



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	https://hdl.handle.net/11094/36661
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	白	阪	琢	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 IL-2 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 IL-2 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 IL-2 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)

- ① PBMC ; 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。
- ② LAK 細胞の誘導 ; PBMC またはその各種処理細胞を, 種々の濃度の IL-2 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 極体依存性細胞溶解法 ; PBMC に OKT 3 あるいは Leu1b を加え 4°C 45 分間の培養後, 家兎補体溶液中でさらに 37°C 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・ファイバーカラム 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 处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。

⑤IL2結合能の測定；クロラミンT法により¹²⁵I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。

⑥LAK活性の測定；⁵¹Cr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。

⑦N-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³H-thymidine(³H-TdR)を添加培養し、³H-TdRの取り込みを測定した。

⑨Killer 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。

②N-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⁻、CD16⁺であり一部CD3⁺、CD16⁻であった。

③NADC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つたが、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。

④N-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つた。

⑤N-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⁻、CD16⁺であり、一部CD3⁺、CD16⁻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IL2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IL2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。