イヌ歯肉に対するモノクローナル抗体の作製と 対応抗原の各種組織における局在性

和田 聖 二

大阪歯科大学口腔病理学教室（主任：筒井正弘教授）

〔受付：昭和61年5月23日〕

Preparation and application of monoclonal antibodies against dog gingiva.

Seiji Wada

*Department of Oral Pathology, Osaka Dental University,
1-47, Kyobashi, Higashiku, Osaka 540*

(Chief: Masahiro Tsutsui)

[Accepted for publication: May 23, 1986]

Key words: Monoclonal antibody / dog / gingiva

Abstract: Preparation of monoclonal antibodies against dog gingiva.

As part of immunohistochemical studies of periodontal disease, we have been producing monoclonal antibodies related to the oral region for several years. The aim of the present investigation was to produce and characterize monoclonal antibodies to dog gingiva. The results were as follows:

1) Spleen cells from Balb/c mice immunized with dog gingival epithelial cells and myeloma cells were fused and followed by HAT selection. Fusion of Balb/c splenocytes immunized with the epithelial cells resulted in 236 hybridomas. The incidence of hybrid formation was 236/348. Out of these 236 clones, 46 hybridomas produced immunoglobulins. Of them 23 hybridomas produced antibodies being reactive with the frozen section of the dog gingiva.

2) Two monoclonal antibodies, MoAb D1 (IgM) and D2 (IgM) were finally established. MoAb D1 reacted with the cell membrane of epithelial cells of dog gingiva and MoAb D2 reacted with the cytoplasm of the cells. Both reacted with the capillaries in connective tissue. The epithelial tissue of other oral regions, such as lip, cheek, hard palate, tongue showed the pattern of reaction similar to that of gingiva. Furthermore, MoAb D1 reacted with the membrane parts of the surface epithelium of stomach, the sinusoidal capillary and Bowman's capsule, whereas MoAb D2 reacted with the cytoplasm of surface epithelium and parietal cells of stomach, hepatocytes, distal tubule and the thick ascending limb. However, these two antibodies did not react with human and monkey gingiva.

3) Proteolytic digestion using pepsin and trypsin did not reduce the reactivity of the epithelium with the MoAb D1, but trypsin treatment abolished the reactivity of the capillaries with MoAb D2.

4) Data from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting showed that MoAb D1 recognized an antigenic protein of 50 K dalton.

5) These two monoclonal antibodies will be available for studying pathological changes in periodontal tissues.

緒 言

1975年, Köhler と Milstein¹⁾によって発表され

大阪市東区京橋 1-47 (〒540)

たモノクローナルハイブリドーマ抗体の作製は、
医学生物学にとって画期的な技術革新であった。
その特徴としてまず第一に特異的であり煩雑な吸
収テストを必要としないということ、第二にきわ

めて高力価の抗体が得られるということ、第三に半永久的に生産可能であること、第四に抗原の精製を必要としないということなどがあげられる。

これらの特徴を利用した研究はウイルスや各種ホルモンに対する抗体の作製、リンパ球分化抗原の解析、腫瘍抗原の解析など実に広範囲の分野に応用されている。

歯学領域においてもモノクローナル抗体（以下モノクロ抗体と略す）を応用した研究は増加の一途をたどり、またその作製についても、いくつかの生理活性物質や細菌などの報告が出されている。

著者の所属する教室では歯周疾患の免疫組織化学的研究の一環として、口腔領域関連の抗原に対する抗体の作製とその応用研究を行なってきた。最近ではヒト歯肉上皮、サル歯肉上皮、線維芽細胞、コラーゲン、リンパ球などを抗原としてモノクロ抗体の作製を行なっており²⁻⁶⁾、今回、著者はイヌ歯肉上皮に対するモノクロ抗体作製の詳細と、分離した二種のモノクロ抗体(MoAb D1, D2)について、その免疫学的性状およびその対応抗原の組織分布、局在性を検索し興味ある知見を得たので報告する。

実験方法

(1) 抗原材料

雑種成犬をケタラル（三共）で麻酔し口腔内を70%アルコールにて消毒後、上下顎の遊離および付着歯肉を切除し、PBSで2回洗浄後、15% HyClone (Sterile Systems 社) 含有の DMEM (Flow 社) 中で4°C、2時間保存した。0.02% EDTA リン酸緩衝液中で約5mm立方に細切し、10分間浸漬後、更に0.25%トリプシンリン酸緩衝液中で、12~15時間酵素処理を行なった。細切歯肉をトリプシン/EDTA 溶液に移し、鋭利なピンセットで上皮層と固有層とを剥離し⁷⁾、スライドグラス法にて single cell suspension とし、3枚のガーゼで濾過した。この基底細胞、棘細胞、各種扁平細胞からなる細胞浮遊液を1,500r.p.m. 5分間遠心し (Kubota KR 702)、約 3×10^7 個の歯肉上皮細胞を得、これを抗原材料とした。

(2) 免疫

可溶性および不溶性抗原に対して高率にハイブリドーマ形成ができることが明らかとなっている当教室の短期間免疫方法⁸⁾を採用した。即ち上記イヌ歯肉上皮細胞抗原を5週齢の雌性 Balb/c マウス（日本クレア社）の腹腔内に1回あたり 5×10^6 個を一週間おきに3回注入し免疫を行なった。初回免疫は Freund's complete adjuvant と、2回目は incomplete adjuvant と、最終免疫は DMEM 中に浮遊させて行なった。最終免疫3日後にモノクロ抗体作製のため脾臓を摘出する一方、ポリクロ抗体用として心臓より採血し、血清を分離した。いずれの免疫もこの17日間に十分な感作を行なうことができた。

(3) ハイブリドーマの作製

細胞融合は教室で確立された方法⁹⁾により行なった。即ち3匹の感作マウスのうち大きい脾腫を示す2匹を選び、スライドグラス法で脾細胞を得、0.83% NH_4Cl 処理を行なって赤血球を除き、DMEM で数回洗浄し、一匹あたり 10^8 個の脾細胞を得た。細胞融合日までに少なくとも3回の継代を行ない、対数増殖期に調製したグロブリン非分泌性のマウス由来骨髓腫細胞 P3X63Ag8U1 (P3U1) 3×10^7 個を DMEM で洗浄し、上記脾細胞と混合し遠心した。沈渣を40°Cに加温後、45% ポリエチレングリコール 3350 (Sigma 社) 1.2ml を1分間かけてゆっくり加え融合させた。それを8分間反応させ、DMEM で希釈して反応を停止、遠心後沈渣を15% HyClone 含有 DMEM 50ml に浮遊させ、1匹あたり96ウェルプレート (Flow 社) 4枚に0.1ml ずつ分注し、 CO_2 incubator (5% CO_2 , 37°C) で培養し、翌日から HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) selection を行ない、ハイブリドーマの colony の形成を観察した。HAT 培地交換は計5回行ない14日で終了した。その時点でハイブリドーマ形成のウェル数を肉眼的および位相差顕微鏡下で観察し求めた。

(4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

肉眼的観察で明らかに colony の形成が認められたウェルの培養上清を EIA Screening Kit (KPL 社) を使用してスクリーニングし、抗マウ

ス IgG+M (KPL 社) と反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した⁹⁾。すなわちポリ塩化ビニル製U底96ウェルプレート (三光純薬社) に培養上清を50 μ l 滴下し、室温で2時間吸着させた後、1%ウシ血清アルブミン (BSA) PBS 溶液で各ウェルを満たし最低30分放置し、ブロッキングを行なった。洗浄液で数回軽く洗浄し、希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス Ig ヤギ抗体 (KPL 社) を50 μ l、各ウェルに加え、室温で1時間反応させた。さらに洗浄液で5回洗浄後、発色剤基質として H₂O₂-ABTS を50 μ l ずつ各ウェルに加え、室温暗所にて静置、反応させた。判定は肉眼的に青色を呈したウェルを選択し、また光学的には 405 nm の吸光度を測定 (コロナ MTP-12型マイクロプレート光度計, コロナ社) することにより行なった。

(5) 間接免疫ペルオキシダーゼ法

陽性ウェルの培養上清を間接免疫ペルオキシダーゼ法により光学顕微鏡下で検索した。すなわち O.C.T. Compound に包埋したイヌ歯肉を急速凍結させ、cryostat microtome で6 μ m の連続切片を作製し、ゼラチン処理したマルチテストスライド (Flow 社) にのせ、アセトン固定後実験に用いた。通法に従い、一次抗体として各培養上清を添加し湿潤箱に入れ、室温、1時間反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として50倍希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス Ig ヤギ抗体 (KPL 社) を添加し、同様に反応させた。次に発色剤として3, 3'-ジアミノベンチジン 4 塩酸 (DAB) 40mg を PBS 100ml に溶解したものに過酸化水素30 μ l を加えて使用した。切片をこの発色液に入れて室温で2~3分間反応させ、洗浄後、後染色としてヘマトキシリンあるいはメチルグリーンを用い、封入、鏡検した。対照標本には正常マウス血清を500倍希釈したものを一次抗体の代わりに用いた。

このようにして検出されたハイブリドーマを HT 中の限界希釈法¹⁰⁾によりクローニングした。その際単一の colony を形成しているウェルの培養上清を間接免疫ペルオキシダーゼ法で再確認し、さらに正常培地中でもう一度クローニングを行ない、最終的にモノクロー抗体 D1, D2の二種を

分離した。

(6) モノクロー抗体の免疫グロブリンクラスの決定

モノクロー抗体の免疫グロブリンサブクラスはヤギ抗マウス IgA, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM (Serotek 社) を用い、Ouchterlony 二重拡散沈降法により決定した。

(7) 腹水腫瘍化

5週齢の Balb/c マウスの腹腔にプリスタン0.5 ml を投与し、1週間後にハイブリドーマ 1×10^7 個を腹腔内投与した¹¹⁾。腹水が十分貯留してから回収、遠心し、その上清を以下の実験に使用した。

(8) 各培養容器培養上清および腹水腫瘍化の力価の測定

96ウェルプレート、24ウェルプレート (Becton Dickinson 社)、T-25 フラスコ T-75 フラスコ (Becton Dickinson 社) で限界まで培養した培養上清および(7)で得た腹水の上清の力価を二種の方法で求めた。第一は生化学的測定で ELISA 法によるイムノグロブリンの検出限界希釈度を力価とするもの、第二は免疫組織学的測定で間接免疫ペルオキシダーゼ法による免疫組織学的検出限界希釈度を力価とするものである。即ち生化学的には ELISA の項で記載したごとく上清を assay し、発色剤を加えて30分後の 405 nm の吸光度が 0.1を示す希釈度を求め、また免疫組織学的には染色が陰性となる希釈度を求めた。

(9) 抗体の特異性の検討

吸収テストはモノクロー抗体を免疫原である歯肉上皮細胞で吸収した後、間接免疫ペルオキシダーゼ法により確認した。またヒトおよびサル歯肉との交叉性はいずれも歯肉凍結切片をイヌ歯肉凍結切片と同様の方法で2例について染色し、判断した。

(10) 対応抗原の組織局在性

口腔内および他組織の対応抗原の組織局在性を検索するために5例のイヌの口唇、頬粘膜、舌、硬口蓋、食道、胃、小腸、大腸、肝臓、腎臓、腹大動脈、皮膚組織を採取し、凍結切片と10%ホルマリン固定後のパラフィン切片の両方を作製し、間接免疫ペルオキシダーゼ法により染色した。その際脱パラフィン化の後に0.6%過酸化水素水加

メタノール液 (99.5%) で内因性のペルオキシダーゼをブロックした。

(11) 対応抗原の化学的性状の解析

(11)-1 対応抗原の安定性

凍結切片とホルマリン固定後のパラフィン切片について染色性の差異を検討した。また0.02%トリプシン処理や200u/ml ペプシン処理による蛋白消化, 1%過ヨウ素酸酸化, および90°C, 5分の熱処理を行なった。

(11)-2 対応抗原の抽出

歯肉上皮細胞および肝ホモジネートを凍結融解し, SDS, Triton-X, Tween 20, NP-40 の界面活性剤を使用して, Dot blotting により検索した, すなわち凍結融解した歯肉上皮細胞および肝ホモジネートのそれぞれを等量の 2% SDS, Triton-X, Tween 20, NP-40 と混合し, 室温で2時間放置した。それらを 10,000 r.p.m. 遠心し (HITACHI 20PR), その上清を粗抗原として以下の実験¹²⁾に用いた。次にこれら粗抗原をニトロセルロース膜上に吸着させ, 3%ゼラチンで膜上のタンパク非吸着部分をブロックした後, 一次抗体としてモノクロ抗体を室温, 1時間反応させ, 0.05% Tween 20加 TBS で十分洗浄後, 二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG+M 抗体 (Bio Rad 社) を300倍希釈して室温, 1時間反応後, 洗浄し, 基質 [0.015%過酸化水素および0.5mg/ml 4-クロロ-1-ナフトール (Bio Rad 社) を含む TBS, pH 7.5] 中で発色させた。

(11)-3 SDS-PAGE および Western blotting

SDS-Polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) は泳動用キット (Bio Rad 社) を使用し, Imai et al.¹³⁾の報告に準じて実施した。上記粗抗原を 50 μ l のサンプルバッファーで希釈し, 95°C 4分の熱処理を行って還元させ, gel 一枚あたり 24mA で3時間電気泳動した。一方, 非還元下での対応抗原の解析はメルカプトエタノールを除いたサンプルバッファーを用いて行ない, 同様に電気泳動した。また gel の半分は0.025%の coomassie brilliant blue R-250で染色した。一方残り半分の gel は Western blotting 用とし, 渡辺らの方法¹⁴⁾に従って Trans Blot 装置 (Bio Rad 社) を用いてニトロセルロース膜上に転写し, Dot blotting

と同じ操作で反応させ, 4-クロロ-1-ナフトールを基質として発色させた。なお分子量決定のため, 標準タンパクとして Ovalbumin (分子量45,000), BSA (66,200), Phosphorylase B (92,500), β -Galactosidase (116,250) の4種 (Bio Rad 社) を用いた。

研究成績

(1) モノクロ抗体の作製

3回, 17日間の免疫で感作マウスの脾臓の平均湿潤重量は403mg となり, control の103mg に対し約4倍となった。

colony の観察は, 肉眼的にあるいは位相差顕微鏡により行ない, 融合後14日目の時点でのハイブリドーマの形成率は236/384 (61%) であった。これらの培養上清を ELISA 法でスクリーニングしたところ, IgG+M産生率は46/236 (20%) であり, 歯肉凍結切片を間接免疫ペルオキシダーゼ法で染色したところ, 歯肉コンポーネントと反応したものは23/46 (6%) であった (Table 1)。すなわち代表的な染色パターンは歯肉上皮の細胞膜, 基底細胞の細胞膜 (Fig. 1), 歯肉上皮の細胞質, 結合組織の乳頭部 (Fig. 2), 毛細血管などに観察され, 幾種類かの歯肉コンポーネントに対する抗体を産生するハイブリドーマが得られることがわかった。これらのうち2個についてマウスの胸細胞をフィーダーに用いて限界希釈法によりクローニングし, 最終的には2つのクローンを得, それらの産生するモノクロ抗体を D1および D2と命名した。

D1 は歯肉上皮の角化層以外の細胞膜および毛細血管と反応し (Fig. 3a, b), 一方 D2は歯肉上皮の角化層以外の細胞質を染色し, 同時に D1と同様, 毛細血管とも反応した (Fig. 4)。また D1, D2とも外縁上皮と内縁上皮との間には差は認められなかった。しかしポリクロ抗体で染色した場合は結合組織にびまん性に, 上皮組織にも弱い

Table 1

Hybridoma	236/384	(61%)
Ig positive	46/236	(20%)
Gingiva positive	23/46	(6%)

Fig. 1 Immunoperoxidase staining of a gingiva section. Membrane parts of basal cells were stained positively. $\times 200$

Fig. 2 Immunoperoxidase staining of a gingiva section. Dermal papilla were stained positively. $\times 100$

Fig. 3 Immunoperoxidase staining of a gingiva section. Membrane parts of epithelium and capillary were stained positively. a $\times 100$ b $\times 400$

染色が認められた。

また Ouchterlony 二重拡散沈降法により D1, D2とも IgM との間に一本の沈降線が観察された (Fig. 5)。

(2) 各培養容器培養上清および 腹水腫瘍化の力価の測定

96ウェルプレートで培養した細胞がほとんど培

養容器底面を満たし、培地が黄変したものを順次 24ウェルプレート、T-25フラスコ、T-75フラスコに移しかえ、それらの培養上清を検索に用いた。

またハイブリドーマを腹腔内に投与後11日目では体重は平均 10.4g 増加し、1匹あたり平均 6.7ml の腹水が得られた。これを遠心し、上清を以下の実験に用いた。

Fig. 6 に示すように405nm の吸光度が0.1を示す希釈度は各培養上清間ではほとんど差は認められず、力価は5000であった。一方腹水腫瘍化した場合は200万と大きい値を示した。なお以下の実験は操作が簡便であり、また抗体産生性の安定性を保つために、24ウェルの培養上清を使用して行なった。

免疫組織学的検出限界希釈度は D1, D2 とも100倍希釈までは光顕的に反応部位の識別が可能であるが、200倍希釈位からは陽性判定は困難と

なり、力価は100であった。

(3) 歯肉上皮細胞による吸収テスト

100倍希釈したモノクロー抗体 D1, D2 100 μ l を、免疫原である歯肉上皮細胞 4×10^5 個および 1.2×10^6 個と4°C, 12時間反応させ、その上清を一次抗体として間接免疫ペルオキシダーゼ法を試みたところ、 4×10^5 個の細胞で吸収させた場合は染色性は減退し、 1.2×10^6 個の細胞では消退した (Fig. 7)。

(4) ヒトおよびサル歯肉との交叉性

モノクロー抗体 D1, D2は他のイヌ歯肉4例においても同様な染色パターンを示したが、ヒト歯肉およびサル歯肉とは同条件下では交叉性を示さず、種特異的であると判断した。

Fig. 4 Immunoperoxidase staining of a gingiva section. Cytoplasm of epithelium and capillary were stained positively. $\times 100$

Fig. 5 Gel diffusion precipitation test. MOAB D1 and D2 were IgM.

Fig. 6 Titer of hybridoma-supernatants in various conditions by ELISA.

Fig. 7 Absorption test with gingival epithelial cells.
A : Immunoperoxidase staining with MoAb D1.
B : Immunoperoxidase staining with MoAb D2.
C : After absorption test, MoAb D1 and D2 did not react with gingiva section.

Table 2

	SDS	Tween-20	NP-40	Triton-X
D1	+	—	+	+
D2	++	—	—	—

(5) 対応抗原の各種組織における 分布とその局在性

モノクロ抗体 D1, D2の認識する対応抗原は各種組織において Table 3 に示すように興味ある分布状況であった。以下その詳細について述べる。

Fig. 8 Immunoperoxidase staining of a tongue section. They showed the pattern of staining similar to that of dog gingiva with MoAb D1 and D2,

(5)-1 重層扁平上皮における 対応抗原 の 局在性

モノクロー抗体 D1, D2は舌, 硬口蓋粘膜, 口唇, 頬粘膜, 食道, 皮膚の重層扁平上皮においては歯肉と同様な染色パターンを示し (Fig. 8), かつ粘膜と皮膚との間に差は認められなかった。

(5)-2 胃組織における対応抗原の局在性

抗体 D1は Fig. 9a に示すように正常胃体部の表層粘液細胞および血管内皮細胞と反応したが, 胃小窩内の上皮細胞や固有胃腺細胞とは反応しなかった。

一方抗体 D2は Fig. 9b, 10に示すように表層粘液細胞細胞質, 固有胃腺壁細胞細胞質, 粘膜筋板, 筋層の平滑筋と反応し, D1による反応パターンとは対象的な分布を示した。

(5)-3 小腸における対応抗原の局在性

抗体 D1は小腸の吸収上皮細胞を膜性に染色し, また血管内皮細胞と反応した。一方抗体 D2は吸収上皮細胞を質性に染色し, また血管内皮細胞, 平滑筋と反応した。しかし D1, D2とも吸収上皮細胞微小絨毛とは反応しなかった。

(5)-4 肝臓における対応抗原の局在性

抗体 D1は中心静脈および洞様毛細血管内皮細胞, 小葉間動静脈内皮細胞, 小葉間胆管と反応したが (Fig. 11a), D2はほとんどの肝細胞細胞質の染色が著明であった (Fig. 11b)。

(5)-5 腎臓における対応抗原の局在性

D1 は糸球体においては内皮細胞とボウマン囊の扁平上皮細胞を (Fig. 12a), 尿細管においては集合管の一部の細胞の底面膜を, また血管内皮細胞をも染色した。それに対し D2は遠位尿細管上皮およびヘンレ係蹄の太い部分の細胞質の染色が著明であった (Fig. 12b)。

(5)-6 脈管系およびその他組織における 対応抗原の局在性

腹大動脈においては D1, D2ともに内皮細胞を染色したが, D1の方が染色力は若干強かった。また D2は中膜の平滑筋とも反応した。

食道腺の導管および毛の外根鞘においても D1は膜性に, D2は質性に反応した。

(6) 対応抗原の安定性

凍結切片とパラフィン切片について 染色性の差

Fig. 9 Immunoperoxidase staining of a stomach section.

- a : Membrane parts of surface epithelium cells were stained positively with MoAb D1.
- b : Cytoplasm of surface epithelium cells were stained positively with MoAb D2.
- c : Effect of treatment with trypsin on immunoperoxidase staining of a gingiva section with MoAb D2.

を検討したが, パラフィン切片の方が若干染色性が減退したのみで, 反応部位にほとんど差は認められなかった。したがって切片作製時に使用するアセトン, アルコール, キシレン, ホルマリンに

は安定であると言える。

また D1はトリプシン処理、ペプシン処理、過ヨウ素酸化、90°C、5分の熱処理に安定であり、しかも0.02%トリプシンにて30分間前処置した方が染色性が向上することがわかった。一方 D2はトリプシン処理によりのみ染色性が減退し、特に毛細血管で著明であった。この結果は歯肉のみならず他の各種組織においても同様に認められた (Fig. 9c)。

(7) 対応抗原の抽出

D1 に対する抗原の抽出は 歯肉上皮細胞 では

Fig. 10 Lamina muscularis mucosae and capillary were stained positively with MoAb D2.

Fig. 11 Immunoperoxidase staining of a liver section.

a : Sinusoidal capillary were stained positively with MoAb D1.

b : Hepatocytes were stained positively with MoAb D2.

Fig. 12 Immunoperoxidase staining of a kidney section.

a : Bowman's capsules and A. et V. interloburasis were stained positively with MoAb D1.

b : Proximal tubule epithelium cells were stained positively with MoAb D2.

Fig. 13 SDS-PAGE (7.5% gel) and western blotting. MoAb D1 recognized the antigen of a 50K dalton protein extracted from liver.

SDS, NP-40, Triton-X が結果は良好であり、一方 D2 では SDS のみで可能であった。しかし共に非常に抽出されにくい傾向があり、SDS-PAGE を行なうにあたって十分な抗原量が得られなかった (Table 2)。

(8) モノクロ抗体 D1 の対応抗原の分子性状および抗原決定基

D1の対応抗原の局在性は前述のごとく肝臓においては広範囲にわたっているため、肝組織を2% SDS で抽出して得た粗抗原を Dot blotting により検索したところ、反応が陽性となったため、SDS-PAGE および Western blotting に使用した。その結果を Fig. 13に示した。

D1 の対応抗原は還元および非還元いずれの条件においても分子量50Kダルトンの位置に陽性バンドを認めた。また凍結切片とパラフィン切片上の過ヨウ素酸処理には安定であるため、50Kダルトンの過ヨウ素酸抵抗性糖鎖、あるいはクマシーブルー陽性蛋白を認識していると推測される。

考 察

歯肉の重層扁平上皮は常に外部からの物理的、

Table 3 Crossreactivity of MoAb D1, D2 to dog normal tissues detected by immunoperoxidase staining.

	D1	D2
1. Epithelial tissue		
Skin		
Epithelium	M++	C++
Hair follicle	M++	C++
Esophagus		
Epithelium	M++	C++
Esophageal gland	-	-
Duct	M+	C+
Stomach		
Surface epithelium	M+	C+
Foveolar epithelium	-	-
Glandular epithelium		
Chief cell	-	-
Parietal cell	-	C+
Small intestine		
Villi	-	-
Surface epithelium	M+	C+
Large intestine		
Surface epithelium	M±	C+
Liver		
Hepatocyte	-	C++
Sinusoidal capillary	++	-
Kidney		
Bowman's capsule	++	±
Proximal tubule	-	-
Thick ascending limb	-	+
Distal tubule	-	+
2. Nonepithelial tissue		
Smooth muscle	±	++
Muscularis mucosae	±	+
Endothelial cell	++	+
3. Connective tissue	-	-

++ strongly positive

+ moderately positive

± weakly positive

- negative

M : Membrane

C : Cytoplasm

化学的、細菌的な刺激を受けており、歯周疾患の発症の場としても重要な意義を持っている。しかしその構造および発生や分化のメカニズムは未だ不明の部分が多いのが現状である。著者は歯周疾患を免疫組織化学的見地から解明する一助として、歯肉上皮の基底細胞層、棘細胞層、顆粒層、

角化層のそれぞれと特異的に反応するモノクロー抗体の作製を試みた。その結果として歯肉上皮の角化層以外の細胞膜、細胞質と反応する2種のモノクロー抗体を得たので、それらの作製過程、各種組織における分布および局在性、さらにその免疫学的性状について考察を加えてみたい。

(1) モノクロー抗体の作製

イヌ歯肉に対するモノクロー抗体の作製は数回試みているが、教室の武田の報告⁸⁾と同じで脾腫の程度が低いもの、即ち5週齢のマウスを使用した場合に300mg以下の湿潤重量を示すものは概してハイブリドーマの形成性は不良であった。今回の実験では、免疫群の脾臓の平均湿潤重量は403mgでcontrolに対し約4倍となっており、ハイブリドーマの形成率も14日目の時点で61%と高率であった。また教室の一連のモノクロー抗体作製の研究でIgM産生のハイブリドーマが比較的良好に分離されているが、これは一週間おきに3回、計17日間という短い免疫スケジュールが影響していると考えている。

次に免疫原のイヌ歯肉上皮細胞であるが、ポリクローナル法(従来法)では可溶化や分画を行わずそのまま免疫することは考えられないことであるが、できるだけ免疫組織学的に興味あるモノクロー抗体を分離したいと考え、モノクロー法の特徴を生かし、このように無数の抗原決定基からなる細胞自身で免疫を行なった。こうした免疫法によっても多数の特異抗体産生性ハイブリドーマが得られており、未知の抗原を検索していくには病理学者にとって非常に都合の良い方法であることが明らかとなった。また量的にも免疫一回あたり使用した 5×10^6 個の細胞数で十分であることが確認された。

教室の研究から明らかとなっていることは、P3U1株を使用した細胞融合では対数増殖期かつ附着性のミエローマ細胞を使うこと、大きな脾腫を示す脾臓を選ぶこと、適切な培地交換および移しかえなどであり本研究においてもこの点に留意し、好結果を得ることができた。

(2) ハイブリドーマ培養上清の力価

96ウェルプレート、24ウェルプレート、T-25フラスコ、T-75フラスコと順次大きな培養器に移し

かえていくが、このときハイブリドーマに与える環境変化は抗体産生性の安定性に好ましくない影響を与える可能性が示唆されている。したがって簡便さも考え、免疫組織学的に十分な抗体を作製するには24ウェルプレート培養で行なうことにした。この方法だと約72時間の培養で1ウェルあたり2ml、24ウェルだと48mlの培養上清が採取でき、余剰ハイブリーマを吸引除去すればさらに約72時間で48mlずつ抗体が採取できることになり、簡便な抗体大量作製法といえる。しかし得られた培養上清中の抗体濃度は $20\mu\text{g/ml}$ であり、高濃度の抗体を得るには今回も検討を行なったように、やはり腹水腫瘍化を行なう必要がある。実験の項に記したように 1×10^7 個のハイブリドーマの移植で11日間で腹水として6.7mlを得ることができた。しかし免疫組織学的には24ウェルプレート培養法で十分であった。

24ウェルの培養上清はELISA法、間接免疫ペルオキシダーゼ法、Dot blotting, Western blottingなどの実験に使用したが、いずれも十分な濃度を示し、ELISAによる力価は5000、免疫組織学的力価は100であった。一方腹水におけるELISAによる力価は200万と高い値を示したが、モノクロー抗体以外にもその実験動物の持つ抗体も含まれているため精製の操作など煩雑な面も多く、むしろ24ウェルプレートの培養上清の使用で十分であるといえる。

(3) 対応抗原の局在性、および分子性状

ヒト癌細胞、リンパ球、その他各種組織に対するモノクロー抗体の作製報告は数多くなされているが、歯肉コンポーネントに対する抗体の作製は本教室を除いてはほとんど無に等しい。

一方正常ヒト表皮細胞に対するモノクロー抗体としてはAiba et al.^{15,16)}がAHS-1~8の8種のハイブリドーマを得、それらは表皮細胞細胞質、細胞膜、基底膜などと反応し、またAHS-1、AHS-2は角化層より抽出されたケラチンと反応すると報告している。モノクロー抗体D1の対応抗原の局在性はAHS-4と類似し、D2のそれはAHS-1あるいはAHS-2と類似している。しかしD1、D2抗体はヒト歯肉に対してはイヌと同条件下では交叉性を示しておらず、認識する対応抗原は種特異的である

と思われる。

今回著者の作製したモノクロ抗体 D1, D2は、歯肉コンポーネントと反応し、特に角化層を除く外縁、内縁上皮層に広範囲に局在したが、炎症過程や腫瘍化における局在の変化などは今後の課題である。

また歯肉コンポーネント以外の各種組織においても広範囲な分布を示しており、歯肉からは困難であった対応抗原の抽出を肝臓におきかえてみたところ、D1認識抗原は50Kダルトンの分子であることが明らかとなった。このように歯肉上皮組織以外の各器官からの抽出は量的に十分であることが多く、さらに進んだ抗原の解析に役立つことが期待されよう。

また歯肉上皮細胞で免疫したにもかかわらず、腎臓においても交叉性を示したが、このような現象はよく認められており、Varki et al.¹⁷⁾や遠藤ら¹⁸⁾はヒト肺癌、Moriarty et al.¹⁹⁾や笹浪²⁰⁾はヒト肝癌、Goos N.P. Van Muijen et al.²¹⁾はサイトケラチンに対するモノクロ抗体で、いずれも腎臓との交叉性を認めている。イヌ組織に対してはHerzlinger and Ojakian²²⁻²⁵⁾らがMardin Darby canine kidney (MDCK)培養細胞に対するモノクロ抗体の作製および対応抗原の解析に関する一連の研究を報告している。それによるとモノクロ抗体11B8は35Kダルトンの糖蛋白を認識し、その対応抗原はヘンレ係蹄の太い部分、遠位尿管、集合管の遠位尿管より一部の細胞に局在すると述べている。その他、50Kダルトンの糖蛋白を認識するモノクロ抗体H6、60Kダルトンの糖蛋白を認識するモノクロ抗体G12の作製も報告している。今回著者は50Kダルトンの分子を認識するモノクロ抗体D1を得たが、Herzlinger and Ojakianらの作製したモノクロ抗体H6と比較すると、分子量および腎臓と交叉性を示す点で共通点がある。しかしH6の対応抗原の腎臓における局在については詳細に述べられておらず、またIgGであること、歯肉上皮細胞で免疫したこと、血管内皮細胞と反応することなどの点で差異があり、D1とH6とは同一ではないとみなされる。

次に小腸上皮細胞においてもD1, D2は交叉性を示したが、杉山²⁶⁾はラット大腸上皮細胞の微小

絨毛膜あるいは側、底面膜に局限して反応するモノクロ抗体対応抗原の性状について述べており、D1, D2対応抗原の解析に重要な指標を与えている。すなわち、D1対応抗原は歯肉上皮細胞においては全周性に存在するが、小腸吸収上皮細胞においては微小絨毛膜側には存在せず、また胃においても胃小窩の上皮細胞には存在しなかった。このことは膜上に発現する一連の酵素、糖蛋白あるいはレセプターによる上皮細胞における吸収、分泌の機能的方向性の検索に今後の課題を提供している。この点でも腎集合管の一部の細胞の底面膜と反応したことは興味深い。

一方D2対応抗原は歯肉上皮細胞細胞質のみならず、上皮性の細胞細胞質、平滑筋細胞、腎尿管、固有胃腺の壁細胞など広範囲に分布しており、特に腎臓における局在性は前述のHerzlinger and Ojakianらによるモノクロ抗体11B8と類似しているが、現在のところ著者はD2対応抗原の分子量同定に成功しておらず、その比較同定は将来のテーマとして残っている。

今まで述べてきたように歯肉上皮細胞を抗原として幾種類かの歯肉コンポーネントに対するモノクロ抗体を得ることができた。そのうちの二種はそれぞれ歯肉上皮細胞の細胞膜と細胞質を認識しているため、実験的イヌ歯周炎の有用なマーカーとなる可能性が強いと思われる。すなわち炎症性変化を受けた上皮細胞は核濃縮、細胞体の減少、および上皮細胞間橋の減少消失をきたすが、その一連の変化の過程を検索するのに細胞膜あるいは細胞質に対するモノクロ抗体は有用と思われる。また口腔領域にとどまらず他組織との交叉性を調べることにより全身疾患との関連性に関する研究の土台にもなりうる。

このようにハイブリドーマ技術の利用は歯肉上皮細胞の細胞膜および細胞質の構造、発生や分化のメカニズム、歯周疾患の病態の把握や鑑別診断に有用であると思われる、今後対応抗原の完全なる解析や免疫電顕に関する研究が必要と思われる。

結 論

歯周疾患の免疫組織化学的研究の一環として、

イヌ歯肉に対するモノクローナル抗体の作製および対応抗原の組織分布や局在性あるいは免疫学的性状の検索を行なったところ以下の結果を得た。

1) イヌ歯肉上皮細胞 (2×10^6) を Balb/c mouse に1週間おきに3回免疫し、最終免疫3日後の脾臓を細胞融合に用いた。脾臓は脾腫を示し、正常群の約4倍となっていた。また脾腫の程度からハイブリドーマの形成性も推測できることが明らかとなった。

2) ハイブリドーマの形成率は236/384、免疫グロブリン産生率は46/236、歯肉コンポーネントと反応したものは23/46であり、イヌ歯肉上皮の抗原性がよいことがわかった。このうち2種のハイブリドーマについて繰り返しクローニングを行ない、モノクロー抗体 D1, D2を得た。

3) D1, D2抗体とも IgM で、D1は歯肉上皮の細胞膜および毛細血管、D2は細胞質および毛細血管と反応した。

4) 96ウェルプレート、24ウェルプレート、T-25フラスコ、T-75フラスコで培養した上清の抗体価はいずれの場合もほとんど差は認められなかった。従って以下の実験は24ウェルの培養上清を使用して行なった。また ELISA による力価はハイブリドーマ上清で5000倍、腹水腫瘍化で200万倍であった。

5) 間接免疫ペルオキシダーゼ法による検出は100倍希釈まで可能であった。免疫原による吸収テストから D1, D2抗体の対応抗原は歯肉上皮細胞にあることが確認された。

6) D1, D2抗体は他のイヌ歯肉4例においても同様な染色パターンを示したがヒトおよびサル歯肉とは同条件下では交叉性を示さなかった。

7) D1, D2抗体の認識する抗原決定基はアセトン、アルコール、キシレン、ホルマリン、熱に安定であり、また過ヨウ素酸処理においても染色

性の減退を示さなかった。しかし D2の染色性はトリプシンにより減少が認められた。

8) 口腔内および他組織の重層扁平上皮における対応抗原の局在性を検索したところ、口唇、頬粘膜、舌、硬口蓋、食道、皮膚のいずれにおいても歯肉に対する D1, D2抗体と同様な染色パターンを示した。

9) 対応抗原の他臓器における組織分布および局在性を検索したところ、食道、胃、小腸、大腸、肝臓、腎臓、腹大動脈、腹部皮膚のいずれも染色陽性を示し、興味ある局在性を示していた。

10) D1 および D2 対応抗原の歯肉からの抽出は非常に困難であったが、D1対応抗原は肝臓からの SDS 抽出が可能な coomassie blue 陽性蛋白、あるいは過ヨウ素酸抵抗性の糖鎖で分子量が50Kダルトンの分子であることが明らかとなった。

以上の結果から今回検討した免疫方法によりイヌ歯肉に対するモノクロー抗体の作製が可能であること、またその免疫学的性状および免疫組織学的検索を行ない、対応抗原の組織分布、局在性を明らかにすることができた。こうしたモノクロー抗体の応用研究を行なうことは、今後歯周疾患を免疫組織学的に研究する上で、重要なアプローチを与える可能性を示唆している。

稿を終わるにあたり、ご懇篤なご指導とご校閲を賜った大阪歯科大学口腔病理学教室簡井正弘教授に深甚な謝意を表するとともに、終始有益な御助言をいただいた魚部健市講師に厚くお礼申し上げます。またいろいろ御協力いただきました口腔病理学教室の諸先生方に感謝いたします。

本論文の要旨は第341回大阪歯科学会例会(1985年10月12日、大阪)および第33回 JADR 総会(1985年11月29日)において発表した。

抄録：今回著者は歯周疾患の免疫組織化学的研究の一環として、イヌ歯肉コンポーネントに対するモノクローナル抗体を作製し、その対応抗原の組織局在性および免疫学的性状について検索した。

3回、17日間の免疫により感作されたマウス脾細胞とマウス骨髓腫細胞 P3U1との細胞融合により、数種類の興味ある抗体産生性ハイブリドーマを得、限界希釈法によるクローニングで D1, D2と命名する2種類のモノクローナル抗体を得た。

D1, D2とも IgM で、D1は歯肉上皮の細胞膜および毛細血管、D2は細胞質および毛細血管と反応した。ま

た口腔内（舌，硬口蓋，口唇，頬粘膜）および皮膚の重層扁平上皮においても，歯肉に対するそれと同様な染色パターンを示し，重層扁平上皮以外でも胃，小腸，肝臓，腎臓，腹大動脈など広範囲において興味ある分布状況を示した。

さらに生化学的検索により，モノクロー抗体 D1 の対応抗原の分子量は50K ダルトンの分子であることが判明した。

以上のことからイヌ歯肉に対するモノクロー抗体の作製が可能であり，その特異性を利用した研究は今後歯周疾患を免疫組織学的に研究する上で，有用な手段となることが明らかとなった。

文 献

- Köhler, G. T. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificities. *Nature* **256** : 495-497, 1975.
- 筒井正弘：モノクローナル抗体の免疫組織学的応用。日歯周誌 **27** : 661-662, 1985.
- Uobe, K., Wada, S. and Tsutsui, M.: Monoclonal antibodies against human gingiva and dog gingiva. *J. Dent. Res.* **64** : Abstract 143, 1985.
- Uobe, K., Wada, S., Wato, M., Nishida, K. and Tsutsui, M.: Monoclonal antibodies against human gingiva and dog gingiva. *J. Jpn. Ass. Periodont.* **27** : 259 Abstract 27, 1985.
- Uobe, K., Wada, S., Wato, M., Nishida, K., Tsutsui, M. et al.: Monoclonal antibodies against various components of gingiva. *Jpn. Inflam. Ass. Abstract* : 194, 1985.
- Wada, S., Uobe, K. and Tsutsui, M.: Monoclonal antibodies against human gingiva and dog gingiva. *Jpn. Assoc. Dent. Res. Abstract* 65, 1985.
- Eisinger, M., Raaf, J. H. and Fortner, J. G.: Wound coverage by a sheet of epidermal cells grown in vitro from dispersed single cell preparations. *Surgery* **88** : 287-293, 1980.
- Takeda, R.: Doctorial thesis, 1985, Histochemical studies of periodontal disease: Fundamental study on production of hybridoma using myeloma cell line P3U1.
- 岩崎辰夫，安東民衛，市川かおる，保井孝太郎：単クローン抗体。ハイブリドーマと ELISA，一版，pp. 144-169，講談社，東京，1983.
- Mishell, B. B. and Shiige, S. M.: Selected methods in cellular immunology. 細胞免疫実験操作法，（今井勝行，川口 進，原田孝文共訳），一版，pp. 336-337，理工学社，東京，1982.
- 岩崎辰夫，安東民衛，市井かおる，保井孝太郎：単クローン抗体。ハイブリドーマと ELISA，一版，pp. 91-94，講談社，東京，1983.
- 国松己歳，佐々木實：ニトロセルロース膜を用いたマルチススポットエンザイムイムノアッセイ—モノクローナル抗体の検出・同定への応用。（右田俊介編集），免疫実験操作法 **11**，pp. 3521-3528，日本免疫学会，金沢，1982.
- Imai, K., Galloway, D. R. and Ferrone, S.: Serological and immunochemical analysis of the specificity of the xenoantiserum 8986 elicited with hybrids between human melanoma and murine fibroblasts. *Cancer Res.* **41** : 1028-1033, 1981.
- 渡辺 武，大原純一，江田康幸，松橋幸子：プロッティング法によるモノクローナル抗体の検出。（右田俊介編集），免疫実験操作法，**11** : pp. 3485-3489，日本免疫学会，金沢，1982.
- Aiba, S., Masuko, T., Hosokawa, M. and Hashimoto, Y.: Monoclonal antibodies to various morphologic components of human skin. *J. invest. Dermatol.* **81** : 498-502, 1983.
- 相場節也，益子 高，橋本嘉幸：正常ヒト表皮細胞に対するモノクローナル抗体の作製。最新医学 **39** : 56-61, 1984.
- Varki, N. M., Reisfeld, R. A. and Walker, L. E.: Antigens associated with a human lung adenocarcinoma defined by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **44** : 681-687, 1984.
- 遠藤高夫，今井浩三：ヒト肺腺癌細胞に対するモノクローナル抗体の作製と癌患者血清中抗原の検出。札幌医誌 **54** : 393-410, 1985.
- Moriarty, D. M., Fox, N., Aden, D. P., Hoyer, J. R. and Knowles, B. B.: Identification of human hepatoma-defined cell surface molecules. *Hybridoma* **2** : 39-47, 1983.
- 笹波哲雄：ヒト肝癌細胞に対するモノクローナル抗体の作製とその応用。札幌医誌 **53** : 223-241, 1984.
- Muijen, G. N. P. V., Ruiter, D. J., Poncet, M., Mey, C. H. D. and Warnaar, S. O.: Monoclonal antibodies with different specificities against cytokeratins. *Am. J. Pathol.* **114** : 9-17, 1984.
- Herzlinger, D. A., Easton, T. G. and Ojakian, G. K.: The MDCK epithelial cell line expresses a cell surface antigen of the kidney distal tubule. *J. Cell. Biol.* **93** : 269-277, 1982.
- Ojakian, G. K. and Herzlinger, D. A.;

Studies of kidney epithelial cell surfaces using monoclonal antibodies. *Anat. Rec. [Suppl]* **1** : 85-102, 1983.

- 24) Herzlinger, D. A. and Ojakian, G. K. : Studies on the development and maintenance of epithelial cell surface polarity with monoclonal antibodies. *J. Cell. Biol.* **98** : 1777-1787, 1984.

- 25) Ojakian, G. K. and Herzlinger, D. A. : Analysis of epithelial cell surface polarity with monoclonal antibodies. *Fed. Proc.* **43** : 2208-2216, 1984.

- 26) 杉山敏郎：ラット大腸上皮および大腸癌細胞における膜抗原の分布に関する研究. 札幌医誌 **54** : 215-231, 1985.