

Title	単個細胞レベルにおける抗体産生に関する研究
Author(s)	露口, 泉夫
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29548
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	露 口 泉 夫 つゆ ぐち いず お
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 3 8 7 号
学位授与の日付	昭 和 4 3 年 3 月 2 8 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 内 科 系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文名	単個細胞レベルにおける抗体産生に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 山 村 雄 一 (副査) 教 授 北 川 正 保 教 授 天 野 恒 久

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

従来、細胞レベルでの抗体産生研究法に螢光抗体法と microdrop 法がある。1963年 Jerne らにより簡単に容易に抗体産生細胞を量的に観察し得る、ユニークな Antibody Plaque 法が発表されたが、用いる抗原は赤血球に限られ、蛋白抗原一般については成功をみていない。そこで著者は広く蛋白抗原にも本法が応用でき得る方法を考案しようと試みた。

一方、単個細胞が特異性の異なる二種類の抗体を同時に作り得るか否かに関しては現在賛否両論があるが、今回著者は新しい検出法を開発し、ジアゾ化蛋白で免疫した場合、ハプテンと担体蛋白とに対する抗体が同一細胞で作られるかどうかを明らかにしようとして本研究を行なった。

〔方 法〕

1) 抗原としてブタ血球 (PRC) とヒツジ血球 (SRC) はマウス尾静脈より、牛血清アルブミン (BSA), Sulfanil-azo-BSA, 及び arsanil-azo-BSA は家兎の足蹠皮内にアジュバントと共に夫々注射し、これらの動物の脾臓及び膝窩リンパ節細胞を用いた。

2) Antibody Plaque 法は Jerne らの原法に従った。即ち、被検細胞と target erythrocytes を Eagle-寒天内で 37°C 一時間 incubate し、モルモット補体を加えて出現してくる透明な溶血斑 (plaque) を算え、抗体産生細胞数を測定した。

3) Double Plating 法は著者が新しく開発した法で、target erythrocytes を含む薄い Eagle-寒天層を二枚の slide glass につくり、その間に被検細胞を挟み、incubate 後、両 plate をはがし被検細胞を洗滌して補体を加えた。若し二枚の plate の target erythrocytes が同一で、被検細胞がこの target erythrocytes に対する抗体をつくっている時には、溶血斑は両 plate 上で鏡像の位置に出現する。

4) BSA のヒツジ血球への coupling は後述の如く種々の条件で行ない、ハプテンの coupling はジアゾ法で行なった。¹³¹I-labelled BSA の作製は chloramine-T 法で行ない、radioactivity は well type の scintillation counter で測定した。抗血清の 19S, 7S, 分画の分離は硫酸半飽和沈澱物の Sephadex G-200 によるゲルろ過及び DEAE-Cell-ulose カラムクロマトグラフィーで行なった。又、抗 BSA 抗体の精製には BSA-coupled poly-RSA の immunoabsorbent を用いた。

〔実験成績〕

1) CrCl₃ による BSA のヒツジ血球への coupling について

IgG 及び IgM 抗 BSA 抗体に対し最高の鋭敏度を示す coupling の条件は、種々検討の結果：最終濃度 CrCl₃ 0.25mM, SRC 2.5%, BSA 0.1% で 37°C 一時間反応させることであった。また ¹³¹I-labelled BSA を用いて couple された BSA 量を定量した。本条件下で感作した血球を用いた passive immune hemolysis で検出する IgG 及び IgM 抗 BSA 体の最少量は夫々 0.8γ/ml, 0.09γ/ml で高い鋭敏度を示した。また CrCl₃ による coupling は BSA のみならず IgG やラット血清アルブミンでも可能で、これら感作血球は homologous の抗血清によってのみ溶血反応がおこる点から本反応の特異性がみられた。

2) 抗蛋白質抗体産生細胞の検出法について

上記の至適条件下で作製した BSA-coupled SRC を用い Jerne の方法に準じて抗 BSA 抗体産生細胞の検出を試みた。家兎では一次免疫 8~9 日、二次免疫 3 日に産生細胞数のピークを見、又後期でも抗家兎 IgG モルモット血清の作用で、多数の plaque が出現したが、血清ではほとんど 2-Mercapto-ethanol の作用に安定な抗体であった。又この方法は抗人 IgG, 抗ラット血清アルブミン産生細胞の検出にも応用できることをみとめた。

3) Double Plating 法について

本法の efficiency と specificity をみるため、SRC 免疫マウス脾細胞を、SRC で coat した二枚の plate 間に挟むと、約 84% に plaque が一致した。片方を PRC で coat した plate とすると、この上には全く plaque が出現せず、本法の特異性が確められた。又抗 BSA, 抗 hapten 抗体産生細胞を用いると、夫々の homologous target erythrocytes を用いた場合の efficiency はいずれも 76% であった。

4) 抗ハプテンと抗担体蛋白抗体産生細胞の関係について

Double Plating 法で二枚の plate を夫々、hapten-SRC, BSA-SRC とし、hapten-BSA 免疫の家兎リンパ節又は脾臓細胞を挟んで行なったところ、一次免疫 8, 9 日、二次免疫 3 日では、大部分の細胞はどちらか一方に対する抗体をつくっている single producer であった。

〔総括〕

1) CrCl₃ によるヒツジ血球への BSA coupling の種々の要因の検討の結果、至適条件を明らかにし、本法で作製した感作赤血球による passive immune hemolysis の鋭敏度及び特異性を確立した。

2) 上記の方法で感作した BSA-coupled SRC を用いて Jerne 法を改変し、抗 BSA 抗体産生細胞の検出法を考案した。併せて家兎における抗 BSA 抗体産生細胞の cytokinetics を観察し、又他

の蛋白抗原にも本法が応用しうることを認めた。

3) 単個細胞が二種の特異性をもつ抗体を同時に作りうるかどうかを明らかにしうるユニークな Double Plating 法を考案し、その efficiency と specificity を確立した。

4) ハプテン-アゾ BSA で免疫した家兎のリンパ節及び脾臓内では、抗ハプテン及び抗 BSA 抗体はそれぞれ異なった細胞で作られていることを、Double Plating 法で明らかにした。

論文の審査結果の要旨

Jerne のプラーク形成法はユニークな抗体産生細胞検出法であるが、使用し得る抗原には限度があった。本研究では、この方法を改変し抗蛋白質抗体産生細胞の検出法と、Double producer の迅速かつ容易な検出法という2つの新しい応用範囲を開発、細胞レベルにおける抗体産生機構の解明に寄与するところ大であると考えられる。