



|              |                                                                                                                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | ヒト末梢血リンパ球のin vitroにおける免疫応答V.<br>PHAとプロテインAによるヒトBコロニー形成の誘導とB<br>細胞サブセットの解析                                                                                          |
| Author(s)    | 村口, 篤                                                                                                                                                              |
| Citation     | 大阪大学, 1981, 博士論文                                                                                                                                                   |
| Version Type |                                                                                                                                                                    |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/32700">https://hdl.handle.net/11094/32700</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<br>ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利<br>用をご希望の場合は、<a<br>href="https://www.library.osaka-<br>u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文につい<br>て</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|             |                                                                                     |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名・(本籍)    | 村 口 篤                                                                               |
| 学 位 の 種 類   | 医 学 博 士                                                                             |
| 学 位 記 番 号   | 第 5 2 2 2 号                                                                         |
| 学位授与の日付     | 昭 和 56 年 3 月 25 日                                                                   |
| 学位授与の要件     | 医学研究科 内科系専攻<br>学位規則第5条第1項該当                                                         |
| 学 位 論 文 題 目 | ヒト末梢血リンパ球の <i>in vitro</i> における免疫応答V. PHA<br>とプロテインAによるヒトBコロニー形成の誘導とB細胞<br>サブセットの解析 |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査)<br>教 授 岸 本 忠 三<br>(副査)<br>教 授 濱 岡 利 之 教 授 北 村 幸 彦                              |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

リンパ球は種々の機能をもつ細胞群の集合体である。この集合体を構成するリンパ球サブセットを解析する上において、又この集合体中に存在する異常なリンパ球を検出する上において、単一リンパ球に由来するリンパ球コロニーの作成は有用な手段を提供する。マウスにおいては1975年 Metcalf らがB細胞のコロニー法に成功し、Kincade らはこの方法を用いて自己免疫や免疫不全マウスにおけるB細胞サブセットの機能異常を報告した。

ヒトB細胞コロニー法はSLEなどの自己免疫疾患をB細胞サブセットの機能異常という観点から研究していく上で有用であると考えられる。またB細胞コロニー法を用いることにより、単個B細胞の分裂・分化の機構の解析も可能になるものと期待される。しかし現在までヒトのB細胞コロニーの作成は成功していない。ここではヒトB細胞コロニー法の開発を試み、単個細胞レベルで免疫グロブリンH鎖の転換を解析しうる実験系を確立した。

### 〔方法ならびに成績〕

ヒトB細胞のマイトーゲンとして Phytohemagglutinin(PHA) 及び Staph. aureus より得られたプロテインAを用いた。リンパ球分離は Ficoll-Isopaque による比重遠沈法で行った。T・B細胞の分離は羊赤血球ロゼット法を用いた。寒天培養によるコロニー形成は二段階二層法を用いた。寒天培養は15%牛胎児血清を含む McCoy's-5a 培地を用い、37℃・10%CO<sub>2</sub> インキュベーターで7日間培養を行った。コロニー(50個以上の細胞集団)の数を顕微鏡下で算定すると同時に、マイクロパスツールで個々のコロニーを拾い上げ、コロニー構成細胞の膜表面免疫グロブリン(以下 Ig: Immuno-

globulin) 及び細胞内Igについて調べた。

B細胞をマイトーゲンの存在下でレ線照射したT細胞とともに3日間液体培地で前培養を行った後に、同じマイトーゲンを含む0.5%寒天加培養液と0.3%寒天加培養液の二層からなる寒天培地の upper 層に播種することでコロニー形成が見られた。コロニーは3日目から出現し、6日目まで数・大きさともに増加するが、6日目からは分裂は停止し、10日目以降細胞は死滅していく。PHA, プロテインAコロニー形成の至適濃度はそれぞれ $1.25\mu\text{l/ml}$ ,  $10\mu\text{g/ml}$ であった。コロニーの数は $10^6$ 個の播種細胞あたりPHAの場合 $324\pm 22$ 個, プロテインAの場合 $726\pm 28$ 個であった。コロニーの数と播種細胞数の間に直線関係が見られ、コロニーが1個の細胞に由来することが示された。コロニー構成細胞の性状は、PHAコロニーの場合約90%の細胞が細胞表面Ig<sup>+</sup>(IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>細胞はそれぞれ90%, 43%)であり細胞内Igを有していなかった。プロテインAコロニーは約60%の細胞が細胞表面Ig<sup>+</sup>(IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>はそれぞれ67%, 6%)であり、しかも68%の細胞が細胞内Ig<sup>+</sup>(IgM<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup>, IgA<sup>+</sup>細胞がそれぞれ32%, 18%, 26%)であった。これらの結果はPHA, プロテインAコロニーはB細胞により構成されていること、及びプロテインAコロニー形成細胞においてはB細胞の分裂とともに抗体産生細胞への分化が起ったことを示している。

プロテインAコロニーの細胞内Igを時間的経過を追って調べた結果、IgM<sup>+</sup>, IgG<sup>+</sup>, IgA<sup>+</sup>陽性細胞が一つコロニーの中に連続的に出現することが明らかにされた。すなわちIgM産生細胞が3日目に、IgG産生細胞が4日目に、IgA産生細胞が5日目に出現した。このことは一つのクローン細胞のIgM→IgG→IgAへのH鎖の変換を示唆するものである。PHAとプロテインAの両者を含む寒天培地中に感作細胞を播種した場合、PHA, プロテインA単独で得られるコロニーの数のほぼ和に等しいコロニーが出現し、しかも44%のコロニーが細胞内Ig陽性細胞により構成されていた。この結果よりPHAとプロテインAは異なるB細胞サブセットを刺激してコロニーを誘導することが示唆された。

#### [総括]

PHAとプロテインAを用いてヒトB細胞コロニーを誘導することに成功した。B細胞を照射T細胞とともにマイトーゲンの存在下で前培養を行い、この感作細胞を軟寒天に播種することで、 $10^6$ 個あたり300~700個のコロニー形成が見られた。コロニーはB細胞から成り、PHAコロニーは成熟B細胞, プロテインAコロニーは抗体産生細胞により構成されていた。プロテインAコロニーにおいて、培養開始後3~5日目の間に一つのコロニーの中にIgM, IgG, IgA産生細胞が連続的に出現してくることからIgM→IgG→IgAへのIgH鎖の変換が示唆された。一方、PHAとプロテインAは異なるB細胞サブセットを刺激してコロニー形成を行わしめることを示す結果が得られ、ヒト末梢血B細胞が少なくとも二つの異なるサブセットからなることが実証された。

## 論文の審査結果の要旨

複雑な免疫応答のメカニズムを解析する上においてクローン化リンパ球を用いることは有用な手段

である。本論文はヒトBコロニー法を初めて確立したものである。この方法を用いて、ヒト末梢血B細胞中に少なくとも二種類のB細胞サブセットが存在すること、自己免疫疾患の一つである若年性リウマチ様関節炎（JRA）の患者の末梢血中に異常なB細胞サブセットが存在することが明らかにされた。更に、B細胞が抗体産生細胞へ分化するとき、単個細胞内でIgM→IgG→IgAへと免疫グロブリンH鎖の変換が起こることが示唆された。

このように、本論文により確立されたヒトBコロニー法は、ヒトB細胞サブセットの機能異常の解析や、免疫グロブリンのスイッチング機作の研究に優れた手段を提供するものと思われる。