

# 免疫担当細胞のスクリーニング—ヒトマクロ ファージに対するモノクローナル抗体

岸 本 忠 三  
(大阪大学医学部病理病態学)

円 山 誓 信  
(大阪大学医学部第三内科)

## は じ め に

T細胞, B細胞, マクロファージなどの免疫担当細胞それぞれの分化段階に存在する細胞表面抗原にむけられたモノクローナル抗体を作成することは免疫不全症における細胞の機能異常が細胞のどのレベルでおこっているのかということを知る上で極めて有用であろうと思われる。今回は機能的ならびに形態学的にヒト成熟マクロファージに近いとされる human histiocyctic lymphoma cell line U937で感作された Balb/c 脾細胞とマウスミエローマ細胞 P<sub>3</sub>U<sub>1</sub>を細胞融合することにより, ヒト単球にむけられたモノクローナル抗体を産生する融合細胞(ハイブリドーマ)を得た。この抗体の特異性ならびに意義について述べてみたい。

## 方 法

細胞の分離: Ficoll による比重遠沈法により, ヒト末梢血から単核球分画を得た。この分画をプラスチックディッシュ上で培養する事により付着細胞(マクロファージ)を分離し, 非付着性細胞はさらに E-ロゼット法によりロゼット形成細胞(T細胞)とロゼット非形成細胞(B細胞)に分離した。顆粒球は末梢血を比重遠沈法で分離した際の赤血球分画に混在するものを用いた。(0.83% NH<sub>4</sub>Cl にて赤血球を溶血した後使用する。)

細胞融合: human histiocyctic lymphoma cell line (U937)  $1 \times 10^7$  を Balb/c マウス(8週令)に2週間隔で3回免疫し, 最終免疫後3日目に脾臓をとり出し, single cell suspension とした。これとマウスミエローマ細胞(P<sub>3</sub>U<sub>1</sub>)とを45%ポリエチレングリコール存在下に融合し, HAT 培地(Hypoxanthine  $1 \times 10^{-4}$ M, Aminopterin  $4 \times 10^{-7}$ M, Thymidine  $1.6 \times 10^{-5}$ M)にて融合細胞のみを選別した。

ハイブリドーマの産生する抗体のスクリーニング: ヒト末梢血T細胞, B細胞, マクロファージ, 顆粒球それぞれ  $1 \times 10^6$  コを標的細胞とし, 間接蛍光抗体法により, ハイブリドーマの培養上清中に存在する抗体の特異性について検索した。2次抗体としては FITC-conj rabbit anti-mouse IgG [(Fab')<sub>2</sub> fragment] を用いた。

Fluorescence activated Cell Sorter (FACS) による分析: ヒト単球に特異性を示す抗体については, さらに FACS による分類をおこなった。

ヒト白血球細胞：急性単球性白血病，急性骨髄性白血病，慢性骨髄性白血病，急性リンパ性白血病，慢性リンパ性白血病患者由来の白血病細胞を用いた。

PWM 刺激によるリンパ球の DNA 合成：末梢血単核球をプラスチックディッシュにより，プラスチックディッシュ付着細胞と非付着細胞に分離し，付着細胞は  $40 \mu\text{g/ml}$  のマイトマイシン C で  $37^\circ\text{C}$  45 分処理したものを使用した。平底マイクロカルチャープレート (Falcon 3042) にて PWM の存在下に  $5 \times 10^4$  コの非付着細胞を培養する際に，同数のマイトマイシン処理付着細胞添加による非付着細胞の増殖反応におよぼす影響を  $^3\text{H-TdR}$  の取りこみにより調べた。

モノクローナル抗体による細胞表面抗原の解析：human histiocytic lymphoma cell line を  $^{125}\text{I}$  で標識後，0.5% NP40 で可溶化した。一方 Protein A を表面にもつ *Staphylococcus aureus* の死菌体に Protein A を介して rabbit anti-mouse  $\kappa$ -chain serum を結合させる。次に rabbit anti-mouse  $\kappa$  chain を介してモノクローナル抗体を *Staph. aureus* に結合させる。

このモノクローナル抗体を結合させた *Staph. aureus* と  $^{125}\text{I}$  でラベル後 0.5% NP40 で可溶化した U937 を混合，インキュベートし，モノクローナル抗体と結合する U937 上の細胞表面抗原を *Staph. aureus* とともに沈澱させた。これを煮沸後 5% SDS-PAGE により分子量を同定した。

## 結 果

スクリーニング：960 コのハイブリドーマ培養上清を感作に用いた U937 細胞を標的細胞とし，間接蛍光抗体法にて検索し，蛍光陽性細胞につきさらにヒト末梢血 T 細胞，B 細胞，単球，顆粒球を標的細胞として同様に間接蛍光抗体法により単球とのみ反応する抗体を産生するハイブリドーマを選別し，このハイブリドーマを limiting dilution 法にて 2 回クローニングした。以下とくにことわらないかぎり，この 2 回クローニング後のハイブリドーマの培養上清 (M206) を実験に用いた。

この抗体は agar plate (Melo Lab) により IgG2a に属することがわかっている。

モノクローナル抗体 (M206) の特徴：図 1 はヒト単球に対するモノクローナル抗体を first antibody とし間接蛍光抗体法で染色後 FACS による分析をおこなったものである。標的細胞として同一人由来の T 細胞，B 細胞，単球，顆粒球を用いた。また positive control として感作に用いた U937 cell line を用いた。図 1 a はこの U937 を標的とした時の FACS パターンであり，ほとんどすべての細胞が M206 により染色されているのがわかるし，正常人ヒト単球も同様に強く染色される (図 1 b)。しかしながら B 細胞，T 細胞はほとんど染色されない (図 1 d, e)。顆粒球に関しては図 1 c にみる如く極めて弱いが染色陽性を示した。従ってこのモノクローナル抗体は単球特異的である可能性がつよい。さらに正常人 8 人の末梢血 T 細胞，B 細胞，単球，顆粒球についてモノクローナル抗体の反応性を間接蛍光抗体法にて調べたところ (表 1) 図 1 と同様な結果を示した。すなわちモノクローナル抗体はいずれの単球とも反応

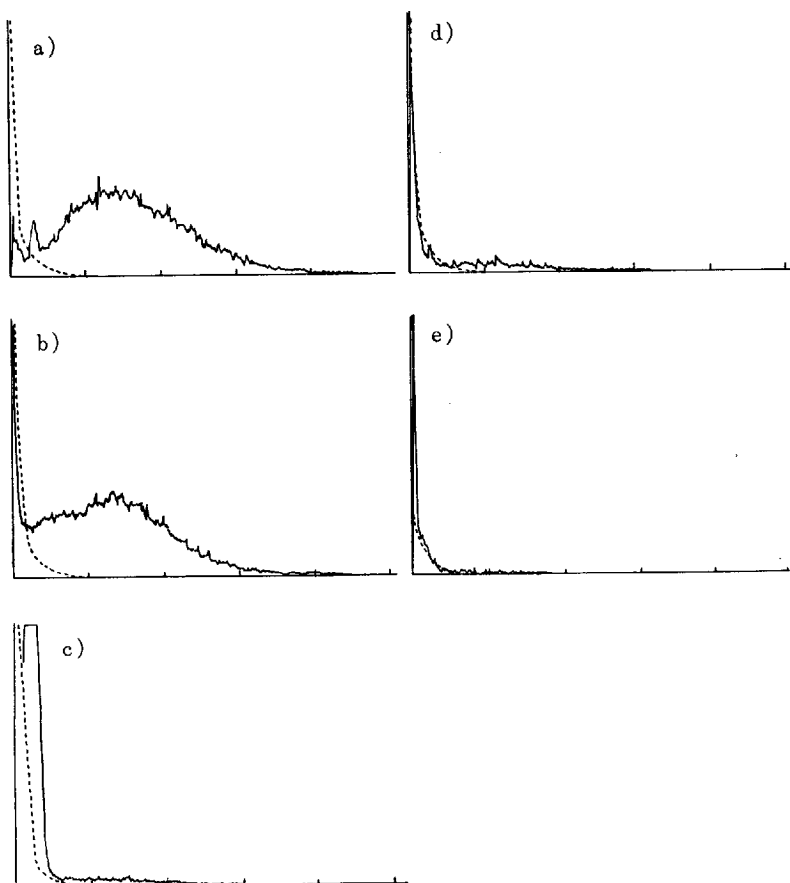


図1 モノクローナル抗体 M206 による末梢血各分画の FACS パターン  
a) U937, b) ~ e) は同一人由来の末梢血各分画, b) 単球,  
c) 顆粒球, d) B細胞, e) T細胞

表1 モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法による反応パターン

| Donors | Indirect immunofluorescence |      |          |             |
|--------|-----------------------------|------|----------|-------------|
|        | T                           | B    | Monocyte | Granulocyte |
| H.K.   | -                           | -    | 卅        | +           |
| T.N.   | -                           | -    | 卅        | +           |
| S.M.   | -                           | -    | 卅        | +           |
| O.K.   | N.D.                        | N.D. | 卅        | +           |
| K.M.   | -                           | -    | 卅        | +           |
| H.N.   | N.D.                        | -    | 卅        | +           |
| A.K.   | -                           | -    | 卅        | +           |
| K.N.   | -                           | -    | 卅        | +           |

卅：蛍光強陽性, +：弱陽性, -：陰性

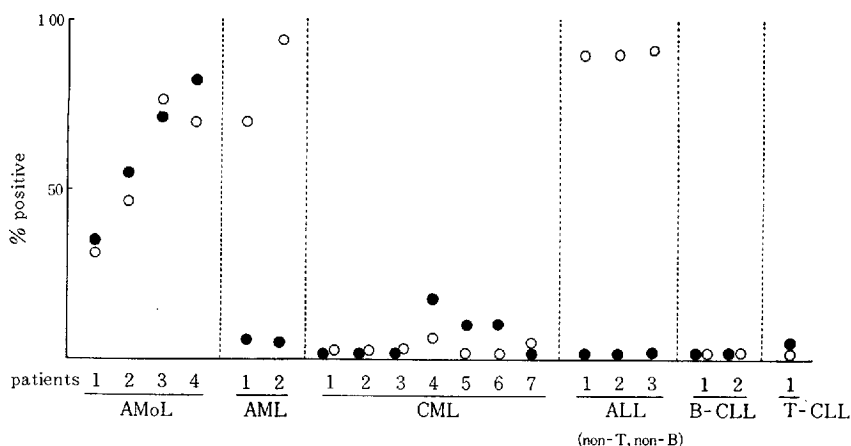


図2 黒丸印(●)は、モノクローナル抗体 M206 による間接蛍光抗体法で染色したもの  
白丸印(○)は末梢血液スミアの白血病細胞の%

性を示しT細胞、B細胞とは反応しなかった。顆粒球についてはいずれの場合も弱反応を示した。このことはこのモノクローナル抗体はヒトのアロ抗原にむけられたものでなく、単球固有の細胞表面抗原にむけられたものであることを強く示唆する。次にヒト単球性白血病、急性ならびに慢性リンパ性および骨髄性白血病の患者の血液より比重遠沈法により単核球分画を分離し、これを標的細胞として間接蛍光抗体法によりモノクローナル抗体との反応性を調べた。同時に末梢血液より blood smear を作製し白血病細胞の%を算定し蛍光陽性細胞と比較した。図2に示すようにモノクローナル抗体は単球性白血病患者由来の腫瘍細胞と強く反応するが急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病患者由来の白血病細胞とは反応しなかった。慢性骨髄性白血病細胞については症例により様々な染色パターンを示した(図2)。従ってこのモノクローナル抗体は正常成熟単球のみならず未熟な単球ならびに human histiocytic lymphoma cell U937 を含めた monocyte lineage 全体にむけられた抗体であると想像される。

PWM 刺激によるリンパ球増殖反応：PWM刺激によるリンパ球増殖反応は単球依存性であることが知られている。比重遠沈法により分離した末梢血単核球をプラスチックディッシュ付着細胞(単球)と非付着細胞に分け、マイトマイシンC処理した付着細胞添加による PWM 刺激非付着細胞の増殖反応への影響をみたのが表2である。プラスチックディッシュ付着細胞除去により非付着細胞の増殖反応が著減しているのがわかる。このとき付着細胞、非付着細胞をそれぞれモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法ならびにペルオキシダーゼ染色で検索すると、付着細胞は96%がペルオキシダーゼ反応陽性でかつ94%がモノクローナル抗体と反応し非付着細胞のペルオキシダーゼ陽性細胞は1.5%、モノクローナル抗体反応性細胞は0.4%であった。このこともモノクローナル抗体と反応する細胞は単球であることを強く示唆する。

モノクローナル抗体(M206)により認識される細胞表面抗原の解析：「方法」に示したや

表2

| Cell populations |          | PWM | uptake of $^3\text{H}$ -TdR<br>cpm $\pm$ SD |
|------------------|----------|-----|---------------------------------------------|
| non-adherent     | adherent |     |                                             |
| +                | +        | +   | 68,146 $\pm$ 17,971                         |
| +                | -        | +   | 8,284 $\pm$ 1,558                           |
| +                | +        | -   | 275 $\pm$ 95                                |
| -                | +        | +   | 567 $\pm$ 185                               |

|                                          | non-adherent | adherent     |
|------------------------------------------|--------------|--------------|
| Peroxidase staining                      | 8/507(1.5%)  | 361/376(96%) |
| Indirect immunofluorescence<br>with M206 | 1/268(0.4%)  | 204/216(94%) |

り方にしたがってモノクローナル抗体の認識する単球細胞表面抗原の分子量を同定したところ、分子量が18万の molecule であり、還元によっても分子量がかわらない事により single chain であろうと想像された。

## 考 察

本稿においてヒト単球に特異的なモノクローナル抗体について述べた。この抗体は単球共通の細胞表面抗原にむけられたものでありしかも正常人末梢血単球と反応するのみならず、単球性白血病細胞、human histiocytic lymphoma cell line U937 (形態的、機能的にも正常成熟マクロファージに近い cell line) とも反応し、単球 lineage 共通の細胞表面抗原を認識するモノクローナル抗体と想像される。顆粒球は単球と共通の stem cell より分化してくるというのが今日の通説であるが、モノクローナル抗体にて顆粒球が弱反応性を示すことは単球抗原の一部が顆粒球にも一部表現されている事を意味するかもしれない。このモノクローナル抗体の認識する単球細胞表面抗原は分子量18万の single chain である。

現在までにヒト単球にむけられたモノクローナル抗体はいくつか報告されているが、それらの抗体の特異性は必ずしも同一でない。ヒトマクロファージ様株化細胞 U937 は形態学的にも、機能的にも正常ヒトマクロファージに極めて近いとされている。特定の細胞にむけられた抗体によりその細胞が分化あるいは分化の抑制がみられる事はよく知られた事実である。U937 cell line と強く反応するモノクローナル抗体は現在のところ M206 しかない。established cell line U937 を用いて、抗体の細胞の機能におよぼす影響を調べる事は意義あることと思われる。

また表3に現在までに報告されているヒト単球に対するモノクローナル抗体を列記したが、こういった特異性のちがうモノクローナル抗体を組みあわす事により、マクロファージの機能異常もより精密に解析されうるものと思われる。

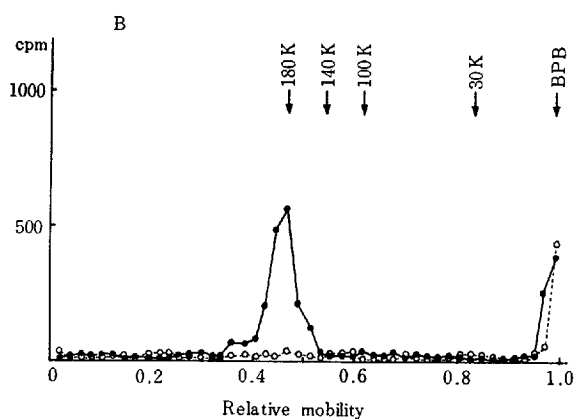
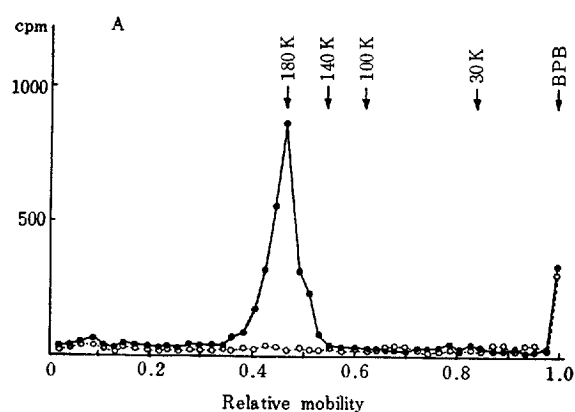


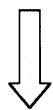
図3 M206 と反応する  $^{125}\text{I}$  ラベル単球細胞表面抗原 5 % SDS-PAGE,  
A : 非還元下, B : 還元下

表3 各モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法による染色パターン

|                          | M206    | OKM1 | anti-Mo1  | anti-Mo2  | 63D3      | Mac120    |
|--------------------------|---------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Monocytic leukemia cells | 3+      | 3+   | 3+        | 3+        | 3+        | N.D.      |
| U937                     | 3+      | N.D. | +         | —         | —         | —         |
| Monocytes                | 3+      | 3+   | 3+        | 3+        | 3+        | 3+        |
| Granulocytes             | +       | 3+   | 3+        | +         | +         | —         |
| T-cells                  | —       | 3+   | —         | —         | —         | —         |
| B-cells                  | —       | —    | —         | —         | —         | —         |
| Null cells               | N.D.    | 3+   | 3+        | —         | N.D.      | N.D.      |
| Cell surface molecules   | 180,000 | N.D. | N.D.      | N.D.      | 200,000   | 120,000   |
| Immunization             | U937    |      | Normal Mφ | Normal Mφ | Normal Mφ | Normal Mφ |

3+ : 蛍光強陽性, + : 弱陽性, — : 陰性

下段の数字は各モノクローナル抗体と反応する単球細胞表面抗原の分子量。



## 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



はじめに

T 細胞, B 細胞, マクロファージなどの免疫担当細胞それぞれの分化段階に存在する細胞表面抗原にむけられたモノクローナル抗体を作成することは免疫不全症における細胞の機能異常が細胞のどのレベルでおこっているのかということを知る上で極めて有用であろうと思われる。今回は機能的ならびに形態学的にヒト成熟マクロファージに近いとされる human histi. ocytic lymphoma cell line U937 で感作された Balb/c 脾細胞とマウスミエローマ細胞 P3U1 を細胞融合することにより, ヒト単球にむけられたモノクローナル抗体を産生する融合細胞(ハイブリドーマ)を得た。この抗体の特異性ならびに意義について述べてみたい。