抗唾液免疫ニワトリ血清中の 抗ルイス抗体について

中島たみ子・矢沢 伸・古川 研

群馬大学医学部法医学教室

(主任: 古川 研教授)

(昭和52年8月31日受付)

ルイス式血液型に関連した動物の免疫血清については、1939年上山良治¹⁾が非分泌型のヒト唾液をニワトリに注射して、現在の抗 Le^a 抗体に当る抗 T 沈降素を作ったのが最初である。その後、石沢、²⁾ 浅香³⁾ はアラビヤゴムで、須山⁴⁾ は桃、桜などの樹脂でニワトリを免疫して、それぞれ抗 T 沈降素が産生されるのを認めた。また、遠山⁵⁾ はブソイドムチン性卵巣囊腫液でウサギを免疫して、抗 T 沈降素及び抗 T 不完全寒冷凝集素の産生に成功し、津金沢⁶⁾ は非分泌型唾液を山羊に免疫して抗 T 凝集素を得た。さらに、抗 T 凝集素や沈降素は唾液の他に精液⁷⁾ 尿⁸⁾、胆汁、⁹⁾ 胃液、¹⁰⁾ 胎便、¹¹⁾ 初乳及び羊水¹²⁾ などの人体諸分泌液をはじめとして、アラビヤゴムや種々の樹脂¹³⁾、リパーゼや魚貝類¹⁴⁾ などを動物に免疫しても得られることがわかった。ルイス式血液型の抗 Le^a 凝集素は、1946年 Mourant¹⁵⁾ によって、抗 Le^b 凝集素は、1948年 Andresen¹⁶⁾ によってヒト血清中に見出され、 $Le(a+b-)$ 、 $Le(a-b+)$ 及び $Le(a-b-)$ の3型に分類された。ルイス式血液型は唾液中のABH物質の分泌型、非分泌型と関係があり¹⁷⁾、 $Le(a+b-)$ 型は非分泌型で唾液中に Le^a 物質を分泌し、 $Le(a-b+)$ 型は分泌型で唾液中にABH物質の他 Le^b と Le^c 物質を分泌している。また $Le(a-b-)$ 型は、分泌型はABH物質を分泌しているが、ルイス型物質は分泌しておらず、 $Le(a-b-)$ 型の非分泌型は、ABH及びルイス型物質をいずれも分泌していない。そして、この抗 Le^a 抗体も種々の動物にヒトの水溶性型物質を免疫することによって得られている。Glynn ら¹⁸⁾ はヒトの卵巣囊腫液の Le^a 型物質を溶血性連鎖状球菌に吸着させたもの

でウサギを免疫すると、抗 Le^b 凝集素が作られることを明らかにした。Iseki ら¹⁹⁾ は、分泌型のヒト唾液を濃縮したものでウサギを免疫して抗 Le^a と抗 Le^b 不全寒冷凝集素を作製し、更に $Le(a-b-)$ 型のヒト唾液でウサギを免疫すると、 $Le(a-b-)$ 型の血球とのみ特異的に反応する抗 Le^c 凝集素及び沈降素が作られることを明らかにした。Brown ら²⁰⁾ や Levine and Celano²¹⁾ は、ヒト唾液をそれぞれウサギに注射して抗 Le^a 抗体を作り、Baer ら²²⁾ は、卵巣囊腫やフェノール抽出したヒト唾液でニワトリを免疫してそれぞれ抗 Le^a 抗体が産生されたことを報告している。また、Kerde ら²³⁾ や Marcus ら^{24) 25)} は、ヒト卵巣囊腫液をヤギに免疫して抗 Le^a と抗 Le^b 凝集素を作っている。Potapov²⁶⁾ は $Le(a-b-)$ 型の分泌型のヒト唾液をヤギに注射して、分泌型の $Le(a-b-)$ 型血球とだけ反応する抗体が産生されたことを認め、抗 Le^d と名付けて報告した。Gunson and Latham²⁷⁾ は妊婦血清中に $Le(a-b-)$ 型で非分泌型のヒトの血球と特異的に反応する抗体を見出し、これを抗 Le^c と名付けた。抗 Le^c 物質は、 $Le(a-b-)$ 型の非分泌型のヒトの唾液中に存在し、 $Le(a+b-)$ 型及び $Le(a-b-)$ 型の分泌型唾液中には少量含まれていた。更に Potapov²⁸⁾ は、ヒト唾液をヤギに注射して抗 Le^a 、抗 Le^b 、抗 Le^c 、抗 Le^d 抗体の他、更に抗 Le^s (抗 $Le^b + Le^d$)、抗 Le^{ns} (抗 $Le^a + Le^c$)、抗 Le^m (抗 $Le^b + Le^c$)、抗 Le^x (抗 $Le^a + Le^b$) 抗体を体製し得たことを報告している。

ここでは、ヒトの唾液をニワトリに免疫して得られた抗 Le^a 抗体及び抗 Le^b 抗体の性状について報告する。

実験材料と方法

1) 唾液: OLe(a+b-) 非分泌型, OLe(a-b+) 分泌型, OLe(a-b-) 非分泌型及び分泌型唾液をとり, 100°C, 20分間加熱後, 遠心して上清を用いた. 一部は凍結乾燥して保存した.

2) 免疫方法: OLe(a+b-) 非分泌型及び OLe(a-b+) 分泌型唾液を 2 日おきに 3cc ずつ 6 回ニワトリの翼静脈に注射し, 最終免疫日から 1 週間後に試験採血し, 抗体産生を認めたものは全採血した. 抗体産生が認められなかったものは, 更に 3cc ずつ 5 回追加免疫し採血した.

3) 血球: 作用血球は, 洗浄後の遠心沈殿血球に等量の 1% パパインを加え, 37°C で 30 分間放置後, 生理的食塩水で 3 回洗浄し, 2% パパイン処理血球浮遊液を用いた. 吸収用には, OLe(a+b-), OLe(a-b+) 型のヒト血球を 10 倍量の生理的食塩水で 3 回洗浄した生血球と上述の方法で処理したパパイン処理血球とを用いた.

4) 吸収方法: 血球による吸収は, 洗浄血球を抗

血清に加え, よく混合し, 4°C に置き最高 30 分後に 2,000 RPM で 10 分間遠心して上清を分離した. 唾液による吸収は, 煮沸遠心後の唾液を抗血清に加え, 4°C で 16 時間後, 10,000 RPM で 15 分間遠心して, 上清を分離した.

5) 抗 Le^a 及び抗 Le^b 標準血清: ヒトの抗 Le^a 及び Le^b 抗体と井関ら¹⁹⁾ の方法によって濃縮唾液を免疫したウサギの抗 Le^a 及び抗 Le^b 抗体を用いた.

6) 糖による抗体の吸収試験: 単糖は市販のものをうい, オリゴ糖は人乳から分離したものをういた. 凝集素の阻止試験は, 倍数稀釈した糖に凝集素価 4 倍の抗血清を加え, 2 時間後に血球と反応させ, 凝集阻止価を判定した. 沈降素の反応阻止試験は, 1% のゼラチン溶液で糖を倍数稀釈し, 抗血清に対して 1/4 量を加え, よく攪拌して 4°C で 16 時間放置後, 20 倍に稀釈して沈降素価(抗原価)を 1 倍に調整した唾液を反応させ, 沈降阻止価を判定した. 沈降素の吸収試験は, 抗血清に 1/4 量の糖を加え, 4°C で 16 時間後に倍数稀釈した唾液との沈降反応によって沈降素価(抗原価)の低下を

表 1: 唾液免疫ニワトリ血清中の抗 Le^a 及び Le^b 凝集素

免疫唾液	吸収血球*	凝集素価	
		OLe(a+b-) 型 血球*	OLe(a-b+) 型 血球*
OLe(a+b-) 非分泌型 唾液	OLe(a-b+) 型 血球	8	0
OLe(a-b+) 分泌型 唾液	OLe(a+b-) 型 血球	0	8

* パパイン処理血球

表 2: 唾液免疫ニワトリ血清中の抗 Le^a 及び抗 Le^b 沈降素

免疫唾液	吸収唾液	沈降素価			
		OLe(a-b-) 非分泌型唾液	OLe(a-b-) 分泌型唾液	OLe(a+b-) 非分泌型唾液	OLe(a-b+) 分泌型唾液
OLe(a+b-) 非分泌型唾液	OLe(a-b-) 分泌型唾液	0	0	80	0
OLe(a-b+) 分泌型唾液	OLe(a-b-) 分泌型と OLe(a+b-) 非分泌型唾液	0	0	0	80

判定した。沈降反応は全て重層法で行った。

実験成績

1) 抗唾液免疫トリ血清中の抗 Le^a 及び抗 Le^b 凝集素

表 1 に示すように、OLE (a+b-) 非分泌型唾液で免疫したニワトリ血清を、等量の OLE (a-b+) 分泌型生血球と、1.5 倍量のババイン処理した血球で吸収すると、OLE (a+b-) 型ババイン処理血球と反応する抗 Le^a 凝集素が証明された。また、OLE (a-b+) 分泌型唾液で免疫したニワトリ血清を、等量の OLE (a+b-) 型生血球と 1.5 倍量のババイン処理血球で吸収すると、OLE (a-b+) 型ババイン処理血球と反応する抗 Le^b 凝集素が証明された。これらの抗 Le^a 及び抗 Le^b 凝集素は 4℃ で最も強く反応する不完全抗体で、免疫血清中には、生血球と反応するいわゆる完全抗体の

性状をもつ抗 Le^a と抗 Le^b 凝集素の産生は認められなかった。

2) 抗唾液免疫トリ血清中の抗 Le^a、抗 Le^b 沈降素

表 2 に示すように、OLE (a+b-) 非分泌型唾液で免疫したニワトリ血清を、OLE (a-b-) 分泌型唾液半量で吸収すると、OLE (a+b-) 非分泌型唾液と特異的に反応する抗 Le^a 沈降素が証明された。また OLE (a-b+) 分泌型唾液で免疫したニワトリ血清を、半量の OLE (a-b-) 分泌型唾液と半量の OLE (a+b-) 非分泌型唾液で吸収すると、OLE (a-b+) 分泌型唾液に特異的に反応する抗 Le^b 沈降素が証明された。

3) 単糖及びオリゴ糖による抗体の吸収試験

型物質を構成する単糖及び人乳オリゴ糖による抗 Le^a 凝集素、抗 Le^b 凝集素の凝集阻止試験の結果は、表 3 のようである。ニワトリの凝集素は、

表 3：糖による凝集阻止試験

糖	血球凝集反応を阻止する糖の最少量 (mg/ml)					
	ニワトリ血清		ウサギ血清		ヒト血清	
	抗 Le ^a	抗 Le ^b	抗 Le ^a	抗 Le ^b	抗 Le ^a	抗 Le ^b
L-Fucose	50	—	—	—	—	—
D-Galactose	25	—	50	—	—	—
N-Acetyl-D-galactosamine	—	—	—	—	—	—
N-Acetyl-D-glucosamine	—	—	—	—	—	—
Lactose	50	—	50	—	—	—
Lacto-N-tetraose*	—	—	2.5	—	—	—
Lacto-N-fucopentaose II**	0.63	—	0.02	—	0.08	0.3
Lacto-N-difucohexaose I***	—	0.16	0.7	0.04	0.63	0.08

—；単糖及び lactose は 100 mg/ml，他のオリゴ糖は 5 mg/ml で凝集反応を阻止しない。

*Lacto-N-tetraose

Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc

**Lacto-N-fucopentaose II

Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc

***Lacto-N-difucohexaose I

Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc

Le^a 型の決定群の糖鎖の構造である α -(1→4)-fucosyl 基と β -(1→3)-galactosyl 基を非還元末端にもつ Lacto-*N*-fucopentaose II (LNF-II) で最も強く阻止され、 β -galactosyl 基をもつ lactose や D-galactose でも弱く、L-fucose でも僅かに阻止された。またニワトリの抗 Le^b 凝集素は、Le^b 型の決定群の糖鎖の構造である α -(1→2)-と α -(1→4)-fucosyl 基が隣り合って非還元末端に結合している Lacto-*N*-difucohexaose I (LND-I) で特→4)-fucosyl 基が隣り合って非還元末端に結合し凝集素は、LNF-II で強く阻止されるが、LND-I や Lacto-*N*-tetraose (LNT) でもやや弱く、D-galactose や lactose でも弱く阻止された。ウサギの Le^b 凝集素もニワトリと同様に LND-I で特異的に反応を阻止された。ヒトの抗 Le^a 凝集素は、LNF-II で最も強く LND-I でもやや弱く阻止されるが、他の単糖やオリゴ糖では阻止されなかつ

た。ヒトの抗 Le^b 凝集素は、LND-I で最も強く、LNF-II でやや弱く阻止された。つぎに、これらの糖を用いてニワトリ血清中の抗 Le^a 及び抗 Le^b 沈降素に対する反応阻止力を吸収試験で比較してみた。結果は表 4 に示すように、抗 Le^a 沈降素は LNF-II で完全に吸収される他、galactose, lactose, LNT, LND-I でも完全に吸収された。これに対し抗 Le^b 沈降素は、LNF-II と LND-I とによって完全に吸収された。そこで、LNF-II と LND-I の反応阻止力の差を、ヒト唾液と抗血清の沈降反応阻止試験で調べてみると表 5 のように、抗 Le^a 沈降素では、LNF-II が LND-I より強く抗 Le^b 沈降素は逆に LND-I が LNF-II より強く阻止した。

考 察

ヒトの唾液でニワトリを免疫することによって、

表 4：糖による沈降素の吸収試験

単糖, オリゴ糖	沈 降 反 応							
	抗 Le ^a				抗 Le ^b			
	OLe(a+b+) 非分泌型唾液				OLe(a-b+) 分泌型唾液			
	10	20	40	80	10	20	40	80
未 吸 収	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Fucose*	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose*	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl-D-galactosamine*	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl-D-glucosamine*	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose*	+	+	+	+	+	+	+	+
Lacto- <i>N</i> -tetraose**	+	+	+	+	+	+	+	+
Lacto- <i>N</i> -fucopentaose II**	+	+	+	+	+	+	+	+
Lacto- <i>N</i> -difucohexaose I**	+	+	+	+	+	+	+	+

*10%溶液25 μ lを抗血清100 μ lに加えた。

**0.5%溶液25 μ lを抗血清100 μ lに加えた。

表 5：糖による沈降阻止試験

ヒト唾液との反応を完全に阻止する糖の最少量 (mg/ml)		
	抗 Le ^a	抗 Le ^b
Lacto- <i>N</i> -fucopentaose II	0.313	1.25
Lacto- <i>N</i> -difucohexaose I	0.625	<0.313

抗体価8倍の抗Le^a凝集素及び抗Le^b凝集素を作ることが出来た。また抗Le^a及び抗Le^b沈降素価はそれぞれLe(a+b-)型及びLe(a-b+)型唾液に対して80倍であった。これらの抗体の単糖及び人乳から分離したルイス式血液型物質に関連したオリゴ糖²⁹⁾による吸収試験を行い、抗Le^a抗体及び抗Le^b抗体の特異性について調べてみた。ニワトリとウサギの抗Le^a凝集素は、LNF-IIで強く阻止されるが、lactoseやgalactoseでも阻止され、fucoseでも僅かに阻止されるので、非還元末端の α -(1→4)-fucosyl基よりも、(1→3)結合の β -galactosyl基により強い親和性を示していることがわかった。またニワトリとウサギの抗Le^b凝集素は、fucose, galactoseなどの単糖では全く阻止されず、Le^b型物質の糖鎖構造を持ったLND-Iによって非常によく阻止され特異性の高い凝集素である。一方、ヒトの抗Le^a及び抗Le^b凝集素は、いずれもLNF-IIとLND-Iとで反応を阻止されるが、抗Le^aはLNF-II、抗Le^bはLND-Iで極めて強く阻止され、それぞれのオリゴ糖の構造に対して特異性の高い凝集素であることがわかった。またニワトリの抗Le^a沈降素も凝集素と同じようにLNF-IIで強く阻止されるが、 β -galactosyl基をもつオリゴ糖やgalactoseでも強く阻止され、fucoseでも弱く阻止された。これに対し、ニワトリの抗Le^b沈降素は、LND-Iで強く阻止され、オリゴ糖の構造に対して特異性をもった沈降素であった。

結 論

OLe(a+b-)非分泌型、OLe(a-b+)分泌型のヒト唾液をニワトリに免疫することによって、パパイン処理血球と反応する凝集素価それぞれ8倍の抗Le^aと抗Le^b凝集素及び唾液に対する沈降素価80倍の抗Le^aと抗Le^b沈降素を作ることが出来た。ニワトリとウサギの抗Le^a抗体は、LNF-IIで最も強く阻止されるので、 α -(1→4)-fucosyl基と β -(1→3)-galactosyl基が重要であるが、galactoseやlactoseなどでもやや強く阻止され、fucoseでは僅かに阻止されるので、 α -(1→4)-fucosyl基よりも β -(1→3)-galactosyl基により強い親和性を持つことがわかった。また抗Le^b抗体は、LND-Iにのみ強い特異性をもつので、隣り合った α -(1

→2)-, α -(1→4)-fucosyl基に対し、親和性をもつことが確かめられた。またヒトの抗Le^a抗体はLNF-IIに、抗Le^b抗体はLND-Iでそれぞれ強く阻止され、単糖では全く阻止されなかった。

文 献

- 1) 上山良治：非排出型人唾液中に発見せる新抗原「T」に就いて，犯罪誌，13：51～64，1939.
- 2) 石沢茂徳：人体諸体液，分泌液，排泄物の血液型的及び血清化学的研究，長崎医会誌，18：1131～1217，1940.
- 3) 浅香勝茂：沈降反応よりみたる人体諸分泌液及び排泄物の型質に関する研究，医学研究，15：2565～2624，1941.
- 4) 須山弘文：樹脂免疫から観たT型質，第35次日本医学会総会報告，9：269～270，1955.
- 5) 遠山昭平：S-T式血液型に関する研究，日法医誌，10：105～122，1956.
- 6) 津金沢正男：山羊を免疫動物とせる抗T抗体，特に抗T凝集素抗体について，日法医誌，10：309，1956.
- 7) 高夢雄：人精液中の型質，特にT型質について，第42次日本法医学会総会報告，12：281，1958.
- 8) 田島重喜：人尿中T型質に関する研究，日法医誌，17：347～366，1963.
- 9) 尾崎二郎，及川慶儀，高夢雄：人胆汁中の血液型質，特にT型質について，第42次日本法医学会報告，12：280，1958.
- 10) 久保清，平野了：人胃液のT型質及び抗T抗体の産生について，日法医誌，13：48，57，1959.
- 11) 及川慶儀：胎便に関する研究，日法医誌，13：982～1015，1959.
- 12) 田口俊夫：人唾液，初乳並び羊水の型質に関する研究，日法医誌，14：6～47，1960.
- 13) 中島八良：S-T式血液型に関する研究，その1. ヒト唾液及びアラビアゴム免疫による抗T凝集素の作製について，お茶の水医誌，6：687～696，1958.
- 14) 中田久夫：魚貝類の血液型物質，特にT型質について，日法医誌，14：231～248，1960.

- 15) Mourant, A.E.: 'New' human blood group antigen of frequent occurrence, *Nature*, **158**: 237-238, 1946.
- 16) Andresen, P.H.: The blood group system L. A new blood group L₂. A case of epistasy within the blood groups, *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **25**: 728-731, 1948.
- 17) Grubb, R.: Correlation between Lewis blood group and secretor character in man, *Nature*, **162**: 933, 1948.
- 18) Glynn, A.A., Glynn, L.E. and Holborow, E.J.: The secretor status of rheumatic fever patients, *Lancet*, **ii**: 759-762, 1956.
- 19) Iseki, S., Masaki, S. and Shibasaki, K.: Studies on Lewis blood group system. I. Le^c blood group factor, *Proc. Jap. Acad.*, **33**: 492-497, 1957.
- 20) Brown, P.C., Glynn, L.E. and Holborow, E.J.: Lewis^a substance in Saliva, *Vox Sang.*, **4**: 1-12, 1959.
- 21) Levine, P. and Celano, M.: The antigenicity of Lewis (Le^a) substance in saliva coated on to tanned red cell, *Vox Sang.*, **5**: 53-61, 1960.
- 22) Baer, H., Naylor, I., Gibbel, N. and Rosenfield, R.E.: The production of precipitating antibody in chickens to a substance present in the fluids of non-secretors of blood groups A, B and O, *J. Immunol.*, **82**: 183-189, 1959.
- 23) Kerde, C., Brunk, R., Fünfhausen, G. and Prokop, O.: Über die Herstellung von Anti-Lewis-Seren an *Capra hircus* L., *Z. ImmunForsch.*, **119**: 462-468, 1960.
- 24) Marcus, D.M. and Grollman, A.P.: Studies of blood group substances. I. Caprine precipitating antisera to human Le^a and Le^b blood group substances, *J. Immunol.* **97**: 867-875, 1966.
- 25) Marcus, D.M., Bastani, A., Rosenfield, R.E. and Grollman, A.P.: Studies of blood group substances. II. Hemagglutinating properties of caprine antisera to human Le^a and Le^b blood group substances, *Transfusion, Philad.*, **7**: 277-280, 1967.
- 26) Potapov, M.I.: Detection of the antigen of the Lewis system, characteristic of the erythrocytes of secretory group Le(a-b-), *Probl. Haemat. (USSR)*, **11**: 45, 1970.
- 27) Gunson, H.H. and Latham, V.: An agglutinin in human serum reacting with cell from Le(a-b-) non-secretor individuals, *Vox Sang.*, **22**: 344, 1972.
- 28) Potapov, M.I.: Production of immune anti-Lewis sera in goats, *Vox Sang.*, **30**: 211-213, 1976.
- 29) Watkins, W.M. and Morgan, W.T.J.: Specific inhibition studies relating to the Lewis blood-group system, *Nature*, **180(4594)**: 1038-1040, 1957.

**ANTI-LEWIS CHICKEN SERA IMMUNIZED
WITH HUNAN SALIVA****TAMIKO NAKAJIMA, SHIN YAZAWA AND KEN FURUKAWA****Department of Legal Medicine School of Medicine,
Gunma University, Maebashi****(Director: Prof: Ken Furukawa)**

Anti-Le^a and anti-Le^b agglutinins and precipitins were produced in chicken sera immunized with human Le(a + b-) non-secretor and Le(a-b +) secretor saliva respectively. The chicken anti-Lewis agglutinins reacted with enzyme treated red cells. The results of the agglutination and precipitation inhibition tests with mono- and oligosaccharides indicated that the chicken anti-Le^a antibodies had stronger affinity for nonreducing end β -galactosyl residue joined by a (1→3) linkage to N-acetylglucosamine than a (1→4) linked α -fucosyl residue. The chicken anti-Le^b antibodies were specifically inhibited by lacto-*N*-difucohexaose I. Therefore chicken anti-Le^b had potent affinity for adjacent nonreducing end α -fucosylresidues joined by (1→2) and (1→4) linkage.