鶏の血清学的体質に関する研究

II 自然抗体の免疫化学的性質

大場 義彦・渡辺 誠喜・鈴木 正三

(東京農業大学 東京都)

前報¹⁾において、血球抗原の検索に際し、Papain 処理血球を用いて2種の正常抗体を認め、これにより鶏の血液型を3型に分類できることを報告した。血液型検査の実施にあたっては、迅速、かつ正確さを絶対条件として要求されるため、種々の条件下での血球抗原の働き、判定用抗血清の性質を精査しておくことは重要である。

ヒトにおいては、法医学的物性検査の精度を高める手段として血痕および体液斑の血液型判定にあたって、型特異的凝集素の吸着試験、型特異的凝集素検出法²⁾、補体結合反応³⁾、解離試験^{4) 5)}、混合凝集反応⁶⁾、蛍光抗体法⁷⁾、アイソトープ標識抗体法⁸⁾などが導入されている。

鶏について、この種の報告はみあたらないが、判定用抗血清の性状については SISTER ら⁹⁾の報告によると、同種免疫によって得られた抗 D、抗 L 血清中には 19 S macroglobulin、抗 A、抗 B、抗 C 血清中には主として 7S γ -globulin が含まれており、7S 抗体は特に凝集反応の強さに影響するとのべている。

本研究は、さきに分類した鶏血清中の自然抗体につき、解離試験による血液型の判定法並びに抗体の免疫化学的性状を明らかにしようと試みたものである。

実験材料および実験方法

血球：FsI 型、FsII 型血球を有する鶏の翼下静脈より凝固防止のため 2% Citrate 加生理的食塩水を入れた注射筒内に採血し、生理的食塩水で3回遠心 (3,000 r.p.m. 5 分間) 洗滌した沈殿血球を Papain で処理して用いた。

抗血清：先に報告した抗-FsI、抗-FsII 血清を用いた。保存のためには 1% Na₂S₂O₃ を 1/10 量加えた。ヒト血清は日本製薬血液銀行より入手した血液を 3,000 r.p.m. で 5 分間遠心分離後、上清を 56°C、30 分間保ち非働化したものを使用した。

解離試験：

1) 吸着：試験管内に血球と凝集素価を4倍に調整した抗血清を混合し、恒温器中に2時間、室温に2時間、氷室 (4°C) に1昼夜放置し、さらに室温に30分間保ち遠心分

離したのちの上澄液について凝集阻止価を検査した。

2) 解離：吸着後の抗原・抗体結合物を氷室 (4°C) 中で保存した生理的食塩水で3~5回洗滌し、生理的食塩水を数滴加えて 55°C の温浴槽中で7~10分間加温後、熱解離した抗体を速かに遠心分離 (3,000 r.p.m. 5 分間) して、抗体を分離した。

3) 凝集反応：解離した抗体を他の試験管に移し、0.5~1.0% の作用血球を1滴加えて、30分間室温において、凝集反応により血液型を判定した。

超遠心分離：抗血清約 10ml を遠沈管に採り、日立製超遠心機 (Roter RP-40-103) により 5°C の温度下で6時間遠心分離したものを注射器により4分画に分離した。

2-mercaptoethanol 処理：CHAN¹⁰⁾らの方法に従って抗体活性の有無を検査した。

すなわち、血清 1 ml と 0.2M 2-mercaptoethanol 1 ml を混合し 37°C の恒温器に2時間放置し、pH 7.3 のリン酸緩衝食塩水中で1昼夜透析したのちその抗体活性を検査した。対照血清としてはヒト抗-A (IgM)、抗-B (IgM) および抗-D (IgG) 血清を用いた。

熱処理：抗血清を 70°C の温浴槽中に10分間静置したのち抗体活性を検査した。

免疫電気泳動法：スライドガラス (26mm×76mm) 上に純化寒天 (J-Agar) の1%溶液 2 ml を流し、恒温器 (37°C) 内で固化した後、cutter を用いて寒天層中に1本の溝 (幅 2 mm) とその両側に1個ずつ小孔 ($\phi=1.2$ mm) を作った。解離血清 0.01 ml を孔に分注し、Veronal buffer (pH 8.6 $\mu=0.05$) を用い、6V/cm の定電圧で120分間泳動した。

泳動後、溝に抗鶏免疫血清を 0.1 ml 注ぎ、37°C に20時間 incubate したのち、数回蒸留水で洗滌し、Amido-black 10B で染色し、1%酢酸溶液で脱色洗滌した。

DEAE-cellulose column 分画：Sober & Peterson¹¹⁾の方法に従った。すなわち、抗-Fs 血清 15ml を pH 6.3、0.0175 M リン酸ソーダ緩衝液で1昼夜透析し、DEAE-cellulose を 2.0×18.0 cm column に注入し、これを 8°C の低温箱内で、1時間 48 ml の流速のもとに第1液

第1表 吸着試験と解離試験による血液型の判定

Table 1 Judgement of blood types by absorption test and elution test.

血 球 Red cells	実験法 Method	吸 着 試 験 Absorption test		解 離 試 験 Elution test	
		抗-FsI Anti-FsI	抗-FsII Anti-FsII	抗-FsI Anti-FsI	抗-FsII Anti-FsII
Fs I		—	+	+	—
Fs II		+	—	—	+

(0.0175 M リン酸ソーダ, (pH 6.3)), 第2液 (0.04 M リン酸ソーダ (pH 5.9)), 第3液 (0.1 M リン酸ソーダ (pH 5.8)), 第4液 (0.4 M リン酸ソーダ (pH 5.5)) および第5液 (0.4 M リン酸ソーダ (pH 4.4) + 2 M NaCl) の各緩衝液で順次 Stepwise elution をおこなって溶出させた。溶出液は各試験管に 8 ml ずつ分取し, その一部について蛋白濃度をフェノール試薬 (Folin-ciocalteu reagent) により日立製光電光度計で比色定量した。

実験結果

1. 吸着試験と解離試験による血液型の判定

型特異的血球を用いて解離試験をおこなった結果, 第1表の成績が得られた。すなわち, 吸着試験において陽性の型血球は解離試験において陰性反応を示し, 逆に吸着試験で陰性の場合には解離試験で陽性反応を示した。また, 血球抗原漸減量法により, 凝集阻止試験をおこなった結果は前報¹⁾と同様な結果が得られた。すなわち, Fs I 抗原は 1:8, Fs II 抗原は 1:16 まで凝集反応を阻止した。さらに, 解離試験においても前報¹⁾と同様な結果が得られ, 吸着試験によって相補性を有する血球と再結合し, 陽性の凝集反応を呈することが確認された。

2. 免疫電気泳動による検討

そこで, 解離試験によって得られた抗体について免疫電気泳動的に検討した。その泳動像は第1図に示すとおりである。

すなわち, 解離試験によって得られた抗体について, 寒天ゲル内電気泳動終了後, 抗鶏血清免疫家兎血清と反応させたところ β -globulin 域と推定される分画に1本

第1図 解離抗体の電気泳動像
Fig. 1 Immunelectrophoretic analysis with eluted anti-Fs serum

- 1) 泳動孔: 解離抗体
Trough: Eluted antibody
2) 反応用溝: 鶏免疫血清
Well: Anti-chicken serum

第2表 超遠心分離による抗体の分析
Table 2 Agglutination titer and protein concentration of serum fraction obtained by centrifugation.

実験法 Method	分 画 Fraction	未処置 Untreatment	分 画 Fraction			
		1	2	3	4	
蛋白分画の量 volume(ml)		5	0.5	3.5	0.7	0.3
蛋白濃度 Protein concentration (%)		5.8	1.8	4.6	8.4	12.8
凝集反応 Agglutination		×8	—	—	—	×16

の沈降線が認められた。

3. 超遠心分離法による結果

超遠心分離法により 抗-Fs II 血清 5 ml を4層 (F₁~F₄) にわけ, 各層をそれぞれ 0.5 ml, 3.5 ml, 0.7 ml および 0.3 ml ずつ採取した。この4分画の蛋白濃度および抗体価について調査した結果は第2表に示すとおりである。

すなわち, 第2表に示されるように各分画の蛋白濃度は F₁ は 1.8%, F₂ は 4.6%, F₃ は 8.4%, F₄ は 12.8% を示した。Fs II 型血球抗原に対する凝集素価は F₄ 分画においてのみ 16 倍の力価が認められ他の層には殆んど抗体活性が認められなかった。ちなみに, 原血清の蛋白濃度は 5.8%, その凝集素価は 8 倍であった。

4. 2-mercaptoethanol 処理による影響

次に抗-Fs I, 抗-FsII 抗体の 2-mercaptoethanol に対する抵抗性を調査するために抗血清を 0.2 M 2-mercaptoethanol によって処理したのち, 対応する血球と反応させたところ, 第3表に示す結果が得られた。すなわち,

第3表 Fs 抗体に対する 2-mercaptoethanol の影響

Table 3 Effect of 2-mercaptoethanol on anti-Fs sera and control sera.

抗 血 清 Antisera	凝 集 素 価 Agglutination-titer	
	未 処 置 Untreatment	処 置 Treatment
抗-Fs I Anti-Fs I	1 : 4	0
抗-Fs II Anti-Fs II	1 : 4	0
ヒト抗-A (Ig M) Human anti-A	1 : 64	0
ヒト抗-D (Ig G) Human anti-D	1 : 32	1:32

第2図 Fs 抗体の DEAE-cellulose による分画
Fig.2 Effluent diagram of anti-Fs serum for
DEAE-cellulose column chromatography.

抗-Fs I, 抗-Fs II 抗体は 2-mercaptoethanol を用いて処置することによって、いずれも反応を示さなくなった。(第3表) 対照血清の IgM (19S, γ M) type に属するヒト抗-A, 抗-B 抗体はその活性を失なったが, IgG (7S, γ G) type に属する抗-D 抗体はその活性を失なわなかった。

5. 熱処理による検討

抗体の耐熱性を検討するために 抗-Fs 血清を 70°C の温浴槽中で 10 分間加熱処理したのち、その抗体活性を検査したところ抗 A, 抗 B 抗体と同様に抗-Fs I, 抗-Fs II 抗体はいずれも活性を失なった。しかし、抗-D 血清の活性には変化が認められなかった。

6. DEAE-cellulose 分画法による抗体の分析

DEAE-cellulose を用いて抗血清を分析し、その蛋白濃度をフェノール試薬による比色法により調査した。その結果は第2図に示されるように、その抗血清の蛋白濃度は4分画にわけられた。この各分画を Carbowax を用いて濃縮し、それに対応する抗原血球を作用させて、凝集反応をおこなったところ、F₄ 分画に凝集素価2倍の、F₁ 分画に Tr. の凝集反応が認められた。

考 察

本研究に供した抗血清は、力価の高い正常抗体について抗体価を4倍に調整したものであるが、鶏の正常抗体について、Papain で処理した血球を用いても力価の高いものは得られにくいようである。Fs II 抗体の凝集力は Fs I 抗体のそれの約 1/3.5¹⁾ でかなり強い傾向が認められたが、吸着試験によって両者の間に阻止価の違いは認められなかった。したがって、この2種の抗血清の間では、その性状に本質的な差異はないものと考えられる。

本実験において、解離試験は吸着試験の裏試験としての有効性をもつ実験として考えた方が妥当であり、解離試験を主体として考えることは妥当性を欠くように思われる。

従来、新しい血液型の検査に際し、誤判を最小限にするため、血球側から血液型抗原を、血清側から血液型抗体を検査しているように、鶏の場合にも、吸着試験と解離試験を併用することによって誤りの少ない血液型判定ができるものと思われる。

次に、鶏 Fs 抗体がどのような globulin 分画に属する蛋白であるかについて前述の解離抗体について電気泳動をおこなったところ、 β -globulin 域に移動することが判明された。超遠心分離によって最下層の部分に凝集反応が認められたことからかなり大きい分子量の分画に抗体活性が存在することが示唆された。そこで、さらに 0.2 M 2-mercaptoethanol 処理前後の抗-Fs I, 抗-Fs II 血清について、食塩水法により凝集反応を調べてみると処理後の抗血清に対して陰性反応を示した。このことは Fs 抗体が完全抗体の形にあったものが 2-mercaptoethanol の還元剤で処理することによって、S-S 結合部が開裂し、SH 化された結果であると考えられる。これについて、DEUTSCH ら¹³⁾ は SH 化合物を用いて、ヒトのマクログロブリン血症患者から得られた IgM 抗体を還元処理を施すことによって、これは中性で比較的安定な 7S のサブユニットに完全に変化し、その抗体活性は失なわれるが抗原組成は変らなかったとのべ、また UHR ら¹³⁾ によるとバクテリオファージ ϕ 174 をモルモットに免疫して得られた 19S 抗体は 2-mercaptoethanol によって分解されるが、7S 抗体は分解されないから、この方法は 7S 抗体と 19S 抗体の存在を推測する指標になると報告している。熱処理によって抗体活性が消失することは、この自然抗体としては熱に対する抵抗性が弱く破壊され易い抗体であることを意味しているものであり WIENER ら¹⁴⁾¹⁵⁾ がのべている熱に対して強い不完全抗体とは別のものと考えられる。さらに、DEAE-cellulose column chromatography による抗体の分析を試みたところ、19S 成分が溶出される第4分画に抗体活性が認められた。ABELSON¹⁶⁾¹⁷⁾ や YOKOYAMA¹⁸⁾ はヒト血清での抗体分析では、Coombs test 陽性、アルブミン凝集抗体などは早く溶出する分画に、また食塩水抗体は最も遅く溶出される分画に存在すると報告している。本実験において、第1分画にわずかな凝集反応が認められたことについては、必ずしもその理由はあきらかでない。しかし鶏抗血清中の抗体の大部分は IgM (19S γ M) type の globulin であると推定される。したがって、血液型判定にあたっては IgM type の globulin が食塩水法による

直接凝集反応および解離試験における凝集反応に直接関与しているものと思われる。また、赤血球を **Papain** で処理することによって凝集反応が増強されることは、赤血球膜中に被覆されていた抗原性決定基がそれによって赤血球表面に新しく現われ、これに **IgM type** の抗体が結合した結果であろうと推測される。

要 約

自然抗体によって分類できた鶏血液型について、解離試験による判定法並びに抗体の免疫化学的性状を明らかにするため、**2-mercaptoethanol** 処理法、超遠心分離法、熱処理法、免疫電気泳動法および **DEAE-cellulose column chromatography** 法を用いて調べた。

その結果を要約すると次のとおりである。

1. 解離試験によって解離された抗体は、赤血球の抗原性決定基と再結合し、凝集反応を形成した。

2. 抗体の超遠心分離において最下層の分画に抗体活性が認められた。また解離抗体は電気泳動的に β -globulin 域に沈降線を作った。

3. 抗-Fs I, 抗-FsIIの抗体活性は **2-mercaptoethanol** 処置および 70°C 10 分間の加熱処置によって失われた。

4. 抗-FsI, 抗-FsII抗体は **DEAE-cellulose column chromatography** によって分析した場合、**19S** 成分が溶出される分画に抗体活性が認められた。

したがって、鶏血清中の自然抗体であるこの **Fs** 抗体は **IgM (19S, γ M) type** の globulin であると推定された。

本実験をおこなうにあたり御懇篤な御助言を賜った

科学警察研究所池本卯典博士に厚く御礼申しあげる。

文 献

- 1) 大場義彦, 池本卯典, 渡辺誠喜, 鈴木正三: 家禽会誌, **4**, 2, 1967.
- 2) WIENER, A.S.: Blood groups and transfusion, **406**, 1943.
- 3) 正橋武文: 日法医誌, **5**, 1, 1951
- 4) NICKOLLS, L.C.: Med. Sci. and L., **2**, 172, 1962.
- 5) 矢田昭一: 科警研報告, **15**, 472, 1962.
- 6) 赤石 英, 村上 利, 工藤敏行, 清水三男: 弘前医学, **15**, 589, 1964.
- 7) HASEBE, H.: 日法医誌, **16**, 325, 1962.
- 8) 池本卯典: 日法医誌, **18**, 207, 1964.
- 9) SISTER, D.K., L.W. SCHIERMAN and A.W. NORDSKOG: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **121** 1966.
- 10) CHAN, P.C. & H.F. DEUTSCH: Immunol., **85**, 37, 1960.
- 11) SOBER, H. & E.A. PETERSON: Fed. Proc., **17**, 1116, 1956.
- 12) DEUTSCH, H.F. & J.I. MORTON: J. Biol. Chem., **231**, 1107, 1958.
- 13) UHR, J.W. & M.S. FINKELSTEIN: J. Exp. Med., **117**, 457, 1963.
- 14) WIENER, A. S.: J. Lab. & Clin. Med., **30**, 66, 1945.
- 15) WIENER, A.S.: J. Lab. & Clin. Med., **30**, 957, 1945.
- 16) ABELSON, N.M. & A.J. RAWSON: J. Immunol., **82**, 435, 1959
- 17) ABELSON, N.M. & A.J. RAWSON: J. Immunol., **83**, 49, 1959.
- 18) YOKOYAMA, M.: J. Immunol., **87**, 56, 1961.

Studies on the Serological Constitution of Chicken

II. Immunochemical Characteristics of Natural Antibodies

Yoshihiko OHBA, Seiki WATANABE and Shōzō SUZUKI

Tokyo University of Agriculture, Tokyo

The purpose of the present study is to clarify the relationship between the constitution and the blood types of chicken classified with natural antibodies by Suzuki.

The present paper reports on the blood types of chicken investigated by the elution test and the immunochemical characteristics analyzed by method of 2-mercaptoethanol treatment, ultracentrifugation, heat-treatment, immunoelectrophoresis and diethylaminoethyl cellulose anion exchanger.

The results obtained were as follows:

- 1) The blood cells (Fs I and Fs II) were reagglutinated by the antibodies eluted from antigen-antibody complex.
- 2) The antibodies eluted from antigen-antibody complex were observed in β -globulin zone by immunoelectrophoresis.
- 3) The activity of antibodies was recognized in the most under domain of fractions obtained by centrifugation.
- 4) The agglutination turned to disappear by the treatment of 2-mercaptoethanol.
- 5) The protein, appearing at the end of a DEAE-chromatogram and being responsible for the capacity of the sera to agglutinate red cells treated by papain.
- 6) It is considered that the major constituent in these antibodies was IgM (19S, γ M) type globulin.

(Japan Poultry Sci., 6, 137, 1969)