

Title	Cytotoxic Factorを産生する活性化マクロファージハイブリドーマの作製
Author(s)	武田, カ
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35980
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	たけ 武	だ 田	つとむ 力
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	8 1 2 6	号
学位授与の日付	昭和 63 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	医学研究科外科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	Cytotoxic Factor を産生する活性化マクロファージハイブリドーマ の作製		
論文審査委員	(主査) 教 授 森 武貞	(副査) 教 授 濱岡 利之	教 授 岸本 進

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

癌免疫におけるマクロファージのはたらきは重要であり、かつその機能は多様である。Accessory cell として免疫応答に関与し、TNF (腫瘍壊死因子)、Interleukin-1 等の液性因子を産生し、また effector 細胞としても腫瘍細胞に対し増殖阻止または細胞破壊作用をもつ。このマクロファージの多様な機能はその由来により異なり、その機能解析はかならずしも容易ではない。そこでこの多彩なマクロファージ機能を解析するためにマクロファージハイブリドーマの作製をこころみた。

さらに TNF 等の液性因子を産生する活性化マクロファージハイブリドーマを作製することができれば、その産生物質またはハイブリドーマによる癌治療への応用も検討したいと考えた。

[方 法]

5~7 週齢の雄 BALB/c マウス 2 匹の腹腔内に、Propionibacterium acnes を 2 mg 注入し、2 日後の採取した腹腔滲出細胞を、マウス骨髄腫細胞 NS-1 と PEG2000 の存在下で細胞融合させた。Non-specific esterase, β -galactosidase, asialo GM₁, Mac-1 および Ia^d の存在を免疫組織化学的に検討し、Fc-receptor についてはロゼット法にて検討した。

マクロファージハイブリドーマを 5×10^5 /ml にて培養し、これに各種濃度の LPS (Salmonella enteritidis の lipopolysaccharide) または OK-432 を加え、24 時間後の培養上清を採取し、その上清中の L 細胞に対する cytotoxic activity をメチレンブルーの色素とりこみ法 (A_{660nm}) にて測定した。

次に 1×10^7 個のマクロファージハイブリドーマをヌードマウス (BALB/c, nu/nu) の腹腔内へ注入して 1 ヶ月間腹腔内で増殖させたのち、LPS を 10 μ g 腹腔内に注入した。2 時間後の血清と腹

水を採取し、その cytotoxic activity を L 細胞に対する ^3H -thymidine とりこみ法にて測定した。

さらにマクロファージハイブリドーマと各種ヒト癌細胞株とを種々の Effector/Target (E/T) 比にて混合培養し、その直接細胞障害活性を microcytotoxicity test にて測定した。

[成 績]

12回の細胞融合のうち1回に融合細胞を認め、その生成率は5well/140wellであった。クローニング後のハイブリドーマは細胞内の non-specific esterase と β -galactosidase が強陽性であり、表面抗原の asialo GM₁, Mac-1, Ia^d は94~97%の陽性率であった。これに対し融合前のマクロファージは、それぞれ48%, 55%, 45%の陽性率をしめした。

このハイブリドーマの培養上清は、LPS, OK-432の刺激なしでも、L細胞に対して約30%の cytotoxic activity をしめしたが、LPS, OK-432の付加により cytotoxic activity はさらに上昇し、0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LPS 付加で50%, 5 KE/ml の OK-432 付加で56%の cytotoxic activity をしめした。同じ条件下で NS-1 骨髄腫細胞の培養上清に LPS または OK-432 を付加しても cytotoxic activity は2%以下であった。

またこのハイブリドーマを移植されたヌードマウスの血清、腹水には強い cytotoxic activity をみとめ、40倍稀釈にても L 細胞に対し81.5%の cytotoxic activity をしめした。一方、NS-1 骨髄腫細胞を移植したヌードマウスの血清には LPS を付加しても、10倍稀釈で-2.0%の cytotoxic activity しかしめさなかった。

さらにヒト癌細胞株と E/T=25 にて混合培養することにより、T-24 膀胱癌で75.3%, Hela-S₃ 子宮頸癌で66.7%, MCF-7 乳癌で58.3%, HT-29 大腸癌で54.5%, PANC-1 膵癌で68.3%の腫瘍障害活性が認められた。

[総 括]

作製したマクロファージハイブリドーマは細胞内に non-specific esterase, β -galactosidase を、また細胞表面に Ia^d, Mac-1, asialo GM₁ を有していた。その培養上清中には cytotoxic factor が存在し、各種のヒト癌細胞に対して強い cell-mediated cytotoxicity をしめした。

論文の審査結果の要旨

本研究は、癌免疫におけるマクロファージ (M ϕ) の多様な機能を解析することを目的として、M ϕ ハイブリドーマの作製を試みたものである。

Propionibacterium acnes で誘導したマウス腹腔滲出細胞をパートナーとすることにより、non-specific esterase, β -galactosidase を細胞内に、また Ia^d, Mac-1, asialo GM₁ を細胞表面に有する、活性化した M ϕ ハイブリドーマを得ることができた。

このハイブリドーマは各種ヒト癌細胞に対しても強い細胞障害活性をしめし、その上清中には cytotoxic factor を分泌していた。

これらの成績は、癌免疫におけるMφ機能を解析するうえで大いに寄与するものと期待され、学位に
値する。