抗毛髪ケラチン抗体の作製とその特性： 牛初乳ならびに常乳の利用

海老名卓三郎・太田 実*・打和秀世**・村上梅司**

宮城県立がんセンター研究所，名取市 981-12

* 東北大学農学部附属農場，宮城県鳴子町 989-67

** 鐘紡(株)生化学研究所，小田原市 250

(1993. 7. 5 受付)

要 約 皮膚ケラチンとは反応せず，毛髪に特異的に結合し，毛髪の破断強度を上げる抗毛髪ケラチン抗体を含む初乳ならびに常乳を免疫牛に産生させた。人毛髪ケラチン 50 mg を出産 60 日前のホルスタイン牛に筋肉内に注射し，(2~3) 週間後に同抗原を乳房内または乳房リンパ節附近に投与すると，血中抗体価ならびに初乳中の毛髪ケラチンに対する抗体価は 10^5 に上昇した。この時，免疫牛一頭の初乳中に (1~1.5) kg の IgG を産生することが出来た。さらにこれらの免疫牛に分娩 2~3 カ月後ケラチンを 50 mg ずつ筋肉注射し，4 週おきに同抗原を筋肉内注射又は腹腔内注射を 3 回行なったところ，常乳中に初乳と同等の比活性を持った抗体が出来ることを見出した。常乳では 300 日間搾乳することができ，全体では (4~5) kg の IgG を得ることができる。これより，初乳に加えて常乳を抗体生産に利用することが可能となった。

日畜会報，65 (6) : 580-590, 1994

われわれは先の報告⁽⁶⁾で，毛髪ケラチンに対する抗体が皮膚ケラチンに結合せず，毛髪に抗原・抗体反応で結合すること，そしてこの結合によって毛髪損傷の改善が期待できることを報告した。しかしながら使用した抗体はウサギ血清由来であり，これから得られる抗体の量は少なく，抗体の生産コストが高つくため，毛髪分野への実用化は困難であった。

抗体の大量生産方法については，牛初乳⁵⁻⁷⁾，牛常乳，および鶏卵黄⁸⁾を利用する方法が考えられる。中でも EBINA らが報告している牛初乳由来抗体を利用したロタウイルス下痢症の予防，ならびに治療法の発見^{5,7,9)}と実用的応用¹⁰⁾はその可能性を示している。

従来牛の初乳は常乳と成分が異なるため，子牛に与え残りは利用されず捨てられていた。ところが初乳中には IgG, IgA, IgM が常乳に比して数 10 倍から 100 倍以上多く含まれ，特に IgA は蛋白分解酵素に抵抗性で，ウイルスに対する中和抗体価の比活性も高いことが分かった^{5,6)}。そこで今まで捨てられていた初乳を利用すべく，われわれは妊娠 8 カ月のホルスタイン乳牛に麻疹ウイルス⁶⁾やヒトロタウイルス^{7,10)}を免疫し，この初乳の抗ウ

イルス活性を証明してきた。これらのことは，牛初乳を抗体大量生産に利用することの価値が高いことを示している。

本報では，抗毛髪抗体の大量生産法として牛初乳ならびに常乳の利用に注目し，詳細な免疫条件および得られた抗体の毛髪に及ぼす効果を検討した。その結果，牛初乳ならびに常乳から得られた抗体は，ウサギ血清由来抗体⁽⁶⁾と同様の損傷毛髪の強度低下を修復する特性を持ち，且つ大量に生産できることを見出したので報告する。

材料および方法

1. 抗原

抗原の調製は，BADEN ら¹⁾の方法に準じて行なった。日本人毛髪 20 g を 5 l 8 M 尿素および 0.2 M β -メルカプトエタノールを含む 0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.2) で，窒素気流下 50°C，1 時間抽出後に摩砕した。遠心後上清を集め，遮光下で 400 g のモノヨード酢酸 (pH 8.0) を加え，1.5 時間室温で穏やかに攪拌した。反応は β -メルカプトエタノールを添加して停止した。水で透析後，

1/4 容量の 1 M KCl を含む 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 4.1) を添加し、等電点沈澱する区分を集めた。これを生理食塩水に溶解後、 $0.2\mu\text{m}$ 孔の膜を用いて濾過し、限外濾過濃縮して抗原溶液 200 ml (20 mg/ml) を得た。

2. 免疫方法

常法に従い、2 本の注射筒を用いて抗原溶液と完全フロイントアジュバント (FCA) または不完全フロイントアジュバント (FIA) (以上 Difco laboratories 社、シシガン) を混和し、油中水 (W/O) 型の乳化物とした。投与抗原量は、牛 1 頭当たり皮下注射の場合 (10~200) mg/回、筋肉内注射の場合 (10~50) mg/回、乳腺内、リンパ節内、腹腔内接種の場合 50 mg/回とした。

3. 乳牛

妊娠ホルスタイン牛 17 頭、年齢は (3~7) 年、体重 (530~690) kg を用いた。このうち牛 No. 605, 624, 575, 598 は 2 年にわたり免疫した。牛 No. 500 は分娩後 3 日目にリンパ節内に追加免疫した。

供試牛は、毎月 1 回体重を測定し、健康状態を観察した。また、分娩後は毎月搾乳量を計量した。

4. 抗体価測定

血清中及び乳中の抗体価の測定には、酵素免疫測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) を用いた。ELISA は、96 穴プレートの各穴に 3.9 ng/ml の抗原を 0.1 ml 吸着反応させ、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗牛 IgG 抗体 (E.Y. Laboratories 社、カリフォルニア) を用いた間接抗体法で行ない、抗体価を測定した。比活性は単位抗体濃度当りの抗体価として算出した。

比活性 = [抗体価 (Titer)/IgG 濃度] (l/g)

5. 免疫グロブリン量測定

血清中および乳中の免疫グロブリン量 (IgM, IgA, IgG, IgG₁, IgG₂) の測定は、一元放射状免疫拡散法 (Single radial immunodiffusion; SRID) を用い、SRID キット (Binding Site 社、バーミンガム) を使用した。

6. 脱脂操作

搾乳した初乳は日量約 4 l を子牛に与え、残りを 20 l のポリ容器に入れ -20°C または 4°C に長くとも 3 日保存しておいた。脱脂操作は、クリームセパレーターを用い、個体別に分画操作を行なった。

7. 抗体の精製

脱脂乳に 0.1 N 塩酸を添加して pH 4.5 にしカゼインを沈澱除去した。得られた上清を中和した後、33% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、抗体を塩析させた。遠心分離して得た抗体は生理食塩水に溶解し、この

硫酸塩析をさらにもう一度行なった。10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) にて透析し、蛋白質として約 60 g 相当量を同緩衝液にて平衡化した Diethylaminoethyl (DEAE) セルロースカラム (直径 $7.2\text{ cm} \times 50\text{ cm}$, 流速 20 ml/min , 4°C) に供した。同緩衝液で非吸着画分を溶出した。50 mM 塩化ナトリウム含有同緩衝液で溶出する画分を集めた。Sodium Dodecylsulfate (SDS) 電気泳動、およびゲル濾過分析法で調べた抗体の純度は 90% 以上であった。

さらにこの画分を抗原として用いた毛髪ケラチンを結合させた担体 (アフィゲル 15) を使ったアフィニティークロマトグラフィーに供した。毛髪ケラチンとアフィゲル 15 の結合は、3- (N-Morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) 緩衝液 (pH 7.5) 中、ゲル 1 ml 当たり 8 mg の毛髪ケラチンを加え、 4°C で一昼夜反応させた。エタノールアミン HCl (pH 8.0) で未反応活性基のブロッキングを行なった。このゲルを PBS (Phosphate-buffered saline, NaCl 8.0 g/l , KCl 0.2 g/l , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g/l , KH_2PO_4 0.2 g/l (pH 7.2)) で洗浄、平衡化し、アフィニティークロマトグラフィー (直径 $1\text{ cm} \times 20\text{ cm}$, 流速 20 ml/h , 4°C) を行なった。DEAE 精製抗体 7 g 相当量をカラムに供し、非吸着画分を除いた後、0.2 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.5) で溶出した。抗体価の収率は 100% で定量的に回収されており、比活性は 100 倍以上がり特異的な抗体のみからなる抗毛髪ケラチン抗体を得た。

対照抗体は、非免疫牛初乳を用いて同様の方法で DEAE セルロースカラムイオン交換クロマトグラフィーを行ない、その吸着画分から得た標品をもってした。

8. 毛髪結合試験

男性 (26 才) の正常毛髪の凍結切片 ($6\mu\text{m}$) をゼラチンを塗布した無蛍光スライドガラスにパラホルムアルデヒド固定した。アフィニティークロマトグラフィーで精製した抗毛髪ケラチン抗体あるいは対照抗体を、10% ウサギ血清含有 PBS で 0.5 mg/ml に希釈し、室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、2 次抗体としてのローダミン標識ウサギ抗牛イムノグロブリン抗体を室温で 30 分間反応させた。PBS グリセリンで封入し、OLYMPUS 落射型蛍光顕微鏡で観察した。

9. 皮膚ケラチンの反応性試験

毛髪由来のケラチンと皮膚由来のケラチン (シグマ社、ミズーリー, K0253) 各々 50 ng を、SDS-10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて展開し、これを TOWBIN ら¹⁴⁾ の方法に従って蛋白質をニトロセルロース

膜（ミリポア・リミテッド社製）に転写し、 $1.7\mu\text{g}/\text{ml}$ の DEAE セルロースイオン交換クロマトグラフィーで調製した抗毛髪ケラチン抗体を使い、ウェスタン・ブロッティングを行なった。なお、Coomassie Brilliant Blue (CBC) 染色を対照とした。

10. 毛髪の破断強度測定

ブラッシングで1万回処理した女性の毛髪1gを束ねて毛髪サンプルとした。DEAE セルロースイオン交換ク

ロマトグラフィーで調製した毛髪ケラチン抗体をPBSで0.01%, 0.1%, 1%に溶解させ、この溶液10mlに30℃で1時間毛髪サンプルを浸漬した。流水中で10分間洗浄した後、45℃で風乾した。毛束より70~80 μm の太さの毛髪50本を無作為に取り出し、ヘアテスター（L. B. ケミカル社製、東京）を用いて破断強度を測定した。対照抗体として免疫していない牛初乳より精製した抗体溶液を用い、PBSに浸漬したものに対する統計的比較

Table 1. Hair keratin immunization groups

Group No.	Cow No.	Inoculum size	Route of inoculation	Time of inoculation
1	493	1st dose : 10 mg+FCA	sc	8 weeks before parturition
		2nd~6th : 10 mg+FIA	sc	10 days intervals
	614	1st dose : 10 mg+FCA	sc	8 weeks before parturition
		2nd~4th : 10 mg+FIA	sc	10 days intervals
		5th~6th : 10 mg+FIA	im	10 days intervals
	525	1st dose : 50 mg+FCA	sc	8 weeks before parturition
		2nd~6th : 50 mg+FIA	sc	10 days intervals
	605	1st dose : 50 mg+FCA	sc	8 weeks before parturition
		2nd~4th : 50 mg+FIA	sc	10 days intervals
		5th~6th : 50 mg+FIA	im	10 days intervals
2	527, 617	1st~3rd : 200 mg+FCA	sc	10 days intervals from 40 days before parturition
3	500	1st dose : 50 mg+FCA	im	8 weeks before parturition
		2nd dose : 50 mg+FIA	IMm	2 weeks after 1st inoculation
	612	1st dose : 50 mg+FCA	im	8 weeks before parturition
		2nd dose : 50 mg+FIA	IMm	2 weeks after 1st inoculation
		3rd dose : 50 mg+FIA	im	10 days before parturition
4	464, 583	1st dose : 50 mg+FCA	im	8 weeks before parturition
		2nd dose : 50 mg+FIA	IMm	2 weeks after 1st inoculation
		3rd dose : 50 mg+FIA	IMm	4 weeks after 1st inoculation
5	575, 598	1st dose : 50 mg+FCA	im	8 weeks before parturition
		2nd dose : 50 mg+FIA	ILn	3 weeks after 1st inoculation
6	605	immunize : 50 mg		1 year before (see group 1)
		bst : 50 mg+FIA	IMm	8 weeks and 4 weeks before parturition
7	500	immunize : 50 mg		(see group 3)
		bst : 50 mg+FIA	ILn	3 days after parturition
8	575, 598	bst : 50 mg+FIA	im	1 month intervals, 4 times
	605, 624	bst : 50 mg+FIA	ip	1 month intervals, 4 times
	585, 608	1st dose : 50 mg+FCA	im	
		bst : 50 mg+FIA	im	1 month intervals, 3 times
	620, 625	1st dose : 50 mg+FCA	im	
		bst : 50 mg+FIA	ip	1 month intervals, 3 times

sc=subcutaneously im=intramuscularly IMm=intramammarily ILn=into mammary lymph node region ip=intraperitoneally

(*t*-検定)を行った。

結 果

1. 免疫方法の検討

(1) 牛初乳の利用

試験に供した牛および免疫方法を表 1 にまとめた。実験 1 では妊娠 8 カ月のホルスタイン牛 4 頭を使い、10 または 50 mg の毛髪ケラチンを 10 日間間隔で 6 回皮下および筋肉内注射した。初回のみ FCA を使い、以降は FIA を使用したが、初乳中に抗体価 10^4 以上の高い抗体を得ることができなかった。次に実験 2 では妊娠 8 カ月の牛 2 頭を使い投与抗原量を 200 mg に増加し、すべて

FCA を用いて 10 日間隔で 3 回皮下投与した。しかし血中の抗体価もそれ程上昇せず、初乳の抗体価も高くなかった。

そこで実験 3 では TZIPORI ら¹⁵⁾の方法に準じて、出産予定日の 60 日前に FCA と共に抗原 50 mg を筋肉内注射した後、2 週間目に FIA と共に乳房内に注射し免疫した(牛 No. 500)。1 頭はさらに出産予定日の 10 日前筋肉内注射で追加免疫した(牛 No. 612)。投与抗原量はいずれも 50 mg とした。その結果、表 2 に示すように血中の抗体価が 1 頭は 10^5 を越え、他の 1 頭も 4.7×10^4 まで上昇した。ただし、初回免疫から 6 週目の血中抗体価が極大値(牛 No. 500 : 2.0×10^5 , 牛 No. 612 : 9.9×10^4)を示

Table 2. Hair keratin antibody titers and contents of immunoglobulins in colostrum and serum of cows immunized into a mammary gland

Cow No.	Sample		Volume (kg)	Protein (g/l)	Immunoglobulin (g/l)			Titer	Specific activity Titer/IgG (l/g)
					IgM	IgA	IgG		
500	serum	pre-immu.						4.2×10^3	
		calving			2.61	0.19	38.0	1.9×10^5	5,000
	colostrum	calving	10.4	148	3.39	0.89	85.8	1.7×10^6	20,000
		2nd day	7.3	85.4	1.87	0.46	31.1	7.5×10^5	24,000
		3rd day	7.8	55.8	0.64	0.20	14.7	2.1×10^5	14,000
612	serum	pre-immu.						6.6×10^3	
		calving			3.02	0.06	20.6	4.7×10^4	2,300
	colostrum	calving	3.6	135	3.56	1.00	83.4	4.0×10^5	4,800
		2nd day	7.5	62.8	1.36	0.29	19.8	9.7×10^4	4,900
		3rd day	13.6	44.9	0.36	0.09	5.6	3.7×10^4	6,600

Table 3. Hair keratin antibody titers and contents of immunoglobulins in colostrum and serum of cows immunized into a mammary lymph node

Cow No.	Sample		Volume (kg)	Protein (g/l)	Immunoglobulin (g/l)			Titer	Specific activity Titer/IgG (l/g)
					IgM	IgA	IgG		
575	serum	pre-immu.						6.4×10^3	200
		calving						2.1×10^5	10,600
	colostrum	calving	6.0	174	5.85	0.11	104	1.6×10^6	15,400
		2nd day	7.7	59.4	1.56	ND	19.6	3.0×10^5	15,300
		3rd day	3.1	40.8	0.54	ND	7.9	1.1×10^5	13,900
598	serum	pre-immu.						1.5×10^3	50
		calving							3.4×10^4
	colostrum	calving	13.9	180	4.92	0.96	87.2	5.4×10^5	6,200
		2nd day	12.5	60.5	0.86	0.12	15.0	5.3×10^4	3,500
		3rd day	14.7	37.6	0.28	ND	4.2	1.2×10^4	2,900

ND : not detectable

したもの、7週目以降出産時(牛 No. 500: 9週目, 牛 No. 612: 8.5週目)まで穏やかな低下傾向がみられ、追加免疫の時期が至適でなかったことを示していた。得られた初乳中の抗体価も血中抗体価に相応した値が得られた。なお初乳から得られる IgG 量は、1頭より(1~1.5) kgが見込まれた。またこれまで3回の実験でいずれも血中より初乳中の比活性が数倍高く、抗体の乳中への選択的な移行が観察された。

さらに実験4では乳房内追加免疫による牛 No. 500の効果の再現性を確認すると共に、回数を2度(乳房内投与は2週間後および4週間後)行なうことによるさらなる効果を見た。その結果、2頭とも血中の抗体価がいずれも 10^5 を越えブースト効果を認め、初乳中抗体の抗体価も血中の抗体価と相応して上昇し、比活性は1頭が(17,600~4,800)、他の1頭が(5,500~2,600)と牛 No. 500と同様の結果を得、乳房内投与の効果を確認した。ただし回数を2度行なうことによる顕著な効果は見られなかった。

そこで実験5では乳房リンパ節への追加免疫の効果を調べた(表3)。出産予定日の60日前に FCA と共に 50 mg の抗原を筋肉注射し、3週間後に FIA と共にリンパ節付近に同量投与した。血中の抗体価からブースト効果を認め、1頭は 10^5 を越え、初乳中抗体の比活性も血中の抗体価と相応して1頭が(15,000~13,000)、他の1頭が(6,200~2,900)と乳房内投与と同様の結果を得(表3)、乳房リンパ節付近への効果を確認した。

いずれの免疫方法でも出産時での血中抗体価の減少が認められたので、出産前後での血中 IgG₁ および IgG₂ 濃度を測定した。結果を図1に示した。IgG₁ 濃度は出産数週間前より急激な低下を認め、出産時には半分以下になっていた。一方 IgG₂ 濃度は出産に関係なく一定値を示した。このことより、出産時の血中抗体価の減少の一因として、IgG₁ の初乳への移行が示唆された。

次に実験6では免疫経験牛への再免疫を試みた。1年前に免疫した No. 605 牛(皮下および筋肉内注射)に出産2カ月前および1カ月前に抗原を乳房内に注入した。この結果、少なくとも1年前に1度免疫した牛はこの毛髪蛋白質に対する抗体生産能を保持しており、1年後の追加免疫により急激な抗体価の上昇を認め初乳中抗体の比活性は(8,100~5,700)であった。ただし、この場合2回目のブースト効果は認められなかった。

(2) 牛常乳の利用

次に実験7では牛 No. 500 を使って、分娩後3日目に FIA と共にリンパ節内に 50 mg 毛髪セラチンを追加免疫し常乳利用の可否を検討した。その結果図2に示すよ

Fig. 1. Changes in the concentrations of IgG₁ and IgG₂ in serum associated with calving. Cow No. 598 (■: IgG₁, □: IgG₂), No. 575 (▲: IgG₁, △: IgG₂), No. 500 (●: IgG₁, ○: IgG₂)

うに常乳中にも初乳と同様の高い比活性を持った抗毛髪セラチン抗体を得ることが出来た。すなわち追加免疫することにより初乳だけでなく常乳でも抗体を生産することが出来ることが分かった。

そこで前年に免疫してある感作牛と、免疫していない非感作牛を使い毛髪セラチンを 50 mg ずつ、分娩後(2~3)カ月にはば4週おきに筋肉内(im),ならびに腹腔内(ip)に4回免疫したところ、図3(A)に示すように感作牛では最初から高い抗体価を得ることが分った。一

Fig. 2. Hair keratin antibody titers of IgG in the milk from the cow immunized after calving.

↑ : booster injected into a mammary lymph node region

方非感作牛では図3(B)に示すように、3回免疫後から抗体価が上昇することが分かった。常乳は1泌乳期に約6,500 kg生産されるので、常乳にはIgGが(4~5) kg含まれることになる。

(3) 牛に与える免疫の副作用

免疫をした牛の体重の推移、分娩の状況、子牛の健康状況及び泌乳量等について異常は認められず、筋肉内または皮下注射の後、局所に軽度の腫脹が見られること以外には臨床的に異常は認められず、初乳ならびに常乳を得ることが出来た。

2. 蛍光抗体法による抗体と毛髪との結合

図4に結果を示すとおり、対照抗体は毛髪とは反応せず、抗毛髪ケラチン抗体で反応させた標本のみ毛髪全域にわたり蛍光発色が観察され、免疫抗体が毛髪のしかも角質化した毛髪(毛幹部)に結合することを認めた。

3. 抗体の毛髪ケラチンとの結合

牛抗毛髪ケラチン抗体が毛髪に特異的であるかどうかを、毛髪由来のケラチンと皮膚由来のケラチンに対する抗体の反応性をウェスタン・ブロッティング法を用いて検査した(図5)。これにより、牛初乳から得られた抗毛

髪ケラチン抗体は皮膚ケラチンと反応せず、毛髪由来のケラチンと特異的に反応していることが観察された。

4. 抗毛髪ケラチン抗体処理毛髪の物性

毛髪ケラチン免疫牛から得た粗抗毛髪ケラチン抗体と対照抗体で処理した、人毛髪の破断強度を比較した。図6に示すように、免疫牛の初乳から得た抗体はブラッシングの損傷により低下した毛髪の強度を向上させた。これに対し、非免疫牛の初乳から得た抗体は、毛髪の強度に影響を与えなかった。

考 察

妊娠牛に免疫して効率良い抗毛髪ケラチン抗体を産生させるためには、初回免疫からある程度(4週間後)の間隔を開けた1度から2度の追加免疫が適していた。牛の免疫間隔については、本研究で使った毛髪ケラチンの様な蛋白質に関する知見に乏しく、主としてウイルス及び細菌についての研究に限られている。ウイルス及び細菌については、抗原とアジュバンドの組合せに応じて、免疫間隔が1週間^{3,13)}から8週間¹⁵⁾で行われている。しかし、同じ抗原についても研究者によって免疫間隔が異

Fig. 3. Hair keratin antibody titers in milk.

(A) cows previously injected with the same antigen. ○: Cow No. 598 (intramuscularly: im), ●: No. 575 (im), △: No. 624 (intraperitoneally: ip), ▲: No. 605 (ip), (B) non-immunized cows. ○: No. 608 (im), ●: No. 585 (im), △: No. 625 (ip), ▲: No. 620 (ip), ▽: the time of immunization with keratin emulsified in FCA ▼: the time of immunization with keratin emulsified in FIA

なり、一定の規則性はみられない。

さらに牛初乳に抗毛髪ケラチン抗体を効率よく産生させるためには、その追加免疫部位は乳房内あるいは乳房リンパ節への投与が適していた(表2, 3)。この原因は未だ確認できないが、今のところ局所免疫が同時に起こり、効率よく抗体が産生されたと推定している。

乳房内投与は大腸菌¹²⁾等で試みられている。これは、出産の(4~5)週間前の牛に14種の大腸菌を乳房内に投

与し、この牛から得られた初乳が大腸菌が原因の下痢に効果があることを臨床的に確かめているが、本研究と比較しうる抗体価についての知見はない。毛髪ケラチンが大腸菌の様な感染力を持たず乳房内での抗原刺激が低いと思われることから、今後解明がまたれる興味ある結果である。また免疫経験のある牛への追加免疫時期は、出産1カ月前でよいと思われた。

次にさらに大量の抗体を得るため常乳の利用の可否を

Fig. 4. Indirect immunofluorescence of cryotome sections of human hair with hair keratin antibody.

A : hair keratin antibody, B : non-specific antibody, C : control (PBS)

Fig. 5. Immunoblot analysis of human hair and epidermal keratins.
A : Coomassie Brilliant Blue, B : hair keratin antibody, 1 : human hair keratins, 2 : human epidermal keratins

Fig. 6. Effect of hair keratin antibody on tensile strength.
Valus are means $\pm$ SE.

検討した。抗体の大量調製は、常乳中の IgG 濃度が初乳の (1/50~1/100) である⁴⁾ことから、出発物として常乳はほとんど使われていない²⁾。従って、本研究では常乳中の抗体の比活性 (抗体価/IgG) を上げる方法を探索した。その結果、1 年目に出産前に免疫してある感作牛に関しては、分娩 (2~3) 月後ほぼ 1 カ月毎に筋肉内又は腹腔内に追加免疫することにより、常に高い値の抗体価を持った常乳を得ることが出来ることがわかった (図 3 A)。ただし非感作牛ではなかなか高い値の抗体価を得ることが出来なかった (図 3 B)。すなわち 1 年目では初乳を利用し、2 年目からは追加免疫することにより、常乳も利用できることが分った。

得られた牛免疫抗体は蛍光抗体法により人毛髪に結合し (図 4)、ウェスタン・ブロッティング法で人皮膚ケラチンには結合せず、人毛髪ケラチンとだけ特異的に結合した (図 5)。ケラチンに関する知見から、ケラチンの 3 次構造は種間を問わず中央部に α -ヘリックスを持ち、両端に非ヘリックス部を持つ点で極めて類似している。ただし非ヘリックス部に皮膚と毛髪で差異があり、前者

はグリシンとセリンを多く含み、後者はシステインとプロリンを多く含むことが知られている¹¹⁾。従って共通部である中央部 α -ヘリックス部に対する抗体ができれば皮膚と毛髪を区別できないし、非ヘリックス部の異なる部位に対する抗体ができれば区別できると考えられる。実験結果から牛抗体は非ヘリックス部位を認識しているのではないかと考えている。今後、毛髪ケラチン標品の構造化学的知見と、抗毛髪ケラチン抗体の認識部位の解明が望まれる。さらにこの抗体はブラッシングの損傷によって低下した人毛髪の強度を向上させた(図6)。

本実験により、皮膚ケラチンに結合せず、毛髪に特異的に結合し、損傷で弱くなった毛髪の物性を回復する特性を持った抗毛髪ケラチン抗体の大量生産方法が見出された。

文 献

- 1) BADEN, H.P., N. MCGILVARY, L.D. LEE, L. BADEN and J. KUBILUS, Comparison of stratum corneum and hair fibrous proteins. *J. Invest. Dermatol.*, **75** : 311-315. 1980.
- 2) BEDK, L.D., US patent, No. 4. 284. 623. 1981.
- 3) BRÜSSO, W.H., H. HILPERT, I. WALTHER, J. SIDDTI, C. MIETENS, and P. BACHMANN, Bovine milk immunoglobulins for passive immunity to infantile rotavirus gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, **25** : 982-986. 1987.
- 4) BUTLER, J.E. Synthesis and distribution of immunoglobulins. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, **163** : 795-798. 1973.
- 5) EBINA, T., A. SATO, K. UMEZU, N. ISHIDA, S. OHYAMA, A. OHIZUMI, K. AIKAWA, S. KATAGIRI, N. KATSUSHIMA, A. IMAI, S. KITAOKA, H. SUZUKI and T. KONNO, Prevention of rotavirus infection by cow colostrum containing antibody against human rotavirus. *Lancet*, **2** : 1029-1030. 1983.
- 6) EBINA, T., A. SATO, K. UMEZU, H. ASO, N. ISHIDA, H. SEKI, T. TSUKAMOTO, S. TAKASE, S. HOSHI and M. OHTA, Treatment of multiple sclerosis with anti-measles cow colostrum. *Med. Microbiol. Immunol.*, **173** : 87-93. 1984.
- 7) EBINA, T., A. SATO, K. UMEZU, N. ISHIDA, S. OHYAMA, A. OHIZUMI, K. AIKAWA, S. KATAGIRI, N. KATSUSHIMA, A. IMAI, S. KITAOKA, H. SUZUKI and T. KONNO, Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing antihuman-rotavirus antibody. *Med. Microbiol. Immunol.*, **174** : 177-185. 1985.
- 8) EBINA, T., K. TSUKADA, K. UMEZU, M. NOSE, K. TSUDA, H. HATTA, M. KIM and T. YAMAMOTO, Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation (PSK). *Microbiol. Immunol.*, **34** : 617-629. 1990.
- 9) EBINA, T. and K. TSUKADA, Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus-induced diarrhea in suckling mice. *Microbiol. Immunol.*, **35** : 583-588. 1991.
- 10) EBINA, T., M. OHTA, Y. KANAMARU, Y.Y. OSUMI and K. BABA, Passive immunizations of suckling mice and infants with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *J. Med. Virol.*, **38** : 117-123. 1992.
- 11) 北島康雄, ケラチンの生化学, 生化学, **60** : 546-551. 1988.
- 12) MIETENS, C. and H. KEINHORST, Treatment of infantile *E. coli* gastroenteritis with specific bovine anti-*E. coli* milk immunoglobulins. *Eur. J. Pediatr.*, **132** : 239-252. 1979.
- 13) TACKET, C.O., G. LOSONSKY, H. LINK, Y. HOANG, P. GUESRY and H. HILPERT, Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.*, **318** : 1240-1243. 1988.
- 14) TOWBIN, H., T. STAEGELIN and J. GORDON, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76** : 4350-4354. 1979.
- 15) TZIPORI, S., D. ROBERTON and C. CHAPMAN, Remission of diarrhoea due to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. *Br. Med. J.*, **293** : 1276-1277. 1986.
- 16) 打和秀世・平野 真・小野靖子・村上梅司・太田実・海老名卓三郎, 抗毛髪ケラチン抗体の作成とその特性(第1報), 兎抗体の利用, 日本皮膚科学会雑誌, 印刷中, 1994.

Production of Anti-Hair Keratin Antibody and Its Characteristics : Utilization of Cow Colostrum and Milk

Takusaburo EBINA, Minoru OHTA*, Hideyo UCHIWA**
and Umeji MURAKAMI**

Research Institute Miyagi Cancer Center, Natori-shi 981-12
* Experimental Farm, Faculty of Agriculture, Tohoku University,
Narugo-machi, Miyagi-ken 989-67
** Kanebo Co. Ltd., Odawara-shi 250

Eight-month pregnant Holstein cows were intramuscularly immunized with a reduced carboxymethylated human hair keratin preparation via a complete Freund's adjuvant, which was boosted into a mammary gland or a lymph node of the breast after 2-3 weeks. The cow colostrum, containing a high-titered anti-human hair keratin antibody, was obtained. Two months after delivery, the immunized cows were injected intramuscularly and boosted intramuscularly or intraperitoneally with keratin protein 3 times at 4-week intervals, resulting in the production of cow's milk containing a high-titered antibody to human hair keratin. This signifies the possibility of mass-producing the anti-human hair keratin antibody. This antibody is bound specifically to human hair keratin, not to epidermal keratin, and could improve the tensile strength of brushed human hair.

Anim. Sci. Technol. (Jpn.) 65 (6) : 580-590, 1994

Key words : Mass-production of antibodies, Cow colostrum, Hair keratin, Cow's milk