

# 正常ヒト末梢血リンパ球 Class II 抗原およびヒト B細胞腫 Class II 抗原のT細胞活性化機能の解析

山本 益嗣<sup>1)2)</sup> 矢野 明彦<sup>2)</sup>

1) 信州大学医学部小児科学教室

2) 信州大学医学部寄生虫学教室

## Analysis of Class II Antigen of Human B Cell Tumor and Normal PBL in T cell Activation

Masuji YAMAMOTO<sup>1)2)</sup> and Akihiko YANO<sup>2)</sup>

1) *Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine*

2) *Department of Parasitology, Shinshu University School of Medicine*

A comparative study of the capacity of normal human stimulator cells and human B cell line EBV-Wa cells to stimulate allo-reactive T cells was done. Class II antigen (presumably HLA-DR4 determinant) on EBV-Wa cells was shown to act as a stimulating molecule in the mixed lymphocyte culture reaction (MLR). Furthermore, it was found that HLA-DR positive antigen-presenting cells in the responder population were required in order to elicit MLR responses against HLA-DR antigen on EBV-Wa cells. In contrast, HLA-DR positive antigen-presenting cells in the responding cell population were not essential for the elicitation of MLR responses against HLA-DR antigen on normal allogeneic peripheral blood lymphocytes (PBL). These results indicate that there is functional separation of HLA-DR antigen between normal human PBL and EBV-Wa cells in activation of HLA-DR4 antigen specific T cells and also that HLA-DR positive antigen-presenting cells play an important role in the manifestation of T cell responses to malignant B cell tumor. *Shinshu Med. J.*, 33 : 119-127, 1985

(Received for publication December 12, 1984)

**Key words :** mixed lymphocyte culture reaction, Class II antigen, antigen-presenting cells, human B cell line EBV-Wa

混合リンパ球培養反応, Class II 抗原, 抗原提示細胞, ヒトB細胞腫 EBV-Wa

### I はじめに

主要組織 適合抗原遺伝子 産物の 1つである マウス Ia 抗原やヒト HLA-DR 抗原は Class II 抗原と総称されており, B細胞, 一部のT細胞, マクロファージ, デンドリティック細胞, ランゲルハンス細胞, あるいは血管内皮細胞などの細胞膜上に存在している<sup>1)-3)</sup>。ところでマクロファージに代表される 抗原提示細胞 (antigen-presenting cells, APC) は細菌や異物な

どの抗原, あるいは PHA, Con A などの mitogen をプロセスした形で提示し 抗原特異的 T細胞や mitogen に対する T細胞を活性化する 機能をもっている。この抗原提示細胞による T細胞活性化は細胞膜上 Class II 抗原によって担われていることが解明されている<sup>4)-6)</sup>。このような T細胞活性化機能をもつ抗原提示細胞として, マクロファージのほかはデンドリティック細胞, ランゲルハンス細胞, 血管内皮細胞などが知られている。一方, 混合リンパ球培養反応 (mixed

lymphocyte culture reaction, MLR) は刺激細胞膜上の自己あるいは非自己のマーカーである主要組織適合抗原に対する T 細胞の反応であり、T 細胞の自己-非自己認識機構を解析する重要なモデルである。ところで、主要組織適合抗原、特に Class II 抗原は混合リンパ球培養反応におけるおもな刺激分子として働くことが知られている<sup>7-9)</sup>。しかし興味あることに、同じ Class II 抗原でありながら抗原提示細胞上の Class II 抗原は混合リンパ球培養反応の刺激分子となりえるが、B 細胞上の Class II 抗原は混合リンパ球培養反応における T 細胞刺激能力に乏しいことが従来から知られており<sup>10-12)</sup>、このことは Class II 抗原の働きを考える上で重要な問題点の 1 つとなっている。しかし、最近になって、ある条件下では正常 B 細胞の Class II 抗原も混合リンパ球培養反応における刺激分子となりうるという報告が相次いでなされた<sup>13)</sup>。さらにはマウスの系で、Ia 抗原陽性 B 細胞腫が抗原提示細胞と同様に抗原特異的 T 細胞を活性化したり、かつ混合リンパ球培養反応を惹起させうるという研究結果も報告された<sup>14-15)</sup>。本研究ではヒト B 細胞腫である EBV-Wa 細胞<sup>16)</sup> の HLA-D R 抗原と正常ヒト末梢血リンパ球の HLA-D R 抗原の混合リンパ球培養反応における T 細胞活性化機構を解析した。その結果、正常ヒト末梢血リンパ球に対する混合リンパ球培養反応を惹起する場合は、反応細胞側の HLA-D R 抗原陽性細胞を必要とせず、HLA-D R 抗原陽性刺激細胞のみが必要であることが示された。さらに興味あることにはヒト B 細胞腫 EBV-Wa 細胞に対する混合リンパ球培養反応を惹起するには、EBV-Wa 細胞の HLA-D R 抗原のみならず、反応細胞側の HLA-D R 抗原陽性細胞の存在が必須であることが解明された。すなわち、正常ヒト末梢血中刺激細胞に対する異系 (アロ) 抗原特異的 T 細胞活性化機構とは異なり、B 細胞腫瘍に対する T 細胞の活性化には、HLA-D R 抗原陽性抗原提示細胞が必須であることが示された。この B 細胞腫を用いた混合リンパ球培養反応の実験系は HLA-D R 抗原の免疫生物学的解析に有用であるのみならず、B 細胞腫に対する生体の免疫反応機構を解析する上でも有用なモデルになると考えられる。

## II 材料および方法

### A ヒト末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte, PBL)

健康人より得たヘパリン加末梢血液から、Ficoll-

Conray 比重遠心法によりヒト末梢血リンパ球を分離した。ヒト末梢血リンパ球は 10% 胎仔牛血清 (fetal calf serum, FCS) (GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.) を含んだ RPMI 1640 培養液 (GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.) に浮遊し、混合リンパ球培養反応系に供した。

### B 培養細胞株

ヒト株化 B 細胞腫として EBV-Wa 細胞<sup>16)</sup> (旭川医科大学、片桐一博士より供与された) を用いた。EBV-Wa 細胞は、10% FCS 加 RPMI 1640 培養液を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で継代維持した。

### C 抗体

モノクローナル抗 HLA-D R 抗体 (ISCR 3) は篠原信賢博士 (NCI, NIH, Md., U.S.A.) より供与された。ISCR 3 はマウスの Ia 抗原である I-E<sup>k</sup> 分子に反応し、さらにヒト HLA-D R α 鎖に交叉反応することが明らかになっている<sup>17)18)</sup>。当実験では、ISCR 3 を抗 HLA-D R 抗体として使用した。

### D 混合リンパ球培養反応 (mixed lymphocyte culture reaction, MLR) における刺激細胞 (stimulator cell) と反応細胞 (responder cell) の抗体処理

2×10<sup>6</sup> ヒト末梢血リンパ球浮遊液 1 ml に抗 HLA-D R 抗体 (ISCR 3) 20 μl を加え室温で 30 分間静置し、その後 RPMI 1640 培養液で 2 回洗浄後ウサギ補体を加え 37°C で 1 時間処理した。この処理の後 RPMI 1640 培養液で 2 回洗浄し、10% FCS 加 RPMI 1640 培養液に浮遊した。

### E 刺激細胞 (stimulator cell) の作製

刺激細胞であるヒト末梢血は Mitomycin C (MMC, 協和発酵, 東京) を最終濃度 50 μg/ml になるように加え、5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で 1 時間培養し不活化した。ヒト株化 B 細胞腫 EBV-Wa 細胞は、MMC (100 μg/ml) で 37°C 1 時間処理後、1,500 Rad X 線照射し (MBR-150R, 日立メディコ, 東京) 不活化した。MMC は RPMI 1640 培養液で 3 回洗浄し除去した。その後刺激細胞は 10% FCS 加 RPMI 1640 培養液に浮遊し、細胞数を調整した。

### F 一次混合リンパ球培養反応 (primary mixed lymphocyte culture)

5×10<sup>4</sup> ヒト A 末梢血リンパ球 (100 μl) は、不活化した正常ヒト末梢血リンパ球刺激細胞 (100 μl)、もしくは、不活化した EBV-Wa 刺激細胞 (100 μl) と混合培養した。混合リンパ球培養反応は 96 穴 micro

well culture plate (Nunc, Roskilde, Denmark) で 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の条件で 5 日間培養した。培養終了 18 時間前に [<sup>3</sup>H]-Thymidine ([<sup>3</sup>H]-TdR, sp act 16 Ci/mm ol, New England Nuclear, Boston, MA, U.S.A.) 1 μ Ci/well を加え、培養終了時セルハーベスター (アベ科学, 千葉) で細胞を採取し、放射線活性を β 線リキッドシンチレーションカウンター (Packard Instrument Co., Downers, Ill, U.S.A.) を用いて測定した。実験結果は取りこまれた [<sup>3</sup>H]-TdR の cpm 値, あるいは異系抗原特異的反応 (*d* cpm) として、刺激細胞 (異系正常末梢血あるいは EBV-Wa 細胞) による混合培養反応 (cpm) から自己刺激細胞による対照反応 (cpm) を差し引いた値で示した。

### G 二次混合リンパ球培養反応 (secondary mixed lymphocyte culture)

ヒト A 末梢血リンパ球を反応細胞として 10 日間混合培養した後生存細胞を回収し、二次混合リンパ球培養反応の反応細胞として供した。反応細胞を 2 × 10<sup>4</sup>/well に調整し、不活化した 1 × 10<sup>4</sup> EBV-Wa 細胞もしくは 3 × 10<sup>4</sup> 正常ヒト末梢血リンパ球刺激細胞と二次混合培養をおこなった。二次混合リンパ球培養反応は、混合培養開始 2 日目に、一次混合リンパ球培養反応と同様に [<sup>3</sup>H]-TdR の反応細胞内への取りこみで測定した。

### H モノクローナル抗 HLA-DR 抗体による抗

#### EBV-Wa 細胞混合リンパ球培養反応の阻止実験

混合リンパ球培養反応における EBV-Wa 細胞の刺激分子を解析するために、モノクローナル抗 HLA-DR 抗体を各種濃度で培養系に添加した。抗 HLA-DR 抗体の混合リンパ球培養反応に対する影響は、反応細胞への [<sup>3</sup>H]-TdR の取りこみで測定した。阻止効果は、次の式で計算した。

$$\% \text{ of blocking} = [1 - \text{experimental response} (d \text{ cpm}) / \text{control response} (d \text{ cpm})] \times 100$$

### I HLA タイピング

HLA-A, B, C, DR および MT phenotype は国立佐倉病院 (千葉), 信州大学医学部法医学教室および望星サイエンス (神奈川) でタイピングされた。

## III 結 果

### A 混合リンパ球培養反応の活性化における刺激細胞の細胞数の影響

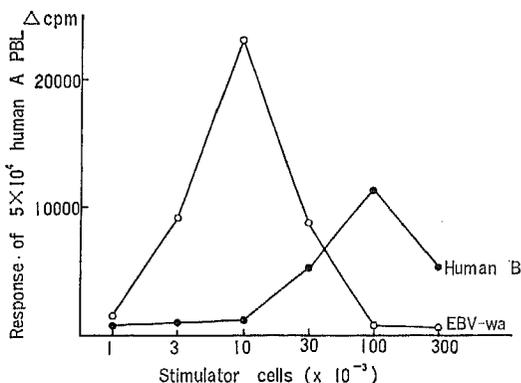


Fig. 1 Stimulator cell dose response in the allogeneic or anti-EBV-Wa cells MLR. 5 × 10<sup>4</sup> human A PBL were cultured with varying numbers of human A PBL, human B PBL, (●—●) or EBV-Wa cells (○—○) as stimulator cells, MLR responses were assayed on day 5. The results are expressed as *d* cpm.

5 × 10<sup>4</sup> ヒト A 末梢血リンパ球を反応細胞として用いた。刺激細胞として 1 × 10<sup>3</sup>, 3 × 10<sup>3</sup>, 1 × 10<sup>4</sup>, 3 × 10<sup>4</sup>, 1 × 10<sup>5</sup>, および 3 × 10<sup>5</sup> に調整した EBV-Wa 細胞とヒト B 末梢血リンパ球を用いて 5 日間混合培養した結果を図 1 に示した。ヒト B に対する異系混合リンパ球培養反応は不活化したヒト B 刺激細胞数が 1 × 10<sup>6</sup> のところで最大値を示した。一方、同様にヒト A 末梢血リンパ球はヒト B 細胞腫である EBV-Wa 細胞に対しても強い混合リンパ球培養反応を示した。ヒト B に対する異系混合リンパ球培養反応の場合とは異なり、EBV-Wa 細胞数が 1 × 10<sup>4</sup> のところで最大の反応がみられた。

### B 抗ヒト B および抗 EBV-Wa 混合リンパ球培養反応の経時的変化

5 × 10<sup>4</sup> ヒト A 末梢血リンパ球を反応細胞とし、1 × 10<sup>5</sup> ヒト B 末梢血リンパ球, あるいは 1 × 10<sup>4</sup> EBV-Wa 細胞を刺激細胞として、それぞれ 3 日間から 6 日間培養した (表 1)。対照群として 1 × 10<sup>5</sup> 自己 (ヒト A) 末梢血リンパ球を刺激細胞として用いた。ヒト B 末梢血リンパ球を刺激細胞とした群では培養 4 日目より [<sup>3</sup>H]-TdR とりこみがみとめられ 5 日目で最大値を示し、その後反応は減弱していった。また EBV-Wa 細胞を刺激細胞とした群でも同様に培養 5 日目で最大の [<sup>3</sup>H]-TdR のとりこみがみられた。ヒト A の EBV-Wa の細胞に対する反応は正常ヒト B 末梢血リンパ球に対する混合リンパ球培養反応と同様の経時的変化を

Table 1 Kinetics of allogeneic and anti-EBV-Wa MLR responses

Stimulator cells	MLR responses of human A PBL*							
	day 3		day 4		day 5		day 6	
	cpm±SEM	Δcpm**	cpm±SEM	Δcpm**	cpm±SEM	Δcpm**	cpm±SEM	Δcpm**
Human A	1,803±25		3,402±1,516		1,208±36		1,482±296	
Human B	2,479±1,305	676	7,709±401	4,307	8,234±1,860	7,026	4,563±2,305	3,081
EBV-Wa	422±47	<0	4,747±2,455	1,345	12,626±652	11,418	8,989±618	7,507

\*  $5 \times 10^4$  human A PBL were cultured with inactivated  $1 \times 10^5$  human A PBL, human B PBL or  $1 \times 10^4$  EBV-Wa cells for 3-6 days.

\*\* Δcpm: the difference of the mean between cpm obtained from the culture with allogeneic or EBV-Wa stimulator cells and cpm obtained from the culture with autologous stimulator cells.

Table 2 Specificity of antigen recognition of human A responding cells specific for EBV-Wa cells

Secondary stimulator cells	HLA phenotype	Secondary MLR responses induced by human A anti- EBV-Wa primary MLR*	
		cpm±SEM	Δcpm**
Human A	A2, AW24, BW52, BW55, CW1, DR2, DR9, MT1, MT3	5,940±690	
EBV-Wa	AW24, BW54, —, DR4, —	35,430±2,880	29,490
Human B	A2, AW31, BW35, BW59, CW1, CW4, DR4, MT3	15,770±1,210	9,830
Human C	A11, AW24, B15, BW61, CW3, CW4, DR4, MT3	12,920±1,190	6,980
Human D	A11, AW24, BW35, BW51, CW3, DR1, DR5, MT1, MT2	1,110±100	<0

\*  $3 \times 10^4$  human A responder cells induced by inactivated EBV-Wa cells for 10 days in the primary MLR were restimulated with either  $1 \times 10^4$  EBV-Wa cells or  $3 \times 10^4$  various human PBL. Secondary MLR were assayed on day 2.

\*\* See footnote to Table 1.

示すことがわかった。

以下の実験では、刺激細胞の細胞数および培養日数とも最大の反応のみられる条件でおこなった。

### C 抗EBV-Wa 混合リンパ球培養反応における反応細胞の抗原特異性

次にヒトA末梢血リンパ球に対する、EBV-Wa細胞の刺激分子を二次混合リンパ球培養反応 (secondary MLR) の系を用いて解析した。 $5 \times 10^4$  ヒトA (HLA-A2, AW24, BW52, BW55, CW1, DR2, DR9, MT1, MT3) 末梢血リンパ球を反応細胞、不活化した  $1 \times 10^4$  EBV-Wa細胞 (HLA-AW24, BW54, DR4) を刺激細胞として10日間混合培養し、増殖した細胞を回収した。このEBV-Wa細胞に対して増殖したヒトA細胞を、HLAの異なった何人かのヒト末梢血

リンパ球、もしくはEBV-Wa細胞で再刺激した (secondary MLR)。表2に示したように、一次刺激に用いたEBV-Wa細胞に対して強い二次混合リンパ球培養反応がみられた (Δcpm 29,490)。さらにEBV-Wa細胞とHLA-DR4のみを共有するヒトB (HLA-A2, AW31, BW35, BW59, CW1, CW4, DR4, MT3) 末梢血リンパ球やヒトC (HLA-A11, AW24, B15, BW61, CW3, CW4, DR4, MT3) 末梢血リンパ球に対しても、強い二次混合リンパ球培養反応がみられた。しかし、一次刺激に用いたEBV-Wa細胞とHLA-AW24を共有するがHLA-DR4を共有しないヒトD (HLA-A11, AW24, BW35, BW51, CW3, DR1, DR5, MT1, MT2) 末梢血リンパ球に対しては有意の混合リンパ球培養反応を惹起する

Table 3 EBV-Wa specific human A MLR responding cells cross-react with HLA-DR positive human B PBL

Secondary stimulator cells	Secondary MLR responses induced by human A anti-EBV-Wa primary MLR*	
	cpm $\pm$ SEM	$\Delta$ cpm**
Human A PBL (autologous)	3,736 $\pm$ 391	
Human B PBL treated with		
C alone	9,897 $\pm$ 946	6,161
Anti-DR+C	2,775 $\pm$ 203	<0
Human D PBL	4,555 $\pm$ 912	819
EBV-Wa cells	19,776 $\pm$ 1,490	16,040

\*  $3 \times 10^4$  human A responder cells induced by inactivated EBV-Wa cells for 10 days in the primary MLR were restimulated with  $1 \times 10^4$  EBV-Wa cells,  $3 \times 10^4$  human A PBL,  $3 \times 10^4$  human D PBL or  $3 \times 10^4$  human B PBL treated with anti-HLA-DR antibody plus C. After the treatment, live cells were counted with 0.25% trypan blue solution and the cell number was adjusted. Secondary MLR were assayed on day 2.

\*\* See footnote to Table 1.

ことができなかつた。この結果から、EBV-Wa 細胞によって一次刺激をうけたヒト A 末梢血リンパ球は、二次混合リンパ球培養反応において HLA-DR4 陽性正常ヒト末梢血リンパ球と交叉反応することが強く示唆された。

次に、EBV-Wa 細胞によって活性化されたヒト A 末梢血リンパ球が HLA-DR4 抗原陽性ヒト由来の末梢血リンパ球で再刺激をされる際に HLA-DR 抗原陽性細胞が刺激細胞である可能性を検討したのが表 3 である。 $5 \times 10^4$  ヒト A 末梢血リンパ球を、 $1 \times 10^4$  EBV-Wa 細胞と 10 日間混合培養し、増殖した細胞を回収した。この EBV-Wa 細胞によって活性化されたヒト A 末梢血リンパ球は EBV-Wa 細胞で強い二次反応をおこした ( $\Delta$ cpm 16,040)。また、EBV-Wa 細胞と同じ HLA-DR4 をもつヒト B 末梢血リンパ球にしても混合リンパ球培養反応を惹起した ( $\Delta$ cpm 6,161)。そこで、ヒト B 末梢血リンパ球を抗 HLA-DR 抗体と補体で処理し、混合リンパ球培養反応における刺激能を検討した。その結果、HLA-DR 抗原陽性細胞を除去したヒト B 末梢血リンパ球では、二次刺激を惹起することはできなかつた ( $\Delta$ cpm <0)。さらには、HLA-DR4 をもたないヒト D 末梢血リンパ球もまったく二次刺激を惹起することはできなかつた。以上の結果は、EBV-Wa 特異的に反応し活性化されたヒト A 末梢血リンパ球は HLA-DR 抗原陽性ヒト B 末梢血リンパ球と交叉反応することを示している。

#### D 抗 EBV-Wa 混合リンパ球培養反応におけるモノクローナル抗 HLA-DR 抗体による阻止効果

EBV-Wa 細胞によって刺激されたヒト A 末梢血リンパ球の抗原認識の解析をモノクローナル抗 HLA-DR 抗体を用いておこなったのが図 2 である。EBV-Wa 細胞と 10 日間混合培養し、増殖したヒト A 末梢血リンパ球細胞  $3 \times 10^4$  を  $1 \times 10^4$  EBV-Wa 細胞もしくは  $3 \times 10^4$  human B 末梢血リンパ球で二次刺激をおこなった。この二次混合リンパ球培養反応の系にモノクローナル抗 HLA-DR 抗体を各種濃度で加え混合リンパ球培養反応における影響をみた。EBV-Wa に対する二次反応もヒト B 末梢血リンパ球に対する二次反応とともに抗 HLA-DR 抗体が  $3 \times 10^{-8}$  の濃度で完全に阻止された。したがって、正常末梢血混合リンパ球培養反応と同様に EBV-Wa 細胞に対する混合リンパ球培養反応においても、HLA-DR 抗原が刺激分子となっていることが明らかとなった。

#### E 抗 EBV-Wa 混合リンパ球培養反応における反応細胞分画中の HLA-DR 抗原陽性細胞の関与

これまでの実験結果で EBV-Wa 細胞膜上 HLA-DR 抗原がヒト A 末梢血リンパ球を刺激することが示された。次に、このヒト B 細胞腫に対する T 細胞活性化機構と正常の末梢血混合リンパ球培養反応における T 細胞活性化機構を比較検討した (表 4)。まず反応細胞であるヒト A 末梢血リンパ球を抗 HLA-DR 抗体と補体で処理し HLA-DR 抗原陽性細胞を除去し

Table 4 Requirement of HLA-DR positive cells to elicit the anti-EBV-Wa primary MLR responses

Stimulator cells	Treatment of responding human A PBL*					
	C alone treated		Anti-HLA-DR plus C treated			
	Nothing added		Nothing added		Reconstituted with human A PBL**	
	cpm	$\Delta$ cpm	cpm	$\Delta$ cpm	cpm	$\Delta$ cpm
Human A	6,890±730		660±100		2,510±460	
Human B	16,600±460	9,710	6,010±150	5,350	9,650±1,540	7,140
EBV-Wa	28,080±3,960	21,190	3,290±260	2,630	22,730±2,900	20,220

\*  $5 \times 10^4$  human A PBL pretreated with either C alone or anti-HLA-DR plus C were cultured with either  $1 \times 10^5$  human A PBL, human B PBL or  $1 \times 10^4$  EBV-Wa cells as stimulator cells.

\*\*  $3 \times 10^4$  inactivated human A PBL were added to the cultures.

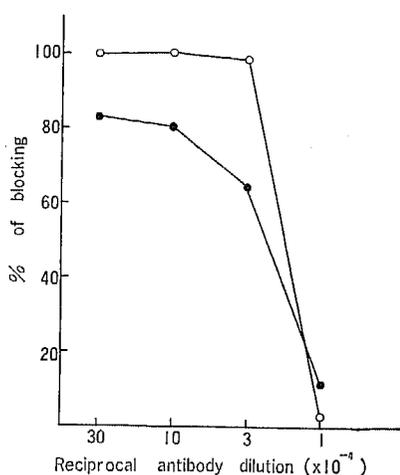


Fig. 2 Effect of the monoclonal anti-HLA-DR antibody on the secondary MLR responses of human A PBL *in vitro* induced by EBV-Wa cells.  $3 \times 10^4$  human A responder cells stimulated by inactivated EBV-Wa cells for 10 days in primary MLR were restimulated with either  $1 \times 10^4$  EBV-Wa cells (●—●) or  $3 \times 10^4$  human B PBL (○—○). Twenty  $\mu$ l of variously diluted monoclonal anti-HLA-DR antibody (ISCR3) were added to the assay culture. Percentage of inhibition was calculated according to the following formula :

$$\left(1 - \frac{\text{experimental responses } (\Delta \text{cpm})}{\text{control responses } (\Delta \text{cpm})}\right) \times 100$$

た。この HLA-DR 抗原陽性細胞を除いたヒトA末梢血リンパ球はヒトB末梢血 HLA-DR 抗原陽性細

胞のみで刺激された ( $\Delta$ cpm 5,350)。すなわち、正常ヒト末梢血リンパ球を刺激細胞とした混合リンパ球培養においては、反応細胞側の HLA-DR 抗原陽性細胞の関与なしに、刺激細胞の HLA-DR 抗原に対する混合リンパ球培養反応が惹起されることが示された。

EBV-Wa 細胞に対する混合リンパ球培養反応においては、対照群として補体のみで処理をしたヒトAの反応細胞は  $\Delta$ cpm 21,190 の強い反応を示した。ところが、反応細胞を抗 HLA-DR 抗体と補体で処理すると  $\Delta$ cpm 2,630 と著明な混合培養反応の減少がみられた。さらには、不活化したヒトA末梢血リンパ球を加えることによりこの減弱した混合リンパ球培養反応はほぼ完全に回復した ( $\Delta$ cpm 20,220)。

次に、この添加したヒトA末梢血中の HLA-DR 抗原陽性細胞がこの EBV-Wa 細胞に対する混合リンパ球培養反応惹起に重要な役割をもっていることを示したのが図3である。HLA-DR 抗原陽性細胞を除いたヒトA末梢血リンパ球は EBV-Wa 細胞単独の刺激では、増殖できなかった。しかし、補体のみで処理された不活化ヒトA末梢血リンパ球を、この反応細胞に加えることにより、EBV-Wa 細胞に対する強い混合リンパ球培養反応がみられるようになった。しかし、不活化ヒトA末梢血リンパ球を抗 HLA-DR 抗体と補体で処理したところ EBV-Wa 細胞に対する混合リンパ球培養反応は回復することができなかった。

以上の結果より、ヒトB細胞腫である EBV-Wa 細胞に対する混合リンパ球培養反応を惹起するためには、正常ヒト末梢血リンパ球に対する異系混合リンパ球培

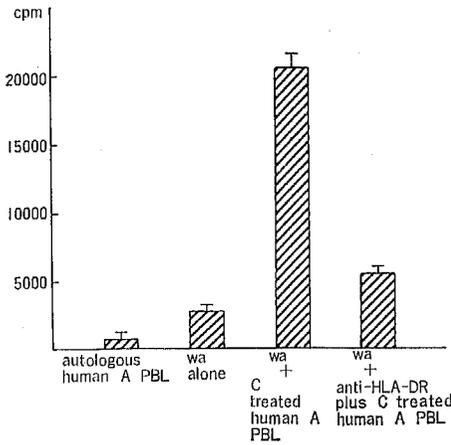


Fig. 3 Requirement of HLA-DR positive accessory cells for the elicitation of anti-EBV-Wa MLR responses. HLA-DR positive cell depleted  $5 \times 10^4$  human A PBL were cultured with either autologous human A PBL, EBV-Wa cells alone, EBV-Wa cells plus C treated human A PBL or EBV-Wa cells plus anti-HLA-DR plus C treated human A PBL.

養反応を惹起するのとは異なり、反応細胞分画中の HLA-DR 抗原陽性細胞の存在が必須であることが示された。

#### IV 考 察

今回、我々は、HLA-DR 抗原陽性ヒトB細胞腫、EBV-Wa 細胞の混合リンパ球培養反応におけるT細胞活性化機能を検討した。その結果、EBV-Wa 細胞は正常ヒト末梢血刺激細胞よりも少ない細胞数で、強い混合リンパ球培養反応を惹起しうることが明らかになった。さらにモノクローナル抗 HLA-DR 抗体による二次混合リンパ球培養反応阻止実験を用いた結果、EBV-Wa 細胞においても、正常ヒト末梢血リンパ球と同様に HLA-DR 抗原が刺激分子となっていることが示された。

さらに、今回我々の観察したヒトA抗 EBV-Wa 混合リンパ球培養反応の系ではヒトA反応細胞は EBV-Wa 細胞膜上の HLA-DR 抗原を認識しているにもかかわらず、その活性化には自己 HLA-DR 抗原陽性細胞の存在が不可欠であるという興味ある実験結果がえられた。この事実は、従来から言われている正常

末梢血 Class II 抗原陽性細胞によるT細胞活性化とは異なるものである<sup>10)-19)</sup>。マウスの系では、Class I 抗原に対する混合リンパ球培養反応においては反応細胞分画中の Class II 抗原陽性細胞の必要性が報告されている<sup>20)</sup>。さらに Yoshizawa と Yano<sup>21)</sup> はマウス抗ヒト異種 Class II 抗原に対するT細胞の活性化には、反応細胞側のマウス Ia 抗原陽性細胞の存在が必要であることを解明している。今回我々が得た実験結果は、前述のマウスにおける抗 Class I 混合リンパ球培養反応およびマウス抗ヒト異種間混合リンパ球培養反応において Ia 抗原陽性細胞が関与する現象と類似している。この抗 EBV-Wa 混合リンパ球培養反応における HLA-DR 抗原陽性細胞の役割の詳細な解析は今後の研究を待たなければならないが、次のような可能性が考えられる。第1は、この HLA-DR 抗原陽性細胞は可溶性抗原特異的T細胞活性化における抗原提示細胞と同様の役割を演じているという可能性である。第2は、T細胞の mitogen 刺激に対する反応や、キラーT細胞誘導におけるアクセサリー細胞と類似した役割を演じているという可能性である<sup>22)</sup>。第1の可能性としてあげた抗原提示細胞は、抗体産生におけるヘルパーT細胞活性化や、遅延型アレルギーにおけるエフェクターT細胞の活性化に重要な役割を演じており、T細胞との細胞間相互作用の際に主要組織適合抗原を介した遺伝的拘束現象がみられる<sup>4)5)23)</sup>。一方、第2の可能性としてあげたアクセサリー細胞には、この主要組織適合抗原による遺伝的拘束現象が認められず、一般的にその機能はマクロファージ由来のモノカインであるインターリュウキン1 (IL-1) によって代償されると言われている<sup>24)</sup>。現在進行中の予備実験でえられた結果では、抗 EBV-Wa 混合リンパ球培養反応系に IL-1 を加えても EBV-Wa 細胞単独ではT細胞を活性化できない。さらには、反応T細胞と HLA-DR phenotype を共有する HLA-DR 抗原陽性細胞のみが EBV-Wa 細胞に対するT細胞反応を惹起することが示され、細胞間相互作用における遺伝的拘束現象の存在が明らかにされている (Yamamoto, M. and Yano, A. 投稿中)。すなわち、EBV-Wa 細胞に対する混合リンパ球培養反応における HLA-DR 抗原陽性細胞の役割は、前述の第1番目の可能性が考えられる。つまりこの HLA-DR 抗原陽性細胞は EBV-Wa 細胞膜上 Class II 抗原を一般の可溶性抗原と同様にプロセスし、T細胞を活性化すると考えられるが、そのアロ抗原のプロセッシングについての詳

細は現在検討を加えているところである。

このように正常ヒト末梢リンパ球刺激細胞膜上の HLA-DR 抗原と B 細胞腫膜上の HLA-DR 抗原は同じ HLA-DR 分子でありながらアロ HLA-DR 抗原特異的 T 細胞の活性化機能に大きな違いがあるという事実が解明された。さらに、この実験系を用いることにより Class II 分子の生理活性を解析することが可能であると思われる。またヒト B 細胞腫に対する T 細胞反応を惹起するには反応細胞分画中の HLA-DR 抗原陽性細胞が必要であるという実験結果は、B 細胞腫に対する免疫応答機構の解析、ひいては免疫療法の開発を考える上で重要な意味をもつものと思われる。

## V 結 語

ヒト B 細胞腫, EBV-Wa 細胞膜上の HLA-DR 4 抗原は、正常の末梢血リンパ球膜上 HLA-DR 4 抗

原と同様に、混合リンパ球培養反応における異系 (アロ) 抗原決定基として機能することが明らかとなった。しかし、EBV-Wa 細胞を刺激細胞とした場合、それ単独では HLA-DR 4 抗原特異的 T 細胞を活性化できず、抗原提示細胞の存在が必要であった。一方、正常末梢血刺激細胞は単独で HLA-DR 4 抗原特異的 T 細胞を活性化できることが示された。

本稿を終るにあたり、本研究の御指導を頂いた、信州大学医学部小児科学教室、赤羽太郎教授、信州大学医学部寄生虫学教室、小島荘明教授に感謝いたします。また HLA タイピングに御協力頂いた信州大学医学部法医学教室、支倉逸人教授、太田正徳助手に謝意を表します。本論文の作成に御協力頂いた岡江理恵子氏に深謝いたします。なお、本論文の要旨は第14回日本免疫学会総会 (昭和59年12月4～6日、大阪) において発表した。

## 文 献

- 1) Shevach, E.M. and Rosenthal, A.S. : The function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II. Role of the macrophage in the regulation of genetic control of the immune response. *J Exp Med*, 138 : 1213-1229, 1973
- 2) Stingel, G., Katz, S.I., Green, I. and Shevach, E.M. : The functional role of Langerhans cells. *J Invest Dermatol*, 74 : 315-323, 1980
- 3) Steinman, R.M. and Nussenzweig, M.C. : Dendritic cells : features and functions. *Immunol Rev*, 53 : 127-147, 1980
- 4) Yano, A., Schwartz, R.H. and Paul, W.E. : Antigen presentation in the murine T lymphocyte proliferative response. I. Requirement for genetic identity at the major histocompatibility complex. *J Exp Med*, 146 : 828-843, 1977
- 5) Schwartz, R.H., Yano, A. and Paul, W.E. : Interaction between antigen-presenting cells and primed T lymphocytes : An assessment of Ir gene expression in the antigen-presenting cell. *Immunol Rev*, 40 : 153-180, 1978
- 6) Rogoff, T.M. and Lipsky, P.E. : Characterization of isolated guinea pig Kupffer cells : Accessory cell function in mitogen-induced T lymphocyte activation. *J Immunol*, 123 : 1920-1927, 1979
- 7) Ahman, G.B., Nadler, P.I., Birnkrant, A. and Hodes, R.J. : T cell recognition in the mixed lymphocyte response. I. Non-T, radiation-resistant splenic adherent cells are the predominant stimulators in the murine mixed lymphocyte reaction. *J Immunol*, 123 : 903-909, 1979
- 8) Schwartz, R.H., Fathman, D.G. and Sachs, D.H. : Inhibition of stimulation in murine mixed lymphocyte cultures with an allo-antiserum direct against a shared Ia determinant. *J Immunol*, 116 : 929-935, 1976
- 9) Albrechtsen, D., Solheim, B.G. and Thorsby, E. : Antiserum inhibition of the mixed lymphocyte cultures (MLC) interaction. Inhibitory effect of antibodies reactive with HLA-D-associated determinants. *Cell Immunol*, 28 : 258-265, 1977
- 10) Minami, M., Shreffler, D.C. and Cowing, C. : Characterization of the stimulator cells in the murine primary mixed lymphocyte response. *J Immunol*, 124 : 1314-1321, 1980
- 11) Blomgren, H. : Subpopulation of cells involved in the human mixed lymphocyte culture re-

- sponse. Scand J Immunol, 6 : 857-862, 1977
- 12) Albrechtsen, D. and Lied, M. : Stimulating capacity of human lymphoid cell subpopulations in mixed lymphocyte culture. Scand J Immunol, 7 : 427-433, 1978
  - 13) Chesnut, R. W. and Grey, H. M. : Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. J Immunol, 126 : 1075-1079, 1981
  - 14) McKean, D., Infante, A., Nilson, A., Kimoto, M., Fathman, C., Walker, E. and Warner, N. : MHC-restricted antigen presentation to antigen-reactive T cells by B lymphocyte tumor cells. J Exp Med, 154 : 1419-1431, 1981
  - 15) Glimcher, L. H., Kim, K.-J., Green, I. and Paul, W. E. : Ia antigen bearing B cell tumor lines can present protein antigen and alloantigen in a major histocompatibility complex-restricted fashion to antigen-reactive T cells. J Exp Med, 155 : 445-459, 1982
  - 16) Katagiri, M., Ikeda, H., Maruyama, N., Moriuchi, J., Wakisaka, A., Kimura, S., Aizawa, M. and Itakura, K. : Evidence for two B-cell alloantigen loci in the HLA-D region. Immunogenetics, 9 : 335-343, 1979
  - 17) Suzuki, T., Ochiai, T., Taniguchi, M. and Shinohara, N. : The ability of interspecies cross-reactive anti-Ia murine alloantibodies to eliminate a subpopulation of human adherent cells responsible for induction of alloimmunity. Transplantation, 35 : 368-373, 1983
  - 18) Watanabe, M., Suzuki, T., Taniguchi, M. and Shinohara, N. : Monoclonal anti-Ia murine alloantibodies crossreactive with the Ia homologues of other mammalian species including humans. Transplantation, 36 : 712-718, 1983
  - 19) Lonai, P. : Genetic control of the stimulator and effector function in allogeneic lymphocyte interaction : The expression of I-region gene products on T and B lymphocytes in immune recognition. Edited by A. Rosenthal. pp.683-704, Academic Press, New York, 1976
  - 20) Rock, K. L., Barnes, M. C., Germain, R. N. and Benacerraf, B. : The role of Ia molecules in the activation of T lymphocytes. II. Ia-restricted recognition of allo K/D antigen is required for Class I MHC-stimulated mixed lymphocyte responses. J Immunol, 130 : 450-462, 1983
  - 21) Yoshizawa, K. and Yano, A. : Mouse T lymphocytes proliferative responses specific for human MHC products in mouse anti-human xenogeneic MLR. J Immunol, 132 : 2820-2829, 1984
  - 22) Yamashita, U. and Hamaoka, T. : The requirement of Ia-positive accessory cells for the induction of hapten-reactive cytotoxic T lymphocyte *in vitro*. J Immunol, 123 : 2637-2643, 1979
  - 23) Yamashita, U. and Shevach, E. M. : The histocompatibility restrictions on macrophage T helper cell interaction determine the histocompatibility restrictions on T helper cell B cell interaction. J Exp Med, 148 : 1171-1185, 1978
  - 24) Germain, R. : Accessory cell stimulation of T cell proliferation requires active antigen processing Ia restricted antigen presentation and a separate nonspecific 2nd signal. J Immunol, 127 : 1964-1966, 1981

(59. 12. 12 受稿)