

抗 HLA-A2. A28 モノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ モノクローナル抗体の作製と免疫応答の解析

辻崎 正幸 今井 浩三
札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Preparation and Immune Response of Anti-idiotypic Monoclonal Antibodies to Anti HLA-A2. A28 Monoclonal Antibodies

Masayuki TSUJISAKI and Kohzoh IMAI
Department of Internal Medicine (Section 1) Sapporo Medical College
(Chief: Prof. A. Yachi)

ABSTRACT Model experiments using anti HLA monoclonal antibodies were performed to apply the immune response of anti-idiotypic antibodies to immunotherapy since anti-idiotypic antibodies are of interest in the investigation of a new immunomodulator for cancer patients.

Polyclonal anti-idiotypic antisera and anti-idiotypic monoclonal antibodies induced with anti HLA-A2. A28 monoclonal antibody KS1 in a syngeneic system recognized the private idio type on monoclonal antibody KS1.

Idiotypic mapping of monoclonal antibody KS1 showed that there might be at least four idiotopes on it; two idiotopes at a combining site, one at a non-combining site and another at an intermediate site.

The four different anti-idiotypic monoclonal antibodies might induce anti-anti-idiotypic antibodies specific to their immunized anti-idiotypic monoclonal antibody in the syngeneic system. One of the anti-idiotypic monoclonal antibodies against the idio type at the combining site of monoclonal antibody KS1 could induce an anti-anti-idiotypic antibody which might have the same reactivity as that of monoclonal antibody KS1 to HLA-A2. A28 antigen.

The results suggest that an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of a tumor associated antigen may induce the anti-anti-idiotypic antibodies specific to the tumor associated antigen and therefore may be useful for cancer therapy.

(Received October 31, 1988 and accepted December 1, 1988)

Key words: Anti-idiotypic monoclonal antibody, Internal image of antigen, Idiotypic mapping, Cancer therapy

1 緒 言

Jerne が³, 抗体可変部に存在するイディオタイプ(Id)を介して免疫系が調節されている可能性を idio type network theory¹⁾として提唱して以来, 多くの実証²⁾が集積され, この仮説が免疫学の基本概念の1つになりつつある。さらに, イディオタイプの考えは, 自己免疫疾患^{3,4)}およびレセプター病^{5,6)}等の臨床研究にも応用されつつある。さらに, 抗イディオタイプ抗体をワク

チン⁷⁾として利用する研究も進展しつつある。われわれはこれまでに抗 HLA 抗体あるいは抗メラノーマ関連抗原抗体に対する抗 Id 抗体を作製し, 抗体可変部の構造解析や抗原検出^{8,9)}などに利用できることを示してきた。

本研究においては, 腫瘍に関する抗 Id 抗体を用いた新しい免疫療法の可能性を検索するため, 基礎モデル実験として, 抗 HLA-A2. A28 モノクローナル抗体 (MoAb) に対する抗 Id MoAb を作製した。イディオタイプの解析より, 抗体上の抗原結合部位における,

idiotype mapping を検討し、それぞれのイディオタイプが誘導する免疫応答の詳細な検索から、抗原の internal image (内部イメージ) の存在を示唆する興味ある成績が得られたので報告する。

2 研究方法

2.1 モノクローナル抗体の特異性

MoAb KS1 および CR11-351 は、すでに HLA タイピングされたヒトリンパ球を用いた anti-globulin test¹⁰⁾ および電気泳動による免疫化学的検索¹¹⁾ により、HLA-A2. A28 に反応することが立証されている。

MoAb CR1, CR10-131, CR10-214, CR10-215, CR11-115, Q1/28 および 6/31 は HLA-Class I (monomorphic) に対する特異性を有し、MoAb Q6/64 は HLA-B locus, MoAb KS3 および KS4 は HLA-B7. B27, NAMB1 は β_2 -microglobulin, MoAb Q2/70 および Q5/6 は HLA-DR, MoAb Q2/80, 127, 417, 420 および 441 はすべて HLA-DR+DP, MoAb Q5/13 は HLA-DR+DQ+DP に対する特異性をそれぞれ有していることが、すでに確認されている^{12,13)}。一方、MoAb 149.53, 225.28, 653.25, 657.5, 763.74 および 902.51 は高分子メラノーマ関連抗原 (high molecular weight-melanoma associated antigen; HMW-MAA), MoAb 345.134 は 115K dalton MAA, MoAb 376.94 は 100K dalton MAA および MoAb CL203 は 96K dalton MAA をそれぞれ認識していた^{14,15)}。

2.2 モノクローナル抗体の精製および¹²⁵I-標識ならびに F(ab')₂ fragments の作製

各種 MoAb の精製には caprylic acid 沈殿法¹⁶⁾ あるいは protein A セファロースによる affinity chromatography 法¹⁷⁾ を用いた。MoAb の¹²⁵I-標識には chloramine T 法¹⁸⁾ を用いた。また、マウス IgG・Fc 部分に対する羊抗血清は Jackson Immuno Research Laboratory 製 (West Grove, USA) を使用した。

MoAb の F(ab')₂ fragments は Parham の報告¹⁹⁾ に準じて作製した。

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて F(ab')₂ fragments であることを確認²⁰⁾ したうえで、F(ab')₂ fragments による¹²⁵I-標識 MoAb (完全免疫グロブリン分子) の target cell への反応阻止能を検索して、F(ab')₂ fragments の抗原結合能保持を確認した。

2.3 同系抗イディオタイプ抗血清の作製

精製 MoAb 1 mg/ml に Keyhole limpet

hemocyanin (KLH) 1 mg を加え、0.25% glutaraldehyde を用いて室温 45 分間反応させ、MoAb と KLH を conjugate させた後、Phosphate buffer saline (PBS) 中で透析した。次に、KLH 結合 MoAb 200 μ g を complete Freund's adjuvant に懸濁し、BALB/c マウスに腹腔内投与した。7 日間隔で 2 回の追加免疫を行い、最終免疫 3 日後、採血し血清を得た。

2.4 抗イディオタイプモノクローナル抗体の作製

免疫原および免疫方法は 2.3 と同様に行い、最終免疫 3 日後、BALB/c マウスからの脾細胞を用いて、マウスミエロマ細胞 X63-Ag8.653 と守谷・今井²¹⁾ が記載した方法に従い、細胞融合を行った。

2.5 血清学的検索

2.5.1 ポリクローナル抗血清の解析

2.5.1.1 F(ab')₂ 結合反応

MoAb の F(ab')₂ fragments を 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) により 0.1 mg/ml に調整し、100 μ l を 96 穴塩化ビニールプレート (Dynatec 社, USA) に加え 16 時間インキュベートし付着させた。0.05% Tween 20 加 PBS で 3 回洗浄後 1% ウシアルブミン (BSA) によりブロッキングした後、10 倍希釈した抗血清 100 μ l を加え 4°C, 5 時間反応させた。洗浄後、¹²⁵I-標識抗マウス IgG・Fc 抗体 (1 \times 10⁵ cpm/well) を加え、4°C, 5 時間反応させた。Tween 20 加 PBS により 5 回洗浄後、標識抗体の結合 cpm を γ -counter により測定した。

2.5.1.2 Sandwich assay

F(ab')₂ 結合反応と同様に MoAb の完全免疫グロブリンを炭酸緩衝液により、0.1 mg/ml に調整し、塩化ビニールプレートに固相化した。洗浄後、希釈抗血清を加え、4°C, 5 時間反応させた後、プレートの固相化に用いた同じ MoAb の¹²⁵I-標識物を反応させ、その結合能を γ -counter により測定した²²⁾。

2.5.1.3 Inhibition assay

¹²⁵I-標識 MoAb (1 \times 10⁵ cpm/well) 50 μ l を抗血清 50 μ l と 4°C, 2 時間、インキュベートした後、target cell 2 \times 10⁵/well を加え、4°C, 1 時間反応させた。PBS で 5 回洗浄後、結合 cpm を測定した。対照として¹²⁵I-標識 MoAb と正常血清をインキュベートしたものをを用いた。%阻止率は対照の結合 cpm でサンプルでの結合 cpm を除して算出した。

2.5.1.4 種々の MoAb との交差反応 (阻止反応試験)

2.5.1.1 と同様の操作で、F(ab')₂ fragments を 96 穴塩化ビニールプレートに固相化した。50 μ l の抗 Id 抗血清と、ここに含まれる抗 Id 抗体の F(ab')₂ frag-

ments への結合を充分ブロックできる濃度の MoAb (20 μg ~50 μg) 50 μl を 4°C, 3 時間, インキュベートし, さらに, この混合物を F(ab')₂ fragments 固相化プレートに移し, 4°C, 5 時間反応させた. 洗浄後, 1 \times 10⁵ cpm/well の ¹²⁵I-標識抗マウス IgG•Fc 抗体を 4 時間インキュベートした. 洗浄後, 結合している放射活性を測定した. %inhibition 値は, MoAb の代わりに PBS (non-inhibitor count) を, また抗 Id 抗体の代わりに正常マウス血清 (background count) をそれぞれ用いて以下の式から算出した.

%inhibition =

$$\left(1 - \frac{\text{inhibitor count} - \text{background count}}{\text{non-inhibitor count} - \text{background count}}\right) \times 100$$

2.5.2 モノクローナル抗イディオタイプ抗体の解析

2.5.2.1 スクリーニング法

抗血清解析に用いた前述の F(ab')₂ 結合反応, sandwich assay および inhibition assay を, 抗血清の代わりに, ハイブリドーマ培養上清を用いて, 同様の方法で行った.

2.5.2.2 直接結合試験および交差阻止試験

直接結合試験には種々の MoAb を炭酸緩衝液を用いて 0.1 mg/ml に調整し, 塩化ビニールプレートに 4°C, 16 時間インキュベートして固相化した. ¹²⁵I-標識抗 Id MoAb (10⁵ cpm/well) を加え, 4°C, 3 時間反応させ, 5 回洗浄した後, 結合 cpm を測定した. また交差阻止試験には抗 HLA-A2. A28 MoAb KS1 (0.1 mg/ml・炭酸緩衝液) をプレートに固相化した後, cold inhibitor として過剰量の抗 Id MoAb を加え, 4°C, 3 時間反応させた. 洗浄後, ¹²⁵I-標識抗 Id MoAb (1 \times 10⁵ cpm/well) を 4°C, 3 時間インキュベートし, 結合 cpm を測定し対照との間で阻止率を算出した.

2.5.3 抗・抗イディオタイプ抗血清の作製とその解析

KLH 結合抗 Id MoAb 1 μg , 10 μg , および 100 μg を 2.3 で示した方法でマウスに同系免疫し, 抗・抗 Id 抗血清を得た. 次に, 2.5.1.2 の sandwich assay と同様, 0.1 mg/ml に調整した抗 Id MoAb をプレートに固相化し, 得られた抗・抗 Id 抗血清を反応させた. さらに ¹²⁵I-標識抗 Id MoAb をトレーサーとして結合 cpm を測定した. 一方, 2.5.1.3 の inhibition assay と同様, 抗・抗 Id 抗血清 50 μl と ¹²⁵I-標識抗 Id MoAb 50 μl (1 \times 10⁵ cpm) をブレインキュベーション後, MoAb KS1 固相化プレートに加え結合 cpm を測定し, 対照値との比較から阻止率を算出した.

さらに, 抗・抗イディオタイプ抗血清中の抗体の解

析を進めるため, 以下の競合試験を行った. すなわち, target cell (2 \times 10⁵ /well) に抗・抗 Id 抗血清 (10 倍希釈) (Ab3) を加えた後, ¹²⁵I-標識 MoAb (1 \times 10⁵ cpm) (Ab1) を加え 4°C, 1 時間インキュベーションした. 5 回洗浄後結合 cpm を測定した. 対照として正常血清を用い, これとの比較により阻止率を算出した.

3 成 績

3.1 MoAb KS1 の特異性

HLA-A2. A28 を認識する MoAb KS1 および MoAb CR11-351 は Table 1 に示すごとく両抗体とも培養リンパ系細胞においても HLA-A2 保有細胞に強い反応性を有していたが point mutation を有する HLA-A2 variant cell に対する反応性が異なり, MoAb KS1 は DR1B, DK1B および M7B すべてに反応するが, MoAb CR11-351 は DK1B には反応性を示さなかった. さらに Fig. 1 に示すように, HLA-A2. A28 陽性培養 B リンパ系細胞を用いた結合阻止試験により, 両抗体は互いの結合をほぼ完全に阻止しあう成績が得られた. これらの結果は MoAb KS1 と MoAb CR11-351 の認識する epitope は同一ではないが, 非常に近接していることを示唆している.

3.2 ポリクローナル抗 Id 血清の解析

KLH 結合 MoAb KS1 を免疫原とし, 同系免疫により, 抗 Id 血清を得た. 抗 HLA-A2. A28 MoAb CR11-351, 抗 HLA-Class I MoAb CR11-115 および抗 HLA-B7. B27 MoAb KS4 についても同様のスケジュールにより免疫した. 得られた抗血清について, それぞれ F(ab')₂ 結合反応, sandwich assay および inhibition assay を行い, 抗血清中に含まれる抗 Id 抗体の解析を試みた. 特に特異性の類似した MoAb KS1 と MoAb CR11-351 のイディオタイプの異同を検索する目的で, アッセイ系は MoAb KS1 と MoAb CR11-351 の F(ab')₂ fragments を用いて行った. Fig. 2(A) に示すごとく, 抗 MoAb KS1 抗血清は MoAb KS1 の F(ab')₂ fragments に強い反応を示し, MoAb CR11-351 のそれには反応は認めなかった. また抗 MoAb CR11-351 抗血清は, 抗 MoAb CR11-351 の F(ab')₂ fragments に強い反応を示したが, MoAb KS1 のそれには反応は認めなかった. 同様に, Fig. 2(B) および (C) に示すごとく, 抗 MoAb KS1 抗血清は MoAb KS1 を用いた sandwich assay および inhibition assay においてのみ反応性を認め, 抗 MoAb CR11-351 抗血清は MoAb CR11-351 を用いた assay にのみ反応性を有していた. 一方, 他の抗 MoAb CR11-115 抗血清, 抗

Table 1 Reactivity of HLA-A2, A28 MoAb KS1 and CR11-351 with cultured B and T lymphoid cells^a

Cultured cells		HLA		¹²⁵ I-labelled MoAb	
		A	B	KS1 (cpm)	CR11-351 (cpm)
A2 bearing	LG-2	2	27	30830	19520
	WIL-2	1.2	5.17	28300	17490
	WALK	2	12	28920	19990
	WT49	2	17	32920	15970
	MT	2	27	29550	20580
	EIB2	2.3	7.44	32840	16150
	THO	2.3	40	22230	13530
A2 variant ^b	DR1B	2.11	7. w44	17020	10390
	DK1B	2. w33	30. w44	17700	740
	M7B	2.3	w35, w53	24140	14250
A2 negative	MANN	29	12	1590	950
	Molt4	1.25	18	1160	680
	RPMI840	1.10	7.17	1090	650
	Daudi	—	—	680	760
	K562	—	—	820	1060

^a 50 μ l of cultured lymphoid cells (4×10^6 /ml) were incubated with 50 μ l of ¹²⁵I-labelled MoAb (1×10^5 cpm) for 2 hours at 4°C and then following 5 washing, bound radioactivity was counted in a γ -counter.

^b A2 variant cells carry amino acid substitutions within the chains of HLA antigens.

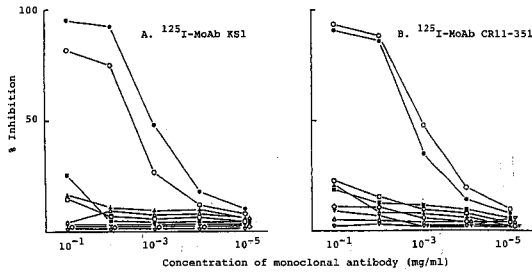


Fig. 1 Inhibition of binding of ¹²⁵I-labelled MoAb KS1 (panel A) and MoAb CR11-351 (panel B) to cultured B lymphoid cells by MoAb KS1 (●), CR11-351 (○), CR11-115 (□), CR10-215 (■), CR1 (Δ), W6/32 (▲), NAMB1 (▽), Q6/64 (◇), and Q5/13 (▼).

MoAb KS4 抗血清および正常血清はいずれの assay にも反応性を示さなかった。

さらに他の MoAb との交差反応性を検討するために blocking assay を行った。Table 2 に示すように抗 HLA-Class I MoAb, 抗 HLA-Class II MoAb および抗 MAA MoAb など, 検討した範囲で, 抗 MoAb KS1 抗血清は免疫原である MoAb KS1 にのみ反応し, 他のいずれの MoAb にも交差反応を示さなかった。一方, 抗 MoAb CR11-351 抗血清は免疫原である MoAb CR11-351 に強く反応するとともに, 抗 HLA-Class I MoAb Q6/64, Q1/28 および 6/31, さらに抗 HLA-Class II MoAb Q5/6 および 441 とも交差反応性を認

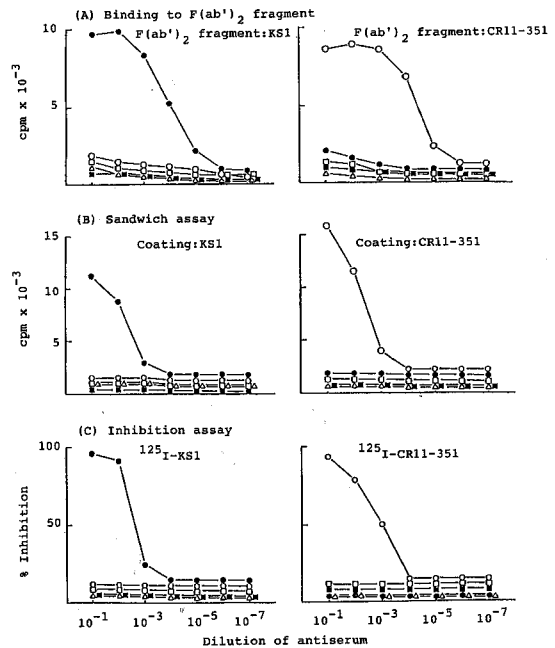


Fig. 2 Reactivities of anti-idiotypic antibodies in binding assay to F(ab')₂ fragment, sandwich assay and inhibition assay by anti-MoAb KS1 antiserum (●), anti-MoAb CR11-351 antiserum (○), anti-MoAb CR11-115 antiserum (□), anti-MoAb KS4 antiserum (■) and preimmune serum (Δ).

Table 2 Analysis with a blocking assay of specificity of syngeneic anti MoAb KS1 antiserum and anti MoAb CR11-351 antiserum

Monoclonal Antibody	Specificity	Ig subclass	Anti MoAb KS1 antiserum ^a (%)	Anti MoAb CR11-351 antiserum ^a (%)
KS1	HLA-A2, A28	G1	94	3
CR11-351	HLA-A2, A28	G1	2	90
KS3	HLA-B7, B27	G2b	7	8
KS4	HLA-B7, B27	G2b	7	7
Q6/64	HLA-B locus	G2a	5	75
CR1	HLA-Class I	G1	2	1
CR10-131	HLA-Class I	G2b	9	0
GR10-214	HLA-Class I	G1	13	12
CR10-215	HLA-Class I	G2b	1	8
CR11-115	HLA-Class I	G1	0	2
Q1/28	HLA-Class I	G2a	5	80
6/31	HLA-Class I	G2a	3	76
NAMB 1	β 2-m	G1	2	2
Q2/70	HLA-DR	G1	4	3
Q2/80	HLA-DR+DP	G2a	1	0
Q5/6	HLA-DR	G2a	2	70
Q5/13	HLA-DR+DQ+DP	G2a	5	24
127	HLA-DR+DP	G2a	7	37
417	HLA-DR+DP	G1	2	6
420	HLA-DR+DP	G1	3	20
441	HLA-DR+DP	G1	12	72
149.53	HMW-MAA ^b	G1	8	3
225.28	HMW-MAA	G2a	11	7
653.25	HMW-MAA	G1	10	0
657.5	HMW-MAA	G1	1	1
763.74	HMW-MAA	G1	0	2
902.51	HMW-MAA	G1	3	0
345.134	115K MAA	G2a	1	15
376.94	100K MAA	G2a	0	10
CL203	96K MAA	G1	1	2

^a The anti MoAb KS1 antiserum (50 μ l) and the anti MoAb CR11-351 antiserum (50 μ l) at dilution of 1:500 and 1:1000 was incubated with purified monoclonal antibodies (50 μ l of 60 μ g/ml and 30 μ g/ml respectively) for 3 hrs. at 4°C and then tested for binding to F(ab')₂ fragments of the MoAb KS1 and the MoAb CR11-351.

^b High molecular weight-melanoma associated antigen.

め、MoAb KS1 の場合と異なっていた。

3.3 MoAb KS1 に対する抗イディオタイプモノクローナル抗体の作製と解析

2.4 に示した方法に従い型のごとく細胞融合を行った。融合効率^{61/411} (14.8%) であった。Table 3 に示すごとく F(ab')₂ 結合反応により、スクリーニングしたクローンの中には、inhibition assay で陽性、sandwich

assay で陰性のクローンおよび両アッセイともに陰性のクローンも存在し、2つのアッセイの間に関連性はなかった。スクリーニングされたクローンより、代表的な抗 Id MoAb T13-116, T13-401, T13-428 および T13-117 を選択し、¹²⁵I-標識した後、各種 MoAb との反応性を検討した。抗 HLA-Class I MoAb, 抗 HLA-Class II MoAb および抗 MAA MoAb に対する反応性

Table 3 Comparison of the sensitivity of the binding assay to $F(ab')_2$ fragments of MoAb KS1, the inhibition of the binding of ^{125}I -labelled MoAb KS1 and the sandwich assay to detect anti-idiotypic MoAb

Binding to $F(ab')_2$ fragments of MoAb KS1	Inhibition of MoAb KS1 binding to target cells	Sandwich assay	Hybridomas elicited with MoAb KS1 The number of clones
+	+	+	31
+	-	+	0
-	-	+	0
+	+	-	23
+	-	-	7
-	+	-	0
-	-	-	350

(+); Reactive in the assays.

(-); Non-reactive in the assays.

Table 4 Specificity of monoclonal anti-idiotypic antibodies elicited with anti HLA-A2, A28 MoAb KS1^a and CR11-351

MoAb	Ig	Specificity	^{125}I -labelled anti-Id monoclonal antibodies to					
			MoAb KS1				MoAb CR11-351	
			T13-116	T13-401	T13-428	T13-117	T10-505	T8-203
KS1	G1	HLA-A2, A28	29.5	15.0	28.8	35.3	0.5	0.3
CR11-351	G1	HLA-A2, A28	0.3	0.7	0.5	0.4	17.3	34.8
KS3	G2b	HLA-B7, B27	0.5	0.6	0.5	1.4	0.4	0.4
KS4	G2b	HLA-B7, B27	0.4	0.6	0.6	0.4	0.4	0.4
Q6/64	G2b	HLA-B locus	0.3	0.6	0.5	0.4	0.4	35.4
CR1	G1	HLA-Class I	0.4	0.7	0.5	0.4	0.3	0.6
CR10-131	G2b	HLA-Class I	0.3	0.6	0.5	0.4	0.5	0.3
CR10-214	G1	HLA-Class I	0.4	0.7	0.5	0.4	0.3	0.4
CR10-215	G2b	HLA-Class I	0.4	0.7	0.5	0.5	0.8	0.3
CR11-115	G1	HLA-Class I	0.4	0.5	0.6	0.4	0.4	0.2
Q1/28	G2a	HLA-Class I	0.4	0.6	0.5	0.4	0.5	33.7
6/31	G2a	HLA-Class I	0.3	0.6	0.4	0.4	0.3	33.2
NAMB1	G1	$\beta 2$ -m	0.3	0.6	0.5	0.6	0.3	0.7
Q2/70	G1	HLA-DR	0.5	0.7	0.6	0.4	0.5	0.3
Q2/80	G2a	HLA-DR+DP	0.3	0.5	0.4	0.4	0.3	0.5
Q5/6	G2a	HLA-DR	0.3	0.6	0.4	0.4	0.2	22.0
Q5/13	G2a	HLA-DR+DQ+DP	0.4	0.6	0.6	0.5	0.3	31.4
127	G2a	HLA-DR+DP	0.6	0.6	0.5	0.4	0.3	29.4
417	G1	HLA-DR+DP	0.3	0.6	0.5	0.4	0.2	0.3
420	G1	HLA-DR+DP	0.4	0.5	0.4	0.5	0.2	0.9
441	G1	HLA-DR+DP	0.4	0.7	0.6	0.5	0.3	29.3
149.53	G1	HMW-MAA	0.4	0.6	0.6	0.5	0.3	0.3
225.28	G2a	HMW-MAA	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4
653.25	G1	HMW-MAA	0.3	0.7	0.5	0.4	0.4	0.3
657.5	G1	HMW-MAA	0.3	0.7	0.4	0.4	0.3	0.3
763.74	G1	HMW-MAA	0.3	0.7	0.5	0.4	0.4	0.5
902.51	G1	HMW-MAA	0.4	0.7	0.4	0.5	0.4	0.4
345.134	G2a	115K MAA	0.3	0.7	0.5	0.5	0.3	0.3
376.94	G2a	100K MAA	0.3	0.7	0.5	0.4	0.3	0.3
CL203	G1	96K MAA	0.3	0.7	0.4	0.4	0.3	0.4

^a ^{125}I -labelled monoclonal anti-idiotypic antibodies were incubated for 3 hrs. at 4°C with monoclonal antibodies coated microtiter plates. Then the plates were washed five times and bound radioactivity was counted in a γ -counter. Results are expressed as $\text{cpm} \times 10^{-3}$.

を検討すると、Table 4 に示すごとく、免疫原である MoAb KS1 にのみ強い特異性を認め、他の MoAb とは交差反応を示さなかった。この結果は、ポリクローナル抗 Id 血清での成績と一致していた。

次に抗 Id MoAb を用いて MoAb KS1 上のイディオタイプ解析を試みた。まず、inhibition assay を行った。MoAb KS1 の target cell への結合反応に対し、抗 Id MoAb の有する阻止能を検討すると、Table 5 に示すように抗 Id MoAb T13-116, T13-401, T13-428 および T13-117 は各々、94%、99%、69% および 4% の阻止率を示した。

次に、抗 Id MoAb の認識する MoAb KS1 上のイディオトープの相違すなわち位置関係を crossblocking assay により検討した。Table 5 に示すごとく、抗 Id MoAb T13-116 と T13-401 は互いに阻止効果を認めるが、他の MoAb の影響は認めなかった。また抗 Id MoAb T13-428 は T13-401 により反応が阻止された。一方、MoAb T13-117 は他の MoAb から、まったく影響されなかった。

さらに、抗 Id MoAb の MoAb KS1 に対する親和性は Table 5 に示すごとく、 $1.8 \sim 3.6 \times 10^8 / M$ であり、大きな差異は認めなかった。また、この親和性は MoAb KS1 の HLA-A2. A28 抗原に対する親和性 $9.0 \times 10^7 / M$ に比較し、高い傾向を示した。

3・4 MoAb KS1 上のイディオタイプマッピング

3・3 で示した成績にもとづいて抗 Id MoAb による MoAb KS1 のイディオタイプマッピングを検討した。イディオトープと抗原結合部位との位置関係を反映する inhibition assay の結果および各々の抗 Id MoAb の認識する epitope (すなわち抗体上のイディオトープ) の相違を表わす crossblocking assay の結果から、MoAb KS1 上には少なくとも 4 種のイディオトープが存在すると推測された。すなわち、Fig. 3 に示すごとく、

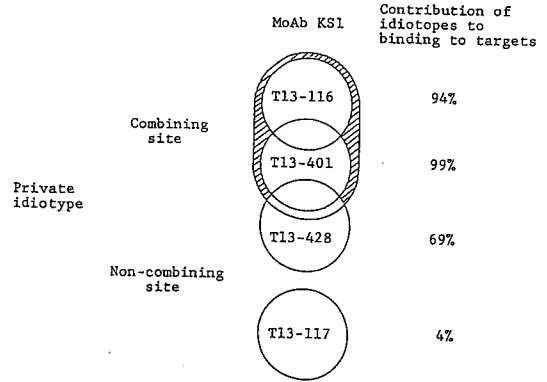


Fig. 3 Idiotype mapping of anti HLA-A2. A28 MoAb KS1.

抗原結合部位に抗 Id MoAb T13-116 および T13-401 の認識する 2 種のイディオトープ、非抗原結合部位に T13-117 の認識するイディオトープおよび、これらの中に MoAb T13-428 の認識するイディオトープの 4 種が存在すると考えられた。

3・5 抗イディオタイプモノクローナル抗体による免疫応答

そこで、さらに抗 Id MoAb の *in vivo* における免疫応答を解析するため、MoAb KS1 上の 4 種の異なるイディオトープを認識している抗 Id MoAb T13-116, T13-401, T13-428 および T13-117 をそれぞれ BALB/c マウスに同系免疫し、その免疫応答を検討した。

精製抗 Id MoAb T13-116 および T13-117 についてそれぞれ $1 \mu g$, $10 \mu g$, および $100 \mu g$ を 3 回免疫し、得られた抗血清の解析を行った。その結果、抗・抗 Id MoAb T13-116 血清および抗・抗 Id MoAb T13-117 血清は、それぞれ抗 Id MoAb T13-116 および抗 Id MoAb T13-117 と反応し、特異的な抗・抗 Id 抗体が誘導されたことが確認された。抗 Id 抗体免疫後の抗・抗 Id 抗体の誘導を経時的に検討すると Fig. 4 に示すごとく

Table 5 Characteristics of anti-idiotypic monoclonal antibodies to anti HLA-A2. A28 MoAb KS1

	Inhibitor	Anti-idiotypic MoAbs to MoAb KS1			
		T13-116	T13-401	T13-428	T13-117
Crossblocking assay	T13-116	91%	71%	0%	0%
	T13-401	73	80	75	0
	T13-428	0	0	80	13
	T13-117	14	18	16	82
% inhibition of MoAb KS1 binding to target cells		94%	99%	69%	4%
Affinity to MoAb KS1 ($K_a \times 10^8 M^{-1}$)		1.8	3.6	2.5	2.2

く、1週後では、ほとんど見出されないが、2週以降、徐々に増加している。図に示していないが、3回免疫後、4~6週まで抗・抗 Id 抗体は増加傾向を示し、その後プラトーとなり12週後でも減少せず血中に存在していることを確認した、一方、免疫原の量との関係では、1 μ g, 10 μ g および 100 μ g の間で大きな差異を認めず、抗体価のうえでほぼ同等の response を示した。

次に得られた抗・抗 Id 抗体の特異性について検討を加えた。抗 Id MoAb T13-401 および T13-428 についても抗・抗 Id 血清を得た。抗血清の有する反応性を抗 Id MoAb を用いた sandwich assay および inhibition assay により検討した。Table 6 に示すように抗・抗 Id MoAb T13-116 血清, T13-401 血清, T13-428 血清 および, T13-117 血清はそれぞれ免疫原である抗 Id MoAb T13-116, T13-401, T13-428, および T13-117 とのみ特異的な反応性を有し, sandwich assay により, 抗 Id MoAb への結合能および inhibition assay により, 抗 Id MoAb の MoAb KSI への結合阻止能を認めた。この成績は抗 Id MoAb が抗・抗 Id 抗体を誘導し, しかも抗・抗 Id 抗体は免疫原の抗 Id MoAb に特異的であり, 抗 Id MoAb の抗原結合部位を認識する抗体群を含むことを強く示唆している。

3.6 抗・抗 Id 抗体に含まれる MoAb KSI 類似抗体の検出 (Ab1 like Ab3 の誘導)

前述のごとく、4つの異なるイディオトープを認識している抗 Id MoAb T13-116, T13-401, T13-428 およ

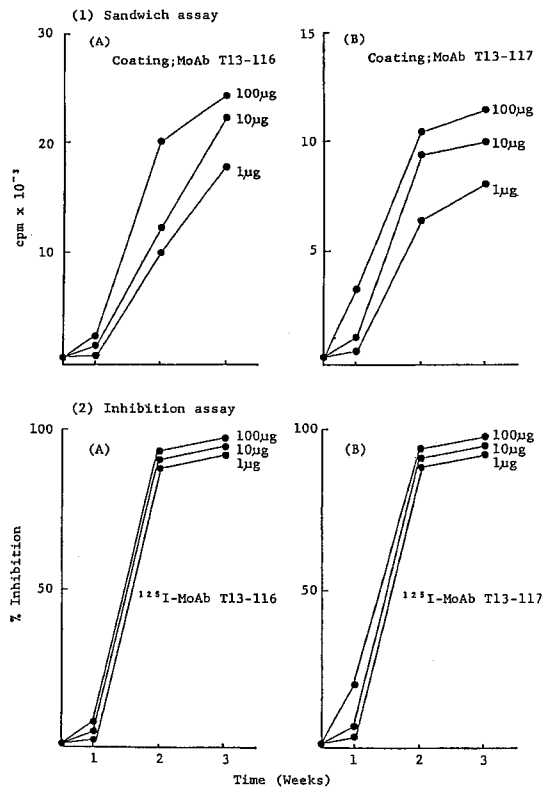


Fig. 4 Effect of immunizing periods and of immunogen concentrations on the reactivities in sandwich assay and inhibition assay by anti-anti-Id MoAb T13-116 antiserum (panel A) and anti-anti-Id MoAb T13-117 antiserum (panel B).

Table 6 Analysis of anti-MoAb KSI monoclonal anti-idiotypic antibodies with anti-anti-idiotypic antisera
Sandwich assay

Monoclonal anti-idiotypic antibodies	Anti-anti-idiotypic antisera (1:10 dilution) generated with				
	T13-116 (cpm)	T13-401 (cpm)	T13-428 (cpm)	T13-117 (cpm)	Preimmune serum (cpm)
T13-116	4790 ^a	110	560	530	530
T13-401	120	13600	510	540	580
T13-428	800	750	13150	870	920
T13-117	610	630	320	7260	580

Inhibition assay

Monoclonal anti-idiotypic antibodies	Anti-anti-idiotypic antisera (1:10 dilution) generated with				
	T13-116 (%)	T13-401 (%)	T13-428 (%)	T13-117 (%)	Preimmune serum (%)
T13-116	97 ^b	5	0	0	0
T13-401	2	85	0	0	0
T13-428	0	0	97	0	0
T13-117	0	6	0	96	0

^a Binding activities of anti-anti-idiotypic antisera to monoclonal anti-idiotypic antibodies in sandwich assay. Results are expressed as cpm.

^b Inhibition of the binding of monoclonal anti-idiotypic antibodies to MoAb KSI by anti-anti-idiotypic antisera.

び T13-117 を免疫して得られた, それぞれの抗・抗 Id 血清中に, もとの抗体である MoAb KS1 と類似の特異性を有する抗・抗 Id 抗体が存在するかを, 検討した. この場合, あらかじめ免疫に用いる抗 Id MoAb の量を 100 μg と 5 μg の 2 段階に定め, 比較した. 4 種の抗 Id MoAb 100 μg を免疫し得られた抗血清について 10 倍希釈血清を target cell に加えた後, ^{125}I -標識 MoAb KS1 (1×10^5 cpm) を加え, 競合反応を検討した. % 阻止率は, 対照として正常血清を用いた場合の成績と比較して算出した. Table 7 に示すごとく, 4 種の抗血清は MoAb KS1 と 0~7% しか競合せず, 対照である MoAb CR11-351 および CR11-115 を用いた場合の 0~8% との間に差異を認めなかった.

これに対して, 抗 Id MoAb 5 μg をそれぞれ免疫し抗血清を得た場合には, 抗・抗 Id MoAb T13-116 血清のみが, MoAb KS1 に対し 21% の阻止率を認め, 他の血清における 5~12% より高値を示した. さらに対照である MoAb CR11-351 あるいは CR11-115 の場合の 0~10% に比較しても高値であった. 以上の成績より Abl like Ab3 の誘導には, 用いる抗 Id 抗体 (Ab2) の種類が影響する以外に, 免疫する Ab2 量も影響することが示唆された.

4 考 察

新しい試みとして, 抗イディオタイプ抗体を用いて 担癌患者に免疫応答を誘導し, 患者自身の液性および細胞性免疫により抗腫瘍効果を誘導しようとする癌免疫療法が期待されている. 本研究ではその可能性をさぐるべく基礎的研究を行った. これまでに Miller ら²³⁾ は, 抗 Id MoAb を用いて B cell lymphoma 患者を治療し, 一部の例に緩解状態を得ることに成功している. この治療法は腫瘍 B 細胞表面に存在する免疫グロブリン

に, 最も特異的であると考えられる抗体, 抗 Id 抗体を反応させ殺細胞あるいは増殖抑制をきたすもので, その機序は本研究における試みのそれとは意味が異なる. 一方, Koprowski ら²⁴⁾ は抗大腸癌関連抗原 MoAb を癌患者に投与した際, 血清中に抗 Id 抗体が多く誘導される症例ほど予後が良好であることを見出している. この結果は腫瘍関連抗原をめぐる免疫応答においても, イディオタイプが重要な役割を担っていることを示唆していると考えられる²⁵⁾.

このような背景から抗原構造が明確にされている HLA-A2, A28 抗原を認識する MoAb KS1 を対象とした. まず, それに対するポリクローナル抗 Id 抗血清を, 次いで抗 Id MoAb を作製し, これらを用いてイディオタイプ解析を行った. さらに, 抗体上の idiotype mapping を試み, 各々の idiotype が誘導する免疫応答を検索した.

4・1 ポリクローナル抗血清によるイディオタイプ解析

抗 MoAb KS1 抗血清は sandwich assay において免疫原である MoAb KS1 とのみ強い反応性を示した. さらに blocking assay により他の抗 HLA-Class I, 抗 HLA-Class II および抗 MAA MoAb との反応性を検討したが, 交差反応を認めなかった. これらの成績は, 抗 MoAb KS1 抗血清中に MoAb KS1 にのみ特異的な private idiotype を認識する抗 Id 抗体が存在し, さらに抗原結合部位を認識する population を含んでいることを示している.

4・2 モノクローナル抗体によるイディオタイプ解析

抗 Id 抗血清の成績に基づいて, 抗イディオタイプ MoAb を作製し, そのなかから 4 種選択し, イディオタイプ解析に用いた. MoAb KS1 に対する抗 Id MoAb はすべて MoAb KS1 にのみ強く反応し, 検索し得た他の MoAb とは, 反応性を示さなかった. この成績は抗

Table 7 The analysis of anti-anti-idiotypic antisera using competitive binding assay of ^{125}I -labelled MoAbs to target cells

Anti-anti-idiotypic antisera to MoAb (1:10 dilution)	^{125}I -labelled monoclonal antibodies					
	KS1		CR11-351		CR11-115	
	100 μg ^a	5 μg	100 μg	5 μg	100 μg	5 μg
T13-116	3±1 ^b	21±3	6±2	9±2	0±1	9±2
T13-401	1±1	7±1	0±1	10±2	1±1	0±1
T13-428	7±1	12±2	4±1	6±1	4±1	0±1
T13-117	0±1	5±1	0±1	2±1	8±2	0±1

^a The immunizing amounts of monoclonal anti-idiotypic antibody to generate the anti-anti-idiotypic antisera.

^b % inhibition of the binding of ^{125}I -labelled MoAb to target cells by anti-anti-idiotypic antisera.

Id MoAb が MoAb KS1 上の private idotype を認識することを強く示唆し、ポリクローナル抗イデオタイプ抗体の解析結果と一致していた。一方、対照として用いた MoAb CR11-351 に対する抗 Id MoAb は、2 グループに分類され、ひとつは抗 Id MoAb T10-505 に代表されるように、MoAb CR11-351 の private idotype を認識するグループであり、もうひとつは抗 Id MoAb T8-203 のように多くの MoAb に共通して存在する crossreactive idotype を認識するものであった (Table 4)。この交差反応性はポリクローナル抗 Id 血清の反応性 (Table 2) に完全に一致していた。すなわちこの交差反応性は1つのイデオタイプに基づくことを示唆しており、非常に興味深い。

抗原・抗体間結合は立体的な相補的構造によると考えられていることから、抗体の特異性とイデオタイプとの間の関係を検索した報告がみられる。Piatier-Tonneau²⁶⁾らおよび Devaux and Pierres²⁷⁾ は抗 HLA-DR MoAb を同系および異種免疫してポリクローナル抗 Id 血清を作製し、その解析から特異性の類似している MoAb に共通のイデオタイプ (crossreactive Id) を認めることを示している。しかし、Sher ら²⁸⁾ は、抗 HLA-DR MoAb の特異性が同じでも、必ずしもイデオタイプを共有するとは限らないとしており、この点われわれの抗 HLA-Class I MoAb に関する今回の成績はこれを支持し得るものと考えられる。これらの成績は抗体多様性の起源が germ line theory あるいは somatic mutation theory などのいずれの機序が優位に働いているかを検索するアプローチの1つとして期待される。

さらに MoAb KS1 に対する抗 Id MoAb を用いて、前者の抗原結合部位と後者の認識するイデオトープとの位置関係を inhibition assay により検討した。抗 Id MoAb T13-116, T13-401, T13-428 および T13-117 のもつ MoAb KS1 とその対応抗原との反応に対する阻止率はそれぞれ 94%, 99%, 69% および 4% であった (Table 5)。また、crossblocking assay より、それぞれの認識するイデオトープは異なることが示唆された。これらを考え合わせると、MoAb KS1 に関し Fig. 3 のような idotype mapping が推測される。すなわち、抗原結合部位に 2 種、非抗原結合部位に 1 種さらにこの中間部に 1 種の、少なくとも 4 種のイデオトープが存在していると考えられた。

4・3 抗イデオタイプモノクローナル抗体による免疫応答

Mapping に示したように、異なるイデオトープを

認識している、それぞれの抗 Id MoAb を、さらに同系免疫し、誘導される免疫応答を検索した。Sandwich assay (Table 6) より明らかのようにそれぞれの抗 Id MoAb (Ab2) の同系免疫により特異的な抗・抗 Id 抗体 (Ab3) を誘導することができた。さらに inhibition assay でも同様に特異的の反応を示すことから、誘導された Ab3 は免疫した Ab2 に特異的で、かつ少なくとも結合部位上のイデオトープを認識する抗体の population を含むことが示唆された。次に、これらの抗 Id MoAb (Ab2) 100 μ g および 5 μ g を同系免疫し、誘導される抗・抗 Id 抗体 (Ab3) に MoAb KS1 (Ab1) と同様の特異性を有する Ab1 like Ab3 が存在するか否かを検索した。Table 7 に示すように、得られた抗血清 (Ab3) と、¹²⁵I 標識 MoAb KS1 (Ab1) の target cell への競合反応をみた。100 μ g を免疫して得た抗血清は、いずれも MoAb KS1 と競合しなかったが、5 μ g を免疫して得た抗血清のうちで抗 MoAb T13-116 血清は、MoAb KS1 と競合反応を示した。これらの成績から、抗 Id 抗体 (Ab2) に対して Ab2 特異的 Ab3 が確実に誘導され、また、Ab1 抗原結合部位上のイデオトープを認識する Ab2 の一部により、Ab1 と同様の特異性を持つ抗・抗 Id 抗体 (Ab1 like Ab3) が誘導されることが明らかになった。このような Ab1 like Ab3 の誘導には Ab2 の比較的低濃度による感作条件が適当であると考えられた。

以上、述べたように、抗 HLA-A2. A28 MoAb KS1 をモデルとして用い、そのイデオタイプ解析および免疫応答から抗原の内部イメージの存在を解析した。この結果、抗原の内部イメージは、Ab1 の抗原結合部位を認識する抗 Id 抗体の一部に存在することが推測された。Jerne¹⁾ が、idotype network theory のなかで抗原の内部イメージの存在を提唱して以来、これに関する報告が散見される。特に、腫瘍抗原と関連して、Herlyn ら²⁹⁾ は腺癌関連抗原を認識する MoAb (Ab1・マウス) に対して異種の系で、ポリクローナル・ヒツジ抗 Id 抗体を作製し、さらにそれをマウスに免疫して得た抗・抗 Id MoAb (Ab3) がもとの MoAb (Ab1) と同じ特異性をもつことを明らかにし、腫瘍抗原系でも内部イメージが存在することを示している。Idotype network system を Fig. 5 に模式的に示したが、本研究の成績に述べたように、ある抗原に特異的な抗体 (Ab1) から、Ab1 上の抗原結合部位および非抗原結合部位に対する多種の抗 Id 抗体 (Ab2) が誘導されてくる。さらに、各々の Ab2 から、Ab2 に特異的な多くの抗・抗 Id 抗体 (Ab3) が誘導されることを示した。このなか

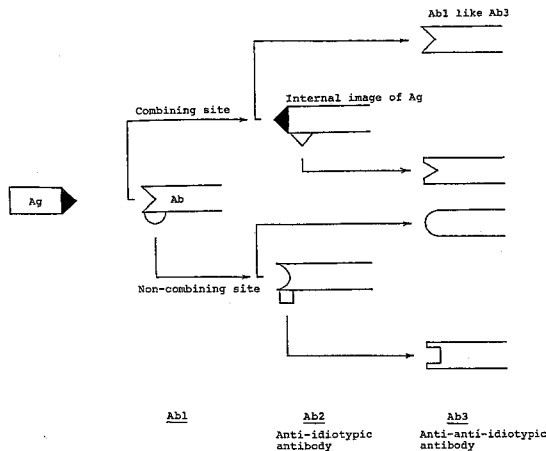


Fig. 5 Idiotypic network system.

で、抗 Id MoAb T13-116 のように抗原の内部イメージを有する抗 Id 抗体 (Ab2) から誘導される抗・抗 Id 抗体 (Ab3) は、もとの抗体 (Ab1) と類似の特異性をもつと考えられた。

現在、T cell receptor に免疫グロブリン類似構造があることが議論されており、免疫グロブリンと同様のイデオタイプを有する T cell の存在も検討されている。Lee ら³⁰⁾ は、マウス膀胱癌に対するラット MoAb を用いてマウス抗 Id MoAb を作製し、これを同系免疫した際、癌特異的な細胞性免疫である delayed-type hypersensitivity を誘導できたと報告している。また Raychaudhuri ら^{31,32)} はマウス・リンパ腫について、同系の抗 Id 抗体を用いて、腫瘍特異性を有する cytotoxic T cell を誘導できたことを報告している。すなわち抗 Id 抗体により惹起された細胞性免疫の側面に関しても今後十分に検討する必要があると考えられる。このように抗 Id 抗体を利用して、idiotype network system に immunomodulation を与えることにより、抗原特異的な、抗・抗 Id 抗体、helper T cell および cytotoxic T cell などの誘導が可能であるとすれば、将来、癌免疫療法に新領域が拓かれることが期待されよう。

要 約

1. 抗 HLA-A2. A28 モノクローナル抗体 KS1 をマウスに同系免疫することにより、モノクローナル抗体 KS1 に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗イデオタイプ抗体を作製した。
2. ポリクローナルおよびモノクローナル抗イデオタイプ抗体の解析により、得られた抗イデオタイプ

抗体は特異的にモノクローナル抗体 KS1 上の private idiotype を認識し、他のモノクローナル抗体とは反応性を認めなかった。

3. モノクローナル抗体 KS1 上のイデオタイプマッピングより、抗原結合部位に 2 種、非抗原結合部位に 1 種および両者の中間部位に 1 種の、少なくとも 4 種のイデオタイプが存在することが示唆された。
4. 4 つの異なったイデオタイプを認識する抗イデオタイプモノクローナル抗体 (Ab2) を同系免疫すると、それぞれ Ab2 に特異的な抗・抗イデオタイプ抗体 (Ab3) が誘導された。
5. それぞれの抗イデオタイプモノクローナル抗体 (Ab2) により誘導された抗・抗イデオタイプ抗体 (Ab3) とモノクローナル抗体 KS1 (Ab1) との間で、HLA-A2. A28 抗原に対する競合反応を利用し、Ab1 like Ab3 の存在が確認された。また同時に、モノクローナル抗体 KS1 の抗原結合部位にあるイデオタイプの 1 つを認識する抗イデオタイプモノクローナル抗体上に抗原の内部イメージが存在する可能性が示唆された。
6. 以上のモデル実験を基礎として、腫瘍関連抗原についても、その内部イメージを有する抗イデオタイプモノクローナル抗体が作製される可能性があり、将来癌治療に応用されることが期待される。

謝 辞

ご指導、ご校閲いただいた谷内 昭教授に謝意を表します。本研究は厚生省対癌 10 年戦略事業 (谷内、今井) および文部省科学研究費がん特別 I (谷内) および II (今井) の補助によった。

文 献

1. Jerne, N. K.: Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol. (Paris)* **125**, 373-389 (1974).
2. Shenk, R. R., Weissberger, H. Z. and Dickler, H. B.: Anti-idiotypic stimulation of antigen-specific antigen-independent antibody responses in vitro. *J. Immunol.* **132**, 2709-2714 (1984).
3. Fox, R. I., Chen, P. and Carson, D. A.: Expression of cross-reactive idiotype on rheumatoid factor in patients with Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* **136**, 477-483 (1986).
4. Hahn, B. H. and Ebling, F. M.: Suppression of murine lupus nephritis by administration of an anti-idiotypic antibody to anti DNA. *J. Im-*

- munol.* **132**, 187-190 (1984).
5. Cleveland, W. L., Wassermann, N. H. and Sarangarajan, R.: Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by a normally functioning auto-anti-idiotypic mechanism. *Nature* **305**, 56-57 (1983).
 6. Burman, K. D. and Baker, J. R.: Immune mechanisms in Graves' disease. *Endocr. Rev.* **6**, 183-186 (1985).
 7. Kennedy, R. C., Eichberg, J. W. and Lanford, R. E.: Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science* **232**, 220-223 (1986).
 8. Kusama, M., Tsujisaki, M. and Ferrone, S.: Syngeneic monoclonal antiidiotypic antibodies to murine anti human high molecular weight-melanoma associated antigen monoclonal antibodies, In: Gallo, R. C. and Albertini, A.: *Monoclonals and DNA Probes in Diagnostic and Preventive Medicine*. 101-110, Raven Press, Now York (1987).
 9. 辻崎正幸, 日馬幹弘, 今井浩三, 得地茂, 山本公雄, 谷内 昭: 抗イディオタイプモノクローナル抗体による遊離腫瘍関連抗原の検出. *医学のあゆみ* **142**, 251-252 (1987).
 10. Tsujisaki, M., Sakaguchi, K., Igarashi, M., Richiardi, P., Perosa, F. and Ferrone, S.: Fine specificity and idiotypic diversity of the murine anti HLA-A2. A28 monoclonal antibodies CR11-351 and KS1. *Transplantation* **45**, 632-639, (1988)
 11. Russo, C., Pellegrino, M. A. and Ferrone, S.: Analysis of the repertoire of anti HLA antibodies with anti-idiotypes to a murine anti HLA-A2. A28 monoclonal antibody. *Hum. Immunol.* **10**, 57-67 (1984).
 12. Quaranta, V., Pellegrino, M. A. and Ferrone, S.: Serological 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**, 548-551 (1981).
 13. Tsujisaki, M., Sakaguchi, K. and Richiardi, P.: Syngeneic polyclonal and monoclonal antiidiotypic antibodies to murine anti HLA-B7. B27 monoclonal antibodies, In: Pincus, S. H. and Pisetsky, D. S.: *Biologically based immunomodulators in the therapy of rheumatic diseases*. 205-217, Elsevier. New York. Amsterdam. London. (1987).
 14. Imai, K., Ng, A. K. and Ferrone, S.: Characterization of monoclonal antibodies to human melanoma associated antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 489-496 (1981).
 15. Kusama, M., Kagesita, T., Tsujisaki, M., Perosa, F. and Ferrone, S.: Syngeneic antiidiotypic antisera to murine anti-human high molecular weight-melanoma associated antigen monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **47**, 4312-4317 (1987).
 16. Russo, C., Callegaro, L., Lanza, E. and Ferrone, S.: Purification of IgG monoclonal antibody by caprylic acid precipitation. *J. Immunol. Methods* **65**, 269-271 (1983).
 17. Ey, P. L., Prowes, S. J. and Jenkin, C. R.: Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry* **15**, 429-436 (1978).
 18. Greenwood, F. C., Hunter, W. M. and Glover, J. S.: The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* **89**, 114 (1963).
 19. Parham, P.: On the fragmentation of monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from BALB/c mice. *J. Immunol.* **131**, 2895-2902 (1983).
 20. Perosa, F., Tsujisaki, M. and Ferrone, S.: Syngeneic anti-idiotypic antisera to murine monoclonal antibodies to monomorphic and polymorphic determinants of HLA class I antigens. *J. Immunol.* **138**, 2202-2207 (1987).
 21. 守谷保夫, 今井浩三: モノクローナル抗体を用いたCEAの免疫学的研究. *札幌医誌* **53**, 455-467 (1984).
 22. Tsujisaki, M., Kusama, M. and Sakaguchi, K.: A sandwich assay to detect and characterize syngeneic anti-idiotypic antibodies to murine anti-HLA and tumor associated antigen monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* **75**, 47-55 (1986).
 23. Miller, R. A., Maloney, D. G. and Warnke, R.: Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N. Engl. J. Med.* **306**, 517-522 (1982).
 24. Koprowski, H., Herlyn, D., Lubeck, M., Defreitas, E. and Sears, H.: Human antiidiotypic antibodies in cancer patients: Is the modulation of the immune response beneficial for the patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 216-219 (1984).
 25. Defreitas, E., Suzuki, H., Herlyn, D., Lubeck, M., Sears, H., Herlyn, M. and Koprowski, H.: Human antibody induction to the idiotypic and anti-idiotypic determinants of a monoclonal antibody against a gastrointestinal carcinoma antigen. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **119**, 75-89 (1985).

26. Piatier-Tonneau, D., Boyer, B., Debre, P. and Charron, D. J.: Syngeneic anti-idiotypes against monoclonal anti-HLA-DR antibodies.: characterization of recurrent idiotopes. **J. Immunol.** **131**, 1339-1343 (1983).
27. Devaux, C. and Pierres, M.: Clonal analysis of B and T cell responses to Ia antigens. III. Characterization of 12 xenogeneic anti-idiotypic antisera to A. TH-derived anti-I-A^k and anti-I-E^k monoclonal antibodies. **J. Immunol.** **128**, 751-754 (1982).
28. Sher, M.R., Bender, T.P. and Niederhuber, J.E.: Two Ia. 17-specific monoclonal antibodies detect the same epitope but do not share idio type. **J. Immunol.** **133**, 338-344 (1984).
29. Herlyn, D., Ross, A. H. and Koprowski, H.: Anti-idiotypic antibodies bear the internal image of a human tumor antigen. **Science** **232**, 100-102 (1986).
30. Lee, V.K., Harriott, T.G. and Kuchroo, V.K.: Monoclonal antiidiotypic antibodies related to a murine oncofetal bladder tumor antigen induced specific cell mediated tumor immunity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**, 6286-6290 (1985).
31. Raychaudhuri, S., Saeki, Y., Fuji, H. and Kohler, H.: Tumor-specific idio type vaccines. I. Generation and characterization of internal image tumor antigen. **J. Immunol.** **137**, 1743-1749 (1986).
32. Raychaudhuri, S., Saeki, Y., Chen, J. J., Iribe, H. and Fuji, H.: Tumor-specific idio type vaccines. II. Analysis of the tumor related network response induced by the tumor and by internal image antigen (Ab2 β). **J. Immunol.** **139**, 271-278 (1987).

別刷請求先:

(〒 060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 辻崎正幸