Epstein-Barr virus transformation 法による ヒトモノクローナル抗血小板抗体の作製

松 本 満

Jpn. J. Clin. Immun., 11(3) : 268~275, 1988.

Production of human monoclonal anti-platelet autoantibodies by Epstein-Barr virus transformation

Mitsuru Matsumoto

The First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Ehime University

【Summary】

Nine monoclonal anti-platelet autoantibody producing human cell lines were established from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) by Epstein-Barr virus (EBV) transformation and their characteristics were studied. Three of the antibodies showed cross-reactivity with single-stranded DNA (ssDNA), as determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and one of them was also found to bind to the synthetic polynucleotides, poly (dT) and poly (I), as well as to ssDNA.

One of these EBV-transformed human cell lines was fused with the mouse myeloma P3X63 Ag8.653. The resulting hybridoma could be grown in nude mouse ascites by which large quantities of human monoclonal antibodies were obtained.

Key words : Epstein-Barr virus transformation,
human monoclonal anti-platelet autoantibody,
EBV-hybridoma technique

【概 要】

Epstein-Barr virus (EBV) transformation 法を用いて、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者から、9 系統のヒトモノクローナル抗血小板抗体産生細胞株を樹立した。酵素免疫測定法 (ELISA 法) を用いた検討から、それらのうち 3 系統では 1 本鎖 DNA との交差反応性が認められ、さらにそのうちの 1 系統は poly (dT), poly (I) とともに強い反応性を示した。また、これらのうちの 1 系統を選んで、EBV-ハイブリドーマ法により、マウス骨髓腫細胞株 P3X63Ag8.653 との融合細胞を作製した。得られたマウス-ヒト・ヘテロハイブリドーマはヌードマウス腹腔内への移植が可能で、それにより、高濃度のヒトモノクローナル抗体が得られることが明らかになった。

I. はじめに

1975年, Köhler と Milstein¹⁾ により報告されたマウス骨髓腫細胞と免疫マウス脾細胞とを用いた細胞融合法によるモノクローナル抗体産生性ハイブリドーマの作製は, その後の医学, 生物学の各分野に飛躍的な発展をもたらした. その後, Olsson と Kaplan²⁾ は, この細胞融合法がほとんどそのままヒトモノクローナル抗体の作製にも適用できることを示し, それにより, 臨床的にも診断や治療へのさらに広い応用の可能性が開かれた.

ヒトモノクローナル抗体の作製には, このような細胞融合法のほかに, Epstein-Barr ウイルス (EBV) による形質転換 (transformation) 法も用いられる. EBV はヒト B 細胞に感染して, もとの B 細胞の抗体産生能を維持したまま, それを長期間培養可能なリンパ芽球様細胞株に transformation させる. したがって, EBV で transformation した B 細胞を単個培養し, クローン化すれば, その培養上清をヒトモノクローナル抗体として用いることができる³⁾.

他方, 自己免疫性疾患患者の血清中には, さまざまな臓器特異的あるいは種特異的自己抗体が存在し, その出現は, それぞれに対応する自己の抗原によって, 個体が内因性に感作された状態を示したものであると考えられている. したがって, 自己免疫性疾患患者から, このような自己抗体産生細胞株を樹立することは, 自己抗体ならびにそれに対応する抗原の詳細な解析に有用であると思われる.

これらのことをふまえて, 本研究では, 抗血小板自己抗体が病像の成立過程に深く関与していると考えられている特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura; ITP) 患者から, EBV transformation 法を用いて抗血小板抗体産生細胞株の樹立を試みるとともに, このようなモノクローナル自己抗体で指摘されている反応の多様性を検討する目的で, 得られた抗血小板モノクローナル抗体と DNA との反応性についても検討した. さらに, このようなヒトモノクローナル抗体をより効率よく得る目的で開発された EBV-ハイブリドーマ法^{4,5)} について検討した成績についても, あわせて報告する.

II. 材料および方法

1. リンパ球の調製

3名の ITP 患者のうち, 1例は末梢血リンパ球を2回, 2例は摘脾時の脾リンパ球をそれぞれ用いた. 末梢血リンパ球は, ヘパリン加採血した末梢血液を等量のリン酸

緩衝食塩液 (PBS), pH 7.2 で希釈後, Ficoll-Conray 液, 比重 1.077 に重層して $200\times g$ で35分間遠心し, 単核細胞層を採取し, RPMI 1640 培地 (GIBCO) で2回洗浄後, $2\times 10^6/ml$ の細胞濃度に調整して 20% 非働化ウシ胎児血清 (FCS), 2 mM L-glutamine, 100 $\mu g/ml$ streptomycin, 100 U/ml penicillin, 10 mM HEPES (N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; 半井化学) 加 RPMI 1640 培地 (20%FCS 加培養液) に浮遊させた. また, 脾は細切した後, ステンレス・スチールメッシュ #200 を透過させて RPMI 1640 培地中で単細胞浮遊液とし, 以下, 末梢血リンパ球と同様に, Ficoll-Conray 比重遠心法を用いてリンパ球を分離, 調製した.

2. EBV transformation 法

1) EBV の調製

Miller ら⁶⁾ によって樹立された EBV 産生細胞株 B 95-8 を, 20%FCS 加培養液に $5\times 10^5/ml$ の細胞濃度で浮遊させ, 5%CO₂, 37°C 培養器 (以下, 培養器) 中に維持した. 7日後, 培養上清を回収して $110\times g$ で5分間遠心した後, 0.45 μm の膜型フィルター (Sartorius) で濾過して EBV 浮遊液とした. なお, 使用時まで $-80^\circ C$ で凍結保存した.

2) EBV transformation

末梢血液あるいは脾より調製したリンパ球浮遊液と EBV 浮遊液とを等量ずつ混合した後, 96穴平底マイクロプレート (Falcon 3072) に1穴あたり 200 μl ずつ分注し, 培養器中に維持した. 4日目ごとに 10%FCS 加培養液を用いて半量液交換を行い, 約2週間後, 増殖してくる EBV による形質転換細胞を倒立顕微鏡で確認し, 培養上清中の抗体活性を以下の方法を用いて測定した.

3. ELISA 法による抗血小板抗体および抗 DNA 抗体の測定

1) 血小板固相化 ELISA プレートの作製

血液型 O 型健康者から, プラスチック注射器を用いて採血した全血 9 容に 3.8% クエン酸ナトリウム 1 容を加え, $110\times g$ で15分間遠心して上清の多血小板血漿 (platelet rich plasma; PRP) を分離した. この PRP をさらに $110\times g$ で10分間遠心して赤血球および白血球の混入を除いた後, 15% (V/V) になるように酸性クエン酸ブドウ糖 (ACD-A 液) を加え, $1,000\times g$ で15分間遠心した. 得られた血小板沈渣を 15%ACD-A 液加 PBS で3回, 同様な遠心操作で洗浄した後, 血小板数を算定し, $5\times 10^4/\mu l$ となるように同緩衝液に浮遊させた.

この血小板浮遊液 50 μ l ずつを 10 μ g/ml の poly-L-lysine (Sigma) で室温 30 分間処理した 96 穴ポリビニールクロライド・マイクロプレート (Flow) の各穴に分注し、300 $\times$ g で 5 分間遠心した。次いで、各穴に冷却 PBS で 0.5% に希釈した glutaraldehyde (和光純薬) 50 μ l を加え、再び 300 $\times$ g で 5 分間遠心後、室温に 10 分間静置した。次いで、上清をすて、0.05% Tween 20 (半井化学) を含む PBS (PBS-Tween 20) でプレートを 3 回洗浄した後、各穴に 1% 卵白アルブミン (DIFCO) を含む PBS を 200 μ l ずつ加えて 37°C で 2 時間静置後、再び PBS-Tween 20 でプレートを 3 回洗浄して風乾した。なお、この血小板固相化 ELISA プレートは、使用時まで 4°C に保存した。

2) DNA 固相化 ELISA プレートの作製

i) 1 本鎖 DNA 溶液の調製

ウシ胸腺 DNA (Sigma) を 2.5 μ g/ml となるように PBS で溶解し、100°C で 10 分間加熱後、氷水中で急速に冷却して 1 本鎖 DNA 溶液とした。

ii) 2 本鎖 DNA 溶液の調製

2 本鎖 DNA の調製は Blin と Stafford⁷⁾ の方法にしたがった。ヘパリン加採血した末梢血液を 450 $\times$ g で 10 分間遠心後、上清を除き、溶血用緩衝液として 17 mM Tris-HCl 緩衝液-144 mM NH₄Cl, pH 7.2 を加えて氷上で 10 分間静置した後、再び 450 $\times$ g で 10 分間遠心する操作を上清が無色になるまで繰り返して赤血球を除き、白血球沈渣を得た。さらに、それを PBS で 3 回遠心洗浄後、この沈渣をガラス棒で圧迫破碎し、20 ml の 0.5 M EDTA (ethylenediaminetetra-acetic acid, disodium salt)-0.5% SDS (sodium laurylsulfate) 溶液および 2 mg の proteinase K (Merck) を添加し、ときどき軽く震盪しながら、50°C で 3 時間反応させた後、飽和フェノール溶液を用いて DNA 抽出を 2 回実施した。次いで、緩衝液層を 50 mM Tris-HCl 緩衝液-10 mM EDTA-10 mM NaCl 溶液、pH 8.0 で途中、液を換えて 18 時間透析した後、RNase A (Sigma) 溶液を 100 μ g/ml の濃度となるように加えて、37°C で 3 時間処理し、再び飽和フェノール溶液を用いて DNA 抽出を 2 回行った。得られた DNA は 10 mM Tris-HCl 緩衝液-1 mM EDTA 溶液で 18 時間透析し、波長 260 nm で DNA 量を測定後、エタノールを用いて沈殿させ、2.5 μ g/ml となるように PBS に溶解して 2 本鎖 DNA 溶液とした。

iii) DNA 抗原の固相化

あらかじめ 10 μ g/ml の poly-L-lysine で室温 30 分間処理した 96 穴ポリビニールクロライド・マイクロプレートの各穴に、DNA 溶液 50 μ l ずつを分注し、37°C

で 18 時間静置してプレートを乾燥させた。PBS-Tween 20 でプレートを 3 回洗浄した後、各穴に 1% 卵白アルブミンを含む PBS を 200 μ l ずつ分注した。以下、血小板固相化 ELISA プレートと同様の処理を行い、4°C に保存した。

3) 抗原未感作 ELISA プレートの作製

血小板および DNA 固相化 ELISA プレートと同様に、あらかじめ poly-L-lysine で処理した 96 穴ポリビニールクロライド・マイクロプレートの各穴に PBS 50 μ l を分注し、37°C で 18 時間静置してプレートを乾燥させた後、DNA 固相化 ELISA プレートと同様の処理を行い、抗原未感作 ELISA プレートとした。

4) ELISA 法による抗体活性の測定

培養上清 100 μ l を各 ELISA プレートに分注し、37°C で 1 時間反応させた後、PBS-Tween 20 でプレートを 3 回洗浄した。次いで、各穴に horseradish peroxidase 標識抗ヒト免疫グロブリン (IgG+IgM) ヤギ血清 (Capel) を 100 μ l ずつ分注し、再び 37°C で 1 時間反応させ、PBS-Tween 20 で 3 回洗浄した後、5.5 mM o-phenylenediamine (Sigma) および 0.012% (W/V) H₂O₂ を含む 0.1 M クエン酸緩衝液を 200 μ l ずつ加え、22°C の暗室で 20 分間反応させた。判定は各穴の吸光度を Titertek Multiskan MC (Flow) を用いて、波長 492 nm で測定した。

4. 抗血小板抗体産生 EBV 形質転換細胞株の樹立

ELISA 法による抗血小板抗体の測定により、高い抗体価を示した培養上清の細胞について、mitomycin C (協和醗酵) 処理 (16 μ g/ml, 37°C で 30 分間) Raji 細胞を feeder layer として用い、限界希釈法を 2 回実施した後、さらに軟寒天クロニング法を行い、単一な細胞由来の抗血小板抗体産生細胞株を樹立した。

5. ELISA 法抑制試験による抗原特異性の検討

PBS に種々の濃度で溶解した 1 本鎖 DNA, 2 本鎖 DNA, RNA, poly (dA), poly (dT), poly (C), poly (G), poly (I), poly (U) および cardiolipin のそれぞれの溶液と、培養上清とを等量ずつ混合して、37°C で 1 時間静置した後、それぞれの混合液から 100 μ l ずつとり、1 本鎖 DNA 固相化 ELISA プレートに加えた。そして、先に述べた ELISA 法と同様に吸光度を求めて抑制吸光度とし、PBS のみを加えて得られた吸光度を対照吸光度として、次の式から抑制率を求めた。

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{対照吸光度} - \text{抑制吸光度}}{\text{対照吸光度}} \times 100$$

表 1 Binding characteristics of human monoclonal autoantibodies

Patient	No. of Antibodies	OD		
		Platelet	ssDNA	No Antigen
1	1 (IgM, κ) ^a	1.133	-0.009	-0.003
2 Exp 1	2 (IgM, κ)	0.174	0.036	0.006
	3 (IgM, κ)	0.810	0.130	0.001
	Exp 2	4 (IgM, κ)	0.210	0.007
		5 (IgM, κ)	0.745	0.145
		6 (IgM, κ)	0.415	0.058
		7 (IgM, λ)	0.219	0.054
3	8 (IgM, κ)	1.141	0.576	-0.005
	9 (IgM, κ)	0.313	0.039	0.026

The values represent optical densities read at 492 nm in ELISA.

a: immunoglobulin class

なお、1本鎖 DNA と 2本鎖 DNA は上記の方法により調製したものをを用い、RNA と cardiolipin は Sigma 社、また poly (dA), poly (dT), poly (C), poly (G), poly (I), poly (U) は Pharmacia 社のものをを用いた。

6. EBV-ハイブリドーマ法

1) マウス-ヒト・ヘテロハイブリドーマの作製

細胞融合は Kobayashi ら⁹⁾の方法によった。すなわち、血清未添加の Eagle 培地の Dulbecco 修正最低必須培地 (D'MEM; GIBCO) に EBV 形質転換細胞株とマウス骨髓腫細胞株 P3X63Ag8.653 (Ag8.653) とを細胞数 3:1 の割合で混合し、 $110 \times g$ で 5 分間遠心後、上清を除き、D'MEM 培地に溶解した 45% (W/V) polyethylene glycol 4,000 (Sigma) 1 ml を加えて融合させた。融合操作後、 $1 \times 10^6/ml$ の細胞濃度となるよう $0.1 \mu M$ hypoxanthine (Sigma), $0.4 \mu M$ aminopterin (Sigma), $0.016 \mu M$ thymidine (和光純薬) および $10 \mu M$ ouabain (Sigma) を含む 20% FCS 加培養液に浮遊させ、96 穴平底マイクロプレートに $100 \mu l$ ずつ分注して培養器中に維持した。細胞融合後 5 日目に上記培養液を $100 \mu l$ ずつ添加し、以後、2 週間目までは $0.1 \mu M$ hypoxanthine と $0.016 \mu M$ thymidine を含む 10% FCS 加培養液、また 2 週間目以降は 10% FCS 加培養液を用いて、4 日目ごとに半量液交換を行った。3~4 週間後、増殖してくるマウス-ヒト・ヘテロハイブリドーマについては、それらの培養上清中の抗体活性を ELISA 法により測定し、陽性を示したコロニーは限界希釈法によりクローニングした。

2) マウス腹腔内への移植

ヘテロハイブリドーマは、1 週間前にあらかじめ pris-

tane (2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane; Aldrich) $0.5 ml$ を腹腔内注射しておいた BALB/c シスノードマウスの腹腔内に、 $1 \sim 2 \times 10^7/ml$ の細胞濃度で $0.5 ml$ ずつ接種した。

7. モノクローナル抗体の免疫グロブリンクラスの同定

クローニング後の抗体産生細胞の培養上清を 50% 飽和硫酸アンモニウム (pH 7.1) 塩析法により約 20 倍に濃縮し、抗ヒト IgG, IgA, IgM ヤギ血清 (Behringwerke) および抗ヒト κ 鎖, λ 鎖ウサギ血清 (Behringwerke) を用いて、micro-Ouchterlony 法により同定した。

III. 成 績

培養開始時に異なる場所から出現した陽性コロニーのクローニングから、IgM, κ クラスの抗体産生細胞株を 8 系統、IgM, λ クラスの抗体産生細胞株を 1 系統、計 9 系統樹立した。なお、本研究では必要以上の継代培養による染色体の脱落を防ぐために、細胞株樹立後はそれらを凍結保存し、できるだけ継代数を少なくして抗体産生能の安定化をはかった。

1. ヒトモノクローナル抗体の反応性の検討

1) 血小板および 1 本鎖 DNA との反応性

これら 9 系統のヒトモノクローナル抗体について、血小板および 1 本鎖 DNA との反応性を ELISA 法により検討した。表 1 に示したように、血小板との反応では、最低は No. 2 の 0.174, 最高は No. 8 の 1.141 と、反応の程度に差がみられたが、いずれの抗体も血小板固相化

表 2 Direct binding ELISA of 3 human monoclonal autoantibodies

No. of Antibodies	OD		
	ssDNA	dsDNA	No Antigen
3	0.130	0.011	0.001
5	0.145	-0.008	-0.006
8	0.576	0.009	-0.005

図 1 Competitive inhibition assay of monoclonal autoantibody No. 8. The antibody was incubated with various concentrations of polynucleotides and then tested for residual binding to ssDNA by ELISA. The binding of the antibody to ssDNA was inhibited not only by ssDNA, but also by poly(dT) and poly(I).

プレートと反応した。他方、1本鎖 DNA との反応では、No. 3 と No. 5 が軽度の反応性を示し、また No. 8 は比較的強い反応性を示し、これら 3 系統の抗体は血小板と DNA の両者に反応性が認められた。

2) DNA 反応性抗体の抗原特異性

1本鎖 DNA との反応性が認められた No. 3, 5, 8 の 3 系統について、それらの抗原特異性を ELISA 法により検討した。表 2 に示したように、これらの抗体は、いずれも 1本鎖 DNA とのみ反応し、2本鎖 DNA との反応はみられなかった。さらに、これら 3 系統の抗体のうち、1本鎖 DNA ともっとも強い反応性を認めた No. 8 については、1本鎖 DNA, 2本鎖 DNA, RNA, 種々の合成核酸および cardiolipin を用いた抑制試験を行い、その成績を図 1 に示した。すなわち、この抗体は 1本鎖 DNA の他に、poly(dT) および poly(I) と強い反応性を示し、2本鎖 DNA, RNA, poly(dA), poly(C), poly(G), poly(U) および cardiolipin とは反応しなかった。

2. EBV-ハイブリドーマ法

表 1 に示した抗血小板抗体産生 EBV 形質転換細胞株 No. 1 を用いて、P3X63Ag8.653 株とのヘテロハイブリドーマの作製を試みた。

1) マウス-ヒト・ヘテロハイブリドーマの作製

融合操作後、プレートの 192 穴に分注し、17 穴でハイブリドーマの出現がみられた。このうち 11 コロニーで抗体活性が認められ、それらの中でも高い抗体価を示した 6 コロニーの細胞について、限界希釈法によるクローニングを行い、抗体産生の安定したクローンを樹立した。このようにして得られたヘテロハイブリドーマは P3X63Ag8.653 株と同様に付着性の増殖を示した。

2) マウス腹腔内への移植

このヘテロハイブリドーマは、あらかじめ pristane を投与しておいた BALB/c 系ヌードマウス腹腔内への移植が可能で、投与約 4 週間後、1 匹あたりから約 10 ml の腹水を採取した。

3) 抗体産生量の検討

ヘテロハイブリドーマおよびもとの EBV 形質転換細胞培養上清中の抗体価を、ヘテロハイブリドーマ接種マウスの腹水中の抗体価と比較した。図 2 に示したように、ヘテロハイブリドーマもとの EBV 形質転換細胞の抗体産生量は、ほぼ同じ程度であったが、ヘテロハイブリドーマ・マウス腹水中には、これらの培養上清中のおよそ 100 倍近い高い濃度でヒトモノクローナル抗体が含まれていた。

IV. 考 察

本研究では、ヒトの自己免疫性疾患に出現するいわゆる自己抗体ならびにそれに対応する抗原の詳細な解析を目的として、3 名の ITP 患者のうち、1 例は末梢血リンパ球を 2 回、2 例は摘脾時の脾リンパ球をそれぞれ用いて、EBV transformation 法により、ヒトモノクローナル抗血小板抗体産生細胞株を樹立した。これらの患者には hydralazine や procainamide のような薬剤の使用歴はなく、また腎症や発疹などの SLE 様の臨床所見もみられなかった。得られた 9 系統のヒトモノクローナル抗血小板抗体のうち、3 系統では 1本鎖 DNA との交差反応

図2 Concentration of monoclonal anti-platelet autoantibody. Culture supernatant of EBV-transformed B cells (■—■), culture supernatant of mouse-human heterohybridoma cells (▲—▲) and ascites fluid from mice injected with mouse-human heterohybridoma cells (●—●) were diluted with PBS and assayed by ELISA.

性がみられ、さらにそのうちの1系統について抗原特異性を検討した結果、poly (dT), poly (I) とも強い反応性が認められた。

抗DNA抗体は、主として全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)患者血清中に見出される代表的な自己抗体の1つであるが、これまでに抗DNAモノクローナル抗体がDNAのみならず、cardiolipin⁹⁾、赤血球¹⁰⁾、血小板¹⁰⁻¹²⁾、IgG¹³⁾、細胞骨格成分であるvimentin¹⁴⁾、さらに腎糸球体基底膜に含まれているヘパラン硫酸¹⁵⁾などとも交差反応を示す場合があることが報告されており、SLEの示す多彩な病像を理解するうえで示唆に富む知見と考えられている¹⁶⁾。これらのうち、血小板との交差反応性は、SLE患者でしばしばみられる血小板減少との関連性をうかがわせ、抗DNA抗体が抗血小板抗体としても作用しうる可能性を示した成績である。他方、ITP患者の血清中には抗血小板自己抗体が存在し、血小板寿命の短縮に主要な役割をはたしていると考えられている¹⁷⁾が、血清学的な検査所見を含めて、一部の症例ではSLEと類似した病像がみられることも知られており¹⁸⁾、また両疾患を合併することもまれではない¹⁹⁾。本研究では、1本鎖DNAとの交差反応性を含めて、SLE患者由来の抗DNAモノクローナル抗体^{12,20)}と同様に多様な反応性を示す抗血小板抗体産生細胞株が得られた。Nugentら²¹⁾もITP患者から樹立した抗血小板抗体産生細胞株の中に、vimentinを含む細胞骨格成分と交差反応を示すものがあったことを報告して

いる。これらの成績から、このようなクローンが強く発現された場合には、ITPとSLEの両疾患にみられるような病像の発現の可能性も考えられた。

本研究で作製したマウス-ヒト・ヘテロハイブリドーマは、ヌードマウス腹腔内への移植が容易で、それにより高濃度のヒトモノクローナル抗体が効率よく得られることを示した。一般に、EBV形質転換細胞の分泌するヒトモノクローナル抗体の量は少なく、またその抗体産生能は不安定であるとされている²²⁾。EBV-ハイブリドーマ法はこれらの欠点を補うものとして、Kozborらによって開発された。EBV形質転換細胞との融合細胞は、当初、ouabainに抵抗性を示すマウス骨髄腫細胞株が用いられた⁴⁾が、その後、ヒトBリンパ芽球様細胞ouabain耐性変異株も用いられるようになり⁵⁾、いずれの場合にも、もとのEBV形質転換細胞のおよそ10~15倍と、高い抗体産生能をもつハイブリドーマが得られている。両者を比較すると、マウス骨髄腫細胞株を親株に用いた場合には、マウス-ヒトの異種間の細胞融合となり、ヒトの染色体が脱落しやすく、とくにL鎖κをコードするNo. 2染色体ではこの傾向が強い²³⁾、安定な抗体産生株を得るには不利であることが指摘されている。他方、ヒトBリンパ芽球様細胞株を用いた場合には、抗体産生能は比較的安定であるが、マウス腹腔内への移植には、一度、ヌードマウスの皮下に移植した後、腫瘤を形成して定着したものを採取し、これをpristaneおよびX線照射による処置を行ったヌードマウスの腹腔内に再び投与す

る操作が必要とされている^{24,25)}。しかし、この場合には得られる腹水も 2 ml 程度と少量であるため、マウス腹腔内への移植はあまり有効ではないとの報告もある²⁵⁾。本研究で作製したマウス-ヒト・ヘテロハイブリドーマを用いた検討では、このハイブリドーマ自体の抗体産生量は、もとの EBV 形質転換細胞とほぼ同じ程度であったが、マウス腹腔内への移植が有効であることが明らかになり、マウス骨髓腫細胞株を用いた場合の EBV-ハイブリドーマ法の新たな有用性が確認された。

ITP 患者血清中の抗血小板抗体に対応する血小板上の抗原は、現在のところ、大部分の症例において同定されておらず、血小板寿命の短縮にいたる詳細な免疫学的機序も不明である¹⁷⁾。したがって、ITP 患者から抗血小板抗体産生細胞株を樹立し、それらに対応する抗原を検索することは、このような問題の解明にも有力な手がかりを与えるものと考えられ、さらに本研究で得られたモノクローナル抗体については、対応抗原の解析に努力している。

V. 結 語

EBV transformation 法を用いて、ITP 患者から 9 系統のヒトモノクローナル抗血小板抗体産生細胞株を樹立し、その反応性を検討した。そして、それらのうちの 1 系統については、マウス骨髓腫細胞株 P3X63Ag8.653 とのヘテロハイブリドーマを作製し、ヌードマウス腹腔内への移植により、高濃度のヒトモノクローナル抗体が得られることを示した。

本研究の一部は愛媛県保健医療財団の援助を受けた。

謝辞：本研究の御指導をしていただいた愛媛大学医学部第 1 内科 小林譲教授に深謝します。また、B 95-8 株を分与していただいた東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞遺伝部門 山本興太郎博士ならびに材料を提供していただいた市立宇和島病院内科 河野秀久先生ならびに松山日赤血液センターに深謝します。

文 献

- 1) Köhler, G., Milstein, C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256 : 495~497, 1975.
- 2) Olsson, L., Kaplan, H.S. : Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 5429~5431, 1980.
- 3) Steinitz, M. et al. : EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature*, 269 : 420~422, 1977.
- 4) Kozbor, D. et al. : Human anti-tetanus toxoid monoclonal antibody secreted by EBV-transformed human B cells fused with murine myeloma. *Hybridoma*, 1 : 323~328, 1982.
- 5) Kozbor, D. et al. : Human hybridomas constructed with antigen-specific Epstein-Barr virus-transformed cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 6651~6655, 1982.
- 6) Miller, G. et al. : Epstein-Barr virus : Transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69 : 383~387, 1972.
- 7) Blin, N., Stafford, D.W. : A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, 3 : 2303~2308, 1976.
- 8) Kobayashi, Y. et al. : Antigenic analysis of Japanese encephalitis virus by using monoclonal antibodies. *Inf. Immun.*, 44 : 117~123, 1984.
- 9) Lafer, R. et al. : Polyspecificity of monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. *J. Exp. Med.*, 153 : 897~909, 1980.
- 10) Jacob, L. et al. : Binding of monoclonal anti-DNA autoantibody to identical protein(s) present at the surface of several human cell types involved in lupus pathogenesis. *J. Clin. Invest.*, 75 : 315~317, 1985.
- 11) Shoenfeld, Y. et al. : Production of autoantibodies by human-human hybridomas. *J. Clin. Invest.*, 70 : 205~208, 1982.
- 12) Shoenfeld, Y. et al. : Polyspecificity of monoclonal lupus autoantibodies produced by human-human hybridomas. *N. Engl. J. Med.*, 308 : 414~420, 1983.
- 13) Rubin, R.L. et al. : Multiple autoantigen binding capabilities of mouse monoclonal antibodies.

- ies secreted for rheumatoid factor activity. *J. Exp. Med.*, 159 : 1429~1440, 1984.
- 14) André-Schwartz, J. et al. : Binding of cytoskeletal proteins by monoclonal anti-DNA lupus autoantibodies. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 31 : 261~271, 1984.
- 15) Faaber, P. et al. : Cross-reactivity of human and murine anti-DNA antibodies with heparan sulfate. *J. Clin. Invest.*, 77 : 1824~1830, 1986.
- 16) Schwartz, R.S., Stollar, B.D. : Origins of anti-DNA autoantibodies. *J. Clin. Invest.*, 75 : 321~327, 1985.
- 17) McMillan, R. : Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.*, 304 : 1135~1147, 1981.
- 18) DiFino, S.M. et al. : Adult idiopathic thrombocytopenic purpura : Clinical findings and response to therapy. *Am. J. Med.*, 69 : 430~442, 1980.
- 19) Budman, D.R., Steinberg, A.D. : Hematologic aspects of systemic lupus erythematosus : Current concepts. *Ann. Intern. Med.*, 86 : 220~229, 1977.
- 20) Sasaki, T. et al. : Monoclonal human anti-DNA antibodies from EB virus transformed lymphocytes of systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *J. Clin. Immunol.*, 5 : 246~253, 1985.
- 21) Nugent, D.J. et al. : Isolation of platelet specific human monoclonal antibodies using Epstein Barr virus transformation and somatic cell hybridization. *Monoclonal Antibodies and Human Blood Platelets*, Edited by McGregor, J.L., Elsevier, Amsterdam, 1986, pp. 307~317.
- 22) Kozbor, D., Roder, J.C. : The production of monoclonal antibodies from human lymphocytes. *Immunol. Today*, 4 : 72~79, 1983.
- 23) Croce, C.M. et al. : Preferential retention of human chromosome 14 in mouse X human B cell hybrids. *Eur. J. Immunol.*, 10 : 486~488, 1980.
- 24) Truitt, K.E. et al. : Production of human monoclonal antibody in mouse ascites. *Hybridoma*, 3 : 195~199, 1984.
- 25) Kozbor, D. et al. : Specific immunoglobulin production and enhanced tumorigenicity following ascites growth of human hybridomas. *J. Immunol. Methods.*, 81 : 31~42, 1985.