

Title	Nocardia rubra細胞壁骨格成分 (N-CWS) によるヒト Lympho-kine-activated killer (LAK) 細胞活性の増強効果とその機序の解析
Author(s)	白阪, 琢磨
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36661">https://hdl.handle.net/11094/36661</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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)	しら	さか	たく	ま
	白	阪	塚	磨
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8451	号	
学位授与の日付	平成元年2月9日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	<u>Nocardia rubra</u> 細胞壁骨格成分(N-CWS)によるヒト Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞活性の増強効果とその機序の解析			
論文審査委員	(主査)	教授 岸本 進		
	(副査)	教授 田口 鐵男	教授 濱岡 利之	

### 論文内容の要旨

#### 〔目 的〕

最近ヒト末梢血やマウス脾細胞をIL2存在下に培養することにより、Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞が誘導され、これが自己腫瘍やNK抵抗性腫瘍に対し、強力な抗腫瘍活性を示すことや、自己LAK細胞とヒトIL2を用いた癌の養子免疫療法の有効性が報告されている。いっぽう、Nocardia rubra 細胞壁骨格成分(N-CWS)が種々の免疫賦活作用を有することが示されている。本研究では少量のIL2により、より強力な抗腫瘍活性を有するLAK細胞を誘導することを目的として、N-CWSのLAK活性に対する影響につき、ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)を用いて検討した。

#### 〔方 法〕

- ①PBMC；健常成人より採取したヘパリン加末梢血からFicoll-paque比重遠沈法でPBMCを分離した。
- ②LAK細胞の誘導；PBMCまたはその各種処理細胞を、種々の濃度のIL2およびN-CWSの存在下に4日間培養し、LAK細胞を誘導した。
- ③補体依存性細胞溶解法；PBMCにOKT3あるいはLeullbを加え4℃45分間の培養後、家兎補体溶液中でさらに37℃40分間培養した。
- ④各細胞画分の調整；PBMCからPlastic Dish、ナイロン・ファイバークラムおよびSephadex G-10カラムで得られた細胞を非附着性細胞画分(NADC)とし、さらにAET処理羊赤血球を用いて、Eロゼット形成細胞(ERFC)と非形成細胞(ERNFC)とに分けた。附着性細胞画分(ADC)はPBMCを24穴平底プレートに加えて2時間培養後に非附着性細胞を除去して得た。

⑤ IL2 結合能の測定；クロラミンT法により<sup>125</sup>Iにて標識したIL2を用い、N-CWSの存在下あるいは非存在下に培養したPBMCのIL2受容体の数と親和性をScatchard plot解析により決定した。

⑥ LAK活性の測定；<sup>51</sup>Cr標識Daudi細胞を標的細胞として種々のE:T比で4時間Cr遊離法にてLAK活性を測定した。

⑦ N-CWS刺激PBMC培養上清の作成；PBMCをN-CWSと共に無血清培養液で培養した上清を回収しN-CWS刺激PBMC培養上清(N-CWS-PBMC-SN)として用いた。

⑧ 増殖増強活性測定；マウス胸腺細胞を各上清およびPMAと共に60時間培養後、4時間<sup>3</sup>H-thymidine(<sup>3</sup>H-TdR)を添加培養し、<sup>3</sup>H-TdRの取り込みを測定した。

⑨ Killer Helper Factor(KHF)活性測定；各上清の存在下あるいは非存在下にマウス胸腺細胞あるいはヒトERFCから誘導されたアロキラー活性より、KHF活性を測定した。標準KHFとしてヒトT細胞株24A・CA2培養上清を用いた。

#### 〔結果〕

① 健常人9人のPBMCをIL2およびN-CWSと共に4日間培養し測定した抗腫瘍活性は、Medium単独培養群あるいはN-CWS単独培養群では、ほとんど認められず、IL2添加培養群では全例に抗腫瘍活性の誘導を認めたが、N-CWSの併用により全例で有意な腫瘍溶解能の増強を認めた。またN-CWSによるLAK活性増強効果の発現にはN-CWSが培養過程の初期に存在することが必要であった。

② N-CWS、IL2で誘導されたLAK細胞の前駆細胞および攻撃細胞表面マーカーは補体依存性細胞溶解法によると大部分がCD3<sup>-</sup>、CD16<sup>+</sup>であり一部CD3<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>であった。

③ NADC画分、ERFC画分、ERNFC画分、いずれもN-CWSの併用によるLAK活性の増強はほとんど示さなかったが、それぞれの画分にADCを再構成すると、いずれの画分でもN-CWSのLAK活性増強能が認められた。

④ N-CWS刺激PBMCではコントロール群に比較して有意に細胞あたりのIL2レセプターの個数が増加していた。しかしレセプターのIL2に対する親和性には有意な差を認めなかった。

⑤ N-CWS-PBMC-SN添加群では、コントロール群に比べ添加上清の濃度依存性にLAK活性が有意に増強された。またN-CWS-PBMC-SN中にマウス胸腺細胞で増殖増強活性が認められ、さらにマウス胸腺細胞およびヒトERFCの系で有意なKHF活性を認めた。

#### 〔総括〕

IL2単独培養群に比しN-CWSの併用でヒトPBMCからより強力なLAK細胞を誘導できた。そのLAK細胞の前駆細胞および攻撃細胞の表面マーカーは大部分がCD3<sup>-</sup>、CD16<sup>+</sup>であり、一部CD3<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>であった。N-CWSによるPBMCからのLAK誘導増強効果は、N-CWSがADCおよびNADC共存下にKHF物質産生を増強し、さらにはIL2レセプター発現を増強して、最終的にLAK細胞の誘導を増強するという機序によることが示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

本研究は、Nocardia rubra 細胞壁骨格成分 (N-CWS) と、ヒト遺伝子組み換え型 IL 2 の併用により、ヒト末梢血単核球 (PBMC) から、より強力な Lymphokine-activated-killer (LAK) 活性を誘導することを示し、その LAK 誘導増強のメカニズムとして N-CWS の刺激で PBMC から、killer helper factor 活性物質が産生され、PBMC 上の高親和性 IL 2 レセプター発現が増強し、LAK 細胞誘導が増強したことを明かにしたものである。

抗腫瘍免疫療法の研究に寄与することが大である。