



Title	マウス免疫グロブリンのH鎖可変領域に対するラットモノクローナル抗体の作製とその特異性
Author(s)	南, 友策
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37097
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	みなみ 南	ゆう 友	さく 策
学位の種類	医	学	博
学位記番号	第	9109	号
学位授与の日付	平成2年3月24日		
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻		
学位論文題目	学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	マウス免疫グロブリンのH鎖可変領域に対するラットモノクローナル抗体の作製とその特異性		
論文審査委員	(主査) 教 授 垂井清一郎		
	(副査) 教 授 藤尾 啓 教 授 濱岡 利之		

論文内容の要旨

〔目的〕

免疫グロブリンのH鎖可変領域は、B前駆細胞の段階でDJH結合、次いでV_H-DJ_H結合が生じて、機能的な可変領域を形成する。マウスのV_H遺伝子は、DNA配列からみると75%以上のホモロジーをもった9~11のファミリーに分類され、一部に重なり合うもファミリー毎に群を形成して組織されている。V_Hのアミノ酸配列からみるとV_Hは強く保存されているframeworkと抗原に対応し超可変なcomplement determinant region(CDR)から成っている。もしV_Hフラグメントのファミリー特異的なモノクロナール抗体(Mab)があれば、pre-B細胞で生産されるH鎖に使用しているV_Hがどんなファミリーのメンバーであるかをin situで識別しえるかもしれない。従ってV_Hフラグメントに対するMabは、pre-B細胞におけるH鎖可変領域の再構成機構の現象をとらえる可能性をもっている。

本論文においてQ52ファミリーのメンバーであるMOPC141のV_Hフラグメントを精製し、これに親和性をもつMabをラットを用いて作製し、その特異性について解析した。

〔方法〕

1. 骨髄腫蛋白の精製：MOPC141のプラズマ細胞腫の腹水(BALB/c)よりプロテイン-Aセファローズカラムを用いて精製した。
2. V_Hフラグメントの精製：骨髄腫蛋白をペプシン消化、DEAEセルローズイオン交換クロマトグラフィー、CNBr切断、セファデックスG-50によるゲルろ過の一連の操作によってVHフラグメ

ント（N末端の1～82を含む）を精製した。

3. モノクローナル抗体の作製：SDラット雌に完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントでKLHを結合したFd'やH鎖全体を乳化して免疫した。抗血清を確認後、脾細胞をP3-X63-Ag. 8.653と細胞融合をおこない、enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) にてV_Hフラグメントに対するハイブリドーマを検索した。
4. 抗体の¹²⁵Iの標識：chloramine T法にておこなった。
5. 阻害試験：flexible microtiter plateを用いてradioimmunoassayをおこなった。¹²⁵Iのカウントはgamma spectrometerにて測定した。
6. 骨髓腫蛋白のH鎖とL鎖の分離：骨髓腫蛋白を0.2M Tris-HCl pH8.4/0.001MEDTA-Na₃/0.15M NaCl/0.01M DTTの溶液中に室温で2時間反応させ、終濃度0.02Mのiodoacetaamideを加えて30分間反応させ、セファクリールS-200カラム(in 6M urea/1M acetic acid)によりゲルろ過を行って分離した。

〔結果〕

1. γ2bはペプシン消化に対して分解をうけやすいために、いくつかの長さの違ったFd'が生じたが、V_Hフラグメントに対するMabの作製時に影響はなかった。
2. 完全なH鎖やFd'-KLHで免疫したラットの脾細胞とP3-X63-Ag. 8.653を細胞融合しハイブリドーマを作製し、V_Hフラグメントに対するMabを5個選択した。RIAによるbinding assayから、MOPC141のH鎖に親和性の強い二つのMabs(3-2-7H, 3-5-6f)を得た。
3. 3-2-7H, 3-5-6fの二つのMabsについてRIAによる阻害試験をおこなった。共にH鎖の定常領域に親和性がなく、明らかにV_Hフラグメントに対する抗体であった。

MOPC141に対する親和性の違いから、3-2-7Hは、L鎖の影響を受けにくい決定基に対する抗体で、3-5-6fは、L鎖に隠された決定基に対する抗体であると考えられる。両抗体のMOPC141のH鎖に対する相対的な親和性は、他のファミリーに代表させたH鎖やL鎖に対するものに比較して200倍以上強かった。以上より作製された二個のMabsはMOPC141のV_Hフラグメントに特異的であり、互いに認識部位が違うことがわかった。

〔総括〕

1. V_Hフラグメントに対する抗体を作製するのに、骨髓腫蛋白を一連の操作を用いて処理し、V_Hフラグメントを精製した。
2. V_H遺伝子のQ52ファミリーのメンバーであるMOPC141のV_Hフラグメントに対するラットMabを作製した。3-2-7H及び3-5-6f抗体はMOPC141のH鎖に強い親和性を示し、他のファミリーのV_HをもつH鎖にはほとんど交叉反応を示さなかった。さらにintact MOPC141に対してほとんど交叉反応を示さなかった。すなわち両抗体はMOPC141のH鎖に対して

特異的に反応することがわかった。

論文の審査結果の要旨

免疫グロブリンのH鎖可変領域($V_H D T_H$)を構成している V_H 遺伝子は、マウスBalb/cにおいてDNAの配列が75%以上のホモロジーをもった9~11ファミリーに分類され、ファミリー毎に群を形成して染色体上に並んでいる。 V_H の選択機構はまだよくわかっていないが、Pre-B細胞で生産されるH鎖に使用されている V_H がどんなファミリーのものであるかin situで識別するために V_H フラグメントのファミリー特異的なモノクローナル抗体が有用となる。ここでQ52ファミリーの V_H をもつMOPC 141の V_H を精製し、それに対するラットモノクローナル抗体を2個作製した。これらは互いに違ったエピトープに対する抗体で、さらに他のファミリーのVHを用するH鎖やL鎖にほとんど親和性をもたず、Q52ファミリーに特異的であることがわかった。