<原 著>

A型肝炎における低分子 (7S) IgM 型 HA 抗体の検出とその動態

横田 勝至 菅 充生 小玉 俊典 佐藤 喜夫
 平根 敏光 赤保内良和 谷内 昭*

要 旨: A型肝炎ウイルス感染症における血清中 IgM 型 HA 抗体の分子性状を分析し, 病期による抗体分子の出現動態について検討した. その結果, IgM 型 HA 抗体の抗体活性は19S 領域と7S 領域の IgM に認められ, A型肝炎の感染初期には19S IgM の抗体活性が優位であり, 肝炎の経過とともに7S IgM の抗体活性が優位となった. 7S と19S の IgM 型 HA 抗体の比 (LMW/HMW 比) は肝炎発病61日以降に有意 ($p<0.05$) な高値を示し, さらに LMW/HMW 比と肝炎病日との間に有意 ($p<0.01$) な正の相関を認めた. 以上より, A型肝炎ウイルス感染症における IgM 型ウイルス特異抗体産生は, 経過中に高分子型 (19S) から低分子型 (7S) へ変換すると考えられた.

索引用語: IgM 型 HA 抗体 (低分子) IgM 型 HA 抗体 (高分子) IgM (7S)
 A型肝炎

はじめに

A型肝炎ウイルス感染症において, 感染初期に IgM 型 HA 抗体が, ついで IgG 型 HA 抗体が産生されることは既に確認され, IgM 型 HA 抗体はA型肝炎の血清学的診断に応用されている. ウイルス感染で生体の防御機構の一次免疫応答を示す IgM は, 近年種々の疾患において pentamer (19S) のほかに monomer (7S) の IgM として存在することが明らかになり, またその一部には特異的なウイルス抗体活性が認められている.

今回, A型肝炎患者血清を高速液体クロマトグラフィー (HLC) で分画し, 各分画中の IgM 型 HA 抗体活性を測定した結果, 7S IgM 分画にも HA 抗体活性の存在することを明らかにしたので報告する.

対象および方法

1. 対象

対象は IgM 型 HA 抗体陽性の A型肝炎 9 例, 25 検体である. 血清は使用するまで -20°C に保存した.

2. 患者血清の分画

東洋ソーダ社製 HLC 803A 装置を使用し, カラムは G3000SW 2 本を用いて患者血清の分画を行なった. 血清は PBS で 8 倍に希釈し, その $20\mu\text{l}$ をカラムに添

加して, 0.15M NaCl 加 0.02M 酢酸緩衝液 ($\text{pH } 6.0$) で溶出し $640\mu\text{l}$ ずつ分画採取した.

3. IgM 型 HA 抗体の測定

HLC 分画中の IgM 型 HA 抗体は HAVAB-M EIA キット (Dainabot) を用いて測定し, 抗体価は cut off index (CI) で示した. 分子量の明らかな標準蛋白試料 (gel filtration calibration kit: Pharmacia 社) と比較して, 高分子 (19S; HMW) IgM 型 HA 抗体および低分子 (7S; LMW) IgM 型 HA 抗体を判定した. また IgM 型 HA 抗体の溶出曲線面積から相対的に低分子および高分子 IgM 型 HA 抗体量を求め, LMW/HMW 比で表わした.

4. affinity chromatography による IgM の単離

CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia 社) 30g に抗ヒト IgM 約 400mg を結合させて作製した IgM-Sepharose 4B カラムに患者血清を添加して IgM を結合させ, 10mM EDTA および 1.5M NaCl 加 5mM リン酸緩衝液を極限緩衝液とする直線食塩濃度勾配で IgM を溶出した.

5. IgM の還元

患者血清に 2-mercaptoethanol (2ME) が終濃度 0.1M になるように加え, 37°C で 1 時間 incubation して IgM を分解, 失活させた.

* 札幌医科大学第 1 内科 (主任: 谷内 昭教授)

<受付日 61 年 11 月 14 日>

成 績

1. 低分子 IgM 型 HA 抗体の基礎的検討

(a) HLC 分画中の IgM 型 HA 抗体価

A型肝炎発病44日の血清を用いた HLC 分画の血清蛋白の溶出像、および対応する IgM 型 HA 抗体の抗体価を Fig. 1 に示した。IgM 型 HA 抗体は void volume に一致する高分子領域 (19S) に二峰性のピークと、IgG 分画に一致する低分子領域 (7S) に単峰性のピークが検出され、前者は既知分子量試料の標準曲線より分子量66万以上、後者は約15万であった。さらに

Fig. 1 HLC elution patterns of IgM anti-HA (—) and serum proteins (---) in a patient with hepatitis A.

Fig. 2 HLC elution pattern of IgM anti-HA. A sample was obtained with anti-IgM affinity chromatography.

affinity chromatography を用いて同血清より IgM を単離して、HLC で分画し IgM 型 HA 抗体を測定すると、同様に低分子領域にも抗体活性が認められた (Fig. 2).

(b) 血清保存状態の影響

血清の凍結融解の影響をみるべく、処置前と10回凍結融解した血清を同様に HLC で分画し、IgM 型 HA 抗体を測定したが、凍結融解の前後で IgM 型 HA 抗体の溶出曲線の変化は認められなかった。

(c) 2ME 処理の影響

2ME 処理前および処理後血清を HLC で分画し、分画中の IgM 型 HA 抗体を測定した結果を Fig. 3 に示した。2ME 処理血清のいずれの分画においても IgM 型 HA 抗体活性は認められなかった。

2. A 型肝炎の経過による低分子 IgM 型 HA 抗体の変動

3 歳女兒の A 型肝炎の急性期 (A: 発病13日)、回復期 (B: 発病43日) および治癒期 (C: 発病106日) 血清を HLC で分画し、分画中の IgM 型 HA 抗体を測定した結果を Fig. 4 に示した。急性期には 19S IgM 型 HA 抗体が主体であり、次第に 19S IgM 型 HA 抗体の減少があり、治癒期には 7S IgM 型 HA 抗体が優位となった。A 型肝炎の経過による IgM 型 HA 抗体価の変動と、それに占める 7S IgM 型 HA 抗体の割合を

Fig. 3 Effect of 2 mercaptoethanol (2ME) on IgM anti-HA.

(a) PBS treated sample, (b) 2ME treated sample

Fig. 4 Changes of low molecular weight and high molecular weight IgM anti-HA during the course of hepatitis A.

A) 13days after onset of illness, B) 43days after onset of illness, C) 106days after onset of illness

Fig. 5 Changes of whole IgM anti-HA and the ratio of low molecular weight (LMW) IgM anti-HA to whole IgM anti-HA during the course of hepatitis A.

Table 1 Comparison of the ratio of low molecular weight IgM anti-HA to high molecular weight IgM anti-HA (LMW/HMW ratio) between the days after onset of illness and age. Value are the mean $\pm$ SD.

Days after onset	Adult	Child	p-value
1- 60days	0.15 $\pm$ 0.12 n=4	0.34 $\pm$ 0.28 n=9	N.S.
61-120days	0.47 $\pm$ 0.10 n=3	1.20 $\pm$ 0.77 n=40	N.S.
p-value	p<0.05	p<0.05

Fig. 6 Correlation between the ratio of low molecular weight IgM anti-HA to high molecular weight IgM anti-HA (LMW/HMW ratio) and the days after onset of illness.

Fig. 5に示したが、経過とともに7S IgM型HA抗体の占める比率の増加が認められた。

3. 肝炎の経過による LMW/HMW 比の変動

肝炎発病60日以前と61日以降のLMW/HMW比を比較すると、後者は有意($p<0.05$)の高値を示した。しかし大人と子供のLMW/HMW比の間に差は認められなかった(Table 1)。さらにLMW/HMW比と肝炎病日とを比較すると、両者は有意な正の相関($r=0.66$, $p<0.01$)を示した(Fig. 6)。

4. LMW/HMW 比と臨床検査成績との関係

LMW/HMW比と、他の臨床検査成績との関係をTable 2に一括して示したが、LMW/HMW比と血清IgM値、GPTおよびIgM型HA抗体価とは有意な負の相関が認められ、HA抗体価とは有意な正の相関が認められた。

考 案

A型肝炎におけるIgM型HA抗体の分子性状を検

Table 2 Correlation coefficients of the ratio of low molecular weight IgM anti-HA to high molecular weight IgM anti-HA (LMW/HMW ratio) among IgM anti-HA, anti-HA, serum IgM and liver function tests.

	n	correlation coefficient	p-value
IgM HA	25	-0.78	$p<0.01$
anti-HA	25	0.63	$p<0.01$
IgM	25	-0.60	$p<0.01$
GPT	25	-0.53	$p<0.05$
GOT	25	-0.38	NS
T.Bil	25	-0.24	NS

討した結果、19S領域のIgMのほかに、低分子(7S)のIgMにもHA抗体活性のあることを明らかにした。

一般に血清IgMはpentamer(19S)として存在しているが、SLEやマクログロブリン血症¹⁾、肝疾患ではPBCや非B型慢性活動性肝炎の一部²⁾、またはある種の感染症で一部は低分子量の単量体として存在していると報告されている。7S IgMはBリンパ球の表面免疫グロブリンとして認められるが³⁾、血清中に遊離の形で存在する7S IgMの由来、産生部位については、まだ充分には明らかにされていない。

しかし、今回の成績でも示したように、血清の凍結融解によりその抗体活性の分子性状に差異の認められないことから、人工的に19S IgMの分解によって7S IgMが出現することは考え難く、Bushらも血清の凍結融解で7S IgMの濃度に変化はないと報告しており⁴⁾、他に類似の報告もみられる^{5,6)}。

また、発生学的な見地からみると、下等脊椎動物においてヒトのIgMに相当する免疫グロブリンは19Sと7Sが存在しているが、7Sが優位となっている⁷⁾。この点から考えると、ヒトのある種の疾患において血清中に7S IgMが出現してくることは、系統発生と個体発生の関連からみて興味深い。

一方、抗体活性の面からは、SjogrenらはB型慢性肝炎において19S IgM型HBc抗体のほかに7S領域のIgMにもHBc抗体活性のあることを初めて明らかにし⁸⁾、さらにTsudaらは急性肝炎で19S、慢性肝炎で7SのIgM型HBc抗体が優位であることから、IgM型HBc抗体の分子性状から両者の鑑別を試み報告している⁹⁾。

今回、A型肝炎において肝炎の経過によるIgM型

HA抗体の分子性状を検討すると、HAVの感染初期に19S IgMのHA抗体活性が優位であり、治癒期には7S IgM型HA抗体が優位となり、HAV感染の約4カ月の間にIgM型HA抗体は高分子型から低分子型に変換することを明らかにした。

著者らはB型肝炎患者血清中のIgA型HBc抗体を測定し、HBVの一過性感染でpolymer型IgA、持続性感染でmonomer型IgAがその抗体活性の主体であることを認め¹⁰⁾、さらにB型肝炎患者末梢血リンパ球をPWMで刺激し産生されるIgA型HBc抗体の分子性状を分析し、血清中の測定結果と同じくHBVの一過性感染でpolymer型IgA、持続性感染でmonomer型IgAがその抗体活性の主体であることを明らかにし、IgA型ウイルス特異抗体は感染の遷延に伴って高分子型から低分子型へ変換することを報告した¹¹⁾。また、細菌の感染において反応するIgA型特異抗体でも同様な現象が認められるという最近の報告もある¹²⁾。

このように、HBV感染症では一次免疫応答と二次免疫応答において反応するIgA型ウイルス特異抗体は、高分子型から低分子型へ変換する現象が証明されているが、一次免疫応答において反応するIgM型ウイルス特異抗体も短期間の間に高分子型から低分子型へ変換することは現在までの報告にみられない。

IgA型ウイルス特異抗体のみならずIgM型ウイルス特異抗体の分子性状が、高分子型から低分子型へ変換するような現象が、肝炎ウイルス感染症において特異的な反応なのか、あるいは個体の免疫応答において普遍的に認められるのか、また個体の免疫応答にどのように関与しているのか、今後さらに検討を加えたい。

結 語

A型肝炎患者血清中のIgM型HA抗体の分子性状を検討し以下の成績を得た。

1. 19SのIgM型HA抗体のほか、7Sに一致する低分子IgM型HA抗体が存在した。
2. HA抗体活性は肝炎発病初期には19S IgMが主体であり、次第に7S IgMが優位となった。
3. LMW/HMW比と肝炎病日の間に有意($p < 0.01$)な正の相関が認められた。

文 献

- 1) Stobo JD, Tomasi TB Jr: The low molecular

- weight immunoglobulin antigenically related to 19S IgM. *J Clin Invest* 46: 1329—1337, 1967
- 2) Fakunle YM, Aranguibel F, De Villiers D, et al: Monomeric (7S) IgM in chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 38: 204—210, 1979
- 3) Vitetla E, Baur S, Uhr JW: Cell surface immunoglobulin. II. Isolation and characterization of immunoglobulin from mouse splenic lymphocytes. *J Exp Med* 134: 242—264, 1971
- 4) Bush ST, Swedlund HA, Gleich GJ: Low molecular weight IgM in human sera. *J Lab Clin Med* 73: 194—201, 1969
- 5) Solomon A, McLaughlin CL: Biosynthesis of low molecular weight (7S) and high molecular weight (19S) immunoglobulin M. *J Clin Invest* 49: 150—160, 1970
- 6) Dammacco F, Giustino V, Bonomo L: The occurrence of serum 7S IgM in diseases associated with immunoglobulin abnormalities. *Int Arch Allergy* 38: 618—626, 1970
- 7) Marchalonis J, Edelman GM: Phylogenetic origins of antibody structure. *J Exp Med* 122: 601—618, 1965
- 8) Sjogren MH, Lemon SM: Low-molecular weight IgM antibody to hepatitis B core antigen in chronic infections with hepatitis B virus. *J Infect Dis* 148: 445—451, 1983
- 9) Tsuda F, Naito S, Takai E, et al: Low molecular weight (7S) immunoglobulin M antibody against hepatitis B core antigen in the serum for differentiating acute from persistent hepatitis B virus infections. *Gastroenterology* 87: 159—164, 1984
- 10) 菅 充生, 赤保内良和, 吉崎栄泰, 他: IgA型HBc抗体の検出とその臨床的意義. *肝臓* 26: 689—695, 1985
- 11) 菅 充生, 横田勝至, 小玉俊典, 他: B型肝炎における患者末梢血リンパ球のIgA型HBc抗体産生能. *日消誌* 84: 127, 1987
- 12) Mascart-Lemone F, Duchateau J, Oosterom J, et al: Serum IgA antibody responses to mucosal and parenteral antigenic stimuli. Abstract of 6th International Congress of Immunology, 1986, p52

Low molecular weight IgM antibody to hepatitis A virus in sera from the patients with hepatitis A virus infection

Katsuji YOKOTA, Mitsuo SUGA, Toshinori KODAMA, Yoshio SATO,
Toshimitsu HIRANE, Yoshikazu AKAHONAI, and Akira YACHI*

The molecular form of IgM antibody to hepatitis A virus (IgM anti-HA) was analysed by high speed liquid chromatography and enzyme immunoassay in 25 sera from 9 patients with hepatitis A virus infection. IgM anti-HA was detected in not only high molecular weight (HMW) IgM fractions but also low molecular weight (LMW) ones. HMW IgM anti-HA was predominant in the sera with an early phase of hepatitis A. In contrast, LMW IgM anti-HA was predominant in the sera with a late phase of illness. A significant correlation ($p<0.01$) was found between the ratio of LMW IgM anti-HA to HMW IgM anti-HA and the days after onset of illness. These findings suggest that the molecular form of IgM anti-HA may switch from HMW to LMW during the course of hepatitis A.

* Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College (Sapporo)
(Chief: Prof. Akira YACHI)