



## ヒト肺胞マクロファージと類上皮細胞肉芽腫に反応する単クローン性抗体、AMH-2、AMH-3

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: 秋山, 仁一郎 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/914">http://hdl.handle.net/10271/914</a>

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	医博第 61号	学位授与年月日	昭和63年 3月25日
氏名	秋山 仁一郎		
論文題目	ヒト肺胞マクロファージと類上皮細胞肉芽腫に反応する単クローン性抗体、AMH-2, AMH-3		

ヒト肺胞マクロファージと類上皮細胞肉芽腫に反応する単クローン性抗体、  
AMH-2, AMH-3

### 論文の内容の要旨

#### 目的:

肺胞マクロファージ(M $\phi$ )は食能以外に抗原提示能、免疫調節機能、腫瘍細胞障害作用などの多様な機能を発揮し、肺内の免疫応答において重要な役割を演じており更に、各種肺疾患の病因に深く関与している事が明らかにされてきた。肺胞M $\phi$ の分化成熟と病態変化を解明する目的で、ヒト肺胞M $\phi$ を認識する単クローン性抗体を作製し、それらを用いて陽性細胞の組織局在、喫煙による影響、および肺肉芽腫病変によるM $\phi$ の変化などについて検討した。

#### 材料および方法:

1. 単クローン性抗体の作製: 肺癌などの限局性肺病変をもつ喫煙者の対側健常肺に気管支肺胞洗浄(BAL)を施行し、得られたBAL細胞を抗原として、BALB/Cマウスに過免疫した。細胞融合法により抗体産生株を準備し、細胞性ラジオイムノアッセイにより選別して、2種類の単クローン性抗体(AMH-2, AMH-3)を準備した。
2. 標的細胞および組織の準備: 末梢血単核球の分離は比重遠心法および管底付着法により行い、一部の単球は10%牛胎児血清添加RPMI-1640溶液中において、48時間培養した。肺、肝、脾、腎、皮膚の各組織は手術時に採取し、新鮮凍結切片を準備した。
3. フローサイトメトリー: 第2抗体にFITC標識ヤギF(ab')<sub>2</sub>・抗マウスIgGを用いた間接免疫蛍光法により、EPICS-Vにて解析した。
4. 免疫組織化学的染色: 組織に対しては、Avidin Biotin Complex法を用いた酵素抗体法により検索した。
5. 免疫グロブリンサブクラスの同定: Ouchterlony法により行った。

#### 成績:

1. 単球・腹腔M $\phi$ との反応: 末梢血単球はAMH-3は反応性を示さず、AMH-2は $7.8 \pm 3.4\%$ の陽性率で弱く反応した。両抗体は何れも腹腔M $\phi$ と反応しなかった。単球を培養すると両抗体ともに陽性率の増加が認められ、各々 $16.7 \pm 2.3\%$ 、 $13.9 \pm 1.1\%$ の陽性率を示した。
2. BAL-M $\phi$ との反応性: AMH-2およびAMH-3は非喫煙者のBAL-M $\phi$ と強く反応し、陽性率は各々 $85.9 \pm 5.7\%$ 、 $87.6 \pm 6.7\%$ であった。喫煙者のBAL-M $\phi$ の両抗体の反応性は有意に低下しており( $P < 0.01$ )、陽性率は各々 $33.8 \pm 22.0\%$ 、 $44.5 \pm 21.6\%$ であった。
3. 肺組織におけるAMH陽性細胞の局在: AMH-2とAMH-3は何れも肺胞腔内のM $\phi$ と強く反応したが、AMH-3が肺間質M $\phi$ の大多数と強く反応性を示したのに対し、AMH-2はその一部の細胞と弱く反応した。過敏性肺臓炎およびサルコイドーシス患者肺の肉芽腫病変局所にみられる類上皮細胞は両抗体の何れに対しても強陽性を示した。
4. その他各種組織における陽性細胞の局在: AMH-3は肝Kupffer細胞や脾の胚中心以外のM $\phi$ と反

応性を示したが、AMH-2は何れとも反応しなかった。また両抗体は腎臓メサンギウムや皮膚Langerhans細胞と反応性を示さなかった。抗体のサブクラスは、AMH-2はIgG<sub>1</sub>、AMH-3はIgG<sub>2b</sub>であった。

#### 考察および結語：

今回報告したAMH-2およびAMH-3は肺M $\phi$ と強く反応し、末梢血単球と殆ど反応性を示さず、肺M $\phi$ の分化抗原を認識するものである事が明らかとなった。肺間質M $\phi$ は血液単球と肺胞M $\phi$ の分化の移行型であり、類上皮細胞は単球・M $\phi$ 系細胞より分化するとされており、今回の検討において、AMH-2、AMH-3が単球、肺間質M $\phi$ 、肺胞M $\phi$ 、類上皮細胞と様々な反応性を示した事は、肺M $\phi$ が膜抗原上不均一な細胞集団を形成しており、両抗体は肺M $\phi$ の分化成熟の程度の違いや複数の亜群の存在を表現している可能性が示唆された。以上よりAMH-2、AMH-3は肺M $\phi$ の機能的亜群の検索や肉芽腫性肺疾患の成立機序の研究に極めて有用であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

肺胞マクロファージ(alveolar macrophages ; A・M $\phi$ )は肺における感染症や肉芽腫性病変の発症や消長に密接に関係すると考えられているが、その起源、分布・増殖、動態、機能などについては不明の点が多い。本申請者はヒトA・M $\phi$ の分化・成熟機構と病態変化を解明する目的で、ヒトA・M $\phi$ を認識する2種類の単クローン性抗体を作製し、それらを用いて組織内局在、喫煙による影響、肉芽腫性病変による変化などを検討し以下の結果をえた。

1. 肺癌および肺結核などの限局性肺病変をもつ喫煙者の対側健常肺よりえられた気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage ; BAL)細胞を抗原としてBALB/cマウスを過免疫し、細胞融合法によりA・M $\phi$ を認識する2種類の単クローン性抗体AMH-2(IgG<sub>1</sub>)とAMH-3(IgG<sub>2b</sub>)を作成することに成功した。
2. 両抗体を用いた免疫組織化学的染色、フローサイトメトリー等により陽性細胞の局在を検索した。(1)両抗体は非喫煙者のBAL-M $\phi$ と強く反応し、85%以上の陽性率を示した。しかし、喫煙者のBAL-M $\phi$ との反応性はいずれも有意に低下していた。(2)両抗体は肺胞腔内のM $\phi$ と強く反応した。肺間質M $\phi$ はAMH-3とのみ反応した。(3)両抗体はいずれも腹腔滲出M $\phi$ とは反応しなかった。末梢血単球はAMH-2とのみ軽度の反応性を示したが、単球を2日間培養すると両抗体とも陽性率が上昇した。(4)肝Kupffer細胞と脾M $\phi$ (胚中心以外)はAMH-3とのみ反応した。腎メサンギウムと皮膚ランゲルハンス細胞とはいずれも反応しなかった。(5)過敏性肺炎およびサルコイドーシス患者肺の病変局所の類上皮細胞とは両抗体とも強く反応した。

これらの結果より、両抗体はいずれも肺M $\phi$ と強い反応性を示す単クローン性抗体であり、肺M $\phi$ の分化成熟の程度の違いや複数の亜群の存在することを主張した。とくに、AMH-2は肺M $\phi$ に特異的な分化抗原を認識する抗体であることを示した。これらの解析所見とAMH-2の独自性、有用性に対し高い評価が与えられ、今後の発展が期待された。

以上の成果に対し下記の諸点について質疑がおこなわれた。

1. 両抗体の認識する対応抗原の分子量および物理化学的性状について、
2. すでに報告されたA・M $\phi$ に対する単クローン性抗体と両抗体との相違点について、
3. 各種マクロファージ細胞株との反応性について、
4. 喫煙によるA・M $\phi$ の変化と、両抗体との反応性が低下する理由、
5. 珪肺、塵肺、結核、サルコイドーシスなどの患者のA・M $\phi$ との反応性および病変の進行との関連性について、
6. 両抗体を用いた重染色によるM $\phi$ 膜抗原の検討、
7. A・M $\phi$ の各種生物活性に対する両抗体の影響について、
8. A・M $\phi$ と腹腔M $\phi$ に対する両抗体の反応性の相違をいかに説明するか。

以上の点に対し申請者はおおむね適正な応答をするともに対応抗原の詳細な分析など残された問題については現在検討を進めている旨の回答をおこなった。

以上の審査の結果、本論文はヒト肺胞マクロファージの分化・成熟機構と病態変化を解明する上できわめて興味ある知見を提示するものであると考えられ、学位授与に値する十分な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	山下	昭				
	副査	教授	吉田	孝人	副査	教授	吉見	輝也
	副査	助教授	瀧川	雅浩	副査	助教授	森田	豊彦