ラット免疫グロブリンの分離と子宮液中における免疫グロブリンの同定について

長谷川喜久*・菅原七郎・竹内三郎

(東北大学農学部 家畜繁殖学教室)

発情前期のラットの子宮分泌液中に、血清蛋白質である albumin と globulin および子宮液に特異的であると考えられる多くの蛋白質が含まれていることを著者らはすでに明らかにした¹⁻⁸⁾。また、発情前期から発情期にかけて増加する子宮液の蛋白質の多くは、 γ -globulin であることを明らかにした¹⁾。しかしながら、ラット子宮液中の immunoglobulin の種類については、まだ殆ど知られていない。従って、これらに関する知見を得ることは、生殖免疫学的な観点から非常に重要であるといわれている⁴⁻⁷⁾。そこで、本研究においてまずラットの immunoglobulin 特に IgG と IgA⁸⁻¹¹⁾ の分離を試み、それらの性質を検討した。さらに、生殖免疫学的観点から、子宮液中の immunoglobulin の同定を行った。

材料および方法

1) 血清、子宮液および初乳

血清および子宮液の採取は前報の方法により行った¹⁾。初乳は分娩後 2 日から 3 日目の新生児のラットの胃から採取し、PBS (pH 7.2) で 2 倍に希釈後、5°C で 12,000 r. p. m. 1 時間遠心分離を行って乳清を分離し、以後の実験に用いた。

硫酸飽和溶液による塩析¹²⁾、disc 電気泳動法、amido black による染色などは常法により行った¹⁾。

2) Column chromatography

Gel は sephadex-G200 と sepharose-6B を用いた。いずれも PBS 溶液中で膨潤させた後に、長さ 100 cm、直径 2 cm の column に充填した。緩衝液の流速は 1 ml/cm²/hr で行った。流出液は 3 ml ずつ分取し、分光

光度計により波長 280 m μ を用いその吸光度を測定した。イオン交換 chromatography は、長さ 50 cm、直径 3 cm の column に充填した DEAE cellulose を用いて行った。

3) SDS polyacrylamide gel 電気泳動法

WEBER と OSBORN¹³⁾ および DUNKER と BUECKERT¹⁴⁾ の原法および林と大場の改良法¹⁵⁾により行った。acrylamide の濃度が 5% の gel を用い、tracking 色素は、0.1% の coomassie brilliant blue R250 溶液を用いた。蛋白質の SDS 化は 50°C に 2 時間置いて行った。2-mercaptoethanol (2-ME) 処理をする場合は、2-ME の終末濃度が 4% になるように試料に加えて SDS 化を行った。acrylamide, bisacrylamide は、それぞれ chloroform と acetone で精製してから用いた。染色は電気泳動後に coomassie brilliant blue G250 によって行った¹⁶⁾。

蛋白質分画の易動度を測定した後、標準蛋白質としては thyroglobulin (MW: 65 $\times 10^4$)、ferritin (MW: 54 $\times 10^4$)、bovine γ -globulin (MW: 17.5 $\times 10^4$)、bovine serum albumin (MW: 6.7 $\times 10^4$)、 β -lactoglobulin (MW: 3.6 $\times 10^4$) および chymotrypsinogen A (MW: 2.5 $\times 10^4$) などを用い各分画の蛋白質の分子量を概算した。

4) 蔗糖密度勾配遠心分離法

0.01 M のリン酸緩衝液を用いて 5% から 20% の蔗糖密度勾配液 4 ml に試料を 0.2 ml 載せ、日立の RP 400 の roter を用い、35,000 r. p. m. で 8 時間遠心分離を続けた。分子量の標準蛋白質としては、urease (MW: 48.5 $\times 10^4$) と catarase (MW: 22 $\times 10^4$) を用いた。

5) Ouchterlony 法および免疫電気泳動

前報³⁾と同様に行った。

6) IgG と IgA の分離

IgG の分離は、硫酸の 40% 飽和により血清から得た globulin を DEAE cellulose column chromatography により行った¹⁷⁾。流出液は、0.01 M: pH 7.5・0.02 M pH 6.2・0.05 M: pH 5.3 のリン酸緩衝液を順次用い、

*現所属：群馬大学医学部産婦人科学教室

Isolation of rat immunoglobulins and determination of immunoglobulins in rat uterine fluid.

HASEGAWA, Yoshihisa*, Shichiro SUGAWARA & Saburo TAKEUCHI (Laboratory of Animal Reproduction, Tohoku University, Sendai; *Present address: Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Gunma University, Maebashi 371)

Jap. J. Animal Reprod. 22(4), 1977.

最後に、0.5 M の NaCl を含んだ 0.05 M のリン酸緩衝液で溶出した。

血清からの IgA の分離は硫酸 33% 飽和により得た γ -globulin を sepharose-6B により分画した。

初乳中の IgA は前述の乳清を酢酸により pH 4.6 に調整し沈澱物を除き、さらに硫酸 50% 飽和によって albumin を除いた後に sephadex-G200, sepharose-6B および DEAE cellulose column chromatography によって分画した。

実験結果

1. Immunoglobulin の分離

1) IgG: DEAE cellulose column chromatography の結果は Fig. 1 に示すように 4 分画に分かれたが、図示したように 5 分画に分けて各分画の蛋白質成分を免疫電気泳動によって分析した。その結果、第 I 分画は最も陰極側に 2 本の沈降線を示していたので IgG₂ 分画と推定する。第 II 分画は、第 I 分画の蛋白よりやや陽極側に 1 本の沈降線を示し IgG₁ 分画と推定される。第 III 分画および第 IV 分画には、IgG₁ と他の globulin が混在していた。第 V 分画には多種の globulin が含まれており、IgA および IgM はこの分画に混入していると考えられる。

2) IgA: sepharose-6B column chromatography によって得られた結果は Fig. 2a に示し、各 peak の免疫電気泳動像は Fig. 2b に示した。第 2 峰は陽極側の蛋白質であり、第 3 峰は陰極に移動する蛋白質であった。しかし第 1 峰は DAUGHADAY の蛋白質の測定法¹⁾によっても蛋白質は全く検出できなかった。

Fig. 1. Fractionation of rat serum γ -globulins by DEAE-cellulose chromatography with stepwise addition of phosphate buffers.

Fig. 2a. Fractionation of rat serum γ -globulins by sepharose-6B column chromatography. Fig. 2b. Each peak was analyzed for immunoglobulin by immunoelectrophoresis.

次に初乳から IgA の分離を行った。sephadex-G200 column chromatography によって得た第 1 峰を sepharose-6B column chromatography を行い、2 つの分画像を得た。免疫電気泳動の結果から最初の peak は IgM、次の peak は IgA 分画であることがわかった。

血清および初乳より得た IgA は disc 電気泳動では原点よりわずかに移動するのみであった。免疫電気泳動像では、それぞれの IgA は原点よりやや陽極側に位置していたが、血清 IgA は乳清 IgA よりもわずかながら陽極側に移動した。血清と乳清の IgA を Ouchterlony 法で分析した結果、これらの IgA は融合し、免疫化学的に等しいことがわかった (Fig. 3b)。

次にこれらの IgG および IgA の物理化学的性質について検討した。SDS 電気泳動の結果は Fig. 4 に示すとおりである。IgG₁ および IgG₂ はともに多くの band に分かれたが、bovine γ -globulin や aldorase に近い位置に主な分画が認められた (Fig. 4 A, B)。また 2-ME 処理により、この蛋白質分画は分子量の小さい 3 つの band に分かれた。血清と乳清の IgA は、原点近くの thyroglobulin と ferritin の間の位置に band が

Fig. 3a. Immunoelectrophoretical analysis of serum protein, and IgG. Upper well contain normal rat serum (S), and lower well IgG.

Fig. 3b. Ouchterlony test of rat IgA. Upper well contain anti-rat serum antiserum, lower left contain secretory IgA (SIgA) obtained from colostrum and lower right contain secouns peak in Fig. 2a.

現れた。また、2-ME 処理することにより3つあるいはそれ以上の蛋白質に分割された。

血清 IgA について、さらに蔗糖密度勾配超遠心法によって検討したが、Fig. 5 に示すとおり、血清 IgA は標準蛋白質の urease より高分子であることがわかった。

3) ラットの IgG と IgA の共通性について: Ouchterlony 法によって分析したところ、IgG と IgA の間に交差反応が見られた。さらに、抗 IgA 家免血清を IgG で吸収した後も、その抗体とラットの IgA との間に反応がみられた。

2. 子宮液中の immunoglobulin

発情前期の子宮液中に γ -globulin に相当する蛋白質が多量含有されていることは実験の結果明らかになったが^{1,3)}、さらに免疫化学的な検討を加えた。抗子宮液抗体 (AUF) と血清および血清で吸収した抗子宮液抗体 (AUF+S) に子宮液を反応させると、globulin 領域に位置する子宮液に多量に含まれている蛋白質は、AUF に血清あるいは子宮液を反応させると沈降線を形成した。しかし、吸収後の抗体に子宮液を反応させても沈降

Fig. 5. Density gradient ultracentrifugation of rat serum IgA compared to marker proteins. Sedimentation is from right to left.

Fig. 7. Density gradient ultracentrifugation of rat uterine fluid at 22:00 of proestrus compared to marker proteins.

反応は認められなかった。次に血清と乳清から得た IgG, IgA, IgM と AUF のそれぞれの間の反応では、IgG とは痕跡程度の沈降線が認められるにすぎず、子宮液中に IgG の少ないことが示された。IgM に対しては、不明瞭な沈降線が認められた。IgA と AUF と反応では極めて鋭敏な沈降線を形成し、その沈降線の位置は、血清と AUF の反応で観察された沈降線の位置とほぼ一致した。この沈降線は、血清および初乳から分離した IgA が示した沈降線よりもさらに陰極側にあり、IgG₁ の位置にまで伸びていた。IgG₁ と AUF との間には、極めて微弱な沈降線の形成しか認められなかった。

蔗糖密度勾配法により子宮液中の蛋白質の分子量を測定し、前述の IgA の分析の結果と比較検討した (Fig. 7)。その結果、子宮液の蛋白質は、catarase より分子量の小さいものが殆どであり、大きいものは少なかった。

た。しかしなが、前述の IgA の沈降位置、さらに高分子分画の位置に peak を認めた。

考 察

人やマウスの immunoglobulin については、その物理化学的、免疫化学的性質や allotype の遺伝学的性質について非常に多くの研究が見られる。しかしラットの immunoglobulin に関する研究は比較的少ないようである。初め ARNASON ら¹⁸⁾によってラットの immunoglobulin は IgG と IgX に分類され、その後、IgG には IgGa と IgGb の subclass が発見され、IgX は、その易動度が人の IgA に類似していることから IgA と考えられた。しかし、蛋白質の物理化学的性質は IgA とは異なり、 γ_1 , 7S γ_1 , あるいは IgG₁ と呼ばれている immunoglobulin に属するものの一種であった¹⁹⁾。しかし、ラットの IgA は最近になって、 γ -globulin の免疫電気泳動による沈降線について、各々の immunoglobulin が同定されることにより、IgA の位置も示された²⁰⁾。

一般に immunoglobulin の分離は種々の chromatography や電気泳動法などにより行われているが、本研究においても、IgG の分離法は DEAE cellulose を用いたイオン交換 column chromatography により、IgA の分離法は sephadex-G200 および sepharose-6B を用い column chromatography によって行った。IgG に用いる緩衝液は分離する subclass や動物の種などにより種々のものが使用されている。著者らは、リン酸緩衝液を用い、イオン交換 chromatography により IgG の分離を行った^{17,21)}。

すでにラットの外分泌液より IgA の分離は試みられているが、血清 IgA の分離はあまり行われていない。sephadex-G200 を用いた column chromatography によって IgA を単離することができなかったのも、sepharose-6B を用いた column chromatography により、塩析で得た γ -globulin からの IgA 分離を試みたところ、ほぼ単一の蛋白質を得ることができた。人血清の IgA は monomer であり分子量は分泌型 IgA の半分以下で、IgG のそれに近似しているとされている¹¹⁾。本研究においてラットの IgG および IgA についての物理化学的性質を検討した結果、IgG の分子量は約 16 万で、3つの subclass から構成されていると推定された。血清および乳清から得た IgA の分子量は IgG の約 3 倍であり、IgG 同様に 4つの subclass の存在が示唆された。さらに人とラットの immunoglobulin を比較するために、人の IgG と血清 IgA を SDS 電気泳

動により分析したところ、人の IgG の泳動像とラットの IgG の泳動像は類似していたが、ラットと人の血清 IgA の泳動像は異なり生物物理化学的に性質の異なることが明らかになった。

従来、ラットの分泌液中の IgA の分離は主に初乳を用いて行われているが、SUTECHSCHULFE ら²²⁾の初乳からの IgA の分離法を試みたが、未だかなりの混入物があった。そこで、本実験では、酢酸および硫酸による処理および sepharose-6B による column chromatography を行うことにより IgA を単離することができた。

他の動物¹⁷⁾の IgA の分離に用いられている DEAE cellulose column chromatography を応用したラットの初乳 IgA の分離法では、本実験においては他の報告^{17,22)}に示されたような良い結果は得られなかった。

免疫生殖学の研究により、雌の生殖器官に抗精子抗体が産生されると、それが不妊の原因となる可能性のあることが報告されている^{4,5)}。それらの抗体の産生される機序については、すでに多くの研究がみられるとはいえ、未だ不明の点が少なくない。特に、それらの過程における抗原の感作と、その後の生殖器官分泌液への抗体の移行について明らかにするため、種々の動物について immunoglobulin の検索および同定が試みられている。しかしながら、ラットの子宮液中の immunoglobulin に関する報告はみられない。本研究において、ラット血清中の immunoglobulin の性質を検索するとともに、子宮液中の immunoglobulin についても検討した。IgG は、発情前期から発情期の子宮液中には殆ど認められなかった。従って、交尾により子宮内に入った精子は IgG 抗体に曝される危険性は殆どないと考えられる。なお、卵管における感作については不明であるが、少なくとも妊娠初期の子宮液中の immunoglobulin の組成は血清のそれに類似しているところから²³⁾、受精卵の成長または着床時期に卵が IgG 抗体による阻害を受ける可能性がある。

IgA については、未だ不明の点があるが、子宮液中には γ -globulin が多く存在し、分子量から推定すれば IgG like であるが、免疫学的には抗 IgG 抗体とは沈降線を形成せず、むしろ抗 IgA 抗体と交差した。免疫電気泳動における沈降線はより原点に近いところ（既知の IgA に近い位置）に認められるので、子宮液に多い γ -globulin はおそらく IgA であろうと考えられる。その蛋白質の物理化学的性質は、血清および乳清から分離した IgA とは異なるもので、分子量も小さいものと思われる。

これまでの研究¹⁰⁾によって、ラットの血清 IgA は高分子型と低分子型の 2 種類があることが示唆されていることなどを考え合わせると、ラット子宮液中に特に多い血清蛋白質は、血清中の低分子の IgA が透過して子宮液中に認められるためであろうと推定される。

このように、著者らの研究によってラットの発情期の子宮液中の蛋白質組成の特異性が明らかにされたが、血清と子宮液中の immunoglobulin の組成の違いは子宮組織により制御されているものと思われる。

要 約

本報では、ラットの immunoglobulin の分離同定およびその物理化学的性質をしらべると共に、子宮液中の immunoglobulin の存在様式の特異性について検討した。

IgG と IgA は血清および初乳乳清から、塩析、gel 濾過およびイオン交換 column chromatography によって分離された。それらの物理化学的性質の検討を disc および SDS gel 電気泳動、免疫電気泳動および蔗糖密度勾配遠心分離により行ったところ、IgG と IgA の分子量、それらの subclass と免疫化学的性質が明らかにされた。

子宮液中の immunoglobulin について、免疫化学的方法により同定したところ、IgG が著しく少なく、IgA と免疫化学的に共通であり、IgA より分子量の小さい immunoglobulin が認められた。

(1976. 7. 15 受付)

文 献

- 1) 長谷川(喜)・菅原(七)・竹内(三): 本誌, 19, 26, 1973.
- 2) 長谷川(喜)・菅原(七)・竹内(三): 本誌, 19, 73, 1973.
- 3) HASEGAWA, Y., S. SUGAWARA & S. TAKEUCHI: *Tohoku J. Agr. Res.* 25, 67, 1974.
- 4) 磯島(晋): 妊孕現象に関する免疫学的研究 第 23 回日本産科婦人科学会宿題報告, 東京, 1971.
- 5) BEHRMAN, S.J.: The Mammalian Oviduct ed. B.J. BLANDAU & E.S.E. HAFEZ. The University of Chicago Press Chicago, London 1971.
- 6) EDWARDS, R.G.: Immunology and Reproduction ed. R.G. EDWARDS, International Planned Parenthood Federation London 1969.
- 7) BEHRMAN, S.J., M.E. LIEBERMAN, N. UCHIDA & R. ANSBACHER: Pathways to Conception ed. A.I. SHERMAN, C.C. THOMAS Publisher Springfield, Illinois 1971.
- 8) TOMASI, T.B. & J. BIENENSTOCK: Advances in Immunology Vol. 9 ed. F.J. DIXON and H.G. KUNKEL, Academic Press New York, London 1968.
- 9) BEER, A.E. & R.E. BILLINGHAM: Advances in Immunology Vol. 14 ed. F.J. DIXON & H.G. KUNKEL, Academic Press New York, London 1971.
- 10) 小林(邦): 生物物理化学, 18, 35, 1974.
- 11) 小林(次): 蛋白核酸酵素, 18, 828, 1974.
- 12) 松岡(雄): 免疫学・アレルギー学実験法, 進藤宙二監修, 文光堂, 東京, 1971.
- 13) WEBER, K. & M. OSBON: *J. Biol. Chem.*, 244, 4406, 1969.
- 14) DUNKER, A.K. & R.R. RUECKERT: *J. Biol. Chem.*, 244, 5074, 1969.
- 15) 林(健)・大場(義): 蛋白質核酸酵素, 17, 304, 1972.
- 16) DIEZEL, W., G. KOPPERSCHLAGER & E. HOFMAN: *Analyt. Biochem.*, 48, 617, 1972.
- 17) 白井(美)・成内(秀)・松橋(直): 免疫化学, 中山書店, 東京, 1973.
- 18) ARNASON, B.G., C. de VAUX St. CYR & P. GRABAR: *Nature*, 199, 1199, 1963.
- 19) BAZIN, H., A. BECKERS & P. OUERINJEAN: *Eur. J. Immunol.*, 4, 44, 1974.
- 20) BISTANY, T.S. & T.B. TOMASI: *Immunochem.*, 7, 453, 1970.
- 21) JONES, V.E.: *Immunology*, 16, 589, 1969.
- 22) STECHSCHULTE, D.J. & K.F. AUSTEN: *J. Immunol.*, 104, 1052, 1970.
- 23) 長谷川(喜)・菅原(七)・竹内(三): 本誌, 22, 109, 1976.

Summary

Present study was designed to isolate immunoglobulins from serum and colostrum whey, and determine immunoglobulins in uterine fluid of proestrous rat.

Results obtained were as follows:

1. Subclass of IgG and IgA in serum and colostrum whey were obtained by DEAE cellulose, sephadex-G 200 and sepharose-6B column chromatography (Figs. 1~3).
2. Physicochemical analysis of immunoglobulins were performed by SDS acrylamide gel electro-

phoresis and density gradient ultracentrifugation methods (Figs. 4, 5). Molecular weight of isolated IgG and IgA was about 16×10^4 and 50×10^4 , respectively.

3. Immunoglobulins in uterine fluid were determined by immunoelectrophoresis. Although high molecular IgA in uterine fluid determined by physicochemical analysis was very small amount, uterine fluid contained high level of the protein component reacted to serum IgA, of which molecular weight is smaller than 20×10^4 .

Immunoglobulin G was not appeared in the rat uterine fluid at 22:00 of proestrus.

Explanation of Figures

Fig. 4. SDS acrylamide gel electrophoresis of immunoglobulins.

- (A) rat immunoglobulin G_{2a}
- (B) rat immunoglobulin G_1
- (C) human serum immunoglobulin A
- (D) rat serum immunoglobulin A
- (E) rat colostrum immunoglobulin A

2ME, SDS gel electrophoretic pattern of protein treated with 2-melcaptethanol.

Fig. 6. Immunoelectrophoretic analysis of immunoglobulins and specific protein in uterine fluid at 22:00 of proestrus.

UF, uterine fluid	AUF, anti-uterine fluid antiserum
S, serum	AUF+S, AUF absorbed with serum protein

PLATE

Fig. 4.

Fig. 6.