

以 B 型肝炎表面抗原離體免疫人類 B 淋巴球

黃俊奇 周千慧 曾哲明

國立臺灣師範大學生物研究所

摘 要

B 型肝炎的感染與帶原者的比率，在台灣地區仍是非常高，而目前預防與治療方面的研究方向之一，是製造出人類抗 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的單株抗體。製造單株抗體首要步驟是以離體免疫法增加抗 HBsAg 抗體製造細胞。報告指出在離體免疫以前，以 Leu-OMe 去除週邊血液單核細胞 (PBMC) 中之富含溶小體細胞 (lysosome-rich cells) 或以 OKT-8 加補體去除 CD8⁺T 細胞，可增加人類淋巴球對多種抗原離體免疫之效率；本實驗在探討同樣的處理，是否可促進 HBsAg 離體免疫人類 B 淋巴球的效果，而增加抗 HBsAg 抗體製造細胞的數目，再以 Filter Immunoplaque assay (FIPA) 測定抗體製造細胞的數目。實驗結果顯示，處理過 Leu-OMe 或 OKT-8 加補體，6 天後，抗 HBsAg 抗體製造細胞的數目，顯著增加，而 Leu-OMe 或 OKT-8 加補體並不影響離體免疫過程中，其他免疫細胞之存活率。經 Leu-OMe 處理後之淋巴球對淋巴球活化劑 (PWM: Pokeweed mitogen) 之反應，並不隨 PWM 濃度增加而增加抗 HBsAg 抗體製造細胞數目，但是其最佳濃度為 10ug/ml。總之，經 Leu-OMe 或 OKT-8 加補體處理 PBMC 後，應可對隨後之製造人類抗 HBsAg 單株抗體有所助益。

關鍵字：B 型肝炎表面抗原，離體免疫。

前 言

全世界感染 B 型肝炎的人數，至少超過二十億 (Li *et al.*, 1990)，有 1.2% 是帶原者 (Jonas *et al.*, 1990)，而臺灣地區感染過 B 型肝炎的比例，更高達 90%，帶原者占 15-20% (蔡，1991)。目前最普遍使用以控制 B 型肝炎的方法，是廣泛地施行肝炎疫苗注射；但對於母親是 B 型肝炎患者的新生兒及常與患者接觸的醫療人員等 B

型肝炎高危險群，則需以「被動免疫注射」，即注射抗 B 型肝炎抗體，來保護避免染患 B 型肝炎。現今所用的「被動免疫」製劑為 B 型肝炎免疫球蛋白 (HBIG)，其來源為患者或抗 B 型肝炎抗體陽性反應者之血漿；因此不僅來源上受限制，也可能帶有致病病原 (Li *et al.*, 1990)，所以最好的方法是製造出人類抗 B 型肝炎表面抗原的單株抗體，取代 HBIG；既無污染的顧慮，亦可將融合瘤大量培養，產生

大量的抗體。

現今製造人類抗 B 型肝炎表面抗原單株抗體的方法有二種，一是產生融合瘤 (Van-Meel *et al.*, 1985, Ichimon *et al.*, 1985, Golucci *et al.*, 1986, Haeda *et al.*, 1986, Harada *et al.*, 1989)，另一是利用 DNA 重組的分子生物技術 (Li *et al.*, 1990, Winter *et al.*, 1991)；所產生的抗體有的已應用在大猩猩上，可中和病毒 (HBV) 的感染 (Harada *et al.*, 1989)，但是未真正用於治療上，而且產量介於 0.3ug ~ 10ug/ml /day /10⁶ cells (Meada *et al.*, 1986, Harada *et al.*, 1989)，所以人類抗 B 型肝炎表面抗原單株抗體的製造，仍有繼續研究的必要性。第一種方法又可分為人類—人類細胞融合與人類—老鼠細胞融合 (James *et al.*, 1987) 由於融合瘤製造技術簡便，而且兩種融合瘤比較之下，以人類—老鼠細胞融合，成功率較高 (Glasky *et al.*, 1989)，故本實驗室採用此法。不過，由於血液中，分泌專一性抗體之 B 淋巴球非常少，(Kozbor *et al.*, 1984)，因此在細胞融合前，必須設法增加分泌專一性抗體的 B 細胞，其方法又可分成體外免疫 (in vitro immunization) 和體內免疫 (in vivo immunization) (James *et al.*, 1987)，基於道德方面的考慮，及來源之不虞匱乏，離體免疫 (in vitro immunization) 已經成為產生人類融合瘤的必要步驟。

依據前人之報告 (Borrebaeck *et al.*, 1988, Lagace *et al.*, 1985) 去除對 L-Leucine methyl ester 敏感的細胞 (包括 large granular lymphocytes, monocytes,

cytotoxic T cells, and a subset of CD8⁺T cells) 或去除 CD8⁺ 之 T 淋巴球 (主要是胞殺性及抑制性 T 淋巴球) 對多種抗原之離體免疫有正面的作用。本研究的目的即在於研究以 B 型肝炎表面抗原，離體免疫人類 B 淋巴球之最佳條件；主要著重在探討去除胞殺性 (cytolytic) 細胞或 CD8⁺ T 淋巴球，對離體免疫的影響。

材料和方法

藥品：

Heparin, Leu-OMe (L-leucine methyl ester), PWM (pokeweed mitogen) 購自 Sigma, MO. Ficoll-paque 購自 Pharmacia, NJ. OKT8 購自 Sanbio, Uden-Holland。Low-Tox-M Rabbit complement 購自 Cedarlane Laboratories Limited, Canada。HRP-streptoavidin 購自 Zymed, California。

Buffer 緩衝液：

PBS: phosphate-buffer saline, 0.01M, pH7.4

TBS: Tris-buffer saline, 50mM Tris/Hcl 含 0.2M NaCl, pH7.8

FIPA 之 enzyme substrate solution:
2ml 4-chloro-1-naphthol (Sigma, MO)
10ml TBS

40ml 3% H₂O₂

培養液：

RPMI 1640 (Hazleton, KS)

培養細胞的 RPMI 1640 含 10% heat-inactivated 胎牛血清 (FCS) (Gibco, NY), 2mM L-glutamine (Gibco, NY),

1mM sodium pyruvate (Gibco, NY)
100units/ml penicillin/streptomycin (Gibco, NY) 和 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Sigma, MO)

純化B型肝炎表面抗原：

含HBsAg的患者血漿，以57°C處理隔夜，破壞病毒活性，再經10000g，離心30分鐘，去掉沈澱物；以0.8 μ m濾紙過濾。將過濾後的血漿以抗B型肝炎表面抗原抗體製成的親和性管柱，純化出HBsAg，後經SDS-PAGE電泳法和酵素免疫分析法作定性和定量分析。由於一般從血漿純化的HBsAg皆與人類血清蛋白形成複合體，故作為活體免疫時，以蛋白含量為基準。

分離周圍血液單核細胞 (peripheral blood mononuclear cells: PBMN):

血液取自抗B型肝炎抗體陽性者，血液抽出後立即與抗凝血劑 (heparin) 混合；隨後加在Ficoll-paque的上層，並離心2000rpm，20分鐘。離心後，從交界面取得PBMN，以離心法(1400rpm, 10min)使用無血清之RPMI 1640清洗三次，隨後計算細胞數目。

去除胞殺性細胞：

參考前人所發表論文 (Borrebaeck *et al.*, 1988)，將PBMN調整為 1×10^7 cells/ml，加入2.5mM Leu-OMe，然後在室溫下處理40分鐘，隨後立即以含2%胎牛血清之RPMI 1640離心1400rpm, 10min；清洗三次，徹底去除殘留之Leu-OMe，細胞隨後進行離體免疫。

去除CD8之T淋巴球：

參考前人論文 (Lagace *et al.*, 1985)，

PBMN調配成 1×10^7 cells/800ul後，加入1/8稀釋的100ml OKT8抗體，在37°C下，處理20分鐘，然後加100 μ l 兔子補體，在37°C下，再處理45分鐘，每15分鐘搖晃一次，使細胞保持懸浮，隨即以含5%胎牛血清之RPMI 1640離心清洗細胞兩次，去除殘留之抗體與補體。

離體免疫B淋巴球

經Leu-OMe或是OKT8抗體處理過的細胞，均調成 2×10^6 cells/ml，加入5 μ g/ml的PWM，培養於含5% CO₂, 37°C的incubator內，隔日加入4ug/ml的HBsAg，開始離體免疫反應，細胞在一定之培養時間後，取出進行FIPA。若細胞用來分析PWM之濃度效應實驗，則將經Leu-OMe處理過之PBMN置於24-well plate內，每個小格細胞濃度是 2×10^6 cell/ml，加入不同量的PWM，也是培養於5% CO₂, 37°C的培養箱。一天後加入4ug/ml的HBsAg，隔5日後，即進行FIPA實驗。

Filter-Immunoplaque assay (FIPA) (Moller *et al.*, 1985)

在前一日把nitrocellulose (BIO-RAD)剪成1.5cm見方之膜片，滅菌後，每個膜片加入16ng/100 μ l的HBsAg置4°C，維持18-4hr，以使HBsAg附著在膜片上。再以無菌PBS洗膜片兩次，膜片上未附著HBsAg之部分，以PBS-0.1%脫脂奶粉飽和之(200 μ l/paper)。經過37°C，30分鐘之後，使用無菌PBS洗去未附著之脫脂奶粉。

經離體免疫數目的細胞取出，使用血球計數盤，計算細胞數目。以

trypan blue 染色) 及估算細胞存活率。每個膜片加入 1×10^5 個活細胞 $> 100 \mu\text{l}$ ，經 37°C ，3hr 的培養後，以 PBS 洗五次，再以 PBS-0.05% Tween 20 洗六次，去除未附著的細胞。附著在膜片上抗 HBsAg 抗體製造細胞，則使用 biotin-avidin 法偵測之，即先加入 1/500 稀釋之 HBsAg- biotin ($100 \mu\text{l}$ /膜片)，在 37°C ，反應 1hr 後，以 PBS-0.05% Tween 20 洗 10 次；再加入稀釋 1/1000 的 HRP-streptoavidin $100 \mu\text{l}$ /paper， 37°C 下，反應 1hr，以 PBS-0.05% Tween 20 洗 6 次，TBS 洗 8 次。抗體製造細胞以 enzyme substrate solution 呈色；最後以解剖顯微鏡觀察，有正反應之細胞呈藍色斑點。

結 果

Leu-OMe 處理對離體免疫的影響：

由數據 (表一) 顯示，除了實驗 3 之外，不論 PBMN 是否經 Leu-OMe 處理，SFC 的數目隨著培養天數增加而增加；加 Leu-OMe 和不加 Leu-OMe 的 PBMN，在培養 3、4 天時，SFC 的數

目並無顯著差異，但至第六天，兩者之 SFC 數目已有明顯的差別 ($P < 0.05$)，Leu-OMe 處理過的 PBMN 比未處理的 PBMN，含較多的抗體製造細胞。

OKT-8 處理對離體免疫的影響：

PBMN 以 OKT-8 處理後，SFC 的數目亦隨著培養天數的增加而增加 (表二)，而且培養到 4 天以後，加了 OKT-8 與未加 OKT-8 的 PBMN 之間，產生 SFC 的數目，有顯著差異 ($P < 0.05$)，顯示除去 CD8^+ 細胞，可增加抗體製造細胞的量。

PWM 不同濃度對離體免疫的影響：

經 Leu-OMe 處理，再以不同濃度 PWM 刺激的 PBMN，所產生的 SFC 數目，以加入 $10\mu\text{g/ml}$ 之 PWM 為最佳 (表三)，不過 PWM 對 SFC 的產生，並無顯著之濃度效應。

Leu-OMe，OKT-8 對離體免疫細胞存活率的影響：

由表四可見，不管是加入 Leu-OMe 或是 OKT-8，在培養 6 天之後，對細胞的存活率 (Viability)，皆無顯著影響。

表一 Leu-0-Methyl Ester 處理對離體免疫之影響

處理方法	培養天數	SFC 數目 * / 10^5 細胞		
		實驗 1	實驗 2	實驗 3
加 Leu-0-Me	3	4	2	4
	4	3	6	3
	5	5	7	2
	6	8	14	3
不加 Leu-0-Me	3	3	0	0
	4	4	3	0
	5	3	3	0
	6	5	9	0

* SFC (Spot forming cell) 數目 係指用 FIPA 的方法所測得在 Nitrocellous membrane 上的藍色斑點數 每一斑點表示一個抗體形成細胞 (antibody-forming cell)

表二 OKT-8 處理對離體免疫之影響

處理方法	培養天數	SFC 數目 * / 10 ⁵ 細胞		
		實驗 1	實驗 2	實驗 3
加 OKT-8	3	ND	5	0
	4	5	5	7
	5	7	5	7
	6	15	7	18
不加 OKT-8	3	ND	4	0
	4	1	1	5
	5	4	1	5
	6	7	4	10

* SFC (Spot forming cell) 數目 係指用 FIPA 的方法所測得在 Nitrocellous membrane 上的藍色斑點數 每一斑點表示一個抗體形成細胞 (antibody-forming cell)

表三 PWM 不同濃度處理對離體免疫之影響

PWM 濃度	SFC 數目 * / 10 ⁵ 細胞		
	實驗 1	實驗 2	實驗 3
0	3	3	4
2	4	0	5
5	4	4	2
10	16	6	6
20	6	1	2
50	3	2	ND

* SFC (Spot forming cell) 數目 係指用 FIPA 的方法所測得在 Nitrocellous membrane 上的藍色斑點數 每一斑點表示一個抗體形成細胞 (antibody-forming cell)

表四 不同處理對離體免疫存活率之影響

處理	Viability %		
	實驗 1	實驗 2	實驗 3
加 Leu-0-Me	ND	89	70
不加 Leu-0-Me	ND	88	79
加 OKT-8	93	93	80
不加 OKT-8	88	89	76

討 論

本實驗以 FIPA 測 SFC 的數目，決定 PBMN 處理過 Leu-OME 與 OKT-8 對離體免疫效率之影響。使用 Leu-OME 處理 PBMN，會造成 Leu-OME 在富含溶小體 (lysosome) 細胞 (包括 large granular lymphocytes, monocytes, cytotoxic T cells, a subset of CD8⁺T cells) 的溶小體內，產生 Leu-Leu-OME，而造成不可逆地胞殺作用 (irreversible cytotoxicity) (Borrebaeck., 1988) 此外，Leu-OME 自由地擴散入這些細胞的溶小體內，代謝形成胺基酸 (free amino acids) 堆聚在溶小體內，而脹破溶小體，也是其殺死富含溶小體細胞的機轉之一，但對 B 細胞、CD4⁺T 淋巴球和其他輔助細胞 (accessory cells) 則無殺害作用 (Borrebaeck., 1988) 由前人報告 (Borrebaeck *et al.*, 1988)，PBMN 去除這些對 Leu-OME 敏感的細胞會提高產生人類單株抗體，離體免疫的效率；從我們的數據中，顯示 Leu-OME 處理 PBMN，對 HBsAg 的離體免疫亦有效果，而由存活率的數據看出，Leu-OME 並不會對 PBMN 中之其他細胞，造成後續的胞殺作用。

除了 Leu-OME 以外，也有報告指出 (Lagace *et al.*, 1985)，去除 CD8⁺T cells，對離體免疫也有正面影響。我們的實驗中，以 OKT-8 處理 PBMN，去除 CD8⁺T 細胞，亦對 HBsAg 的離體免疫有正面的效果。CD8⁺ cells 包括了抑制性和胞殺性的 T 細胞，除去後，可增加抗原離體免疫的效率。

PWM 是 B.T 細胞的非特異性活化

劑，前人報告 (Colucci *et al.*, 1986; Ichimon *et al.*, 1985, Maeda *et al.*, 1986) 均使用 PWM 來刺激 lymphocytes 的分裂，以增加抗 HBsAg 抗體製造細胞的數目，但是 PWM 所用的濃度並不一致。由我們的實驗數據顯示，PWM 之濃度對於抗 HBsAg 抗體製造細胞的產生，在統計學上，無相關性。另外，也有報告 (Kozbor *et al.*, 1984) 認為，PWM 離體免疫的效果，不如 Epstein-Barr virus 和特異性抗原的專一性活化作用。因此，PWM 活化了 B 細胞，也可能活化了其他免疫相關性細胞，而影響了抗體製造細胞的分裂與分化。

實驗結果也透露出，由於捐血者之間個體差異的存在，因此來自不同志願捐血者的 PBMN，在相同的實驗條件下，對離體免疫 HBsAg 的反應並不相同；以 Leu-OME 處理為例，實驗 3 的捐血者，其 PBMN 需經 Leu-OME 處理後，才有抗 HBsAg 之抗體製造細胞的產生，其結果不同於同組之其他捐血者。

綜言之，以 Leu-OME 去除胞殺性細胞或 OKT-8 去除 CD8⁺ 抑制性 T 淋巴球，確實可促進離體免疫的效率及有效增加抗 HBsAg 抗體製造細胞的數目，對爾後製造抗 HBsAg 單株抗體，必有助益。

誌 謝

本實驗承蒙財團法人生物技術開發中心，細胞生物及免疫組，張東玄主任，洪彩霞博士，黃智雄博士，對

實驗的建議與協助，尤其劉涓博士在FIPA方面的指教，更是使實驗得以突破的關鍵，謹以致謝。另外，對於多位志願供血者，亦表最深的謝意。

參考文獻

- Borrebaeck, C. A. K., I. Danielsson, and S. A. Moller. 1988. Human monoclonal antibodies produced by primary in vitro immunization of peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:3995.
- Borrebaeck, C. A. K., 1988. Human mAbs produced by primary in-vitro immunization. *Immunology Today.* 9(11):355.
- Colucci, G., D. S. Kohtz, and S. D. Waksal. 1986. Preparation and characterization of human monoclonal antibodies directed against the hepatitis B virus surface antigen. *Liver.* 6:145.
- Glasky, M. S., and C. L. Reading. 1989. Stability of specific immunoglobulin secretion by EBV-transformed lymphoblastoid cells and human-murine heterohybridomas. *Hybridoma.* 8(4):377.
- Harada, K., Y. Ichimori, K. Sasano, S. Sasai, K. Kitano, S. Iwasa, K. Tsukamoto, and Y. Sugino. 1989. human-human hybridomas secreting hepatitis B virus-neutralizing antibodies. *Bio/Technology.* 7:374.
- Ichimon, Y., K. Sasano, H. Itoh, S. Hitotsumachi, Y. Kimura, K. Kaneko, M. Kida, and K. Tsukamoto. 1985. Establishment of hybridomas secreting human monoclonal antibodies against tetanus toxin and hepatitis B virus surface antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 29(1):26.
- James, K., and G. T. Bell. 1987. Human monoclonal antibodies production: current status and future prospects. *J. Immunol. Methods.* 100:5.
- Jonas, M. M., R. K. Reddy, M. Demedina, and E. R. Schiff. 1990. Hepatitis B infection in a large municipal obstetrical population: characterization and prevention of perinatal transmission. *Am. J. Gastro.,* 85(3):277.
- Kozbor, D., and J. C. Roder. 1984. In vitro stimulated lymphocytes as a source of human hybridomas. *Eur. J. Immunol.,* 14:23.
- Lagace, J., and B. R. Brodeur. 1985. Parameters affecting in vitro immunization of human lymphocytes. *J. Immunol. Methods.* 85:127.
- Li, Y-W., D. K. Lawrie, P. Thammana, G. P. Moore, and C. W. Shearman. 1990. Construction, expression and characterization of a murine/human chimeric antibody with specificity for hepatitis B surface antigen. *Mol. Immunol.,* 27(3)

- :303.
- Maeda, T., Y. Eda, K. Nishiyama, Y. Ishikawa, A. Tashiro, and T. Watanabe. 1986. Production of stable mouse x human hybridomas secreting HBs antigen-specific human monoclonal antibody by using in vitro sensitization. *Hybridoma*. 5(1): 33.
- Moller, S. A., and C. A. K. Borrebaeck. 1985. A Filter immuno-plaque assay for the detection of antibody-secreting cells in vitro. *J. Immunol. Methods*. 79:195.
- Van-Meel, F. C. M., P. G. A. Steenbakkens, and J. C. H. Oomen. 1985. Human and chimpanzee monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods*. 80:267.
- Winter, G., and C. Milstein. 1991. Man-Made antibodies. *Nature*. 349:293.
- 蔡文城，1991，微生物學第二版，藝軒圖書出版社 611 頁。

In vitro immunized human B lymphocytes with HBsAg

Jung-chi Hwang, Chin-Hui Chow, Jerming Tseng.
Department of Biology, National Taiwan Normal University.

ABSTRACT

The researches on prophylaxis and diagnostics of Hepatitis B (HB) are still in the first priority due to the high percentage of chronic HB virus carrier in Taiwan. The current trend in HB research is to generate the human monoclonal antibodies against HB surface antigen (HBsAg), which is generally initiated by an *in vitro* immunization process for increasing the number of antigen-specific antibody forming cells. Several reports demonstrated that depletion of lysosome-rich cells by Leu-OMe or elimination of CD8⁺ T lymphocytes by OKT8-mediated complement reaction resulted in an increase in the efficiency of *in vitro* immunization. In this report, we examine the effect of the same treatments on the efficiency of HBsAg-mediated *in vitro* immunization by measuring the number of spot-forming cells (SFC) on the filter of a Filter Immunoplaque Assay (FIPA). The data indicated that depletion of Leu-OMe sensitive cells or OKT8⁺ cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) significantly increase the number of SFC after six days of *in vitro* immunization. The viability of the rest of immune cells were not affected by the treatments during the subsequent immunization period. After Leu-OMe treatment, the cells responded normally to pokeweed mitogen (PWM), a nonspecific B cell activator with an optimal dose at 10ug PWM per ml. therefore, our studies suggested that depletion of lysosome-rich or CD8⁺ cell population did enhance the number of HBsAg-specific antibody forming cells, thus would increase the probability of cloning out the anti-HBsAg antibody producer.

Key words: HBsAg, *in vitro* immunization.