

Toxoplasma 膜抗原について : Monoclonal 抗体による精製

飯 田 孝 田 中 建 志 伊 勢 や よ い
佐 藤 功 栄 鈴 木 貴 和 嶋 田 孝 吉

(昭和57年12月3日 受領)

Key words: *Toxoplasma gondii*, a component of membrane, monoclonal antibody, FITC conjugation

はじめに

Toxoplasma (以下 TP) の膜に関する情報は, TP 感染初期の抗体検索 (Karim and Ludlam, 1975; 伊勢ら, 1981) や, TP の感染および, その防禦等の研究に不可欠のものであるが, TP 膜の精製が難しく, その分析が遅れているために, 未だ不十分で不明な点が多い。

近年, myeloma 細胞と抗体産生細胞を融合させた, いわゆる hybridoma 細胞から monoclonal 抗体を得る方法が発達し, 特異性の高い抗体が得られるようになって, 従来困難であった生体膜等の成分の分離・解析が容易になった。この手法を用いて, Remington 一派は, TP 成分に対する数種の monoclonal 抗体を作成し, その抗体の諸性質を報告した (Handman and Remington, 1980; Araujo *et al.*, 1980; Hauser and Remington, 1981)。

今回われわれは, TP 膜に対する monoclonal 抗体を作成し, これを用いて対応する TP 抗原を精製し, この抗原について解析を行なったので報告する。

材料と方法

A monoclonal 抗体の作成

1) 抗原の感作と脾臓細胞の調整: マウス (ddy) に TP 虫体 (Beverley 株) を接種して, その脳内に出来た Cyst 5~6 コを, BALB/c マウス (8 週齢) に経口感染した。投与後 5 週目のマウス脾臓細胞を無血清培地 (RPMI-1,640 培地) で洗浄したのち, 冷 0.17M-塩化アンモニウムで 10 分間低張処理した。この際マウスから採血

し, 分離した血清を I- 抗体とした。

2) myeloma 細胞: P3 (MOPC-21株) の変異株である P₃-X63-Ag8 を使用した。

3) 培地: 基礎培地には, RPMI-1,640 培地 (Gibco 社 U.S.A) を, HAT 培地は Hypoxanthine 136mg/l, Aminopterin 44 mg/l, Thimidine 72.6mg/l を基礎培地に溶かしたものを 10 倍濃度溶液として用いた。培養時には 10 倍 HAT を 1 容, RPMI-1,640 を 6 容, Calf-serum 2 容, NCTC 109 培地を 1 容の割合で混合し, 用いた。

4) 融合: 感染マウス脾臓細胞 1×10^8 コと myeloma 細胞 2×10^7 コを混合し, 30% PEG-1,000 (Merck 社ドイツ) を 0.2ml 加え 8 分間室温で反応した。

5) 抗体の検出: 後述の M- 抗原を RIA 用マイクロプレート (Corstar 社 USA) に付着させ radioimmuno assay 法で hybridoma 細胞の抗体産生の有無を調べた。

6) Cloning: 2% メチルセルロースを用い, カピラリーピペットによる吊出し法で hybridoma 細胞を採取し, 細胞が増殖した時点で上澄液中の抗体を測定した。抗体を産生している細胞について, 本操作を 4 回繰り返した。

7) マウス腹腔での hybridoma 細胞の培養: Pristane (2, 6, 10, 14-tetramethyl pentadecane) を, 初回と 8 日目にそれぞれ, 0.25ml ずつマウス腹腔に注射し, 最終注射日の 2 日後, hybridoma 細胞を $1 \sim 2 \times 10^7$ コマウス腹腔に接種した。約 7~14 日の間に産生された抗体を B-201 抗体として, 種々の検査をした。

B. 粗抗原の調整

TP 原虫を低張処理したあと, 10 G 万の遠心で得た上澄を細胞質抗原 (C- 抗原) とした。さらに沈渣をトラ

財団法人 東京都臨床医学総合研究所 (生体防衛)

イトン×-100存在下でフレンチプレスにかけ、10万G遠心で得た上澄を、粗膜抗原(M-抗原)とした(有滝ら1981)。

C. TP細胞質内抗体(C-抗体)の作成

8週齢のマウス(ddY)に、C-抗原をアジュバントとともに、マウス臀筋および皮下に200 μ g/0.2ml接種した。追加免疫は2週間隔で3回行ない初回接種より90日目の血清を使用した。

D. monoclonal抗体の測定

1) 間接赤血球凝集試験: TP虫体を低張処理し、10万Gの遠心で得た上澄(C-抗原)を用いる医科研法(常松, 1963)に従って、マイクロタイター法で行なった。

2) ラテックス凝集試験: M-抗原を用いる坪田・小沢(1977)の方法に従ってマイクロタイター法で行なった。

3) Dye test: Sabin and Feldman(1948)をマイクロタイター法に改良したPedersen(1979)の方法で行なった。

E. TP膜抗原の精製

Protein Aのアフィニティーカラム1.0ml(ファルマシア社, スウェーデン)でB-201抗体を含むマウス腹水中のIgGを分離精製し、得られたIgG抗体10mgをCN-Brで活性化したsepharose-4B 1mlに吸着させ、抗原精製用のアフィニティーカラムを作製した。このカラムに前述したM-抗原を充分量流したあと、20%ショ糖液で洗い、非特異的に吸着したIgGを除き、さらにPBSでよく洗浄した。この抗原の溶出にはpH 2.5の0.1M-酢酸緩衝液を使用した。この一連の操作を2回繰り返し、精製した抗原をB-201抗原とした。

F. スラブ電気泳動によるTP抗原の分離と、セルロース・ナイトレイトへの転写

SDSスラブ電気泳動はLaemmli(1970)の方法で行ない、ゲル中の分離抗原バンドを、Bittner *et al.*(1980)の方法に従って、セルロース・ナイトレイト膜上に転写した。なを、ゲル中の蛋白の染色には、Coomassie blueを使い、セルロースナイトレイト膜上の蛋白の染色にはAmido blackを用いた。また、セルロース・ナイトレイト膜上に転写した抗原は、感染マウス抗体と反応させたのち、後述のFITCを標識したウサギ・抗マウスr-globulin抗体を反応させ、抗原バンドと反応したマウス抗TP抗体の存在を、紫外線照射装置(ミツミ社Type SJ-1031)を用いて観察した。このSDS分離抗原のニトロセルロース膜転写蛍光抗体法を以後、転写膜蛍光抗体法と略す。

1) immunoabsorbentによるFITCの標識:

ウサギ・抗マウスr-globulin抗体へのFITCの標識は、活性化したSephrose 4Bにマウスr-globulin分画を結合させたアフィニティーカラム(以下AF-カラム)で行なった。AF-カラムは使用前20%ショ糖と、pH 2.5のグリシン塩酸緩衝液で非特異吸着物質を予め除去した。このAF-カラムにウサギの抗マウスr-globulinを結合させたあと、0.05M-炭酸緩衝液(pH 9.5)で置換した。次に、マウスIgG 1mg当り25~30 μ gのFITCをAF-カラム容積の1.5倍の量の炭酸緩衝液(pH 9.5)に溶解し、このFITCでAF-カラム内を置換した。一部空気を残して密封したAF-カラムは、約4時間、しずかに転倒混和した。反応終了後に1M-MgCl₂で非特異吸着物質を除去するとともに、PBSでAF-カラム内をよく洗った。溶出には0.2Mグリシン塩酸緩衝液pH 2.5を使い、溶出した標識抗体は氷冷し、ただちに1M-トリス塩酸緩衝液pH 8.5で中和した。この方法で得た標識抗体はF/P比が3~4と、やや高いが、抗原との反応部位であるFabがFITCでブロックされないため、非特異反応が従来の方法に比べて少なく、染まり方が良好であった。また、F/P比が高いため、かなり希釈しても検出感度が低下しないなど、利点の多いことが判った。

G. 等電点電気泳動

O' Farrel(1975)の方法をマイクロ化した三川(1981)の方法で分離し、蛋白の検出は、感度の高いSwitzerら(1979)の銀染色法を利用した。

H. 抗原のアミノ酸分析

共沸塩酸でB-201抗原を加水分解したのち日立のアミノ酸分析計835形で分析した。

結 果

抗体と対応する抗原を分析するのに、ポリアクリルアミドゲルで分離した抗原では不向きなため、これを抗体と反応させ易いセルロース・ナイトレイト膜に転写し、のちに、蛍光抗体法を用いて、作成した抗体との反応を調べた。

TP虫体は、マウス腹腔から採取後CF-11カラム(Tanabe, 1978)を通して、混在しているほとんどのマクロファージ(M ϕ)を除いたが、それでも調整したTP抗原(M-抗原, C-抗原)には、少量のM ϕ と赤血球の混入していることが考えられた。そこで、SDS-PAGEでC-抗原とM-抗原を分離したところ20万分子量付近のバンドが赤血球の分離バンドと一致したため、その混入を

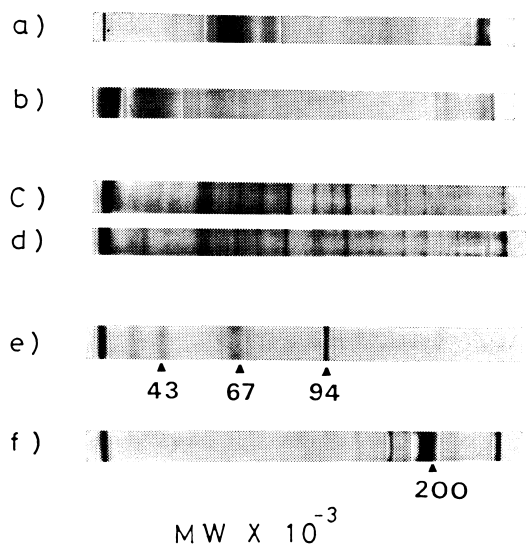


Fig. 1 Patterns of *Toxoplasma* antigens on 7.5 % gel by SDS-PAGE. a) mouse macrophage and b) mouse red blood cell, c) cytoplasmic antigens and d) membrane antigens of *Toxoplasma*, and in e) and f) myosin (200,000), phosphorylase A (94,000), bovine serum albumin (67,000), and ovalbumin (43,000) were used as markers.

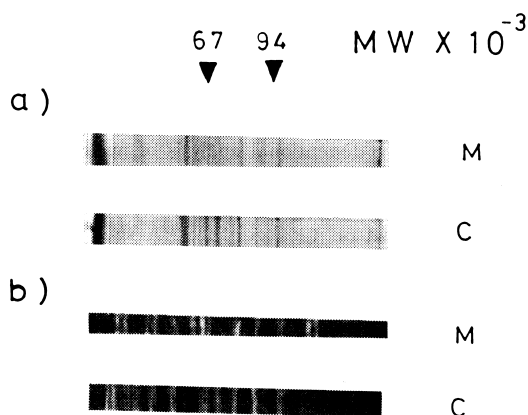


Fig. 2 Analysis of membrane and cytoplasmic constituents a) and antigenic components b). After SDS-PAGE the separated components were transferred from the gel to cellulose-nitrate membrane. The detection of antigenic components were performed with antiserum obtained from mice infected with *Toxoplasma* by immunofluorescent technique. Bands were stained with Amido-Black a) M: membrane antigens, C: cytoplasmic antigens.

否定できなかったが、それ以外の TP 虫体成分では、Mφ と赤血球の混入は考えられなかった (Fig. 1). 一方、Mφ と赤血球の分離バンドについて、転写膜蛍光抗体法を行なったところ、I-抗体は全く反応しなかった。

セルロース・ナイトレイト膜への TP 抗原分離バンドの転写と蛍光抗体法: M-抗原画分と C-抗原画分を 7.5 % アクリルアミドゲルで分離したあと、セルロース・ナイトレイト膜上に、それぞれの抗原バンドを転写したところ、ゲル中に認められた数多くの抗原バンドの内、太いバンドはゲル中に、かすかに残ったが、セルロース・ナイトレイト膜上には、いずれのバンドも鮮明に転写された。分離した M と C の各抗原画分には互いに共通するバンドが数多く見られ、分子量 5 万~10 万の間には太いバンドが 5~6 本も認められた。

また、転写された抗原に感染マウス抗体 (I-抗体) を反応させたのち、蛍光抗体法で反応した抗体の検出を行なったところ (Fig. 2), C-抗原中で I-抗体と反応したバンドは 11 本あり、M-抗原では 13 本のバンドが反応した。このうち C-抗原と M-抗原に共通して反応したバンドは 8 本あった。M-抗原にのみ認められた分子量 20 万と 6.7 万付近のバンドと、M-抗原、C-抗原のいずれにも存在した分子量 10 万と約 7.5 万の太く濃いバンドは、TP 抗原の分離をする上で、よい指標となった。

TP 膜抗原に対する monoclonal 抗体 (B-201 抗体) の生物活性: 作成した monoclonal 抗体 (B-201) のサブクラスは、ヤギ抗マウス血清 (Chapel 社 USA) を用いてウクタロニー法を行ない IgG2b であることが判った。また、抗体活性は、間接赤血球凝集試験では陰性、ラテックス凝集試験で 32~512 倍まで陽性で、Dye test は 16,000 倍を示した。

TP 虫体における B-201 抗体の分布状態 (蛍光抗体法による検索): TP 原虫はマウス腹腔から採取したあと、冷 PBS で 3 回洗浄し、これをスライドガラスの上に乾燥固定して、0.1% Nonidet P-40 で 20 分間処理したのち、2% paraformaldehyd (以下 PFA) で固定したものと (以下 NP-TP) と、0.01% trypsin で処理したあと 2% PFA で固定したものと (以下 Try-TP) の 2 種を用いた。Try-TP には B-201 抗体が虫体の周辺によく結合したが (Fig. 3) NP-TP には、この抗体は全く結合しなかった。一方、虫体を低張処理して得た C-抗原で作ったマウスの抗体では、逆に Try-TP は染色されず NP-TP に FITC がよく結合していた。以上のことから、hybridoma で作った抗体 B-201 に対応する抗原は、主に虫体の膜に存在し、NP-40 による処理で容易

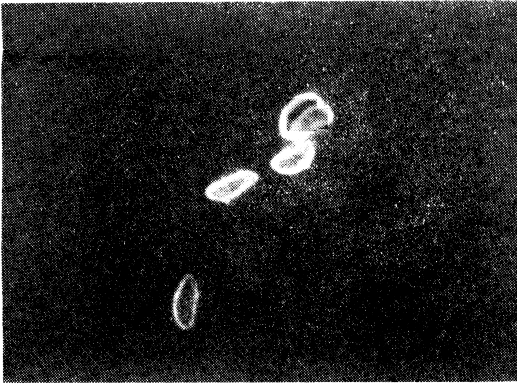


Fig. 3 *Toxoplasma* stained with FITC-conjugated monoclonal antibody (B-201), showing fluorescence on the membranes of the tachyzoites.

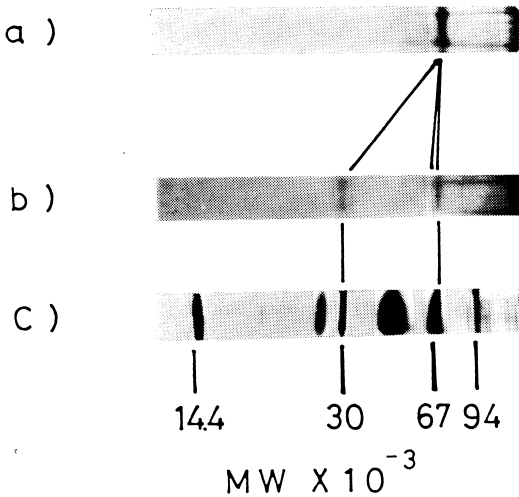


Fig. 4 Analysis of a purified *Toxoplasma* membrane on 13% gel by SDS-PAGE; a) in the absence of 2-ME, b) in the presence of 2-ME and c) in the markers. Protein bands stained with silver-stain are highly effective for the detection.

に溶出または、変性する抗原であることが示唆された。

B-201 抗体に対応する抗原 (B-201 抗原) の分析: 抗体を用いた AF- カラムで精製した B-201 抗体は SDS-PAGE および等電点電気泳動などを行ない、その物理化学的性質を調べた。

SDS-PAGE による B-201 抗原の分子量の決定: B-201 抗原をβ-メルカプトエタノール (2-ME) の存在下で13%ゲルによる SDS-PAGE で6.7万、約6万と3万

にバンドを形成した (Fig. 4b). 一方、2ME抜きで泳動すると、6万と3万のバンドが消失した (Fig. 4a).

等電点の決定: B-201 抗原の等電点電気泳動は、ヘマトクリット管を利用し、微量法で行なった。9M- 尿素を主体とする調整溶液に、B-201 抗原を溶解し、泳動後に13%ポリアクリルアミドゲルで2次元展開したのが Fig. 5 である。分子量6.7万、PI約6.2に1つのスポットを形成した。

吸光測定: Beckman のスペクトロフォトメーター ACTA C-111 で B-201 抗原の紫外部の吸収スペクトラムを測定した。コントロールとして用いた M- 抗原で

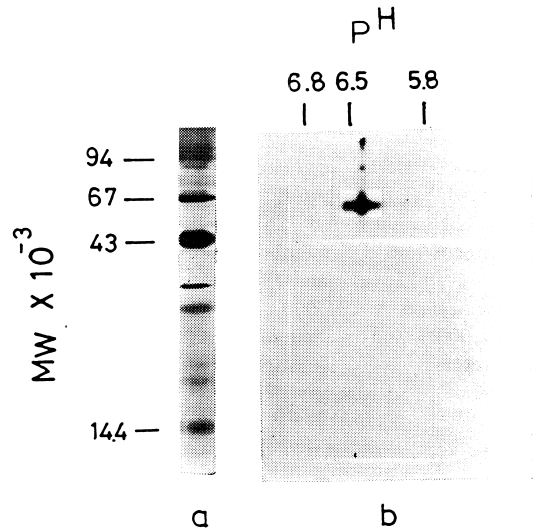


Fig. 5 Two-dimensional analysis of purified *Toxoplasma* membrane antigens. The electrophoresis was carried out with isoelectrofocusing (pH 5-8) followed on 13% gel SDS-PAGE.

Table 1 Amino acid composition of B-201 antigen (from *Toxoplasma* membrane).

Amino acid	mol/mol*	Amino acid	mol/mol*
Asp	62.9	Ile	16.2
Thr	37.9	Leu	35.2
Ser	88.6	Tyr	12.1
Glu	81.2	Phe	16.2
Gly	144.2	Lys	23.0
Ala	44.6	His	27.7
Val	27.7	Arg	21.6
Met	3.9	Pro	28.4

* residues per 67,000.

は 260nm に吸収極大があり、核酸などの混入が考えられたが、B-201 抗原では、273nm に吸収極大があり、255nm に吸収の谷が認められ、蛋白であることが示唆された。

アミノ酸分析：B-201 を共沸塩酸で24時間と72時間に分けて加水分解した試料を、日立のアミノ酸分析計 835 形にかけ、得られた結果を Table-1 に示した。特に、グリシン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸などの酸性アミノ酸が多く、メチオニン、チロシン、フェニルアラニン、イソロイシンが、きわめて少なかった。

考 察

TP 抗原の中でも膜成分に関する研究は、端緒にあり、その情報は未だ少なく、不明な点が多い。そこで今回われわれは、膜成分に反応する monoclonal 抗体を作成し、それを使って TP 抗原の精製を行ない、生物学的、および物理学的諸性質を検討した。

TP 膜抗原 (M-抗原) は SDS-PAGE で多数のバンドを形成する、しかし、抗体に反応する抗原の分析を行なうには、ポリアクリルアミドゲルで分離した抗原では困難なため、この抗原バンドを抗体と反応させやすいセルロース・ナイトレイト膜に転写する方法により行なつた。SDS-PAGE で分離したすべての抗原バンドは、効率よくセルロース・ナイトレイト膜上に転写された。転写されたバンドは抗 TP 抗体を反応させた上、FITC ラベル抗マウス抗体による蛍光抗体法で感度よく抗 TP 抗体に対応する抗原を検出した。この転写膜蛍光抗体法で TP 感染マウス抗体 (I-抗体) と反応した M-抗原バンドは13本あり、この内 8本は C-抗原中にもあることが判つた。M-抗原に特異的に存在する抗原バンドのうち、分子量の大きい20万分子量付近の2本と、6.7万付近にある太いバンドは、TP の膜特異抗原と考えられた。

一方、われわれは、感染マウスの脾臓細胞と myeloma 細胞で作つた hybridoma 細胞から、膜抗原に反応する monoclonal 抗体を作成し、それによつて上記の抗原バンドのうち、分子量6.7万に相当するバンドと反応する抗体を得ることができた。今回 hybridoma の細胞により作成した B-201 抗体は、細胞質内抗原である C-抗原を赤血球に感作した間接赤血球凝集試験では陰性であったが、膜成分を多く含む M-抗原を感作したラテックス凝集試験や Dye test では、強い陽性を示した。さらにこの B-201 抗体は膜に結合することが蛍光抗体法で確かめられた。

monoclonal 抗体 (B-201) は、0.01% トリプシン処理後に PFA 固定した虫体の膜に結合し、NP-40 処理した虫体には結合しなかつた。一方、細胞質内成分に対する抗体は、PFA 固定した虫体には結合せず、NP-40 処理した虫体の主に核に相当する部分に結合した。したがつて、B-201 抗体に対応する抗原は、トリプシンには比較的安定であるが、NP-40 では溶出されるか、あるいは、抗原性を失う蛋白で、膜に多く分布するが、細胞質内には無いか、有つても極少量であることが考えられた。

この monoclonal 抗体 B-201 は Beverley 株接種マウスの脾臓から得た細胞で作つたものであるが、この抗体は RH 株の虫体膜にも結合することが蛍光抗体法で確認された。このことは、Beverley, RH の両虫体に B-201 抗原が共通して存在していることを示唆している。

monoclonal 抗体 B-201 での AF カラムにより精製した膜抗原 (B-201 抗原) は、SDS-PAGE で 6.7 万の分子量を持ち、2ME 存在下で比較的安定であるが、一部、3 万の分子量をもつポリペプチド鎖を形成した。等電点電気泳動では PI 6.2 で高度に精製された、やや酸性側の蛋白であることが明らかになつた。Tomita and Marchesi V. T (1975) は人赤血球膜の glycophorin をアミノ酸分析すると、スレオニン、セリンが多く、これらのアミノ酸の側鎖は、Oligosaccharide と結合していることを報告した。B-201 抗原のアミノ酸分析でセリンが多く含まれていたことから、この抗原には糖鎖が存在していることが示唆された。また分析の結果、B-201 抗原に多く存在していたグルタミン酸、アスパラギン酸は、等電点電気泳動で PI が 6.2 であつたことから考えると、グルタミン、アスパラギンがその主体であると考えられた。

ま と め

トキソプラズマ感染マウスからの抗体に対応する抗原を検出するため、TP 膜抗原を SDS-PAGE で分離し、そのバンドをセルロース・ナイトレイト膜に転写した。これを用いて抗体に反応する抗原を蛍光抗体法で確認した上で、TP 膜抗原に対する monoclonal 抗体を作成し、これにより、TP 膜抗原を精製した。

この方法で分離された抗原は、2-ME 存在下で SDS-PAGE をしたところ、6.7 万、約 6 万と 3 万に計 3 本のバンドを形成し、転写膜蛍光抗体法から、いずれのバンドも感染抗体と反応することが明らかになつた。また、この抗原は 2-ME 非存在下では、6 万と 3 万バンドが消

失した。

謝 辞

本研究に対し、助言と援助を載いた当研究所、町田篤彦、飯塚久雄両博士と大室弘美先生に深謝致します。

文 献

- 1) Araujo, F. G., Handman, E. and Remington, J. S. (1980): Use of monoclonal antibodies to detect antigens of *Toxoplasma gondii* in serum and other body fluids. *Infect. Immun.*, 1, 30, 12-16.
- 2) 有滝千恵子・伊勢やよい・飯田 孝・佐藤功栄・鈴木貴和・嶋田孝吉 (1981): トキソプラズマ虫体膜の抗原成分について. *寄生虫誌*, 30, 557-562.
- 3) Bittner, M., Kupferer, P. and Morvis, C. F. (1980): Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acid from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose sheets. *Anal. Biochem.*, 1, 102, 459-471.
- 4) Hauser, W. E. JR. and Remington, J. S. (1981): Effect of monoclonal antibodies on phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Infect. Immun.*, 2, 32, 637-640.
- 5) Handman, E. and Remington, J. S. (1980): Serological and immunochemical characterization of monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Immunology*, 40, 579-588.
- 6) 伊勢やよい・有滝千恵子・飯田 孝・佐藤功栄・鈴木貴和・嶋田孝吉 (1981): 妊婦のトキソプラズマ感染と児への影響. *寄生虫誌*, 30, 563-570.
- 7) Karim, K. A. and Ludlam, G. B (1975): The relationship and significance of antibody titers as determined by various serological methods in glandular and ocular *Toxoplasmosis*. *J. Clin. Path.*, 28, 42-49.
- 8) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680-685.
- 9) 三川 隆 (1981): 手軽なマイクロ 2次元電気泳動と高感度蛋白染色法 (微量蛋白分析のために). *生体の科学*, 32(1), 74-78.
- 10) O' Farrell, P. H. (1975): High Resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 4007-4021.
- 11) Pedersen, B. S and Styr, A. M. L. (1979): The prevalence of *Toxoplasma* antibodies among 11736 pregnant women in Norway. *Scand. J. Infect. Dis.*, 11, 159-165.
- 12) Sabin, A. B. and Feldman, H. A (1948): Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science.*, 108, 660-663.
- 13) Switzer, R. C., Merril, C. R., and Shifrin, S. (1979): A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 98, 231-237.
- 14) Tanabe, K., Kimata, I., Tabuse, Y., Furusawa, M. and Takada, S. (1978): *Toxoplasma gondii* penetration into differentiating friend erythroleukemia cells. *Exp. Parasitol.*, 46, 72-82.
- 15) 坪田宣之・小沢 光 (1977a): トキソプラズマラテックス凝集反応に関する研究 (第1報), マイクロタイター用試薬の調整条件と安定性. *寄生虫誌*, 26, 276-285.
- 16) 常松之典 (1963): *Toxoplasma* 症の診断について. *モダンメディア*, 9, 443-449.
- 17) Tomita, M. and Marchesi, V. T. (1975): Amino-acid sequence and oligosaccharide attachment sites of human erythrocyte glycoporphin. *Proc. Nat: Acad. Sci. USA.*, 72(8), 2964-2968.

Abstract

THE PURIFICATION OF *TOXOPLASMA* MEMBRANE ANTIGEN
BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY WITH
MONOCLONAL ANTIBODY

TAKASHI IIDA, TAKESHI TANAKA, YAYOI ISE, KOEI SATO,
TAKAKAZU SUZUKI AND KOHKICHI SHIMADA
(*Department of Biophylaxis, Tokyo Metropolitan Institute Medical
Science, Tokyo, Japan*)

A monoclonal antibody against one of *Toxoplasma* membrane antigens was obtained by hybridoma technique and then an antigen of *Toxoplasma* membrane was purified through an affinity column with the antibody. The detection of antigens with antisera from mice infected with *Toxoplasma* parasites were performed by printing the antigen on cellulose-nitrate membrane from polyacrylamide gel followed by fluorescent antibody technique. The antigen is 67,000 in molecular weight, pI 6.2 and distributed on the membrane of *Toxoplasma* organism. Its biological and chemical properties were also studied.