

腺癌関連糖鎖抗原に対するイデオタイプ抗体 AI206 の 抗原認識構造に関する研究

小野 晃裕 杉山 敏郎 今井 浩三

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Study on the Antigen-Binding Structure of Anti-Idiotypic Antibody AI206 to Adenocarcinoma-Associated Carbohydrate Antigen

Akihiro ONO, Toshiro SUGIYAMA and Kohzoh IMAI

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. A. YACHI)

ABSTRACT Monoclonal antibody (MoAb) AI206 (IgG1) is an anti-idiotypic antibody of MoAb YH206 (IgM) to adenocarcinoma-associated carbohydrate antigen and inhibits the reaction of MoAb YH206 to YH206 antigen. By Western blotting analysis, MoAb AI206 reacted with only unreduced MoAb YH206, whereas it did not react with reduced MoAb YH206. Furthermore MoAb AI206 reacted with IgM subunits (180Kd), F(ab')₂ (110Kd) and Fab (50Kd) of unreduced pepsin-treated MoAb YH206. Thus MoAb AI206 recognized the structure on Fab of MoAb YH206. MoAb YH206 reacted with unreduced MoAb AI206 and also F(ab')₂ (110Kd) and Fab (50Kd) of unreduced pepsin-treated MoAb AI206. It is presumed that MoAb YH206 and MoAb AI206 recognize each other in an unreduced condition but not in a reduced condition. The recognition of such a conformational idio type on Fab must be important for this particular anti-idiotypic MoAb AI206 and MoAb YH206.

Since MoAb YH206 recognized the carbohydrate on YH206 antigen as well as the peptide on MoAb AI206, the conformation on Fab of MoAb AI206 may mimic the carbohydrate structure on YH206 antigen. In fact, YH206 antibody activity was induced in syngeneic mouse serum immunized with MoAb AI206. These observations suggest that the internal image of YH206 carbohydrate antigen is preserved within the conformational idio type on Fab of MoAb AI206. The analysis on conformational idio type may be important for choosing an anti-idiotypic antibody which possesses the internal image of the original carbohydrate antigen.

(Received May 14, 1990 and accepted June 14, 1990)

Key words: Carbohydrate antigen, Monoclonal anti-idiotypic antibody, Conformational idio type, Internal image

1 緒 言

Jerne の idio type network theory¹⁾ に基づき, 抗イデオタイプ抗体 (抗 Id Ab) をワクチンとして利用しようとする試みが報告されている. 特に HB ウィルス, human immunodeficiency virus (HIV) などの各種ウィルス感染症に対して試みられ, 既に動物実験レベルでは, 抗 Id Ab の投与によって HB ウィルスによ

る肝炎の発症を阻止できたという報告²⁾もある. また最近では悪性腫瘍の治療において少量の抗腫瘍モノクローナル抗体 (MoAb) の投与が抗体の直接作用ではなく, idio type network を介した機序によって, 抗腫瘍効果を示すと報告^{3,4)}されつつある. これらの理論的背景は抗 Id Ab のもつ抗原類似の内部イメージ (internal image) を利用して, 抗 Id Ab の投与が, 元の抗原を排除する免疫応答を誘起させる点にある.

教室の山本⁵⁾は腺癌関連糖鎖抗原を認識する MoAb YH206(Ab1) に対する抗 Id Ab(Ab2) である MoAb AI206 を作製し YH206 抗原と MoAb YH206 の反応を MoAb AI206 が強く阻止することを認め、MoAb AI206 が MoAb YH206 の抗原結合部位か、少なくともその近傍を認識していると推測した。

そこで本研究においてはさらに MoAb YH206 とその抗 Id 抗体である MoAb AI206 との反応性を検討し、互いにかなる構造を認識しているかを検討し、また Ab2 が internal image を有する可能性を、Ab2 の抗原解析ならびに同系免疫実験から考察した。

2 研究方法

2.1 モノクローナル抗体及び培養細胞

MoAb YH206(IgM, κ) はヒト腺癌関連糖鎖抗原を認識する MoAb^{6,7)} であり、また MoAb AI206(IgG1, κ) は MoAb YH206 の抗 Id Ab であることは既に報告⁵⁾ した。MoAb CP3(IgM, κ) は *Campylobacter pylori* を免疫原として作製された MoAb⁹⁾ である。MoAb MUSE 11(IgG1, κ) は胃癌患者腹水の高分子画分を免疫原として作製された MoAb⁹⁾ である。これらの抗体は抗体産生ハイブリドーマ移植マウスから得た腹水を精製し用いた。YH206 抗原は、1%FCS 加 RPMI 1640 で培養したヒト肺腺癌細胞株 A549 の培養上清を 10 倍濃縮して、Sephacryl S300 によりゲル濾過し精製した。

2.2 MoAb AI206 の MoAb YH206 への反応性及びその特異性の検定

既に MoAb AI206 は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) の系において MoAb YH206 と濃度依存性に反応し YH206 抗原抗体反応を微量で阻止することが報告されている⁵⁾。そこでさらにウェスタンブロット法を用いて両者の反応性を詳細に検討した。

2.2.1 ウェスタンブロット法

Towbin *et al.* の方法¹⁰⁾ に従い、10%SDS ゲルを使用し MoAb YH206 10 μ g を非還元条件下及び 2-メルカプトエタノール (250 mM) による還元条件下で電気泳動した。なお還元、非還元の処理は、試料を煮沸せずに室温一晩で行なった。泳動展開後ニトロセルロース膜に転写し、3%ウシアルブミン (BSA) 加リン酸緩衝液 (PBS, pH7.4, 0.01 M) でブロック後、ビオチン化 MoAb AI206 (5 μ g/ml) 及びアビジン-ビオチン化ワサビペルオキシダーゼ複合体 (Vectastain ABC キット, Vector, USA) と反応させ、4-chloro-1-naphthol (Bio-Rad, USA) を基質として発色した。コントロー

ルとして MoAb CP3 を泳動し、同様にビオチン化 MoAb AI206 と反応させた。次に MoAb AI206 と MoAb YH206 の反応が特異的であるかどうかを調べるため、あらかじめ過剰量 100 μ g/ml の MoAb YH206 をビオチン化 MoAb AI206 溶液 (10 μ g/ml) に等量加え、同様にウェスタンブロット法を施行した。

2.2.2 2-メルカプトエタノール処理

2-メルカプトエタノール濃度の抗原へ及ぼす影響について検討した。種々の濃度 (100 mM, 10 mM 及び 2.5 mM) の 2-メルカプトエタノールを MoAb YH206 溶液に加え室温下に一晚、非煮沸条件で還元し、その後は 2.2.1 と同様にウェスタンブロット法にて検討した。

2.2.3 ペプシン処理

MoAb YH206 を Kishimoto *et al.* の方法¹¹⁾ に従いペプシン処理した。すなわち、MoAb YH206 を 0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 4.5) で透析後、ペプシン (Worthington Biochemical, USA) を MoAb YH206 10 mg に 0.2 mg 加え、37°C 18 時間反応させた。その後遠心し沈殿を除き上清を PBS で透析し反応を停止させた。コントロールとして用いた MoAb CP3 も同様に処理した。ペプシン処理した MoAb 10 μ g を用い、非還元条件下にウェスタンブロット法で検討した。一次抗体としてビオチン化ヒツジ抗マウス IgM 抗体 (μ 鎖特異的) (Vector, USA)、ヒツジ抗マウス κ 鎖抗体 (Bethyl, USA) 及びビオチン化 MoAb AI206 をそれぞれ 5 μ g/ml に希釈し、室温で 2 時間または 4°C 一晩反応させた。PBS で洗浄後、ビオチン化抗体は 2.2.1 に準じ、また抗マウス κ 鎖抗体は、5 μ g/ml のビオチン化ウサギ抗ヒツジ IgG 抗体 (H+L 鎖特異的) (Vector, USA) と室温下 1 時間反応後、アビジン-ビオチン化ワサビペルオキシダーゼ複合体と反応させ、洗浄後発色させた。次にこのペプシン処理された MoAb YH206 及び MoAb CP3 を 100 mM の 2-メルカプトエタノールで一晩、非煮沸の条件で還元してビオチン化 MoAb AI206 との反応性を検討した。

2.3 MoAb YH206 の MoAb AI206 への反応性

2.3.1 ウェスタンブロット法及び 2-メルカプトエタノール処理

12.5%SDS ゲルを使用し 2.2.1 と同様に行なった。抗原を MoAb AI206 とし、その 10 μ g を非還元条件、さらに種々の濃度 (100 mM, 10 mM, 2.5 mM 及び 1 mM) の 2-メルカプトエタノールによる還元条件下で電気泳動し、転写後にビオチン化 MoAb YH206 (5 μ g/ml) との反応性を検討した。

2.3.2 ペプシン処理

2.2.3 と同様に MoAb AI206 をペプシン処理し、抗マウス κ 鎖抗体、ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗マウス IgG 抗体 (Fc 鎖特異的) (Cappel, USA) 及びビオチン化 MoAb YH206 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) との反応性を検討した。ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体は 500 倍に希釈して使用した。

2.4 ポリクローナル抗 MoAb AI206 抗体 (Ab3) の誘導

辻崎, 今井¹²⁾ の方法に従い, 精製 MoAb AI206 の 50 μg を keyhole limpet hemocyanin (Sigma, USA) に glutaraldehyde を用いて結合させた上で, Freund's complete adjuvant と共に MoAb AI206 と同系の BALB/c マウスに免疫し, 最終免疫の 2 週後にマウスの腋窩動脈より採血し, 抗血清を得た。コントロールとして, 同じ IgG1 サブクラスであるマウス MoAb MUSE 11 を用いて, 同様に同系 BALB/c マウスを免疫し抗血清を得た。

2.5 抗 MoAb AI206 抗体の特異性

2.5.1 ELISA 法による MoAb AI206 との反応性

MoAb AI206 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 150 μl ずつ 96 穴マイクロタイタープレート (F. A. S. T. system, Becton Dickinson, USA) に固相化し, 3% BSA 加 PBS でブロックした。次に 2.4 の方法で得られた抗 MoAb AI206 抗体 (Ab3) を PBS により各種濃度に希釈して 4°C 一晚反応させた。洗浄後, ビオチン化 MoAb AI206 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と 4°C 一晚反応させ, さらに洗浄後ペルオキシダーゼ標識アビジン (Vector, USA) と室温下 2 時間反応させた。o-phenylenediamine (0.4 mg/ml) (片山化学) を基質として発色させ, ELISA リーダー (三光純薬) で 492 nm における吸光度を測定した。

2.5.2 ELISA 法による YH206 抗原との反応性

精製 YH206 抗原 (100 U/ml) 150 μl を, ピンに固相化し, 2.5.1 に準じ実施した。一次抗体として抗 MoAb AI206 抗体を, コントロールには抗 MoAb MUSE 11 抗体を PBS で各種濃度に希釈して用い, 二次抗体にはペルオキシダーゼ標識家兎抗マウス免疫グロブリン抗体 (DAKO, Denmark) を 500 倍に希釈し用い, 室温下 2 時間反応させ発色させた。

2.5.3 ウェスタンブロット法による YH206 抗原との反応性

5% の SDS ゲルを用い, YH206 抗原を 2-メルカプトエタノールにて還元し泳動した。2.2.1 の方法に準じ, 一次抗体として 25 倍に希釈した抗 MoAb AI206 抗体及び抗 MoAb MUSE 11 抗体を反応させ, 二次抗体に

ビオチン化抗マウス IgG 抗体 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用い, さらにアビジン-ビオチン化ワサビペルオキシダーゼ複合体と反応させ, 発色させた。次に, 以上の反応の特異性を検定するため, 抗 MoAb AI206 抗体溶液に過剰量の YH206 抗原を添加した後に, 一次抗体として反応させ, 以下, 上記と同様に実施した。

3 研究成績

3.1 MoAb AI206 の MoAb YH206 への反応性及びその特異性

3.1.1 ウェスタンブロット法による検討

Fig. 1 に示すように非還元状態の MoAb YH206 は IgM 型 (分子量約 97 万) のためゲル上部に位置するが, MoAb AI206 と明瞭に反応した。しかし MoAb YH206 を還元して得られた H 鎖と L 鎖には全く反応しなかった。また, コントロールの MoAb CP3 及びそれを還元して得られた H 鎖及び L 鎖に全く反応しなかった。次に過剰量の MoAb YH206 をビオチン化 MoAb AI206 に加えて, ビオチン化 MoAb AI206 と MoAb YH206 との反応が阻止されるか否かを検討した。Fig. 2 に示すように MoAb AI206 の MoAb YH206 に対す

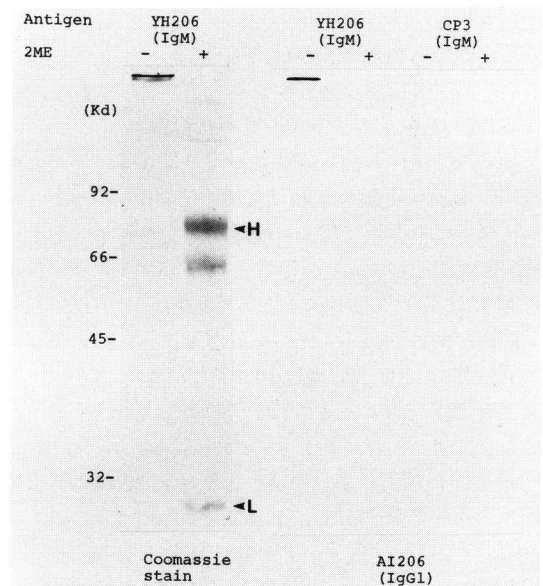


Fig. 1 Western blotting analysis of 2-mercaptoethanol (2ME)-treated MoAb YH206. MoAb AI206 reacted with unreduced MoAb YH206, but not with reduced MoAb YH206 (heavy or light chains). MoAb CP3 (IgM) was used as a negative control for the reactivity of MoAb AI206.

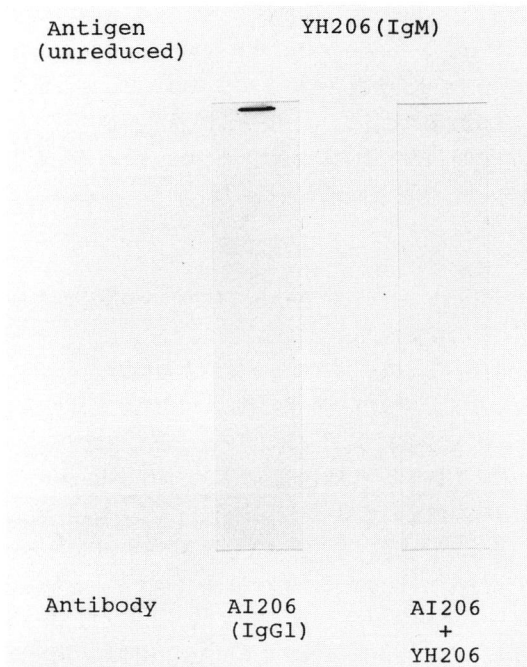


Fig. 2 Absorption test of MoAb AI206 with MoAb YH206 in Western blotting. Reaction of MoAb AI206 to MoAb YH206 was diminished after MoAb AI206 was incubated with MoAb YH206.

る反応性は過剰量の MoAb YH206 添加により完全に消失し、この反応は特異的であることが示された。

3・1・2 2-メルカプトエタノール処理

強い還元条件の 250 mM 2-メルカプトエタノールで処理すると、H 鎖と L 鎖に分離した際イディオトープの抗原性に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで Fig. 3 のごとく 3 種の濃度の 2-メルカプトエタノールで MoAb YH206 を還元し、同様に MoAb AI206 との反応性を検討した。クマシー染色により、2-メルカプトエタノール 100 mM 及び 10 mM の濃度の場合には H 鎖と L 鎖が明瞭に認められ十分に還元されている。しかしウェスタンブロットティングでは、MoAb AI206 は H 鎖及び L 鎖とは反応を示さなかった。2-メルカプトエタノール濃度が 2.5 mM の還元条件ではクマシー染色に示すように、還元が不十分で H 鎖と L 鎖も存在すると同時に非還元状態の MoAb YH206 も一部残存していた。この場合、ウェスタンブロットティングでは非還元状態の MoAb YH206 に反応を認めるにもかかわらず、その H 鎖と L 鎖とは全く反応しなかった。従って、MoAb AI206 は、H 鎖と L 鎖が解離していない形での MoAb YH206 とのみ反応しうることが判明した。

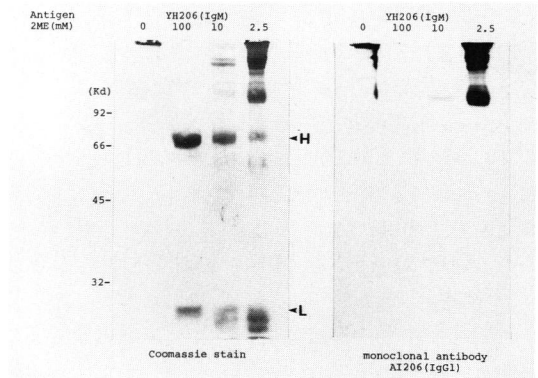


Fig. 3 Reactivity of MoAb AI206 to reduced MoAb YH206 at various concentrations of 2-mercaptoethanol (2ME) in Western blotting. MoAb AI206 reacted with only unreduced MoAb YH206, but did not react with either the heavy or light chains of MoAb YH206 which were obtained when MoAb YH206 was treated with a very low concentration of 2ME.

3・1・3 ペプシン処理

次に MoAb AI206 の反応部位が MoAb YH206 の Fab 部分と反応するか否かを検討するためペプシン処理を施した。Fig. 4 に示すようにペプシン処理をした MoAb YH206 及び MoAb CP3 は抗マウス IgM 抗体 (μ 鎖特異的) とは両者とも主に 180 Kd, 110 Kd 付近

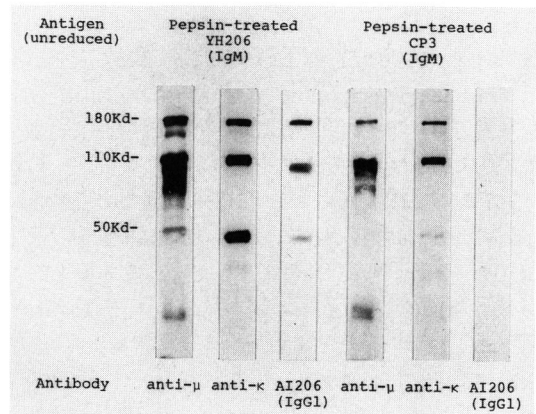


Fig. 4 Western blotting analysis of pepsin-treated MoAb YH206. MoAb AI206 reacted with the IgM subunits, $F(ab')_2$ and Fab of MoAb YH206, which were obtained with pepsin treatment, while it did not react with those of control MoAb CP3. Goat anti- μ and goat anti- κ antibodies clearly reacted with IgM subunits, $F(ab')_2$ and Fab of pepsin-treated MoAb YH206 and MoAb CP3.

に反応を認めた。抗マウス κ 鎖抗体を用いると 180 Kd, 110 Kd に加え、50 Kd 分子とも明瞭に反応した。ペプシン処理により IgM 抗体は IgM サブユニット (180 Kd), F(ab')₂ (110 Kd) 及び Fab (50 Kd) に分離されることが判明しているが^{13,14)}、以上のウェスタンブロットティングの結果は、この 3 種類の IgM 分解産物を示している。

次に MoAb AI206 との反応性を検討すると、ペプシン処理 MoAb YH206 の 180 Kd, 110 Kd 及び 50 Kd に反応を認め、コントロールのペプシン処理 MoAb CP3 の各分画とは全く反応しなかった。以上の結果から MoAb AI206 は、MoAb YH206 の Fab 部分を認識していることが示された。

さらに MoAb YH206 の IgM サブユニット、F(ab')₂ 及び Fab を還元して、MoAb AI206 との反応性を検討した。Fig. 5 に示すように、MoAb AI206 はこれらの

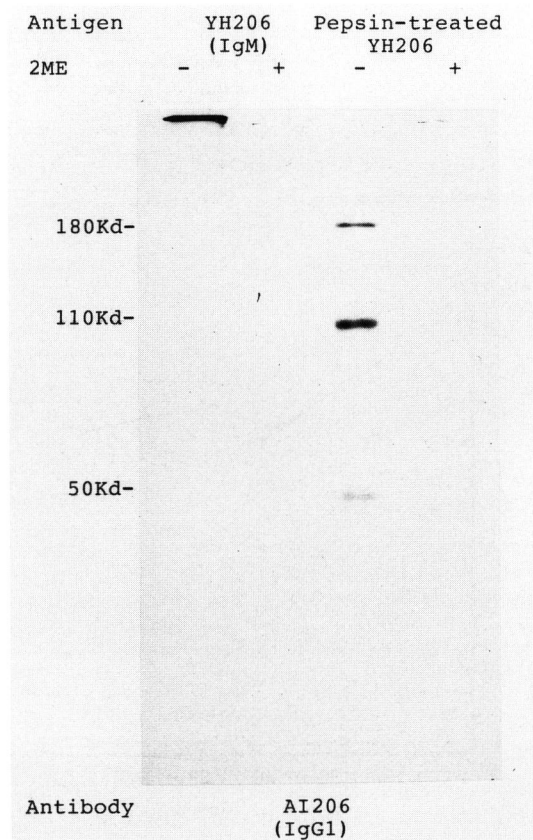


Fig. 5 Reactivity of MoAb AI206 to pepsin-treated MoAb YH206 in Western blotting. MoAb AI206 reacted with unreduced pepsin-treated MoAb YH206, but not with reduced pepsin-treated MoAb YH206.

ペプシン処理及び 2-メルカプトエタノールで還元された産物とは、全く反応しなかった。すなわち MoAb AI206 が反応しうる最小単位は H 鎖及び L 鎖に分離していない YH206 の Fab 部分に存在する構造と判断される。

3.2 MoAb YH206 の MoAb AI206 への反応性

3.2.1 ウェスタンブロット法及び 2-メルカプトエタノール処理

次に MoAb YH206 の MoAb AI206 に対する反応性を検討した。Fig. 6 に示すように、MoAb AI206 の MoAb YH206 への反応性と同様に、MoAb YH206 は非還元の MoAb AI206 とのみ反応性を示し、さらに Fig. 7 に示すように 2.5 mM あるいは 1 mM の 2-メルカプトエタノール存在下では非還元の 160 Kd の MoAb AI206 と反応し、還元分離された H 鎖及び L 鎖とは全く反応しなかった。

3.2.2 ペプシン処理

3.1.3 と同様に MoAb AI206 をペプシン処理し、MoAb YH206 との反応部位を検討した (Fig. 8)。ペプシン処理 MoAb AI206 の抗マウス κ 鎖抗体との反応をみると、MoAb AI206 (IgG1) のペプシン処理は MoAb YH206 (IgM) に比べると分解がやや不十分で様々の大きさの分解産物が含まれ、ペプシンに対する感受性が

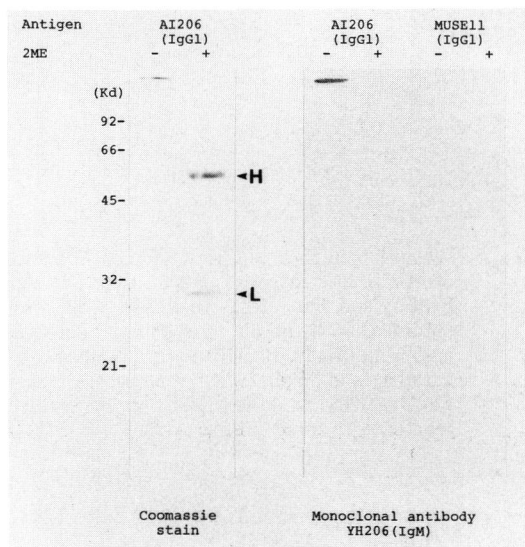


Fig. 6 Western blotting analysis of 2-mercaptoethanol (2ME)-treated MoAb AI206. MoAb YH206 reacted with unreduced MoAb AI206, but not with reduced MoAb AI206 (heavy or light chains). MoAb MUSE11 (IgG1) was used as a negative control for the reactivity of MoAb YH206.

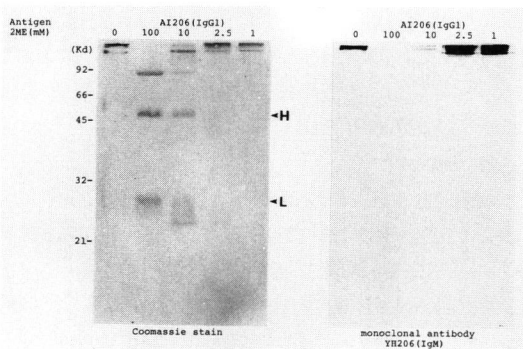


Fig. 7 Reactivity of MoAb YH206 to reduced MoAb AI206 at various concentrations of 2-mercaptoethanol (2ME) in Western blotting. MoAb YH206 reacted with only unreduced MoAb AI206 which were obtained when MoAb AI206 was treated with a very low concentration of 2ME.

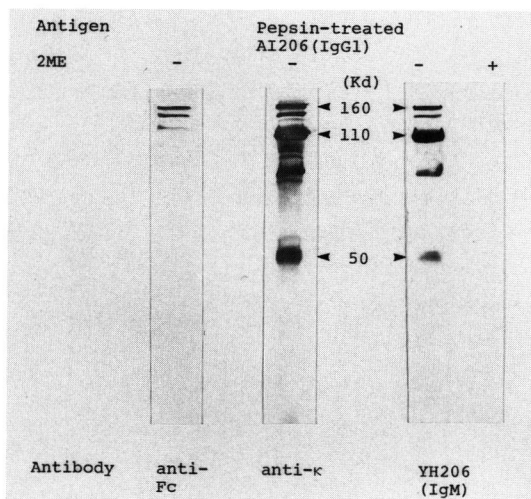


Fig. 8 Western blotting analysis of pepsin-treated MoAb AI206. MoAb YH206 reacted with $F(ab')_2$ and Fab of MoAb AI206, which were obtained with pepsin treatment. The goat anti- κ antibody clearly reacted with $F(ab')_2$ (110Kd) and Fab (50Kd) of pepsin-treated MoAb AI206, while the goat anti-Fc antibody reacted with intact MoAb AI206.

サブクラスにより異なることによると推測された。しかし抗マウス Fc 特異抗体による検討では 50~120 Kd の間に存在する分子に対する反応は消失しており、ペプシン処理 MoAb AI206 の主な分子は Fc 部分の取り除かれた $F(ab')_2$ 及び Fab であった。この場合、MoAb YH206 は、非還元状態の MoAb AI206 ペプシン分解産物とくに 110 Kd ($F(ab')_2$), 50 Kd (Fab) とは明瞭に反応し、還元されたペプシン処理 MoAb AI206 とは反

応性を認めなかった。以上の成績より、MoAb YH206 と MoAb AI206 は互いに H 鎖及び L 鎖に分離していない Fab からなる conformation を認識し、反応していると考えられた。

3.3 抗 MoAb AI206 抗体の特異性

MoAb AI206 を固相化して用いた ELISA の結果を Fig. 9 に示した。MoAb AI206 で免疫したマウスの抗体は高力価で固相化 MoAb AI206 と反応するが、コントロールの抗 MoAb MUSE11 抗体は反応を示さなかった。

次にこの MoAb AI206 免疫マウス抗体を用いて YH206 抗原との反応性を検討した。まず Fig. 10 に示すように、ELISA により抗 MoAb AI206 抗体は明瞭に固相化 YH206 抗原と反応を示し、その反応性は抗血清の希釈に従って低下した。一方、コントロールの抗 MoAb MUSE11 抗体は全く反応しなかった。ウェスタンブロットングで同様に検討すると Fig. 11 に示すよう抗 MoAb AI206 抗体は YH206 抗原と反応を認めるが、コントロールの抗 MoAb MUSE11 抗体は反応しなかった。しかも抗 MoAb AI206 抗体を分量量の YH206 抗原で吸収した後、同様に反応させると、陽性バンドは完全に消失した。以上の結果は、MoAb AI206 で免疫されたマウス血清中に、YH206 抗原で免疫して

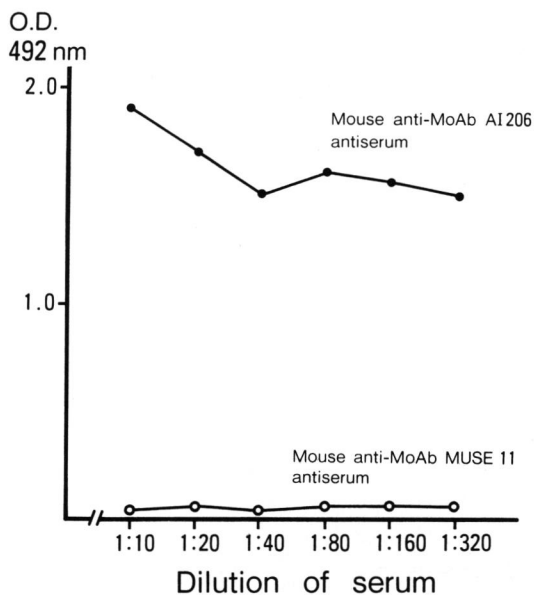


Fig. 9 Reactivity of anti-MoAb AI206 antiserum (Ab3) with MoAb AI206 (Ab2) assessed by ELISA. Anti-MoAb AI206 antiserum strongly reacted with MoAb AI206, while anti-MoAb MUSE 11 antiserum failed to react.

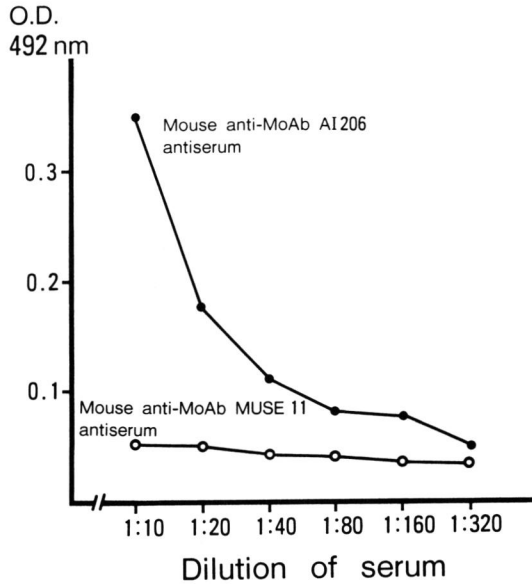


Fig. 10 Reactivity of anti-MoAb AI206 antiserum (Ab3) with YH206 antigen assessed by ELISA. Anti-MoAb AI206 antiserum reacted with YH206 antigen, while anti-MoAb MUSE 11 antiserum failed to react.

いないにもかかわらず YH206 抗体活性が存在することを強く示唆する。

4 考 察

抗 Id 抗体 (Ab2) は、その特異的なイデオトープの存在部位により分類されている¹⁵⁾。Ab2- α と呼称されるイデオトープは Ab1 の抗原結合部位より離れたところに存在し、それは抗原と Ab1 との反応を阻止することは出来ない。一方、抗原と Ab1 との反応を阻止可能な Ab2 を Ab2- β と呼んでいる。Ab2- β は Ab1 の抗原結合部位を認識し、さらにこの中に抗原の internal image を表現していると考えられている。また、Ab2- γ は Ab1 の抗原結合部位の一部又はその近傍を認識する抗体で、抗原と Ab1 の結合を部分的に阻止できる。各種感染症の予防にワクチンとして使用したり、抗腫瘍免疫を誘導するには Ab2- β が最適と考えられている¹⁵⁾。

MoAb AI206 は、YH206 抗原抗体反応を微量で阻止することより MoAb YH206 (Ab1) の抗原結合部位を認識する Ab2 (Ab2- β) と考えられ、YH206 抗原の internal image を有する可能性が考えられた⁵⁾。非常に興味深い点は、MoAb YH206 が、一方では YH206 抗原上のアシアロ型糖鎖を認識していることが判明⁷⁾ しており、もう一方ではその抗 Id 抗体 MoAb AI206 上の

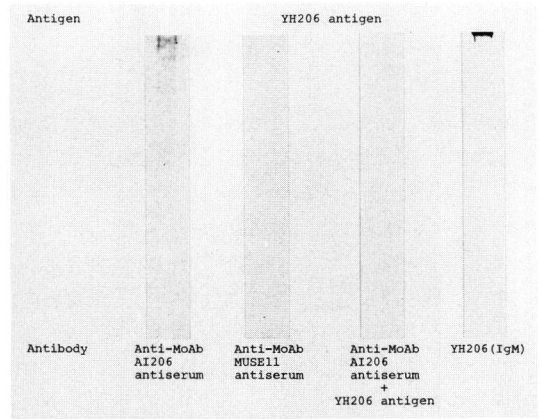


Fig. 11 Detection of YH206 antigen using anti-MoAb AI206 antibody (Ab3) by Western blotting. Anti-MoAb AI206 antiserum (Ab3) reacted with YH206 antigen, while control antiserum (anti-MoAb MUSE 11 antiserum) failed to react. The reaction of anti-MoAb AI206 antiserum (Ab3) to YH206 antigen was diminished by preincubation of anti-MoAb AI206 antiserum with YH206 antigen.

ペプチド部分と反応している点にある。本研究で明らかにし得たことは、MoAb YH206 と MoAb AI206 が相互に、H 鎖と L 鎖に分離していない Fab からなる高次構造を認識している点である。従って MoAb AI206 の Fab 上の高次構造が YH206 抗原糖鎖構造と類似の構造を持ちうる可能性が推測された。そこで、実際 MoAb AI206 を同系免疫して得られたポリクローナル抗体 (Ab3) を用いて検討したところ、この Ab3 は、ELISA 法、ウェスタンブロット法により YH206 抗原と反応を示すことが明らかとなった。すなわち、MoAb AI206 中に YH206 抗原の internal image が含まれていることが強く示唆された。

Ab2 が認識する Ab1 のエピトープが、H 鎖及び L 鎖の両者、あるいはいずれか一方のどの部位に存在するかに関しては種々の報告がある。Bluestone *et al.*¹⁶⁾ は、抗 H-2K^k 抗体のポリクローナル抗 Id 抗体を作製し、抗 H-2K^k の分離された H 鎖、L 鎖との反応性を direct binding radioimmunoassay により検討し、H 鎖上にイデオトープが存在しているとした。Zanetti *et al.*¹⁷⁾ は、ウェスタンブロットングにおいて Ab2 が、サイログロブリンに対する Ab1 の H 鎖及び L 鎖の両方を認識していること、また ELISA 法により Ab1 の H 鎖及び L 鎖は、それぞれ Ab1 の Ab2 への結合を阻止し、同様に Ab1 は、Ab1 の H 鎖及び L 鎖の Ab2 への結合を

阻止することを証明している。以上のように抗体上のイディオトープの存在部位は抗体により様々に報告されている。

しかしながら、これらの報告は Ab2 がペプチド抗原を認識する Ab1 上のいかなる部位を認識しているかを検討した報告であり、本研究のごとく Ab1 の対応抗原エピトープが糖鎖である場合についての報告は非常に少ない。Umeda *et al.*¹⁸⁾ は血液型糖鎖抗原である Le^x に対する Ab1 及び Ab2 の反応性を検討し、Ab2 の対応エピトープが Ab1 の H 鎖上のみ存在することを報告している。しかも Ab1 を 10 mM 以下のきわめて低濃度の 2-メルカプトエタノールで、しかも煮沸しないきわめて穏やかな還元条件で処理した場合にのみ、H 鎖上のイディオトープが検出された。すなわち、通常の還元条件下では H 鎖とは反応せず、従って Ab1 上の抗原決定基には高次構造も関与している可能性があることを指摘している。

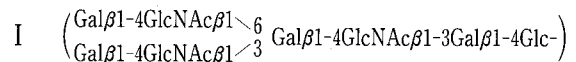
本研究においては、MoAb AI206 の MoAb YH206 への反応性を、きわめて穏やかな還元条件において検討した。2-メルカプトエタノール濃度が 2.5 mM でも、MoAb AI206 は MoAb YH206 の H 鎖や L 鎖単独とは反応せず、非還元条件下でのみ反応した。これらの成績は、MoAb YH206 が H 鎖及び L 鎖に分離される際の化学処理により、それぞれの抗原活性が低下した結果を反映している可能性も完全に否定できないが、このような低濃度の 2-メルカプトエタノール処理ではその可能性はきわめて低いと思われる。むしろ、MoAb AI206 が、MoAb YH206 の H 鎖と L 鎖の両者で形成される抗原構造を認識している可能性を強く示唆している。一方、MoAb YH206 も非還元条件下の MoAb AI206 とのみ反応し、1 mM 濃度の低濃度 2-メルカプトエタノール処理によってもその反応性は消失し、お互いに H 鎖と L 鎖が分離していない非還元条件下でのみ反応しうることが明らかとなった。

さらにこの点はペプシン処理抗原を用いても示された。MoAb YH206 をペプシン処理し、IgM サブユニット (180 Kd)、F(ab')₂ (110 Kd) 及び Fab (50 Kd) に分解しても非還元条件下であれば MoAb AI206 は反応しうる。また逆に MoAb AI206 をペプシン処理し、F(ab')₂ (110 Kd) 及び Fab (50 Kd) に分解しても同様に非還元条件下であれば MoAb YH206 は反応した。この結果は MoAb YH206 と MoAb AI206 はお互いに intact な Fab 部分で認識し合っていることを示している。

MoAb YH206 と MoAb AI206 との反応部位が、お

互いにアミノ酸配列によって規定される一次構造ではなく、H 鎖及び L 鎖の conformation を認識しているとすれば、MoAb AI206 上のイディオトープが糖鎖抗原 YH206 と類似の構造をとり、それが YH206 抗原の internal image となる可能性が考えられる。Ab2 が intact の Ab1 のみを認識する例として、ごく最近の Monestier *et al.*¹⁹⁾ の報告がある。それによると、非還元 Ab1 とのみ反応する Ab2 は internal image を有する可能性が述べられており、われわれの成績と類似する。

最近、YH206 抗原エピトープについて、瀧孝雄博士 (東京医科歯科大医学部、分子医化学) との共同研究 (私信) により、その糖鎖構造が



と関連していることが明らかにされつつあり、今後エピトープと internal image の対応が分子レベルで明らかにされる可能性がある。

さらに本研究において、ペプシン処理抗原を用いた実験から、MoAb AI206 上の Fab 部分のみで MoAb YH206 に対する反応性を十分に保持できることが明らかにされ、この部分が存在すれば有効に Ab1 様活性を誘導することが可能かも知れない。

人体にマウス MoAb を投与する際には抗マウス Ig 抗体の出現やアレルギー反応等の副作用の出現が指摘されており、ヒト型 MoAb の作製が望まれている。しかし、いまだヒト型 MoAb は安定したクローンは得難く、実用の域に達していない。そこでマウス MoAb を Fab や F(ab')₂ の形で投与するのも現時点ではひとつの方法と考えられる。実際 Teitelbaum *et al.*²⁰⁾ は、抗 DNA 抗体 (Ab1) の Ab2 を F(ab')₂ の形で投与し抗 DNA 抗体活性を誘導し得たと報告している。

YH206 抗原を含め、これまで報告されてきた腺癌関連抗原のほとんどが糖鎖抗原である²¹⁾ が、抗腫瘍効果を期待して糖鎖抗原をワクチンとして用いる場合、有効な免疫反応を誘起しうるか、あるいは idiotype network が作働する場合に、抗体である Ab2 が糖鎖抗原様の構造を保有しうるか、等不明な点が多い²²⁾。本研究では糖鎖抗原に対するモノクローナル抗体の抗 Id モノクローナル抗体について検索し、抗原類似の内部イメージが H 鎖及び L 鎖から構成される高次構造の中に含まれる可能性を示し、Ab1 like Ab3 を誘導できる Ab2 の選択のひとつの条件を明らかにした。

5 結 論

1) MoAb YH206(Ab1)と MoAb AI206(Ab2)は、互いに非還元状態の H 鎖と L 鎖からなる Fab 部分で認識していることが判明し、その conformation が重要と考えられた。

2) 腺癌関連糖鎖抗原を認識する MoAb YH206 は、同時に MoAb AI206 の intact な Fab を認識し、この部分に YH206 抗原様構造が存在している可能性が示唆された。

3) MoAb AI206 を同系免疫することにより、抗血清中に YH206 抗原に対する抗体活性を誘導できることが判明し、MoAb AI206 は YH206 抗原と同様の抗原構造 (internal image) を有していると推測された。

4) 以上の成績より、糖鎖抗原に対する抗体に対して作製された抗 Id 抗体でも in vivo 投与により Ab1 like Ab3 活性を誘導し得ることが明らかにされ、腺癌関連糖鎖抗原に対しても idiotypic vaccination の可能性が考えられた。

謝 辞

ご指導、ご校閲いただいた谷内昭教授、ご指導、ご協力いただいた日野田裕治博士ならびに辻崎正幸博士に深謝いたします。本研究は文部省がん特別研究 I (谷内)、II (今井) 及び北海道老年医学研究振興会補助金 (谷内) の補助による。

文 献

1. Jerne, N. K.: Toward a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.* **125C**, 373-389 (1974).
2. Kennedy, R. C., Eichberg, J. W., Lanford, R. E. and Dreesman, G. R.: Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science* **232**, 220-223 (1986).
3. Koprowski, H., Herlyn, D., Lubeck, M., DeFreitas, E. and Sears, H. F.: Human anti-idiotypic antibodies in cancer patients: Is the modulation of the immune response beneficial for the patients? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 216-219 (1984).
4. Wettendorff, M., Iliopoulos, D., Tempero, M., Kay, D., DeFreitas, E., Koprowski, H. and Herlyn, D.: Idiotypic cascades in cancer patients treated with monoclonal antibody CO17-1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3787-3791 (1989).
5. 山本公雄: 腺癌関連モノクローナル抗体 YH206 に対するイディオタイプ抗体の作製とその臨床応用. *札幌医誌* **57**, 197-207 (1988).
6. 遠藤高夫, 今井浩三: ヒト肺腺癌細胞に対するモノクローナル抗体の作製と癌患者血清中抗原の検出. *札幌医誌* **54**, 393-410 (1985).
7. Hinoda, Y., Imai, K., Ban, T., Endo, T. and Yachi, A.: Immunochemical characterization of adenocarcinoma-associated antigen YH206. *Int. J. Cancer* **42**, 653-658 (1988).
8. Yachi, A., Sugiyama, T., Yosida, H., Imai, K., Yabana, T., Yokota, K. and Oguma, K.: Preparation of anti-Campylobacter pylori monoclonal antibodies and clinical implications. *Campylobacter pylori and gastroduodenal diseases. 1*, (Proc. 1st. Tokyo Int. Symp. Campylobacter pylori) 99-104 (1988).
9. Ban, T., Imai, K. and Yachi, A.: Immunohistological and immunochemical characterization of a novel pancreas cancer-associated antigen MUSE 11. *Cancer Res.* **49**, 7141-7146 (1989).
10. Towbin, T., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354 (1979).
11. Kishimoto, T., Onoue, K. and Yamamura, Y.: Structure of human immunoglobulin M. III. Pepsin fragmentation of IgM. *J. Immunol.* **100**, 1032-1040 (1968).
12. 辻崎正幸, 今井浩三: 抗 HLA-A2. A28 モノクローナル抗体に対する抗イディオタイプモノクローナル抗体の作製と免疫応答の解析. *札幌医誌* **58**, 1-13 (1989).
13. Mihaesco, C. and Seligmann, M.: Peptic split products of human IgM globulins. *Immunochemistry* **5**, 457-469 (1968).
14. Metzger, H.: Structure and function of γ M macroglobulin. *Adv. Immunol.* **12**, 57-116 (1970).
15. Kohler, H., Muller, S. and Bona, C.: Internal antigen and the immune network. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **178**, 189-195 (1985).
16. Bluestone, J. A., Metzger, J. J., Knode, M. C., Ozato, K. and Sachs, D. H.: Anti-idiotypes to monoclonal anti-H-2 antibodies-I. Contribution of isolated heavy and light chains to idiotypic expression. *Mol. Immunol.* **19**, 515-524 (1982).
17. Zanetti, M., Liu, F. T., Rogers, J. and Katz, D. H.: Heavy and light chains of a mouse monoclonal autoantibody express the same idiotypic. *J. Immunol.* **135**, 1245-1251 (1985).

18. Umeda, M., Diego, I., Ball, E. D. and Marcus, D. M.: Idiotypic determinants of monoclonal antibodies that bind to 3-fucosyllactosamine. **J. Immunol.** **136**, 2562-2567 (1986).
19. Monestier, M., Debbas, M. E. and Goldenberg, D. M.: Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to murine antineoplastic antigen monoclonal antibodies. **Cancer Res.** **49**, 123-126 (1989).
20. Teitelbaum, D., Rauch, D., Stollar, B. D. and Schwartz, R. S.: In vivo effects of antibodies against a high frequency idiotype of anti-DNA antibodies in MRL mice. **J. Immunol.** **132**, 1282-1285 (1984).
21. Hakomori, S. and Kannagi, R.: Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. **J. Natl. Cancer Inst.** **71**, 231-251 (1983).
22. Rico, M. J. and Hall, R. P., III.: Anti-idiotypic antibodies as vaccine candidates. The immune network. **Arch. Dermatol.** **125**, 271-275 (1989).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 小野晃裕