

## 単クローン抗体による3種類の新しいT細胞分化抗原の解析

上 出 延 治

札幌医科大学脳神経外科学講座 (主任 佐藤 修 教授)

小 柴 博 文

札幌医科大学病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

### Analysis of Three New Surface Antigens on Human T Cells Defined by Monoclonal Antibodies

Teiji UEDE

*Department of Neurosurgery, Sapporo Medical College*

*(Chief : Prof. O. Sato)*

Hirofumi KOSHIBA

*Department of Pathology (Section 1), Sapporo Medical College*

*(Chief : Prof. K. Kikuchi)*

Spleen cells from BALB/c mice immunized with a human T cell line, SKW-3 or MT-1, were fused with cells of the mouse myeloma cell line X-63-Ag-8.653 or NS-1. Three monoclonal antibodies secreted by established hybridoma cells recognized three distinct new surface antigen specificities, provisionally named HLTB-1, HLT-2 and HLT-3. The HLTB-1 antigen was detectable on peripheral T cells, B cells and monocytes. Cytotoxic studies revealed that the monoclonal antibody reacted with 97% of peripheral blood lymphocytes, 95% of tonsil cells, 77% of spleen cells and 8% of thymocytes. A T cell subset bearing the HLTB-1 antigen was characterized as a human TL-like antigen-negative mature T cell. The HLT-2 antigen was detectable on peripheral T cells, but not on B cells, monocytes or granulocytes. Cytotoxic studies revealed that this monoclonal antibody reacted with only 10% of peripheral T cells. The HLT-3 antigen was detectable on 53% of human TL-like antigen-positive cortical thymocytes and 28% of the HLTB-1 antigen-positive medullary thymocytes. However, this antigenic expression was rapidly decreased during the maturation of T cells and was finally detected on only 5% of tonsil T cells and on below 3% of peripheral T cells. This reactivities suggested that the HLT-3 antigen is expressed on a intermediate cell during maturation from a cortical thymocyte to a medullary thymocyte. The HLT-3 antigen was also undetectable on B cells, monocytes and granulocytes. Immunochemical analysis revealed that the HLT-3 antigen consisted on a single component with a molecular weight of a 42K daltons glycoprotein not associated with  $\beta_2$ -microglobulin.

The analysis of the three antigens suggests that these monoclonal antibodies provide a valuable probe for possible maturation stages during human T cell development.

(Received January 5, 1983 and accepted January 31, 1983)

**Key words:** Hybridoma technology, Monoclonal antibody, T cells, Maturation and differentiation of lymphocytes

## 1 緒 言

生体内で種々の免疫機能を担うリンパ球亜群は、その細胞表面に発現される抗原形質により分類されてきた。これらリンパ球表面抗原は、従来より同種あるいは異種抗血清を用いて検出されてきたが、これには多種の抗体が含まれており、特異性を得るためには繰り返し吸収操作を必要とし、これは抗体活性の低下をまねき、常に特異性・再現性が問題となっていた。

これに対して、細胞融合法<sup>1)</sup>が免疫学の分野に応用され、単クローン抗体が作製される様になるに至り、複雑な抗原系の中から一つの抗原特異性を分別することが可能となり、リンパ球表面抗原の解析は著しい進歩をとげている。細胞融合法を応用して得られる単クローン抗体は、単一の抗原決定基を特異的に検出し、抗体産生ハイブリドーマ・クローンを維持することにより、常に同一条件の高い抗体価の抗体を無限に得ることができる。すなわち、単クローン抗体を用いる事により、従来の異種抗血清の持つ欠点を補う事ができたばかりか、リンパ球の発生学的・機能的分化と密接に関連する多くの新しい抗原系が発見されるようになって来た<sup>2)</sup>。

著者らは、細胞融合法を用い、ヒト T 細胞亜群を検出する 3 種類の単クローン抗体を作成した。すなわち、ヒト末梢成熟型 T 細胞由来培養株 SKW-3 を免疫した BALB/c マウス脾細胞と、BALB/c マウス由来ミエローマ細胞株 X-63-Ag-8.653 細胞を融合させ、抗 HLTB-1 抗体を作製し、さらにヒト成人 T 細胞型白血病細胞由来培養株 MT-1 を免疫した BALB/c マウス脾細胞と、BALB/c マウス由来ミエローマ細胞株 NS-1 細胞を融合させ、抗 HLT-2 抗体と抗 HLT-3 抗体を作成した。これら 3 種類の単クローン性抗体の血清学的特異性を解析し、さらにこの抗体で検出される抗原の、正常ヒト T 細胞分化過程との関連を明らかにし得たので報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 ヒト造血器腫瘍由来培養株

本実験に使用した 23 種類のヒト造血器腫瘍由来培養株は、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 養和田博士より供与されたものであり、これら培養株の由来、及び細胞表面抗原形質を Table 1, 2, 3 に記載した<sup>3,4)</sup>。

### 2.2 ヒト免疫担当細胞の分離

#### 2.2.1 末梢リンパ球の分離

正常末梢リンパ球の分離は、Ficoll-Gonray 比重遠沈法を基本に行なった<sup>5)</sup>。ヘパリン加正常ヒト末梢血を、phosphate-buffered saline (PBS) で約 2 倍に希釈し、等量の Ficoll-Conray 液 (比重 1.082) に静かに重層し、 $400 \times G \cdot 20$  分間遠沈、単核細胞層をピペットで採取し、PBS にて 3 回洗浄後、RPMI 1640 medium に  $1 \sim 5 \times 10^6/ml$  の濃度に浮遊させ、末梢リンパ球分画とした。

#### 2.2.2 胸腺細胞・脾細胞・扁桃細胞の分離

手術時摘出された正常胸腺・脾臓・扁桃組織をハサミで微細片化し、2 枚のスライドガラスの間にはさんで軽くすりつぶし、PBS 中で良くピペッティングした。次いでガーゼで大きな不純物塊を除き、細胞浮遊液を作製し、PBS で 3 回洗浄後、末梢リンパ球の分離と同様に Ficoll-Conray 比重遠沈法により生細胞のみを得、RPMI 1640 medium で  $1 \sim 5 \times 10^6/ml$  に調整し、胸腺細胞・扁桃リンパ球・脾臓リンパ球各分画とした。

#### 2.2.3 T 細胞・B 細胞・マクロファージ・顆粒球分画の調整

$1 \sim 5 \times 10^7/ml$  に調整した扁桃細胞分画を nylon-wool column を通過させ、非付着細胞を T cell enriched fraction (約 95% の T 細胞を含む) として使用した。また付着細胞はさらに 33% 羊赤血球浮遊液と等量に混合し、 $100 \times G \cdot 5$  分間遠沈し、 $4^\circ C$  で 1 時間反応させ、次いで Ficoll-Gonray 比重遠沈法を応用して E-rosette 形成細胞をさらに除去し、B cell enriched fraction (約 95% の B 細胞を含む) として使用した。

マクロファージの分離には、マクロファージ純粋分離用特殊コーティング・プレート MSP-P (日本抗体研究所) を用い、これに 2.2.1 にて得た単核細胞分画を加えて、 $37^\circ C$  炭酸ガス培養器内で 2 時間反応させた。次いで、プレートを室温の PBS で静かに洗浄し、非付着細胞を除去した後、剝離液を用いて付着細胞を回収した。冷 PBS で 3 回洗浄した後、 $1 \sim 5 \times 10^6/ml$  に調整しマクロファージ分画とした<sup>6)</sup>。この分画のラテックス貪食陽性細胞は約 80% であった。

顆粒球の分離には比重法を応用した。すなわち、ヘパリン加末梢血を PBS で約 2 倍に希釈したものを、6% デキストラン (M. W. 20~50 万) 液に静かに重層し、室温に 2 時間放置後、上清を Ficoll-Gonray 比重遠沈法により、単核球分画とペレット化する赤血球・顆粒球分画に分別する。次いで赤血球・顆粒球分画を赤血球除去用トリス緩衝液<sup>7)</sup> で処理し赤血球を除き、PBS で 3 回洗浄した後  $1 \sim 5 \times 10^6/ml$  の濃度に調整して顆粒球分画とした。この分画には、各々約 10% の T 細胞と

B細胞が混入していた。T cell enriched fraction, B cell enriched fraction, マクロファージ分画, 顆粒球分画の各々に分別した細胞以外に混入した細胞 (T細胞・B細胞・マクロファージ) の比率は, E-rosetting, human Ia like antigen (Ia), 細胞表面免疫グロブリン (SmIg), HLB-1 抗原<sup>9)</sup>, Leu-1 抗原<sup>9)</sup>などをマーカーとして測定した。

### 2.3 単クローン抗体の作製

BALB/c マウス腹腔内に, 末梢成熟型 T 細胞由来培養株 SKW-3 細胞を  $5 \times 10^7$  個, 10 日間隔にて 5 回免疫した。最終免疫後 3 日目に, 免疫 BALB/c マウスより脾臓を摘出して得た脾細胞  $1 \times 10^8$  個と, BALB/c マウス由来ミエローマ細胞株 X-63-Ag-8.653 細胞  $2 \times 10^7$  個を, Köhler と Milstein の方法に準じて, ポリエミレン・グリコール (M. W. 4,000, 和光純薬) 存在下に細胞融合させた。細胞融合後, 全細胞に非免疫 BALB/c マウス脾細胞を feeder 細胞として混じり, 400 ml の 10% FCS 加 HAT medium (hypoxanthine  $1 \times 10^{-4}$  M., aminopterin  $4 \times 10^{-7}$  M., thymidine  $1.6 \times 10^{-5}$  M. in RPMI 1640 medium) に浮遊させ, 次いで 1 ml ずつ Nunc. 168357 multi well plate (Nunc, Kamstrup, Denmark) 400 ウェルに分注した。この状態で, 炭酸ガス培養器内 ( $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ ) にて 10 日間培養し, 融合細胞のみを選択した。培養 10 日目より, 3 日間隔で, 10% FCS 加 HT medium (hypoxanthine  $1 \times 10^{-4}$  M., thymidine  $1.6 \times 10^{-5}$  M., in RPMI 1640 medium) を用いて培養液交換を繰り返し, 融合細胞が増殖してきたウェルの培養上清を, 免疫原の SKW-3 細胞をはじめとするいくつかのヒト造血器腫瘍由来培養株細胞を用い, 後述する補体依存性細胞障害試験でスクリーニングした。そこで興味ある特異性を有した抗 HLTB-1 抗体を発見し, この抗体産生雑種細胞を限界希釈法<sup>10)</sup>を用いてクローニングし, 単クローン抗体産生細胞とした後, 継代培養をつづけた。樹立した抗 HLTB-1 抗体産生ハイブリドーマ・クローンの培養上清を蓄積し, 飽和硫酸で塩析し, 最終容量を 1/10 とし, 約 200 倍容量の PBS に 2 日間透析し, 常に同一抗体価の単クローン性抗 HLTB-1 抗体を使用できる条件とした後に実験を行なった。

同一の方法で, BALB/c マウスをヒト成人 T 細胞型白血病細胞由来培養株 MT-1 で免疫し, 免疫マウス脾細胞と BALB/c マウス由来ミエローマ細胞株 NS-1 細胞を細胞融合させ, 単クローン性抗 HLT-2 抗体, 及び抗 HLT-3 抗体産生ハイブリドーマ・クローンを樹立した。また同様にハイブリドーマ・クローンの培養上

清を蓄積し, 飽和硫酸で塩析し, 最終容量 1/10 とした抗 HLT-2 抗体・抗 HLT-3 抗体を, 以下の実験に使用した。

### 2.4 補体依存性細胞障害試験

Kimura *et al.*<sup>11)</sup>による microcytotoxicity test を用いた。すなわち, 被験免疫細胞浮遊液・培養株細胞浮遊液 (細胞濃度  $5 \times 10^6/\text{ml}$ )  $1 \mu\text{l}$  と単クローン抗体 (飽和硫酸塩析培養上清)  $2 \mu\text{l}$  を混和し, 炭酸ガス培養器内で 1 時間培養し, その後補体原として 4 倍に希釈し, それ自体では細胞障害活性を示さない家兎血清を  $2 \mu\text{l}$  加え, さらに 1 時間反応させた。判定には trypan blue dye exclusion 法を用い, 生細胞と死細胞の比率を測定した。

### 2.5 蛍光抗体法

単クローン抗体と特異的に結合する細胞表面抗原との反応は, 間接蛍光抗体法で判定した<sup>12)</sup>。すなわち, ペレットにした免疫細胞・培養細胞  $1 \sim 5 \times 10^6$  個と単クローン抗体  $100 \mu\text{l}$  を混和し,  $4^\circ\text{C} \cdot 40$  分間反応させた後, 過量の PBS で 1 回洗浄し, 次いで 2 次抗体として fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG を混和し 30 分間反応させ, PBS で 2 回洗浄後, Leize Ortholux microscope (vertical U. V.) あるいは, Fluorescence-activated cell sorter (FACS analyser, Becton Dickinson FACS system, Mountain View, CA) を用い, 蛍光色素で標識された陽性細胞の比率を測定した。

### 2.6 定量吸収試験

単クローン抗体により検出される抗原のリンパ球系細胞, 及び培養株細胞における発現をより定量的に検索するため, 定量吸収試験を行なった。この際その精度を上げるため, 免疫原細胞に対し細胞障害活性を示し得る限界付近まで単クローン抗体を希釈して用いた。すなわち, 2,000 倍希釈の抗 HLTB-1 抗体・抗 HLT-3 抗体, あるいは 1,000 倍希釈の抗 HLT-2 抗体と, 種々の細胞数の免疫細胞 ( $2.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ ) とを,  $4^\circ\text{C} \cdot 1$  時間反応させた。400 × G・10 分間遠沈した後, 上清に残存する免疫原細胞に対する細胞障害活性の有無を, 補体依存性細胞障害試験にて検索した。ヒト造血器腫瘍由来培養株細胞は, その培養株により細胞容積に大きな相違があるため, 培養株細胞の packed volume と希釈抗体の容積比で, 1:1~1:6, あるいは 1:1~1:8 の吸収を  $4^\circ\text{C} \cdot 1$  時間行ない, 同様に遠沈後の上清に残存する免疫原細胞に対する細胞障害活性の有無を検索した。

また抗原の非リンパ系組織内分布を検索するため, 各

種臓器(脳・肝・腎)のホモジェネートを作成し, packed volume で 1:1, 1:3, 1:6 の各吸収を 4°C・1 時間行なって, 同様に吸収活性の有無を検索した。

## 2.7 活性化リンパ球の調整

Nonspecific mitogen による活性化リンパ球の調整には, concanavalin-A (Con-A, Sigma, St. Louis), pokeweed mitogen (PWM, GIBCO, N. Y.), phytohemmagglutinin (PHA, Difco, Detroit) を, それぞれ培養時最終濃度 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 5  $\mu\text{l}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{l}/\text{ml}$  にて使用した。細胞数を 0.5 $\times 10^6/\text{ml}$ , 0.2  $\text{ml}/\text{well}$  にて, 3~5 日間炭酸ガス培養器内で培養し, 活性化リンパ球を得た。

リンパ球混合培養 (MLC) による alloreactive cell の誘導には, Nakayama *et al.*<sup>13)</sup> の方法を用いた。すなわち 1 $\times 10^7$  個の responder cell と, mitomycin C (0.5  $\text{mg}/\text{ml}$ , 協和醸造) 前処理 stimulator cell 2 $\times 10^7$  個を, 5% FCS 加 RPMI 1640 medium 10  $\text{ml}$  に浮遊させ, tissue culture flask (Nunc, Kamstrup, Denmark) にて 7 日間培養し, alloreactive cell を得た。

## 2.8 抗原の免疫化学的測定

### 2.8.1 細胞表面抗原蛋白の放射性標識

松浦ら<sup>14)</sup>の方法に準じて, <sup>125</sup>I を用い, lactoperoxidase (LPO) 法で細胞表面蛋白の放射性標識を行なった。すなわち, 0.5~2 $\times 10^8/\text{ml}$  の細胞浮遊液 1  $\text{ml}$  に, 100  $\mu\text{l}$  の LPO (2  $\text{mg}/\text{ml}$ , Sigma) と, 1  $\text{mCi}$  の Na-<sup>125</sup>I を加え, さらに 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ・100  $\mu\text{l}$  を加え混合した。さらに 4 分毎に 100  $\mu\text{l}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を計 4 回加え, 合計 16 分間・27°C で反応させた。次に PBS を加え 250 $\times\text{G}$ ・10 分間遠沈し, さらに 50  $\text{ml}$  の PBS で沈浄後, 可溶化した。

### 2.8.2 細胞表面抗原蛋白の可溶化と, 糖蛋白への精製

標識膜抗原の可溶化には, non-ionic detergent の Lubrol-PX (半井化学) を用いた。<sup>125</sup>I 標識細胞ペレットに 2% Lubrol-PX を含む PBS を加え, 4°C・1 時間反応させた後, 4,000 $\times\text{G}$ ・15 分間遠沈した上清をミリポアフィルターで濾過し, さらに 0.2% Lubrol-PX を含む PBS に透析したものを, whole lysate として用いた。

この Whole lysate の一部は, さらにレンチルレクチン (Lch) 結合セファロース 4 B カラム (Pharmacia) に apply し, 結合分画を 0.2% Lubrol-PX を含む PBS に透析して, 糖蛋白抗原 lysate とした。

whole lysate 及び, 糖蛋白抗原 lysate は, radio-

activity を測定したのち, radioimmunoprecipitation (RIP) の試量とした。

### 2.8.3 Radioimmunoprecipitation (RIP)

単クローン抗体を用い, RIP にて反応する抗原の精製を行なった。15 万 cpm の whole lysate あるいは 1.5 万 cpm の糖蛋白抗原 lysate と, 単クローン抗体 100  $\mu\text{l}$  を混合し, 4°C・24 時間反応させ soluble immune complex を形成させた。使用した単クローン抗体は全て直接に staphylococcal protein-A に結合しないため, bridging antibody として 10  $\mu\text{l}$  の家兎抗マウス IgG 血清を加え, 37°C・2 時間反応させ, 次いで 10% staphylococcus aureus Cowan I (SACI, Enzyme Center Inc.) を 300  $\mu\text{l}$  加え, 37°C・1 時間作用させることにより, 沈降反応を行なわせた。沈降物を 0.2% Lubrol-PX 加 PBS で 3 回, 4,000 $\times\text{G}$ ・15 分間遠沈する条件で洗浄した。SACI に結合した抗原抗体複合物の解離には, 5% 2-メルカプトエタノール, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) を含んだ 50 mM Tris-HCl buffer (sample buffer) を 100  $\mu\text{l}$  を加え, 100°C・4 分間煮沸することにより行ない, これを SDS-PAGE 用の試料とした。

### 2.8.4 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

SDS-PAGE は, 10% polyacrylamide gel, 0.1% SDS の存在下で行なった<sup>15)</sup>。泳動後の放射活性の検出は, オートラジオグラフィによる。ゲルの固定・染色は, 0.025% Coomassie brilliant blue R-250, 45.4% メタノール, 9% 氷酢酸混合溶液で室温にて 20 時間行ない, 脱色後濾紙の上で乾燥させたゲルを X 線フィルム (Kodak RP Royal X-Omat film), Cornex calcium tungsten intensifying screen (Dupont) の間にはさみ, フィルムカセットに入れて, -70°C で露出した。

標準蛋白は phosphorylase-b (分子量 94,000-94 K; kilo daltons), bovine serum albumin (67 K), ovalbumin (43 K), carbonic anhydrase (30 K), trypsin inhibitor (20 K),  $\alpha$ -lactalbumin (14 K) を用いた。

## 3 結 果

### 3.1 免疫原細胞に対する細胞障害活性 (抗体価) の検討

各単クローン抗体産生細胞の培養上清を飽和硫酸で塩析し, 最終容量を 1/10 としたのを用い, 各免疫原細胞に対する細胞障害活性を測定した。Fig. 1 で示すご

とく、抗 HLTB-1 抗体は免疫原の SKW-3 細胞に対して  $8 \times 10^3$  倍まで細胞障害活性を有しており、抗 HLT-2 抗体、抗 HLT-3 抗体は免疫原の MT-1 細胞に対して、それぞれ  $4 \times 10^3$  倍、 $8 \times 10^3$  倍まで細胞障害活性を

有していた。

各単クローン抗体の heavy chain の subclass は、class specific reagents (Cappel Laboratories, Cochranville, PA.) を用い、免疫拡散法<sup>16)</sup>にて検索したが、抗 HLTB-1 抗体は IgG-2b で、抗 HLT-2 抗体・抗 HLT-3 抗体は IgG-2a であった。

3.2 各種ヒト造血器腫瘍由来培養株に対する細胞障害活性の検討

3.2.1 T細胞系腫瘍由来培養株細胞との反応性 (Table 1)

抗 HLTB-1 抗体は、cALL 抗原陽性・ヒト TL 様抗原陰性の未熟胸腺細胞由来と考えられる培養株 RPMI-8402, ヒト TL 様抗原陽性の胸腺細胞由来と考えられる CCRF-CEM, MOLT-4F, P 12/Ichikawa とは全く反応しない。さらにヒト TL 様抗原陰性の末梢 T 細胞由来と考えられる MT-1, Peer, SKW-3 のうち、免疫原の SKW-3 細胞とのみ反応した。

抗 HLT-2 抗体は、7 種類の T 細胞系培養株のうち最も未熟と考えられ cALL 抗原陽性の RPMI-8402, CCRF-CEM 以外の全ての T 細胞系培養株と反応した。

抗 HLT-3 抗体は cALL 抗原陽性の RPMI-8402 及び cALL 抗原陰性・ヒト TL 様抗原陰性の末梢 T 細胞由来と考えられる Peer を除く 5 種類の T 細胞株と反応した。

このうち、抗 HLT-2 抗体と細胞株 P 12/Ichikawa, 抗 HLT-3 抗体と細胞株 SKW-3 との反応はきわめて微弱で、補体依存性細胞障害試験ではわずかに 5% 程度の陽性細胞を認めるのみで (+/-) と判定した。

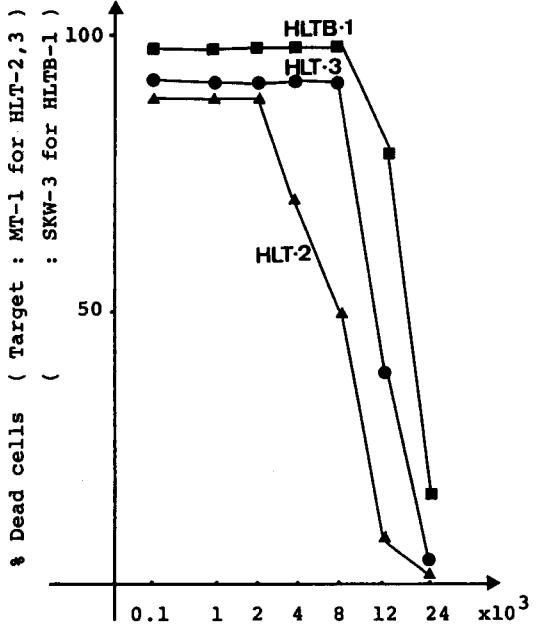


Fig. 1 Cytotoxicity of three monoclonal antibodies to each immunizing cells. Three serially diluted monoclonal antibodies were tested on each immunizing cell (anti-HLTB-1 antibody to SKW-3 cells, and anti-HLT-2 and anti-HLT-3 antibodies to MT-1 cells).

Table 1 Reactivity of monoclonal antibodies to various cultured T cell lines

	Monoclonal antibodies <sup>a) b)</sup>								
	cALL	TL	Leu-1	Leu-2	Leu-3	HLB-1	HLTB-1	HLT-2	HLT-3
T cell lines									
RPMI 8402	+	-	+	-	+	-	-	-	-
CCRF-CEM	+	+	+	-	+	-	-	-	+
MOLT-4F	-	+	+	+	+	-	-	+	+
P12/Ichikawa	-	+	+	+	+	-	-	+/-	+
MT-1	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Peer	-	-	+	-	+	-	-	+	-
SKW-3	-	-	+	+	+	-	+	+	+/-

a) Expression of cell surface markers including common acute lymphoblastic leukemia antigen (cALL), human TL-like antigen (TL), Leu-1, leu-2 and Leu-3 are from published results (J. Minowada et al. 1981)

b) Reactivities of cultured T cell Lines with anti-HLTB-1, HLT-2 and HLT-3 antibody were assessed by complement dependent microcytotoxicity, +, positive; -, negative.

### 3・2・2 B細胞系腫瘍由来培養株との反応性 (Table 2)

抗 HLTB-1 抗体は、T 細胞系培養株とのきわめて限られた反応性と異なり、B 細胞系培養株とはきわめて広く反応した。すなわち、pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) 由来培養株 NALM-18, NALM-6, B-ALL 由来培養株 BALM-1, BALM-3, Burkitt's lymphoma 由来培養株 Daudi, Raji, Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B 細胞由来 RPMI 8075, RPMI 6410 の全ての B 細胞系培養株と反応した。さらに 2 種類の myeloma 由来培養株 RPMI-8226, ARH-77 のうち、ARH-77 と反応した。しかし、non-T,

non-B ALL 由来培養株 KM-3, Reh とは全く反応しなかった。これら non-T, non-B ALL 由来培養株細胞及び、B 細胞系培養株との反応性は、笠井・小柴らの発見した抗 HLB-1 抗体<sup>9)</sup>の反応性に類似したものであった。

これに対して抗 HLT-2 抗体・抗 HLT-3 抗体は、これら non-T, non-B ALL 由来培養株及び B 細胞系培養株とは全く反応しなかった。

### 3・2・3 顆粒球系・単球系・赤芽球系腫瘍由来培養株との反応性 (Table 3)

抗 HLTB-1 抗体は histiocytic lymphoma 由来培養株 U-937 (monoblast) とは反応したが、AML 由来

Table 2 Reactivity of monoclonal antibodies to various hematopoietic cell lines

Cell lines	Monoclonal antibodies <sup>a)</sup>						
	Ia	cALL	SmIg	HLB-1	HLTB-1	HLT-2	HLT-3
nonT, nonB ALL							
KM-3	+	+	-	-	-	-	-
Reh	+	+	-	-	-	-	-
pre-B ALL							
NALM-18	+	+	(+)*	+	+	-	-
NALM-6	+	+	(+)*	+	+	-	-
B-ALL and Burkitts							
Raji	+	+	+	+	+	-	-
Daudi	+	+	+	+	+	-	-
BALM-1	+	-	+	+	+	-	-
BALM-3	+	-	+	+	+	-	-
EBV-transformed B							
RPMI 8075	+	-	+	+	+	-	-
RQMI 6410	+	-	+	+	+	-	-
Myeloma							
ARH 77	+	-	+	+	+	-	-
RPMI 8226	+	-	+	-	-	-	-

\* Cytoplasmic  $\mu$ -chain

<sup>a)</sup> Complement dependent microcytotoxicity was assessed to detect cell surface markers including human Ia like antigen (Ia), cALL, HLB-1, HLTB-1, HLT-2 and HLT-3, +, positive; -, negative.

Table 3 Reactivity of monoclonal antibodies to various hematopoietic cell lines

	Monoclonal antibodies					
	Ia	MCS-1	HLG-1	HLTB-1	HLT-2	HLT-3
Myeloblast and Monoblast derived						
ML-2	-	+	-	-	-	-
KG-1	+	+	-	-	-	-
U-937	-	+	-	+	-	-
Erythroid precursor cell derived						
K562	-	-	-	-	-	-

培養株 KG-1, ML-2 (myeloblast), 及び erythroid precursor cell 由来培養株 K 562 とはすべて反応しなかった。

さらに抗 HLT-2 抗体・抗 HLT-3 抗体は、これらの細胞株とは全く反応しなかった。

### 3.3 各種培養株細胞を用いた定量吸収試験

各単クローン抗体で検出される抗原の各培養株細胞表面での発現をより定量的に観察する目的で、定量吸収試験を行なった。

Fig. 2 に示すように抗 HLTB-1 抗体の抗 SKW-3 細胞障害活性は、EBV-transformed B cell line の RPMI 8075, RPMI 6410 細胞及び、免疫原の SKW-3 細胞では、その吸収細胞容量に比例して吸収され、低下しているのに対して、SKW-3 細胞以外の T 細胞系培養株 (RPMI 8402, CCRF-CEM, MOLT-4 F, Peer, MT-1) 及び non-T, non-B ALL 由来培養株

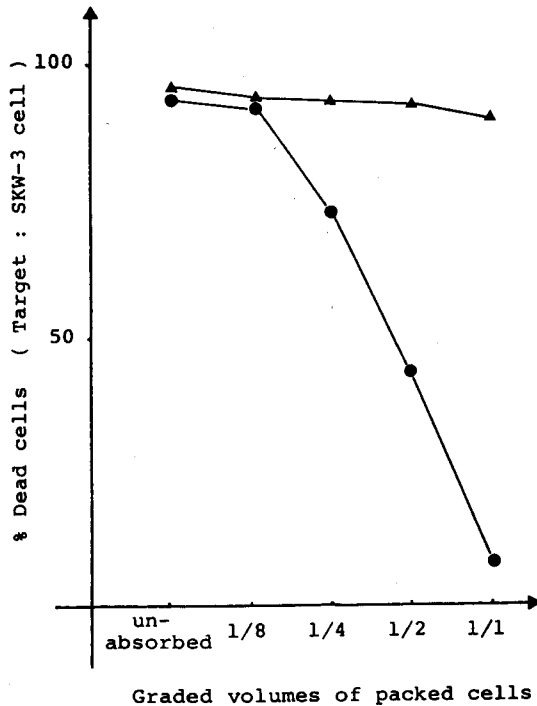


Fig. 2 Quantitative absorption test for HLTB-1 antigen on various cell lines. 100  $\mu$ l of the monoclonal antibody (diluted at 1:2,000) was absorbed with a graded volume of packed cells from RPMI 8075, RPMI 6410 or SKW-3 cells (●-●) and cells from KM-3, RPMI 8402, MOLT-4F, CCRF-CEM, MT-1 or Peer cell lines (▲-▲). The supernatants were tested for their residual cytotoxic activities against SKW-3 cells.

KM-3 では全く吸収されず、低下しなかった。このことから、HLTB-1 抗原は T 細胞系培養株では末梢 T 細胞由来と考えられる SKW-3 細胞のみに発現されているが、末梢正常 B 細胞由来培養株 RPMI 8075, RPMI 6410 の細胞表面にも同程度の抗原量が発現されていることがわかる。

また Fig. 3 に示すように、抗 HLT-2 抗体の抗 MT-1 細胞障害活性は、T 細胞系培養株の MOLT-4 F, Peer, SKW-3, MT-1 では、その吸収細胞容量に比例して吸収され低下するのに対して、他の T 細胞系培養株 RPMI 8402, CCRF-CEM 及び non-T, non-B ALL 由来培養株 KM-3, monoblast (U-937), myeloblast (KG-1, ML-2) さらに erythroid precursor

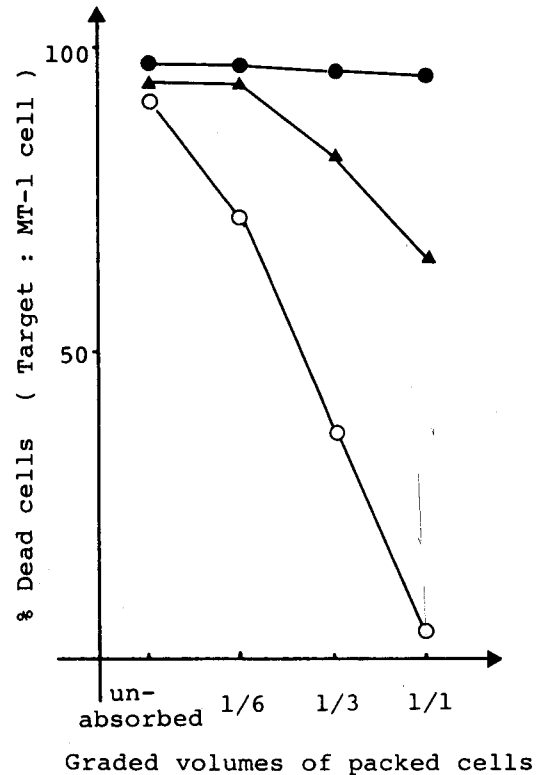


Fig. 3 Quantitative absorption test for HLT-2 antigen on various cell lines. 100  $\mu$ l of the monoclonal antibody (diluted at 1:1,000) was absorbed with a graded volume of packed cells from MOLT-4F, SKW-3, Peer or MT-1 cell lines (○-○), P12/Ichikawa (▲-▲) and cells from RPMI 8075, RPMI 6410, Daudi, KM-3, Reh, KG-1, U-937, K 562, RPMI 8402 or CCRF-CEM cell lines (●-●). The supernatants were tested for their residual cytotoxic activities against MT-1 cells.

cell (K 562) では、全く吸収されなかった。これに対して T 細胞系培養株の P 12/Ichikawa 細胞では partial な吸収をうけ、抗 MT-1 細胞障害活性の低下が認められた。すなわち HLT-2 抗原は、T 細胞系でも限られた分化段階の培養株細胞にのみ発現されていることがわかる。また、細胞障害試験・蛍光抗体法で有意な陽性所見を得られなかった P 12/Ichikawa 細胞が、抗原量は少ないものの明らかに HLT-2 抗原を発現していることが判明した。

Fig. 4 に示すごとく抗 HLT-3 抗体活性は、T 細胞系培養株のうち CCRF-CEM, MOLT-4 F, P 12/Ichikawa, MT-1 細胞でその吸収細胞容量に比例して

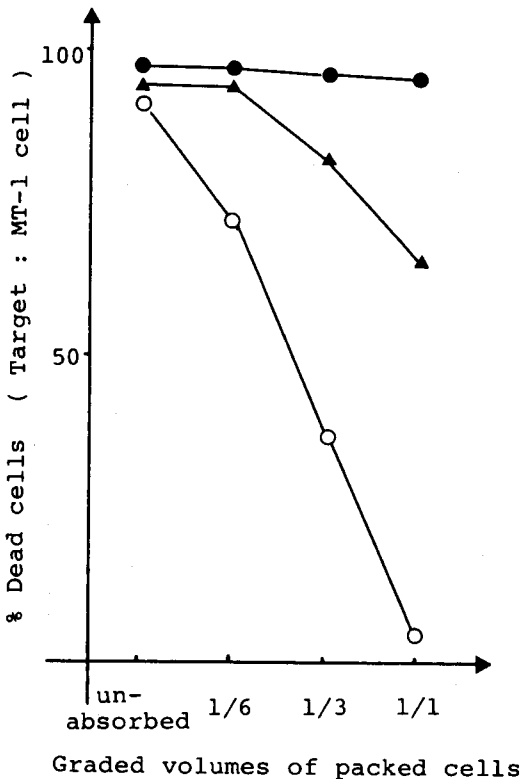


Fig. 4 Quantitative absorption test for CLT-3 antigen on various cell lines. 100  $\mu$ l of the monoclonal antibody (diluted at 1:2,000) was absorbed with a graded volume of packed cells from CCRF-CEM, MOLT-4F, P12/Ichikawa or MT-1 cell lines (○-○), SKW-3 cell line (▲-▲) and cells from RPMI 8075, RPMI 6410, Daudi, KM-3, Reh, KG-1, U-937, K 562, RPMI 8402 or Peer cell lines (●-●). The supernatants were tested for their residual cytotoxic activities against MT-1 cells.

著明に吸収されるのに対して、SKW-3 細胞では partial な吸収を受けるに過ぎなかった。しかし、RPMI 8402, Peer 及び他の非 T 細胞系培養株細胞では全く吸収されなかった。以上より HLT-3 抗原も、T 細胞系培養株のうち限られた培養株細胞にのみ発現される抗原であることが明らかとなった。また SKW-3 細胞が、その細胞表面抗原量は少ないものの明らかに HLT-3 抗原を発現していることがわかる。

### 3.4 リンパ系組織内分布 (Table 4)

胸腺・脾臓・扁桃各組織内リンパ球及び末梢リンパ球における抗原の発現を、細胞障害試験及び蛍光抗体法で検索した。

HLTB-1 抗原は、末梢リンパ球・扁桃細胞の 90~95%、脾細胞の 75~80%、胸腺細胞の 5~10% に発現されていた。この分布から、同抗原が末梢では T 細胞と B 細胞に等しく発現されるものの、T 細胞系では未熟胸腺細胞には検出されず、末梢成熟型 T 細胞への分化にともなって発現されるという事が示唆される。まず、扁桃細胞を T 細胞分画と B 細胞分画に分別し、各分画での HLTB-1 抗原の発現を検索したが、両分画ともに約 95% の細胞が陽性で、明らかな差は認められなかった。すなわち HLTB-1 抗原が末梢 T 細胞・B 細胞にほぼ等しく発現される抗原である事が明らかとなった。

HLT-2 抗原陽性細胞は、末梢リンパ球・扁桃細胞の約 10% であったが、胸腺細胞には認められなかった。この陽性細胞は、扁桃 T 細胞分画の 10% に enrich されることから、正常リンパ系組織では末梢 T 細胞の minor population に発現される抗原と考えられた。

HLT-3 抗原は、胸腺細胞の 34~42% に発現されるものの、扁桃細胞では 4%、末梢リンパ球ではわずかに 3% 以下の陽性細胞を認めるのみであった。末梢組織では minor population にのみ発見され、しかもこの陽性細胞は扁桃 T 細胞分画に限局していた。

また各抗体の単球・顆粒球に対する反応性を検索したが、抗 HLTB-1 抗体のみが、末梢単球の約 50% と反応した。

さらに 3 種類の抗原のリンパ系組織内分布をより定量的に観察するため、定量吸収試験を行なった。Fig. 5 に示すごとく、抗 HLTB-1 抗体活性は、扁桃 T 細胞・B 細胞両分画にて細胞数に比例して、しかも同程度の著明な吸収を受けている。すなわち抗原量の面からも HLTB-1 抗原は、末梢 T 細胞と B 細胞に同程度に発現されていることが明らかとなった。これに対して抗 HLT-2 抗体・抗 HLT-3 抗体活性は共に、B 細胞分画



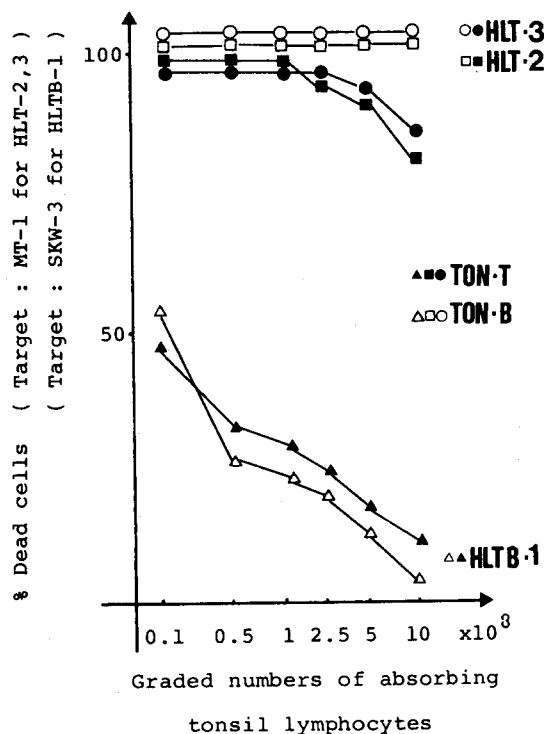
**Table 4** Reactivity of monoclonal antibodies to normal lymphoid cells, monocytes and granulocytes

Target cells		% E-rosetting and antigen positive <sup>a,b)</sup>								
		E	Ia	TL	SmIg	HLB-1	Leu-1	HLTB-1	HLT-2	HLT-3
Thymocyte	1.	95	5	85	2	0	100	5	0	34
	2.	97	5	85	3	0	100	10	0	42
Tonsil lymphocyte		20	65	nd	54	50	25	90	10	3
PBL	1.	62	20	0	15	15	60	95	10	3
	2.	60	15	0	10	10	60	90	12	0
Tonsil T rich fraction		82	30	nd	17	10	85	95	11	4
Tonsil B rich fraction		3	85	nd	72	60	10	90	0	0
Monocyte		4	80	nd	6	0	0	40	0	0
Granulocyte		10	15	nd	12	5	10	15	0	0

nd, not done.

<sup>a)</sup> Complement dependent microcytotoxicity was assessed to detect cell surface markers including Ia, cALL, Leu-1, HLB-1 and HLTB-1 and is represented by the percentages of lytic cells.

<sup>b)</sup> Reactivity with HLT-2 and HLT-3 antibody was assessed by indirect immunofluorescence and is represented by the percentages of labeled cells.



**Fig. 5** Quantitative absorption test for the three antigens on normal tonsil lymphocytes. 100  $\mu$ l of each diluted monoclonal antibody was absorbed with a graded number of cells from tonsil T rich populations or B rich populations. The supernatants were tested for their residual cytotoxic activities on each immunizing cell (anti-HLTB-1 to SKW-3 cells, and anti-HLT-2 and anti-HLT-3 antibodies to MT-1 cells).

では全く吸収されず、T細胞分画で一部吸収された。すなわち HLT-2 抗原・HLT-3 抗原は末梢 B 細胞には発現されず、末梢 T 細胞の minor population に発現されていることが明らかとなった。

これに対して胸腺細胞を用いた吸収試験 (Fig. 6) では、抗 HLT-2 抗体活性は全く吸収されず、抗 HLTB-1 抗体活性は partial な吸収をうけた。しかし抗 HLT-3 抗体活性は吸収胸腺細胞数に比例して著明に吸収された。このことから、HLT-3 抗原は胸腺細胞に強く発現され、HLTB-1 抗原は胸腺細胞の minor population に発現されるが、HLT-2 抗原は胸腺では全く発現されていないことが明らかとなった。

### 3.5 活性化リンパ球との反応性

Nonspecific mitogen (PWM, Con-A, PHA) は polyclonal activator であるが、少なくとも T 細胞か B 細胞のいずれかを、しかも異なるクローン集団を活性化すると考えられている。しかも、マウスにおいてある抗原系は、この活性化あるいは allogenic cell に反応した活性化にもなって著しい抗原量の変化を示すことが知られている<sup>17)</sup>。

Table 5 に示すように HLTB-1 抗原は PHA, Con-A, PWM blast さらには alloactivated blast にも発現されていた。しかも、これらによる活性化の過程で、細胞表面抗原量の著明な増加が観察された (Fig. 7)。しかし HLT-2 抗原・HLT-3 抗原、いずれの活性化リンパ球分画にも発現されていなかった。

### 3.6 非リンパ系組織内分布 (Fig. 8)

非リンパ系実質臓器での各抗原の発現を検索するために、脳・肝・腎のホモジェネートを用い、半定量吸

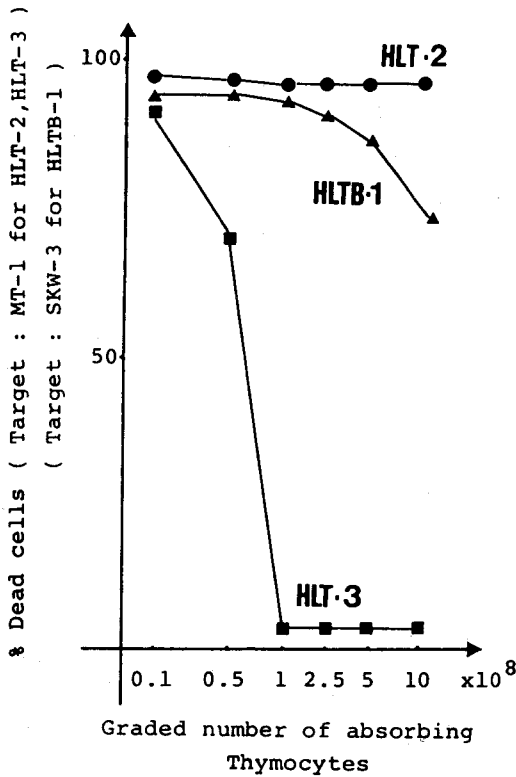


Fig. 6 Quantitative absorption test for the three antigens on normal thymocytes. 100  $\mu$ l of each diluted monoclonal antibody was absorbed with a graded number of thymocytes. The supernatants were tested for their residual cytotoxic activities against each immunizing cell.

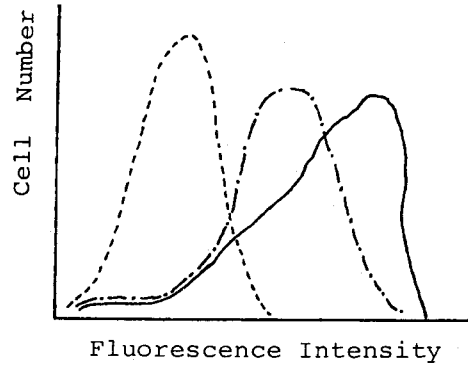


Fig. 7 Immunofluorescence profiles of fresh peripheral blood lymphocytes (---) and 5-day Con-A activated ones (—) stained with anti-HLTB-1 antibody. Background fluorescence intensity (.....) was obtained by incubating cells with control X-63-Ag-8.653 culture supernatants and developing FITC-conjugated goat anti-mouse IgG.

Table 5 Reactivity of three monoclonal antibodies to PHA, Con-A, PWM blasts and alloactivated cells<sup>a)</sup>

	HLTB-1	HLT-2	HLT-3
PHA Blast	+	-	-
Con-A Blast	+	-	-
PWM Blast	+	-	-
ALLoactivated cell	+	-	-

<sup>a)</sup> Reactivities of three monoclonal antibodies to blast cells were detected by indirect immunofluorescence, +, positive; -, negative.

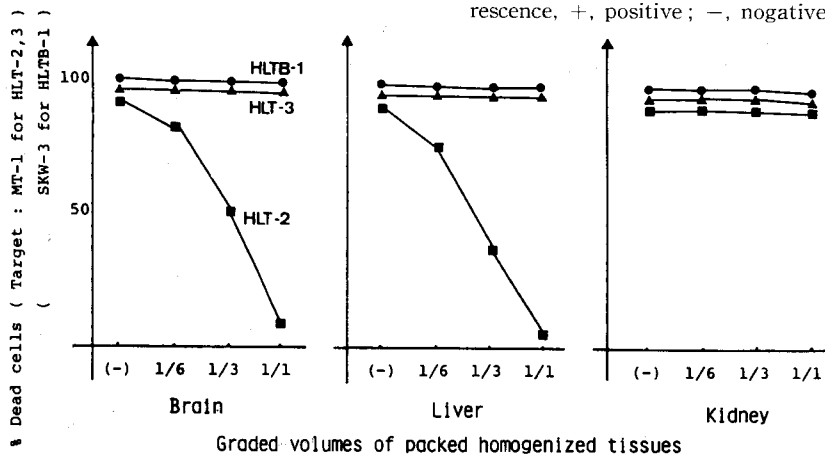


Fig. 8 Quantitative absorption test for the three antigens on non-lymphoid tissues. 100  $\mu$ l of each diluted monoclonal antibody was absorbed with a graded volume of packed tissue homogenates from brain, liver and kidney. The supernatants were tested for their residual cytotoxic activities on each immunizing cell.

取試験を行なった。

抗 HLTB-1 抗体活性・抗 HLT-3 抗体活性はいずれの臓器ホモジネートでも吸収されなかったが、抗 HLT-2 抗体活性は脳・肝ホモジネートにより、その吸収容量に比例して著明に吸収され低下したが、腎ホモジネートでは吸収されなかった。

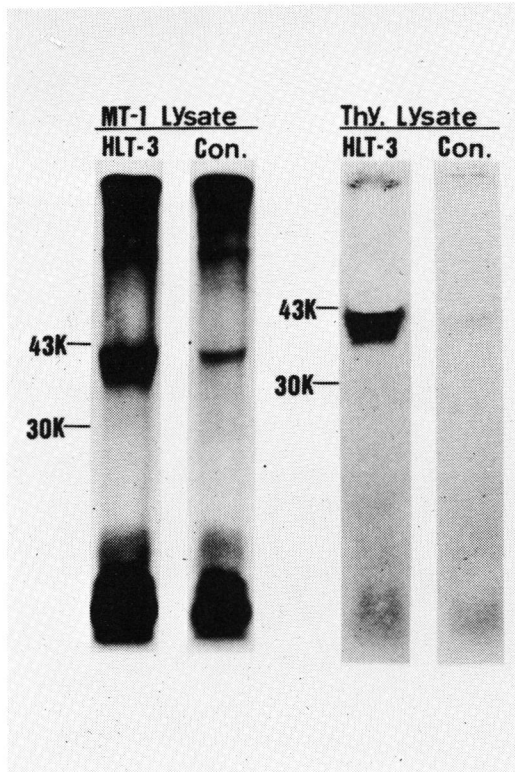
以上より、HLT-1 抗原・HLT-3 抗原は検索したいずれの臓器にも発現されていないが、HLT-2 抗原は少なくとも脳・肝に発現されていることが明らかとなった。

### 3.7 抗原の免疫化学的同一

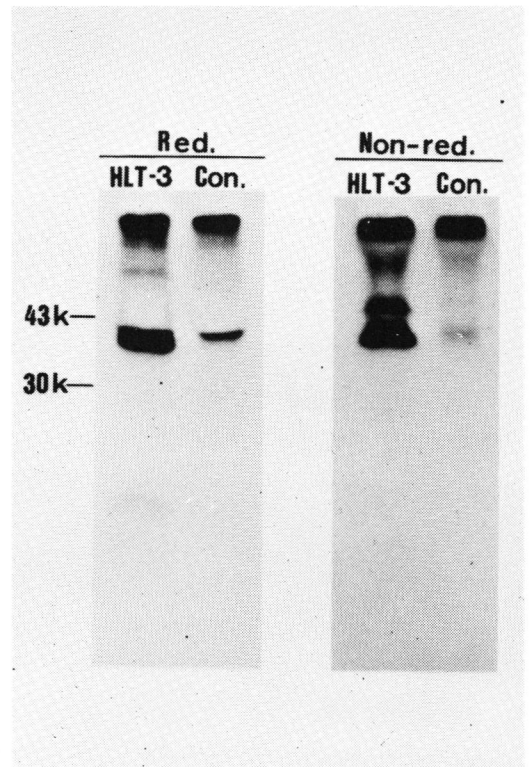
SDS-PAGE による解析では、抗 HLTB-1 抗体・抗 HLT-2 抗体ともに有意な抗原蛋白バンドを同定できなかった。これには、表面抗原蛋白の放射性標識・可溶化に際する抗原分子の破壊、免疫沈降物の形成不全、

あるいは電気泳動に際して抗原蛋白がゲル内に拡散し得ないなどの可能性が考えられるが、今後さらに検討する必要がある。

これに対して、抗 HLT-3 抗体は免疫原の培養株 MT-1 細胞 whole lysate あるいは thymus cell whole lysate から、分子量 42 K ダルトンの単一な抗原蛋白を同定し得た (Fig. 9)。この 42 K ダルトンの抗原蛋白は、thymus cell whole lysate の Lch-bound fraction (糖蛋白抗原 lysate) を用いても同様に検出できることから、糖蛋白であり、また還元・非還元状態で同一のバンドとして同定される事から、intra-chain disulfide bond を持たない単一な蛋白であることが明らかとなった (Fig. 10)。



**Fig. 9** SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates of anti-HLT-3 antibody made with  $^{125}\text{I}$ -labeled MT-1 cells (MT-1 lysate) and thymocytes (Thy. lysate) under reducing conditions. Note the single component with a molecular weight of 42K daltons by anti-HLT-3 antibody with both MT-1 cells and thymocytes lysates, but not by control NS-1 culture supernatants (Con.).



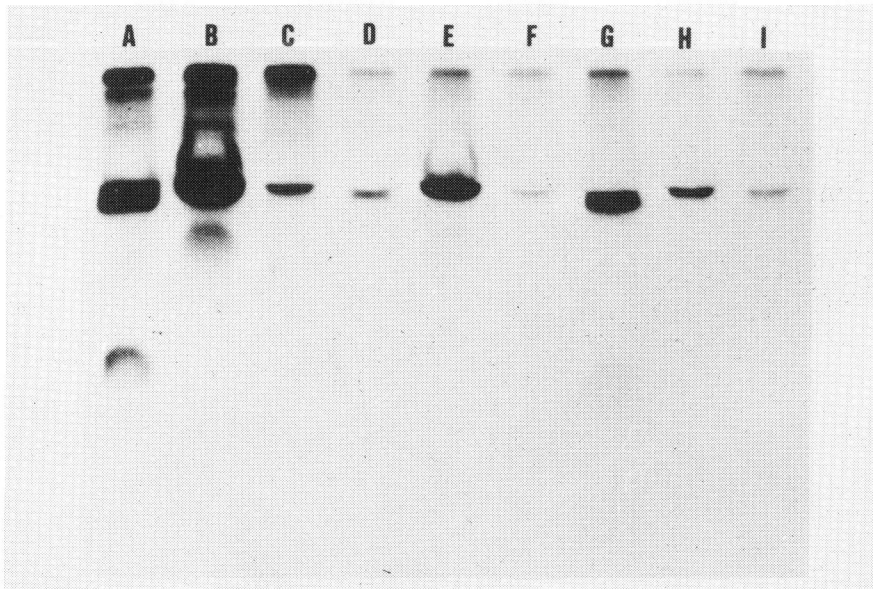
**Fig. 10** SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates of anti-HLT-3 antibody made with  $^{125}\text{I}$ -labeled thymocyte glycoproteins, which were purified by a Lch-coupled Sepharose 4B column. This anti-HLT-3 antibody precipitated a single component with a M. W. of 42K-daltons which ran identically in gels both under reducing (Red.) and non-reducing (Non-red.) conditions. Control immunoprecipitate (Con.) was prepared by the same thymus lysate with NS-1 culture supernatants.

この抗 HLT-3 抗体により検出される分子量 42 K ダルトンの糖蛋白抗原は、その化学的性状及び前述したリンパ系・非リンパ系組織内分布より、末梢成熟型 T 細胞の minor population にも検出されることを除けば、ヒト TL 様抗原に類似するものであった。ヒト TL 様抗原は、分子量 12 K ダルトンの  $\beta_2$ -microglobulin を associate した分子量 49 K ダルトンの糖蛋白として単クローン性 OKT-6 抗体<sup>18)</sup>、NA-1/34 抗体<sup>19)</sup>、Hu-TL 抗体<sup>20)</sup> などにより同定され、その化学的性状及び組織分布より、マウス TL 抗原<sup>21,22)</sup> の human homologue と考えられる。ここではさらに、ヒト TL 様抗原と HLT-3 抗原の異同を明らかにするため、sequential immunoprecipitation 法を用いた。ヒト TL 様抗原に対する単クローン抗体としては、Hu-TL 抗体を用いた (Fig. 11)。

Thymus cell lysate の Lch-bound fraction をあらかじめ抗 HLT-3 抗体と SACI で吸収し抗 HLT-3 抗体と結合する抗原蛋白を除いた。この条件で抗 HLT-3 抗体及び Hu-TL 抗体で RIP を行ない、SDS-PAGE で解析すると、抗 HLT-3 抗体で検出される抗原は完全に吸収され有意なバンドを認めないが、Hu-TL 抗体では明らかに分子量 49 K ダルトンの糖蛋白を認めた。また逆に Hu-TL 抗体と SACI であらかじめ吸収した lysate を用いた場合は、Hu-TL 抗体と結合する蛋白は吸収除去されるが、抗 HLT-3 抗体では明らかに 42 K ダルトンの蛋白を同定し得た。この事から、抗 HLT-3 抗体と Hu-TL 抗体は、全く異なる抗原分子を認識する抗体であることが明らかとなった。

### 3・8 T 細胞分化過程との相関

リンパ球表面抗原の多くは、その発生学的・機能的分化にともなって消長する分化抗原としての性格が強

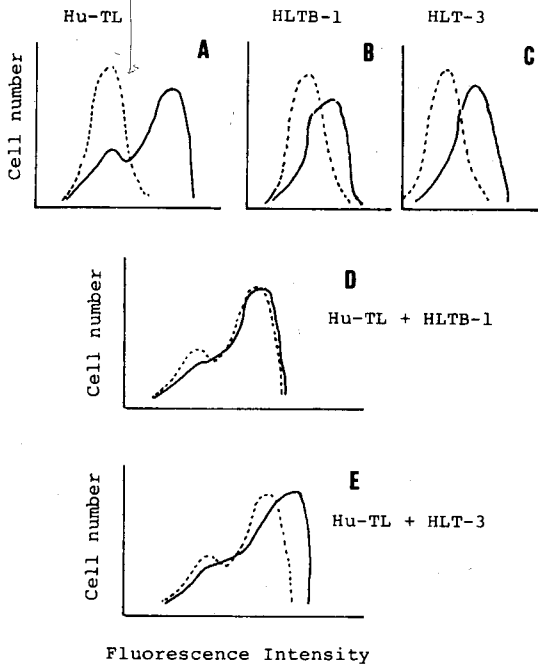


**Fig. 11** SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between anti-HLT-3 or Hu-TL antibody and <sup>125</sup>I-labeled thymus glycoproteins either non-depleted or immunodepleted by HLT-3 or Hu-TL antibody. Non-depleted glycoproteins were used in lanes A, B and C. Glycoproteins immunodepleted by HLT-3 antibody were used in lanes D, E, and F. Glycoproteins also immunodepleted by Hu-TL antibody were used in lanes G, H and I. Immunoprecipitations were done using HLT-3 antibody (A, D, G), Hu-TL antibody (B, E, H) or control NS-1 culture supernatants (C, F, I).

The 42K-dalton glycoprotein was precipitated by HLT-3 antibody with labeled thymocyte glycoproteins (lane A), even after being immunodepleted by Hu-TL antibody (lane G), and the 49K-dalton glycoproteins also was precipitated by Hu-TL antibody with labeled thymocyte glycoproteins (lane B), even after being immunodepleted by HLT-3 antibody (lane E).

い。T細胞分化過程において、胸腺細胞から末梢T細胞にいたる過程で発現されるHLTB-1抗原とHLT-3抗原の、T細胞分化成熟との相関を検索した。

前出したヒトTL様抗原は、T細胞の骨髄内分化過程では発現されず、その胸腺細胞への分化にともなって発現される抗原である。すなわち、コルチゾン感受性胸腺細胞(胸腺皮質細胞)にいたって発現されるが、



**Fig. 12** The immunofluorescence profile of normal thymocytes with Hu-TL antibody (A), HLTB-1 antibody (B) and HLT-3 antibody (C), Hu-TL and HLTB-1 antibodies added simultaneously (E). Background fluorescence intensity was obtained by incubating cells with control NS-1 culture supernatants and developing FITC-conjugated goat anti-mouse IgG.

胸腺髄質細胞への分化に伴って消失することが知られており<sup>18,21,22)</sup>、この事からヒトT細胞胸腺内分化過程の重要な指標と考えられている。従って、ここではHLTB-1抗原・HLT-3抗原とヒトTL様抗原の胸腺細胞における発現を明らかにすることにより、両抗原とT細胞分化との関連を検索した。

FACS analyserを用いて検索した結果をFig. 12に示した。Hu-TL抗体・抗HLT-3抗体・抗HLTB-1抗体では胸腺細胞のそれぞれ85%、45%、15%が陽性反応を示したが、Hu-TL抗体と抗HLTB-1抗体を同時に反応させると、Hu-TL抗原陰性細胞の大部分が陽性細胞に転じ、ほぼ100%の細胞が染色されたが、Hu-TL抗原陽性細胞群には何の変化も見られなかった。これに対して、Hu-TL抗体と抗HLT-3抗体を同時に反応させるとHu-TL抗原陰性細胞の一部が陽性細胞に転じると同時に、Hu-TL抗原陽性細胞の一部がさらに蛍光強度を増加させた。すなわちHLTB-1抗原はHu-TL抗原陰性細胞のみに発現される抗原であり、またHLT-3抗原がHu-TL抗原陰性細胞と陽性細胞の両群に発現される抗原であることが強く示唆された。

この結果をさらに詳細に検討するために、Table 6, 7に示すように、negative selectionの実験を行なった。

胸腺細胞を抗HLTB-1抗体と補体で処理して、HLTB-1抗原陽性細胞を除去した分画では、ほぼ100%の細胞がHu-TL抗原陽性細胞であり、Hu-TL抗体と抗HLTB-1抗体を同時に反応させるとほぼ100%の細胞が染色されることも合わせて、HLTB-1抗原はヒトTL様抗原陰性の胸腺髄質細胞にのみ発現される抗原と考えられる。

さらに、抗HLTB-1抗体と補体で処理した胸腺皮質細胞分画では、53%の細胞がHLT-3抗原陽性であり、またHu-TL抗体で処理した胸腺髄質細胞分画では、28%の細胞が陽性であった。すなわち、HLT-3抗原は胸腺皮質細胞に主に発現され、その髄質細胞への分化

**Table 6** Relationship of TL-positive and HLTB-1 positive subpopulations of thymocytes

	Monoclonal antibodies <sup>b)</sup>		
	Hu-TL	HLTB-1	Hu-TL+HLTB-1
Whole thymocytes	89	10	97
HLTB-1 depleted thymocytes	98 <sup>a)</sup>	0	98

<sup>a)</sup> HLTB-1 positive thymocytes were depleted by incubation of whole thymocytes with monoclonal anti-HLTB-1 antibody and complement.

<sup>b)</sup> Reactivity of monoclonal antibody with fresh and fractionated thymocytes was assessed by indirect immunofluorescence and is represented by the percentages of labeled cells.

Table 7 Expression of HLT-3 antigen on cortical and medullary thymocytes

	Monoclonal antibodies <sup>b)</sup>	
	Hu-TL	HLT-3
Whole thymocytes	89	45
HLTB-1 depleted thymocytes (cortical thymocytes)	98	53
Hu-TL depleted thymocytes (medullary thymocytes)	0 <sup>a)</sup>	28

<sup>a)</sup> Hu-TL positive thymocytes were depleted by incubation of whole thymocytes with monoclonal Hu-TL antibody and complement.

<sup>b)</sup> Reactivity of monoclonal antibody with fresh and fractionated thymocytes was assessed by indirect immunofluorescence and is represented by the percentages of labeled cells.

Table 8 Reactivities of monoclonal antibodies to cells of leukemic patients

Hematopoietic malignancy	number of cases	Number of markers and antigen-positive cases										
		E	Ia	SmIg	HLB-1	TL	Leu-1	Leu-2	Len-3	HLTB-1	HLT-2	HLT-3
AML	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nonT, nonB ALL	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-ALL	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
B-CLL	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
T-ALL	2	2	0	0	0	2	2	2	2	0	0	2
T-CLL	2	2	0	0	0	0	2	0	2	2	0	0
ATL	3	3	1	0	0	0	3	0	3	3	0	0

AML=acute myelogenous leukemia; ATL=adult T cell leukemia

にもなって陽性細胞が減少することが明らかとなった。

### 3・9 ヒト白血病細胞での発現 (Table 8)

ヒト白血病患者末梢血より Ficoll-Conray 比重遠沈法にて腫瘍細胞を分離し、各単クローン抗体との反応性を検索した。

抗 HLTB-1 抗体は、ヒト造血器腫瘍由来培養株での検索と同様に、ヒト Ia 様抗原陽性の AML、ヒト Ia 様抗原・cALL 抗原陽性の non-T, non-B ALL とは反応しなかったが、HLB-1 抗原陽性・SmIg 陽性の B-ALL, B-CLL と反応した。T 細胞系腫瘍では、ヒト TL 様抗原陽性の T-ALL とは反応しないが、ヒト TL 様抗原陰性の末梢 T 細胞由来 T-CLL, adult T cell leukemia (ATL) と反応した。

抗 HLT-2 抗体は、培養株細胞での広い反応性に反して、現在まで反応する新鮮白血病症例は見いだされていない。

抗 HLT-3 抗体は、ヒト TL 様抗原陽性の T-ALL と全て反応したが、末梢 T 細胞由来 T-CLL, ATL で反応した症例は現在までの所なく、また他の非 T 細胞性白血病とは全く反応しなかった。

## 4 考 察

ヒトリンパ球表面抗原は、一部腫瘍化にもなって発現する腫瘍関連抗原として捉えられるが、大部分はその発生学的・機能的分化にもなって消長する分化抗原としての性格を有している。免疫学の分野に単クローン抗体が応用され、多くの分化抗原系が発見されるにいたって、ようやく正常リンパ球の分化過程が細胞表面の抗原形質から検索されるようになってきた<sup>23)</sup>。

本研究では、正常ヒト T 細胞分化過程の検索・T 細胞機能的亜群の同定、さらに T 細胞性白血病の分類・診断への応用を目的として、細胞融合法により単クローン抗体を作製し、新しい3種類の T 細胞分化抗

原を明らかにし、これら抗原の組織内分布・免疫化学的性状・発生学的分化過程との相関について検索した。

4.1 組織内分布

リンパ球は腫瘍化に際しても、その分化成熟過程に対応して消長する分化抗原を適格に保持していると考えられ、この意味から腫瘍細胞は正常リンパ球の分化過程の一つの局面を代表する frozen clone であると言える。またリンパ系腫瘍は、その細胞表面抗原形質により、細胞由来・分化段階を判定することが出来るわけである<sup>24)</sup>。すなわち造血器腫瘍由来培養株は、表面抗原的にも monoclonal な細胞集団からなり、対応する正常リンパ球分化段階を想定し得ることから、きわめて有用である。

抗 HLTB-1 抗体は全ての B 細胞系培養株と反応したが、T 細胞系ではヒト TL 様抗原陽性の細胞株とは反応せず、成熟型 T 細胞由来培養株のうち、免疫原の SKW-3 細胞とのみ反応した。すなわち T 細胞系ではヒト TL 様抗原陰性の末梢成熟型 T 細胞にのみ発現されると推定された。正常リンパ系組織の検索でも、胸腺細胞の 5~10%、脾細胞の 75~80%、扁桃細胞・末梢 T 細胞の 90~95% と反応した。また T 細胞分画・B 細胞分画との反応性・吸収試験から、HLT B-1 抗原は末梢 T 細胞・B 細胞のほぼ全てに、しかも抗原量も同程度に発現されていることが明らかとなった。

抗 HLT-2 抗体は、cALL 抗原陽性の最も未熟な T 細胞系培養株を除く全ての T 細胞系培養株と反応したが、他の非 T 細胞系培養株とは全く反応しなかった。正常リンパ系組織でも T 細胞とのみ反応したが、末梢成熟型 T 細胞の 10% のみに検出され、胸腺細胞とは反

応しなかった。

抗 HLT-3 抗体も同様に、T 細胞系培養株とのみ反応するが、この中で最も未熟と考えられる RPMI 8402 及び末梢成熟型 T 細胞由来 Peer とは反応せず、SKW-3 では反応する抗原量が少量であった。正常リンパ球でも抗 HLT-3 抗体は T 細胞系とのみ反応したが、胸腺細胞の 35~45% と反応するのに対し、末梢血では陽性細胞が著明に減少し 3~5% のみであった。

4.2 免疫化学的性状

免疫化学的に HLTB-1 抗原及び HLT-2 抗原は同定し得なかったが、HLT-3 抗原は分子量 42 K ダルトンの単一な糖蛋白よりなることを明らかにした。また、この HLT-3 抗原はその組織分布からも、ヒト TL 様抗原に類似していることから sequential immunoprecipitation 法を用いて両抗原が異なることを示した。免疫化学的にヒト TL 様抗原に類似する  $\beta_2$ -microglobulin を associate する抗原<sup>25,26)</sup> としては、HLA の他に単クローン性 M-241 抗体<sup>27)</sup> で検出される分子量 43 K ダルトンの糖蛋白があるが、この抗原はヒト TL 様抗原と全く同様の組織分布を示しており、マウス Qa 抗原<sup>28)</sup> との相同性が検索されている。しかしこの抗原も、末梢 T 細胞に発現され、 $\beta_2$ -microglobulin を associate しない HLT-3 抗原とは明らかに異なる抗原と考えられる。

4.3 T 細胞分化過程との相関

ヒト T 細胞分化にともなう細胞表面抗原形質の変化は、主として Leu 抗原系<sup>18)</sup>・OKT 抗原系<sup>29)</sup> を中心として詳細に検討されているが、本研究で明らかにし得た 3 種類の新しい分化抗原との関連を Table 9 に概略し

Table 9 T cell maturation and differentiation

antigen	stages	Thymocytes			Peripheral T cell compartment	
		Pre-T	early	common	late	H/I T cell
Leu-1		////	////	////	////	////
Leu-2			////	////	////	////
Leu-3			////	////	////	////
OKT-10		////	////	////		
Hu-TL			////	////		
HLT B-1					////	////
HLT-3			////	////	////	
HLT-2						////

た。

すなわち、T細胞分化過程において、胸腺皮質細胞から髓質細胞への分化にともなってヒトTL様抗原は急激に減少・消失するが、HLTB-1抗原はこれに変わって発現されてくる抗原と考えられ、B細胞系にも発現されるが、T細胞系では末梢成熟型T細胞の重要なマーカー抗原と考えられた。これらHLTB-1抗原の分布はマウスLy-6抗原<sup>11)</sup>・Ly-7抗原<sup>30)</sup>ときわめて類似するものであった。

HLT-3抗原はこれに対して、胸腺皮質細胞より発現される抗原で、髓質細胞・末梢T細胞へと分化するのに伴って急激に減少する抗原であり、ヒトTL様抗原陽性細胞とHLTB-1抗原陽性細胞の中間分化段階の細胞群に発現される抗原であると考えられた。

HLT-2抗原は胸腺細胞には全く検出されず、末梢T細胞の約10%にのみ発現されるT細胞終末分化段階に関連する抗原と考えられた。

## 5 結 論

単クローン抗体を用いて、ヒトT細胞亜群に発見される3種類の新しいT細胞分化抗原を同定した。

1) HLTB-1抗原は、B細胞の全分化過程にも発現されるが、T細胞系では胸腺髓質細胞以後の末梢成熟型T細胞にのみ発現される抗原であった。

2) HLT-2抗原は、ヒト造血器腫瘍由来培養株での反応性と異なり、正常末梢T細胞のminor subsetにのみ発現される抗原であり、同時に脳・肝にも検出することができた。

3) HLT-3抗原は、胸腺皮質細胞に主として発現され、髓質細胞・末梢T細胞へと分化するに従って急激に減少するが、終末分化段階で明らかに数%の細胞がこの抗原を保持していた。さらに免疫化学的検索により、このHLT-3抗原は分子量42Kダルトンの単一な糖蛋白よりなることが明らかとなった。

T細胞終末分化段階細胞の特定のT細胞亜群に発現されるHLT-2抗原・HLT-3抗原と、T細胞機能分化との関連を明らかにすることが今後の課題と考えられる。

## 文 献

- Kohler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificities. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
- 小柴博文・菊地浩吉: 造血器腫瘍に対する異種抗血清とモノクローナル抗体の比較. *癌と化学療法* **8**, 1175-1183 (1981).
- Minowada, J., Sagawa, K., Trowbridge, I. S., Kung, P. D., and Goldstein, G.: Marker profiles of 55 human leukemia-lymphoma cell lines. In: Rosenberg, S. A. and Kaplan, H. S.: *Malignant lymphomas, etiology, immunology, pathology, treatment.* 53-74, Academic, New York (1982).
- Minowada, J., Koshiba, H., Sagawa, K., Morita, M., Saito, M., Pauly, J. L., Kubonishi, I., Lok, M. S., Tatsumi, E., Han, T., Srivastava, B. I. S., Ohnuma, T., Trowbridge, I. S., Evans, R. L. and Goldstein, G.: Heterogeneity of marker profile in 52 leukemia-lymphoma cell lines: I. T-cell line. In: Knapp, W.: *Leukemia markers.* 279-282, Academic, New York (1981).
- Ishii, Y., Fujimoto, J., Koshiba, H. and Kikuchi, K.: Isolation and partial characterization of a 72,000-daltons glycoprotein (Tgp 72) on human thymus and T cells; possible relationship to murine Ly-1 antigen. *J. Immunol.* **126**, 2171-2176 (1981).
- Unaune, E. R.: Properties and some uses of anti-macrophage antibodies. *Nature* **218**, 36-38 (1968).
- 吉永 秀: 赤血球除去用トリス緩衝液. 免疫実験操作法, 日本免疫学会編, **A**, 450 (1975).
- Kasai, K., Koshiba, H., Ishii, Y. and Kikuchi, K.: A monoclonal antibody defining human B cell differentiation antigen (HLB-1 antigen). *Microbiol. Immunol.* **27**, 51-64 (1983).
- Engleman, E. G., Warnke, R., Fox, R. I., Dilley, J., Benike, C. J. and Levy, R.: Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1791-1795 (1981).
- Lemke, H., Hammerling, G., Hohmann, C. and Rajewsky, K.: Hybrid cell lines secreting monoclonal antibody specific for major histocompatibility antigen of the mouse. *Nature* **271**, 249-251 (1978).
- Kimura, S., Tada, N., Nakayama, E. and Hammering, U.: I. Serological characterization of mouse Ly-6 alloantigen by monoclonal antibodies. *Immunogenetics* **11**, 373-381 (1980).
- Ishii, Y., Koshiba, H., Ueno, H., Maeyama, I., Takami, T., Ishibashi, F. and Kikuchi, K.: Characterization of human B lymphocyte specific antigen. *J. Immunol.* **114**, 466-469 (1975).
- Nakayama, E., Shiku, H., Stockert, E., Oettgen, H. F. and Old, L. J.: Cytotoxic T cells; Lyt phenotype and blocking of killing activity by Lyt antisera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**,



- 1977-1981 (1979).
14. 松浦晃洋・石井良文・藤本純一郎・菊地浩吉：細胞表面の免疫化学的解析法；細胞表面高分子の放射性標識法とradioimmunoprecipitation法について。免疫実験操作法，日本免疫学会編 **10**，3181-3188 (1981)。
  15. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970)。
  16. Ouchterlony, O. and Nilson, L. A.: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis in "Handbook of Experimental Immunology, B. M. Weir ed., 3rd. ed., chapter 19, Blackwell, Oxford (1978)。
  17. Matossian-Rogers, A., Rogers, P. and Herzenberg, L. A.: Analysis of Ly-6.2-bearing murine lymphocyte subpopulations in relation to the T-lymphocyte markers, Thy-1, Lyt-1 and Lyt-2. *Cell. Immunol.* **69**, 91-100 (1982)。
  18. Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., Levy, R. H. and Schlossman, S. F.: Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1588-1592 (1980)。
  19. McMichael, A. J., Pilch, J. R., Golfre, G., Mason, D. Y., Fabre, J. R. and Milstein, C.: A human thymocyte antigen defined by a monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* **9**, 205-210 (1979)。
  20. 今信一郎・武井 崇・石井良文・藤本純一郎・菊地浩吉：日本免疫学会総会記録，日本免疫学会編 **12**，68-69 (1982)。
  21. Tada, N., Tanigaki, N. and Pressman, D.: Human cell membrane component bound to beta-2-microglobulin in T cell-type cell lines. *J. Immunol.* **120**, 513-519 (1978)。
  22. Fujimoto, J., Ishii, Y., Koshiba, H., Matsuura, A., Ogasawara, M., Uede, T. and Kikuchi, K.: Human thymus antigen; Characterization and its expression on human leukemias. *Am. J. Hematol.* **10**, 145-156 (1981)。
  23. 藤本純一郎・菊地浩吉：非ホジキン腫瘍の膜表面形質。治療学 **7**，521-528 (1981)。
  24. 菊地浩吉・上出廷治：癌細胞診—とくに造血臓器腫瘍細胞診について—。細胞工学 **1**，51-56 (1982)。
  25. Cotner, T., Mashimo, H., Kung, P. C., Goldstein, G. and Strominger, J. L.: Human T cell surface antigens bearing a structural relationship to HLA antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3858-3862 (1981)。
  26. Tanigaki, N., Tokuyama, H., Fukunishi, T., Minowada, J. and Pressman, D.: Human cell membrane components dominant in T cell lineage: Identification and characterization of human TL-like antigens. *J. Immunol.* **123**, 2906-2914 (1979)。
  27. Knowles, R. W. and Bodmer, W. F.: A monoclonal antibody recognizing a human thymus leukemia-like antigen associated with  $\beta_2$ -microglobulin. *Eur. J. Immunol.* **12**, 676-681 (1982)。
  28. Staton, T. H. and Hood, L.: Biochemical identification of the Qa-1 alloantigen. *Immunogenetics* **11**, 309-314 (1980)。
  29. Ledbetter, J. A., Evans, R. L. and Lipiniki, M.: Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J. Exp. Med.* **153**, 310-323 (1981)。
  30. Potter, T. A., Morgan, G. M. and Mckenzie, I. F. C.: Murine lymphocyte alloantigens. II. The Ly-7 Locus. *J. Immunol.* **125**, 546-550 (1980)。

---

別刷請求先：

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学脳神経外科科学講座 上出廷治