

---

---

シンポジウム

---

---

## モノクローナル抗体の臨床応用

### Clinical Application of Monoclonal Antibodies

第409回新潟医学会

日時 昭和60年5月18日(土)

会場 新潟大学医学部研究棟第Ⅱ講義室

司会 柴田 昭(第一内科)

演者 渡部久実(医動物), 中村享道(第二内科), 荒川正昭(第二内科), 追手 颯(腎研免疫), 清水不二雄(腎研免疫), 山舖昌由(第三内科), 伊藤雅章(皮膚科), 渡辺重博(産婦人科), 青木定夫(第一内科), 本間慶一(第二病理)

発言者 品田章二(輸血部), 藤原道夫(医動物), 永井明彦(第二内科)

司会 では、定刻になりましたので、第409回新潟医学会のシンポジウムをこれからはじめたいと思います。今回のテーマは、“モノクローナル抗体の臨床応用”というテーマでありまして、全部で六題、それに、一題、追加発言があります。ジョージ・ケラーとセーザ・ミルシュタインがモノクローナル抗体というものをネイチャーの誌上に発表したのは、1975年のことであります。それからわずか5年しかたっていませんが、私の経験からしても、“モノクローナル抗体という聞きなれない言葉はいいんだ”と言っていたのが、ついこの間のことのように思われます。それが現在では、これを用いないと、臨床の仕事はできないというほどにルーチンの仕事に入ってきています。モノクローナル抗体というのは、従来の抗血清に含まれていた色々な問題点を一挙に解決するのではないかという非常に大きな期

待をもって登場してきたわけですが、最近では、やや pessimistic な見解も出はじめてきておりますし、いったいどの程度の可能性と限界があるのか、ということが問題になるかと思えます。本当に果たして、みんなが考えていたように、モノクローナル抗体というのが「夢の武器」になるのか、それとも「落ちた偶像」になるのかは、今後、更に検討を要する問題であろうかと思えます。今日はそういう問題を含めて、現時点でモノクローナル抗体というものが臨床応用でどの程度の可能性もっているのかということが、主な内容になるかと思えます。ただ、最初からすぐに臨床の問題に入る前に、医動物の渡部先生にまず基礎のお話を伺って、それから本論に入っていきたいと思えます。それでは渡部先生、お願いいたします。

## 1) モノクローナル抗体の基礎

新潟大学医学部医動物学教室 渡部 久実・河又 聡子

モノクローナル抗体 (MoAb) は細胞融合という手法により作製され、免疫学のみならず広く医学、生物学の分野に大きく貢献している。この細胞融合の現象は、1957年に岡田<sup>9)</sup>により HVJ (センドライウイルス) が細胞を融合させるという事実として見出され、体細胞遺伝学の領域に多くの成果をもたらした。その後、1975年に Köhler と Milstein は<sup>2)</sup>、細胞融合で作られた雑種細胞 (ハイブリドーマ) による MoAb の産生法を確立した。彼らは、ヒッジ赤血球で免疫されたマウス脾細胞とマウス形質細胞腫由来培養細胞を融合させ、ヒッジ赤血球に対する抗体を持続的に産生するハイブリドーマの作成に成功したのである。この画期的な手法の開発には、いくつかの基礎的な実験が背景として存在した。まず、免疫応答系においては、1個の B 細胞は1種類の抗原に対する抗体しか作らないという点があげられる。一方、培養技術の進歩により、いくつかの形質細胞腫細胞株 (ミエローマ) が樹立され、なかでも免疫グロブリン産生能を失い、さらにある種の酵素が欠損した変異株が細胞融合の親株として開発されたことも大きな支えとなった。現在では、種々の抗原に対する MoAb が得られ、細胞表面抗原の解析、細胞表面に存在するレセプターの解析、微量物質の測定や精製、ウイルスや細菌などの病原微生物の抗原構造の解析や診断、さらに癌の

診断や治療など、多くの分野で利用されている。これらの基礎を確立した Köhler と Milstein は1984年にノーベル医学、生理学賞を授与されたことは周知の通りである。本稿では、MoAb およびその作製法について概説し、市販の MoAb の使用に際しての基礎的な検討結果についても述べる。なお、MoAb については多くの優れた総説や成書があるので参考にしていただきたい。<sup>3)-10)</sup>

## MoAb の特徴

MoAb の大きな特徴は、1個の融合細胞より増殖した細胞集団によって産生された抗体であることから、抗原分子の特定の抗原決定基のみを認識することができ、また抗体のクラスやサブクラス、親和力なども均一な抗体の集団であるといえる。図1に示したように、ある MoAb は A という抗原決定基を認識する IgG クラスの抗体であるが、同じ抗原決定基を認識する IgM クラスの MoAb も作り出すことができる。それに比べて、従来の動物に抗原を免疫して得られる免疫血清 (conventional antisera) では、A, B, C という抗原決定基をそれぞれ認識する抗体が混じり、またそれらのなかでもクラスやサブクラスが異ったり、親和力が異ったりする抗体が混在している。従って、MoAb は免疫血

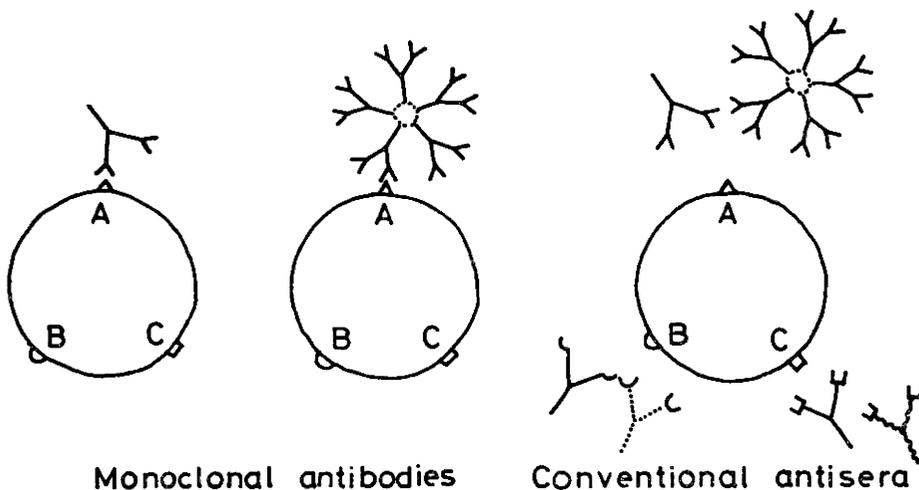


図1 モノクローナル抗体と免疫血清の違い 文献6)より引用

清のように吸収操作により特異性を高める必要が全くないため、非常に高い抗体価をもっている。さらに、得られたハイブリドーマを凍結保存することにより、いつでも同一ロットの抗体を得ることが可能である。

### 細胞融合の原理および MoAb の作製法

細胞融合の親株として用いられる形質細胞腫細胞株は、いずれも HGPRT (hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase) あるいは TK (thymidine kinase) という酵素を欠損した変異株である。これらの細胞は免疫グロブリン産生能や分泌能が欠除しているが、正常リンパ球と融合することにより産生、分泌能を得ることができる。よく使用されるものとしては、BALB/c マウス形質細胞腫 MOPC-21 由来の X63-Ag 8-6.5.3 株や NS-1 株がある。

細胞融合により、目的とする抗体を産生しているリンパ球と融合したミエローマだけを選択的に取り出すためには、HAT 選択培地を用いる。ミエローマは HGPRT もしくは TK の欠損株なので、その核酸合成は *de novo* 回路と呼ばれる生合成系により行なわれる。一方、正常細胞は非常時の回路としてさらに salvage 回路をもっている。融合後、この *de novo* 回路の阻害剤である aminopterin を含み、さらに hypoxanthine, thymidine の添加された培地、いわゆる HAT 培地で細胞を培養することにより、ミエローマは核酸合成ができなくなり死滅する。ところが、ハイブリドーマは融合によりリンパ球から HGPRT や TK の供給を受け、salvage 回路で核酸合成を行うことで生存でき、一方、残ったリンパ球は約2週間程度で増殖能を失う結果、ハイブリドーマだけを選択的に増殖させることが可能となる。

細胞融合の方法としては、現在は HVJ ではなく、扱いが簡単なポリエチレングリコール (PEG) が用いられている<sup>1)</sup>。PEG は細胞膜の脂質二重層構造を一時的に破壊し、その回復過程で接触した細胞どうしを融合させる。

MoAb の作製法を図2に示した。免疫動物としては BALB/c マウスが多用される。その理由として、ミエローマの多くが BALB/c マウス由来であり、しかも得られたハイブリドーマをマウスの腹腔にもどすことにより、腹水から高力価の抗体を得ることが容易となるからである。免疫方法は抗原の種類によって回数や期間も異なるが、2~4週間後に追加免疫し、その3~4日後の脾細胞を用いる。得られた脾細胞とミエローマを PEG

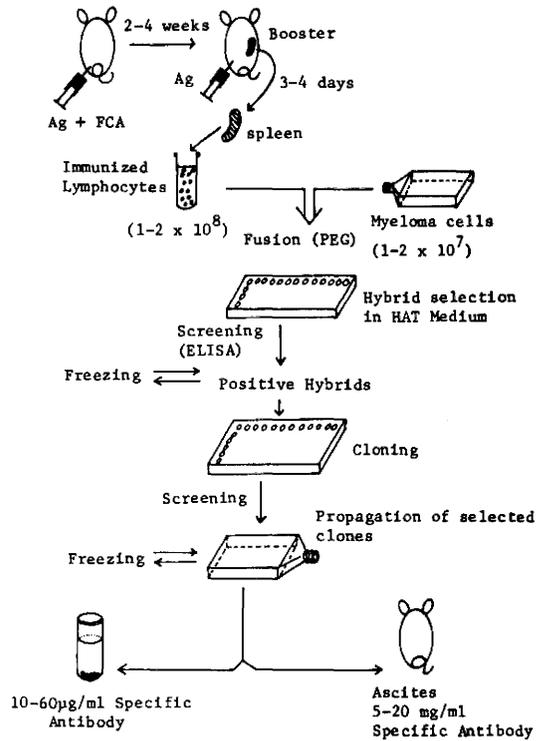


図2 モノクローナル抗体の作製法

で融合させ、融合細胞をマイクロプレートにまき、HAT 培地による選別を行なう。7~10日で細胞が増殖しコロニーが形成されるので、その培養上清を採取し、抗体の有無を検索する。その方法としては酵素抗体法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ、細胞傷害試験、蛍光抗体法などが知られているが、短時間で多くの検体を測定する方法として ELISA 法がよく用いられる。抗体が陽性の細胞はさらにクローニングを行ない、MoAb 産生株を得る。目的とする抗体は培養上清の形で使用したり、腹水型にして用いられたいする。

### MoAb の問題点

MoAb は従来の免疫血清に比べて多くの利点をもっているが、以下に述べるようないくつかの問題点も指摘されている。

MoAb は特異性の高い均一な抗体であるために、抗原と結合しても抗体による立体的な架橋構造を形成しにくく、従って沈降しにくいという点がある。そのために、沈降反応による抗原の分離精製や性状の解析が困難な面がある。さらに MoAb は、抗原分子の1個でしか

も狭い範囲の抗原決定基を認識することが可能なために、同様の決定基をもった異った抗原分子とも反応してしまう。従って、多くの抗原決定基と反応する抗体を含む免疫血清では交差反応は少なくなるが、MoAb では逆に完全な交差反応を示すことになる。このような点から、免疫組織化学の分野においては、従来の免疫血清と MoAb の使い分けが必要であるとも言われている<sup>12)</sup>。また、腫瘍細胞に対する MoAb では、抗体のクラスやサブクラスによっては細胞への結合性はあるが、細胞傷害性を示さないものがあるなど、その多様性も示されている<sup>13)</sup>。

次にヒトへの免疫療法に応用した場合には、大部分の MoAb がマウスの抗体であるために、マウス免疫グロブリンに対する抗体ができてくる問題があげられる。その点を解決するためにはヒト型 MoAb が有効で、現在ヒト-ヒトハイブリドーマによる MoAb の作製が精力的に進められており、また細胞融合によらずヒト B 細胞を EB ウイルス (Epstein-Barr virus) によりトランスホームさせて、抗体産生細胞を増殖させようという試みもなされている。しかし有用な親細胞株が樹立されていないなかったり、クローニングの困難さや、抗体が EB ウイルスに汚染されている危険性があるなど、解決しなければならない点も多い。

### 市販 MoAb の検定

#### —マウス抗リンパ球抗体を使って—

現在、特異性の高い MoAb が多数市販され、多くの研究室で手軽に利用されている。そこでその使用にあたって十分な基礎的検討を行うことが、MoAb をより有効な研究手段として用いることにつながる。こ

こでは我々の教室で行なった MoAb によるリンパ球亜群の除去法についての検討結果を述べ、諸氏の参考に供したい。使用した MoAb は、抗 Thy 1.2 抗体 (セダレーン社、 $\times 20$  で使用)、抗 Lyt 1.2 抗体 (明治乳業、 $\times 4,000$  で使用)、抗 Lyt 2.2 抗体 (明治乳業、 $\times 20,000$  で使用) である。補体は low toxic rabbit complement (セダレーン社、 $\times 10$  で使用) を用いた。MoAb による細胞の処理法は、 $10^7$  のマウス脾細胞に希釈した抗体を添加後、室温で30分間反応させ、遠心洗浄ののち、補体を加え  $37^\circ\text{C}$  40分間の反応を行なった。

#### 1) 抗 Thy 1.2 抗体による処理について

マウス脾細胞を抗 Thy 1.2 抗体と補体で処理し、T 細胞の除去の程度を Mitogen による反応で調べた (表 1)。1回の抗体処理では ConA に対する反応は十分に低下しなかったが、2回処理により Mitogen を添加しない対照とほぼ同じ値を示した。従って少なくとも2回の抗体処理により、T 細胞を十分に除去できた。なお、LPS に対する反応は抗体未処理群より低下しないことから、B 細胞への影響は認められなかった。

#### 2) 抗 Lyt 1.2 抗体による処理について

次に、抗 Lyt 1.2 抗体と補体処理によるヘルパー T 細胞の機能の抑制を抗体産生系を用いて調べた。ヒッジ赤血球を BALB/c マウスに免疫し、1週間後に脾臓を取り出し、その脾細胞に *in vitro* で二次刺激を加えることにより、ヒッジ赤血球に対する抗体産生能をブランク形成法で調べた。その結果、抗体処理により IgM 産生細胞は検出できず、IgG 産生細胞も未処理群のわずか6%であり、従ってヘルパー T 細胞を除去できたと考えられた (表 2)。

表 1 Mitogen response of anti-Thy 1.2+C treated spleen cells

Cells	$^3\text{H-TdR}$ uptake (cpm)						—
	Con A ( $\mu\text{g}/\text{well}$ )			LPS ( $\mu\text{g}/\text{well}$ )			
	0.2	2.0	10	0.1	1.0	10	
Untreated	93,034	30,817	4,728	26,020	31,418	48,640	8,410
Anti-Thy 1.2 + C $\times 1$	14,057 (0.15)	26,967 (0.88)	791 (0.17)	28,640 (1.10)	44,706 (1.42)	56,323 (1.16)	6,796 (0.81)
Untreated	28,993	180,918	194,692	24,391	37,413	63,227	4,618
Anti-Thy 1.2 + C $\times 2$	8,560 (0.30)	6,318 (0.03)	5,888 (0.03)	63,436 (2.60)	65,234 (1.74)	80,451 (1.27)	7,904 (1.71)

表2 Effect anti-Lyt 1.2+C treatment on the secondary PFC response

Cells	IgM PFC /culture	IgG PFC /culture
Untreated	703 (1.00)	273 (1.00)
Anti-Lyt 1.2+C	0 (0.00)	17 (0.06)

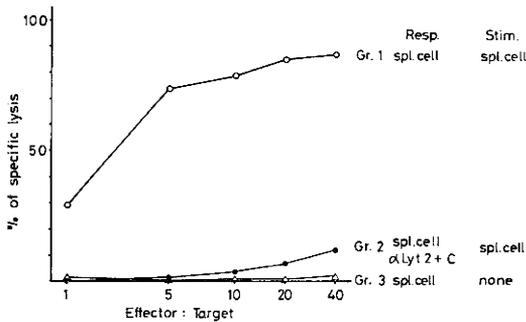


図3 抗Lyt 2抗体と補体処理によるCytotoxic T Lymphocyte (CTL) 誘導の抑制

### 3) 抗Lyt 2.2抗体による処理について

抗Lyt 2.2抗体と補体処理により、Lyt 2陽性細胞である細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導を抑えることができるかどうかを検討した。BALB/cマウスをC57BL/6マウス脾細胞で免疫し、1週間後にその脾細胞を抗体で処理したのち *in vitro* で再刺激し、EL-4細胞を標的細胞として<sup>51</sup>Cr release assayによりそのCTL活性を測定した。図3に示したように、抗体未処理群(Gr. 1)では70~80%の強いCTL活性を示したが、処理群(Gr. 2)ではE:T比が40:1で約10%の傷害が示されたにとどまり、5:1では活性が検出できなかった。再刺激を加えなかった群(Gr. 3)ではCTL誘導はみられなかった。従って抗体処理により大部分のLyt 2陽性のCTLは除去できたものと考えられた。

### おわりに

以上述べたように細胞融合の技法により作り出されたMoAbは、免疫学における基礎的研究だけでなく、病気の診断、治療への応用など、多くの分野に新しい局面をもたらした。今後臨床への応用としては、癌細胞に関してだけでなく、自己免疫疾患などの免疫異常、ウイルス性疾患、内分泌疾患、循環器疾患、さらには生殖や

移植免疫の分野に大きな役割をはたすことが期待されている。

### 参考文献

- 1) Okada, Y.: The fusion of Ehrlich's tumor cells caused by HVJ virus *in vitro*, Biken J., 1: 103~110, 1958.
- 2) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, 256: 495~497, 1975.
- 3) Hurrell, J.G.R.: Monoclonal hybridoma antibodies: techniques and applications, CRC Press, Florida, 1982.
- 4) モノクローナル技術の免疫学への応用, 臨床免疫, 14(6), 1982.
- 5) 岩崎辰夫, 他著: 単クローン抗体, ハイブリドーマとELISA, 講談社サイエンティフィク, 1983.
- 6) Campbel, A.M.: Monoclonal antibody technology, the production and characterization of rodent and human hybridomas. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984.
- 7) モノクローナル抗体—基礎と臨床の現状 I—, 最新医学, 39(1), 1984.
- 8) モノクローナル抗体—基礎と臨床の現状 II—, 最新医学, 39(2), 1984.
- 9) モノクローナル抗体の現状と臨床応用, 免疫と疾患, 8(6), 1984.
- 10) 富山朔二, 安東民衛, 編: 単クローン抗体ハンドブック, 講談社サイエンティフィク, 1985.
- 11) Davidson, R.L., et al.: Polyethylenglycol-induced mammalian cell hybridization: effect of polyethylenglycol molecular weight and concentration, Somatic Cell Genetics, 2: 271~280, 1976.
- 12) 清水不二雄: モノクローナル抗体の免疫組織化学への応用, Medical Immunology, 9(6): 895, 1985.
- 13) Seto, M., et al.: *In vivo* antitumor effects of monoclonal antibodies with different immunoglobulin classes, Cancer Res., 43: 4768~4773, 1983.

司会 ありがとうございます。

最初は、医動物の渡部先生から、基礎的な問題をお話

いただきました。私なりにまとめてみますと、第一にモノクローナル抗体というものと、conventionalな抗血清との対比で、モノクローナル抗体の特性をお話になり、ついで二番目は細胞融合の問題、hybridoma cellの原理とその実際をお話になりました。三番目にモノクローナル抗体がかかえている問題点をご指摘になり、最後に自験例でその有効性あるいは機能検査についての成績をお示しになったと思います。どなたかご発言ございますか。

**品田** 私達も human-human の hybridoma の作成を計画中ですが、できたクローンをどのように保存しておられるか、教えてください。すなわちクリオしてとっておくのか、あるいは、その継代培養したほうがいいのか、経済性などもあわせて教えてください。

**渡部** 私供も、モノクローナル抗体の作製を始めたばかりで経験が浅いのですが、教科書的には、hybridomaは継代培養を続けることにより性質が変化したりする場合がありますことが知られておりますし、また細菌による汚染等を考えますと、凍結保存を行う方がよいと思われまます。他の研究室ではどのようにしていらっしゃるのでしょうか。逆に、私供にも教えていただきたいと思います。

**司会** 品田先生、どうでしょうか。その点について、こうしたらいいのではないか、というアイデアでも結構です。

**品田** まだ、作っていないのですが、凍結保存をしておけば、経済的だと思います。当輸血部には良い機械もありますので、ご利用いただきたいと思います。

**司会** 他に、ございませんか。渡部先生、モノクローナル抗体を使って、たとえば、物質を同定する場合ですね。共通抗原をもっていれば、抗原決定基が共通であれば、色々なものが、だぶってくる可能性が当然あるわけですね。

**渡部** そのような可能性は十分に考えられますし、その点がモノクローナル抗体の短所でもあるわけです。免疫血清（ポリクローナル抗体）は、いくつかの抗原決定基に対する抗体を含んでいるため、異なった抗原分子間において、1つの共通な抗原決定基があった場合でも、他の抗原決定基と反応することによって、交差を防ぐことができます。一方、モノクローナル抗体は、1つの抗原決定基のみを認識しますから、それが共通だった場合には、完全に交差反応を生じ、異なった抗原分子を一つのものとして、認識してしまうわけです。そのような交差反応の問題は、実際に、モノクローナル抗体を作られ

ている先生方も、悩まれている面もあるのではないのでしょうか。

**司会** もう一つの問題は、非常にたくさんの色々なモノクローナル抗体が、商品でもでておりますし、各研究施設でも どんどん名前をつけているわけです。その standardization という動きは、今どうなのでしょう。

**渡部** 私には、その点については分かりません。現在、我々が市販のモノクローナル抗体を使用するにしましても、その詳しい性能表が手に入りません。従いまして、我々の研究室では、前に述べましたような抗体の性能検査を行ない、使用法が適切であるか、あるいは抗体に問題はないかを検定して、実際に使用しております。

**司会** 藤原先生、国際的な標準化の動きはあるのでしょうか。

**藤原** 私も、詳しくは知りませんが、たとえば、DNA 抗体に対するモノクローナル抗体なんていうのは、あちこちでとられており、果たして、特異性が、みんな同じものかどうかということ、比較する必要があると思います。それらを登録して、アメリカあたりがセンターになってやるなどという話を聞いたことは、あるのですけれども、それも、実用的に重要なもの、たとえば、抗 HL 抗体などという時には、当然、やるでしょうけれども、そうでないものというのは、なかなか進まないようです。その点では、先生が先程から、問題にされていた、本当にモノクローナル抗体と言っているけれども、一つだけ見ているのか、あるいは cross reactionの問題はどうなっているのかなどということを含めて、ちゃんとやる必要があるのではないかと思うのです。研究するレベルでやっているものに対しては、あまり進んでいないような感じがするのですが、やるべきだと思いますね。

**司会** 有難うございました。他にございませんか、はい、どうぞ。

**追手** 腎研免疫の追手でですけど、今日の演題を見てみますと、細胞のマーカー的要素にモノクローナル抗体を用いたものが、非常に多いと思いますが、先程の交差性の問題を含めまして、やはり、問題点が、たくさんでてきていると思います。必ずしも、モノクローナル抗体という言葉を使っていいのか、交差性の問題からしますと、先程、藤原先生が言われたように、DNA のモノクローナル抗体は、たとえば、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとか、あるいは、リボ核酸に交差反応性があるわけ

です。そうしますと、モノクローナル抗体1つだけ使ってやっている場合に、その交差性で反応している抗原を、どうやってチェックしていくかというのは、非常に問題あると思います。その一つとして、やはり、気をつけなければならないのは、やはり control をしっかりする。すなわち、細胞であれば、HLA の抗原研究が、非常に進んだように、パネル cell をしっかりもつ。組織であれば、色々な組織由来の純粋抗原をしっかりと。そういう方法が絶対必要なのではないかと思えます。それで、これから発表なさる方に、ぜひ、そういうことも含めて、発表していただきたいと思えます。

司会 有難うございました。これからの speaker の

方は、その点をちょっと頭において頂きたいと思えます。今の問題ですね。先程、渡部先生がご指摘になった問題点、異種血清であるという問題は沈降しにくいという問題に加えて、もう一つの非常に大きな問題なのではないかと思えます。他にございませんか。それでは、時間の関係もありますので、臨床応用という本題に入りたいと思えます。これからのご演題に対しては、基礎の先生方もご遠慮なく、ご発言いただければ幸いです。

第二席は、腎疾患への応用という題で、第二内科の中村先生お願いいたします。

## 2) ヒト腎糸球体成分に対するモノクローナル抗体

新潟大学医学部第二内科 中村 享道・荒川 正昭

新潟大学医学部腎研免疫 追手 巍・清水不二雄

ヒト糸球体疾患においては、免疫 globulin, 補体成分、および凝固因子等の腎糸球体への沈着が証明され、これらの因子がその発症・進展に関与していることが示唆されている。しかし、各種糸球体疾患における細胞および細胞間物質の増殖の機序、分布および質的变化について、現時点では不明な点が多い。

細胞融合法<sup>1)</sup>の導入により、細胞表面抗原や細胞間物質の domain に特異的に反応する抗体の作製が容易となり、細胞の同定および細胞間物質の構造や局在の分析に用いられている。現在までに、単離糸球体、単離糸球体基底膜、あるいは腎皮質 homogenate などを抗原として用いて、糸球体および尿細管上皮細胞<sup>2) 3) 4)</sup>、IV型 collagen, fibronectin を含む細胞間物質<sup>5) 6)</sup>を認識する種々の monoclonal 抗体が作製されている。糸球体疾患の解析には、上記 monodonal 抗体以外に、糸球体成分に特異的な marker が必要である。著者らは、mesangium 細胞を含む糸球体成分に対する monoclonal 抗体の作製を、培養ヒト胎児腎皮質細胞を抗原として試み、腎糸球体と反応する2種の monoclonal 抗体を得たので、若干の考察を加えて報告する。

### 方 法

抗原、月令7ヶ月の早産死亡胎児より腎を摘出後、滅菌生理食塩水中でその被膜と髄質部分を除去し、皮質部分は1mm立方に細切した。細切した組織片を37°C、

5分間 trypsin 処理後、1,000rpm で5分間遠心し、沈渣を20% FBS-RPMI 1640 培地に浮遊した。ついで、50ml 培養 flask に5ml ずつ分注し、37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator で培養した。細胞が confluent な状態の時に、0.05% trypsin, 0.01% EDTA 含有 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> free Dulbecco's-PBS 溶液にて処理後、継代培養した。

免疫; 雄 BALB/C マウス6匹に、培養胎児腎皮質細胞を5~6代継代培養し、10mM EDTA で培養 flask より集め、10<sup>5</sup>個をCFAとともに免疫した。最終投与は腹腔内と静脈内に行った。

融合細胞の作製; 最終免疫4日目に、マウスの脾よりリンパ球浮遊液を得、NS-1 (P3-NS1/1-AG4-1) と10:1の割合で混合し、polyethylene glycol 4,000を用いて、細胞融合を行った。細胞融合翌日より、HAT培地で10日間、引き続きHT培地で10日間培養し、融合細胞を選別した。培養上清中の抗体活性は、正常ヒト腎組織を用いて、蛍光抗体間接法で screening した。

免疫組織学的検討; 蛍光抗体間接法および電顕酵素抗体法を用いて行った。

monoclonal 抗体 (moAb) の class および subclass; ヤギ抗マウス IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA および IgM 抗体を用いて、蛍光抗体間接法および Ouchterlony 法で検討した。

moAb 対応抗原の可溶性; Burlington ら<sup>7)</sup>の方法に従って、腎より糸球体を単離し、蒸留水に浮遊した。