仮説の提唱に至っている^{12,13)}。次なる課題は、IgA免疫複合体を直接マウスに投与することによる経口免疫寛容の成立の如何を調べてこの仮説を立証すること、またその応用としてIgA免疫複合体をワクチンとして利用したアレルギー治療法の確立を検討することである。そのためには、大量の均質なIgAが必要である。母乳や唾液にもIgAおよびIgA免疫複合体が存在するが、組成が不明かつロット差が大きく、量的、質的に研究試薬としては使えない。本論文では抗原を含まない純粋なIgAを多量に調製するため、IgAモノクローナル抗体を作製し、人工的なIgA免疫複合体(pIC: pseudo Immune Complex)の調製を試みた。

II. 試料および方法

モノクローナル抗体の作製を始めとする免疫学的手法に関しては、基本的に森下と成田の方法³⁾に従った。

1) 動物

5~13週齢の市販のカゼインベースの食餌(オリエンタル酵母社, ラット・マウス用MF飼料:以下、通常食)もしくは、タンパク質を卵白タンパク質(キュービー製, 乾燥卵白Kタイプ(CS) No.2)のみとしてAIN-93G配合で調製した食餌で飼育した雌のBALB/cマウスを使用した。なお、動物実験は、「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年文部科学省告示第71号)」に基

づき、京都女子大学・京都女子大学短期大学部動物実験規定に従って行った。

2) 免疫

通常食で飼育したマウスには、卵白タンパク質を10mg/日で7日間強制経口投与した。また、5週齢のマウス2匹には腹腔内に卵白タンパク質10μgと完全フロイントアジュバント(Freund's complete adjuvant: FCA, Difco社製)とのエマルジョン(1容:1容)を投与後、2週間目に初回免疫と同一の卵白タンパク質10μgと不完全フロイントアジュバント(Freund's in complete adjuvant, Difco社製)とのエマルジョン(1容:1容)を腹腔内に投与し、さらに2週間後同抗原10μgを含むリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate Buffered Saline: PBS, 10mM NaPi, 0.15M NaCl, pH 7.4)を腹腔内に投与した(表1)。

3) 細胞融合とHAT選択

経口投与もしくは免疫をしたマウスは、その最終投与もしくは免疫の3日後に、その他のマウスは表1の週齢に屠殺し、脾臓もしくは腸管膜リンパ節を摘出してこれをほぐし、基本培地(RPMI-1640培地に100mM ビルビン酸ナトリウム, 結晶ペニシリンGカリウム1万単位/L, ストレプトマイシン10mg/Lを加えた培地)に懸濁した後、各細胞を遠心分離で回収した。回収した脾臓細胞もしくは腸管膜リンパ節細胞と、10%ウシ胎仔血清添加基本培地(以下、血清添加培地と記す)で培養した対数増殖期のマウスミエローマ細胞P3U1を10:1の比率になるように混合し、基本培地で2回洗浄した。遠心分離により細胞を回収し、細胞ペレットに平均分子量1,500の50%ポリエチレングリコール溶液(Roche社製)1mLを1分かけて添加し、その後1分間静置した。さらに20mLの基本培地を10分かけて添加し、細胞液を希釈した後、遠心分離により細胞を回収した。この細胞を40mLのHAT培地(4×10⁻⁷M アミノプテリン, 16×10⁻⁵M チミジン, および1×10⁻⁴M ヒポキサンチンを含む血清添加培地)に懸濁し、96

穴プレート 4 枚に分注後、湿度 100%、炭酸ガス 5%、37°C で培養を開始した。培養開始の翌日、HAT 培地を各ウェルに 100 μ L 添加し、以後 2 ないし 3 日ごとに半量の培地を新たな HAT 培地と交換し、培養を続け、脾臓もしくは腸間膜リンパ節とミエローマ細胞とのハイブリドーマのみを増殖させた。

4) スクリーニング (酵素免疫吸着測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : ELISA))

細胞融合後、増殖させたハイブリドーマから IgA 抗体産生細胞を選択するため、IgA 測定用サンドイッチ ELISA を行った。すなわち、抗マウス IgA (Fc) (American Qualex Antibodies 社製) を 0.02% NaN₃ を含む PBS (10mM NaPi, 0.15M NaCl, 0.02% NaN₃, pH 7.4) で希釈し、96 穴プレート (Nunc 社製) に 25ng/ウェルを、37°C、1 時間で固相化後、これを PBS で 3 回洗浄し、1% BSA/PBS によりブロッキングした (37°C、1 時間、もしくは 4°C 一晩)。PBS で 3 回洗浄後、ハイブリドーマ培養上清中に分泌された IgA を 37°C で 1 時間反応させ、続いて、トリス緩衝食塩液 (Tris Buffered Saline: TBS, 10mM Tris-HCl Buffer, 0.15M NaCl, pH 7.4) で 1 回、0.05% Tween20 入り TBS (T-TBS) 溶液で 5 回、TBS で 1 回洗浄後に、0.1% BSA/T-TBS 溶液で 0.1 μ g/mL に希釈したアルカリフォスファターゼ (Alkaline Phosphatase : ALP) 標識抗マウス IgA (α) (BETHYL 社製) を 50 μ L/ウェル加えて 37°C で 1 時間反応させた。次に、TBS で 1 回、T-TBS 溶液で 5 回、TBS で 1 回洗浄した後、 p -ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として検出し、405nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Model 3550, Bio-Rad 社製) を用いて測定した。

抗体の特異性を調べるための固相 ELISA は、固相化をオボアルブミン (Ovalbumin : OVA, 京都大学北畠研究室より供与)、オボムコイド (第一化成より供与)、もしくは牛乳タンパク質の α -カゼイン (SIGMA) をそれぞれ 25ng/ウェルで行った後、上述のサンドイッチ ELISA と同様に行った。

5) ハイブリドーマのクローニング

スクリーニングにおいて IgA 産生陽性の細胞について、限界希釈法により 2 回のクローニングを行った。増殖培地として血清添加培地に ORIGEN (IGEN 社製の B 細胞増殖因子を含む溶液) を 10% になるように添加したものをを用いた。2 回のクローニングを経て、IgA 産生スクリーニングの結果、陽性率が高いものをモノクローナル抗体産生細胞株とした。

6) モノクローナル抗体のクラス決定

モノクローナル抗体産生細胞株が培養上清液中に分泌するモノクローナル抗体について、その免疫グロブリンのクラスを、マウスモノクローナル抗体アインタイプングキット (Amersham 社製) を用いて調べた。

7) 抗体の大量調製

BALB/c マウスに腹水癌を誘導するために 0.5mL/匹の 2, 6, 10, 14-Tetramethylpentadecane (プリスタン, 和光純薬工業社製) を腹腔内に投与し、投与 3~10 日後に 1×10^7 個のモノクローナル抗体産生細胞を腹腔内に移植した。その約 2 週間後に腹水を採取し、細胞を遠心分離後 (10,000 \times g, 4°C, 5分)、上清を採取し、KAPTIVE-AE (TECNOGEN 社製)¹⁴⁾ もしくは、Immuno Pure Immobilized Protein L (PIERCE 社製)¹⁵⁾ を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより純化した。

8) SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) Polyacrylamide Gel Electrophoresis : SDS-PAGE

Laemmli¹⁶⁾ の方法を用いて、Compact PAGE AE-7300 (アトー社製) で、還元剤存在下において電気泳動を行った。ゲルはクマシーブリリアントブルー R-250 (CBB) 染色した。

9) ウエスタン解析 (Western Blotting : WB)

精製抗体を還元状態で SDS-PAGE に供し、ゲル内のタンパク質を 170mA の定電流で 90 分間ポリビニリデンジフルオライド膜 (BIO-RAD 社製) に転写し、5% スキムミルクを含む PBS によって室温で 1 時間ブロッキングした。その後、PBS で 3 回洗浄し、0.1% BSA/T-TBS 溶液で 0.1 μ g/mL に希釈した ALP-抗マウス IgA (α) で室温、1 時間の反応を行った。その後、T-TBS で 3 回洗浄し、ALP 発色キット (ナカライテスク社製) による発色を行った。

10) ゲルろ過解析

得られたマウスモノクローナル IgA について、分子量をゲルろ過により解析した。抗体産生細胞の培養上清を 0.45 μ m のフィルターにかけた後、ナカライ 5 Diol-300 カラム、ナカライ 5 Diol-300-II ガードカラム、及び日立 L-6200 形インテリジェントポンプを用いて、0.1% NaN₃ を含む PBS を移動相として、流速 0.4mL/分でゲルろ過を行った。得られたゲルろ過画分中のマウス IgA をサンドイッチ ELISA により定量し、その溶出位置から分子量を検討した。

11) 仮性IgA免疫複合体 (pseudo Immune Complex : pIC) の作製¹⁷⁾

PBS-EDTA (0.1M NaPi, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 0.02% NaN₃, pH 7.5) に OVA を 2.5mg/1mL で溶解させ、20mM Sulfo-succinimidyl 6-[3'-(2-pyridyldithio)-propionamide] hexanoate : Sulfo-LC-SPDP (Thermo 社製) 溶液を 42μL 添加し、室温で 30分 反応させた。この過程で、Sulfo-LC-SPDP のスルフォサクシニミド基が外れ、そこに OVA のアミノ基が酸アミド結合する。その後、透析により反応に使われなかった Sulfo-LC-SPDP を除去し、OVA : IgA がモル比 5 : 1 になるように IgA を添加して一晩室温にて反応させた。この過程で、ピリジルジチオール-OVA のピリジン2-チオンが外れ、そこに IgA のシステイン残基が S-S 反応により結合する。その後、Protein L カラムにより IgA と結合しなかったピリジルジチオール-OVA を素通り画分に除去し、吸着したものを 0.1M グリシン-HCl pH2.98 で溶出して 0.1M Tris-HCl pH 9.6 で中和し、OVA-pIC 画分とした。

Ⅲ. 結果および考察

1. スクリーニングに用いる二次抗体の特異性

モノクローナル抗体産生細胞のスクリーニングを行う場合、通常抗原を固相化した固相 ELISA が用いられる。目的とする抗体のクラスにこだわらなければ、二次抗体として用いる酵素標識抗体に抗軽鎖抗体を用いれば有効である。クラスにこだわる場合は重鎖に対する二次抗体を用いることになるが、こ

の二次抗体の特異性が甘いと、スクリーニングによって目的とするクラスのモノクローナル抗体産生細胞を得ることが困難である。特に、IgA や IgE のようにその産生細胞の少ないクラスの抗体を取得するには注意が必要になる。我々は、ハイブリドーマの IgA 産生スクリーニングを、IgA の Fc 領域認識の抗体を固相とするサンドイッチ ELISA により行ったが、固相 ELISA と同様に、IgA にこだわる場合、二次抗体の特異性が問題となる。

そこで、まず市販の 2 種類の IgA 重鎖認識の ALP 標識抗 IgA のマウス IgA, IgG, IgM に対する反応性を検証した (図 1)。それぞれに対する抗体や抗原を用いて固相化したマウス IgA, IgG, IgM に対して BETHYL 社製及び EY Lab. 社製の ALP 標識抗マウス IgA (α) を反応させたところ、前者では後者より約 1.5 倍感度高く IgA を測定できる上マウス IgA 特異的であるが、後者はマウス IgG に交差することが判明した。この交差反応性は低いものの、細胞融合時に用いる細胞集団は、IgA 産生細胞より IgG 産生細胞の方が数的に勝っていることが予測されるため、スクリーニングには BETHYL 社製の ALP 標識抗体を用いることにした。

2. マウス腸間膜リンパ節細胞と脾臓細胞の IgA 産生の比較

モノクローナル抗体の作製には通常マウスの脾臓細胞を用いるが、IgA 産生は全身免疫系より粘膜免疫系で活発であることから、IgA 産生ハイブリドーマを得るには全身免疫系の脾臓細胞よりも粘膜系リ

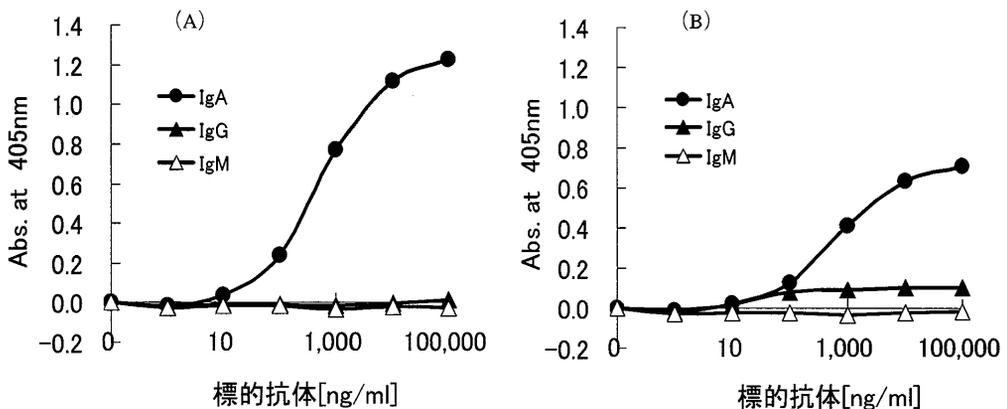


図1 アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgA 抗体の交差反応性

5 μg/mL の抗マウス IgA, 抗マウス IgG, もしくは OVA を 50μL/well で固相化後、1% BSA/PBS によりブロッキングし、マウス IgA (●: Intercell Tech 社), マウス IgG (▲: 当研究室製, 抗オボムコイド-6H 抗体), マウス IgM (△: 当研究室製, 抗 OVA-10H 抗体) を、それぞれの固相の特異性と合致させて 0 ~ 100 μg/mL の濃度で反応させた。その後、(A) BETHYL 社製もしくは (B) EY Lab. 社製の ALP 標識抗マウス IgA (α) 抗体と反応させ、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として検出し、405nm における吸光度を測定した。

ンパ節の細胞を使ったほうが良いと思われた。松原ら⁶⁾は、鼻粘膜関連リンパ系組織を用いて細胞融合を行っているが、鼻粘膜リンパ球細胞は少量で取りにくいことから、我々は腸間膜リンパ節を用いる方がよいと考えた。

そこで、10週齢の通常食マウスの脾臓及び腸間膜リンパ節の細胞を採取して培養し、培養上清中の Total IgA 量と Total IgG 量を比較した。(表 2) その結果、IgA 産生量としては腸間膜リンパ節よりも脾臓細胞の方が高かったが、脾臓では IgG 産生が主であるのに対して、腸間膜リンパ節では IgG 産生がほとんど見られないことから、IgA 産生細胞の樹立には腸間膜リンパ節を用いる方が適していることが示唆された。なお、通常食におけるタンパク質はカゼインベースであるので、カゼイン特異的 IgG、IgA も測定したが、脾臓、腸間膜ともに検出限界以下であった。このことは、通常の条件では食事由来たんぱく質に対する IgG、IgA 産生応答はさほど強くないことを意味している。

3. モノクローナル IgA 抗体の作製

経口的に摂取したタンパク質が腸管の M 細胞經由で取り込まれると、パイエル板下で抗原特異的に活性化された T 細胞が B 細胞の IgA へのクラススイッチを誘導する。この IgA 産生前駆 B 細胞がホーミングにより消化管や乳腺などの実行組織に移行して IgA を産生する。通常、モノクローナル IgG (IgM) の取得のためには、抗原をしかるべきルートからしかるべき助剤とともに免疫したマウスの脾臓細胞を用いるが、IgA 産生はその感作系が上述のように他のクラスの抗体とは異っているため、マウスの適切な活性化法は確立されていない。

そこで、我々は抗原特異的、非特異的抗体産生細胞の両方を獲得する目的で、牛乳タンパク質であるカゼインベースの食餌を与えられたマウス、卵白タンパク質を食餌タンパク質とした卵白食を与えられたマウス、もしくはカゼインベースの食餌に加えて

表 2 腸間膜リンパ節、脾臓リンパ球による IgA 産生 [ng/mL]

	腸間膜リンパ節	脾臓
Total IgA	46	119
Total IgG	—	357
カゼイン特異的 IgA	—	—

10週齢の通常食マウスの脾臓及び腸間膜リンパ節の細胞を採取し、24穴プレートを用いて 1×10^6 個/1 mL で培養した。培養 6 日目の培養上清の Total IgA、Total IgG をサンドイッチ ELISA、カゼイン特異的 IgA を固相 ELISA により定量した。—: 検出限界以下

卵白タンパク質を経口的に強制経口投与されたマウス、さらには、アジュバンドを用いて腹腔免疫されたマウス、計 18 匹から腸間膜リンパ節細胞を調製し、計 6 回の細胞融合を行った (表 1)。そのうち 5 回の細胞融合においては脾臓細胞を、1 回はパイエル板細胞も調製し、細胞融合を行った。合計 645 個のハイブリドーマをスクリーニングした結果、当初 8 個の IgA 産生細胞が得られたが、最終的には腸間膜リンパ節由来ハイブリドーマ 3 個 (2G, 6E, 6C)、脾臓細胞由来ハイブリドーマ 1 個 (5D) の IgA 産生細胞を樹立した。念のため、Amersham 社のアイソタイプングキットを用いて、以上の 4 クローンの作る抗体のクラス決定を行ったところ、脾臓細胞由来である 5D 以外のすべてのクローンで IgA が産生されていることが確認できた。よって、以下は 5D を除いた 3 クローンについて解析した。

4. モノクローナル抗体の特異性

3 クローンの培養上清を用いて、産生抗体が食餌タンパク質である牛乳タンパク質の α -カゼイン、もしくは卵白タンパク質の OVA、オボムコイドに特異的であるかを固相 ELISA で確認したが、すべてのクローンにおいて、全試験抗原への反応は見られなかった (図 2)。その他、乳清タンパク質の β -ラクトグロブリン、小麦タンパク質のグリアジン、

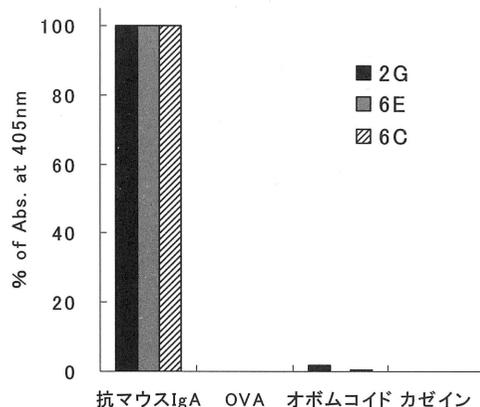


図 2 モノクローナル IgA の特異性

固相化された抗マウス IgA (Fc)、もしくは OVA、オボムコイド、カゼインに対して、各ハイブリドーマ培養上清中の IgA を反応させた (■: 2G, ■: 6E, ▨: 6C)。その後、BETHYL 社製 ALP 標識抗マウス IgA 抗体を反応させ、 p -ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として検出し、405nm における吸光度を測定した。グラフは、それぞれの固相抗原に対する反応性を、IgA 濃度に相当する抗マウス IgA 固相の場合の吸光度を 100% として示した。

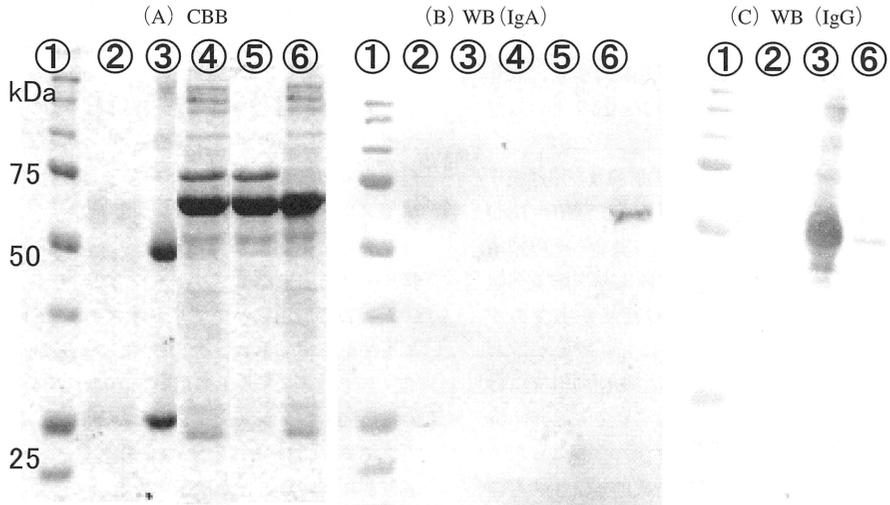


図3 KAPTIVE カラムを利用した腹水からの IgA 精製

ハイブリドーマ (2G) の腹水 1 mL を 20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 により 2 倍希釈後, 1 mL の KAPTIV-AE カラムに供し, 同緩衝液により素通り画分を除いた。次に, 0.1 M 酢酸を用いて吸着画分を溶出し, 直ちに 0.1 M Tris-HCl pH 9.6 で中和した。得られた画分に対して, 10% 均一ゲルを用い, 還元状態における SDS-PAGE を行い CBB 染色を行った (A)。さらにゲル内のタンパク質を膜に転写後, (B) ALP-抗マウス IgA (α) 染色, (C) ALP-抗マウス IgG (γ) 染色を行った。①分子量マーカー, ②市販マウス IgA (2 μ g), ③マウス IgG (2 μ g), ④ 2 G 腹水 (5 μ g), ⑤ Through 画分 (2 μ g), ⑥ 吸着画分 (3 μ g)

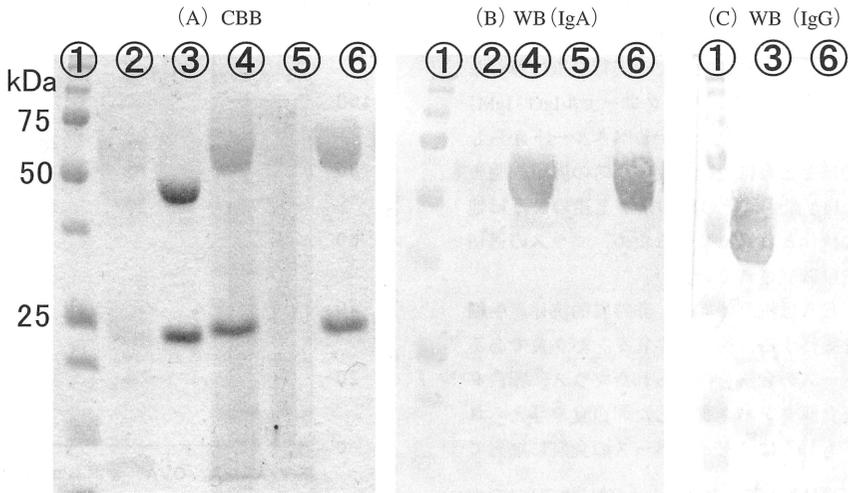


図4 Protein L カラムを利用した培養上清からの IgA 精製

ハイブリドーマ (2G) の基本培地培養上清 120 mL を 75% 飽和硫酸で 3 mL に濃縮し, その 1 mL を 0.15 M NaCl/0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4 により 2 倍希釈後, 1 mL の Protein L カラムに供し, 同緩衝液により素通り画分を除いた。次に, 0.1 M グリシン HCl pH 2.89 を用いて吸着画分を溶出し, 直ちに 0.1 M Tris-HCl pH 9.6 で中和した。得られた画分に対して, 10% 均一ゲルを用い, 還元状態における SDS-PAGE を行い CBB 染色を行った (A)。さらにゲル内のタンパク質を膜に転写後, (B) ALP-抗マウス IgA (α) 染色, (C) ALP-抗マウス IgG (γ) 染色を行った。①分子量マーカー②市販マウス IgA (2 μ g), ③マウス IgG (2 μ g), ④ 2 G 培養上清硫酸濃縮画分 (4 μ g), ⑤ Through 画分 (1 μ g), ⑥ 吸着画分 (1 μ g)

そば、落花生、BSA に対する反応性を固相 ELISA で確認したが、すべてのクローンにおいて、全試験抗原への反応は見られなかった。我々は、母乳中、及び唾液中の特異的 IgA の解析において、食品タンパク質特異的 IgA が総 IgA の約 1,000 分の 1 から 1 万分の 1 であることを経験している。また、外分泌液中のほとんどの IgA がハウスダストや微生物に対するものであると報告もあることから、今回得られたモノクローナル IgA もおそらく微生物やハウスダスト特異的ではないかと思われる。

5. IgA の精製

一般的に IgA の精製は、ゲルろ過や DEAE 樹脂を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって行われる¹⁸⁾。しかし、我々は、迅速・簡便な方法であるアフィニティークロマトグラフィーを用いることにした。

まず、IgA、IgE を特異的に吸着する合成ペプチドを固定化したアガロースゲルである KAPTIVE-AE¹⁴⁾ を用いて、プリスタン処理マウスから得られた腹水からの IgA の精製を試みた。しかし、ゲル吸着画分を SDS-PAGE にかけた結果、IgA だけでなく、低、高分子のタンパク質が吸着されていることが判明した。さらに、ウエスタン解析 (Western Blotting: WB) の結果、腹水中のマウス IgG も吸着していることが判明した (図 3)。KAPTIVE-AE を用いて腹水中の IgA を精製するのは不可能であり、マウス IgA のみを吸着出来る吸着体が市販されていないことから、他の抗体を含まない基本培地で IgA 産生細胞を培養後、免疫グロブリン吸着体である Protein L¹⁵⁾ を用いて培養上清から IgA を精製することを目指した。Protein L は *Peptostreptococcus magnus* が産生するタンパク質で、免疫グロブリン分子の κ 鎖を認識する。本実験で用いたマウスミエローマ細胞は κ 鎖分泌株由来であるため、Protein L が有用であると考えられた。そこで、血清添加培地で増殖させた 1×10^7 個の IgA 産生細胞を基本培地により 2 回洗浄して FBS 由来の抗体を除いた後、基本培地 60mL に 5 日間培養し、回収した培養上清を 75% 飽和硫酸アンモニウム沈殿により濃縮後、Protein L にかけて IgA を純化した。SDS-PAGE の結果からも、基本培地中では、IgA が主要タンパク質であることがわかる。これを Protein L にかけることでさらに IgA が純化された (図 4)。サンドイッチ ELISA により回収率を求めたところ、ほぼ 100% であることが確認出来た。

しかし、さらに大量の IgA を調製する必要がある場合は、基本培地より腹水の方が通常 30~100 倍の濃

度で抗体溶液を得られることから、やはり腹水を用いる方が効率がよいように思われる。その際は、ハイトラップ IgM (Pharmacia 社製) 及び Protein G (Amersham 社製) で IgM、IgG をそれぞれ除いてから、Protein L で IgA を回収するという 3 段階の精製が必要になる。

6. モノクローナル抗体の分子量

通常、IgA は単量体、もしくは二量体で存在する。抗体産生細胞に分化した B 細胞が IgA を産生するが、この際、小胞体内で J 鎖の修飾を受けると、二量体として細胞外に放出される。二量体の IgA が外分泌線から分泌される際は、分泌片 (SC) によってさらに IgA 同士が強固に結合した分泌型 IgA となる。モノクローナル抗体産生細胞から産生される IgA は、単量体と二量体の両方の可能性があるが、二量体の場合、外分泌の過程を経ていないため、SC は結合していないと予想された。得られたモノクローナル IgA 産生細胞が培養上清液中に分泌する IgA について、ゲルろ過解析を行ったところ、市販のマウス IgA と同じく約 360kDa と、280kDa にピークが見られた (結果省略)。単量体のマウス IgA は 130kDa、マウス血清中の二量体 IgA は 280kDa と報告されているので¹⁹⁾、得られたモノクローナル IgA はおそらく二量体であると思われる。

7. モノクローナル IgA の利用

当初、IgA 免疫複合体を調製するにあたり、抗原特異的 IgA 産生ハイブリドーマを作製して抗原特異的 IgA を多量調製した後、抗原抗体反応を利用して免疫複合体を形成させることを目指していた。これは、より天然の免疫複合体に近い状態で IgA 免疫複合体を形成することが出来、母乳や唾液中の IgA 免疫複合体が経口免疫寛容の直接的な誘導因子であることを立証するために有用だと考えたからである。

しかし、小腸パイエル板上の M 細胞に発現している IgA レセプターは、IgA の Fc 領域 ($\alpha 1$, $\alpha 2$) を認識していることから¹⁰⁾、IgA を抗原の単なるキャリアーと考えると、化学修飾により任意の食品タンパク質を IgA に結合させた仮性 IgA 免疫複合体 (pIC: pseudo Immune Complex) でも、腸管免疫系を効率よく活性化できると考えられる。むしろ、抗原抗体反応で形成される特異的 IgA 免疫複合体よりも、特異性を無視して抗原を結合させた pICの方が抗原の組み合わせを多様にすることが出来る上、安定であることから、IgA 免疫複合体によるアレルギーの予防や治療への応用としては有効ではないか

と考えた。

そこで、精製したIgAにOVAを化学修飾させ、pICの作製を試みた。化学修飾には、タンパク質中のアミノ基とカルボキシル基を利用するカルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、システイン残基を利用するマレイミド法、糖鎖を利用する方法などがある。一般的に使われる、カルボジイミド法、グルタルアルデヒド法では修飾されるアミノ酸数が多く、修飾が複雑になると考えられた。修飾が複雑になると、IgAがIgA受容体に認識されにくくなる可能性があるため、より架橋箇所が少ない結合法が望ましいと思われた。マウスIgAの糖鎖は14個と、カルボジイミド法、グルタルアルデヒド法と比べて架橋箇所は少ないが、糖鎖結合部位はIgA受容体の認識部位近傍に多く、そこに修飾を加えれば受容体に認識されなくなる可能性が考えられた。そこで、比較的結合箇所も少なく、IgA受容体認識部位にも少ないシステイン残基を利用する Sulfo-LC-SPDP を用いて結合させる事にした。図5に示したように、得られたOVA-pICを用いて、抗OVA抗体と抗マウスIgA(α)のサンドイッチELISAが成立したことから、OVA-pICが形成されていることが確認出来

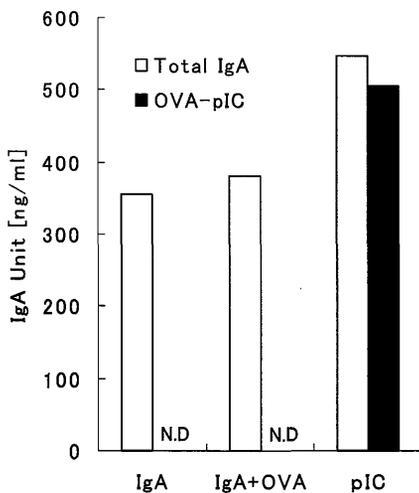


図5 仮性IgA-免疫複合体(pIC)の調製

pIC作製に用いた純化モノクローナル2G抗体(IgA)、2G抗体とOVAを1:5で混合させただけのもの(IgA+OVA)、2G抗体とOVAを1:5で混合し、Sulfo-LC-SPDPにより架橋形成させたもの(pIC)を、IgA量を合わせて試料とし、抗マウスIgA(Fc)とALP標識IgA(α)のサンドイッチELISAによりIgA(□)を、抗OVAポリクローナル抗体とALP標識IgA(α)のサンドイッチELISAによりOVA-pIC(■)を測定した。ND:検出限界以下

た。まだ予備実験の段階であるが、得られたOVA-pICをマウスに経口投与後、FCAとともに卵白タンパク質を免疫したところ、遊離OVAを投与した対照群にくらべてOVA特異的IgG産生が抑制されることが確認出来ている(木津ら、未発表)。

今後、IgAに結合させる抗原の種類や、IgAと抗原との結合方法、さらには任意のIgA免疫複合体の投与方法に検討を加え、IgE産生やアレルギー反応の抑制効果、さらにはそのメカニズムの解明に応用していきたいと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、御協力頂いた池田美紀さん、佐川仁美さんに深謝致します。

引用文献

- 1) 中村桂子, 松原謙一監訳: 細胞の分子生物学第4版, 1375-1380 (2004)
- 2) Köhler G, Milstein C: *Nature*, **256** (5517), 495-497 (1975)
- 3) 森下恵美, 成田宏史: 本誌, **47**, 118 (1992)
- 4) Tanikawa T, Kurohane K, Imai Y.: *Hybridoma (Larchmt)*, **26** (5), 328-32 (2007)
- 5) Tanikawa T, Ishikawa T, Maekawa T, Kuronane K, Imai Y.: *Scand J Immunol.*, **68** (4), 414-22 (2008)
- 6) Matsubara T, Aoki N, Hino S, Okajima T, Nadano D, Matsuda T.: *Clin Exp Allergy.*, **39** (4), 579-90 (2009)
- 7) Furuya K, Miwa S, Omura M, Asakura T, Yamano K, Takatori K, Kudo S.: *Hybridoma (Larchmt)*, **27** (3), 153-7 (2008)
- 8) Hirose J, Ito S, Hirata N, Kido S, Kitabatake N, Narita H: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1438-1440 (2001)
- 9) 成田宏史, 廣瀬潤子, 北直直文: 日本栄養食糧学会誌, **55** (4), 235-237 (2002)
- 10) Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacheruvu KR, Rey J, Corthésy B, Neutra MR.: *J. Immunol*, **169**, 1844-51 (2002)
- 11) Zhou F, Kraehenbuhl JP, Neutra MR: *Vaccine*, **13** (7), 637-644 (1995)
- 12) 廣瀬潤子, 木津久美子, 成田宏史: 化学と生物, **45**, 230-232 (2007)
- 13) 成田宏史: 小林陽之助, 金子一成編「食物アレルギーの治療と管理」(改訂第2版), 診断と治療社, 218-224 (2008)

- 14) Palombo G, De Falco S, Tortora M, Cassani G, Fassina G: *J. Mol. Recognit.*, **11**, 243–246 (1998)
- 15) Nilson BH, Lögdberg L, Kastern W, Björck L, Akerström B: *J. Immunol. Methods*, **164**, 33–40 (1993)
- 16) Laemmli UK: *Nature*. **15**, 227 (5259):680–5 (1970)
- 17) Cumber AJ, Forrester JA, Foxwell BM, Ross WC, Thorpe PE: *Methods Enzymol.*, **112**, 207–25 (1985)
- 18) 中村 弘, 杉浦 勉: 日本生化学会編「統生化学実験講座」第 5 卷 (第 1 版) 東京化学同人, 1124 (1986)
- 19) Shimada S, Kawaguchi-Miyashita M, Kushiro A, Sato T, Nanno M: *The Journal of Immunology.*, **163**, 5367–5373 (1999)