



Establishment and Characterization of a New Human B Lymphoblastoid Cell Line in Response to a Low Molecular Weight B Cell Growth Factor

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: 後藤, 吉規 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/917

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 64号	学位授与年月日	昭和63年 3月25日
氏 名	後 藤 吉 規		
論文題目	Establishment and Characterization of a New Human B Lymphoblastoid Cell Line in Response to a Low Molecular Weight B Cell Growth Factor (低分子量 B 細胞成長因子に反応する新しいヒト B リンパ球系細胞株の樹立および特性に関する研究)		

Establishment and Characterization of a New Human B Lymphoblastoid Cell Line in Response to a Low Molecular Weight B Cell Growth Factor (低分子量B細胞成長因子に反応する新しいヒトBリンパ球系細胞株の樹立および特性に関する研究)

論文の内容の要旨

B細胞成長因子(BCGF)は、マイトジェンで刺激されたヘルパーT細胞より分泌され、抗原等の刺激で活性化されたB細胞の増殖を促進するリンフォカインの一種で、既に complementary DNA も同定されている。今までBCGFの標的細胞としては、末梢血より煩雑な操作を繰り返して分離したB細胞が用いられてきたが、今回我々はBCGFに反応性を有するヒトBリンパ球系細胞株(KS-3細胞)を樹立したので、この細胞株の特性およびBCGFに対する反応性について報告する。

〔方法〕

- 1) 1986年2月22日骨髓腫(IgG κ 型)とバセドウ病を合併した48歳の女性より骨髓を採取し、Ficoll-Hypaque比重遠心法にて有核細胞を分離し、20%牛胎児血清、1%ヒトBCGFを含むMcCoy's 5A培地に浮遊させ炭酸ガス培養装置に入れた。培養液交換は週2回行った。
- 2) 各種染色法、電子顕微鏡標本作製、E・EA・EACロゼット陽性細胞検出法、染色体分析、Epstein-Barr virus 関連核抗原の検出は常法に従った。
- 3) 表面マーカーは蛍光抗体法及びfluorescent activated cell sorterにて検討した。分泌免疫グロブリンはimmunoblot法で検討した。
- 4) KS-3細胞のリンフォカインに対する反応性：96穴のウェルに 1×10^4 個の細胞を入れ、一定量のリンフォカイン(BCGF、インターロイキン2、インターフェロン γ)及び2%牛胎児血清、McCoy's 5A培地を加え48時間培養した。結果は $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込み及びMTT法にて検討した。

〔結果〕

- 1) 初代培養より約3か月間は細胞の増殖は認められなかったが、その後細胞は集塊状に増殖を開始した。BCGF濃度は継代数10代で0.5%に減じ、14代目で無添加とした。一方牛胎児血清濃度は16代で15%、27代で10%にまで減少させたが、増殖を続けていた。昭和62年12月5日現在で継代数は64代である。倍加時間は約36時間であった。
- 2) メイギムザ染色像：核/細胞質比は高く、好塩基性の細胞質を有し、核では粗なクロマチン構造と明瞭な核小体が観察された。PAS、コロイド鉄、メチルグリーン-ピロニン染色は陽性で、ペルオキシダーゼ、エステラーゼ、ズダン黒染色は陰性であった。
- 3) 電顕像：細胞質ではミトコンドリアが比較的多く認められ、粗面小胞体も散見された。核小体も明瞭で陥入核が見られ、リンパ芽球様細胞の形態を有していた。
- 4) 表面マーカー：E、EA(IgG Fc receptor)は陰性で、EAC(C3 receptor)は58%の細胞に検出された。表面免疫グロブリンはIgA(81.4%)、IgG(1.3%)、 κ (21.8%)及び λ (57.2%)が陽性で、IgM、IgDは陰性であった。B細胞抗原(CD20[98.5%]、CD21[12.0%])及びDR抗原(90.6%)は陽性であったが、T細胞抗原(CD3、CD4、CD8)、前B細胞抗原(CD10)、単球・顆粒球系抗原(CD11b、CD13、CD33)及びIL2 receptorはいずれも陰性であった。本細胞ではIgG κ 及び λ の分泌が認められた。EBNAは陽性であった。
- 5) 染色体：KS-3細胞は69%に46XXのmodal numberを有した。
- 6) リンフォカイン反応性：KS-3細胞は、1~5%のBCGFに対し濃度依存性の増殖が認められたが、インターロイキン2、インターフェロン γ には反応しなかった。

〔考察〕

我々は骨髓腫及びバセドウ病の合併例よりヒトBリンパ球系細胞株(KS-3細胞)を樹立した。本細胞

は、電顕像、表面免疫グロブリン、EBNA等の所見より骨髓腫由来ではなく、EBvirusによって transformされた末梢Bリンパ球であると考えられた。表面免疫グロブリンがIgA型であること、DR(+), B1(+), 補体レセプター(+)という所見より本細胞の分化程度は成熟期と考えられた。この細胞は、従来報告されているBリンパ球系細胞株と異なり、BCGFに対し濃度依存性に反応し、インターロイキン2には反応せず、分化程度が成熟に近いので、BCGFの測定、receptorの研究等に有用な研究材料になりうると考えられた。

論文審査の結果の要旨

B細胞成長因子(BCGF)は抗原などで活性化したB細胞に対する増殖促進因子で分子量は約12,000であり、そのcomplementary DNAも同定されている。しかし、BCGFを定量的に測定しようとする場合、末梢血から複雑な手段でB細胞を分離する必要がある。従ってBCGFによく反応するヒトB細胞系の細胞株があれば、BCGFの測定に便利である。このような状況において、申請者は、それらの条件に合致する細胞株を樹立し報告した。

形質細胞腫とパセドウ病を有する48歳の女性の骨髓を採取し、McCoy's 5A培地にて培養し、炭酸ガス培養装置に入れた。3カ月以後細胞は増殖を始め、継代は64代に及び約22カ月を経過した。栄養要求性は減じ、細胞株の樹立とみなされた。

株細胞は倍化時間36時間であり、組織学的、電顕的観察によりリンパ芽球様でありKS-3と名付けた。KS-3細胞はEBウイルス関連核抗原が陽性でEBウイルスによりtransformされた末梢B細胞であり、表面免疫グロブリンがIgA型、DR抗原陽性、CD20陽性、補体レセプター陽性であることより成熟期であることがわかった。

KS-3細胞は1~5%のBCGFに対して濃度依存性の増殖が認められた。しかし、インターロイキン2、インターフェロン α に対しては、反応を示さなかった。尚、本リンパ球の増殖は ^3H -thymidine 取り込み法とMTT法で行い、両者の結果はよく相関していた。

以上の論文内容に対して次の試問がなされた。

1. この細胞の由来は何か。
2. この細胞は κ 及び λ いずれかが陽性でポリクローナルであるが、クローニングをする必要はないのか。
3. BCGFの単位は何か。
4. EBウイルス感染の時期はいつか。
5. この株細胞の実際の有用性はあるか。
6. このBCGFは、今までクローニングされているインターロイキンと同じものか。
7. MTT測定法は定量性があるか。

試問に対する申請者の解答は学位授与に値する水準に達しており、その結果本研究論文を学位授与に値するものと全審査員が一致して判定した。

論文審査担当者	主査	教授	喜納	勇			
	副査	教授	山崎	昇	副査	教授	吉田孝人
	副査	助教授	太田	英彦	副査	講師	南野正隆