



Title	B細胞分化因子B151-TRF2による自己抗体産生誘導の免疫遺伝学的解析
Author(s)	村上, 伸也
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/35947
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

B 細胞分化因子 B 1 5 1 - T R F 2 による
自己抗体産生誘導の免疫遺伝学的解析

村 上 伸 也

大 阪 大 学 歯 学 部 口 腔 治 療 学 講 座

(主 任 : 岡 田 宏 教 授)

Immunogenetic analysis of autoantibody
production induced by a B cell
differentiation factor, B151-TRF2

Shinya Murakami

Department of Periodontology and
Endodontology

Osaka University Faculty of Dentistry

(Chairman: Prof. Hiroshi Okada)

[緒 言]

Systemic lupus erythematosus (SLE) の基本的病態として、ヒト及びマウスにおいて、自己抗体産生を伴う、多クローン性B細胞活性化の異常亢進が認められる。この原因としてこれまでの自己免疫疾患を自然発症するモデルマウスの研究から、大別して1) B細胞機能の異常、2) T細胞機能の異常が考えられる。B細胞機能の異常で自己免疫疾患を自然発症するモデルマウスとしては、NZB, (NZB \times NZW)F₁, 及びBXSBなどのマウスが挙げられ、これらマウスのB細胞は、種々のマイトージェン或いはT細胞由来B細胞刺激因子 (B cell-stimulating factor:BSF) に対し、正常マウスB細胞に比し著しく高い応答性を示すことが明らかにされている¹⁾。一方T細胞機能の異常を示すマウスとしては、Thy1⁺, L3T4⁻ T細胞の異常増殖による脾臓及びリンパ節の腫張を伴って自己免疫疾患を発症する MRL/lpr マウスがあり、このマウスのT細胞

は多クローン性 B 細胞分化を誘導する BSF を自然産生していることが報告されている²⁾。また CBA/N マウスに認められる BSF に応答する B 細胞の選択的欠損 (ヘルパー T 細胞との直接接触により活性化される B 細胞機能は正常) を支配する X 染色体連鎖遺伝子 (xid) を NZB, BXSB, 或いは MRL/lpr マウスに組み込み作製した congenic マウスにおいては、自己免疫疾患の発症が抑制されることが明らかにされている^{3, 4, 5)}。以上のことから B 細胞あるいは T 細胞の何れの機能異常に基づく場合でも、自己免疫疾患の発症に T 細胞由来の BSF が重要な役割をはたしていることが明らかである。一方、自己免疫疾患が種々の抗原に対する免疫応答を支配する主要組織適合抗原複合体 (MHC) 遺伝子型と密接に関連している事が報告されているが^{6, 7)}、その遺伝子支配機構に関しては明らかにされていない。

最近、Hamaoka らはマウス T 細胞融合株

B151K12 より産生される B 細胞分化因子 B151

-TRF2 は抗原非感作B細胞に直接作用して自己抗体産生を伴う多クローン性のB細胞分化を誘導することを見い出している^{8, 9)}。また、B151-TRF2の免疫学的及び物理化学的性状は、上記MRL/lprマウス及び慢性graft-vs-host (GVH) 反応により自己免疫疾患が惹起されたマウスのT細胞より産生されるB細胞分化因子ときわめて類似しており、その産生は疾患の発症と密接に関連していることが示されている¹⁰⁾。さらに注目すべきことに、B151-TRF2による自己抗体産生を伴う多クローン性B細胞活性化過程にMHC領域内の自己I領域遺伝子産物(Ia分子)の認識を介したB-B細胞間相互作用が介在していることが明らかにされている^{8, 11)}。

本研究ではIa拘束性B-B細胞間相互作用の観点からB151-TRF2により誘導される自己抗体産生応答の免疫遺伝学的解析を行なった。その結果、自己抗原の1つであるBromelain処理マウス自己赤血球(BrMRBC)に対する自

己抗体産生は、MHC内のI領域遺伝子により調節されていることが明らかにされた。さらに興味ある事に、BrMRBC特異的B細胞の生成がB細胞に発現される自己Ia認識特異性と密接な関連を持っているという全く新しい自己抗体産生応答の遺伝子支配機構が明らかにされた。

[実験材料及び方法]

マウス BALB/cCr, C57BL/10(B10), B10.BR, 及び B10.D2マウスは 静岡県実験動物農業協同組合(静岡) から、

SJL, SJA マウスは五木田商店(東京)から購入した。

B10.S マウスは米国 NIH D. Sachs 博士より恵与された。A.TH, A.TL マウスは、大阪大学医

学部バイオメディカルセンター腫瘍発生学教室において維持されているものを用いた。また、

(B10 x B10.S)F1, (B10 x SJL)F1, (B10 x

A.TH)F1及び(A.TL x A.TH)F1 マウスは大阪大学医学部バイオメディカルセンター腫瘍発生学教室において作成し、実験に供した。

試薬 単クローン性抗-I-A^{k, d} 抗体(10-2.16)

及び抗-I-A^{b, d} 抗体(34-5-3s)は米国 NIH 尾里博士より恵与された^{12, 13)}。これらのハイ

ブリドーマ細胞は in vitro で維持し、それぞれの培養上清を Protein-A Sepharose

(Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala,

Sweden) カラムにて精製したものを、単クロー

ン性抗-Ia 抗体として実験に供した。

B151-TRF2 の調製 B151-TRF2 を含む培養上清 (B151-CFS) は、結核菌感作 BALB/c T 細胞と AKR 由来胸腺腫 BW5147 とを細胞融合して得られた B151K12 T 細胞融合株 (5×10^3 /ml) を抗原刺激なしにローラボトルで6日間培養して調製した^{9, 14)}。培地は、0.5%牛血清アルブミン (BSA: Fraction V, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), $5 \mu\text{g/ml}$ ヒトトランスフェリン、 $5 \mu\text{g/ml}$ 牛インスリンを含む RITC 培養液 (味の素、東京) を用いた。また、精製 B151-TRF2 標品は次に示す方法で調製した。すなわち、B151K12 株を蛋白非添加の RPMI 1640 培地 (日水製薬、東京) で培養した上清を出発材料として、20-55% 硫酸塩析後、0.1M NaCl を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) カラム ($2 \times 18 \text{ cm}$) にかけて、溶出を 0.1M から 0.5M NaCl の直線濃度勾配により行なった。B151-TRF2 活性は 0.25-0.3M NaCl 濃度の画分に回収され

た。更に B151-TRF2 の N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) 鎖に対する特異的結合性を利用して、上述の B151-TRF2 活性画分をリン酸緩衝生理食塩水 (6.7mM PBS, pH 7.2) で透析後、GlcNAc copolymerである chitin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) カラムにかけ、PBS でよく洗浄後、6M グアニジン塩酸溶液 (pH 2.8) での溶出画分を PBS で透析したものを精製 B151-TRF2 標品として実験に供した。

脾臓 B 細胞の調製

抗原非感作マウス脾細胞から単クローン性抗-Thy1.2 抗体 (F7D5; Serotec Ltd, Bicester, UK) と家兎補体処理により、T 細胞を除去したものを B 細胞として用いた。さらにマクロファージ (Mφ) を除去する場合には、Lyらの方法¹⁵⁾ に準じて、Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) カラムに対する付着性を利用してこれを除去した。G-10 カラムを通過した細胞集団に Mφ が含まれていないことは、

1) Mφ 依存性抗原である 2, 4, 6-

trinitrophenyl-Ficoll (TNP-Ficoll) に対する *in vitro*での抗-TNP一次抗体産生応答の消失、或いは2) アロ Mixed leukocyte reaction (MLR) に於いて、G-10カラム非付着性細胞画分の刺激細胞としての機能の消失により確認した。

● B151-TRF2 により誘導される抗体産生の検出

上述のようにして準備された脾臓B細胞を抗原及びマイトージェン非存在下で、B151-TRF2とともに5日間培養し、出現する多クローン性のIgM産生細胞をProtein A (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) 結合羊赤血球 (SRBC) を標的細胞とし、家兎抗-マウスIgM抗血清を *facilitating antibody* として用いたリバーズ plaque-forming cell (PFC) 法により測定した¹⁶⁾。また、一部の実験ではTNP化羊赤血球 (TNP-SRBC) を標的細胞として出現する抗-TNP IgM PFC数を算定する事により、多クローン性B細胞活性化の指標とした。

● 一方培養上清中の総IgM量は培養後7日目に

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて測定した。

in vivo における B151-CFS の Bromelain 処理マウス自己赤血球 (BrMRBC) に対する PFC 誘導能は、正常 B10 congenic マウスの皮下に B151-CFS を 1ml 投与し、5 日後に脾細胞中に出現する抗-BrMRBC PFC により測定した。

in vitro における抗-BrMRBC PFC の誘導は、抗原非感作マウス脾臓 B 細胞を B151-TRF2 とともに 5 日間培養する事により行なった。また、in vitro における抗-ssDNA 抗体の誘導は、抗原非感作マウス脾臓 B 細胞を、B151-TRF2 とともに 7 日間培養し、培養上清中の抗-ssDNA 抗体を ELISA 法により測定した。

培養条件は、抗原非感作 B 細胞 1×10^5 個を 10% 牛胎児血清 (FCS: Irvine Scientific, Santa Ana, Calif.) 及び $5 \times 10^{-5} M$

2-mercaptoethanol (2-ME) 含有 RPMI 1640 培養液で 2ml に懸濁し平底型 24-well プレート

(No. 25820 Corning Glass Works, Corning, NY)

にて、5%CO₂ 37°Cの条件下で incubateした。

抗-BrMRBC PFC 測定法 マウス赤血球を

Cunninghamの方法¹⁷⁾に準じて Bromelain 処理した。即ち、BALB/c及びB10 マウス末梢血を650xG 5分間遠心して得た赤血球と、20mg/ml Bromelain(和光純薬工業、大阪)及び10mg/ml BSAを含むPBS溶液(pH7.2)を、容積比1:1で混合した後、37°Cにて30分間 incubateし、BrMRBCを作成した。この赤血球を標的細胞として、抗-BrMRBC PFCを測定した。なお、補体源としては、正常家兔血清を用いた。

抗-ssDNA抗体及び総IgM抗体測定法 仔牛胸

腺DNA(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)を100°C温浴中で熱処理後、氷上にて急冷したものを抗原(一本鎖DNA:ssDNA)として用い、1mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA:和光純薬工業、大阪)添加PBSにて50μg/mlに調整し、96-well ELISA用プレート(住友ベークライト、東京)に添加し、

37°Cにて1時間 incubateした。プレートを洗浄後、EDTAを最終濃度10mMになるように添加した培養上清を、50 μ l/well添加した。37°Cにて1時間 incubateした後プレートを洗浄し、標識抗体添加後、更に37°Cにて30分間 incubateした後、プレートを洗浄し基質を添加して呈色反応を起こさせた。酵素反応は10% H₂SO₄を加え中止させた。なお標識抗体には Peroxidase結合家兔抗-マウス Ig(G+A+M)抗体 (Zymed laboratories, Inc. San Francisco, CA) を用いた。また各ステップでの洗浄には0.05% Tween20 (和光純薬工業、大阪) 添加PBSを用いた。基質には o-phenylenediamine (和光純薬工業、大阪) を用い、OD₄₉₀は Immuno Reader NJ-2000 (日本インターメッド、東京) にて測定した。標準抗体として、MRL/lprの血清をあらかじめ用意し、この血清を400倍希釈したものを200 units/mlとし、試料のunit数を算定した。

培養上清中の総IgMの測定には、家兔抗-

マウス IgM 抗体 (Zymed laboratories, Inc. San Francisco, CA) を ELISA 用 プレート に 被覆 し、標 識 抗 体 と し て Peroxidase 結 合 家 兔 抗 - マウス IgM 抗 体 (Zymed laboratories, Inc. San Francisco, CA) を 用 い る 事 に よ り 測 定 し た。標 準 抗 体 と し て は MOPC104E ミ ャ ロ ー マ 蛋 白 (IgM, $\mu\lambda$, Litton Bionetics, Inc.

Kensington, MD) を 使 用 し、そ の 他 の 方 法 に つ い て は、上 述 の 方 法 に 準 じ て 測 定 し た。

限界希釈法による TNP 及び BrMRBC 特異的 B 細胞クローンの頻度解析 B151-TRF2 応答性 B

細胞中の TNP 及び BrMRBC 特異的 B 細胞クローンの頻度は、Portnoi らの方法¹⁸⁾を改良し決定した。B10 及び B10.S の T 細胞除去脾細胞を種々の細胞濃度につき 48wells ずつ B151-TRF2 (10%) 及び feeder cells と共に 96-well マイクロプレート (No. 25860 Corning Glass Works, Corning, N.Y.) で 5 日間培養した。

Feeder cells と し て は、同 系 の T 細 胞 除 去 脾 臓 細 胞 を マ イ ト マ イ シ ン C (MMC、協和マイ

トマイシン S、協和発酵、東京) 処理

(1×10^7 / $50 \mu\text{g/ml}$, 37°C 45分間 incubation)

したものを 5×10^4 /well 加えた。応答細胞と feeder cellsのみで培養した群を negative control とし、それぞれの細胞濃度につき 24 wells ずつ準備した。この negative control の (算術平均) + (3 x 標準偏差) の PFC 数をこえる well を陽性として、各細胞濃度における陽性 well の割合を決定した。

F1マウス B (F1B) 細胞の分画 100mm のプラスチックディッシュ (No. 25020 Corning Glass Works, Corning, N.Y.) に 8ml の poly-L-lysine (PLL) 溶液 ($50 \mu\text{g/ml}$) を加え室温で 60分間放置する事により、ディッシュへ PLL を固定した。ハンクス緩衝液 (HBSS) で洗浄後、ディッシュに 1.2×10^8 個の B10 或いは SJL または B10.S マウス脾臓 B 細胞を 12ml の HBSS に浮遊して加え室温で 30分間静置した。HBSS で洗浄後、被覆されていない PLL を飽和する目的で、10% FCS を含む RPMI 1640 培養液 8ml を

添加し室温で15分間静置した。以上の操作で調製した親脾臓B細胞結合ディッシュを2000R照射した後、(B10 x SJL)F1 及び (B10 x B10.S)F1B細胞 5×10^7 個を12mlのRPMI 1640培養液(10%FCS 及び 2.5×10^{-5} M 2-ME含有)に浮遊して加えた。そして時々穏やかに攪拌しながら37°C、90分間 incubateした後、非付着性のF1B細胞を取り除いた。親脾臓B細胞に付着したF1B細胞は10%FCS及び50mM EDTAを含むPBS溶液(pH 7.2)を8ml添加し37°C、10分間の incubationの後、pipettingにより回収し、HBSSで良く洗浄後応答性B細胞として実験に供した。

[結 果]

I 領域 遺伝子 による 抗 - BrMRBC 抗体 産生 の 調節

自己抗原の1つと考えられるBrMRBCに対する抗体産生応答の遺伝子支配を解析する目的でH-2領域の遺伝子のみが異なるB10 congenicマウスの抗-BrMRBC PFC応答を調べた。

先ずB151-TRF2のin vivo投与により誘導される抗-BrMRBC PFC応答のマウス系統間での差異を検討した所、図-1に示す如く、B10(H-2^b)、B10.BR(H-2^k)及びB10.D2(H-2^d)マウスは著明な抗-BrMRBC PFC応答を示すのに対してB10.S(H-2^s)マウスは低レベルの抗-BrMRBC PFC応答しか示さなかった。しかしB10.SマウスはリバーソPFC法で検出される総IgM抗体産生細胞数及び多クローン性に誘導される抗-TNP IgM PFC数に於いて他の系統のマウスと同程度の応答性を示した。

次に in vivo の実験により明らかになった B10.S マウスの選択的な抗-BrMRBC PFC 低応答性の成立に T 細胞や Mφ が関与しているか否かを検討する目的で、前述の B10 congenic マウス脾細胞中より T 細胞及び Mφ を可及的に除去した精製脾臓 B 細胞を in vitro で B151-

● TRF2 と共に培養し、誘導されてくる抗-BrMRBC PFC 応答を検討した。図-2 に示すように B10, B10.BR, 及び B10.D2 マウスの B 細胞は B151-TRF2 に応答して著明な抗-BrMRBC PFC を生成したが、B10.S (H-2^s) マウス B 細胞では、用いた何れの濃度の B151-TRF2 によっても低い応答性しか誘導されなかった。しかしながら、in vivo の実験結果と同様に、

B10.S B 細胞のリバーズ PFC 及び抗-TNP IgM PFC 応答性は、他の H-2 ハプロタイプのマウス B 細胞とほぼ同程度の応答性を示す事が明らかとなった。以上の如く、H-2^s ハプロタイプを有する B10.S マウス B 細胞は、抗-

● BrMRBC PFC の選択的低応答性を示す事から、

B151-TRF2 による抗-BrMRBC PFC 応答において H-2 遺伝子が B 細胞の応答性を調節していることが示された。

更にこの点を確認する目的で B10.S 以外の H-2^a ハプロタイプを有するマウスの抗-BrMRBC PFC 応答に関して検討を加えた。即ち、SJL マウス (H-2^a, Igh^b) とその Igh アロタイプの congenic マウスである SJA マウス (H-2^a, Igh^a) 及び、対照として BrMRBC 高応答性である BALB/c (H-2^d, Igh^a) マウスの B 細胞の抗-BrMRBC PFC 応答性を調べた。図-3 に示すように、いずれのマウス B 細胞とも B151-TRF2 に反応して著明なリパーズ PFC を生成するが、抗-BrMRBC PFC 応答性に関しては、B10.S B 細胞と同様に SJL, SJA において選択的低応答性が認められた。以上の結果より、抗-BrMRBC PFC の選択的低応答性が、H-2^a 遺伝子により調節されていることが明らかとなった。更にこの低応答性が Igh アロタイプの違いによるものではないことも示唆さ

れた。

そこで H-2 遺伝子領域内の何れの遺伝子により抗-BrMRBC PFC の応答性が支配されているのかを検討する目的で、I 領域遺伝子が異なる congenic マウスである A.TH ($K^s I^s D^d$) 及び A.TL ($K^s I^k D^d$) を用いて検討した。図-4 に示すように I 領域が I^k の対立遺伝子を有する A.TL マウス B 細胞は B151-TRF2 に応答して、抗-BrMRBC PFC, リバーズ PFC 及び多クローン性抗-TNP PFC を生成したのに対して、 I^s の対立遺伝子を有する A.TH マウス B 細胞は、H-2^s 遺伝子を有するマウス B 細胞と同様に抗-BrMRBC PFC の選択的な低応答性を示した。ここで A.TL と A.TH の H-2 遺伝子は I 領域以外に Qa-1 及び Tla 遺伝子を異にすることが知られている。しかし Qa-1, Tla 遺伝子座に A.TH と同様の対立遺伝子を有する B10.BRB 細胞が、図-2 で示した様に抗-BrMRBC PFC 高応答性であることから、抗-BrMRBC PFC 低応答性は I 領域遺伝子により規定されていると結論される。

又、抗-BrMRBC PFC 高応答性のマウス

(High Responder)と低応答性を示すマウス

(Low Responder)との交配により得られた種

々の F1 hybrid マウスの抗-BrMRBC 応答性を

調べた所、図-5から明らかなように、これら

(High Responder x Low Responder) F1 B細胞

はそれぞれの親の中間の抗-BrMRBC PFC 応答

性を示した。この事より、I 領域遺伝子によ

り支配される抗-BrMRBC PFC 応答性は共優性

に遺伝する形質であることが明らかとなった。

次に BrMRBC 以外の自己抗原に対する免疫応

答に関しても、同様に H-2 複合体内の I 領域

遺伝子によりその応答性が調節されているか

否かを検討する目的で、B151-TRF2 により誘

導される in vitro 抗-ssDNA 抗体産生を検討

した。図-6に示す如く、抗-BrMRBC PFC 低応

答性の B10.S マウス B細胞に於いても、他の

高応答性マウス B細胞と同レベルの抗-ssDNA

抗体の産生が認められた。この事から I^A ハ

プロタイプのマウス B細胞はすべての自己抗

体産生において低応答性を示すのではないことが明らかとなった。

B151-TRF2 により誘導される抗-BrMRBC PFC 応答性の kinetics

H-2^a 遺伝子を有するマウスで認められる抗-BrMRBC PFC 低応答性が、抗-BrMRBC PFC 応答の kinetics の差によるものか否かを明らかにする目的で、抗-BrMRBC PFC 高応答性 B10 マウス B 細胞と低応答性 B10.S マウス B 細胞をそれぞれ、B151-TRF2 とともに培養し、培養開始 3 日後、5 日後、7 日後の抗-BrMRBC PFC 応答及び多クローン性抗-TNP IgM PFC 応答を調べた。結果は図-7に示すように、抗-TNP PFC 応答に関しては、この期間中 B10 及び B10.S B 細胞ともほぼ同レベルのマグニチュードであった。一方抗-BrMRBC PFC 応答に関しては B10 及び B10.S マウス B 細胞とも 5 日目に、maximum response を呈するが、前述のごとく B10.S マウス B 細胞は B10 マウス B 細胞に比較し明らかに低応答性であり、か

つ、7日目には抗-BrMRBC PFC が更に減少している事より、B10.S マウス B 細胞で検出される抗-BrMRBC PFC 低応答性は、他のマウスとの kinetics の差によるものではない事が明らかとなった。

抗-BrMRBC PFC 低応答性成立における抑制性細胞の介在に関する検討

I^a の対立遺伝子を有するマウスで認められる抗-BrMRBC PFC 低応答性の成立に、抑制性細胞が関与しているか否かを検討した。即ち抗-BrMRBC PFC 応答性の (B10 x A.TH)F1 及び (B10 x B10.S)F1 B 細胞を B151-TRF2 とともに培養する際に、種々の細胞数の抗-BrMRBC PFC 低応答性 A.TH 及び B10.S マウス B 細胞をそれぞれ培養系に加え、抗-BrMRBC PFC 応答が抑制されるか否かを検討した。表-1に示したように A.TH 及び B10.S の脾臓 B 細胞を B151-TRF2 との培養系にそれぞれ添加していても (B10 x A.TH)F1 及び (B10 x B10.S)F1 B 細胞の抗-BrMRBC PFC 応答は何ら影響を受ける

事はなかった。この事は多クローン性抗-TNP IgM PFC に関しても同様であった。以上の結果より、I^s の対立遺伝子を有するマウスの BrMRBC に対する抗体産生の低応答性は、抑制性細胞によりもたらされるのではないことが確かめられた。

I^s ハプロタイプのマウスにおける BrMRBC 特異的 B 細胞クローンの頻度解析

I^s ハプロタイプのマウスの B 細胞は選択的な抗-BrMRBC PFC の低応答性を示すこと、また (High Responder x Low Responder)F1 の B 細胞はそれぞれの親の中間の抗-BrMRBC PFC 応答性を示すことから、I^s ハプロタイプのマウスにおいて、BrMRBC 特異的 B 細胞のクローンサイズが他のマウスに比較して著明に小さい可能性が考えられる。この可能性を検討する目的で、B10 及び B10.S マウスの B151-TRF2 応答性 BrMRBC 特異的 B 細胞クローンの頻度を限界希釈法により測定した。図-8に示す様に B10 及び B10.S マウスの B151-TRF2 応

答性 TNP 特異的 B 細胞クローンの頻度は、それぞれ $1/1.10 \times 10^4$, $1/1.17 \times 10^4$ で両者に有意な差異は認められなかった。このとき、B151-TRF2 応答性 BrMRBC 特異的 B 細胞クローンの頻度を比較すると、B10 及び B10.S でそれぞれ $1/7.7 \times 10^3$, $1/3.8 \times 10^4$ となり、

B10.S マウスにおいて、BrMRBC 特異的 B 細胞クローンが、B10 マウスのそれと比較して約 $1/5$ のクローンサイズしかないことが明らかとなった。以上のことから、 I^k のハプロタイプを有するマウスにおいては、BrMRBC 特異的 B 細胞クローンのクローンサイズが、他のマウスに比較して著しく小さく、そのために選択的な抗-BrMRBC PFC 低応答性を呈しているということが明らかとなった。

B 細胞の示す自己 Ia 認識特異性が BrMRBC 特異的 B 細胞クローンの生成にはたす役割

Hamaoka らはこれ迄に、B151-TRF2 による多クローン性 B 細胞分化誘導過程に、自己 I 領域遺伝子産物 (Ia 分子) の認識を介した B-B 細

胞間相互作用が介在しており、その反応は抗-Ia抗体により阻害されることを明らかにしている^{8, 11)}。またB151-TRF2による抗-BrMRBC抗体産生系においても、自己Ia分子の認識を介したB細胞活性化過程が関与していることが明らかにされている¹⁰⁾。そこで、(High Responder x Low Responder)F1B細胞の抗-BrMRBC PFC応答に対して、それぞれの親のIa分子に対する抗体がいかなる影響を及ぼすか検討した。その結果図-9に示すように、B10マウス或いはSJL及びB10.SマウスB細胞のB151-TRF2による抗-TNP PFCの誘導はそれぞれ抗-I-A^b或いは抗-I-A^s抗体で阻害された。又、B10マウスB細胞の抗-BrMRBC PFC応答は抗-I-A^b抗体によってのみ抑制された。ところが興味あることに(B10 x SJL)F1及び(B10 x B10.S)F1 (H-2^{b/m}) B細胞の抗-BrMRBC PFC応答は、抗-I-A^b抗体で著明に抑制されたが抗-I-A^s抗体では殆ど阻害されなかった。これまでの解析でB151-TRF2応

答性 F1 B 細胞集団はそれぞれの親の Ia 分子を認識する亜集団に分画されることが明らかにされているので¹⁹⁾、上記の結果は、(B10 x SJL)F1 及び (B10 x B10.S)F1 B 細胞は Ia^b 或いは Ia^s 分子をそれぞれ認識する亜集団にわかれ、Ia^s 分子を認識する亜集団が抗 -

BrMRBC PFC の選択的低応答性を示している可能性を示唆する。そこでこの可能性を検討するために、B10 及び SJL 或いは B10.S B 細胞をプラスチックディッシュに poly-L-lysine を介して固定し、X 線照射後に (B10 x SJL) F1 或いは (B10 x B10.S)F1 B 細胞を加え一定時間 incubate した後、それぞれの親 B 細胞 monolayer に付着性の F1 B 細胞を分取し、B151-TRF2 と 5 日間培養し、出現する PFC を測定した。図-10 に示すように、自己 Ia^b 認識特異性を示す B10 B 細胞 monolayer 付着性 F1 B 細胞は抗-TNP PFC 及び抗-BrMRBC PFC を生成したが、自己 Ia^s 認識特異性を示す SJL B 細胞 monolayer 及び B10.S B 細胞

monolayer 付着性 F1B 細胞画分は SJL 及び
B10.S B 細胞と同様に選択的な抗-BrMRBC
PFC の低応答性を示した。このことから、

(H-2^b x H-2^s) F1 B 細胞集団のなかでも自
己 Ia^s 分子認識特異性を示す B 細胞亜集団が
抗-BrMRBC PFC の選択的低応答性を示す事が
明らかとなった。即ち B 細胞の自己 Ia 分子認
識特異性が BrMRBC 特異的 B 細胞クローンの生
成に影響を及ぼすことが明らかとなった。

【 考 察 】

本研究で、SLE 様 自 己 免 疫 疾 患 の 発 症 に 密 接 に 関 連 し て い る と 考 え ら れ る 多 ク ロ ー ン 性 B 細 胞 分 化 因 子 B151-TRF2 を 用 い て 自 己 抗 体 産 生 の 1 つ と 考 え ら れ る 抗 -BrMRBC PFC 応 答 性 の 免 疫 遺 伝 学 的 解 析 を 試 み た 。 そ の 結 果 、

I^a の ハ プ ロ タ イ プ を 有 す る マ ウ ス は 低 応 答 性 を 示 す こ と 、 即 ち MHC 内 の I 領 域 遺 伝 子 に よ り 抗 -BrMRBC PFC 応 答 性 が 調 節 さ れ て い る こ と が 明 ら か と な っ た (図 -2, 3, 4) 。 こ こ で 注 目 す べ き 点 は 、 in vitro で の B151-TRF2 に よ る 抗 -BrMRBC PFC 誘 導 系 に T 細 胞 も Mφ も 関 与 し て い な い こ と で あ る 。 こ れ ま で の 研 究 で MHC 内 の I 領 域 遺 伝 子 が 免 疫 応 答 の 高 低 を 調 節 す る こ と が 明 ら か に さ れ て い る が ²⁰⁾ 、 そ の 遺 伝 子 支 配 機 構 の 解 析 の 多 く は B 細 胞 の 抗 体 産 生 細 胞 へ の 分 化 を ヘ ル プ す る T 細 胞 に 関 し て な さ れ て き た ^{20, 21)} 。 本 研 究 で 示 さ れ た T 細 胞 非 存 在 下 で の MHC 遺 伝 子 に よ る B 細 胞 免 疫 応 答 の 調 節 は 、 全 く 新 し い 免 疫 応 答 の

遺伝子支配機構の存在を示すものである。なお、I^aハプロタイプのマウスB細胞はB151-TRF2に反応して、高応答性B細胞と同程度の抗-TNP及び抗-ssDNA抗体産生を示すので(図-2、3、4、6) I^aマウスの抗-BrMRBC PFC低応答性は、B細胞のB151-TRF2に対する応答性に起因するものではないことは明らかである。

I^aのハプロタイプを有するマウスで認められる抗-BrMRBC PFC低応答性がBrMRBC上のいかなる抗原決定基に対する低応答性であるのかは現在のところ不明である。しかし、結果には示していないが、抗-BrMRBC PFC高応答性のB10マウス由来のBrMRBCと、抗-BrMRBC PFC低応答性のB10.Sマウス由来のBrMRBCをそれぞれ標的細胞として用い、これらBrMRBCに対するB10.SマウスB細胞の抗-BrMRBC PFC応答を検討したところ、同系のBrMRBCに対しても同種異系のBrMRBCに対してもB10.SマウスB細胞は抗-BrMRBC PFC低応

答性を示した。このことから I^s のハプロタイプを有するマウスで認められる抗-BrMRBC PFC 低応答性は、BrMRBC上のアロ抗原に対する低応答性ではなく BrMRBC上に共通して存在する構造に対する低応答性と考えられる。

● 限界希釈法による頻度解析の結果、 I^s のハプロタイプを有するマウスは、正常マウスと比較し BrMRBC特異的 B細胞のクローンサイズが約 $1/5$ である事が示されたので (図-8)、I領域遺伝子により、BrMRBC特異的 B細胞クローンの生成が調節されていることが明らかとなった。尚、結果には示していないが Lipopolysaccharideにより抗-BrMRBC PFC を誘導した際にも I^s のハプロタイプを有するマウスは選択的な抗-BrMRBC PFC 低応答性を示す事から、抗-BrMRBC PFC 低応答性マウスでみられる BrMRBC特異的 B細胞クローンの頻度の低さは、B151-TRF2 応答性 B細胞亜集団に限局したものではないと考えられる。

● Hayakawaら^{22, 23)}は抗-BrMRBC 抗体産生及

び抗-ssDNA抗体産生に、T細胞分化抗原であるLy1抗原を細胞表面に有するLy1⁺B細胞が深く関与していること、及び腹腔浸出細胞(PEC)中のLy1⁺B細胞の存在率にマウス系統間での差異があることを報告している。したがって、I^{*}のハプロタイプを有するマウスにおいて、選択的にLy1⁺B細胞亜集団が減少しているため、選択的な抗-BrMRBC PFC低応答性が成立している可能性が考えられる。しかし、彼らも報告しているように、脾臓細胞中のLy1⁺B細胞の存在率には著しいマウス系統間での差異はみられず、PEC中の

Ly1⁺B細胞の存在率に関しても、A.TLとA.THはほぼ同程度であると報告していることから考えて、抗-BrMRBC PFC低応答性がLy1⁺B細胞の存在率の差を反映しているものとは考えがたい。事実、結果には示していないが脾臓B細胞中のLy1⁺B細胞を抗-Ly1+補体処理により可及的に除去しても抗-BrMRBC PFC応答には全く影響を及ぼさなかった。

一般に T 細胞の示す自己 Ia 認識特異性は、T 細胞前駆細胞の遺伝子型ではなく、X 線抵抗性の胸腺上皮細胞の H-2 ハプロタイプにより決定され、かつその特異性は、T 細胞免疫応答の遺伝子支配と密接に関連することが知られている^{20, 21)}。従って I^a のハプロタイプを有するマウスにおいて、自己 Ia^a 認識特異性を示す T 細胞が BrMRBC 特異的 B 細胞クローンの生成に影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし、結果には示していないが、低応答性マウス (H-2^a) の骨髓細胞を X 線照射 (H-2^b x H-2^a) F1 マウスに移入して作成したキメラマウスの T 細胞は Ia^a のみならず Ia^b 拘束性を示すにも拘らず、上記キメラマウスの B 細胞は依然として抗-BrMRBC PFC 低応答性を示すことを見いだしている。従って T 細胞の示す自己 Ia^a 認識特異性が BrMRBC 特異的 B 細胞クローンの生成に影響を及ぼすわけではないものと思われる。

Hamaoka らはこれ迄に、B151-TRF2 による多ク

ローン性 B 細胞分化過程に、自己 Ia 分子の認識を介した B-B 細胞間相互作用が介在している事^{8, 11)}、又、B151-TRF2 応答性 F1 B 細胞集団は、親 B 細胞からなる monolayer に対する結合能によりそれぞれの親の Ia 分子を認識する少なくとも 2 つの亜集団から構成される事^{8, 19)}を明らかにしている。本研究において、興味あることに抗-BrMRBC PFC 高応答性 B10 (H-2^b) マウスと低応答性 SJL, B10.S (H-2^s) マウスとの交配により作成した (B10 x SJL)F1 及び (B10 x B10.S)F1 (H-2^{b/s}) B 細胞をそれぞれの親脾臓 B 細胞 monolayer で分画した所、B10 B 細胞 monolayer 付着性 F1 B 細胞 (Ia^b 認識特異性を示す) は抗-BrMRBC PFC を生成するのに対して、SJL 及び B10.S B 細胞 monolayer 付着性 F1 B 細胞 (Ia^s 認識特異性を示す) は、殆ど抗-BrMRBC PFC を生成しないことが明らかとなった (図-10)。即ち、I^s のハプロタイプを有するマウスの選択的な抗-BrMRBC PFC 低応

答性はB細胞の示す自己Ia認識特異性と密接に関連していること、換言すれば、B細胞の示す自己Ia認識特異性がB細胞のレパートリー形成に影響を及ぼす事が示された。

尚今回の研究で(High Responder x Low Responder)F1B細胞の抗-BrMRBC PFC応答が、抗-Ia^a抗体により部分的に阻害されているのが観察されたが(図-9)、これはF1B細胞中にF1マウスユニークなIa分子を認識するB細胞亜集団が存在し、このような亜集団においては、BrMRBC特異的クローンが正常レベル存在する可能性を示唆しているものと思われる。

今回の研究により、MHC内のI領域遺伝子によりBrMRBCに対する抗体産生が調節されていること、そしてその免疫応答遺伝子支配がB細胞レベルに発現されている事が明らかとなった。又、I^aハプロタイプを有するマウスにおいてBrMRBC特異的クローンの頻度が低いために抗-BrMRBC PFCの低応答性がもたら

されることが明らかになった。さらにその低応答性は、T細胞非依存性に決定されるB細胞の示す自己Ia認識特異性に起因している事が示された。これらの事実はB細胞免疫応答の遺伝子支配機構に関する全く新しいモデルを提唱するものと考えられる。

ある種のSLE疾患発症が、ある特定のHLA-DR遺伝子（マウスのI領域遺伝子に対応）型と密接に連鎖することが、報告されてはいるが^{6,7)}、その遺伝子支配機構は今までほとんど明らかにされていない。更に、Adelmanらは、SLE様自己免疫疾患を自然発症する(NZB x NZW)F1マウスに抗-Ia抗体を投与すると、免疫複合体の沈着により惹起される腎疾患の発症が抑えられることを報告しており、自己免疫疾患の発症とマウスI領域遺伝子産物（Ia分子）との間に何らかの因果関係が存在していることを示唆している²⁴⁾。従って、本研究で明らかにされたB細胞免疫応答の新しい遺伝子支配機構に関する知見は、SLE疾

患発症のみならず病巣局所において自己抗体
産生を伴う多クローン性B細胞活性化が認め
られる歯周疾患²⁵⁾の病態の解明に重要な手
がかりを与えるものと思われる。

〔 結 論 〕

SLE 様 モデル マウス に 於 い て 自 己 免 疫 疾 患
の 発 症 に 密 接 に 連 関 し て い る 多 ク ロ ー ン 性 B
細 胞 分 化 因 子 B151-TRF2 に よ る 自 己 抗 体 産 生
応 答 の 免 疫 遺 伝 学 的 解 析 に よ り、 抗 -BrMRBC
抗 体 産 生 は、 H-2 複 合 体 内 の I 領 域 遺 伝 子 に
よ り 調 節 さ れ て い る こ と が 明 か と な っ た。 即
ち I^a の ハ プ ロ タ イ プ を 有 す る マ ウ ス は
BrMRBC 特 異 的 B 細 胞 の ク ロ ー ン サ イ ズ が 小 さ
い 為 に 抗 -BrMRBC 抗 体 産 生 の 低 応 答 性 を 示 す
こ と が 明 ら か と な っ た。 更 に B 細 胞 の 示 す 自
己 I^a 認 識 特 異 性 が BrMRBC 特 異 的 B 細 胞 ク ロ ー
ン の 生 成 に 重 要 な 役 割 を 果 た し て い る こ と が
示 さ れ た。 以 上 の 結 果 は、 B 細 胞 の 示 す 自 己
I^a 認 識 特 異 性 が 免 疫 グ ロ ブ リ ン レ パ ー ト リ ー
形 成 に 深 い 関 わ り を 持 つ と い う B 細 胞 免 疫 応
答 の 全 く 新 し い 遺 伝 子 支 配 機 構 の 存 在 を 示 す
も の で あ る。

〔 謝 辞 〕

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った、大阪大学歯学部口腔治療学講座岡田宏教授、並びに大阪大学医学部バイオメディカルセンター腫瘍発生学部門濱岡利之教授に心より感謝いたします。

また、本研究を進めるにあたり、終始適切な御助言と御教示を賜った大阪大学医学部バイオメディカルセンター腫瘍発生学部門小野史郎博士に深く感謝いたします。

最後に、本研究の遂行にご協力を戴いた、大阪大学歯学部口腔治療学講座の皆様、並びに大阪大学医学部バイオメディカルセンター腫瘍発生学部門の皆様に深く感謝いたします。

Immunogenetic Analysis of Autoantibody Production Induced by a B Cell
Differentiation Factor, B151-TRF2

Shinya MURAKAMI

Department of Periodontology and Endodontology
Osaka University Faculty of Dentistry
1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

key words: Polyclonal B cell differentiation factor, B151-TRF2 ·

Autoantibody production · I-region control ·

Self-Ia-recognition specificity by B cells

Autoantibody responses induced by polyclonal B cell differentiation factor, B151-TRF2 were immunogenetically analyzed by using various congenic mice. It was revealed that B cells with I^S allele failed to generate anti-Bromelain-treated mouse red blood cells (BrMRBC) PFC response, representing one of autoantibody responses, whereas they gave rise to reverse IgM PFC, polyclonal anti-TNP IgM PFC and anti-ssDNA antibody responses comparable to those of the other H-2

haplotype strains. Furthermore, it was clearly demonstrated that B cells specific for BrMRBC were low frequent in mice with I^S allele by limiting dilution analysis.

In addition, interesting to note was the fact that when (high responder $H-2^b$ x low responder $H-2^S$)F1 B cells were fractionated by their ability to bind to either one of monolayers of parental B cells, the F1 B cells adherent to $H-2^b$ monolayer gave rise to anti-BrMRBC and anti-TNP PFC responses comparable to B10 B cells, whereas those adherent to the $H-2^S$ monolayer exhibited selective low anti-BrMRBC PFC response like as parental $H-2^S$ B cells. Thus, these results provide the first direct evidence showing that selective low PFC response to BrMRBC of B cells bearing I^S allele ascribed to the self-Ia-recognition specificity expressed by B151-TRF2-responsive B cells.

This finding has important implication to the problems of the MHC-linked Ir-gene control of B cell response, especially generation of antibody repertoire. Moreover, the present results provide a new insight into basic mechanism underlying autoimmune disease.

[文献]

- 1) Prud'homme, G.J., Balderas R.S., Dixon F.J. and Theofilopoulos, A.N. (1983): B cell dependence on and response to accessory signals in murine lupus strains. J. Exp. Med., 157, 1815-1827.
- 2) Prud'homme, G.J., Park, C.L., Fieser, T.M., Kofler, R., Dixon, F. J. and Theofilopoulos, A.N. (1983): Identification of a B cell differentiation factor(s) spontaneously produced by proliferating T cells in murine lupus strains of the lpr/lpr genotype. J. Exp. Med., 157, 730-742.
- 3) Smathers, P.A., Steinberg, B.J., Reeves, J.P. and Steinberg, A. D. (1982): Effect of polyclonal immune stimulators upon NZB. xid congenic mice. J. Immunol., 128, 1414-1419.
- 4) Golding, B., Golding, H., Foiles, P.G. and Morton, J.I. (1983): CBA/N X-linked defect delays expression of the Y-linked accelerated autoimmune disease in BXSB mice. J. Immunol., 130, 1043-1046.
- 5) Steinberg, E.B., Santoro, T.J., Chused, T.M., Smathers, P.A. and Steinberg, A.D. (1983): Studies of congenic MRL-lpr/lpr mice. J. Immunol., 131, 2789-2795.
- 6) Reinertsen, J.L., Klippel, J.H., Johnson, A.H., Steinberg, A.D.

and Decker, J.L. (1982): Family studies of B lymphocyte alloantigens in systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol., 9, 253-262.

7) Smith, H.R. and Steinberg, A.D. (1983): Autoimmunity- a perspective. Ann. Rev. Immunol., 1, 175-210.

8) Hamaoka, T. and Ono, S. (1986): Regulation of B-cell differentiation: Interaction of factors and corresponding receptors. Ann. Rev. Immunol., 4, 167-204.

9) Ono, S., Hayashi, S.I., Takahama, Y., Dobashi, K., Katoh, Y., Nakanishi, K., Paul, W.E. and Hamaoka, T. (1986): Identification of two distinct factors, B151-TRF1 and B151-TRF2, inducing differentiation of activated B cells and small resting B cells into antibody-producing cells. J. Immunol., 137: 187-196.

10) Dobashi, K., Ono, S., Murakami, S., Takahama, Y., Katoh, Y. and Hamaoka, T. (1987): Polyclonal B cell activation by a B cell differentiation factor, B151-TRF2. III B151-TRF2 as a B cell differentiation factor closely associated with autoimmune disease. J. Immunol., 138, 780-787.

11) Ono, S., Takahama, Y. and Hamaoka, T. (1986): Polyclonal B cell

activation by a B cell differentiation factor, B151-TRF2.

I. Involvement of self-Ia recognition process mediated by B cells. J. Immunol., 137, 1149-1156.

12) Oi, V.T., Jones, P.P., Golding, J.W., Herzenberg, L.A. and Herzenberg, L.A. (1978): Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2, and Ia antigens. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 115-129.

13) Ozato, K., Mayer, N.M. and Sachs, D.H. (1982): Monoclonal antibodies to mouse major histocompatibility complex antigens. IV. A series of hybridoma clones producing anti-H-2^d antibodies and an examination of expression of H-2^d antigens on the surface of these cells. Transplantation, 34, 113-120

14) Takatsu, K., Tominaga, A. and Hamaoka, T. (1980): Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). I. Functional characterization of a TRF-producing helper T cell subset and genetic studies on the production. J. Immunol., 124, 2414-2422.

15) Ly, I.A. and Mishell, R.I. (1974): Separation of mouse spleen cells by passage through columns of Sephadex G-10.

J.Immunol.Meth.,5,239-247.

16) Gronowicz,E.,Coutinho,A.and Melcher,F.(1976):A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class. Eur.J.Immunol.,6,588-590.

17) Cunningham,A.J.(1974):Large numbers of cells in normal mice produce antibody components of isologous erythrocytes. Nature ,252,749-751.

18) Portnoi,D.,Freitas,A.,Holmberg,D.,Bandeira,A.and Coutinho,A.(1986):Immunocompetent autoreactive B lymphocytes are activated cycling cells in normal mice. J.Exp.Med.,164, 25-35.

19) Takahama,Y.,Ono,S.and Hamaoka,T.(1987):Polyclonal B-cell activation by a B-cell differentiation factor B151-TRF2.IV. B151-TRF2-responsive F1 B cells consist of two separate populations capable of recognizing only one of the parental I-A products expressed on B cells. J.Mol.Cell.Immunol.,3,177-194.

20) Schwartz,R.H.(1986):Immune response (Ir) genes of the murine major histocompatibility complex. Adv.Immunol.,38,31-201.

- 21) Klein, J. (1984): What causes immunological nonresponsiveness? Immunol. Rev., 81, 177-202.
- 22) Hardy, R. R. and Hayakawa, K. (1986): Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog, Leu-1 B. Immunol. Rev., 93, 53-79.
- 23) Hayakawa, K., Hardy, R. R., and Herzenberg, L. A. (1986): Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. Eur. J. Immunol., 16, 450-456.
- 24) Adelman, N. E., Watling, D. L. and McDevitt, H. C. (1983): Treatment of (NZBxNZW)F1 disease with anti-I-A monoclonal antibody. J. Exp. Med., 158, 1350-1355.
- 25) Gargiulo, A. V., Robinson, J., Toto, P. D. and Gargiulo, A. W. (1982): Identification of rheumatoid factor in periodontal disease. J. Periodontol., 53, 568-577.

〔 脚 注 〕

大 阪 大 学 歯 学 部 口 腔 治 療 学 講 座

(主 任 : 岡 田 宏 教 授)

本 論 文 の 要 旨 は 第 1 6 回 日 本 免 疫 学 会 総 会
(昭 和 6 1 年 1 2 月 、 東 京) に お い て 発 表 し
た 。

図 - 1 B10 congenicマウスへの B151-TRF2
の in vivo 投与により誘導される抗-BrMRBC
PFC、リバーズPFC、及び抗-TNP PFC応答

抗原非感作 B10 (●)、B10.BR (▲)、
B10.D2 (■)、及び B10.S (○) マウス背部
皮下に B151-CFSを 1 ml注射し、5日後に脾臓
細胞中に誘導される PFC を検出した。図中の
Noneは生理食塩水投与群を表わしている。結
果は4匹のマウスの PFC 数の算術平均及び標
準誤差で表わしている。

図 - 2 B10 congenicマウス B細胞の B151-
TRF2により誘導される in vitro 抗-BrMRBC
PFC、リバーズ PFC、及び抗-TNP PFC応答

抗原非感作 B10 (●)、B10.BR (▲)、
B10.D2 (■)、及び B10.S (○) 脾臓 B細胞
(1×10^6 /well) を、B151-TRF2 とともに 5
日間培養し、誘導される抗-BrMRBC PFC、リ
バーズ PFC、及び抗-TNP PFCを測定した。結
果は3wellsの算術平均と標準誤差で表わして

いる。

図 - 3 SJL、SJA マウス B 細胞の B151-TRF2
により誘導される抗-BrMRBC PFC 及びリバー
ス PFC 応答

抗原非感作 BALB/c (▲)、SJA (●)、及
び SJL (○) 脾臓 B 細胞 (1×10^6 /well) を
B151-TRF2 とともに 5 日間培養し、誘導され
る PFC を測定した。結果は 3 wells の算術平均
と標準誤差で表わしている。

図 - 4 B151-TRF2 により誘導される抗-
BrMRBC PFC 応答性の I 領域遺伝子による調節

抗原非感作 A.TL (●)、A.TH (○) 脾臓 B
細胞 (1×10^6 /well) を B151-TRF2 とともに
5 日間培養し、誘導される PFC を測定した。
結果は 3 wells の算術平均と標準誤差で表わし
ている。

● 図 - 5 抗-BrMRBC PFC 高応答性マウスと低

応答性マウスの交配により作製した F1B 細胞
の B151-TRF2 により誘導される 抗-BrMRBC
PFC 応答

抗原非感作マウス脾臓 B 細胞 (1×10^6 /
well) を、B151-TRF2 (5%) と共に 5 日間培養
した。それぞれの %response は、各群の高応
答性マウスの示す 抗-BrMRBC PFC 応答及び 抗
-TNP PFC 応答をそれぞれ 100% として表示して
いる。

図 - 6 B10 congenic マウス B 細胞の B151-
TRF2 により誘導される 抗-ssDNA 抗体産生

抗原非感作 B10、B10.BR、B10.D2、及び
B10.S 脾臓 B 細胞 (1×10^6 / well) を B151-
TRF2 (5%) とともに 7 日間培養し、培養上清中
に産生される総 IgM 量、抗-ssDNA 抗体を
ELISA 法により測定した。

図 - 7 B151-TRF2 により誘導される 抗 -

BrMRBC PFC 応答の kinetics

抗原非感作 B10 (●) 及び B10.S (○) マウス脾臓 B 細胞を B151-TRF2 (5%) とともに培養し、培養開始後 3 日目、5 日目、及び 7 日目に誘導される抗-BrMRBC PFC 及び抗-TNP PFC を測定した。結果は 3 wells の算術平均と標準誤差で表わしている。

図 - 8 限界希釈法による BrMRBC 特異的 B 細胞クローンの頻度解析

抗原非感作 B10 (●) 及び B10.S (○) マウス脾臓 B 細胞をそれぞれの細胞濃度で、B151-TRF2 (10%) 及び MMC 処理した同系の T 細胞除去脾臓細胞 (feeder cell: 5×10^4 /well) と共に 5 日間培養した。応答細胞と feeder cells のみで培養した群を negative control とし、(negative control で出現する PFC 数の算術平均) + (3x 標準偏差) をこえる PFC 数を示す well を陽性として、各細胞濃度における陽性 well の割合を決定し、頻度解析を行った。

図 - 9 (B10 x SJL)F1 及び (B10 x B10.S)F1 脾臓 B 細胞の抗-BrMRBC PFC 応答の抗-I-A^b 抗体による選択的抑制

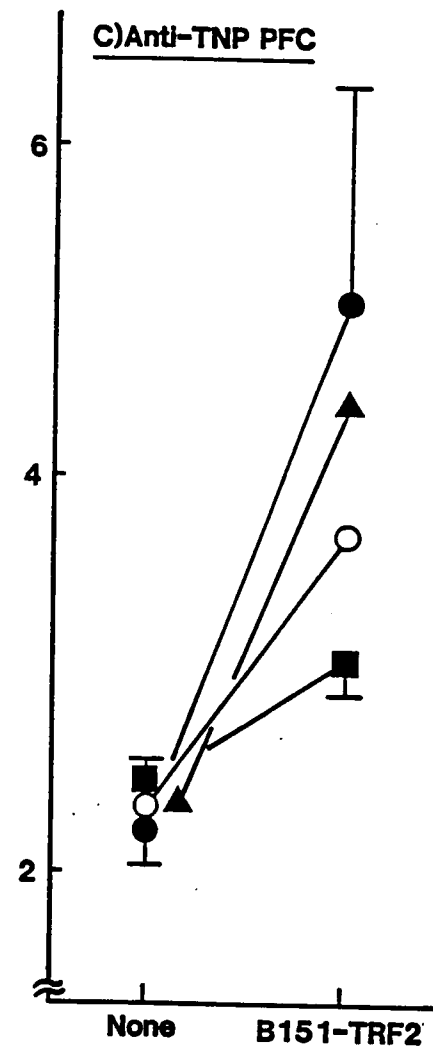
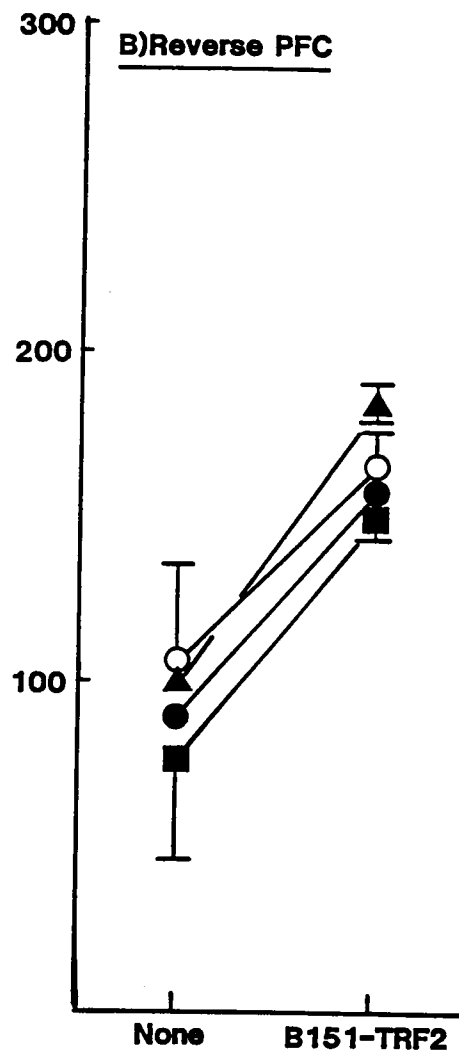
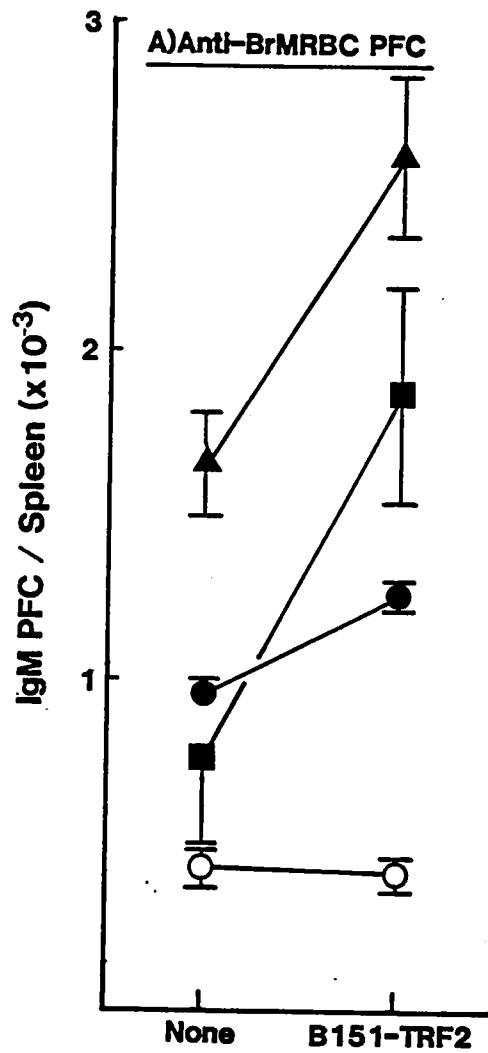
(B10 x SJL)F1 及び (B10 x B10.S)F1 脾臓 B 細胞 (1×10^5 /well) を抗-I-A^b 抗体及び抗-I-A^a 抗体の存在下で B151-TRF2 (5%) と共に 5 日間培養した。

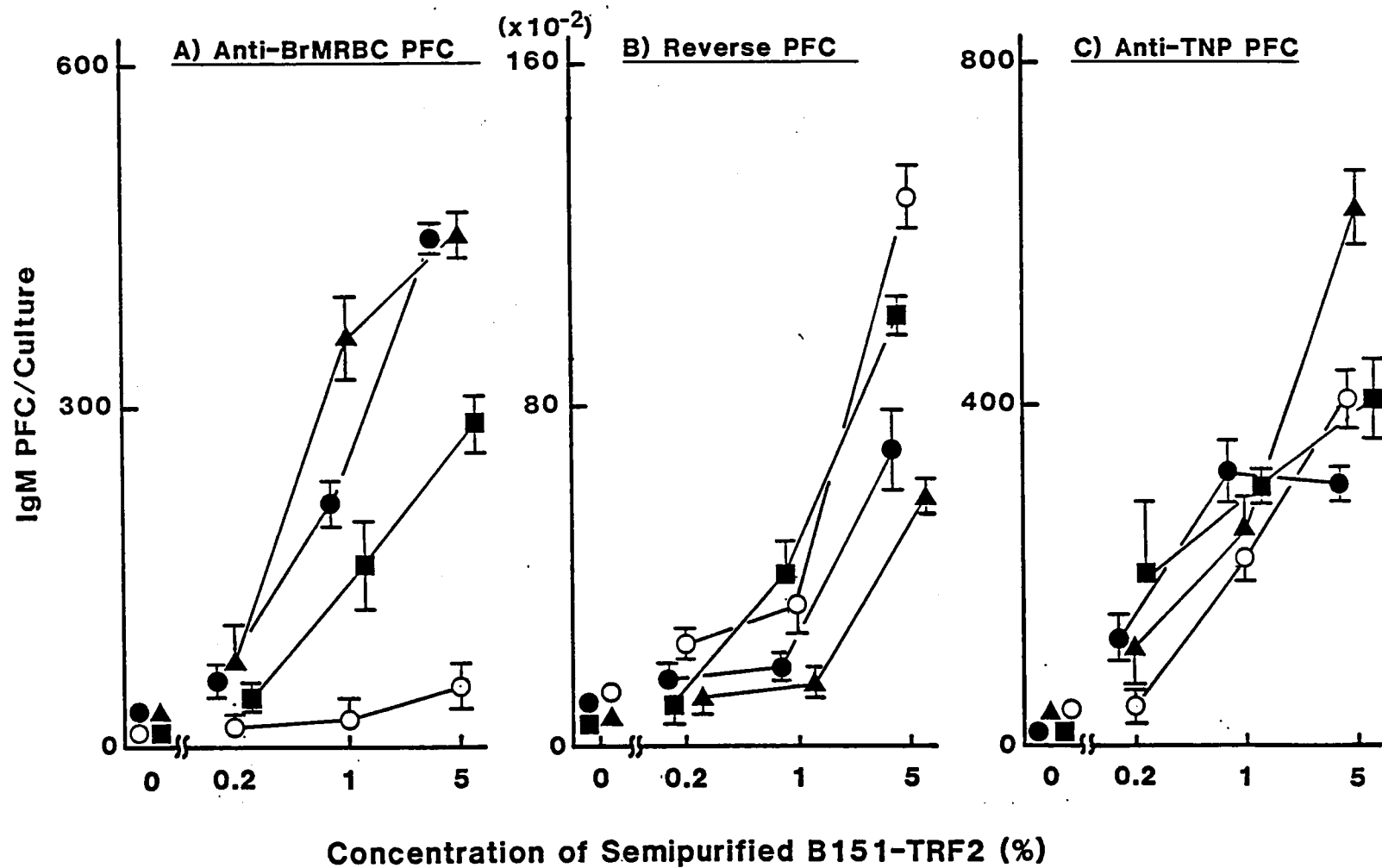
$\% \text{response} = 100 \times (\text{抗-I-A抗体存在下でのPFC} / \text{抗-I-A抗体非存在下でのPFC})$

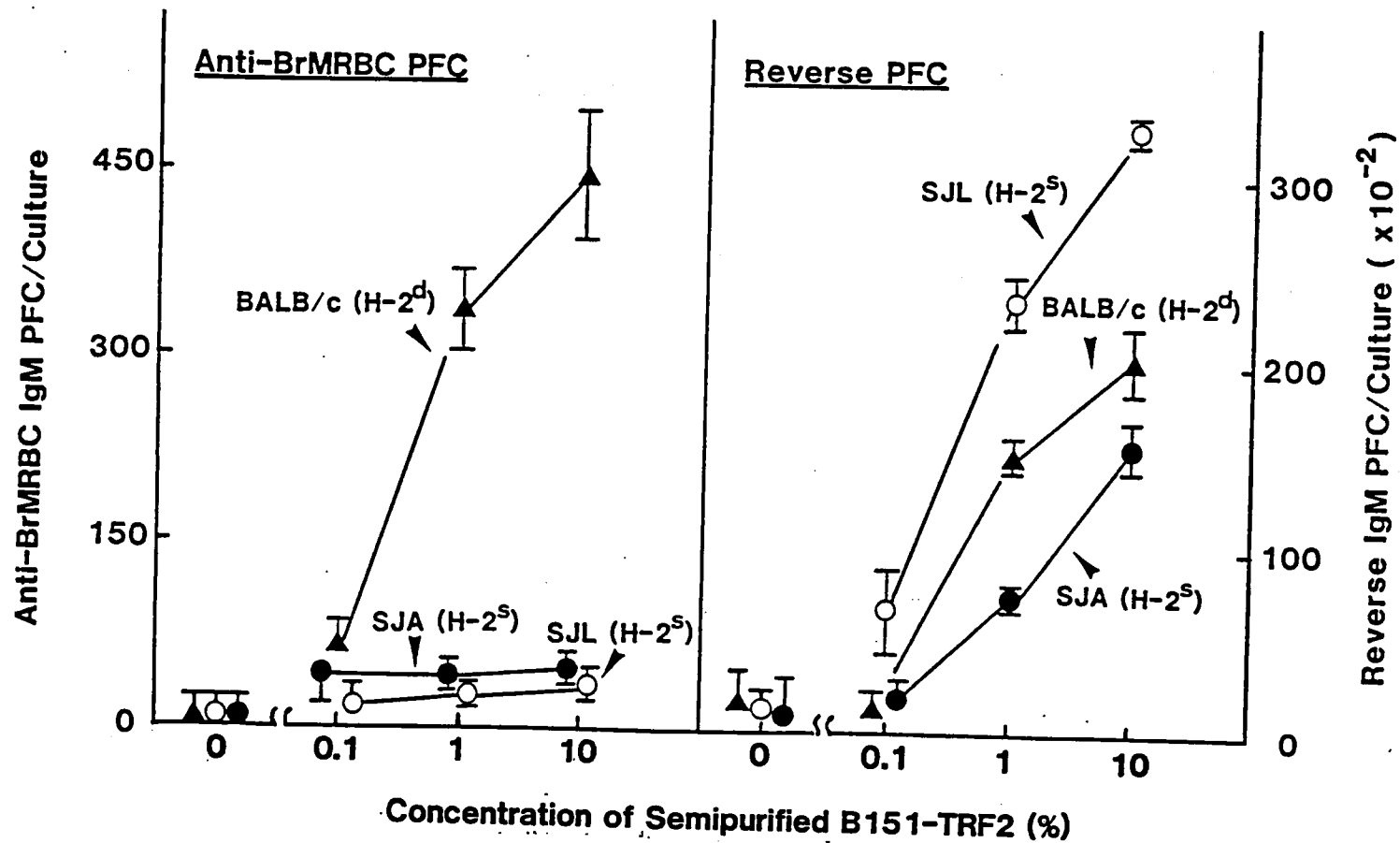
図 - 10 H-2^a monolayer に付着性の (B10 x SJL)F1 及び (B10 x B10.S)F1 B 細胞の選択的抗-BrMRBC PFC 低応答性

(B10 x SJL)F1 及び (B10 x B10.S)F1 脾臓 B 細胞を "実験材料及び方法" の項で記した手法にしたがって、それぞれの親脾臓 B 細胞の monolayer に付着性を示す細胞集団に分画した。さらに、未分画及び分画した F1B 細胞 (1×10^5 /well) を B151-TRF2 (10%) と共に 5

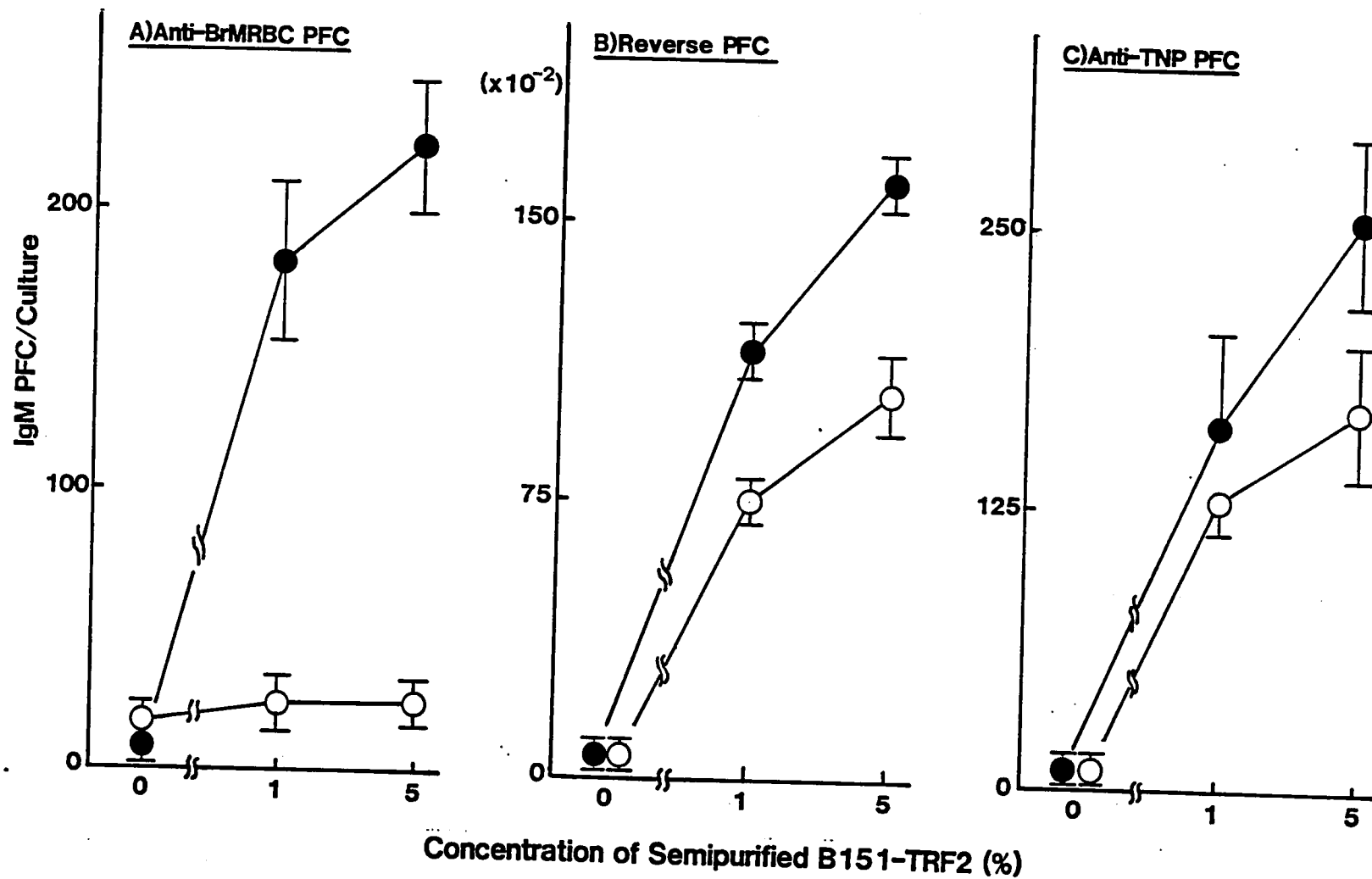
日間培養し誘導される抗-BrMRBC PFC 及び抗-TNP PFCを検出した。Exp.1 は (B10 x SJL) F1の Exp.2 は (B10 x B10.S)F1 の脾臓 B 細胞を分画した結果をそれぞれ示している。



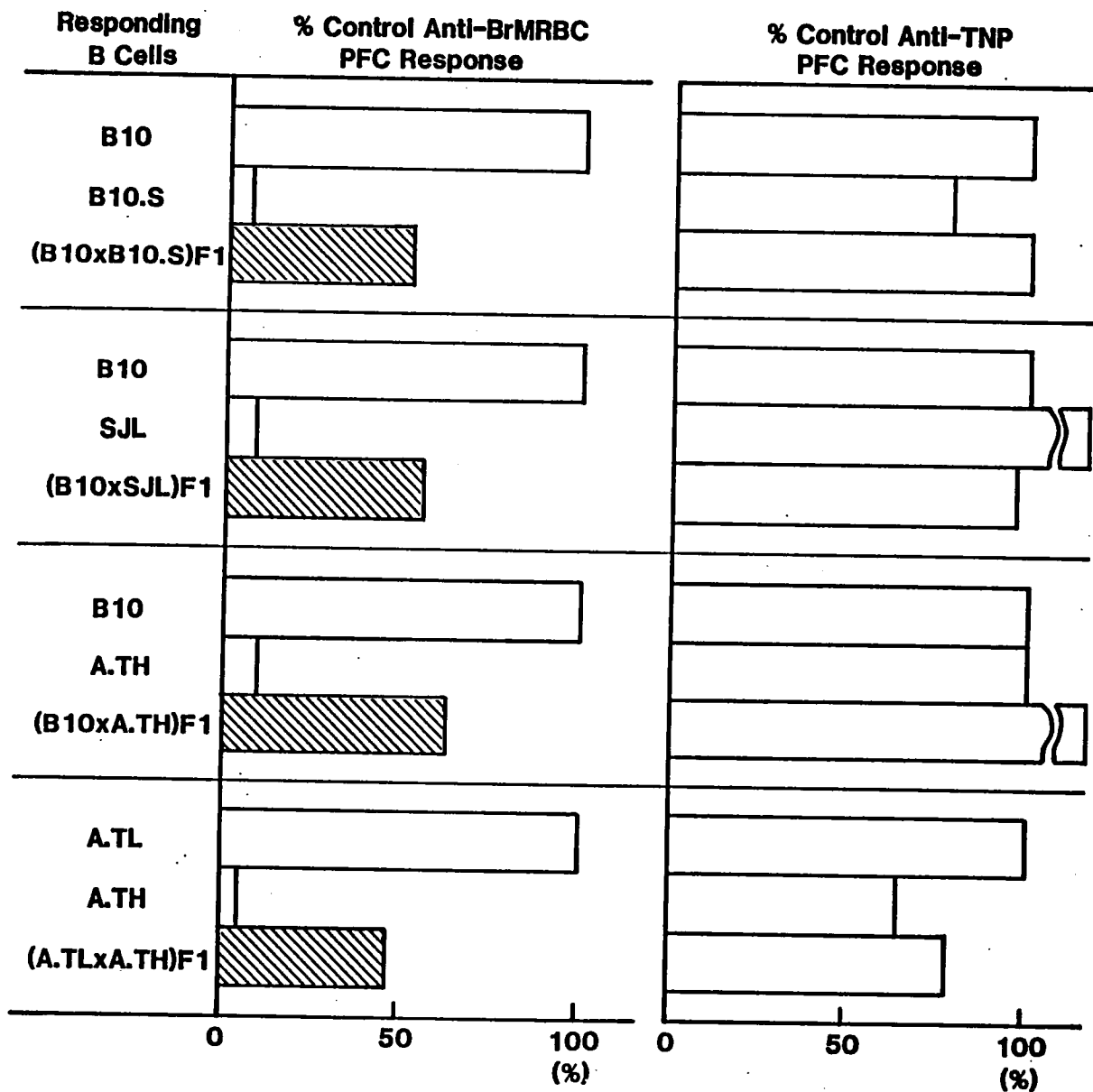




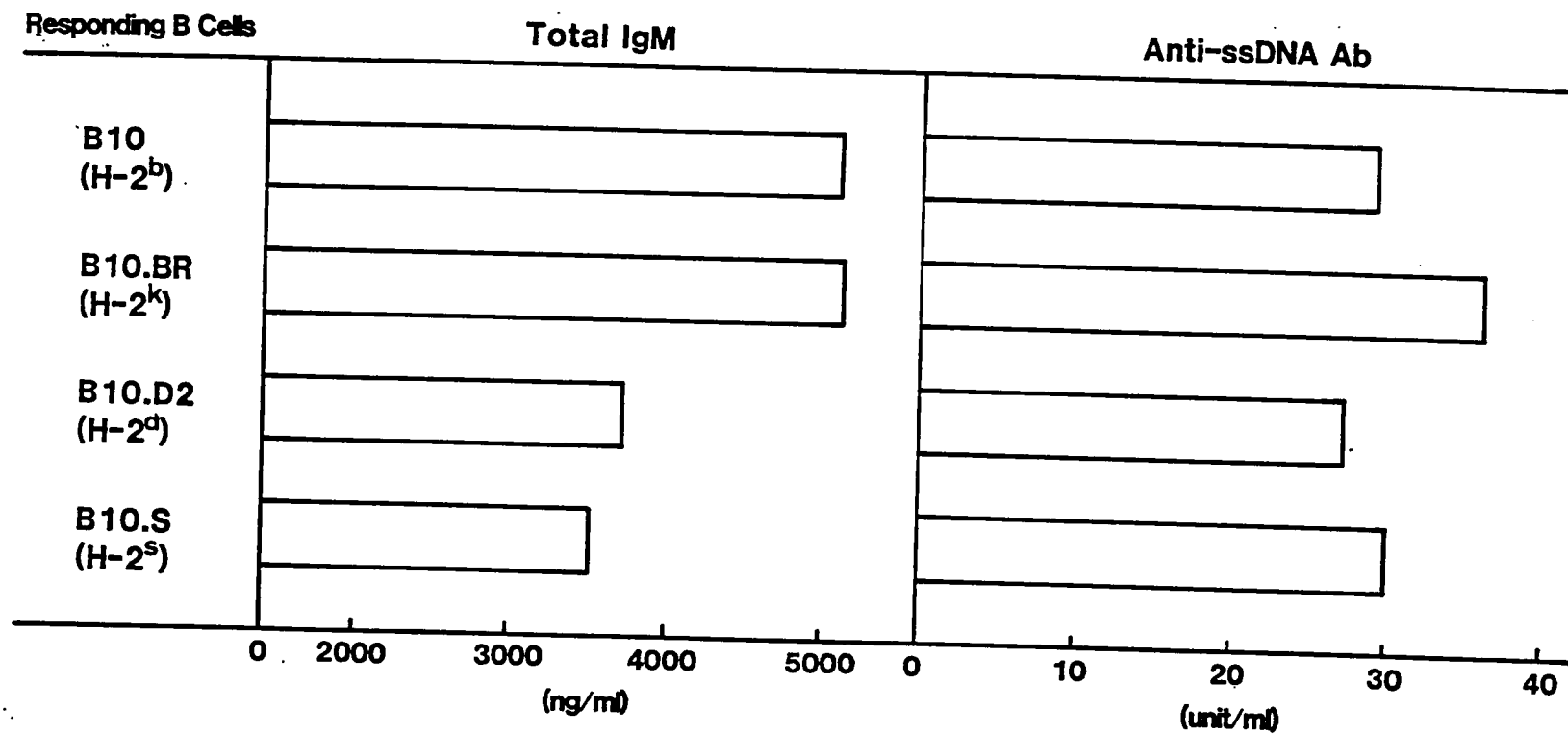
☒ - 4



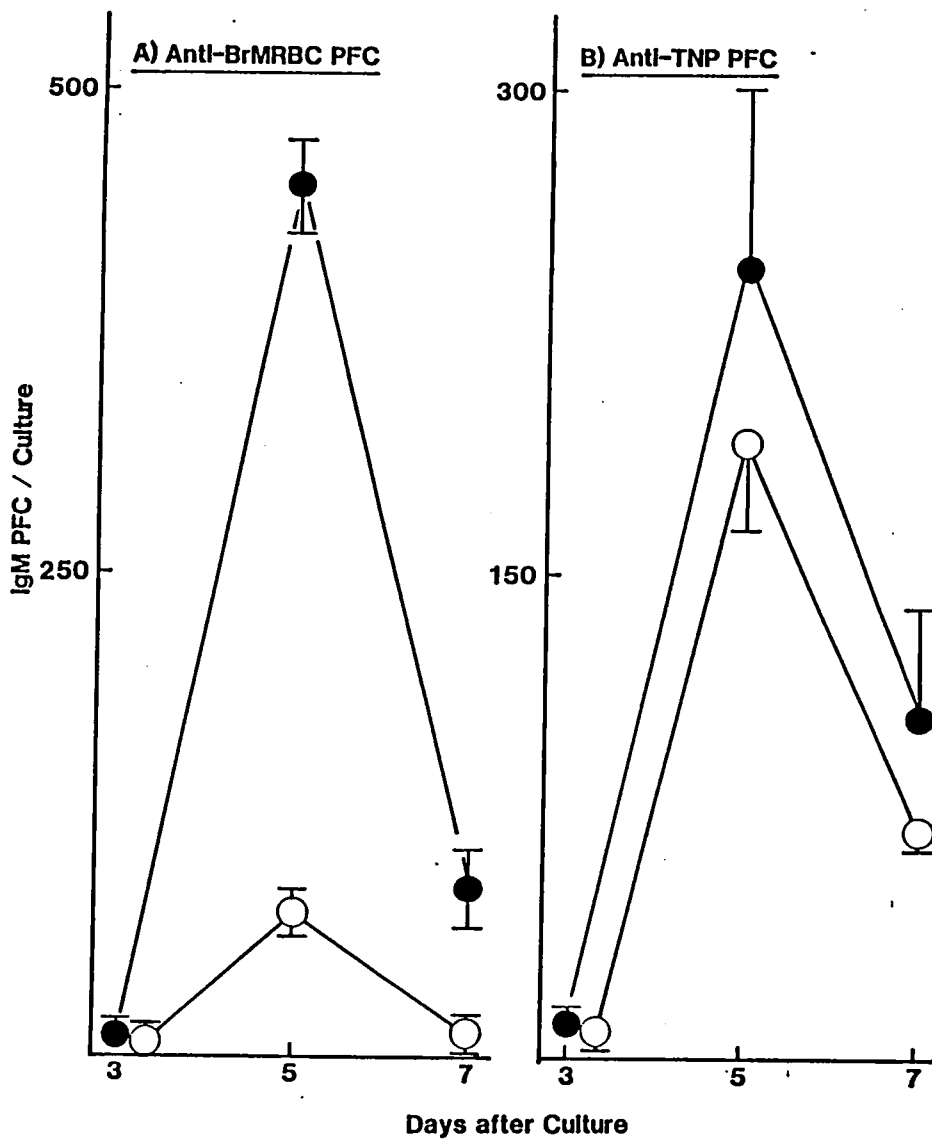
☒ - ↓



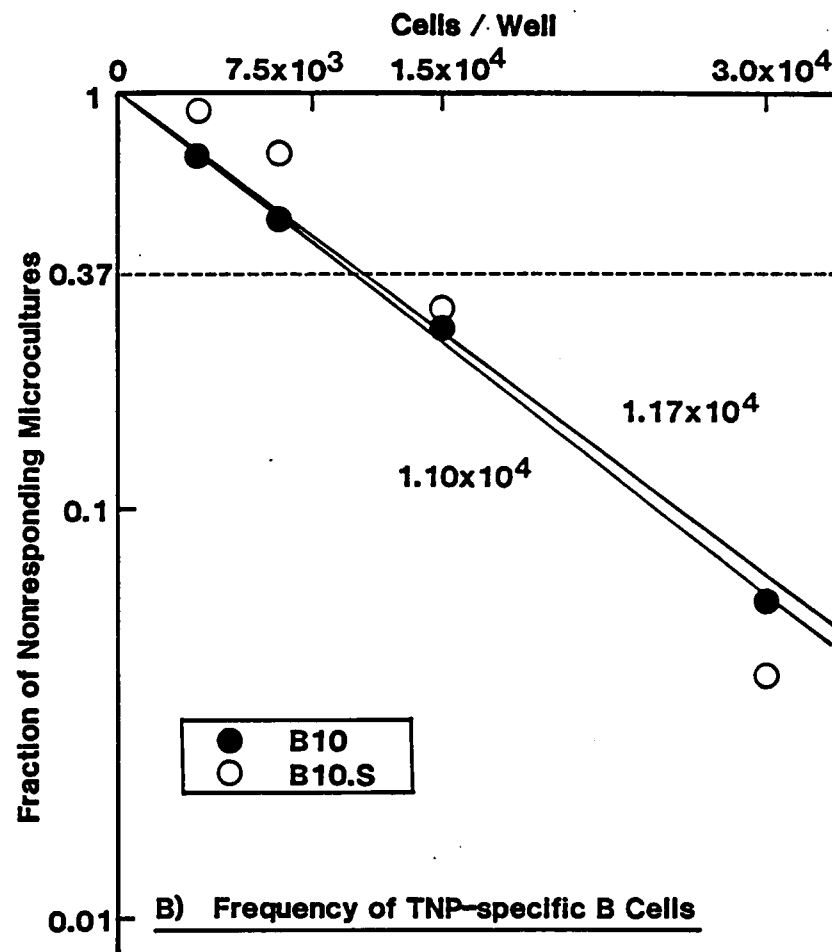
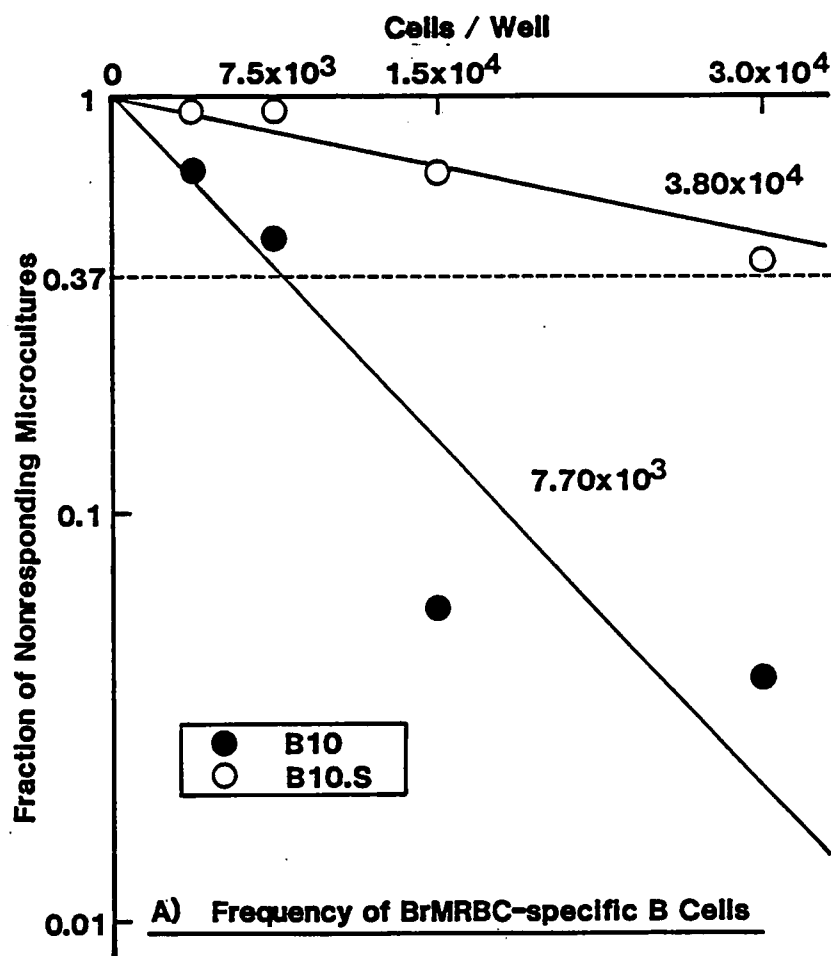
12 - 6



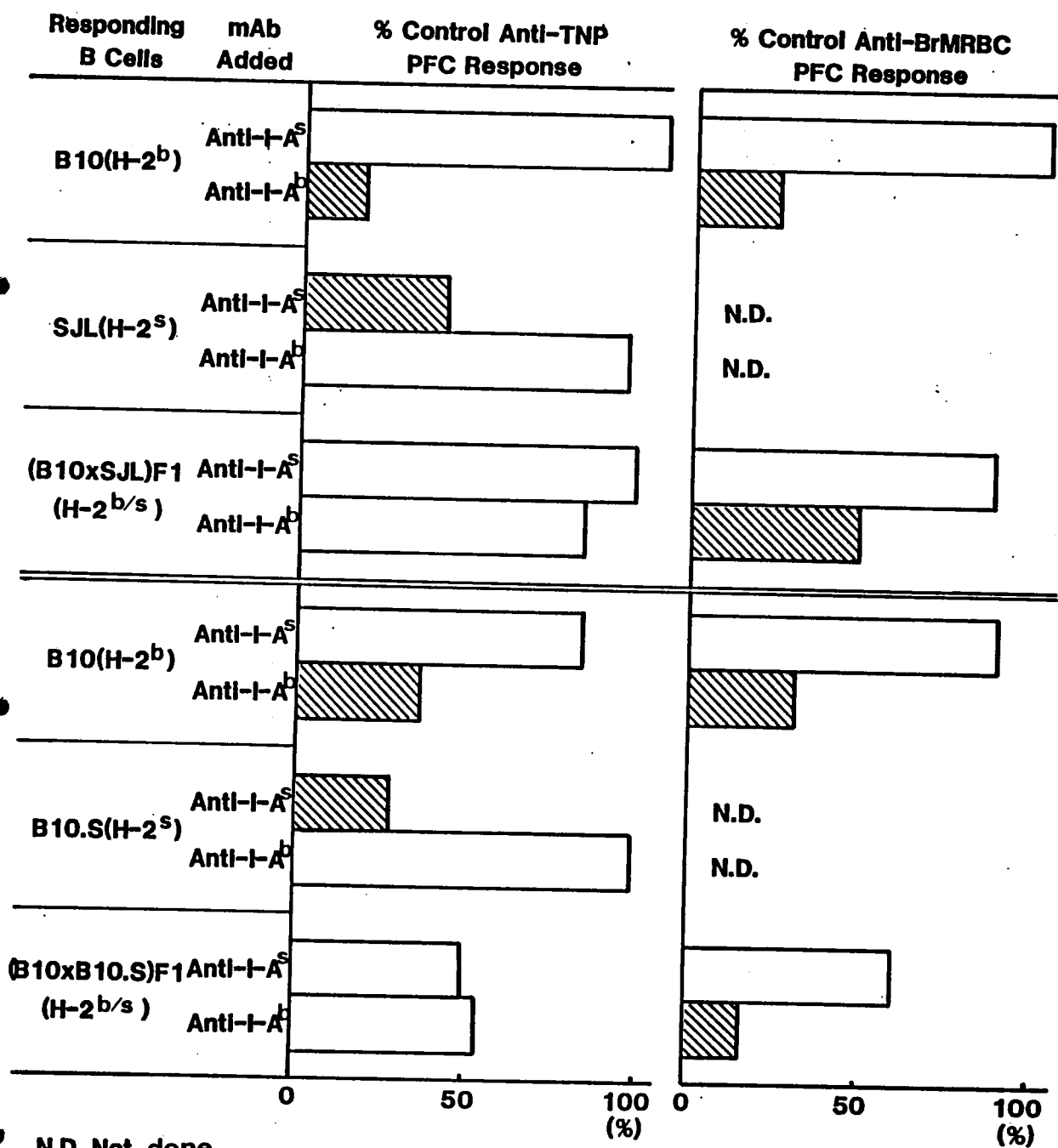
7-7



8 - 8



17 - 9



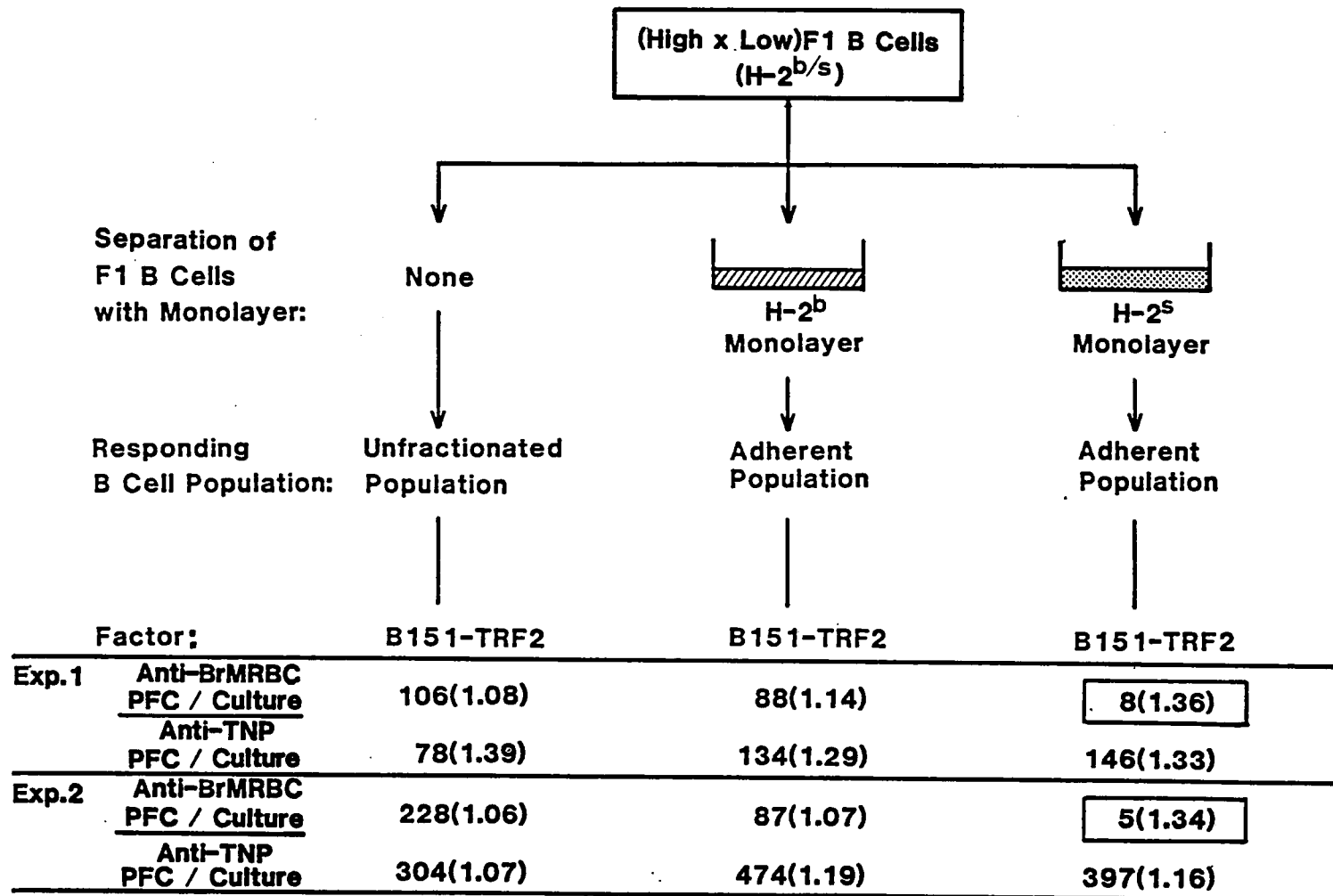


表 - 1

表 - 1 抗-BrMRBC PFC 低応答性マウス B 細胞の抑制活性に関する解析

Responding B Cells ^{a)}		Anti-BrMRBC PFC/Culture ^{b)}		Anti-TNP PFC/Culture ^{c)}	
(High x Low)F1	Low	Exp.1 ^{d)}	Exp.2 ^{e)}	Exp.1	Exp.2
1.0 x 10 ⁶	(-)	568 ± 71 ^{f)}	212 ± 14	455 ± 98	182 ± 1
(-)	2.5 x 10 ⁵	28 ± 8	0 ± 13	60 ± 7	95 ± 8
(-)	5.0 x 10 ⁵	30 ± 13	65 ± 15	267 ± 43	177 ± 49
(-)	1.0 x 10 ⁶	62 ± 10	35 ± 12	338 ± 35	297 ± 8
1.0 x 10 ⁶	2.5 x 10 ⁵	605 ± 43	205 ± 23	830 ± 148	242 ± 26
1.0 x 10 ⁶	5.0 x 10 ⁵	453 ± 84	238 ± 19	569 ± 115	362 ± 5
1.0 x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁶	438 ± 76	204 ± 36	660 ± 48	418 ± 129

- a) 脾臓 B 細胞を B151-TRF2(5%) と共に 5 日間培養した。
b) , c) 細胞培養のみの値を差し引いてある。
d) (B10xA.TH)F1 と A.TH の組合せによる実験。
e) (B10xB10.S)F1 と B10.S の組合せによる実験。
f) 3 wells の算術平均及び標準誤差を示す。