

Title	hapten-carrier結合物に対する免疫応答と造血幹細胞動態に関する研究
Author(s)	浜野, 照明
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32464">https://hdl.handle.net/11094/32464</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	ほまのてるあき 浜野照明
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4744 号
学位授与の日付	昭和54年10月27日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	hapten-carrier 結合物に対する免疫応答と造血幹細胞 動態に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 天野 恒久 (副査) 教授 浜岡 利之 教授 近藤 宗平

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目的〕

colony-stimulating factor (CSF)はgranulocyteのhumoral regulatorと考えられている glyco-proteinであり, in vitroにおけるCFU-Cの分化増殖には不可欠の物質である。今までに, in vitroでmitogenやalloantigenでT細胞を刺激した培養液上清には極めて高濃度のCSF活性が存在し, あらかじめin vitroで2,000RのX線照射したallogeneicな脾細胞を投与したマウスの骨髄および脾細胞中のCFU-SおよびCFU-Cは対照群に比し有意に増加しており, T細胞由来の可溶性物質が造血幹細胞の分化増殖に対して何らかの調節機能を有している可能性を示唆した(Hamano, T. et al. Acta Haemat. Jap. 40:62, 1977, Hamano, T. et al. Transplantation 25:23, 1978)。

今回, hapten-carrier 結合物に対する免疫応答における造血幹細胞動態と抗体産生機構に検討を加え, T細胞ならびにB細胞とCFU-Cとの相互関連性を明らかにすることを実験目的とした。

#### 〔材料および方法〕

- ① 実験動物：我々の研究室で継代維持している8～12週令のC57BL/6, B6D2F<sub>1</sub>(C57BL/6×DBA/2)およびBALB/C系のマウスを使用した。
- ② 免疫方法：alumに吸着した200 $\mu$ gのDNP<sub>19</sub>-KLHあるいはDNP<sub>43</sub>-BGGを10<sup>9</sup>個の百日咳菌と共にマウスに腹腔内に注射し, 6～10週後に40 $\mu$ gの同じ抗原で二次免疫を施行して7日後にこれらのマウスを実験に供した。
- ③ CFU-Sのassay：Till-McCulloch法に従い, 800RのX線全身照射後直ちに7.5×10<sup>4</sup> cellsの骨髄細胞または10<sup>6</sup> cellsの脾細胞を静注し, 10日後に生じる脾コロニーを肉眼的に数えた。

- ④ CFU-Cの assay : Metcalfらの軟寒天法に準じて $10^5$  cells/mlの骨髓細胞を含む1 mlの agar culture mediumに活性既知のCSF(ConA-conditioned mediumを使用)を加えて7日間 plastic dishで培養し, 生じたコロニーを倒立顕微鏡でカウントした。
- ⑤ 上清(SUP)の作成 :  $2 \times 10^7$  cells/mlの脾細胞を $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, 200 mM L-glutamine および10% inactivated fetal calf serumを含むRPMI-1640培養液にて $10 \mu\text{g/ml}$ の DNP<sub>19</sub>-KLHまたはDNP<sub>43</sub>-BGGの存在下で通常は24時間培養し, 遠沈して得られる上清(DNP-KLH-SUP or DNP-BGG-SUP)につきCSFおよびhelper T cell factorの活性を調べた。
- ⑥ CSF活性の assay : 軟寒天法により $10^5$  cellsの正常マウス骨髓細胞より形成されるCFU-Cのコロニー数を計算することにより assay した。
- ⑦ helper T cell factor活性の assay : あらかじめ in vitro で抗Thy1血清と補体で処置後のT細胞除去脾細胞を Mishell-Dutton法に従い抗原と共に培養する系にSUPを加えて5日間培養し, 生じた抗体産生細胞をCunninghamの溶血プラーク法にて検出した。
- ⑧ ゲル濾過 : DIAFLO Ultrafiltration membrane PM10にて10倍濃縮したSUPをSephadex G-200を充填したカラム(2.5×90 cm)に添加してゲル濾過を施行し, spectrophotometerで280 nmにおけるODを測定して7つのFractionに分画し, 再び濃縮後実験に供した。
- ⑨ イオン交換クロマトグラフィー : ゲル濾過にて分離したSUPの分画を更にDEAE Sephadex A-50を充填したカラム(2.5×10 cm)に添加し, pH8.1のリン酸緩衝液を使用して0.01 Mから0.15 Mの連続勾配溶出法にてさらに4つのSubfractionに分離し, 各々をリン酸緩衝食塩水にて充分透析後実験に供した。

[成績]

DNP<sub>19</sub>-KLHで二次免疫したマウスの脾臓でのCFU-SおよびCFU-Cはいずれも対照群に比し有意に増加しており, またこれらのマウスの血清中のCSF活性も著増していた。DNP<sub>19</sub>-KLHの抗原刺激により造血幹細胞の分化増殖が亢進すると考えられる。次にSUPのCSF活性を調べると短時間培養でも高い活性を有し, 24時間でピークに達した。しかし, 抗Thy1血清と補体で処置後の脾細胞を培養して得られたSUPにはCSF活性は殆んど認められず, carrier蛋白で刺激をうけたT細胞がCSFを産出するものと考えられる。また, C-57BL/6(H-2<sup>b</sup>)マウス由来のSUPは, DBA/2(H-2<sup>d</sup>), B6D2F<sub>1</sub>(H-2<sup>b</sup>/2<sup>d</sup>), C3H/He(H-2<sup>k</sup>), AKR(H-2<sup>k</sup>)およびA/J(H-2<sup>a</sup>)などのH-2 locusの異なるマウスの骨髓細胞に対しても高いCSF活性を有し, 主要組織適合抗原(MHC)のbarrierを越えて作用すると考えられる。

次にSUPが in vitro での抗体産生機構に如何なる影響をおよぼすかにつき検討を加えた。まず, 抗Thy1血清処置後の脾細胞における primary のS-RBCに対するIgM-PFC反応への効果を調べると, 培養2日目に50%の濃度になる様にSUPを加えると著しいPFC数の増加を認めた。しかし抗Thy1血清処置後の脾細胞培養によって得られたSUPにはT cell replacing factorとしての活性は全く存在しなかった。以上の実験結果は, SUPにはT細胞産生の生物学的作用機序を全く異にする2つのfactorが同時に存在していることを示している。次にSUPをゲル濾過して得られた7つの分画につ

き各々の活性を調べた。尚 helper T cell factor は DNP<sub>19</sub>-KLH で二次免疫を施したマウスより得られた脾細胞を抗 Thy 1 血清処置で T 細胞除去後、抗 DNP-IgG-PFC 反応で assay した。両者とも Fraction V のみに高い活性が存在していることが確認され、marker protein により Fraction V は ovalbumin と pepsin の間に存在し分子量 35,000~45,000 daltons の物質であると推定される。また、DNP-KLH-SUP より得られた Fraction V は DNP<sub>43</sub>-BGG で免疫したマウスの脾細胞に対しても強い helper T cell function を示し、DNP-BGG-SUP より得られた Fraction V は DNP<sub>19</sub>-KLH で免疫した脾細胞に対しても全く同様の作用を有し、この factor は抗原および carrier 蛋白に非特異的な性質を有すると考えられる。また DNP<sub>43</sub>-BGG で二次免疫後の C57BL/6 マウス由来の Fraction V は同じ抗原で免疫した BALB/C マウスの T 細胞除去脾細胞に対しても、抗 DNP-IgG-PFC の反応を十分に惹起することができたことより、CSF と同様に MHC の barrier を越えて作用し得ると考えられる。Fraction V を更に DEAE Sephadex A-50 によるイオン交換クロマトグラフィーにより 4 つの Subfraction に分離して調べると、CSF は Fraction V-2 および V-3、helper T cell factor は Fraction V-4 のみに存在しており、両者は異なった化学的性質を有する物質であると考えられる。

#### 〔総括〕

hapten-carrier 結合物で免疫したマウスの脾臓での CFU-S と CFU-C は対照群に比し著明に増加し、血清中の CSF 活性も有意に上昇していた。また二次免疫後の脾細胞を培養することにより、carrier 蛋白で刺激された T 細胞が短時間内に生物学的作用機序を全く異にする CSF と helper T cell factor を同時に産生することが明らかになった。両者とも MHC の barrier を越えて作用し、後者は抗原および carrier 蛋白に非特異的な factor であった。ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィー法により、両者とも分子量は 35,000~45,000 daltons であるが、全く同一物質ではないと考えられる。以上の実験結果は hapten-carrier 結合物に対する免疫応答において、活性化された T 細胞由来の可溶性物質の存在下で抗体産生機構のみならず造血幹細胞の分化増殖も亢進することを示唆したものであり、T 細胞、B 細胞および CFU-C との密接なる相互関連性を示したものである。

### 論文の審査結果の要旨

hapten-carrier 結合物に対する免疫応答においては、抗体産生機構のみならず造血幹細胞の分化増殖も亢進しており、carrier 蛋白で刺激を受けた脾 T 細胞により colony-stimulating factor と helper T cell-factor が同時に産生され、いずれも分子量 35,000~45,000 daltons の糖蛋白であるが生化学的に全く同一物質ではないことを明らかにした。