

# Null 細胞型急性リンパ球性白血病細胞株, NALL- I に対する monoclonal 抗体の作製とその解析

## 第 1 編

### 3 種の monoclonal 抗体, 抗 HLA, 抗 Ia,

#### 抗白血球共通抗原抗体の特異性

岡山大学医学部第 2 内科 (主任: 木村郁郎教授)

春 田 祐 郎

**Key Words :** Null-ALL cell line

Monoclonal 抗体

抗 Ia 抗体

MLC inhibition

## 緒 言

各種腫瘍細胞表面抗原の解析は, その腫瘍細胞の由来, 機能の検索のみならず, 診断ならびに治療に有用である。従来より, この解析のため, 広範な吸収操作によって得られた各種異種抗血清が用いられてきたが, それら吸収異種抗血清は抗体価が低く, 量的にも不十分であり, monospecific な抗体は得がたいという欠点があった。この吸収血清の欠点を解決する画期的な方法として, 1975年, Köhler, Milstein により hybridoma 法による monoclonal 抗体 (mono-Ab) の作製方法が開発され, monospecific な高い抗体価をもつ抗体の大量生産が可能となった<sup>1)</sup>。

現在まで各種人白血病細胞に特異的な腫瘍抗原の検索は多数試みられてきたが, 今だこれら抗原に対する満足すべき抗体は得られておらず, 人白血病抗原は同定されていない<sup>2, 3)</sup>。本研究の目的は, Null (non T, non B) 細胞型急性リンパ球性白血病 (ALL) 細胞株, NALL- I 細胞を免疫細胞とし, mono-Ab を作製, 得られた多数の抗体を解析することにより白血病特異抗原を同定することである。

第 1 編においては, この実験過程で得られた特異性の異なる 3 種類の mono-Ab の解析結果について報告する。

## 実験材料および方法

### 1) 細胞

すでに樹立, 継代維持されている培養株細胞, null cell line (NALL- I<sup>4)</sup>, KOPN- I; 慶応大学小児科, 中沢より分与), pre B cell line (NALM- I<sup>5)</sup>, 腫瘍 B cell line (BALL- I<sup>4)</sup>, Daudi<sup>6)</sup>, Raji<sup>7)</sup>, 正常 B cell line (K- 81, K- 100, K- 103, K- 105, RC- 106; 慶応大学小児科, 中沢より分与), T cell line (MOLT- 3<sup>8)</sup>, MOLT- 4<sup>8)</sup>, TALL- I<sup>4)</sup>, 成人 T 細胞性白血病 (ATL) cell line (MT- I<sup>9)</sup>, myeloid cell line (HL- 60<sup>10, 11)</sup>, K 562<sup>12)</sup>, myeloma cell line (Oda 株), 肺癌細胞株<sup>13)</sup> (扁平上皮癌細胞株; EBC- I, 腺癌細胞株; ABC- I, 小細胞癌細胞株; SBC- I) を用いた。これらの株細胞は 10% 胎児牛血清 (FCS) 加 PRMI 1640 培養液にて培養維持し, 実験に用いた。正常人末梢血リンパ球, 単球, 顆粒球は以下の如く分離し用いた。即ち, Ficoll Conray 法<sup>14)</sup> により単核球を得, さらに FCS で処理したフラスコボトルにて 1 時間, 37 °C で静置, non-adherent cell と adherent cell とに分離し, それぞれリンパ球と単球を得た。顆粒球は Ficoll Conray 分画下層より 5% デキストランを用いて集めた。各種造血器腫瘍細胞は末梢血, 骨髓, 生検リンパ節あるいは腹水より得, 新鮮な状態あるいは凍結保存したものを

用いた。

## 2) Mono-Ab の作製

Null-ALL 細胞株, NALL-I 細胞を免疫原とし, BALB/C マウス (7週令, 雌) に2週間隔で3回,  $4.0 \times 10^6$  cells/body 腹腔内投与し, 最終免疫4日後に脾細胞を得, マウス骨髄腫細胞 P3-NS I/I Ag 4-I(NS-I)<sup>15)</sup>を Köhler, Milstein の方法に準じて細胞融合した。即ち, 免疫脾細胞と NS-I 細胞を細胞比5:1に混合し, 42.6% polyethylene glycol (PEG, M.W. 4000, Koch Light 社) 0.2ml にて, 37°C, 3分間反応させ, 隔合ペレットを HAT 選択培地 (10% FCS 加 RPMI 1640 に hypoxanthine 1.36mg/dl, aminopterin 19.1 µg/dl, thymidine 387 µg/dl を加えた培養液) にて NS-I 細胞  $5 \times 10^5$  cells/ml とし, 96穴マイクロプレート (Falcon #3042) に0.2ml ずつ分注した。これらを5%炭酸ガス培養器にて培養し, hybridoma コロニーの出現を認めた7日目頃より, HAT 選択培地にて3~4日毎に培養液の交換を行ない, 増殖に従い HT 培地 (HAT 選択培地より aminopterin を除いた培養液) に変換し, 21日目までに培養上清について抗体活生存否を決定した。

## 3) 抗体活性有無の決定

マイクロプレートを用いた補体依存性細胞障害試験により次の様に施行した。Falcon #3042 マイクロプレートを用い, 培養上清20µl に標的細胞, NALL-I 細胞  $4.0 \times 10^6$  cells/ml 20µl を加え, 37°C, 30分間放置, さらに1/4希釈ラビット血清 (Cappel 社) を補体として20µl 加え, 37°C, 60分間放置した。細胞障害作用は直接到立顕微鏡下にて観察し, あるいは0.2% trypan blue を用い細胞障害率を求め判定した。細胞に対する抗体活性陽性上清について, さらに BALL-I 細胞と MOLT-4 細胞を用いて同様に検討しスクリーニングを行ない, 特異性の異なる3種類の hybridoma についてクローニングを行なった。

## 4) クローニングおよび腹水抗体の作製

クローニングは limiting dilution 法にて少なくとも3回行なった。BALB/C マウスの脾細胞 (feeder cell)  $5 \times 10^5$  cells/well とスクリー

ニングで得られた抗体産生 hybridoma 細胞 5~10 cells/well をマイクロプレートにて混合培養した。得られた抗体産生クローン株細胞を pristane 0.5 ml 腹腔内投与2週間後の BALB/C マウスに,  $3 \sim 5 \times 10^6$  cells/body 腹腔内投与した。約2~3週間後腹水を得た。

## 5) Mono-Ab の解析

Mono-Ab の特異性は通常の間接膜蛍光抗体法にて検討した。即ち, 標的細胞として培養株細胞, 正常人末梢血細胞, 凍血保存あるいは新鮮各種造血器腫瘍細胞  $1 \sim 2 \times 10^6$  個に mono-Ab 50µl を4°C, 30分反応後, 2回0.1% sodium azide 加 phosphate buffered saline (PBS) で洗滌, 引き続き fluorescein isothiocyanate

(FITC) 標識 goat anti-mouse immunoglobulin (E.Y. 社) を同様に反応させ, 洗滌後落射型蛍光顕微鏡 (オリンパス社) 1,000倍にて観察した。なお各種 mono-Ab の Ig クラスの決定は FITC 標識 goat anti-mouse IgG, IgM, IgA (Cappel 社) を用い, 間接膜蛍光抗体法により行なった。H-2 mono-Ab は各種細胞との反応特異性より Ia frame work determinant と特異的に反応するものであることが強く示唆されたため, 人リンパ球の表面 immunoglobulin

(SIg) あるいは市販の抗 Ia mono-Ab で検出される Ia との関連性を蛍光抗体二重染色法により検討した。また H-3 mono-Ab についても同様に行なった。まず FITC 標識 goat anti-human Ig (ベーリンガー社) と末梢血リンパ球を4°C, 30分間反応させ, 次に H-2, H-3 あるいは Becton-Dickinson 製抗 HLA-DR 抗体を同様に反応させ, さらに tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) 標識 goat anti-mouse Ig (E.Y. 社) 染色後, FITC 蛍光に対しては惹起フィルター IF 490 (オリンパス社) を, TRITC 蛍光に対しては惹起フィルター IF 545 (オリンパス社) を用い観察した。

## 6) 吸収試験による H-2 と Becton-Dickinson 製抗 HLA-DR 抗体の比較

H-2 と Becton-Dickinson 製抗 HLA-DR 抗体のと差異を BALL-I 細胞を用いた吸収試験により検討した。両抗体価をそれぞれ膜蛍光抗体法での最終抗体価濃度の8倍濃度とし, 等容量

表 1. 各種培養株細胞に対する mono-Ab (H-1, H-2, H-3) の反応性

Cell lines		Reaction of monoclonal antibodies		
		H-1	H-2	H-3
Lymphoid	NALL-1	+	+	+
	KOPN-1	+	+	+
	NALM-1	+	+	N.T.
	BALL-1	+	+	+
	Daudi	-	+	+
	Raji	+	+	N.T.
	Normal B(5株)	+	+	N.T.
	MOLT-3	+	-	+
	MOLT-4	+	-	+
	TALL-1	+	-	+
	MT-1**	+	+	-
Myeloma	Oda	+	+	N.T.
Myeloid	HL-60	+	-	+
	K562	-	-	+
Lung cancer	EBC-1 (squamous)	+	+	-
	ABC-1 (adeno.)	+	-	-
	SBC-1 (small cell)	+	-	-

\* Normal B cell lines(K81, K100, K103, K105, RC 106)  
 \*\* MT-1; ATL cell line  
 N.T.; not tested

表 2. 正常人末梢血リンパ球, 単球, 顆粒球に対する mono-Ab (H-1, H-2, H-3) の反応性

Antibodies Test cells	% of IF positive cells from donors;					
	1	2	3	4	5	6
H-1	97	99	99	99	74	-
H-2 Lymphocytes	20	10	-	-	-	-
H-3	26	20	53	45	37	-
H-1	-	-	-	-	76	-
H-2 Monocytes	55	76	-	-	-	-
H-3	-	-	-	89	-	-
H-1	87	91	83	99	76	100
H-2 Granulocytes	3	1	-	-	-	1
H-3	1	1	5	2	1	-

-: not tested

の洗滌 BALL-I 細胞で 4℃, 6 時間反応させ吸収し, その遠沈上清を NALL-I 細胞に反応させ, 間接膜蛍光抗体法でその抗体活性の有無を検討した。

### 7) MLC inhibition test

H-2 抗体が MLC 反応を block しようものであるか否かを検討するため, BALL-I 細胞を stimulator 細胞, 正常人末梢血リンパ球を responder 細胞とし, one-way MLC にて検討した<sup>16)</sup>。

96穴u底マイクロプレート(NUNC社)を用い人末梢血単球核 $5 \times 10^5$  cells/ml を $100 \mu\text{l}$  ずつ分注,  $50 \mu\text{g/ml}$  mitomycin C で30分処理した BALL-I 細胞 $1 \times 10^5$  cells/ml を $100 \mu\text{l}$  ずつ添加, さらに図4の如く希釈した H-2 抗体を $20 \mu\text{l}$  加え培養した。培養6日後,  $100 \mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -thymidine(Amersham社)を $10 \mu\text{l}$  ( $1 \mu\text{Ci/well}$ ) 加え, 24時間培養後 automated sample harvester を使って glass fiber filter paper に細胞を収集, 洗滌, 乾燥後 liquid scintillation counter にて測定した。コントロールとして PHA-M(Difco社)最終濃度1:100および NS-I 腹水を用いた。またすべて実験は triplicate にて施行し, stimulation index (S.I.) は次の様に計算した。

$$S.I. = \frac{\left( \frac{\text{dpm in mixed}}{\text{cell culture}} \right) - \left( \frac{\text{dpm in mitomycin C-treated}}{\text{stimulator cell culture}} \right)}{\text{dpm in non-stimulated lymphocyte culture}}$$

### 8) H-2 抗体の精製

径 $2.6\text{cm} \times 94.5\text{cm}$  column を用いて Sephacryl S 300 (Farmacia社) にて H-2 腹水をゲル濾過した。

## 結 果

### 1) Mono-Ab 産生 hybridoma クローンの樹立と抗体活性

NALL-I 細胞で免疫した BALB/C マウスの脾細胞と NS-I 細胞を融合させ培養し, hybridoma の増殖を認めた培養上清について NALL-I, BALL-I, MOLT-4 細胞を用い, 補体依存性細胞障害試験にてスクリーニングした。この結果, 3種類の細胞すべてに細胞障害性を発揮した2種類の hybridoma ならびに MOLT-4 細胞には反応せず NALL-I, BALL-I 細胞に反応した1種類を選び limiting dilution 法にてクローニングし, 3種類の hybridoma クローンを得, これらの産生する抗体を H-1, H-2, H-3 抗体と名づけた。H-1, H-3 抗体は3種類のスクリーニングに用いた株細胞いずれにも細胞障害試験, 蛍光抗体法において陽性に反応し, H-2 抗体は MOLT-4 細胞には反応せず NALL-I, BALL-I 細胞に陽性であった。

これらの Mono-Ab; H-1, H-2, H-3 の

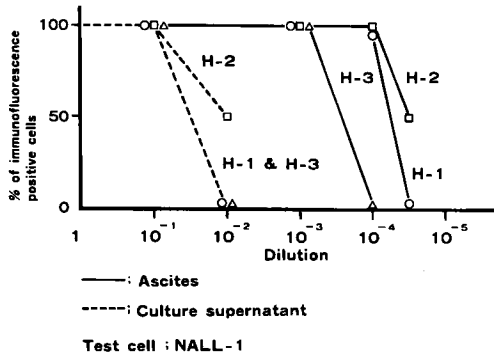


図1. 蛍光抗体法による mono-Ab (H-1, H-2, H-3) の抗体価の検討

表3. 各種造血器腫瘍細胞に対する mono-Ab (H-1, H-2, H-3, HLA-DR) の反応性

Diseases	H-1	H-2	H-3	HLA-DR*
Null-ALL	4/4**	4/4	3/4	4/4
T-ALL	2/2	0/2	2/2	0/2
ATL	3/4	1/4	2/4	1/4
CLL	1/1	1/1	0/1	1/1
CML-BC	2/2	3/4	2/2	3/4
APL	1/1	1/1	0/1	1/1
AML	5/5	3/5	5/5	3/5
AMoL	1/1	2/3	1/1	2/3
B-NHL	2/2	2/2	1/2	2/2
T-NHL	2/2	0/3	1/2	0/3
Null-NHL	1/1	2/2	0/1	2/2

\* tested by anti-HLA-DR, Becton Dickinson  
 \*\* No. of positive cases/no. of cases tested

NALL-1 細胞に対する抗体価を蛍光抗体法で検討した結果、H-1, H-2, H-3 抗体いずれも培養液上清での抗体価は 1:10 であったが、腹水抗体では H-1 H-2 抗体で 1:10,000, H-3 抗体で 1:1,000 と高い抗体活性が認められた (図1)。以下これら mono-Ab の蛍光抗体法による解析には培養液上清は原液を、腹水抗体は 1:100 希釈とし用いた。なおこれらの mono-Ab の Ig クラスは H-1 と H-3 は IgG, H-2 は IgM であった。

2) mono-Ab の各種細胞に対する反応

各種培養株細胞に対する mono-Ab ; H-1,

H-2, H-3 の反応性を検討した結果を表1に示した。この結果、H-1 抗体は HLA 抗原発現のない Daudi<sup>17)</sup> および K562<sup>18)</sup> 以外のテストしたすべての株細胞に反応し、抗 HLA 抗体である可能性が示唆された。H-2 抗体は T cell line の 3 系, HL-60, K 562, ABC-1, SBC-1 に反応せず, null cell line, pre B cell line, B cell line, ATL cell line (MT-1), myeloma cell line (Oda), 肺癌細胞株の内扁平上皮癌由来 EBC-1 と反応した。これらの反応結果は Becton-Dickinson 製抗 HLA-DR 抗体の反応結果と完全に一致し、H-2 抗体は anti-Ia mono-Ab と考えられた。H-3 抗体はテストした細胞の内 MT-1 および肺癌細胞株の 3 系と反応しなかったが Ia 抗原陰性の T cell line の 3 系に陽性であり、この反応結果は H-1, H-2 抗体と異なるものであった。

次に、正常人末梢血リンパ球、顆粒球に対する反応を検討した (表2)。この結果、H-1 抗体はリンパ球、単球、顆粒球いずれに対しても 74% 以上の高い陽性率を示した。H-2 抗体はリンパ球に対して 10~20% 陽性であり、この値は SIg 陽性リンパ球の混在率とほぼ一致しており、又単球には 55~76% と高率に反応したが顆粒球には反応しなかった。H-3 抗体の反応性は H-1, H-2 抗体のそれと異なり 20~53% のリンパ球と反応したが顆粒球には反応せず、しかし単球には 89% と高い陽性率を示し又その反応性は強いものであった。

各種造血器腫瘍細胞に対する H-1, H-2, H-3, 抗 HLA-DR mono-Ab の反応性を検討し、この結果を表3に示した。H-1 抗体は T cell 系分化抗原の発現を欠き、E rosette 陽性であった非定形的な ATL の 1 例を除き、すべての症例の腫瘍細胞と反応した。H-2 抗体は抗 HLA-DR 抗体と完全に一致した反応性を示し、T-ALL の 2 例, T-non-Hodgkin's lymphoma (NHL) の 3 例はいずれも反応しなかった。一方, null-ALL, B 細胞型慢性リンパ球性白血病 (B-CLL), 急性前骨髄性白血病 (APL), B-NHL, null-NHL はいずれも陽性であり、その他 ATL, 慢性骨髄性白血病の急転 (CML-BC), 急性骨髄性白血病 (AML), 急性単球性白血病 (AMoL)

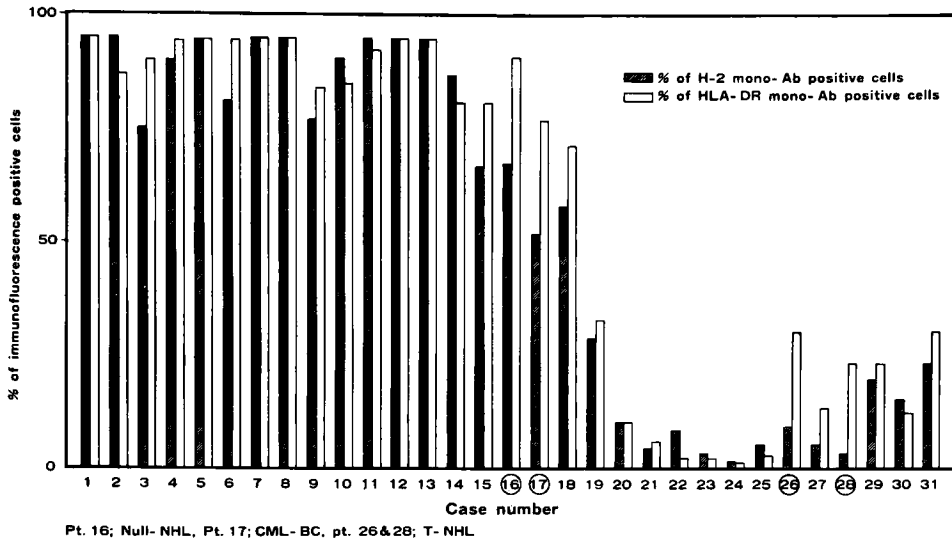
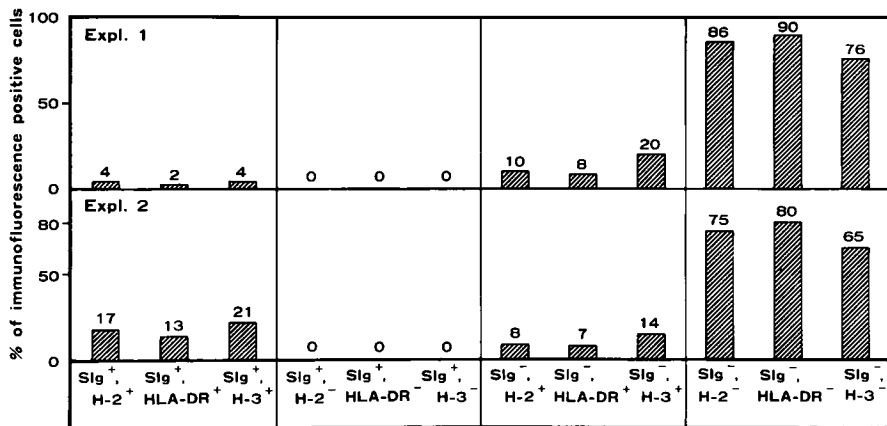


図 2. 各種造血器腫瘍細胞に対する H-2 と抗 HLA-DR 抗体の反応性の比較



Slg: detected by FITC-goat anti-human IgF(ab)<sup>2</sup>  
 H-2Ag, H-3Ag & HLA-DR; stained with H-2Ab, H-3Ab or anti-HLA-DR(Becton Dickinson)  
 & further with TRITC-goat anti-mouse Ig  
 Test cells; human normal peripheral blood lymphocytes

図 3. 二重染色蛍光抗体法による H-2 抗体, H-3 抗体, 抗 HLA-DR 抗体の比較

の一部の症例で反応した。H-3 抗体は H-1, H-2 抗体と異なる反応結果であったが、造血器腫瘍の病型との間に一定の傾向は認められなかった。

3) 各種造血器腫瘍細胞に対する H-2 と抗 HLA-DR 抗体の反応性の比較

各種造血器腫瘍細胞に対する H-2 と抗 HLA-DR 抗体の反応性を蛍光抗体法により調べ、そ

の陽性細胞率を比較し検討した。図 2 に示した如く、31 症例に対する H-2 ならびに抗 HLA-DR 抗体の陽性率はほぼ一致していた。しかし症例 16, 17, 26, 28 においては H-2 抗体陽性率が抗 HLA-DR 抗体陽性率より 20% 以上低値であった。

4) 二重染色膜蛍光抗体法による H-2 抗体および H-3 抗体と抗 HLA-DR 抗体の比較

H-2 抗体および H-3 抗体に反応する正常リ

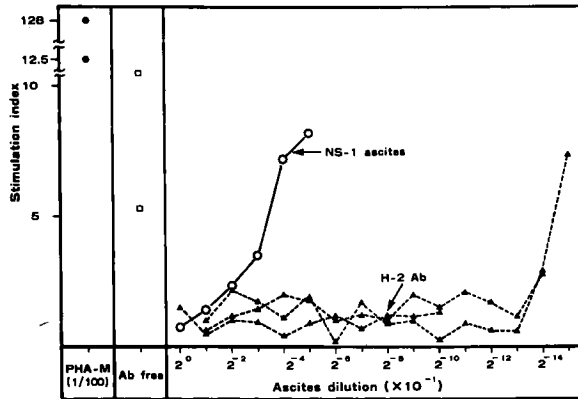


図4. MLC 反応に対する H-2 抗体の作用

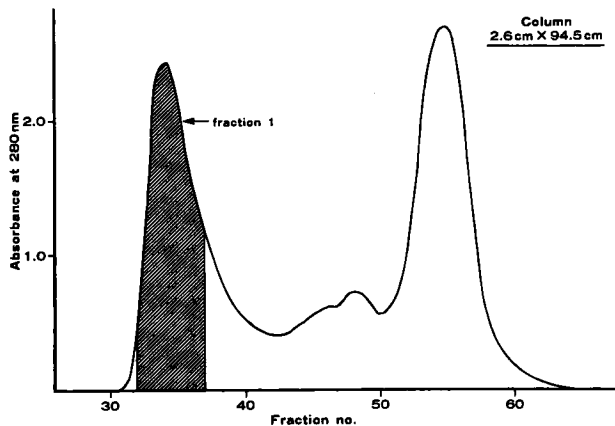


図5. Sphacryl S 300による H-2 腹水の溶出曲線

リンパ球の帰属を知る目的で FITC 標識 goat anti-human Ig および TRITC 標識 goat anti-mouse Ig を用い、SIg と H-2, H-3 あるいは抗 HLA-DR 抗体反応抗原を二重染色し図3の如く検討した。この結果、給血者より得た末梢血において、SIg ならびに H-2 あるいは抗 HLA-DR 抗体反応抗原を共に保有するリンパ球は、実験1ではそれぞれ4%、2%であり、実験2では17%、13%と互いによく一致していた。さらに SIg を欠き H-2 あるいは抗 HLA-DR 抗体反応抗原のみを保有するリンパ球も7~10%で互いによく一致していた。なお、SIg 陽性で H-2 あるいは HLA-DR 抗原陰性の細胞は存在せず、さらに SIg ならびに H-2 あるいは HLA-DR 抗原を欠くリン

パ球は、実験1ではそれぞれ86%、90%、実験2では75%、80%であった。以上の結果は H-2 抗体反応抗原は、SIg 陽性細胞即ち B cell ならびに数%の SIg 陰性細胞に発現されるものであり、抗 HLA-DR 抗体反応抗原とほぼ同一のものであることが示された。一方、SIg ならびに H-3 あるいは抗 HLA-DR 抗体反応抗原を共に保有するリンパ球は、実験1ではそれぞれ4%、2%、実験2では21%、13%であり、一方、SIg 陽性で H-3 抗原陰性の細胞は存在しなかった。しかし、SIg を欠き H-3 あるいは抗 HLA-DR 抗体反応抗原を保有する細胞は、実験1ではそれぞれ20%、8%、実験2では14%、7%であり、SIg を欠き H-3 抗体反応抗原を保有する細胞は SIg を欠き抗 HLA-DR 抗体反応抗原を保有する細胞に比べ有意に多かった。以上の結果は H-3 抗体反応抗原はすべての B cell と一部の T cell に存在することを示すものであった。

#### 5) 吸収試験による H-2 と抗 HLA-DR 抗体の比較

H-2 と抗 HLA-DR 抗体の同一性を確認する目的で、BALL-1 細胞での吸収前後における両抗体の NALL-1 細胞に対する反応性を検討した結果、両抗体はともに吸収後 NALL-1 細胞とまったく反応せず、それぞれの反応抗原が同一抗原であることが確認された。

#### 6) MLC 反応に対する H-2 抗体の作用

今回の MLC の実験においては、反応リンパ球に100倍希釈 PHA-M を加えた場合12.5あるいは128の、又腹水を加えず one-way MLC のみを行なった場合5.3あるいは10.5の stimulation index が得られた。このような実験系に H-2 腹水抗体を図4の如く添加した場合、81,920倍希釈まで MLC 反応はほぼ完全に抑制されたが、それ以上の希釈では stimulation index は増加

した。一方 NS-1 腹水を用いて同様にテストした場合には40倍まで MLC 反応は低値であった。

#### 7) H-2 mono-Ab の精製

H-2 腹水抗体を精製するため Sephacryl S 300 column chromatography を行ない、図5に示すように void volume 直後に fraction 1 が得られた。この fraction 1 は抗体活性を有し、抗マウス IgM 抗体と特異的に反応した。なお H-2 腹水 1 ml より約10mg IgM が得られた。

### 考 案

急性リンパ球性白血病 (ALL) 細胞の腫瘍抗原ならびにリンパ球分化抗原に関する研究は、免疫学的のみならず臨床診断的ならびに治療においても重要であり、現在まで多数の報告がなされてきた<sup>3,19)</sup>。特に1975年 Köhler, Milstein<sup>1)</sup>により細胞融合法が開発され、さらに Pontecorvo<sup>20)</sup>のポリエチレングリコール法が確立されて以来、mono-Ab を用いたこれら白血病細胞の抗原発現に関する解析は著明に進展した<sup>21)</sup>。本研究においては教室で樹立、維持している null-ALL 細胞株, NALL-1 に対する mono-Ab を作製解析し、臨床的に有用な抗体を得ようと試みた。

Mono-Ab 作製にあたり、1つの困難な問題点は、多数の抗体産生 hybridoma をいかにスクリーニングし、目的とする抗体産生クローンを選別するかである。今回はその1つの方法として96穴マイクロプレートを用い補体依存性細胞障害試験によりスクリーニングした。この方法は細胞洗滌操作がなく、直接プレートのままで簡易倒立顕微鏡下で判定が可能であり、またアイソトープ、蛍光顕微鏡あるいは吸光度計等は不要であり、多数の抗体をスクリーニングする場合有用であった。しかしデータには示していないが蛍光抗体法との間に明らかな不一致が認められ、補体依存性細胞障害活性を欠く抗体は検出できず、さらに抗原発現の少ない細胞に対しては感度が悪いという欠点があった。したがって今回のスクリーニング法は抗原量の多い細胞をテスト細胞とし、補体依存性細胞障害活性を有する抗体を得ようとする場合有用であると考えられた。

得られた mono-Ab の内、H-1 抗体は表1、

2, 3 に示した如く、HLA 抗原を欠く Daudi<sup>17)</sup>, K 562<sup>18)</sup>細胞を除くテストしたすべての人有核細胞と反応するものであった。HLA 抗原 (HLA-A, B, C 抗原群) は同種移植片拒絶抗原として解析された主要組織適合性遺伝子複合体の遺伝子産物で、ほとんどすべての有核細胞に発現されており、H-1 抗体の反応結果はこの抗体が HLA 抗原と特異的に反応するものであることを示している。なおテストした1例の ATL 細胞とはまったく反応しなかったが、この症例の ATL 細胞は通常認められる各種 T 細胞分化抗原を欠いており、HLA 抗原についても欠損ないし、その発現が非常に弱い可能性が考えられた。

個体の免疫応答を支配する重要な遺伝子産物として、マウスでは Ia 抗原が知られており、ヒトでは HLA-DR 抗原あるいはヒト Ia 抗原がそれに相等する。このヒト Ia 抗原は正常 B 細胞、単球、null 細胞に発現され<sup>22)</sup>、一般に T 細胞、成熟顆粒球には認められず、さらに白血病細胞では null-ALL, B-CLL 細胞に存在し、また AML, APL, CML-BC, ATL の一部の症例において認められるが、T-ALL 細胞には認められないものである<sup>22-25)</sup>。H-2 抗体の反応性はこれらの知見とよく一致するものであり、H-2 mono-Ab が Ia 特異抗体である可能性が示された。

次にこの可能性をより明らかにする目的で、Ia 抗原分子を免疫沈降することが証明されている Becton-Dickinson 製抗 HLA-DR 抗体<sup>26)</sup>と H-2 抗体を比較検討した。まず、各種造血器腫瘍細胞に対する両抗体の反応性を比較した結果、それぞれの反応性ならびに反応陽性率はほぼ完全に一致した。しかし検討した31例中4例においてはそれぞれの反応性に有意の差 (図2) が認められた。この不一致性は蛍光抗体法にともなう観察者の主観以外に、これら細胞の Ia 抗原発現量が比較的少ないことならびに Lampson, Carrel, Quaranta 等<sup>26-28)</sup>により報告された Ia サブセットの相異による可能性も考えられた。正常リンパ球を用いた抗 Ig 抗体と H-2 あるいは抗 HLA-DR 抗体の2重染色による検討においても、両 mono-Ab の反応性はよく一致して

おり、さらにこれら抗体の反応抗原すなわち Ia はすべての SIg 陽性細胞と数%の SIg 陰性細胞に存在することが示された。SIg 陽性細胞すなわち B 細胞に Ia が発現されていることはすでに述べた通りであるが、SIg 陰性で Ia 陽性の細胞の帰属については、テストしたリンパ球中に混在する単球あるいは null 細胞と考えられた。さらに一般に T 細胞は Ia を欠くとされているが、Rund Schuurman<sup>29)</sup>は正常末梢血 T 細胞の 4~7%は Ia 陽性であると報告しており、今回検出した H-2 陽性、SIg 陰性細胞が Ia 陽性 T 細胞である可能性も考えられた。

Ia 抗原は本来 MLC 刺激抗原として認識された抗原系であり<sup>30)</sup>、また抗 Ia アロ血清あるいは異種血清は同種 MLC を block する<sup>31)</sup>。今回作製した H-2 抗体も one-way MLC において明らかにその反応を block するものであり、さらに IgM 抗体として充分量を得ることができるものであり、今後 Ia 抗原の関与するヒト免疫系の解析に有用なものであることが示された。さらに H-2 と抗 HLA-DR 抗体による相互吸収試験においても、両者は同一抗原を認識した mono-Ab であることが明らかとなった。以上の結果より、今回得られた H-2 抗体はヒト Ia 抗原の framework determinant に特異的な IgM 抗体であり、かつ MLC 反応を block する作用を有するものであることが判明した。

H-3 抗体についてはその反応抗原を同定することはできなかったが、培養株細胞、正常末梢血、各種造血器腫瘍細胞に対する反応性から、上記に示した HLA、Ia 抗原とは明らかに異なる抗原に反応しており、顆粒球を除く造血器細胞に広く分布する抗原と反応するものであった。結果に示した如く SIg と H-3 抗体を用いた正常末梢血リンパ球を 2 重染色した検討で、SIg 陽性細胞はすべて H-3 抗体陽性で、かつ SIg 陰性、H-3 抗体陽性細胞の比率は SIg 陰性、抗 HLA-DR 抗体陽性細胞群に比べ有意に高率であり、H-3 抗体反応抗原は B cell と T cell の一部に存在するものであった。即ち、H-3 抗体は T cell の亜群に反応し、未熟な顆粒球系細胞、単球系細胞、B cell に広く分布するヒト白血球共通抗原 (LC 抗原) に反応するものであると考

えられた。本来 LC 抗原は、T および B リンパ球、胸腺細胞、単球、顆粒球に存在し他の組織に存在しない糖蛋白より構成されているものであるが、R. Dalchau は B リンパ球において有意に存在するこの LC 抗原のサブセットを認識する (F 8-11-13) を作製した<sup>32)</sup>。この F-8-11-13 抗体は顆粒球には全く反応せず、胸腺、骨髓、末梢血単核球およびリンパ節の内、それぞれ一部の細胞と反応し、特に、B リンパ球に強陽性を示し、一部の T リンパ球に陽性を示した。以上は、H-3 抗体と F 8-11-13 抗体の反応の類似性を示すものであり、H-3 抗体はヒト LC 抗原サブセットを認識していることを強く示唆するものであった。

## 結 論

Non-T, non-B 急性リンパ球性白血病細胞株、NALL-1 を免疫原として、マウスを用いた B cell hybridoma を作製し、補体依存性細胞障害作用を有する 3 種類の monoclonal 抗体 H-1 ( $\gamma$ )、H-2 ( $\mu$ )、H-3 ( $\gamma$ ) を得、以下の結論を得た。  
1) H-1 は HLA 抗原の発現のない培養株細胞、Daudi, K 562 を除いて検討したすべて有核細胞と反応し、HLA 抗原を認識する抗体と考えられた。

2) H-2 は各種培養株細胞、正常末梢血細胞、各種造血器腫瘍細胞との反応性を検討した結果、Ia 特異抗体であることが強く示唆された。さらに、Becton-Dickinson 製抗 HLA-DR 抗体とその反応パターンはほぼ完全に一致し、吸収試験でもその同一性が確認された。この H-2 mono-Ab は MLC 反応の抑制活性を有し、さらに IgM 抗体として純化され、抗ヒト Ia IgM mono-Ab として今後巾広い有用性が期待される。

3) H-3 は明らかに H-1、H-2 と異なり、T cell の亜群に反応し、顆粒球を除く造血器細胞と広く反応するヒト白血球共通抗原に関連したものと考えられた。

御指導いただいた木村郁郎教授ならびに坪田輝彦博士に深謝致します。



文 献

1. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting of predefined specificity. *Nature* **256**, 495—497, 1975.
2. Nadler, L.M., Stasheko, P., Handy, R., and Schlossman, S.F.: A monoclonal antibody defining a lymphoma associated antigen in man. *J. Immunol.* **125**, 570—577, 1980.
3. Ritz, J., Pesando, J.M., Notis-McConarty, J., Lazarus, H. and Schlossman, S.F.: A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. *Nature* **283**, 583—585, 1980.
4. Miyoshi, I., Hiraki, S., Tsubota, T., Kubonishi, I., Matsuda, Y., Nakayama, G., Kishimoto, H., and Kimura, I.: Human B cell, T cell and null cell leukemic cell lines derived from acute lymphoblastic leukemias. *Nature* **267**, 843—844, 1977.
5. Minowada, J., Tsubota, T., Greaves, M.F., and Walters, T.R.: A non-T, non-B human leukemia cell line (NALM-1); Establishment of the cell line and presence of leukemia-associated antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 83—87, 1977.
6. Klein, E., Klein, G., Nadcarni, J.S., Nadkarni, J.J., Wigzell, H., and Clifford, P.: Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res.* **28**: 1300—1310, 1968.
7. Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, Y.M., Zajac, B., Henle, G., and Henle, W.: Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji). *J. Natl. Cancer Inst.* **37**, 547—559, 1966.
8. Minowada, J., Ohnuma, T., and Moore, G.E.: Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 891—895, 1972.
9. Miyoshi, I., Kubonishi, I., Sumida, M., Hiraki, S., Tsubota, T., Miyoshi, I., Kubonishi, I., Sumida, M., Kimura, I., Miyamoto, K., and Sato, J.: A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Gann* **71**, 155—156, 1980.
10. Collins, S.J., Gallo, C.R., and Gallagher, R.E.: Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. *Nature* **270**, 347—349, 1977.
11. Boss, M.A., Delia, D., Robinson, J.B., and Greaves, M.F.: Differentiation-linked expression of cell surface markers on HL-60 leukemic cells. *Blood* **56**, 910—916, 1980.
12. Lozzio, C.B., and Lozzio, B.B.: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321—334, 1975.
13. 平木俊吉, 宮井正博, 瀬戸 匠, 田村哲生, 渡辺洋一, 小沢志郎, 池田裕政, 中田康則, 木村郁郎: ヒト肺癌 (扁平上皮癌, 腺癌, 小細胞癌) 細胞株の樹立と異種移植. *肺癌* **22**, 53—57, 1982.
14. 辻 公美: 比重遠沈法によるリンパ球の分離, Conray 400-Ficoll 法. *免疫実験操作法* **1**, 265—268, 1971.
15. Köhler, G., Howe, S.C. and Milstein, C.: Fusion between immunoglobulin-secreting and non secreting myeloma cell lines. *Eur. J. Immunol.* **6**, 292—295, 1976.
16. Tsubota, T., Miyoshi, I., Uno, J., Hiraki, S., and Kimura, I.: Comparison of the stimulating capacity of human leukemia T-cell, Null cell and B-cell lines in mixed lymphocyte culture. *J. Natl. Cancer Inst.* **60**, 793—795, 1978.
17. Koyama, K., Nakamura, K., Tanigaki, N., and Pressman, D.: Alloantigens of human lymphoid cell lines; 'human Ia-like antigens.' *Immunology* **33**, 217—230, 1977.

18. Koefler, H.P. and Golde, D.W.: Human myeloid leukemia cell lines: A review. *Blood* **56**, 344—350, 1980.
19. Ueda, R., Tanimoto, M., Takahashi, T., Ogata, S., Nishida, K., Namikawa, R., Nishizuka, Y., and Ota, K.: Serological analysis of cell surface antigens of null cell acute lymphocytic leukemia by mouse monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 4386—4390, 1982.
20. Pontecorvo, G.: Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethyleneglycol treatment. *Somatic Cell Genetics* **1**, 397—400, 1975.
21. Foon, K.A., Schroff, R.W. and Gale, R.P.: Surface markers on leukemia and lymphoma cells; Recent Advances. *Blood* **60**, 1—19, 1982.
22. Schlossman, S.F., Chess, L., Humphreys, R.E., and Strominger, J.L.: Distribution of Ia-like molecules on the surface of normal and leukemic human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 1288—1292, 1976.
23. Winchester, R.J., Ross, G.D., Jarowski, C.I., Wang, C.Y., Halper, J., and Broxmeyer, H.E.: Expression of Ia-like antigen molecules on human granulocytes during early phases of differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 4012—4016, 1977.
24. Fitchen, J.H., Foon, K.A. and Cline, M.J.: Medical progress; The antigenic characteristics of hematopoietic stem cells. *N. Engl. J. Med.* **305**, 17—24, 1981.
25. Hattori, T., Uchiyama, T., Takatsuki, K. and Uchino, H.: Presence of human B-lymphocyte antigens on adult T-cell leukemia cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **17**, 287—295, 1980.
26. Lampson, L.A. and Levy, R.: Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J. Immunol.* **125**, 293—299, 1980.
27. Carrel, S., Tosi, R., Gross, N., Tanigaki, N., Carmagnola, A.L., and Accolla, R.S.: Subsets of human Ia-like molecules defined by monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* **18**, 403—411, 1981.
28. Quaranta, V., Pellegrino, M.A. and Ferrone, S.: Serologic and immunochemical characterization of the specificity of four monoclonal antibodies to distinct antigenic determinants expressed on subpopulations of human Ia-like antigens. *J. Immunol.* **126**, 548—552, 1981.
29. Schuurman, R., K.B. Gelfand, E.W., Matheson, D., Zimmerman, B., and Dosch, H.: Identification of Ia on a subpopulation of human T lymphocytes that stimulate in a mixed lymphocyte reaction. *J. Immunol.* **124**, 1924—1928, 1980.
30. Thorsby, E., Albrechtsen, D., Hirschberg, H., Kaakinen, A., and Solkeim, B.G.: MLC-activating HLA-D determinants; Identification, tissue distribution, and significance. *Transplant. Proc.* **9**, 393—400, 1977.
31. Russo, C., Quaranta, V., Indiveri, F., Pellegrino, M.A., and Ferrone, S.: Effect of polyclonal and monoclonal HLA-DR xenoantibodies on xenogeneic mixed lymphocyte reactions *Immunogenetics* **11**, 413—416, 1980.
32. Dalchau, R. and Fabre, J.W.: Identification with a monoclonal antibody of a predominantly B lymphocyte-specific determinant of the human leukocyte common antigen. *J. Exp. Med.* **153**, 753—765, 1981.

**Studies on antibodies to human null-acute lymphoblastic leukemia cell  
line (NALL-1). I. Monoclonal antibodies with specificities for HLA,  
Ia-like and human leukocyte common antigens.**

**Yuro HARUTA**

**Second Department of Internal Medicine,**

**Okayama University Medical School**

**(Director : Prof. I. Kimura)**

Three monoclonal antibodies, designated H-1, H-2 and H-3, were produced by immunizing BALB/C mice with *cells of* an established human null-acute lymphoblastic leukemia (NALL-1) cell line and fusing spleen cells from these mice with cells of a mouse myeloma cell line, P3-NSI/1-AG4-1. The resulting hybrid cells were initially screened for production of antibodies by complement-dependent cytotoxicity. Stable monoclonal antibody-producing cell lines were isolated by repeated cloning. These independently derived monoclonal antibodies showed complement-dependent cytotoxicities. Further characterization of the monoclonal antibodies was made by immunofluorescence. H-1 antibody reacted with all tested cells of the human nucleated cells except for HLA-lacking Daudi and K562 cells, and thus was shown to be specific for a common antigenic determinant of HLA-A, -B and -C. H-2 antibody reacted with all of the tested null-cell lines, B-cell lines, B-cells and monocytes. Moreover, studies on fresh leukemia and lymphoma cells revealed that tumor cells from null-acute lymphoblastic leukemia, B-chronic lymphocytic leukemia and null-non-Hodgkin's lymphoma were H-2 antibody reactive. Cells from some patients with acute myelogenous leukemia, acute monocytic leukemia, chronic myelogenous leukemia in blast crisis and adult T-cell leukemia were also H-2-positive. In contrast, T-acute lymphoblastic leukemia, T-non-Hodgkin's lymphoma cells and mature T-cells did not react with H-2. A cross absorption study using H-2 and anti-HLA-DR monoclonal antibody confirmed the same specificity. Interestingly, H-2 showed blocking activities against the stimulation in one-way mixed lymphocyte culture. These results indicate that H-2 is a monoclonal antibody specific for a framework determinant of human Ia-like antigens. Reactivity of H-3 antibody was different from that of H-1 and H-2. H-3 reacted with some T-cells, B-cells and monocytes, suggesting that the antibody is associated with human leukocyte common antigens.