

図 1 Suppressive effect of Ig preparation on PWM-induced Ig production

ブ～抗イデオタイプ干渉、抗体の Fc リセプターを介した抑制作用等が考えられているがいずれもその詳細は明らかにされていない<sup>1)</sup>。

Griscelli<sup>2)</sup> らはエタノール分画により得られた筋注用  $\gamma$ -グロブリン製剤 (~30% の凝集体含有) を 80 mg/kg, 15 日毎に投与し, 3~4 回の投与後には *in vitro* での PWM による免疫グロブリン産生細胞が IgG, IgA, IgM のいずれにおいても著明に減少する事を見出した。さらに彼らはこの製剤を *in vitro* で 1 mg/ml の濃度で末梢血リンパ球と 48~72 時間培養するとやはり免疫グロブリン産生細胞が著減することを見出し, この抑

制効果が Fc fragment に依存しており, かつ直接的に B 細胞に働く事, サプレッサー T 細胞を活性化することにより出現する可能性も存在することを示唆した。今回, 私達は本邦で使用されている静注用  $\gamma$ -グロブリン製剤を用いて PWM による末梢血リンパ球の Ig 合成に及ぼす *in vitro* での影響を検討したところ, 3 製剤共に添加量に依存して IgG, IgA の合成を抑制する事を見出した。一方 IgM に関しては分析システムの感度が低い点を考慮しなければならないが, 3 製剤において 1 mg/ml の濃度でのみ抑制が認められ, IgG, IgA に比して抑制効果が低い可能性が示唆された。またペプシン処理製剤でも S-スルホ化, PEG 処理製剤と相違が認められず, 少なくともこの結果からは Fc が抑制作用に essential であるとは考え難い。また Griscelli<sup>2)</sup> らは F(ab)'<sub>2</sub> fragment, あるいは凝集体を除いた IgG では抑制効果は認められないとしているが, 私達の使用した製剤には 4~15% の凝集体が含まれているので, これらの凝集体が関与している可能性も考えられた。今後この抑制効果の *in vivo* における意味と, その target cell について検討を加える予定である。

#### 〔文 献〕

- 1) 崎山幸雄:  $\gamma$ -グロブリン, 臨床医 7, 2444, 1981.
- 2) A. Durandy, A. Fisher, C. Griscelli: Dysfunctions of pokeweed mitogen-stimulated T and B lymphocyte responses induced by gammaglobulin therapy. J. Clin. Invest. 67, 867, 1981.

## モノクローナル抗ヒト IgG 抗体の作製とその臨床応用への試み

京都大学小児科 三 河 春 樹  
細 井 進

小児気管支喘息は, 家塵などの吸入性抗原が主要な原因抗原であり, 特異 IgE 抗体を介した即時型アレルギー反応によって発症することが知られている。しかし, 真菌抗原の一部及び食事性抗原の中には, IgG 抗体を介した遅発型アレルギー反応にて喘息を誘発したり難治化を促すことが知られて来た。従って喘息児の病態を理解し日常生活の指導をするためには, 特異 IgE 抗体のみ

ではなく特異 IgG 抗体の測定も重要であると思われる。現在特異 IgG の測定には Protein-A 法と RAST 法が用いられているが, IgE の場合と異なりヒト血清中には非特異 IgG が多量に存在するため信頼性に乏しく広く臨床に応用される段階に到っていない。細胞融合法は特定の抗原に対する親和性の均一な抗体を作製することを可能にし, 融合法により得られたモノクローナル抗体は

表 1

Batch No.	<sup>125</sup> I 標準条件		比放射能 ( $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ )	ゲルクロマト (Sepharose 6B)	
	抗ヒト IgG	Na <sup>125</sup> I		変性蛋白	遊離 <sup>125</sup> I
1	100 $\mu\text{g}$	1 mCi	6.2	0.9%	1.4%
2	20 $\mu\text{g}$	1 mCi	25.5	0.9%	2.4%
3	50 $\mu\text{g}$	1 mCi	12.2		

COUNT %

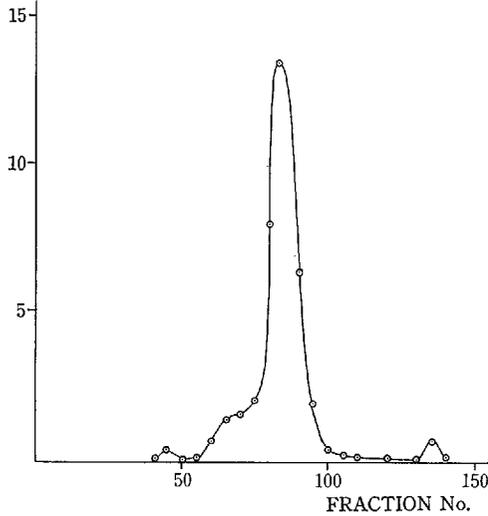


図 1 <sup>125</sup>I 標識モノクローナル抗ヒト IgG 抗体の Sepharose 6B ゲルクロマトグラフィーのパターン

COUNT (B)

B/T (%)

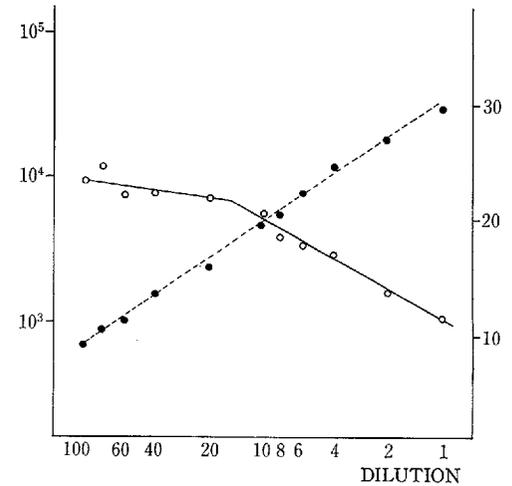


図 2 Reference 血清 A に対する希釈 <sup>125</sup>I 標識モノクローナル抗ヒト IgG 抗体の総カウントと結合カウントの関係

極めて特異性が高く、しかも多量に得られるため二次抗体として用いることにより現在の RAST 法の欠点を解決し得るものと考えられる。我々はヒト IgG に対するモノクローナル抗体を作製し、その結果については昨年度の本研究班の報告書に記している。その後臨床応用への一歩として、特異 IgG RAST 法への応用を試みて来たので報告する。

#### 1) モノクローナル抗ヒト IgG 抗体の作製と <sup>125</sup>I 標識

ヒト IgG 感作マウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞株 NSI 細胞とをポリエチレングリコールを用いて融合し、モノクローナル抗ヒト IgG 抗体を産生する融合細胞株を得た。(55年度報告書参照)。予めプリステンを投与したマウスの腹腔内に融合細胞を注射し約 3 週間後腹水を得た。40%飽和硫酸にて 2 回塩析しセファデックス G25 にて脱塩した後、凍結乾燥した。エンザイモビーズを用いた固相化酵素法にてモノクローナル抗ヒト IgG 抗体

に <sup>125</sup>I を標識した。結果を表 1 に示す。又、バッチ No. 2 のセファロース 6 B ゲルクロマトグラフィーの溶出パターンを図 1 に示す。以上より固相化酵素法はモノクローナル抗ヒト IgG 抗体に <sup>125</sup>I を標識するのに適しており、比放射能を容易に変更し得ることが明らかになった。

#### 2) <sup>125</sup>I 標識モノクローナル抗ヒト IgG 抗体のファデバス IgG RAST 系への適用

現在 IgG RAST 法による特異 IgG 抗体の測定において最も信頼性が高いと言われているファデバス IgG RAST 系を用いて <sup>125</sup>I 標識モノクローナル抗ヒト IgG 抗体の検定を行なった。バッチ No.1 の <sup>125</sup>I 標識抗体を系列希釈し、それぞれ最高濃度の特異 IgG 抗体を含む標準血清 A に反応させ、結合カウントと総カウントとの関係を求めた(図 2)。(●)は結合カウント数を(○)は総カウント数に対する結合カウント数の割合を示している。総カウント数を増加するに従って結合カウントの割

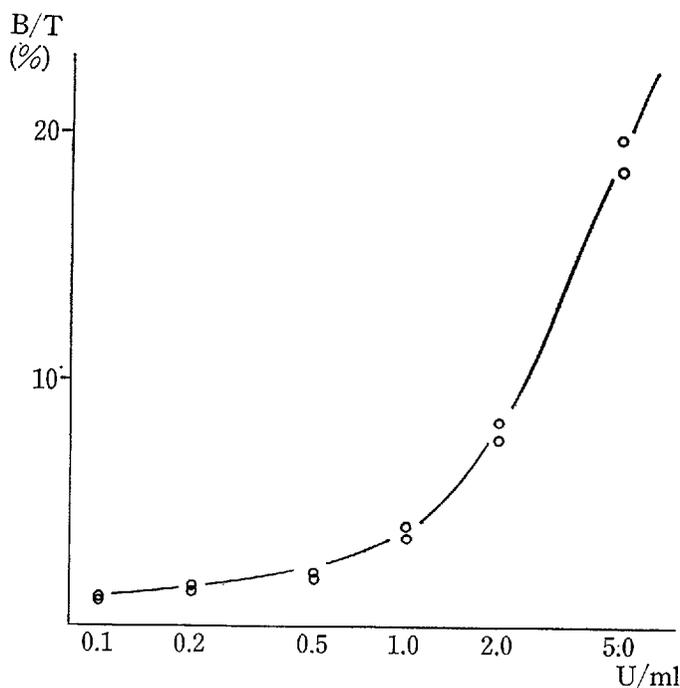


図3  $^{125}\text{I}$  標識モノクローナル抗ヒト IgG 抗体を用いたファデバス IgG RAST の Reference 曲線

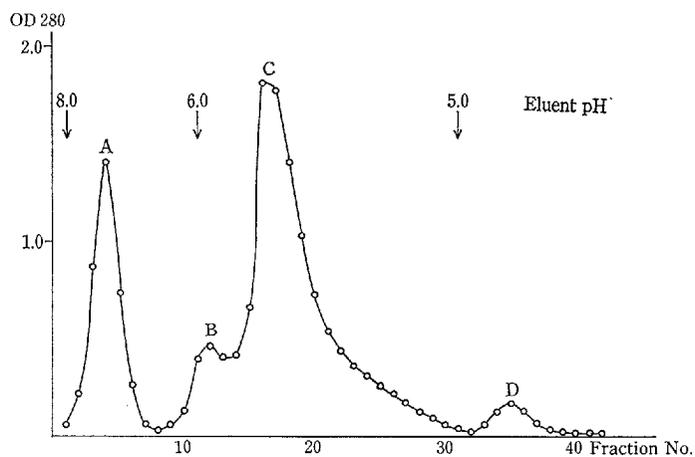


図4 腹水より得られたモノクローナル抗ヒト IgG 抗体の Protein-A Sepharose CL 4 B カラムの溶出パターン

合が減少しこの  $^{125}\text{I}$  標識抗ヒト IgG 抗体は特異性を持つと考えられたが、結合カウントの割合が最高でも30%以下であり、結合カウントが総カウントに殆んど直線的に比例して増加しており問題点を残しているものと考えられた。比較する意味でファデバス IgG RAST に用いられている二次抗体を検定した所、同様の結果が得られ、

この点が現在の特異 IgG RAST 法の問題点であるように考えられた。

次に、 $^{125}\text{I}$  標識モノクローナル抗ヒト IgG 抗体を用い、ファデバス IgG RAST の標準曲線を求めた。図3に示すように結合カウントの割合と特異 IgG 抗体の間には 0.5 U/ml から 5.0 U/ml の間で直線関係を示し

ており、現在の  $^{125}\text{I}$  標識モノクローナル抗ヒト IgG 抗体を用いた場合でも一応特異 IgG の測定が可能であると考えられた。

腹水より得られた抗体の純度を検定するため Protein-A セファロース CL 4 B カラムを用い分画した。結果を図4に示す。各分画を SDS ポリアクリルアミドゲルにて分析した結果、分画Aは抗体を含まない夾雑物であり、分画B, C, D は各々よく精製された IgG であることが分かった。このことより、今回使用した  $^{125}\text{I}$  標識モノクローナル抗ヒト IgG 抗体にて満足のできる結果が

得られなかったのは分画Aに属する夾雑物が混入したためであると考えられた。

以上、我々はモノクローナル抗ヒト IgG 抗体を用いた RAST 法の検定を行ない一定の成果が得られた。今後、精製を十分に行なった抗体を用いることにより、一層改善し得るものと考えられる。同時に、ヒト IgG サブクラスに特異的なモノクローナル抗体を作製することにより、サブクラス別に特異 IgG 抗体測定を試みる予定である。

## IgE soluble immune complex の chemotaxis 抑制効果について

京都大学小児科 伊藤節子  
三河春樹

### 〔はじめに〕

好中球の主な機能である細菌の殺菌作用は、大きく分けると、chemotaxis, phagocytosis, intracellular bacterial killing の三段階より成っており、この各段階における機能異常が、好中球機能不全症として多数報告されている。

好中球は、細菌の殺菌作用以外に、種々の炎症反応に関与しており、この炎症反応においても chemotaxis が最初のステップである。好中球 chemotaxis は、種々の因子、特に immune complex (IC) により影響を受け、炎症反応像の修飾をもたらしている。

好中球と IC との反応は、好中球膜上の免疫グロブリン (Ig) receptor を介しておこっているものと考えられ、好中球上には Ig receptor として IgG receptor と IgA receptor とが存在するが、IgM receptor は存在しない事が従来より知られている。私共も、IgA receptor を介して、IgA IC が好中球 chemotaxis を抑制する事を既に報告してきた<sup>1)</sup>。今回は、好中球膜上には、IgE receptor も存在する事、又、この receptor を介して IgE IC が好中球 chemotaxis を抑制する事を報告したい。

### 〔方法〕

精製 IgE 及び抗体の作製: IgE (K) myeloma 蛋白は、石坂等の方法<sup>2)</sup> によりK型 IgE 血清より分離精製し

た。ヤギの抗 $\kappa$ 鎖抗体の  $\text{F}(\text{ab}')_2$  鎖又は抗 $\kappa$ 鎖抗体の  $\text{F}(\text{ab}')_2$  鎖は、市販の抗血清より免疫吸着反応により分離精製した。

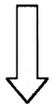
IgE soluble immune complex (SIC) の作製: 上記精製 IgE ( $\kappa$ ) を抗原、市販の抗血清より精製したヤギ抗 $\kappa$ 鎖抗体、及び抗 $\kappa$ 鎖抗体を抗体とし、既に報告した IgG SIC, IgA SIC と同様の方法<sup>1)</sup>で、L鎖及びH鎖を介した抗原過剰又は抗体過剰の4つの形の IgE SIC を作製した。

$\text{O}_2^-$  産生:  $\text{O}_2^-$  生産は、VI型の cytochrome C を用いて、Simchowitz らの方法<sup>3)</sup> により superoxide dismutase inhibitable cytochrome C reduction を測定する事により間接的に測定した。

Chemotaxis: IgE SIC の好中球 chemotaxis に及ぼす影響は、既に報告した方法<sup>1)</sup>で、Boyden chamber を用いて行った。遊走因子としては、endotoxin で活性化した新鮮血清を用いた。

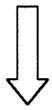
### 〔結果〕

好中球を種々の濃度の IgE ( $0.01\mu\text{g}\sim 10\mu\text{g}/10^6\text{PMN}$ ) で前処理し、洗浄後、精製した抗 $\kappa$ 鎖抗体の  $\text{F}(\text{ab}')_2$  鎖又は抗 $\kappa$ 鎖抗体の  $\text{F}(\text{ab}')_2$  鎖  $10\mu\text{g}$  で刺激し、 $\text{O}_2^-$  産生をみたのが図1である。H鎖に対する抗体で刺激しても、L鎖に対する抗体で刺激しても、IgE の濃度に比例



## 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



小児気管支喘息は、家塵などの吸入性抗原が主要な原因抗原であり、特異 IgE 抗体を介した即時型アレルギー反応によって発症することが知られている。しかし、真菌抗原の一部及び食事性抗原の中には、IgG 抗体を介した遅発型アレルギー反応にて喘息を誘発したり難治化を促すことが知られて来た。従って喘息児の病態を理解し日常生活の指導をするためには、特異 IgE 抗体のみではなく特異 IgG 抗体の測定も重要であると思われる。現在特異 IgG の測定には Protein-A 法と RAST 法が用いられているが、IgE の場合と異なりヒト血清中には非特異 IgG が多量に存在するため信頼性に乏しく広く臨床に応用される段階に到っていない。細胞融合法は特定の抗原に対する親和性の均一な抗体を作製することを可能にし、融合法により得られたモノクローナル抗体は極めて特異性が高く、しかも多量に得られるため二次抗体として用いることにより現在の RAST 法の欠点を解決し得るものと考えられる。我々はヒト IgG に対するモノクローナル抗体を作製し、その結果については昨年度の本研究班の報告書に記している。その後臨床応用への一步として、特異 IgGRAST 法への応用を試みて来たので報告する。