モノクローナル抗体を用いた Matuhasi-Ogata phenomenon の解析

梶田 忠宏¹⁾³⁾ 七條 茂樹¹⁾ 横山 三男¹⁾ 東谷 孝徳²⁾

1) 久留米大学医学部免疫学教室

2) 久留米大学病院輸血部

3) 国際試薬株式会社

(昭和61年11月25日受付)

EVALUATION OF MATUHASI-OGATA PHENOMENON USING MONOCLONAL ANTIBODIES

Tadahiro Kajita¹⁾³⁾, Shigeki Shichijo¹⁾, M. Mitsuo Yokoyama¹⁾ and Takanori Higashitani²⁾

1) Department of Immunology, Kurume University School of Medicine, Kurume

2) Blood Transfusion Service, Kurume University School of Medicine, Kurume

3) International Reagents Corporation, Kobe

Monoclonal antibodies specific to human group A red blood cells (A-116, A-251 and A-361) and group B red cells (B-218, B-299 and B-361) were obtained through murine hybridomas. Three of these monoclonal antibodies, A-251, B-218 and B-361, were used for the present analysis. This study aimed for further immunological characterization whether the Matuhasi-Ogata phenomenon is truly exist and if it is true event in immunological basis.

The analysis was carried out by absorption and elution of the mixture of monoclonal anti-A and anti-B antibodies with human group A group B red blood cells. The resulting antibody activity was measured by saline and papain methods. The phenomenon was also studied using sera from group O, and the mixture of group A and group B sera from healthy donors. A commercial blood typing anti-A and anti-B and commercially obtained monoclonal anti-A antibodies were simultaneously used for a comparative study.

In absorption experiment, the mixture of monoclonal anti-A and anti-B antibodies was markedly absorbed by the red blood cells processing corresponding antigen without affecting the titer for reciprocal red cells, respectively. In group O serum, the absorption with group A red cells markedly abolished the titer against group A red cells, while anti-B was also moderately reduced. A similar but reciprocal phenomenon was observed when the serum was absorbed by group B red cells. In the case of the mixture of group A and group B normal sera the mixture of commercial anti-A and anti-B sera, absorption of antibody with red cells was type specific.

In elution experiment, only corresponding antibody was recovered from the red cells after mixing with the monoclonal anti-A and anti-B mixed antibodies, respectively. No cross reaction with red cells was observed, while the eluates from group A and group B red cells absorbed group O serum agglutinated both A and B red cells. However, the eluates from the mixture of group A and group B normal sera agglutinated only corresponding red cells, respectively, and no cross reaction with both red cells was observed. Furthermore, the eluates from the mixture of commercial anti-A and anti-B sera also showed type specific agglutination, respectively, and no cross reaction with both red cells was observed.

From these results, it is suggested that non-specific adhesion of antibody molecules to antigen-antibody complex known as Matuhasi-Ogata phenomenon was not confirmed when the mixture of monoclonal and normal anti-A and anti-B antibodies, and the phenomenon was only observed when group O serum was used. The phenomenon was therefore implicated due to the presence of cross-reactive antibody only in group O serum reactive with a nature of chemical structures of group A and

group B antigens on the red cells.

It was clarified by the present investigation that Matsuhasi-Ogata phenomenon seems to be a false phenomenon presented by non-specific adhesion of serum proteins to the membrane when red blood cells were used in the experiment after a day for storage. No Matsuhasi-Ogata phenomenon was observed when the mixture of both type-specific antibodies was used for fresh group A or group B red cells.

序 言

Matuhasi-Ogata phenomenon^{1)~4)}は、O型血清（抗Aおよび抗B抗体を含む）でみられる現象が、A型血清（抗B抗体）とB型血清（抗A抗体）との混合（抗A+抗B）血清でもみられることをいう。すなわち、O型血清にA型赤血球を反応させると、抗A抗体の力価が著明に低下するとともに抗B抗体も吸収される。同様な現象がB型赤血球を加えると抗B抗体価が著減すると同時に抗A抗体価も低下する。また、O型血清で凝集した赤血球から抗体分子を解離した上清には、吸収に用いた赤血球の血清型に応じて解離抗体が証明されるが、対立する血液型をもつ赤血球とも反応する。すなわち、O型血清で凝集したA型血清からは抗A抗体が解離されるが、抗B抗体もいくらか解離してくる。B型血球を用いたときは、反対に、抗B抗体が解離されるが、同時に、いくらか抗A抗体も解離される。しかし、Matuhasi-Ogataは、A型とB型の血清を混合して人工的にO型様の血清を作製して同様の実験を行っても同じような現象がみられると報告している。

このような現象については、これまでにいくつかの解釈がなされている^{5)~10)}。そのなかでも、この現象は、IgGが赤血球膜上に非特異的に吸着される結果という考え⁷⁾、あるいは、補体を結合した赤血球は、その赤血球膜上に存在しない抗原に対する抗体を非特異的に吸着するという単に蛋白と蛋白の結合が関与しているのではないかという考え⁸⁾などがある。

近年、細胞融合法のテクノロジーが開発され、各種の血球ならびに癌細胞の膜抗原に対するモノクローナル抗体が作製され^{11)~25)}、細胞の由来や分類、細胞の分化度の決定や抗原の解析^{26)~29)}などに広く応用されるようになった。

そこで、われわれは、ABO式血液型に対するモ

ノクローナル抗体を作製することにより、これらモノクローナル抗体を用いて Matuhasi-Ogata phenomenon を解析したので報告する。

材料と方法

1. モノクローナル抗体の作製

1) 免疫原

末梢静脈から採血したA型、B型およびO型のヒト赤血球をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）でそれぞれ4回洗浄した後、0.1%トリプシン（Difco社、Ditroit, MI, U.S.A.）および0.01% EDTAを含むPBS（5ml）を各赤血球のペレット（0.2ml）に加え血球を再浮遊してから、37℃で2時間インキュベイトした。ついで、各赤血球をPBSで4回洗浄した後、PBSで1%血球浮遊液に調製し、免疫原とした。

2) 免疫法

トリプシンで処理した各赤血球の1%PBS浮遊液を等量ずつ混合し、1mlずつ3匹のBALB/cマウスの尾静脈より1週間の間隔で4回免疫した。

3) 細胞融合法

最終免疫から4日目にBALB/cマウスの摘脾を行ない、RPMI-1640培養液中で脾細胞の浮遊液を作製した。ついで、脾細胞をRPMI-1640培養液で4回洗浄後、細胞数を算定した。

細胞融合には、2-amino-6-oxy-8-azapurine（8-Azaguanine, Calbiochem社、La Jolla, CA, U.S.A.）耐性のBALB/cマウス骨髓腫由来培養細胞株（P3-X63-Ag⁸³⁰、以後X63細胞と省略する）を親細胞として用いた。

X63細胞は非働化したfetal calf serum（FCS）5%を含むRPMI-1640培養液（20μg/ml, 8-Azaguanine含有）で継代培養し、対数増殖期のX63細胞をRPMI-1640培養液で3回洗浄した後、細胞数を算定した。

細胞融合は、ポリエチレングリコール³¹⁾ (Polyethylenglycol-4000, Sigma 社, St. Louis, MO, U.S.A.) を RPMI-1640 培養液に 50 (w/v)% 濃度となるよう溶解して使用した。

脾細胞と X63 細胞の比が 10:1 となるように混合し、1,500rpm, 5 分間遠心後、上清を除去し、細胞のペレットをよくほぐし、ポリエチレングリコールを用いて、Köhler と Milstein^{30)~32)} の方法に準じて細胞融合を行った。その後、脾細胞が 4×10^6 個/ml となるように、HAT 選択培地³³⁾³⁴⁾ (10% の FCS を添加した RPMI-1640 培養液に 1×10^{-4} M hypoxanthine, (Sigma 社), 4×10^{-7} M aminopterin (ICN Pharmaceutical 社) および 1.6×10^{-5} M thymidine (Sigma 社) を含有) に浮遊した。ついで、細胞浮遊液の 100 μ l ずつを 96well マイクロテストプレート (Falcon 社) の各 well に分注した後、CO₂ incubator (37°C, humified, 5% CO₂ atmosphere) 内で培養を行った。

2. モノクローナル抗体産生株 (hybridoma) の樹立

1) スクリーニング

培養開始後、7 日目より細胞のクローンが出現してきた。抗体産生の有無を確認するため、hybridoma の培養上清を用いて、A 型、B 型、O 型および AB 型の各赤血球に対する凝集活性のスクリーニングテストを行った。テストは培養上清を 0.1% アジ化ナトリウムを含む PBS で約 2 倍に希釈した後、この培養上清 30 μ l と各赤血球 1% 浮遊液 30 μ l を試験管 (Pyrex culture tube) に入れて混合し、室温に 30 分間放置した後、SERO-FUGE Centrifuge II で 30 秒間遠心してから血球凝集の有無を検べた。

2) クローニング

目的のクローン細胞を限界希釈法によって HT 培養液で 2×10 個/ml に調整し、この細胞浮遊液を 96well マイクロテストプレートの各 well に 50 μ l ずつ分注し、CO₂ 培養器で培養した。同時に BALB/c マウス胸腺細胞を HT 培養液で 1×10^7 個/ml に調整し、これを feeder cell として各 well に 100 μ l ずつ加えた。採取した単一クローン細胞についてクローニングを 3 回くり返した。

3) モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラス の決定

Ouchterlony の寒天内二重拡散法³⁵⁾を用いて免疫グロブリンのサブクラスを検定した。Hybridoma 培養上清をセルロース透析チューブに入れて、減圧限外濾過法を用い、約 5 倍に濃縮した後、ヤギ抗マウス IgG₁, IgG₂, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgA および IgM (Meloy 社, Springfield, VA, U. S.A.) と寒天内で反応させた。

4) モノクローナル抗体の力価の検定

高濃度のモノクローナル抗体を得るため、PBS に浮遊させた 1×10^7 個/ml の hybridoma 細胞を、あらかじめ pristane (和光純薬) で処理した BALB/c マウスの腹腔内へ注射し、7~14 日後に腹水を回収した。採取した腹水を生理食塩水で 2 倍連続希釈系列を作製し、A, B, O および AB 型の各赤血球の 1% 浮遊液を加えて凝集反応を観察した。同時に、培養上清中の抗体価を検定した。

5) モノクローナル抗体の酵素処理赤血球に対する反応性の検討

a) ブロメリン法⁸⁾: 各種 ABO 血液型赤血球の 1% 浮遊液 1 滴、モノクローナル抗体の 2 倍連続希釈系列 1 滴、および 0.1% ブロメリン (片山化学) を含む PBS (1/15M リン酸ナトリウム, 0.85% 塩化ナトリウム, pH 5.5) 1 滴をホールガラス上で混合し、室温で 15 分間反応させ凝集を判定した。

b) パパイン法: A 型、B 型および O 型洗浄赤血球ペレットと 0.1% パパインを含む PBS を 1:2 の割合で混合し、37°C, 30 分間インキュベートした後、PBS で 3 回洗浄し、血球浮遊液を 1% となるよう調整した。次に 2-1) と同様の手技によりモノクローナル抗体との血球凝集反応を検べた。

6) パネルセルおよび O 型ヒト臍帯赤血球との反応

パネルセル (DADE 社, Miami, FL, U.S.A.) およびコードセル DEAE 社) を用いて、モノクローナル抗体との凝集反応を 2-1) と同様の手技で検べた。

7) ヒトの A 型および B 型物質の分泌型唾液を用いたモノクローナル抗体の血球凝集阻止試験

A型およびB型の分泌型唾液をそれぞれ1時間煮沸した後、3,000rpmで10分間遠心し、上清を採取した。この上清1滴と力価を1:64に調整したモノクローナル抗体腹水1滴を混合し、室温に1時間置いてからA型およびB型赤血球の2%浮遊液1滴を加えて混合した。CERO-FUGE II centrifugeで30秒間遠心した後、血球の凝集を検べた。

3. 呼吸ならびに解離試験

1) 血清: 健常人A型, B型およびO型(各グループ20名分) 血清は、久留米大学医学部付属病院輸血部より入手し、それぞれ等量に混合した。

ヒト由来の市販血液型判定用血清(抗Aおよび抗B血清)はDADE社より入手した。

市販モノクローナル抗体としての抗A抗体(Sera-Clone)は大日本製薬より入手した。

今回作製したモノクローナル抗体は、抗Aおよび抗B抗体の腹水を用いた。

2) 赤血球: A型, B型およびO型赤血球を輸血部より入手し、それぞれ20名分を等量混合して用いた。各赤血球は、PBSで4回洗浄した後、37℃に加温したPBSで30分間37℃でインキュベートし、加温PBSで4回洗浄して、吸収解離試験および凝集判定用の標示赤血球とした。また、教室の研究者から4名のA型、3名のB型および2名のO型よりヘパリン加真空採血管で静脈血を採取し、各グループの血液をそれぞれ混合した後、上記と同様の手技で洗浄し、新鮮血球として用いた。

3) 吸収および解離試験⁸⁾

3-1) で得た健常人A型およびB型の血清を等量ずつ混合し、健常人混合血清とした。市販血液型判定用抗Aおよび抗B血清を等量ずつ混合し、判定用抗血清混合液とした。今回作製した抗Aおよび抗Bモノクローナル抗体腹水を1%BSAを含むPBSで希釈し、力価を128および2,048に調整した後混合し、モノクローナル抗体混合液とした。また、市販のモノクローナル抗A抗体は、今回作製したモノクローナル抗B抗体(B-218)と混合して用いた。

O型血清、健常人混合血清、判定用抗血清混合液およびモノクローナル抗体混合液をそれぞれ1

mlとA型、B型およびO型赤血球ペレット1mlをそれぞれ混合し、室温で1時間反応させた後、3,000rpmで10分間遠心し、赤血球凝集塊と上清を得た。上清は、抗Aおよび抗B抗体の力価の検定に、また、赤血球凝集塊は、さらにPBSで5回以上洗浄し、その上清中に抗体活性が検出されないことを確認した。最終洗浄の後、上清を完全に除去し、各赤血球ペレットに対し、1mlのPBSを加え、ときどき試験管を軽く振りながら、56℃で10分間インキュベートした後、あらかじめ56℃に加温しておいた遠心用バケットに入れ、3,000rpmで4分間遠心した。遠心後、直ちに赤血球が混入しない様に上清を回収し、その溶液に含まれる抗Aおよび抗B抗体の力価を検定した。O型赤血球は対照として用いた。

4) 血球凝集および力価の検定

各段階における抗体価の測定は、それぞれの試料の2倍連続希釈系列を作製し、その40 μ lとA型およびB型赤血球の2%PBS浮遊液の40 μ lを混合し凝集反応で検討した。さらに、2-6)-b)と同様の手技で、パバインで処理したA型およびB型赤血球の2%浮遊液との凝集反応で検定した。凝集反応は、室温で1時間静置した後、Cerofuge II Centrifugeで30秒間遠心してから判定した。また、抗体価の検定は、各試料の2倍連続希釈系列の作製にあたって、抗体のcarry overに注意した。

実験成績

1. モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

96well マイクロテストプレートの計576wellのうち372wellにハイブリドーマを認めた。このうち抗A抗体を産生する3種類のHybridoma(A-116, A-251およびA-301)と3種類の抗B抗体を産生するHybridoma(B-218, B-299およびB-361)が得られた。これらのHybridomaについて、3回の限界希釈法によるクローニングを繰り返した後、安定したモノクローナル抗体産生Hybridomaを得た。これらのうち、A-251, B-218およびB-361について分析した。モノクローナル抗体A-251, B-218およびB-361の免疫グロブリン

Table 1 Agglutinating titer of monoclonal antibodies against group A, B and O red blood cells by saline and bromelin methods on whole glass

Sera or monoclonal antibodies		A cells		B cells		O cells	
		Saline	Bromelin	Saline	Bromelin	Saline	Bromelin
Normal serum	Group A	0	0	64	64	0	0
	Group B	64	64	0	0	0	0
Antiserum	Anti-A	256	512	0	0	0	0
	Anti-B	0	0	256	512	0	0
MoAb A-251	Supernatant	8	32	0	0	0	0
	Ascites	2,048	8,192	0	0	0	0
MoAb B-218	Supernatant	0	0	—	—	0	0
	Ascites	0	—	32,768	131,072	0	—
MoAb B-361	Supernatant	0	0	64	128	0	0
	Ascites	0	1w	4,096	16,384	0	0
Ulex europaeus	Anti-H	128	2,048	128	512	256	4,096

— : not tested

のクラスの検査では、すべてIgMであった。

2. モノクローナル抗体の力価

モノクローナル抗体 A-251腹水は、A型赤血球に対して2,048倍の力価を示し、B型およびO型赤血球とは反応しなかった。また、パバイン処理のB型およびO型赤血球とも反応しなかった。またB-218およびB-361はB型赤血球に対してそれぞれ32,768倍および4,096倍の力価を示したが、パバイン処理したA型およびO型赤血球に対しては弱い凝集が認められた (Table 1)。

3. モノクローナル抗体とパネルセルおよびヒト臍帯血球との反応性

Rh, MNSs, Lewis, Lutheran, Kell, Duffy, Kidd および Xg^a抗原をもつO型赤血球およびO型ヒト臍帯血球に対してA-251, B-218およびB-361腹水は、いずれも全く凝集活性は認められなかった。

4) モノクローナル抗体の唾液による凝集阻止試験

A-251腹水のA型赤血球に対する凝集活性は、分泌型ヒトA型唾液により阻止されたが、分泌型ヒトB型唾液によっては全く阻止されなかった。また、B-218およびB-361腹水のB型赤血球に対する凝集活性は、分泌型ヒトB型唾液によって完全に阻止されたが、A型唾液によっては全く阻止されなかった。

5. 吸収解離試験

a) O型血清をA型またはB型赤血球で吸収すると、血清中の抗原に対応する抗A抗体または抗B抗体の力価が1:1～1:2まで低下した。同時に抗原と対応しない抗B抗体または抗A抗体の力価も減少した (Table 2)。また、O型血清で感作されたA型またはB型赤血球凝集塊からの抗体解離液は、それぞれA型およびB型赤血球といずれも反応した (Table 3)。

b) 健常人A型およびB型混合血清をA型またはB型赤血球と反応させると、血清中の抗Aおよび抗B抗体の力価が低下した (Table 2)。しかし、これらの赤血球からの解離液は、吸収に用いた血液型の赤血球とのみ凝集反応と示した。しかし、解離液中の力価は低値であった (Table 3)。

c) 判定用抗血清混合液をA型赤血球と反応させると抗A抗体の力価のみが低下し、抗B抗体の低下は認められなかった。また、この赤血球の凝集塊からの解離液はA型赤血球のみ凝集した。同様に、この抗血清混合液をB型赤血球と反応させると抗B抗体の力価のみ低下したが、抗A抗体の力価の低下は認められなかった (Table 2)。またこの赤血球の凝集塊からの解離液はB型の赤血球のみを凝集した (Table 3)。

d) 抗Aおよび抗Bモノクローナル抗体混合液とA型赤血球とを反応させると、抗A抗体の力価のみ低下し、抗B抗体の力価は低下しなかった。また、この赤血球の凝集塊からの解離液はA型の

Table 2 Agglutinating activity after absorption with group A, B and O red blood cells by saline methods

		Original		Absorbed with O cells		Absorbed with A cells		Absorbed with B cells	
Methods		Saline		Saline		Saline		Saline	
Sera or MoAbs	Test cells	A	B	A	B	A	B	A	B
Group O sera		256	256	256	256	1	128	128	2
Normal sera		32	16	32	16	0	16	32	0
Anti-A+Anti-B									
Antisera		128	128	128	128	2	128	128	1
Anti-A+Anti-B									
Monoclonal antibodies									
I		128	64	128	64	0	64	128	0
II		256	256	256	256	8	256	256	0
A-251+B-361	III	128	512	128	512	0	512	128	0
IV		128	1,024	128	1,024	0	1,024	128	0
V		128	2,048	128	2,048	0	2,048	128	0
I		128	32	128	64	0	64	128	0
II		256	256	256	256	2	256	128	0
A-251+B-218	III	128	512	128	512	0	512	128	0
IV		128	1,024	128	1,024	0	1,024	128	0
V		128	1,024	128	1,024	0	1,024	128	0
Commercial anti-A MoAb		—	—	512	1,024	1	2,048	512	1
Anti-A+B-218									

— : not tested
I ~ V : Represents five different individual red cells used for agglutination tests.

Table 3 Agglutinating activity of eluates from group A and B red blood cells by saline and papain methods

Treatment		Eluates from A cells				Eluates from B cells			
Methods		Saline		Papain		Saline		Papain	
Sera or MoAbs	Test cells	A	B	A	B	A	B	A	B
Group O sera		8	2	32	16	4	8	32	64
Normal sera		2	0	16	0	0	1	0	2
Anti-A+Anti-B									
Antisera		8	0	32	0	0	2	0	8
Anti-A+Anti-B									
Monoclonal antibodies									
I		0	0	2	0	0	0	0	0
II		32	0	256	0	0	0	0	2
A-251+B-361	III	2	0	16	0	0	0	0	2
IV		8	0	32	0	0	2	0	16
V		8	0	32	0	0	2	0	16
I		0	0	1	0	0	0	0	0
II		32	0	128	0	0	0	0	2
A-251+B-218	III	2	0	16	0	0	1	0	4
IV		8	0	64	0	0	1	0	8
V		4	0	32	0	0	2	0	8
Commercial anti-A MoAb		2	0	8	0	0	2	0	8
Anti-A+B-218									

— : not tested
I ~ V : Represents five different individual red cells used for agglutination tests.

赤血球のみを凝集した。同じように、モノクローナル抗体の混合液とB型赤血球とを反応させると、抗B抗体の力価のみが低下したが抗A抗体の力価には影響しなかった。また、この赤血球の凝集塊からの解離液は、B型赤血球のみを凝集した。さらに、このモノクローナル抗体の混合液の抗体価を高めて赤血球と反応させて抗体を解離しても、赤血球からの解離液は、吸収に用いた血液型の赤血球以外とは反応しなかった (Table 2および3)。しかし、モノクローナルの抗A抗体の力価を1:256以上にして赤血球と反応させた場合、赤血球の凝集塊が洗浄してもほぐれず、テストに不適当であった。

e) 市販モノクローナル抗A抗体とモノクローナル抗体 B-218との混合液を用いて、同様の方法で吸収および解離試験を行った結果、吸収に用いた血液型の赤血球に対してのみ抗体価が低下した (Table 2)。また、これらの赤血球の凝集塊からの抗体解離液は、A型およびB型赤血球とは交差反応を示さなかった (Table 3)。

f) a)~e)の実験で、O型赤血球を用いて吸収および解離試験を行なっても、各抗体価の低下は認められなかった (Table 2)。

考 察

マウス hybridoma システムを用いて、ヒト ABO 式血液型抗原を識別する抗 A (A-251) および抗 B (B-218および B-361) モノクローナル抗体を産生する融合細胞株を樹立した。これらのモノクローナル抗体の各種血液型赤血球、パネルセルおよびO型ヒト臍帯血に対する凝集反応の特異性、さらに分泌型ヒト唾液による凝集阻止試験の結果より、A-251はA型赤血球膜表面上のA型抗原を、また、B-218および B-361は、B型赤血球膜表面上のB型抗原をそれぞれ特異的に識別するモノクローナル抗体であった。

これらの作製した抗Aおよび抗Bモノクローナル抗体を混合し、A型赤血球(またはB型赤血球)と反応させ、抗A抗体とA型赤血球(または、抗B抗体とB型赤血球)との抗原抗体複合体を作製し、この凝集塊に抗B抗体(または、抗A抗体)が非特異的に吸着されるかどうかを検討した。そ

の結果、この凝集塊から熱解離法による抗体解離液中には、凝集反応で検出される感度では、非特異的な抗B抗体(または、抗A抗体)は検出されなかった。また、市販モノクローナル抗体を用いても同様の結果が得られた。

松橋ら¹¹⁻¹⁴⁾は、ヒトA型およびB型血清の混合液とA型またはB型赤血球を反応させ、それらの赤血球からの抗体解離液が、A型およびB型いずれの赤血球とも反応することを凝集反応のレベルで観察している。

O型の血清中には、A型およびB型赤血球と交差反応する抗体が存在することは、すでに吸収および解離試験の結果から報告されている^{5)36)~38)}。この交差反応性の抗体について、1) Wiener と Wexle³⁹⁾は、第三の抗体分子として抗C抗体の存在を提唱したが、A型およびB型の可溶性血液型物質によって、その抗体活性が阻止されることから適切でないとされた。2) Dodd ら⁹⁾は、“hybrid 抗体”の存在を考えたが、抗体産生細胞の免疫グロブリン合成機構より、この種の抗体産生については現在のところ証明されていない。3) Kabat⁴⁰⁾および Dodd ら⁹⁾は、A型およびB型抗原分子の化学構造上には基本的に類似性があり、末梢糖鎖の差によって特異性が決定されるため交差反応が起ると証明した。さらに、4) 吸収および解離操作の過程で抗体が変性することによる結果⁵⁾⁶⁾などが考えられている。

Yokoyama と Fudenberg³⁷⁾は、O型ヒト血清を用いて、A型およびB型赤血球より抗体解離液を作製し、交差反応性の抗体について検討し、抗体解離液中には、抗原抗体複合体に別の抗体が吸着された結果とする説には反論をとらえている。

Bove ら⁷⁾は、¹²⁵I 標識 IgG 抗体を用いて、Matuhasi-Ogata phenomenon について検討した。その結果、感作赤血球と非感作赤血球との間では、これら赤血球膜上に存在しない抗原に対する¹²⁵I 標識 IgG 抗体量には、有意な差が認められていない。すなわち、赤血球膜上には、特定の抗原に非特異的な免疫グロブリン分子が吸着されないことを証明した。以上のことから、O型血清中には、交差反応性の抗体が存在することが強く示唆さ

れ、これを裏付ける事実として、われわれや Bundle ら¹⁷⁾によっても、A型赤血球と交差反応する抗Bモノクローナル抗体が得られている。このことから Kabat⁴⁰⁾が指摘するように、A型およびB型抗原分子の化学構造上の類似性により、それらの抗原分子をいずれも認識する抗体がO型血清中に存在し、A型またはB型赤血球に対する抗体価の違いは、それぞれの抗原に対する抗体の affinity の差に由来するものと考えられる。

もし、Matuhasi-Ogata phenomenon が正しいとすれば、A型およびB型血清混合液と反応させたA型またはB型赤血球からの抗体解離液中に観察される現象が、モノクローナル抗体によっても同様に観察されねばならない。しかし、今回の実験の結果が示したように、この現象は認められなかった。ただし、O型血清で観察される現象は、1) A型およびB型抗原分子の化学構造上の類似性によるための抗体の交差反応、2) 赤血球膜上に抗体分子が付着した結果として、抗体解離液中に他の特異性をもつ抗体が検出されたため、さらに、3) 抗体解離液の作製過程での抗体分子の変性などが考えられているが、O型血清中の抗体の交差反応性の結果であるという考えが妥当であるように思われた。

む す び

ABO 式血液型抗原を認識する抗 A (A-116, A-251 および A-301) および抗 B (B-218, B-299 および B-361) モノクローナル抗体をマウス hybridoma システムを用いて作製した。これらのモノクローナル抗体を用いて Matuhasi-Ogata phenomenon を抗体の吸収および解離試験によって解析した。同時に、ヒト O 型、A 型および B 型の正常人血清ならびに市販の血液型判定用血清を用いて同様に解析した。

その結果、O 型血清では、Matuhasi-Ogata phenomenon が観察されたがモノクローナル抗 A および抗 B 混合液、A 型および B 型混合血清および市販の血液型判定用抗 A および抗 B 血清混合液では、その現象が認められなかった。このことより、O 型血清中に存在する抗体分子は化学的に類似した構造をもつ A 型および B 型抗原分子に対する交

差反応によるものであることが示唆された。

謝辞 本研究に際して、貴重な胎児ウシ血清を提供していただいた Mr. Robert S. Milligan 氏 (General Scientific Laboratories), また、ハイブリドーマ法を指導して下さった本学免疫学教室の松尾良信先生に感謝致します。

本研究は、昭和60年度の文部省科学研究費 (一般 C 60570282) により行なわれた。

文 献

- 1) 松橋 直: 血清学からみた血漿蛋白。とくに抗体の所在。Proc. 15th. Gen. Assembly Jap. Med. Congr. Tokyo, 1959, 4: 80—87, 1959.
- 2) 松橋 直, 熊沢 博, 白井美津子: 所謂交差反応性抗体についての疑義。日本輸血学会雑誌, 6(6): 295—297, 1960.
- 3) Ogata, T. and Matuhasi, T.: Problems of specific and cross reactivity of blood group antibodies. Proc. 8th Congr. Int. Soc. Blood Transf. Tokyo, 1960: 208—211, 1962.
- 4) Ogata, T. and Matuhasi, T.: Further observation on the problems of specific and cross reactivity of blood group antibodies. Proc. 9th Congr. Int. Soc. Blood Transf. Mexico, 1962: 528—531, 1964.
- 5) Dodd, B.E., Lincoln, P.J. and Boorman, K.E.: The cross-reacting antibodies of group O sera: Immunological studies and possible explanation of the observed facts. Immunology, 12: 39—52, 1967.
- 6) Dodd, B.E. and Lincoln, P.J.: The effect of elution on the reactivity of antibodies of the ABO system, including cross-reacting antibodies, as demonstrated by use of red cells of various subgroups of A, and group B. British J. haematology, 26: 93—104, 1974.
- 7) Bove, J.R., Holburn, A.M. and Mollison, P.L.: Non-specific binding of IgG to antibody-coated red cells (The Matuhashi-Ogata Phenomenon). Immunology, 25: 793—801, 1973.
- 8) Issitt, P.D. and Issitt, C.H.: 'Applied blood group serology'. 2nd edition, Spectra Biologicals, Division of Becton, Dickinson and Company, Calif, 1957.
- 9) Allen, F.H.J., Issitt, P.D., Degnan, T.J., Jackson, V.A., Reinhart, J.K., Knowlin, R.J. and Adebahr, M.E.: Further observation on the matuhashi-Ogata phenomenon. Vox Sang., 16: 47—56, 1969.
- 10) Svardal, J.M., Yarboro, J. and Yunis, E.J.: Ogata phenomenon explaining the autogenous anti-I. Vox Sang., 13: 427—484, 1967.
- 11) Branstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G.,

- Galfre, G., Milstein, C., Willisms, A.F. and Ziegler, A.: Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes. HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell*, 14: 9-20, 1978.
- 12) Tucker, E.M., Wright, L.J. and Varden, S.E.: Monoclonal antibodies to blood group antigens on ruminant red cells. *Immunology Letters*, 3: 121-123, 1981.
 - 13) Edelman, L., Rouger, P., Loinel, C., Garchon, H., Bach, J.F., Reviron, J. and Salmon, C.: Thermodynamic and immunological properties of a monoclonal antibody to human blood A. *Immunology*, 44: 549-554, 1981.
 - 14) Majdic, O., Knapp, W., Vetterlein, M., Mayr, W.R. and Speiser, P.: Hybridomas secreting monoclonal antibodies to human group A erythrocytes. *Immunobiology*, 156: 226-227, 1979.
 - 15) Voak, D., Sacks, S., Alderson, T., Takei, F., Lennox, E., Jarvis, J., Milstein, C. and Darnborough, J.: Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma evaluation as a blood grouping reagent. *Vox Sang.*, 39: 134-140, 1980.
 - 16) Abe, K., Levery, S.B. and Hakomori, S.: The antibody specific to type 1 chain blood group A determinant. *J. Immunol.*, 132(4): 1951-1955, 1984.
 - 17) Bundle, D.R., Gidney, M.A.J., Kassam, N. and Rahman, F.R.: Hybridomas specific for carbohydrates; Synthetic human blood group antigens for the production, selection, and characterization of monoclonal, typing reagents. *J. Immunol.*, 129(2): 678-682, 1982.
 - 18) Rouger, P., Edelman, L., Doinel, C., Reviron, J., Salmon, C. and Bach, J.F.: Study of blood group B antigen with a specific monoclonal antibody (anti-B, b-183). *Immunology*, 49: 77-82, 1983.
 - 19) Sacks, S.H. and Lennox, E.S.: Monoclonal anti-B as a new blood-typing reagent. *Vox Sang.*, 40: 99-104, 1984.
 - 20) Young, W.W.J., Johnson, H.S., Tamura, Y., Karlsson, K.A., Larson, G., Parker, J.M.R., Khore, D.P., Spohr, U., Baker, D.A., Hindsgau, O. and Lemieux, R.V.: Characterization of monoclonal antibodies specific for the lewis a human blood group determinant. *J. Biol. Chem.*, 258(8): 4890-4894, 1983.
 - 21) Brockhause, M., Magnan, J.L., Blaszyk, M., Steplewski, Z., Koprowski, H., Karlsson, K.A., Larson, G. and Ginsburg, V.: Monoclonal antibodies directed against the human Le blood group. *J. Biological Chemistry*, 256(24): 13223-13225, 1981.
 - 22) Doinel, C., Edelman, L., Rouger, P., Leblanc, J., Pevron, J., Bach, J.F. and Salmon, C.: A murine monoclonal antibody against blood group H type-1 and type-2 structures. *Immunology*, 50(2): 215-221, 1983.
 - 23) Edwards, P.A.W.: Monoclonal antibodies that bind to the human erythrocyte-membrane glycoproteins glycophorin A and band 3. *Biochemical society Transactions*. 587th Meeting, Dundee, 8: 334-335, 1980.
 - 24) Bigbee, W.L., Vanderlaan, M., Fong, S.S. and Jensen, R.: Monoclonal antibodies specific for the M-and N-forms of human glycophorin A. *Mol. Immunol.*, 20(12): 1353-1362, 1983.
 - 25) Telen, M.J., Palker, T.J. and Haynes, B.F.: Human erythrocyte antigens: II. The In(Lu) gene regulates expression of and antigen on and 80-kilo-dalton protein of human erythrocytes. *Blood*, 64(3): 599-606, 1984.
 - 26) Herlyn, M., Shen, J.W., Sears, H.F., Civin, C.I., Verril, H.L., Goldberg, E.M. and Koprowski, H.: Detection of a circulating gastrointestinal cancer antigen in sera of patients with gastrointestinal malignancies by a double determinant immunoassay with monoclonal antibodies against human blood group determinant. *Clin. Exp. Immunol.*, 55: 23-35, 1984.
 - 27) Clifford, M.C., Ernst, P.A., Karl, H.P. and Geroge, R.P.J.: Use of monoclonal antibodies for the localization of tissue isoantigens A and B in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *J. Histochem. Cytochem.*, 31(5): 557-561, 1983.
 - 28) Finan, J., Derk, G.D.W., Lennox, E.S., Stephen, J.S. and Bleehe, N.M.: Human blood group isoantigen expression on normal and malignant gastric epithelium studied with anti-A and anti-B monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 70(4): 679-682, 1983.
 - 29) Hansson, G., Larsson, K.A., Larson, G., Mckibbin, J.M., Blaszczyk, M., Herlyn, M., Steplewski, Z. and Koprowski, H.: Mouse monoclonal antibodies against human cancer cell lines with specificities for blood group and related antigens. *J. Biological Chemistry*, 258(7): 4091-4097, 1983.
 - 30) Kohler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497,

- 1975.
- 31) O'Malley, K.A. and Davidson, R.L.: A new dimension in suspension fusion techniques with polyethylen glycol. *Somatic Cell Genetics*, 3: 441—448, 1977.
 - 32) Kohler, G. and Milstein, C.: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.*, 6: 511—519, 1976.
 - 33) Kohler, G., Howe, S.C. and Milstein, C.: Fusion between immunoglobulin secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur. J. Immunol.*, 6: 292—295, 1976.
 - 34) Littlefield, J.W.: Selection of hybrid from matigens of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science*, 145: 709—710, 1964.
 - 35) Ouchterlony, O.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog. Allerg*, 5: 1—78, 1958.
 - 36) Owen, R.D.: Heterogeneity of antibodies to the human blood groups in normal and immune sera. *J. Immunol.*, 73: 29—39, 1954.
 - 37) Yokoyama, M. and Funderberg, H.H.: Studies on "cross-reacting" isoagglutinins. *J. Immunol.*, 92(6): 966—976, 1964.
 - 38) Richardson, J.A., Kaneb, L. and Abrahamov, A.: A technique for the titration of "cross-reacting antibody" in group O serum. *J. Lab. Clin. Med.*, 54(5): 779—783, 1959.
 - 39) Wiener, A.S. and Wexler, I.B.: The mosaic structure of red blood cell agglutinogens. *Bact. Rev.*, 16: 69—87, 1952.
 - 40) Kabat, E.A.: Blood group substances. Their chemistry and immunochemistry. Academic Press, New York, 1956.
-