



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35947">https://hdl.handle.net/11094/35947</a>
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B151-TRF2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, (NZBxNZW)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、種々のマイトイジエン或いは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<sup>1)</sup>。一方T細胞機能の異常を示すマウスとしては、Thy1<sup>+</sup>, L3T4<sup>-</sup> 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を自然產生していることが報告されている<sup>2)</sup>。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細胞との直接接觸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<sup>3,4,5)</sup>。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細胞由來の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<sup>6,7)</sup>、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より產生される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出している<sup>8,9</sup>)。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細胞より產生されるB細胞分化因子ときわめて類似しており、その产生は疾患の発症と密接に連関していることが示されている<sup>10</sup>)。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<sup>8,11</sup>)。

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

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 × B10.S)F1, (B10 × SJL)F1, (B10 × A.TH)F1 及び (A.TL × 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<sup>b,c,d</sup> 抗体 (10-2.16) 及び抗-I-A<sup>b,d</sup> 抗体 (34-5-3s) は 米国 NIH 尾里博士より恵与された<sup>12,13</sup>。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 ( $5 \times 10^3 / \text{ml}$ ) 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<sup>9, 14</sup>。培地は、0.5%牛血清アルブミン (BSA: Fraction V, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ヒトトランスフェリン、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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 (日本製薬、東京) で培養した上清を出発材料として、20-55% 硫安塩析後、0.1M NaCl を含む 50 mM 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、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) 鎮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 で透析したものをお精製 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ニ性抗-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<sup>15)</sup>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ゲン非存在下で、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ス plaque-forming cell(PFC)法により測定した<sup>16)</sup>。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日に

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

法にて測定した。

in vivo における B151-CFS の Bromelain 处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  $1 \times 10^6$  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%CO<sub>2</sub> 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<sup>17)</sup>に準じて Bromelain 处理した。即ち、BALB/c 及び B10 マウス末梢血を 650×G 5 分間遠心して得た赤血球と、20 mg/ml Bromelain(和光純薬工業、大阪) 及び 10 mg/ml BSA を含む PBS 溶液(pH 7.2)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、正常家兎血清を用いた。

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、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA:和光純薬工業、大阪) 添加 PBS にて 50 µg/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、50μl/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%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加え中止させた。なお標識抗体にはPeroxidase結合家兎抗-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、OD<sub>490</sub>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倍希釈したものを作り、200units/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、家兎抗-

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 結合家兎抗

- 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 ミエローマ蛋白

(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

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<sup>18)</sup>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 48 wells 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

・ 肝細胞をマイトイシン C (MMC、協和マイ

トマイシン S、協和発酵、東京) 处理

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

したものを  $5 \times 10^4 / \text{well}$  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 × 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 100 mm のプラスチックディッシュ (No. 25020 Corning Glass Works, Corning, N.Y.) に 8 ml の poly-L-lysine (PLL) 溶液 ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 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  $1.2 \times 10^8$  個の B10 或いは SJL または B10.S マウス脾臓 B 細胞を 12 ml 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 8 ml 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 $5 \times 10^7$ 個を12mlのRPMI 1640培養液(10%FCS及び $2.5 \times 10^{-5}$ 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<sup>b</sup>) , B10.BR (H-2<sup>k</sup>) 及びB10.D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスは著明な抗 - BrMRBC PFC 応答を示すのに対してB10.S (H-2<sup>s</sup>) マウスは低レベルの抗 - BrMRBC PFC 応答しか示さなかつた。しかしB10.S マウスはリバースPFC法で検出される総 IgM 抗体産生細胞数及び多クローネ性に誘導される抗 - 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<sup>s</sup>) マウス B 細胞では、用いた何れの濃度の B151-TRF2 によつても低い応答性しか誘導されなかつた。しかしながら、in vivo の実験結果と同様に、 B10.S B 細胞のリバース 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つた。以上の如く、H-2<sup>s</sup> 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup>, Ig<sup>h<sup>b</sup></sup>) とその Ig<sup>h</sup> アロタイプの congenic マウスである SJA マウス (H-2<sup>a</sup>, Ig<sup>h<sup>a</sup></sup>) 及び、対照として BrMRBC 高応答性である BALB/c (H-2<sup>d</sup>, Ig<sup>h<sup>a</sup></sup>) 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バース 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<sup>a</sup> 遺伝子により調節されていることが明らかとなつた。更にこの低応答性が Ig<sup>h</sup> 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 congeneric 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, リバース PFC 及び多クローニング性抗-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<sup>s</sup> 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 T1a 遺伝子を異にすることが知られている。しかし Qa-1, T1a 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 高応答性である事から、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つた。

次に BrMRBC 以外の自己抗原に対する免疫応答についても、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<sup>a</sup> 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つた。

#### B151-TRF2により誘導される抗-BrMRBC PFC

##### 応答性のkinetics

H-2<sup>+</sup>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つた。

#### 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<sup>+</sup>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くても(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 に関する結果よりも同様であった。以上の結果より、I<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 応答性を示す事から、I<sup>+</sup> 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 なかつた。このとき、  
B151-TRF2 応答性 BrMRBC 特異的 B 細胞 クロ  
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  
となつた。以上 の 事 から 、 1° 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  
択性 な 抗 - BrMRBC PFC 低応答性 を 呈 し て いる  
と い う こ と が 明らか となつた。

#### 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<sup>8, 11</sup>。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<sup>10</sup>。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<sup>b</sup>或いは抗-I-A<sup>d</sup>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<sup>b</sup>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<sup>b/+</sup>)B細胞の抗-BrMRBC PFC応答は、抗-I-A<sup>b</sup>抗体で著明に抑制されたが抗-I-A<sup>d</sup>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 F1B 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<sup>19)</sup>、上記の結果は、(B10 × SJL)F1 及び (B10 × B10.S)F1 B 細胞は Ia<sup>b</sup> 或いは Ia<sup>s</sup> 分子をそれぞれ認識する亜集団にわかれ、Ia<sup>s</sup> 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は、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 × SJL)F1 或いは (B10 × 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 F1B 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<sup>b</sup> 認識特異性を示す B10 B 細胞 monolayer 付着性 F1B 細胞は抗 - TNP PFC 及び抗 - BrMRBC PFC を生成したが、自己 Ia<sup>s</sup> 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。この事から、  
(H-2<sup>b</sup> × H-2<sup>a</sup>)F1 B 細胞集団の中でも自  
己 Ia<sup>\*</sup> 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  
明らかとなつた。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つた。

## [ 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<sup>+</sup> 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つた（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<sup>20</sup>）、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<sup>20, 21</sup>）。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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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。この事から I<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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つた。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<sup>+</sup> 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<sup>22, 23</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> のハプロタイプを有するマウスにおいて、選択的に Ly1<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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事から考えて、抗 - BrMRBC PFC 低応答性が Ly1<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>20, 21</sup>。従って I<sup>a</sup> のハプロタイプを有するマウスにおいて、自己 Ia<sup>a</sup> 認識特異性を示す T 細胞が BrMRBC 特異的 B 細胞クローニング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<sup>b</sup>) の骨髓細胞を X 線照射 (H-2<sup>b</sup> x H-2<sup>a</sup>) 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<sup>a</sup> のみならず Ia<sup>b</sup> 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<sup>a</sup> 認識特異性が BrMRBC 特異的 B 細胞クローニング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<sup>8, 11)</sup>、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<sup>8, 19)</sup>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<sup>b</sup>) マウスと低応答性 SJL, B10.S (H-2<sup>a</sup>) 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<sup>b</sup>/<sup>a</sup>) 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<sup>b</sup> 認識特異性を示す) は抗 - BrMRBC PFC を生成するのにに対して、SJL 及び B10.S B 細胞 monolayer 付着性 F1 B 細胞 (Ia<sup>a</sup> 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つた (図 - 10)。即ち、I<sup>a</sup> 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<sup>-</sup>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つた。又、I<sup>+</sup>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<sup>6,7</sup>、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<sup>2,4</sup>。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<sup>25)</sup>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 产 生 応 答 の 免 疫 遗 伝 学 的 解 析 に よ り 、 抗 - BrMRBC 抗 体 产 生 は 、 H-2 複 合 体 内 の I 領 域 遗 伝 子 に よ り 調 節 さ れ て い る こ と が 明 か と な っ た 。 即 ち I<sup>\*</sup> 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 产 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 Ia 認 識 特 異 性 が BrMRBC 特 異 的 B 細 胞 ク ロ ー ン の 产 生 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 Ia 認 識 特 異 性 が 免 疫 グ ロ ブ リ ン レ パ ト リ 一 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 遗 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<sup>d</sup> antibodies and an examination of expression of H-2<sup>d</sup> 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16回日本免疫学会総会  
(昭和61年12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、リバース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1ml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、リバース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( $1 \times 10^6 / \text{well}$ )を、B151-TRF2とともに5日間培養し、誘導される抗-BrMRBC PFC、リバース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 S JL、S JA マウス B 細胞 の B 151-T RF 2  
により誘導される抗 - Br M RBC PFC 及びリバ-  
ス PFC 応答

抗原非感作 BALB/c (▲) 、 S JA (●) 、 及  
び S JL (○) 脾臓 B 細胞 ( $1 \times 10^6 / \text{well}$ ) を  
B 151-T RF 2 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 B 151-T RF 2 により誘導される抗 -  
Br M RBC 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 ( $1 \times 10^6 / \text{well}$ ) を B 151-T RF 2 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 - Br M RBC 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( $1 \times 10^6$  / 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抗体產生  
抗原非感作 B10、B10.BR、B10.D2、及び  
B10.S脾臓B細胞( $1 \times 10^6$  / well)をB151-TRF2(5%)とともに7日間培養し、培養上清中に產生される総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:  $5 \times 10^4$  / 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) + (3 × 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、頻度解析を行なった。

図 - 9 (B10 × SJL)F1 及び (B10 × B10.S)  
F1 B 細胞の抗 - BrMRBC PFC 応答の抗 - I - A<sup>b</sup> 抗  
体による選択的抑制

(B10 × SJL)F1 及び (B10 × B10.S)F1 脾臓

B 細胞 ( $1 \times 10^6$  / well) を抗 - I - A<sup>b</sup> 抗体及び  
抗 - I - A<sup>a</sup> 抗体の存在下で B151-TRF2(5%) と共に  
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<sup>s</sup> monolayer に付着性の (B10  
× SJL)F1 及び (B10 × B10.S)F1 B 細胞の選択  
的抗 - BrMRBC PFC 低応答性

(B10 × SJL)F1 及び (B10 × 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 F1 B 細胞  
( $1 \times 10^6$  / 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。

Y - 1

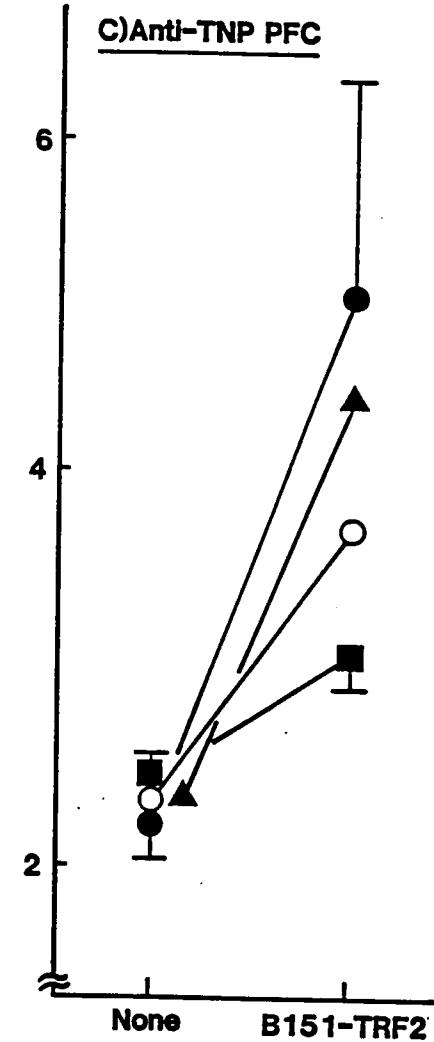
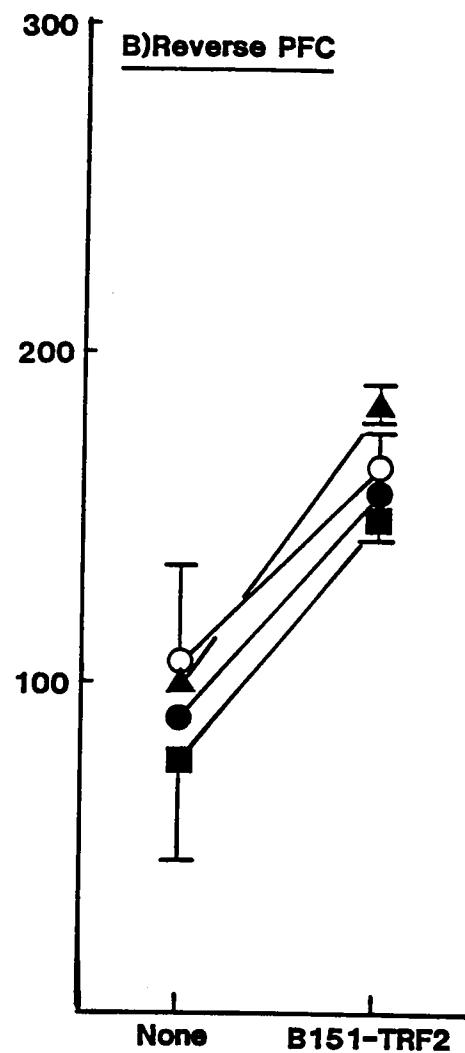
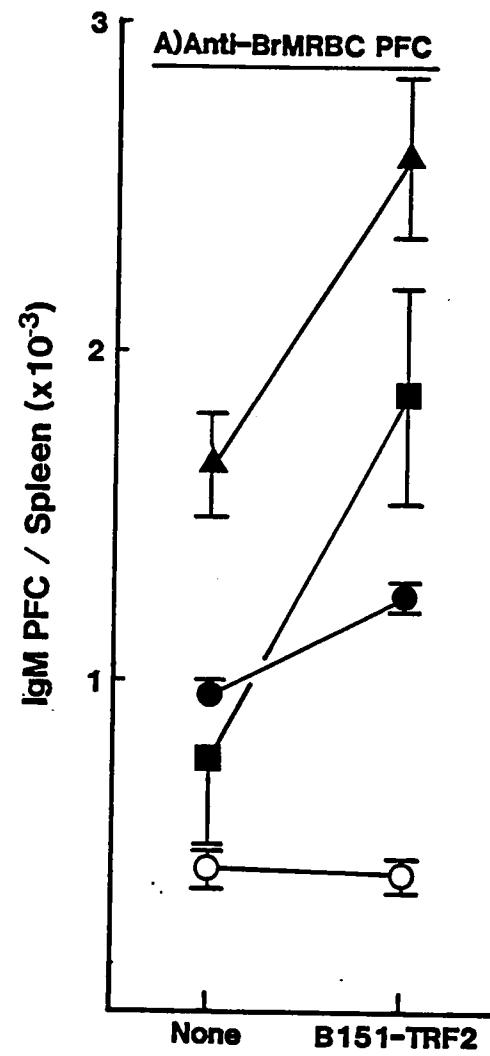
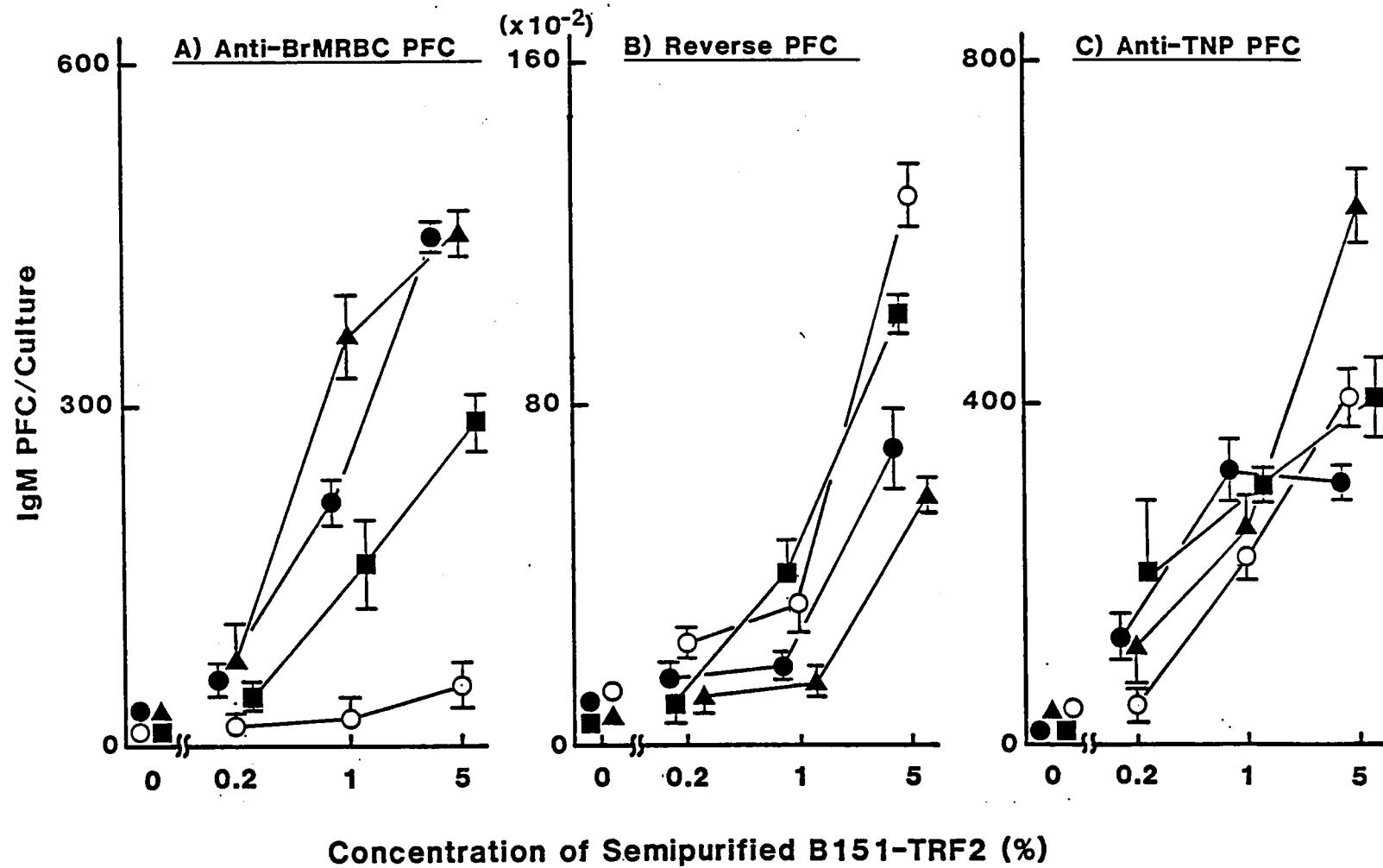
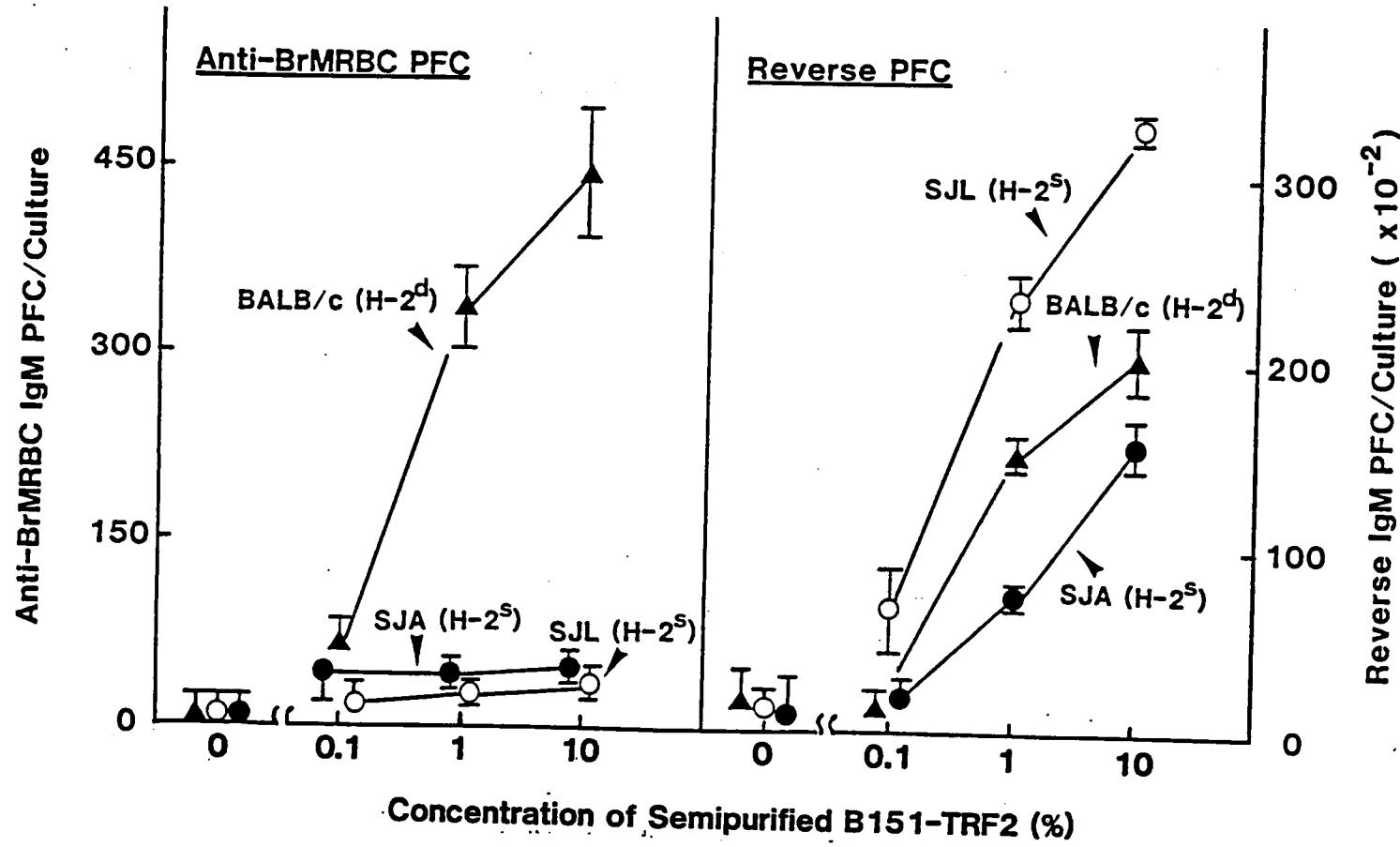


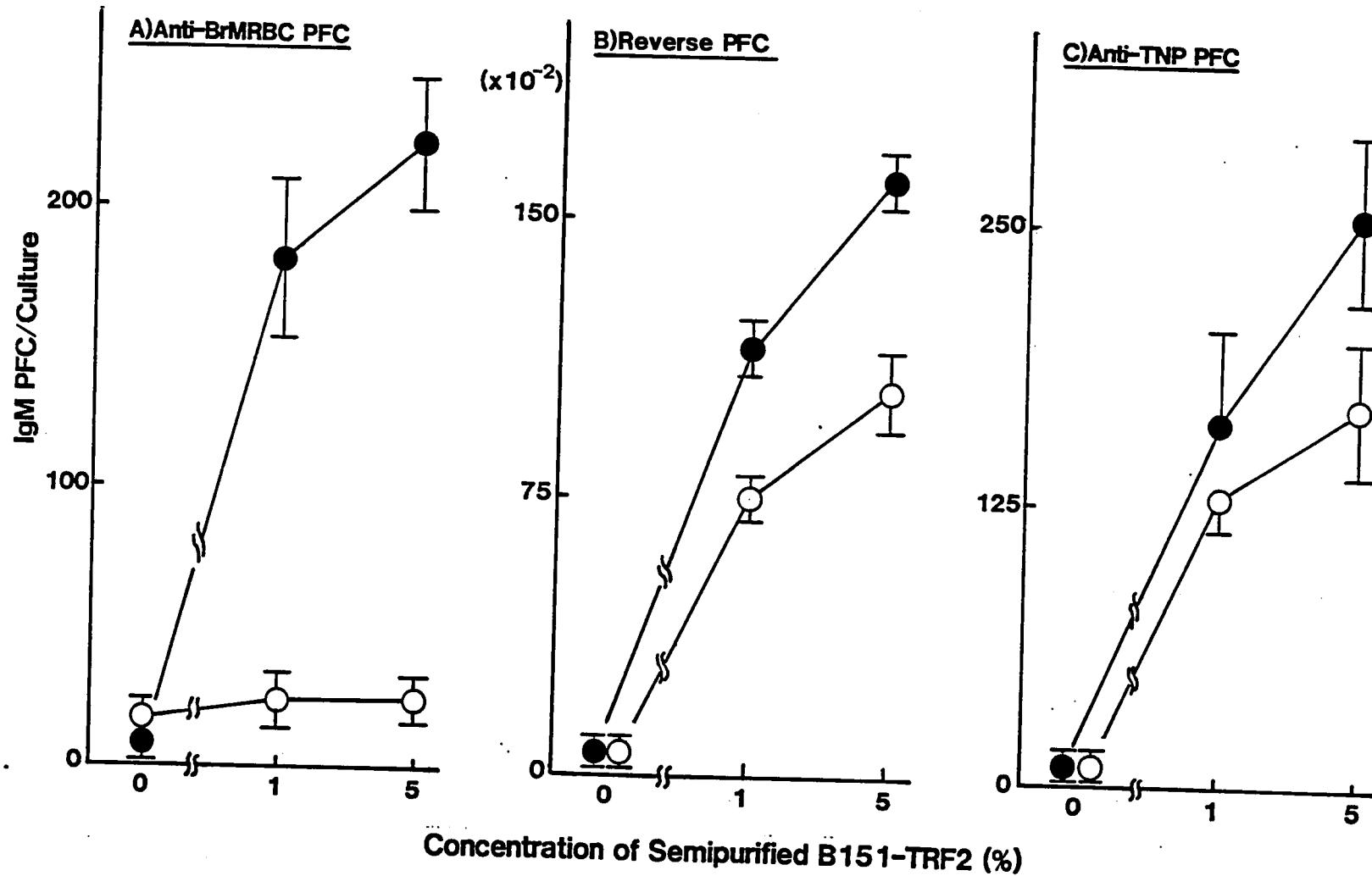
Fig - 2



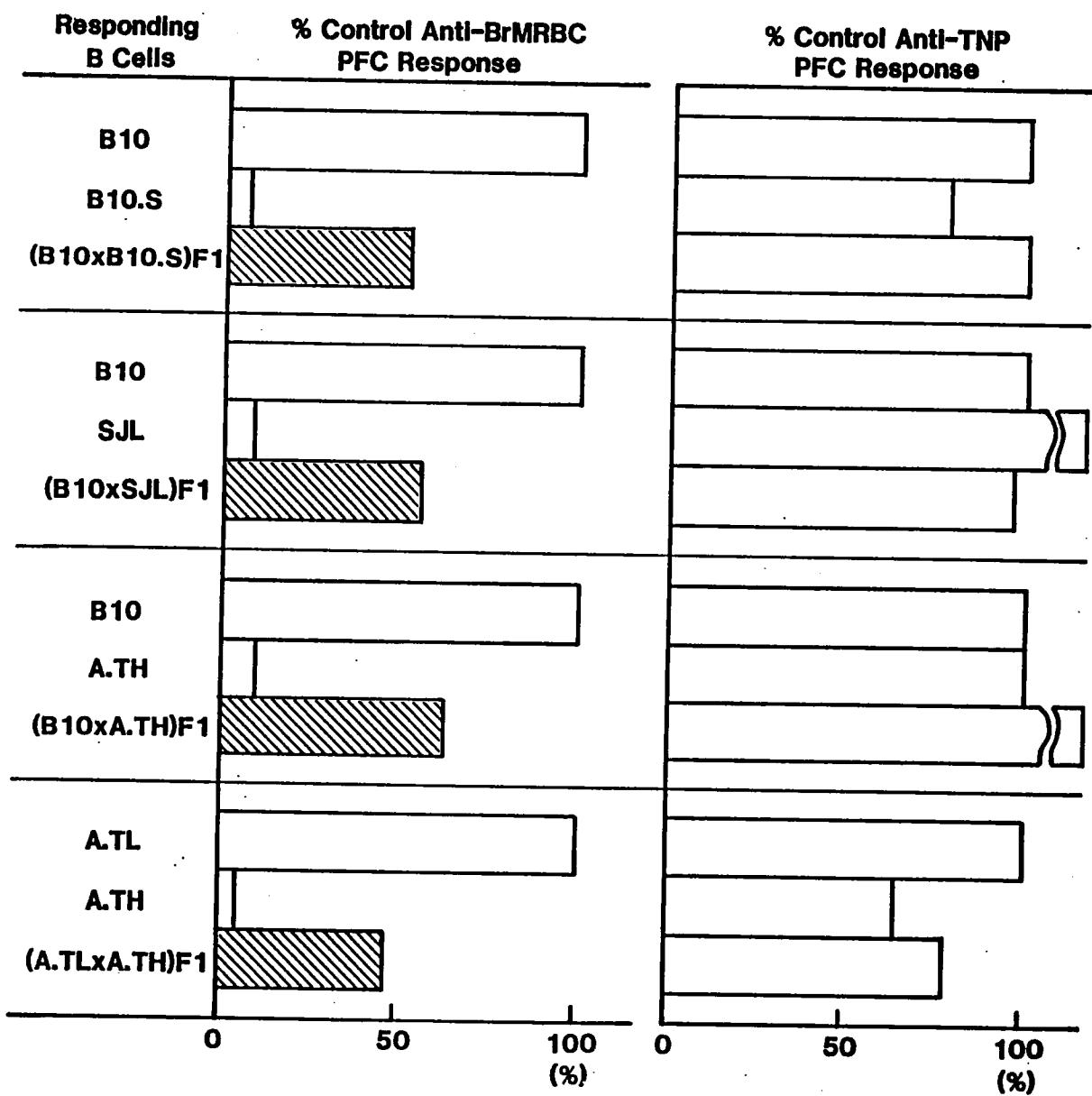
[x] - 3



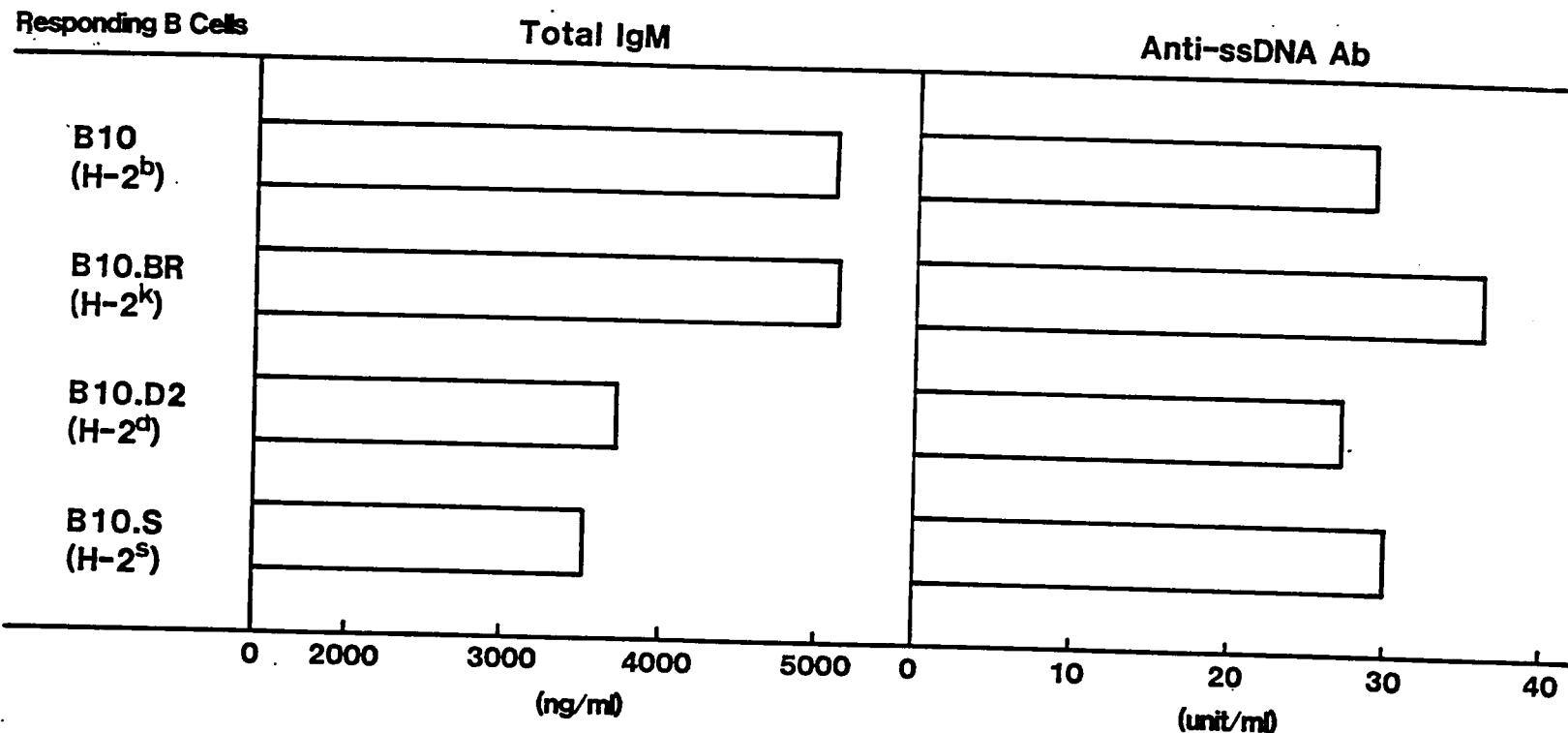
[X] - 4



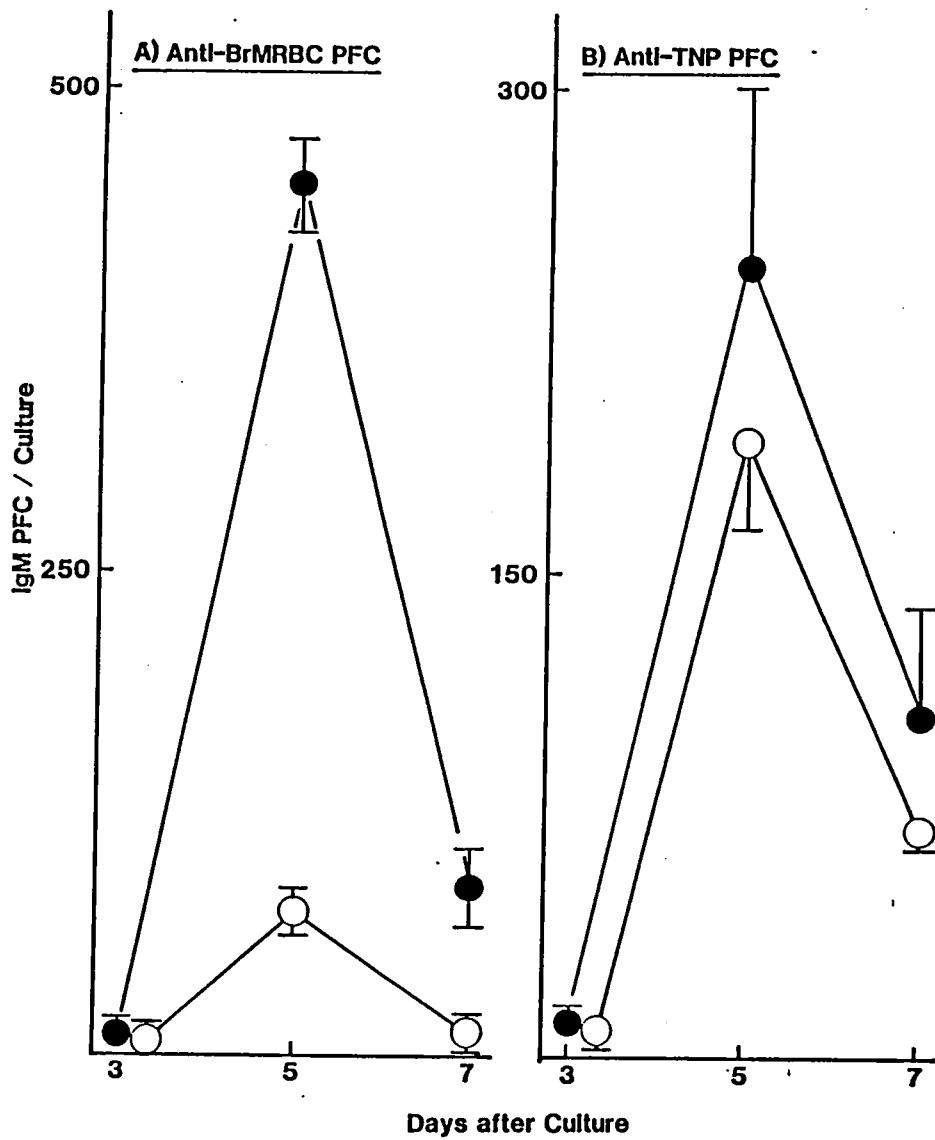
Y - ↓



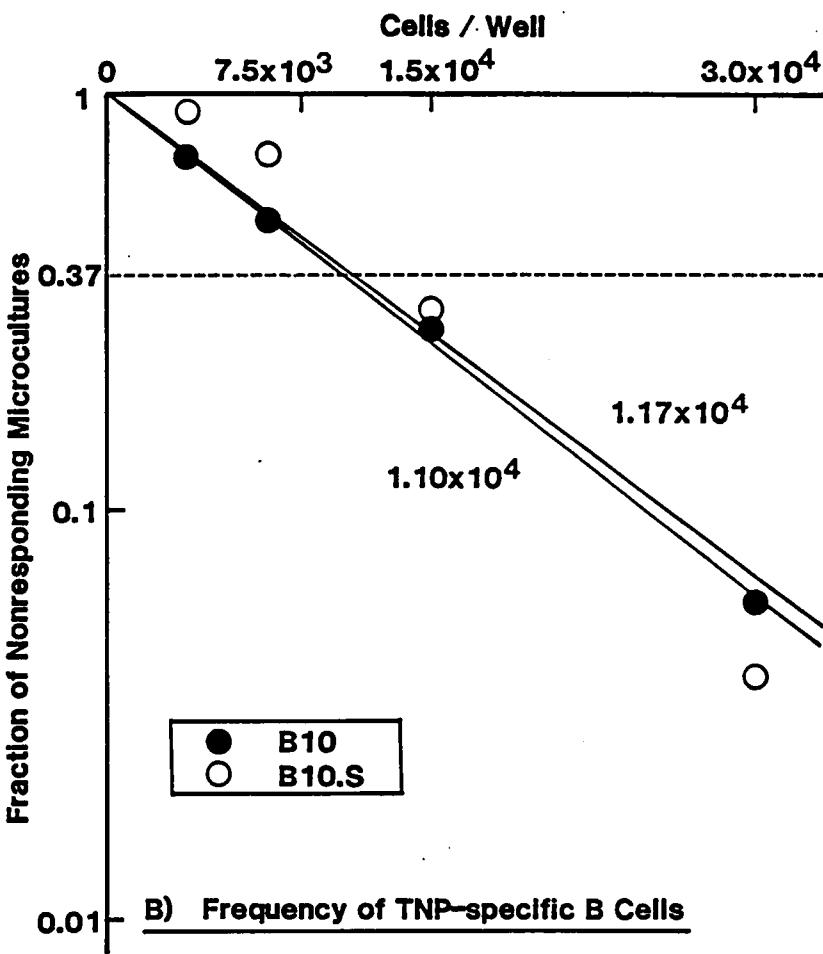
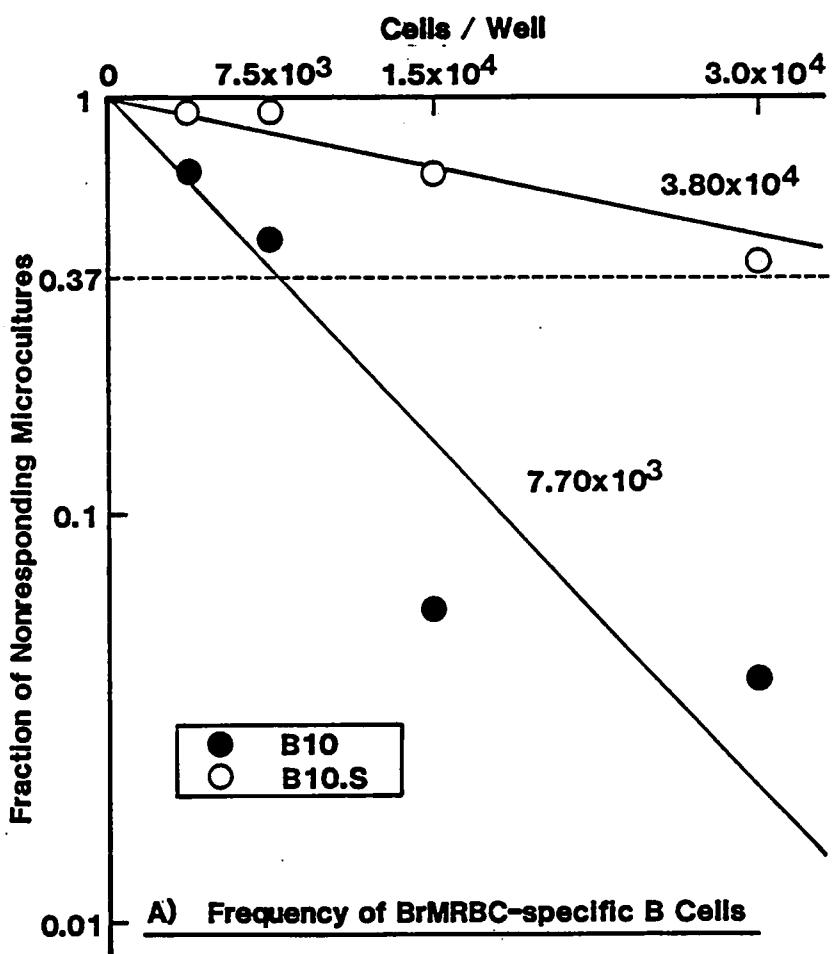
IV - 6



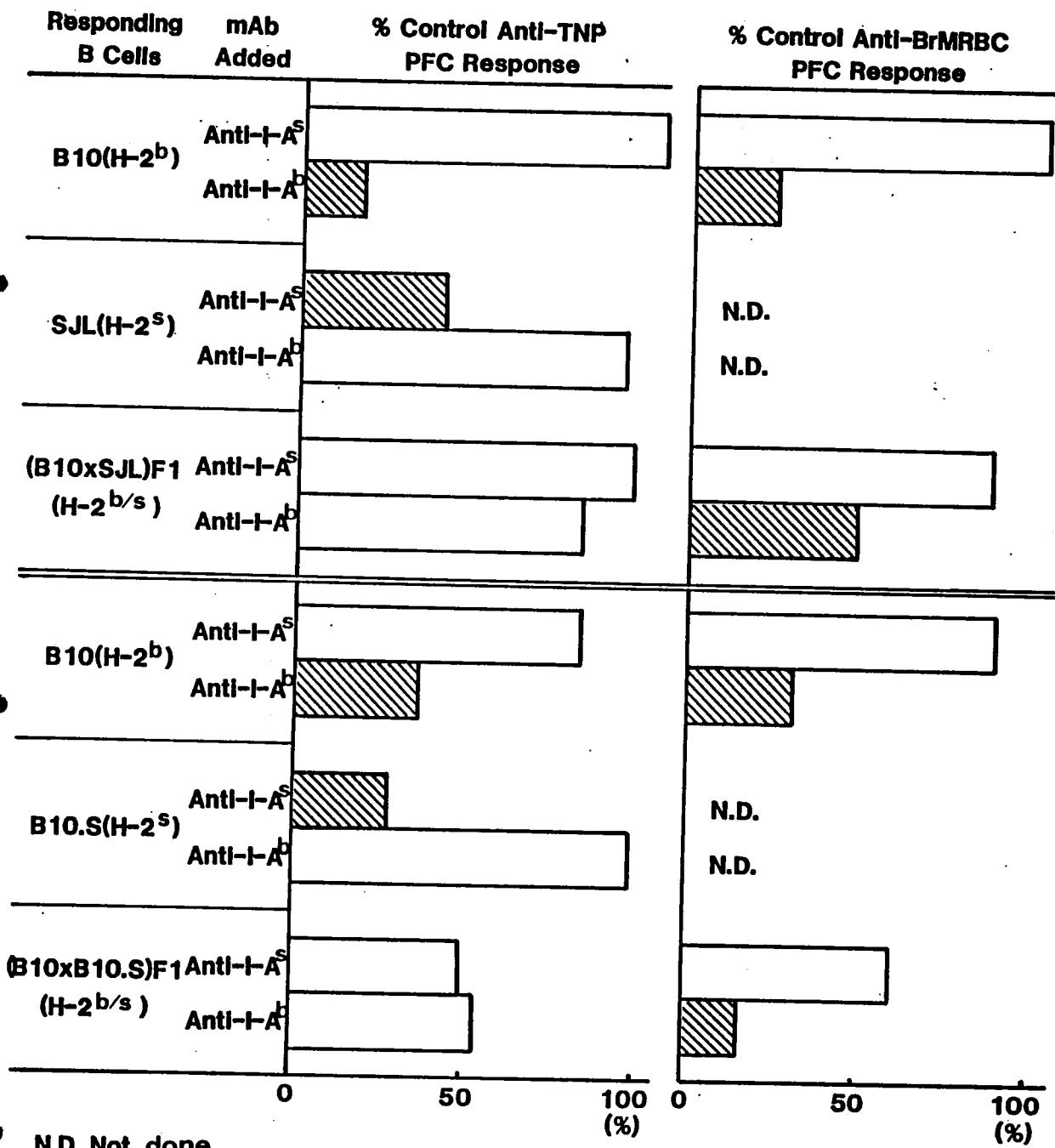
14 - 7



- 8



[X] - ♀



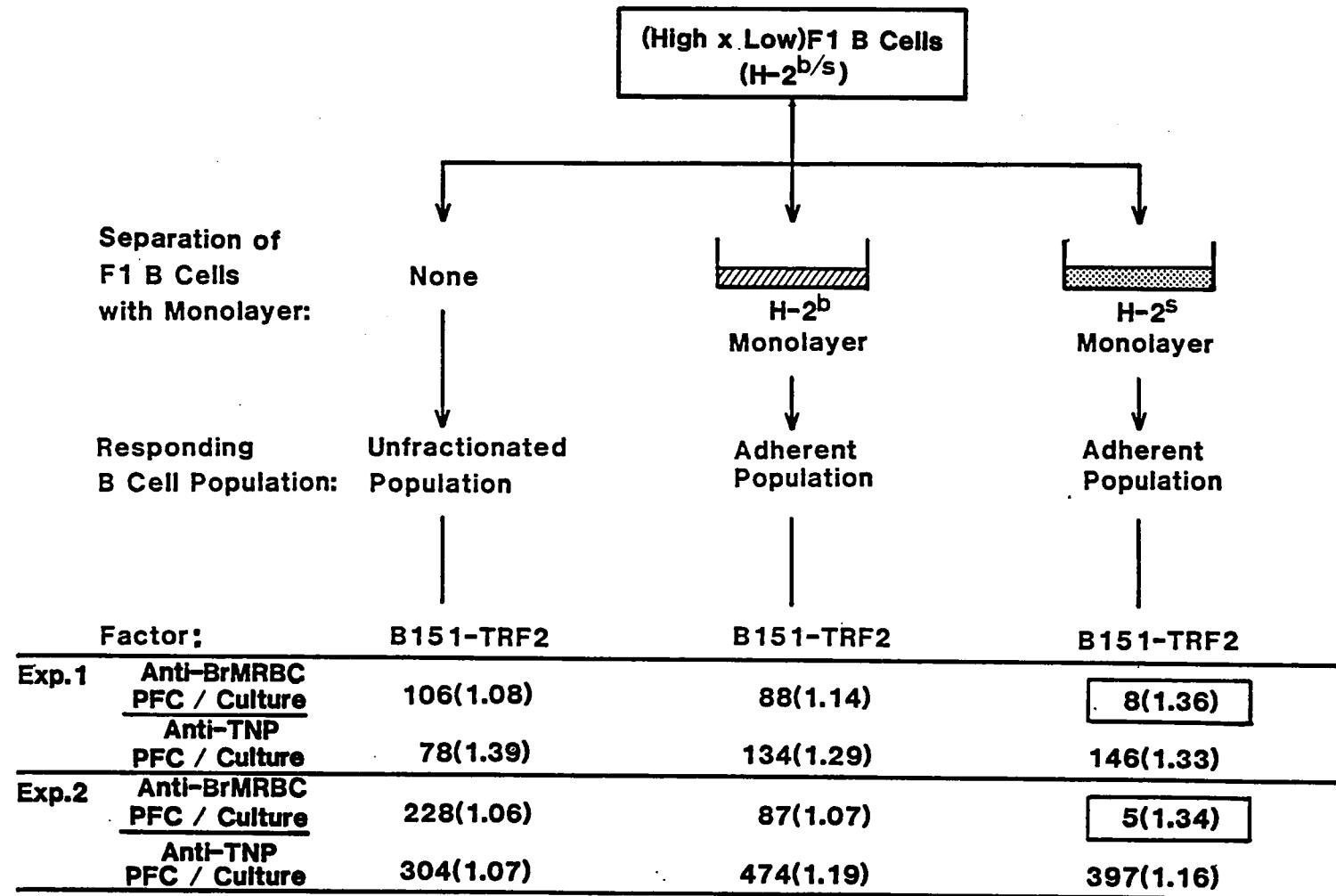


表 - 1

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

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