〔原 著〕

ヒト IgD に関する研究*

第1報: IgD 精製法の確立と抗血清の作製について

荒川 正明**・榎本・博光**伊藤 喜久**
 櫻林郁之介**・河合 忠**

Summary

A new method was established for a high yield of purified IgD by using ion exchange chromatography under the conditions where the IgD protein was not absorbed.

Despite the buffer containing 0.01 M ϵ -amino caproic acid was used to protect against proteolysis, spontaneous degradation of IgD occurred during purification step at 4°C. The molecular weight of this degradation fragment was about 123,000 daltons determined by SDS-PAGE. It was, therefore, probable that the fragments were F(ab)₂δ or the dimer of Fcδ and Fabδ.

For the study of the reactivity against Fabδ portion, specific rabbit anti-IgD antibody was prepared and compared with those supplied commercially. The results indicated that the latter did not show any reaction against Fabδ, suggesting that it may lack the antibody against Fdδ.

Key words: IgD, purification, ϵ -amino caproic acid, spontaneous degradation, Fcδ and Fabδ.

緒 言

1965年, Rowe らによって第4番目の免疫グロブリンとして発見された IgD¹⁾ は, B細胞膜表面に多く存在し^{2,3)}, ヒトの免疫応答におけるその役割が最近注目されてきている⁴⁾. しかし, IgD の血清中濃度がきわめて微量であること^{5,6)}, 生体内酵素によって分解を起こしやすいことなどから, その分子構造や機能については未だ不明な点が多い. また, このような IgD の諸性質は, その免疫学的測定法にも種々の影響を及ぼし, 検体の保存条件や標準物質などにより一層の規準化が望まれている. われわれは,

- 1) このような IgD の諸性質を明らかにすること.
- 2) 信頼性の高い測定法を確立すること.
- 3) IgD 測定の臨床的意義を明らかにすること.

を目的として研究を進めているが, 今回, 骨髄腫患者血清からの高純度な IgD 精製法を確立し, 抗血清を作製し, 種々の検討を試みたので報告する.

材料および方法

1. IgD の単離精製法 (Table 1)

同一の IgD-λ 型骨髄腫患者血清を用いて以下に示すような2種類の方法により精製を行った.

血清に飽和硫酸を45%になるように添加し沈殿物分画を蒸留水で溶解し, Method 1 では 0.01 M リン酸緩衝液 (以下 PB と略), pH 8.0 で, Method 2 は 0.04 M PB, pH 8.0 で透析後, 遠心分離・汙過して, 生じた沈殿物を除去した. 次に, DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia 社) を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行った. Method 1 では 0.01 M PB, pH 8.0 で平衡化したカラム (φ 2.6 cm × 30 cm) に試料を吸着させ, カラム内を上記緩衝液で十分洗浄後, 0.02 M, 0.04 M, 0.06 M PB, pH 8.0 にて, stepwise で IgD を溶出させて得た. Method 2 では 0.04 M PB, pH 8.0 で Method 1 と同様にカラム内を平衡化し, 試料を添加した. この条件では試料中の IgD は吸着されない. 次に, DEAE-

* Studies on human immunoglobulin D. I: Purification of IgD and preparation of antiserum.

** Masaaki Arakawa, Hiromitsu Enomoto, Yoshihisa Ito, Ikunosuke Sakurabayashi, Tadashi Kawai, 自治医科大学臨床病理学教室.

(受付 1982年3月1日, 受理 1982年5月27日)

Table 1. Procedure for purification of IgD.

All buffers contained 0.01 M EACA and 0.05% NaN_3 .

Sephadex A-25 カラムで溶出した IgD main 分画を Sephadex G-200 (ϕ 2.6 cm $\times$ 90 cm) によりゲル濾過を行った。この段階からは、Method 1, 2 と同じ方法である。ゲル濾過に用いた緩衝液は 0.1 M Tris-HCl (含 0.15 M NaCl) pH 8.0 である。さらに、ゲル濾過で溶出した IgD main 分画を、抗 IgG, 抗 IgA を BrCN 活性化 Sepharose 4B に結合させた affinity column に通し、IgG, IgA を吸着除去し、IgD を精製した。緩衝液は 0.01 M PB (含 0.15 M NaCl) pH 8.0 を用いた。

なお、精製に使用した緩衝液すべてに、0.01 M の ϵ -amino caproic acid (以下 EACA と略) と 0.05% の NaN_3 を添加した。また、精製 IgD の純度はディスク電気泳動法 (Davis らの方法⁷⁾, 7.5% ポリアクリルアミドゲルを使用) で、分子量は SDS-PAGE (Weber-Osborn の方法⁸⁾, 5% ポリアクリルアミドゲルを使用) で検定した。

2. 自家製抗 IgD (以下抗 IgD と略) の作製法

Method 1 で精製した IgD 1 mg を Freund's complete adjuvant (FCA) と等量混合し、ウサギの背部皮下に免疫し、2 週間ごとに精製 IgD 0.5 mg を追加免疫して約 3 ヶ月後に採血し抗血清を得た。この抗血清は IgD との反応以外に IgG との反応が認められたので、人血清で吸収して特異抗血清を作製した。

3. Fc δ と Fab δ の精製法

精製 IgD を 0.01 M PB, pH 8.0 にて透析後, trypsin (Sigma 社) を IgD の 1/100 量添加し, 37°C で 2 時間 incubate し, ただちに trypsin soybean inhibitor (Si-

gma 社) を IgD の 1/50 量添加し, 反応を止めた⁹⁾。得られた試料を, DEAE-Sephadex CL-6B を 0.01 M PB, pH 8.0 (含 0.01 M EACA) で平衡化したカラムに添加した。この条件で, tFab δ (trypsin 処理で得られた Fab δ) は吸着されず通過する。カラム内を上記緩衝液で十分洗浄後, 0.01 M PB (含 0.15 M NaCl, 0.01 M EACA) pH 8.0 にて tFc δ (trypsin 処理で得られた Fc δ) を溶出させて得た。次に, tFab δ main 分画, tFc δ main 分画を各々 Sephadex G-200 カラム (ϕ 2.6 cm $\times$ 90 cm) にてゲル濾過を行い, tFab δ および tFc δ を精製した。緩衝液は 0.01 M PB (含 0.15 M NaCl, 0.01 M EACA) pH 8.0 を用いた。

なお、精製に使用した緩衝液すべてに 0.05% の NaN_3 を添加した。

4. 免疫化学的分析

精製 IgD, tFab δ , tFc δ および抗 IgD の分析を、免疫電気泳動法および Ouchterlony 法にて行った。分析に使用した抗血清は、Dako 社製 (抗 δ , 抗 γ , 抗 α , 抗 μ , 抗 λ , 抗 κ , 抗 α_2 -m, 抗 Tf, 抗ヒト全血清, 抗 C $_3$, 抗 β -Lipo) および Behring 社製 (抗 δ , 抗 Hpt) である。また、IgD の定量は MBL 社製プレート (SRID 法) を用いて行った。免疫電気泳動法は Grabar-Williams の方法¹⁰⁾に従って行い、Ouchterlony 法¹¹⁾では 1% agar (Oxoid 社) ゲル板を用いて行った。

結 果

1. IgD 精製法

Table 2. The recovery of IgD (%) in each step

Purification step	Method 1	Method 2
45% (NH ₄) ₂ SO ₄	81.0%	71.4%
DEAE-Sephadex A-25	36.8%	59.1%
Sephadex G-200	11.8%	39.4%
Affinity chromatography	5.6%	34.3%

同一血清を出発材料として、イオン交換クロマトグラフィーでの処理を異にした精製法 Method 1 と Method 2, 各々の方法で精製された IgD の収率およびその性状について比較検討を行った。

1) 収率 (Table 2)

精製材料に用いた血清に含まれている IgD 量を SRID 法で測定し、その測定値を100%として計算した。イオン交換クロマトグラフィー処理後で、IgD の収率は Method 1 では約 37%, Method 2 では約 59% で、最終的に affinity カラムクロマトグラフィー処理後、精製された IgD の収率は、Method 1 では約 6%, Method 2 では約 34% と明らかに Method 2 の方が良好な収率を示した。

2) 免疫電気泳動法による分析 (Fig. 1)

Method 1 および Method 2 で精製された IgD を各

Fig. 1. Immunoelectrophoretic patterns of purified IgD 1 and IgD 2.

IgD 1: purified by Method 1, IgD 2: purified by Method 2.

各免疫電気泳動を行い比較検討すると、Method 2 で精製された IgD は抗 δ と 1 本の沈降線を示し、抗 IgD との反応でやや陰極側にもう 1 本沈降線が認められた。Method 1 で精製された IgD は抗 δ との反応で沈降線は 1 本であるが、陽極側に延びて弧を形成しており、抗 IgD と反応では、さらに陰極側に 1 本沈降線が認められた。

3) ディスク電気泳動法および SDS-PAGE 法による分析 (Fig. 2)

Fig. 2. Disc electrophoretic patterns (A) and SDS-PAGE patterns (B) of purified IgD.

(1): purified by Method 1, (2): purified by Method 2.

Method 1 および Method 2 で精製された IgD を各々ディスク電気泳動および SDS-PAGE を行い比較検討すると、ディスク電気泳動において、各々のバンドは 2 本であるが、main バンドの位置が異なっており、Method 1 で精製された IgD の main バンドはより陽極側で、Method 2 で精製された IgD の main バンドはより陰極側であった。SDS-PAGE において、Method 1 で精製された IgD の main は分子量約 12,300 で、Method 2 で精製された IgD の main は分子量約 170,000 であった。また、分子量約 60,000 を示すバンドがわずかながら認められた。

Fig. 3. Immunoelectrophoretic patterns (A) and Ouchterlony immunodiffusion analyses (B) of purified IgD.

2. 精製 IgD の分析 (Fig. 3)

免疫電気泳動法および macro Ouchterlony 法による分析で、精製 IgD と抗 γ, 抗 α, 抗 μ, 抗 C₃, 抗 α₂-m, 抗 Tf, 抗 Hpt, 抗 κ, 抗 β-Lipo, および抗ヒト全血清との反応は認められず、抗 δ, 抗 λ および抗 IgD とのみ反応が認められた。免疫電気泳動での抗 λ との反応で染色後は Fig. 3-a に示したように沈降線がはっきり認められるが、染色前は沈降線は認められず、染色後に認められた沈降線と同じ位置に透明な line が認められた。

また、抗 IgD との反応で抗 δ との反応では認められなかった沈降線が陰極側に 1 本認められた。ディスク電気泳動で精製 IgD は 2 本のバンドを示した。

3. 自家製抗血清 (抗 IgD) の分析

ウサギを採血して得た特異抗血清は、Fig. 3-A に示したように免疫電気泳動において、精製 IgD との反応で 2 本の沈降線を形成した。また、データは省略したが、正常人血清との反応は認められなかった。マクロオクトロニー法で、抗 IgD は IgG, IgA, IgM, および λ 型 Bence Jones protein と反応せず、また精製 IgD との反応で認められた沈降線は、市販抗血清抗 δ との沈降線と完全に融合した。(Fig. 4)

Fig. 4. Ouchterlony immunodiffusion analyses of anti IgD.

1: anti IgD Lot-1, 2: purified IgD by Method 1, 3: purified IgG, 4: purified IgA, 5: purified IgM, 6: purified BJ, 7: NHS, 8: anti IgD Lot-2, 9: anti IgD Lot-3, 10: anti δ (Dako), 11: anti δ (Behring).

Fig. 5. Immunoelectrophoretic patterns of tFcδ and tFabδ.

4. tFcδ および tFabδ の分析 (Fig. 5)

Trypsin 処理を行って得た tFcδ と tFabδ を、免疫電気泳動法で分析した。tFcδ は抗 δ および抗 IgD と反応し、その沈降線の位置は、精製 IgD と抗 δ および抗 IgD との反応で認められる沈降線の陽極側に延びた沈降線とほぼ同じ位置である。tFabδ は抗 IgD および抗 λ と反応し、その沈降線の位置は精製 IgD と抗 IgD と反

応で認められる, より陰極側の沈降線とほぼ同じ位置であった (Fig. 5 の矢印).

考 察

以上述べた結果より, まず IgD 精製法に関しては, イオン交換クロマトグラフィー処理でカラムに IgD を吸着させない Method 2 の方が吸着させて後で溶出させて得る Method 1 より明らかに収率および精製 IgD の性状の点で良好な結果を示した. また, 各精製段階において, IgD 量測定と同時に F. Lowry 法による蛋白量を測定しており, IgD の純度を比較すると, イオン交換クロマトグラフィー処理後は Method 1 の方が高い純度を示したが, 絶対量は明らかに Method 2 の方が多かった. 最終的に精製された IgD の純度はどちらもほぼ 100% に近かった. 従って, IgD の精製を行う場合は, イオン交換クロマトグラフィーの段階で IgD を吸着させず通過させることがより良い方法であると考えられる. しかし, IgD 骨髄腫患者血清中に含まれている IgD は個人によりその電気的移動度が異なるので, 今回は 0.04M PB を用いて IgD を通過させたが, 各々の血清の少量をイオン交換クロマトグラフィー処理して, それぞれに適合した緩衝液を選び出す必要があると考えられる.

Method 1 で精製された IgD の免疫電気泳動で抗 IgD との反応で認められる陽極側に延びた沈降線と, 陰極側に認められるもう 1 本の沈降線は, 精製 IgD を trypsin 処理して得た tFc δ と tFab δ の免疫電気泳動における抗 IgD との反応から推測して, 各々 Fc δ および Fab δ が抗 IgD と反応して形成された沈降線であると考えられる^{12,13}. 抗 IgD は IgG, IgA, IgM および λ 型 Bence Jones protein との反応は示さないことから L-chain に対する抗体は含んでおらず, tFab δ との反応は抗 Fd δ によるものと考えられる. なお, データは省略したが, ほかに 2 種類の λ 型 Bence Jones protein と抗 IgD との反応は, マクロオクトロニー法で認められなかった. 一方, 市販の抗血清抗 δ は tFab δ と反応を示さないことから, Fd δ に対する抗体がごく微量であるか, あるいは抗 δ ではなく抗 Fc δ ではないかと考えられる. また, Fig. 1 で示したように, Method 1 で精製された IgD と抗 IgD との反応で認められる 2 本の沈降線は交差しているようである. 陰極側の沈降線は抗 Fd δ によって形成された沈降線と考えられるため, 完全 IgD と抗 IgD との反応で認められる沈降線と 1 部融合するはずであるが, 交差していることから, 完全

IgD の Fd region が隠されて, 抗 Fd δ と反応しないのではないかと考えられる.

精製 IgD の免疫電気泳動における抗 λ との反応で認められる透明な line は, IgD と抗 λ との反応でしばしば認められる clear line (または phantom line) であると推測される¹⁴. また精製 IgD のディスク電気泳動で認められる 2 本の蛋白帯は, ゲルを切り出した後, 抗 δ による分析からどちらも IgD であることを確認しており, そのうち 1 本 (陽極側) は IgD の精製保存中に自然分解¹⁵⁻¹⁷で生じた fragment であると考えられる. この fragment は, 上記免疫電気泳動における抗 IgD との反応で認められる陽極側および陰極側の沈降線を形成する Fc δ および Fab δ であると考えられるが, SDS-PAGE による分析から, この fragment の分子量は約 123,000 であり, ごくわずかに分子量約 60,000 の蛋白帯も認められるが, Fc δ および Fab δ が各々 2 量体を形成しているか, さらに F(ab) $_2$ δ も含まれているのではないかと推測される. しかし, Method 2 で精製された IgD の免疫電気泳動で, 抗 IgD との反応で認められるやや陰極側の沈降線は, 精製を開始する前の血清にすでに認められていることから, Method 2 の精製過程における分解はわずかであると推測される.

IgD の精製保存に使用した緩衝液にはすべて 0.01 M の EACA が含まれているが, この条件では IgD の自然分解を完全に押えることはできず, 特にイオン交換クロマトグラフィー処理で IgD を吸着させた場合は, ほとんど効果がなかった. しかし, 0.01 M の EACA 添加により, 保存中の IgD の分解がごくわずかであることから, この時に起こる IgD の分解は, IgD が吸着されることによりプロテアーゼの作用をより受けやすくなったとも考えられるが, IgD が吸着されることだけで分解が起こるのではないかと考えられる. EACA 以外の inhibitor については今後検討していく予定である.

ま と め

IgD の精製法に関しては, これまで種々の報告がなされてお^{16,18-20}, いろいろ問題点があったが, 今回われわれは高純度でかつ収率の高い IgD の精製法を確立した. 精製において, イオン交換クロマトグラフィー処理を行う場合は, IgD 自体を吸着させず通過させることが最良の方法である. しかし, IgD の自然分解は 0.01 M の EACA を添加しても徐々にではあるが起こっており, F(ab) $_2$ δ または Fc δ および Fab δ の 2 量体である fragment が生じてくると推測される. また, 市販

の抗血清抗 δ は Fab δ との反応を示さないことから、
Fd δ に対する抗体がきわめて微量であると推測される。

文 献

- 1) Rowe, D.S. and Fahey, J.L. : J. Exp. Med., **121** : 171, 1965.
- 2) VanBoxel, J.A. et al. : J. Immunol., **109** : 648, 1972.
- 3) Melcher, U. et al. : J. Exp. Med., **140** : 1427, 1974.
- 4) Rowe, D.S. et al. : J. Exp. Med., **138** : 965, 1973.
- 5) Rowe, D.S. and Fahey, J.L. : J. Exp. Med., **121** : 185, 1965.
- 6) Rowe, D.S. et al. : Clin. Exp. Immunol., **3** : 477, 1968.
- 7) Davis, B.J. : Ann. N.Y. Acad. Sci., **121** : 404, 1964.
- 8) Weber, K. and Osborn, M. : J. Biol. Chem., **244** : 4406, 1969.
- 9) Shinoda, T. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **78** : 785, 1981.
- 10) Graber, P. and Williams, C. A. : Biochim. Biophys. Acta, **10** : 193, 1953.
- 11) Ouchterlony, O. : Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1967.
- 12) Griffiths, R.W. and Gleich, G. J. : J. Biol. Chem., **247** : 4543, 1972.
- 13) Jefferis, R. and Mathews, J.B. : Immunochemistry, **14** : 171, 1977.
- 14) Spiegelberg, H. L. : Immunol. Rev., **37** : 3, 1977.
- 15) Fahey, J.L. et al. : Am. J. Med., **45** : 373, 1968.
- 16) Rowe, D.S. et al. : Immunochemistry, **6** : 437, 1963.
- 17) Goyert, S.M. et al. : J. Immunol., **118** : 2138, 1977.
- 18) Jefferis, R. : J. Immunol. Methods, **9** : 231, 1976.
- 19) Spiegelberg, H.L. et al. : Biochem., **9** : 2115, 1970.
- 20) Lin, L.-C. and Putnam, F.W. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **76** : 6572, 1972.