Chronic lymphocytic leukemia の 1 症例にみられた ヒトアルブミンに対する monoclonal antibody

坂 田 茂 樹*, T.B. Tomasi, Jr., M.Z. Atassi

**A monoclonal IgM with antibody activity for human albumin
in a patient with chronic lymphocytic leukemia**

Shigeki Sakata*, T.B. Tomasi, Jr., M.Z. Atassi

Department of Immunology, Mayo Clinic, Rochester, MN. 55901, U.S.A.

**Present address: Department of Internal Medicine*

Gifu University School of Medicine, Gifu

【Summary】

Monoclonal IgM with antibody activity for human albumin was isolated. Binding between ^{125}I -IgM and HSA, BSA, fragments of HSA were studied.

In contrast of rabbit anti-HSA IgG, the monoclonal IgM did not cross react with BSA. Binding between the monoclonal IgM and HSA fragments showed that the monoclonal IgM was directed to at least three antigenetic sites of HSA.

Mechanisms of recognition of antigenic sites by the monoclonal IgM and possibility of restricted heterogeneity of the monoclonal antibody were discussed.

Key words : human serum albumin
monoclonal antibody
antigenic sites of serum albumin

I. はじめに

Monoclonal gammopathy のほとんどの症例において増加した immunoglobulin の抗体活性は明らかでないが、これまでに bacterial polysaccharides, lecithin に対する抗体活性および rheumatoid factor の活性をもつ monoclonal immunoglobulin が報告されている¹⁻³⁾。他方、細胞融合のテクニックを用いた monoclonal antibody の作成は免疫学のトピックの1つで、免疫学のみならず、生化学その他の分野でも有力な武器として用いられ

つつある。一方、タンパク質の免疫活性部位の研究も、その一次構造および高次構造が明らかになるにつれ活発となり、これまで myoglobin⁴⁾, lysozyme⁵⁾, cytochrome C^{6,7)}, myelin basic protein^{8,9)}, hemoglobin¹⁰⁾, ribonuclease¹¹⁾, chorionic gonadotropin¹²⁾, アルブミン¹³⁻¹⁷⁾などの抗原決定基が報告されている。この2つの研究の接点は、理論上、単クローンから作られる monoclonal antibody がタンパク質抗原の単一の抗原決定基に対する抗体であるという基盤に立っているといえる。われわれは、これまでにヒトおよびウシ血清アルブミンが反復した抗原決定基 (repeated antigenic structure) をもつことを明らかにし¹³⁻¹⁵⁾、その5つの主な抗原決定基を同定し合成した^{16,17)}。この研究中、白血病

Mayo Clinic, Department of Immunology, Rochester, MN 55901, U.S.A.

*現所属：岐阜大学医学部第3内科

図 1A 症例の ^{125}I -抗 HSA IgM と HSA と HSA の各フラグメントおよび BSA の immunoadsorbents との結合の滴定曲線

の患者で血清電気泳動上 monoclonal なスパイクを呈し、そのスパイク部分が IgM λ であり、ヒトアルブミンに対する抗体活性をもつ症例¹⁸⁾を経験し、この IgM がアルブミン分子のどの抗原決定基に対したものであるか検討を加えたので報告する。

II. 症例および研究方法

この症例の臨床所見, monoclonal IgM のヒトアルブミンに対する抗体活性の同定など若干の検討は既に報告している¹⁸⁾。症例は 70 歳の白人女性で、10 年前に慢性リンパ性白血病と診断されていたが、全身けん怠感、紫斑、消化管からの出血、反復する感染、肝脾腫などで Mayo Clinic に入院し消化管出血が原因で死亡した。剖検結果は reticulum cell sarcoma であった。血清電気泳動で α 部分に monoclonal なスパイクが認められ、免疫電気泳動で IgM λ と同定された。この IgM をセファデックス G 200 を用い分離し、さらに pH 2.5 の Glycine-HCl 平衡液で結合したアルブミンの分離を行った。この IgM を ^{125}I を用い Hunter と Greenwood のクロラミン T 法¹⁹⁾で標識した。ヒト血清アルブミン (human serum albumin, 以下 HSA と略す) およびウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, 以下 BSA と略す) はおのおの Calbiochem, ICN pharmaceuticals より入

^{125}I -IgM		
Immunoadsorbent	cpm bound	% bound
HSA	12200	100 %
F ₁₁₅₋₁₉₄	4200	34 %
F ₁₉₈₋₃₉₈	3500	29 %
F ₁₉₈₋₅₈₅	9700	79 %
BSA	300	2 %

図 1B A の滴定曲線上の 500 μl の immunoadsorbents でみた HSA のフラグメントと ^{125}I -抗 HSA IgM との結合 (cpm) および HSA と比較した結合率 (% bound)

手し、HSA のフラグメントは Dr. Peters (Mary Inogene Bassett Hospital, N.Y., U.S.A) から贈られた。HSA の免疫活性部位を構成するペプチドの合成は固相法を用いて行った^{16,17)}。HSA, BSA, HSA のフラグメント、ペプチドの immunoadsorbents の作成は March らの方法²⁰⁾を用いた。immunoadsorbents への非特異的結合は、myoglobin および lysozyme の immunoadsorbent を用い補正した。

III. 結果および考察

^{125}I を用いラベルした本症例の抗 HSA IgM と HSA, BSA および HSA のフラグメントの immunoadsorbent との結合の滴定曲線を図 1 に示す。 ^{125}I 抗 HSA IgM は HSA の F₁₁₅₋₁₉₄ (F: フラグメントの略) と 34%, F₁₉₈₋₃₉₈ と 29%, F₁₉₈₋₅₈₅ と 79% の結合を示した。したがって F₃₉₉₋₅₈₅ とは 50% 結合したことになる。また、以前報告した HSA の抗原決定基を構成する 4 つの合成ペプチド (図 2) との特異的な結合は認められなかった。 ^{125}I 抗 HSA IgM はまた、BSA とほとんど交叉反応を示さなかったが、これはこれまでわれわれが報告した肝硬変患者における抗 HSA 抗体²¹⁾、および家兎で作成した抗 HSA 抗体¹⁷⁾の BSA との交叉反応と大きく異なるものである。この結果から、本症例の抗 HSA 抗体が消化管免疫を介し、ミルク中に含まれる BSA により刺激され生成された抗体でないことは明らかである。Brown²²⁾ は HSA, BSA の一次構造を発表し、それらはともに 3 つの domain, 9 つの subdomain から成るとしている。BSA, HSA の間の一次構造の homology は約 85% であった。われわれは以前に、家兎抗 BSA の HSA に対する交叉反応は免疫する回数がかかるにつれ、また、おそく採血した抗血清ほど上昇することを報告した¹⁴⁾。この現象は BSA 分子のある特定の抗原決定基の immunodomi-

(a) REGIONS CARRYING ANTIGENIC SITES

Site 1:

BSA: Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro

HSA: Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro

Site 2:

BSA: Phe-Leu-Tyr-Glu-Tyr-Ser-Arg-Arg-His-Pro

HSA: Phe-Leu-Tyr-Glu-Tyr-Ala-Arg-Arg-His-Pro

Site 3:

BSA: Ala-Leu-Val-Glu-Leu-Leu-Lys-His-Lys-Pro

HSA: Ala-Leu-Val-Glu-Leu-Val-Lys-His-Lys-Pro

Site 5:

BSA: Ala-Glu-Asp-Lys-Asp-Val-Cys-Cys-Ala-Lys-Asp

HSA: Val-Glu-Ser-Lys-Asp-Val-Cys-Cys-Ala-Ala-Asp

Site 6:

BSA: Ala-Asp-Asp-Lys-Glu-Ala-Cys-Cys-Lys-Asp-Val

HSA: Ala-Asp-Asp-Lys-Glu-Thr-Cys-Cys-Lys-Glu-Val

(b) PEPTIDES SYNTHESIZED

Peptide I: Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ile-Ala-Arg-Arg-His-Pro

Peptide II: Ala-Leu-Val-Glu-Leu-Leu-Lys-His-Lys-Pro

Peptide III: Ala-Glu-Asp-Lys-Asp-Val-Gly-Gly-Ala-Lys-Asp

Peptide IV: Ala-Asp-Asp-Lys-Glu-Ala-Gly-Gly-Lys-Asp-Val

REFERENCE NON-ANTIGENIC LOCATION OF BSA

Peptide V: Tyr-Val-Pro-Lys-Ala-Phe-Asp-Glu-Lys-Leu

CONTROLS

Lysozyme Antigenic

Site 1: Arg-Gly-Gly-Arg-Gly-Glu-Gly-Gly-Arg-Lys

Site 2: Phe-Gly-Lys-Lys-Asn-Thr-Asp

図 2

(a) HSA および BSA の抗原決定基が存在すると想定された 5 箇所の一次構造を示す。

(b) 合成され免疫活性をもつことが確認されたペプチドを示す。同時に免疫活性をもたないと想定されたペプチド (peptide V) を示す。また非特異的結合のコントロールとして用いた lysozyme の antigenic site 1 および 2 の構造を示す。矢印はペプチド結合の方向を示す。

nance か、アルブミン分子の反復した抗原決定基の存在で説明がなされた¹⁴⁾。家兎抗 BSA の HSA との交叉反応は初回免疫後 7 日目で 7% だったのが、4 回免疫後の 398 日後では 42% と上昇した。また、別の家兎に HSA を免疫し、BSA との交叉反復を調べたが、3 回免疫後の 75 日目に採血した IgG の BSA との交叉性は 50.1% (家兎 HA11), 54.1% (家兎 HA 12) だった¹⁵⁾。はたしてヒトと家兎が同じ抗原決定基を認識するか結論は出ていないが、本症例の抗 HSA IgM の認識する HSA の抗原決定基は BSA と一次構造の全く異なった部分といえる。

この IgM が変性した HSA と沈降線を作り、native な HSA はその沈降線生成を抑制することから¹⁸⁾、本症例の IgM は HSA が native な状態で分子表面にでていない部分 (hidden antigenic determinants) に対する抗体の可能性はある。BSA を Freund's complete adjuvant とともに家兎に免疫した場合、分子内部にマスクされた部分に対する抗体はできないとの報告がある²³⁾。分子表面の抗原決定基を認識する限り、抗 BSA、抗 HSA とともにそれぞれ HSA および BSA と 50% 程度の交叉反応があるのであろう。しかし何らかの原因で、血中あ

るいは組織中の HSA が変性し、それに対して特定のクローンが刺激され抗 HSA 抗体ができた場合、必ずしも BSA と交叉反応する必要性はないといえる。このように考えると、ヒトと家兎がはたしてタンパク質上の同じ抗原決定基を認識するかという問題以前に、家兎 HSA 抗体を用いて同定された HSA の 4 つの抗原決定基と本症例の抗 HSA 抗体との特異的結合が認められなかったのは説明がつく。本症例の抗 HSA 抗体は電気泳動上 monoclonal な抗体であった¹⁸⁾が、その HSA のフラグメントとの結合は 1 つの domain のみでなく、3 つの domain の全てに結合し、特に C 末端の domain と 50 % の結合を示した。monoclonal antibody は、理論上、単一の抗原決定基に対応した抗体との観点から多くの研究がなされつつある。例えば、アセチルコリン受容体のアセチルコリンの結合部位にのみ結合する monoclonal antibody を作り、重症筋無力症の免疫学的研究がなされつつある²⁴⁾。また、ヒト T 細胞の subpopulation を monoclonal antibody を用いて分離する研究もなされている²⁵⁾。細胞融合のテクニックを用い、作成されたこれらの monoclonal antibody が isoelectric focusing で単一バンドを示したり、抗原と均一の結合定数をもっていても、それが抗原の一個所の抗原決定基とのみ結合するかという疑問は解決されていない。本症例の抗 HSA IgM 抗体は monoclonal antibody に関する 2 つの問題を提起している。1 つは、血清電気泳動上のパターンが monoclonal なスパイクを呈しても抗原との結合性からみた場合には依然として heterogeneity が存在してい

る可能性があること、つまりあくまで restricted heterogeneity であること、2 つめには、single clone の増殖から monoclonal antibody が生成されるにせよ、それが抗原であるタンパク質などの高分子の一個所の抗原決定基にのみ結合することは未だ証明がなされていないことである。もし single clone の増殖によりできた抗体がタンパク質の多くの部位（抗原決定基）と結合すれば、monoclonal antibody は restricted heterogeneity をもった抗体にすぎないことになる。これまでに transferrin に対する monoclonal IgG 抗体ができ hemochromatosis を来した症例²⁶⁾、lipoprotein の apoprotein に対する monoclonal 抗体のため高脂血症をきたした症例が報告されている²⁷⁾。しかしながら transferrin、および lipoprotein の抗原決定基については現在でも全くわかっておらず、これら症例を用いた monoclonal antibody とタンパク質の抗原決定基との関連は全く明らかでなかった。本症例は HSA に対する抗体活性をもつ monoclonal IgM antibody のみられた症例で、アルブミンの抗原決定基の研究をすすめていたわれわれが、その抗原決定基との結合性を調べる機会を与えられた症例である。

三浦 清 教授、奥山牧夫助教授の御校閲に深謝いたします。

本研究は、昭和 55 年 11 月第 122 回日本内科学会東海地方会で報告した。

文 献

- 1) Hannestad, K. and T.B. Christensen : Multiple M-components in a single individual. II. Studies on urinary Fab-like fragments in macroglobulinemia. *Immunochem.* 8, 917~931, 1971.
- 2) Killander, A., J. Killander, L. Philipson and R. Willen : A monoclonal γ macroglobulin complexing with lecithin. *Nobel Symp.* 3, 359, 1967.
- 3) Kritzman, J., H.G. Kunkel, J. McCarthy and R.C. Mellors : Studies of a Waldenström-type macroglobulin with rheumatoid factor properties. *J. Lab. Clin. Med.* 57, 905~917, 1961.
- 4) Atassi, M.Z. : Antigenic structure of myoglobin; The complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structure of proteins. *Immunochem.* 12, 423~438, 1975.
- 5) Atassi, M.Z. : Precise determination of the entire antigenic structure of lysozyme. *Immunochem.* 15, 909~936, 1978.
- 6) Reichlin, M. : Amino acid substitution and the antigenicity of globular proteins. *Adv. Immunol.* 20, 71~123, 1975.
- 7) Urbanski, G.J. and Margoliash, E. : Topographic determinants on cytochrome C. I, The complete antigenic structure of rabbit, mouse, and guanaco cytochromes C in rabbits and mice. *J. Immunol.* 118, 1170~1180, 1977.
- 8) Eylar, E.H. and Hashim, G.A. : Allergic encephalomyelitis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 197, 1~15, 1975.

- phalomyelitis; the structure of encephalogenic determinant. *Proc Natl. Acad. Sci.* 61, 644~650, 1968.
- 9) Hashim, GA., RD. Sharpe, EF. Carvalho and LE. Stevens : Suppression and reversal of allergic encephalomyelitis in guinea pigs with a non-encephalitogenic analogue of the tryptophan region of the myelin basic protein. *J. Immunol.* 116, 126~130, 1976.
- 10) Kazim, AL. and Atassi, MZ. : Prediction and confirmation by synthesis of two antigenic sites in human hemoglobin by extrapolation from the known antigenic structure of sperm-whale myoglobin. *Biochem. J.* 167, 275~278, 1977.
- 11) Lloyd GC. Jr. and HA. Scheraga : Location of the antigenic determinants of bovine pancreatic ribonuclease. *Biochemistry* 18, 4386~4395, 1979.
- 12) Matsuura, S., M. Ohashi, H-C. Chen and GD. Hodgen : A human chorionic gonadotropin-specific antiserum against synthetic peptide analogs to the carboxyl-terminal peptide of its β -subunit. *Endocrinol.* 104, 396~401, 1979.
- 13) Sakata, S. and MZ. Atassi : Immunochemistry of serum albumin-V. A time dependent examination of the antibody response to bovine serum albumin by the activity of its third domain. *Molec. Immunol.* 16, 451~456, 1979.
- 14) Sakata, S. and MZ. Atassi : Immunochemistry of serum albumin VI. A dynamic approach to the immunochemical cross-reactions of proteins using serum albumins from various species as models. *Biochim. Biophys. Acta.* 576, 322~332, 1979.
- 15) Sakata, S., RG. Reed, T. Peters, Jr. and MZ. Atassi : Immunochemistry of serum albumin-VIII. The antigenic reactivity of the third domain of bovine serum albumin residues in the last sub-domain. A dynamic examination of the change of antibody affinity and specificity. *Molec. Immunol.* 16, 703~709, 1979.
- 16) Atassi, MZ., S. Sakata and AL. Kazim : Localization and verification by synthesis of five antigenic sites of bovine serum albumin. *Biochem. J.* 179, 327~331, 1979.
- 17) Sakata, S. and MZ. Atassi : Immunochemistry of serum albumin. X. Five major antigenic sites of human serum albumin are extrapolated from bovine albumin and confirmed by synthetic peptides. *Molec. Immunol.* 17, 139~142, 1980.
- 18) Hauptman, S. and TB. Tomasi, Jr. : A monoclonal IgM protein with antibody-like activity for human Albumin. *J. Clin Invest.* 53, 932~940, 1974.
- 19) Hunter, WM. and FC. Greenwood : Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194, 495~496, 1962.
- 20) March, ST., I. Parikh and P. Cuatrecasas : A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Analyt. Biochem.* 60, 149~152, 1974.
- 21) Sakata, S., TB Tomasi, Jr. and MZ Atassi : (Manuscript in preparation)
- 22) Brown, J.R. : Structural origins of mammalian albumin, *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp Biol.* 35, 2141~2144, 1976.
- 23) Ishizaka, T., DH. Campbell and K. Ishizaka : Internal antigenic "determinants in protein molecules. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103, 5~9, 1960.
- 24) Lennon, V.A. (personal communication)
- 25) Reinherz, EL., PC. Kung, G. Goldstein and SF. Schlossman : Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4061~4065, 1979.
- 26) Wernet, P., B. Kickhöfen and M. Westershausen : A monoclonal immunoglobulin with combining specificity for transferrin in a case of hemochromatosis. *Clin. Res.* 20, 521 (Abst), 1972.
- 27) Lewis, LA. and IH. Page. : An unusual serum lipoprotein-globulin complex in a patient with hyperlipemia. *Am. J. Med.* 38, 286~297, 1965.