

牛血清アルブミン分解物の抗原性とそれらを以てする 免疫トレランス誘導の試み

田辺製薬総合製品研究所

高 田 功

京大胸部研 細菌血清学部

桂 義 元

京大胸部研 胸部外科学部

寺 松 孝

免疫トレランスの誘導には、可溶性の抗原の静注が最も普通に行なわれているが^{1),2)}、トレランス誘導に適した抗原分子の性状や分子の大きさは、抗原の種類によって異なるといわれている。

Parish と Ada³⁾ は、*Salmonella adelaide* の flagellin を抗原とし、ラットにトレランスを誘導するには、flagellin 自体を用いるよりも、それを CNBr で分解したものをを用いた方が容易であることを報告している。このような抗原分子の分解物によるトレランス誘導の研究があまり行なわれないのは、元の抗原のすべての抗原基が分解物上に保存されているか否かを明らかにしがたいこと、及び生化学的にも一定の分解物がえがたく、再現性に乏しい憾みがあることなどのためであるが、もし Parish らの研究結果が他の多くの抗原によるトレランス誘導にも適用しうるものであれば、免疫トレランスの誘導に新しい局面が開かれると思われる。

本研究は、能う限りの一定条件下でえられたウシ血清アルブミン (BSA) のペプシン水解物を用い、それら各画分の抗原性について検討するとともに、元の BSA に対するトレランスの誘導を試みたものである。

I. 検討用材料、その調整法および実験方法

(1) 試 薬

BSA は Pentex 社の Bovine albumin crystallized を、エンドキシン (ET) は Difco 社の Lipopolysaccharide B, *E. coli* 0111. を使用した。ペプシンは Armour 社の 2×crystallized & lyophilized (1:60,000) を Sephadex G-75 を通して精製して使用した。分子量決定のために使用した種々の標準蛋白は Mann Research Lab. 社のものである。

(2) BSA のペプシンによる分解

a. ペプシン分解ウシ血清アルブミン (peptic-BSA) の調製

ウシ血清アルブミン 1g を 35ml の 0.25M-塩酸-酢酸ソーダ緩衝液 (pH 4.2) に溶解し、これに上記緩衝液 15ml にペプシン 50mg を溶解したものを加え、37°C で毎分90回振とうして、15分あるいは30分 incubate した後、0.1N-水酸化ナトリウムで pH 9.5 とし反応を停止せしめた。15分の incubate で得た分解物 (peptic BSA-15) はそのまま注射に用い 30分の incubate で得た分解物 (peptic-BSA-30) は以下のように Sephadex G-75 カラムで分画して用いた。

b. Peptic BSA-30 の Sephadex G-75 による分画

peptic BSA-30 溶液を Sephadex G-75 カラム (5×52cm) を通して分画した。溶出には pH

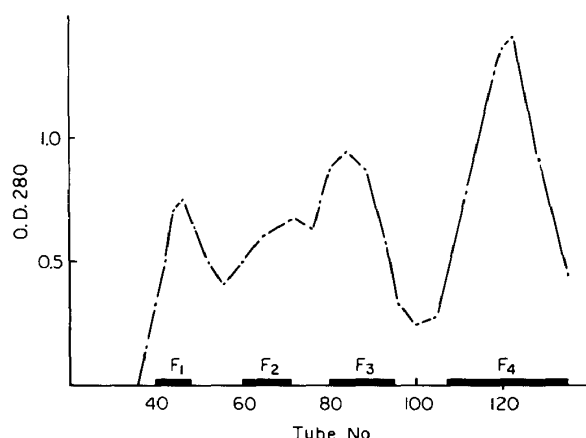


Fig. 1 Sephadex G-75 Column Chromatogram of Peptic BSA-30

9.5 の 0.1 M-NaCl/0.05M-燐酸緩衝液を用いた。**Fig. 1** に示した各画分を集めて、F₁~F₄とした。

c. F₁, F₂, F₃, F₄ の分子量測定

0.1M-燐酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Sephadex G-100カラム (2.5×45 cm) を用い、ヒトγ-グロブリン、ウマ心筋チクローム C、シラスクジラミオグロビン、ウシ臍キモトリプシノーゲン A、卵アルブミン、ウシ血清アルブミンを、それぞれ標準蛋白として、Whitaker の方法⁴⁾ により分子量を測定し、**Fig. 2** に示すように、F₁≒60,000, F₂≒45,000, F₃≒30,000, F₄≒10,000 を得た。

d. Peptic BSA-30 と各フラクションの電気泳動

永井の方法⁵⁾ に準じ、disk 電気泳動を行なった。泳動は酸性 (pH 4.0) とアルカリ性 (pH 8.3) で行なった。**Fig. 3** に示すように Peptic

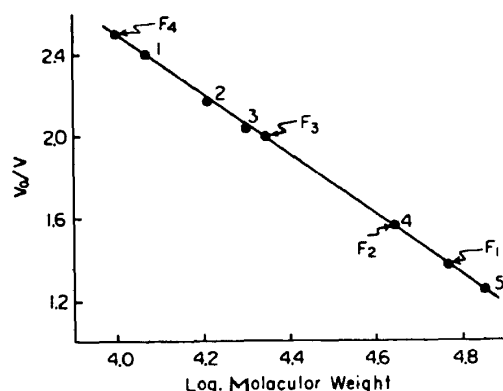


Fig. 2 Molecular Weight of Peptic BSA-30 Fractions

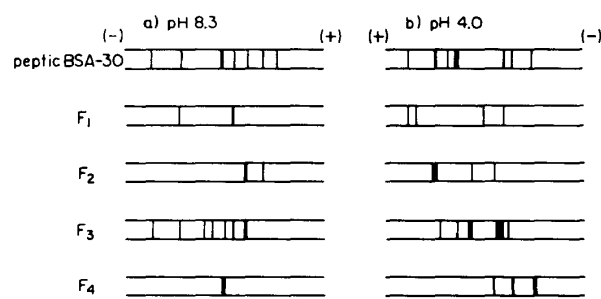


Fig. 3 Disk electrophoresis of Peptic BSA-30 Fractions

BSA-30 は少なくとも7コの component からなっており、F₁~F₄ も2コ以上の component に分離される。

(3) マウス

国立遺伝学研究所 (三島) よりえた CBA マウスを当研究所で繁殖させたもので、7~8週令の雄を用いた。

(4) トレランス誘導のための注射

BSA あるいはペプシン分解物を 105,000×g で90分間超遠心、上清の上部約 1/2 をとり、マウスの静脈内に注射した。

(5) 免疫注射 (Challenge)

alum precipitated BSA (AP-BSA) 100μg と ET 10μg を加えて静脈内に投与した。抗原の調整方法等は Katsura の既報⁶⁾ に記している。この抗原投与方法によると、BSA に対するγM およびγG 抗体産生が最も効果的に誘導される。

(6) 抗体の測定

glutaraldehyde で固定し、bis-diazotized benzidine 処理により BSA を結合させたマウス赤血球を用い、血球凝集価を測定した。micro titration plate を用いる方法や、2-mercapto-ethanol 処理法などを含めて詳しいことは Katsura の論文⁶⁾ に記した通りである。

(7) Ouchterlony test

pH 7.4 の燐酸緩衝液 (μ=0.1) を用い、ガラス板上に寒天ゲルを作り、穴をあけて、中央の穴にはウサギの anti-BSA 又は anti-peptic BSA、血清、周囲の穴には BSA あるいはペプシン水解物を入れ、室温に24時間静置した。

(8) Relative Immune Index (R.I.I.)

次の式を用い、実験群のγM 反応およびγG

の反応の強さを, 実験群と対照群との相対値(%)から測定した。詳細は Katsura の論文⁷⁾を参照されたい。

$$\gamma M-R.I.I.=2^{b-a} \times 100$$

$$\gamma G-R.I.I.=2^{d-c} \times 100$$

a=geometrical mean maximum

γM titre (control)

b=geometrical mean maximum

γM titre (experimental)

c=geometrical mean maximum

γG titre (control)

d=geometrical mean maximum

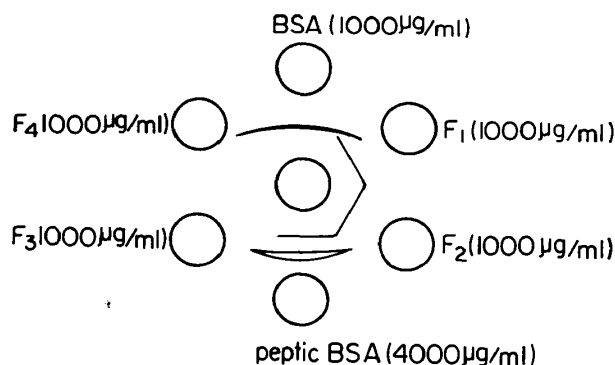
γG titre (experimental)

(9) 定量沈降反応, 定量沈降反応阻止試験常法⁸⁾により行なった。

II. Peptic BSA-30 の免疫学的性質

(1) Ouchterlony test

Fig. 4-a は, anti-BSA 血清に対する反応で, **Fig. 4-b** は anti-peptic BSA-30 血清に対する反



center circle; anti-BSA

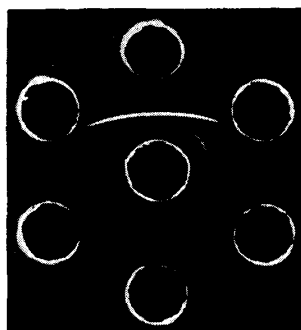


Fig. 4-a Comparison of BSA and Peptic BSA-30 Fractions by diffusion in agar gel by method of Ouchterlony

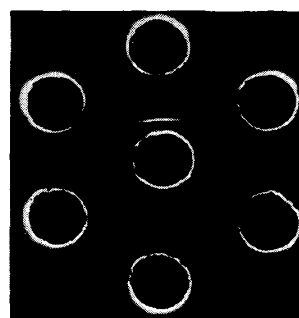
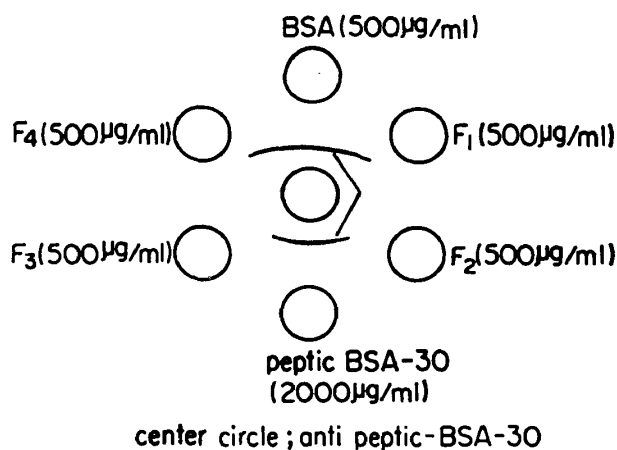


Fig. 4-b Comparison of BSA and Peptic BSA-30 Fractions by diffusion in agar gel by method of Ouchterlony

応である。anti-BSA 血清との反応では, BSA, F_1 および F_2 に沈降線が認められ, BSA と F_1 の沈降線は spur をなし, F_1 と F_2 の沈降線は, fuse している。又, peptic BSA-30 の沈降線は 2 本認められ, そのうち, Rf 値の小さい方は, F_1 および F_2 と fuse した。 F_3 および F_4 は, 蛋白濃度を $37.5 \sim 1,200 \mu\text{g/ml}$ の範囲で変えても沈降線を与えなかった。

(2) 定量沈降反応

a. anti BSA との反応

先ず, BSA について equivalence zone を求めたところ $500 \mu\text{g/ml}$ の時に最高沈降量を与えることがわかったので, 各フラクションについて, この濃度で定量沈降反応を行なった。抗原に BSA を使ったときの沈降蛋白量を 100% とすると, 各フラクションの沈降蛋白量の比率は, **Fig. 5-a** のように, $F_1=38.5\%$, $F_2=4.5\%$, $F_3=0.9\%$, $F_4=0.8\%$ で, 抗原を添加しない control は 4.3% であった。従って, F_2 , F_3 , F_4

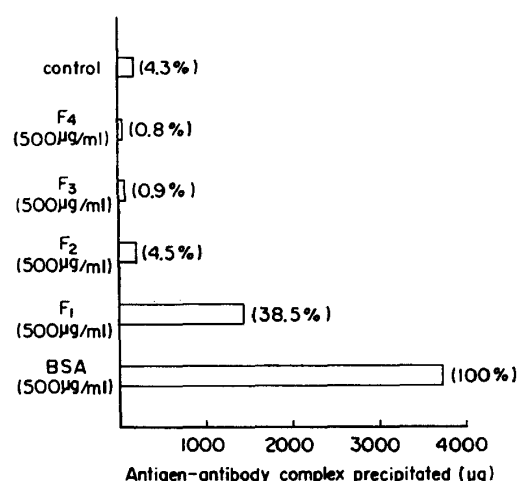


Fig. 5-a Precipitin experiments with Peptic BSA-30 Fractions in anti-BSA serum

は BSA に比し著しく抗原性が低下しているといえる。

b. anti-peptic BSA-30 との反応

BSA を抗原にした時の最高沈降量を与える抗原濃度は $200\mu\text{g/ml}$ であったので、この濃度で、各フラクションについて定量沈降反応を行った。その結果を Fig. 5-b に示した。BSA を抗原とした時の沈降蛋白量を 100 % として各

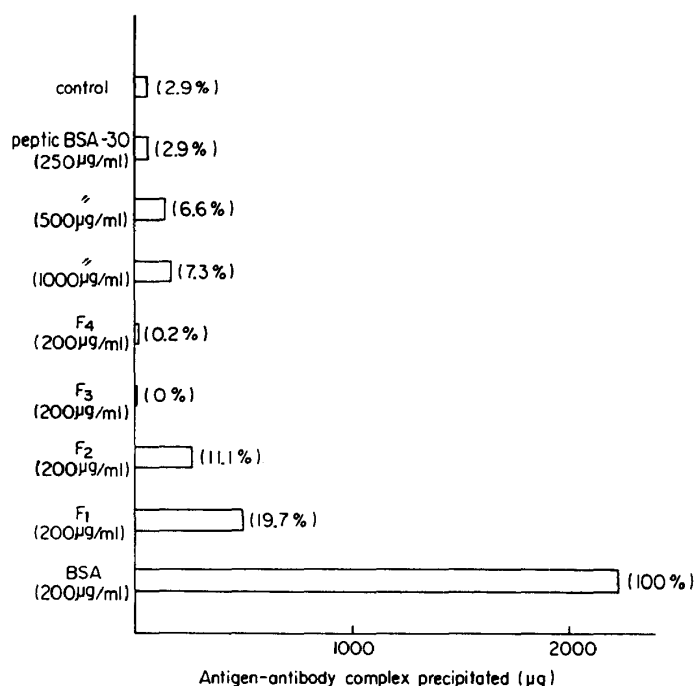


Fig. 5-b Precipitin experiments with Peptic BSA-30 Fractions in anti-Peptic BSA-30 Serum

フラクションの沈降蛋白量の比率を求めると、 $F_1=19.7\%$ 、 $F_2=11.1\%$ と低いながら反応はみられたが F_3 、 F_4 では殆んど沈降物はえられなかった。

c. F_3 および F_4 の anti-BSA との反応性

F_3 と F_4 は Ouchterlony test でも、定量沈降反応でも、反応性を示さなかったが、これは、 F_3 、 F_4 が、その抗原決定基のいくつかを失い、不完全抗原となってしまったか、あるいは pepsin 分解により、BSA との共通した抗原性を有することができない迄に、その高次構造が変わってしまったことが予想される。そこで定量沈降反

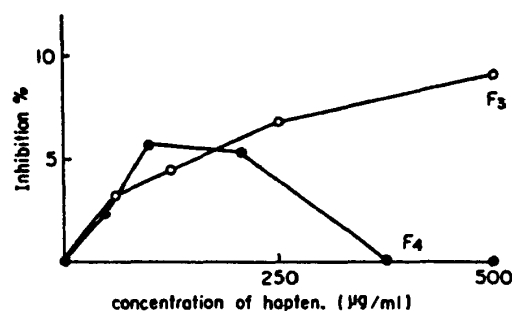


Fig. 6 Precipitin Inhibition Test by F_3 and F_4 in BSA-anti-BSA system

応阻止試験を行なってこの点を検討した。操作は BSA を抗原にして、“免疫学アレルギー学実験法”⁷⁸⁾ 記載の常法に従い行なった。結果は Fig. 6 に示した。 F_3 、 F_4 共に、anti-BSA と BSA の沈降反応を阻害し、その程度は、阻止率で10%程度であった。従って、 F_3 および F_4 は BSA と共通した抗原性を留めていることがわかったわけで、 F_3 、 F_4 も有効な tolerance inducer (tolerogen) となりうるのではないかと推定された。

III. トレランス誘導実験

各群5匹のマウスに、超遠心した BSA あるいは peptic-BSA-15 をそれぞれ 1mg 静脈内に注射し、次の日に AP-BSA と ET で challenge を行なった。Fig. 7 に $\gamma\text{M-R.I.I.}$ と $\gamma\text{G-R.I.I.}$ を示している。この方法では s-BSA でもそれほど強い

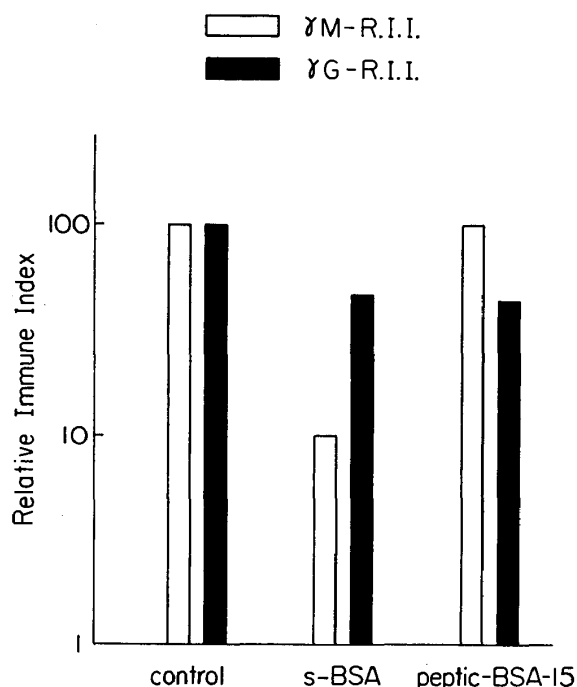


Fig. 7 Relative immune index (R.I.I.) of mice given a single injection of 1mg of s-BSA or peptic-BSA-15 and challenged next day.

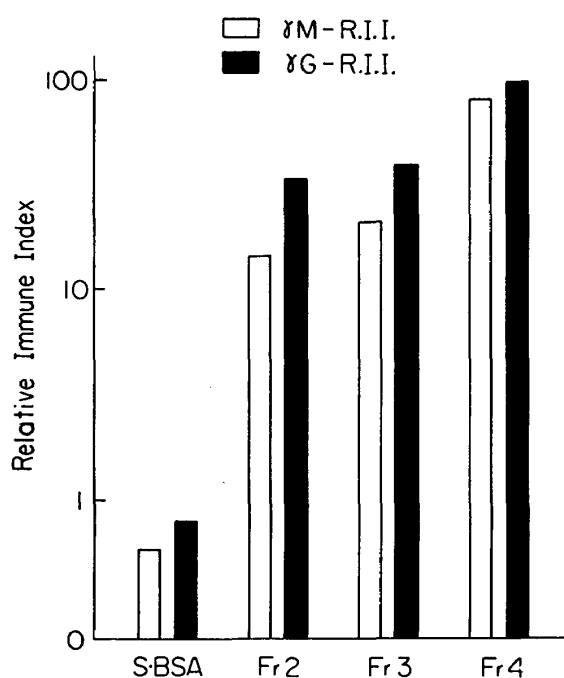


Fig. 8 Relative immune index (R.I.I.) of mice given two weekly injections of 100 μg of s-BSA, s-Fr2, 3-Fr3 or s-Fr4 and challenged 1 week later.

tolerance は誘導されないが, peptic-BSA-15 の注射はほとんど影響がない。

各群 6 匹のマウスに超遠心した BSA, F₂, F₃

あるいは F₄ (それぞれ s-BSA, s-Fr₂, s-Fr₃, s-Fr₄) の 100 μg を 1 週間々隔で 2 回注射して, 2 回目の注射から 1 週間目に AP-BSA と ET で challenge を行なった。これらのいずれを注射した場合も challenge 前には抗体は出現しなかった。Fig. 8 に γM-R.I.I. と γG-R.I.I. を示している。s-BSA を与えた場合 challenge に対する反応は対照群の約 1 % になる。一方, 分解物の場合, F₂ あるいは F₃ を与えるとある程度の反応の低下はあるが, s-BSA による低下よりは明らかに弱い。

IV. 考 按

一般に抗原蛋白を酵素水解すると, その抗原性が著しく低下することが知られている。例えば, 唐沢⁹⁾ は, BSA をペプシン水解するに伴って, その抗原性が著しく低下していくと報告している。

著者らの今回の実験の前半は, BSA のペプシン水解物の抗原性について検討したものであり, 後半は, その水解物の一部を以ての BSA に対する免疫学的寛容の誘導を試みたものである。

さて, 唐沢によると, ペプシンによる BSA 水解過程は, 水解当初から小さな断片がこきざみに切れるようで, 大まかな中間物は生じないと結論している。また, この場合, 分子量の低下に伴ない, 抗原性も著しく低下する。水解物で透折されない画分の電気泳動図は, 数個の易動度を異にする画分に分かれているが, 免疫電気泳動で沈降帯を与えるのは, BSA の易動度に一致する成分のみで, 唐沢はこの成績から, ペプシンによる水解について前記のように結論したのであろう。

一方, 最近, Wright¹⁰⁾ らは, BSA の消化管内での分解, 吸収およびそれらの抗原性について検討している。彼は, BSA をペプシンの至適 pH で 3 時間水解し, Sephadex G100 カラムクロマトで, 3 個のピークに分画し, それらの免疫学的性質について検討した。それによると, 寒天内二次元拡散法を用い, 分子量の大きいピーク 1 およびピーク 2 では, BSA の抗原決定

基の全てが保持されているとしている。一方、分子量 10,000 以下と推定されるピーク 3 は、沈降帯はえられないが、BSA と抗 BSA 家兎血清との反応は阻止すると述べている。また、各ピークの抗 BSA 家兎血清抗体との結合性を、 ^{125}I ラベル BSA との競合反応の成績から、ピーク 1 は BSA とほぼ同様、ピーク 2 は BSA の約 80%、ピーク 3 は 30% と計算している。

著者らの水解条件は、唐沢らとほぼ同じであるにもかかわらず、その成績は、むしろ、Wright の報告に近いものとなった。

著者らの BSA 水解物は Sephadex G75 のカラムで、4 個の画分に分離され、その免疫学的性状からすると、F₁ および F₂ は、Wright のピーク 1 および 2 に当るもので、F₃ および F₄ がピーク 3 に近いもののようである。

また、著者らのえた成績および Wright のそれとを併せ考えるならば、ペプシンによる BSA 水解過程については、少なくとも免疫学的には最初に大まかな数個の画分に分かれるとしてよいのではないと思われる。

しかし、著者らのえた F₁ および F₂ (分子量は 60,000, 45,000 位と推定される) では、元の BSA の抗原基の幾つかが失なわれているようであり、この意味では、唐沢のいうように、こま切れ的な分解過程も否定しえない。また、F₃ および F₄ (分子量は約 30,000, 10,000) が BSA と抗 BSA 家兎血清との結合を抑制する能力を有していることから、唐沢の考え方は、完全には否定しえない、と思われた。

何れにしても、BSA のペプシンによる水解過程については、今後なお検討を要する処が多い。

次に、成績の再現性の問題であるが、著者らの行なった材料および方法によると、えられる画分の分子量および抗原性に関する限り、再現性は高いようで、数回の計測値がほぼ一致していた。

従って、今後さらに精確な実験を行ないうる見通しである。

最後に、免疫学的寛容の誘導であるが、今回の実験結果からする限り、BSA に対する寛容の誘導は、BSA 水解物では簡単には招来され

ないといえるようである。

免疫学的寛容の誘導に関する知見は多いが、任意の抗原ないし動物を用いた場合に適用する定法は未だない。しかしながら、Katsura は BSA を tolerogen とした場合、安定した成績をうる方法を確立しており⁷⁾ この意味から、著者らのえた peptic-BSA-30 は tolerogen とはなり難いと思われるのである。

Peptic-BSA-30 が tolerogen になり難い理由について考えてみると、その 1 つは、F₂ から F₄ までの Peptic-BSA-30 が、元の BSA の抗原基の全てを有していないということが考えられる。前記の Parish, Ada らの *Salmonella* 抗原の分解物あるいは Friedman, Gaby¹¹⁾ の *Shigella* 抗原のトリプシン水解物などが tolerogen として有効であったのは、それらが元の抗原基の全てを保有していたということかも知れない。

BSA の抗原性のうちには、立体構造的に特異性、抗原性を示すものが多いと考えるならば、それらが分解により消失するのは当然であろう。そして、これが tolerogen としての性格を失わせた原因かも知れない。

また次のようなことも考えられる。すなわち、ペプシン分解によりある程度の抗原性は失われたとは言え、かなりの抗原性が F₁ あるいは F₂ には残っているので、F₁ や F₂ が tolerance 誘導に適しているならば、上述の方法でかなり強い tolerance が誘導されるはずではないだろうか。そう考えると tolerance の誘導にはある程度の分子の大きさ、あるいはいくつかの抗原決定基が必要であるという見解¹²⁾ と一致する面があるのかも知れない。そのことは今後の課題である。

V. 結 論

(1) BSA のペプシン水解を行ない、比較的再現性の高い、F₁, F₂, F₃ および F₄ の 4 つの画分をえた。それらの分子量は、それぞれほぼ、60,000, 45,000, 30,000 および 10,000 である。

(2) 何れの画分においても、その抗原性は減弱しており、とくに、F₃ および F₄ は、Anti-BSA

家兎血清との間に沈降物を造らず, 単に BSA と Anti-BSA 血清との間の反応を軽度に阻害するのみとなる。

(3) Peptic-BSA-15 も peptic-BSA-30 の各分画も tolerogen としての性質は極めて弱い。

引用文献

- 1) Dresser, D.W.: Immunology, 5: 378, 1962.
- 2) Dresser, D.W. and Mitchison, N.A.: Advanc. Immunol., 8: 129, 1968.
- 3) Parish, C.R. and Ada, G.L.: Immunology, 17: 153, 1969.
- 4) Whitaker, J.R.: Anal. Chem., 35: 1950, 1963.
- 5) 永井裕, 蛋白質・核酸・酵素, 11: 818, 1944.
- 6) Katsura, Y.: Japan. J. Microbiol, 16: 223, 1972.
- 7) Katsura, Y.: Japan. J. Microbiol, 16: 269, 1972.
- 8) 木村一郎, 免疫学アレルギー学実験法, 299, 1971.
- 9) 唐沢直人, 生化学, 31: 669, 1959.
- 10) Wright R.N. and Rothberg, R.M.: J. Immunol., 107: 1410, 1971.
- 11) Friedman, H. and Gaby, W.L.: J. Immunol., 85: 478, 1960.
- 12) Bretcher, P. and Cohn, M.: Nature. 220: 444, 1968.