

氏 名 (本籍)                    やま                    た                    かず                    よし  
山                    田                    和                    義

学 位 の 種 類                    医                    学                    博                    士

学 位 記 番 号                    医                    第                    1 4 6 6                    号

学 位 授 与 年 月 日                    昭 和   5 8   年   2 月   2 3   日

学 位 授 与 の 要 件                    学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                    昭 和 4 9 年 3 月  
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目                    Myeloid Differentiation Antigen defined by a  
Monoclonal Antibody I F 10.  
(顆粒球分化抗原に対するモノクローナル抗体 IF 10 の作製)

(主 査)

論 文 審 査 委 員   教 授   後   藤   由   夫   教 授   吉   永   馨

教 授   橋                    武   彦

# 論文内容要旨

## 緒言

Kohler と Milstein がハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体作製法を開発して以来、種々のリンパ球サブセットに対するモノクローナル抗体が作製され、臨床応用がなされつつある。一方ヒトの顆粒球に対する抗体も近年報告されてきている。今回、我々もハイブリドーマの系を用い、種々のモノクローナル抗体を得たが、中で特に顆粒球系細胞に主に反応するが、他の幼若分化段階にある細胞にも反応する抗体 (IF10) を得たので報告する。

## 方法

ヒト単球性白血病細胞樹立株 THP-1 を 8 週令の BALB/c マウスに 4 回免疫、その脾細胞と BALB/c マウス由来の骨髓腫細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) とをポリエチレングライコールを用いて、Milstein らの方法に準じて細胞融合を行なった。融合後は HAT 培地にて 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下で 2~3 週間培養した。スクリーニングには間接蛍光抗体法を用い、THP-1 に反応する culture well を選び、さらに末梢血細胞分画を用いて正常顆粒球にのみ反応する株を得た。2 度のクローニング後、同一反応性を示すモノクローナル抗体 IF10 を得た。この抗体の反応特異性をみる目的で、正常末梢血分画、骨髓細胞、胸腺細胞、培養細胞株、白血病・リンパ腫細胞との反応性を調べた。又、顆粒球分化抗原に対する抗体であることの証明の為、以下の分化誘導実験も試みた。即ち、ヒト前骨髓球性白血病樹立株 HL-60 は phorbol diester により単球様細胞に、又 retinoic acid (RA) により成熟顆粒球に分化することが知られている。そこで、HL-60 細胞を 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 16 nM 濃度で培養、又は RA 0.5 μM 濃度で培養した。又、ヒト骨髓芽球性白血病樹立株 ML-1 も 16 nM 濃度 TPA 存在下に培養、IF10 の反応性の変化を観察した。

## 結果

アガー二重免疫拡散法により IF10 は IgM 抗体で、細胞障害作用のあることが明らかになった。正常末梢血との反応性は、顆粒球とのみ 100% 強陽性に反応し、単球、T、B リンパ球、赤血球、血小板とは反応しなかった。正常骨髓細胞をファイコールで分けた分画の 61% に反応した。Haegert らのロゼット形成法及び、補体依存性細胞障害試験により、正常骨髓細胞では、骨髓芽球の一部、前骨髓球以下成熟好中球まで IF10 は陽性であった。赤芽球、形質細胞、リンパ球、単球とは反応しなかった。胸腺細胞及び PHA、Con A 刺激リンパ球とも反応しなかった。21 種

類のヒト白血病・リンパ腫培養細胞株との反応は、骨髄性細胞株 (KG-1, ML-1, HL-60), 単球様細胞株 (THP-1, U-937), 骨髄性・赤芽球細胞株 (K-562) のすべてに反応したが, B細胞株 (Raji, Daudi, BALL-1, Oono, A4/Fukuda) とは反応しなかった。T細胞株では、早期胸腺細胞段階の細胞株といわれる (CCRF-CEM, CCRF-HSB, RPMI-8402) と強く反応したが, HPB-ALL, Molt-4F, P12/Ichikawa とはほとんど反応しなかった。成人T細胞性白血病樹立株MT-1とは3.5%弱陽性に反応した。Null細胞株では、NALM-1と4.7%弱陽性に反応し、NALM-16, Reh とは反応しなかった。24例の白血病・悪性リンパ腫細胞との反応は、16例の骨髄性白血病のうち10例陽性であった。4例のリンパ性白血病及び4例の悪性リンパ腫とは反応しなかった。急性骨髄芽球性白血病では半数例に陽性 (4/8) であったが、急性単球性白血病では全例陽性 (3/3) であった。分化誘導時の培養細胞株とIF10の反応性の変化。HL-60をTPAで処理すると単球様細胞に変化し、非特異的エステラーゼ強陽性、貪食能の増加をみた。IF10の反応性は、培養2日目で31%から0%になった。ML-1でも同様の変化を示し、IF10の反応性は培養2日目で92.6%から22%に減少した。又、HL-60をRAで処理すると、NBT還元能、C3レセプター、貪食能の増加がおり、成熟顆粒球に分化した。IF10の反応性は培養2日目で、31%から100%に増加した。

## 考 案 及 び 結 論

ヒト単球様細胞株THP-1を用いて作製したIgM抗体であるIF10は、正常末梢血の顆粒球、及び骨髄系細胞と反応し、単球、T、Bリンパ球と反応しない。培養株では、骨髄性、骨髄・赤芽球性、単球性細胞株のすべてと反応し、T細胞株 (特に幼若T細胞株)、Null細胞株の一部と反応する。急性骨髄性白血病の約半数例と急性単球性白血病の全例に反応するも、リンパ性白血病、悪性リンパ腫とは反応しない。分化誘導実験成績より、IF10の認識する抗原は、成熟顆粒球へと分化するにつれ増加し、単球様細胞に分化すると減少することがわかった。以上より、IF10は、幼若T細胞、幼若顆粒球、幼若単球に存在するが、T細胞、単球へと分化成熟するにつれ失われ、顆粒球系ではずっと存在している抗原を認識しているユニークな抗体と考えられる。尚、この抗原は赤芽球系細胞の非常に幼若な段階にも存在しているかもしれない。これまで報告された顆粒球特異抗体 (My-1, TG-1, FMC 10, 11, 12, 13, D5) とは、IF10がT細胞株に反応するのに対し、これらの抗体が反応しないという点で異なっていると考えられる。

## 審査結果の要旨

山田和義

ハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体作製法の開発以来、種々のリンパ球サブセットに対するモノクローナル抗体が作成され、臨床応用がなされている。この研究は、顆粒球分化抗原に対するモノクローナル抗体の作製と、その反応特異性を明らかにする目的で行なわれたものである。

方法としては、ヒト単球性白血病細胞樹立株 THP-1 で BALB/c マウスを免疫、その脾細胞とマウス骨髄腫細胞とを、ポリエチレングライコールを用いて細胞融合を行い、特異な反応性を有する抗体 IF 10 を得ている。測定には間接蛍光抗体法、ロゼット形成法、補体依存性細胞障害を用いている。化学誘導剤による分化誘導実験も行なつてつぎの成績を得ている。Ig M 抗体である IF 10 は、顆粒球とのみ反応し、T, B リンパ球、マイトーゲン刺激リンパ球、単球、赤血球、血小板とは反応しない。正常骨髄の骨髄芽球の一部、前骨髄球以下成熟好中球まで反応し、赤芽球、形質細胞と反応せず、胸腺細胞とも反応しない。培養株では、骨髄性、骨髄・赤芽球性、単球性細胞株のすべてと反応し、T 細胞株、Null 細胞株の一部と反応し、B 細胞株とは反応しない。急性骨髄性白血病の約半数例と急性単球性白血病の全例に反応するも、リンパ性白血病、悪性リンパ腫とは反応しない。分化誘導実験では、IF 10 の認識する抗原は成熟顆粒球へと分化するにつれ増加し、単球様細胞に分化すると減少する。これらの成績より著者は、IF 10 はこれまで報告された顆粒球特異抗体とは異なり、幼若 T 細胞、幼若顆粒球、幼若単球に存在するが、T 細胞、単球へと分化成熟するにつれ失われ、顆粒球系では全期間を通じて存在する抗原を認識しているユニークな抗体であるとしている。

この研究は新しいモノクローナル抗体を作製し、白血病の診断を容易にしたものであり、学位授与に値する。