



Title	Eatablishment of an interleukin 6 (IL6) /B cell stimulatory factor 2 (BSF2) -dependent cell line and preparation of anti-IL6 monoclonal antibodies
Author(s)	松田, 正
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37152">https://hdl.handle.net/11094/37152</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">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="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	まつ 松	だ 田	ただし 正
学 位 の 種 類	医	学	博 士
学 位 記 番 号	第	9 0 9 3	号
学位授与の日付	平 成	2 年 3 月 24 日	
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	Establishment of an interleukin 6 (IL6)/B cell stimulatory factor 2 (BSF2)-dependent cell line and preparation of anti-IL6 monoclonal antibodies (抗ヒトインターロイキン6 (IL-6)モノクローナル抗体 の作製とIL-6依存性ハイブリドーマの樹立)		
論文審査委員	(主査)	岸 本 忠三	
	教 授		
	(副査)	濱 岡 利之	教 授 平 野 俊 夫
	教 授		

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

インターロイキン6 (IL-6) は当初、活性化B細胞を抗体産生細胞へと最終分化させるB細胞分化因子 (BSF-2) としてそのcDNAがクローニングされたが、その後リコンビナント分子や抗体を用いた研究によりIL-6は免疫系のみならず造血系、肝臓および神経系に作用し、生体防御ネットワークの中核をなす多機能分子であることが明らかにされた。またIL-6の異常産生は種々の自己免疫疾患の発症に深く関与していることも報告されている。これら疾患との関連をより詳細に解析するためにはIL-6の微量測定法の確立が必要とされる。この目的のためにヒトIL-6分子に対するモノクローナル抗体の作製とそれらを用いた簡便なEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を確立すべく本研究を行った。

### 〔方法ならびに成績〕

1) 抗ヒトIL-6モノクローナル抗体の作製：大腸菌由来のリコンビナントヒトIL-6 (10 $\mu$ g/匹/週) を免疫したBALB/cマウスより得たリンパ節細胞とマウスミエロマ細胞P3U1をポリエチレングリコールを用いて細胞融合し、ヒトIL-6 (5 U/ml) を含むHAT選択培地で増殖したクローンの培養上清中の<sup>125</sup>I-IL-6結合能を指標として抗IL-6モノクローナル抗体産生クローンをスクリーニングした。この結果、二種の抗ヒトIL-6モノクローナル抗体産生クローンMH60, BSF2 ( $\alpha$ BSF2.60: IgM,  $\kappa$ ), MH166.BSF2 ( $\alpha$ BSF2.166: IgG1,  $\kappa$ ) を得た。

2) MH60, MH166両クローンのin vitroでの増殖におけるIL-6の効果：両クローンはIL-

6存在下で産生されたクローンであり、IL-6に対して依存性を有する可能性から両クローンを $1 \times 10^4$ 個/200  $\mu$ l/well で種々の濃度のIL-6存在下に48時間培養したのち1  $\mu$ Ci/well の $^3$ H-チミジンを添加し、各wellの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。その結果、MH166細胞にはIL-6添加効果は認められなかったが、MH60細胞においてはIL-6の濃度依存的に $^3$ H-チミジンの取り込みが観察された。MH60による $^3$ H-チミジンの取り込みはIL-6に特異的でヒトIL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、G-CSF、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、マウスIL-4、IL-5、NGFなどには反応しなかった。 $^3$ H-チミジンの取り込みのhalf-maximumは6 pg/ml (0.03 U/ml)であり、MH60細胞はpg/ml濃度のIL-6を特異的に測定しうることが判明した。

3) モノクローナル抗体によるIL-6活性の中和： $\alpha$ BSF 2.166抗体はIL-6によるMH60細胞の $^3$ H-チミジンの取り込みならびにEpstein-Barr virusで形質転換したヒトB細胞株SKW6-CL4のIgM抗体産生を濃度依存的に抑制した。しかしながら $\alpha$ BSF 2.60抗体は両測定系においてIL-6活性を抑制しなかった。

4) モノクローナル抗体によるヒトIL-6分子の単離：ヒト膀胱癌細胞株T24細胞の培養上清と $\alpha$ BSF 2.166抗体を結合したセファロースビーズを4℃、一晚インキュベートした。0.15 M NaClを含むリン酸緩衝液、pH 7.4で洗浄した後、セファロースビーズをSDSを含むトリス塩酸緩衝液中で煮沸し、溶出液を還元下SDS-PAGEにかけ銀染色を行った。この銀染色により分子量21 kDaの単一な蛋白バンドが観察された。また、同試料を還元SDS-PAGE後、 $\alpha$ BSF 2.60抗体によるウェスタンブロットを行うと分子量21 kDaの位置に染色像が観察され、両抗体がヒトIL-6分子を認識することが明らかとなった。

5) ヒトIL-6に対するELISA法の確立： $\alpha$ BSF 2.60 (10  $\mu$ g/ml)、 $\alpha$ BSF 2.166 (0.1  $\mu$ g/ml) 両抗体を0.1 M 炭酸緩衝液、pH 9.6でELISA用プレートにコートした後、種々の濃度のIL-6を添加、4℃、一晚インキュベートした。プレート洗浄後、アフィニティー精製したウサギ抗IL-6抗体を添加し、室温2時間インキュベート後、アルカリ性ホスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体とインキュベートし、ホスファターゼ基質を加え発色し405 nmの吸光度を測定した。 $\alpha$ BSF 2.60抗体を用いることにより2~50 ng/ml、 $\alpha$ BSF 2.166抗体を用いることにより0.05~0.8 ng/mlのヒトIL-6が特異的に検出された。

#### 〔総括〕

1) ヒトIL-6分子を認識するモノクローナル抗体 $\alpha$ BSF 2.60 (IgM,  $\kappa$ )、 $\alpha$ BSF 2.166 (IgG1,  $\kappa$ )を作製し、さらにこれらを用いて簡便なELISA法を確立した。

2)  $\alpha$ BSF 2.60抗体を産生するMH60細胞はIL-6依存的な $^3$ H-チミジンの取り込みを示し、pg/ml濃度のIL-6を特異的に検出しうることが判明した。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は、多彩な生物活性因子であるインターロイキン6（IL-6）に対するモノクローナル抗体の作製とIL-6依存性ハイブリドーマの樹立に関するものである。ヒトIL-6分子を認識するモノクローナル抗体 $\alpha$ BSF2.60（IgM,  $\kappa$ ）,  $\alpha$ BSF2.166（IgG1,  $\kappa$ ）を作製するとともに簡便なELISA法を確立した。さらに $\alpha$ BSF2.60抗体を産生するMH60細胞はIL-6依存性ハイブリドーマとしてIL-6の生物活性を測定しうることを明らかにした。

これら両測定系を用いることによりIL-6と疾患との関連を明らかにすることが可能であり、学位論文として価値あるものと認める。