

## ニワトリを用いた抗体の作製法

### I . はじめに

一般に、我々は抗体の調製には、哺乳動物を用いてきた。しかしながら、ある種ホルモンや成長因子といったように、高度に配列が保存され抗原性が低いタンパクに対して抗体作製がままならない事がしばしばあった。さらに、ウサギのタンパクが抗原の場合、ポリクローナル抗体の作製には、大抵の場合大型動物を使用せざる得なく極めて不便であった。その点、鳥類は、爬虫類から枝分れして独自の進化を遂げたために、哺乳類では抗体が得られなかった抗原に対して、特異的抗体産生が可能になる場合があり、筆者らも、ウサギ金属エンドペプチダーゼ (EP-24.16) について、ニワトリを用いて抗体調製を行ったところ、本抗原はラットからヒトまで 90~95%の高い相同性を持つタンパクでありながら、抗体の調製に良好な結果を得ている<sup>1)</sup>。また鳥類の免疫機構は、他の動物種にはない多くの特性をもっており、有用な点が多い。

### II . ニワトリの免疫グロブリンについて

ニワトリの免疫グロブリンには、現在までに IgG、IgM、IgA の3つのグロブリンクラスが存在が確認されている。IgE と IgD については、間接的に存在が示唆されているが同定にはいたっていない。IgG は、大量に卵黄 (Yolk) に含まれ、また、ほ乳類の IgG と共通抗原性がなく、種々の異なる物理化学的性質を持つことから、鳥類では IgY と呼ばれている。

これら IgY、IgM、IgA は、ニワトリ血清中に各々 3.0~7.0mg/ml、1~3mg/ml、0.3~0.6mg/ml 程度存在することが知られている。ところが卵では、IgM、IgA は卵白に局在、卵黄には IgY のみが存在する。これらは親鳥からの移行抗体であり、卵黄の IgY は、血中 IgY が卵巣の上皮を通過して卵母細胞に取り込まれることによって卵黄へ移行し蓄積されている。これに対し卵白では、卵管で産生され卵管粘液中に大量に含まれる IgM、IgA が卵白へ移行したものと考えられている (図1)。これらの免疫グロブリンは、孵化後、卵白中の IgM、IgA は雛の腸管内へ、卵黄中の IgY は雛の血液中に移行し、雛の初期感染防御に重要な役割を果たすことになる。こうして親鳥は獲得免疫を子孫に伝えているわけであるが、このとき卵黄中の IgY 含量はおよそ 10mg/ml と血清よりも高濃度に濃縮蓄積されている。従って、卵性動物である鳥類が持つ特徴的な母子免疫機構を利用すれば、感作したニワトリの卵から、抗原特異的 IgY を、比較的簡単にかつ大量に調製することができる。これは、抗体の精製にあたり、動物にとっても出血を伴わず、負担がなくてよい。

ニワトリ IgY の主な特徴は表1にまとめたが、このほか、プロテイン A、プロテイン G、リウマチ因子、Fc レセプターと結合せず、哺乳類の補体系を活性化しない (C1 の活性化をしない)。このリウマチ様関節炎を初めとして様々な疾患にみられるリウマチ因子は、多くのイムノアッセイにおいて最も主要な障害因子である。従って血液成分を検体とする ELISA などでの IgY 使用は、疑陽性検体の排除の点で有利である。

### III . ニワトリを用いた抗体調製

#### 1 . ニワトリ

品種では抗体産生能が他品種に比べ優れているとされる白色レグホンがよく、卵を産み始めた生後 6 カ月以上の雌鳥を使用する。生後 5 カ月以内では、雌鳥といってもまだ産卵するかしないか不明で、避けることが望ましい。また、感作のストレスで卵を生まなくなる場合もあるので、1 抗原 2 羽以上の感作が好ましい。

#### 2 . ニワトリ飼育上の注意点

過密飼育あるいは高温多湿の環境下では、副腎皮質から大量のコルチコステロン産生がおこり抗体産生が低下する事が知られている。従って、ニワトリにがざった事ではないが、ニワトリのストレスが少ない飼育環境を整えてやるよう心がけたい。

#### 3 . ニワトリの感作

抗原の調製、抗体産生の時間経過とも、ウサギの場合とほぼ同様と考えてよい。アジュバントについても同様である。感作は、トサカを避け翼の裏側に皮下注射にて行なう。ニワトリの足を自分の太ももの間にはさみ、脇から手を入れて翼を左右に広げながら、文字どおり羽交い締めにすると、翼の裏が良く露出し、ニワトリはおとなしくなる。翼の裏側は、羽もまばらで、皮下の筋肉、静脈ともよく発達しているのが観察できる。70%エタノールで消毒してから、筋肉と血管の間に皮下注する。結合組織が未発達なので、試料が多量に入りそうに感じるが、1ヶ所には 0.1 ~ 0.2ml までを限度として、左右に数カ所ずつ注入する方が効率が良い。

#### 4 . 採卵

通常、血清中の IgY 濃度がピークに達してから 3~7 日後に卵黄中の IgY 濃度の上昇がみられるので、最終感作より 10~20 日くらいの卵を採取すると効果的である。一羽あたり毎日 1~2 個の卵を採取できる。

#### 5 . タイターチェック

ほ乳類で行う通常のオクタロニーテストや ELISA などによるチェックで全く差し支えない。

#### 6 . 鶏卵抗体(IgY)の調製

鶏卵の卵黄は大量の脂質 (30%) をリポタンパク質 (LDL、HDL) として含有し、IgY は、リポタンパク質が形成する

卵黄エマルジョン中に混在する。この点から、IgY 精製法は、超遠心分離法、有機溶媒による脱脂法やいくつかのリポタンパク質分離法<sup>2)-4)</sup>などが開発されている。本稿では、簡便で効率が良くとされるデキストラン硫酸ナトリウムによるリポタンパク質分離法<sup>2)</sup>を紹介する。

- 【試薬】
- ・ TBS --- 20mM Tris-HC(pH7.5), 0.15M NaCl, 0.5% NaN<sub>3</sub>
  - ・ 1M CaCl<sub>2</sub> in TBS
  - ・ 10% Dextran sulfate in TBS
  - ・ 硫安

#### 【操作手順】

##### 1. 卵黄の分離

卵を二つに割って、殻の中に卵黄を残して余分な卵白を落とし卵黄と卵白を分離する。卵黄を二つの殻で何度か移してやると効果的に卵白を除去できる。卵黄の容量は、およそ 10~13ml である。

##### 2. 卵黄膜の除去

卵黄を葉さじ等で潰した後、二重にしたガーゼで濾過する。倍量の TBS でガーゼに残った分も流す。ガーゼのかわりに水切りパックなどに使用されている薄いポリプロピレン不織布が便利である。

##### 3. 脂質、リポタンパク質の除去

TBS で 50ml までメスアップし、10%デキストラン硫酸/TBS を 3ml 加え、10 分攪拌する。

1McaCl<sub>2</sub>/TBS を 7.5ml 加え攪拌後、室温で 1 時間静置する。

##### 4. 遠心による IgY 分画の回収

8000rpm で 15 分遠心し、上清を回収する。

<再抽出> IgY の回収が不十分の場合は、沈殿を 50ml の TBS に再懸濁しステップ 3 から繰り返す。

##### 5. 硫安分画

上清に最終濃度 40%になるよう硫安を加え 1 時間以上静置。8000rpm で 15 分遠心し、沈殿を回収。

##### 6. 透析および硫酸カルシウムの除去

沈殿を 10ml の TBS に再懸濁し、TBS にて透析する。

これだけの簡単な操作で、約 80~90%の純度でだいたい卵 1 個あたり 80~120mg の IgY を調製でき、約 1 ヶ月の調製で数グラム単位の抗体の調製が可能となる。タイターが十分に上がっていれば、簡単な免疫組織化学やウエスタンブロットも、このグレードで十分使用に耐えうる。わずかに残った不純物もゲル濾過あるいはイオン交換クロマトで簡単に除去できるので、必要に応じて追加精製を行う。特に、ELISA 等デリケートな実験に使用する場合は、抗原カラムによるクロマトまで行うことが望ましい。また、Fab' fragments の調製<sup>5)</sup>についても哺乳類の場合と変わらず調製できるので、必要のある方は参考文献を参照されたい。

#### IV. おわりに

ニワトリを用いた抗体作製は、ウサギなどでのポリクローナル抗体の作製と比較して難しい点はない。精製に関して、プロテイン A カラムなど使えないという事はあるが、IgY の調製はいたって簡単であり、しかも IgY には哺乳類の抗体にはない様々な利点がある。今後こうした鳥類を利用した抗体の応用が、我々の研究の幅を広げてくれるものと確信している。

#### 謝辞

九州大学理学部の原野友之先生に貴重なご助言を頂きました。深く感謝申し上げます。

#### 文献

- 1) Nakagawa K, Kawabata S, Nakashima Y, Iwanaga S, Sueishi K: Tissue distribution and subcellular localization of rabbit liver metalloendopeptidase. *J Histochem Cytochem* 45: 41-47, 1997.
- 2) Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C: Eggs: conveniently packaged antibodies. *Methods for purification of yolk IgG. J Immunol Methods* 46: 63-68, 1981.
- 3) Hatta H, Kim M, Yamamoto T: A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY": *Agric Biol Chem.* 54: 2531-2535, 1990.
- 4) Polson A: Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunological Investigations* 19: 253-258, 1990.
- 5) Yamanaka HI, Inoue T, Ikeda-Tanaka O: Chicken monoclonal antibody isolated by a phage display system. *J Immunol* 157: 1156-1162, 1996.