

ヒトリンパ芽球様細胞株における 免疫グロブリン産生の研究

高知県立中央病院：癌研究所

赤木 忠厚

岡山大学医学部：第2内科

松田 勇蔵

〔昭和52年1月31日受稿〕

はじめに

今日までに正常人末梢血, Burkittリンパ腫, 骨髄性白血病, その他各種人体材料から, 数多くのリンパ芽球様細胞株が樹立されているが, これらは極く少数の細胞株を除いては, すべてB細胞(骨髄由来あるいはブルザ相当器管由来リンパ球)系に属する細胞株であり,¹⁾殆どどの細胞が免疫グロブリン(Ig)を産生する^{2,3,4,5)}したがって, 抗体産生細胞による抗体産生機構の研究には絶好の材料を提供する。

ところで, 細胞表面Ig(M-Ig)と細胞質内Ig(C-Ig)あるいは分泌Ig(S-Ig)との関係, 産生Igクラス
の細胞分化に伴う変化, 1個の細胞が同時に2種類以上のIgを産生し得るかどうかなどの点については, 未だ解決しなければならない点が多く残されている。

この論文では, われわれの研究室で樹立した4種類のリンパ芽球様細胞株を使用して, このような観点から検査した結果の一部を報告する。

実験材料と実験方法

細胞：われわれの研究室で株化した4種類のリンパ芽球様細胞株を使用した。KO-HL-1は白血性リンパ肉腫症患者末梢血から, KO-HL-2は胃癌原発組織から, KO-HL-3と4は胃癌転移リンパ節から樹立した。培養液は10%牛胎仔血清(FCS)加RPMI 1640を使用し, 5%CO₂下, 37℃で培養を行った。

ヒツジ赤血球ロゼット(E-ロゼット)形成：矢田と橘の方法⁶⁾に準じて行った。培養細胞を 5×10^6 /mlにFCSに浮遊したものと, 同じくFCSに 1×10^8 /mlに浮遊したヒツジ赤血球とを等量混合し, 37℃,

15分反応後, 500rpmで5分間遠沈, そのまま0℃, 60分反応させた。その後静かに再浮遊させその1滴をスライドグラスに取り鏡検した。培養細胞を500個以上数え, 3個以上結合するものを陽性と判定した。

補体結合細胞(EAC-ロゼット)：矢田と橘の方法⁶⁾に準じて行った。西岡の方法⁷⁾で家兎抗ヒツジ赤血球抗体を作り, これよりSephadex G-200カラムクロマトグラフィーで19S分画を得た。この19S抗体でヒツジ赤血球を感作し, さらに10倍稀釈新鮮マウス血清を加えて補体を結合させた(EAC)。 1×10^8 /mlのEACと 5×10^6 /mlの培養細胞を0.2mlずつ等量混合し, 500rpm, 2分遠沈後室温に30分放置し, それを再浮遊後鏡検し3個以上結合せるものを陽性とした。

細胞表面Ig：蛍光色素(フルオレッセイン)標識抗人H鎖(γ, μ, α), L鎖(κ, λ)特異抗血清はBehringwerke社のものを使用した。

培養細胞を磷酸緩衝生理食塩水(PBS)で3回洗滌後, 2×10^7 /mlの細胞浮遊液0.1mlに10倍稀釈抗血清を等量加え, 4℃, 60分反応させた。次いでPBSにて3回洗滌後グリセリン緩衝液(pH7.2)で封入し, 蛍光顕微鏡(千代田光学)で観察した。細胞500個以上を数え, 明らかな輪状, ネックレス状あるいは, segment状の蛍光を有するものを陽性とし, その百分率を算定した。非特異的吸着を考慮に入れ, 0.5%以上の陽性細胞を有するものを陽性と判定した。

細胞質内Ig：培養細胞をPBSで3回洗滌後, スライドグラスに塗沫乾燥, エタノールで5分固定, PBSで洗滌後20倍稀釈蛍光色素標識抗血清を滴下し, 37℃, 40分反応させた。

PBSで洗滌後、蛍光顕微鏡で細胞500個以上を観察した。

クローニング：KO-HL-1についてクローンを分離した。方法は久場川らの軟寒天内コロニー形成法⁹⁾によった。40%のconditioned medium(CM), 20%のFCSを含む0.5% agar(Bacto-agar, Difco)加RPMI1640を下層とし、直径57mmのP-4シャーレ(三春製作所)1個当り 10^5 個あるいは 8×10^3 個になるように調整した。0.3% agar加細胞浮遊液を上に乗重し、5% CO₂下にて培養した。

CMはKO-HL-1細胞 2×10^5 /mlを7日間培養後3000rpm, 30分遠沈して細胞を除いた培養液をミリポアフィルターで濾過して使用した。14日後に実体顕微鏡下にコロニーを判定し、マイクロピペットでコロニーをひとつずつ吸い取り、マイクロテストプレート(Falcon, 3040)に入れてさらに培養を続け、十分に増えたところでP-4シャーレに移した。

結果と考察

E-およびEAC-ロゼットの結果は表1に示す通りで、いずれの細胞株もE-ロゼットは陰性、EAC-ロゼットは陽性でB細胞株としての特徴を有していた。

M-Igは表2に示すごとくKO-HL-1は20代では γ , μ , α (L鎖は未検出)、39代ではすべて陰性、KO-HL-2は γ , α , λ , KO-HL-3は γ , α , k , KO-HL-4は γ , μ , α , λ であった。

C-Igは表3に示すごとく、KO-HL-1は20代では γ , μ (L鎖は未検出)、39代では γ , μ , α , κ , KO-HL-2は μ , λ , κ , KO-HL-3は γ , μ , κ , KO-HL-

4は μ , λ であった。

M-Igは、いずれの細胞も2種類以上のH鎖(但しKO-HL-1の39代ではすべて陰性)と、 κ か λ のいずれか1種類のL鎖を有していた。C-Igについては、H鎖はKO-HL-2, 4が1種類(μ), KO-HL-1, 3が2種類以上を、L鎖はKO-HL-1, 3, 4が1種類、KO-HL-2が2種類(但し κ は陽性の最低限界の値)を有していた。

しかし陽性率はさまざまで、M-Igについては、最高はKO-HL-2の α (56.5%)、最低はKO-HL-1(39代)の0%、C-Igについては、最高はKO-HL-2の μ (81.4%)、最低はKO-HL-2の κ (0.5%)であった。

またH鎖陽性細胞の率とL鎖陽性細胞の率の間には大きくない違いが存在し、一般にH鎖の検出頻度が高かった。われわれの方法では、検出されるH鎖とL鎖が、完全なIg分子を形成しているかどうかを知ることは出来ないが、Finegoldら³⁾は培養リンパ芽球様細胞の合成するH鎖とL鎖は、大部分結合して7Sあるいは18SのIg分子を形成しており、正常のヒトIgと免疫化学的に非常に類似しているか同一であると報告している。しかしわれわれの細胞株で観察されたH鎖とL鎖の検出頻度の差は、両者の間に検出感度の差が存在することを考慮に入れても大きく、やはり過剰に産生され遊離の形で存在するH鎖がかなりあると考えられる。

培養リンパ芽球様細胞は、一般に1種類あるいはそれ以上のIgを産生しているが、1個の細胞が同時に2種類以上のIgを産生しうるか否かに関しては、

表1. E-およびEAC-ロゼットの陽性率(%)

	KO-HL-1 (38代)	KO-HL-2 (65代)	KO-HL-3 (67代)	KO-HL-4 (57代)
E-ロゼット	0.0	0.0	0.0	0.0
EAC-ロゼット	38.9	52.8	1.0	88.8

表2. 細胞表面免疫グロブリン(M-Ig)の陽性率(%)

細胞	γ	μ	α	k	λ
KO-HL-1, 20代	8.6	5.1	3.8	—	—
KO-HL-1, 39代親株	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
" クローンNo.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
" クローンNo.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
" クローンNo.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KO-HL-2	29.4	0.4	56.5	0.2	2.9
KO-HL-3	5.9	0.0	7.3	3.1	0.0
KO-HL-4	1.3	5.9	1.2	0.0	10.3

表3. 細胞質内免疫グロブリン(C-Ig)の陽性率(%)

細胞	γ	μ	α	k	λ
KO-HL-1, 20代	15.9	58.4	0.0	—	—
KO-HL-1, 39代親株	4.4	4.0	3.5	4.6	0.0
“ クローンNo.1	6.9	8.9	6.6	7.5	0.0
“ クローンNo.2	9.2	7.2	18.3	9.5	0.0
“ クローンNo.3	0.0	0.0	1.4	1.9	0.0
KO-HL-2	<0.2	81.4	<0.2	0.5	30.6
KO-HL-3	31.6	16.6	0.0	9.7	0.0
KO-HL-4	0.0	35.7	0.0	0.0	25.3

表4. KO-HL-1細胞(39代)の軟寒天内コロニー形成率

接種細胞数/シャーレ	各シャーレに出現したコロニー数		平均クローニング効率(%)
1,000	0	0	0.05
8,000	54	76	0.81

Takahashiら⁴⁾は蛍光抗体併重染色法を用いてC-Igを検索し、L鎖はいずれか1種類しか検出されないが、H鎖は2種類以上検出されるものがあることを明らかにした。またHinumaとGrace⁹⁾はクローニングを行った細胞についてC-Igを調べ、ひとつのクローンが2種類のH鎖を有することを明らかにしている。われわれの細胞集団全体の検索では、L鎖についてはただ1種類のL鎖しか産生していないようであるが、H鎖については表面にも細胞質内にも2種類以上検出されるものが多かった。そこでこの点をより明らかにするため、KO-HL-1についてクローニングを切った。そのクローニング効率は表4に示すごとく非常に低かった。クローンを3系分離し、その各々についてM-Ig(表2)とC-Ig(表3)を調べた。M-Igは親細胞(39代)が陰性で、クローン細胞もすべてのIgが陰性であった。C-IgはクローンNo.1とNo.2が親細胞と同じく3種類のH鎖(γ , μ , α)と1種類のL鎖(κ)を、クローンNo.3が1種類のH鎖(α)と1種類のL鎖(κ)を有していた。例数は少いけれども、少なくともC-Igについては、ひとつのクローンに由来する細胞が2種類以上のH鎖を有することがあるようである。しかしながら、KO-HL-1の場合クローニング効率が非常に低く多くの細胞を接種しているので、ひとつのコロニーが2個以上の細胞に由来している可能性を否定出来ず、さらにクローニングを繰り返したり、例数を増やして検討をする余地が残されている。

B細胞は個体発生的には初めM-IgとしてIgMを有しており、これがIgG産生細胞の前駆細胞になる

とされており¹⁰⁾次いでニワトリではIgM→IgG→IgAという順序で、Ig産生の転換が起ることが知られている¹¹⁾しかし*in vivo*でみる限りにおいては、大部分の細胞はただ1種類のIgしか有していないようであり¹²⁾転換に際し同時に2種類以上のC_H geneが活性化されることは殆んどないことを示し、*in vitro*でリンパ芽球様細胞株にみられる所見と著しい対比を示す。その理由はよくわからないが、B細胞の分化の差を示すのか、あるいは*in vivo*での規則的な転換を規制している調節機構が、*in vitro*では失われるのかも知れない。

ひとつの細胞株で異ったIg産生を示すクローンが分離されたことは、もとの親の細胞株が異ったクローンのmixed populationであることを必ずしも意味しない。RuddersとRoss¹³⁾は慢性リンパ性白血病患者末梢血リンパ球のM-IgとC-Igを調べたところ、IgG(κ)とIgA(κ)のいずれかを持った2種類のリンパ球から成り、これらIgG(κ)とIgA(κ)が同じidiotypicを持つことを見出している。同じB細胞クローンがC_H geneのみの変化を、生理的な分化の過程で、あるいは抗原刺激等のなんらかの引き金によって起す可能性が大きい。

Ig陽性細胞の率はさまざまで、いずれのIgも有しない細胞がかなりの率混在しているが、これらの陰性細胞が恒常的にIg産生陰性でないことは、Ig陰性細胞のみをとり出しても、まもなく元と同じような割合に陽性細胞がみられるというLitwinとLinの実験¹⁴⁾から明らかである。クローニングを行っても陽性細胞と陰性細胞が混在するというわれわれの実

験もこの見解を支持する。

M-IgはC-IgあるいはS-Igと同じ idio type 特異性を有し、細胞表面における抗原認識の受容体分子を構成すると考えられる。M-IgとC-Igを同時に調べた報告は少ないが、われわれのデータでは、L鎖に関しては大体M-IgとC-Igの種類が一致している。しかしH鎖に関しては、M-IgとC-Igで特別の相関はみられず、KO-HL-2のようにM-Igが γ , α , C-Igが μ と全く別のH鎖がみられるものもある。また陽性率もまちまちであった。

幼若マウスの脾細胞のM-Igは殆んど monomeric なIgMであり、抗原刺激によって初めてIgGを有するものが増えてくる¹⁵⁾。またリンパ性白血病のM-IgはIgMとIgDが多い¹⁶⁾。M-Igも同じく細胞質内で合成されるにしても、その合成がS-Igとは別の機構で調節されるとすれば、¹⁷⁾C-Igの大部分はS-Igとなるので、M-IgとC-IgのH鎖が異なることも有り得ると思われる。しかしこのように各種のH鎖が無秩序に出現することは、やはり *in vitro* の条件でIg産

生の調節機構、特に C_H gene の活性化に混乱が生じていると考えられ、このような長期培養リンパ芽球様細胞株での成績から、*in vivo* の現象を解釈する場合には慎重でなければならない。

ま と め

白血性リンパ肉腫症患者末梢血、胃癌原発組織および胃癌転移リンパ節から樹立した、4種類のB細胞系リンパ芽球様細胞株のM-IgおよびC-Igを蛍光抗体法によって調べた。また1細胞株についてはクローニングを行い、分離したクローンについてもM-IgとC-Igを調べた。その結果、

- ① 1個の細胞はただ1種類のL鎖しか産生していない。
- ② H鎖については2種類以上産生しているものがある。
- ③ M-IgとC-Igのクラスの間には特別の相関性がみられないことがわかった。

文 献

- 1) Moore, G. E., "Human Tumor Cells *in Vitro*", ed. J. Fogh, p. 299, Plenum Press, New York, 1975.
- 2) Fahey, J. L., Finegold, I., Rabson, A. S. and Manaker, R. A., Science, 152: 1259, 1966.
- 3) Finegold, I., Fahey, J. L. and Granger, H., J. Immunol., 99: 839, 1967.
- 4) Takahashi, M., Yagi, Y., Moore, G. E. and Pressman, D., J. Immunol., 102: 1274, 1969.
- 5) Tanigaki, N., Yagi, Y., Moore, G. E. and Pressman, D., J. Immunol., 97: 634, 1966.
- 6) 矢田純一, 橋 武彦, "免疫実験操作法, II, 日本免疫学会編", p. 473, 1972.
- 7) 西岡久寿弥, 蛋白質・核酸・酵素, 11: 1485, 1966.
- 8) 久場川博三, 岸紀代三, 出井章三, 田坂捷雄, 浜島義博, 第4回日本免疫学会総会記録, p. 366, 1974.
- 9) Hinuma, Y. and Grace, J. T. Jr., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 124: 107, 1967.
- 10) Cooper, M. D., Lawton, A. R. and Kincade, P. W., "Contemporary Topics in Immunobiology", ed. M. G. Hanna, 1: 33, Plenum Press, New York, 1972.
- 11) Kincade, P. W. and Cooper, M. D., Science, 179: 398, 1973.
- 12) Lennox, E. S. and Cohn, M., Ann. Rev. Biochem., 36: pt. 1: 365, 1967.
- 13) Rudders, R. A. and Ross, R., J. Exp. Med., 142: 549, 1975.
- 14) Litwin, S. D. and Lin, P. K., Cell. Immunol., 24: 270, 1976.
- 15) Uhr, J. W., Vitetta, E. S. and Melcher, U. K., "Cellular Selection and Regulation in the Immune Response" ed. G. M. Edelman, p. 133, Raven Press, New York, 1974.
- 16) Kubo, R. T., Grey, H. M. and Pirofsky, B., J. Immunol., 112: 1952, 1974.
- 17) Lerner, R. A., McConahey, P. J., Jansen, I. and Dixon, F. J., J. Exp. Med., 135: 136, 1972.

**Pattern of immunoglobulin production
in human lymphoblastoid cell lines**

Tadaatsu AKAGI* and Yuzo MATSUDA**

Cancer Institute, Kochi Prefectural Central Hospital, Kochi*

and Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School,

Okayama**

Membrane-associated (M-Ig) and cytoplasmic immunoglobulins (C-Ig) of 4 human lymphoblastoid cell lines and 3 clones isolated from one of them were examined by immunofluorescence test. It was found that individual cells produced only a single type of light chain components and one or more types of heavy chain components of Ig. There was no specific correlation between the Ig types of M-Ig and C-Ig.