

## 潰瘍性大腸炎組織結合 IgG の認識する大腸抗原の精製・局在と ADCC 抗体標的分子としての意義

坂 牧 純 夫

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

### Purification and Localization of Colon Antigen Recognized by Tissue Bound IgG of Ulcerative Colitis and Its Significance as a Ttarget Molecule for ADCC

Sumio SAKAMAKI

Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. I. Urushizaki)

The role of colon associated antigen for the cytopathic effect of colonic mucosa in ulcerative colitis was evaluated.

(1) A glycoprotein recognized by colitis colon associated IgG (CCA-IgG) was purified by the combination of DEAE Affi-gel Blue column chromatography and Phenyl Sepharose column chromatography. The protein obtained was electrophoretically pure and migrated to the position of 40,000 daltons by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

(2) Murine monoclonal antibodies and a monospecific polyclonal rabbit antibody specifically reacted with this protein have been developed.

(3) By using one of the 18 monoclonal antibodies, 7 E<sub>12</sub>H<sub>12</sub>, an indirect immunoperoxidase method was performed in order to elucidate the tissue localization of this protein. The significant stain was observed in the basolateral and apical aspects of the colonic epithelial cells lining the lumen as well as in the crypts. There was no significant stain within the cytoplasm of epithelial cells.

(4) The F(ab')<sub>2</sub> of rabbit polyclonal antibody blocked the antibody dependent cell mediated cytotoxicity of the colonic tumor cell line by sera of patients with ulcerative colitis, suggesting that the antigen recognized by this F(ab')<sub>2</sub> is a target molecule of the antibody for ADCC of colonic mucosal cells.

(Received July 10, 1987 and accepted July 27, 1987)

**Key words:** Ulcerative colitis, CCA-IgG, 40 kD protein, Monoclonal antibody, ADCC

### 1 緒 言

潰瘍性大腸炎は大腸粘膜にびらんや潰瘍を形成し、反復する腹痛、粘血便を主症状とする非特異的慢性炎症性腸疾患である。本症には、SLE, RA, 橋本病などの他の自己免疫疾患が合併したり<sup>1,2)</sup>、免疫抑制剤<sup>3-5)</sup>や副腎皮質ホルモン<sup>6,7)</sup>が著効を示す例が認められるなどの経験的事実や、患者血清中には胎児大腸細胞あるいは大腸粘膜細胞<sup>8-10)</sup>、ヒト大腸癌由来培養細胞<sup>11)</sup>などの大腸粘膜上皮由来細胞と結合、かつ抗体依存性細胞障害(ADCC)活性を示す免疫グロブリンが存在する可能性が示され、自己免疫疾患<sup>12,13)</sup>としての組織障害機

序が想定されるようになってきた。

1978年、Dasら<sup>14)</sup>は、潰瘍性大腸炎病変組織に酸性緩衝液で溶出されるIgG型免疫グロブリン(colitis colon associated IgG, CCA-IgG)が結合していることを明らかにし、教室の高橋<sup>15)</sup>は、このIgGに対応する大腸粘膜抗原がSDS/PAGEで分子量約40,000ダルトンの部位に泳動される蛋白質で胃・十二指腸・空腸・回腸には存在しない大腸特異抗原であること、更に本症患者血清中にも、この蛋白質を認識する抗体が存在することを示した。既に述べたように、血清中に存在する抗大腸抗体がADCC活性を有する訳であるが<sup>11)</sup>、現在までのところ本症のADCCに関与する抗体の認識

する標的分子が CCA-IgG と結合する 40,000 ダルトンの大腸抗原であるか否かは不明である。

そこで、著者は CCA-IgG の認識する大腸粘膜抗原を精製、それに対するマウスモノクローナル抗体及び家兎ポリクローナル抗体を作製し、本抗原の大腸粘膜内局在を明らかにするとともに、この粘膜抗原が本症患者血清中の ADCC 抗体の target molecule となっているか否かを、家兎ポリクローナル抗体より作製した F(ab')<sub>2</sub> で ADCC 関与抗体の標的細胞結合を阻害する inhibition ADCC アッセイで解析したので報告する。

## 2 実験材料と方法

### 2.1 実験材料

#### 2.1.1 大腸粘膜組織

札幌医大第四内科及び Albert Einstein College Hospital において手術時に得た潰瘍性大腸炎及びクローン病患者各 2 例の病変大腸粘膜組織と大腸癌患者 2 例の切除健常大腸粘膜組織を用いた。

#### 2.1.2 患者及び対照血清

検索対象として札幌医大第四内科及び Albert Einstein College Hospital において得られた潰瘍性大腸炎患者 17 例、健常者 15 例の計 32 例の血清を用いた。潰瘍性大腸炎の診断は、臨床症状、血液検査所見、注腸バリウム検査所見、大腸内視鏡検査所見、生検組織所見をもとにした Evans and Acheson の診断基準<sup>16)</sup>により、クローン病の診断は Crohn's disease activity index (CDAI)<sup>17)</sup> により行った。

### 2.2 大腸特異抗原の精製法

ヒト切除大腸組織から大腸粘膜抗原の精製を始めた。精製の概略を Fig 1 に示した。精製の各段階で得られた各分画について、2.6 及び 2.7 に示した SDS/PAGE immunoblot 法を行い、これを指標として目的の大腸抗原物質を精製した。

#### 2.2.1 大腸粘膜抗原粗抽出法

切除大腸組織 10 g を 2 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) と 2 mM sodium azide を添加した 0.01 M sodium phosphate buffer-0.15 M NaCl, pH 7.5 (PBS) 中で、粘膜層を筋層から剝離・細切し、1000×g, 5 分間遠心して沈澱物を得た。沈澱物に 30 ml の同緩衝液を加えよくかく拌し、1,000×g, 5 分間遠心後上清を除去するという洗浄操作を 15 回繰り返した。沈澱物に 40 ml の 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) と 2 mM PMSF を含む PBS を加え、Polytron Blender (Kinematic type PT, Switzerland) で 5 秒間、10 回ホモジナイズした。この

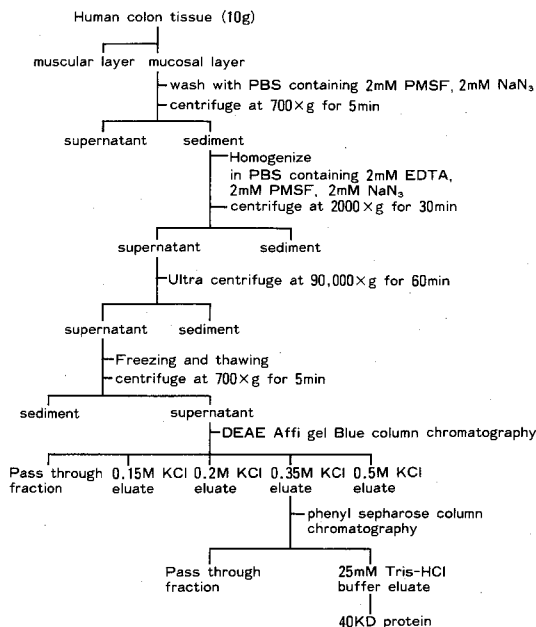


Fig. 1 Flow diagram of procedures for purification of 40 kD protein which reacted with CCA-IgG.

ホモジネートを 2,000×g, 30 分間遠心し上清を得、さらに Beckman Spino model L ultracentrifuge, Rotor SW 27 (Beckman Co.) を用いて 90,000×g, 60 分間遠心し、上清を回収、PBS 粗抽出抗原とした。この PBS 粗抽出抗原を -20℃ で 24 時間凍結保存後、室溫水中 1 時間で解凍し、再び -20℃ で凍結した。同じ操作を 3 回繰り返した後、700×g 5 分間 4℃ で遠心後上清を回収した。

#### 2.2.2 DEAE Affi-gel Blue カラムクロマトグラフィー

2.2.1 で得た上清 20 ml を 6 l の 0.02 M potassium phosphate buffer, pH 8.0 中で 24 時間透析後、あらかじめ同緩衝液で平衡化した DEAE Affi-gel Blue (Bio-Rad) カラム (2.5×3.5 cm) に流速 0.5 ml/min で添加した。カラム容積の 5 倍量の同緩衝液でカラムを洗浄後、0.15 M, 0.2 M, 0.35 M, 0.5 M の potassium chloride (KCl) を含む 0.02 M potassium phosphate buffer 30 ml で非連続的にカラム結合蛋白を溶出した。0.35 M KCl を含む 0.02 M potassium phosphate buffer で溶出した分画 50 ml を 4 l の蒸留水中で 24 時間透析・脱塩後 Speed Vaccume Concentrator (SAVANT, USA) で 10 倍に濃縮し、これを部分精製抗原とした。

#### 2.2.3 Phenyl Sepharose カラムクロマトグラフィー

Phenyl Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals) カ

ラム (1×5 cm) は、0.5 M の ammonium sulfate を含む 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 で平衡化した。2・2・2 で得た濃縮液 5 ml に ammonium sulfate を最終濃度 0.5 M になるように加えた後、流速 0.4 ml/min でカラムに添加した。カラム容積の3倍量の開始緩衝液で洗浄後、20 ml の 25 mM Tris-HCl buffer でカラム結合蛋白を溶出した。溶出分画 20 ml は 4 l の蒸留水中で 16 時間透析後 Speed Vaccume Concentrator (SAVANT, USA) で 10 倍に濃縮し、これを精製抗原とした。

### 2・3 蛋白定量法

蛋白濃度は Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて測定した。標準蛋白には assay kit 中の BSA を用いた。

### 2・4 CCA-IgG の抽出・精製法

CCA-IgG の抽出・精製は高橋<sup>15)</sup>の方法に準拠した。10 g の潰瘍性大腸炎病変大腸粘膜組織を 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 2 mM sodium azide を添加した PBS 溶液中で細切り、Polytron Blender でホモジネートを作製した。混在する血清免疫グロブリンを除去するため PBS で十分洗浄後、組織に結合した蛋白を 0.02 M citric acid-sodium citrate (citrate buffer), pH 3.2 で分離、PBS で透析後 protein A-Sepharose CL-4 B (Pharmacia Fine Chemicals) のアフィニティーカラム (4.0×0.7 cm) に添加し IgG を精製した。同様にクローン病病変大腸粘膜組織から、組織結合 IgG を精製し対照として用いた。

### 2・5 CCA-IgG の<sup>125</sup>I 標識

<sup>125</sup>I 標識 CCA-IgG の作製は Hudson and Hay<sup>16)</sup>の方法に準拠した。IODO-GEN (1, 3, 4, 6-tetrachloro 3 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -diphenylglycouril, Pierce Chemical Company) を濃度 1 mg/ml となるようにクロロホルムに溶解し、その 20  $\mu$ l を 5×1 cm のガラス試験管に取り、窒素ガスを静かに吹き込みクロロホルムを蒸発させ、IODO-GEN の被膜を作製した。80  $\mu$ g/100  $\mu$ l の CCA-IgG または対照の IgG と 700  $\mu$ Ci/7  $\mu$ l の Na-<sup>125</sup>I (比放射能 100 mCi/ml, Amersham) をこの試験管内で水中 10 分間反応させた後、1 mM Potassium Iodide 0.5 ml, 2-mercaptoethanol 5  $\mu$ l を加え反応を停止させた。<sup>125</sup>I 標識 CCA-IgG と非結合 Na-<sup>125</sup>I の分離は Sephadex G 25 カラムによるゲル濾過で行った。得られた<sup>125</sup>I 標識 CCA-IgG と<sup>125</sup>I 標識 control IgG の specific activity (放射活性  $\mu$ Ci/蛋白濃度  $\mu$ g) はともに 2  $\mu$ Ci/ $\mu$ g であった。

### 2・6 Sodium Dodecyl Sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE)

SDS/PAGE は Maizel<sup>19)</sup>の方法に準拠した。分離用ゲル緩衝液は 0.1% SDS を含む 1.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.8 を用い、分離用ゲル濃度を acrylamide 9.74% (w/v), N, N'-methylenebis-acrylamide 0.26% (w/v) の計 10% acrylamide となるよう調整し、N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), ammonium persulfate をそれぞれ 0.025%, 0.03% となるよう添加した。濃縮用ゲル緩衝液は 0.1% SDS を含む 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8 を用い、濃縮用ゲル濃度を acrylamide 2.92% (w/v), N, N'-methylenebis-acrylamide 0.08% (w/v) の計 3% acrylamide となるよう調整し、TEMED, ammonium persulfate をそれぞれ 0.025%, 0.03% となるように添加した。電極槽緩衝液は 0.1% SDS を含む 0.25 M Tris-glycine buffer, pH 8.8 を用い、泳動装置はスラブゲル電気泳動装置 (Bio-Rad) を用いた。試料用緩衝液には 2% SDS, 0.02 M 2-mercaptoethanol, 20% glycerol を含む 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8 または 2-mercaptoethanol を含まない同緩衝液を用い、試料と当量混合し、100°C 25 分間処理後、試料溝に添加し、3-4 時間室温で泳動した。分子量決定の標準蛋白として SDS/PAGE 用 low molecular protein set (Bio-Rad) を用い、相対易動度から分子量を算出した。

### 2・7 Immunoblotting 法

Towbin<sup>20)</sup>の方法に準じ、2・6 の SDS/PAGE 後、ゲルをニトロセルロース膜 (Schreiber & Schuell, Inc. West Germany) に密着させ 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5 を満たした Trans-Blot™ cell (Bio-Rad) のホルダーに固定し、室温で、10 V 150 mA, 16 時間泳動し、スラブゲルで分離した蛋白を転写した。転写後ニトロセルロース膜は 5% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む 0.05 M Tris-HCl-0.15 M NaCl buffer, pH 7.9 で 2 時間インキュベーションし非特異的結合をブロックした後、<sup>125</sup>I 標識 CCA-IgG を最終濃度が 5×10<sup>5</sup> cpm/ml になるように加えた 3% BSA を含む 0.05 M Tris-HCl-0.15 M NaCl buffer と 2 時間室温でインキュベーションした。その後ニトロセルロース膜を 0.05 M Tris-HCl-0.15 M NaCl buffer で 30 分間振とう洗浄し、乾燥後 Cornex Intensifying Screen を用い、XAR-5 フィルム (Kodak) に密着し、-70°C で 72 時間感光し、オートラジオグラフィーを行った。

## 2・8 $^{125}\text{I}$ 標識 concanavalin A (Con A) 結合性の検討

2・2・2 及び 2・2・3 で作製した粗抽出及び精製大腸抗原を同時に 2 枚 SDS/PAGE 電気泳動した後、ニトロセルロース膜に転写した。この 2 枚のニトロセルロース膜を 2% (w/v) polyvinyl pyrrolidone (PVP), 3 mM  $\text{NaN}_3$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$  を含む 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 と 30 分間インキュベート後、一方を  $^{125}\text{I}$  標識 Con A (specific activity  $10 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ , NEN Research products) を含む同緩衝液 ( $5 \times 10^5$  cpm/ml) に、他方を 0.21 M  $\alpha$ -mannose と  $^{125}\text{I}$  標識 Con A を含む同緩衝液 ( $5 \times 10^5$  cpm/ml) に 4°C 4 時間インキュベーションした。ニトロセルロース膜は 1% PVP を含む 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 で 30 分間振とう洗浄後乾燥し、オートラジオグラフィを行った。

## 2・9 精製大腸抗原に対するモノクローナル抗体の作製

### 2・9・1 ハイブリドーマ細胞の作製

Köhler and Milstein<sup>21)</sup> の方法に準じ、以下の方法で作製した。免疫原には 2・2・2 で得た部分精製大腸抗原と 2・2・3 で得た精製大腸抗原を使用した。部分精製大腸抗原  $100 \mu\text{g}$  ( $1 \text{ mg/ml}$ ) を complete Freund's adjuvant (SIGMA) と混和し、6 週の BALB/c マウス腹腔内に第 1, 35, 42 日目に投与した。さらに、第 49 日目に精製大腸抗原  $40 \mu\text{g}$  を経静脈的に投与した。第 50 日目に免疫マウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞 (NS-0) を 50% ポリエチレン グリコール (M.W. 5000) を用いて融合した。融合後 HAT 培養液 ( $100 \mu\text{M}$  ハイポキサンチン,  $400 \text{ nM}$  アミノプテリン,  $16 \mu\text{M}$  チミジン, 20% 非動化ウシ胎児血清 (FCS), 1% ペニシリン, 1% ストレプトマイシン, 1% 非必須アミノ酸を含む Dulbecco modified Eagle medium (DMEM)) に  $5 \times 10^5$  骨髄腫細胞/ml の濃度で浮遊させ、96 穴平底プレート (Falcon 3072) に  $100 \mu\text{l}/\text{well}$  ずつ分注、 $37^\circ\text{C}$  8%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中で培養した。培養開始後 14 日目に上清中の抗体を 2・9・2 に述べる Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定し、抗体産生ハイブリドーマを選択した。ハイブリドーマ細胞のクローニングは直徑 60 mm のシャーレに二重軟寒天層を作製して行った。すなわち、下層には栄養層としてマウス線維芽細胞を含む 0.5% アガロース-HT 培養液、上層には 80 個のハイブリドーマ細胞を含む 0.3% アガロース-HT 培養液で二重軟寒天層を作製した。このシャーレを  $37^\circ\text{C}$  8%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中で 10 日間培養後、倒立顕微鏡下で増生したコロニーを吸引・回収し 96 穴平底プレート中で培養した。4 日後、培養

上清中の抗体を ELISA 法で測定し、抗体産生クローンを選択した。得られた抗体のアイソタイプ及びサブタイプは家兎抗マウス IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgM (Zymed) 及びアルカリフォスファターゼ標識家兎抗マウス免疫グロブリン (Zymed) を用いた 2・9・2 に述べる ELISA 法で検討した。

### 2・9・2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Engvall and Perlmann<sup>22)</sup> の方法に準拠し ELISA を行った。2・2・3 で得た精製抗原蛋白を 0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.6 で  $2 \mu\text{g/ml}$  に希釈し、immunoplate (Immulon<sup>TM</sup> plate, Dynatech, USA) の各 well に  $100 \mu\text{l}$  ずつ加え  $4^\circ\text{C}$  24 時間静置し抗原蛋白を固相化した。0.05 M sodium phosphate buffer-0.15 M NaCl (PBS), pH 7.4 で各 well を洗浄後、 $100 \mu\text{l}$  の 5% BSA を含む PBS を加え室温で 1 時間静置後、0.05% Tween 20 を含む PBS で 1 回洗浄した。 $100 \mu\text{l}$  のハイブリドーマ培養上清を加え  $37^\circ\text{C}$  1 時間インキュベート後 3 回洗浄、1% BSA を含む PBS で 500 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (Zymed) を  $100 \mu\text{l}$  加え、 $37^\circ\text{C}$  1 時間インキュベート後 3 回洗浄した。最後に 0.5 M sodium carbonate buffer, pH 9.6 に溶解した  $1 \text{ mg/ml}$  の p-nitrophenyl phosphate, disodium (Phoshatase substrate, SIGMA 104<sup>(R)</sup>) を  $100 \mu\text{l}$  加え、 $37^\circ\text{C}$  1 時間インキュベーションした。各 well の吸光度を波長 405 nm で Titertek Multiscan ELISA リーダー (Flow Lab.) で測定した。

### 2・10 精製抗原蛋白に対する家兎ポリクローナル抗体の作製

#### 2・10・1 家兎抗血清の作製

免疫原には 2・2・3 で得た精製大腸抗原蛋白を使用した。第 1 日目に  $100 \mu\text{g}$  ( $1 \text{ mg/ml}$ ) の精製大腸抗原蛋白と complete Freund's adjuvant の混和液を Flemish Giant 系家兎の両側背部皮下に接種した。第 14, 21, 28, 35 日目に  $50 \mu\text{g}$  の抗原蛋白と incomplete Freund's adjuvant の混和液と同様に追加免疫した後、第 37 日目に採血し抗血清を得た。血清は温浴槽内で  $56^\circ\text{C}$  30 分非動化した。

#### 2・10・2 血清 IgG の分離と F(ab')<sub>2</sub> の作製

家兎抗血清  $20 \text{ ml}$  を  $4 \text{ l}$  の 0.02 M potassium phosphate buffer, pH 8.0 中で 16 時間透析後、あらかじめ同緩衝液で平衡化した DEAE Affi-gel Blue カラム ( $1 \times 5 \text{ cm}$ ) に添加し、試料がカラムに浸透後、 $30 \text{ ml}$  の同緩衝液でカラムを洗浄し、カラム通過分画を IgG 溶液と

して回収した。このIgG溶液50 ml (3 mg/ml) を Speed Vaccume Concentrator で10倍に濃縮後、4 l の0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.5 中で3時間透析し、さらに3 mg の Pepsin (SIGMA) を加え 37°C 16 時間インキュベーションした。0.5 ml の 0.5 M NaHPO<sub>4</sub> を加え反応停止後、900×g, 10 分間遠心し上清を回収、Sephadex G 100 カラム (1.5×100 cm) に添加し、PBS, pH 7.4 で F(ab')<sub>2</sub> 分画を溶出した。得られた F(ab')<sub>2</sub> 分画 40 ml を Speed Vaccume Concentrator で 5 ml (5 mg/ml) に濃縮し、F(ab')<sub>2</sub> フラグメントをヤギ抗ラビット F(ab')<sub>2</sub> 抗体 (Zymed) 及びヤギ抗ラビット Fc 抗体 (Zymed) を用い Ouchterlony 法<sup>23)</sup> で確認した。

## 2.11 免疫組織学的検索法

大腸癌患者の切除健常大腸組織を10%ホルマリンを含む PBS 溶液で16時間固定後パラフィン包埋し、クリオスタットを用い5 µm の凍結切片を作製した。凍結切片はスライドガラス上で脱パラフィン後、内因性のペルオキシダーゼ活性を阻害するため0.3%過酸化水素を含む0.1 M PBS, pH 7.4 中で30分インキュベーションした。切片は0.1 M PBS で洗浄後、50倍希釈した正常ウマ血清と2時間インキュベーションし、さらに100 µl のハイブリドーマ培養上清と4°C 16時間反応させた。PBS で洗浄後、200倍希釈した biotin 標識ウマ抗マウス IgM 抗体 (Vector Lab., USA) と90分インキュベート後洗浄し、avidinbiotin peroxidase complex (ABC, Vector Lab.) と90分反応させた。最後に1 mg/ml の 3, 3'-diaminobenzidine と0.02%過酸化水素を含む0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.6 と暗室で10分間インキュベーションした後、脱水鏡検した<sup>24)</sup>。全てのインキュベーションは室温で行い対照としてアルバートアインシュタイン医科大学微生物学免疫学教室ダイヤモンド教授より供与を受けたマウス抗ヒト赤血球膜モノクローナル抗体 4 T 006 (IgM) を用いた。

## 2.12 潰瘍性大腸炎患者血清 ADCC 活性に関与する抗体の検討

### 2.12.1 ADCC アッセイ

健常者のヘパリン加採血した末梢静脈血から Ficoll-hypaque 比重遠心法で得た末梢単核球 (PBMC) をエフェクター細胞とし、ヒト大腸癌由来培養細胞 RPMI 4788 細胞 2×10<sup>6</sup> cells/0.5 ml を 100 µCi/0.1 ml の (<sup>51</sup>Cr) sodium chromate (Amersham Corp.) と 37°C 60 分間インキュベーションして得た <sup>51</sup>Cr 標識 RPMI 4788 細胞を標的細胞とした。この標的細胞を 96 穴平底マイクロプレートに各 well 5×10<sup>4</sup> Cells

となるよう分注し18時間培養後、3回洗浄し、DMEM で2倍希釈した潰瘍性大腸炎患者血清及び正常血清 50 µl を各々加え、60分培養した。3回洗浄後エフェクター細胞をエフェクター細胞：標的細胞比 (E/T ratio) を 50:1 として加え4時間培養後、上清 100 µl を採取した (以下上清 A)。更に1% TritonX-100, 100 µl を加えて標的細胞を完全に破壊した後、その上清 100 µl を採取し (以下上清 B)、上清 A とともにその放射活性を autogamma counter (LKB Instrument Inc., USA) で測定した。Spontaneous cell mediated cytotoxicity (SCMC) は10%非動化 FCS 添加 DMEM を血清のかわりに用い、spontaneous cell lysis はエフェクター細胞無添加のアッセイ系から算出し、ADCC 活性の計算には次式を用いた<sup>11)</sup>。

Experimental <sup>51</sup>Cr-release (E)

$$(E) = A / (B + A/2) \times 100 (\%)$$

Total cytotoxicity (T)

$$(T) = (E - S) / (100 - S) \times 100 (\%)$$

ADCC 活性

$$(ADCC) = (T) - (SCMC) (\%)$$

S = Spontaneous Cell Lysis

SCMC = Spontaneous Cell Mediated Cytotoxicity

### 2.12.2 Inhibition ADCC アッセイ

Inhibition ADCC アッセイは Shoham<sup>25)</sup> らの方法に準じ行った。標的細胞中の抗原蛋白をブロックするため 2×10<sup>2</sup> で得た精製大腸抗原免疫家兎 F(ab')<sub>2</sub> 又は免疫前家兎 F(ab')<sub>2</sub> 100 µl (5 mg/ml) を 2×10<sup>1</sup> で得た <sup>51</sup>Cr 標識 RPMI 4788 細胞 5×10<sup>4</sup> が付着している各 well に加え、37°C 8%CO<sub>2</sub> 60分間 インキュベーションした。DMEM で3回洗浄後、2×10<sup>1</sup> と同様に ADCC アッセイを行った。

### 2.12.3 標的細胞蛋白の SDS/PAGE

#### immunoblot 法

標的細胞として使用したヒト大腸癌由来 RPMI 4788 細胞に CCA-IgG と結合する蛋白が存在するか否かを検討するため、SDS で細胞を可溶化した後 SDS/PAGE-transblot し、CCA-IgG をプローブとしたオートラジオグラフィを行った。RPMI 4788 細胞を培養フラスコ (Falcon 3024) 内で 15% FCS, 4 mM L-グルタミン, 100 µg/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM を用い、37°C 8%CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養した。培養開始3日後、細胞の付着したフラスコに0.4%トリプシンを加え浮遊細胞を得、ファルコンチューブ (Falcon) に回収した。得

られた $1 \times 10^6$ 個の細胞に40 mlのDMEMを加え700×g 10分間の遠心を3回くりかえし、更に細胞ペレットに等量の4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol溶液を加え、100℃ 15分間しゃ沸後、1,000×g 10分間遠心し上清を回収、標的細胞抽出蛋白とした。その20  $\mu$ lを2.6, 2.7に示したようにSDS電気泳動した後、ニトロセルロース膜に転写、 $^{125}$ I標識CCA-IgGをプローブとしてオートラジオグラフィーを施行した。

### 2.13 統計学的検定

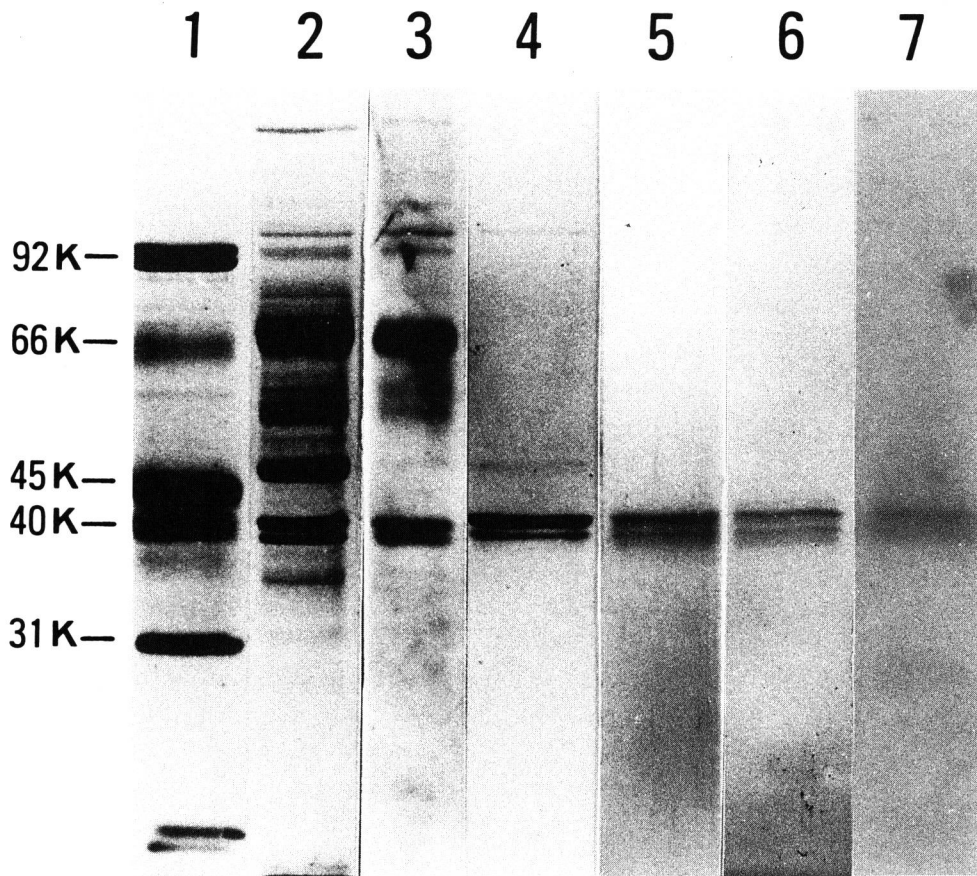
各群における平均値の差の検定には、Cochran-Cox

法を用い、危険率5%以下 ( $p < 0.05$ ) を有意とした。

## 3 結 果

### 3.1 大腸特異抗原蛋白の精製

CCA-IgGにより認識される大腸抗原の精製は10gのヒト大腸組織を出発材料とし、PBS抽出、freezing and thawing、DEAE Affi-gel Blue カラムクロマトグラフィー、Phenyl Sepharose カラムクロマトグラフィーを組みあわせて行った。各精製段階で得られた画分のCoomassie Brilliant Blue 染色によるSDS/PAGE像



**Fig. 2** SDS/PAGE of proteins at each step of purification. Proteins are stained with 1% Coomassie Blue.  
 lane 1: Marker protein  
 lane 2: PBS extracts of normal colon  
 lane 3: PBS extracts of normal colon after freezing and thawing  
 lane 4: 0.35 M KCl eluate from DEAE Affi-gel Blue column  
 lane 5: Eluate from Phenyl Sepharose column (reduced with 2-mercaptoethanol)  
 lane 6: Eluate from Phenyl Sepharose column (non reduced)  
 lane 7: Autoradiogram of SDS/PAGE-immunoblot of finally purified 40 kD protein probed with  $^{125}$ I-CCA-IgG.

を Fig. 2 に示した. レーン 1 は Marker protein, レーン 2 は PBS 粗抽出抗原, レーン 3 は 3 回の凍結・融解後の PBS 粗抽出抗原, レーン 4 は部分精製抗原, レーン 5 及び 6 は精製抗原である. レーン 5 及び 6 の Phenyl Sepharose カラムクロマトグラフィーで得られた分画では, レーン 5 に示した還元状態及びレーン 6 に示した非還元状態ともに電気泳動上, 分子量約 40,000 ダルトンの位置に近接する 2 本のバンドのみ染色された. このレーン 5 の蛋白をニトロセルロース膜に転写した後,  $^{125}\text{I}$  標識 CCA-IgG との結合性をオートラジオグラフィーで検討した. Fig. 2 レーン 7 に示したように, 分子量約 40,000 ダルトンの近接する 2 本のバンドは, むしろ幅広い 1 本のバンドとして認められたが, ともに CCA-IgG と結合した. 最終的に 10 g 大腸切除組織から得られた 40 ml (3.0 mg/ml) の PBS 粗抽出抗原から 1.5 mg の SDS/PAGE 上純粋な蛋白質が得られた.

### 3.2 精製 40 kD 抗原の Con A 結合性

SDS/PAGE 上  $^{125}\text{I}$  標識 CCA-IgG と結合するバンドが分子量約 40,000 ダルトンの位置に近接して 2 本認められたため  $^{125}\text{I}$  標識 concanavalin A (Con A) を用いて, 両バンドに対する結合能を検討した. Fig. 3 レーン 1 は粗抽出抗原蛋白 30  $\mu\text{g}$ , レーン 2, 3 はそれぞれ 5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$  の精製抗原蛋白を SDS/PAGE で分離, ニト

ロセルロース膜に転写し  $^{125}\text{I}$  標識 Con A とインキュベーション後オートラジオグラフィーを行った結果を示す. Fig. 3-A に示したように  $^{125}\text{I}$  標識 Con A は Coomassie Blue 染色及び  $^{125}\text{I}$  標識 CCA-IgG をプローブとしたオートラジオグラフィーで得られた分子量約 40,000 ダルトンの幅広い 2 本のバンドのうち上方の部分とのみ結合した. 一方ニトロセルロース膜に転写した蛋白を 0.21 M  $\alpha$ -mannose を含む  $^{125}\text{I}$  標識 Con A 溶液とインキュベーションしオートラジオグラフィーを行ったところ, Fig. 3-B に示したようにバンドは消失し Con A の結合は  $\alpha$ -mannose により阻害される特異的なものと考えられた. 従って, Coomassie Blue で染色された 40 kD 蛋白の近接する 2 本のバンドのうち陰極側のバンドは glucose または mannose を含む糖鎖構造を有すると考えられた.

### 3.3 40 kD 抗原に対するマウスモノクローナル抗体の作製

#### 3.3.1 40kD 蛋白に対するマウスモノクローナル抗体

精製抗原蛋白を免疫した BALB/c マウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞 (NS-0) を融合して得たハイブリドー

Table 1 Anti-40 kD monoclonal antibodies and their Ig isotypes.

Monoclonal Antibodies	*Immunoreactivity against purified 40 kD protein	Ig Isotypes
1. 7 E <sub>12</sub> H <sub>12</sub>	+++	M
2. 7 E <sub>12</sub> H <sub>4</sub>	++	M
3. 7 E <sub>12</sub> E <sub>11</sub>	+	M
4. 7 E <sub>12</sub> E <sub>7</sub>	+	M
5. 7 E <sub>12</sub> E <sub>5</sub>	+	M
6. 7 E <sub>6</sub> A <sub>5</sub>	++	G <sub>1</sub>
7. 7 E <sub>6</sub> A <sub>7</sub>	++	G <sub>1</sub>
8. 7 E <sub>6</sub> B <sub>12</sub>	+	G <sub>1</sub>
9. 7 E <sub>6</sub> C <sub>5</sub>	++	G <sub>1</sub>
10. 7 E <sub>6</sub> D <sub>2</sub>	++	G <sub>1</sub>
11. 7 E <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	++	G <sub>1</sub>
12. 7 E <sub>6</sub> D <sub>8</sub>	++	G <sub>1</sub>
13. 4 C <sub>10</sub> D <sub>7</sub>	+	M
14. 4 C <sub>10</sub> D <sub>4</sub>	++	M
15. 4 C <sub>10</sub> D <sub>3</sub>	++	M
16. 4 C <sub>10</sub> A <sub>7</sub>	+	M
17. 4 C <sub>10</sub> A <sub>1</sub>	+	M
18. 3 D <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	+	M

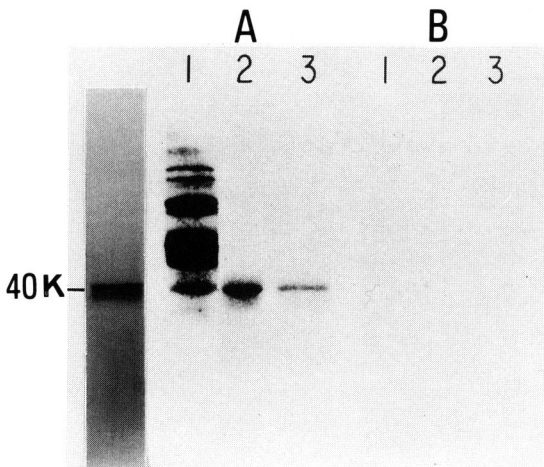


Fig. 3 Autoradiogram of SDS/PAGE-immunoblot of PBS extracts of normal colon (lane 1) and purified 40 kD protein (lane 2 : 5  $\mu\text{g}$ , lane 3 : 1  $\mu\text{g}$ ) probed with  $^{125}\text{I}$ -Con A. Bindings of  $^{125}\text{I}$ -Con A (A). Bindings of  $^{125}\text{I}$ -Con A were inhibited by 0.21 M  $\alpha$ -mannose (B).

Left side lane showed the purified 40 kD protein stained with Coomassie Blue.

[0.1- < 0.4 = +  
 [0.4- < 0.6 = ++  
 [ $\geq$  0.6 = +++  
 Control = 0.04  
 \*O. D. at A<sub>405</sub>  
 in the ELISA

マ細胞を二重軟寒天法でクローニングし、それぞれの培養上清中の抗体価を精製抗原蛋白を固相化した Immunoplate による ELISA 法でスクリーニングした。Table 1 に示したように 18 クローンのモノクローナル抗体を得、そのうち IgM 抗体は 11、IgG 抗体は 7 であった。スクリーニング時に最も高い吸光度 (O. D.) を示したモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ (7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub>) 1×10<sup>7</sup> 個を BALB/c マウス腹腔内に投与し 2 週間後に腹水を得た。以後の実験にはこの 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> を用いた。

### 3・3・2 マウスモノクローナル抗体 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> の抗原特異性

7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> または対照に用いた前述の IgM 型モノクローナル抗体を含むハイブリドーマ培養上清を倍数希釈し、精製抗原蛋白を標準抗原とした ELISA 法を施行した。Fig. 4 に黒丸印で示したように 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> で特異結合曲線が得られた。白丸印で示した対照の IgM 型モノクローナル抗体では特異的な結合は得られなかった。さ

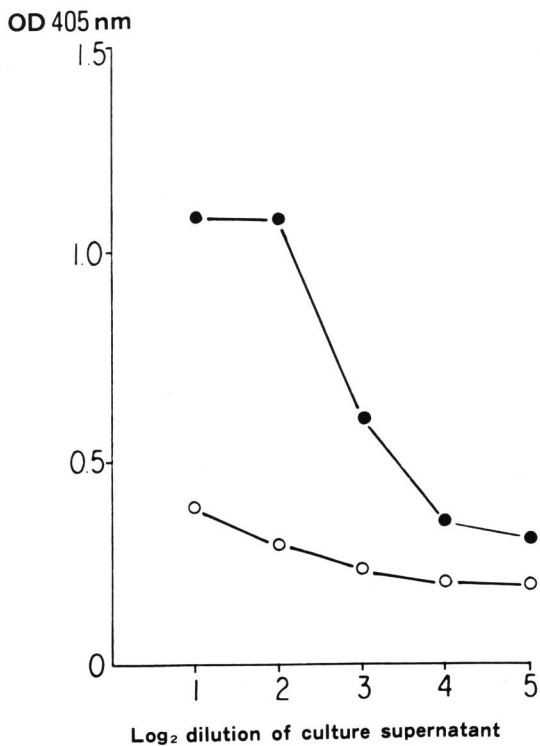


Fig. 4 Evaluation of specificity of 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> monoclonal antibody for 40 kD protein by ELISA. Data represents the optical density at 405 nm. Specific binding of 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> monoclonal antibody to the purified 40 kD protein (●—●). Binding of control monoclonal antibody to the purified 40 kD protein (○—○).

らに 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> の抗原特異性を Immunotransblot 法で検討した結果を Fig. 5 に示した。粗抽出抗原 30 μg を SDS/PAGE で分離、ニトロセルロース膜に転写し、PBS で 5 倍希釈した 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> 抗体または対照の IgM モノクローナル抗体を含むマウス腹水とインキュベート後洗浄し、PBS で 500 倍希釈した家兎抗マウス IgM 抗体とインキュベーションした。洗浄後に <sup>125</sup>I 標識 protein A (Specific activity 20 μCi/μg, NEN Research products) 溶液 (5×10<sup>5</sup> cpm/ml) とインキュベーションしオートラジオグラフィを行った。Fig. 5 レーン 1 に粗抽出抗原の Coomassie Blue 染色像、レーン 2、3 にそれぞれ 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub>、対照のモノクローナル抗体とインキュベーションしオートラジオグラフィを行った結果を示す。レーン 2 に示すように 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> はレーン 1 に示す大腸粘膜粗抽出蛋白のうち、CCA-IgG の認識する抗原蛋白である 40 kD の部位の近接する 2 本のバンドの両者と結合した。対照の IgM モノクローナル抗体ではレーン 3 に示したようにこの結合は認められなかった。

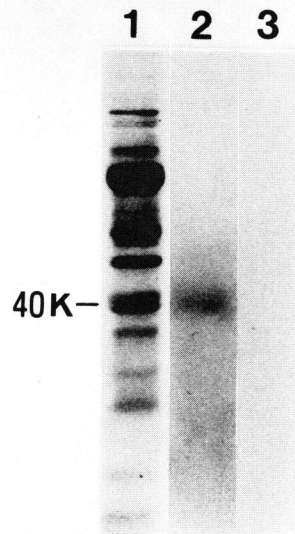


Fig. 5 Autoradiogram of SDS/PAGE-immunoblot of normal colon probed with 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> monoclonal antibody (lane 2) or control monoclonal antibody (lane 3) followed by rabbit anti-mouse IgM and <sup>125</sup>I-protein A. Lane 1 showed Coomassie Blue stained SDS/PAGE gel of PBS extracts of normal colon.



### 3.3.3 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> と CCA-IgG の認識するエピトープの共通性

7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> の認識するエピトープが CCA-IgG の認識するエピトープ中に含まれているか否かを inhibition ELISA を用いて検討した。Fig. 6 の黒四角印に示す 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> による特異的結合は ELISA プレートに固相化した精製抗原をあらかじめ CCA-IgG とプレインキュベーションすることで白丸印の曲線に示したように完全に阻害された。一方対照のクローン病組織結合 IgG (白三角印) で固相化抗原をプレインキュベーションしても 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> の結合は阻害されなかった。従って 40 kD 蛋白のうち 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> で認識されるエピトープは CCA-IgG でも認識されていることが示された。

### 3.4 抗原蛋白の大腸粘膜内局在の検討

精製抗原蛋白の大腸粘膜内局在を知る目的で 7E<sub>12</sub>

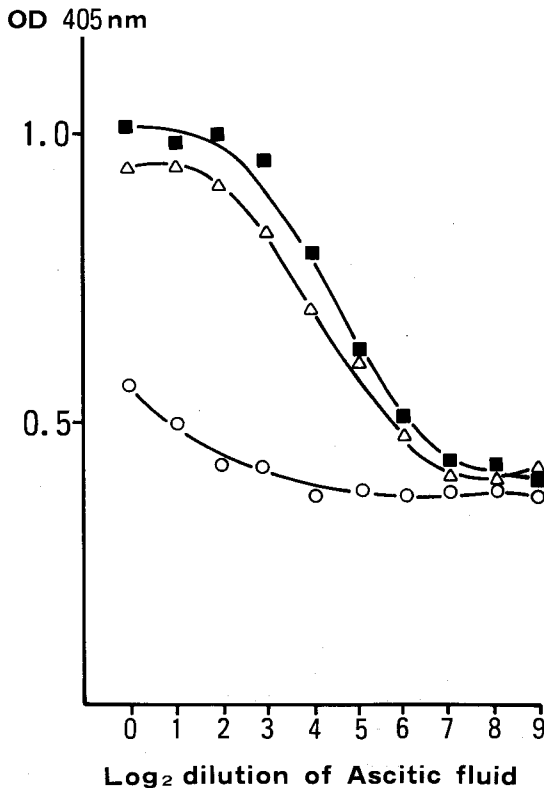


Fig. 6 Inhibition ELISA of 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> monoclonal antibody by CCA-IgG or control IgG. Specific binding of 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> monoclonal antibody to the purified 40 kD protein (■—■). 40 kD protein were preincubated with control IgG obtained from the colonic mucosa of Crohn's disease patient as described in materials and methods (△—△) or CCA-IgG (○—○). Data represents optical density at 405 nm.

H<sub>12</sub>を用いた indirect immunoperoxidase 法を施行した。Fig. 7-A 左側及び Fig. 7-B, C に示すように染色は大腸腺窩に存在する上皮細胞の基底面及び側面と管腔側に沿って存在する上皮細胞の基底面、側面及び先端面に認められた。腺窩では特に深部に存在する上皮細胞に染色が認められ、細胞側面では基底側約 1/3 に染色が認められた。細胞質の粘液は染色されていないと考えられた。

### 3.5 精製抗原蛋白に対する家兎ポリクロナール抗体の作製

#### 3.5.1 抗原特異性の検討

精製抗原を免疫して得られた家兎血清を 10<sup>6</sup> 倍まで倍数希釈し、精製抗原を固相化して作製した ELISA 法の結果を Fig. 8 に示した。白丸印に示した曲線の免疫前家兎血清と比べて黒丸印で示した曲線の抗血清では精製抗原蛋白に対する特異結合曲線が得られた。さらに Fig. 9 に示すように Immunotransblot 法で抗原特異性を検討した。レーン 1 には粗抽出抗原、レーン 2, 3 に

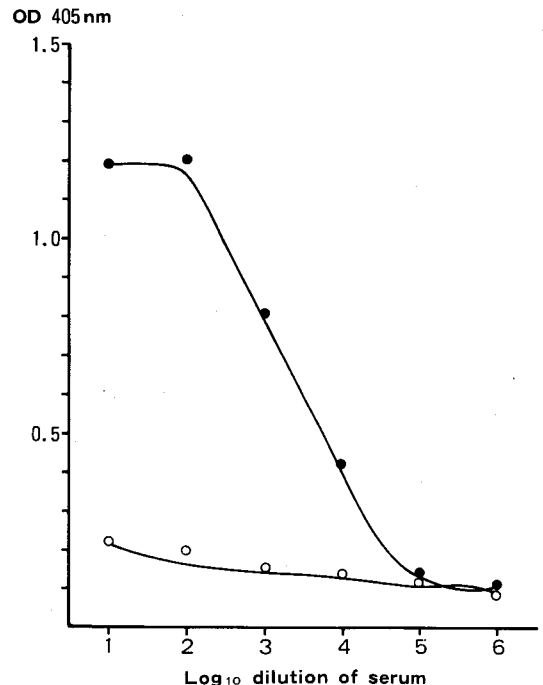
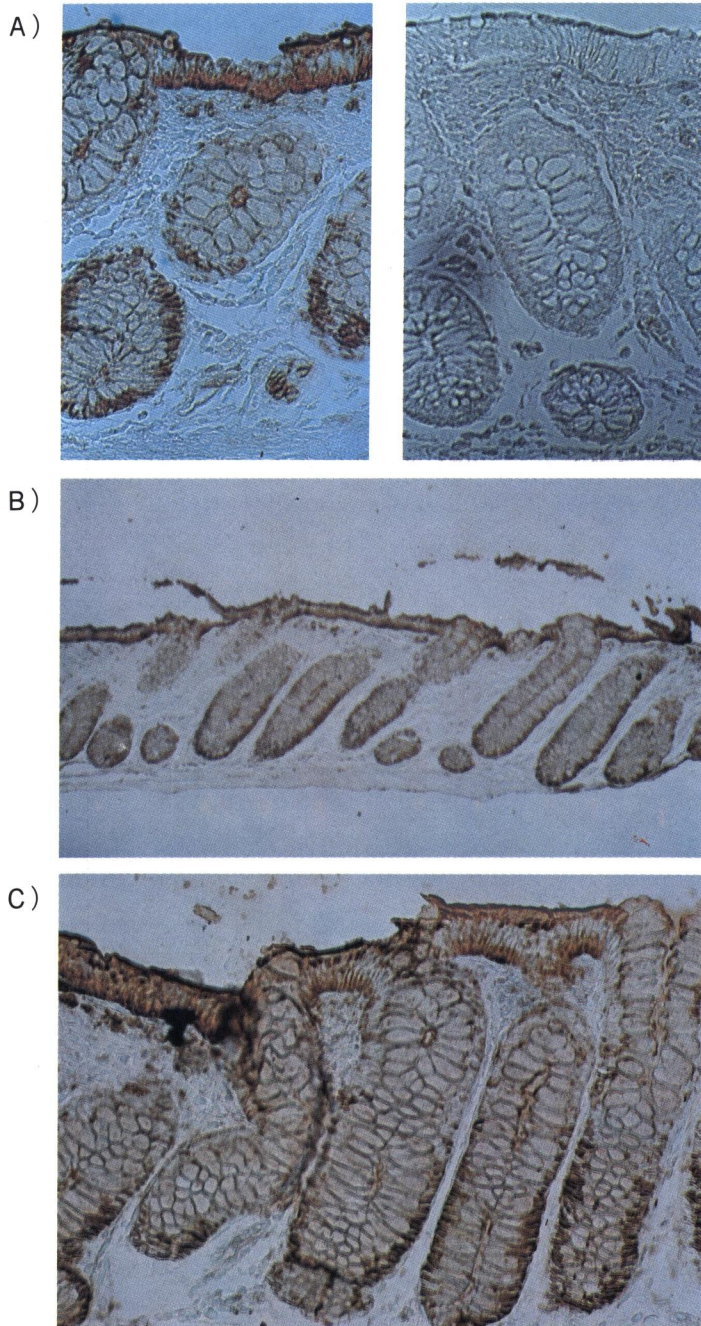


Fig. 8 Evaluation of specificity of anti-40 kD rabbit serum for 40 kD protein by ELISA. Data represents optical density at 405nm. Specific binding of anti-40 kD rabbit serum to the purified 40 kD protein (●—●). Binding of preimmune rabbit serum to the purified 40 kD protein (○—○).



**Fig. 7** Immunoreactivity of the monoclonal antibody 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> against normal human colonic mucosa by the immuno-peroxidase method.

(A) right side : Control monoclonal antibody. There is no reactivity. (×37).

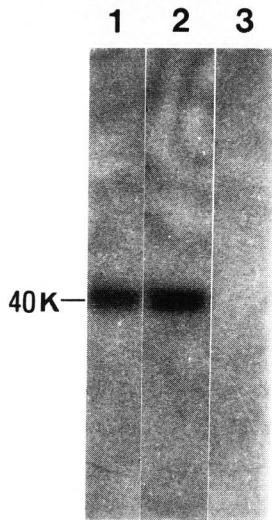
left side : Immunoreactivity of 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub>.

The reactivity is localized to the epithelial cell in the crypts and along the lumen.

(B) lower magnification Immunoreactivity of 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub>. (×12)

(C) Higher magnification Immunoreactivity of 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub>.

The reactivity is found in the baso-lateral and apical aspects of the colonic epithelial cells.(×49)

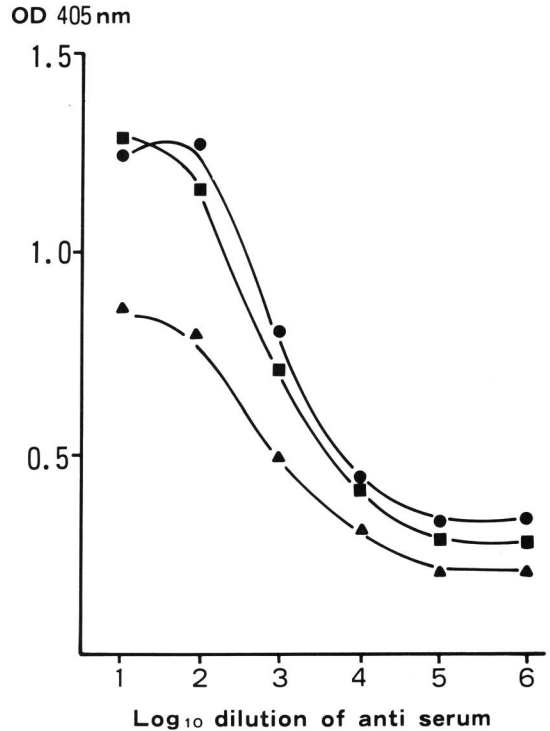


**Fig. 9** Autoradiogram of SDS/PAGE-immunoblot of PBS extracts of normal colon (lane 1) and purified 40 kD protein (lane 2) probed with anti-40 kD rabbit serum followed by  $^{125}\text{I}$ -protein A. Lane 3 showed autoradiogram of SDS/PAGE-immunoblot of purified 40 kD protein probed with preimmune rabbit serum followed by  $^{125}\text{I}$ -protein A.

は精製抗原を添加泳動後、レーン 1, 2 は 100 倍希釈家兔抗血清、レーン 3 は 100 倍希釈免疫前家兔血清とインキュベート、その後  $^{125}\text{I}$  標識 protein A をプローブとして、オートラジオグラフィを行ったが、レーン 1, 2 に示したように、家兔抗血清は CCA-IgG で認識される分子量約 40,000 ダルトンの近接する 2 本のバンドと特異的に反応した。レーン 3 の免疫前血清ではこの反応はみられなかった。

### 3・5・2 家兔ポリクロナール抗体と CCA-IgG の認識するエピトープの共通性

家兔ポリクロナール抗体と CCA-IgG の認識するエピトープの共通性を検討するため inhibition ELISA を行った。Fig. 10 黒丸印の曲線は精製抗原に対する家兔ポリクロナール抗体の特異結合曲線を示す。この結合は固相化した精製抗原を CCA-IgG とブレインキューベーションすることで黒三角印の曲線に示したように、部



**Fig. 10** Inhibition ELISA of anti-40 kD rabbit serum by CCA-IgG or control IgG. Specific binding of anti-40 kD rabbit serum to the purified 40 kD protein (●—●). 40 kD protein were preincubated with control IgG (■—■) or CCA-IgG (▲—▲). Data represents optical density at 405 nm.

分的に阻害されたが、クローン病組織結合 IgG でのブレインキューベーションでは黒四角印の曲線のように阻害されなかった。

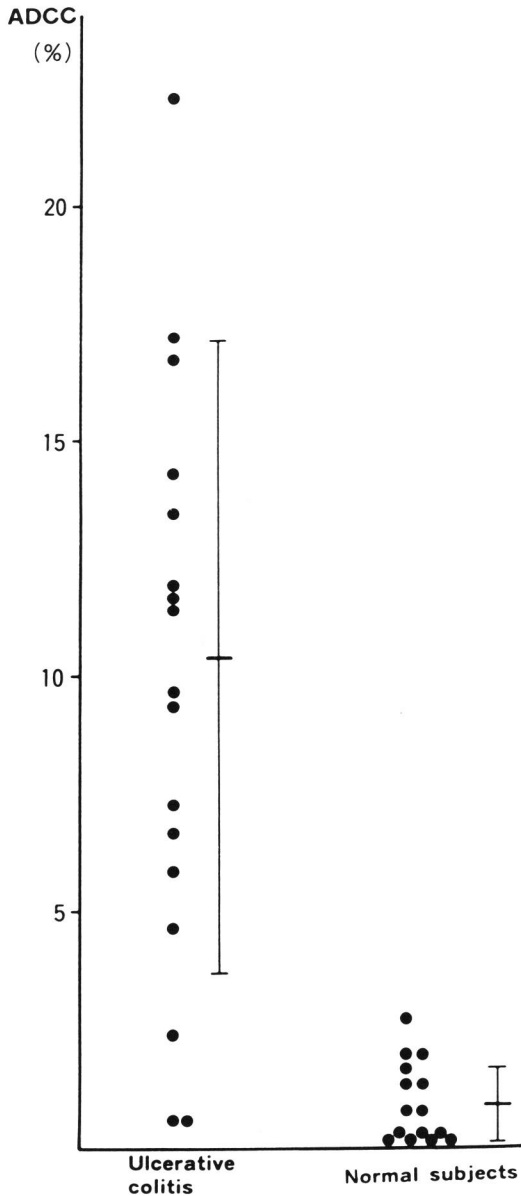
### 3・6 潰瘍性大腸炎患者血清 ADCC 活性に関する抗体の検討

#### 3・6・1 ADCC アッセイ

ヒト大腸癌由来 RPMI 4788 細胞を標的細胞として潰瘍性大腸炎患者 17 例並びに 15 例の健常者血清を用い、ADCC 活性を測定した結果を Fig. 11 に示した。潰瘍性大腸炎患者血清の ADCC 活性は  $10.37 \pm 6.72\%$  であり対照に用いた健常者の血清 ADCC 活性が  $0.91 \pm 0.85\%$  であったのに比べ有意に上昇していた。

#### 3・6・2 Inhibition ADCC アッセイ

$2 \cdot 10^2$  で作製した  $\text{F}(\text{ab}')_2$  で前処理して対応抗原をブロックした標的細胞を用い潰瘍性大腸炎患者血清 ADCC 活性を測定した。精製抗原免疫家兔 IgG より作製した  $\text{F}(\text{ab}')_2$  で標的細胞を前処理すると、Fig. 12-A に示したように、10 例の潰瘍性大腸炎患者の ADCC 活

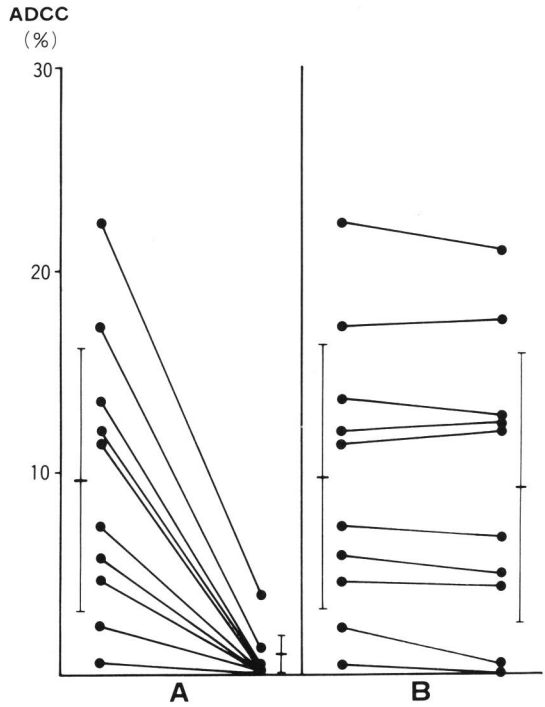


**Fig. 11** ADCC activity against RPMI 4788 cell with sera from patients with ulcerative colitis and with normal subjects.

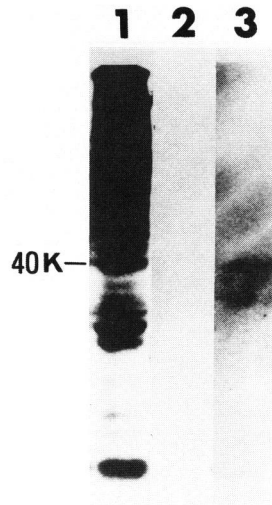
性は  $9.70 \pm 6.52\%$  から  $0.95 \pm 1.06\%$  へと著明に低下した。対照に用いた免疫前家兔血清 IgG より作製した  $F(ab')_2$  で標的細胞を前処理しても、Fig. 12-B に示したように、ADCC 活性は  $9.15 \pm 6.64\%$  と有意に変化しなかった。

**3・6・3 ADCC 標的細胞抽出蛋白中の抗原蛋白**

CCA-IgG の認識する蛋白と同じ抗原蛋白が標的細胞である大腸癌由来 RPMI 4788 細胞に存在するか否かを確認するため、PRMI 4788 細胞から SDS で抽出した



**Fig. 12** Inhibition ADCC assay of sera from patients with ulcerative colitis.  
 A : RPMI 4788 cells were preincubated with  $F(ab')_2$  obtained from anti-40 kD rabbit serum IgG.  
 B : RPMI 4788 cells were preincubated with  $F(ab')_2$  obtained from preimmune rabbit serum IgG.



**Fig. 13** Autoradiogram of SDS/PAGE-immunoblot of SDS extracted proteins from RPMI 4788 cells probed with  $^{125}I$ -CCA-IgG (lane 3) or  $^{125}I$ -control IgG (lane 2). Lane 1 showed Coomassie Blue stain of SDS extracted proteins from RPMI 4788 cells.

蛋白をSDS/PAGEで分離し、Immunoblot法で<sup>125</sup>I標識CCA-IgGとの結合性を検討した。Fig. 13レーン1は細胞抽出蛋白をSDS/PAGEで分離、1% Coomassie Blueで染色した像を示した。CCA-IgGはFig. 13レーン3に示すように細胞抽出蛋白中分子量約40,000ダルトンのメインバンドと約30,000ダルトンのバンドに結合し、対照に用いたクローン病組織結合IgGでは、Fig. 13レーン2に示すように結合は見られなかった。

#### 4 考 察

潰瘍性大腸炎の病因に免疫学的機序が関与していることはBroberger and Perlmann<sup>26)</sup>がヒト大腸粘膜のフェノール・水抽出抗原と反応する血清中の抗大腸抗体を、間接赤血球凝集法、寒天ゲル内免疫沈降反応で確認したことに始まる。以後Bregman and Kirsner<sup>27)</sup>、Polak and Vokurka<sup>28)</sup>により同様の指摘がなされるとともに、実際、大腸病変粘膜局所にもIgG含有細胞の増加<sup>29)</sup>やIgG抗体の沈着<sup>14)</sup>を認める報告がなされるようになった。さらに、Stoboら<sup>30)</sup>は、大腸粘膜上皮細胞に特異的に結合した血清抗体がFc receptorを介してnull cellのADCC反応を惹起する可能性を示唆し、Kemlerら<sup>31)</sup>も本症患者血清から抽出した免疫グロブリンと末梢血リンパ球をインキュベーションすることにより、ヒト大腸上皮細胞に対し、細胞障害性を示すことを明らかにした。また、教室の門野<sup>11)</sup>は、本症患者血清中にはヒト大腸癌由来培養細胞RPMI 4788細胞を標的細胞としたADCC活性を有する循環抗体が存在し、その活性は臨床病期に一致した変動を示すと報告した。このように、本症の大腸粘膜細胞障害機序として、ADCCの関与を示唆する報告は多いが、関与する抗体及び対応する抗原の同定・局在など詳細は未だ不明のままである。

同時に、本症のように自己免疫機序がその病因に関与すると推測される疾患<sup>12,13)</sup>においてその細胞障害に関与する抗体や対応する抗原を明らかにすることは、SLE、重症筋無力症など他の自己免疫疾患における、抗DNA抗体、抗アセチルコリンレセプター抗体などの報告<sup>32,33)</sup>に見られるように、その疾患の病態解明及び病状把握に有用と考えられる。教室の高橋<sup>15)</sup>は、本症の大腸病変粘膜組織に特異的に結合しているIgG抗体(CCA-IgG)が血清中にも存在することを示し、さらにこの<sup>125</sup>I標識CCA-IgGをプローブとし大腸・小腸・十二指腸・胃粘膜及び肝組織ホモジェネートからPBSで溶出される抗原をSDS/PAGEで分離、Im-

munoblot法、オートラジオグラフィーで分析、大腸粘膜ホモジェネートからのみ分子量約40,000ダルトンの位置に泳動される抗原を同定、CCA-IgGで認識される大腸組織特異抗原であるとした。更に、この分子量約40,000ダルトンの大腸抗原は、DEAE cellulose columnで350 mMのpotassium chlorideで濃縮、溶出されることが明らかにされたが、単一の標品として精製されるまでには到らなかった。

そこで著者はこの大腸抗原の精製、抽出を試みるとともに本蛋白が本症患者のADCCに関与する抗体の標的分子である可能性を解析することとした。本抗原を抽出するにあたり凍結保存・融解を繰り返し、その影響をみたところ、SDS/PAGE上本抗原に対応する分子量約40,000ダルトンのバンドは他の蛋白バンドに比べ、変性、喪失されず本操作に安定だったため、抽出の最初の段階に3回のfreeze and thawingを組み入れることとした。また、DEAE Affi-gel Blueカラムの350 mM KClで溶出された分画は、その後、疎水結合カラムであるPhenyl Sepharoseカラムを利用したところ、ゲルクロマトグラフィー上単一ピーク、SDS/PAGEで分子量約40,000ダルトンの部位に2-mercaptoethanolによる還元・非還元状態ともに近接した2本のバンドとして認められた。これより、本抗原は構造上、分子間ジスルフィド結合を有していないと考えられた。この2本のバンドはCoomassie Blue染色でより明瞭に分離されていたが<sup>125</sup>I標識CCA-IgGをプローブとしてオートラジオグラフィーを行った際には、両バンドの境がやや不鮮明となり、幅広いバンドとして認められ、高橋<sup>15)</sup>が<sup>125</sup>I標識CCA-IgGをプローブとし、大腸組織のPBS粗抽出抗原を用いて行ったオートラジオグラムの泳動パターンと同一の現象を捉えていると考えられる。従ってCCA-IgGは精製大腸抗原を示すこの2本のバンドを認識しCCA-IgGの認識するエピトープを有したまま精製されたと考えられた。さらに<sup>125</sup>I標識したCon Aが精製抗原蛋白を示す近接する2本のバンドのうち、陰極側のバンドとのみ結合したことから、このバンドはグルコースまたはマンノースを含む糖鎖を有する糖蛋白質で、陽極側のバンドはこの糖鎖の一部または全部が脱落した可能性が推測された。

次にこの大腸抗原40 kD蛋白がADCCに関与する抗体の標的分子であるためにはその粘膜内局在が問題になる。これまで大腸抗原の粘膜内局在に関してはMais and Fink<sup>34)</sup>がヒト大腸粘膜の95%エタノール・水抽出物を家兎に免疫して得た抗血清を用い蛍光抗体法で、ヒト大腸粘膜の基底膜に蛍光を認めたとし、Gold and

Miller<sup>35)</sup>は、ヒト大腸粘膜のフェノール・水抽出物を用い、同様の方法で検討を行い、ヒト大腸粘膜細胞のムチンに蛍光を認めたと報告している。また木村ら<sup>36)</sup>は、ラット大腸粘膜に対するモノクローナル抗体を作製し、酵素抗体法でラット大腸粘膜の杯細胞と反応する抗体を得たとしている。しかしながら、これら局在の報告された大腸抗原はいずれも抗原蛋白として同定、精製されておらず、報告者により局在が異なり、また本症病因との関連も不明である。Dasら<sup>14)</sup>は、CCA-IgGとヒト大腸組織を用いて、蛍光抗体間接法で、この抗原蛋白の大腸粘膜内局在の同定を試みているが、1次抗体として使用したCCA-IgGがヒトポリクローナル抗体であったことと2次抗体として用いたFITC標識家兎抗ヒトIgG抗体が大腸粘膜固有層内に存在する内因性IgGも認識し、バックグラウンドが高くなったなどの理由で、蛍光を大腸粘膜上皮細胞に認めたとしながらも必ずしも大腸粘膜抗原の局在同定として満足できるものではなかった。そこで著者は、精製したこの大腸抗原40 kD蛋白に特異的なマウスモノクローナル抗体を作成し、それを用いて本抗原の大腸粘膜内局在をindirect immunoperoxidase法で検討した。検討に用いたモノクローナル抗体7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub>は、ELISA法及びImmunotransblot法で抗原特異性が確認でき、さらにinhibition ELISAの結果から、7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub>の認識するエピトープはCCA-IgGでも認識されていると考えられた。その結果、Fig. 7に示したように、染色は腺窩及び腸管腔に面した大腸粘膜上皮細胞に認められ、特に上皮細胞の基底面と側面及び先端面に強く認められた。さらに上皮細胞内細胞質に染色は認められないことから上皮細胞内ムチンとの反応性はないものと考えられた。したがって7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub>の認識する抗原、すなわち大腸抗原40 kD蛋白は大腸粘膜上皮細胞の主として基底及び側面など辺縁部に存在すると考えられた。この成績は病変が大腸粘膜に限局している本症の病態を考えあわせると40 kD蛋白が本症ADCC関与抗体の標的分子である可能性を強く支持している。

そこで抗大腸抗原40 kD蛋白抗体から作製したF(ab')<sub>2</sub>を用いADCC標的細胞中の対応抗原をブロックすることで、本症患者ADCC活性の抑制をみるinhibition ADCCアッセイを用い本症患者血清ADCC活性に関与する抗体がこの大腸粘膜上皮細胞に存在する大腸抗原40 kD蛋白を認識しているか否かを検討した。局在検討に使用したモノクローナル抗体7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub>は認識するエピトープが1つで、ADCCに関与する抗体が40 kD蛋白を認識しているとしてもその結合抑制

効果は少なく、また7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub>は高分子なIgM型抗体であるため逆に立体障害により非特異的なADCCの抑制が出現する可能性も考えられたため、本実験には精製大腸抗原に対する家兎ポリクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>を利用した。この家兎ポリクローナル抗体はELISA法及びImmunotransblot法で抗原特異性が確認でき、さらにinhibition ELISAの結果からCCA-IgGの認識するエピトープを認識していると考えられた。初めにRPMI 4788細胞を標的細胞としたADCCアッセイを行った結果、潰瘍性大腸炎患者血清で10.37±6.72%と対照群0.91±0.85%に比較し高い細胞障害活性を示すことが確認された。次にこれら患者血清のADCC活性変化をinhibition ADCCアッセイで検討したところ、標的細胞を40 kD蛋白免疫家兎F(ab')<sub>2</sub>とブレインキューベーションすることで、本症患者ADCC活性は9.70±6.52%から0.95±1.06%へと活性の著明な低下が認められた。対照として用いた免疫前家兎ポリクローナル抗体から得たF(ab')<sub>2</sub>と標的細胞をブレインキューベーションしてもADCC活性は9.15±6.64%と変化が認められなかったことから、免疫家兎F(ab')<sub>2</sub>が標的細胞中の対応抗原と結合し、ADCC関連抗体の標的細胞への結合を阻害したため、ADCC活性が抑制されたと結論された。

このように標的細胞RPMI 4788にはinhibition ADCCアッセイでブロックされる標的抗原が存在することが明かとなったが、実際に、大腸粘膜に存在する抗原と同一抗原であったか否かが問題となる。Fig. 13に示したように標的細胞中には、CCA-IgGで認識される分子量約40,000ダルトンと約30,000ダルトンの蛋白質の存在が確認され、このうち、分子量約40,000ダルトンの抗原は大腸粘膜から得られたそれと同一のものと考えられたが分子量約30,000ダルトンのバンドはヒト大腸粘膜抽出蛋白中には認められなかった。その理由として、RPMI 4788細胞からの蛋白抽出は、蛋白分解酵素阻害剤の非存在下で行ったため、蛋白抽出過程においてリソゾームからの蛋白分解酵素により、40 kD蛋白が一部分解され出現した可能性や本細胞が培養細胞であることから継代培養中に不完全なペプチドが産生されるようになった可能性が考えられる。

以上、CCA-IgGが認識している分子量約40,000ダルトンの蛋白(40 kD蛋白)を精製するとともに、本抗原に対する特異抗体を作製し、それを用いたinhibition ADCCアッセイで本抗原が潰瘍性大腸炎患者のADCC関連抗体の標的分子となっているものと考えられた。

## 5 結 論

CCA-IgG の認識する大腸粘膜抗原 (40 kD 蛋白) の本症患者 ADCC 標的分子としての意義について検討し以下の結論を得た。

1) CCA-IgG と結合する 40 kD 蛋白は DEAE Affi-gel Blue カラムクロマトグラフィーと Phenyl Sepharose カラムクロマトグラフィーを用い大腸粘膜粗抽出蛋白から SDS/PAGE 上純粋な蛋白質として精製された。

2) 40 kD 蛋白は SDS/PAGE-immunoblotting- autoradiography 法で  $^{125}\text{I}$  標識 Con A と結合することから糖蛋白質と考えられた。

3) 精製 40 kD 蛋白に特異的なマウスモノクローナル抗体 7E<sub>12</sub>H<sub>12</sub> を用い, Indirect immunoperoxidase 法により本抗原の大腸粘膜内局在を検討したところ, 染色が大腸粘膜上皮細胞の周辺部に認められ, 細胞質中に認められなかったことから, 本抗原は大腸粘膜上皮細胞の辺縁部に存在すると考えられた。

4) 精製 40 kD 蛋白に特異的な家兎ポリクローナル抗体から作製した F(ab')<sub>2</sub> で標的細胞をブレインキューベーションすると, 本症患者血清の ADCC 活性が抑制されたことから, 本抗体で認識される抗原は大腸粘膜細胞の ADCC に関与する抗体の標的分子と考えられた。

以上, 潰瘍性大腸炎病変局所粘膜組織に特異的に結合している CCA-IgG 抗体により認識される抗原は大腸粘膜上皮細胞に存在しており, さらに本症の大腸粘膜細胞障害機構と考えられる ADCC に関与する抗体の標的分子である可能性が示唆された。

本研究は, 米国 Albert Einstein 医科大学消化器内科と本学内科学第四講座との共同研究として行われた。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲をいただいた本学内科学第四講座漆崎一朗教授, 研究に際して御指導いただいた米国 Albert Einstein 医科大学 Kiron M. Das 教授及び御協力いただいた本講座新津洋司郎助教授, 高後 裕 講師及び長井忠則, 門野 豊, 高橋文雄博士に深謝致します。また, 免疫組織学的染色を御指導いただいた米国 Albert Einstein 医科大学故 Alex B. Novikoff 教授に深謝致します。

## 文 献

- Greestain, A J., Janowitz, H. D. and Sachar, D. D.: The extraintestinal complications of Crohn's

disease and ulcerative colitis: A study of 700 patients. *Medicine (Baltimore)* **55**, 401-412 (1976).

- Kirsner, J. B.: The local and systemic complications of inflammatory bowel disease. *JAMA* **242**, 1177-1183 (1980).
- Bean, H. D.: The treatment of chronic ulcerative colitis with 6-mercaptopurine. *Med. J. Aust.* **9**, 592-593 (1962).
- 朝倉 均, 渡辺 哲, 日比紀文: 腸管系疾患 (潰瘍性大腸炎など) に対する免疫抑制剤の正しい使い方とその評価. *臨床病理* **8**, 57-64 (1975).
- Korelitz, B. I., Therapy of inflammatory bowel disease, including the use of immunosuppressive agents. *Clin. Gastroenterol.* **9**, 331-349 (1980).
- Truelove, S. C., Willoughby, C. P. and Lee, G.: Further experience in the treatment of severe attacks of ulcerative colitis. *Lancet* **2**, 1080-1088 (1978).
- Kirsner, J. B.: Observation on the medical treatment of inflammatory bowel disease. *JAMA* **243**, 557-564 (1980).
- Broberger, O. and Perlmann, P.: Demonstration of an epithelial antigen in colon by means of fluorescent antibodies from children with ulcerative colitis. *J. Exp. Med.* **115**, 13-25 (1962).
- Koffler, D., Minkowitz, S., Rothman, W. and Garlock, J.: Immunocytochemical studies in ulcerative colitis and regional ileitis. *Am. J. Pathol.* **41**, 733-745 (1962).
- Bartnic, W. and Shorter, R. G.: Inflammatory bowel disease. Immunologic developments, In: Berk, E.: *Developments in digestive disease*. 3, 109-127, Lea & Febiger, Philadelphia. (1980).
- 門野 豊: 潰瘍性大腸炎患者血清の ADCC 活性とその臨床的意義に関する研究. *札幌医学雑誌* **54**, 369-379 (1985).
- Whorwell, P. J. and Wright, R.: Immunological aspects of inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol.* **52**, 303-321 (1976).
- Kraft, S. C. and Kirsner, J. B.: The immunology of ulcerative colitis and Crohn's disease: clinical and humoral aspects, In: Kirsner, J. B. and Shorter, R. G.: *Inflammatory Bowel Disease*. 2nd ed., 86-120, Lea & Febriger, Philadelphia (1980).
- Das, K. M., Dubin, R. and Nagai, T.: Isolation and characterization of colonic tissue-bound antibodies from patients with idiopathic ulcerative colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4528-4532 (1978).
- 高橋文雄: 潰瘍性大腸炎組織結合 IgG の認識する大

- 腸抗原の同定とそれに対応する血清抗体定量の臨床的意義に関する研究. 札幌医学雑誌 **56**, 487-501 (1987).
16. Evans, J. G. and Acheson, E. D.: An epidemiological study of ulcerative colitis and regional enteritis in the Oxford area. *Gut* **6**, 311-324 (1965).
  17. Best, W. R., Becketl, J. M., Singleton, J. W. and Kern, F.: Development of a Crohn's disease activity index. *Gastroenterology* **70**, 439-444 (1976).
  18. Hudson, L. and Hay, F. C.: Iodination of proteins: Iodogen method, In: *Practical Immunology*. 2nd ed., 241-242, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1980).
  19. Maizel, V.: Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. *Methods Virol.* **5**, 179-246 (1973).
  20. Towbin, H., 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).
  21. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
  22. Engvall, E. and Perlmann, P.: Quantitation of specific antibodies by enzyme linked anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.* **109**, 129-135 (1972).
  23. Uchterlony, O.: Diffusion-gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy* **6**, 30-154 (1962).
  24. Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 577-580 (1981).
  25. Shoham, J. and Cohen, M.: Antibodydependent cellular cytotoxicity to human colon-tumor cells. II. Analysis of the antigens involved. *Br. J. Cancer* **40**, 244-252 (1979).
  26. Broberger, O. and Perlmann, P.: Autoantibodies in human ulcerative colitis. *J. Exp. Med.* **110**, 657-674 (1959).
  27. Bregman, E. and Kirsner, J. B.: Colon antibodies in ulcerative colitis. *J. Lab. Clin. Med.* **56**, 795 (1960).
  28. Polak, J. and Vokurka, V.: Auto-immuno reactions in the course of ulcerative colitis. *Am. J. Dig. Dis.* **5**, 395-405 (1960).
  29. Rosekrans, P. C. H., Meijer, C. J. L. M., Van der Wal, A. M., Cornelisse, C. J. and Lindeman, J.: Immunoglobulin containing cells in inflammatory bowel disease of the colon: a morphometric and immunohistochemical study. *Gut* **21**, 941-947 (1980).
  30. Stobo, J. D., Tomasi, T. B., Huizenga, K. A., Spencer, R. J. and Shorter, R. G.: In vitro studies of inflammatory bowel disease: Surface receptors of the mononuclear cell required to lyse allogeneic colonic epithelial cells. *Gastroenterology* **70**, 171-176 (1976).
  31. Kemler, B. J. and Alpert, E.: Inflammatory bowel disease: Study of cell mediated cytotoxicity for isolated human colonic epithelial cells. *Gut* **21**, 353-359 (1980).
  32. Morimoto, C., Sano, H., Abe, T., Homma, M. and Steinberg, A. D.: Correlation between clinical activity of systemic lupus erythematosus and the amounts of DNA in DNA/anti-DNA antibody immune complexes. *J. Immunol.* **219**, 1960-1965 (1982).
  33. Cleveland, W. L., Wassermann, N. H., Sarangarajaw, R., Penn, A. S. and Erlanger, B. F.: Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by a normally functioning auto-antiidiotypic mechanism. *Nature* **305**, 56-57 (1983).
  34. Mais, R. F. and Fink, S.: The distribution of Escherichia coli antigens in rectal mucosa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **136**, 848-852 (1971).
  35. Gold, D. V. and Miller, F.: A mucoprotein with colon-specific determinants. *Tissue Antigens* **11**, 362-371 (1978).
  36. 木村明美, 秋山昌広, 諏訪義光, 津島隆明, 黒江晴郎, 吉田 豊: モノクローナル抗体によるラット大腸粘膜抗原の検討. *消化器と免疫* **13**, 128-131 (1984).

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4講座 坂牧純夫