6種類のウシ蛋白質に対する抗体産生に及ぼす ウズラの系統間差

大谷 元・松本克之・水谷 誠*

信州大学農学部, 長野県南箕輪村 399-45

* 日本生物科学研究所, 山梨県小淵沢町 408

(1993. 1. 18 受付)

要 約 分子量の異なる6種類のウシ蛋白質に対する7系統のウズラの抗体の生産性を調べ、各蛋白質に対する抗体産生の系統間の比較と、各系統内での6種類のウシ蛋白質の抗原としての強さの比較を行なった。7日間隔で6回免疫後のIgG, α_{s1} -カゼイン, β -ラクトグロブリンおよび α -ラクトアルブミンの4種類の蛋白質に対する抗体産生はPNNが他の6系統よりも、また、血清アルブミンに対する抗体産生はPNNがTKPH以外の他の5系統よりも統計的に有意に高かった($P < 0.05$)。しかし、インスリンに対してはPSNがSBPN以外の他の5系統より統計的に有意に高い($P < 0.05$)抗体産生を示した。一方、各系統のウズラにおける6種類のウシ蛋白質の抗原としての強さの比較では、TKPHとRWLfの2系統ではIgGが他の蛋白質よりも統計的に有意に高い抗体産生を示し($P < 0.05$)、PNN, AMRPおよびSBPNもIgGに対して高い抗体産生を示す傾向が見られた。しかし、PSNとTKPLでは抗原の違いにより産生される抗体量の統計的有意差はほとんど見られなかった。また、SBPNにおいて標準偏差が大きいために統計的有意差は見られなかったが、抗体価の平均値ではインスリンに対する値が α -ラクトアルブミン, β -ラクトグロブリンおよび血清アルブミンのそれらよりも明らかに高く、TKPHとAMRPではインスリンに対する抗体はほとんど産生されなかった。これらの結果より、分子量の異なるウシ蛋白質に対するウズラの抗体産生能はウズラの系統により異なることや、インスリンのような低分子量蛋白質に対しては抗体を産生する系統と抗体をほとんど産生しない系統が存在することが明らかになった。

日畜会報, 64 (8) : 847-854, 1993

体液性免疫の中心をなす免疫グロブリンは、感染症の予防や治療のための免疫グロブリン製剤としてはもとより、抗原抗体反応の高い特異性から研究や診断用の試薬としても広く用いられている。

従来、試薬として用いられる免疫グロブリンは、実験動物や家畜の血清から分離したポリクローナル抗体や、ラットやマウスの細胞培養により作製したモノクローナル抗体であるが、それらの抗体の作製に際しては、動物に苦痛を与えることはもとより、一匹の動物から得られる抗体量が少ないことや、高額な設備や試薬が必要であったり、動物の死体処理が環境問題を引き起こしたりしている。そのために、血清抗体やモノクローナル抗体に代る抗体の生産が望まれるところである。

鳥類では母鳥の血液中の抗体が卵に移行することは古

くから知られていたが⁹⁾、この卵を抗体の分離源として利用すれば上述した問題が解消できることが考えられ、近年、ニワトリの免疫機構を利用した抗体の生産とその利用に関する研究が活発化している。

一般に、抗原刺激により生産される抗体量は抗原の分子量や宿主の種類により異なることは哺乳動物ではよく知られたところであるが、POLSON *et al.*¹⁰⁾は、白色レグホーン種や白色レグホーンとロードアイランドレッドの交雑種は分子量30,000以下の蛋白質に対する免疫応答が弱いことを報告している。また、OTANI *et al.*⁷⁾は分子量23,500の α_{s1} -カゼインに対する抗体生産をウサギ(日本白色種)とニワトリ(白色レグホーン種)で比較し、ニワトリの抗体産生はウサギと比べて低く、ニワトリで抗体価を上げるためには長期間免疫を繰り返す必

要があることを示している。これらの報告から、低分子量蛋白質に対する抗体の生産はニワトリを初めとした鳥類では不都合であることが示唆される。しかし、ニワトリ以外の鳥類で同じ蛋白質に対して系統差の違いが免疫応答に与える影響を調べた報告はほとんどなされておらず、ニワトリ以外の鳥類では低分子量蛋白質に対して高い免疫応答を示す系統が存在する可能性も考えられる。

そこで本論文では、ニワトリと同様に卵の生産に広く利用されているウズラの卵黄抗体を利用する目的から、7系統のウズラについて分子量の異なる6種類のウシ由来の蛋白質に対する抗体の生産性を調べた。なお、卵黄における抗体の存在は血液と比べて約一週間ほど遅れるが、卵黄中と血液中の抗体価はほぼ同じであることが示されていることから^{3,7)}、本研究で用いた各蛋白質に対する抗体価は血清抗体価を測定することにより判定した。

材料および方法

1. 材 料

7系統の日本ウズラ、すなわち PNN, PSN, TKPH, TKPL, AMRP, SBPN および RWLf は、(財)日本生物科学研究所より得た。ウシ α_{s1} -カゼイン (分子量 2.35 万) およびウシ β -ラクトグロブリン (同 1.8 万) は既報^{4,5)} に準じて調製した。ウシ IgG (同 16 万) は KANAMARU *et al.* の方法¹⁾ に準じてウシ初乳より調製した。ウシ α -ラクトアルブミン (同 1.4 万)、ウシ血清アルブミン (同 6.7 万) およびウシインスリン (同 0.6 万) は Sigma 社 (U.S.A.) より購入した。

2. 抗体産生試験

IgG, 血清アルブミン, α_{s1} -カゼイン, β -ラクトグロブリン, α -ラクトアルブミンおよびインスリンを各 1% 量 (w/v) 含む滅菌 PBS (0.15 M NaCl を含む 0.01 M 磷酸緩衝液, pH 7.2) 溶液に同容量の Freund 完全アジュバント (ナカライテスク, 京都) を加えてエマルジョンにしてウズラの左右両深胸筋に各 0.1 ml ずつ注射した。注射は 7 日間隔で 6 回行ない、注射の前日に部分採血し、抗体価の測定に供した。なお、免疫に用いた各系統のウズラの数 6~18 羽であり、得られた抗体価は平均値 $\pm$ 標準偏差として表し、*t* 検定分析に供して統計的有意差の有無 ($P < 0.05$) を求めた。

3. 抗体価の測定

抗体価は酵素免疫測定法 (ELISA) により求めた。なお、ウズラ卵黄抗体は抗ニワトリ IgG 抗体と反応することから⁸⁾、二次抗体にはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ニワトリ IgG 抗体 (Benthyll 社, U.S.A.) を用いた。すなわち、96 穴マイクロプレート (Nunc 社, デ

ンマーク) の各ウェルに 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) に溶解した蛋白質溶液 (IgG, 血清アルブミン, α_{s1} -カゼイン, β -ラクトグロブリン, α -ラクトアルブミンあるいはインスリンのいずれかを溶解, 100 μ g/ml) 300 μ l を入れて 4°C で一夜放置した。PBS-Tween (0.05 % Tween 20 を含む PBS) で 5 回洗浄後、0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) に溶解した 0.2 % ニワトリ卵白アルブミン溶液 (Sigma 社, U.S.A.) 300 μ l を加えて 25°C で 2 時間放置した。次いで、PBS-Tween で 5 回洗浄後、2 % ポリビニルピロリドンを含む PBS-Tween で 1000 倍希釈したウズラ血清 100 μ l を加えて 25°C で 90 分間反応させた。反応後、PBS-Tween で 5 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ニワトリ IgG 抗体 100 μ l を加えてさらに 90 分間反応させた。次いで、PBS-Tween で 5 回洗浄し、基質溶液 (0.4 % o-フェニレンジアミンと 0.003 % 過酸化水素を含む 0.1 M クエン酸緩衝液, pH 5.0) を加えて暗所、25°C で 15 分間反応させた。4 N H_2SO_4 25 μ l を加えることにより反応を停止させ、直ちにプレートリーダー (三光純薬, 東京) により 490 nm の波長で吸光度を測定した。得られた吸光度 (ELISA 値) を抗体価として表示した。

結果および考察

免疫前、免疫開始後 14 日目、28 日目および 42 日目のウズラ血清中のウシ IgG に対する抗体価を測定した結果を図 1 に示した。図 1 より、免疫開始後 14 日目で既に、AMRP と SBPN 以外の 5 系統のウズラで高い抗体価が見られ、同一系統内においても個体差があるものの 42 日目にはすべての系統で顕著な抗体産生が見られる。そこで、42 日目の抗体価の平均値と標準偏差を算出し、血清アルブミン, α_{s1} -カゼイン, β -ラクトグロブリン, α -ラクトアルブミンおよびインスリンに対する 42 日目の抗体価について同様に求めた結果と合わせて表 1 に示した。また、それら抗体価を *t* 検定分析に供して、各蛋白質に対する抗体生産の系統間比較を行った結果を表 2 に、各系統内での抗体生産における 6 種類の蛋白質の抗原としての強さの比較を行なった結果を表 3 に示した。まず、表 1 と表 2 に示した系統間の比較を行なった結果より、血清アルブミンとインスリン以外の 4 種類の蛋白質に対しては PNN が他の系統よりも統計的に有意に高い ($P < 0.05$) 抗体産生を示し、血清アルブミンに対しても PNN は TKPH 以外の 5 系統よりも統計的に有意に高いことがわかる。しかし、インスリンに対しては PSN と SBPN が他の系統よりも明らかに高い抗体産生を示し、特に PSN は SBPN 以

ウズラ抗体産生

Fig. 1. Changes of antibody titers specific to IgG in 7 lines of Japanese quails.
●: PNN, ○: PSN, ■: TKPH, □: TKPL, ▲: AMRP, △: SBPN, ◇: RWLf.

Table 1. Antibody titers of 7 lines of Japanese quails immunized with 6 kinds of bovine proteins

Line	n	Antibody titer (ELISA value, mean±S.D.) against					
		IgG	BSA	α_{s1} -CN	β -Lg	α -La	Insulin
PNN	8	1.79±0.17	1.30±0.67	1.54±0.43	1.09±0.49	1.09±0.57	0.05±0.05
PSN	8	0.90±0.77	0.53±0.74	0.61±0.28	0.38±0.32	0.27±0.18	0.35±0.31
TKPH	13	1.41±0.54	0.63±0.75	0.46±0.44	0.18±0.40	0.23±0.42	0.01±0.01
TKPL	6	0.88±0.77	0.24±0.40	0.26±0.37	0.27±0.26	0.10±0.07	0.04±0.03
AMRP	10	0.61±0.48	0.25±0.34	0.10±0.06	0.12±0.15	0.28±0.31	0.02±0.01
SBPN	8	0.56±0.43	0.17±0.23	0.41±0.35	0.07±0.04	0.04±0.03	0.32±0.41
RWLf	18	0.93±0.58	0.35±0.57	0.13±0.12	0.06±0.04	0.06±0.05	0.06±0.14

BSA: Serum albumin, α_{s1} -CN: α_{s1} -Casein, β -Lg: β -Lactoglobulin, α -La: α -Lactalbumin.

外の5系統と比べて統計的に有意差 ($P<0.05$) がある。また、TKPH や AMRP ではインスリンに対する抗体の産生はほとんど見られない。さらに、ウサギでは主として一次構造上不連続なエピトープを認識させることが知られている β -ラクトグロブリンと α -ラクトアルブミン⁶⁾ について見ると、 β -ラクトグロブリンに対する抗体産生の7系統の応答性は α -ラクトアルブミンに対するそれと類似していることがわかる。同様に、表1と表3に示した各系統内での6種類のウシ蛋白質の抗原としての強さの比較を行った結果より、TKPH と RWLf の2系統では IgG が他の蛋白質よりも統計的に有意に高い抗体産生を示し ($P<0.05$)、PNN、AMRP および SBPN の3系統も IgG に対して高い抗体産生を示

す傾向が見られる。しかし、PSN や TKPL では抗原の違いによる統計的有意差はほとんど見られない。また、SBPN において、標準偏差が大きいために統計的有意差は見られないが、血清アルブミンに対する抗体価の平均値よりも α_{s1} -カゼインやインスリンに対する平均値の方が高いことがわかる。すなわち、これらの結果より、同じ動物起源の蛋白質に対しても分子量の大きさだけがウズラにおける抗体産生を左右するのではなく、ウズラの系統により左右されることや個体差が大きいことが明らかである。

本実験に用いた7系統のウズラの系統的關係を図2に示した。図2より、同じ系統樹内に属する PNN、PSN、AMRP、SBPN および RWLf の5系統は、CE のみ

Table 2. Comparison of immune responses among 7 lines of Japanese quails against 6 kinds of bovine proteins

	PNN	TKPH	RWlf	PSN	TKPL	AMRP	SBPN
IgG							
PNN	*	>	>	>	>	>	>
TKPH		*	—	—	—	>	>
RWlf			*	—	—	—	—
PSN				*	—	—	—
TKPL					*	—	—
AMRP						*	—
SBPN							*
BSA							
PNN	*	—	>	>	>	>	>
TKPH		*	—	—	—	—	—
RWlf			*	—	—	—	—
PSN				*	—	—	—
TKPL					*	—	—
AMRP						*	—
SBPN							*
α s ₁ -CN							
PNN	*	>	>	>	>	>	>
TKPH		*	>	—	—	>	—
RWlf			*	<	—	—	—
PSN			>	*	—	>	>
TKPL					*	—	—
AMRP						*	<
SBPN						>	*
β -Lg							
PNN	*	>	>	>	>	>	>
TKPH		*	—	—	—	—	—
RWlf			*	<	—	—	—
PSN			>	*	—	>	>
TKPL					*	—	—
AMRP						*	—
SBPN							*
α -La							
PNN	*	>	>	>	>	>	>
TKPH		*	—	—	—	—	—
RWlf			*	<	—	—	—
PSN			>	*	>	—	>
TKPL					*	—	—
AMRP						*	—
SBPN							*
Insulin							
PNN	*	—	—	<	—	—	—
TKPH		*	—	<	—	—	—
RWlf			*	<	—	—	—
PSN	>	>	>	*	>	>	—
TKPL					*	—	—
AMRP						*	—
SBPN							*

BSA : Serum albumin, α s₁-CN : α s₁-Casein, β -Lg : β -Lactoglobulin, α -La : α -Lactalbumin.

>, < : Significant difference (P<0.05), — : Not significant.

ウズラ抗体産生

Table 3. Comparison of immunogenicities of 6 kinds of bovine proteins in 7 lines of Japanese quails

	IgG	BSA	α s ₁ -CN	β -Lg	α -La	Insulin
PNN						
IgG	*	—	—	>	>	>
BSA		*	—	—	—	>
α s ₁ -CN			*	—	—	>
β -Lg				*	—	>
α -La					*	>
Insulin						*
TKPH						
IgG	*	>	>	>	>	>
BSA		*	—	—	—	>
α s ₁ -CN			*	—	—	>
β -Lg				*	—	>
α -La					*	>
Insulin						*
RWLf						
IgG	*	>	>	>	>	>
BSA		*	—	>	>	—
α s ₁ -CN			*	>	>	—
β -Lg				*	—	—
α -La					*	—
Insulin						*
PSN						
IgG	*	—	—	—	—	—
BSA		*	—	—	—	—
α s ₁ -CN			*	—	>	—
β -Lg				*	—	—
α -La					*	—
Insulin						*
TKPL						
IgG	*	—	—	—	—	>
BSA		*	—	—	—	—
α s ₁ -CN			*	—	—	—
β -Lg				*	—	—
α -La					*	—
Insulin						*
AMRP						
IgG	*	—	>	>	—	>
BSA		*	—	—	—	—
α s ₁ -CN			*	—	—	>
β -Lg				*	—	—
α -La					*	>
Insulin						*
SBPN						
IgG	*	>	—	>	>	—
BSA		*	—	—	—	—
α s ₁ -CN			*	>	>	—
β -Lg				*	—	—
α -La					*	—
Insulin						*

BSA : Serum albumin, α s₁-CN : α s₁-Casein, β -Lg : β -Lactoglobulin, α -La : α -Lactalbumin,

> : Significant difference (P<0.05), — : Not significant.

Fig. 2. Phylogenetic relationship of 7 lines of Japanese quails.

を起源とする PNN と RWLf, CE と P の 2 つを起源とする AMRP と SBPN, 並びに CE, P, Dilution の 3 つを起源とする PSN に大別される。上述したように、他の 4 系統には含まれていない Dilution の形質を有する PSN はそれら 5 系統の中では抗原の種類による影響を最も受けなかった系統である。また、P の形質を有しているのは PSN, SBPN および AMRP の 3 系統であるが、これらのうち PSN と SBPN にはインスリンに対して他の系統と比べて極めて高い抗体産生を示す個体が存在した。これらのことから、Dilution や P の形質と免疫応答の間には何らかの関係があることが示唆され、これらの形質を導入したウズラの免疫応答についてさらに検討することが望まれる。一方、TKPH と TKPL は同じ祖先を持つがニワトリ赤血球に対する免疫応答性の違いから選抜された系統であり、TKPH はニワトリ赤血球に対して高い抗体産生能を有する系統であり、TKPL はニワトリ赤血球に対して低い抗体産生能を示す系統である。本実験で用いた 6 種類のウシ蛋白質のいずれの蛋白質に対しても TKPH と TKPL の間に統計的有意差は見られなかった。このことより、ニワトリ赤血球に対するウズラの免疫応答性は種々の蛋白質に対する免疫応答性を知るための指標にはならないものと思われる。なお、SBPN と AMRP は同じ起源であるにもかかわらず、必ずしも同じ傾向の免疫応答性を示さなかったのは、系統選抜に用いた選抜基準（各ウズラの赤血球の種々のレクチンに対する反応性から選抜している）により免疫応答性に変化が生じたためと考えられる。また、本実験に使用したウズラでは全般的に標準偏差が大きく、個体差が大きいたことが示されたが、その原因の一つにはクローズドコロニーが十分に確立されていないことが関係しているものと思われる。

以上の通り本論文では、ウシ由来の分子量の異なる 6 種類の蛋白質に対する 7 系統のウズラの抗体産生能を比

較し、ウズラの系統によってはインスリンのような低分子量蛋白質に対しても抗体産生を示す系統が存在することを明らかにした。合わせて、同じ系統のウズラでも個体差が大きいたことを示した。LEE *et al.*²⁾ は、ニワトリで抗インスリン抗体を作製する場合、2 量体のインスリンを用いることでインスリンのような低分子量蛋白質に対しても抗体産生を高めることが可能であることを報告している。本実験結果は、インスリンのような低分子量蛋白質に対する抗体価を高める手法として、目的とする抗原に対する系統選抜や個体選抜も重要な因子であることを明らかにしたものである。

なお、本実験では個体差による影響を出来るだけ排除する目的から 6 種類の抗原の混合液を免疫したが、混合液中で抗原蛋白質同士の相互作用により免疫原性が修飾された可能性もあり、さらに、各単独抗原溶液を用いた同様の実験も望まれる。

謝 辞

本研究を行うのに際して、研究費の一部をご援助頂いた(財)長野県テクノハイランド開発機構および(財)浅間テクノポリス開発機構に対して深く感謝致します。

文 献

- 1) KANAMARU, Y., R. NIKI and S. ARIMA, Susceptibility of bovine colostral immunoglobulin G (IgG) subclasses to digestive enzymes and reducing agents. *Agric. Biol. Chem.*, **41**: 1203-1210. 1977.
- 2) LEE, K., A. AMETANI, M. SHIMIZU, H. HATTA, T. YAMAMOTO and S. KAMINOGAWA, Production and characterization of anti-human insulin antibodies in hen's egg. *Agric. Biol. Chem.*, **55**: 2141-2143. 1991.
- 3) LOSCH, U., I. SCHRANNER, R. WANKE and L. JURGENS, The chicken egg, an antibody source. *J. Vet. Med. B*, **33**: 609-619. 1986.
- 4) OTANI, H., T. UCHIO and F. TOKITA, Antigenic reactivities of chemically modified β -lactoglobulins with antiserum to bovine β -lactoglobulin. *Agric. Biol. Chem.*, **49**: 2531-2536. 1985.
- 5) OTANI, H., F. TAKAHASHI and F. TOKITA, Antigenic reactivities of fragments obtained by cyanogen bromide cleavage of bovine α_{s1} -casein toward antiserum to intact α_{s1} -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **50**: 607-613. 1986.
- 6) 大谷 元, 牛乳蛋白質の抗原決定部位. *日畜会報*, **58**: 907-918. 1987.

- 7) OTANI, H., K. MATSUMOTO, A. SAEKI and A. HOSONO, Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **24**: 152-158. 1991.
- 8) OTANI, H., K. MATSUMOTO and M. HIRAO, Antigenic reactivity of the egg yolk antibody in Japanese quail towards the anti-chicken IgG antibody. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, **64**: 28-31. 1993.
- 9) PATTERSON, R., J.S. YOUNGNER, W.O. WEIGLE and F.J. DIXON, Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.*, **89**: 272-278. 1962.
- 10) POLSON, A., M.B. VON WECHMAR and G. FAZAKERLEY, Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. *Immunol. Commun.*, **9**: 495-514. 1980.
- 11) YOLKEN, R.H., F. LEISTER, S.-B. WEE, R. MISKUFF and S. VONDERFECHT, Antibodies to rotaviruses in chickens' eggs: a potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption. *Pediatrics*, **81**: 291-295. 1988.

Immune Responses to Several Bovine Proteins in 7 Lines of Japanese Quails

Hajime OTANI, Katsuyuki MATSUMOTO
and Makoto MIZUTANI*

Faculty of Agriculture, Shinshu University,
Minamiminowa-mura, Nagano-ken 399-45

* Nippon Institute for Biological Science,
Kobuchizawa-machi, Yamanashi-ken 408

Seven lines of Japanese quails were compared for immune responses to bovine proteins. A protein mixture consisting of 6 bovine proteins, having a molecular weight ranging from 6,000 to 160,000, was injected 6 times at intervals of 7 days. Antibody titer to each protein on the 7th day after the final immunization was used as the criterion of immune response for each line. Out of 7 lines (PNN, PSN, TKPH, TKPL, AMRP, SBPN and RWLf), the PNN line showed the highest immune responses to IgG (m.w. 160,000), serum albumin (m.w. 67,000), α_1 -casein (m.w. 23,500), β -lactoglobulin (m.w. 18,000) and α -lactalbumin (m.w. 14,000), while the PSN line represented a significantly higher immune response to insulin (m.w. 6,000) than the other lines ($P < 0.05$). On the other hand, out of the 6 proteins, IgG was a significantly stronger immunogen than the other proteins in 2 lines (TKPH and RWLf), whereas lines PSN and TKPL showed few significant differences in immune responses toward the 6 proteins. Moreover, the SBPN line represented a higher antibody titer toward insulin than toward serum albumin, β -lactoglobulin, and α -lactalbumin, and lines TKPH and AMRP produced few antibodies toward insulin. These results indicate that the immune response to protein antigens in Japanese quails depends on lines, and that some lines produce significant antibodies toward proteins having low molecular weight such as insulin, whereas the other lines showed little response.

Anim. Sci. Technol. (Jpn.) 64 (8) : 847-854, 1993

Key words : immune response, Japanese quail, bovine proteins, insulin, milk proteins