

急性糸球体腎炎における溶連菌細胞膜抗原の関与について

藤沢 晨一、吉本 政弘

福井医科大学 小児科

序言：

溶連菌感染後急性糸球体腎炎(以下APSGN)の起因抗原として溶連菌細胞膜(以下SCM)抗原をはじめとするいくつかの溶連菌関連抗原が報告されており^{1, 2}、我々もELISAによってAPSGN患者血清中にSCM抗原に対する抗体価の有意の上昇を証明し既に報告している^{3, 4}。またIgA腎症においてもASO値の上昇を認めるなど溶連菌感染の関与が考えられる症例がかなり存在する。これら腎炎に関与する溶連菌関連抗原を明らかにするため、今回SCMに対するモノクローナル抗体の作成を試みた。

方法：

1) SCMの作成

図1に作成法の概略を示す。Wheelerら

図1 SCMの作成法

culture GAS, type 12, in 150 ml THB at 37°C overnight
↓
add to 5000 ml THB and culture until $A_{650} = 0.4$
↓
centrifuge and suspend GAS in 500 ml PBS
↓
mix with 1046 ml PAL and 30% NaCl in 454 ml PB and incubate for 45 min
↓
centrifuge and wash in PB with 7% NaCl
↓
suspend in hypotonic PB with DNAase and RNAase and incubate for 30 min
↓
centrifuge, wash and lyophilize

の方法⁵に準じてAPSGN患者より分離したA群溶連菌 phage associated lysin を作用させ、細胞壁を除去して作成した。得られたSCMのラムノーズ濃度は0.5%以下であり、細胞壁成分の混入は問題にならなかった。

2) モノクローナル抗体の作成

超音波処理により可溶化したSCM抗原200 μ gをマウス腹腔内に2週間の間隔で2回注入して感作して得た脾細胞とNS-1ミエローマ細胞を50%ポリエチレングリコール存在下で融合し、HAT培地で選択培養した。

生じたハイブリドーマのコロニーのうち、SCM抗原に対する抗体産生能を有するものをELISAにより選別し、これを限界希釈法により2度クローニングした。このように単クローン化されたハイブリドーマの培養上清中のIgのクラスおよびサブクラスをOuchterlony法で同定し、IgGクラスのモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを継代培養した。

培養したハイブリドーマをpristaneで前処置したマウスの腹腔内に 10^7 個注入し、約2週後生じた腹水を採取し、硫酸分画後Protein A Sepharose CL-4Bを用いたアフィニティークロマトグラフィーによりモノクローナル抗体を精製した。

3) モノクローナル抗体に対応するSCM抗原の同定法

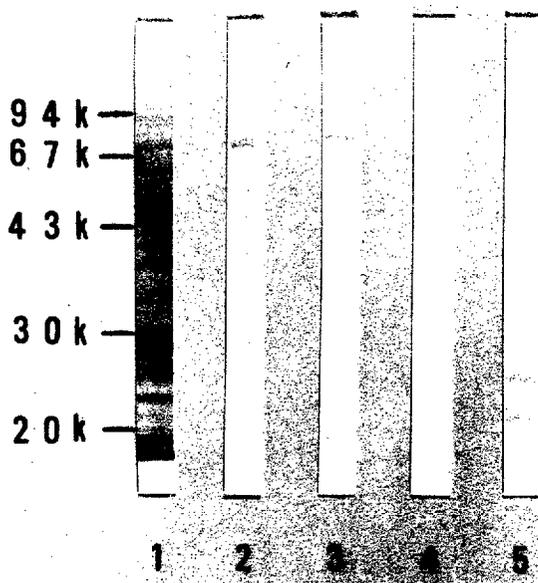
SCM抗原を10%アクリルアミドゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、分子量に応じて分離し、Western blotting法⁶によりnitrocellulose膜に転写した。これにモノクローナル抗体を反

応させ、さらにペロキシダーゼ標識抗マウス IgG、基質として4-Chloro-1-naphthol を反応させて対応抗原を同定した。

結果：

IgGクラスのモノクローナル抗体は15種類得られた。そのサブクラスはIgG₁が8、IgG_{2a}が3、IgG_{2b}が4であった。このうち9種類はWestern blotting法により、対応するSCM抗原が図2の如く同定された。lane 1はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分画されたSCM抗原の0.1%アミノブラック10Bによる染色像である。lane 2の位置に泳動された抗原に対応するモノクローナル抗体が3種類、lane 3が3種類、lane 4が2種類、lane 5が1種類であった。

図2 Western blotting



考察：

SCM抗原に対するモノクローナル抗体が15種類作成できたが、このうちWestern blotting法により対応抗原を同定できた

ものは9種類であり、残り6種類はnitro-cellulose上のSCM抗原には結合しなかった。この原因としてこれら6種類のモノクローナル抗体が多糖類に対応する可能性あるいはSDSによりサブユニット化されると消失する抗原に対応することが考えられた。

モノクローナル抗体は抗原決定基の分析あるいは抗原の分離に有用であり、溶連菌関連抗原のうち急性糸球体腎炎などの発症に関与し、あるいは臨床経過ないし診断の指標となりうる抗原の解明には欠かせないものと考えられる。今後これらのモノクローナル抗体や手段を用いて研究を進める予定である。

結論：

SCM抗原に対するモノクローナル抗体を15種類作成し、これらのうち9種類はWestern blotting法により4種類のSCM抗原に対応するものと同定できた。

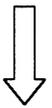
参考文献：

1) Treser G., Semar M., Ty A., Sagel I., Franklin 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. Immun.* 35; 335-342, 1982.
- 3) Okuhara K., Yoshimoto M., Fujisawa S., Watanabe Y. and Okuda R.: Anti-streptococcal cell membrane and anti-human glomerular basement membrane titers in sera of patients with poststreptococcal acute glomerulonephritis and anaphylactoid purpura. *Jpn. Circ. J.* 47; 1293-1297, 1983
- 4) Fujisawa S., Yoshimoto M., Sudo M. and Okuda R.: Anti-streptococcal cell membrane titers in sera of patients with streptococcal infections and their sequelae, in *Recent Advances in Streptococci and Streptococcal Diseases*, edited by Kimura Y., Kotani S. and Shiokawa Y., Reedbooks, p340-341, 1985.
- 5) Wheeler J., Holland 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. Gen. Microbiol.* 120; 27-33, 1980.
- 6) Towbin H., Staehelin T. and Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76; 4350-4354, 1979.



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



結論:

SCM 抗原に対するモノクローナル抗体を 15 種類作成し,これらのうち 9 種類は Western blotting 法により 4 種類の SCM 抗原に対応するものと同定できた。