

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

移植 (1983.08) 18巻4号:351～356.

Con Aによるヒト末梢リンパ球増殖反応に及ぼす抗ヒトIa様抗原巢クローン抗体の影響に関する研究

東 寛, 片桐 一, 池田久実

# Con A によるヒト末梢リンパ球増殖反応に及ぼす抗ヒト Ia 様 抗原単クローン抗体の影響に関する研究

東 寛・片 桐 一\*・池 田 久 實\*

## Participation of Human Ia-like Molecules in the Con A-induced Proliferation of Lymphocyte

Hiroshi Azuma, Makoto Katagiri\* and Hisami Ikeda\*

*Department of Pediatrics, Asahikawa Medical College*

*\*Department of Pathology, Asahikawa Medical College*

### 【Summary】

Con A-induced proliferation of human peripheral blood lymphocytes (PBL) was inhibited by murine monoclonal antibody (7B6) specific to human Ia-like antigens, whereas PHA-induced proliferation of PBL was not blocked by 7B6 antibody.

7B6 seems to act at early phase of the Con A-induced proliferation of PBL because effective inhibition by the antibody is no more observed when the antibody is added to the culture 12 hours after the initiation of Con A-induced proliferation of PBL.

The cytokine activity measured by the capacity of culture supernatant to initiate the proliferation of murine thymocyte, was not increased in the supernatant from the culture where Con A-induced proliferation of PBL was blocked by 7B6 antibody. It is concluded that human Ia-like molecules participate in the production of cytokine essential to Con A-induced proliferation of PBL.

**Key words:** Ia-like molecule,  
Con A,  
cytokine,  
monoclonal antibody,  
Lymphocyte proliferation

### I. はじめに

Concanavalin A (Con A) 刺激による T 細胞増殖反応には, Ia 抗原陽性のマクロファージが必要であるとみなされている. このことは, 反応系より Ia 抗原陽性マ

クロファージを除去すると Con A 刺激による T 細胞の増殖反応が大幅に減少することにより明らかにされた. しかし Ia 抗原自体が何らかの機能を果たしているか否かは, これらの実験では明らかにされていない<sup>1-6)</sup>.

Palacios は, ヒト Ia 様抗原に対するマウス単クローン抗体をヒト末梢リンパ球と Con A との反応系に加えても T 細胞の増殖を抑制できなかったことから, この反応系においては, Ia 様抗原は, 何ら機能的役割を担っ

旭川医大 小児科

\* 同 第 2 病理

(58・5・30 受付)

表 1 レクチンの各濃度における 7B6, 12A5 抗体の抑制効果

			7B6		12A5	
			-	+	-	+
Exp. 1	Con A ( $\mu\text{g}/\text{well}$ )	5	13.76 $\pm$ 0.05	7.14 $\pm$ 1.19	15.52 $\pm$ 2.56	17.64 $\pm$ 1.42
	PHA (1/希釈倍数)	1/100	20.33 $\pm$ 3.73	21.15 $\pm$ 1.86	15.57 $\pm$ 4.27	13.04 $\pm$ 2.17
Exp. 2	Con A ( $\mu\text{g}/\text{well}$ )	20	16.10 $\pm$ 1.64	9.84 $\pm$ 0.80	13.76 $\pm$ 0.04	11.49 $\pm$ 1.68
		5	18.06 $\pm$ 5.32	2.76 $\pm$ 1.40	16.06 $\pm$ 1.92	11.32 $\pm$ 0.98
		1.25	9.72 $\pm$ 1.39	0.68 $\pm$ 0.22	N. D.	N. D.
		0.3125	0.63 $\pm$ 0.14	0.20 $\pm$ 0.01	N. D.	N. D.
	PHA (1/希釈倍数)	1/100	19.96 $\pm$ 3.11	19.64 $\pm$ 1.97	34.25 $\pm$ 3.08	27.36 $\pm$ 2.22
		1/400	15.47 $\pm$ 6.78	15.22 $\pm$ 0.33	N. D.	N. D.
		1/1600	0.12 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.04	N. D.	N. D.

単位: CPM $\times 10^{-4}$  (実験回数 2)

ていないと述べている<sup>7)</sup>。

著者らは、ヒト Ia 様抗原に対する単クローン抗体をヒト末梢リンパ球と Con A との反応系に加えると T 細胞の増殖反応が抑制されること、さらにその培養上清中に cytokine の産生増加が認められないことを見い出した。以上のことから、Ia 様抗原は、Con A 刺激による T 細胞増殖過程に必要な cytokine の産生に重要な役割を担っていると考えられる。

## II. 材料および方法

### 1. ヒト Ia 様抗原に対する単クローン抗体

ヒト B 細胞株 EBV-Wa でマウスを免疫して得た、ヒト Ia 様抗原に対する単クローン抗体は Köhler と Milstein<sup>8)</sup> の方法に準じて作成した。

実験に用いた単クローン抗体は、7B6 と 12A5 の 2 種である。7B6 は IgG1 に属しヒト Ia 様抗原  $\beta$  鎖の monomorphic 抗原決定基に対する抗体である<sup>9)</sup>。12A5 は  $\beta$  鎖上の monomorphic 抗原決定基を検出し IgM に属する。この抗体は 7B6 の検出する Ia 様抗原分子群の一部を検出することが確かめられている<sup>9)</sup>。

実験に用いた単クローン抗体を含むマウスの腹水は、必要に応じて RPMI で希釈した。

### 2. ヒト末梢リンパ球の Con A, PHA による増殖反応の測定

96 穴のマイクロプレートを用い Triplicate にて行った。健康成人より得た末梢リンパ球浮遊液 0.16 ml (細胞数  $2 \times 10^6$  個) に非動化ヒト AB 血清 40  $\mu\text{l}$ , Con A 溶液 20  $\mu\text{l}$  を加え、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 37°C, 72 時間培養

後、<sup>3</sup>H-サイミジン 1  $\mu\text{Ci}$  を加え、さらに 24 時間培養して、細胞内 DNA への <sup>3</sup>H-サイミジンの取り込みを測定した。

### 3. cytokine の測定

BALB/c マウスの胸腺細胞を標的細胞として用いた。Lachman らの方法に準じて 96 穴のマイクロプレートを使用して行なった<sup>10)</sup>。5 $\times 10^6$ /ml の胸腺細胞浮遊液 0.16 ml, 非動化ヒト AB 血清 10  $\mu\text{l}$ , ヒト末梢リンパ球と Con A との培養上清 20  $\mu\text{l}$  を合わせて 72 時間培養後、<sup>3</sup>H-サイミジン 1  $\mu\text{Ci}$  を加え、さらに 24 時間培養して DNA への <sup>3</sup>H-サイミジンの取り込みを測定した。

cytokine の測定に使用したリンパ球培養上清は培養開始後 1 日目, 2 日目, 3 日目の上清をとり出し, 2,000 回転 5 分遠沈後, その上清をとり, -20°C に保存したものを使用した。

## III. 結 果

### 1. レクチンによるリンパ球増殖反応に対する単クローン抗体 (7B6, 12A5) の抑制効果

種々の濃度の PHA および Con A によるヒトリンパ球増殖反応に対する単クローン抗体の影響を検討した (表 1)。末梢リンパ球と PHA との反応系においては、PHA の量に関係なく 7B6 による増殖反応の抑制は認められない。しかし Con A による増殖反応は、Con A の量が 5  $\mu\text{g}/\text{well}$  以下の時、7B6 により著明な抑制が認められた。また 12A5 は、5  $\mu\text{g}/\text{well}$  以上の量の Con A による増殖反応を抑制しなかった。

一定量の Con A (5  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) によるヒト末梢リンパ

表 2 一定量の Con A (5  $\mu$ g/well) に対する 7B6, 12A5 の抑制効果

抗 体		希釈倍数			
		10 倍	100 倍	1000 倍	—
7B6	Exp. 1	2.50 $\pm$ 0.88	4.55 $\pm$ 1.67	14.41 $\pm$ 1.27	16.08 $\pm$ 1.92
	Exp. 2	2.80 $\pm$ 0.30	3.72 $\pm$ 0.63	11.89 $\pm$ 1.43	13.34 $\pm$ 0.99
12A5	Exp. 1	11.32 $\pm$ 0.98	12.47 $\pm$ 1.19	13.56 $\pm$ 1.31	16.08 $\pm$ 1.92
	Exp. 2	17.63 $\pm$ 1.47	20.47 $\pm$ 1.22	19.07 $\pm$ 1.57	15.52 $\pm$ 2.56

単位: CPM $\times$ 10<sup>-4</sup> (実験回数 6)

6 回の実験のうち 2 回の成績を示した。他 4 回の成績もほぼ同様である。

表 3 ヒト末梢リンパ球と Con A との反応開始後 7B6 抗体の抑制効果が発現しうる時期

時 間	-0.5	0	0.5	1	2	4
Exp. 1	7.81 $\pm$ 0.54	N. D.	8.80 $\pm$ 0.56	N. D.	N. D.	N. D.
Exp. 2	8.86 $\pm$ 1.39	6.42 $\pm$ 0.55	8.33 $\pm$ 0.51	8.53 $\pm$ 0.90	9.63 $\pm$ 1.45	8.61 $\pm$ 0.96
時 間	6	12	24	48	7B6(-)	
Exp. 1	N. D.	N. D.	17.50 $\pm$ 0.75	18.90 $\pm$ 0.58	15.53 $\pm$ 1.50	
Exp. 2	9.06 $\pm$ 0.88	17.03 $\pm$ 0.99	N. D.	N. D.	18.85 $\pm$ 0.44	

単位: CPM $\times$ 10<sup>-4</sup> (実験回数 2)

球増殖反応系に、種々の量の 7B6 および 12A5 を作用させ、その抑制効果を検討した (表 2)。

表 2 に示すとおり、7B6 に関しては抗体量と抑制効果との間には、dose-response の関係が認められた。したがって Con A による末梢リンパ球増殖反応には、7B6 の認識する Ia 様抗原が関与していることが明らかとなった。一方 PHA による増殖反応には、Ia 様抗原は重要な役割を担っていないことが示唆された。

## 2. リンパ球増殖の抑制効果が発現される時期の解析

7B6 による抑制が増殖反応過程のどのような時点で認められるかを検討した。Con A 添加後の種々の時期に 7B6 を加え、その抑制効果を調べた (表 3)。Con A 添加後、6 時間までに 7B6 を加えると抑制効果が認められるが、12 時間を経過した時点では、抑制効果が認められない。すなわち Con A によるヒト末梢リンパ球増殖反応に対する 7B6 の抑制効果は、Con A とヒト末梢リンパ球との反応のかなり初期における過程が抑制されるためと考えられる。

## 3. Con A による末梢リンパ球増殖反応過程の培養上清中の cytokine 活性

Con A による末梢リンパ球増殖反応に対する 7B6 の抑制機序を解析するために Con A と末梢リンパ球との培養上清中の cytokine の測定を行なった (表 4)。Con A による末梢リンパ球増殖反応過程の培養上清中の cytokine 活性は、培養開始後 1 日目、2 日目、3 日目で徐々に上昇していた。これに反し 7B6 により増殖反応が抑制された培養上清中には、cytokine 活性の上昇は認められなかった。

7B6 がマウス胸腺細胞に直接反応する可能性および cytokine 活性を有する分子に反応する可能性を考え、cytokine の測定系に十分量の 7B6 (10 倍希釈の腹水 20  $\mu$ l) を加えた測定を同時に行った (表 4, Exp. 1)。その結果は、cytokine 測定系に新たに 7B6 を加えない場合と同様であった。したがって 7B6 は cytokine の測定系には影響を与えていないと考えられる。

次に培養上清中に残留する Con A の影響をのぞくために cytokine の測定系に 0.2 M- $\alpha$ -Methyl-Mannoside ( $\alpha$ -MM) を加え、Con A の作用を阻止して培養上清の胸腺細胞に対する直接的な mitogenic 活性を測定した (表 5)。

$\alpha$ -MM を加えると全体の <sup>3</sup>H-サイミジンの取り込みは低下するが 7B6 を添加していない培養上清の mito-

表 4 7B6抗体により増殖反応が抑制された培養上清中の cytokine 活性

	培養上清の由来	1 日	2 日	3 日
Exp. 1	PBL+Con A+7B6	5.78±0.13 (4.24±0.29)	4.03±0.62 (2.48±0.45)	2.68±0.82 (3.06±0.58)
	PBL+Con A	5.10±1.63 (3.96±1.57)	11.32±1.72 (6.76±0.97)	24.40±4.11 (15.60±3.85)
Exp. 2	PBL+Con A+7B6	4.67±0.73	3.06±2.38	4.08±1.49
	PBL+Con A	4.76±0.88	8.29±1.00	9.55±0.82

単位: CPM×10<sup>-4</sup> (実験回数3)

( ) 内は cytokine 測定系に十分量の 7B6 抗体を加えた場合. 3 回実験を行い, そのうちの 2 回の成績を示した. 他の 1 回の成績もほぼ同様である,

表 5 ヒト末梢リンパ球と Con A との反応における培養上清中の cytokine の測定

培養上清の由来	α-MM	0 日	1 日	3 日
リンパ球+Con A+7B6	+	969±266	2,901± 249	2,026± 571
リンパ球+Con A	+		3,343± 550	11,428± 48
リンパ球+Con A+7B6	-	1,903±455	38,049± 3,992	18,274±8,842
リンパ球+Con A	-		31,209±13,769	72,590±9,590

単位: CPM (実験回数1)

genic 活性は, 1 日目から 3 日目と増加傾向を示し, 7B6 により増殖反応を抑制した上清は逆に mitogenic 活性の減少を示した. ここで 3 日目の培養上清 20 μl には, ごく微量の Con A しか存在しないと考えられるが, α-MM 添加によって, 3 日目の <sup>3</sup>H-サイミジンの取り込みが, 1/6 以下に低下することから, 微量の Con A と cytokine は, マウス胸腺細胞の増殖に対し相乗作用を有し, 添加した α-MM によって Con A の作用が抑制されると, この相乗効果も消失すると思われる.

#### IV. 考 案

ヒト末梢リンパ球がレクチンまたは抗原と反応して増殖する過程においてマクロファージおよび cytokine の関与が明らかにされつつある. T 細胞がレクチン刺激によって増殖を開始する過程は, 次のように考えられている.

- ① レクチンが T 細胞表面にはたらき T 細胞を活性化し, TCGF (IL-2) に感受性を持たせる.
  - ② レクチンがマクロファージに作用し, マクロファージからの LAF (IL-1) 産生をうながす.
  - ③ マクロファージから放出される IL-1 は IL-2 産生 T 細胞に作用し, IL-2 産生をうながす.
- さらに最近, マクロファージが IL-1 を産生するため

には, 一部のリンパ球との直接的な接触が必要であることを示唆する報告がなされている<sup>7,12,15)</sup>. この中でとりわけ Con A の反応系においては, Ia 抗原陽性マクロファージが必要であるといわれている. マウスのリンパ球と Con A との反応系に Ia 抗原に対するアロ抗血清を加えた実験では, 部分的な T 細胞の増殖抑制が認められている<sup>14,15)</sup>. しかしアロ抗血清を使用している点および部分的な抑制しか得られていない点は, Ia 抗原が機能的な役割を担っていることを充分解明していると思われない.

一方 Palacios は, ヒト Ia 様抗原に対するマウス単クローン抗体をヒト末梢リンパ球と Con A との反応系に加えても T 細胞の増殖を抑制できなかったことから, この反応系においては Ia 様抗原は, 何ら重要な役割を担っていないと述べている<sup>9)</sup>. われわれの結果では, ヒト Ia 様抗原に対する単クローン抗体 7B6 には Con A によるヒト末梢リンパ球増殖反応の抑制効果を認めたが, 12A5 には抑制効果を認めなかった.

使用した 7B6 が細胞障害性に作用していないことは ①7B6 は IgG1 に属し補体結合性を有しない. したがって補体を介しての細胞障害作用は生じないこと. ②末梢リンパ球と PHA との反応を抑制しないこと. ③培養開始後 12 時間を経過した時点では, 7B6 による T 細胞

増殖の抑制がかからないこと、等から明らかである。一方 12A5 抗体は、7B6 抗体と同様  $\beta$  鎖に反応するが、抑制効果を示さない。このことは 12A5 が 7B6 により検出される Ia 様抗原分子群の一部分の分子群のみを検出するためかまたは、12A5 の検出する Ia 様抗原分子あるいは抗原決定基が、この反応系に重要な役割を担っていないためと思われる。

7B6 によるリンパ球増殖抑制の機序を解析するために著者らは、7B6 による抑制をかけない培養上清と 7B6 による抑制のかかった培養上清中の cytokine の活性の測定を行なった。

Lachman によれば IL-1 の定義は、1) マウス胸腺細胞に直接作用し、 $^3\text{H}$ -サイミジンの取り込みをうながす。2) 低濃度の Con A に対する胸腺細胞の反応を増強する、である<sup>10)</sup>。しかし、IL-2 にも上記 1), 2) の作用があり<sup>11,16)</sup>、両者の区別は、IL-1 のみが T 細胞の長期培養を可能にするという点だけである。著者らの実験系において表 5 の結果は 1) の反応を、表 4 の結果は 2) の反応を検討していると思われる。

すなわち Con A による末梢リンパ球増殖反応過程の培養上清中には 1), 2) の反応を促す cytokine の産生増加が認められる。これに対して 7B6 でリンパ球の増殖抑制が認められた培養上清中の cytokine 活性は上昇してこない。したがって Con A による末梢リンパ球増殖反応過程に必要な cytokine 産生に Ia 様抗原が重要な役割を担っていると思われる。

Con A と末梢リンパ球の反応系における 7B6 の標的細胞としては、①Con A 刺激で増殖する T 細胞<sup>17,18)</sup>、②cytokine 産生に関与する T 細胞、③マクロファージ、④上記の 2 つ以上の細胞群等が考えられる。

表 3 に示したごとく培養開始後 12 時間を経過した時点では、7B6 による抑制が認められないことから①の可能性は否定的である。しかし②以下の可能性については論ずることはできない。したがって Con A による T 細胞増殖反応のどの過程で Ia 様抗原が関与するのかを明らかにすることが今後の課題である。

## V. ま と め

ヒト末梢リンパ球の Con A による増殖反応はヒト Ia 様抗原に対する単クローン抗体により阻止された。そして増殖反応が抑制されている反応系には cytokine 活性の増加が認められなかった。したがってリンパ球の Con A による増殖反応に関与する cytokine の産生には、Ia 様抗原が重要な役割を担っているとみなされる。

## 文 献

- 1) Rosenstreich, D. L., Farrar, J. J. and Dougherty, S.: Absolute macrophage dependency of T lymphocyte activation by mitogens. *J. Immunol.*, 116 : 131~139, 1976.
- 2) Frelinger, J. A.: Ia-bearing cells promote Con A mitogenic response of Ia-negative T cells. *Eur. J. Immunol.*, 7 : 447~450, 1977.
- 3) Hedfors, E., Holm, G. and Pettersson, D.: Activation of human peripheral blood lymphocytes by Concanavalin A dependence of monocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 22 : 223~229, 1975.
- 4) Campbell, D. A. Jr., Oehler, J. R., Tsai, C. T., LoBuglio, A. F. and Niederhuber, J. E.: Effect of mouse anti-I region antiserum and complement on human mononuclear cell response to Concanavalin A. *J. Immunol.*, 128 : 2057~2062, 1982.
- 5) Habu, S. and Raff, M. C.: Accessory cell dependence of lectin-induced proliferation of mouse T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 7 : 451~457, 1977.
- 6) Ahmann, G. B., Sachs, D. H. and Hodes, R. J.: Requirement for an Ia-bearing accessory cell in Con A-induced T cell proliferation. *J. Immunol.*, 121 : 1981~1989, 1978.
- 7) Palacios, R.: Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J. Immunol.*, 128 : 337~342, 1982.
- 8) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256 : 495, 1975.
- 9) 片桐 一・池田久實・比嘉敏夫・丹野正隆・東寛・三代川斎之・楯 玄秀・平田 哲・古井秀典・林 朋子・佐藤英俊: 単クローン性抗体による HLA-DR 及び DR 様抗原分子の解析. 日本免疫学会総会記録, 11 : 195~196, 1981.
- 10) Lachman, L. B., Hacker, M. P. and Handschumacher, R. E.: Partial purification of human lymphocyte-activating factor (LAF) by ultrafiltration and electrophoretic techniques. *J. Immunol.*, 119 : 2019~2023, 1977.
- 11) Smith, K. A.: T-cell growth factor. *Immunol.*

- Rev., 51 : 337~357, 1980.
- 12) Mizel, S. B., Oppenheim, J. J. and Rosenstreich, D. L.: Characterization of lymphocyte-activating factor (LAF) produced by the macrophage cell line, P 388 D<sub>1</sub>. *J. Immunol.*, 120 : 1497~1503, 1978.
  - 13) Larsson, E. L.: Functional heterogeneity of helper T cells: Two distinct helper T cells are required for the production of T cell growth factor. *J. Immunol.*, 128 : 742~745, 1982.
  - 14) Iwata, M. and Osawa, T.: The role of Ia-bearing cells in T-cell proliferative response to Concanavalin A. *Cell. Immunol.*, 52 : 275~284, 1980.
  - 15) Mizouchi, T., Yamashita, U., Hamaoka, T. and Moriwaki, K.: The role of Ia antigens in the activation of T cells by Concanavalin A: An evidence for the species restriction between T cells and accessory cells. *Cell. Immunol.*, 57 : 28~41, 1981.
  - 16) Conlon, P. J., Henny, C. S. and Gillis, S.: Cytokine-dependent thymocyte responses: Characterization of IL 1 and IL 2 target subpopulations and mechanism of action. *J. Immunol.*, 128 : 797~801, 1982.
  - 17) Palacios, R.: Mechanism of T cell activation: Role and functional relationship of HLA-DR antigens and interleukins. *Immunol. Rev.*, 63 : 73~110, 1982.
  - 18) Moretta, A., Accolla, R. S. and Cerottini, J. C.: IL-2-mediated T cell proliferation in humans is blocked by a monoclonal antibody directed against monomorphic determinants of HLA-DR antigens. *J. Exp. Med.*, 155 : 599~604, 1982.
-