

第2章 β -ラクトグロブリンのT細胞エピトープ解析

Localization of T-cell determinants on bovine β -lactoglobulin

【要旨】

抗原提示細胞内で生成したT細胞エピトープを含むペプチドは、アグレート部分でMHCクラスII分子と複合体を形成した後抗原提示細胞の表面に提示され、T細胞エピトープ部分を介して抗原特異的T細胞を活性化する。 β -LGの全領域をカバーする合成部分ペプチドを用い、H-2ハプロタイプの異なる3系統のマウスBALB/c (H-2^d)、C3H/He (H-2^k)、C57BL/6 (H-2^b) におけるT細胞エピトープの検索を行なった。 β -LGで免疫したマウスのリンパ節細胞を採取し、ペプチド抗原存在下の増殖活性を³H-チミジンの取り込みを指標として測定した結果、BALB/cマウスはペプチド42-56、62-76、139-153を、C57BL/6マウスはペプチド11-26、72-86、100-113、119-133を、C3H/Heマウスはペプチド72-86、91-104、129-143、139-153をそれぞれ認識して増殖した。同定されたT細胞エピトープ領域はハプロタイプの異なる系統のマウス間で異なっており、唯一、ペプチド139-153がBALB/c (H-2^d) とC3H/He (H-2^k) に共通して認識された。このことは、各ハプロタイプのMHCクラスII分子の多型性により異なるペプチドフラグメントが提示された結果である他、各系統間で準備されているT細胞レパートリーが異なることも大きく影響していると考えられた。

第1節 緒言

第1章では β -L G分子上の抗体結合領域を解析し、詳細なB細胞エピトープマッピングを行なった。B細胞エピトープを介した抗原特異的B細胞への捕捉はマクロファージや樹状細胞の非特異的な取り込みに比べて桁違いに効率が良く、低濃度の抗原にも抗体応答できる仕組みになっているが、これらのB細胞が抗体産生細胞に分化するためにはヘルパーT細胞による補助が必須である。抗原タンパク質中にはB細胞エピトープと異なる領域にT細胞エピトープが存在し、抗原特異的T細胞の活性化を誘導する。本章では β -L G分子上のT細胞エピトープの解析を行なった。

外来性の抗原タンパク質は生体内のAPCのエンドソームに取り込まれた後酵素分解を受けてペプチド断片となるが、その中のいくつかにはT細胞エピトープ部分が含まれている(111)。これらのペプチド断片のうち新しく合成されたMHCクラスII分子と会合できたものがAPC表面に運ばれてMHC-抗原複合体となり、T細胞に提示される。外来抗原タンパク質に対する抗体応答には、このヘルパーT細胞による抗原認識とその活性化が必須である。

ペプチド断片がMHC分子に結合する能力と、T細胞認識領域として免疫応答を引き起こす能力の間には高い相関があるため(112、113)、MHCとどれだけ安定な会合体を形成できるかが、ペプチドがT細胞応答を引き起こせるか否かの鍵となる。本研究を含めT細胞エピトープを特定するための実験系では従来より合成ペプチドが用いられてきたが、これらの系では抗原ペプチドは培養液中に添加され、MHC分子と会合させるようにしている。本来抗原が細胞内に取り込まれて内在型抗原の形をとると、それらから生成したペプチド断片は新しく合成されたMHCクラスII分子と会合す

ることになるが、合成ペプチドを細胞外に加えた場合、そのほとんどは細胞表面に出ているMHC分子と結合すると考えられている(114)。細胞表面に出ているMHC分子は既に自己抗原や他のタンパク質分解物と会合しているため、後から加えた合成ペプチドがMHC分子と会合しようとするれば、既に複合体をつくっているタンパク質分解物と競合し、押し退けなければならないことになる。すなわち、培養液中に添加する方法でMHC分子と会合できた合成ペプチドは、MHC分子との高い結合性を保証されていることになる。

合成ペプチドを用いてT細胞エピトープを解析する方法は、BjorkmanらによってMHC分子の構造が解析されて以来ますます重要となってきた(115、116、117)。複数の抗原タンパク質について合成ペプチドを用いたT細胞エピトープ解析が行なわれ、可溶性タンパク質抗原やウイルスタンパク質抗原上のT細胞エピトープが数多く決定された(118)。これらT細胞エピトープのアミノ酸配列パターンからT細胞エピトープの予測法も提唱されるようになった(119、120、121)。

本章では合成ペプチドを用いた β -LGのT細胞エピトープの解析を行ない、3系統のマウスにおける同タンパク質T細胞エピトープ領域の同定を行なった。また、それらの結果をT細胞エピトープ予測法により算出されたエピトープ領域と比較し、考察を行なった。

第2節 実験材料および方法

1) β -ラクトグロブリンの調製

第1部1-2-1に記した。

2) 合成ペプチド

β -LGは162残基からなり一次構造も明らかにされているタンパク質であるため、図51に示すようにアミノ酸配列に従って合成した部分ペプチドを用いた。合成部分ペプチドの鎖長は14から16残基、隣接するペプチドとのオーバーラップ部分は5残基である。66、106、119、121および160残基目のCysはAlaに置換して合成した。合成方法は1-2-2に記した。

3) 実験動物

BALB/c (H-2^d)、C57BL/6 (H-2^b)、C3H/He (H-2^k)の雌は日本チャールスリバー(東京)より5週齢で購入した。

4) 免疫

一匹あたり40 μ gの β -LGを生理食塩水に溶解し Mycobacterium tuberculosis · H37Ra (Difco) を含むCFAで1:1 (v/v) に乳化した後、8から10週齢のマウスの足しょおよび尻尾基部に注射した。

5) T細胞増殖試験

β -LGで免疫1週間後、マウスより膝下部、鼠径部および大動脈リンパ節を無菌的に得た。テトロンメッシュ上で単細胞浮遊液とした後96ウェル平底マイクロプレートに細胞数 5×10^5 ずつ分注し、37℃、炭酸ガス5%、湿度100%の条件で培養した。このとき、培地中には検体であるオーバーラッピング合成部分ペプチドを1ウェルあたり5から200 μ g添加した。対照として5 μ g/ml ConA (Sigma)、オポアルブミンまたは β -LGを添加した群も設けた。培地には50 μ Mメルカプトエタノール、10mM

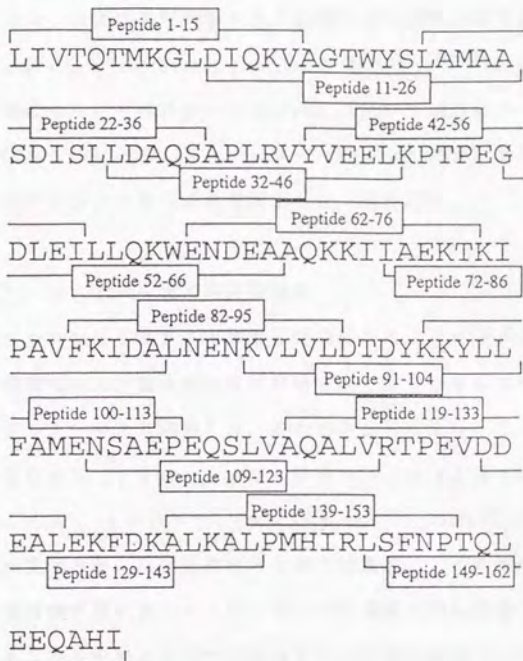


図 5 1. T細胞エピトープの決定に用いたオーバーラッピング
合成部分ペプチド

数字はペプチドのN末側アミノ酸、C末側アミノ酸のアミノ酸番号
残基数を示す。66、106、119、121、160残基目のシ
ステイン残基はアラニンに置換して合成した。

HEPES、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンおよび1%同系マウス血清を含むRPMI1640を用いた。培養3日後に1ウェルあたり1 μ Ciの 3 H-チミジンでパルス、16時間後にセルハーベスター (Skatron 7020) で細胞をハーベストし、液体シンチレーションカウンター (Packard 3255) でリンパ節細胞へのチミジンの取り込みを測定した (図52)。

6) モノクローナル抗体の調製

マウスMHCクラスII抗原に特異的なモノクローナル抗体は、篠原信賢博士 (三菱化成生命科学研究所) より分与していただいたハイブリドーマより調製した。すなわち39-10-8 (122)、I SCR3 (123) および10-2-16 (124) よりそれぞれI-A^d、I-E^{k.d.t.p}およびI-A^{k.r.s}に特異的なモノクローナル抗体を得、MHCクラスII分子拘束性リンパ節細胞増殖反応の阻害実験に用いた。ハイブリドーマの培養上清に同量の飽和硫酸アンモニウムを加えて得た塩析物を50%飽和硫酸アンモニウム/PBSで洗浄し、PBSに対して透析した。得られた抗体粗精製物より、プロテインAカラム (Ampure™ PA Kit, Amersham) を用いてモノクローナル抗体を精製した。

第3節 結果

β -LGの一次構造に従って合成された部分ペプチドを用いて行なったT細胞増殖試験の結果を、BALB/cについては図53、C57BL/6については図54、C3H/Heについては図55に示した。図の値は各々のペプチドに対する至適増殖応答を示した抗原濃度下でのチミジンの取り込みを表わしている。図に示すよう

T細胞増殖試験

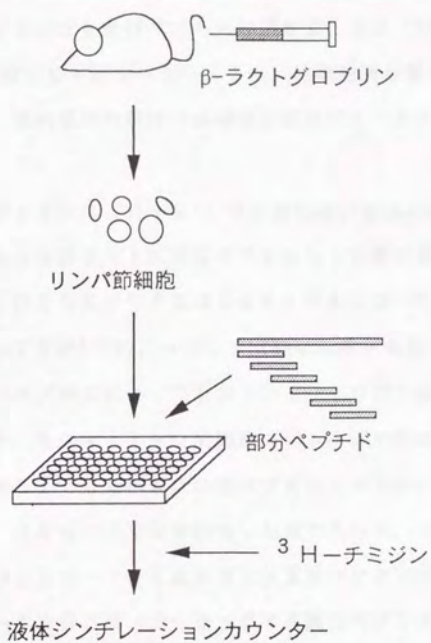


図52. T細胞増殖応答試験の概略

に、H-2ハプロタイプの違いを反映し、各系統において異なったT細胞エピトープ領域が検出された。

T細胞エピトープを含むペプチドの限定は、SI (Stimulation Index) を指標として行なった。SIは、抗原刺激を受けた細胞の増殖応答をE、無刺激の対照群での増殖応答をCとしたときE/Cで算出した。

BALB/cマウス(H-2^d)では最も高い増殖応答がペプチド⁶²ENDEAAQKKIIAEKT⁷⁶を添加した群で得られた。ペプチド⁴²YVEELKPTPEGDLI⁵⁶および¹³⁹ALKALPMHIRLSFNP¹⁵³によってもT細胞は刺激された(SI>3)。他のすべてのペプチドによってもSI>1.6の弱い応答が誘導されたことより、他のマイナーなT細胞エピトープの存在も示唆された。その中でSI>2を示したのはペプチド1-15、11-26、72-86、129-143を添加した群であった。ペプチド72-86および129-143は主要な抗原性ペプチド62-76および139-153とオーバーラップする隣接ペプチドであることから、これらは重なり部分で主要T細胞エピトープを共有している可能性もあると考えられた。

C57BL/6(H-2^b)由来のリンパ節細胞はペプチド¹¹DIQKVAGTWYSLAMAA²⁶、⁷²IAEKT⁷⁶KIPAVFKIDA⁸⁶、¹⁰⁰KKYLLFAMENSAEP¹¹³および¹¹⁹AQALVRTPEVDDEAL¹³³でSI>2の増殖応答を示した。ペプチド32-46および42-56でもSI>1.6の弱い増殖応答がみられ、領域32-56はマイナーT細胞認識領域であると考えられた。

ペプチド⁹¹KVLVLDTDYKKYLL¹⁰⁴はC3H/He(H-2^k)において強い増殖応答を誘導した。リンパ節細胞の増殖は

72 IAEKTKIPAVFKIDA⁸⁶、 129 DDEALEKFDKALKAL¹⁴³および 139 ALKALPMHIRLSFNP¹⁵³の添加群においても顕著であった。ペプチド129-143と139-153は139残基目から143残基目の5残基分がオーバーラップしており、この重複部分がT細胞エピトープとなっている可能性がある。ペプチド82-95、119-133はSI>1.6の弱い増殖応答を誘導したが、いずれのペプチドも主要なT細胞エピトープペプチドとオーバーラップしており、ペプチド82-95はペプチド72-86および91-104、ペプチド119-133はペプチド129-143とそれぞれT細胞エピトープを共有しているのかもしれない。

以上、H-2^dハプロタイプ拘束性のT細胞エピトープはペプチド42-56、62-76および139-153に含まれており、H-2^bハプロタイプ拘束性のT細胞エピトープはペプチド11-26、72-86、100-113および119-133に、H-2^kハプロタイプ拘束性のT細胞エピトープはペプチド72-86、91-104、129-143および139-153に存在すると結論した(図56)。なおこれらのペプチドにより誘導されたT細胞の増殖応答はStudentのt統計量検定によりP<0.01で統計的に有意であった。

次に、各T細胞エピトープのMHCクラスII分子拘束性を詳しく調べるため、抗MHCクラスIIモノクローナル抗体を用いた増殖反応の阻害実験を行なった。マウスにおけるMHCクラスII分子にはI-A分子とI-E分子がある。H-2^bのC57/BL6ではI-A分子のみが発現型であるためペプチド11-26、72-86、100-113および119-133はI-A^b分子と会合してT細胞に認識されると考えられる。BALB/cおよびC3H/Heに

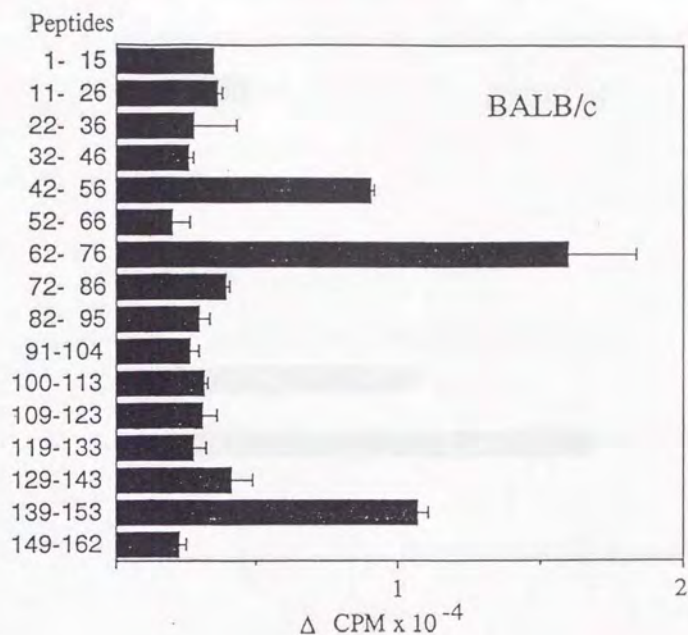


図53. β -ラクトグロブリンで免疫したBALB/cマウス由来リンパ節細胞の合成部分ペプチドに対する増殖応答

3連の培養の平均値を示した。ペプチド52-66、109-123は $5\mu\text{g/ml}$ 、ペプチド1-15、72-86、82-95、119-133、139-153、149-162は $10\mu\text{g/ml}$ 、ペプチド91-104、129-143は $20\mu\text{g/ml}$ 、ペプチド11-26、42-56、100-113は $40\mu\text{g/ml}$ 、ペプチド22-36、32-46、62-76は $80\mu\text{g/ml}$ の濃度における増殖応答の値を示す。 β -ラクトグロブリン、オボアルブミン、コンカナバリンAに対するSIはそれぞれ8.20、1.10、120.67であった。抗原非存在下の培養における ^3H -チミジンの取り込みは $3359 \pm 242\text{c.p.m.}$ であった。

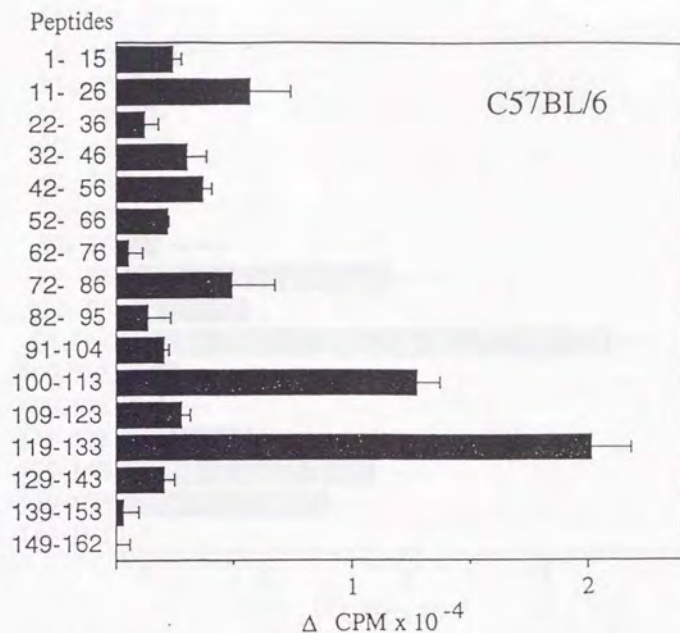


図54. β -ラクトグロブリンで免疫したC57BL/6マウス

由来リンパ節細胞の合成部分ペプチドに対する増殖応答

3連の培養の平均値を示した。ペプチド149-162は5 μ g/ml、ペプチド100-113、139-153は25 μ g/ml、ペプチド119-133は50 μ g/ml、ペプチド22-36、62-76、82-95は100 μ g/ml、ペプチド1-15、11-26、32-46、42-56、52-66、72-86、91-104、109-123、129-143は200 μ g/mlの濃度における増殖応答の値を示す。 β -ラクトグロブリン、オボアルブミン、コンカナバリンAに対するSIはそれぞれ6.41、0.95、11.59であった。抗原非存在下の培養における³H-チミジンの取り込みは4695 \pm 1108c.p.m.であった。

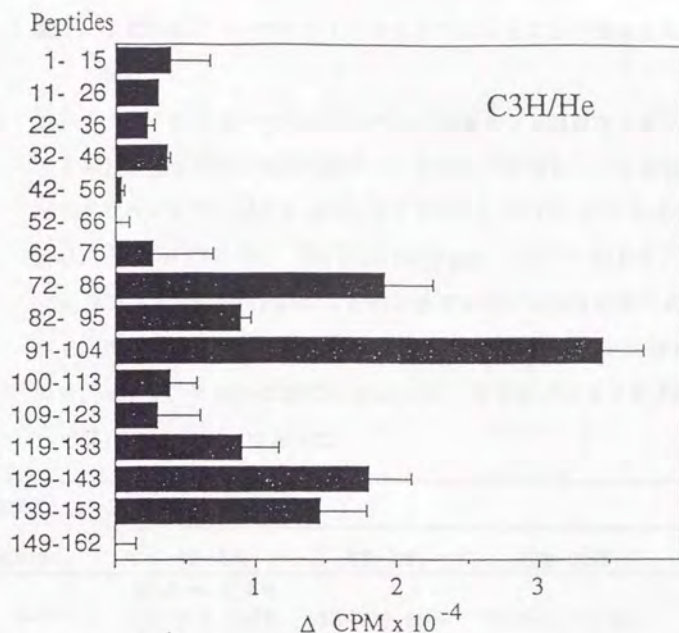


図55. β -ラクトグロブリンで免疫したC3H/Heマウス由来リンパ節細胞の合成部分ペプチドに対する増殖応答

3連の培養の平均値を示した。ペプチド22-36は $5\mu\text{g/ml}$ 、ペプチド42-56は $10\mu\text{g/ml}$ 、52-66は $25\mu\text{g/ml}$ 、ペプチド1-15、100-113は $50\mu\text{g/ml}$ 、ペプチド82-95、129-143、139-153は $100\mu\text{g/ml}$ 、ペプチド11-26、32-46、62-76、72-86、91-104、109-123、119-133、149-162は $200\mu\text{g/ml}$ の濃度における増殖応答の値を示す。 β -ラクトグロブリン、オボアルブミン、コンカナバリンAに対するSIはそれぞれ6.39、1.13、14.32であった。抗原非存在下の培養における ^3H -チミジンの取り込みは $12126 \pm 1062\text{c.p.m.}$ であった。

表1. T細胞エピトープペプチドのクラスII MHC分子拘束性の解析

β -ラクトグロブリンで免疫したマウス由来リンパ節細胞を抗クラスII MHC分子特異的抗体の存在下、非存在下で培養し、T細胞エピトープペプチドに対する増殖応答を調べた。ペプチド42-56は5 μ g/ml、ペプチド91-104、139-153は100 μ g/ml、ペプチド62-76、72-86、129-143、139-153は200 μ g/mlの濃度における増殖応答の値を示す。抗原非存在下の培養における ^3H -チミジンの取り込みはBALB/cマウスにおいて 2970 ± 165 c.p.m.、C3H/Heマウスにおいて 1814 ± 113 c.p.m.であった。

BALB/c (H-2 ^d)		Stimulator		
antibody	42-56	62-76	139-153	
	δ c.p.m. \pm SE			
—	$53-3 \pm 1566$	1348 ± 596	7464 ± 1146	
39-10-8 ^a	1932 ± 748	838 ± 358	3137 ± 460	
ISCR3	1018 ± 34	2195 ± 323	8670 ± 152	

C3H/He (H-2 ^k)		Stimulator			
antibody	72-86	91-104	129-143	139-153	
	δ c.p.m. \pm SE				
—	5156 ± 72	2599 ± 331	4591 ± 7	2915 ± 892	
10-2-16 ^c	-346 ± 247	-776 ± 239	-739 ± 142	-679 ± 509	
ISCR3	757 ± 539	1450 ± 125	-163 ± 160	1096 ± 651	

^a39-10-8, specific to I-A^d.

^bISCR3, specific to I-E^{k,d,t,p}.

10-2-16, specific to I-A^{k,r,s}.

おける各エピトープのMHCクラスII分子拘束性を調べた結果を表1に示した。H-2^dのBALB/cマウスにおいてペプチド139-153により誘導される増殖応答は、抗I-A^d抗体の添加で阻害され、I-A^d分子拘束的にT細胞に認識されていることが示唆された。ペプチド62-76による増殖応答も抗I-E抗体の影響が無いところ抗I-A^d抗体により反応が低下しており、I-A^d拘束性である可能性が高いと考えられた。ペプチド42-56による反応は抗I-A^d、抗I-Eいずれの抗体によっても不完全ながら阻害されたため、ペプチド42-56は両方の分子に結合性を持ち、そのいずれかを認識するT細胞の増殖応答の総和が検出されていることが示唆された。C3H/Heにおいてペプチド72-86、91-104、129-143および139-153により誘導される増殖応答はいずれも抗I-A^k抗体と抗I-E抗体の両方により阻害された。

第4節 考察

本章では合成部分ペプチドを用い、近交系マウスにおけるβ-LG上のT細胞エピトープ領域を同定した。β-LGは牛乳アレルギーの主要原因タンパク質のひとつであり、酵素分解物を用いた抗原性領域の解析の例はあるものの(54)、そのT細胞エピトープ領域を充分短いペプチドを用いて同定する仕事は行なわれていなかった。自然状態の細胞から分離してきたMHCクラスII結合ペプチド断片の大きさが13から17残基もしくはそれより長いペプチドであることを考慮する(125~127)と、本実験で用いた14から16残基というペプチドの長さは適当であったと考えられる。また、MHC分子に結合したペプチド断片と競合して入れ替わること

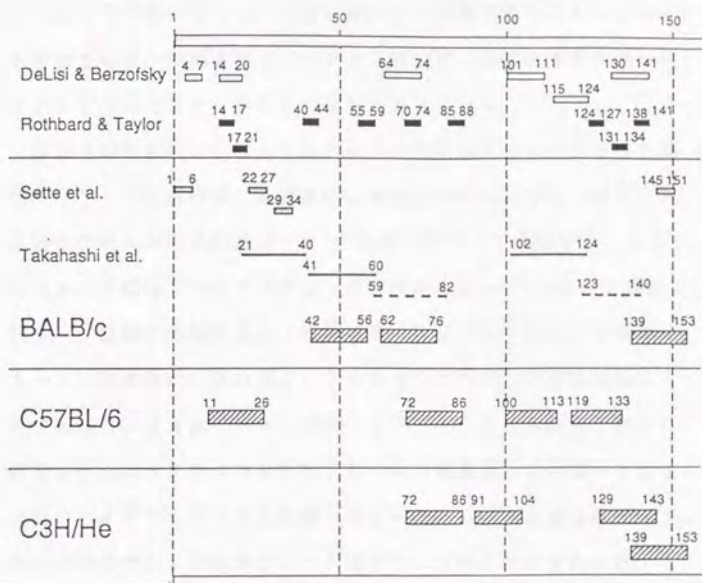


図56. BALB/c、C57BL/6、C3H/Heマウスに認識される β -ラクトグロブリンT細胞エピトープ領域のまとめ。各系統のマウスにおけるT細胞エピトープ領域を斜線のバーで示した。 α -ヘリックス様の構造をとり易いアンフィパティックな領域を白抜きのバーで、RothbardとTaylorのT細胞エピトープモチーフを黒塗りのバーで示した。H-2^d拘束性の抗原性領域については、Setteらの方法で予測されるクラスII MHC分子結合性領域を影付きのバーで、Takahashiらによって抗原性の確認されたトリプシンおよびキモトリプシンフラグメントの領域を実線および点線でそれぞれ示した。

のできるT細胞エピトープの最小単位が5残基であること(128)を考慮すると、隣接するペプチドと5残基ずつの重複部分を持つペプチドを用いたことも妥当であったと考えられる。

酵素分解物を用いたBALB/cマウスにおける β -L G上T細胞エピトープの解析は、高橋らによる報告がある(54、図56)。本研究で明らかにされたH-2^dT細胞エピトープ領域を β -L Gトリプシン分解物、キモトリプシン分解物中のH-2^d拘束性T細胞エピトープ領域と比較すると、領域42-56はトリプシン分解物41-60残基目に、領域62-76はキモトリプシン分解物59-82残基目に含まれていた。領域139-153は本研究で新たに同定された。トリプシン分解物21-40残基目、102-124残基目とキモトリプシン分解物123-140に相当する合成ペプチドはここではT細胞エピトープ領域として検出されなかった。このことは本研究で用いた合成ペプチドでは66、106、119、121、160残基目のCysがAlaに置換されていることによるのかもしれない。チオール基がT細胞認識に重要である可能性とともに、短いペプチドはプロセッシングを受けないで細胞表面のMHC分子に結合すると考えられているものの、Cysに富む領域はカテプシンによる酵素分解に比較的耐性であるためにT細胞認識領域となり易いという報告もあるからである(129)。他系統のマウスにおける結果も含め、Cys残基の影響、選んだペプチドのとり得る立体構造やその中での特定アミノ酸残基の位置の影響等を受けてここで同定され得なかったT細胞エピトープの存在は否定できないものの、本研究によりマウスにおける β -L G分子上のT細胞エピトープの全容が明らかにされたと考える。なお上記のような問題を解決するには、マルチピンペプチド合成法など他の手法を導入することも考えられる(130、131)。

同定されたT細胞エピトープ領域はハプロタイプの異なる系統のマウス間で異なっており、3系統に共通して認識された領域は無かった。唯一、ペプチド139-153がBALB/c (H-2^d)とC3H/He (H-2^k)の2系統にT細胞エピトープ領域として認識された。各ハプロタイプのMHC分子の抗原結合部位は多型性を持つと考えられているが(115)、実際にはMHC結合性分子の多くは複数のMHC分子と結合する性質を持つ(112、132)。それにもかかわらずハプロタイプ間共通のT細胞エピトープがほとんど存在しないということは、MHC分子との結合性の相違に加えて、各系統間で準備されているT細胞レパートリーが異なることも大きく影響していると考えられる。

複数のタンパク質において近交系マウスにおけるT細胞エピトープが解析され、そのアミノ酸配列パターンが蓄積されてきた(118)。そしてそれらのデータをもとにしたT細胞エピトープの予測方法がいくつかのグループから提唱されるようになった(119~121)。RothbardとTaylorはT細胞エピトープに共通にみられる性質として、アミノ酸配列が[1]荷電アミノ酸またはGly-[2]疎水性アミノ酸-[3]疎水性アミノ酸-[4]極性アミノ酸またはGlyとなる4残基および[1]荷電アミノ酸またはGly-[2]疎水性アミノ酸-[3]疎水性アミノ酸-[4]疎水性アミノ酸またはPro-[5]極性アミノ酸またはGlyとなる5残基を含んでいると考えた(119)。また、この4残基または5残基に隣接するアミノ酸配列にはハプロタイプによる特徴的な違いがあると提唱した(119)。図56に、 β -LGに含まれるRothbardとTaylorのT細胞エピトープモチーフを示した。荷電アミノ酸は(Asp, Glu, His, Lys, Arg)、疎水性アミノ酸は(Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Met, Trp, T

h r、T y r)、極性アミノ酸は(A s p、G l u、H i s、A r g、L y s、A s n、G l n、S e r、T h r)として検索を行っている。9個のモチーフのうち6個が本研究で明らかにされたT細胞エピトープ領域に含まれていた。ハプロタイプに特徴的とされた隣接アミノ酸配列は存在しなかった。

DeLisiとBerzofskyはT細胞エピトープ領域とアンフィパティック(amphipathic)な領域に高い相関があると考えた(120)。彼らは、 α -ヘリックス様の構造をとり易いアンフィパティックな領域内にT細胞抗原決定部位が存在することが多いとしている。同じく図56にDeLisiとBerzofskyのT細胞エピトープ予測領域を示した。ここで明らかにされた β -LGのT細胞エピトープのうち、BALB/cマウスでは62-76残基目、C57BL/6マウスでは100-113および119-133、C3H/Heでは129-143がこれらの領域を含んでいた。

X線結晶解析の結果によると、 β -LG分子内の α -ヘリックスはただひとつ130-140残基目に存在し、3回ターンする構造をとっている(41)。この α -ヘリックス領域を含むペプチド129-143は131-134残基目と138-141残基目にRothbardとTaylorの抗原性モチーフを持ち、131-141残基目にアンフィパティックな領域を含んでいる。このペプチドはC3H/HeにおいてT細胞エピトープ領域として認識された。ペプチド129-143の他にも抗原性モチーフとアンフィパティックな領域を両方含んでいるペプチドが3つあるが、そのうちペプチド62-76とペプチド119-133がそれぞれBALB/cマウスとC57BL/6マウスにおいて最も強くT細胞増殖を誘導したことは興味深いと思われる。

H-2^dハプロタイプは α -ヘリックスをT細胞エピトープとして

認識しやすいという知見がある(133-135)。 β -LG分子上で α -ヘリックスをとる130-140残基目に対応する領域に対してはBALB/cマウスは弱いT細胞応答を示しただけだったが、H-2^dハプロタイプにおけるT細胞エピトープ領域の2/3はアンフィパティックな領域を含んでいた。H-2^bのT細胞エピトープにおける頻度は2/4、H-2^kにおいては1/4であった。

H-2^dハプロタイプの認識しやすい領域についてさらに言及すると、SetteらはH-2^dに結合性の高い領域をアミノ酸配列から簡便に予測する方法を報告している(121)。この方法によれば、図56に示すように領域1-6、22-27、29-34および145-151がI-A^d分子と高い結合性をもつことが予想される。BALB/cマウスにおける主要なT細胞エピトープ領域のひとつペプチド139-153は領域145-151を含んでおり、抗I-A^d抗体を用いたT細胞増殖阻害実験においてもI-A^d拘束的に認識されていることが示された。領域22-27と29-34はTakahashiらに抗原性領域として報告されている酵素フラグメントの中に含まれている。また、I-E^dに結合性をもつペプチドは塩基性-塩基性-非荷電-塩基性というアミノ酸配列を持つことが同じくSetteらにより提唱されているが、このモチーフは β -LG分子のなかには見いだされなかった。ただしペプチド42-56に対するT細胞増殖応答は抗I-A^d抗体のみならず抗I-E抗体によっても阻害されていることから、実際にはI-E^d分子に結合するペプチドも β -LGから生成すると考えられる。

以上、マウス3系統におけるT細胞エピトープ領域の解析結果を示したが、明らかにされた主要T細胞エピトープ領域のうち42-56および72-86はそれぞれの系統のマウスにおいて主要B細胞エピトープ領域であることも解っており(77、98)、 β -L

Gが摂取されたときにこの領域のペプチドフラグメントが生成すれば、T細胞エピトープとB細胞エピトープの両方を含んだ抗原性の高いペプチドとなることが予想される。また、そうしたペプチドはアレルゲンタンパク質から生成した抗原性フラグメントのモデルとして、in vitroにおける詳細な解析にも有用であると考えられる。

第2部 β -ラクトグロブリン特異的T細胞クローンの樹立
と機能解析

第1章 β -ラクトグロブリン特異的T細胞クローンの樹立
と抗原特異性の解析

Establishment of T-cell clones specific to bovine
 β -lactoglobulin and analysis of their specificity

【要旨】

β -LGに特異的なT細胞の抗原認識とそれに伴う免疫応答を解析することを目的とし、 β -LG特異的CD4⁺T細胞クローンを樹立してそれらの表面抗原、MHCクラスII分子拘束性、T細胞エピトープの解析を行なった。 β -LGで免疫したBALB/cマウスのリンパ節および脾臓細胞を採取し*in vitro*抗原刺激を繰り返すことによって β -LG特異的T細胞ラインを得た後、同細胞群から限界希釈法によりクローンを樹立した。 β -LGに特異性を示すCD4⁺T細胞4クローン(H1.1、5G、2.11G、6.11G)を得た。これらはいずれもMHCクラスII分子の内I-A^d分子拘束的に β -LGを認識して増殖した。特にH1.1および5GはBALB/cマウスにおける主要T細胞エピトープ42-56残基目を認識することから、*in vivo*における β -LGおよび β -LG由来のペプチドフラグメントに対する免疫応答をよく反映すると期待される。すなわちこれらT細胞クローンは β -LG特異抗体産生をはじめとする免疫応答に関わるT細胞・B細胞協同作用を*in vitro*で詳細に解析し、T細胞・B細胞エピトープフラグメントが果たす役割を一層深く理解するための有用な材料であると考えられた。

第1節 緒言

第1部では合成ペプチドを用い、ウシ β -LGのB細胞エピトープ、T細胞エピトープの詳細を明らかにしてきた。 β -LGは主要な牛乳アレルギーとして広く知られているが、食物アレルギーとして注目されていると同時にその抗原構造が詳細に解析されているタンパク質は希少である。他にエピトープマッピングがなされたアレルギータンパク質の例として、B細胞エピトープの解析が牛乳 α_{s1} -カゼイン(136~139)や β -カゼイン(140、141)、鶏卵リゾチーム(142、143)、オボムコイド(144)、ミオグロビン(145、146)等で、T細胞エピトープの解析も同様に α_{s1} -カゼイン(138、139)、 β -カゼイン(140、147)、鶏卵リゾチーム(135、148)、オボアルブミン(149)オボムコイド(150)、ミオグロビン(151)等で行なわれているが、 β -LGは立体構造が明らかにされていることもあり、食物アレルギーに対する免疫応答を解析する上で非常に優れたモデルタンパク質となり得る。

一方、タンパク質抗原に対する免疫応答は主にT細胞とB細胞により担われているが、特にT細胞は液性因子の産生や細胞間相互作用を通して様々なエフェクター機能を発揮することにより全体の応答を制御する役割を担っている。T細胞は、抗原提示細胞により分解され、MHCクラスII分子との複合物として提示された抗原由来ペプチドフラグメント(T細胞エピトープフラグメント)を認識して応答を開始する(111)。その応答機構は多岐にわたり、中でも抗体産生の調節・遅延型過敏症反応の制御などはアレルギー発症との深い関わりが指摘されている(11)。これらの現象を *in vitro* で詳細に解析するためには抗原特異的T細胞クローンを用いるの

が有利である。

本研究では β -LGに特異的なT細胞の抗原認識とそれに伴う免疫応答を解析することを目的とし、BALB/cマウスから β -LG特異的T細胞クローンを樹立してそれらの表面抗原、MHCクラスII分子拘束性、T細胞エピトープの解析を行なった。

第2節 実験材料および方法

1) β -ラクトグロブリンの調製

1-2-1に記した。

2) 還元カルボキシメチル化 β -ラクトグロブリンの調製

還元カルボキシメチル化 β -ラクトグロブリン(RCM- β -LG)は、McKenzieらの方法により調製した(156)。すなわち0.027Mの Na_2EDTA を含む0.2Mトリス塩酸緩衝液1.9ml(pH8.5)に、 β -LGを溶解し、同緩衝液で調製した10M尿素溶液8mlを加えた。窒素置換後、2-メルカプトエタノール0.1mlを加えて25℃で4時間反応させ、 β -LGの2つのジスルフィド結合を還元した。さらに、同緩衝液で調製したヨード酢酸ナトリウム(303.5mg/2ml)を加えて40分間反応させ、遊離SH基も含めて5つのSH基をカルボキシメチル化した。pH5.0、0.5M酢酸ナトリウム緩衝液5mlを加えて反応を停止し、4℃で0.01M酢酸および脱イオン水で透析の後、凍結乾燥した。

3) 還元カルボキシメチル化 β -ラクトグロブリンブロムシアン分解物の調製

RCM- β -LGをブロムシアンで処理することにより、4個のメチオニン残基のC末端側で分断したペプチドフラグメントの混合物を得た。RCM- β -LG (200mg) およびCNBr (917mg) をネジ口試験管内で4mlの70%ギ酸に溶解し、窒素置換した。室温で24時間静置の後36ml脱イオン水を加えて反応を停止し、凍結乾燥した。

4) 還元カルボキシメチル化 β -ラクトグロブリン酵素分解物の調製

1%トリプシン (T-8642, Sigma)、1%キモトリプシン (C-7762, Sigma)、5%ペプシン (P-6887) を用いてRCM- β -LGの酵素分解を行なった。基質濃度は1% (w/v) とした。トリプシン、キモトリプシンの酵素反応は0.1mMNH₄HCO₃ (pH8.0) 中で行い、ペプシンの反応は0.01NHCl (pH2.2) 中で行なった。保存剤としてトルエンを添加した。37℃、24時間振とうの後、分子量10,000以下の分解物を限外濾過 (ウルトラフィルターユニット・UCE-1、アドバンテック、東京) を用いて採取し、凍結乾燥した。

5) 合成ペプチド

2-2-2に記した。図60に示すアナログペプチドも同様の方法で合成した。

6) 実験動物

BALB/c (H-2^d) およびSDラットの雌は日本チャールスリバー (東京) より6週齢で購入した。I-A^dとI-E^b (E β はd/b) 分子を表現するB10.GDマウスは、森脇和郎博士 (国

立遣伝学研究所)より御供与いただいた。

7) 免疫

一匹あたり40 μ gまたは100 μ gの β -LGを生理食塩水に溶解し、*Mycobacterium tuberculosis*・H37Ra (Difco) を含むCFAで1:1 (v/v) に乳化した後BALB/cマウスの足しよおよび尻尾基部または腹腔に注射した。腹腔内免疫は3週間後に繰り返した。

8) 培養用培地

RPMI 1640 (Gibco) に10% FCS (Gibco)、50 μ M 2-メルカプトエタノール、10mM HEPES、100U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンとなるよう各試薬を添加した培地を用いた。

9) コンカナバリンA培養上清の調製

SDラットより脾臓を採取し、培養用培地で単細胞懸濁液(5 \times 10⁸細胞/ml)を調製した。コンカナバリンA(5 μ g/ml、Sigma)を添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件下、75cm²フラスコで20時間培養した後遠心分離により細胞を除去し、培養上清を得た。20mM α -メチルマンノピラノシドを添加してコンカナバリンAを不活性化し、T細胞クローン培養用コンカナバリンA培養上清とした(152)。

10) フィーダー細胞の調製

BALB/cマウスの脾臓細胞を採取し、1 \times 10⁸細胞/ml培地の単細胞懸濁液を調製した。メタノールに2.5 μ g/mlの濃

度で溶解したマイトマイシンC溶液を $20\mu\text{l}/\text{ml}$ 添加し、 37°C に25分間静置した後細胞を洗浄し、フィーダー細胞として培養に供した(153)。

11) β -ラクトグロブリン特異的T細胞クローンの樹立

KimotoとPathmanの方法(154)に従って β -LG特異的T細胞クローンを樹立した。皮下免疫後7日目にBALB/cマウスの鼠径部、膝下部および大動脈リンパ節を採取し、単細胞懸濁液を調製した。 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ β -LGの存在下、24ウェルプレートで 5×10^6 細胞/ウェルの細胞密度で4日間培養した後、プラスト化した細胞をリンフォライトM(Cedarlane, Ontario)の界面上に遠心分離($2,000\text{rpm}$, 15分)により採取した。 β -LG非存在下、 1×10^5 細胞/ウェルの細胞をフィーダー細胞(5×10^6 細胞/ウェル)および10%コンカナバリンA培養上清とともに10日間休止させた後、同様の条件のもと β -LGで4日間再刺激した。数回休止期と再刺激を繰り返した後限界希釈法によりクローン化を行なった。限界希釈法の後10~14日で増殖を認めた株を増殖させてT細胞増殖試験を行なうことにより抗原特異性を確認し、さらに休止期と再刺激を繰り返して安定なT細胞クローンを得た。腹腔免疫したマウスよりブースター免疫2週間後に得た脾臓細胞も同様に処理した(図57)。

12) フローサイトメトリー解析

FITC標識した抗Thy-1、CD8、IL-2レセプター抗体、フィコエリスリン標識した抗CD4抗体または抗CD3抗体とT細胞クローンを氷上で45分間インキュベートした後、細胞を洗浄した。抗CD3抗体については第2抗体であるFITC標識抗ハ

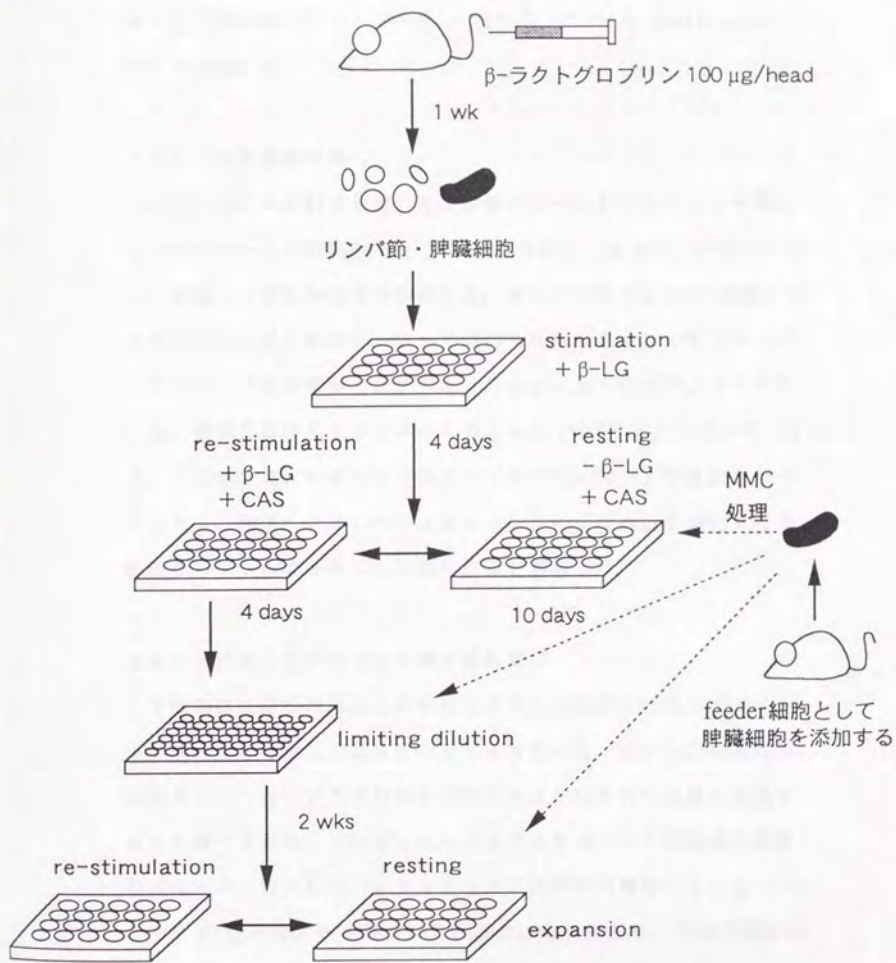


図 57. T細胞クローンの樹立方法

ムスター抗体を同様に反応させ、細胞を洗浄した。染色した細胞の蛍光強度はフローサイトメーター (EPICS, Coulter Electronics, FL) で測定した。

13) T細胞増殖試験

リンフォライトMで分離したT細胞クローンを96ウェル平底マイクロプレートに細胞数 1×10^4 ずつ分注し、37℃、炭酸ガス5%、湿度100%の条件で培養した。培地中には 5×10^5 細胞/ウェルのフィーダー細胞と、 β -LGの一次構造をカバーするオーバーラッピング合成部分ペプチドを $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。培養2日後に1ウェルあたり $1 \mu\text{Ci}$ の ^3H -チミジンでパルス、16時間後にセルハーベスター (Skatron 7020) で細胞をハーベストし、液体シンチレーションカウンター (Packard 3255) でT細胞クローンへのチミジンの取り込みを測定した。

14) MHCクラスII分子拘束性の解析

T細胞は抗原提示細胞上のMHCクラスII分子と抗原フラグメントの複合体を認識して活性化シグナルを受ける。 β -LG特異的T細胞クローンがいずれのMHCクラスII分子拘束的に抗原を認識するかを調べるため、コンジェニックマウスを用いてT細胞増殖試験を行なった。BALB/cマウス由来の抗原提示細胞はI-A^d分子とI-E^d分子の両方を発現しているのに対しB10.GDマウスはI-A^d分子のみを発現している。各々のマウスより採取した脾臓細胞をマイトマイシンC処理して抗原提示細胞とし、T細胞クローンの増殖試験を2-1-12の方法で行なった。

第3節 結果

1) β -ラクトグロブリン特異的T細胞クローンの樹立と表面抗原

β -LG特異的T細胞クローンとしてリンパ節細胞よりH1. 1、2. 11G、6. 11Gの3クローンを得、脾臓細胞より5Gを得た。いずれのクローンも表面形質はT細胞の表面抗原マーカであるThy-1⁺、T細胞レセプターの構成要素であるCD3⁺、ヘルパーT細胞の表面抗原マーカとされるCD4⁺、抑制性・細胞傷害性T細胞の表面抗原マーカとされるCD8⁺、細胞活性化の指標とされるIL-2レセプター⁺であった(図58)。

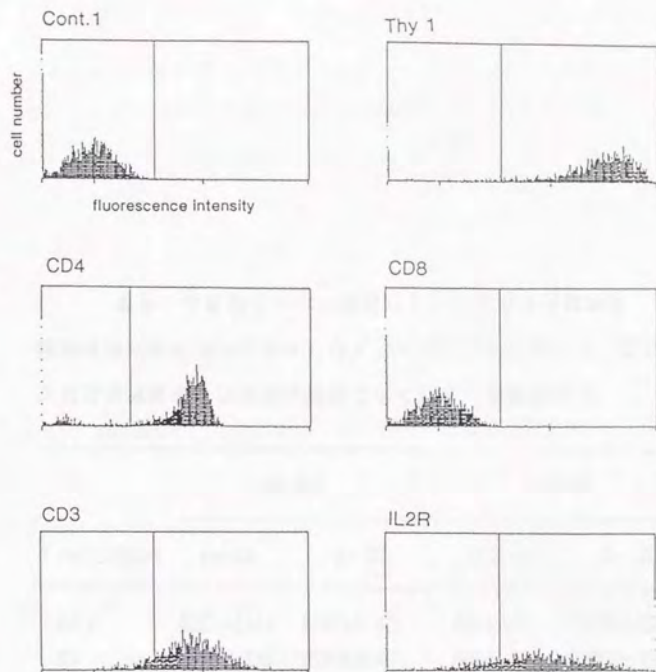
2) MHCクラスII分子拘束性

H1. 1、2. 11G、6. 11G、5GはBALB/cマウス、B10. GDマウスいずれの脾臓細胞を抗原提示細胞として用いた場合にも抗原特異的増殖応答を示した(表2)。BALB/cマウスがMHCクラスII分子としてI-A^d、I-E^dの両方を発現しているのに対してB10. GDマウスはI-A^d分子のみを発現していることから、これらのクローンはI-A^d分子拘束的に β -LGを認識して増殖したと考えられた。

3) 抗原特異性

β -LGの一次構造をカバーするオーバーラッピング合成部分ペプチドを用いて各クローンの抗原特異性を解析した。図59に示すようにH1. 1と5Gはペプチド42-56(YVEELKPTPEGLLEI)を認識して増殖した。2. 11Gと6. 11Gはこれらの合成ペプチドに対して増殖応答を示さなかった。

H1. 1と5GのT細胞認識領域については図60に示すアナロ



Phenotype analysis of T cell clones

	Thy1	CD4	CD8	CD3	IL2R
H1.1	+	+	-	+	+
5G	+	+	-	n. d.	n. d.
2.11G	+	+	-	+	+
6.11G	+	+	-	+	+

図58. フローサイトメトリーによるT細胞クローンの

細胞表面抗原の分析結果

チャートはH1.1における解析結果を示した。横軸は蛍光強度、縦軸は細胞数(頻度)を示す。

表2. T細胞クローンのMHCクラスII分子拘束性
細胞増殖試験においてBALB/cマウスまたはB10.GDマウス由来脾臓細胞を抗原提示細胞として用いた結果を示す。

T cell clones	BALB/c		B10.GD	
	medium	β -LG	medium	β -LG
H1.1	6261±1143	13881± 521	890±145	40002±1233
5G	5350± 975	27218± 606	445± 56	10931± 224
2.11G	12878±3606	28859±1351	1147±420	61751± 601
6.11G	7019± 350	50593±3848	1025±208	22901± 112

MHC class II (Ia) molecule

BALB/c (I-A^d, I-E^d)

B10.GD (I-A^d)

グペプチドを用いて限定化を試みた。アナログペプチドはペプチド42-56のN末側10残基およびC末側10残基を基本ペプチドとし、MHCクラスII分子に結合するのに十分な長さを保つよう1から5残基をGlyに置換したものをを用いた。H1.1はペプチド42-52を認識して増殖したが、ペプチド46-56は増殖応答を誘起しなかった。興味深いことにペプチド42-52より42残基目のTyrをGlyに置換したペプチドの方がH1.1の増殖を強く誘起した。以上よりH1.1のT細胞認識領域は⁴³VEELKPTPEG⁵²に限定化された。5Gはこれらのアナログペプチドに対しては増殖応答を示さなかった。

また、2.11Gと6.11GのT細胞認識領域を調べるためRCM化β-LGとその分解物を用いたT細胞増殖試験を行なったところ、いずれのクローンもRCM化β-LGとそのCNBr分解物を認識して増殖した(図61)。トリプシン、キモトリプシンおよびペプシンによる酵素分解処理は両クロンの反応性を低下させた。酵素分解処理によるRCM化β-LGの抗原性の低下は、6.11Gの増殖試験においてより顕著に認められた。

第4節 考察

1980年にKimotoとFathmanが抗原特異的T細胞クローンを樹立して以来多くのCD4⁺T細胞クローンが樹立され免疫現象の解析に利用されてきた。しかし抗原構造が詳細に解析されている抗原に特異的なクローンといえばその数は非常に限られている。本章では、β-LG特異的免疫応答現象の解明を行なうと同時に抗原特異的免疫応答の詳細なモデル系を作製することを目的とし、β-LG特異的T細胞クローンの樹立を行なった。

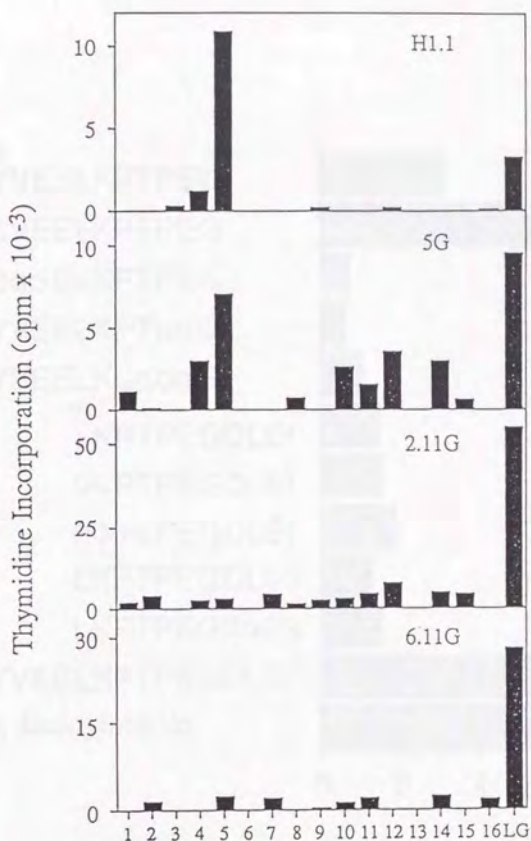


図59. T細胞クローンの合成部分ペプチドに対する増殖応答

5 $\mu\text{g/ml}$ のペプチドおよび50 $\mu\text{g/ml}$ の β -L G に対する増殖応答の結果を3連の培養の平均値で示した。抗原非存在下の培養におけるクローンの³H-チミジンの取り込みは H1.1、5G、2.11G、6.11G においてそれぞれ 178 ± 85 、 4239 ± 192 、 3955 ± 441 、 2566 ± 232 c.p.m. であった。1-16のペプチド番号は1より順に ペプチド1-15、11-26、22-36、32-46、42-56、52-66、62-76、72-86、82-95、91-104、100-113、109-123、119-133、129-143、139-153、149-162を示す。

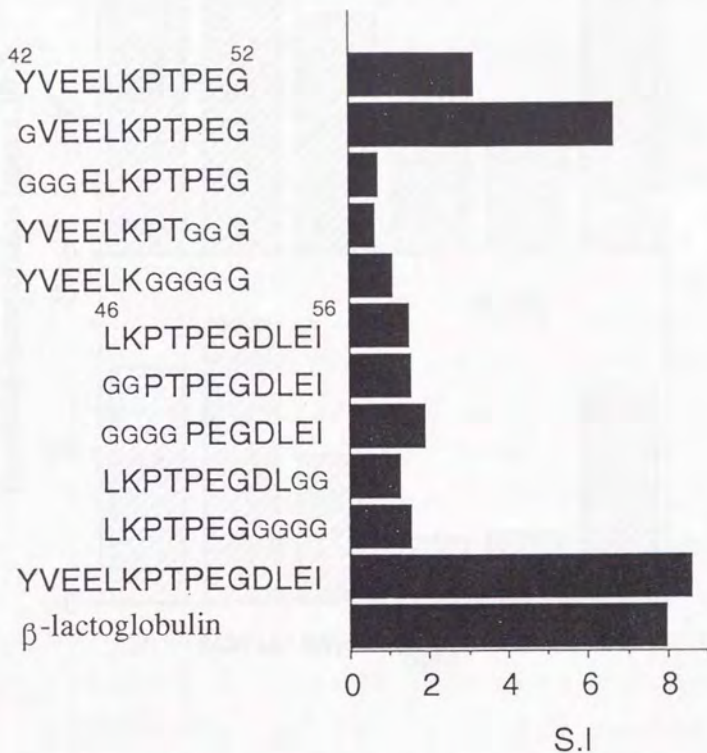


図60. T細胞クローンH1.1の β -ラクトグロブリン、
 ペプチド42-56とそのアナログペプチドに対する増殖応答
 $5\mu\text{g/ml}$ のペプチドおよび $50\mu\text{g/ml}$ の β -LGに対する増殖応答の結果を3連の培養の平均値で示した。抗原非存在下の培養における ^3H -チミジンの取り込みは $6560 \pm 532\text{c.p.m.}$ であった。

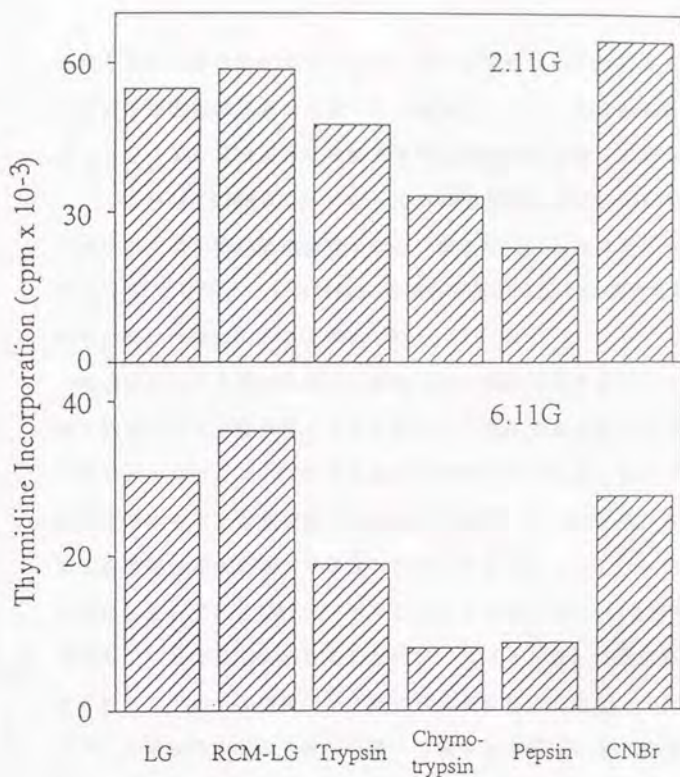


図61. T細胞クローン2.11G、6.11Gのβ-ラクトグロブリン、還元カルボキシメチル化β-ラクトグロブリンおよびそのフラグメントに対する増殖応答

50ng/mlから50μl/mlの範囲で各抗原に対する至適増殖応答を調べた。β-LG、RCM-β-LG、トリプシン処理RCM-β-LG、キモトリプシン処理RCM-β-LG、ペプシン処理RCM-β-LG、CNBr処理RCM-β-LGの濃度を、2.11Gの培養では50、0.5、5、5.5、5.5μg/ml、6.11Gの培養では50、5、50、0.5、0.5、5μg/mlとした群における結果をグラフに示した。抗原非存在下の培養における³H-チミジンの取り込みは2.11Gにおいて3955±441c.p.m.、6.11Gにおいて2566±232c.p.m.であった。

第1部第2章の結果より、BALB/cマウスにおける β -LGの主要T細胞認識領域は42-56残基目、62-76残基目および139-153残基目に存在することが明らかとなっている。H1.1と5Gの認識するペプチド42-56はBALB/cマウスにおける主要T細胞認識領域のひとつであり、これらのクローンは*in vivo*における β -LG特異的免疫応答現象で働く代表的な細胞群のひとつを代表していると考えられた。

報告によると自然の抗原提示細胞上のMHCクラスII分子より分離されたペプチドは少なくとも13-17残基であるが(125~127)、アナログペプチドを用いた解析によりH1.1のT細胞認識領域は43-53残基目に限定化された。アナログペプチドに対する増殖応答性は $^{42}\text{YVEELKPTPEGDLEI}^{56} > ^{42}(\text{G})\text{VEELKPTPEG}^{52} > ^{42}\text{YVEELKPTPEG}^{52}$ であり、N末端のTy rはG1yに置換したペプチドでより高い増殖応答が誘起された。Ty rは側鎖にかき高い6員環を有しており、これがペプチドのMHCクラスII分子の溝への結合を妨げている可能性が考えられた。しかしながら、N末端がTy rであってもペプチド42-56は常にペプチド42-52(G1y⁴²)より高い増殖応答を誘導したことから、T細胞認識領域である抗原性ペプチドは15残基程度の長さを必要とすることが示唆された。

2.11Gと6.11GのT細胞認識領域は用いた16ペプチドでは特定されなかった。いずれのクローンもジスルフィド結合を切り、スルフヒドリル基をアセチル化した β -LG(RCM化 β -LG)およびその分解物を認識して増殖したことから、そのT細胞認識領域にジスルフィド結合が含まれている可能性は否定されたが、合成ペプチドでA1aに置換されている66、106、119、121、160残基目のCysがMHC分子との結合またはT細胞認

識に関与している可能性は残っている。また、RCM化 β -LGの加水分解酵素による抗原性の低下の様子が2.11Gと6.11Gで異なっていたことより、これらは異なるエピトープを認識していると考えられた。今後CNBr処理および酵素処理により生成するペプチドのなかでいずれのペプチドがT細胞認識領域となるかを解析する必要がある。

本章により樹立されたCD4⁺ β -LG特異的T細胞クローンをを用い、外来性抗原タンパク質に対する様々な免疫応答のモデル系を確立することが可能である。特に、 β -LGはT・Bエピトープが詳細に解析されており、牛乳アレルギーの主要原因タンパク質でもあることから、牛乳アレルギー症状に関与するT細胞機能を解析していくうえで重要な働きをすることが期待される。

第2章 T・Bエпитープペプチドがin vitro抗体産生に
及ぼす影響

Effects of nonlinear T and B cell epitope fragments
on in vitro antibody response

【要旨】

B細胞は、細胞表面に抗原特異性を持つB細胞レセプターを表現している。B細胞レセプターの最も重要な機能は、抗原を効率よくとらえてプロセシングの経路に乗せることであると考えられているが、一方ではB細胞レセプターからのシグナル自体がB細胞の増殖に関わるという現象も示されている。ここでは一次構造上離れた部分のB細胞エпитープペプチド22-36とT細胞エпитープペプチド42-56を用いることによりプロセシングの過程を省略し、B細胞レセプターとT細胞からのシグナルを分離させて解析した。B細胞群は β -L Gで免疫したBALB/cマウスの脾臓細胞より調製し、T細胞はT細胞クローンH1.1を用いた。その結果ペプチド42-56はH1.1を活性化することにより単独でB細胞群の抗体産生を促した。また、ペプチド22-36はT細胞エイトープの存在下で抗ペプチド22-36抗体の産生を増強させた。すなわちB細胞エイトープフラグメントは単独では抗体産生に影響を及ぼさないものの、T細胞エイトープフラグメントの存在下という条件の下で抗体産生を増強することが示された。

第1節 緒言

第1章で樹立したCD4⁺T細胞クローンのうち、H1.1および5GはBALB/cマウスにおける主要T細胞エピトープのひとつである42-56残基目を認識して増殖することが明らかとなった。これらT細胞クローンによる抗原認識と免疫応答は、*in vivo*におけるβ-LGおよびβ-LG由来のペプチドフラグメントに対する免疫応答をよく反映すると期待される。すなわちこれらT細胞クローンはβ-LG特異抗体産生に関わるT細胞・B細胞協同作用を*in vitro*で詳細に解析し、T・Bエピトープフラグメントが果たす役割を一層深く理解するための有用な研究材料であると考えられる。

CD4⁺T細胞とB細胞の細胞間相互作用は活発に研究されてきたが(155~161)、抗原特異的免疫応答におけるB細胞の活性化と抗体産生細胞への分化過程についてはいまだに明らかにされていない点が多々ある。抗原特異的B細胞の活性化は、大まかに分けて2つの要素によって制御される。すなわち、クラスII MHC抗原を介するT細胞レセプターとの結合をはじめとするT細胞との接触による活性化情報と、抗原が結合した表面イムノグロブリン(sIg)からの活性化情報が主にB細胞の状態を規定していると考えられる。T細胞からの活性化情報には、CD40やB7等MHCクラスII分子以外の表面抗原を介する直接細胞間接触やIL-4、IL-5、IL-6などサイトカインの効果も盛んに研究されており、それらが複合的にB細胞に作用して抗体産生細胞へと分化させることが明らかにされつつある。それに比べるとsIgを介する抗原情報の細胞活性化への効果については未だに議論が続いている状態である(162~167)。ほとんどの外来性タンパク質抗原はT細胞依存性(TD)抗原であることから、sIgの最も重要な役割は

効率よく抗原をトラップし、MHCクラスII分子に提示することによって結果的にT細胞との接触性を高めることだと考えられている。また、sIgを介して細胞内に取り込まれた抗原は、ピノサイトーシスで取り込まれた抗原よりも優先的にプロセッシングを受け、MHCクラスII分子に提示されるという報告もあり(168~171)、B細胞がsIgを有することによって非常に効果的な抗原提示細胞となることを示している。この抗原捕捉機能がsIgの機能そのものであるという解釈さえうかがえる。

しかしながら、TD抗原特異的sIgを介した刺激そのものがB細胞内に活性化または不活性化の情報を伝達し、T細胞非依存性(TI)抗原と同様にTD抗原に対する抗体産生量にも影響を及ぼしていることを示唆する報告もあり、sIgの機能については今後の研究を待つところが多いと考えられる(165)。

一般的に免疫応答を誘起するためにはT細胞エピトープとB細胞エピトープが同一分子内に存在しなければならないと考えられており、実際にT・Bエピトープを直線化することにより免疫原性を高めたという例は、ハプテン-キャリア系やMAPSシステムなどで示された。(172~176)。ところが最近、独立したハプテンとキャリア、T細胞エピトープフラグメントとB細胞エピトープフラグメントを免疫した場合にも同じようにB細胞エピトープ特異的抗体が産生されることが観察されている(177~179)。

T・B細胞エピトープを直列につないだ場合にはsIgは抗原捕捉による効率的な抗原提示と情報伝達の両方に働いている可能性があるのに対して、独立したフラグメントの場合にはsIgは抗原提示には寄与しないと考えられる。B細胞エピトープとsIgの結合自体が抗体産生量を制御する例として興味深い。

第2章では、第2部第1章で樹立したT細胞クローンとT細胞エ

ビトープペプチドおよびH-2^dにおいて主要B細胞エピトープと考えられるペプチド32-46を用い、これら独立したエピトープフラグメントが*in vitro*抗体産生量におよぼす影響を調べた。

第2節 実験材料および方法

1) β -ラクトグロブリンの調製

1-2-1に記した。

2) 合成ペプチド

2-2-2に記した。B細胞エピトープとしてペプチド22-36、T細胞エピトープとしてペプチド42-56を用いた。コントロールペプチドとしてペプチド72-86を用いた。

3) 実験動物

日本チャールスリバー(東京)より雌のBALB/cマウスを5週齢で購入した。

4) 免疫

一匹あたり100 μ gの β -LGを生理食塩水に溶解し、*Mycobacterium tuberculosis*・H37Ra (Difco)を含むCFAで1:1(v/v)に乳化した後BALB/cマウスの腹腔に注射した。3~8週間後に同様の処理により追加免疫を行なった。

5) B細胞の調製

追加免疫から3~8週間目の β -LG免疫マウスより脾臓を採取した。単細胞懸濁液を調製後、Tris-NH₄Cl溶血処理を行った。すな

わち、0.1 ml 遠沈細胞を 1 ml の Tris-NH₄Cl に懸濁し、氷上に 5 分静置して低張処理した後 8 ml の RPMI1640 で希釈して 1 ml FCS の上に重層した。遠心、洗浄の後以後の操作に用いた。樹状細胞およびマクロファージは、 1×10^7 細胞/ml 培養用培地の細胞懸濁液を 37℃、90 分プラスチックシャーレ上で培養した際に付着する細胞として除去した。さらに RPMI1640 で希釈した抗マウス T 細胞ポリクローナル抗体 (Cedarlane, Ontario) と細胞懸濁液 (1×10^7 細胞/ml) を 37℃、15 分インキュベートした後グルコース含有 RPMI1640 (10 mg/ml グルコース) で洗浄し、同組成培地中のウサギ補体 (Cedarlane, Ontario) で 37℃、30 分処理することにより T 細胞を除去した。RPMI1640 で洗浄した後、パーコールグラジエントで 40/60% の界面で採取された細胞群を *in vitro* 抗体産生試験に用いた。培養用培地の組成は 2-2-8 に記した。

6) CD4⁺T 細胞クローン

2-1 で樹立された T 細胞クローンの中から H1.1 をヘルパー T 細胞として *in vitro* 抗体産生試験に用いた。休止期の H1.1 は遠心分離 (1,500 rpm, 15 分) によりリンโฟライト M と培地の界面を採取することにより得た。

7) *In vitro* 抗体産生系

H1.1 (1×10^4 /well) と B 細胞 (1×10^6 /well) を 24 ウェルプレート中で β -LG またはその部分ペプチド存在下・非存在下で培養した。3 日目に細胞を捕集し、RPMI1640 で 3 回洗浄後、培養用培地で分散して 96 ウェルプレートで培養した。3 日目の培養上清を採取し、特異抗体量を ELISA で測定した (図 62)。

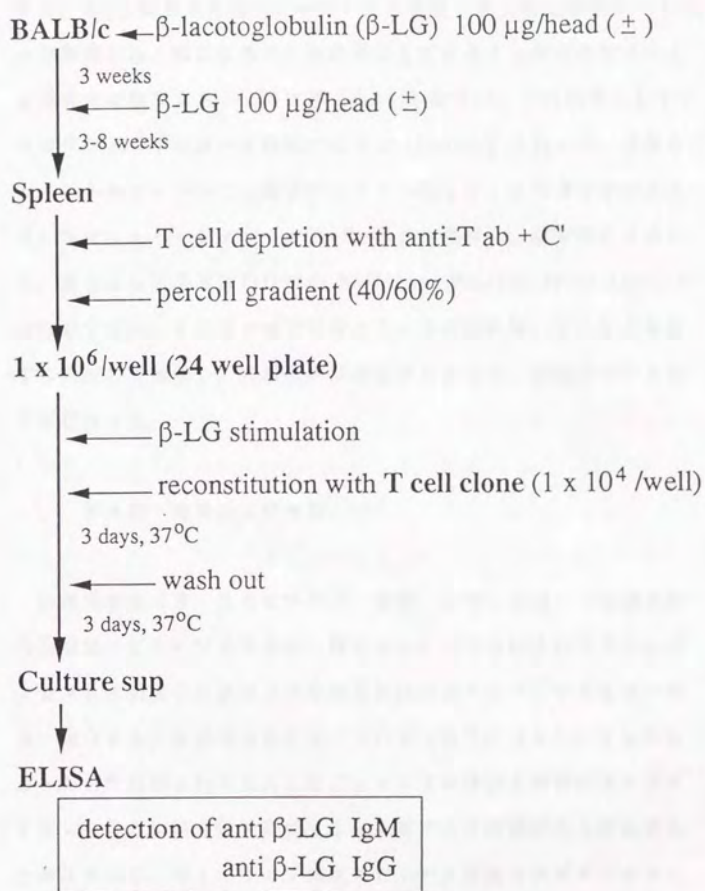


図 6 2. *in vitro*抗体産生系のスケジュール

8) ELISA法

マイクロタイタープレート (Nunc) を β -LG (10 μ g/100 μ l PBS) または合成ペプチド (50 μ g/100 μ l PBS) でコーティングした。0.1% BSA でブロッキングした後培養上清を添加し、4℃、一夜静置した。検出抗体は一次抗体としてビオチン標識抗マウス IgG または抗マウス IgM 抗体 (Zymed) を用い、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識アビジン (Cappel) を用いた。基質は p-ニトロフェニルりん酸2ナトリウム塩を 0.1% 濃度でジエタノールアミンバッファー (pH 9.8) に溶解し、酵素反応に用いた。呈色反応の測定は Titertek Multiskan MCC/340 (Flow Laboratories) を用い、405 nm で行なった。検出抗体はいずれも PBST に希釈して使用し、各段階の間の洗浄も各 6 回、同組成の PBST で行なった。

第3節 結果および考察

抗原性領域 22-36 はマウス・家兎・山羊に共通して認識される B 細胞エピトープであるが、特に β -LG で免疫された BALB/c マウス血清中に産生される特異抗体の多くはペプチド 22-36 に結合することが明らかとなっている (97, 98)。すなわち β -LG で感作された BALB/c マウスの脾臓 B 細胞にはペプチド 22-36 に結合性を持つ sIg を有する B 細胞が多く存在すると考えられる。H1.1 の T 細胞エピトープであるペプチド 42-56 およびペプチド 72-86 もマウスの B 細胞エピトープであるため、*in vitro* 産生抗体の解析においては、ペプチド 22-36 とともにペプチド 42-56、72-86 に特異性を示す抗体の検出を行なった。

図63、64にELISA法による抗体産生量の測定結果を示した。B細胞集団のみでは β -LGに反応しなかったがH1、1との共培養により β -LG存在下でIgMおよびIgG産生能を得た。 β -LGのかわりにT細胞エпитープペプチド42-56のみを添加した培養においても β -LGを添加した場合と同等以上の抗体産生が見られた。

図65と図66にはペプチド22-36、ペプチド42-56、ペプチド72-86を検出抗原としたときのIgM、IgG抗体産生量を示した。一次培養に添加するペプチドがB細胞エпитープペプチド22-36であったときは抗体産生は誘導されなかったが、T細胞エпитープであるペプチド42-56を添加した場合は検出抗原いずれに対しても抗体産生が誘導された。

B細胞エпитープペプチド22-36とT細胞エпитープペプチド42-56を同時に添加した場合には、興味深いことにペプチド22-36に対する抗体価がIgM、IgGともに増強されていた。ペプチド42-56および72-86に対する抗体価には影響がなかった。

β -LGはTD抗原であるため、B細胞が抗体応答をする際のT細胞の補助は必須である。ここでもT細胞エпитープであるペプチド42-56がH1、1を活性化し、*in vitro*抗体産生を誘導するために必要とされた。また、ペプチド42-56により活性化されたH1、1は、いずれのB細胞エпитープに対する抗体産生も等しく誘導した。近年になって活性化T細胞は、産生するサイトカイン・CD40リガンドなどの接着分子によりポリクローナルなB細胞応答を促すことが示されている(157~161)。そのためMHCクラスII分子と抗原の複合体を認識して抗原特異的に活性化されたT細胞は抗原非特異的なヘルパー機能を獲得し、ポリクローナル

In Vitro Antibody Production

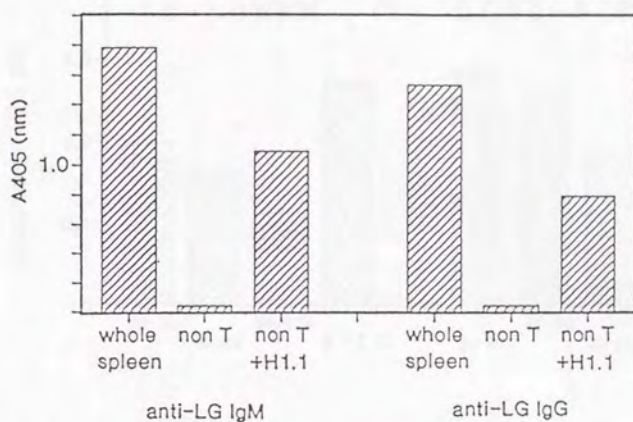


図63. *in vitro*抗体産生系におけるβ-ラクトグロブリン特異抗

体量をELISAで測定した結果

T細胞を除去した脾臓B細胞群では抗体産生が誘導されなかったが、

H1.1で再構成した培養では顕著な抗体産生が見られた。

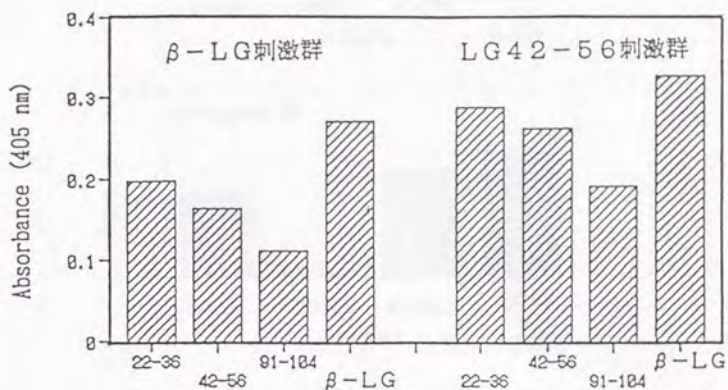


図64. *in vitro*抗体産生系における抗β-ラクトグロブリン
および抗合成部分ペプチド抗体量 (I g M) を

E L I S A で測定した結果

BALB/cマウスにおけるB細胞エイトープペプチド22-36、42-56、91-104およびβ-LGを吸着させたプレートを用いて抗ペプチド抗体量を測定した。β-LGのかわりにH1.1のT細胞エイトープペプチド42-56のみを添加した培養においてもβ-LGと同等以上の抗体産生が見られた。

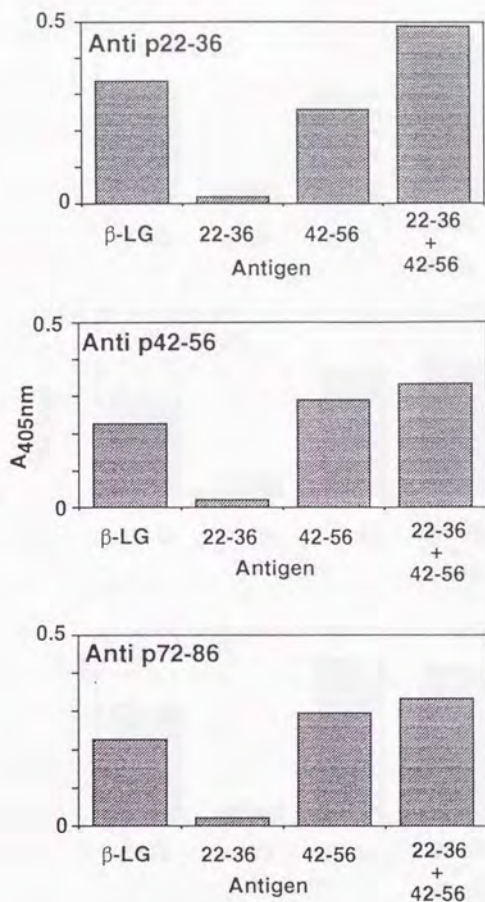


図 65. T細胞クローンH1. 1とB細胞の混合培養系における

I g M抗体応答

BALB/cマウスにおけるB細胞エピソードペプチド22-36、42-56、72-86および β -L Gを吸着させたプレートを用いて抗ペプチド抗体量を測定した。Antigenは培養中の刺激抗原を指し、B細胞エピソードであるペプチド22-36、H1. 1のT細胞エピソードであるペプチド42-56および β -L Gを用いた。

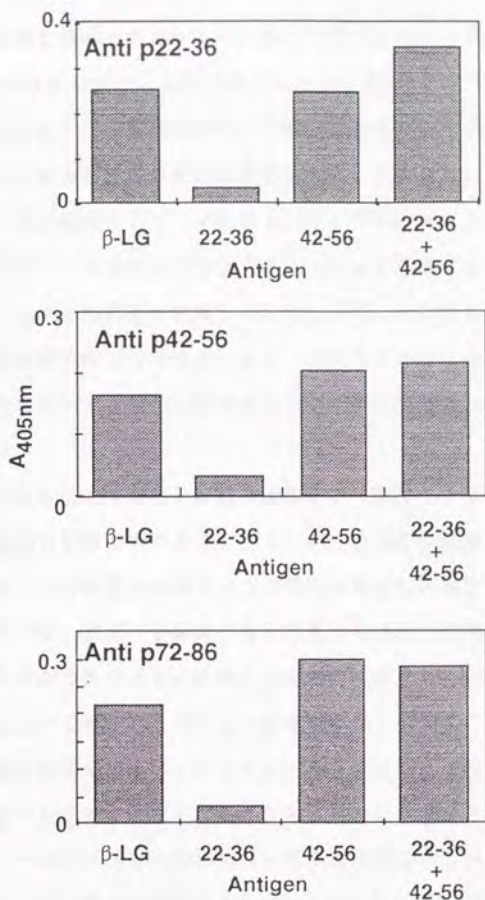


図 66. T細胞クローンH1.1とB細胞の混合培養系における
IgG抗体応答

BALB/cマウスにおけるB細胞エピソードペプチド22-36、42-56、72-86および β -LGを吸着させたプレートを用いて抗ペプチド抗体量を測定した。Antigenは培養中の刺激抗原を指し、B細胞エピソードであるペプチド22-36、H1.1のT細胞エピソードであるペプチド42-56および β -LGを用いた。

な抗体産生を誘導すると考えられる。このバイスタンダー効果は *in vivo* における研究でも観察されている (180)。

これに対して、T細胞エпитープ存在下におけるペプチド 22-36 の抗体産生増強機能は抗原特異的であると考えられた。この実験におけるB細胞エпитープはH1.1のT細胞エпитープと別のペプチドとして与えられているため、sIgの働きとして抗原の補足と抗原提示の効率化は考慮しなくてもよく、B細胞エпитープ特異的な抗体産生増強効果はsIgにペプチドが結合することにより、B細胞の増殖または分化に関与するシグナルが伝えられた結果と考えられた。

一般にTD抗原特異的B細胞の活性化と増殖はsIgMを架橋する等の刺激でも誘導される(181)が、抗体産生細胞への分化はサイトカインや細胞間接触などのT細胞の補助を必要とすることが知られている。また、T細胞の補助を受けられない状態ではsIgMからの刺激は抗体応答にはむしろ抑制的に働くことも知られている(182、183)。このことを考慮するとペプチド22-36がT細胞の補助を促すペプチド42-56の存在下でのみ抗体産生増強に働いたことが理解される。さらにMHCクラスII、LFA-1、IL-2レセプターなどの分子の発現量がsIgMからの刺激で上がるという報告もあり(184~186)、その結果としてB細胞の応答性が増すことも考えられる。

現在はこれらsIgを介する刺激がsIgの架橋により伝えられると理解されているが、ここで用いた低分子でモノバレント(単価)なB細胞エпитープペプチドは単独でsIgを架橋する能力を持たない。sIgの架橋がシグナル伝達に必須であるとすれば、培養初期に産生された抗ペプチド22-36抗体がペプチド22-36と免疫複合体を形成することによって二価となり、sIgを架橋して

いる可能性が考えられる。ただしこの場合も、免疫複合体がFcレセプターとsIgを架橋すればむしろ抑制的なシグナルが入ると考えられ(187)、抗体分子の働きを特定することは困難と思われる。

本章では単一のT細胞クローンの存在下、in vitroにおけるT細胞・B細胞エピトープフラグメントの働きを解析してきたが、最近、in vivoにおいて同様の知見が得られている。すなわち、直線化していないB細胞エピトープペプチドとT細胞エピトープペプチドを免疫したマウスにおいて、免疫に使用したB細胞エピトープに対する抗体価が増強されるという報告がなされている(177~179)。in vitroとin vivoの両方で同様の効果が見られたことは、B細胞エピトープフラグメントが抗体産生に及ぼす影響が既知の範囲にとどまらないことを示唆しており、アレルギータンパク質に対する抗体応答を制御する際にもB細胞エピトープフラグメントの生成動態を注視する必要があると考えられた。

第3章 β -ラクトグロブリン特異的T細胞クローンの

複合的機能解析

Complex effector functions of CD4⁺ T cell clones
specific to bovine β -lactoglobulin

【要旨】

CD4⁺T細胞は複数のサイトカインや細胞間接触を通じて様々な機能を発揮し、生体防御反応や炎症反応を制御している。 β -LGなど食物アレルギーに対する抗原特異的免疫応答を解析する際にも、抗体産生の補助・抑制、炎症の誘起や持続に関わる機能を解析することにより、アレルギー発症のしくみや消化管・皮膚などのアレルギー症状について免疫学的理解が深まると考えられる。特に炎症反応とその遷延化におけるCD4⁺T細胞の役割は大きいとされ、様々なアレルギー症状の緩和もCD4⁺T細胞を制御することにより可能となる場合も考えられる。ここでは β -LG特異的T細胞クローン4株についてそれらの多機能性をサイトカイン産生能、抗体産生補助機能、細胞傷害活性、遅延型過敏症反応(DTH反応)の誘導活性を指標に検討した。サイトカイン産生能はサイトカイン依存性細胞株を用いたバイオアッセイ、ヘルパー機能はin vitro抗体産生系、細胞障害機能は標的細胞からの³H-チミジンの遊離、DTH反応はマウス足しよの浮腫反応をそれぞれ指標として解析した。その結果、2.11Gと6.11Gは比較的高い細胞傷害活性とDTH反応誘起能からT_H1型であり、5Gは高い抗原特異的ヘルパー活性と低いDTH反応誘起能からT_H2型であると考えられた。H1.1はその中間的な機能を示した。

第1節 緒言

CD4⁺T細胞の機能としては抗体産生補助機能が以前より解析されてきたが、生体内では複数のサイトカインや細胞間接触を通じて様々な機能を発揮し、生体防御反応や炎症反応を制御していると考えられる。β-LGなど食物アレルギーに対する抗原特異的免疫応答を解析する際にも、抗体産生補助に関わるCD4⁺T細胞機能のみならず抗体産生の抑制・炎症の誘起や持続に関わる機能を解析することにより、アレルギー発症のしくみや消化管・皮膚などの不快なアレルギー症状の細胞免疫学的理解が深まると考えられる。腸管の炎症緩和に抗CD4抗体の投与が試みられている例もあるように、特に炎症反応とその遷延化におけるCD4⁺T細胞の役割は大きいと考えられ、様々なアレルギー症状の緩和もCD4⁺T細胞を制御することにより可能となる場合も考えられる。

アレルギータンパク質など外来可溶性抗原に対する免疫応答は、MHCクラスII分子と抗原由来ペプチドフラグメントの複合体が特異的なT細胞レセプターに認識されることが端緒となる。そして様々な機能を持つ不均一なT細胞集団により様々な免疫応答が誘導される。ヘルパーT細胞は抗体産生を促すように働き、抑制性または細胞傷害性T細胞はそれを抑制するように働く。また、炎症性T細胞は遅延型過敏症反応(DTH反応)に伴う炎症反応に関与していると考えられている。抗原が生体に入ったあとは、それに対する機能性T細胞の組み合わせが現象の出口となる免疫応答を規定していると考えられる。免疫のシステムは多様な状況に対処するため、一抗原に対しても幅広い機能のバリエーションを持ったT細胞群が準備されていることが望ましい。

免疫応答の方向付け、すなわちどのような種類のT細胞が刺激さ

れるか、またはどのようなT細胞機能が誘導されるかは、抗原の種類と濃度、また抗原とホストストレインとの組み合わせなどの要因により規定される(188)。例えば、*Leishmania*感染に耐性のあるC57BL/6またはC3H/Heにおいては、原虫による感染によりIFN- γ を産生するT細胞が誘導され、結果としてDTH反応を呈する。これに対し、BALB/cなど感染に弱い系統ではIL-4を産生するT細胞の誘導とIgEを含む抗体の過剰産生がみられる(189)。他にも、高濃度のKLH(Keyhole Limpet Haemocyanin)により抗体産生は誘導されるがDTH反応は抑制されるのに対し、低濃度のKLHはDTH反応を誘導するという例が報告されている(190)。

実際の免疫応答においてはIL-4、IFN- γ 、TGF- β 、IL-12などのサイトカインがT細胞の機能を制御するともいわれているが(191、192)、様々な機能が、異なる機能を有するT細胞サブセットを刺激して発揮されるのかまた多機能性を持つT細胞が抗原刺激の条件によりある特定の機能を発揮するようになるのかについてはさらに解析する必要がある。

本章では第1章で樹立した β -LG特異的T細胞クローン4株についてそれらが複数の機能を有するか否かをヘルパー活性、細胞傷害活性、DTH反応誘導活性を指標に検討した。

第2節 実験材料および方法

1) β -LGおよびTNP化 β -LGの調製

β -LGの調製については第1部1-2-1に記した。TNP- β -LGは以下の方法で調製した(193)。 β -LG(23.5 mg)とTNBS(2.7 mg, Sigma)を1 mlのホウ酸緩衝生理食塩水中で

25℃、2時間緩慢に攪拌し、Sephadex G-25 (Pharmacia) カラムでゲル濾過したのちPBS (10 mM) に対して4℃で2日間透析することにより17.1 mgのTNP化β-LGを得た。

2) 実験動物

BALB/c マウス (雌) は日本チャールスリバー社 (東京) より5週齢で購入した。

3) 免疫

B細胞採取用マウスの免疫方法は第2部2-2-4に記した。

4) CD4⁺T細胞クローン

第2部第1章に樹立法等を記した。活性化後3週間以上経たT細胞クローンを、リンフェライトMの界面上に遠心分離 (2,000rpm、15分) により集め、休止期T細胞クローンとして各種アッセイに用いた。

5) *In vitro*抗体産生系

CD4⁺T細胞クローン (1 x 10⁴細胞/ウェル) とB細胞 (1 x 10⁶細胞/ウェル) を24ウェルプレート中でβ-LG (50 μg/ml) の存在下・非存在下で培養した。3日目に細胞を捕集し、RPM 11640で3回洗浄後、培養用培地で分散して96ウェルプレートで培養した。3日目の培養上清を採取し、特異抗体量をELISA法で測定した。B細胞の調製法は第2部1-2-5に記した。

6) ELISA法

マイクロタイタープレート (Nunc) をβ-LG (10 μg/100 μl P

BS) で4℃、一夜コーティングした。0.1%BSAでブロッキングした後培養上清を添加し、4℃、一夜静置した。ビオチン標識抗マウスIgGまたは抗マウスIgM抗体(Zymed)を検出抗体とし、アルカリフォスファターゼ標識アビジン(Cappel)を結合させて酵素反応を行なった。基質はp-ニトロフェニルりん酸二ナトリウム塩を0.1%濃度でジエタノールアミンバッファー(pH 9.8)に溶解して反応に用いた。呈色反応の測定はTitertek Multiskan MCC/340(Flow Laboratories)を用い、405nmで行なった。検出抗体はPBSTに希釈して使用し、各段階の間の洗浄も各6回、同組成のPBSTで行なった。アルカリフォスファターゼ標識アビジン結合後の洗浄は8回とした。

7) サイトカイン産生

マイトマイシンCで処理した脾臓細胞の存在下、T細胞クローンをコンカナバリンA(5μg/ml, Sigma)で刺激し、20時間後の培養上清を採取した。96穴プレートに培養用培地で8段階または16段階までの希釈系列(3連)をつくり、 2×10^4 細胞/ウェルのサイトカイン依存性細胞株を48時間培養した。培養終了4時間前に $[^3\text{H}]$ -チミジン(1μCi/ウェル)でパルスし、セルハーベスター(Skatron 7050)で細胞をハーベストした後、細胞に取り込まれた放射能を液体シンチレーションカウンター(Packard 3255)で測定した(194)。指標細胞にはIL-2依存性細胞株としてCTL-2、IL-4依存性株としてFDC、P2、IL-6依存性株としてB-1-Cを用いた。B-1-Cは後飯塚僚博士(東京大学)より供与していただいた。IL-2とIL-4の活性を中和するモノクローナル抗体としてそれぞれS4B6(抗マウスIL-2モノクローナル抗体)と11B11(抗マウスIL-4モノク

ローナル抗体)を用いた。また、コントロールとして、コンアルブミンに特異性を有するT_H2型のT細胞クローンD10, G4, 1培養上清についても同様の解析を行なった。

8) [³H] チミジン遊離試験 (細胞障害活性試験)

T細胞クローンの細胞傷害活性は標的細胞に取り込まれた [³H] -チミジンの遊離を指標にして解析を行なった (195)。標的細胞としてA20-HLを用いた。A20-HLはA20-2Jのトランスフォーマントで、H-2^dハプロタイプの本MHCクラスII分子とTNP特異的なsIgMを有する (196)。この細胞はDr. Hozumi, Nobumichi (Mount Sinai Hospital Research Institute, Toronto, Canada) より供与していただいた。A20-HLを1μCi / ml の [³H] -チミジン (ICN Biomedicals, Inc.) でラベルし、培養用培地で3回洗浄して試験に用いた。A20-HL (1 x 10⁴細胞) とT細胞クローンを必要なイフェクター/ターゲット (E/T) 比を与えるように96穴丸底プレート (Falcon) の200μlの培養用培地中に分散し、抗原存在下、37℃、5%CO₂でインキュベートした。16時間後、培養上清100μlを採取し、液体シンチレーションカウンター (Packard 3255) で遊離 [³H] -チミジン量を測定した。最大遊離放射能は、Triton X-100を1%になるように標的細胞の培養に添加した際の数値とした。細胞障害活性はパーセント特異遊離量として次に示す式で計算した。

$$SP (\%) = 100 \times ((E - S) / (T - S))$$

SP (%): パーセント特異遊離量

E: 試験検体における遊離量

S; コントロールタンパク質であるオボアルブミンを50 μ g /
ml の濃度で添加した際の自然遊離量

T; 最大遊離量

9) 遅延型過敏症反応 (DTH 反応) の誘起

DTH 誘導能は、T細胞クローンと抗原を直接マウス足しよに注入する方法を用いた(197)。T細胞クローン (5×10^5 または 1×10^6 細胞) を50 μ g の β -LG とともに20 μ l 生理食塩水に分散し、マウス左足足しよに注射した。24時間後、ダイヤルキヤリパー (Ozaki Co., Ltd, 東京) で足厚を測定し、足しよの浮腫反応とした。右足足しよは生理食塩水のみを注入し、コントロールとした。図64に方法を図示した。

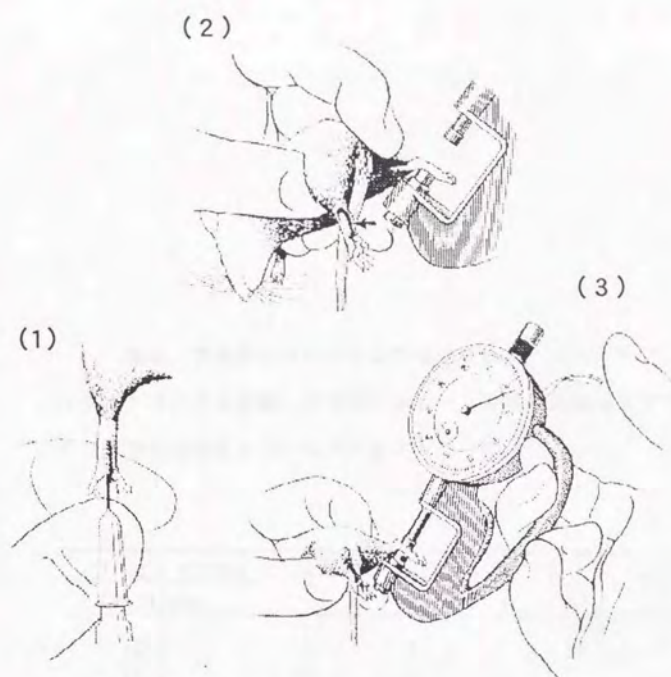
第3節 結果

1) 産生サイトカイン

T細胞クローンの培養上清はいずれもCTL-2、FDC、P2およびB-1-Cの増殖を支持し、表3に示すようにIL-2、IL-4、IL-6を産生していると考えられた。また、CTL-2、FDC、P2の増殖はそれぞれS4B6、11B11で中和された。

2) ヘルパー機能 (抗体産生補助機能)

図68に示すようにいずれのT細胞クローンも一次培養での β -LGの存在下、 β -LG特異的IgMおよびIgGの産生を誘導した。T細胞除去したB細胞群をT細胞クローンと共培養した場合、全脾臓細胞を培養した場合に比べて特にIgM抗体産生が増強されていた。H1.1と2.11Gは β -LGの非存在下においても抗



β-ラクトグロブリン
+
CD4陽性T細胞クローン

図67. 遅延型過敏症反応(DTH反応; 足しよ浮腫反応)の
測定方法

表3. T細胞クローンにより産生されたサイトカイン
 コンカナバリンA刺激したT細胞クローンの培養上清を各サイトカ
 イン依存性細胞株を用いたバイオアッセイに供した。

T cell clones	D10G4.1	H1.1	5G	2.11G	6.11G
Cytokines					
IL-2	-	+	+	+	+
IL-4	+	++	+	++	+
IL-6	++	+	+	+	+

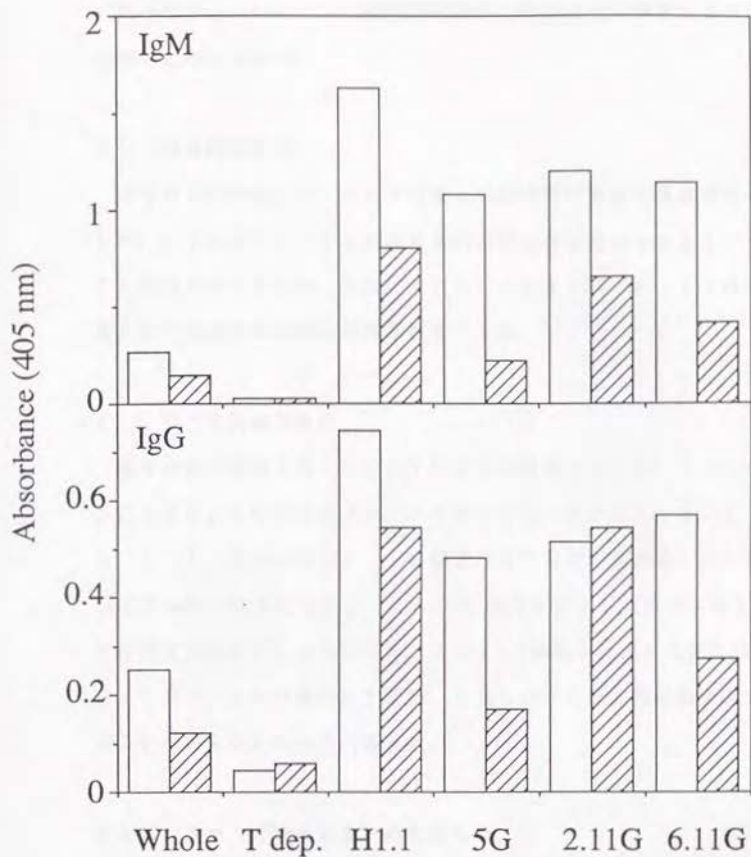


図68. B細胞群とT細胞クローンの供培養中に誘導された
*in vitro*抗体産生量

β -LG存在下(白抜きのカラム)および非存在下(斜線のカラム)における抗 β -LG抗体量をELISA法により測定した。Wholeは脾臓細胞群、Tdep.はT細胞除去脾臓細胞群(B細胞群)を示す。

体産生を誘起しており、これらのクローンは5Gおよび6.11Gに比べてポリクローナル（抗原非特異的）抗体産生を誘導する能力が強いと考えられた。

3) 細胞障害活性

図69にT細胞クローンと共培養した際の標的細胞の傷害率を示した。いずれのクローンも抗原特異的な細胞傷害活性を有していることが明らかとなった。また、4クローンの中では、6.11Gが最も高い抗原特異的な細胞傷害活性を示した。

4) DTH反応誘導能

表4に各T細胞クローンのDTH反応誘導能を示した。 β -L G 50 μ gとともにT細胞クローンを注入することにより、2.11G、6.11GおよびH1.1は顕著なDTH反応を誘導した。5Gは最も弱い誘導能を示し、 5×10^5 細胞を注入した際にはほとんど浮腫反応は観察されなかった。 1×10^6 細胞を注入した際には 4.0×10^{-2} cmの浮腫反応を認め、5GもDTH反応誘導能を有することが明らかとなった（表4）。

第4節 考察（表5にまとめを示した。）

機能性T細胞はその表面抗原により大きくCD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺およびCD4⁻CD8⁻細胞に分けられる。一般的にCD4⁺T細胞はMHCクラスII拘束性でヘルパー細胞として働くと考えられており、それらがサイトカインやT細胞-B細胞間接触を通じてB細胞の抗体産生を補助する機構は徐々に明らかにされてきた（155-161）。一方、CD8⁺T細胞はMHCクラスI分子拘束性で細胞傷害性または抑制性T細胞として働くとされている。しか

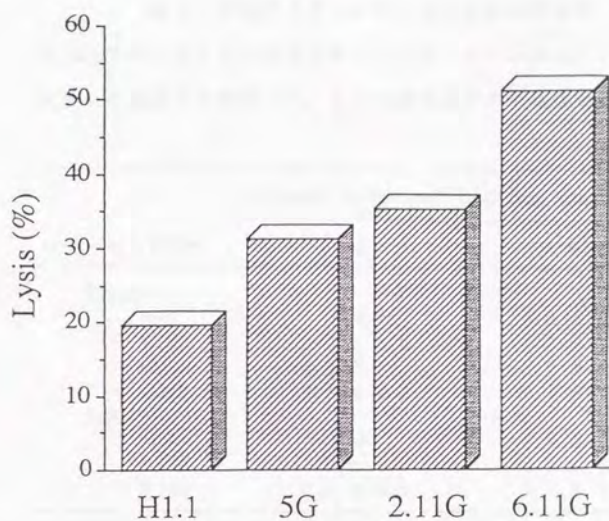


図69. T細胞クローンの細胞傷害活性

T細胞クローン (2×10^4 細胞/ウェル) と供培養した標識済みA20-HL細胞 (1×10^4 細胞/ウェル) から遊離する ^3H -チミジン量を指標とした。TN P- β -LG ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下における3連の培養の平均値を示した。

表4. T細胞クローンのDTH反応誘導活性

BALB/cマウス足しょに直接抗原とT細胞クローンを注入し、24時間後の浮腫反応を測定した。5匹の測定結果の平均値を示した。

T cell clones	Increase in Footpad Thickness (cmx10 ⁻³)	
	β -LG (-)	β -LG (+)
Exp. 1 ¹⁾		
None	n.d. ³⁾	0.0 \pm 0.0
H1.1	1.2 \pm 0.6	5.2 \pm 1.0
5G	1.8 \pm 0.3	2.2 \pm 1.6
6.11G.	1.7 \pm 0.3	5.7 \pm 1.0
Exp. 2 ²⁾		
None	n.d.	0.5 \pm 0.5
6.11G	1.0 \pm 0.0	4.7 \pm 0.2
2.11G	1.1 \pm 0.5	7.4 \pm 1.5

- 1) 5x10⁵ cells of T cell clones and 25 μ g β -LG were used.
 2) 1x10⁶ cells of T cell clones and 50 μ g β -LG were used.
 3) Not determined.

表5. β -ラクトグロブリン特異的T細胞クローンの
性質および機能

	H1.1	5G	2.11G	6.11G
marker	CD4*	CD4*	CD4*	CD4*
Ia restriction	I-A ^d	I-A ^d	I-A ^d	I-A ^d
specificity	pp42-56	pp42-56	n. d.	n. d.
helper function	+++	++	++	++
cytotoxicity	+	++	++	+++
DTH induction	++	±	+++	++

し最近では、T細胞の細胞表面抗原と機能性の面での不均一性が示されるようになった。例えばMHCクラスII分子拘束的に抗原を認識するCD8⁺T細胞(198)、細胞傷害活性を有するCD4⁺T細胞(199)、ヘルパー活性をもつCD4⁻CD8⁻T細胞に分化するCD8⁺T細胞(200)などの報告がある。

本章ではヘルパー活性とともに細胞傷害活性を有するβ-LG特異的T細胞クローンの解析を行なった。すべてのクローンが多機能性を持つことが明らかとなり、ヘルパー活性については抗原特異的な抗体産生と抗原非特異的な抗体産生を共に誘導することが示された。一方、細胞傷害活性は抗原特異的であり、他の報告でも考察されているようにCD4⁺T細胞がその細胞傷害活性を介して抗原特異的抗体産生に抑制的に働く可能性も考えられる(201、202)。

DTH反応誘導能もCD4⁺T細胞、なかでも炎症性T細胞と呼ばれる細胞群の機能として広く知られている(1、2、203、2-4)。β-LG特異的T細胞クローンも抗原特異的DTH反応を誘起する能力を有しており、2.11G、6.11Gは特に強い活性を示すことが明らかとなった。DTH反応で代表されるN型アレルギーは、食物アレルギーと密接に関わる消化管の炎症やアトピー性皮膚炎における炎症反応に関与すると考えられている(11~14)。β-LGが食物アレルギーであることを考慮すると、β-LG特異的CD4⁺T細胞の炎症反応への関与を研究することは将来的に意義深いと考えられる。

一般にマウスCD4⁺T細胞は産生サイトカインの組み合わせにより2つのグループに分けられる(1、2)。T_H1細胞はIL-2、IL-3、IFN-γ、リンフォトキシンを産生し、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10は産生しないとされる。これに対し、T_H2細胞はIL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10

を産生し、IL-2、IFN- γ 、リンフォトキシンは産生しないとされる(205)。また、それらの機能で分類すると、T_H1細胞でDTH誘導能やマクロファージ活性化能、細胞傷害活性が強く(191、206、207)、T_H2細胞では好酸球やマスト細胞の機能こう進や抗体産生補助の機能が強いとされている。しかし最近の報告によると、サイトカインの産生や機能発現のパターンが不均一な場合もある(208~210)。サイトカイン産生のパターンでは、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IFN- γ およびGM-CSFを産生するT_H0やIL-2のみを産生するT_Hpが報告されている(205、206、210)と同時にサイトカインパターンと機能の相関についても多くの例外があることが報告されている(2、3、211、212)。

本章で用いたT細胞クローンはそのサイトカインパターンよりT_H0に分類されると考えられる。機能のパターンからみると、2、11Gと6、11Gは比較的高い細胞傷害活性とDTH反応誘起能からT_H1型であり、5Gは高い抗原特異的ヘルパー活性と低いDTH反応誘起能からT_H2型であると考えられる。H1、1はその中間的な機能を示した。

いずれのT細胞クローンも多機能的であることを考慮すると、CD4⁺T細胞の中には様々なサイトカインの産生パターンや機能を持った細胞が存在し、その機能の発現も、既定されたものではなくむしろ可塑性(弾力性)を持ったものだと考えてもよい。おそらくは抗原濃度、サイトカイン、他の細胞との接触など微小環境の条件によって各細胞の機能が方向付けられると考えられる。

また、これらの β -L G特異的T細胞クローンは、牛乳アレルギーに関わる細胞の免疫応答について新しい情報を得るための有用な道具となると考えられる。

第4章 CD4⁺T細胞クローンによる抗原非特異的抗体産生の促進と抗原特異的抗体産生の抑制

Antigen specific suppression with non-specific enhancement of antibody production by activated CD4⁺ T cell clone

【要旨】

T細胞クローンが多機能的に働くとすれば、実際の免疫応答の場において各々の機能は協同的・相乗的あるいは拮抗的に作用して生体内の変化を決定すると考えられる。本章では、BALB/cマウスの脾臓B細胞群において、活性化H1.1が多機能的に誘導または抑制する抗体応答を観察した。活性化H1.1は、未処理およびβ-LG免疫マウス由来の脾臓B細胞群において抗原非特異的に抗体産生を誘導した。高濃度のβ-LG抗原存在下では抗原特異的な抗体産生は抑制され、その傾向はβ-LGで免疫したマウス由来の細胞群において特に顕著であった。⁵¹Cr遊離法による細胞傷害試験の結果、抗体産生抑制の一因としてH1.1の細胞障害作用が関与していることが示唆された。単一T細胞クローンが抗原濃度に応じてin vitroで多機能的に働き、抗原特異的抗体産生を促進・抑制の両方向に制御する事象が示されたことより、生体における一つのT細胞の機能も、弾力性を持って発現されると推測される。すなわち抗原濃度、サイトカイン、他の細胞との接触など微小環境の条件によって各細胞の機能、ひいては免疫応答が方向付けられると考えられた。

第1節 緒言

第3章では β -L G特異的CD4⁺T細胞クローンが抗原刺激に対して様々なエフェクター機能を発揮することを示した。実際の免疫応答の場において各々のエフェクター機能は協同的・相乗的あるいは拮抗的に作用して生体内の変化を決定すると考えられる。また生体内にはもうひとつの大きなT細胞群としてCD8⁺T細胞が存在し、これらもまたCD4⁺T細胞に協同的あるいは拮抗的に働いて外来性抗原に対する免疫応答をよりきめ細やかなものに行っている。第4章ではCD4⁺T細胞クローンの複合的なエフェクター機能により抗体応答が制御される例を*in vitro*で示すことを目的としている。

一般にCD4⁺T細胞は産生サイトカインや細胞間接触による抗体産生補助機能を持ち、CD8⁺細胞は抑制性または細胞障害性機能を有するとされているが、最近の研究により、ヘルパーT細胞の新しい側面がいくつか明らかにされつつある。

まず、活性化T細胞およびそれらから分離した細胞膜には、抗原の非存在下で、MHCクラスII分子を介さないB細胞との接触によりB細胞のポリクローナルな応答を誘導する働きがあることが示された(157、159、213~218)。結果として、抗原非特異的な細胞間接触がMHCクラスII分子を介した抗原特異的な細胞間相互作用と同様に重要であると認識され、CD4⁺T細胞とB細胞の接触により抗原特異的抗体産生ばかりでなく非特異的な抗体産生も促されることが知られるようになった(161、219~226)。また、ヘルパー機能のみでなく細胞障害性ももつ多機能性CD4⁺T細胞の研究も行なわれるようになった(199、201、227~232)。

さらに、MHCクラスII分子拘束的に抗原を認識するT細胞の細

胞障害活性が抗体産生に抑制的に働く機構も提唱され(198、199、201、233)、CD4⁺T細胞が示す細胞障害活性には非特異的なバースタンダー細胞障害と抗原特異的な直接的なターゲティングがあることも明らかにされた(230、231、234-243)。このことは、機能性T細胞により抗原非特異的な抗体産生抑制と抗原特異的な抗体産生抑制の両方が起こり得ることを示している。

このように、CD4⁺T細胞の抗体産生応答における働きは、従来考えられていた図式より複雑であると考えられる。CD4⁺T細胞の介在により、抗原特異的および抗原非特異的な抗体産生が増強にも抑制にも働く可能性があることから、抗原情報等の条件により多機能性CD4⁺T細胞クローンがどのように抗体産生を制御するかを解析することは重要であると考えられる。H1.1は強いヘルパー機能と細胞障害性機能を合わせもつCD4⁺T細胞クローンであることから、本章ではH1.1の複合的機能が*in vitro*抗体産生に及ぼす影響を解析した。

第2節 実験材料および方法

1) 抗原タンパク質の調製

β -LGは1-2-1に示した方法で調製した。ウシ β -カゼインおよび鶏卵オボムコイドはそれぞれHippら(244)およびFredericqとDeutch(245)の方法に従い調製し、さらにイオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した。TNP化 β -LGの調製法は第2部3-2-1に記した。

2) 実験動物

BALB/cマウス雌とSDラット雌は日本チャールスリバー（東京）より5週齢で購入した。

3) 免疫

第2部2-2-4に記した。

4) 細胞の調製

(A) B細胞

第2部2-2-5を参照。β-LGで免疫処理をしていないマウスについても脾臓細胞より同様にしてB細胞を調製した。

(B) T細胞クローン

H1.1はβ-LGとマイトマイシンC処理した同系脾臓細胞で活性化した。1日後、活性化H1.1をリンフォライトMの界面上に集め、洗浄した後*in vitro*抗体産生試験に供した。

(C) 標的細胞

J774.1、A20-2J、A20-HLおよび脾臓細胞を細胞障害試験における標的細胞として用いた。付着性細胞は、培養用培地に 1×10^7 細胞/mlに分散したβ-LG非感作マウス由来の脾臓細胞をプラスチック培養用シャーレ（Falcon）中で37℃、90分、5%CO₂下でインキュベートした際の付着細胞として分離した。sIgGを持つB細胞はβ-LGで免疫したBALB/cマウスより10μg/mlの抗マウスIgM（Cappel）またはIgG抗体（Serotec）で4℃、18時間コーティングしたプラスチックシャーレ上でパンニング法により分離した。シャーレより使用直前に抗-Ig抗体液を除き、PBSで3回洗浄した。炭酸水素ナトリウム

不含の5% FCS-培地で 1.5×10^7 個/mlに分散した脾臓細胞を4 ml加え、水平な机の上で30分室温に保った。シャーレを静かに回し、さらに30分間静置した。1時間後、シャーレを注意深く揺り動かして付着しない細胞を浮遊させ、ピペットで取り除いた。この操作を3回繰り返して行なった。シャーレから非附着性細胞を取り除いたのち、付着した細胞層を10 mlの Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 不含PBSで5回洗った。洗浄した細胞層に、5 mlのリドカイン溶液を加え、15分室温で静置した。パスツールピペットを用いて、溶液を激しく細胞に吹き付け、付着細胞を剥した。全部はがれるまで必要に応じて繰り返す。200 gで10分遠心して細胞を集め、RPMI1640で2回洗浄をおこなった(246)。

5) In vitro抗体産生系

第2部2-2-7に記した。

6) ELISA法

各抗原を $10 \mu g/ml$ の濃度でマイクロタイタープレートに吸着させた。その他の操作は第2部2-2-8に記した。

7) 細胞障害性試験

H1.1の細胞障害活性は標識した標的細胞からの遊離 ^{51}Cr 量を指標として測定した。図67に作業の流れを図示した。標的細胞(1×10^7 細胞/ $100 \mu l$ FCS)を $100 \mu Ci$ の $Na [^{51}Cr] O_4$ (sodium chromate, ICN Biomedicals, Inc.) と $37^\circ C$ 、45分インキュベートし、培養用培地で3回洗浄して試験に用いた。腫瘍細胞ラインは 1×10^4 細胞とH1.1、脾臓細胞は 8×10^4 細胞とH1.1を必要なイフェクター/ターゲット(E/T)比を

与えるように96穴丸底プレート (Falcon) の200 μ lの培養用培地中に分散し、抗原存在下、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂でインキュベートした。16時間後、培養上清100 μ lを採取し、ガンマカウンター (MINAXI γ , Packard) で遊離⁵¹Cr量を測定した。最大遊離放射能は、Triton X-100を1%になるように標的細胞の培養に添加した際の数値とした。細胞障害活性はパーセント特異遊離量として次に示す式で計算した。

$$SP (\%) = 100 \times ((E - S) / (T - S))$$

SP (%): パーセント特異遊離量

E: 試験検体における遊離量

S: 自然遊離量

T: 最大遊離量

図70に試験のスケジュールを示した。

第3節 結果

1) 非免疫マウス由来B細胞の抗体産生応答

B細胞に対するT細胞の非特異的ヘルパー機能をみるため、抗原非感作マウス由来のB細胞と活性化H1.1を β -LGの存在下および非存在下で共培養した。二次培養時の培養上清中の抗 β -LG、抗 β -CN、抗オボムコイド(OM)抗体価を測定した結果を図71に示した。脾臓細胞や分離したB細胞群では高い抗体価が得られなかったのに対し、活性化H1.1とB細胞の共培養では相当量のIgMとIgGが産生されていた。H1.1の培養上清のみでは抗体産生が誘導されないことは別の実験で確認した。

活性化H1.1とB細胞の共培養の上清中には、コントロールタンパク質に対する抗体も β -LG特異抗体と同様に産生されており、

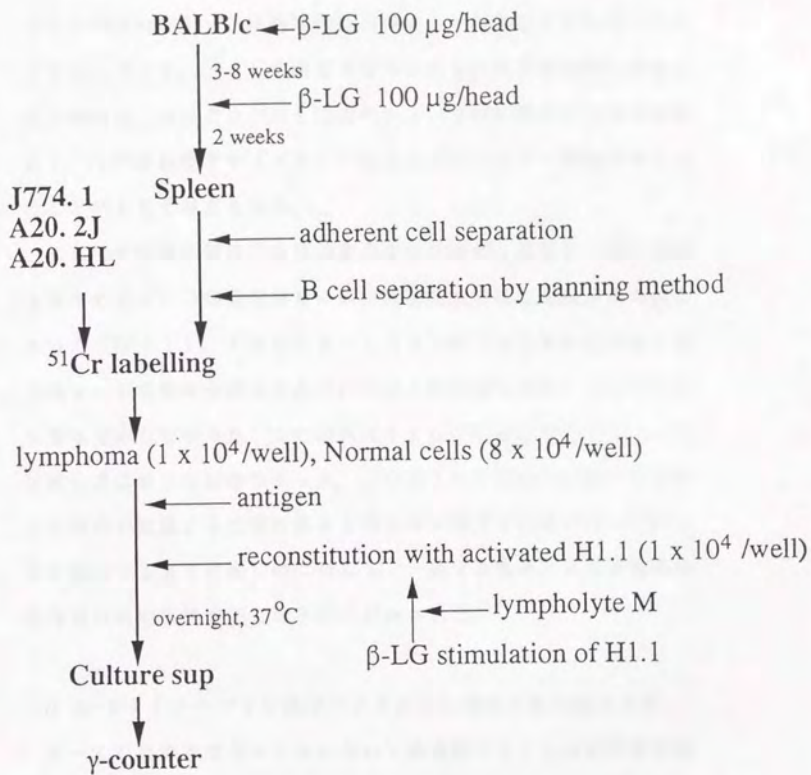


図70. ^{51}Cr 遊離試験のスケジュール

B細胞の非特異的な抗体応答が誘導されたことを示している。興味深いことに、このポリクローナルなB細胞の応答は β -L Gの非存在下でも誘導され、コントロールタンパク質に対する抗体産生量は β -L Gの濃度依存的に増強される傾向があった。

これらの結果はB細胞のポリクローナルな活性化がMHCクラスIIに非拘束的なT-B細胞間相互作用により引き起こされていることを示している。 β -L G濃度の増加に伴う抗原非特異的な抗体産生の増強は、MHCクラスII拘束的なT-B細胞間相互作用の結果H1.1の細胞数やサイトカイン産生などのヘルパー機能が高まったことによると考えられる。

ところで抗原非特異的な抗体産生応答の様式と異なり、同一培養上清中の β -L G特異抗体量には抗原濃度依存的な増加がみられなかった(図71)。すなわち β -L G非存在下の培養中には相当量の抗 β -L G抗体が産生されていたが、抗原量を増加してもその産生量は変わらなかった。この傾向はI g G抗体産生量よりI g M抗体産生量において顕著であった。このようにT細胞の認識する抗原とB細胞の認識する抗原が異なる場合は高濃度の抗原が高い抗体応答を誘導するように働くのに対して、一致する場合には抗原特異的抗体産生は応答性が悪くなることが示された。

2) β -ラクトグロブリン感作マウス由来B細胞の抗体産生応答

β -L G抗原非感作マウスにおいて高濃度の β -L Gが抗原特異的抗体産生に不利に働くことが示されたが、この傾向は抗原特異的B細胞群が増幅された培養系ではより顕著にみられると考えられる。そこで β -L Gで免疫したマウスを用いて同様の*in vitro*抗体産生試験を行なった(図72)。非感作マウスの場合と異なり、 β -L Gで免疫したマウス由来の全脾臓細胞は β -L G特異抗体を産生し

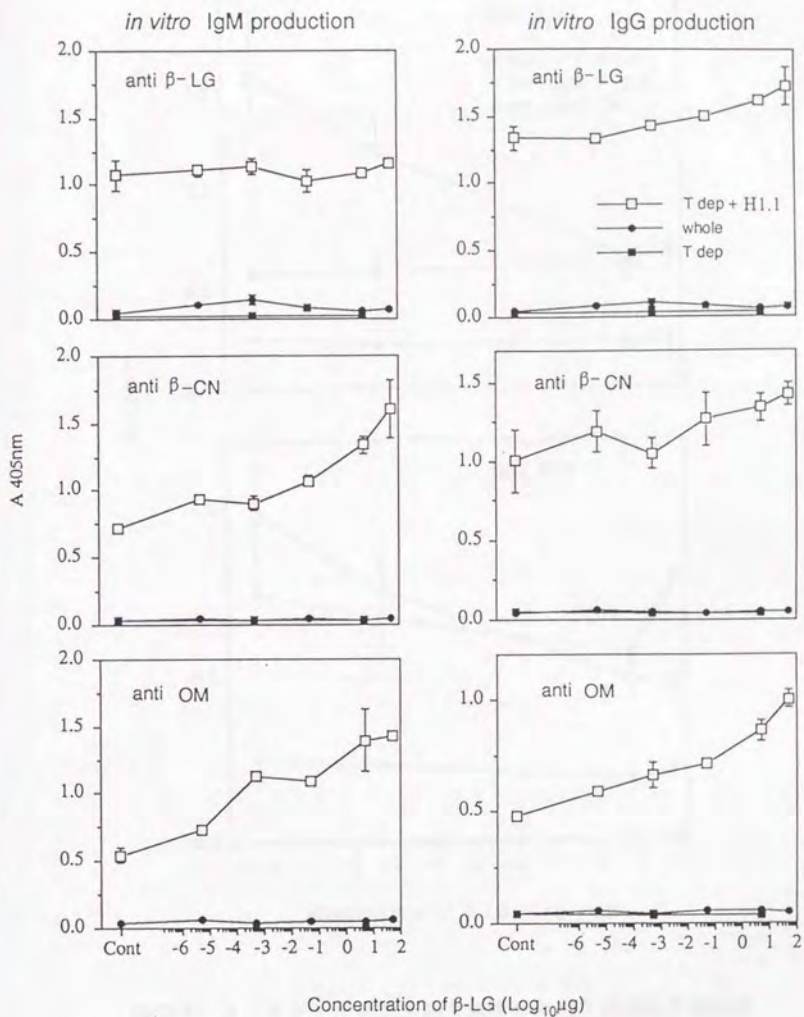


図 7 1. 非免疫マウス由来 B 細胞の抗体産生応答

脾臓細胞 (黒丸)、B 細胞 (黒四角) および H1. 1 と B 細胞の共培養 (白丸) を各濃度の β -LG 存在下で培養した。 β -LG、 β -CN、OM 特異的 IgM、IgG 抗体を ELISA 法で測定した。

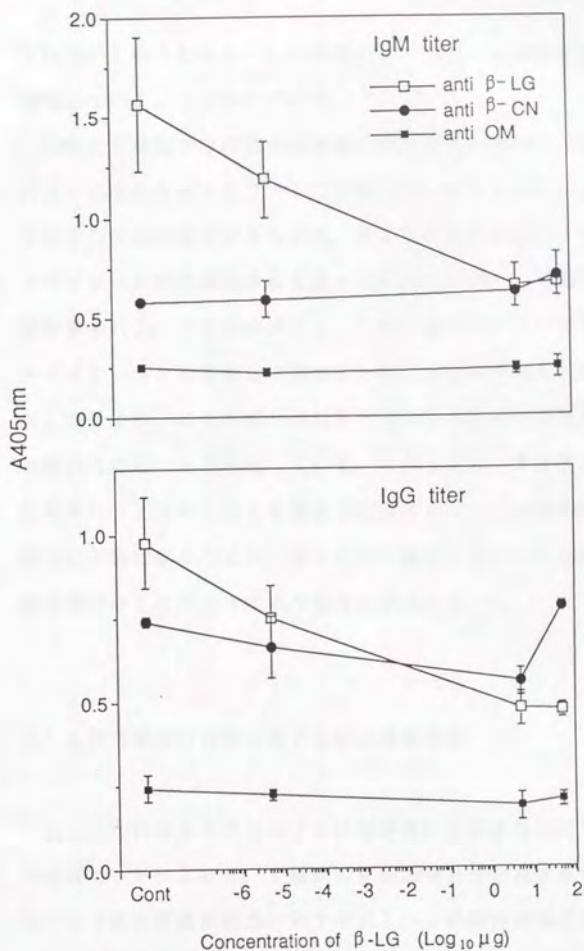


図72. β -ラクトグロブリンで免疫したマウス由来B細胞の
抗体産生応答

H1.1とB細胞を各濃度の β -LG存在下で共培養した。 β -L
G(白四角)、 β -CN(黒丸)、OM(黒四角)特異的IgM、
IgG抗体をELISA法で測定した。

ていた。このことは β -L G 特異的な T 細胞・B 細胞が感作され、増幅していることを示している。

活性化 T 細胞と B 細胞の共培養の系では、非感作マウスの場合と同様に抗原非存在下で β -L G 特異抗体とコントロールタンパク質に対する抗体の産生がみられた。そして予想されたように抗原存在下では β -L G 特異抗体産生量が抗原濃度依存的に抑制される現象が観察された。この抑制は H 1. 1 の T 細胞エピトープであるペプチド 42-56 を高濃度で添加した際にも観察される（未掲載データ）ことより、この抑制が MHC クラス II 拘束性の細胞間相互作用の結果であることを示唆している。このように、T 細胞と B 細胞の抗原タンパク質が一致する場合 T 細胞エピトープが抗原特異的抗体産生に不利に働くことが、 β -L G で感作したマウス由来の脾臓細胞を用いることによってより顕著に示された。

3) 各種抗原提示細胞に対する細胞障害活性

In vitro 抗体産生系における抗原特異的抗体産生抑制を説明する可能性のひとつとして、T 細胞の細胞障害活性が挙げられる。図 7-3 には各種抗原提示細胞に対する H 1. 1 の細胞障害活性を示している。腫瘍細胞ラインと正常脾臓細胞はいずれも β -L G の存在下、H 1. 1 との共培養により抗原特異的に傷害された。A 20-H L を用いた試験では、TNP 特異的な s I g M 抗体から効率良く抗原分子が取り込まれる様 TNP 化 β -L G を抗原として用いた。別の実験で、MHC クラス I 分子を有し、クラス II 分子は表現していないマストサイトームである P 8 1 5 (H-2^d) を H 1. 1 の標的細胞として用いた際には細胞障害活性はみられなかったこと（未掲載

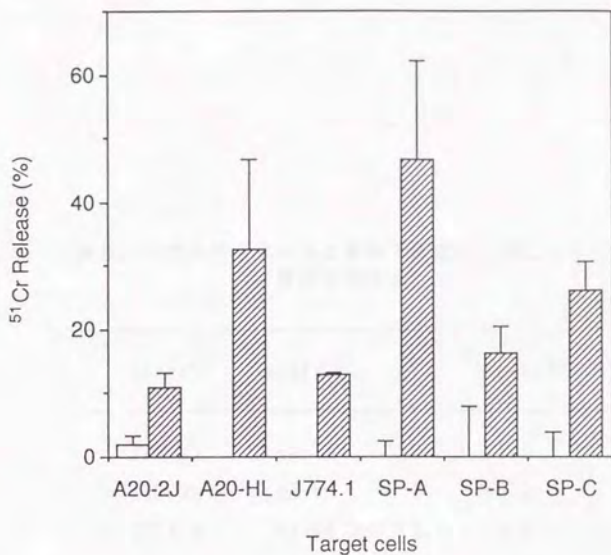


図 73. H 1. 1 の細胞傷害活性

標識した各種標的細胞からの ^{51}Cr 遊離量を指標とした。オボアルブミン（白抜きのカラム）および β -ラクトグロブリン（斜線のカラム）、A20-HLが標的細胞の場合TNP- β -LG存在下での傷害率を3連の培養の平均値で示した。脾臓細胞（SP）は β -LGで免疫したBALB/cマウスより調製した。AはsIgMを表現する細胞群、BはsIgGを表現する細胞群、Cは付着性細胞群における結果を示す。

表6. ペプチド42-56存在下におけるH1. 1の
細胞傷害活性

target	antigen	E/T	lysis (%)
A20.2J	42-56	2	11.5
A20.HL	42-56	2	40.2
J774.1	42-56	2	12.6
slgG	42-56	2	36.0
MΦ	42-56	2	33.7

データ) および表6に示すようにH1. 1のT細胞エピトープであるペプチド42-56が β -LGと同様に抗原特異的細胞障害活性を示したことを考え合わせ、これら抗原提示細胞はMHCクラスII拘束的に傷害されていることが示された。

第4節 考察

CD4⁺T細胞が機能的に不均一な集団であり、個々の細胞も多機能性を持つことは従来の研究の中で提唱されてきた(1-3, 247, 248)。H1. 1をはじめ本研究で樹立したT細胞クローンについても、第2部第3章で示したようにヘルパー機能、細胞傷害活性、DTH反応誘導能が認められており、*in vivo*における免疫応答の際にも多機能的に働くと期待される。そこで特定の抗原に対してバランスのよい免疫応答を導くために個々のT細胞が抗原濃度、介在サイトカイン、近隣の細胞との相互作用など微小環境の条件に応じて最適な機能を発揮すると考えるのは魅力的である(188, 249)。

本章では*in vitro*抗体産生におけるH1. 1の多機能性を、ヘルパー機能と細胞傷害性機能に着目して解析した。活性化H1. 1はMHCクラスII拘束性の相互作用をすることなく抗原非特異的にB細胞を活性化し、抗体産生細胞への分化を導いた。また抗原非特異的抗体産生は β -LG濃度の増加に伴って増強されたが、抗原特異的抗体産生は高濃度の抗原存在下で抑制された。このように β -LGの濃度は抗原特異的および非特異的な抗体産生のバランスを規定するための重要な条件であることがわかる。

一般にCD4⁺T細胞のヘルパー機能(T細胞-B細胞間相互作用)は2相に分けられる。まずMHCクラスII分子と抗原の複合体をT

細胞レセプターで認識して機能を誘導する導入相とクラスII分子非拘束的、抗原非特異的に細胞間接触を行なってサイトカインなどでB細胞の増殖・分化を誘導する効果相である(224、225)。最近になって活性化T細胞に表現されるCD40リガンドがマウス(161、224、250、251)やヒト(223、252~254)のB細胞の分化・増殖を引き起こす分子であることが明らかとなった。また、CD40から入ったシグナルは結果的にLFA-1を介したB細胞の接着性も上げることが示されている(255)。さらに主としてT_H2タイプの活性化T細胞から分泌されるIL-4がB細胞の分化因子として働くだけでなくケモアトラクタント(化学走化性因子)としてT細胞-B細胞間相互作用を増強することも提唱されている(256)。

活性化H1、1の場合にもこのような機構でB細胞と影響し合い、抗原存在化・非存在下の両方においてポリクローナルな抗体応答を引き起こしていると考えられる。

CD4⁺T細胞の細胞傷害機能については、抗原非特異的なバスター細胞傷害(231、237、243)と抗原特異的・直接的な標的細胞傷害(198、234、242)の2つの機構が提唱されている。また、ウイルス感染した標的細胞に対しクラスII拘束性CD4⁺細胞傷害性T細胞が誘導されるという報告もある(257、258)。可溶性抗原に対する細胞性免疫のしくみが生体に備えられていることは十分考えられ、クラスII分子拘束性T細胞が細胞傷害性機能を発揮して抗原特異的な抗体産生の抑制に関わっている可能性については既にいくつかの研究グループで検討がなされてきた(198、199、201、229、233)。本研究で観察された抗原特異的な抗体産生抑制効果も少なくともその一部は直接的な抗原提示細胞の傷害によるものではないかと考えられる。

ここでB細胞の一部はH1.1とMHCクラスII分子を介した接触をし、細胞傷害を受けていると考えられる(図74)。 β -L G特異的なs I gを持つB細胞は抗原を取り込む効率が良いため優れた抗原提示細胞となる(168~171)が、MHCクラスII分子を介した接触のため細胞傷害を受け易いとも考えられる。結果として、コントロールタンパク質に対する抗体応答に比べて β -L G特異抗体の応答は不利になると理解される。抗原濃度が高い条件下であったり、 β -L G特異的B細胞の占める比率が高い条件下であれば、 β -L G特異的抗体産生に対する抑制はより顕著になると考えられる。また、高濃度の抗原存在下では、 β -L G特異的なs I gを持たないB細胞においてもピノサイトーシスによる抗原の取り込みを経、効果的に抗原提示細胞として働くと考えられ、この場合には抗原特異性の一致しないB細胞も細胞傷害を受けると理解される。

β -L Gで免疫応答したマウスから得た細胞集団や β -L Gで抗原刺激した細胞集団では、 β -L G特異的B細胞プラストがコントロールタンパク質に特異的なB細胞プラストより多いため、バースタンダー細胞傷害も抗原特異的抗体産生の抑制に働き得る。バースタンダー細胞傷害は活性化された抗原提示細胞にのみ有効に働くため(228、242)、 β -L G特異的なB細胞プラストは休止期のB細胞より傷害され易く、抗原特異的な抗体産生抑制を導くとも考えられる。しかしながら、本研究の培養系ではパーコールグラジェントによりラージB細胞が採集されているため、抗原特異的なB細胞も抗原非特異的なB細胞も等しくバースタンダー細胞傷害の影響を受けるはずである。抗原特異的な抗体産生抑制が観察されたことより、MHCクラスII分子を介する直接的な標的細胞傷害が起きていると考えたほうが理解し易い。

本章では、T細胞源として1種類のCD4⁺T細胞クローンしか存

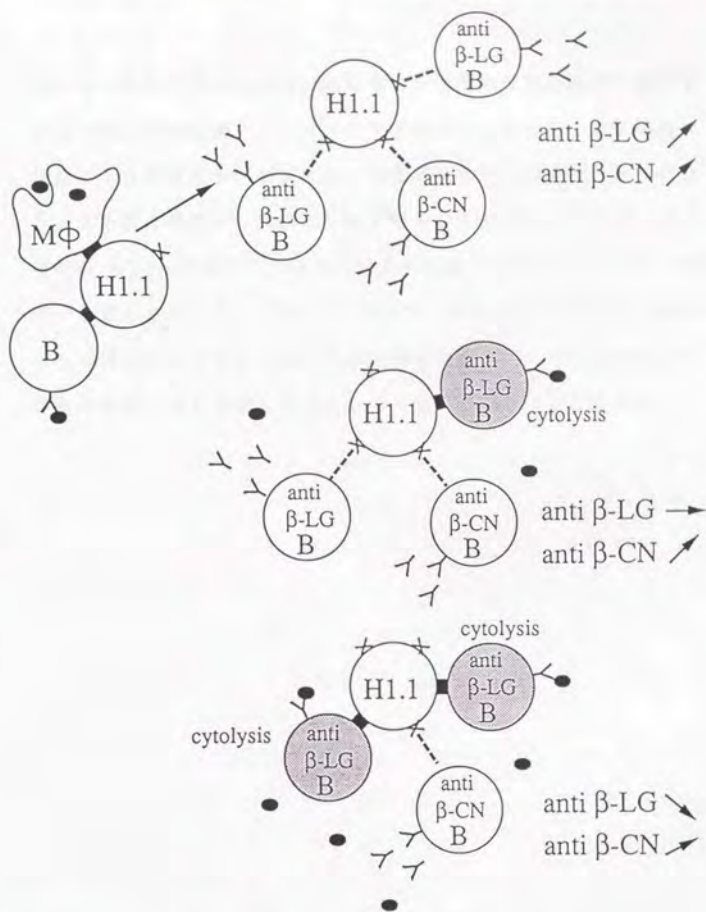


図74. 想定される抗原特異的・非特異的抗体応答における
活性化H1.1の働き

抗原（黒丸：β-LG）存在下、β-LG特異的sIgを持つB細胞は抗原特異的応答、β-CN特異的sIgを持つB細胞は抗原非特異的抗体応答をする。既に活性化されたT細胞クローンH1.1の下ではサイトカインおよびCD40リガンドなどの機能分子Xを介して抗原非特異的な抗体応答が起こるが、活性化T細胞は細胞傷害活性をも獲得しているため抗原-MHCクラスII分子複合体を介した接触はB細胞の傷害（影付きのB細胞）につながる。抗原特異的B細胞は良い標的細胞となるためβ-LG特異的B細胞は抗原存在下で優先的に傷害され、抗β-LG抗体の産生は抑制される。抗原濃度がさらに高まるとβ-CN特異的B細胞もピノサイトーシスによりβ-LGフラグメントを提示し、標的細胞となると考えられる。

在しない条件下での *in vitro* 抗体産生を指標に T 細胞機能の解析を行なった。その結果、1 クローンではあっても T 細胞の持つ複数の機能により抗体産生が制御され、抗原濃度など微小環境の条件により抗体応答は増強にも抑制にも働き得ることが示された。こうした現象が *in vivo* でも起こり得るか否かを検証するにはさらに多くの研究が必要とされるが、CD4⁺T 細胞が、抗体産生を補助する機能とともに MHC クラス II 拘束性の細胞傷害活性を介して抗原特異的抗体産生抑制に働く役割も合わせもつ可能性は高いと考えられる。

結 語

本研究第1部では牛乳アレルギーである β -LGのB細胞・T細胞エピトープを詳細に解析した。第2部では β -LG特異的T細胞クローンを樹立してその機能解析を行なった。また、T細胞クローンをを用いた免疫応答の*in vitro*モデル系においてT細胞・B細胞エピトープフラグメントの機能について新たな知見を得、さらに単一T細胞クローンも微小環境に応じて多機能的に免疫応答の調節を行ない得ることを示した。

β -LGについては、その抗原性に関する知見のみならず、乳清中主要タンパク質として各種の物理化学的性質が明らかにされている。その履歴に加え、本研究により詳細な抗原構造が明らかとなったと同時に特異的T細胞クローンが初めて樹立された。 β -LGのアレルゲンとしての重要性はいうまでもないが、抗原認識・免疫応答機構に関する分子論的解析のためのモデルタンパク質としての価値も一層高まったと考えられる。

さてアレルギーの予防や不快な症状の緩和を求める声が高まってきた中で、今後アレルギー特異的免疫応答機構が一層活発に研究されることが予測されるが、本研究で得られた知見は、低抗原性 β -LGの分子設計等に役立つばかりでなく、広く β -LGあるいは他抗原により引き起こされるアレルギー症状や免疫応答の基礎的知見として活用されることが期待される。また、本研究で得られた β -LG特異的T細胞クローンおよび解析された多機能性は、今後もアレルギー症状における炎症反応等新しい情報を得るための有用な道具となることが期待される。

エピトープ特異的な免疫応答機構の詳細の解明、アレルギー発症に至るプロセスの解明、それらをペプチドフラグメントや変換タンパク質で制御していくことへの期待は大きく、本研究の成果もその発展に寄与できることを願う。

論文の内容の要旨

論文題目 β -ラクトグロブリンに対する抗原特異的
免疫応答に関する研究

Studies on β -lactoglobulin Specific
immune response.

氏名 辻典子

日本人が快適な生活を求め、衣食住すべてのスタイルを変化させてきたことに比例するようにアレルギー疾患が増え続けている。牛乳アレルギーなど食物アレルギーも小児を中心に多くの患者を悩ませており、予防法・治療法の確立が望まれている。 β -ラクトグロブリン(β -LG)はウシをはじめヤギ、ヒツジなどの乳清中に含まれるが人乳中には含まれず、牛乳中最もアレルギー性の高いタンパク質として古くから研究されてきた。

タンパク質自身がアレルギー反応など免疫応答を制御する領域としてB細胞・T細胞エピトープがある。B細胞エピトープは抗体が結合する領域であり、アレルギータンパク質が肥満細胞上のIgE抗体を架橋して即時型アレルギーの症状を誘起する部位、または様々な分化過程にあるB細胞の表面イムノグロブリン(B細胞レセプター)に結合して効率良い抗原提示やB細胞へのシグナル伝達を促す部位としてその重要性が注目されている。B細胞エピトープがB細胞の活性化あるいは不応答化の鍵を握り、B細胞レパートリーを決定するとすれば、その解明の意義は大きい。

T細胞エピトープも抗原特異的免疫応答に重要な役割を果たす。食物アレルギーなど外来性の抗原タンパク質は生体内の抗原提示細胞(APC)のエンドソームに取り込まれた後酵素分解を受けてペプチド断片となるが、その中のいくつかはT細胞エピトープ部分は含まれている。MHCクラスII分子はこれらのペプチド断片と会合し、細胞表面に提示する機能分子であり、その複合体は

T細胞レセプターを介して抗原特異的T細胞の活性化を促すこととなる。抗体産生をはじめとする外来抗原タンパク質に対する様々な免疫応答にはこのT細胞による抗原認識とその活性化が必須であり、T細胞エピトープの解明はアレルギー特異的免疫応答制御のための基礎的知見として非常に重要である。

さて外来抗原処理過程でMHCクラスII分子拘束的に活性化されるT細胞は多くの場合CD4⁺T細胞であり、それらは様々なサイトカインを産生したり様々な細胞と細胞間接触を行なうことにより抗体産生の補助、遅延型過敏症反応(DTH反応)の誘導など幅広い機能を発揮し、免疫応答を調節する。すなわちT細胞エピトープを介したT細胞の活性化は、IgE産生を介して即時型アレルギー反応に関わるのみならず、IgE以外の抗体産生・マクロファージや好酸球等の集積など幅広い生体内変化に関わり、遅発型・遅延型または慢性のアレルギー症状にも関与するとされる。

個々のT細胞が免疫応答の際に、抗原濃度・介在サイトカイン・近隣の細胞との相互作用など微小環境条件に応じて機能を発揮し、特定の抗原に対してバランスのよい免疫応答を導こうとするとの考えは魅力的である。微小環境を変化させることによりT細胞機能のスペクトルを調節し、炎症局所における抗体産生や細胞の集積も制御する道が拓かれることが期待される。各細胞の多機能性を問うこれらの解析には、抗原特異的CD4⁺T細胞クローンが有用である。

本研究ではβ-LGをモデルタンパク質として選び、合成ペプチドを用いてマウス・家兎・山羊におけるB細胞エピトープ、3系統のマウスにおけるT細胞エピトープの解析を行なった。また、β-LG特異的CD4⁺T細胞クローンを樹立し、それらを用いてエピトープ特異的T細胞・B細胞間相互作用、抗原特異的抗体産生応答の制御や遅延型過敏症反応の誘導など、抗原特異的免疫応答の機構解析を行なった。

【第1部第1章 B細胞エピトープの限定化】

β-LGで免疫したICRマウス、家兎、山羊の血清および3動物種に共通するβ-LGの主要抗体結合領域22-56、72-86、119-133、149-162残基目のアナログペプチドを用いた。ELISAを用いた免疫吸収法により同血清中抗β-LG抗体の詳細な結合部位(B細胞エピトープ)を調べたところ、ポリクローナル抗体を用いたにも関わらずほとんどのエピトープ領域が5-7アミノ酸残基まで限定化された。このことはβ-LG分子上動物種を通じて認識され易い領

域のなかでも特に抗体の接近が容易な部分があり、その部分に高い特異性を持つB細胞のみが選ばれてきたことを意味している。同じ領域内においても動物種間では微妙に異なる部位がB細胞エピトープとして認識されており、各動物種に固有のB細胞レパトリーの影響あるいは各ハプロタイプのT細胞エピトープとB細胞エピトープとの位置関係の影響等を強く受けた結果と考えられた。

【第1部第2章 T細胞エピトープの解析】

抗原提示細胞内で生成したT細胞エピトープを含むペプチドは、アグレトープ部分でMHCクラスII分子と複合体を形成した後抗原提示細胞の表面に提示され、T細胞エピトープ部分を介して抗原特異的T細胞を活性化する。 β -L Gの全領域をカバーする合成部分ペプチドを用い、H-2ハプロタイプの異なる3系統のマウスBALB/c (H-2^d)、C3H/He (H-2^k)、C56BL/6 (H-2^b) におけるT細胞エピトープの検索を行なった。 β -L Gで免疫したマウスのリンパ節細胞を採取し、ペプチド抗原存在下の増殖活性を³H-チミジンの取り込みを指標として測定した結果、BALB/cマウスはペプチド42-56、62-76、139-153を、C57BL/6マウスはペプチド11-26、72-86、100-113、119-133を、C3H/Heマウスはペプチド72-86、91-104、129-143、139-153をそれぞれ認識して増殖した。同定されたT細胞エピトープ領域はハプロタイプの異なる系統のマウス間で異なっており、唯一、ペプチド139-153がBALB/c (H-2^d) とC3H/He (H-2^k) に共通して認識された。このことは、各ハプロタイプのMHCクラスII分子の多型性により異なるペプチドフラグメントが提示された結果である他、各系統間で準備されているT細胞レパトリーが異なることも大きく影響していると考えられた。

【第2部第1章 β -L G特異的T細胞クローンの樹立】

β -L Gに特異的なT細胞の抗原認識とそれに伴う免疫応答を解析することを目的とし、 β -L G特異的CD4⁺T細胞クローンを樹立してそれらの表面抗原、MHCクラスII分子拘束性、T細胞エピトープの解析を行なった。 β -L Gで免疫したBALB/cマウスのリンパ節および脾臓細胞を採取しin vitro抗原刺激を繰り返すことによって β -L G特異的T細胞ラインを得た後、同細胞群から限界希釈法によりクローンを樹立した。 β -L Gに特異性を示すCD4⁺T細胞4クローン(H1.1、5G、2.11G、6.11G)を得た。これらはいずれもMHCクラスII分子の内I-A^d分子拘束的に β -L Gを認識して増殖した。特にH1.1および5GはBALB/cマウスにおける主要T細胞エピトープ42-56残基目を認識することから、in vivoにおける β -L Gおよび β -L G由来のペプチドフラグメント

に対する免疫応答をよく反映すると期待される。すなわちこれらT細胞クローンは β -L G特異抗体産生をはじめとする免疫応答に関わるT細胞・B細胞協同作用をin vitroで詳細に解析し、T細胞・B細胞エピトープフラグメントが果たす役割を一層深く理解するための有用な材料であると考えられた。

【第2部第2章 T・Bエピトープペプチドがin vitro抗体産生に及ぼす影響】

B細胞は、細胞表面に抗原特異性を持つB細胞レセプターを表現している。B細胞レセプターの最も重要な機能は、抗原を効率よくとらえてプロセシングの経路に乗せることであると考えられているが、一方ではB細胞レセプターからのシグナル自体がB細胞の増殖に関わるという現象も示されている。ここでは一次構造上離れた部分のB細胞エピトープペプチド22-36とT細胞エピトープペプチド42-56を用いることによりプロセシングの過程を省略し、B細胞レセプターとT細胞からのシグナルを分離させて解析した。B細胞群は β -L Gで免疫したBALB/cマウスの脾臓細胞より調製し、T細胞はT細胞クローンH1.1を用いた。その結果ペプチド42-56はH1.1を活性化することにより単独でB細胞群の抗体産生を促した。また、ペプチド22-36はT細胞エピトープの存在下で抗ペプチド22-36抗体の産生を増強させた。すなわちB細胞エピトープフラグメントは単独では抗体産生に影響を及ぼさないものの、T細胞エピトープフラグメントの存在下という条件の下で抗体産生を増強することが示された。

【第2部第3章 β -L G特異的T細胞クローンの複合的機能解析】

CD4⁺T細胞は複数のサイトカインや細胞間接触を通じて様々な機能を発揮し、生体防御反応や炎症反応を制御している。 β -L Gなど食物アレルギーに対する抗原特異的免疫応答を解析する際にも、抗体産生の補助・抑制、炎症の誘起や持続に関わる機能を解析することにより、アレルギー発症のしくみや消化管・皮膚などのアレルギー症状について免疫学的理解が深まると考えられる。特に炎症反応とその遅延化におけるCD4⁺T細胞の役割は大きいとされ、様々なアレルギー症状の緩和もCD4⁺T細胞を制御することにより可能となる場合も考えられる。ここでは β -L G特異的T細胞クローン4株についてそれらの多機能性をサイトカイン産生能、抗体産生補助機能、細胞傷害活性、遅延型過敏症反応(DTH反応)の誘導活性を指標に検討した。サイトカイン産生能はサイトカイン依存性細胞株を用いたバイオアッセイ、ヘルパー機能はin vitro抗体産生系、細胞障害機能は標的細胞からの³H-チミジンの遊離、DTH反応はマウス足しよの浮腫反応をそれぞれ指標として解析した。その結果、2.1

1 Gと6, 1 1 Gは比較的高い細胞傷害活性とD T H反応誘起能からT_H1型であり、5 Gは高い抗原特異的ヘルパー活性と低いD T H反応誘起能からT_H2型であると考えられた。H 1, 1はその中間的な機能を示した。

【第2部第4章 CD4⁺T細胞クローンによる抗原非特異的

抗体産生の促進と抗原特異的抗体産生の抑制】

T細胞クローンが多機能的に働くとすれば、実際の免疫応答の場において各々の機能は協同的・相乗的あるいは拮抗的に作用して生体内の変化を決定すると思われる。本章では、BALB/cマウスの脾臓B細胞群において、活性化H 1, 1が多機能的に誘導または抑制する抗体応答を観察した。活性化H 1, 1は、未処理およびβ-L G免疫マウス由来の脾臓B細胞群において抗原非特異的に抗体産生を誘導した。高濃度のβ-L G抗原存在下では抗原特異的な抗体産生は抑制され、その傾向はβ-L Gで免疫したマウス由来の細胞群において特に顕著であった。⁵¹Cr遊離法による細胞傷害試験の結果、抗体産生抑制の一因としてH 1, 1の細胞障害作用が関与していることが示唆された。単一T細胞クローンが抗原濃度に応じて*in vitro*で多機能的に働き、抗原特異的抗体産生を促進・抑制の両方向に制御する事象が示されたことより、生体における一つのT細胞の機能も、弾力性を持って発現されると推測される。すなわち抗原濃度、サイトカイン、他の細胞との接触など微小環境の条件によって各細胞の機能、ひいては免疫応答が方向付けられると考えられた。

以上、本研究第1部では牛乳アレルギーであるβ-L GのB細胞・T細胞エピトープを詳細に解析した。第2部ではβ-L G特異的T細胞クローンを樹立してその機能解析を行なった。また、T細胞クローンをを用いた免疫応答の*in vitro*モデル系においてT細胞・B細胞エピトープフラグメントの機能について新たな知見を得、さらに単一T細胞クローンも微小環境に応じて多機能的に免疫応答の調節を行ない得ることを示した。

本研究で得られた知見は、低抗原性β-L Gの分子設計等に役立つばかりでなく、広くβ-L Gあるいは他抗原により引き起こされるアレルギー症状や免疫応答の基礎的知見として活用されることが期待される。また、本研究で得られたβ-L G特異的T細胞クローンおよび解析された多機能性は、今後もアレルギー症状における炎症反応等新しい情報を得るための有用な道具となることが期待される。

参考文献

- (1) Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1987) *Immunol. Today* 8, 223.
- (2) Janeway, C. A., Jr., Carding, S., Jones, B., Murray, J., Portoles, P., Rasmussen, R., Rojo, J., Saizawa, K., West, J. and Bottomly, K. (1988) *Immunol. Rev.* 101, 39.
- (3) Bottomly, K. (1988) *Immunol. Today* 9, 268.
- (4) Kapsenberg, M. L., Wierenga, E. A., Bos, J. D. and Jansen, H. M. (1991) *Immunol. Today* 12, 392.
- (5) Romagnani, S. (1991) *Immunol. Today* 12, 256.
- (6) Lebman, D. A., Lebman, A. and Coffman, R. L. (1988) *J. Exp. Med.* 168, 853.
- (7) Gerondakis, S. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1581.
- (8) Gauchat, J. -F., Lebman, D. A., Coffman, R. L., Bascan, H. and de Vries, J. E. (1990) *J. Exp. Med.* 172, 463.
- (9) Gell, P. G. H. and Coombs, R. R. A. "Clinical Aspect of Immunology" Blackwell Scientific Publication, Oxford (1963)
- (10) Saalman, R., Carlsson, B., Fallstrom, S. P., Hanson, L. A. and Ahlsted, S. (1991) 85, 446.
- (11) Bahna, S. L. and Heiner, D. C. (1980) *Allergies to Milk*, pp23-44, Grune & Stratton, New York
- (12) Mowat, A. M. and Ferguson, A. (1981) *Clin. exp. Immunol.* 43, 574.
- (13) 宮野徑彰 (1992) *治療学* 26, 943-948.
- (14) 小松 平、池澤 善郎 (1992) *治療学* 26, 984.
- (15) James, S. P. (1988) *Gastroenterology* 95, 1667-1669.

- (16) Patton, J. S., Peters, P. M., McCabe, J., Crasw, D., Hansen, S., Chen, A. B. and Liggitt, D. (1987) *J. Clin. Invest.* 80, 1587.
- (17) Remick, D. G., Kunkel, R. G., Larrick, J. W. and Kunkel, S. L. (1987) *Lab. Invest.* 56, 583.
- (18) Butler, L. D., Layman, N. K., Cain, R. L., Riedel, P. E., Mohler, K. M., Bobbitt, J. L., Belagajie, R., Sharp, J. and Bendele, A. M. (1989) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 53, 400.
- (19) Frew, A. J. and Kay, A. B. (1991) *Clin. exp. Immunol.* 84, 270.
- (20) Reinhold, U., Kukul, S., Goeden, B., Neumann, U. and Kreysel H. W. (1991) *Clin. exp. Immunol.* 86, 444.
- (21) Miller, A., Al-Sabbagh, A., Santos, L. M. B., Das, M., P. and Weiner, H. L. (1993) *J. Immunol.* 151, 7307.
- (22) Jameson, B. A., McDonnell, J. M., Marini, J. C. and Korngold, R. (1994) *Nature* 368, 744.
- (23) 金載興、八村敏志、稻見真倫、久恒辰博、船谷章夫、上野川修一 (1993) 日本免疫学会学術集会講演要旨 p. 443.
- (24) Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstom, C. A., Farrell Jr., H. M., Harkwalker, V. R., Jenness, R., Whitney, R. McL. (1984) *J. Dairy Sci.* 67, 1599.
- (25) Braunitzer, G., Chen, R., Schrank, B. and Stangl, A. (1972) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 832.
- (26) Braunitzer, G., Chen, R., Schrank, B. and Stangl, A. (1973) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 867.
- (27) Preaux, G., Braunitzer, G. and Kolde, H. J. (1980) *Arch. Int. Physiol. Chem.* 88, B45.

- (28) Kolde, H. -J., Liberatori, J. and Braunitzer, G. (1981) *Milchwissenschaft* 36, 83.
- (29) Jenness, R. (1983) "Developments in Dairy Chemistry" Vol. 1, ed. by Fox, P. F., Applied Science Publishers, Barking, Essex, p87
- (30) Kolde, H. -J. and Braunitzer, G. (1983) *Milchwissenschaft* 38, 70
- (31) Bell, H., McKenzie, H. A., Muller, V., Rogers, C. and Shaw, D. C. (1981) *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B, 225.
- (32) Conti, A., Godovac-Zimmermann, J., Liberatori, J., Braunitzer, G. and Minori, D. (1984) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365, 1393.
- (33) Conti, A., Godovac-Zimmermann, J., Liberatori, J. and Braunitzer, G. (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366, 601.
- (34) Conti, A., Godovac-Zimmermann, J., Pirchner, F., Liberatori, J. and Braunitzer, G. (1986) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367, 871.
- (35) Godovac-Zimmermann, J. and Shaw, D. (1987) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368, 878.
- (36) Pervaiz, S. and Brew, K. (1985) *Science* 228, 335.
- (37) 山内邦男、東 徳洋、清水 誠、(1982) 日本農芸化学会 昭和57年度大会講演要旨集、p.118.
- (38) Preaux, G., Braunitzer, G., Schrank, B. and Stangl, A. (1979) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1595.
- (39) Braunitzer, G., Liberatori, J. and Kolde, H. J. (1979) *Z. Naturforsch.* 34c, 880.

- (40) Huhtala, M. -L., Seppala, M., Narvanen, A., Palomaki, P.,
Julkunen, M. and Bohn, H. (1986) *Endocrinology* 120, 2620.
- (41) Papiz, M. Z., Sawyer, L., North, A. C. T., Findlay, J. B.
C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E. and
Kraulis, P. J. (1986) *Nature* 324, 383.
- (42) Futterman, S. and Heller, J. (1972) *J. Biol. Chem.* 247,
5168.
- (43) Fugae, J. E. and Song, P. S. (1980) *Biochem. Biophys. Acta*
625, 28.
- (44) Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Liberatori, J. and
Braunitzer, G. (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366, 431.
- (45) Pervaiz, S. and Brew, K. (1985) *Science* 228, 335.
- (46) Godovac-Zimmermann, J. (1988) *TIBS* 13, 64-66.
- (47) Ratner, B., Dworetzky, M., Oguri, S. and Aschheim, L. (1958)
Pediatrics 22, 449.
- (48) Parish, W., E. (1971) *Clin Allergy* 1, 369.
- (49) Lebenthal, E. (1975) *Pediatr Clin North Am* 22, 827.
- (50) Korits, T. N., Suzuki, S. and Coombs, R. R. A. (1987) *Int.*
Archs. Allergy Appl. Immun. 82, 72.
- (51) Haddad, Z. H., Kalra, V. and Verma, S. (1979) *Ann. Allergy*
42, 368.
- (52) Kurisaki, J., Nakamura, S., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K.
(1982) *Agric. Biol. Chem.* 46, 2069.
- (53) Kurisaki, J., Nakamura, S., Kaminogawa, S., Yamauchi, K.,
Watanabe, S., Hotta, K. and Hattori, M. (1985) *Agric.*
Biol. Chem. 49, 1733.

- (54) Takahashi, T., Kaminogawa, S., Kuwata, T., Ando, O. and Yamauchi, K. (1988) *Agric. Biol. Chem.* 52, 2485.
- (55) Takahashi, T., Yamauchi, K. and Kaminogawa, S. (1990) *Agric. Biol. Chem.* 54, 691.
- (56) Adams, S. L., Barnett, D., Walsh, B. J., Pearce, R. J., Hill, D. J. and Howden, M. E. H. (1991) *Immunol. Cell Biol.* 69, 191.
- (57) Kaminogawa, S. and Enomoto, A. (1992) *Comments Agric. & Food Chemistry* 2, 321.
- (58) Liu, Y. -J., Johnson, G. D., Gordon, J. and MacLennan, C. M. (1992) *Immunol. Today* 13, 17.
- (59) Berek, C. and Ziegner, M. (1993) *Immunol. Today* 14, 400.
- (60) Betz, A. G., Neuberger, M. S. and Milstein, C. (1993) *Immunol. Today* 14, 405.
- (61) Kepler, T. B. and Perelson, A. S. (1993) *Immunol. Today* (1993) 14, 412.
- (62) Berek, C. (1993) *Curr. Opinion Immunol.* 5, 218.
- (63) Tew, J. G., Kosco, M. H. and Szakal, A. K. (1989) *Immunol. Today* 10, 229.
- (64) Tew, J. G., Kosco, M. H., Burton, G. F. and Szakal, A. K. (1990) *Immunol. Rev.* 117, 185.
- (65) Van Rooijen, N. (1990) *Immunol. Today* 11, 154.
- (66) Horsfall, A. C., Hay, F. C., Soltys, A. J. and Jones, M. G. (1990) *Immunol. Today* 12, 211.
- (67) 栗崎純一、水町功子、辻典子 (1993) *酪農科学・食品の研究* 42(6) A-237.

- (68) Geysen, H. M., Meloan, R. H. and Barteling, S. J. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3998.
- (69) Houghten, R. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5131.
- (70) Stanfield, R. L. and Wilson, I. A. (1993) Immunomethods
3, 211.
- (71) Altschuh, D., Kocher, H. -P., Quesniaux, V. F. J., Schmitter,
D., Van Regenmortel, M. H. V. and Thierry, J. -C. (1989)
J. Mol. Biol. 209, 177.
- (72) Laver, W. G., Air, G. M., Webster, R. G. and Smith-Gill,
S. J. (1990) Cell 61, 553.
- (73) Stanfield, R. L., Fieser, T. M., Lerner, R. A. and Wilson,
I. A. (1990) Science 248, 712.
- (74) Rini, J. M., Schulze-Gahmen, U. and Wilson, I. A. (1992)
Science 255, 959.
- (75) Vix, O., Rees, B., Thierry, J. -C. and Altschuh, D. (1993)
Proteins 15, 339.
- (76) Rini, J. M., Stanfield, R. L., Stura, E. A., Salinas,
P. A., Profy, A. T. and Wilson, I. A. (1993) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 90, 6325.
- (77) Kurisaki, J., Mizumachi, K. and Tsuji, N. M. (1988) 14th
Intern. Cong. Biochem. Proc., MO p. 176.
- (78) Goodnow, C. C. (1992) Annu. Rev. Immunol. 10, 489.
- (79) Nossal, G. J. V. (1983) Annu. Rev. Immunol. 1, 33.
- (80) Russel, D. M., Dembic, Z., Morahan, G., Miller, J. F. A. P.,
Burki, K. and Namazee, D. (1991) 354, 308-311.
- (81) Murakami, M., Tsubata, T., Okamoto, M., Shimizu, A.,
Kumagai, S., Imura, H. and Honjo, T. (1992) Nature 357, 77.

- (82) Okamoto, M., Murakami, M., Shimizu, A., Ozaki, S., Tsubata, T., Kumagai, S. and Honjyo, T. (1992) *J. Exp. Med.* 175, 71.
- (83) Erikson, J., Radic, M. Z., Camper, S. A., Hardy, R. R., Carmack, C. and Weigert, M. (1991) *Nature* 349, 331.
- (84) Sakurai, T., Ametani, A., Nakamura, Y., Shimizu, M., Idota, T. and Kaminogawa, S. (1993) *Int. Immunol.* 5, 793.
- (85) Hachimura, S., Enomoto, A. and Kaminogawa, S. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 803.
- (86) Aschaffenburg, R. and Drewly, J. (1957) *Biochem. J.* 65, 273.
- (87) Merrifield, R. B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149.
- (88) Monahan, Biopolimer
- (89) Blake, J. and Li, C. H. (1975) *Int. J. Pept. Protein Res.* 7, 495.
- (90) Mojsov, S. and Merrifield, R. B. (1981) *Biochemistry* 20, 2950.
- (91) Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. and Cook, P. I. (1970) *Anal. Biochem.*, 34, 595.
- (92) March, S. C., Parikh, I. and Cuatrecasas, P. (1974) *Anal. Biochem.* 60, 149.
- (93) Atassi, M. Z. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145, 1.
- (94) Blundell, T. L., Sibanda, B. L., Sternberg, M. J. E. and Thornton, J. M. (1987) *Nature* 326, 347.
- (95) Jemmerson, R. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9180.
- (96) Kurisaki, J., Nakamura, S., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K. (1982) *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2069.
- (97) 栗崎純一、辻典子、水町功子 (1987) *生化学* 59(8), 838.

- (98) Kurisaki, J., Mizumachi, K., Tsuji, N. M. and Kaminogawa, S. (under submission)
- (99) Geysen, H. M. 私信
- (100) Trifilieff, E., Dubs, M. C. and Van Regenmortel, M. H. V. (1991) *Mol. Immunol.* 28, 889.
- (101) Lam, K. S., Salmon, S. E., Hersh, E. M., Hruby, V. J., Kazmierski, W. M. and Knapp, R. J. (1991) *Nature* 354, 82.
- (102) Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) *Science* 249, 386.
- (103) Hopp, T. P. and Woods, K. R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3824.
- (104) Fraga, S. (1982) *Can. J. Chem.* 60, 2606.
- (105) Thornton, J. M., Edwards, M. S., Taylor, W. R. and Barlow, D. J. (1986) *EMBO J.* 5, 409.
- (106) Welling, G. W., Weijer, W. J., Van der Zee, R. and Welling-Wester, S. (1985) *FEBS Lett.*, 188, 219.
- (107) Westhof, E., Altschuh, D., Moras, D., Bloomer, A. C., Mondragon, A., Klug, A. and Van Regenmortel, M. H. V. (1984) *Nature* 311, 123.
- (108) Karplus, P. A. and Schulz, G. E. (1985) *Naturwissenschaften*, 72, 212.
- (109) Fanning, D. W., Smith, J. A. and Rose, G. D. (1986) *Bio-polymers* 25, 863.
- (110) Novotny, J., Handschumacher, M., Haber, E., Bruccoleri, R. E., Carlson, W. B., Fanning, D. W., Smith, J. A. and Rose, G. D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 226.
- (111) Schwartz, R. H. (1985) *Annu. Rev. Immunol.* 3, 237.

- (112) Buus, S., Sette, A., Colon, S. M., Miles, C. and Grey, H. M. (1987) *Science* 235, 1353.
- (113) Schaeffer, E. B., Sette, A., Johnson, D. L., Bekoff, M. C., Smith, J. A., Grey, H. M. and Buus, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4649.
- (114) Davidson, H. W., Reid, P. A., Lanzavecchia, A. L. and Watts, C. (1991) *Cell* 67, 105.
- (115) Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1987) *Nature*, 329, 506.
- (116) Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1987) *Nature*, 329, 512.
- (117) Brown, J. H., Jadetzky, T., Saper, M. A., Samraoui, B., Bjorkman, P. J. and Wiley, D. C. (1988) *Nature* 332, 845.
- (118) Milich, D. R. (1989) *Adv. Immunol.* 45, 195.
- (119) Rothbard, J. B. and Taylor, W. R. (1988) *EMBO J.* 7, 93.
- (120) Delisi, C. and Berzofsky, J. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7048.
- (121) Sette, A., Buus, S., Appella, E., Smith, J. A., Chestnut, R., Miles, C., Colon, S. M. and Grey, H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3296.
- (122) Sachs, D. H., Mayer, N. and Ozato, K. (1981) in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Hammerling, G. J., Hammerling, U. and Kearney, J. F., Eds.) pp. 95, Elsevier, Amsterdam.
- (123) Watanabe, M., Suzuki, T., Taniguchi, M. and Shinohara, N.

- (1983) Transplantation 36, 712.
- (124) Oi, V. T., Jones, P. P., Goding, J. W. and Herzenberg, L. A. (1978) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81, 115.
- (125) Rudensky, A. Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.-C., Barlow, A. and Janeway Jr., C. A. (1991) *Nature* 353, 622.
- (126) Acha-Orbea, H. and McDevitt, H. O. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2435.
- (127) Hunt, D. F., Michel, H., Dickinson, T. A., Shabanowitz, J., Cox, A. L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H. M. and Sette, A. (1992) *Science* 256, 1817.
- (128) Reddehase, M. J., Rothbard, J. B. and Koszinowski, U. H. (1989) *Nature* 337, 651.
- (129) Mouritsen, S., Meldal, M., Hansen-Ruud, J. and Werdelin, O. (1991) *Scand. J. Immunol.* 34, 421.
- (130) Maeji, N. J., Bray, A. M. and Geysen, H. M. (1990) *J. Immunol. Methods* 134, 23.
- (131) Gammon, G., Geysen, H. M., Apple, R. J., Pickett, E., Palmer, M., Ametani, A. and Sercarz, E. E. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 609.
- (132) Buus, S., Sette, A. and Grey, H. M. (1987) *Immunol. Rev.* 98, 115.
- (133) Roy, S., Scherer, M. T., Briner, T. K., Smith, J. A. and Gefter, M. L. (1989) *Science* 244, 572.
- (134) Gao, X.-M., Liew, F. Y. and Tite, J. P. (1989) *J. Immunol.* 143, 3007.
- (135) Brett, S. A., Cease, K. B., Ouyang, C. S. and Berzofsky, J. A. (1989) *J. Immunol.* 143, 771.

- (136) Ametani, A., Kaminogawa, S., Shimizu, M. and Yamauchi, K.
(1987) *J. Biochem.* 102, 421.
- (137) Ametani, A., Kim, S. M., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K.
(1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 876.
- (138) Enomoto, A., Shon, D. -H., Aoki, Y., Yamauchi, K. and
Kaminogawa, S. (1990) *Mol. Immunol.* 27, 581.
- (139) Shon, D. -H., Enomoto, A., Yamauchi, K. and Kaminogawa, S.
(1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 1475.
- (140) 福元功子、栗崎純一、平尾典子 (1987) 日本農芸化学会昭和62
年度大会要旨集 p. 555.
- (141) Mizumachi, K., Kurisaki, J., Tsuji, N. M. and Kaminogawa,
S. (under submission)
- (142) Atassi, M. Z. (1978) *Immunochemistry* 15, 909.
- (143) Atassi, M. Z. (1979) *Crit. Rev. Biochem.* 6, 371.
- (144) 山本晃司、栗崎純一、水町功子、金井 聡、秋元政信、加藤 熙
(1994) 食品工業学会第41回大会講演要旨集 p. 28.
- (145) Atassi, M. Z. (1975) *Immunochemistry* 12, 423.
- (146) Atassi, M. Z. (1977) in: *Immunochemistry of Proteins*
(Atassi, M. Z., ed.) vol. 2, pp. 77., Plenum, New York.
- (147) Kurisaki, J., Mizumachi, k., Tsuji, N. M. and Kaminogawa,
S. (under submission)
- (148) Shastri, N., Oki, A., Miller, A., Sercarz, E. E. (1985)
J. Exp. Med. 162, 332.
- (149) Shimonkevitz, R., Colon, S., Kappler, J. W., Marrack, P.
and Grey, H. M. (1984) *J. Immunol.* 133, 2067.
- (150) 栗崎純一、水町功子、辻 典子、上野川修一 (1994) 日農化誌
68(3) p. 493.

- (151) Bixler, G. S. and Atassi, M. Z. (1983) *Immunol. Commun.* 12, 593.
- (152) *Current Protocols in Immunology* (1991) Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W. ed., pp.(3.13.5), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York
- (153) *ibid.* pp.(3.12.8)
- (154) Kimoto, M. and Fathman, C. G. (1980) *J. Exp. Med.* 152, 759.
- (155) Chesnut, R. W. and Grey, H. M. (1986) *Adv. Immunol.* 39, 51.
- (156) Tony, H. -P. and Parker, D. C. (1985) *J. Exp. Med.* 161, 223.
- (157) Owens, T. (1988) *Eur. J. Immunol.* 18, 395.
- (158) Riedel, C., Owens, T. and Nossal, G. J. V. (1988) *Eur. J. Immunol.* 18, 403.
- (159) Julius, M. H. and Rammensee, H. -G. (1988) *Eur. J. Immunol.* 18, 375.
- (160) Whalen, B. J., Tony, H. -P. and Parker, D. C. (1988) *J. Immunol.* 141, 2230.
- (161) Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A. and Aruffo, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 6550.
- (162) Langman, R. E. and Cohn, M. (1991) *Scand. J. Immunol.* 33, 99.
- (163) Moller, G., Alarcon-Riquelme, M., Clinchy, B., Gontijo, C. M. and Hoiden, I. (1991) *Scand. J. Immunol.* 33, 111.
- (164) Langman, R. E. and Cohn, M. (1991) *Scand. J. Immunol.* 33, 117.
- (165) Sinclair, N. R. SrC. (1992) *Sand. J. Immunol.* 35, 125.

- (166) Shuler, R. L. and Owen, C. S. (1993) *Immunol. Cell Biol.* 71, 1.
- (167) Kawakami, K. and Parker, D. C. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23, 77.
- (168) Rock, K. L., Benacerraf, B. and Abbas, A. (1984) *J. Exp. Med.* 160, 1102.
- (169) Lanzavecchia, A. (1985) *Nature* 314, 537.
- (170) Lanzavecchia, A. (1990) *Annu. Rev. Immunol.* 8, 773.
- (171) Lanzavecchia, A. (1987) 99, 38.
- (172) Borrás-Cuesta, F., Fedon, Y. and Petit-Camurdan, A (1988) *Eur. J. Immunol.* 18, 199.
- (173) Migliorini, P., Betschart, B and Corradin, G. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23, 582.
- (174) Su, H. and Caldwell, H. D. (1992) *J. Exp. Med.* 175, 227.
- (175) Chai, S. K., Clavijo, P., Tam, J. P. and Zavala, F. (1992) *J. Immunol.* 149, 2385.
- (176) McLean, G. W., Cross, A. M., Munns, M. S. and Marsden, H. S. (1992) *J. Immunol. Methods* 155, 113.
- (177) Partidos, C. D., Obeid, O. E. and Steward, M. W. (1992) *Immunology* 77, 262.
- (178) Gregoriadis, G., Wang, Z., Barenholz, Y. and Francis, M. J., (1993) *Immunology* 80, 535.
- (179) Sarobe, P., Lasarte, J. -J., Golvano, J., Gullon, A., Civeira, M. -P., Prieto, J. and Borrás-Cuesta, F. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 1555.
- (180) Milich, D. R., McLachlan, A., Thornton, G. B. and Hughes, J. L. (1987) *Nature*, 329, 547.

- (181) Cambier, J. C. and Ransom, J. T. (1987) *Ann. Rev. Immunol.* 5, 175.
- (182) Warner, G. L. and Scott, D. W. (1991) *J. Immunol.* 146, 2185.
- (183) Flahart, R and Lawton, A. (1987) *J. Mol. Cell. Immunol.* 3, 61.
- (184) Finkelman, F. D., Malek, T. R., Shevach, E. M. and Mpm, J. J. (1986) *J. Immunol.* 137, 2252.
- (185) DeFranco, A. L., Raveche, E. S., Asofsky, R. and Paul, W. E. (1982) *J. Exp. Med.* 155, 1523.
- (186) Monroe, J. G. and Cambier, J. C. (1983) *J. Exp. Med.* 156, 1589.
- (187) Heyman, B. (1990) *Immunol. Today* 11, 310, 313.
- (188) Pfeiffer, C. Murray, J., Madri, J. and Bottomly, K. (1991) *Immunol. Rev.* 123, 65.
- (189) Locksley, R. M. and Scott, P. (1991) *Immunol. Today* 12, A58.
- (190) Morikawa, Y. Kuribayashi, K. and Saito, K. (1989) *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.* 90, 130.
- (191) Powrie, F. and Coffman, R. L. (1993) *Immunol. Today* 14, 270.
- (192) Swain, S. L., Bradley, L. M., Croft, M., Tonkonogy, S., Atkins, G., Weinberg, A. D., Duncan, D. D., Hedrick, S. M., Dutton, R. W. and Huston, G. (1991) *Immunol. Rev.* 123, 115.
- (193) Mishell, B. B., Shiigi, S. M. 細胞免疫実験操作法 (1982) 今井勝行、川口 進、原田孝之 共訳 pp. 317-319. 理工学社

- (194) Current Protocols in Immunology (1991) Coligan, J. E.,
Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. and
Strober, W. ed., pp. (6.3.2-6.3.4), Greene Publishing
Associates and Wiley-Interscience, New York
- (195) *ibid.* pp. (3. 17. 9.)
- (196) Watanabe, M., Wegmann, D. R., Ochi, A. and Hozumi, N.
(1986) Proc. Natk Acad. Sci. USA 83, 5247.
- (197) *ibid.* pp. (4.5.1.-4.5.3.)
- (198) Shinohara, N., Watanabe, M., Sachs, D. H. and Hozumi, N.
(1988) Nature 336, 481.
- (199) Shinohara, N. (1987) Cellular Immunol. 107, 395.
- (200) Erard, F., Wild, M.-T., Garcia-Sanz, J. A., Gros, G. L.
(1993) Science 260, 1802.
- (201) Shinohara, N. Huang, Y. -Y. and Muroyama, A. (1991) Eur.
J. Immunol. 21, 23.
- (202) Barnaba, V., Franco, A., Alberti, A., Benvenuto, R. and
Balsano, F. (1990) Nature 345, 258.
- (203) Herzog, W. R., Ferreri, N. R., Ptak, W. and Askenase,
P. W. (1989) J. Immunol. 143, 3125.
- (204) Gocinski, B. L. and Tigelaar, R. E. (1990) J. Immunol.
144, 4121.
- (205) Mosmann, T. R. and Moore, K. W. (1991) Immunol. Today
12, A49.
- (206) Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989) Annu. Rev. Immunol.
7, 145.
- (207) Chang, J. C. C., Zhang, L. Edgerton, T. L. and Kaplan, A. M.
(1990) J. Immunol. 145, 409.

- (208) Tsutsui, H. Mizuochi, Y. and Morisawa, S. (1991) *Scand. J. Immunol.* 34, 433.
- (209) Kelso, A. and Gough, N. M. (1988) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 9189.
- (210) Firestein, G. S., Roeder, W. D., Laxer, J. A., Townsend, K. S., Weaver, C. T., Hom, J. T., Linton, J., Torbett, B. E. and Glasebrook, A. L. (1989) *J. Immunol.* 143, 518.
- (211) Gajewski, T. F., Schell, S. R., Nau, G. and Fitch, F. W. (1989) *Immunol. Rev.* 111, 79.
- (212) Hodgkin, P. D., Yamashita, L. C., Seymour, B., Coffman, R. L. and Kehry, M. R. (1991) *J. Immunol.* 147, 3696.
- (213) Riedel, C. Owens, T. and Nossal, G. J. V. (1988) *Eur J. Immunol.* 18, 403.
- (214) DeFranco, A., Ashwell, J. D., Schwartz, R. H. and Paul, W. E. (1984) *J. Exp. Med.* 159, 861.
- (215) Brian, A. A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 564.
- (216) Lohoff, M., Dirks, M., Rohwer, P. and Rollinghoff, M. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19, 77.
- (217) Yellin, M. J., Lee, J. J., Chess, L. and Lederman, S. (1991) *J. Immunol.* 147, 3389.
- (218) Klaus, S. and Parker, D. (1992) *J. Immunol.* 149, 1867.
- (219) Lohoff, M. Koch, A. and Rollinghoff, M. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22, 599.
- (220) Owens, T. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 979.
- (221) Owens, T. (1991) *Cell. Immunol.* 133, 352.
- (222) Kubota, E., Mckenzie, D. T. Dutton, R. W. and Swain, S. L. (1991) *Immunology* 72, 40.

- (223) Lederman, S., Yellin, M. J., Covey, L. R., Cleary, A. M., Callard, R. and Chess, L. (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5, 439.
- (224) Noelle, R. J. and Snow, E. C. (1990) *Immunol. Today* 11, 361.
- (225) Noelle, R. J., Daum, J., Bartlett, W. C., McCann, J. and Shepherd, D. M. (1991) *J. Immunol.* 146, 1118.
- (226) Noelle, R. J. and Snow, E. C. (1992) *Curr. Opin. Immunol.* 4, 333.
- (227) Eljaafari, A., Vaquero, C., Teillaud, J. L., Bismuth, G., Hivroz, C., Dorval, I., Bernard, A. and Sterkers, G. (1990) *J. Exp. Med.* 172, 213.
- (228) Erb, P., Grogg, D., Trozler, M., Kennedy, M. and Fluli, M. (1990) *J. Immunol.* 144, 790.
- (229) Del Prete, G. F., De Carli, M., Ricci, M., and Romagnani, S. (1991) *J. Exp. Med.* 174, 809.
- (230) Nakamura, M., Ross, D. T., Briner, T. J. and Geffer, M. K. (1986) *J. Immunol.* 136, 44.
- (231) Ozaki, S., York-Jolly, J., Kawamura, H., Berzofsky, J. A. (1987) *Cell. Immunol.* 105, 301.
- (232) Staerz, U. D., Karasuyama, H. and Garner, A. M. (1987) *Nature* 329, 449.
- (233) Lanzavecchia, A. (1989) *Immunol. Today* 10, 157.
- (234) Takayama, H., Shinohara, N., Kawasaki, A., Someya, Y., Hanaoka, S., Kojima, H., Yagita, H., Okumura, K. and Shinkai, Y. (1991) *Int. Immunol.* 3, 1149.

- (235) Tite, J. P. and Janeway, C. A. Jr. (1984) *Eur. J. Immunol.* 14, 878.
- (236) Tite, J. P., Powell, M. and Ruddle, N. H. (1985) *J. Immunol.* 135, 25.
- (237) Tite, J. P. (1990) *Immunology* 71, 208.
- (238) Gromkowski, S. Helper, K. M. and Janeway, Jr. C. A. (1988) *Eur. J. Immunol.* 18, 1385.
- (239) Ju, S. -T. (1991) *J. Immunol.* 146, 812.
- (240) Ju, S. -T., Ruddle, N. H., Strack, P., Dorf, M. E. and DeKruyff, R. H. (1990) *J. Immunol.* 144, 23.
- (241) Ju, S. -T., DeKruyff, R. H. and Dorf, M. A. (1986) *Cell. Immunol.* 101, 613.
- (242) Grogg, D., Hahn, S. and Erb, P. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22, 267.
- (243) Ozaki, S. and Suginochara, T. (1989) *Cell. Immunol.* 120, 477.
- (244) Hipp, N. J., Groves, M. L., Custer, J. H. and McMeekin, T. L. (1952) *J. Dairy Sci.* 35, 272.
- (245) Fredericq, E. and Deutsch, H. F. (1949) *J. Biol. Chem.* 181, 499.
- (246) Mishell, B. B., Shiigi, S. M. 細胞免疫実験操作法 (1982) 今井勝行、川口 進、原田孝之 共訳 pp. 209-215. 理工学社
- (247) Gajewski, T. F., Schell, S. R., Nau, G. and Fitch, F. W. (1989) *Immunol. Rev.* 111, 79.
- (248) Abba, A. K., Williams, M. E., Burstein, H. J., Chang, T. -L., Bossu, P. and Lichtman, A. H. (1991) *J. Immunol.* 123, 5.

- (249) Powrie, F. and Coffman, R. L. (1993) *Immunol. Today* 14, 270.
- (250) Armitage, R. J., Franslow, W. C., Strockbine, L., Sato, T. A., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Davis-Smith, T., Maliszewski, C. R., Clark, E. A., Smith, C. A., Grabstein, K. H., Cosman, D. and Spriggs, M. K. (1992) *Nature* 357, 80.
- (251) Grabstein, K. H., Maliszewski, C. R., Shanebeck, K., Sato, T. A., Spriggs, M. K., Fanslow, W. C. and Armitage, R. J. (1993) *J. Immunol.* 150, 3141.
- (252) Lederman, S., Yellin, M. J., Krichevsky, A., Belko, J., Lee, J. J. and Chess, L. (1992) *J. Exp. Med.* 175, 1091.
- (253) Hermann, P., Blanchad, D., Saint-Vis, B., Fossiez, F., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Briere, F., Banchereau, J., Galizzi, J. -P. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23, 961.
- (254) Lederman, S., Yellin, M. J., Inghirami, G., Lee, J. J., Knowles, D. M. and Chess, L. (1992) *J. Immunol.* 149, 3817.
- (255) Barrett, T. B., Shu, G. and Clark, E. A. (1991) *J. Immunol.* 146, 1722.
- (256) Clinchy, B., Elenstrom, C., Severinson, E. and Moller, G. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 1445.
- (257) Kolaitis, G., Doymaz, M. and Rouse, B. T. (1990) *Immunology* 71, 101.
- (258) Orentas, R. J., Hildreth, J. E. K., Obah, E., Polydefkis, M. Smith, G. E., Clements, M. L., Siliciano, R. F. (1990) *Science* 248, 1234.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導を賜りました東京大学教授上野川修一先生に篤く御礼申し上げます。

常に身近にあり懇切丁寧な御指導を賜りました共同研究者の農林水産省畜産試験場栗崎純一博士に心より感謝致します。

常に身近にあり適切なアドバイスをいただきました共同研究者の農林水産省畜産試験場水町功子博士に心より感謝致します。

共同研究者の日々の指導、理解、協力のもとに本研究をまとめることができました。重ねて深く感謝致します。

T細胞のMHCクラスII分子拘束性の解析にあたり、貴重な抗体を御分与下さり、有益な御助言をいただきました三菱化成生命科学研究所篠原信賢博士に深く感謝致します。

数多くの適切なアドバイスをいただき、フローサイトメトリー解析に際して御協力いただきました、東京工業大学講師馬替純二博士に心より感謝致します。

遅延型過敏症反応をはじめとするT細胞クローンの機能解析において御協力をいただきました野田産業科学研究所辻亮平博士ならびに同研究所の皆様心より感謝致します。

*In vitro*抗体産生系の確立に際し御協力をいただきました明治乳業中央研究所金子哲夫博士に深く感謝致します。

T細胞クローンのMHCクラスII分子拘束性の解析にあたり、貴重なB10.GDマウスを御分与下さいました国立遺伝研究所森脇和郎博士に深く感謝致します。

細胞障害性試験を行なうにあたり、貴重なA20-HL細胞株を御分与下さいましたトロント・マウントサイナイ病院Dr. Hozumi, Nobumichiに深く感謝致します。

貴重なIL-6依存性細胞株B-1-Cを御分与下さいました東京大学後飯塚僚博士に深く感謝致します。

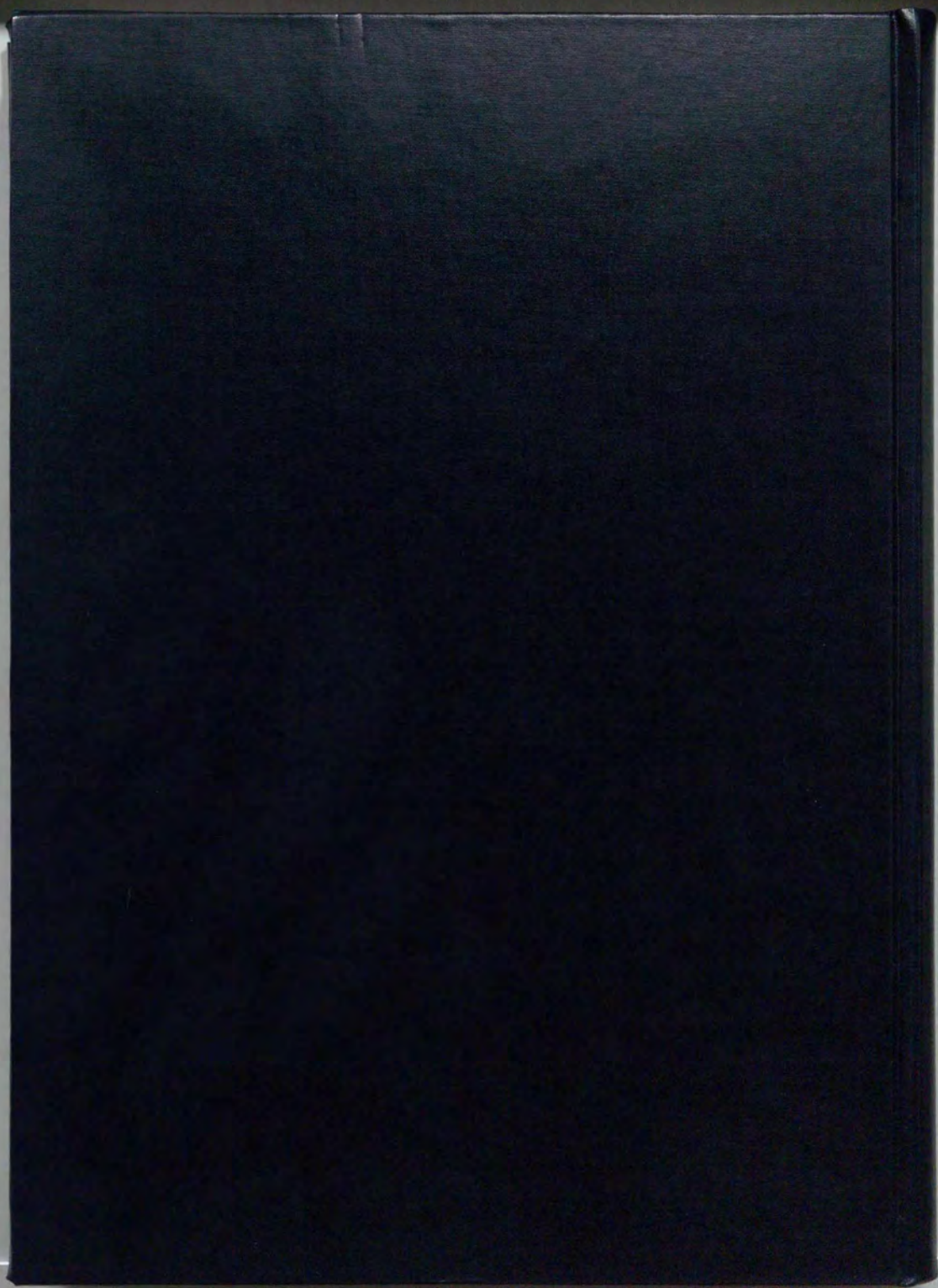
本研究を進めるにあたり、多大なる支援をいただきました農林水産省畜産試験場吉武充博士ならびに同試験場加工部の皆様に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、多くの御協力をいただきました畜産試験場加工部畜産物利用開発研究室の高畑可奈子さん、プリマハム中央研究所の秋元政信さん、金井聡さんに心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、筆者に活力を与え続けて下さいましたすべての友人と先生方に深く感謝致します。

最後に、本研究を進めるにあたり、常に理解し協力を惜しまなかった家族に心より感謝致します。

1994年 辻 典子



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
centimeters 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

Kodak Gray Scale

C **Y** **M**

© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

