

## 【原著・基礎】

## 免疫グロブリン製剤に含まれる IgG2 の好中球オプソニン作用

中江 孝・菊谷 健二・矢田 考治・北村 妙・平尾 豊・藤田 英之

吉富製薬株式会社研究本部大阪研究所\*

(平成9年11月27日受付・平成10年4月6日受理)

ヒト IgG サブクラスは構造的に 4 種類に分類され、機能あるいは抗原への選択性が異なる。*Streptococcus pneumoniae* の臨床分離株ならびにその莢膜多糖体に対するヒト静注用免疫グロブリン製剤 (IVIG) の IgG サブクラス抗体価を酵素抗体法により測定したところ、いずれも IgG2 抗体価が IgG1, IgG3, IgG4 にくらべて高かった。その中でもっとも IgG2 への選択性が高い *S. pneumoniae* SP-23 を用いて、IgG2 のオプソニン作用について検討した。IgG2 とヒト好中球との結合性は Fluorescein isothiocyanate 標識した抗ヒト IgG2 モノクローナル抗体を作用させることで、フローサイトメトリーにより確認され、この結合は抗 Fc $\gamma$ R III モノクローナル抗体により阻害された。さらに球状ピロリン酸マグネシウムカラムを用いたカラムクロマトグラフィにより、IVIG から IgG2 を 4 分の 1 以下に低下させた IgG2 欠乏フラクション (IgG2-D) を調整した。IVIG あるいは IgG2-D の IgG フラクションを *S. pneumoniae* SP-23 と 30 分間、さらに健常人の好中球浮遊液と混合して 1 時間、37 °C で作用させたのちに、好中球内に取り込まれた菌数を光学顕微鏡下で計測した。IgG2-D は IVIG と同 IgG 濃度の比較において好中球へのオプソニン作用が低かった。次に、上記のいずれかの IgG フラクションを *S. pneumoniae* SP-23 と 1 時間作用させた後に、ICR マウスの静脈内に接種して、20 分後の血液中の生菌数を測定した。IgG2-D は IVIG と同 IgG 濃度の比較においてマウス血液中からの菌体の消失に対する作用が低かった。IgG2 は一般的に IgG1 に比べて細胞結合性が低いなど免疫機能との関わりが不明であったが、今回の結果から、*S. pneumoniae* に対する感染防御作用における IgG2 の重要性が示唆された。

**Key words:** 免疫グロブリン製剤, IgG サブクラス, オプソニン作用, 莢膜多糖体, *Streptococcus pneumoniae*

乳幼児期の反復性急性中耳炎と下気道炎は *Streptococcus pneumoniae* や *Haemophilus influenzae* などの莢膜多糖体を持つ細菌を起炎菌とする感染症であり、IgG サブクラスのうち IgG2 の欠乏が原因と考えられる<sup>1,2)</sup>。*S. pneumoniae* は一般的なグラム陽性細菌と同じくペプチドグリカンとテイコ酸を基本構造とする細胞壁を有しているが、この菌種ではその外側に莢膜多糖体が覆っている。この莢膜多糖体は細菌側の免疫機構に対する防御因子、すなわち宿主に対しては病原因子として作用し、補体活性化の第二経路の阻害<sup>3,4)</sup>、古典的補体活性化経路の阻害<sup>5,6)</sup>、貪食作用抵抗性<sup>7,8)</sup>に関与することが報告されている。

IgG は重鎖の構造的な多様性から 4 つのサブクラスに分類することができる。これらの IgG サブクラスはそれぞれ異なった生物学的特性を示し、IgG1 はウイルスや蛋白性毒素、IgG2 は細菌の莢膜などの多糖体、IgG4 はハウスダストに対する特異抗体を多く含むなど抗原の種類によって抗体が特有の IgG サブクラスに偏りを示すことが明らかにされている<sup>9,10)</sup>。このようなサブクラスに対する欠乏症は、そ

れぞれの疾患との因果関係が考えられる。新生児は母親の胎盤を通して免疫グロブリンを受け継いでいるが、1~2 歳までの時期はそれらを合成する能力が未熟であることから血中での値は低く、種々の微生物に対して易感染性を示すことが多い<sup>1)</sup>。このような乳幼児期における感染症は IgG2 欠乏症のような続発性の免疫不全状態を背景にする場合には、抗菌化学療法の施行によりいったん除菌されたのちも反復性に感染を引き起こす例が多い。静注用免疫グロブリン製剤による置換療法はこのような IgG サブクラスの欠乏症を短期間に改善する手段であり、投与直後から各 IgG サブクラスの血中値および細菌への抗体価が上昇<sup>11,12)</sup> することが認められている。

*In vitro* ではオプソニン作用、すなわち抗体が細菌と結合することによる標的細菌の好中球への貪食促進作用は *S. pneumoniae* に対する感染防御の初期段階において中心的役割を示すことが知られる<sup>13,14)</sup>。しかし、IgG2 は IgG1 にくらべると補体結合性や細胞結合性が低く、免疫機構における役割は明確ではない<sup>10)</sup>。そこでわれわれは IgG2 欠乏症に

における免疫グロブリンの細菌感染に対する作用機序を明らかにするために、免疫グロブリン製剤から IgG2 を除いたフラクションを調整して、native な製剤と比較しつつそのオプソニン活性などに対する作用と比較検討した。

## I. 材料と方法

### 1. ヒト免疫グロブリンおよび血清アルブミン

静注用ヒト免疫グロブリン (IVIG) はヴェノグロブリン-IH (ミドリ十字) を用いた。ヒト血清アルブミンは献血アルブミンミドリ, 25 % (ミドリ十字) を用いた。

### 2. 細菌

50%グリセリン中で $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した *S. pneumoniae* および *Escherichia coli* 臨床分離株を用いた。細菌の培養は羊血液寒天培地 (栄研化学) またはブレインハートインフュージョン寒天培地 (Difco Laboratories) を用いた。抗体価の測定に用いる菌株は羊血液寒天培地に接種して培養し、 $4^{\circ}\text{C}$  の 0.5 %ホルマリンで処理して、pH 7.2 に調整した phosphate buffered saline (PBS) に  $10^6$  cells/ml となるように懸濁した。

### 3. 動物

ICR マウス (雄性, 5 週齢) は日本クレアより購入した。

### 4. 使用機器

好中球細胞数のカウントには Coulter MULTISIZER II (Coulter Electronics), フローサイトメトリーによる解析は FACS Calibur (Becton Dickinson) を用いた。光学顕微鏡は OPTIPHOT (ニコン) を用いて 100 倍の倍率において観察した。

### 5. サブクラス抗体価の測定

*S. pneumoniae* に対する IgG サブクラス抗体価は酵素抗体法のサンドイッチ法により測定した<sup>16)</sup>。0.5 %ホルマリンで処理した *S. pneumoniae* 臨床分離株または荚膜多糖体からなる肺炎球菌ワクチン (萬有製薬) をポリ-L-リジン (M.W: 15,000~30,000) (和光純薬) で処理して陽荷電を与えた 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに加えて  $4^{\circ}\text{C}$  で一夜静置して固相化した。1 %BSA と 1 %ヤギ血清を含む PBS (200  $\mu\text{l}$ ) を各ウェルに加えて、1 時間ブロックしたのち、同緩衝液で 2 倍ずつ段階希釈した IVIG を 100  $\mu\text{l}$  ずつ加えて室温で 2 時間反応させた。次に抗ヒト IgG サブクラスに対するマウスモノクローナル抗体 (Zymed Laboratories), さらに二次抗体としてアフィニティ精製ヤギ抗マウス IgG ベルオキシダーゼ標識体 (Bio-Source International) を室温で 2 時間ずつ順次作用させた。またそれぞれの反応後には 0.9 %NaCl を含む 0.05 % Tween 20 で Auto Washer EL403 (BIO-Tek Instrument) を用いて洗浄した。さらに *o*-フェニレンジアミンを加えて室温にて発色させたのち、2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を加えて反応を停止させて、490 nm

における吸光度を Thermo Max プレートリーダー (Molecular Device Inc.) を用いて測定した。それぞれの抗体価は IVIG を加えないウェルの発色をブランク値として、それよりもそれぞれ 0.15 ずつ高い値をエンドポイントとして、そのときの IVIG の希釈倍率をその抗体価とした。

### 6. IgG2 欠乏フラクションの調整

IgG2 欠乏フラクション (IgG2-D) の調整は Immuno Assist MG-PP (関東化学) を充填したカラムを (bed volume; 4.5 ml), 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) で十分平衡化して、IVIG をアプライした。さらに同緩衝液で洗浄した後、NaCl 濃度によるステップワイズグラジエントで溶出したものを 3 ml ずつ分取し、280 nm における吸光度を測定した。

### 7. サブクラス比率分析

IgG サブクラス測定用 ELISA キット (ミドリ十字) を用いて、IVIG および IgG2-D の IgG サブクラス比率を測定した<sup>16)</sup>。

### 8. ヒト好中球と IgG2 の結合性

ヒト好中球上の IgG2 の結合性を Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識した抗ヒト IgG2 モノクローナル抗体 (Sigma Chemical Co.) を用いて、フローサイトメトリーにより解析した。好中球は健常人ボランティアの末梢血からモノポリ分離液 (大日本製薬) を用いて、遠心操作により分離した。20 mM ヘパース緩衝液と 0.1 %ヒト血清アルブミンを加えた RPMI 1640 培地 (日本製薬) で希釈した IVIG (1 mg/ml) と *S. pneumoniae* SP-23 ホルマリン処理菌体 ( $1 \times 10^7$  cells/ml) の混合液を  $25^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートした。この混合液の 0.2 ml をとり、0.8 ml のヒト好中球浮遊液 ( $1 \times 10^6$  個) を加えて、 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 時間作用させて遠心操作により好中球を洗浄した。これに FITC 標識した抗ヒト IgG2 モノクローナル抗体を加えて  $4^{\circ}\text{C}$  で 1 時間作用させたのち、IVIG 中に含まれる IgG2 の好中球への結合性を蛍光強度を指標としてフローサイトメトリーで解析した。また、特異性の確認のために、あらかじめ抗  $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$  モノクローナル抗体 (Pharmingen) を加えて  $4^{\circ}\text{C}$  で 1 時間作用させた好中球を用いて同様の操作を行った。

### 9. オプソニン活性

*S. pneumoniae* SP-23 は羊血液寒天培地, *E. coli* 5137 はブレインハートインフュージョン寒天培地で培養し、RPMI 1640 培地中に  $1 \times 10^7$  cfu/ml になるように懸濁した。また、ヒト血清アルブミンを 1 %溶液になるように RPMI 1640 培地で希釈し、IVIG および IgG2-D を希釈するための溶媒とした。各 IgG フラクションは同溶媒で 2 mg/ml から 0.125 mg/ml まで段階的に 2 倍ずつ希釈した。また溶媒のみを加えたものをコントロールとした。ヒト好中球はコールターカウン

ターで細胞数を計測し、 $2 \times 10^7$  個/ml となるように RPMI 1640 培地に浮遊させた。菌液と IgG フラクシオンを 100  $\mu$ l ずつ混合して振盪しながら 37  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートし、さらに 100  $\mu$ l の好中球液を加えて 60 分間インキュベートした。菌体を取り込んだ好中球はスライドガラスに塗抹して、*S. pneumoniae* はゲンチャナ紫染色、*E. coli* はグラムハッカー染色を行い、光学顕微鏡下で 10 個以上の好中球を観察して、取り込まれた菌数を計測した。上記の一連の操作について、3 人の健常人ボランティアからそれぞれ分離した好中球について同様に試験を行い、1 個の好中球あたりの取り込み菌数の平均値を求めた。

#### 10. マウス体内からのクリアランス

*S. pneumoniae* SP-23 を羊血液寒天上に培養し、翌日に 2 白金耳をかきとり PBS に懸濁した。一方、IVIG または IgG2-D を PBS で希釈して (1.25~20 mg/ml)、試験管内において菌体懸濁液と等量ずつ混合して 37  $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。また PBS と菌体を混合したものをコントロールとした。上記のように IVIG あるいは IgG2-D で処理した菌体を ICR マウスの尾静脈内に接種した。各試験群は 4 ないし 5 匹ずつのマウスを用いた。菌体接種から 20 分後に心臓からヘパリン採血し、一定量を生理食塩水で希釈してブレインハートインフュージョン寒天培地に混釈し、2 日後に生じたコロニー数を測定した。マウスの血液中の菌数を求めることにより、IVIG と IgG2-D の作用を比較した。

#### 11. 統計学的処理

統計学的有意差は IVIG と IgG2-D の同一濃度において対応のない t-検定により検定した。

## II. 結 果

#### 1. *S. pneumoniae* に対する IgG サブクラス抗体価

IVIG の *S. pneumoniae* の臨床分離株 (18 株) と肺炎球菌莢膜多糖体に対するそれぞれの IgG サブクラス抗体価を Table 1 に示す。いずれに対しても IgG2 抗体価がその他の IgG サブクラス抗体価よりも高く、IgG1 は IgG3 とほぼ同等かやや高く、IgG4 は検出限界以下であった。IgG1 抗体価は 5 株において 500 倍以下であり、非常に抗原性の低いグループが存在した。IgG2 は IgG1 に比べて 18 株中 8 株が 16 倍以上反応性が高く、特に IgG1 に抗原性の低い菌株において両者の違いが顕著になる傾向を示した。

#### 2. IgG2 欠乏フラクションの調整

IVIG (50 mg) を原料として Immuno Assist MG-PP カラムを用いて IgG2-D (27.7 mg) を調製した (Fig. 1)。この IgG2-D の IgG サブクラス比率は Table 2 に示すように、IgG2 の比率が 17.5 % から 4.3 % に低下しており、一方では IgG1 の比率が増加したものであった。それに伴って *S. pneumoniae* SP-8 に対

Table 1. IgG-subclass antibody titers of IVIG to clinical isolates and capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*

Antigens	Antibody titer			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
<i>S. pneumoniae</i>				
SP-1	250	4,000	<250	<250
SP-2	4,000	8,000	500	<250
SP-3	250	4,000	<250	<250
SP-4	16,000	32,000	4,000	<250
SP-5	<250	4,000	<250	<250
SP-7	8,000	32,000	2,000	<250
SP-8	8,000	32,000	4,000	<250
SP-9	4,000	64,000	2,000	<250
SP-10	4,000	32,000	1,000	<250
SP-12	4,000	16,000	1,000	<250
SP-13	8,000	16,000	4,000	<250
SP-14	8,000	32,000	2,000	<250
SP-15	4,000	64,000	2,000	<250
SP-18	500	16,000	1,000	<250
SP-23	<250	4,000	<250	<250
SP-25	4,000	64,000	4,000	<250
SP-26	8,000	16,000	2,000	<250
SP-31	16,000	64,000	4,000	<250
Capsular polysaccharide	250	2,000	<125	N.T

N.T: Not tested

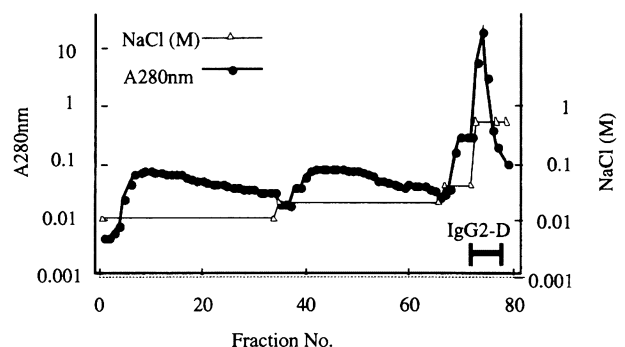


Fig. 1. Preparation of IgG2-D by Immuno Assist MG-PP column chromatography.

Buffer: 10mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)  
Flow rate: 0.5 ml/min

Table 2. Comparison of IVIG and IgG2-D in IgG subclass contents

IgG fractions	IgG subclass contents (%)			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
IVIG	79.6	17.5	1.8	1.1
IgG2-D	93.4	4.3	1.9	0.4

Table 3. Antibody titers of IVIG and IgG2-D against *Streptococcus pneumoniae* SP-8

IgG fractions	Antibody titer		
	IgG1	IgG2	IgG3
IVIG	8,000	32,000	4,000
IgG2-D	8,000	4,000	2,000

する IgG2 サブクラス抗体価は 4 分の 1 以下に低下した (Table 3)。このようにして得られた IgG2-D を用いて、IgG2 の *S. pneumoniae* に対する作用を検討した。

### 3. ヒト好中球と IgG2 の結合性

IVIG を好中球に作用させることにより、FITC 標識抗 IgG2 モノクローナル抗体の結合による蛍光強度が増強した (Fig. 2)。しかし、あらかじめモノクローナル抗体により Fc $\gamma$ RIII をブロックすることにより蛍光発色が抑えられ、この結合が Fc $\gamma$ RIII を介したものであることがわかった。

### 4. オプソニン作用

好中球による菌体の貪食作用に対する IVIG と同 IgG 濃度の IgG2-D を加えた場合に 1 個の好中球に取り込まれた *S. pneumoniae* SP-23 の菌数を比較した (Fig. 3)。IVIG を加えた場合には、0.04~0.33 mg/ml において濃度依存的に取り込み菌数が増加し、0.33 mg/ml では 6.71 個までが取り込まれた。一方、IgG2-D を加えた場合には、0.17, 0.33 mg/ml において同濃度の IVIG よりも好中球内への取り込み菌数が有意に少なかった。同様に、IVIG 作用させた *E. coli* 5137 の好中球内への取り込み菌数を IgG2-D と比較した (Fig. 4)。IVIG と IgG2-D は同濃度においてほぼ同等の取り込み菌数を示し、有意差が認められなかった。

### 5. マウス体内からのクリアランスへの影響

IVIG ならびに IgG2-D と試験管内で *S. pneumoniae* SP-23 を等量ずつ混合して、37℃で 1 時間反応後に ICR マウスの静脈内に接種した ( $3.65 \times 10^4$  cfu/mouse)。菌体接種から 20 分後のマウスの血液中の菌数を比較した (Fig. 5)。IVIG で処理したときの血液中菌体数は同

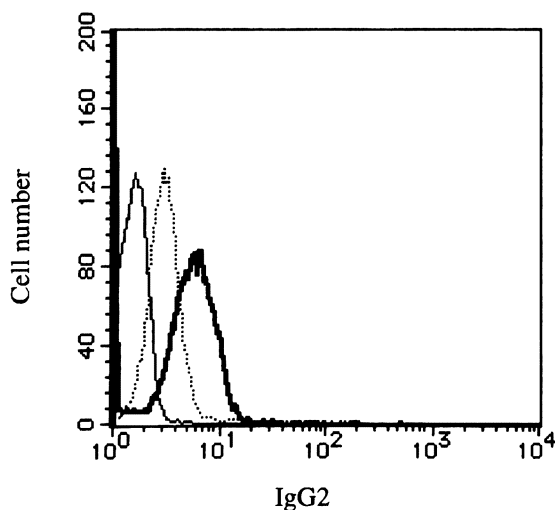


Fig. 2. Binding of IgG2 to human neutrophils.

—, Neutrophils treated with IVIG  
 ·····, Inhibition by anti-Fc $\gamma$ RIII monoclonal antibody  
 - - - , Naive neutrophils

IgG 濃度の IgG2-D の場合に比べて少なく、最終濃度が 2.5, 5 mg/ml の場合において有意差が認められた。すなわち *S. pneumoniae* 菌体の血液中からの消失は、IgG2 の作用によるものであることが明らかとなった。

## III. 考 察

細菌の細胞壁は一般的にペプチドグリカンとグラム陰性細菌の場合には、その外側にリポポリサッカライ

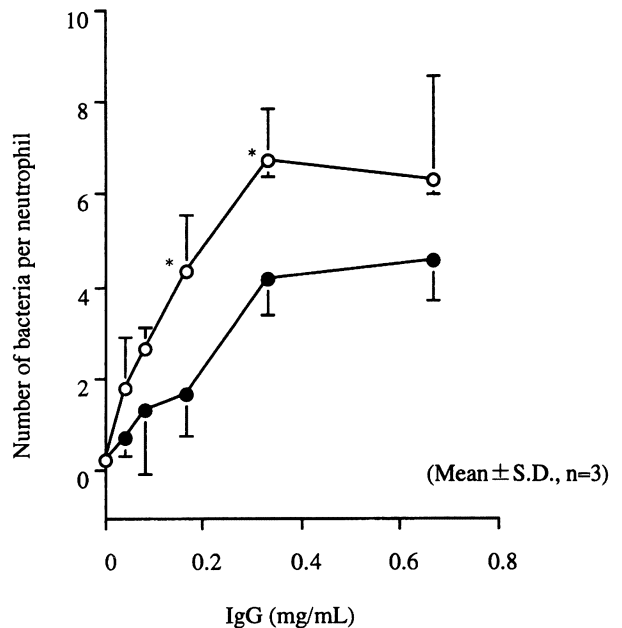


Fig. 3. Opsonic activity of IgG2 against *Streptococcus pneumoniae* SP-23.

○ : IVIG, ● : IgG2-D  
 \*:  $p < 0.05$  vs. IgG2-D (t-test)

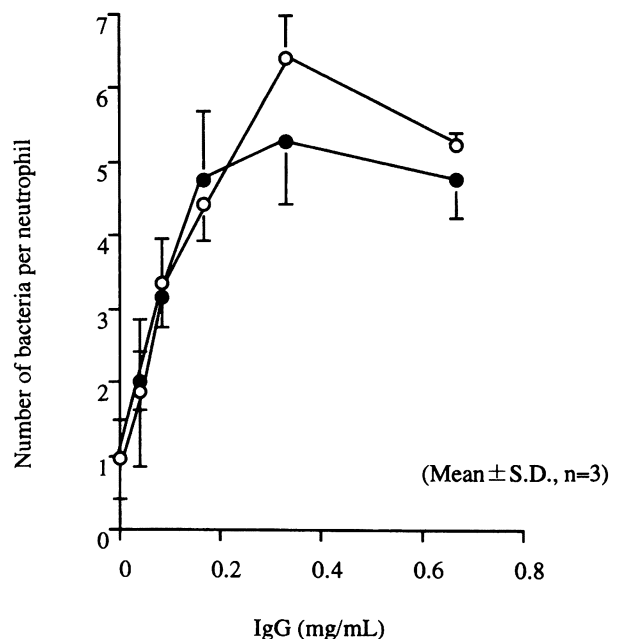


Fig. 4. Opsonic activity of IgG2 against *Escherichia coli* 5137.

○ : IVIG, ● : IgG2-D

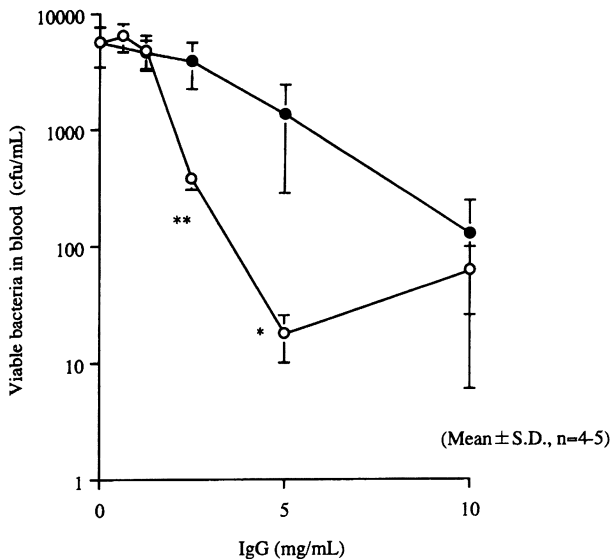


Fig. 5. Bacterial clearance in blood after treatment with IVIG and IgG2-D.

ICR mice were inoculated with *Streptococcus pneumoniae* SP-23 incubated with IVIG or IgG2-D. An aliquot of blood was plated on Brain-heart infusion agar 20 minutes after inoculation.

—○—: IVIG, —●—: IgG2-D

\*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$  vs. IgG2-D (t-test)

ド (O 抗原) から構成されるが、これらは抗体により認識されやすい。しかし *H. influenzae* や *S. pneumoniae* はその外側にポリサッカライドからなる粘性に富んだ莢膜多糖体 (K 抗原) を産生し、それ自体はなんら毒性は示さないが、菌体表面をマスクして異物認識を起りにくくし、生体による補体活性化や貪食作用からのエスケープ機構として働いている<sup>3-8)</sup>。すなわち、幼児や高齢者などの免疫機能が低下している宿主にとってはこのような構造を持つ細菌による難治性の疾患を引き起こすことがある。このような莢膜に対する特異抗体は主に IgG2 であることが知られている<sup>9,10)</sup>。また乳幼児における IgG2 欠乏症は上記の莢膜産生性の菌腫によって急性の中耳炎や下気道感染症を引き起こすことが多い。乳幼児では抗体産生能の他に好中球機能も十分ではないことから<sup>17)</sup>、抗生剤を使用しても起炎菌を完全に除去できずに反復的に感染が続くことが多い。このような IgG2 欠乏症は成長とともに改善し、感染に対して抵抗性を獲得するものの、難治症例では難聴などの異常を残すことがある。小児に対する抗菌化学療法剤の使用は安全性や薬剤耐性の問題から限定されることも多いが、免疫グロブリンは主要な治療方法の 1 つとして有用性も確認されている<sup>3,18)</sup>。一方で、IgG サブクラスのうちで IgG2 補体活性化に対する作用や好中球上のレセプターとの結合性が低いことが知られており、その作用機序についてはすべてが解明されているわけではない。しかし、われわれは今回の検討において、IgG2 とヒト好中球との  $Fc\gamma RIII$  を介した結合性

や IgG2 の細菌特異抗体によるオプソニン作用を確認した。すなわち、IgG2 欠乏症患者では IgG2 が欠乏することにより、*S. pneumoniae* に対する抵抗性が低下していることが推察された。

この実験で用いた IgG2-D は IVIG を材料として Immuno Assist MG-PP カラムクロマトグラフィにより調整したものである。充填剤はピロリン酸マグネシウムを主成分とする多孔質の球状粒子であり、異なる等電点の蛋白質に対して静電的な相互作用により保持の強さに変化を生じることを原理とした精製方法であり、ヒト IgG の IgM からの分離<sup>19)</sup> やマウスの各 IgG サブクラスの精製<sup>20)</sup> に用いられている。この IgG2-D は IVIG に比べて IgG2 比率が約 4 分の 1 以下に低下する一方で IgG1 比率が高くなっており、全体的な IgG サブクラスの比率は IgG2 欠乏症の患者のものに近いと考えられ<sup>20, 23, 24)</sup>、一方で IVIG の IgG サブクラスの比率は健康成人のものに相当している<sup>25)</sup>。IgG2-D と IVIG のサブクラスの比率の変動は *S. pneumoniae* に対するこの IgG サブクラス抗体価にはほぼ一致することから蛋白量あたりの抗体価は変わらず、IgG2 のみが効率よく除かれたものと推察される。

生体内では侵入した細菌が免疫グロブリンと接触することでオプソニン化されて除菌されやすくなると考えられることから、細菌に対する感染防御では特異抗体の量が体内からの除菌の過程に非常に重要である。*S. pneumoniae* に対する感染防御には特異抗体とそれに関わるオプソニン作用が重要な役割を担っていることが基礎的あるいは臨床的な検討から明確になっている<sup>13, 14, 24-26)</sup>。今回の検討では、IVIG は *S. pneumoniae* の臨床分離株に対しては IgG1 抗体価が低く、全体の抗原性の低い菌株の場合に、IgG2 に対する依存性が高い傾向を示した。*S. pneumoniae* SP-23 はその中でも IgG1 抗体価がもっとも低く、IgG2 にもっとも dominant な反応性を示す代表的な菌株であり、IgG2 欠乏症においては高い毒性を示すことが考えられる。そこで、この菌株を用いて *in vitro* におけるオプソニン作用と静脈内接種後の血液中からの菌体消失の促進に対する IVIG の作用を IgG2-D と比較検討した。*S. pneumoniae* は副鼻腔や気道からの分離頻度が高く、急性中耳炎や下気道炎の起炎菌として注目されるが、IgG サブクラスの中でも IgG2 が莢膜多糖体との特異性が高い。一方、*E. coli* は腸内正常細菌フローラを形成しているものであり、尿路感染などの起炎菌となりうるが副鼻腔や気道からの検出はほとんど認められず、菌種に対する反応性の違いも示唆された。今回の試験では IgG2 が欠乏することにより好中球による *S. pneumoniae* の貪食や生体内からの除菌が遅れ、IgG2 の特異的な作用が明らかになった。免疫グロブリン製剤は小児への投与により抗体濃度の上昇が認められており<sup>11,12,18)</sup>、

IgG2 欠乏症患者において IgG2 を補充するための IVIG 置換療法の臨床的有用性が期待される。

文 献

- 1) Bradwell A R: IgG subclass in childhood infection. *Acta. Paed. Sin.* 36: 164~169, 1995
- 2) Ambrosino D M, Umetsu D T, Siber G R et al.: Selective defect in the antibody response to *Haemophilus influenzae* type b in children with recurrent infections and normal serum IgG subclass level. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81: 1175~1179, 1988
- 3) Fine D P: Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect. Immun.* 12: 772~778, 1975
- 4) Giebink G S: Opsonic requirements for phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* type VI, XVⅢ, XXⅢ, XXV. *Infect. Immun.* 18: 291~297, 1977
- 5) Angel C S, Ruzek M, Hostetter M K: Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 170: 600~608, 1994
- 6) Hostetter M K: Serotypic variations among virulent Pneumococi, in deposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production. *J. Infect. Dis.* 153: 682~693, 1986
- 7) Chudwin D S, Artrip S G, Korenblit A, et al.: Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 50: 213~217, 1985
- 8) Matthay K K, Mentzer W C, Ware D W, et al.: Evaluation of opsonic requirements for phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* serotype VII, XIV, and XIX by chemiluminescence assay. *Infect. Immun.* 31: 228~235, 1981
- 9) Hammerström L, Smith C I E: IgG subclasses in bacterial infections. *Monogr. Allergy* 19: 123~133, 1986
- 10) Jefferis R, Kumararatne D S: Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clin. exp. Immunol.* 81: 357~367, 1990
- 11) Acunas B A, Peakman M, Liossis G, et al.: Effect of fresh frozen plasma and gammaglobulin on humoral immunity in neonatal sepsis. *Arch. Dis. Child.* 70: F182~F187, 1994
- 12) Amato M, Huppi P, Imbach P, et al.: Immunoglobulin subclass concentration in preterm infants treated prophylactically with different intravenous immunoglobulins. *Am. J. Perinatol.* 12: 306~309, 1995
- 13) Vidarsson G, Jonsdottir I, Jonsson S, et al.: Opsonization and Antibodies to Capsular and Cell Wall Polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 592~599, 1994
- 14) Kaneda N, Kawauchi H, Mogi G: Role of phagocytes in antimicrobial defence of the middle ear. *Auris. Nasus. Larynx* 18: 331~342, 1991
- 15) 中江 孝, 永井仁志, 渡辺正弘, 他: 静注用免疫グロブリン製剤における日和見細菌臨床分離株に対する抗体価と効力の相関性について。薬学雑誌 114: 972~979, 1994
- 16) 清水 徹, 住吉由紀子, 袋本隆史, 他: 酵素免疫測定法による IgG サブクラス測定の基本検討。臨床検査 42: 117~124, 1998
- 17) Hill H R, Book L S, Hemming V G, et al.: Defective neutrophil chemotactic responses in patients with recurrent episodes of otitis media and chronic diarrhea. *Am. J. Dis. Child.* 131: 433~436, 1977
- 18) Ishizaka A, Sakiyama Y, Otsu M, et al.: Successful intravenous immunoglobulin therapy for recurrent pneumococcal otitis media in young children. *Eur. J. Pediatr.* 153: 174~178, 1994
- 19) Inoue S, Ohtaki N: Pyrophosphates as biocompatible packing materials for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 645: 57~65, 1993
- 20) Ohtaki N, Inoue S: Separation and purification of immunoglobulins using spherical adsorbent of magnesium pyrophosphate. *Bunseki Kagaku* 44: 875~881, 1995
- 21) Scott M G, Shackelford P G, Briles D E, et al.: Human IgG subclasses and their relation to carbohydrate antigen immunocompetence. *Diagnos. Clin. Immunol.* 5: 241~248, 1988
- 22) Shackelford P G, Granoff D M, Madassery J V, et al.: Clinical and Immunologic characteristics of healthy children with subnormal serum concentrations of IgG2. *Pediatr. Res.* 27: 16~21, 1990
- 23) 岸本 進, 上床 周, 伊藤幸治, 他: 日本人成人における血清 IgG サブクラスの正常値。日本臨床免疫学会雑誌 17: 535~544, 1994
- 24) De Velasco E A, Decker B A T, Verheul A F M, et al.: Anti-polysaccharide immunoglobulin isotype levels and opsonic activity of antisera: relationships with protection against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *J. Infect. Dis.* 172: 562~565, 1995
- 25) Stenfors L E, Raisanen S: Immunoglobulin-and Complement-coated bacteria in middle ear effusions during the early course of acute otitis media. *Scand. J. Infect. Dis.* 24: 759~763, 1992
- 26) Ono Y, Kimura S, Oka S, et al.: Low opsonic activity in sera from HIV-infected patients against *Streptococcus pneumoniae*. *感染症学雑誌* 67: 1136~1137, 1993

## Opsonic activity of IgG2 against *Streptococcus pneumoniae*

Takashi Nakae, Kenji Kikutani, Koji Yada, Tae Kitamura,  
Yutaka Hirao and Hideyuki Fujita

Reserch Division, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.25-1, Shodai-Ohtani,  
2-Chome, Hirakata, Osaka 573-1153, Japan

Four subclasses of human IgG exhibit unique profiles and specific spectra against microbial antigens. Antibody titers of human intravenous immunoglobulin preparation (IVIG) including IgG subclasses against 18 clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* and pneumococcal polysaccharides were determined by enzyme-immunoassay. IgG2 was predominantly reactive against each antigen in comparison with IgG1, IgG3 and IgG4. Since *S. pneumoniae* SP-23 was an especially representative strain that is most reactive to IgG2, the opsonic activity of IgG2 was studied by using this strain. Binding of IgG2 to human neutrophils was recognized after incubation with FITC conjugated monoclonal anti-human IgG2 by flow cytometry. This binding was inhibited by the addition of anti-Fc  $\gamma$  RIII monoclonal antibody. Column chromatography using spherical adsorbent of magnesium pyrophosphate resulted in preparation of an IgG2-deficient fraction (IgG2-D) and an approximately 4-fold decrease in IgG2 from native IVIG. Opsonic activities of the two immunoglobulin preparations were subsequently compared after incubation with *S. pneumoniae* SP-23 and human neutrophils at 37°C. Ingested bacteria in neutrophils were counted by microscopy. IgG2-D showed lower opsonic activity against *S. pneumoniae* than IVIG at the same IgG concentrations of 0.17 and 0.33 mg/ml. Each of the two immunoglobulin fractions was incubated with *S. pneumoniae* SP-23 at 37°C for 1 h and inoculated into ICR mice intravenously. Viable bacteria were counted 20 minutes after infection. IgG2-D showed less activity against bacterial clearance in mice than IVIG at the same concentrations. It is suggested that phagocytosis and subsequent intracellular killing of bacteria require the binding of IgG2 to *S. pneumoniae*, namely opsonization.