

6. モノクローナル抗体を用いた ヒトリンパ球サブセットの解析

研究協力者 岸 本 忠 三
(大阪大学医学部・
第三内科病理病態学)

共同研究者 円 山 誓 信
(大阪大学医学部第3内科)

目 的

最近の免疫学の進展により、生体の免疫機能はいくつもの機能を異にするリンパ球の相互作用により調節されていることが明らかにされて来た。したがって免疫不全症においても、どの細胞の欠損によるか、どの細胞の機能異常によるかによって異なった病像を呈してくる事が当然考えられるし、また同じ免疫低下を示す例においても、その異常部位が異なる事が当然考えられる。

したがって、免疫不全症をモニタリングする上において、各リンパ球サブセットに特異的に反応する抗体が存在すれば、どのリンパ球が欠損しているかを、簡単に調べる事が出来る。細胞融合の応用によってモノクローナルな抗体を作る事が可能になり、ヒトのリンパ球を識別する抗体も作成する事が出来るようになって来た。我々もヒトのリンパ球サブセットを識別する抗体を得る事を試み、以下の実験を行なった。

方 法

a) **免疫**：ヒトT及びB細胞株 1×10^7 個を Balb/c マウスに腹腔内投与し、以後3週後、更にその1週後に同数の細胞を計3回腹腔内投与し、最終免疫後3日目の脾細胞を細胞融合に用いる。

b) **細胞融合**：ヒトTあるいはB細胞株感作 Balb/c マウス脾細胞 $1 \sim 5 \times 10^7$ と 8-Azaguanine resistant な Balb/c マウス由来ミエロマ細胞 P₃U₁ を使用する脾細胞の $1/10$ 量(細胞数)の割合で混ぜ合わせ、その Cell mixture のペレットに、50%ポリエチレングリコールを加え、細胞融合を行う。融合細胞の選別は HAT 培地 [Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine 添加 RPMI 1640+10%牛胎児血清 (FCS)] で行う。できてきたハイブリドーマは以後10% FCS 添加 RPMI で維持する。

c) **Binding Assay**：免疫に供したのと同じ細胞を標的細胞として用い、この細胞 1×10^5 個にハイブリドーマ培養上清 $10 \mu\text{l}$ を加え、氷上に60分放置した後、上清を洗いさり、 ^{125}I でラベルした Goat anti-mouse (Fab')₂ を $10 \mu\text{l}$ (20,000~40,000 cpm) 加え、更に45分氷上におく。しかる後に2回洗浄し、free の ^{125}I -Goat anti-mouse (Fab')₂ を除いた後、Cell pellet

図1 BINDING ASSAY16
 F130 anti-SKW-3
 Target cell : SKW-3, Human T-cell line

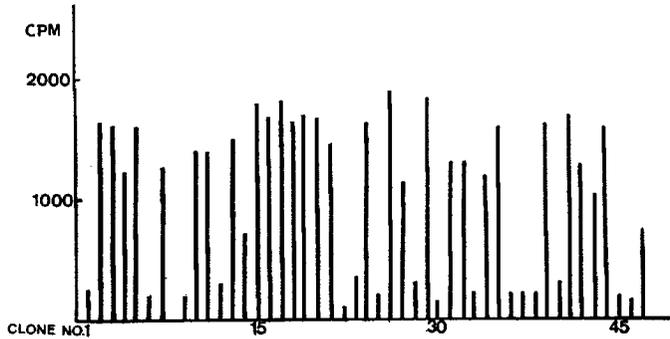
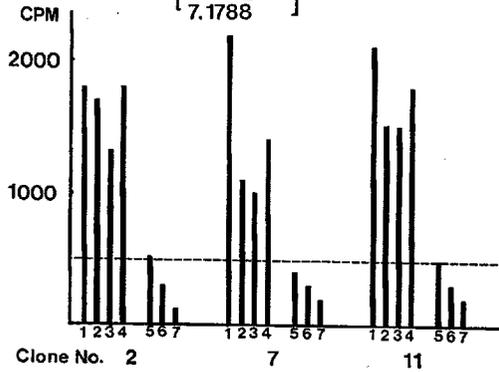


図2 F130 : anti-SKW-3
 Target cells

1. SKW-3	} Human T cell lines
2. HSB	
3. JUR	
4. CEM	
5. SB	} Human B cell lines
6. EP-2	
7. 1788	



を γ カウンターで計測する。

結 果

図1はヒトT細胞株である skw-3 を Balb/c マウスに免疫する事により得られたマウス脾細胞と, P_3U_1 を融合する事により得られた47種類のハイブリドーマにつき, その培養上清中に存在する抗体の抗体活性について skw-3 を標的細胞とする Binding Assay で調べたものである。調べたハイブリドーマのうち約60%が skw-3 と反応する抗体を産生しているのがわかる。このうち3つのハイブリドーマの培養上清について, 他のヒトT細胞株, B細胞株との反応性について調べたところ (図2), これらのハイブリドーマを産生する抗体はいずれもヒトT細胞株に specific であり, B細胞株とは反応しない。すなわち, これらのハイブリドーマの産生する抗体は, ヒトT細胞株に共通の細胞表面抗原を認識するものである。

また, ヒトB細胞株である SB で感作された Balb/c マウス脾細胞と P_3U_1 との融合により得られたハイブリドーマの培養上清について, SB を標的細胞として Binding Assay を行なった (図3)。

図 3

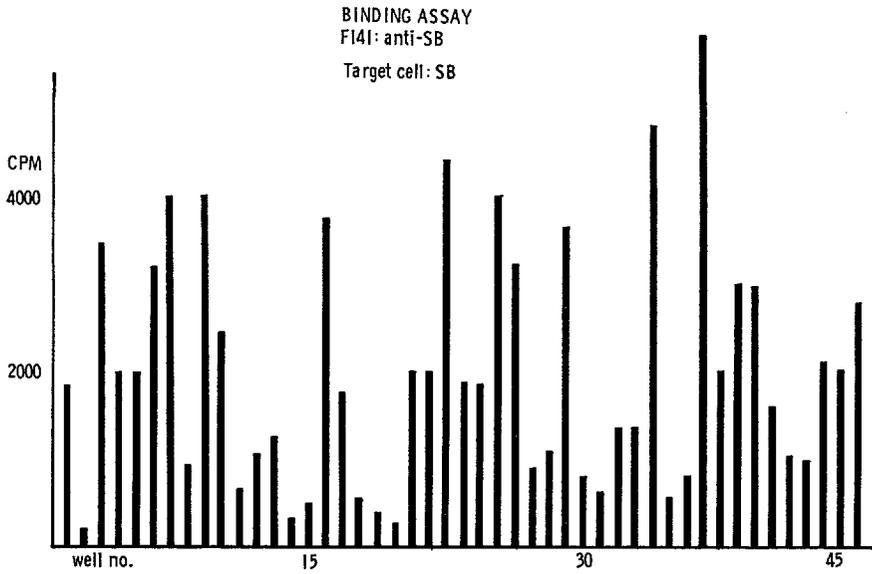
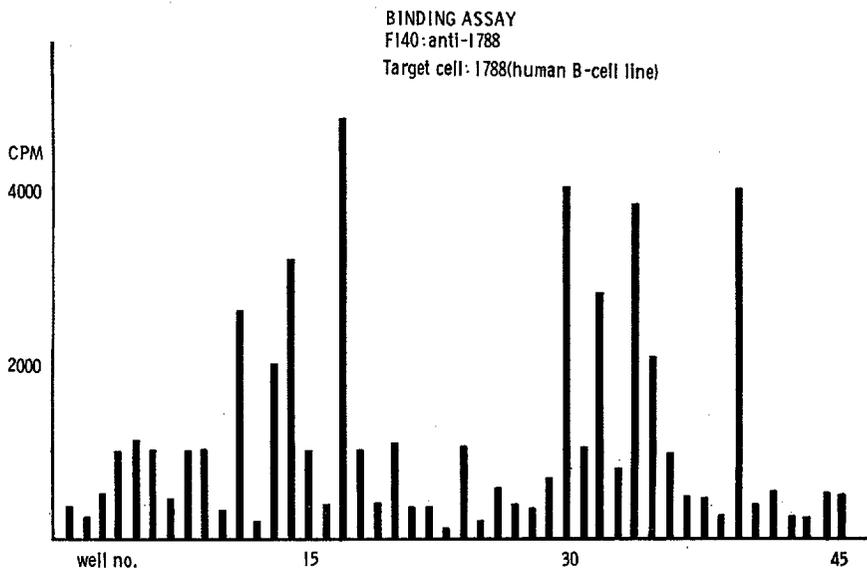


図 5



46個ハイブリドーマのうち約70%が、その培養上清中に SB と反応する抗体を産生しているのがわかる。これらのいくつかについて、種々のヒトT細胞株、B細胞株を標的細胞として Binding Assay を行なった結果、いずれのハイブリドーマの培養上清も同じ傾向を示した。その1例を次に示す(図4)。

ハイブリドーマ培養上清中に存在する抗体は調べたすべてのヒトB細胞株と反応したが、T細胞株とは反応しない。すなわち、これらのハイブリドーマの産生する抗体は、ヒトB細胞株細胞表面抗原特異的であると想像できる。

図 4

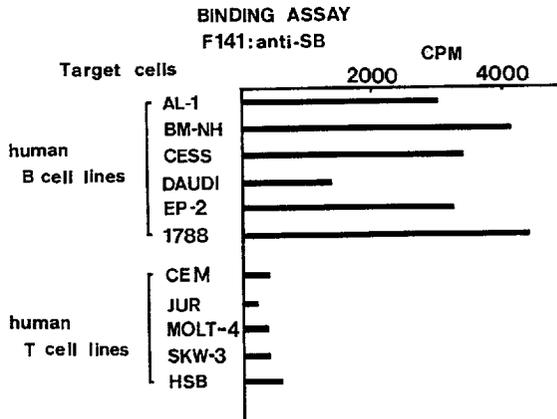
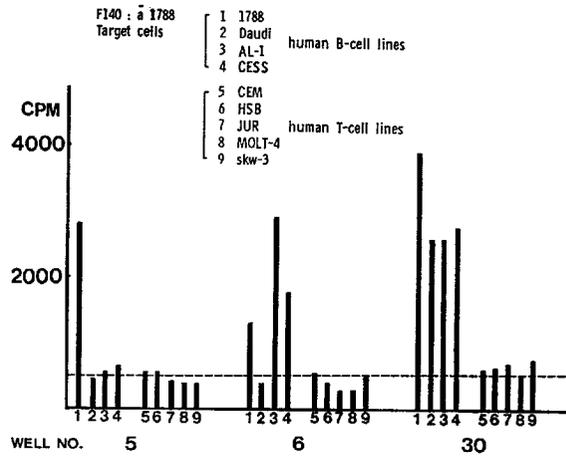


図 6



また同様に、ヒトB細胞株 RPMI 1788 感作 Balb/cマウス脾細胞と、 P_3U_1 の融合により作製されたハイブリドーマについて、RPMI 1788 を標的細胞として Binding Assay を行なったところ、45個のハイブリドーマのうち、40%が RPMI 1788 と反応する抗体を培養上清中に分泌しており、それらのいくつかにつき、同様に、ヒトTおよびB細胞株を標的細胞として Binding Assay を行なった (図5)。

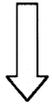
図6の Well No.5のハイブリドーマの産生する抗体については、免疫に用いた RPMI 1788 とのみしか結合せず、HLA-specific な抗体であろうと想像された。また、Well No.6のハイブリドーマの産生する抗体については、HLA-A, B, C, negative, β_2m negative Ia positive の Daudi 細胞以外のB細胞とのみ反応したことにより、Ia 抗原以外のB細胞抗原を認識するものと想像された。Well No.30のハイブリドーマについては、SB と同様B細胞共通の表面抗原に対する抗体を産生しているものと推測された。

以上の事より、1つのB細胞株 RPMI 1788 感作 Balb/c 脾細胞と P_3U_1 との融合により

得られたハイブリドーマは、その clone により、B細胞表面上の様々な抗原に対する抗体を産生する事が示された。

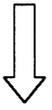
ま と め

TあるいはB細胞株で感作されたマウス脾細胞と、マウスミエローマ細胞との融合により、TあるいはB細胞株に特異的な抗体を産生するハイブリドーマが得られた。またハイブリドーマの産生する抗体が、その抗体の特異性によってB細胞株をいくつかのグループに分けることすなわちB細胞の subsets を識別しうる可能性をも示した。この実験を更におし進める事により、ヒトTおよびB細胞サブセットの識別が可能となり、免疫不全症をモニタリングする上で有用な手段となりうると期待される。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



目的

最近の免疫学の進展により,生体の免疫機能はいくつもの機能を異にするリンパ球の相互作用により調節されていることが明らかにされて来た。したがって免疫不全症においても,どの細胞の欠損によるか,どの細胞の機能異常によるかによって異なった病像を呈して来る事が当然考えられるし,また同じ免疫低下を示す例においても,その異常部位が異なる事が当然考えられる。

したがって,免疫不全症をモニタリングする上において,各リンパ球サブセットに特異的に反応する抗体が存在すれば,どのリンパ球が欠損しているかを,簡単に調べる事が出来る。細胞融合の応用によってモノクローナルな抗体を作る事が可能になり,ヒトのリンパ球を識別する抗体も作成する事が出来るようになって来た。我々もヒトのリンパ球サブセットを識別する抗体を得る事を試み,以下の実験を行なった。