

溶連菌細胞膜抗原に対する抗体価の測定

藤沢 晨一，吉本 政弘

福井医科大学 小児科

1. 序言

急性糸球体腎炎の発症にA群溶血性連鎖球菌（溶連菌）感染が関連していることは既知の事実であるが、その詳しい発症メカニズム、とくに起因抗原については未だ十分に解明されていない。溶連菌菌体成分のうち、蛋白成分の多いM, T, R抗原については詳しく研究がなされており、腎炎発症との因果関係については否定的である。溶連菌細胞膜（SCM）も蛋白含量が多く、多方面から検討が進められつつあり、急性腎炎との関連を示唆する報告もみられる^{①②}。我々は、SCM抗原に対するモノクローナル抗体を既に作成しており^③、これを用いて対応する単一抗原に対する抗体価の測定法を開発したのでその結果とともに報告する。

2. 方法

1) SCMの分離

用いられた溶連菌のうち、T12型とT4型は溶連菌感染後急性糸球体腎炎患者から分離されたものであり、T3型とT8型は単なる咽頭炎患者からのものである。これらの溶連菌から

Wheelerらの方法^④に準じてSCMが分離精製された。

2) モノクローナル抗体の作製

T12型溶連菌から得たSCMに対するIgGクラスのモノクローナル抗体を15種類作成した^⑤。SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティング法を用いて対応する抗原を確認したところ、9種類のモノクローナル抗体はSCMの4種類の抗原のいずれかと対応することが確認された^⑥。

3) ヒト血清（表1）

コントロール血清として溶連菌感染の明らかな既往がなく、ASO価160 u未満の血清23検体（第1群）を用いた。第2群血清は溶連菌性咽頭炎の患児から得た。これら患児はすべて診断後ペニシリンの投与を受けていた。第3群血清は腎炎、溶連菌感染以外の理由で病院を訪れた高ASO価の患児7人より得た。第4群血清は溶連菌感染後急性糸球体腎炎患児25人より得た。

4) ELISAによる抗SCM抗体価の測定

表1. 被検血清

群		例数	平均年齢	ASO価
1	コントロール	23	8才4カ月	< 160
2	咽頭炎	10	6才5カ月	< 320
3	高ASO価	7	6才6カ月	320 - 2560
4	急性糸球体腎炎	25	6才7カ月	30 - 1280

(1) 96穴 Immulon II プレート (Dynatec Lab.) に $0.05M$ carbonate buffer, pH 9.6 で希釈した各モノクローナル抗体 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を $50 \mu\text{l}$ 加え 4°C で1夜 incubate した。

(2) 0.3% Triton X-100 を含む phosphate buffered saline (PBST) で5回洗浄し、 1% BSA 0.2ml を加えて室温で3時間 incubate した。

(3) PBST で5回洗浄し、 1% BSA を含む PBST (dilution buffer) で希釈した SCM 抽出抗原を加えて 4°C で1夜 incubate した。

(4) PBST で5回洗浄後、dilution buffer で30倍希釈したヒト血清を加え、室温で3時間 incubate した。

(5) PBST で5回洗浄後、dilution buffer で希釈したアルカリフォスファターゼ標識マウスモノクローナル抗ヒト IgG (Bio-Yeda-Ltd.) を室温で3時間 incubate した。

(6) PBST で5回洗浄し、基質として p-nitrophenyl phosphate $1.0\text{mg}/\text{ml}$ と MgCl_2 1mM を含む $0.05M$ carbonate buffer, pH 9.8 を $100 \mu\text{l}$ 加え、室温で30分 incubate した。

(7) $1N$ NaOH $50 \mu\text{l}$ を加えて反応を停止させて Titertek Multiskan MCC 340 (Flow Lab.) で 405nm での吸光度を測定した。

ブランクとして (3) の SCM 抗原液の代わりに dilution buffer をおいた系を用いた。各血清について duplicate で行なった測定値の平均値からブランク値を差し引いた値を各血清の実測値とした。

5) 標準曲線の作成

抗 SCM 抗体価の高い血清を標準血清として段階希釈し、各モノクローナル抗体を用いた ELISA において dose-response curve を描き、抗体価測定への応用の可否を

検討した。良好な dose-response curve の得られたモノクローナル抗体を用いて、各群の血清における抗体価を測定した。抗体価の測定に当たっては各プレート毎に6段階希釈した標準血清を同時において片対数グラフ上に標準曲線を作成し、最小希釈および最大希釈での実測値の抗体価をそれぞれ 1.0 a.u. (arbitrary unit) および 0.5 a.u. と表わした (図1)。

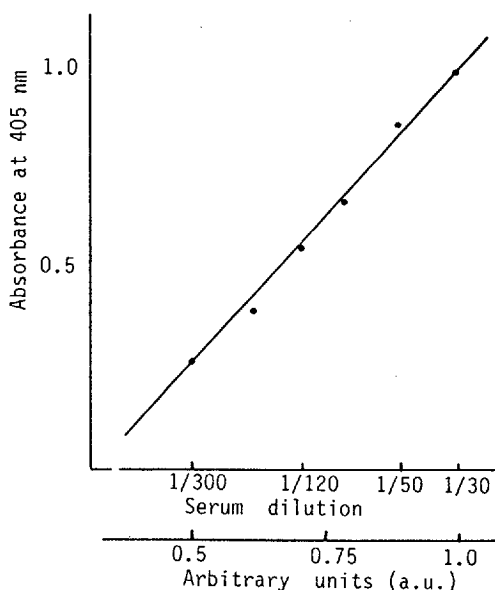


図1 モノクローナル抗体を用いた ELISA における標準曲線

3. 成績

1) 標準曲線

用いた15種類のモノクローナル抗体のうち1種類のみにおいて図1の如く良好な dose-response curve が得られた。このモノクローナル抗体に対応する抗原は、検討した4種類の T型から得た SCM のいずれにも存在するものであった。

2) 抗 SCM 抗体価

測定結果は表2に示した。単なる溶連菌性

表2. 抗SCM抗体価測定結果

群	例数	抗体価 平均 ± 標準偏差	有意差
1	23	0.49 ± 0.11	$\left. \begin{array}{l} \text{N.S.} \\ \text{P} < 0.05 \\ \text{N.S.} \end{array} \right\} \text{P} < 0.01$
2	10	0.48 ± 0.09	
3	7	0.59 ± 0.13	
4	25	0.61 ± 0.18	

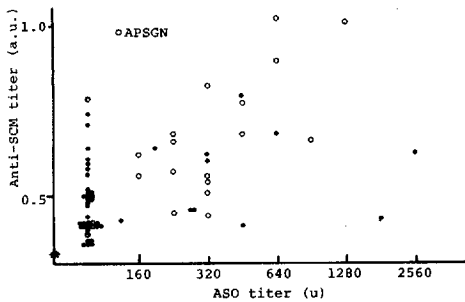


図2 抗SCM抗体価とASO価の関係

咽頭炎の患者血清(第2群血清)では第1群のコントロール血清に比し有意な抗体価の上昇は見られなかった。一方、第3群および第4群血清ではコントロール血清に比し有意な抗体価の上昇が見られた。しかし、第3群と第4群の間には有意差がなかった。

3) 抗SCM抗体価とASO価との相関

図2に示した如く抗SCM抗体価とASO価との間にはは少くとも強い相関はみられなかった。

4. 考 察

SCMは多種の蛋白質を含んでいるが、疎水基を有するものは難溶性であり、蛋白成分の可

溶性化および分離には界面活性剤の存在を必要とする。一方、界面活性剤の存在により蛋白抗原を固相に固着させ難く、これに対する抗体価の測定を困難にしている。我々の用いた方法はまず固相にモノクローナル抗体を固着し、次いで、界面活性剤の存在下に可溶化したSCM抗原を反応させて、SCM抗原のうち対応する単一抗原を結合分離するものである。この方法により、SCMのうちの単一抗原をプレートのウェルに固着できた。しかし、この方法により抗体価の測定に有用なdose-response curveを描けたのは15種類のモノクローナル抗体のうちの1種類だけであった。

このモノクローナル抗体を用いてのELISAによる抗体価の測定の結果、第2群は有意な抗体価の上昇を認めなかった。第2群ではASO価の上昇もほとんどみられず、抗生剤投与により抗原被曝が軽減されたためと考えられた。一方、過去のかんりの溶連菌感染の存在が考えられた第3群および急性糸球体腎炎の第4群では抗体価が有意に上昇しており、両者の間に有意差がみられなかった。従ってこのモノクローナル抗体に対応するSCM抗原に対する抗体は急性腎炎の発症に特異的ではないと考えられた。これはこの抗原が検討した4種類のT型から得たSCMのすべてに含まれており、催腎炎株に特異的なものでなかったためとも考えられる。

しかしいずれにしてもASO価の上昇をきたす様な溶連菌感染においてはSCM抗原も曝露されていることは事実であり、今回測定できなかったSCMの他の抗原が急性糸球体腎炎の発症に関与している可能性は残されている。

抗SCM抗体価とASO価との間には強い相関はみられず、これは抗原がそれぞれ溶連菌の菌体成分と菌体外産生物質という性格的差異によるところが大きいと考えられる。

5. 結 論

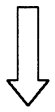
A群溶連菌より分離した細胞膜(SCM)抗原に対してモノクローナル抗体を作成し、これを用いてSCM抗原に対する抗体価をELISAにより測定した。溶連菌感染後急性糸球体腎炎群およびASO価の高い群において抗SCM抗体の上昇を認め、溶連菌感染においてSCM抗原も曝露されていることが証明された。しかし両群で抗体価の有意差を認めず、SCMのうち今回測定した抗原は急性腎炎の発症には関与しないと考えられた。

6. 参考文献

- 1) Treser G., Semar M., Ty A., Sagel I., Franklin M.A. and Lange K.: Partial characterization of antigenic streptococcal plasma membrane components in acute glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 49; 762-768, 1970.
- 2) Stinson M.W. and Bergey E. J.: Isolation of a heart- and kidney-binding protein from group A streptococci. *Infect. Immunity* 35; 335-342, 1982.
- 3) Yoshimoto M., Hosoi S., Fujisawa S., Sudo, M. and Okuda R.: Production of monoclonal antibodies to group A streptococcal cell membrane, in *Recent advances in streptococci and streptococcal diseases*, edited by Kimura Y., Kotani S. and Shiokawa Y., Reedbooks, Berkshire, p. 259-260, 1985.
- 4) Wheeler J., Hoeland J., Terry J.M. and Blainey, J. D.: Production of group C streptococcus phage-associated lysin and the preparation of *Streptococcus pyogenes* protoplast membranes. *J. General Microbiol.* 120; 27-33, 1980.
- 5) Yoshimoto M., Hosoi S., Fujisawa S., Sudo M. and Okuda R.: High levels of antibodies to streptococcal cell membrane antigens specifically bound to monoclonal antibodies in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Clin. Microbiol.*, in press.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



5. 結論

A群溶連菌より分離した細胞膜(SCM)抗原に対してモノクローナル抗体を作成し、これを用いてSCM抗原に対する抗体価をELISAにより測定した。溶連菌感染後急性糸球体腎炎群およびASO価の高い群において抗SCM抗体の上昇を認め、溶連菌感染においてSCM抗原も曝露されていることが証明された。しかし両群で抗体価の有意差を認めず、SCMのうち今回測定した抗原は急性腎炎の発症には関与しないと考えられた。