



Characterization of Stable Epstein-Barr (EB) Virus Transformed Cell Lines and Mouse-Human Hybridomas Producing a Large Quantity of Anti-Tetanus Toxoid (TT) Monoclonal Antibody

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 皆川, 英孝 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1300

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 23号	学位授与年月日	昭和62年 3月18日
氏名	皆川英孝		
論文題目	Characterization of Stable Epstein-Barr (EB) Virus Transformed Cell Lines and Mouse-Human Hybridomas Producing a Large Quantity of Anti-Tetanus Toxoid (TT) Monoclonal Antibody (抗破傷風トキソイドモノクローナル抗体を大量に産生するマウス-ヒトハイブリドーマ細胞、及び安定な Epstein-Barr ウイルストランスフォーム細胞の解析)		

医学博士 皆川英孝
論文題目

Characterization of Stable Epstein-Barr (EB) Virus Transformed Cell Lines and Mouse-Human Hybridomas Producing a Large Quantity of Anti-Tetanus Toxoid (TT) Monoclonal Antibody

(抗破傷風トキソイドモノクローナル抗体を大量に産生するマウス-ヒトハイブリドーマ細胞、及び安定な Epstein-Barr ウイルストランスフォーム細胞の解析)

論文の内容の要旨

マウスを用いた系により、種々のモノクローナル抗体が作られ、抗原の解析や疾病の診断等に広く使用されている。しかし、疾患の治療にマウスモノクローナル抗体を使用することは、異種タンパク質であるがゆえの問題が多い。そこで、ヒトモノクローナル抗体を安定して供給する系の確立が望まれているが、現在までに成功した例は少ない。我々は、Epstein-Barr ウイルス (EBV) を用いてヒトモノクローナル抗破傷風トキソイド抗体産生細胞株を作製し、さらに効率よく抗体を得る目的で、マウスミエローマ細胞との細胞融合を行い、ヌードマウスに移植可能でありヒト抗破傷風トキソイド抗体を産生するハイブリドーマ細胞を得た。

3カ月以内に破傷風の予防接種を受け、血清中の抗体価が上昇している正常人の末梢血よりリンパ球を分離した。このリンパ球を、Pokeweed mitogen 存在下で抗原である破傷風トキソイドで3日間感作した後、B 95-8細胞由来のEBVによりトランスフォームさせた。

トランスフォームした細胞のコロニーは4枚の96穴プレート上で369穴中の214穴(58%)で見られ、抗体の検出を行った156穴中の15穴(10%)に抗破傷風トキソイド抗体が検出された。最終的に9細胞株が確立され、IgM及びIgG抗体が得られた。これらのうち最も高い抗体値を示す株についてクローニングを行い、3G6株(10 μ g/mlのIgM抗体を産生)を得た。この3G6細胞株は樹立後1年以上経過しているが、安定した抗体産生能を維持している。しかし、EBVトランスフォーム細胞では、マウスハイブリドーマ細胞のようにマウス腹水型として大量の抗体を得ることは出来ないため、3G6細胞とマウスミエローマ細胞(X63 Ag 8.653)とのハイブリドーマ細胞を作製した。最終的には、8株の特異抗体産生株が樹立され、そのうち1株であるHE 719細胞株では10カ月以上連続して安定した抗体産生能を維持し、10 μ g/10⁵細胞/日の濃度で抗体を産生している。このHE 719細胞の染色体を調べたところ、20本のメタセントリック染色体が合計110本の染色体中で見られた。アロ抗原を調べた結果、HE 719細胞にはマウスミエローマ細胞由来のH-2^d抗原と、ヒトEBVトランスフォーム細胞由来のHLA-A(24, 33), B(35, 60)抗原が検出された。このマウス-ヒトハイブリドーマ細胞を移植したヌードマウスより得られた腹水中には約0.5 mg/mlの特異抗体が含まれ、その抗体活性も培養上清中の約100倍であった。

今回我々は破傷風トキソイドのある構成成分に対して反応する抗体を効率よく産生させる系を確立することが出来た。この抗体はヒト由来のモノクローナル抗体であることから従来の異種抗体に比して治療への応用において高い有用性を持つものとなる。さらに、この方法により他の抗原に対してもヒトモノクローナル抗体を効率よく作製する可能性を期待しうることから、その応用範囲は広がるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞融合等の方法を用いて種々の単クローン抗体が作製されているが、大別して主に2種類に分類される。一つは各種細胞の膜表面の分化抗原に対する単クローン抗体と、他の一つは治療または細胞の機能の制御に関する分子に対する単クローン抗体である。特に後者において、ヒトの疾病治療や予防の目的で各種抗原に対する特異抗体を、長期間安定にしかも大量産生する雑種細胞株を作製するために、国内外で厳しい努力が続けられている。

申請者は、破傷風トキソイドを抗原として安定な単クローン抗体産生株を得る方法の開発を試みた。あらかじめ予防接種を受けた健康人の末梢血リンパ球を試験管内で分裂誘発剤の存在下で破傷風トキソイドで3

日間再感作し、さらにエプスタイン・パール (EB) ウイルスを産生するマーマセット系の B 95-8 細胞培養上清を加え、形質転換して最終的に IgM 及び IgG 抗体を産生する 9 細胞株を確立した。これらのうち、高値の IgM 抗体を産生する 3 G 6 株は、1 年以上を経過しても安定した抗体産生能の維持を認めた。この 3 G 6 細胞株とマウス骨髄腫細胞との融合雑種細胞はヌードマウスに接種することにより約 0.5 mg/ml という高濃度腹水型抗体を作成した。この雑種細胞の染色体は 110 本で、そのうち 20 本はヒト由来であった。細胞膜表面抗原は、3 G 6 という親株由来のヒトの HLA-A、B 抗原とマウス骨髄腫細胞由来の H-2^d 抗原とを有することが確かめられた。

上記論文は委員会において、形質転換したリンパ球とマウス骨髄腫細胞とのヘテロの雑種細胞を作成し、ヌードマウス腹水中でヒト単クローン抗体を安定で、しかも効率よく大量産生させた点に、独自性を有する新しい方法論的方向性を明らかにした研究であると評価された。更に、審査の過程で、以下の諸問題が論議された。

1. 本研究が指標としたヒト破傷風抗毒素産生雑種細胞株作成に関する国内外における同テーマによりなる研究と、どの点において明確な差があるのか、及び方法論において優先権があるか。
2. ヒト由来及びマウス由来の染色体は、融合細胞中で本数、比率は安定しているか。
3. この細胞の単クローン抗体は破傷風毒素のどのようなフラグメントと結合するか、また中和活性がみられるか。
4. 本単クローン抗体の治療への有用性に関して解決しなければならない問題点。
5. この細胞の産生抗体が、単一の抗原決定基を認識しているとの保証。
6. マウス骨髄腫細胞をパートナーとし、ヒトリンパ腫細胞あるいは骨髄腫細胞をパートナーとしなかった理由。

これらに対する申請者の応答は適切であり、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文に値する内容を備えているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	櫻井	信夫			
	副査	教授	山下	昭	副査	教授	西村 願 治
	副査	助教授	小出	幸夫	副査	講師	本郷 輝 明