

氏名	嶋田俊秀
学位(専攻分野)	博士 (医学)
学位記番号	医博第1403号
学位授与の日付	平成4年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科病理系専攻
学位論文題目	Detection of IgA binding site by flow cytometry with fluorescent microspheres (蛍光標識微粒子——フローサイトメトリー法による細胞表面IgA結合部位の検索法の開発)
論文調査委員	(主査) 教授 鈴木康弘 教授 内田温士 教授 杉山武敏

### 論文内容の要旨

〔目的〕 IgA抗体は、生体と外界の接点である粘膜性防御の上で重要な役割を担っており、臨床的にもIgA欠損症やIgA腎症の成因への関与が示唆されるが、その産生調節機構や代謝経路については未だ不明の点が多く、解明が待たれている。IgA Fcレセプター (Fc $\alpha$ R) は、各種細胞株やヒト及びマウスリンパ球表面に発現・誘導されることから、IgA産生調節機構に深く関わる分子として注目されている。従来Fc $\alpha$ Rの解析には、赤血球ロゼット法等が行われてきたが、単クローン抗体の作製等分子レベルでの検索の為に、簡便性、感度および定量性の改善が必要と考えられた。以上の理由から、蛍光微粒子 (FMS) ロゼット—Flow cytometry法によるFc $\alpha$ Rの高感度検出法の開発を試み、間接蛍光法とも比較検討した。

〔材料〕 1) 細胞：Fc $\alpha$ R発現マウスTハイブリドーマT2D4を増殖培地 (10%FCS—RPM1640) 中で継代し、使用時に $1 \times 10^6$ /ml浮遊液とした。2) IgA抗体：抗TNR—マウス骨髄腫MOPC315腹水をアフィニティー精製し、IgA濃度を検定した。3) 阻害試験対照抗体：マウス血清IgG、ハイブリドーマIgG2b、マウス骨髄腫IgM (MOPC104E)、ヒト血清IgG及びIgAを対照とした。4) FMS：Covalent Technology社製FMS (Covasphere MX, 1.0および0.5 $\mu$ m) を超音波処理後使用した。5) BSA及びTNP—BSA：Sigma社製Fraction Vにアルカリ条件下にTNBSを導入・透析後、導入基数を検定した。6) FITC標識抗マウスIgA：Cappel社製品を40倍希釈にて使用した。

〔方法〕 1) FMSの調製：FMS浮遊液に各種蛋白 (①MOPC315, ②TNP—BSA, ③anti—mouse IgA, ④BSA) を加え室温1時間反応後、1%BSA—PBSにて残留活性基を不活化し、超音波処理にて単一浮遊液とした。2) ロゼット形成法：FMS—ロゼット形成としては以下の方法を試みた。①直接法：MOPC315—FMSをT2D4と反応 (陰性対照BSA—FMS)。②阻害試験：対照抗体と反応後、直接法を行う。③間接法：IgAと細胞を反応後、a) TNP—BSA—FMS, b) anti—mouse IgA—FMS, c) FITC—anti mouse IgAにてFc $\alpha$ Rに結合した結合したIgAを検出 (陰性対照BSA—FMS及びIgA free)。何れの方法においてもロゼット形成後に密度勾配遠心法により、遊離のFMSを除去後に解析を行った。3)

Flow-cytometry: ①死細胞の除去; gating及び色素排除法にて確認。②結果はリニア増幅にて算出された平均蛍光強度 (MFI) で示した (何れの方法も陰性対照の MFI 値が一定となる条件で測定を実施した)。

〔結果〕バックグラウンドを、従来の蛍光抗体間接法と同程度に設定した場合に観察された平均蛍光強度は、従来法の約3倍以上 (TNP-BSA-FMS 及び anti-mouse IgA-FMS) と著しいシグナルの増強を認めた。また、MOPC315-FMS を用いた阻害試験により IgA クラス特異的にロゼットの形成が阻害されることから、この方法によって認識される部位は IgA 特異的であることが示された。

〔考察〕この方法は、形態観察に適したロゼット法と、半定量解析が可能な Flow-cytometry法の長所を併せ持ち、また従来の間接蛍光抗体法と比較しても数倍のシグナルの増強が得られることから単クローン抗体のスクリーニングにも応用可能と考えられる。現在この方法を用いて、ヒト T 細胞株に IgA 特異的結合部位を見出し、それに対する単クローン抗体を作製する研究を進めている。

### 論文審査の結果の要旨

IgA 抗体は、粘膜防御の上で要であり、臨床的にも IgA 腎症等の成因への関与が示唆されるが、産生代謝経路については不明の点が多く、解明が待たれている。IgA Fc レセプター (以下 Fc $\gamma$ R) は、IgA 産生調節機構に深く関わる分子として注目されている。本研究者は、IgA 特異的結合部位が報告されているマウス T ハイブリドーマ T2D4 を用い、①マウス骨髄腫 IgA MOPC315 導入蛍光微粒子による直接ロゼット法、MOPC315 前処理細胞の表面結合 IgA を、②TNP-BSA-ビーズにて検出する間接ロゼット法 1、③抗マウス IgA-ビーズで検出する間接ロゼット法 2 を考案し、④従来の蛍光抗体間接法と比較した。その結果、①の阻害試験により、本法で検出される IgA 結合部位はクラス特異的であり、②③では従来の間接法と比較して 3~4 倍のシグナル増強が得られることを示した。以上の研究は、簡便、高感度で半定量性を有する検出法の開発により、Fc $\gamma$ R の細胞生物学的解析に寄与する所が大きい。従って、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位申請者は、平成 4 年 3 月 30 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格とみとめられたものである。