

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

総括研究報告書

ヒト B 細胞由来の抗体作製に関する研究

主任研究者 垣生園子 東海大学医学部 教授

研究要旨

本研究ではヒト B 細胞由来の抗体を得ることを目指して 2 つの系開発を展開している。第 1 の系では、ヒト末梢血中に存在する抗体産生細胞から特定の抗体遺伝子を得て抗体の大量産生を図るもので、外来病原体（赤痢アメーバおよび B 型肝炎ウイルス、HBV）および自己成分（TNF- α ）に対する抗体のクローニングに成功した。後者に相当する生体内で抗体産生が少ない場合には、ファージディスプレイ法では微量過ぎて困難であるので、EBV トランスフォーム法を併用することによりクローンを与えることに成功した。具体的には、赤痢アメーバ、HBV および TNF- α に対する抗体を得た。第 2 の系では、将来目的とする抗原を免疫してヒト型抗体を得ることができる免疫系再構築モデルを作製することを目指しており、臍帯血から得たヒト幹細胞を免疫不全マウス内に移植し、B 細胞および T 細胞に各々分化誘導することに成功した。なお、T 細胞に関しては予めマウス胸腺ストローマ細胞との *in vitro* での共培養が必要であった。

研究分担者 猪子英俊 東海大学医学部
教授
橋 裕司 東海大学医学部
助教授
穂積勝人 東海大学医学部
助手

ら目的とする抗体を得ることは、従来の方法では量的観点から容易ではない。また、必ずしも希望する抗体が得られない。これら問題を解消するために本研究では、ヒト B 細胞由来のモノクローナル抗体を大量に作製する方法を開発し、臨床に応用できる抗体を得ることを目的としている。本年度は、1) すでに抗体産生をしている B 細胞を末梢血から得て目指す抗体の遺伝子を単離し大量生産できる系を開発すると同時に、2) 新たに希望するヒト抗体を得るために抗原を免疫できるヒト免疫系の再構築モデル作製を試みた。

A. 研究目的

ヒト型抗体は、有効な治療方法がないウイルス感染、自己免疫病あるいは移植に新しい治療方法を提供出来ると期待されている。しかし、現存するヒト・キメラ抗体や大部分の配列をヒト型化した人工抗体では、マウスのアミノ酸配列やマウス型糖鎖を含むため、有効性や安全性の面から臨床応用には問題がある。その意味でヒト B 細胞自身から産生される抗体を利用することが理想的であるが、感染患者や自己免疫病患者か

B. 研究方法

1. ヒト生体内で抗体産生している B 細胞から特定抗体を得る方法の開発

1) ファージディスプレイ法と EBV トランスフォームの併用によるライブラリー作製と抗体遺伝子の増幅：ヒト末梢血から得た B 細胞を EBV 感染によりトランスフォームし、それら培養上清を B 型肝炎ウイルス (HBV) と TNF-a を指標に ELISA 法でスクリーニングした。当該抗体産生の B 細胞オリゴクローンから RNA を抽出し、RT-PCR により抗体遺伝子を増幅して H と L 鎖を分離した。各々を Fab 抗体発現ベクター (pFab1-His2) に組み込み、大腸菌 (JM109) に導入して大量発現させた。

2) 抗原特異性の検索：上記 JM109 を培養により大量に得た後破壊し、その上清の特異性を HBV の表面抗原 (HBs) と TNF-a をコートした ELISA 法により検討した。

3) ファージディスプレイ法のみによるモノクロナール抗体遺伝子の単離と発現検討：赤痢アメーバ特異的抗体が高値を示す患者末梢血よりリンパ球を得て mRNA を単離した。上記 2) と同様に当該遺伝子 DNA を Fab 抗体発現ベクターに組み込んだ後大腸菌に発現させ、その産物を得た。この系では抗赤痢アメーバ以外の抗体が含まれているので、その特異性を固定した赤痢アメーバの染色およびウエスタンブロットにより検討した。さらに、単離された DNA 断片はシークエンス用ベクターにより再クローニングして塩基配列を決定した。

2. 免疫不全マウス内におけるヒト B および T 細胞の分化誘導

臍帯血より CD34+ 細胞をマイクロマグネットビーズを用いて単離し、ヒト造血幹細胞として用いた。免疫不全マウスとして NOD SCID を使用した。

1) B 細胞の分化誘導：CD34+細胞を種々

の線量で照射した NOD SCID マウスに静注した。経時的に B 細胞の出現をヒト B 細胞マーカー (CD45+19+) とヒト免疫グロブリン (Ig) を指標に解析した。

2) T 細胞の分化誘導：マウス MHC に適応した T 細胞レパートリーを形成する目的で、マウス胎仔由来の胸腺ストローマ細胞環境でヒト CD34+細胞を共培養した。共培養は、リンパ球除去胸腺への移入 (FTOC) と、胸腺ストローマ細胞を単離後再凝集する (RTOC) 方法を施行した。in vitro 系で分化誘導後、それら細胞複合体を NOD SCID マウスの腎被膜下に移殖し、経時的に T 細胞の出現をヒト T 細胞マーカーを指標に検索した。

C. 研究成果

1. ファージディスプレイ法と EBV トランスフォームの併用による新しいヒト抗体作製法の樹立：研究方法で述べたように、ファージディスプレイ法と EBV トランスフォームを併用することにより、産生が少ない HBV 表面抗原 (HBs) に対する抗体と TNF-a に対する自己抗体を、大腸菌に大量産生させることに成功した。これら抗体は、抗 HBs の H 鎖はいずれも γ であり、L 鎖が κ であった。中和抗体に関しては抗 HBs 抗体に 1 つ候補が見つけた。

2. ファージディスプレイ法単独による抗体獲得：アメーバ性膿瘍をもち高値の抗体を産生する患者より得た B 細胞から、直接ファージディスプレイ法によってライブラリーを作製し、大腸菌の発現系を用いて赤痢アメーバに対するヒト抗体を作製した。得られた 5 クローンの抗体遺伝子は、H 鎖では 3 種類、L 鎖では 4 種類の異なった配列が認められた。この抗体は固定した赤痢アメーバ標準株 9 種類と反応するものが 4、

7株と反応するものが1種類であったが、生虫体と反応するものは認められず、いずれの抗体も虫体表面でなく虫体内の抗原を認識していることが示唆された

3. ヒトB細胞のマウス内での分化：ヒトCD34+細胞をNOD SCIDマウスに投与後6週間で、血清中にIgMおよびIgGが検出された。ヒトCD45+19+細胞は末梢血中にはほとんど検出されなかったが、骨髄および脾臓ではCD45+細胞が最高40%認められ、そのうちCD19+細胞はほぼ半数であった。この結果は、レシピエントであるNOD SCIDマウスに300-350 radの照射をした場合最も効率良く見られた。

4. ヒトT細胞のマウス内での分化：ヒトCD34+細胞をマウス胎仔胸腺ストローマ細胞と凝集培養すると、FTOCに比較してより効率よくCD4およびCD8SP細胞が分化した。これら細胞複合体をNOD SCIDマウスに移殖すると、局所で末梢型の成熟T細胞に分化すると共に増殖も促進された。

D. 考察

1) 末梢血内のヒトB細胞から特定の抗体を大量に得るために、2つの遺伝子工学的手法を用いて検討した。末梢血液中に当該抗体産生細胞が少量しか存在しない場合は、ファージディスプレイ法とEBVトランスフォーム法を併用すると、大腸菌で目的とする抗体を増やせることが判明した。また、血清中に高値を示す抗体に関しては、ファージディスプレイ法単独でも特異抗体を大腸菌によって作製出来ることが示された。これまで得られた複数の抗体はいずれも特異性は確実で診断等には有用であるが、中和活性に関しては明確なものが得られていない。来年度の研究でさらに抗体数を増加させると同時に、得られた抗体遺伝子に遺伝

子工学的操作を加えて、より強い活性の抗体分子の改造を試みる必要がある。

2) ヒト造血幹細胞をBおよびT細胞に免疫不全NOD SCIDマウス内で分化誘導することに成功した。しかし、本年度の結果はBおよびT細胞がそれぞれ分化したのであって、同一組織内で両者が分化するか否かは結論がでていない。希望するヒトB細胞由来の抗体を産生させるためにはT-B相互作用が必要であり、その際にはTおよびB細胞間におけるMHCの拘束性が問題になる。この点は予測されていたので、マウスMHC発現のB細胞分化を含めて来年度に研究を進めるべく準備をしている。

E. 結論

ヒトB細胞由来の抗体を遺伝子工学的手法を用いて大腸菌で大量作製することに成功した。特に、抗体産生量が少ない或いはクローンの拡張が小さいB細胞から抗体遺伝子を単離する場合、ファージディスプレイ法とEBVトランスフォーム法を組み合わせると可能であることを、世界に先駆けて示した。一方、臍帯血由来のCD34+幹細胞から免疫不全マウス内でヒトBおよびT細胞を分化誘導出来ることを証明し、ヒト免疫系の再構築モデル作製に向けた第一歩を踏み出した。このモデルは血清中に検出されないが臨床応用に必要な抗体作製に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takehito Sato, Satoshi Nunomura, Chiharu Sato, Katsuto Hozumi, Yoshihiro Kumagai, Takashi Nishimura, Tak W. Mak, Kenji Kishihara and

- Sonoko Habu CD45 can act as a negative regulator for the transition from early to late CD4⁺CD8⁺ thymocytes.
Int.Immunol.,11:89-97,1999
- (2) Katsuto Hozumi, Takehito Sato, A. Wilson and Sonoko Habu Stage specific element for germ-line transcription of the TCR receptor α gene. 10th International Congress of Immunology,173-176, 1998
- (3) Takehito Sato, Kenji Kishihara, Tak W. Mak and Sonoko Habu β -selection of immature thymocytes is less dependent on CD45 tyrosinephosphatase.
Immunol.Lett.,64:133-138,1998
- (4) Yoshie Kametani, Hiroko Goto, Akiko Kobori, Takehito Sato, Kiyoshi Ando, Katsuto Hozumi, Takashi Nishimura, Kakashi Saito, Tadashi Yamamoto and Sonoko Habu EX vivo evidence for asymmetric tyrosine phosphorylation of ZAP-70 on double-positive thymocytes in the positive selection process Int. Immunol.vol. 10, No.8, pp.1203-1210 1998
- (5) Kan Shida, Kumiko Makino, Aki Moishita, Kotaro Takamizawa, Satoshi Hachimura, Akio Ametani, Takehito Sato, Yoshihiro Kumagai, Sonoko Habu, and Shuichi Kaminogawa Lactobacillus casei inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures.
Int. Arch. Allergy Immunol. 115: 278- 287, 1998
- (6) Katsuto Hozumi, Yasushi Tanaka, Takehito Sato, Anne Wilson and Sonoko Habu Evidence of stage-specific element for germ-line transcription of the T cell receptor α gene located upstream of J α 49 locus Eur. J. Immunol. 28: 1368-1378, 1998
- (7) Mamoru Watanabe, Yoshitaka Ueno, Tomoharu Yajima, Susumu Okamoto, Tatsuhiko Hayashi, Motomi Yamazaki, Yasushi Iwao, Hiromasa Ishii, Sonoko Habu, Masahiro Uehira, Hirofumi Nishimoto, Hiromichi Ishikawa, Jun-ichi Hata and Toshifumi Hibi Interleukin-7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin-7 protein accumulation in the colonic mucosa J. Exp.Med.,187:389-402,1998
- (8) Marcos Timon, Greg Elgar, Sonoko Habu, Ko Okumura Peter C. L. Beverley Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from the eufferfish Fugu rubripes. Immunogenetics, 47: 170-173, 1998

2. 学会発表

- (1) 岩壁賢治、八幡崇、大見寧、垣生園子、西村孝司 「Th1 と Th2 における LFA-1 依存的 細胞間接着機能の違いとその in vivo 抗腫瘍活性発現における役割」 第 57 回日本癌学会総会 1998

- (2) 太田明夫、北村秀光、松木直人、八幡崇、岩壁賢治、大見寧、垣生園子、西村孝司「NKT 活性化グリコシルセラミド (KRN7000) に対する免疫応答性の遺伝的支配」第 57 回日本癌学会総会 1998 年
- (3) 北村秀光、太田明夫、松木直人、八幡崇、岩壁賢治、大見寧、名久井実、佐藤まりも、安部直子、池田正春、垣生園子、西村孝司「NKT 活性化グリコシルセラミド (KRN7000) による免疫賦活化機構の解明」第 2 回基盤的癌免疫研究会総会 1998
- (4) 八幡崇、北村秀光、太田明夫、名久井実、岩壁賢治、垣生園子、西村孝司「Representational Difference Analysis (RDA) 法による Th1/Th2 特異的 cDNA のクローニング」第 28 回日本免疫学会総会 1998 年
- (5) 増田恵子、古田亜沙、亀谷美恵、穂積勝人、渡辺守、日比紀文、西本宏史「IL-7/2C-d マウスに出現する胸腺内 B 細胞の解析」第 28 回日本免疫学会総会 1998
- (6) 玉内秀一、佐藤健人、小沢秀行、小山浩一、池脇信直、八村敏志、上野川修一、垣生園子「経口抗原投与は IEL と末梢 T 細胞に異なる反応性を誘導する」第 28 回日本免疫学会総会 1998 年
- (7) 大塚良、穂積勝人、鈴木大介、西村孝司、安藤潔、垣生園子「レトロウイルスベクターを用いた未熟 T 細胞への遺伝子導入」第 28 回日本免疫学会総会 1998 年
- (8) 妹尾誠、竹田直樹、垣生園子、真貝洋一「TCR β enhancer (E β) を TCR α enhancer (E α) に置換したモデルマウスの解析」第 28 回日本免疫学会総会 1998
- (9) 佐藤健人、長谷川千己、布村聡、佐藤千春、穂積勝人、垣生園子「ポジティブセレクションにおける生存シグナル」第 28 回日本免疫学会総会 1998 年
- (10) 布村聡、佐藤健人、佐藤千春、長谷川千己、穂積勝人、西村孝司、垣生園子「ポジティブセレクションに伴う AP-1 活性化能の変化の制御機構の解析」第 28 回日本免疫学会総会 1998 年
- (11) 長谷川千己、佐藤健人、布村聡、佐藤千春、伊藤守、野村達次、垣生園子「ポジティブセレクションにおける胸腺細胞の増殖制御の意義」第 28 回日本免疫学会総会 1998 年
- (12) 吉田由紀、穂積勝人、垣生園子「pre-TCR α (pT α) 遺伝子発現抑制の解析」第 28 回日本免疫学会総会 1998
- (13) 斎藤雄紀、穂積勝人、鈴木大介、安藤潔、渡辺良宏、垣生園子「効率的なヒト・マウスハイブリット胸腺器官培養法確立の試み」第 28 回日本免疫学会総会 1998
- (14) 鈴木大介、穂積勝人、佐藤健人、佐藤千春、垣生園子「再凝集培養法による正の選択の in vitro 再構成」第 28 回日本免疫学会総会 1998
- (15) 亀谷美恵、佐藤健人、穂積勝人、垣生園子「ポジティブセレクションに特異的な TCR/コレセプターシグナルの解析」第 28 回日本免疫学会総会 1998
- (16) 松木直人、太田明夫、北村秀光、池田正春、佐藤健人、垣生園子、田代弘行、西村孝司

「OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスを用いた TCR エピトープの同定 - Altered ペプチドによる Th1/Th2 バランスの制御」
第 28 回日本免疫学会総会 1998

- (17) 伊勢渉、戸塚護、高東留美、八村敏志、佐藤健人、飴谷章夫、熊谷善博、垣生園子、上野川修一 「低濃度抗原及び変異抗原刺激により抗原未感作

T細胞に生じる抗原非特異的 IgG 抗体産生誘導能」 第 28 回日本免疫学会総会 1998 年

- (18) 斎藤誠司、穂積勝人、妹尾誠、真貝洋一、垣生園子 「J α 49 および上流域遺伝子欠損マウスにおける TCR α 遺伝子再構成の偏り」
第 28 回日本免疫学会総会 1998

分担研究報告書

ヒトB細胞由来抗体の大量生産方法の開発

分担研究者 猪子英俊 東海大学医学部 教授

研究要旨

ヒトB細胞にエプスタイン・バー・ウイルス(EBV)を感染させ、一切の処理をせずただ継続培養して得られたオリゴクローンのライブラリより2種類の抗原に対する抗体群のクローニングに成功した。1つはB型肝炎ウイルス(HBV)の表面抗原(HBs)に対する4種類の抗体である。もう1つはヒト腫瘍壊死因子(TNF- α)に対する6種類の抗体である。いずれの抗体も大腸菌での大量生産が可能であり、従ってEBVフリーの抗体の調製が可能である。このオリゴクローン法は従来のEBV法による抗体の調製に比べると抗体のクローニングが容易である。また、近年開発されたファージディスプレイ法による抗体の調製とは異なり、1度ライブラリを作ってしまうと抗体の調製は短期間に行える利点がある。

研究協力者 竹腰正隆 東海大学医学部
講師

A. 研究目的

近年、臨床治療への抗体の応用が世界的に目覚ましい。その作製法として主なものは1、マウスモノクローナル抗体のヒト型化(キメラ抗体やヒト化抗体)、2、ハイブリドーマ法、3、EBウイルストランスフォーム法、4、ファージディスプレイ法等がある。1については抗マウスヒト抗体(HAMA)の出現の可能性がある。2の細胞工学的手法は同様のマウスモノクローナル抗体作製法に比べるとかなりの困難が伴う。3についてはシングルクローンアイソレーションが困難であり、またEBウイルス除去の必要性がある。最新技術の4については抗体の出発材料選びが重要で、抗体の取得が容易ではないことが分かってきた。

これらの状況を勘案した上で、我々は新し

い抗体作製法を確立することに成功した。具体的には、3と4の方法を組み合わせつつ、かつ従来とは異なる発想法で新技術を構築した。すなわち抗体の取れやすい3の技術を利用し、かつクローニングを4の方法で行うことである。まず出発材料として末梢血のリンパ球を用い、EBウイルスによるトランスフォームを行う。しかし従来の方法と異なり、抗体価を指標としたスクリーニング・クローニングは一切行わない。代わりに数百個程度のリンパ球に分注して1ヶ月以上培養を行う。やがてこれらは数種の抗体を産生するオリゴクローンに収れん・安定するが、この間、抗体の性質の確認は行わない。本方法のユニークな点はこのオリゴクローンライブラリから抗体遺伝子を得ることである。

抗TNF- α 抗体のような自己抗体を産生するリンパ球は、健康人でも末梢血に微量に存在することが知られている。しかしファージディスプレイ法では微量すぎて抗体遺伝子

として得ることは困難である。ところがEBトランスフォーム法を併用するとマイナーな抗体産生クローンをオリゴクローン中で得ることができる。このオリゴクローンのリンパ球からRNAを取り出し、RT-PCRでFab領域の抗体遺伝子を増幅する。得られた抗体遺伝子は大腸菌でのFab抗体発現ベクターにクローニングする。これでヒト抗体遺伝子が大腸菌で発現させることができるとともに、EB法では困難なクローニングの問題を解決できることになる。またEBウイルスの除去も同時に兼ねることになる。

B. 研究方法

抗HBs活性または抗TNF- α 抗体活性が確認されたオリゴクローンから全RNAを抽出し、開発したプライマーを利用してRT-PCRで抗体遺伝子 (γ , μ , κ , λ) の分離を行う。得られた抗体遺伝子のうちL鎖に関しては、AscIで切断した後にNheIで切断して抗体発現用ベクターpFabI-His2のNheI-AscIサイトにクローニングする。次にH鎖をSfiIで切断した後に、NotIで切断してL鎖をクローニングしたpFabI-His2のSfiI-NotIサイトにクローニングする。これでL鎖とH鎖の入ったライブラリが作製されたことになる。このライブラリを抗体産生用のJM109に導入し、得られた各クローンについて培養を行い、IPTGによる抗体産生誘導後菌体を凍結・融解によって破碎し遠心上清をFab抗体試料とする。これについて抗原(培養細胞産生HBsまたは大腸菌産生組換えTNF- α)をELISAプレートに塗布したものについてELISAを行う。陽性クローンについて塩基配列の解析を行うとともに大量培養を行いアフィニティ精製を行う。

得られた陽性クローンについては塩基配列解析を行う。またホモロジーサーチやマル

チブルアライメントによって抗体遺伝子の特徴を調べる。またELISAによる抗体活性の解析、BIACOREによる解析、組織染色等を行い各抗体間の反応性の違いを調べる。

C. 研究結果

1. 抗HBs抗体

用いた抗体産生細胞株は、抗体遺伝子の解析結果からオリゴクローンであることが判明した。出発材料として約 10^7 個の細胞を用いRNAを抽出した。H鎖には γ 鎖と μ 鎖用のプライマーを用い、L鎖には κ 鎖と λ 鎖用のプライマーを用いて各抗体遺伝子のFab領域の増幅を行い、発現ベクターに組み込んで大腸菌で抗体を産生した。各抗体遺伝子について塩基配列を調べた。

解析を行ったオリゴクローン303と305については得られたRNAを用いて抗体遺伝子を容易に得ることができた。遺伝子解析の結果、いずれもH鎖は γ 鎖のみですべてIgG1, VH3ファミリーに属し、フレームワークと定常領域においては強い相同性を示した。一方、CDRにおいてはかなりの相違を示した。L鎖に関しては κ 鎖が多く見られた。303と305由来のFab抗体は共に抗HBs活性を示し、305については303のコンフォーメーションエピトープとは距離的に離れた領域のリニアエピトープを認識することが判明した。抗体のアフィニティに関してはもっともアフィニティが高い物で解離定数が 10^7 程度であった。現在さらに別のクローンについても解析中である。また得られた抗体遺伝子についてシャッフリングを行い、よりアフィニティの高い抗体を得る試みも行っている。

2. 抗TNF- α 抗体

オリゴクローンライブラリから抗TNF- α 活性のある2つのオリゴクローン1D5と1F5

を選んで、抗体遺伝子をRT-PCRで増幅し大腸菌で発現させることに成功した。オリゴクローン1D5からはクローン1D5-29が分離され、IgM抗体であった。オリゴクローン1F5からIgM抗体が2種（クローンmk-25,26）、IgG抗体は3種（クローンgk-1,10,20）得ることができた。これらH鎖は前者がVH3ファミリーに、後者がVH1ファミリーに属しホモロジーサーチの結果から多くが自己抗体遺伝子と強いホモロジーを示した。抗体活性はELISAの結果から多くが1D5-29と同等の活性を示した。Competition ELISAおよびL929細胞を用いたバイオアッセイにより、TNF- α に対する中和活性は見いだすことができなかった。

D. 考察

B細胞のEBV感染により得られたオリゴクローンより各種抗体遺伝子を抽出して大腸菌で発現させることに成功した。これらのオリゴクローンの中には細胞レベルでは培養不可能なクローンもあり、遺伝子レベルでは細胞の状態に依存しないことが判明した。この事は本方法の適用範囲の広さを示すものである。抗TNF- α 抗体では中和活性のあるものは得られなかったが、抗HBs抗体では中和活性が有ると思われ、本方法の有用性が判明した。

E. 結論

オリゴクローン法によるヒト抗体の取得は、出発材料の選択に厳しく縛られるファージディスプレイ法に比べ容易であることが判明した。今後は新たにオリゴクローンライブラリを構築する。ライブラリの構築は2ヶ月程度ででき、作製したライブラリ自体は各種ヒト抗体を得るための有用な出発材料となる。医学上有用な各種ヒト抗体の作製を目

指すものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Taniguchi Y, Matsuzaka Y, Fujimoto H, Miyado K, Kohda A, Okumura K, Kimura M and Inoko H: Nucleotide sequence of the Ring3 gene in the class II region of the mouse MHC and its abundant expression in testicular germ cells. *Genomics* 51: 114-123, 1998
- (2) Kimura T, Goto K, Yabuki K, Mizuki N, Tamiya G, Sato M, Kimura M, Inoko H, Ohno S: Microsatellite polymorphism within the MICB gene among Japanese patients with Behcet's disease. *Hum Immunol* 59:500-502, 1998
- (3) Takekoshi M, Maeda F, Tachibana H, Inoko H, Kato S, Takakura I, Kenjyo T, Hiraga S, Ogawa Y, Horiki T, Ihara S : Human monoclonal anti-HCMV neutralizing antibody from phage display libraries. *J. Virol. Methods* 74: 89-98, 1998
- (4) Sazazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, Yoshida T, Kimura A, Akaza T, Kamikawaji N, Kodera Y, Takaku F: Importance of HLA-class I allele matching for clinical outcome after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *N Engl J. Med.* 339: 1177-1185, 1998
- (5) Shiina T, Kikkawa E, Yamagata T, Saito W, Tamiya G, Oka A, Watanabe

- K, Yamazaki M, Tashiro H, Okumura K, Ando A, Kimura M, Soeda E, Pontarotti P, Inoko H: Physical mapping of 620 kb between the S and HLA-E genes in the midst of the human MHC class I region by construction of a BAC, PAC and cosmid contig. *Immunogenetics* 48: 402-407, 1998
- (6) Shigenari A, Ando A, Baba A, Yamamoto T, Katsuoka Y, Inoko H: Characterization of alkaline phosphatase genes expressed in seminoma by cDNA cloning. *Cancer Research* 58: 5079-5082, 1998
- (7) Takekoshi M, Maeda F, Tachibana H, Inoko H, Kato S, Takakura I, Kenjo T, Hiraga S, Ogawa Y, Horiki T, Ihara S. Human monoclonal anti-HCMV neutralizing antibody from phage display libraries. *J Virol Methods*. 1998; 74: 89-98.
- (8) Tachibana H, Takekoshi M, Cheng X.-J, Maeda F, Aotsuka S, Ihara S. Bacterial expression of a neutralizing mouse monoclonal antibody Fab fragment to a 150 kilodalton surface antigen of *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 60: 35-40.
- (9) Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S, Aotsuka S, Ono Y, Inoko H, Takekoshi M. Bacterial Expression of a Human Recombinant Monoclonal Antibody Fab Fragment Against Hepatitis B Surface Antigen. *J Med Virol*. 1999 in press.
- (10) Tachibana H, Cheng X.-J, Watanabe K, Takekoshi M, Maeda F, Aotsuka S, Kaneda Y, Takeuchi T, Ihara S. Preparation of recombinant human monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica*. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology* 1999 in press.
- (11) 総説 長塚靖子、竹腰正隆、前田史子、井原征治、小野魁. EBウイルス-形質転換法を用いたヒト抗体産生細胞ライブラリー. *BIO Clinica* 1998; 13:77-82
2. 学会発表
- (1) Maeda F., Ihara S., Nagatsuka Y., Ono Y., Takekoshi M. Bacterial expression of human monoclonal antibody Fab fragment to Hepatitis B surface antigen. *The international symposium on Immunoglobulin genes and B lymphocytes*. 1998
- (2) Takekoshi M, Maeda F, Ihara S, Nagatsuka Y, Ono Y. Bacterial expression of human monoclonal antibody Fab fragment to Hepatitis B surface antigen. *Human Antibodies and hybridomas*. 1998
- (3) 前田 史子、竹腰 正隆、長塚 靖子、小野 魁、井原 征治. ヒト抗HBsモノクローナル抗体カクテル調製の試み 第46回日本ウイルス学会 1998
- (4) 竹腰 正隆、前田 史子、長塚 靖子、小野 魁、井原 征治. オリゴクローン法による抗TNF- α ヒトモノクローナル抗体の作製 第21回日本分子生物学会 1998
- (5) 前田 史子、竹腰 正隆、長塚 靖子、小野 魁、井原 征治. オリゴクローンよりの抗HBsヒトモノクローナル抗体の調製 第21回日本分子生物学会 1998

分担研究報告書

病原微生物に対するヒト型抗体の作製

分担研究者 橋 裕司 東海大学医学部 助教授

研究要旨

赤痢アメーバに特異的なヒト抗体をコードする遺伝子のクローニングと大腸菌における発現について検討した。アメーバ性肝膿瘍を呈する患者の末梢血液中のリンパ球からmRNAを精製し、RT-PCRによって抗体H鎖のFd領域とL鎖をコードする遺伝子を増幅した。このDNA断片を発現ベクターに組み込み、大腸菌に導入した。約 3×10^3 個のコロニーについて、抗赤痢アメーバFab抗体産生の有無をHM-1:IMSS株を抗原とした間接蛍光抗体法によってスクリーニングし、5個の陽性クローンを得た。各クローンの塩基配列を解析したところ、H鎖では3種類、L鎖では4種類の異なる遺伝子が認められた。赤痢アメーバの標準株9株に対する反応性を比較したところ、異なるアミノ酸配列を有する3種類のFabは全株に反応し、別の1種類は7株のみに反応した。これら4種の抗体は*Entamoeba dispar* や他の腸管寄生原虫とは反応しなかった。以上の結果は、赤痢アメーバに特異的なヒトモノクローナル抗体が大腸菌によって作製できたことを示している。得られた抗体について赤痢アメーバに対する中和活性は認められなかったものの、赤痢アメーバ症の診断に利用できると思われる。

A. 研究目的

寄生虫症対策の柱として遺伝子工学によるワクチン開発が試みられて久しいが、いまだに実用化への道は遠い。一方、細胞工学により作製されたマウスモノクローナル抗体は、抗原解析や体外診断に大きな役割を果たし、さらにモデル動物では抗体移入によって感染を阻止できることが報告されている。赤痢アメーバにおいても、虫体表面のGal/GalNAcレクチンが宿主細胞への接着と傷害に重要な役割を果たしており、それに対するマウスモノクローナル抗体は肝膿瘍形成を阻止できることが知られている。しかし、マウス抗体はヒトにとって異種抗体であり、治療や予防のために投与することはできない。もし同様な特異性を持ったヒト抗体を作製でき

れば臨床応用が可能になると思われるが、細胞融合法ではヒト抗体の作製は困難である。また、可変領域あるいは超可変領域だけをマウス由来とするキメラ抗体やヒト化抗体においても、マウスのアミノ酸配列が含まれているために繰り返しての使用は難しい。

本研究は、寄生虫症の予防や治療に応用できる純粋なヒトモノクローナル抗体を作製することを目的としている。今年度は、赤痢アメーバに特異的なヒトモノクローナル抗体Fab断片の大腸菌による作製について検討した。

B. 研究方法

アメーバ性肝膿瘍の患者の末梢血液約10mlからリンパ球を分離し、mRNAを単離した。

ヒト抗体遺伝子用に設計されたプライマーセットを用いてRT-PCRを行い、免疫グロブリンL鎖 (κ , λ) の全領域とH鎖 (γ) のFd領域をコードする遺伝子をそれぞれ増幅した。PCRは、熱変性94°C 1分、アニーリング50°C 2分、伸長反応72°C 3分で35サイクル行った。発現ベクターpFab1-His2の2つのクローニング部位に、増幅されたL鎖、H鎖のDNA断片を組み込み、大腸菌JM109に導入した。

各コロニーから菌体を採取し、2 mlの培地で600nmのODが0.6~0.8に達するまで37°Cで培養し、Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (最終濃度0.1mM) を添加して30°Cで一晩培養した。菌体1.5mlを遠心した後、1 mMのphenylmethylsulfonyl fluorideを含むPBS 150 μ lに懸濁し、超音波破碎した。18,000 g で10分間遠心した上清について、赤痢アメーバに対する抗体産生の有無を間接蛍光抗体法で調べた。抗原にはホルマリン固定した赤痢アメーバHM-1:IMSS株の培養虫体を、二次抗体としてFITC標識抗ヒトIgG Fab ヤギ抗体を用いた。陽性のクローンについては1 liter の培地で培養し、上記のような方法で20mlの上清を得た。

ウェスタンブロットは、赤痢アメーバHM-1:IMSS株の培養虫体をSDSを含むポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、PVDF膜に転写して行った。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG F(ab')₂ ヒツジ抗体を用いた。リンパ球分離の際に得られた患者の血漿を陽性対照として使用した。また、抗レクチン抗体はヴァージニア大学のDr. Petriより分与されたものを用いた。

クローニングされたDNA断片をシーケンス用ベクターCV-1、CV-2に再クローニングし、サイクルシーケンス法によって両方向の塩基配列を決定した。

C. 研究結果

約3 x 10³個のコロニーについて、菌体の破碎上清を赤痢アメーバHM-1:IMSS株の栄養型虫体を抗原としてスクリーニングしたところ、5個の陽性クローン (A235、A429、B220、C546、E244) が得られた。各クローンについてH鎖とL鎖をコードする遺伝子の塩基配列を解析した。H鎖に関してA235とA429、C546とE244の塩基配列は同一であった。L鎖においてもA235とA429は同一の配列を示した。V領域のアミノ酸配列をKabatデータベースの配列と比較したところ、H鎖ではA235 (A429) はVH3、B220 (C546) とE244はVH1グループに属していた。L鎖では、B220がV κ 4に属し、その他はV κ 1に属していた。

得られたヒト抗体の特異性について、ホルマリン固定した栄養型虫体を用いた間接蛍光抗体法により更に検討した。赤痢アメーバの標準株9株 (HK-9、200:NIH、HB-301:NIH、H-302:NIH、H-303:NIH、DKB、C-3-2-1、SAW1627、SAW755CR) に対する反応性を調べたところ、A235 (A429)、B220、E244はすべての株と反応した。しかし、C546は9株中の7株と反応したが、H-302:NIH、SAW1627とは反応しなかった。また、他の腸管寄生原虫、*Entamoeba dispar*、*E. moshkovskii*、*E. coli*、*E. hartmanni*、*Endolimax nana*、*Dientamoeba fragilis*、*Trichomonas hominis*、*Giardia intestinalis*と反応するものは認められなかった。一方、赤痢アメーバHM-1:IMSS株の生虫体を用いた間接蛍光抗体法では陽性反応は認められず、エピトープは虫体表面には存在しないと思われた。

ウェスタンイムノブロット法によると、A235 (A429) とB220は非還元条件下で、260-kDaのバンドを認識していた。この分子量の

抗原は患者血漿中の抗体が最も強く反応するものであり、抗Gal/GalNAcレクチン抗体が反応するものであった。C546とE244に関しては、ウェスタンイムノブロットでバンドは認められなかった。

D. 考察

今回の結果は、赤痢アメーバに特異的なヒトモノクローナル抗体が大腸菌の発現系を用いて産生できたことを示している。寄生虫に対する遺伝子組換え型のヒトモノクローナル抗体Fab断片の作製として最初の報告である。ウェスタンイムノブロットの結果から、A235 (A429) とB220が認識する抗原は赤痢アメーバの主要抗原であると考えられた。従って、このような抗原に対しては、パニングによる濃縮を行わなくても、数千のコロニーをスクリーニングすることで抗体産生クローンを見いだすことができると思われる。

得られた遺伝子組換え型のヒトモノクローナル抗体の活用法として、血清診断の際の陽性対照としての利用がある。すなわち、凝集反応の場合には動物に免疫して作製した抗体で代用できるが、ELISAや間接蛍光抗体法など二次抗体が必要な系ではヒト抗体が使用されなければならない。本研究で示されたような方法を用いれば、病原体に対する均質なヒト抗体を無制限に供給することが可能である。

また、細胞融合法でモノクローナル抗体を作製するには通常約3カ月を要する。その大部分は動物の免疫とハイブリドーマのクローニングに要する時間である。今回のように患者の末梢血液を出発材料にし、大腸菌で抗体遺伝子をクローニングすることで、短期間にモノクローナル抗体を作製することができる。

ヒトモノクローナル抗体の最も有効な利

用は、目的の項で述べたように治療や予防のための応用である。今回得られた抗体の中には、260-kDaのGal/GalNAcレクチンを認識していると思われるクローンがあった。このレクチンには、モノクローナル抗体を反応させることで虫体の宿主細胞への接着が阻止されるエピトープの存在が知られている。しかし、今回得られた抗体を用いて行った予備的検討では接着に対する阻害効果は認められなかった。また、生虫体を用いた間接蛍光抗体法でもエピトープは虫体表面には存在しないと思われたことから、これらの抗体はレクチンの細胞質側のドメインを認識していると考えられる。

今回得られたクローンの中でC546とE244は同一のH鎖から構成されていたが、赤痢アメーバのいくつかの株に対する反応性は異なっていた。このことは、L鎖を置換することによって抗体の抗原への結合強度を変えることができることを示している。従って、同一のH鎖について、様々なL鎖との組み合わせでもう一度スクリーニングすることで、より結合強度の大きい抗体を得ることができるかもしれない。

また、今回は他にも同一の遺伝子を持つクローンが認められた。もともとこのような遺伝子を持つリンパ球が多く存在したのか、PCRによって特定の遺伝子が顕著に増幅されたのか、その理由は明らかではない。いずれにしても、目的の抗体遺伝子を持つリンパ球が少ない場合には、できるだけ大きな抗体遺伝子ライブラリーを作製し、効率の良いスクリーニングを行うことが必要であろう。

E. 結論

赤痢アメーバ症患者の末梢血液中のリンパ球を出発材料にして、ヒトモノクローナル抗体Fab断片を大腸菌で作製した。異なるア

ミノ酸配列を有する3種類の抗体が、調べた限り赤痢アメーバの全ての株と反応し、他の腸管寄生原虫とは反応しないことを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M. Takekoshi, F. Maeda, H. Tachibana, H. Inoko, S. Kato, I. Takakura, T. Kenjyo, S. Hiraga, Y. Ogawa, T. Horiki and S. Ihara Human monoclonal anti-HCMV neutralizing antibody from phage display libraries. *J. Virol. Methods*, 74 (1): 89-98. 1998
- 2) X.-J. Cheng, H. Tsukamoto, Y. Kaneda and H. Tachibana Identification of the 150-kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica* as a galactose- and *N*-acetyl-D-galactosamine-inhibitable lectin. *Parasitol. Res.*, 84 (8): 632-639. 1998
- 3) S. Kobayashi, E. Imai, H. Tachibana, T. Fujiwara and T. Takeuchi *Entamoeba dispar*: cultivation with sterilized *Crithidia fasciculata*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 45 (2): 3S-8S. 1998
- 4) W. L. Rivera, H. Tachibana and H. Kanbara Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59 (6): 916-921. 1998
- 5) X.-J. Cheng, H. Tachibana and Y. Kaneda Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by a monoclonal antibody to a 150-kDa surface lectin of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.*, 85 (1): 78-80. 1999
- 6) H. Tachibana, M. Takekoshi, X.-J. Cheng, F. Maeda, S. Aotsuka and S. Ihara Bacterial expression of a neutralizing mouse monoclonal antibody Fab fragment to a 150-kilodalton surface antigen of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60 (1): 35-40. 1999
- 7) H. Tachibana, X.-J. Cheng, K. Watanabe, M. Takekoshi, F. Maeda, S. Aotsuka, Y. Kaneda, T. Takeuchi and S. Ihara Preparation of recombinant human monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6: in press. 1999

2. 学会発表

- 1) H. Tachibana, X.-J. Cheng, Y. Kaneda, M. Takekoshi, F. Maeda and S. Ihara Bacterial expression of human monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica*. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.*, 26 (1): 32-33. 1998
- 2) 橋 裕司、程訓佳、渡辺勝臣、金田良雅、竹腰正隆、前田史子、井原征治 赤痢アメーバに特異的なヒトモノクローナル抗体Fab断片の大腸菌による作製. *Parasitol. Int.*, 47 (Suppl.): 61. 1998
- 3) H. Tachibana, X.-J. Cheng, K. Watanabe, Y. Kaneda, M. Takekoshi, F. Maeda and S. Ihara Bacterial expression of human monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Int.*, 47 (Suppl.): 333. 1998

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

抗原特異的ヒト B 細胞由来抗体獲得を目指したモデルの開発

分担研究者 穂積勝人 東海大学医学部 助手

研究要旨

臍帯血から得たヒト造血幹細胞である CD34+細胞を操作して、免疫不全マウス内に成熟型 B および T 細胞を分化誘導することに成功した。すなわち、1) CD34+細胞は、適当線量 (300-350rad)の照射を受けた免疫不全マウス—NOD SCID—に移殖することにより、免疫グロブリン (IgM および IgG タイプ) を産生する B 細胞にまで分化することを示した。この系では、Ig 産生細胞数と産生 Ig のピークは移植後 6 週間であった。2) 一方、T 細胞依存的に抗体産生をする B 細胞の分化誘導のために必要とされるヒト T 細胞をマウス内で分化誘導できる新しい系を樹立した。この系では、ヒト CD34+細胞をマウス胸腺ストローマ細胞と in vitro で共培養することにより、成熟型 T 細胞を分化誘導された。さらに、この培養系を in vivo に持ち込み、NOD SCID マウス腎被膜下局所において末梢型 T 細胞の分化と増殖を確認した。

研究協力者 佐藤健人 東海大学医学部
助手
安藤 潔 東海大学医学部
講師

環境に適応した B および T 細胞を分化誘導することにより、目的とする抗原に対するヒト型抗体を得ようとするものである。本年度は、NOD SCID マウス内でヒト幹細胞から T および B 細胞を分化する系の樹立をめざした。

A. 研究目的

目的とする抗原に対するヒト B 細胞由来の抗体を得るためには、ヒト免疫系が再構成されたモデル動物が必要である。特に、T 細胞依存的抗原に対する抗体を得るためには、ヒト B 細胞のみならずヒト T 細胞も必要とされる。従来免疫不全マウスを用いて進められてきたヒト T および B 細胞の単純な移入では、マウス環境での T 細胞による抗原認識が出来ないため、目的とする特異的抗体を得ることが困難であり、又移入細胞の寿命に制限がある。本研究では、マウ

B. 研究方法

ヒト造血幹細胞 (CD34+細胞) から、B および T 細胞を誘導する系の開発を以下の方法で試みた。

1. 免疫不全マウス (NOD SCID) 生体内での抗体産生細胞の誘導：

ヒト臍帯血より CD34+細胞を 0.001 ビーズで分離し、それらを NOD SCID マウスに投与する。NOD SCID は照射群 () と非照射群にわけた。経時的にリンパ系組織お

および末梢血におけるヒト B 細胞および免疫グロブリン (Ig) の出現を、flowcytometer および ELISA により検索した。

2. マウス環境 (MHC) に適応したヒト T 細胞分化の誘導：

(1) *in vitro* 系：臍帯血より分離した CD34 陽性細胞を、(i) マウス胎仔胸腺からリンパ球を除去した小葉に移入するか、あるいは(ii) マウス胸腺由来のストローマ細胞と共にミリポアフィルター上で凝集培養した。胸腺内のリンパ球除去には、マウス胎仔胸腺をデオキシグアノシンによる処理をおこなった。胸腺ストローマ細胞はさらにそれらを trypsin/EDTA で処理して得た。15 日令のマウス胎仔胸腺をデオキシグアノシンで処理することにより得た。ヒト T 細胞の分化抗原を指標に成熟状況を flowcytometer にて解析した。

(2) *in vivo* 系：上記 *in vitro* 系で培養したリンパ球とストローマ細胞の複合体を免疫不全マウス (NOD SCID) の腎被膜下に移植し、その後経時的に局所および末梢リンパ組織内のヒト由来 T 細胞を、flowcytometer にて解析した。

C. 研究成果

1. ヒト B 細胞と Ig の検出

ヒト臍帯血より得た $2-5 \times 10^6$ 個の CD34+ 細胞を NOD SCID マウスに静注し、3、6、9 週後の末梢血およびリンパ組織内のヒトリンパ球を解析した。ヒト CD45+ 細胞は末梢血ではほとんど認められなかったが、骨髄および脾臓では6週をピークに平均 30-50% に検出された。そのうち、B 細胞のマーカーである CD19+ 細胞は最高 50% まで認められた。一方、末梢血中にヒト B 細胞は検出されなかったが、血清中のヒト

IgM および IgG は ELISA にて検出された。なお、レシピエントである NOD マウスに種々の線量の照射を試みた結果、300-350rad の照射が上記結果を得るために最適であることが判明した。

2. ヒト T 細胞の分化誘導

ヒトに限らずマウスでも *in vitro* で造血幹細胞から成熟型 T 細胞に分化誘導することは困難である。例外は、胎仔胸腺環境を *in vitro* で樹立することである。本研究ではまず、ヒト CD34+ 細胞を *in vitro* でマウス胎仔胸腺或いは胸腺ストローマ細胞との共培養によって、成熟型 T 細胞を示す CD4 および CD8SP 細胞が 5-10 週後誘導された。このうち、後者のストローマ細胞との凝集培養の方が確実かつ効率的であることが判明した。

次に、*in vitro* の培養系を NOD SCID マウス腎被膜下に移植することにより、局所で CD4 および CD8SP T 細胞が増殖した。さらに、これら CD8SP 細胞は CD1a の発現が低下しており、末梢型 T 細胞にまで *in vivo* で分化した最初の系となった。しかし、成熟分化した T 細胞は末梢血および他のリンパ組織内には flowcytometer にて検出されなかった。

D. 考察

本年度の研究により、6 週間という限定された期間には、ヒト幹細胞から B 細胞が免疫不全マウス内で T 細胞に非依存的に抗体産生細胞まで分化することが判明した。しかし、分化したこれら抗体産生細胞の局在および抗原特異性は明らかにされなかった。この点は、T 細胞依存的特定抗原・ペプチドに対する抗体作製を目指すために必要な事項であるので、今回樹立した

系を基盤に来年度の課題として展開する予定である。また、T細胞依存的に抗体産生するB細胞分化の分化誘導するT細胞の分化も、CD34+細胞からマウス環境下で分化させることにはじめて成功した。現在の系では、分化した成熟T細胞は腎臓に局在しているため、特異的抗体産生を目指してこれらT細胞とB細胞が相互作用できる操作を工夫することが必要と考えられた。

E. 結論

臍帯血より得たヒトCD34+細胞を、免疫不全マウスであるNOD SCID内でそれぞれ成熟型BおよびT細胞に分化誘導することに成功した。この系の樹立は、T-B細胞の相互作用が可能な系確立への発展性と可能性を示しており、目的とする抗原に対するヒトB細胞由来の抗体獲得が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Katsuto Hozumi, Takehito Sato, Anne Wilson and Sonoko Habu
Stage specific element for germ-line transcription of the TCR receptor α gene. 10th International Congress of Immunology, 173-176, 1998
- (2) Yoshie Kametani, Hiroko Goto, Akiko Kobori, Takehito Sato, Kiyoshi Ando, Katsuto Hozumi, Takashi Nishimura, Kakashi Saito, Tadashi Yamamoto and Sonoko Habu
EX vivo evidence for asymmetric tyrosine phosphorylation of ZAP-70 on double-positive thymocytes in the positive selection process
Int. Immunol. vol.10, No.8,

pp.1203-1210 1998

- (3) Katsuto Hozumi, Yasushi Tanaka, Takehito Sato, Anne Wilson and Sonoko Habu
Evidence of stage-specific element for germ-line transcription of the T cell receptor α gene located upstream of J α 49 locus
Eur. J. Immunol. 28:1368-1378,1998
 - (4) 穂積勝人 「TCR 遺伝子再構成の分化段階的制御」臨床免疫 30(9) 科学評論社 1998
 - (5) 穂積勝人 「免疫系再構成の機構—総論」血液・免疫・腫瘍、4(1) メディカルレビュー社 1999
- #### 2. 学会発表
- (1) 増田恵子、古田亜沙、亀谷美恵、穂積勝人、渡辺守、日比紀文、西本宏史 「IL-7/2C-d マウスに出現する胸腺内B細胞の解析」第28回日本免疫学会総会 1998
 - (2) 大塚良、穂積勝人、鈴木大介、西村孝司、安藤潔、垣生園子 「レトロウイルスベクターを用いた未熟T細胞への遺伝子導入」第28回日本免疫学会総会 1998
 - (3) 佐藤健人、長谷川千己、布村聡、佐藤千春、穂積勝人、垣生園子 「ポジティブセレクションにおける生存シグナル」第28回日本免疫学会総会 1998
 - (4) 吉田由紀、穂積勝人、垣生園子 「pre-TCR α (pT α) 遺伝子発現抑制の解析」第28回日本免疫学会総会 1998
 - (5) 斎藤雄紀、穂積勝人、鈴木大介、安藤潔、渡辺良宏、垣生園子 「効率的なヒト・マウスハイブリット

胸腺器官培養法確立の試み」

第 28 回日本免疫学会総会 1998

- (6) 鈴木大介、穂積勝人、佐藤健人、
佐藤千春、垣生園子 「再凝集培養法に
よる正の選択の *in vitro* 再構成」

第 28 回日本免疫学会総会 1998

CONFIDENTIAL

SECRET

TOP SECRET