

Title	ラット心移植モデルにおける細胞傷害性T細胞の解析： 細胞傷害性T前駆細胞頻度からみた急性拒絶反応の 制御機構
Author(s)	伊藤, 寿記
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37568">https://hdl.handle.net/11094/37568</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">&lt;a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;</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">&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 【58】

氏名・(本籍)	いとうとしのり	伊藤 寿記
学位の種類	医学	博士
学位記番号	第 9349 号	
学位授与の日付	平成 2 年 10 月 5 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	ラット心移植モデルにおける細胞傷害性 T 細胞の解析 — 細胞傷害性 T 前駆細胞頻度からみた急性拒絶反応の制御機構 —	
論文審査委員	(主査) 教授 川島 康生 (副査) 教授 濱岡 利之	教授 園田 孝夫

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

ドナー抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (Tc : Cytotoxic T lymphocyte) の前駆細胞頻度 (f (Tcp) : Tc precursor frequency) を測定する方法として, 限界希釈法 (LDA : Limiting Dilution Assay) がある。本研究はこの LDA を用いて, 移植前後のレシピエントの脾細胞ならびに急性拒絶反応時にグラフトへ浸潤する細胞 (GICs : Graft infiltrating cells) の f (Tcp) を測定し, さらに GICs のクローニングにて得られた細胞を用いて急性拒絶反応の制御機構を解明することを目的とした。

## 〔方法〕

実験モデル: ドナーに BUFFALO (BUF) ラット (RT-1<sup>b</sup>) を, レシピエントに WISTAR-FURTH (WFu) ラット (RT-1<sup>u</sup>) を用い, 腹部異所性心移植モデルを作成した。

免疫担当細胞の分離調整: 脾細胞は脾臓を圧挫にて浮遊細胞とした後, また GICs は移植後 5 日目に摘出したグラフトを酵素処理にて浮遊細胞とした後, rabbit 抗 rat IgG 抗体で coating した Degalan beads column を通過させて, Ig-細胞を分離して T 細胞とした。

LDA: 6 段階に限界希釈した WFu ラットの responder cell に, 2000 rad X 線照射した BUF ラットの stimulator cell  $5 \times 10^4$  個と rat purified IL2 10 U/ml を加え, 37°C 5% CO<sub>2</sub> 下で 8 日間培養した。LDA の Tc による細胞傷害性は, BUF tumor cell line 7316A を target cell として用い, <sup>51</sup>Cr release assay にて測定した。無処置の対照脾 T 細胞, 移植後 5

日目の脾T細胞及びG I Cs-T細胞ならびに移植後3-4週目の脾T細胞(感作脾T細胞)においてf(Tcp)を測定した。f(Tcp)の算出方法は、responder cellを含まない対照wellの<sup>51</sup>Cr release値の平均値+3 S. D.を越えるものをTcpを有するpositive wellと定義して回帰直線を作成し、Poisson分布のゼロ限界点(zero order term)より計算した。

G I Csに含まれるアロ抗原特異的抑制活性:対照W/Fuラットのリンパ節T細胞( $2 \times 10^5$ 個)をresponderとしたMixed lymphocyte culture(MLC)の系に、移植後5日目のG I Cs-T細胞( $2 \times 10^5$ 個)を加えて4日間培養し、その抑制活性をみた。

G I Csのクローニング:移植後5日目のG I CsをB U F脾細胞にて2回刺激し、比重遠心法にて生細胞を分離した。responder cell 0.5個/wellの限界希釈下で、I L 2 10 U/ml, stimulator cell  $5 \times 10^4$ 個/wellを加えてクローニングを行った。

T細胞クローンの免疫学的特性:得られたクローン $1 \times 10^4$ 個にB U FまたはB Nのstimulator  $4 \times 10^5$ 個を加え、3日間培養し増殖応答を求めた。クローン $2 \times 10^5$ 個をMLCの系に加えて4日間培養し、その抑制活性をみた。モノクローナル抗体O X 19, W 3 / 25, O X 8, O X 22を用いてflow cytometryにより、クローンの表面マーカーを検討した。

#### [成績]

- ① B U Fグラフトは平均 $6.1 \pm 0.6$ 日( $n = 8$ )で拒絶された。
- ② 移植後5日目の脾T細胞のf(Tcp)は $1 / (195 \pm 123)$ と、対照脾T細胞の $1 / (2343 \pm 591)$ に比して有意のクローンサイズの拡大をみた。グラフトが拒絶された感作脾T細胞のf(Tcp)は $1 / (696 \pm 243)$ であった。一方、移植後5日目のG I Cs-T細胞におけるf(Tcp)は $1 / (84 \pm 53)$ であった。
- ③ 移植後5日目のG I Cs-T細胞は、ドナー抗原特異的にMLCを抑制(% suppression:73.3%)した。
- ④ 移植後5日目のグラフトから得られたクローンはO X 19<sup>+</sup>, W 3 / 25<sup>+</sup>, O X 8<sup>-</sup>, O X 22<sup>+</sup>すなわちC D 4<sup>+</sup>, C D 8<sup>-</sup>, C D 45 R<sup>+</sup>のT細胞クローンであった。またこのクローンはドナー抗原に対して特異的に増殖し、MLCのドナー抗原特異的な増殖応答を抑制(% suppression:92.5%)した。

#### [総括]

移植後5日目の急性拒絶反応時のグラフトには、拒絶反応を促進させるTcのほかに、その無制限な増殖に対して抑制する方向に作用するT細胞が存在しており、急性拒絶反応の制御の一つの機構が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、ラット心移植モデルを用い、急性拒絶反応の主たる effector 細胞と考えられている細胞傷害性T細胞の前駆細胞頻度を測定できる限界希釈法により、急性拒絶反応時のひとつの制御機構を明らかにしたものである。移植後5日目の脾臓では細胞傷害性T前駆細胞頻度は急速に増大したが、拒絶後2～3週目には縮小した。また、移植後5日目のグラフトには拒絶反応に促進的に働く細胞傷害性T細胞の他に、この細胞の増殖を抑制すると考えられるT細胞を認め、急性拒絶反応における一つの制御機構の存在を示唆したものである。