

遊離 Light Chain の Hidden Antigenic Determinant に関する研究

正木章二 赤保内良和

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 和田武雄教授)

Studies on Hidden Antigenic Determinants of Free Light Chains

Shohzi MASAKI and Yoshikazu AKAHONAI

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Wada)

Various kinds of anti-free L-chain sera (A-FL) were prepared against several Bence Jones proteins (BJP) and a polyclonal L-chain followed by adequate absorption, in order to investigate the localization of hidden antigenic determinants on BJP molecules. These were divided into variable halves (V_L) and constant halves (C_L) by enzymic digestion. The reactions of intact BJP and these fragments to A-FL were analysed by immunoelectrophoresis and immunodiffusion, and the following results were obtained:

1. A-FL appeared to react to a free L-chain, however it did not react to intramolecular L-chains such as whole immunoglobulins (Ig) and Ig fragments (Fab, Fc).

2. The reactions between each BJP and each A-FL showed considerable variations respectively. However, A-FL against a single BJP showed no reactions to a heterologous BJP of the same type at times. On the other hand, A-PFL which was produced by a polyclonal L-chain, however, showed a good reaction to various BJP to such an extent that A-FPL was regarded as broad spectrum antiserum. It is apparent from these results that this antiserum is highly suitable for the determination of a free L-chain.

3. The enzymic digestion of BJP was carried out by using pepsin, trypsin and papain respectively. However, each BJP showed different properties in the conditions and mode of digestion, namely, type of enzyme, enzyme/BJP ratio, buffer, temperature, time etc.. The resultant products also gave rise to a considerable diversity depending on the conditions. Regarding the fragments in certain BJP both V_L and C_L are observed while in other BJP either V_L or C_L alone is observed while in still other BJP both V_L and C_L were not observed, in other words the results were not consistent.

4. It is reasonable to presume that the antigenicity which is recognized in the form of hidden antigenic determinants by using A-FL might relate to the conformational structure of the whole molecule of a L-chain. Although it is not evident from these data whether these determinants are actually located on C_L or V_L , we are of the opinion that it may relate to C_L from the data obtained from certain A-FL.

(Received September 2, 1978 and accepted December 11, 1978)

1 緒 言

light chain (L鎖) は heavy chain (H鎖) とともに免疫グロブリン (Ig) 分子を構成する polypeptide であるが、L鎖に対する抗体 (抗L鎖血清) はL鎖はもちろん、L鎖をその分子内に有する Ig 分子およびその fragment の Fab, F(ab')₂ 等とも反応し、寒天内免疫拡散法により容易に沈降線を形成する。しかしこの抗L鎖血清 (A-L) を正常ヒト血清 (NHS), あるいは各クラス Ig で十分に吸収すると Ig, Fab および F(ab')₂ のように分子内に存在する形のL鎖とはもはや反応せず、遊離L鎖あるいは Bence

Jones 蛋白 (BJP) とのみ反応する抗遊離L鎖血清 (A-FL) が得られ、この抗体の特異性は遊離L鎖に表われる hidden antigenic determinant によるものと推定されている。

遊離L鎖は分子量が小さく腎で代謝され、血中よりすみやかに消失するので、尿中の遊離L鎖を測定することは、体内の Ig 合成の状態および腎機能、とくに腎尿細管の機能を知るうえに大きな意義を有すると考えられる^{1,2,3}。Dammacco and Waldenström^{4,5}、Lindströmら^{6,7}) はこのような A-FL を用いて血中および尿中遊離L鎖を測定し、monoclonal gammopathy を伴う免疫グロブリン

異常症および各種白血病などにおいてそれらの増加を報告している。著者らも同様に BJP を用いて A-FL を作製し、血中および尿中遊離 L 鎖を測定して成績の一部を報告⁸⁾したが、作製した抗血清の種類により L 鎖に対する反応態度にかなりの差異が生ずることを認め、この測定法の臨床応用にあたっては、さらに hidden antigenic determinant 自体についての基礎的な吟味の必要性を認めた。

本研究においては、monoclonal L 鎖である BJP や polyclonal L 鎖を単離・精製し、これらに対する数種の A-FL を作製し、それぞれとの反応性について詳細に検討を加えた。さらにこの抗体と反応する遊離 L 鎖上の反応基、すなわち hidden antigenic determinant を検索する目的で、BJP を constant half (C_L) と variable half (V_L) に分解し、その局在を明らかにすべく検討した。

2 方法

2.1 抗遊離 L 鎖血清の作製

2.1.1 L 鎖の単離・精製

L 鎖は多発性骨髄腫 (MM) 患者尿および多量の polyclonal L 鎖 (κ 鎖および λ 鎖の混合) を含有する lymphadenopathy 患者尿⁹⁾ より、Bernier and Putnam¹⁰⁾ の方法に準じて単離・精製したが、BJP としては κ 型 5 種、 λ 型 3 種を得、さらに polyclonal L 鎖 1 種の 9 試料を得て、抗血清の作製および分析用に供した。これらを本稿においてはそれぞれ BJP κ_{1-5} (BJP κ_n , $n=1-5$), BJP λ_{1-3} (BJP λ_n , $n=1-3$), および PL と命名することにす。これらの精製試料は免疫電気泳動分析 (IEP) および免疫拡散反応 (ID) において、抗ヒト全血清 (A-HS) および抗 IgG 血清によりただ 1 本の沈降線を作り、純度が高いことを確めた。次いでこれを 0.01 M $(NH_4)_2CO_3$ 溶液で透析した後、凍結乾燥粉末にして保存した。

2.1.2 抗 L 鎖血清の作製

抗血清は BJP κ_{1-5} および BJP λ_{1-3} それぞれについて作製するとともに、 κ および λ 型別にそれぞれ等量ずつ混合した試料 (BJP κ_t , BJP λ_t と仮称) および PL を用いて作製した。すなわち、これらを生理食塩水で 10 mg/ml 濃度に溶解し、その 1 ml と Freund's complete adjuvant と混和して家兎の foot pads に注射し、次いで 1~2 週間間隔でそれぞれ 5 mg ずつ 4~5 回 booster を行い、高力価の抗血清を得た。

これらの抗 L 鎖血清中には少量ではあるが他型の L 鎖に対する抗体 (抗 κ 鎖血清の時は λ 鎖に対する抗体) が含まれる可能性があるため、念のために抗血清 10 ml につき他型の L 鎖 1 mg を加えて吸収した。すなわち、これを 37°C, 2 時間反応させた上、4°C で一夜放置後、10,000 rpm,

15 分遠心し、上清を分けて高力価で特異性の高い抗血清を得た。

2.1.3 抗血清の種類とその略号

本研究において作製した抗血清とその略号を一括して下に記す。

A- κ_{1-5} (A κ_n , $n=1-5$): BJP κ_{1-5} それぞれに対する抗血清

A- λ_{1-3} (A λ_n , $n=1-3$): BJP λ_{1-3} それぞれに対する抗血清

A- κ_t : BJP κ_t (κ_{1-5} の等量混合試料) に対する抗血清

A- λ_t : BJP λ_t に対する抗血清

A-PL: polyclonal L 鎖 (PL) (κ 鎖および λ 鎖を含む) に対する抗血清

A-L: BJP および PL に対する抗血清の総称

A-FL: 遊離 L 鎖 (FL) とのみ反応する抗血清の総称 (A-F $\kappa_1 \dots$, A-F $\lambda_1 \dots$, A-F κ_t , A-F λ_t 等)

A- V_L : BJP の variable half (V_L) に対する抗血清
なおヒト全血清に対する抗血清 (A-HS) および抗 IgG 血清 (L 鎖とも反応する) に対する抗血清 (A-IgG) についても括弧内略号を用いた。

2.1.4 抗遊離 L 鎖血清の作製

抗遊離 L 鎖血清 (A-FL) の作製には、上記のようにして得た A- κ_n , A- λ_n , A- κ_t , A- λ_t および A-PL に次の吸収操作を施した。すなわち、A-L それぞれにつき 33% 硫酸飽和法により γ -globulin 分画を分け、生理的食塩水で 10~30 mg/ml 溶液とし、次いで同様の操作で正常ヒト血清 (NHS) より分離した γ -globulin 分画 0.5~10 mg を加え、前項の方法と同様に吸収し A-F κ_n , A-F λ_n , A-F κ_t , A-F λ_t および A-FPL を得た。また吸収は A-FL が NHS と IEP や ID で反応がみられなくなるまでくり返し行った。なおこれらの抗血清は β_2 microglobulin とは全く反応しないことを確めた。

2.2 抗遊離 L 鎖血清の吟味

このようにして作製した A-FL が Ig 分子内 L 鎖と反応しないことを確め、さらに各種遊離 L 鎖といかなる反応を示すかを、次のように IEP および ID により検討した。

2.2.1 免疫グロブリン分子内 L 鎖との反応

Ig 分子内 L 鎖と反応するか否かを NHS, 各クラス Ig, Fab および F(ab')₂ を用いて検討した。NHS は原血清より倍数希釈法で 2,048 倍まで 11 種の試料を作り、また A-FL も同様に 32 倍まで 6 種の希釈抗血清を作ってそれぞれを ID で反応させた。また IgG 型・IgA 型 MM 患者血清から DEAE および CM cellulose chromatography により精製した Ig G- および Ig A-M 成分についても同

様に希釈して抗血清と反応させた。

さらに DEAE cellulose chromatography により単離・精製した polyclonal IgG を papain および pepsin 分解して得られた Fab および $F(ab')_2$ との間にも反応性を検討した。

2.2.2 遊離 L 鎖との反応

monoclonal L 鎖である各種 BJP 試料および polyclonal L 鎖 (PL) との反応を検討した。

A-F κ_n および A-F λ_n と、その作製に用いた免疫原である単離 BJP κ_n および BJP λ_n との間に交叉的に反応を実施し、さらに BJP 熱反応試験陽性を示す各種 M 蛋白血症患者尿を用いて反応態度を観察した。また、PL との反応は Ig fragment 病患者尿を用いて検討し、A-FPL についても同様に各種 BJP および PL との交叉反応性を吟味した。なおこの患者尿は前報⁹⁾のごとく遊離 L 鎖として多量の polyclonal κ (560 mg/day) および polyclonal λ (352 mg/day) 鎖を含む症例の試料である。

2.2.3 L 鎖の variable half および constant half との反応

2.2.3.1 variable half および constant half への分解方法

A-FL の反応性が遊離 L 鎖のどの fragment の抗原性に関連しているかを調べるため、Solomon and McLaughlin¹¹⁾, Solomon¹²⁾, Karlsson ら^{13,14)}, Seon ら¹⁵⁾ の各方

Peptic Cleavage

BJP Concent.: 10 mg/ml
Pepsin/BJP: 1/200-1/1000 (w/w)
Buffer: Acetate Buffer (0.05 M, pH 3.0-3.4)
Incubation: 37°C 30 sec. -120 min.
50-53°C 30 sec. -90 min.

(The reaction was stopped by 1 M NaOH)

Tryptic Cleavage

BJP Concent.: 20 mg/ml
Trypsin/BJP: 1/500-1/1000 (w/w)
Buffer: Tris-HCl Buffer (1 M, pH 8.0)
Incubation: 37°C 30 sec. -90 min.
(The reaction was stopped by trypsin inhibitor)

Papain Cleavage

BJP Concent.: 10 mg/ml
Papain/BJP: 1/250 (w/w)
Buffer: Phosphate Buffer (0.1 M, pH 7.0)
added EDTA and L-cystein
Incubation: 37°C 30 sec. -30 min.

(The reaction was stopped by iodoacetamide)

Fig. 1 Conditions of proteolytic cleavage of Bence Jones proteins.

法に準じて各種 BJP を variable half (V_L) および constant half (C_L) に分解して検討した。すなわち Fig. 1 に示すように一部方法を改良し pepsin, trypsin および papain で分解を試みた。

pepsin 分解の場合、原法では使用緩衝液の pH が 3.4 または 4.5 であるが^{11,13)}、この場合 BJP の分解が必ずしも十分に行われないうえ、緩衝液の pH を 3.0-3.4 とさらに酸性条件下において分解を試みた。すなわち、BJP κ_n および λ_n それぞれ 10 mg/ml を 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 3.0-3.4) で透析し、pepsin/BJP 比を 1/200-1/1000 (w/w) になるように添加して、37°C で反応させ、30 秒後から随時 120 分まで 0.1 ml を採取し、1 N NaOH 1-2 滴を加えて反応を止め、凍結保存した。また Seon ら¹⁵⁾ は 37°C では V_L が検出され易く、55°C では C_L が検出され易いとしているので、比較検討するために BJP を 50-53°C で分解して同様の操作を加えた。

trypsin 分解の場合は BJP 20 mg/ml を 1 M Tris-HCl 緩衝液で透析し、trypsin/BJP 比を 1/500-1/1000 (w/w) となるようにして 37°C で反応させ、trypsin と同量の Lima bean trypsin inhibitor を加えて反応を止めた。

また **papain 分解**の場合は BJP 濃度を 10 mg/ml とし、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に EDTA 0.2 mM および L-cystein 1 mM を加えた溶液で透析し、papain/BJP 比を 1/250 になるよう papain を加えて 37°C で反応させ、iodoacetamide (5 mM) を加えて反応を止めた。これらの分解試料はいずれも使用するまで凍結保存した。

2.2.3.2 variable half および constant half の分析方法

これらの BJP 分解物はその分解程度を知るとともに個々の分子量を測定するため、intact BJP と比較しつつ SDS disc 電気泳動法 (disc EP, アクリルアミド濃度 7.5%) により検討した。また BJP 分解物を IEP により各種の A-L および A-FL を用いて分析した。

さらに V_L に対する抗血清 (A-V κ および A-V λ) を用いたが、Solomon and McLaughlin¹¹⁾ に従って個々の A- κ_n および A- λ_n を heterologous な同型の L 鎖 (免疫原とした autologous L 鎖以外の同型の L 鎖) により吸収して作製した。

3 成績

3.1 各種抗遊離 L 鎖血清の反応性

3.1.1 A-F κ_t および A-F λ_t の反応

A-F κ_t および A-F λ_t の反応性を IEP により、Fig. 2 (a), (b) にそれぞれ A- κ_t および A- λ_t と比較して示した。まず A- κ_t および A- λ_t はともに NHS および単離 BJP κ_t

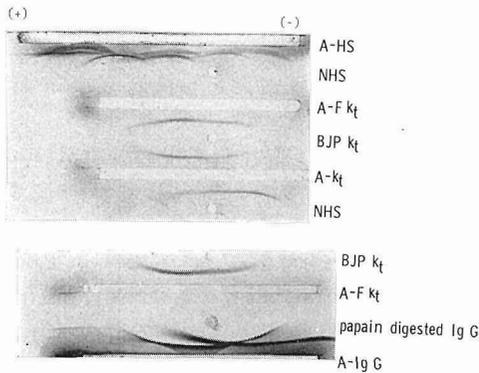


Fig. 2 (a) Characterization on anti-free κ_t -chain serum (A-F κ_t).

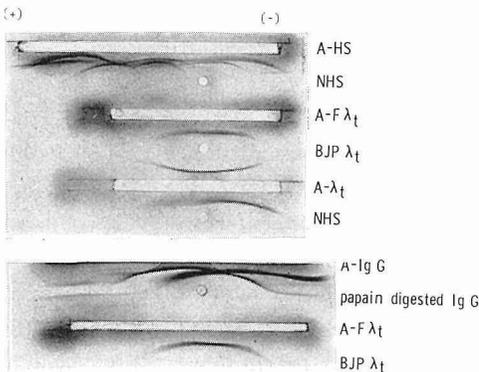


Fig. 2 (b) Characterization of anti-free λ_t -chain serum (A-F λ_t).

ならびに BJP λ_t とそれぞれ 1 本の沈降線を形成し、高力価で各型 L 鎖の特異的抗血清であることが確認された。

一方 Fig. 2 (a)のごとく A-F κ_t は NHS とは全く反応しないが、BJP κ_t との間には明らかに沈降線を形成する。この場合 A- κ_t の作る沈降線に比較してやや薄く、軽度の抗体価の低下がうかがえるが、BJP κ_t に対する反応態度はほぼ同一とみなせる。また Ig G の papain 分解物に対しては、A-Ig G が Fab, Fc と反応して沈降線を作るのに対して、A-F κ_t は全く沈降線を形成しない。さらに、Ig G-ならびに Ig A-M 成分および Ig G の pepsin 分解物である F(ab')₂ もも反応しないことを確認した。これらの沈降線の形成は抗原・抗体量に関係するので、NHS, 各クラス Ig, Fab, および F(ab')₂ 等の抗原および A-F κ_t の希釈系列を作って種々の組合わせで ID を施行したが、いずれの場合にも沈降線の形成は認められなかった。

次に Fig. 2 (b)のごとく A-F λ_t についても同様に検討したが、A-F κ_t と同様の結果を得、Ig 分子内 L 鎖とは反応せず、対応する型の遊離 L 鎖とのみ反応することが認められた。

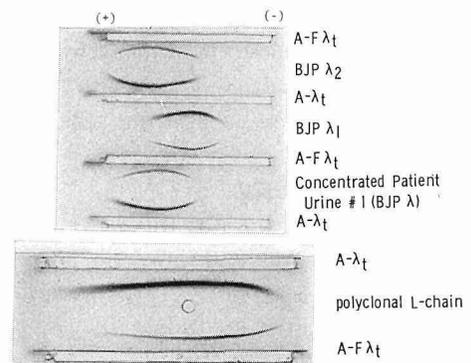


Fig. 3 (a) Characterization of anti-free κ_t -chain serum reacting with Bence Jones proteins (κ) and a polyclonal L-chain.

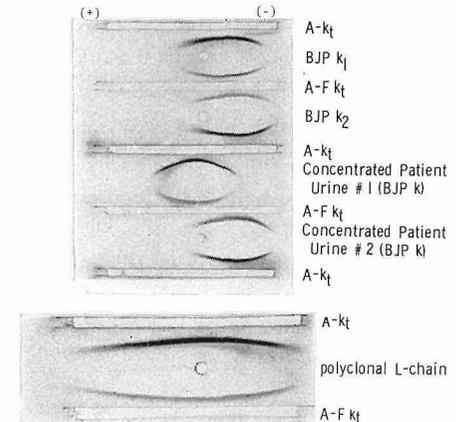


Fig. 3 (b) Characterization of anti-free λ_t -chain serum reacting with Bence Jones proteins (λ) and a polyclonal L-chain.

次いで各種 BJP および PL との反応態度を IEP で調べ Fig. 3 (a), (b) に示した。

Fig. 3 (a) に示すように A-F κ_t は種々の電気泳動的易動度を有する単離 BJP κ_n と単一の沈降線を作り、その強度は吸収処置前の A- κ_t に比較しても軽度低下をみるに過ぎない。また A-F κ_t は BJP κ を含む MM 患者尿試料とよく反応し、調べ得た限りの BJP κ とはすべて反応する broad spectrum の抗血清であると判断された。この性状は polyclonal L 鎖との反応でも明らかであり、IEP 上 α_1 領域から γ 領域にわたり A- κ_t と同様の反応態度を示した。

Fig. 3 (b) に示すように A-F λ_t についても全く同様の結果が得られ、broad spectrum の抗血清であることが確認された。

3.1.2 A-F κ_n および A-F λ_n の反応

個々の BJP に対する A-F κ_n および A-F λ_n の反応性

Table 1 Reactions of anti-free L-chain sera to Bence Jones proteinsBJP κ

	A-F κ_1	A-F κ_2	A-F κ_3	A-F κ_4	A-F κ_5	A-F κ_6	A-FPL
BJP κ_1	+	+	-	-	+	+	+
κ_2	+	+	-	-	+	+	+
κ_3	+	-	+	-	+	+	+
κ_4	+	+	+	+	+	+	+
κ_5	+	+	+	-	+	+	+
PL	+	+	+	-	+	+	+

BJP λ

	A-F λ_1	A-F λ_2	A-F λ_3	A-F λ_6	A-FPL
BJP λ_1	+	+	-	+	+
λ_2	+	+	+	+	+
λ_3	+	+	+	+	+
PL	+	+	+	+	+

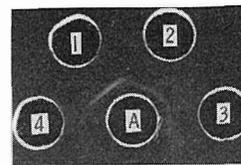
□: autologous reaction

+: positive precipitine line by IEP

-: negative precipitine line by IEP

を、各種 autologous および heterologous BJP との間に交叉反応を施して得られた結果を Table 1 にまとめた。すなわち A-F κ_1 は BJP κ_1 と最もよく反応し、その他の heterologous BJP κ ととも反応して共通の沈降線を作るが、BJP λ とは反応しない。また A-F λ_1 については Fig. 4 のように BJP λ_1 とよく反応し、heterologous な BJP λ_2 および BJP λ_3 とは部分共通性を示す。このように heterologous BJP との反応性は抗血清ごとに異なるが、検査し得た範囲ではすべての L 鎖と反応したのは A-F κ_1 、A-F κ_5 、A-F λ_1 および A-F λ_2 であり、A-F κ_4 は heterologous BJP κ との間に反応を示さなかった。また A-F κ_6 および A-F λ_6 はそれぞれすべての BJP κ および λ ならびに PL と反応し、A-FPL もこれと同様に Fig. 4 のようにすべての BJP κ および BJP λ と反応するが、それぞれに異なる沈降線形成を示して、広域の反応性を有する点が注目された。

以上の成績より、A-FL は多くの BJP を混合した試料、または polyclonal L 鎖で作製したものが、抗体としても broad spectrum の性格を有することが判明した。

A: A-F λ_1

B: A-FPL

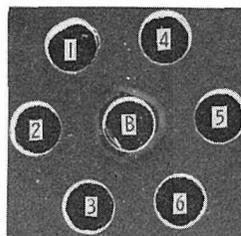
1: BJP λ_1 2: BJP λ_2 3: BJP λ_3 4: BJP κ_1 5: BJP κ_2 6: BJP κ_3 

Fig. 4 Immunodiffusion patterns of Bence Jones proteins developed with anti-free light chain sera.

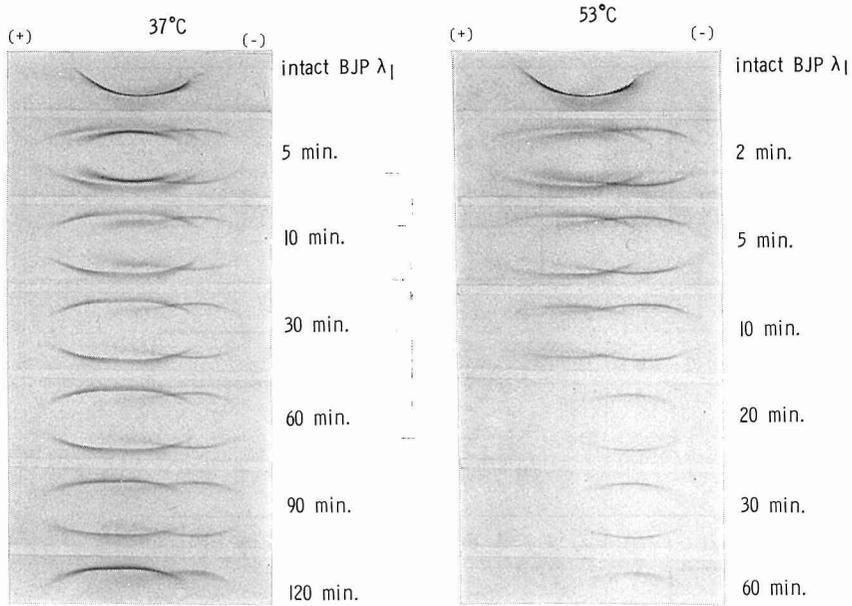


Fig. 5 Immunoelectrophoretic patterns of fragments cleaved from Bence Jones protein λ_1 during peptic digestion at 37°C and 53°C.

3.2 BJP の VL, CL への分解と各種抗遊離 L 鎖血清との反応

3.2.1 VL, CL への分解と同定

Fig. 5 に VL, CL の分解に成功した BJP λ_1 の IEP 像を示した。すなわち、反応温度を 37°C および 53°C で pepsin 分解を施して比較したが、37°C では反応 5 分後には A- λ_1 と 3 本の沈降線がみられ、60 分後には intact λ_1 と思われる沈降線が消失して 2 本となり、最も陽極よりの沈降線が明瞭となっている。一方 53°C では反応が早やく、2 分後においてすでにかかなりの分解が認められ、20 分後には易動度の遅い成分の沈降線のみが認められた。

これらについて分子量 (MW) を SDS disc EP で検討すると Fig. 6 に示すように、分解前の BJP λ_1 は dimer (MW 44,000) と monomer (MW 22,000) の 2 本の band を示し、分解後の試料 (37°C, 10 分) ではこの 2 本の band が薄くなると共に、新たに MW 11,000 前後の幅の広い band 1 本が認められ、ほぼ同一大の half molecule に分解されることが確認された。

これらの分解物の同定を Fig. 7 に示した。すなわち、37°C, 30 分反応後の試料を用い、A- λ_1 , A- λ_2 , および A-V λ_1 を用いて IEP で検索すると、A- λ_1 と反応する 3 本の沈降線のうち陽極側で分子量の小さい沈降線 (矢印) は A-V λ_1 と反応し V λ_1 と同定された。また A- λ_2 によりできる最も陰極側の沈降線は内側の沈降線 (intact λ_1) と partial identity を示し、heterologous な関係にある A- λ_2 と両

方も反応するので C λ_1 と同定された。

したがって Fig. 5 のように、37°C における分解では 30 分以後において大量の V λ_1 と少量の C λ_1 が生じ、53°C では 20 分以後において C λ_1 のみが検出されることが分かる。

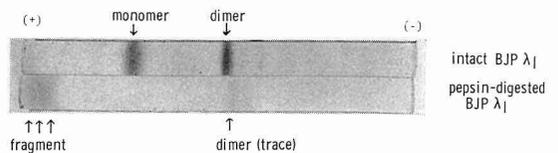


Fig. 6 Analysis of pepsin-digested BJP λ_1 by SDS disc electrophoresis.

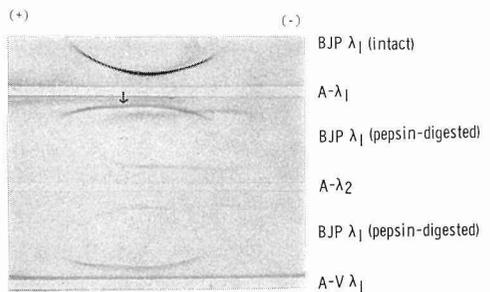


Fig. 7 Immunoelectrophoretic identification of fragments obtained by peptic digestion of BJP λ_1

(A-V λ_1 : A- λ_1 absorbed with a heterologous BJP λ)

pepsin, trypsin および papain を用いて BJP κ 5 種, BJP λ 3 種の分解を試みたが, 至適分解条件はおのこの BJP により酵素の種類, pH, 反応時間等が全く異り, 分解の難易に差を認めた. trypsin および papain の場合にも前述の至適条件を設定したが, V_L および C_L の生成および検出成績は, pepsin の場合に比較して特に優れた成績は得られなかった. 一般に C_L および V_L 両成分を同時に生成することは困難で, その一方を得るに止まるか, 両成分ともに生成出来ないかのいずれかの場合を経験した. 成績をまとめると, Table 2 のごとく, κ 鎖からは $C_{\kappa 3}$, $C_{\kappa 5}$, $V_{\kappa 2}$, $V_{\kappa 4}$, λ 鎖からは $C_{\lambda 1}$, $V_{\lambda 1}$, $C_{\lambda 2}$ の計 7 種の fragment を得ることが出来た.

3.2.2 各種抗遊離 L 鎖血清の V_L および C_L との反応

各種抗遊離 L 鎖血清による BJP の pepsin 分解物の IEP 像のうち代表的なものを Fig. 7, 8 および 9 に示した.

$A-\lambda_1$ および $A-F \lambda_1$ を autologous な関係にある BJP λ_1 の pepsin 分解物と反応させると, Fig. 8 のごとく極めて類似した像を呈し, $V_{\lambda 1}$ および $C_{\lambda 1}$ 両 fragment とよく反応する.

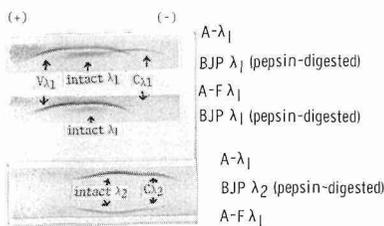


Fig. 8 Immunoelectrophoretic patterns of pepsin-digested Bence Jones proteins developed with anti- λ_1 chain serum ($A-\lambda_1$) and anti-free λ_1 chain serum ($A-F \lambda_1$)

これらの抗血清は heterologous な関係にある BJP λ_2 と反応し, $C_{\lambda 2}$ とよく反応するが, $A-F \lambda_1$ では $A-\lambda_1$ に比較して力価がやや低かった.

$A-\lambda_2$ および $A-F \lambda_2$ を autologous BJP λ_2 の pepsin 分解物と反応させると Fig. 9 のように $C_{\lambda 2}$ とよく反応し, intact λ_2 との間の spur 形成が明瞭である. また heterologous BJP λ_1 に対しては $A-\lambda_2$ は $C_{\lambda 1}$ と弱く反応するに過ぎず, $A-F \lambda_2$ は IEP レベルにおいては $C_{\lambda 1}$ および $V_{\lambda 1}$ とは反応を示さなかった.

$A-PL$ および $A-FPL$ の反応を Fig. 10 に示したが, $A-FPL$ は $A-PL$ に比較して力価は低いが BJP κ_3 および κ_5 の pepsin 分解物と反応して $C_{\kappa 3}$ および $C_{\kappa 5}$ の沈降線を作る.

各種 $A-FL$ の反応成績を一括して Table 2 に示した.

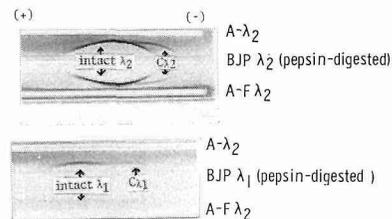


Fig. 9 Immunoelectrophoretic patterns of pepsin-digested Bence Jones proteins developed with anti- λ_2 chain serum ($A-\lambda_2$) and anti-free λ_2 -chain serum ($A-F \lambda_2$).

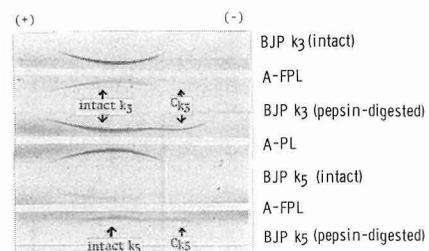


Fig. 10 Immunoelectrophoretic patterns of pepsin-digested Bence Jones proteins developed with anti-polyclonal L-chain serum ($A-PL$) and anti-free polyclonal L-chain serum ($A-FPL$).

各種 $A-F \kappa_n$ はそれぞれ autologous な関係にある BJP κ_n の V_{κ} あるいは C_{κ} と反応するが, heterologous BJP κ_n の fragment とは反応がみられなかった. これに対して $A-F \kappa_3$ は $C_{\kappa 3}$, $C_{\kappa 5}$ および $V_{\kappa 2}$, $V_{\kappa 4}$ と反応したが, それぞれと autologous な関係にあるためと考えられる. しかし $A-FPL$ は C_{κ} とのみ反応し, V_{κ} とは反応しなかった.

各種 $A-F \lambda_n$ については, $A-F \lambda_1$ は autologous BJP λ_1 の $C_{\lambda 1}$ および $V_{\lambda 1}$ と反応するのみならず, heterologous BJP λ_2 の $C_{\lambda 2}$ と反応したが, $A-F \lambda_2$ は autologous な $C_{\lambda 2}$ のみと反応した. $A-F \lambda_1$ は $C_{\lambda 1}$, $V_{\lambda 1}$, $C_{\lambda 2}$ のすべてと反応したが, $A-FPL$ はそのいずれとも反応を示さなかった.

Table 1 の成績と比較すると, $A-FL_n$ は intact BJP に対しては heterologous な関係でも反応するが, それらを pepsin 分解して生ずる fragment C_L および V_L とは IEP および ID レベルでは反応性を失い, autologous BJP の V_L および C_L のみとの反応性が残ることが認められた.

4 考 按

Ig 分子は 2 個の H 鎖と 2 個の L 鎖から構成され, その抗原性は両方の polypeptide 鎖によって示される. BJP

Table 2 Reactions of anti-free L-chain sera to protease-digested fragments of Bence Jones protein

BJP κ							
	A-F κ_1	A-F κ_2	A-F κ_3	A-F κ_4	A-F κ_5	A-F κ_t	A-FPL
V κ_2	-	+	-	-	-	+	-
C κ_3	-	-	+	-	-	+	+
V κ_4	-	-	-	+	-	+	-
C κ_5	-	-	-	-	+	+	+

BJP λ					
	A-F λ_1	A-F λ_2	A-F λ_3	A-F λ_t	A-FPL
C λ_1	+	-	-	+	-
V λ_1	+	-	-	+	-
C λ_2	+	+	-	+	-

□: autologous reaction

+: positive precipitin line by IEP

-: negative precipitin line by IEP

は L 鎖の dimer または monomer と同定され、BJP の抗原決定基と Ig 分子内 L 鎖のそれとはほぼ同一と考えられている^{16,17)}。しかし、BJP に対する抗血清を作って各クラス Ig で吸収するともはや whole Ig 分子とは反応しないが、BJP との反応が残存することが知られ、これは遊離 L 鎖において発現してくる hidden antigenic determinant によるものと推測されて来た^{18,19)}。

本研究においては、各種 BJP および polyclonal L 鎖 (PL) により多種類の抗血清を作製し、 γ -globulin で吸収して遊離 L 鎖とのみ反応する抗血清 (A-FL) を得、これと各種 BJP およびその酵素分解生成物 V_L および C_L との交叉的な組合せ反応を行って抗体の反応態度を分析すると共に、hidden antigenic determinant が L 鎖のどの部位に関連、ないしは局在するかを明らかにしようとした。

まず A-FL が BJP と反応することは Nachman and Engle¹⁸⁾、Epstein¹⁹⁾ により始めて報告されたが、Ig G を還元分解して得た正常 L 鎖および MM 患者尿より得た BJP により抗血清を作ると、whole Ig にはなくて BJP のみに存在する抗原基と反応する抗体が得られるという。これらの反応は whole Ig では "inaccessible" であり、正常遊離 L 鎖、あるいは BJP 形成時にのみ露出してくる抗原基によるものと考えられ、blocked antigenic site¹⁹⁾ または hidden antigenic determinant^{5,18)} と呼ばれて

いる。

この抗原基に対する抗血清は、体液中の遊離 L 鎖と whole Ig が共存していても影響を受けることなく L 鎖の測定が可能ゆえ好都合で、Dammacco and Waldenström^{4,5)}、Lindström^ら^{6,7)} はこの点を利用して諸種疾患における L 鎖の動態を報告している。著者ら⁸⁾ も同様に遊離 L 鎖の測定を試みたが、抗血清と個々の BJP との反応には著明な差異があり、その反応 spectrum が狭くて多種の BJP と一様には反応せず、遊離 L 鎖の測定上には抗血清に一定の制約があることを認めた。したがってその測定には broad spectrum の抗血清を作製することが必要条件であることを指摘した。

今回はこのような点から共通反応性を示す抗血清の作製を意図するとともに、BJP のみならず PL に対する多種類の A-FL をも作ってその反応性を検討した。

まず作製した各種 A-FL の Ig に対する反応をみると、正常人の whole Ig のみならず MM 患者の Ig G- および Ig A-M 成分、さらにそれらの fragment である Fab および F(ab')₂ との間にも反応は認められなかった。つまり L 鎖が H 鎖に結合していれば Fab や F(ab')₂ fragment であっても反応せず、L 鎖の C_L domain と H 鎖の CH₁ domain の S-S 結合部位¹⁶⁾ が立体構造上抗原として露出

され難く, “inaccessible” であるが^{18,19)}, この部位の構造が保たれていれば fragment の状態でも反応しないものと推定される. BJP や遊離 PL は, monomer であれ, dimer であれ, その分子構造の上ではこの部位が抗原として “accessible” であると推測されるゆえ, A-FL の hidden antigenic determinant に対する活性もこの部位にある可能性が考えられる.

次に個々の BJP に対する抗血清の反応性をみると, A-F κ_n は個々の BJP κ と反応し一方, A-F λ_n は BJP λ と反応してそれぞれ型特異性を示す.

また, そのいずれもが autologous BJP と最もよく反応する傾向があるが, heterologous BJP に対してはその多数と反応する broad spectrum の抗血清と, 反応の狭い narrow spectrum の抗血清が認められた. A-F κ_1 , A-F κ_5 , A-F λ_1 , A-F λ_2 などは broad spectrum であり, A-F κ_4 は autologous BJP κ_4 とのみしか反応せず narrow spectrum であった. また各種 BJP を混合して作った A-F κ_t , あるいは A-F λ_t は broad spectrum を示した. 一方, A-FPL は検索した限りの BJP とすべて反応して broad spectrum の抗血清と見なすことができた. したがって多種類の L 鎖との間に反応を吟味して, 出来るだけ broad spectrum の抗血清を選択し, 遊離 L 鎖の測定に応用すべきことをあらためて確認した. この臨床応用については引続き須藤が後報の予定である.

次に hidden antigenic determinant の局在について BJP を C_L および V_L に分解して検討を進めたが, まずその分解について考察を加える.

pepsin, trypsin および papain を用いて種々の分解条件を検討したが, 前述のごとく, 常に V_L および C_L に分解される一定の条件は得られなかった. 8種類の BJP についての分解成績では, 明らかに IEP の上で V_L および C_L 両 fragment の分解が確認できたのは1種のみで, V_L あるいは C_L のいずれかを得たものは5種, 他の2種は分解を確め得なかった. つまり BJP κ については, V κ_2 , V κ_4 , C κ_3 および C κ_5 が, BJP λ については C λ_1 , V λ_1 および C λ_2 の7種の fragment が確認された.

BJP の C_L および V_L への分解は諸家により試みられているがその方法はまちまちで, Solomon and McLaughlin¹¹⁾ は pepsin 分解を施している. 今回もそれと同一条件で分解を試みたが, 使用した BJP はいずれについても満足な結果を示さなかった. (この点については Solomon 自身もごく一部の BJP についてのみ分解が可能であったと私信で述べている.) 一方 Karlsson ら¹³⁾, Seon ら¹⁵⁾ の報告でも酵素/BJP 比, 緩衝液, pH, 温度を変えて分解を試みているが, BJP の試料ごとに成績が異なり, 一定の成績

は得られていない.

Seon ら¹⁵⁾ は 37°C では V_L が得やすく, 55°C ではその反対に C_L が安定して得られるというが, 同様の成績が BJP λ_1 について観察された. しかし, Karlsson ら¹⁴⁾ は pepsin では C_L のみが, trypsin では V_L が得られると述べているが, 今回の結果からすればその点には賛同し難い.

一般に κ 鎖は mild な条件で分解されるが, λ 鎖は endopeptidase に対して抵抗性を示し, 前処置として還元・アルキル化が必要であるとされる^{11,12,13)}. 著者らも本実験では, λ 鎖は κ 鎖に比較して高い酵素濃度において長時間の分解を要することを認めた. さらに生成された V_L および C_L のうち V_L が endopeptidase に対して安定であるという点にも問題がある. BJP がこのように酵素分解に対して多様な態度を示す原因としては, その C_L と V_L domain 間の switch 部の複雑な立体構造の特徴^{11,12,13,14)} によって, 個々の BJP ごとに酵素に対する被分解作用に差異を生ずるためと考えられる.

次に hidden antigenic determinant の局在の問題について考察するが, これを V_L および C_L fragment という観点からみた研究にはなお接しない.

ただ McLaughlin and Solomon²⁰⁾ はある種の A- κ を特定の BJP で吸収すると, intact κ との反応が消えてその C_L に対する反応が残ることを認め, hidden antigenic site が C_L にあると述べているが, しかしこの場合の抗原基に対する考えを今回得られた成績の上に同様にあてはめるわけにはいくまい.

今回の観察においては, A-F κ_n の反応は autologous BJP κ の V_L あるいは C_L に対して認められ, heterologous BJP κ の fragment に対しては反応しなかった. つまり autologous BJP κ との反応からは hidden antigenic determinant は V_L および C_L の両者に関連しているような印象をうけるが, この場合には idiotypic な反応要素の影響を考慮しなければならない. それゆえ hidden antigenic determinant については A-F κ_n の heterologous BJP κ と, その V_L および C_L との反応を検討する必要があるろう. しかし今回の成績で A-F κ_n の intact heterologous BJP への反応性は, C_L および V_L への分解により失われて, いずれの fragment との関連性も同定し得なかった. ただ今回は IEP レベルでの検索ゆえ, 微弱な反応を見逃している可能性があるが, 検索し得た限りのすべての intact BJP と反応する A-FPL についてみると特徴的で, C κ の2種と沈降線の形成を認めた. これは V κ の2種とは反応せず, この A-FPL に関する限り hidden antigenic determinant は C κ 上にあること

が推測された。

一方、A-F λ_n についてみると、A-F λ_1 が autologous な C λ_1 および V λ_1 と同時に heterologous な C λ_2 とも反応し、A-F λ_2 は autologous C λ_2 とのみ反応したが、A-FPL による反応は C κ に対するようには認められず、ただ A-F λ_1 の反応から hidden antigenic determinant が C λ 上にあることがうかがわれるに過ぎなかった。

全般的にみると、A-F κ_n も A-F λ_n も heterologous BJP との反応性は、C_L および V_L に分解するとほとんど IEP レベルでの反応が失われ、A-F κ_n および A-F λ_n の抗体活性により把握される hidden antigenic determinant の発現には BJP が intact であることが重要な条件であるように思われる。ただし A-FPL のようなある種の抗体においては、その活性は C_L に関連していることが示唆された。

V_L は BJP の熱混濁性を示す性質を有する¹¹⁾が、個々の BJP でアミノ酸配列が異なり、この domain には hypervariable region があって^{16,17)}、V_H に相補的に働いて抗体活性の発現に参与する。しかし V_L の構造が個々に異なると言っても全く異なっているわけではなく、類似性の上で群特異性 (group specificity) が区別され¹⁶⁾、V κ は 4 群に、V λ は 5 群に分類できるという。A-FL の反応性が broad で多数の heterologous BJP に及ぶ hidden antigenic determinant によるとすれば、V_L domain については少なくとも群特異性が、それ以上の共通性がなければならぬ。しかし、今回の観察からはこの点に考慮を走せるだけの結果は得られなかった。

C_L は同型の BJP 間では、 κ では Inv 遺伝型、 λ では 2, 3 の isotype 発現部位を除いてアミノ酸配列がほとんど一致している¹⁶⁾。C_L が BJP 間で共通であるとすれば、今回の観察において A-F κ_n および A-F λ_n が heterologous C_L ともっと広く反応してもよさそうに思われた。しかし、 κ および λ の型特異性は酵素分解により減弱することや、Inv 型活性や isotype 特異性等 C_L にそれらの局在がある抗原活性が分解により失われる^{12,21)}ことが知られている。このように L 鎖上の諸種の抗原性の発現には C_L・V_L 間の switch region に相当する高次構造が重要であることが報告^{11,12,13)}されている。また Solomon ら¹²⁾は A- λ が autologous の系でさえも C λ と反応しない場合がみられ、 λ 鎖の抗原性が κ 鎖に比較して立体構造に強く依存 (conformational dependency) していると考えている。このことより、今回 A-FPL が C κ とは反応するが、C λ とは反応しなかった点が説明出来るかもしれない。

またさきにも触れたが、Nachman and Engle¹⁸⁾ およ

び Epstein ら¹⁹⁾の指摘のように C_L-CH₁ 結合部位の関与の可能性については、Solomon¹²⁾の還元・アルキル化による L 鎖の分解および再結合の研究からみて否定できない。今回の成績からすれば、L 鎖のこの部位の構造は蛋白分解酵素の影響をうけていると考えられ、これらの点に関しては今後の追究が必要であろう。

いずれにしても、今回の成績においては hidden antigenic determinant の発現には V_L あるいは C_L のいずれかが関与しているのではなく、intact BJP あるいは PL の立体構造が重要な役割を演じていると考えることが妥当と思われた。

5 結 論

数種の BJP および polyclonal L 鎖より抗遊離 L 鎖血清を作製し、これと反応する L 鎖上の hidden antigenic determinant を検索するため、intact BJP およびそれを酵素分解して V_L, C_L に分け、その局在を検討して次の成績を得た。

(1) A-FL は whole Ig および Ig fragment である Fab, F(ab')₂ のような分子内 L 鎖とは反応せず、遊離 L 鎖とのみ反応する。

(2) 個々の BJP と A-FL_n との反応には抗血清ごとに大きい差がみられ、単独の BJP で作られた抗血清は同型の heterologous BJP とは反応しない場合がある。これに対し polyclonal L 鎖で作製した A-FPL は broad spectrum の抗血清で種々の intact BJP との間によく反応性を示した。したがって本抗血清は遊離 L 鎖の測定に最適と認められた。

(3) BJP を pepsin, trypsin および papain を用いて酵素分解を試みたが、各 BJP によって酵素、酵素/BJP 比、緩衝液、反応温度、および時間等の諸条件が分解態度の上で、それぞれに異なる。分解物もまた V_L と C_L が得られる場合、V_L または C_L のいずれか一方である場合、両者を全く認めない場合等まちまちで、一定しない。

(4) A-FL により hidden antigenic determinant として認識される抗原性の発現には、L 鎖の分子全体の高次構造が密接に関連しているものと推測した。その局在は C_L あるいは V_L 上にあるとは決定し得ないにしても、ある種の抗血清においてはその活性が C_L に関連していることを推測させる成績が得られた。

(本研究は北海道老年医学研究振興会からの補助により行われた。)

文 献

1. 赤保内良和: Dys- および Paraproteinemia 病態に

- おける免疫 Globulin L 鎖 polypeptide の代謝に関する研究. 札幌医誌 **38**, 149-162 (1970).
2. Wochner, R. D., Strober, W. and Waldmann, T. A.: The role of the kidney in the catabolism of Bence Jones proteins and immunoglobulin fragments. *J. Exp. Med.* **126**, 207-221 (1967).
 3. Waldmann, T. A., Strober, W. and Mogielnicki, R. P.: The renal handling of low molecular weight proteins. II. Disorders of serum protein catabolism in patients with tubular proteinuria, the nephrotic syndrome, or uremia. *J. Clin. Invest.* **51**, 2162-2174 (1972).
 4. Dammacco, F. and Waldenström, J.: Bence Jones proteinuria in benign monoclonal gammopathies. *Acta Med. Scand.* **184**, 403-409 (1968).
 5. Dammacco, F. and Waldenström, J.: Serum and urine light chain levels in benign monoclonal gammopathies, multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia. *Clin. Exp. Immunol.* **3**, 911-921 (1968).
 6. Lindström, F. D., Williams, R. C. Jr. and Theologides, A.: Urinary immunoglobulins in patients with cancer. *Scand. J. Haemat.* **7**, 383-388 (1970).
 7. Lindström, F. D., Williams, R. C. Jr. and Theologides, A.: Urinary light chain excretion in leukemia and lymphoma. *Clin. Exp. Immunol.* **5**, 83-90 (1969).
 8. 赤保内良和, 谷内 昭: 免疫グロブリン遊離 L 鎖の測定法単純放射状免疫拡散法 (Mancini). 日本免疫学会編: 免疫実験操作法 II, 393-398 (1972).
 9. 谷内 昭, 赤保内良和, 坂本真一, 武田武雄, 森 道夫: 高 Ig E 血症を伴った免疫グロブリンフラグメント病の 1 例. *臨床血液* **15**, 1238-1247 (1974).
 10. Bernier, G. M. and Putnam, F. W.: Polymerism, polymorphism and impurities in Bence-Jones proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 295-308 (1964).
 11. Solomon, A. and McLaughlin, C. L.: Bence-Jones proteins and light chains of immunoglobulins. I. Formation and characterization of amino-terminal (variable) and carboxyl-terminal (constant) halves. *J. Biol. Chem.* **244**, 3393-3404 (1969).
 12. Solomon, A.: Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. XIV Conformational dependency and molecular localization of the kappa (κ) and lambda (λ) antigenic determinants. *Scand. J. Immunol.* **5**, 685-695 (1976).
 13. Karlsson, F. A., Peterson, P. A. and Berggård, I.: Properties of halves of immunoglobulin light chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **64**, 1257-1263 (1969).
 14. Karlsson, F. A., Peterson, P. A. and Berggård, I.: A structural feature of human immunoglobulin light chains: Two compact domains connected by a small switch region. *J. Biol. Chem.* **247**, 1065-1073 (1972).
 15. Seon, B-K., Roholt, O. A. and Pressman, D.: Differences in the enzymatic digestibility of the variable and constant halves of Bence-Jones protein with temperature. *J. Biol. Chem.* **247**, 2151-2155 (1972).
 16. Solomon, A.: Medical progress—Bence-Jones proteins and light chains of immunoglobulins (First of two parts). *New Eng. J. Med.* **294**, 17-23 (1976).
 17. Solomon, A.: Medical progress—Bence-Jones proteins and light chains of immunoglobulins (Second of two parts). *New Eng. J. Med.* **294**, 91-98 (1976).
 18. Nachman, R. L. and Engle, R. L.: Gamma globulin: Unmasking of hidden antigenic sites on light chains. *Science* **145**, 167-168 (1964).
 19. Epstein, W. V., Tan, M. and Gross, D.: Blocked antigenic sites on the L-chain of human gamma-globulin. *Nature* **202**, 1175-1177 (1964).
 20. McLaughlin, C. L. and Solomon, A.: A hidden antigenic site localized to the constant region of light chains of immunoglobulins. *Science* **179**, 580-582 (1973).
 21. Solomon, A., McLaughlin, C. L. and Steinberg, A. G.: Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins-III Inv antigenicity: A genetic expression with serologic dependency on the intact kappa chain molecule. *Immunochemistry* **7**, 709-713 (1970).