

学 位 論 文 題 名

イヌの白血球に対するモノクローナル抗体の作出と
フローサイトメトリーおよび免疫組織化学による反応性の検討

学位論文内容の要旨

モノクローナル抗体の作製技術が開発されて以来、免疫担当細胞の表面抗原を認識する多くのモノクローナル抗体が作製され、マウスやヒトの免疫系の解析に用いられてきた。近年、小型の実験動物以外でも、ウマ、反芻動物、ブタなどの大型動物の白血球に対する抗体が作製され、免疫系の解析が進められている。イヌは獣医学的に重要な動物の一つであるが、その免疫系に関する基礎的な研究は十分ではない。本研究の目的は、フローサイトメトリーおよび免疫組織化学に有用なイヌ白血球表面抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、イヌの免疫系の解析を行うことである。

2匹のBALB/cマウスにイヌの胸腺細胞とフロイント完全アジュバントからなるエマルジョンを皮下接種した。16週間後、イヌの末梢血から分離した白血球を静脈内および腹腔内に投与して追加免疫を行った。4日後にマウスの脾臓から脾細胞を調製し、定法に従ってマウスミエローマ細胞株（P3U1）と細胞融合を行ってハイブリドーマを作出した。コロニーを形成したウェルの培養上清について、フローサイトメトリー（FCM）による一次スクリーニングを行い、169個のハイブリドーマ中、末梢血白血球と反応を示すものが99個認められた。主としてリンパ系細胞あるいは非リンパ系細胞のいずれか一方と反応する抗体を産生しているハイブリドーマを選択し、免疫組織化学による二次スクリーニングを行った。

第I章で取り上げた169.1抗体は、FCMによるスクリーニングで主に非リンパ球と反応し、免疫組織化学では胸腺の上皮性細網細胞および脾臓の蔕組織で陽性反応を示すものであった。この抗体を用いて、免疫系、神経系をはじめとした全身の主要な臓器において抗体陽性細胞の分布を免疫組織化学により検索した。また、免疫組織化学で最も強い陽性反応が得られた耳下腺からの組織抽出抗原を用いて、免疫ブロッティング法による認識抗原分子量の解析を行った。

169.1抗体（マウスIgM）は、FCMによる解析ではリンパ球集団とは反応せず、非リンパ球集団と反応を示した。非リンパ球集団の中で最も強く反応した細胞群は、プラスチックシャーレ処理によって完全に除去され、側方散乱光の強度がリンパ球よりやや強いことから単球であると考えられる。一方、免疫組織化学では、胸腺の上皮性細胞、脾臓の莢組織、耳下腺の導管系などの上皮組織および末梢神経系ニューロンの細胞質に反応が認められたが、組織中の単球・マクロファージ系の細胞に陽性反応は認められなかった。169.1抗体の認識分子量は48および52kDaであった。

以上の所見より、169.1抗体は限られた細胞に含まれ、細胞形態の維持に関係している抗原を認識すると考えられた。また胸腺の上皮性細胞が特異的に染色される一方で、胸腺内にこの陽性細胞を欠く特殊な領域の存在することが分かった。

第Ⅱ章では、FCMによるスクリーニングで主にリンパ球集団と反応し、免疫組織化学でもリンパ球に陽性反応が認められる抗体（59.4抗体）を選択して性状解析を進めた。胸腺、末梢血および脾臓から分離した白血球について単染色FCM解析を行うとともに、末梢血リンパ球については59.4抗体と市販抗体（抗Thy-1、抗CD4および抗CD8抗体）を用いた二重染色FCM解析を行った。免疫組織化学では、胸腺および脾臓における59.4陽性細胞の分布を検索し、胸腺の連続切片に対して59.4抗体、上記の市販抗体および抗サイトケラチン抗体を用いた免疫染色を施して比較した。

検索の結果、FCMでの59.4抗体（マウスIgG1）とリンパ球の反応性は蛍光強度の違いによって3段階に分けることができた。胸腺のリンパ球は弱あるいは中等度に陽性を示した。末梢血および脾臓のリンパ球は中等度陽性群と強陽性群に分けられた。末梢血リンパ球に対する二重染色FCM解析によって、CD8陽性細胞は59.4強陽性集団に含まれること、CD4陽性細胞の半数が中等度陽性細胞に含まれることが分かった。59.4抗体を用いた胸腺の免疫組織化学では、陽性細胞は主に胸腺髄質に認められた。一部の陽性リンパ球は胸腺の皮髄境界付近に集塊を形成しており、この部位は第Ⅰ章で述べた細胞を欠く領域と一致していた。脾臓では辺縁帯から赤脾髄にかけて強陽性を示すリンパ球が散在していた。

以上の所見より、59.4抗体が認識する抗原は、胸腺内で比較的分化の進んだTリンパ球で発現し始め、末梢リンパ組織内でリンパ球が成熟あるいは活性化すると発現量がより多くなると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	岩	永	敏	彦
副査	教授	橋	本		晃
副査	教授	小	沼		操
副査	助教授	橋	本	善	春

学位論文題名

イヌの白血球に対するモノクローナル抗体の作出と フローサイトメトリーおよび免疫組織化学による反応性の検討

免疫担当細胞の表面抗原を認識するモノクローナル抗体が多数作製され、様々な動物の免疫系の解析に用いられているが、イヌの免疫系に関する基礎的な研究は十分でない。申請者は、フローサイトメトリー（FCM）および免疫組織化学に有用な白血球に対するモノクローナル抗体を独自に作製し、イヌの免疫系の解析を行った。

イヌの胸腺細胞をマウスに免疫して得られた169個のハイブリドーマ中、末梢血白血球と反応するものが99個認められた。この中からリンパ球系細胞に反応するものと非リンパ球系細胞に反応するものを一つずつ選択し、FCMと免疫組織化学による検索を行った。

第Ⅰ章で取りあげた169.1抗体（マウスIgM）は、FCMによる解析では、非リンパ球集団と反応した。最も強く反応した細胞群はプラスチックシャーレ処理によって完全に除去され、側方散乱光の強度がリンパ球よりやや強いことから単球であると考えられた。一方、免疫組織化学では、胸腺の上皮性細網細胞、表皮、耳下腺の導管系などの上皮組織、および末梢神経系ニューロンの細胞質に陽性反応が認められ、細胞形態の維持に関係している抗原を認識していると考えられたが、組織中の単球・マクロファージ系の細胞には陽性反応は認められなかった。169.1抗体の認識抗原分子量は48および52kDaであった。

第Ⅱ章では、主にリンパ球集団と反応する59.4抗体（マウスIgG1）を取りあげた。FCMによる解析で、胸腺のリンパ球は弱あるいは中等度に陽性を示した。末梢血および脾臓のリンパ球は中等度陽性群と強陽性群に分けられた。末梢血リンパ球に対する二重染色FCMにより、CD8陽性細胞は59.4強陽性集団に含まれること、CD4陽性細胞の半数が中等度に陽性を示すことが明らかになった。胸腺の免疫組織化学では、陽性細胞は主に胸腺髄質に認められた。また、胸腺の皮髄境界付近に細網細胞を欠く特殊な領域が存在し、この領域のリンパ球が59.4抗体に選択的に反応することが示された。脾臓では、辺縁帯から赤脾髄にかけて強陽性を示すリンパ球が散在していた。59.4抗体が認識する抗原は、胸腺内で比較的分化の進んだTリンパ球で発現し始め、末梢リンパ組織内でリ

ンパ球が成熟あるいは活性化すると発現量がより多くなると考えられた。

以上のように、申請者は、イヌの白血球に対するモノクローナル抗体を作製し、FCMと免疫組織化学に応用することにより、免疫系の解析に新知見をもたらした。よって審査員一同は、岩見由生彦氏が博士（獣医学）の学位を受けるに資格を有するものと認めた。