

好中球特異抗原を認識するモノクローナル抗体, TAG1, TAG2, TAG3 の特性

谷 口 菊 代

広島大学医学部小児科学講座 (主任: 上田一博教授)

受付 平成12年1月6日

受理 平成12年5月1日

免疫機序による好中球減少症において, 好中球 $Fc\gamma$ receptor IIIb ($Fc\gamma$ RIIIb) 上の抗原である NA 系抗原や $Fc\gamma$ RIII を標的とする抗体がしばしば検出される。抗体検出に用いられるパネル好中球と患者好中球の NA 系抗原の表現型の同定にはモノクローナル抗体 (mAb) または血清抗体が用いられてきた。

このたび, NA1 抗原認識 mAb, TAG1, NA2 抗原認識 mAb, TAG2, $Fc\gamma$ RIII 認識 mAb, TAG3 の3つの mAb を作製した。TAG1, TAG2, TAG3 を NA 系各型パネル好中球および NA-null 好中球と反応させ, NA 系抗原に対する反応性を検討した。また, 各種末梢血血液細胞および白血病細胞由来の各種ヒト由来培養細胞株との反応性も検討した。TAG1 は NA1 陽性好中球とのみ反応し, TAG2 は NA2 陽性好中球と強く反応するとともに NA1/NA1 好中球にも弱く反応した。TAG3 は3タイプの好中球と反応した。いずれの mAb も NA-null 好中球とは反応しなかった。TAG2 と TAG3 は CD14 陽性細胞の一部と CD56 陽性細胞の多くにも反応し, NA2 タイプを示すポリペプチド結合型の $Fc\gamma$ RIIIa に反応したと推測された。TAG1, TAG2, TAG3 は phosphatidylinositol-specific phospholipase C で前処理した好中球とでは, 反応性は顕著に減弱し glycosyl-phosphatidylinositol 結合型の $Fc\gamma$ RIIIb と反応すると考えられた。TAG1, TAG2, TAG3 の認識エピトープの検討には他の $Fc\gamma$ RIII 関連 mAb による抑制試験を行った。TAG1 は NA1 特異的 MG38 によって反応が強く抑制された。TAG2 は NA2 特異的 mAb, GRM1 で強く抑制された。TAG3 は $Fc\gamma$ RIII 特異的 mAb, 3G8 で強く抑制された。以上の結果から, TAG1 は NA1 抗原を, TAG2 は主に NA2 抗原と $Fc\gamma$ RIIIa を, TAG3 は $Fc\gamma$ RIIIa と $Fc\gamma$ RIIIb の共通抗原を認識すると考えられた。

同定困難な血清抗体の特異性を判定する方法として, mAb による抑制試験を行った。NA1 特異性のみられた血清抗体の反応は, NA1 認識 mAb, TAG1 または MG38 または TAG2 で抑制され, NA2 特異性のみられた血清抗体の反応は, NA2 認識 mAb, TAG2 または GRM1 で抑制された。広範な反応性のみられた血清抗体は, しばしば $Fc\gamma$ RIII 認識 mAb, TAG3 または 3G8 で抑制された。mAb による抑制試験は, 血清抗体の特異性が推測でき, パネル好中球すべてと反応する広範な反応性を示す血清抗体の場合には特に有用であると考えられた。

Key words : Monoclonal antibody, $Fc\gamma$ RIII, NA1 antigen, NA2 antigen, Neutropenia

好中球細胞膜上には多くの特異抗原や受容体が存在し, 細胞機能と密接な関係にある。しかしこれらの抗原や受容体は自己抗体, 同種抗体の標的抗原となる場合があり, 自己免疫性好中球減少症^{16,19)}および同種免疫性好中球減少症^{31,44)}, 輸血後急性肺浸潤 (Transfusion-related acute lung injury)^{23,35,40,43)}などでは対応抗原としての解析が行われている。好中球特異

抗原の1つである NA 系抗原は好中球 $Fc\gamma$ receptor IIIb ($Fc\gamma$ RIIIb) 上にある^{11,42)}。 $Fc\gamma$ RIII (CD16) には NK 細胞などに発現する膜貫通型の $Fc\gamma$ RIIIa と, 好中球に発現する Glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) によって細胞膜に結合した $Fc\gamma$ RIIIb の2つがある^{11,14,28,32)}。好中球 $Fc\gamma$ RIIIb には対立遺伝子を成して構成される NA1, NA2 の2つのアロタイプが存在し, 遺伝子型,

表現型とも NA1/NA1, NA1/NA2, NA2/NA2 の3タイプに大別される^{25,26,27)}。最近, SH (+) と呼ばれている NA2 抗原の1塩基が異なった亜型も認められている^{4,17,34)}。また Fc γ RIIb をコードする Fc γ RIIB 遺伝子の欠損による NA-null がまれに存在する^{6,9,12,22)}。NA-null は臨床的には無症状であるが, 妊娠, 輸血等で NA 系抗原を含む Fc γ RIIb 上の抗原で感作を受け, 同種抗体を産生することによる重要な病態が惹起される。近年, Fc γ RIIb には NA 系とは異なる抗原の存在も報告され^{2,20)}, Fc γ RIIb の構造の多様性の存在が明らかとなってきた。Fc γ RIIb 上の種々の抗原に対する抗体も様々な反応性を示すことが考えられており, 抗体の同定には詳細な検討が必要とされる。

NA 系抗原の同定は, The granulocyte indirect immunofluorescence test (GIFT)⁴⁾による血清学的な表現型と, Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP 法)³⁰⁾または Polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP 法)^{5,10)}による遺伝子型の両方での解析が必要であり, 血清学的表現型の同定には抗原特異性の高い抗体の利用が不可欠である。現在まで NA1 認識 mAb と Fc γ RIII 認識 mAb は多くが作製され利用されているが, NA2 認識 mAb は GRM1²⁹⁾が唯一報告されている抗体であるものの, 市販されていないため一般的な使用が不可能である。NA1 と NA2 がわずか5塩基対の差によってコードされてくる抗原であることが^{25,26)}, 特異抗体の作製を困難としていると推測される。

今回著者は NA1 抗原認識 mAb, TAG1 (IgG₁, κ)³⁷⁾, NA2 抗原認識 mAb, TAG2 (IgG₁, κ)^{38,39)}, Fc γ RIII 認識 mAb, TAG3 (IgG₁, κ)³⁸⁾を作製し, これらの mAb の反応性を検討した。

また血清抗体の抗原特異性を判定するために, mAb を用いて抑制試験を行った。NA 系抗原を含む Fc γ RIIb 関連の複数の mAb を用いて, 血清抗体の抑制試験を行うことにより, 血清抗体の抗原特異性をより正確に判定できる可能性が認められた。すなわち, 予め結合した mAb と同一の抗原を認識する血清抗体の反応性は低下し, 特に結合エピトープが同じものほど抑制が顕著にみられる。一つの抗原について反応性の異なる二つの mAb を用いることで, いずれかで強い抑制反応がみられ, 血清抗体の特異性を判定できる可能性が認められた。

材 料 と 方 法

1) 好中球の採取

ヘパリン採取した健常人の末梢血を6% Hydroxyethylstarch (HES) と等量混合し, 23°Cで30分間静置した。白血球濃厚上清を Lymphoprep™ (9.1% Sodium Diatrizoate, 5.7% Polysaccharide, Density = 1.077 ± 0.001 g/ml, Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) に重層し, 800×g 20分間遠心した。低張液で赤血球を溶血し, 95%以上の好中球を得た。

2) 免疫, 細胞融合と抗体産生細胞株樹立

NA1 認識 mAb, TAG1 作製; TAG1 は, 報告した方法³⁷⁾に従って作製した。他の抗体作製との比較のため再度記載する。2×10⁷個の好中球を終濃度1% Paraformaldehyde 含有 Phosphate-buffered saline (pH 7.2) (PFA-PBS) で23°C, 5分間固定した。PBS で洗浄後, 細胞を1mlのPBSに浮遊させ BALB/c マウス (♀) の腹腔内に投与した。2×10⁷個の無固定 NA1/NA1 好中球を2週おきに2回追加免疫した。

NA2 認識 mAb, TAG2 作製; 2×10⁷個 NA2/NA2 好中球を NB1 特異的 mAb, TAG4³⁸⁾で on ice 30分間反応させた。PBS で洗浄後, 1mlのPBSに浮遊させ BALB/c マウス (♀) の腹腔内に投与した。同様に処理した1×10⁷個の NA2/NA2 好中球を2週おきに2回追加免疫した。

Fc γ RIII 認識 mAb, TAG3 作製; 2×10⁷個の NA1/NA2 好中球を TAG1 で on ice 30分間反応させ, PBS で洗浄後, 1mlのPBSに浮遊させ BALB/c マウスの腹腔内に投与した。同様に処理した1×10⁷個の NA1/NA2 好中球を2週おきに2回追加免疫した。

細胞融合, ハイブリドーマの選択とクローニング; Littlefield ら¹⁸⁾と Galfre ら⁸⁾の方法に従って行った。最終免疫から3日目に脾細胞と P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1) 細胞を Polyethylene glycol (PEG) 4.000 (Wako Junyaku Co, Tokyo, Japan) で融合した。融合細胞は HAT 選択培地 (10% FCS, 1×10⁻⁴M Hypoxanthine; Sigma, Chemical Co, St. Louis, MO, 4×10⁻⁷M Aminopterin; Sigma, 1.6×10⁻⁵M Thymidine; Sigma, 含有 RPMI 1640 complete medium) に浮遊させ, CO₂ インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で培養した。培養上清中の抗体スクリーニングは, 全血を用いて on ice で反応させる間接蛍光抗体法 (Indirect immunofluorescence test; IF) を行った。NA 系3タイプとの反応性は Ortho Cytron Absolute (Ortho Diagnostic Systems Inc, Raritan, NJ) を用いて Flow-cytometry (FCM) で解析し, それぞれ目的の抗体を産生するハイブリドーマを得た。これらのクローンの限界希釈を3回行い, 安定な抗体産生細胞株3株を樹立した。NA1 抗原を認識する mAb 産生株を TAG1 (IgG₁, κ),

NA2 抗原を認識する mAb 産生株を TAG2 (IgG₁, κ), Fc γ RIII を認識する mAb 産生株を TAG3 (IgG₁, κ) と命名した。免疫グロブリンサブクラスの決定は, A mouse monoclonal isotyping kit (Amersham International plc, Buckinghamshire, UK) を用いた。

3) FITC-labeled TAG1, FITC-labeled TAG2, FITC-labeled TAG3 の作製

ハイブリドーマを BALB/c マウス (♂) の腹腔内に輸注して得た腹水または硫酸アンモニウムで沈殿して濃縮した培養上清を, Affi-Gel Protein A (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA) で精製し, Fluorescein-isothiocyanate (FITC) (Research Organics Inc, Cleveland OH) で標識した。精製抗体の濃縮および標識抗体の洗浄と濃縮には限外濾過器, セントリカット U-50 (Kurabo Industries Ltd, Osaka, Japan) を用いた。FITC-labeled TAG1 (titer, 1 : 64) は 4 倍希釈液を, FITC-labeled TAG2 (titer, 1 : 32) は 2 倍希釈液を, FITC-labeled TAG3 (titer, 1 : 64) は 4 倍希釈液を反応に用いた。

4) パネル好中球の DNA タイピング

PCR-SSCP法; Satoh らの方法³⁰⁾に準じて行った。NA プライマーは Simmonsら³³⁾による CD16 の cDNA シークエンス結果から宝酒造 (株) にて作製したものをを用いた。EDTA 採取した末梢血から DNA 抽出キット, Sepa Gene (Sanko Junyaku Co, Ltd, Tokyo, Japan) を用いて genomic DNA を抽出した。10 ng/ μ l 濃度の genomic DNA 5 μ l, dNTP mixture (each 2.5 mM dATP, dCTP, dTTP; Takara Shuzo Co, Ltd, Shiga, Japan) 5 μ l, 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) 5 μ l, 5 pmol/ μ l primer (5'AAG GCT GTG GTG TTC CTG GA 3') 5 μ l, 5 pmol/ μ l primer (5'ATG GAC TTC TAG CTG CAC CG 3') 5 μ l, Taq DNA polymerase (Roche Molecular Systems Inc, Branchburg, NJ) 5 μ l (1U), H₂O 20 μ l を混合した (全量 50 μ l)。PCR は 94 $^{\circ}$ C 2 分間, 65 $^{\circ}$ C 1 分間, 72 $^{\circ}$ C 1 分間を Thermal Sequencer TSR-300 (IWAKI Glass Co, Ltd, Chiba, Japan) を用いて30サイクルおこなった。PCR 産物 5 μ l に0.1% SDS 3 μ l と95% Formamide 6 μ l を加え, 95 $^{\circ}$ C 10分間加温し氷冷して single-strand DNA を得た。このサンプルを12% アクリルアミドゲル (Gel plate : 10 \times 10 \times 0.1 cm) 内で4 $^{\circ}$ C, 定電流 5 mA/1 plate の条件で16.5時間泳動させた。DNA フラグメントの bps マーカーには 100 bp DNA Ladder (Bio Labs, Beverly, MA) を用いた。泳動 buffer は, TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.3) を用いた。泳動終了後, DNA フラグメントを銀染色キット

(Daiichi Chemical Co, Ltd, Tokyo, Japan) で染色し, Fc γ RIIIA 遺伝子と Fc γ RIIIB 遺伝子を解析した。

PCR-SSP 法; Bux らの方法⁵⁾に準じて, 以下の様に行った。プライマーは宝酒造 (株) にて作製したものをを用いた。50 ng/ μ l の genomic DNA 5 μ l, dNTP mixture 5 μ l, 10 \times PCR buffer 5 μ l, 15 mM MgCl₂ 5 μ l, 5 pmol/ μ l NA1 primer (5'CAGTGGTTTCACAAATGT-GAA 3') 5 μ l, 1 pmol/ μ l NA2 primer (5'CAATG-GTACAGCGTGCTT 3') 5 μ l, 5 pmol/ μ l NA reverse primer (5'ATGGACTTCTAGCTGCAC 3') 5 μ l, 0.25 pmol/ μ l human growth hormone primers (internal positive control, HGH-I; 5'CAGTGCCTTCCCAAC-CATTCCCTTA3', HGH-II; ATCCACTCACGGATTCT-GTTGTGTTTC 3') 各 5 μ l, Taq DNA polymerase 5 μ l (2U) を混合した (全量 50 μ l)。PCR は95 $^{\circ}$ C 1 分間, 60 $^{\circ}$ C 1 分間, 72 $^{\circ}$ C 1 分間を Thermal Sequencer TSR-300 (IWAKI Glass Co, Ltd, Chiba, Japan) を用いて30サイクル行った。PCR 産物 7 μ l と0.5% BPB/XC-70% glycerol 溶液 (Bromphenol blue; Nakarai Tesque Inc, Kyoto, Japan, Xylene cyanole FF; Katayama chemical Co, Osaka, Japan) 3 μ l を混合し, 8% アクリルアミドゲル (Gel plate : 10 \times 10 \times 0.1cm) 内で4 $^{\circ}$ C, 定電圧 200 V の条件で2時間泳動させた。DNA フラグメントの bps マーカーには 100 bp DNA Ladder を用いた。泳動終了後, DNA フラグメントを Ethidium bromide で染色し, Luminometer で NA 遺伝子を解析した。

5) FCM による解析

細胞と抗体との反応はすべて on ice で行い, FCM による解析には Ortho Cytron Absolute を用いた。TAG1 (titer, 1 : 64) は 4 倍希釈液を, TAG2 (titer, 1 : 32) は 2 倍希釈液を, TAG3 (titer, 1 : 64) は 4 倍希釈液を反応に用いた。

好中球との反応性; 好中球の接着, 活性化, 抗体との非特異的反応を排除するために, すべての操作は低温で行った。反応 buffer と洗浄 buffer に用いた終濃度 0.1% bovine serum albumin, 終濃度 0.1% NaN₃ 含有 PBS (BSA-PBS) と Lysis buffer (NH₄Cl 8.26 g/liter, KHCO₃ 1.0 g/liter, EDTA-4Na 0.037 g/liter) も 4 $^{\circ}$ C に冷却したものをを用い, 抗体と好中球との反応もすべて on ice で行った。NA 系抗原についての反応性の検討には, NA1 認識 mAb, MG38 (Nichirei Co, Tokyo, Japan), NA2 認識 mAb, GRMI (Dr. Garrido, F., Granada University, Granada, Spain) および Fc γ RIII 認識 mAb, 3G8 (Pharmingen, San Diego, CA) で同定した表現型と, PCR-SSCP および PCR-SSP で同定した遺伝子型の一致した好中球をパネル好中球として用いた。これ

らのパネル好中球に対する TAG1, TAG2, TAG3 の反応性は IF による FCM で解析した。すなわち, 血液 50 μ l と培養上清 10 μ l を30分間反応させ, 溶血, 洗浄後, Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled rabbit F (ab')₂ anti-mouse IgG, A, M (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA) と30分間反応させた。洗浄後 BSA-PBS に浮遊させ, TAG1, TAG2, TAG3 と各型好中球との反応性を FCM で解析した。

また, 233人の健康成人ランダムドナーについて TAG1 と MG38, TAG2 と GRM1, TAG3 と 3G8 の反応性を IF による FCM で比較検討した。さらに TAG2 と GRM1 では NA1/NA1 好中球に対する反応性がやや異なっていたので, MAP buffy coat 770 検体について IF による FCM で詳しく比較検討した。反応の強さは蛍光強度 (Log fluorescence intensity, FI) で求め, その強さの比較はマウス IgG₁ アイソタイプコントロールを用いたときの FI に対する比較蛍光強度 (Relative fluorescence intensity, RFI) で示した。TAG2 と GRM1 の反応性の差は Wilcoxon の符号付順位検定で検定した。TAG2 の各型好中球との反応性の差は Wilcoxon 検定で検定した。検定の結果, 有意確率 5% 以下を有意差があると判定した。

各種血液細胞との反応性; NA 系 3 タイプ各 4 人と NA-null 1 人の末梢血血液細胞について調べた。BSA-PBS で洗浄した血液 100 μ l に Phycoerythrin (PE)-labeled Leu M3 (CD14) (Becton Dickinson Immunocytometry systems, San Jose, CA), PE-labeled OKB19A (CD19) (Ortho), PE-labeled 2H7 (CD20) (Pharmingen), PE-labeled OKT3 (CD3) (Ortho), または PE-labeled Leu19 (CD56) (Becton Dickinson) の 20 μ l をそれぞれ30分間反応させ, 溶血, 洗浄後 FITC-labeled TAG1, FITC-labeled TAG2 または FITC-labeled TAG3 の 20 μ l をそれぞれ反応させた。洗浄後, BSA-PBS に浮遊させ, FCM で解析した。赤血球, 血小板, 50 μ g/ml PHA, 50 μ g/ml Con A, 50 μ g/ml PWM (Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan) でそれぞれ CO₂ インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で72時間培養した活性化末梢血単核球および各種ヒト由来培養細胞株 (Japanese Cancer Research Resources Bank, Tokyo, Japan) は, FITC-labeled TAG1, FITC-labeled TAG2 または FITC-labeled TAG3 とそれぞれ30分間反応させ, 洗浄後 BSA-PBS に浮遊させ, FCM で解析した。

Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) 処理好中球との反応性; Fc γ RIIIb は Glycosylphosphatidylinositol (GPI) 結合型のレセプターである

ので, 好中球を PI-PLC で処理して TAG1, TAG2, TAG3 との反応性が減弱するか検討した。2 \times 10⁶個/ml の NA1/NA2 好中球を 1 U/ml PI-PLC (Toagosei Co, Ltd, Tokyo, Japan) と等量混合し, 37°C 15分間反応させた。洗浄後, PI-PLC 処理好中球に FITC-labeled TAG1, FITC-labeled TAG2 または FITC-labeled TAG3 の 10 μ l を30分間それぞれ反応させた。洗浄後, FCM で解析, PI-PLC に代えて PBS で前処理したコントロール好中球との反応性と比較した。

Fc γ RIIIb (CD16) 関連の mAb による抑制試験; 他の mAb が認識するエピトープとの関係を検討するために, Fc γ RIIIb 関連の他の mAb による抑制試験を行った。NA1/NA1 または NA2/NA2 タイプの血液 50 μ l とマウス IgG₁ アイソタイプコントロール, TAG1, MG38, TAG2, GRM1, TAG3, 3G8 の 10 μ l をそれぞれ30分間反応させた。溶血, 洗浄後, 各 mAb で前処理した細胞に FITC-labeled TAG1, FITC-labeled TAG2 または FITC-labeled TAG3 の 10 μ l を30分間反応させた。洗浄後, BSA-PBS に浮遊させ FCM で解析し, マウス IgG₁ アイソタイプコントロールによる前処理をした場合と比較した。反応の強さは蛍光強度, FI で求め, その強さの比較はマウス IgG₁ アイソタイプコントロールを用いたときの FI に対する比較蛍光強度, RFI で示した。

6) 蛍光顕微鏡による好中球との反応性の解析

FCM の解析で行ったと同様に, NA 系各型好中球とマウス IgG₁ アイソタイプコントロール, TAG1, TAG2, TAG3 をそれぞれ反応させ, 蛍光顕微鏡で観察した。

7) 血清抗体の mAb による抑制試験

スクリーニングで好中球抗体陽性と判定された血清について mAb による抑制試験 (Inhibition test with monoclonal antibody, ITMA) を行い, 血清抗体の特異性が推測できるか検討した。NA1/NA2 タイプの血液 50 μ l とマウス IgG₁ アイソタイプコントロール, TAG1, MG38, TAG2, GRM1, TAG3, 3G8 の 10 μ l をそれぞれ混合, 30分間反応させた。洗浄後, 血清 25 μ l と混合し, 30分間反応させた。溶血, 洗浄後, FITC-labeled antihuman IgG, A, M (Zymed) と30分間反応させた。洗浄後, BSA-PBS に浮遊させ FCM で解析し, マウス IgG₁ アイソタイプコントロールによる前処理をした場合と比較した。反応の強さは蛍光強度, FI で求め, その強さの比較はマウス IgG₁ アイソタイプコントロールを用いたときの FI に対する比較蛍光強度, RFI で表した。

結 果

1) NA系抗原の遺伝子型

血清学的に同定されたNA系3タイプのパネル好中球とNA-null好中球のPCR-SSCP法の結果をFig. 1に示す。SSCP法を用いることにより、FcγRIIIA, NA1とNA2の移動度の差が明らかであり、NA-nullも明瞭に識別することができた。NA-nullと考えられた例は、IFでMG38, GRM1, 3G8, Leu11a (CD16) (Becton Dickinson), Leu11b (CD16) (Becton Dickinson), Leu11c (CD16) (Becton Dickinson), CD16 mAb (Ortho)のすべての抗体に全く反応しなかった。PCR-SSCP法でNK細胞のFcγRIIIAのバンドは正常な位置に検出されたが、NA1, NA2のバンドは同定できなかったことより、FcγRIIIB遺伝子の欠損によるFcγRIIIB欠損例であると考えられた。また本例は、PCR-SSP法においてもNA1およびNA2のバンドは検出さ

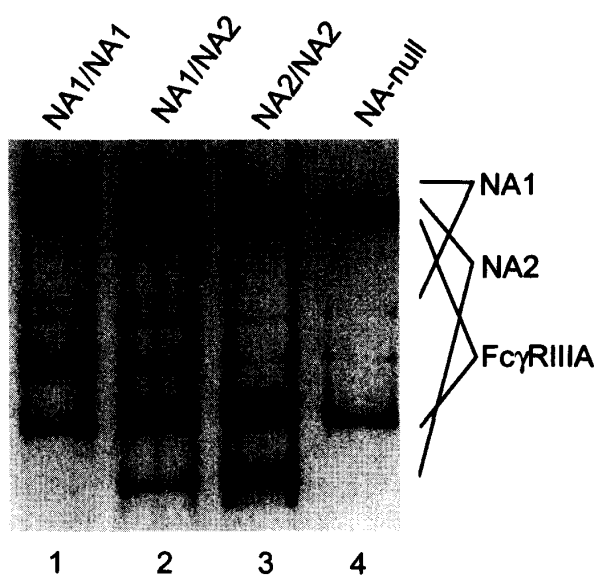


Fig. 1. The PCR-SSCP analysis of FcγRIII. Each lane shows the SSCP pattern of heat-denatured PCR products. Lane 1, NA1/NA1 donor; lane 2, NA1/NA2 donor; lane 3, NA2/NA2 donor; lane 4, NA-null donor.

れなかったのでNA-nullと同定された (Fig. 2)。

2) TAG1, TAG2, TAG3 と好中球との反応性

TAG1, TAG2, TAG3 と NA系3タイプおよびNA-null好中球とのIFによるFCMでの反応性をFig. 3に示した。アイソタイプコントロールのマウスIgG1と比べてTAG1はNA1陽性好中球とは強く反応したが、NA2/NA2好中球とは反応しなかった。TAG2はNA2陽性好中球とは強く反応し、かつNA1/NA1好中球とは弱い反応が認められた。TAG3は3タイプの好中球すべてと同程度に反応した。これらのmAbは、いずれもNA-null好中球とは全く反応しなかった。TAG1, TAG2, TAG3 と NA系3タイプおよびNA-null好中球とのIFによる蛍光顕微鏡像で示された反応性をFig. 4に示した。FCMでの解析と同様、TAG1はNA1陽性好中球に、TAG2はNA2陽性好中球に、TAG3はNA-null以外のすべての好中球と反応したことが観察された。FCMにおけるNA1/NA1好中球に対する

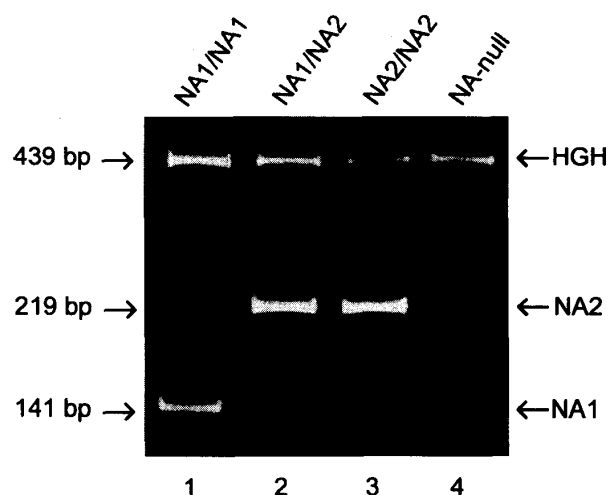


Fig. 2. The PCR-SSP analysis of FcγRIIIB. Amplified NA1 and NA2 bands are 141 bp and 219 bp, respectively. The band of 439 bp is internal control, human growth hormone primers (HGH). Lane 1, NA1/NA1 donor; lane 2, NA1/NA2 donor; lane 3, NA2/NA2 donor; lane 4, NA-null donor.

Table 1. Reactivity of TAG1, TAG2 and TAG3 with neutrophils

		MG38		GRM1		3G8					
		positive	negative	positive	negative	positive	negative				
TAG1	positive	201	0	TAG2	positive	159	0	TAG3	positive	232	0
	negative	0	32		negative	0	74		negative	0	1

Data represent the number of subjects examined. Reactivity was assessed by the indirect immunofluorescence test.

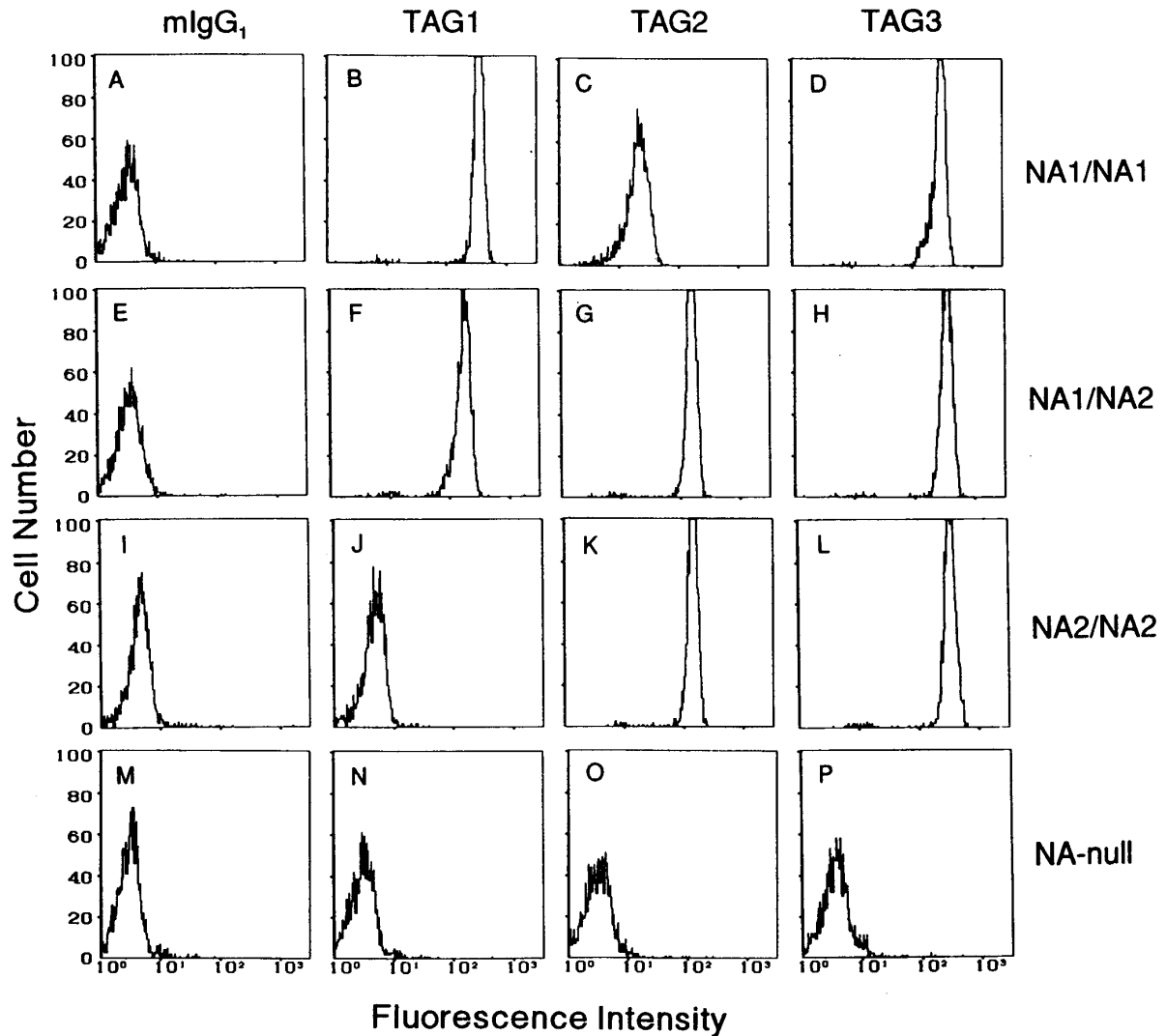


Fig. 3. The reactivity of TAG1, TAG2 and TAG3 with neutrophils.

The reactivities were analyzed by flow cytometry. A through D, NA1/NA1 donor; E through H, NA1/NA2 donor; I through L, NA2/NA2 donor; M through P, NA-null donor. A, E, I and M shows the reactivity of mouse IgG₁ as isotype control.

TAG2 の弱い反応は、蛍光顕微鏡では非常に弱い蛍光で観察された。

すでに利用されている MG38, GRM1, 3G8 との反応性の比較を Table 1 に示した。233人の健常成人ランダムドナーの好中球に対して、TAG1 と MG38, TAG2 と GRM1, TAG3 と 3G8 の反応性を、IF による FCM で比較したが、NA1, NA2, Fc γ RIIIb を認識する点ではそれぞれの抗体は全く同様の反応性を示した。しかし TAG2 と GRM1 では NA1/NA1 好中球に対して反応の強さが異なり、性質が異なることが示唆された。このことを詳しく検討するために、さらに770検体について TAG2 と GRM1 の反応性を比較した (Table 2)。NA2/NA2 好中球と NA1/NA2 好中球に対する反応の蛍

Table 2. Reactivity of TAG2 and GRM1 with neutrophils

NA type	Number	Relative fluorescence intensity		
		mIgG ₁	TAG2	GRM1
NA2/NA2	94	1.0	15.6 \pm 7.3	21.9 \pm 14.4
NA1/NA2	435	1.0	15.8 \pm 8.3	21.4 \pm 15.1
NA1/NA1	241	1.0	2.1 \pm 1.4	1.1 \pm 0.2

Data represent the mean \pm S.D. of the relative fluorescence intensity.

mIgG₁, isotype control (mouse IgG₁).

光強度は GRM1 のほうが TAG2 よりも強い反応性を示したが (NA2/NA2; $p < 0.001$, NA1/NA2; $p < 0.001$), TAG2 の NA2/NA2 好中球または NA1/NA2 好中球と

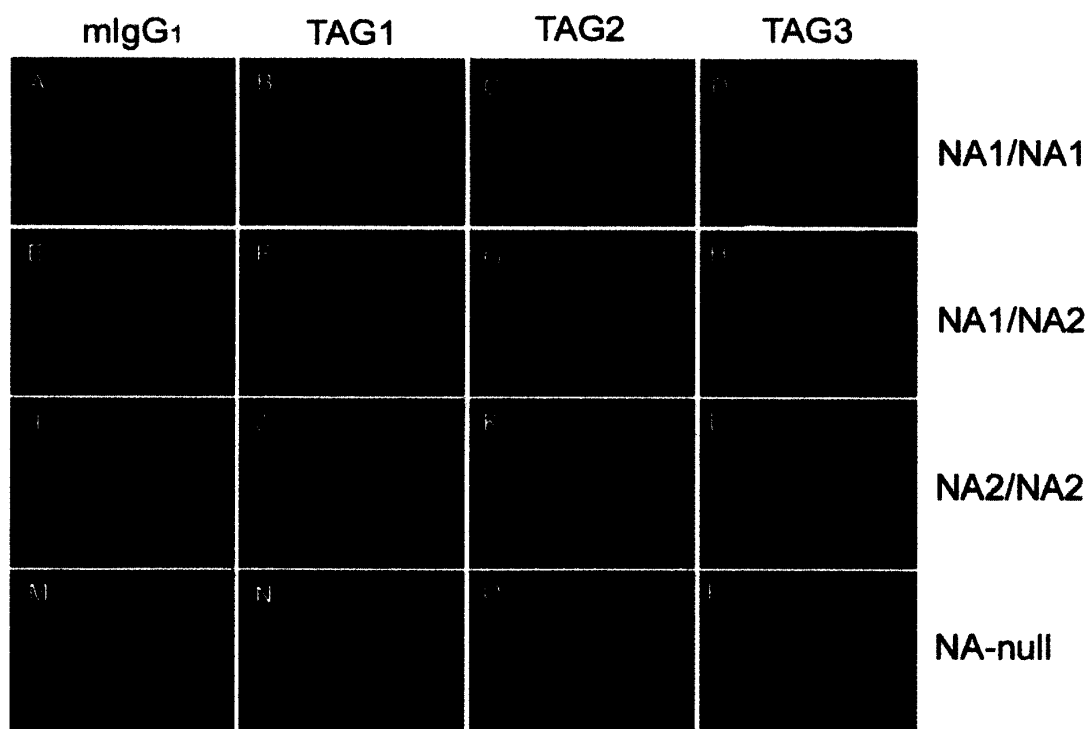


Fig. 4. The reactivity of TAG1, TAG2 and TAG3 with neutrophils.

The reactivities were analyzed by the indirect immunofluorescence test using the fluorescent microscope. A through D, NA1/NA1 donor; E through H, NA1/NA2 donor; I through L, NA2/NA2 donor; M through P, NA-null donor. A, E, I and M shows the reactivity of mouse IgG₁ as isotype control.

Table 3. Reactivity of TAG1, TAG2 and TAG3 with blood cells

Cells	mIgG ₁	TAG1	TAG2	TAG3
Red blood cells ¹⁾	—	—	—	—
Platelets ¹⁾	—	—	—	—
CD14 ⁺ MNC ²⁾	—	—	+	+
CD19 ⁺ MNC ²⁾	—	—	—	—
CD20 ⁺ MNC ²⁾	—	—	—	—
CD3 ⁺ MNC ²⁾	—	—	—	—
CD56 ⁺ MNC ²⁾	—	—	++	++
PHA activated MNC ¹⁾	—	—	—	—
Con A activated MNC ¹⁾	—	—	—	—
PWM activated MNC ¹⁾	—	—	—	—

Reactivity was assayed by the immunofluorescence test using the single¹⁾ or two-color²⁾ flow cytometry designated by CD antigens. mIgG₁, isotype control (mouse IgG₁). (—) less than 5 %, (+), 7 to 20%, (++) 69 to 96% positive cells.

Table 4. Cell lines tested with TAG1, TAG2 and TAG3

Cell Type	Cell Line
B lymphoid	Raji
	Daudi
	RPMI 1788
	RPMI 8226
	KMS-12-BM
	KMS-12-PE
T lymphoid	Molt 3
	RPMI 8402
	CCRF-CEM
	Jurkut
	PEER
Erythroid	HEL
Myeloid/Erythroid	K562
Myeloid	KG-1
	ML-1
	P39/TSU
	KU812
	HL60
Monoblastoid	U937

These cell lines were provided by Japanese Cancer Research Resources Bank.

NA1/NA1 好中球との反応による蛍光強度の差は明らかであった ($p < 0.001$, $p < 0.001$)。しかし, TAG2 と GRM1 の NA1/NA1 好中球に対する反応性では, 逆に TAG2 の蛍光強度は GRM1 より強く, 反応の蛍光強度は有意に異なっていた ($p < 0.001$)。

3) 好中球以外の血液細胞, ヒト由来培養細胞株との反応性

TAG1 はすべてのドナーの正常人末梢血血球 (赤血球, 血小板, CD14 陽性細胞, CD19 陽性細胞, CD20 陽性細胞, CD3 陽性細胞, CD56 陽性細胞) および PWM, PHA, Con A で活性化した末梢血単核球とは反応しなかった。TAG2, TAG3 は, すべてのドナーの CD14 陽性細胞の一部と CD56 陽性細胞の多くに反応したが, 他の細胞とは反応しなかった (Table 3)。Table 4 に示した B lymphoid, T lymphoid, erythroid, myeloid, monoblastoid のヒト由来培養細胞株 に対して TAG1, TAG2, TAG3 は全く反応しなかった。

4) PI-PLC 処理好中球との反応性

Fig. 5 に示す様に, NA1/NA2 好中球を PI-PLC で前処理すると, TAG1, TAG2, TAG3 ともにその反応性は著明に減弱した。

5) TAG1, TAG2, TAG3 の $Fc\gamma RIIIb$ 関連 MoAb による抑制試験

$Fc\gamma RIII$ 関連 mAb の前処理による FITC-labeled TAG1, FITC-labeled TAG2, FITC-labeled TAG3 の反応性の結果を Table 5 に示した。FITC-labeled TAG1 は NA1/NA1 好中球において NA1 認識 mAb, MG38 で完全に反応が抑制された。FITC-labeled TAG2 の反応は NA2/NA2 好中球で NA2 認識 mAb, GRM1 の結合で強く抑制された。また FITC-labeled TAG1 と FITC-labeled TAG2 の反応は, $Fc\gamma RIII$ 認識 mAb, TAG3 と 3G8 の結合でも抑制がみられた。FITC-labeled TAG3 の反応は $Fc\gamma RIII$ 認識 mAb, 3G8 の結合で強く抑制された。

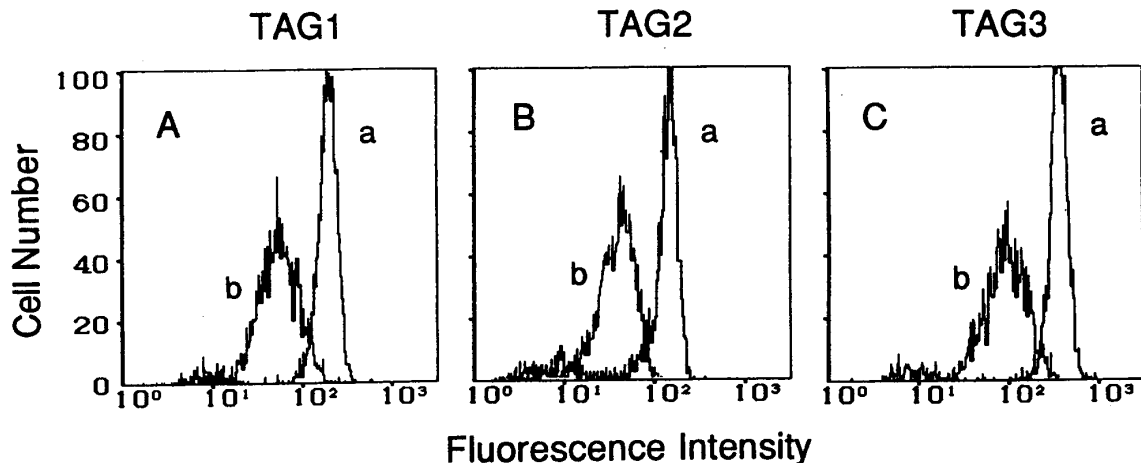


Fig. 5. Effect of the treatment with phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) on the reactivity of TAG1, TAG2 and TAG3. NA1/NA2 neutrophils were treated with PBS (a) or PI-PLC (b) for 15 min at 37°C. After washing twice in PBS, cells were stained with FITC-labeled TAG1 (A), FITC-labeled TAG2 (B) or FITC-labeled TAG3 (C).

Table 5. Effect of monoclonal antibodies on the reactivity of TAG1, TAG2 and TAG3

		mIgG ₁	NA1 mAb		NA2 mAb		Fc γ RIII mAb	
			TAG1	MG38	TAG2	GRM1	TAG3	3G8
FITC-TAG1	NA1/NA1	1.0	0.27	0.2	0.83	0.86	0.19	0.68
	NA2/NA2	1.0	0.90	0.92	0.89	0.92	0.88	1.04
FITC-TAG2	NA1/NA1	1.0	0.45	0.51	0.78	0.71	0.48	0.47
	NA2/NA2	1.0	0.89	0.94	0.27	0.24	0.44	0.54
FITC-TAG3	NA1/NA1	1.0	0.24	0.18	0.77	0.69	0.19	0.22
	NA2/NA2	1.0	0.82	0.89	0.64	0.71	0.2	0.27

Data represent the relative fluorescence intensity. mIgG₁, isotype control (mouse IgG₁).

Table 6. The results of ITMA on the reactivity of sera

Test serum	Specificity	mIgG ₁	NA1 mAb		NA2 mAb		Fc γ RIII mAb	
			TAG1	MG38	TAG2	GRM1	TAG3	3G8
1 T. Y.	NA1	1.0	0.61	0.27	0.88	0.61	0.85	1.08
2 R. S.	NA2	1.0	1.03	0.94	0.25	1.21	0.75	NT
3 M. S.	NA1, broad	1.0	0.31	0.94	0.33	1.46	0.44	0.10
4 A. Y.	NA1, broad	1.0	1.15	0.94	0.50	0.90	0.42	0.39
5 M. O.	NA2, broad	1.0	0.63	0.59	0.42	0.48	0.59	0.68
6 N. H.	NA2, broad	1.0	0.83	0.88	1.18	0.26	0.18	0.39
7 M. K.	broad	1.0	0.75	1.16	1.15	1.25	0.99	0.32
8 S. T.	broad	1.0	0.68	0.59	0.59	0.77	0.32	NT
9 T. N.	broad	1.0	2.55	0.55	1.38	0.61	0.28	0.27
10 A. T.	broad	1.0	0.73	0.84	0.62	1.02	0.47	0.73

Data represent the relative fluorescence intensity. mIgG₁, isotype control (mouse IgG₁). NT, not tested.

6) 血清抗体の mAb による抑制試験 (Inhibition test with monoclonal antibody, ITMA)

好中球減少症と診断され、かつ抗体スクリーニングで好中球抗体陽性と判定された患者血清10検体について行った ITMA の結果を Table 6 に示した。RFI 0.5 以下を完全に抑制されたと判定した。

No.1; 抗体スクリーニングで特異性が NA1 と同定された。ITMA においても NA1 mAb の MG38 で強く抑制され、NA1 抗体の存在が示唆された。

No.2; 抗体スクリーニングで特異性が NA2 と同定された。ITMA においても NA2 mAb の TAG2 で強く抑制され、NA2 抗体の存在が示唆された。

No.3; 抗体スクリーニングで NA 系3タイプのいずれにも反応するが、NA1 陽性好中球に強い反応がみられたため、特異性が NA1, broad と判定された。ITMA では TAG1, TAG2, TAG3, 3G8 で強く抑制され、NA1 抗体、NA2 抗体および Fc γ RIIIb 抗体の存在が示唆された。

No.4; 抗体スクリーニングで NA 系3タイプのいずれにも反応するが、NA1 陽性好中球に強い反応がみられたため、特異性が NA1, broad と判定された。ITMA では TAG2, TAG3, 3G8 で抑制されたが NA1 mAb では全く抑制されなかった。TAG2 による抑制は弱かったので、この NA1 抗体は、NA1 抗原に弱く反応する TAG2 で抑制される性質の NA1 抗体であるか Fc γ RIIIb 抗体の可能性が推測された。

No.5; 抗体スクリーニングで NA 系3タイプのいずれにも反応するが、NA2 陽性好中球に強い反応がみられたため、特異性が NA2, broad と判定された。ITMA では TAG2 と GRM1 で強く抑制され、NA2 抗体の存在が示唆された。患者は NA1/NA2 で自己免疫性の好中球減少症であった。

No.6; スクリーニングで NA 系3タイプのいずれにも反応するが、NA2 陽性好中球に強い反応がみられたため、特異性が NA2, broad と判定された。ITMA では GRM1, TAG3, 3G8 で強く抑制され、NA2 抗体、Fc γ RIIIb 抗体の存在が示唆された。患者は母親が NA-null で、新生児同種抗体による一過性の好中球減少を示した例であった。

No.7-10; スクリーニングで broad な反応性を示した。ITMA では TAG3 と 3G8 の両 mAb またはいずれかの mAb で抑制され、Fc γ RIIIb 抗体の存在が示唆された。No.7 の患者は母親が NA-null で、新生児同種抗体による一過性の好中球減少を示した例であった。

考 察

免疫機序に基づいた血球減少症は赤血球系、血小板系、好中球系ともに単独あるいは複合して認められている。そのほとんどが自己抗体や同種抗体によるものであるが、病態となる対応抗原の同定は必ずしも容易ではない。血球間で共通の抗原を発現していると同時にそれぞれの血球で特異抗原を有していること、また、血球の分化段階で発現されてくる抗原があまりにも多様であることがその原因と思われる。小児期の自己免疫性好中球減少症や新生児の同種免疫性好中球減少症も临床上しばしば認められる疾患であり、対応抗原を明らかにしていくことは病態を解明していく上で重要である。

血清抗体の検出法には Granulocyte cytotoxicity Test (GCT)⁷⁾, Granulocyte indirect immunofluorescence test (GIFT)⁴¹⁾, Micro-leukocyte agglutination test (M-LAT)^{16,21)}, Mixed passive hemagglutination test (MPHA)²⁴⁾, Monoclonal antibody immobilization of

granulocytes antigen assay (MAIGA)³⁾などが利用されているが、対応抗原を明らかにするには抗原既知のパネル好中球が必要である。パネル好中球には DNA タイピングによる遺伝子型と血清学的方法による表現型が一致した好中球が用いられなければならない、表現型の決定には特異抗体が必要となる。しかし現在まで好中球特異抗原に対するモノクローナル抗体はほとんど市販されていない。日常検査において一般的に使用できるものが限られているため、抗原特異性のある血清抗体などを利用して、その表現型を同定してきた。しかし、血清抗体では共存する他の抗体により明瞭な判定結果が得にくいこと、一定の反応性をもつ血清抗体の恒久的使用は不可能であるなどの問題点がある。そこで今回、好中球特異抗原の代表である NA 系抗原および $Fc\gamma$ RIIIb を認識する mAb の作製を試み、NA1 認識 mAb, TAG1, NA2 認識 mAb, TAG2, $Fc\gamma$ RIIIb 認識 mAb, TAG3 を作製した。

好中球との反応性の検討からは、 $Fc\gamma$ RIII b 欠損の NA-null には反応しなかったことより、TAG1, TAG2, TAG3 は $Fc\gamma$ RIIIb 上の抗原と結合すると考えられた。TAG2 と NA1/NA1 好中球が FCM では弱く反応していたが、蛍光顕微鏡では非常に弱い蛍光であることを確認した。サイトロンではこのような非常に弱い蛍光でも鋭敏にとらえたため、コントロールよりもやや強いヒストグラムを示したものと考えられた。以上の結果から、TAG1 は NA1 抗原を認識し、TAG2 は主に NA2 抗原を認識し、TAG3 は $Fc\gamma$ RIII を認識すると考えられた。しかし TAG1, TAG2 と NA 系各型好中球との反応性を既存の mAb と比較すると、異なる性質がみられた。すでに報告したとおり、TAG1 は MG38 と同じく NA1 抗原を特異的に認識し、IF での NA1 抗原同定には全く差はみられないが可溶性抗原に対する反応性に差があることより、その性質は異なるものと考えられた³⁷⁾。TAG2 は NA2 抗原を強く認識するとともに、NA1 抗原も弱いながら認識すると推測され、NA2 特異的 mAb とは言えない。しかし NA2 陽性好中球と NA1/NA1 好中球との反応性には著明な差が認められ、NA2 抗原と NA1 抗原を明瞭に識別できた。TAG2 は GRM1 とは全く反応性の異なる NA2 認識 mAb であると考えられた³⁹⁾。TAG2 と TAG3 は CD14 陽性細胞の一部と CD56 陽性細胞の多くにも反応した。 $Fc\gamma$ RIIIa は NA2 タイプを示すことが知られており²⁸⁾、TAG2 は $Fc\gamma$ RIIIa の NA2 抗原に、TAG3 は $Fc\gamma$ RIIIa と $Fc\gamma$ RIIIb の共通抗原に反応したものと推測された。また、NA 系抗原は GPI で細胞膜に結合している $Fc\gamma$ RIIIb 上にあり^{11,14)}、成熟好中球に発現する

⁴²⁾ことが報告されている。好中球を PI-PLC で前処理すると、TAG1, TAG2, TAG3 とともにその反応性は著明に減弱し、PI-PLC 処理による GPI 結合型 $Fc\gamma$ RIIIb 量の減少がこれらの抗体の反応性の減弱をもたらしたものと推測された。

$Fc\gamma$ RIII関連のmAbによる抑制試験で、TAG1はMG38に、TAG2はGRM1に、TAG3は3G8に強く抑制され、それぞれ同じ抗原を認識すると考えられた。またTAG1とTAG2の反応は、 $Fc\gamma$ RIII 認識 mAb, TAG3と3G8の結合でも抑制がみられた。TAG1とTAG2は $Fc\gamma$ RIIIb上の抗原を認識していることが示唆され、広く $Fc\gamma$ RIIIbを認識する抗体によって反応が抑制されたものと思われた。また、TAG3と3G8では異なる性質が認められた。3G8はTAG3の反応を強く抑制し、NA2認識mAb, TAG2の反応も弱いながら抑制した。しかしTAG1に対する反応抑制はTAG3でのみ認められ、3G8はTAG1の反応を全く抑制しなかった。TAG3をTAG1の反応抑制に用いた場合も強い抑制が認められ、TAG1とTAG3は、特異性が異なるにもかかわらず互いに干渉しあうものと考えられた。血清抗体の抑制試験でも、 $Fc\gamma$ RIII抗体の可能性のある血清抗体に対する抑制性がTAG3と3G8では異なっていた。両mAbで強く抑制される場合といずれかのmAbでのみ抑制される場合があった。これらの結果からTAG3は3G8とは異なる性質をもった抗体であると推測された。

以上より、今回作製したTAG1, TAG2, TAG3は既存のNA1認識mAb, MG38, NA2認識mAb, GRM1, $Fc\gamma$ RIII認識mAb, 3G8とは異なる反応性を持ったmAbであると考えられた。データには示していないが、認識抗原を明らかにする目的で可溶性好中球細胞膜に対する免疫沈降法およびイムノプロット法を試みたが、抗体の特異性を明らかな差として認めることが出来なかった。NA1とNA2が5塩基対の差でコードされてくる蛋白であり、アミノ酸組成も4種類の差しか認められないことに起因しているものと推測された。TAG2とGRM1の反応性は明らかに異なっていたものの、両抗体の認識抗原の差を明らかにすることは出来なかった。

mAbで前処理した好中球と血清抗体を反応させた場合、mAbと血清抗体の結合抗原が同じであれば、その血清抗体の反応は減弱すると考えられる。このことを応用して、スクリーニングで好中球抗体陽性と判定された血清についてmAbによる抑制試験(ITMA)を行い、血清抗体の特異性が推測できるか検討した。作製したmAbと既存のmAbを用いて血清抗体の抑

制試験を行うと、IF による抗体スクリーニングだけでは特異性の分かりにくかった血清抗体の特異性を推測することが可能であった。mAb と血清抗体の抗原特異性が同じであっても、常に mAb の両方で抑制されるとは限らず、しばしば一方でのみ抑制がみられたことは、TAG1 と MG38, TAG2 と GRM1, TAG3 と 3G8 がそれぞれ反応性が異なることが ITMA においても示唆され、さらに血清抗体にも抗原特異性が同一であっても反応性が異なるものが存在することを示唆するものと考えられた。また、抗体スクリーニングで broad な反応性を示したものは特異性を決定することができないが、抑制試験を併用することで特異性の推測が可能であった。以上のように患者血清抗体の特異性を抗原既知好中球との反応性と ITMA を併用することにより、より詳細に同定することが可能であると考えられた。

Stroncek ら³⁶⁾は NB1 抗原を認識する 2 つの mAb について、NB1 血清抗体を用いて抑制試験を行い、結合エピトープの違いを詳細に検討した。同一抗原を認識する mAb でも結合エピトープが異なれば、血清抗体の抑制率に大きな差がみられることを示した。ITMA では mAb と血清抗体の結合エピトープが同じものほど抑制が強くおこり検出感度は高まるが、MAIGA では mAb でとらえた抗原に血清抗体を反応させ、酵素標識抗ヒト IgG で血清抗体の特異性を検出するため、mAb と血清抗体の結合エピトープが異なる方が検出感度は高まる³⁶⁾。TAG1, TAG2, TAG3 は、既存の mAb とは結合エピトープが異なると考えられ、MAIGA や ITMA などの検査法においては特に有用な抗体であると思われる。また各種検査法においては、反応性の異なる複数のモノクローナル抗体をパネル抗体として用いることも、反応結果から血清の反応特異性を検討する際に重要である。今後も多くの mAb が作製され、それらを用いた各種検査法の検討と、より特異性の高い検査法の開発が望まれる。

好中球 Fc γ RIIIb を介する好中球機能はよく知られているが^{1,13)}、NA1 抗原、NA2 抗原の好中球機能上の意義は不明である。好中球抗原の意義を明らかにすることや、免疫機序による好中球減少症で産生された好中球抗体の好中球機能に与える影響と好中球減少に至る機序を明らかにすることは重要であると思われる。種々の mAb を用いて好中球機能への影響をみることにより、好中球抗原の意義を明らかに出来る可能性が考えられる。Fc γ RIII を認識する mAb には種々のものが使用されているが、好中球機能に与える影響は mAb によって異なっていることが報告されている¹⁵⁾。

Fc γ RIII そのものが複雑な構造をもち、その一部である NA 系抗原もその多様性や、機能との関係も複雑な可能性が推測される。従って、種々の mAb を用いて検討することが大切であると考えられる。

既存の mAb とは異なったエピトープを認識すると考えられる TAG1, TAG2, TAG3 は、各種検査法で有用な抗体であるとともに、NA 系抗原と Fc γ RIII の分析と意義の検討を含め、今後の研究に意義深い抗体であると思われる。

謝 辞

稿を終わるにあたり、懇切なるご教授を賜った広島大学医学部小児科学・上田一博教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に対し終始、適切なるご指導、ご教授を賜りました広島大学教育学部幼児保健学・小林正夫教授に心より深謝いたします。さらに本研究にご協力、ご援助を賜りました呉大学看護学部看護学科・岡田浩佑教授、広島大学医学部附属病院輸血部・平岡朝子技師、谷廣ミサエ技師、高田昇助教授、臨床検査部・沖崇太郎技師に深く感謝致します。また、GRM1 の使用を御許可頂いた Granada University の Dr, Federico Garrido と、MAP buffy coat の供給にご協力頂いた広島県赤十字血液センターに深く感謝致します。

尚、本論文の要旨は一部、日本輸血学会雑誌第44巻第3号、第45巻第5号、第42回、第45回、第46回日本輸血学会総会、第24回国際輸血学会において発表した。

参 考 文 献

1. Bux, J., Dickmann, J. O., Stockert, U. and Mueller-Eckhardt, C. 1993. Influence of granulocyte antibodies on granulocyte function. *Vox Sang.* 64 : 220-225.
2. Bux, J., Hartmann, C. and Mueller-Eckhardt, C. 1994. Alloimmune neonatal neutropenia resulting from immunization to a high-frequency antigen on the granulocyte Fc γ receptor III. *Transfusion* 34 : 608-611.
3. Bux, J., Kober, B., Kiefel, V. and Mueller-Eckhardt, C. 1993. Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. *Transfus. Med.* 3 : 157-162.
4. Bux, J., Stein, E. L., Bierling, P., Fromont, P., Clay, M., Stroncek, D. and Santoso, S. 1997. Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc γ receptor IIIb. *Blood* 89 :

- 1027-1034.
5. **Bux, J., Stein, E. L., Santoso, S. and Mueller-Eckhardt, C.** 1995. NA gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion* **35** : 54-57.
 6. **De Haas, M., Kleijer, M., van Zwieten, R., Roos, D. and von dem Borne, A. E. G. Kr.** 1995. Neutrophil Fc γ RIIIb deficiency, nature and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. *Blood* **86** : 2403-2413.
 7. **Drew, S. I., Carter, B. M., Guidera, D., Lee, K. E., Sasaki, M., Terasaki, P. I. and Gale, R. P.** 1979. Further aspects of microgranulocytotoxicity. *Transfusion* **19** : 434-443.
 8. **Galfre, G., Howe, S. C., Milstein, C., Butcher, G. W. and Howard, J. C.** 1997. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* **266** : 550-552.
 9. **Gillett, E. A.** 1995. Abnormal neutrophil phenotype and neutrophil FcRIII deficiency corrected by bone marrow transplantation. *Transfusion* **35** : 874-878.
 10. **Hessner, M. J., Curtis, B. R., Endean, D. J. and Aster, R. H.** 1996. Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion* **36** : 895-899.
 11. **Huizinga, T. W. J., Kleijer, M., Tetteroo, P. A. T., Roos, D. and von dem Borne, A. E. G. Kr.** 1990. Biallelic neutrophil Na-antigen system is associated with a polymorphism on the phosphoinositol-linked Fc γ receptor III (CD16). *Blood* **75** : 213-217.
 12. **Huizinga, T. W. J., Kuijpers, R. W. A. M., Kleijer, M., Schulpen, T. W. J., Cuypers, H. T. M., Roos, D. and von dem Borne, A. E. G. Kr.** 1990. Maternal genomic neutrophil FcRIII deficiency leading to neonatal isoimmune neutropenia. *Blood* **76** : 1927-1932.
 13. **Huizinga, T. W. J., Roos, D. and von dem Borne, A. E. G. Kr.** 1990. Neutrophil Fc γ receptors: A two-way bridge in the immune system (review). *Blood* **75** : 1211-1214.
 14. **Huizinga, T. W. J., van der Schoot, C. E., Jost, C., Klaassen, R., Kleijer, M., von dem Borne, A. E. G. Kr., Roos, D. and Tetteroo, P. A. T.** 1988. The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature* **333** : 667-669.
 15. **Kimberly, R. P., Ahlstrom, J. W., Click, M. E. and Edberg, J. C.** 1990. The glycosyl phosphatidylinositol-linked Fc γ RIIIPMN mediates transmembrane signaling events distinct from Fc γ RII. *J. Exp. Med.* **171** : 1239-1255.
 16. **Kobayashi, M., Yumiba, C., Satoh, T., Maruko, T., Kishi, T., Kawaguchi, Y., Tanaka, Y., Ueda, K., Komazawa, Y., Kaneda, M., Tanihiro, M. and Okada, K.** 1989. Autoimmune neutropenia in infancy due to anti-NA1 antibody: detection of antibody with immunofluorescence and agglutination test. *Pediatr. Res.* **26** : 246-249.
 17. **Koene, H. R., Kleijer, M., Roos, D., De Haas, M. and von dem Borne, A. E. G. Kr.** 1998. Fc γ RIIIB gene duplication: Evidence for presence and expression of three distinct Fc γ RIIIB genes in NA (1+, 2+) SH (+) individuals. *Blood* **91** : 673-679.
 18. **Lalezari, P., Jiang, A. F., Yegen, L. and Santorineou, M.** 1975. Chronic autoimmune neutropenia due to anti-NA2 antibody. *The New England J. Med.* **293** : 744-747.
 19. **Littlefield, J. W.** 1964. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* **145** : 709-710.
 20. **Metcalfe, P. and Waters, A. H.** 1992. Location of the granulocyte-specific antigen LAN on the Fc-receptor III. *Transfus. Med.* **2** : 283-287.
 21. **McCullough, J., Clay, M. E., Priest, J. R., Jensen, N. J., Lau, S., Noreen, H. J., Krivit, W. and Lalezari, P.** 1981. A comparison of methods for detecting leukocyte antibodies in autoimmune neutropenia. *Transfusion* **21** : 483-492.
 22. **Minchinton, R. M., de Haas, M., von dem Borne, A. E. G. Kr., Kleijer, M., Roberts, A. W., Stroncek, D. F., Skubitz, K. M., Plachta, L. B., Shankar, R. A., Clay, M. E., Herman, J., Fleit, H. B. and McCullough, J.** 1991. Alloimmune neonatal neutropenia due to an antibody to the neutrophil Fc γ receptor III with maternal deficiency of CD16 antigen. *Blood* **77** : 1572-1580.
 23. **Nordhagen, R., Conradi, M. and Dromtorp, S. M.** 1986. Pulmonary reaction associated with transfusion of plasma containing anti-5b. *Vox Sang.* **51** : 102-107.
 24. **Ohto, H., Maeda, H., Shibata, Y., Chen, R. F., Ozaki, Y., Higashihara, M., Takeuchi, A. and Tohyama, H.** 1985. A novel leukocyte differentiation antigen: two monoclonal antibodies TM2 and TM3 define a 120-kd molecule present on neutrophils, monocytes, platelets, and activated lymphoblasts. *Blood* **66** : 873-881.
 25. **Ory, P. A., Clark, M. R., Kwoh, E. E., Clarkson, S. B. and Goldstein, I. M.** 1989. Sequences of complementary DNAs that encode the NA1 and NA2 forms of Fc receptor III on human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **84** : 1688-1691.

26. **Ory, P. A., Clark, M. R., Talhouk, A. S. and Goldstein, I. M.** 1991. Transfected NA1 and NA2 forms of human neutrophil Fc receptor III exhibit antigenic and structural heterogeneity. *Blood* 77 : 2682-2687.
27. **Ory, P. A., Goldstein, I. M., Kwoh, E. E. and Clarkson, S. B.** 1989. Characterization of polymorphic forms of Fc receptor III on human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 83 : 1676-1681.
28. **Ravetch, J. V. and Perussia, B.** 1989. Alternative membrane forms of Fc γ RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. *J. Exp. Med.* 170 : 481-497.
29. **Ruiz-Cabello, F., Nevot, M. A. L., Garrido, A. and Garrido, F.** 1987. A study of GRM1 monoclonal antibody that reacts with natural killer cells and granulocytes. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 6 : 99-108.
30. **Satoh, T., Kobayashi, M., Kaneda, M., Tanihiro, M., Okada, K. and Ueda, K.** 1994. Genotypical classification of neutrophil Fc γ receptor III by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism. *Blood* 83 : 3312-3315.
31. 佐藤 篤, 今泉益栄, 斉藤稔哲, 吉成みやこ, 鈴木保志朗, 崔 硯, 飯沼一字, 佐藤 貴 1996. 抗NA2抗体による同種免疫性好中球減少症の1例. *日小血会誌* 10 : 194-198.
32. **Scallon, B. J., Scigliano, E., Freedman, V. H., Miedel, M. C., Pan, Y. C. E., Unkeless, J. C. and Kochan, J. P.** 1989. A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide-anchored and phosphatidylinositol-glycan-anchored forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 5079-5083.
33. **Simmus, D. and Seed, B.** 1988. The Fc γ receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature* 333 : 568-570.
34. **Steffensen, R., Gulen, T., Varming, K. and Jersild, C.** 1999. Fc γ RIIIB polymorphism: evidence that NA1/NA2 and SH are located in two closely linked loci and that the SH allele is linked to the NA1 allele in the Danish population. *Transfusion* 39 : 593-598.
35. **Stroncek, D. F., Leonard, K., Eiber, G., Malech, H. L., Gallin, J. I. and Leitman, S. F.** 1996. Alloimmunization after granulocyte transfusions. *Transfusion* 36 : 1009-1015.
36. **Stroncek, D. F., Shanker, R. A., Noren, P. A., Herr, G. P. and Clement, L. T.** 1996. Analysis of the expression of NB1 antigen using two monoclonal antibodies. *Transfusion* 36 : 168-174.
37. 谷口菊代, 小林正夫, 谷廣ミサエ, 平岡朝子, 岡田浩佑, 高田 昇, 上田一博 1998. 好中球特異抗原NA1に対するモノクローナル抗体の作製. *日輸誌* 44 : 309-316.
38. 谷口菊代, 平岡朝子, 谷廣ミサエ, 高田 昇, 小林正夫, 上田一博, 岡田浩佑 1998. 抗好中球モノクローナル抗体TAG2, TAG3, TAG4, TAG5の特異性の検討. *日輸誌* 44 : 227.
39. 谷口菊代, 小林正夫, 平岡朝子, 谷廣ミサエ, 岡田浩佑, 高田 昇, 木原裕貴, 上田一博 1999. 好中球特異抗原NA2を認識するモノクローナル抗体の作製. *日輸誌* 45 : 629-631.
40. **Van Buren, N. L., Stroncek, D. F., Clay, M. E., McCullough, J. and Dalmasso, A. P.** 1990. Transfusion-related acute lung injury caused by an NB2 granulocyte-specific antibody in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion* 30 : 42-45.
41. **Verheugt, F. W. A., von dem Borne, A. E. G. Kr., Decary, F. and Engelfriet, C. P.** 1977. The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test. *Br. J. Haematol.* 36 : 533-544.
42. **Werner, G., von dem Borne, A. E. G. Kr., Bos, M. J. E., Tromp, J. F., van der Plas-van Dalen, C. M., Visser, F. J., Engelfriet, C. P. and Tetteroo, P. A. T.** 1986. Localization of the human NA1 alloantigen on neutrophil Fc γ -receptors, p109-121. *In* E. L. Reiherz, B. F. Haynes, L. M. Nadler and I. D. Bernstein (eds.), *Leukocyte Typing*, Springer-Verlag, New York.
43. **Yomtovian, R., Kline, W., Press, C., Clay, M., Engman, H., Hammerschmidt, D. and McCullough, J.** 1984. Severe pulmonary hypersensitivity associated with passive transfusion of a neutrophil-specific antibody. *Lancet* 1 : 244-246.
44. 吉田菜穂子, 四方卓磨, 須藤茂行, 松村淳子, 辻井久, 土井康生, 衣笠昭彦, 沢田 淳, 斉藤憲治, 宮本光子 1988. 同種免疫性好中球減少症の双胎例 - ガンマグロブリン大量療法の試み -. *日児誌* 92 : 1550-1555.

Characterization of Monoclonal Antibodies, TAG1, TAG2 and TAG3 for Neutrophil Fc γ receptor IIIb

Kikuyo TANIGUCHI

Department of Pediatrics, Hiroshima University School of Medicine

(Director: Prof. Kazuhiro UEDA)

The neutrophil-specific antigen, NA system is a biallelic system composed of NA1 and NA2. NA antigens are located on phosphatidylinositol-glycan-anchored Fc γ receptor IIIb (Fc γ RIIIb) of neutrophil. The classification of NA1 and NA2 has been performed based on the genotypical determination by PCR-SSCP or PCR-SSP, and phenotypical analysis using monoclonal antibodies or antisera. In this study, three hybridoma cell lines secreting antibodies to Fc γ RIIIb antigens, designated TAG1, TAG2 and TAG3 were developed. These antibodies were tested against peripheral blood cells and cell lines derived from hematological malignancies. TAG1 reacted with only NA1-positive neutrophils. TAG2 strongly reacted with NA2-positive neutrophils, but weakly reacted with NA1/NA1 neutrophils. TAG3 reacted with neutrophils of all three NA-types. However, these antibodies did not react with NA-null (Fc γ RIIIb deficiency) neutrophils. TAG2 and TAG3 also reacted with a part of CD14-positive cells and a most part of CD56-positive cells. It seemed that TAG2 and TAG3 reacted to polypeptide-anchored Fc γ RIII (Fc γ RIIIa) similar to NA2-Fc γ RIIIb. The reactivities of these antibodies for neutrophils treated with phosphatidylinositol-specific phospholipase C were remarkably reduced. These results suggest that three monoclonal antibodies, TAG1, TAG2, TAG3, may be useful for detection of neutrophil-specific antigens located on Fc γ RIIIb.