

食餌性アレルギーの免疫学的研究

第2編. ^{131}I 結合卵白アルブミンによつて検出される IgG, IgA

抗体及び未同定の抗体について.

東京大学医科学研究所 アレルギー学研究部

伊 藤 幸 治 進 藤 宙 二

慶応義塾大学皮膚科学教室

大 城 晶 子

(受付: 6月24日, 1968)

I. 緒 言

radioimmuno-electrophoresis は Yagi ら¹⁾によつて導入されて以来, 極めて鋭敏な抗体検出法として, 広く用いられている. この方法は抗体活性をもつ免疫グロブリンの種類に同定に役立つ. 我々は, 卵白アルブミンに ^{131}I を結合させ, radioimmuno-electrophoresis で, 卵アレルギー患者血清中の抗体を調べたので報告する.

Yagi ら¹⁾は ragweed pollinosis の患者血清中の, IgA, IgM, IgG に ^{131}I -ragweed pollen に対する抗体活性がある事を報告している. Haermans²⁾ らが, これより先, ragweed pollinosis の患者血清中の IgA を分離し, IgA と reagin とが密接な関連をもつと報告し, この報告を支持する実験結果が数多く発表された³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾.

しかし著者⁷⁾は, reagin が DEAE cellulose column chromatography で IgA よりも先に溶出される事を明らかにし, Perelmutter ら⁸⁾も DEAE-Sephadex による分離で同様報告をした.

Perelmutter ら⁸⁾は, 更に, Rowe ら¹⁰⁾によつて発見された IgD と reagin との関連を調べ, 平行関係がないと報告した.

石坂ら¹¹⁾¹²⁾¹³⁾は, 患者血清に抗 IgG, IgA, IgD, IgM を加えても reagin は吸収されず, 抗 Fab 抗体で吸収されるので, reagin は未知の免疫グロブリンであろうと考え, reagin を多く含む分画でウサギを免疫し, reagin を吸収し得る抗体を作り得たので, reagin 活性をもつ新しい免疫グロブリンを IgE として発表した.

Johansson ら¹⁴⁾は, 既知の IgG, IgA, IgM, IgD と異

なる骨髄腫蛋白を発見し IgND として発表した, この IgND は石坂らの IgE と抗原的にも物理同様の性質においても一致した¹⁵⁾. 更に Johansson ら¹⁶⁾はアレルギー性喘息患者では, 非アレルギー喘息患者及び正常人よりも IgND が有意に増加しているとしている.

一方, Menzel ら¹⁷⁾は ragweed pollinosis の血清で rivanol で分画すると, 減感作の前と後とでは reagin 活性の高い分画が別の分画に属するもので, reagin は2種の immunoglobulin に属するかも知れないと報告している.

動物性のアレルゲンについては, Reid ら¹⁸⁾が BSA に対し過敏性をもつ患者血清の reagin が DEAE cellulose column chromatography の 0.01M, pH 7.0 で溶出される IgG 分画にのみ BSA に対する reagin があり, 同じ血清中にある *Cynodon dactylon* (Bermuda grass pollen) に対する reagin は 0.025M, pH 7.0 で溶出される分画にあると報告している. この報告の中で ^{131}I -BSA を使つて radioimmuno-electrophoresis を行ない BSA に対する IgG, IgA 抗体を検出している. 更に Fireman ら⁹⁾は, 同一血清中に牛乳に対する reagin と ragweed pollen に対する reagin とが併存する血清を DEAE cellulose column chromatography で分画した所, 牛乳に対する reagin は, 0.001M, pH 8.0 という低張液の溶出による IgG 分画に最も活性が高く, ragweed に対する reagin はその分画には検出されず, 石坂らの報告同様 0.025M, pH 8.0 で溶出される分画に最も高い活性があつた. 従つて reagin に heterogeneity (多様性) があるのではないかと云っている. この場合 radioimmu-

noelectrophoresis をやっていない。

かくの如く、動物性のアレルギーないし、食餌性アレルギーにおいては、吸入性アレルギーと、やや状況を異にするようで、あるいは抗体を異にする可能性もある。

著者らは、ニワトリの卵に対し強い過敏性を有する患者血清中の抗体を ^{131}I を結合せる卵白アルブミンを使った radioimmuno-electrophoresis で調べ、IgG, IgA 抗体のほかに未同定の抗体をみだし検討を加えた。普通一般に行なわれている radioimmuno-electrophoresis は、 ^{131}I 結合抗原と抗ヒト血清を混合したものと患者血清との間の反応をみている。Yagi ら¹⁾は ^{131}I 結合抗原と、患者血清との間に直接反応をみており、 γ_2 部位に減感作患者血清と ^{131}I -ragweed pollen とが沈降反応を示す事を報告している。これは長期減感作を受けた患者のみ見られた現象としている。我々は、この直接反応を何ら減作を受けていない卵アレルギー患者に適用した。又、患者血清中の抗体を検討するために独特のやり方で作った抗免疫グロブリンを使用した。

II. 材 料

- ① 卵アレルギー患者血清
- ② 5 回再結晶卵白アルブミン (Sigma chemical Company U.S.A)
- ③ ^{131}I 結合卵白アルブミン (EA*と略)
 - ②を使用して作製した、Yagi ら¹⁾の方法に従った。
- ④ 抗卵白アルブミンウサギ血清
 - ①～④はいずれも第1編で用いたものと同じである。
- ⑤ 対照人血清

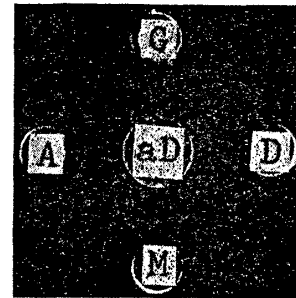
卵を食べても、何らアレルギー症状を示さない人で、且つ、卵白アルブミンを皮内に注射しても、何の反応を示さない正常人の血清を用いた。
- ⑥ 抗人血清
 1. 抗人馬血清
 2. 抗ヒト IgG ヤギ血清
 3. 抗ヒト IgA ヤギ血清
 4. 抗ヒト IgM ヤギ血清

1～4は、いずれも Hyland Laboratories, U.S.A. のものを用いた。
5. 抗ヒト IgD 血清

金沢大学村上教授、関本先生よりいただいた IgD myeloma 血清より Hansson ら²⁰⁾の法により IgD を分離し、これを Freund's complete adjuvant と共にウサギ

Fig. 1. 抗 IgD (aD) ウサギ血清による IgD の沈降線

G: IgG 分画 (正常人)
A: IgA 分画 (同上)
D: IgD 分画 (IgD 骨髄腫)
M: Sephadex G 200による macroglobulin 分画 (正常人)



を免疫して得た抗血清に、正常人血清を $1/10$ 量を加えて抗 IgD のみに反応する抗血清を得た (Fig. 1)。

6. 抗ヒト Fab 血清

DEAE cellulose で 0.005M, pH 8.0 で溶出される IgG 分画を Porter の法²¹⁾により Papain で分解し、Olins ら²²⁾の法により DEAE cellulose で Fab を分離し、この Fab でウサギを免疫して抗ヒト Fab ウサギ血清を得た。

7. 抗免疫グロブリン血清

すべての免疫グロブリンは、共通の L 鎖を持つているので、抗 Fab (抗 L 鎖+抗 Fd) で卵アレルギー患者血清中の免疫グロブリンを沈澱させる事を試みた。抗 Fab ウサギ血清と卵アレルギー患者血清とを種々の割合で混合し、最も沈降物の多い割合 16ml: 1ml で混合して出来た沈降物を pH 8.4, 0.15 M borate buffered saline で 5 回洗滌し、この沈降物を生理食塩水 1.5ml に懸濁させ、等量の Freund's complete adjuvant と混合し、ウサギ 3 匹に 1 ml ずつ免疫した。2 週おきに 3 回免疫し、10日後に採血した。

8. 抗 IgG & IgA 血清

Haermans²³⁾の方法により、ヒト血清 500ml. より IgA 分画を取り、これを DEAE cellulose につけ微量含まれる IgM を取り除き、濃縮して、ウサギに免疫したところ、IgG に対する弱い沈降線と IgA に対する強い沈降線を生ず抗 IgG & IgA 血清を得た。

9. ヒト臍帯血清

東大医科学研究所、石井明治氏にいただいた。

III. 方 法

① radioimmuno-electrophoresis (RIE と略)

Yagi ら¹⁾の方法に従った。抗血清とEA*との混合物を使う original method (one step method)および、EA*のみを溝の中に入れる直接反応の両方を用いた。

② radioimmunodiffusion (RID と略)

①と同様、one step method と直接反応の両方を用いた。①、②共に医用X線フィルム(さくら)を使つて radioautography を行なつた。

③ Prausnitz-Küstner 反応 (PK 反応と略). 原法²³⁾に従つた。

④ DEAE cellulose column chromatography (DE-AE c.c.chr と略)

Sober ら²⁴⁾の方法に従い、おこなつたが溶出条件には modification を行なつた。

⑤ immunoelectrophoresis

Scheidegger²⁵⁾の micromethod に従つた。 $\mu=0.025$, pH 8.6 の veronal buffer に2%の割合で寒天 (Bacto-agar) とかした。泳動時間は1時間である。

⑥ immunodiffusion.

microplate 法で行なつた。

IV. 結 果

① radioimmunoelectrophoresis

患者溝血清を泳動後、泳動方向に平行に溝を作り、この中にEA* (約2 μ C/ml)と抗人馬血清を容積比1:4の割合で混合した液を入れた。immunoelectrophoresis とradioautography を比較してみると、対照の正常人血清にはIgGの沈降線に一致して抗体活性があり、患者血清にはIgGとIgAの沈降線に一致して、EA*の結合がみられた。IgMの沈降線には radioactivity はなかつた。更にIgA, IgG, IgMの沈降線と全く異なる所に巾広い radioactive な部分がみられた。(Fig. 2)

この部分には immunoelectrophoresis では何の沈降線もみられなかつた。IgG, IgA, IgMに対する特殊抗血清でRIEを行なうと、やはり正常人のIgG. 患者のIgG, IgAの沈降線に一致してEA*の結合を認め得たほか、患者血清には、これらの特殊抗血清で沈降線を形成しない部分に radioactive な巾広い部分が出現した。

抗IgD血清を使つた場合には同様の巾広いradioactive な部分が出現した。IgDの沈降線も認められなかつたが次に述べる如く、RIDではIgDの沈降線とは異なる部分に radioactive な所がみられた。

② radioimmunodiffusion (RIP).

抗IgG, IgA, IgM, IgDとEA*とを混合して中心孔に入れ、周囲の孔に患者血清を入れたところいずれも

Fig. 2.

上 immunoelectrophoresis

下 その radioautography (γ -部分のみ)

A.O: 正常人血清, S.A: 卵アレルギー患者血清.
溝の中には I^{131} 結合アルブミン (EA*) と抗人馬血清が入れてある。正常人にはIgGの沈降線に一致してEA*の結合がみられ、患者にはIgG, IgA, のほかに巾広い radioactive な部分がある。

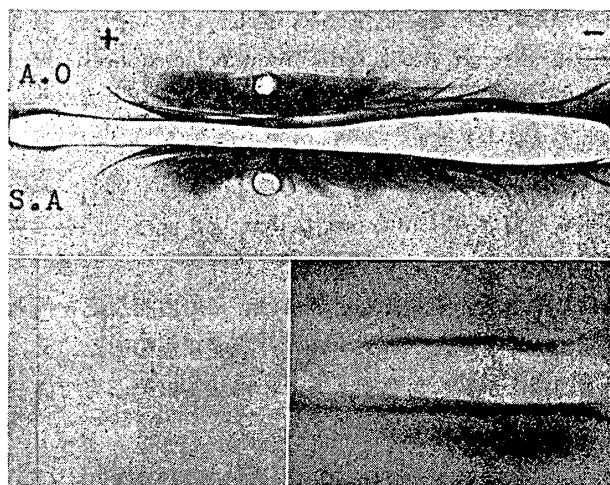


Fig. 3.

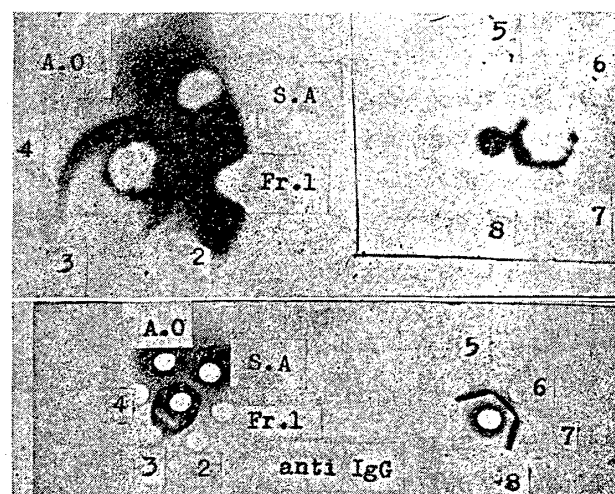
anti IgG にEA*をまぜて中心孔におき、周囲に患者血清及びその分画を入れて行なつた。

radioimmunodiffusion (上), immunodiffusion (下)

S.A 患者, A.O 正常人全血清

Fr 1~8分画血清 (実験番号⑤参照).

IgGの沈降線に一致するEA*の結合がみられるほか、S.AとFr. 1に沈降線と一致しない radioactive な線がある。

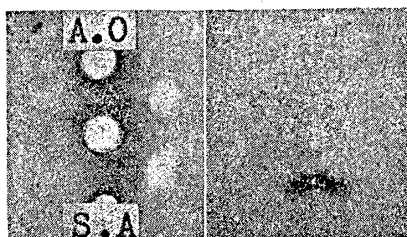


一本の沈降線を生じ、radioautography ではIgG, IgAの沈降線に一致してEA*の部分の結合がみられた。しかし、沈降線を生じない抗原過剰域の沈降線のない部分

Fig4.

radioimmunodiffusion(右) immunodiffusion (左)
中心孔に抗 IgD と I^{131} 結合卵白アルブミンが入っ
ている。

A.O 正常人, S.A S.A 卵アレルギー患者血清。



に EA* を患者血清の反応と思われる radioactive な部
分がみられた。(Fig. 3, Fig. 4)

3 R I Eの直接反応 (Fig. 5)

患者血清を泳動した後、溝の中に EA* のみを入れ、
反応させると、2本の radioactive な線がX線フィルム
上にみられた。しかし沈降線は全く認められなかつた。
溝に近接した線の γ_2 部位は形態、位置よりみて IgG
と思われる。おそらくこの IgG 抗体と EA* の抗原抗
体複合物は、抗人馬血清、あるいは抗ヒト IgG ヤギ血

により沈降線を形成して、そこに radioactivity をX線
フィルムで、とらえる事が出来たのであろう。もう1本
の線は実験結果④で示した R I E (one step method) の
radioautography 上と同じ所に出ており、R I E(one step
method) で沈降線を形成してない部分の radioactive な
線は、EA* と患者血清の直接反応であると考えられ
る。

さてこの2本の radioactive な線は、特異的な反応で
ある事が以下のごとく示された。即ち患者血清 1 ml に
5回再結晶卵白アルブミン 1 mgを加え37°C, 15分間、時
々振とうさせながら反応させ、この血清を使つて上記同
様の R I E (直接反応)をおこなうと、全く陰性となつ
た。卵白アルブミンを加えないで同様処置をおこなつた
血清には、やはり、2本の radioactive な線がX線フィ
ルムで認められたので、卵白アルブミンによる阻止反応
が成立する事が示された。(Fig. 6)

④ R I Dの直接反応

EA* を中心孔に、患者血清を倍々稀釈して周囲の孔
に入れると、Fig. 7に示すごとく、EAと患者血清との

Fig. 5.

直接反応による radioimmunoelectrophoresis (右), immunoelectrophoresis (左) 溝の中には I^{131} 結
合卵白アルブミンだけが入っている。

S.A 卵白アレルギー患者血清, A.O & H.R 正常人血清, R 抗卵白アルブミンウサギ血清,
NR 正常ウサギ血清。患者血清には $\gamma_1 \sim \gamma_2$ の長い radioactive な線と γ_2 に巾広い線がある。

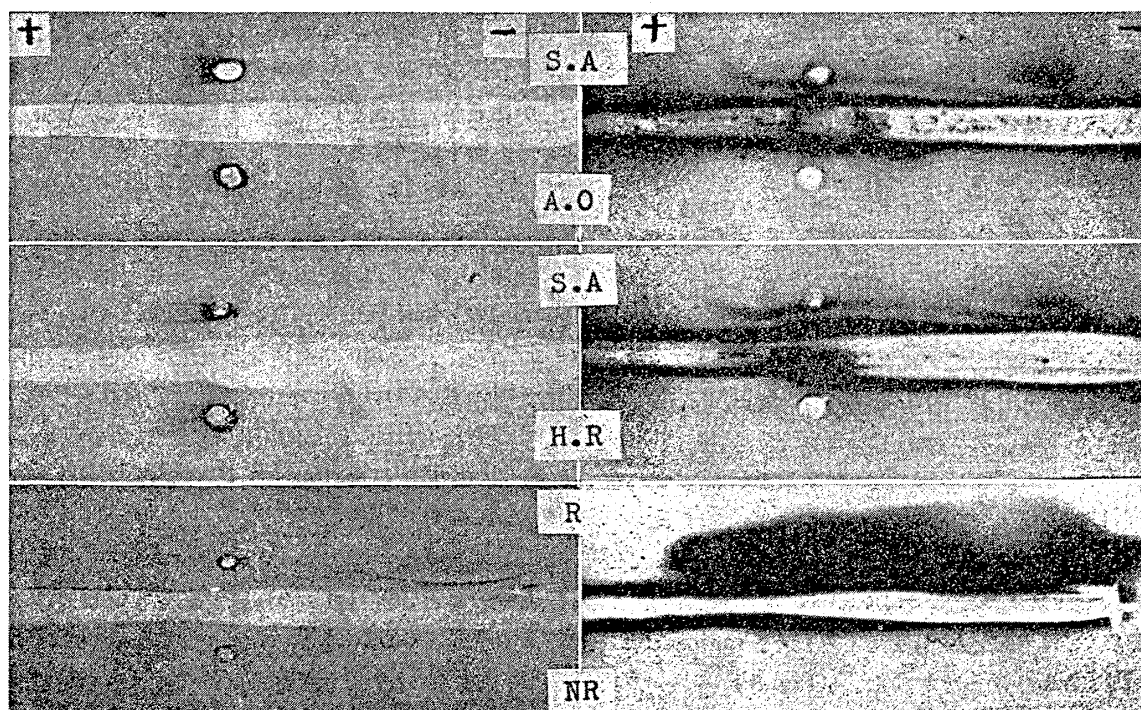


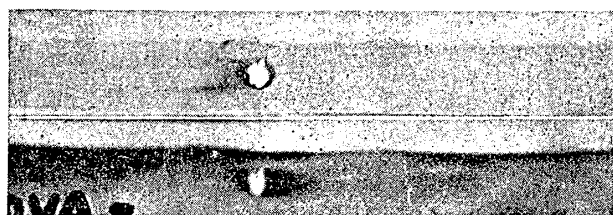
Fig. 6.

卵白アルブミンによる radioimmunoelectrophoresis の阻止反応

A 患者血清, B 卵白アルブミン結晶を加えた患者血清.

おのおの上は immunoelectrophoresis. 下 radioimmunoelectrophoresis

A



B

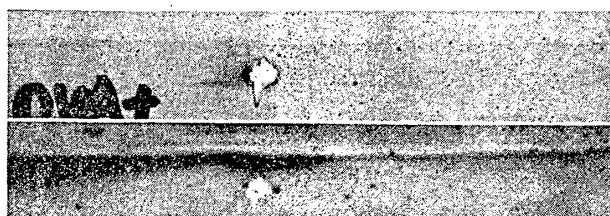
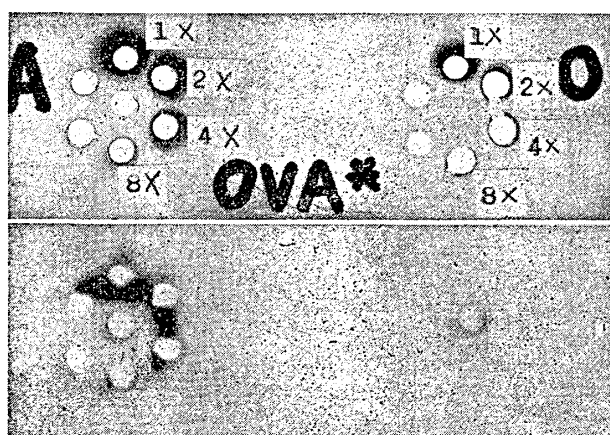


Fig. 7.

卵アレルギー患者の radioimmunodiffusion (直接反応)

上 immunodiffusion, 下 その radioautography

A 患者血清, O 正常人血清, 中心孔に I^{131} 結合卵白アルブミンを入れてある.

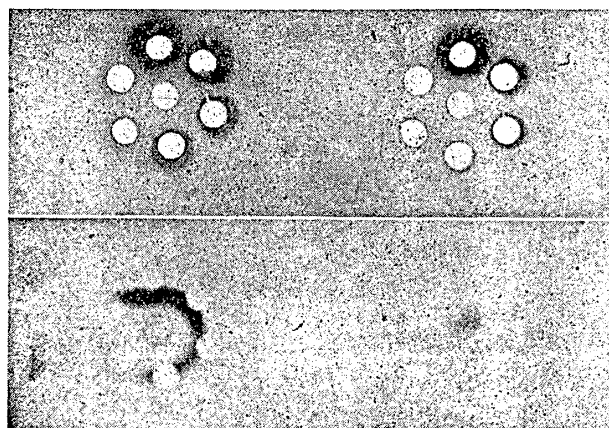


反応は何ら目にみえる沈降線は形成していないけれども, これをX線フィルムにのせて約3日後, フィルムを現像すると, 抗原過剰域に radioactive な line が検出された. EA*を種々の濃度に変えてみたが, radioactive な線の位置はあまり変らなかった. (Fig. 8)

RIDの直接反応は, RIEの直接反応と異なり,

Fig. 8.

Fig. 7. の中心孔に入れる I^{131} 結合卵白アルブミンを $1/8$ に希釈した.



radioactive な線は1本しか観察されなかつた. RIEの場合にはRIDに比し, 著しい抗原過剰であり, それにもかかわらず, IgG 抗体と思われる radioactive な線は, 抗原を入れた溝に近接しており, 抗体過剰域に検出された. 従つてRIDでは更に抗体過剰であるので, この radioactive な線は検出され得なかつたと考えられる. RIEで IgG 抗体の内側に存在する巾広い radioactive な線と同じ線がRIDで検出されたものと思われる.

⑤ DEAE cellulose column chromatography

RIE, RID で EA* と直接反応する患者血清中の抗体は, 抗 IgG, IgA, IgM, IgD のいずれとも反応せず, 卵白アルブミンで中和されるので抗体である事は確かであるが, 所属をいずれとも決めかねる. 仮に γ_x として, 以下記述する.

γ_x の物理化学的性質を明らかにするために患者血清を DEAE c.c.chr で分画した. (図1) 0.005M, pH 8.0 の phosphate buffer から始めて 0.15M, pH 8.0 の phosphate buffer まで gradient elution を行なつた. 5 ml の血清を, 2.5×50 cm の column に apply し, 5 ml ずつ溶出させ, 約50ml ずつ pool して, それぞれ 2.5ml に濃縮した. この分画を, それぞれにつき RIDを行なつたところ, γ_x は 0.005M, pH 8.0 の分画にのみ検出された. (Fig. 3)

この分画を, 各 immunoglobulin の特殊抗血清と反応させると, 抗 IgG のみに反応している. この γ_x を含む IgG 分画には強い reagin 活性をもっている. しかし, 0.025M附近で溶出される部分にも reagin 活性があつたが, γ_x は検出されなかつた. PK titerを調べて

図1 IgG, IgA, IgM: 抗 IgG, IgA, IgM を用い寒天ゲル内沈降反応で検出
PK: 紅斑の大きさ, HA (hemagglutination): 卵白アルブミンを使ったタンニン酸処理血球凝集反応

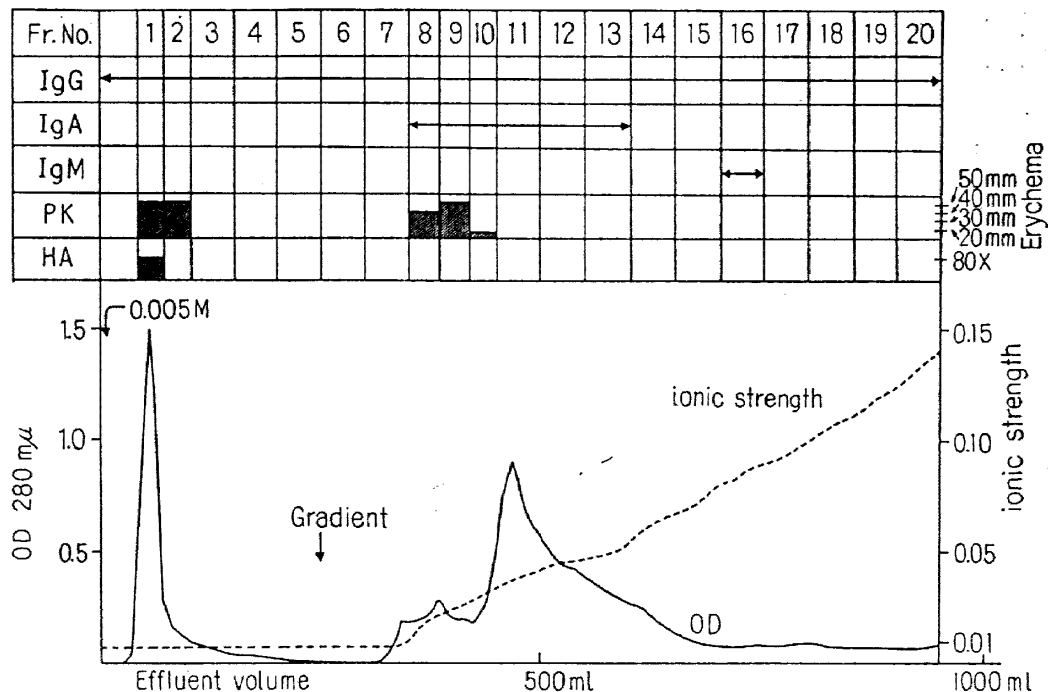
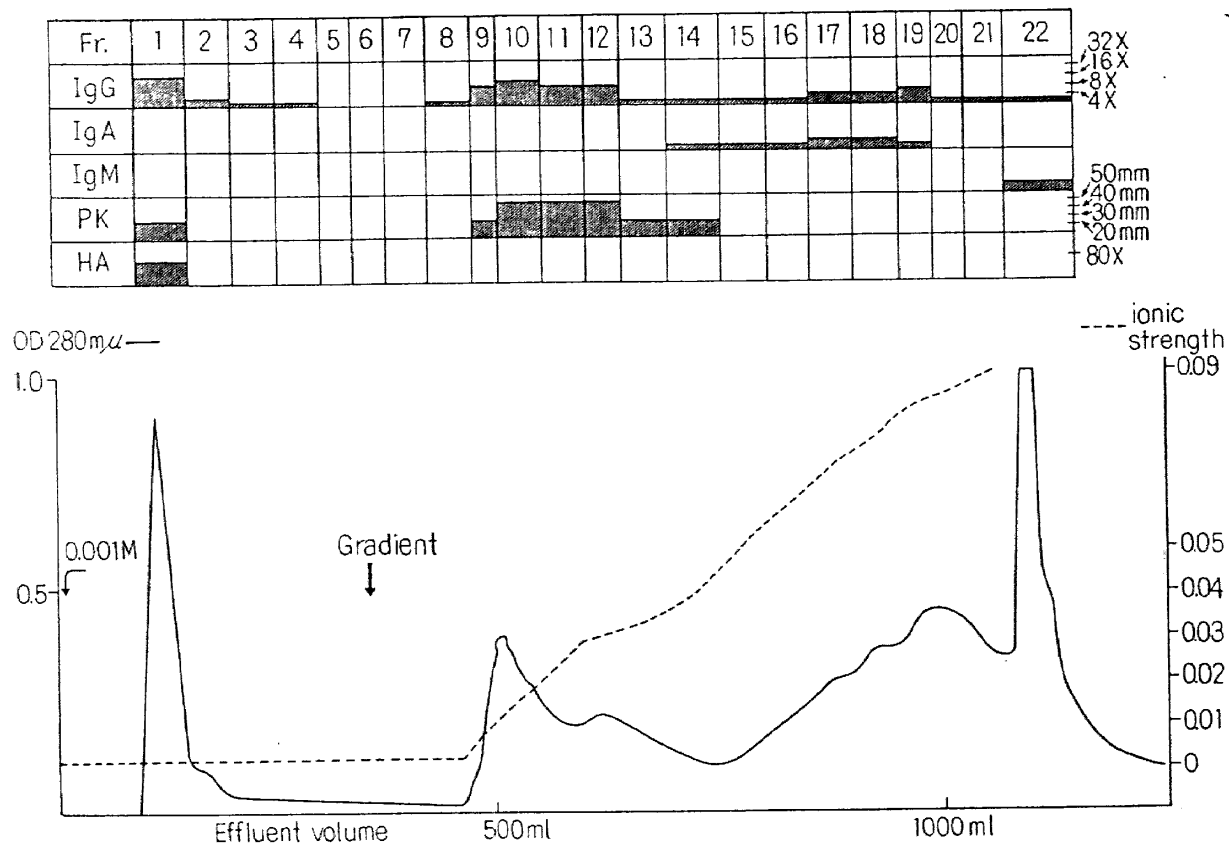


図2: IgG, IgA, IgM.: 各分画を倍々稀釈して抗 IgG, IgA, IgM 抗血清との間に形成する沈降線を寒天ゲル内沈降反応で調べ, その終末点を記した.

PK: 紅斑の大きさ, HA (hemagglutination): 図1に同じ



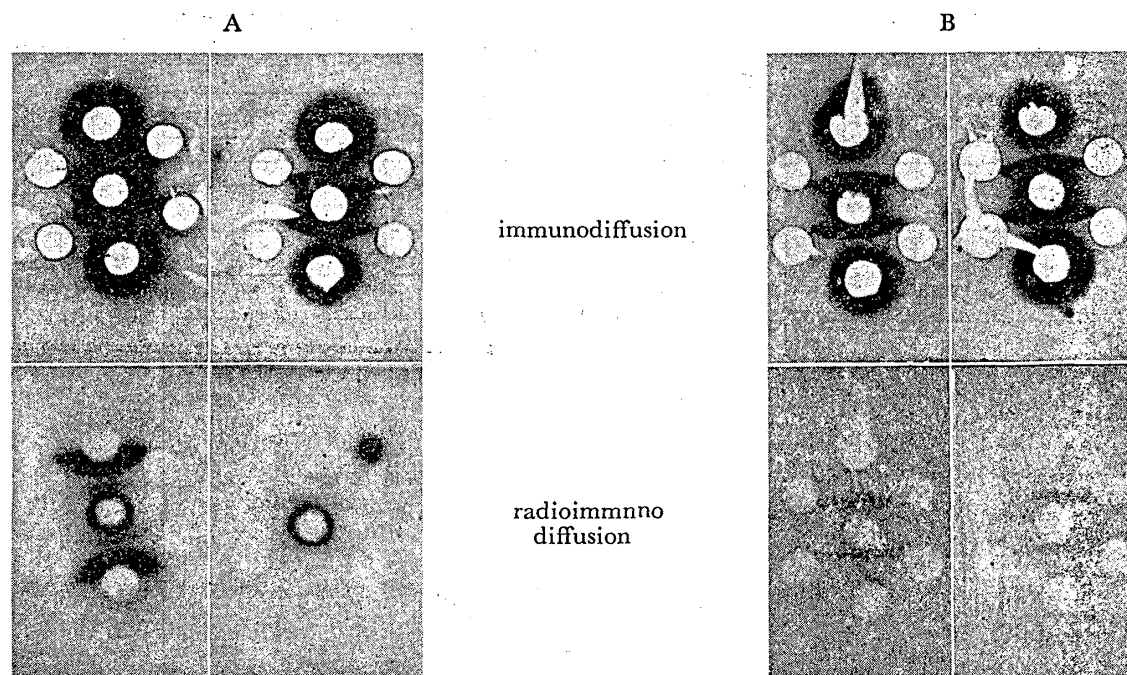


Fig. 9.

- A 中心孔に抗 Fab ウサギ抗体と I^{131} 卵白アルブミン。その上, 下の孔に血清 (S.A 患者血清, A.O 正常人) の Fab の沈降線に一致する radioactive な線と患者の血清を入れた孔近くに太い radioactive な線がある。
- B 中心孔に抗 Fab を入れ沈降線を生じた後で洗滌後, I^{131} 結合卵白アルブミン液の中に入れたもの。
- C radioimmunoelectrophoresis Fab の沈降線以外に radioactive な部分がある (矢印)。上は immunoelectrophoresis

いないので, reagin活性との関係については充分検討できなかった。

DEAE c.c.chr. で, 最初の溶出を 0.001M, pH 8.0 の phosphate buffer で行なってみると, その分画に, 尚, reagin 活性があつた (図2)。

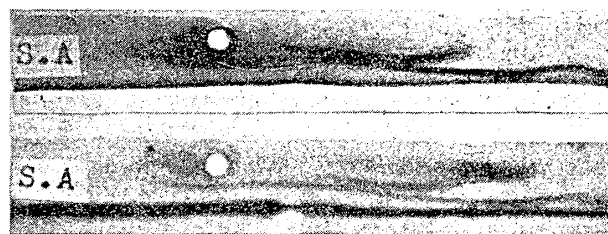
⑥ 抗 Fab による γ_x の検討 (Fig. 9)

抗 Fab ウサギ血清に EA* を 4 : 1 の割合で混合したものと, 患者血清との間の反応を RIE, RID で調べた。Fab の沈降線に一致して radioactive な線が X 線フィルム上に検出されたが, これとは別に, 沈降線のない所に, radioactive な線があり, 仮に γ_x と名付けたものと同じであると思われる。③で述べたごとく, γ_x は抗体であることは確かであるか 抗 Fab で沈降線としてとらえる事ができなかった。

⑦ 抗 immunoglobulin による γ_x の検討

Fig. 10.

抗血清に抗 IgG & IgA 血清を用いた場合。上 immunoelectrophoresis 下 その radioautography で, IgG, IgA の沈降線と一致する radioactive な線のほかに巾広い線がある。



抗 Fab-ヒト immunoglobulin の complex で免疫して作った抗 immunoglobulin を使つて, 患者血清の RIE, RID を行なつたけれども, γ_x は沈降線を作るに至らなかった。

⑧ 抗 IgA, IgG ウサギ血清による γ_x の検討

⑦と同様結果であつた。(Fig. 10)

⑨ 抗 immunoglobulin 血清による IgA の検討

この抗 immunoglobulin 血清を, 患者血清の immunoelectrophoresis の抗血清として使うと, IgA の沈降線に分裂がみられた。(Fig. 11). この抗血清に脐帯血清を $1/10$ 量加え抗 IgM, IgA のみを残して更に検討した。

Fig. 11.

卵アレルギー患者血清の immunoelectrophoresis anti Im. G 1, 2, 3, 抗 immunoglobulin ウサギ血清 No. 1, 2, 3 anti Im. G 1 を使つた場合 IgA の分裂がみられる。(矢印)

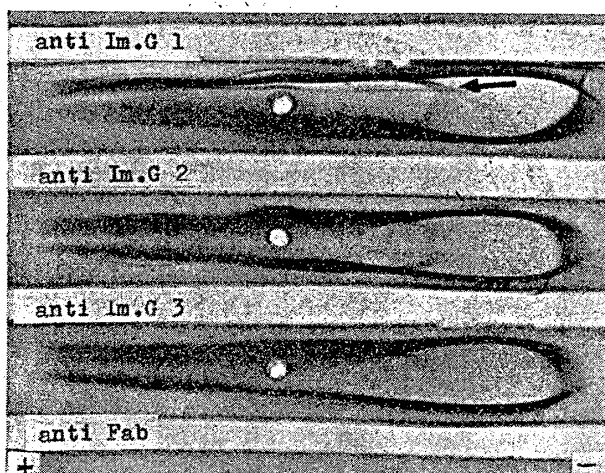


Fig. 12.

卵アレルギー患者の immunoelectrophoresis anti Im. G, 1, 2, 3, anti IgA.: 写真11で使つた抗血清に脐帯血清を加えたもの。

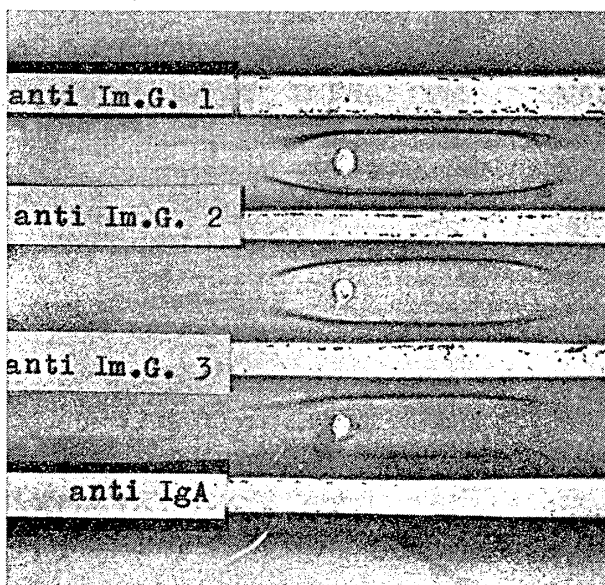


Fig. 13.

中心孔に脐帯血清で吸収した抗 immunoglobulin 1 を入れてある。

γ A-m: IgA 骨髓腫血清 (κ 型)

κ BJ: κ 型 Bence-Jones 蛋白

κ IgG: κ 型 IgG 骨髓腫血清

pat: 卵アレルギー患者血清

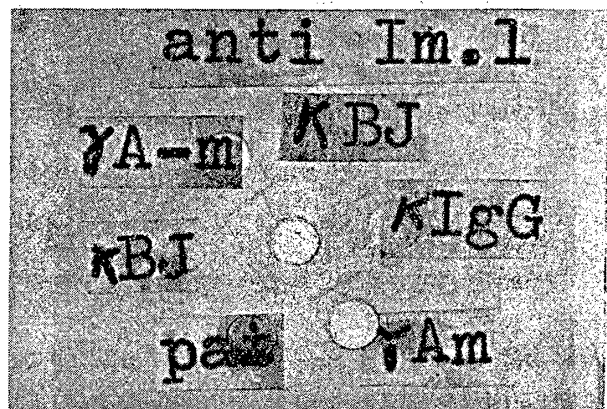


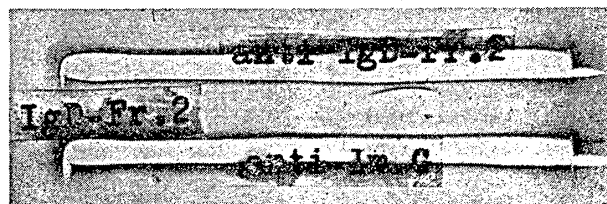
Fig. 14.

IgD 分画の immunoelectrophoresis

IgD-Fr. 2: IgD 骨髓血清の IgD 分画

anti IgD-Fr. 2: 同上で作つた抗血清 (ウサギ)

anti Im. G.: 抗 immunoglobulin No. 1 に脐帯血清を加えたもの。

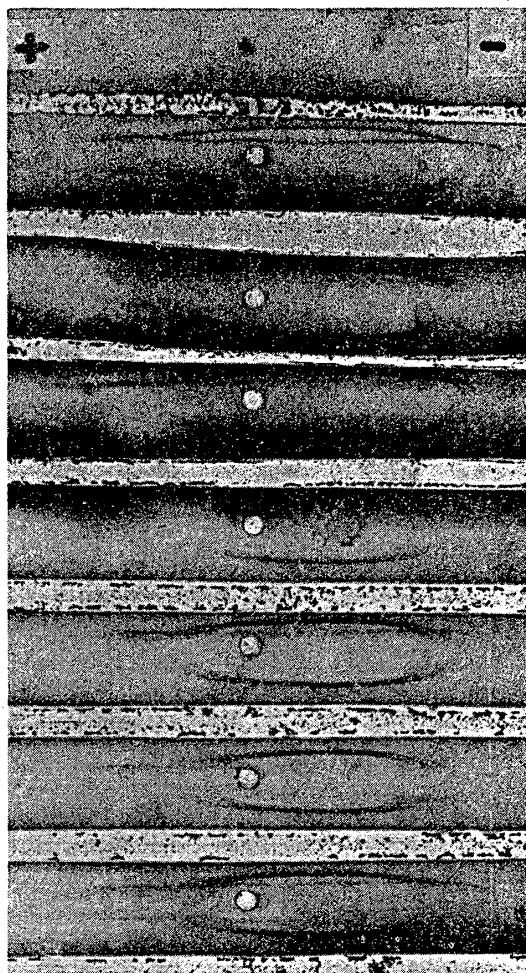


この吸収後の抗 IgM, IgA 血清は患者血清に対し, IgMの沈降線と, 2本に分裂した IgA の沈降線を生じた. 2匹のウサギから採血した抗 immunoglobulin 血清にこのような現象がみられ, 他の1匹, 及び Haermans の方法で分離した IgA で免疫したウサギから採血した血清を使つた場合には IgA の沈降線に分裂はみられなかつた。(Fig. 12)

もし, この IgA の沈降線の分裂が L 鎖の κ, λ の違いによるものならば, IgG の沈降線が出る筈であるが, 沈降線は認められず, 又, この抗血清は, κ 型の Bence-Jones 蛋白とも反応しなかつた (写真13). 又 IgD myeloma protein に対して, この吸収後の抗 IgA, IgM 抗血清は沈降線を作らなかつた (Fig. 14). 従つて IgA の沈降線の分裂は, L 鎖の κ, λ によるものでもなく, IgD によるものでもない事が判明した. おそらく, IgA の

Fig. 15.

9例の正常人血清の immunoelectrophoresis
一番上の溝のみ抗 immunoglobulin 3, 他は抗 im-
munoglobulin 1



H鎖の違いによるものと思われる。この IgA の分裂は、
卵アレルギー患者血清のみならず、9人の正常人の血清
にもみられた。(Fig. 15).

V. 考 案

1) 未同定の抗体について

R I E, R I D の結果を要約すると、対照に用いた正
常人には、EA*と反応する IgG 抗体があり、卵アレ
ルギー患者には、IgG, IgA 抗体とそのほかに未同定の
抗体があつた。

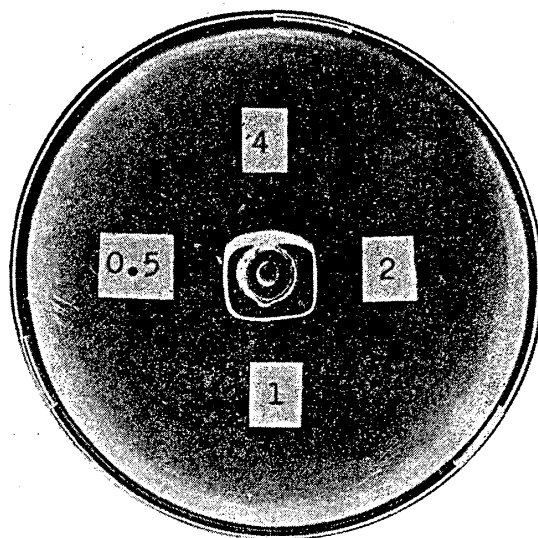
さてそのほかにこの未同定の抗体を γ_x を略して、有
り得る場合を列举して考察する。

① 卵白アルブミンには、2種類の抗原があつて、患
者血清中には、それぞれ反応する IgG 抗体があり、 γ_x
はその1つである。

一般に2本の沈降線を生じた場合、2種の抗原抗体反
応が存在すると考えるのが妥当である。しかし、文献的
には、5回再結晶の卵白アルブミンは電気泳動で A_1
(分子あたりP 2 原子), A_2 (1), A_3 (0) に分けられ
ているが²⁶⁾²⁷⁾、抗原的には均一であるとされている。²⁸⁾
²⁹⁾著者らの使つた卵白アルブミン(5回再結晶)を、ウ
サギに Freund's complete adjuvant を共に5回2週
おきに免疫したけれども、抗体は一種類しか出来なかつ
た。(Fig. 16)

Fig. 16.

抗卵白アルブミンウサギ血清による寒天ゲル内沈降
反応。各数字は5回結晶卵白アルブミンmg/ml



又、R I D で EA* の濃度を種々変えてみたが、radio-
active な線は、ほとんどその位置を変えることなく、患
者血清を入れた孔 (well) の近くにあつた。

② 均一の卵白アルブミン抗原に反応する2種類の抗
体があつて、その1つは IgG でありもう一つは γ_x で
ある。

均一の抗原に対して、分子量の異なる抗体が共存する
場合、異なる沈降線が生ずる事は報告されていない。又
 γ_x は DEAE cellulose C.C. で IgG 分画にあつた。

③ γ_x は IgG の subclass である。

IgG には IgG 1, 2, 3, 4 が知られている³⁰⁾。こ
れはH鎖の構造に相違があるためで、分子量、沈降定数
に違いは見いだされていない。従つて、寒天ゲル内で、
同一抗原に対し、異なる沈降線を作る可能性はないだろ
う。

④ IgE との関係

この患者血清は、卵白アルブミンに対し、高いPK価を持つている。IgE は石坂によれば³¹⁾、DEAE c.c.chr でpH 8.0, 0.025 M phosphate buffer で、その主要部分が溶出されるのに反し、著者の示した γ_x はpH 8.0, 0.005M phosphate bufferで溶出されている。電気泳動ではIgEが γ_1 であると報告されているが、 γ_x は γ_1 と γ_2 との中間、又は γ_2 である。

⑤ γ_x は κ, λ type 以外の L chain をもつた、抗体である。

L chain には κ, λ type のほかに未同定の L chain が少量あるといわれている。この γ_x は、抗 Fab 抗体で沈降線を形成するに至らなかった。しかし、 γ_x が κ, λ type をもっているとしても、 γ_x が微量のために抗 Fab で検出されなかったと考えるべきであろう。吸収操作による検討がさらになされるべきである。

⑥ γ_x と reagin と関係

γ_x がpH 8.0, 0.005 Mの phosphate buffer で DEAE c.c.chr. より溶出されるし、又、reagin もこの分画に含まれるので関連は否定出来ない。しかし、reaginは更に濃度を高めた phosphate buffer で溶出される分画にも存在しているので更に検討の必要がある。

2) reagin の heterogeneity

reagin が DEAE c.c.chr. で 0.005M, pH 8.0の phosphate buffer で溶出されるばかりでなく、0.001M pH, 8.0でも溶出された。これは牛乳アレルギーにおける Fireman ら³⁰⁾の報告と一致するものである。従つて、0.005M, pH 8.0の条件では溶出されないと報告されている ragweed の reagin³¹⁾と、その性質をやや異にする。もしすべての reagin が石坂らの IgE, Johansson らの IgND に属するものとすれば、アレルギーによつて性質の異なる IgE 抗体が存在するのであろうか。しかし、食餌性アレルギーに対する reagin が、ragweed などの吸入性アレルギーに対する reagin よりも、DEAE c.c.chr で早く溶出される別の immunoglobulin に属する事も考えられる。

3) IgA の2本の沈降線について

IgA には、少なくとも2種の subclass がある事が myeloma proteinにより知られている³²⁾。しかし正常人の IgA には、沈降線は一本しか生じない。Grey らは、IgG の Fc を papain で分解すると同一電気移動度を持ちながら2本に分かれた沈降線を生ずると報告している。papain により抗原性を一部消失した Fc と、intact

の Fc が共存した場合2本の沈降線が生ずると考えられる。IgA の myeloma protein より明らかにされた subclass も、Le と、その抗原性を一部消失した He に分けられている。両者の電気移動度は同じである。human immunoglobulin-anti Fab の complex で免疫して作った抗 immunoglobulin ウサギ血清は IgA に2本の沈降線を作つた。このような特殊な免疫方法を行なえば、H鎖の微小な違いが、ウサギの抗体産生細胞に認知されて IgA の2種を識別する抗体を作り得たのではないだろうか。

この2本の沈降線と Le, He の関係は明らかに出来なかつた。

VI. 結 論

(1) ¹³¹I 結合卵白アルブミンを用いて卵アレルギー患者の radioimmunodiffusion, radioimmuno-electrophoresis, を行なつた。又 ¹³¹I 結合卵白アルブミン患者血清との直接反応を寒天ゲル内で調べた。

(2) 患者には IgG, IgA 抗体が確認された。このほかに、¹³¹I 卵白アルブミンを直接反応によつてのみ検出される抗体があつた。この抗体は、抗 IgG, IgA, IgM, IgD, 抗 Fab 抗体によつて沈降線を形成することができなかった。

卵白アルブミンに2種の抗原が存在するため、そのうちの一つに反応する抗体であると考えられるほか、特殊の免疫グロブリンであるという可能性も考えられる。

(3) 卵白アルブミンに対する reagin は、すでに報告されている ragweed pollen に対する reagin ないしは IgE よりも、DEAE cellulose column chromatography で早く溶出されると考えられる結果を得た。

(4) 未同定の抗体と reagin との関係は充分明らかにできなかった。

(5) 抗ヒト Fab ウサギ血清で、ヒト血清中の免疫グロブリンを沈澱させ、この沈澱物でウサギを免疫して作った抗血清は、正常人中に存在する2種の IgA を識別する事が出来た。この抗免疫グロブリン血清も、(2)の未同定の抗体に対し沈降線を形成しなかつた。この免疫方法は、免疫グロブリンの研究に新しい手段を与えると思われる。

貴重な血清を提供して下さいました金沢大学村上元孝教授・関本博氏、東大医科研石井明治氏、助言をいただきました東大医科研渡辺貞助教授、青木良雄氏、中村弘氏、東大病院物療内科広瀬俊一氏に厚くお礼申し上げます。又、終始、実験を手伝つて下さいました柿沢富乃氏

にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Yagi, Y., Maier, P., Pressman, D., Arbesman, C.E. and Reisman, R.E.: The presence of the ragweed-binding antibodies in the sensitive individuals. *J. Immun.* 91, 83—89, 1963.
- 2) Haermans, J.F. and Vaerman, J.P.: β_{2A} -globulin as a possible carrier of allergic reaginic activity. *Nature*, 193, 1091, 1962.
- 3) Fireman, P.: The association of skin-sensitizing antibody with the β_{2A} -globulin in sera from ragweed sensitive patients. *J. Exp. Med.* 17 (4), 604, 1963.
- 4) Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Hornbrook, M.M.: Blocking of Prausnitz-Küstner sensitization with reagin by normal human β_{2A} -globulin. *J. Allergy*, 34, 395, 1963.
- 5) Ishizaka, K., Dennis, E.G. and Hornbrook, M.M.: Presence of reagin and γ_{1A} -globulin in saliva. *J. Allergy*, 35, 143, 1964.
- 6) Terr, A.I. and Beutzi, J.D.: Gel filtration of human skin-sensitizing antibody and β_{2A} -globulin. *J. Allergy*, 35, 206, 1964.
- 7) 伊藤幸治: 皮膚感作抗体の免疫化学的研究、アレルギー, 14 (10), 536—552, 1965.
- 8) Perelmutter, L., Rose, B. and Goodfriend, L.: The relationship between the skin-sensitizing antibody and γA protein in the sera of ragweed-allergic individuals. *J. Allergy*, 37 (4), 236—245, 1966.
- 9) Perelmutter, L., Rose, B. and Goodfriend, L.: The relationship between skin-sensitizing antibodies and γD globulin in the sera of ragweed-sensitive individuals. *Int. Arch. Allerg.* 29, 364—367, 1966.
- 10) Rowe, D.S. and Fahey, J.L.: A new class of human immunoglobulins. I. A unique myeloma protein. II. Normal serum IgD. *J. Exp. Med.* 121, 171—199, 1965.
- 11) Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Hornbrook, M.M.: Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immun.* 97 (1), 75—85, 1966.
- 12) Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Hornbrook, M.M.: Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with γE globulin antibody. *J. Immun.* 97, 840, 1966.
- 13) Ishizaka, T., Ishizaka, K. and Hornbrook, M.M.: Allergen-binding activity of γE , γG and γA antibodies in sera from atopic patients, In vitro measurements of reaginic antibody. *J. Immun.* 98, 490, 1967.
- 14) Johansson, S.G.O., Bennich, H. and Wide, L.: A new class of immunoglobulin in human serum. *Immunology*, 14, 265, 1968.
- 15) 石坂公成: 1967年8月 国際生化学会報告による.
- 16) Johansson, S.G.O.: Raised level of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma. *Lancet*, 2 (7523), 951—953, 1967.
- 17) Menzel, A.E.O. and Sherman, W.B.: The antibody mechanism of ragweed allergy. Electrophoretic and chemical studies. IV. Two reaginic variants demonstrated by rivanol fractionation, the major variant without relationship to beta-2A globulin.
- 18) Reid, R.T., Minden, P. and Farr, R.S.: Reaginic activity associated with IgG immunoglobulin. *J. Exp. Med.* 845—858, 1966.
- 19) Fireman, P., Boesman, M. and Gitlin, D.: Heterogeneity of skin-sensitizing antibody. *J. Allergy*. 40 (5), 259, 1967.
- 20) Hansson, U.B., Lawrell, C.B. and Bauchmann, R.: Sedimentation constants of IgG and IgD myeloma proteins compared with those of normal IgG. *Acta medica Scandinavica*, Suppl. 445, 89—92, 1966.
- 21) Porter, R.R.: The hydrosis of rabbit-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73, 119, 1959.
- 22) Olins, D.E. and Edelman, G.M.: The antigenic structure of the polypeptide chains of human γ -globulin. *J. Exp. Med.* 116, 635, 1962.
- 23) Prausnitz, C. and Kustner, H.: Studien über die Überempfindlichkeit, Zentralblatt f. Bakteriologie, 86, 160, 1921.
- 24) Sober, H.A. and Peterson, E.A.: Protein chromatography on ion exchange cellulose. *Fed. Proc.* 17, 1116—1126, 1958.
- 25) Scheidegger, J.J.: Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allerg.* 7, 103, 1955.
- 26) Longworth, L.G., Cannan, R.K. and MacInnes, D.A.: An electrophoretic study of the protein of egg white, *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 2580, 1940.
- 27) Perlmann, G.E.: Enzymatic dephosphorylation of ovalbumin and plakalbumin. *J. Gen. Physiol.*, 35, 711, 1952.
- 28) Kaminski, M.: Quelques applications de méthodes immuno-chimiques à l'étude du

- blanc dd'oeuf et de ses constituants. Bull. Soc. Chim. Biol., 36, 79, 1954.
 - 29) Dulieux, J. and Kaminski, M.: Séparation des constituants de l'ovalbumine par électrophorèse en gelose. Bull. Soc. Chim. Biol., 38, 1445, 1956.
 - 30) Terry, W.D. and Fahey, J.L.: Subclass of human γ -globulin based on differences in the heavy polypeptide chains. Science, 146, 400, 1964.
 - 31) Ishizaka, K., and Ishizaka, T., Physicochemical properties of reaginic antibody. J. Allergy, 37 (3), 169—185, 1966.
 - 32) Vaerman, J. P. and Heremans, J.F.: Subclass of human immunoglobulin A based on differences in alpha polypeptide chains. Science, 153, 647, 1966.
 - 33) Grey, H. M. and Abel, C. A.: Structure characteristics of the Fc' fragment of human γ G-globulin. Immunochemistry, 4, 315—317, 1967.
-

Immunological Studies on Food Allergy

I. PCA and Prausnitz-Kustner reaction by oral challenging of antigen or allergen

Department of Allergology, Institute of Medical Science, University of Tokyo

Koji Ito, Tiuzi Sindo

Department of Dermatology, School of Medicine, Keio University

Akiko Ohshiro

1) Passive cutaneous anaphylaxis was carried out by oral challenging of antigen.

Both in the case of egg-anti ovalbumin and in the case of cytochrome C-anti cytochrome C, PCA were clearly positive by oral challenging.

2) Serum from a patient sensitive to egg was injected intradermally to four recipient. After taking egg orally, three recipients showed wheal and flare reactions at the PK-site.

3) One recipient who showed no reaction at PK-site by taking egg orally, showed reaction by injection of egg albumin at PK-site. IgG antibody to egg albumin was detected in this recipient by radioimmunoelectrophoresis. The other recipients had no antibodies to egg albumin.

4) By injection of the patient serum once intradermally, one recipient showed skin reaction every three times when he took eggs orally.

Immunological Studies on Food Allergy

II. IgG-, IgA antibody and unidentified antibody detected in egg allergy with ^{131}I conjugated egg albumin

Department of Allergology, Institute of Medical Science, University of Tokyo

Koji Ito, Tiuzi Sindo

Department of Dermatology, School of Medicine, Keio University

Akiko Ohshiro

1) Immunoelectrophoresis and immunodiffusion were carried out with serum from a patient sensitive to egg. IgG- and IgA antibodies were detected with use of I^{131} egg albumin and anti human serum.

Unidentified antibody to egg albumin was detected by direct reaction between the patient serum and I^{131} egg albumin.

This unidentified antibody did not form any precipitin band against anti IgG, IgA, IgM, IgD, Fab and anti immunoglobulin serum.

It is not clear that this antibody is one against a minor component of the egg albumin preparation, or this is another immunoglobulin than IgG, IgA, IgM and IgD.

2) PK activity was found also in IgG fraction which was eluted in DEAE cellulose column chromatography with pH. 8.0, 0.001 M phosphate buffer.

It seems, therefore, that reagin to egg is eluted earlier than reagin to ragweed pollen which was reported by other authors.

3) Two IgA precipitin bands were shown in allergic and non-allergic persons by anti immunoglobulin serum which was prepared by immunization with anti human Fab- human immunoglobulin complex to rabbits.

This immunization method might detect minor differences of H chains of IgA molecules.