



Title	In vitro kinetic study of the immunosuppressive effect of deoxy-methylspergualin on human peripheral blood mononuclear cells
Author(s)	高野, 右嗣
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38124">https://hdl.handle.net/11094/38124</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">大阪大学の博士論文について</a>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	高野右嗣
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第10679号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	In vitro kinetic study of the immunosuppressive effect of deoxy-methylspergualin on human peripheral blood mononuclear cells (デオキシメチルスパガリンのヒト末梢単核球細胞に対する免疫抑制作用機序)
論文審査委員	(主査) 教授 奥山 明彦 (副査) 教授 濱岡 利之 教授 森 武貞

## 論文内容の要旨

## (目的)

15-デオキシスパガリン(以下, DSG)は腎移植後のステロイド抵抗性の急性拒絶反応に対する治療薬として用いられている免疫抑制剤である。また DSG は一部の慢性拒絶反応に対しても効果が認められており、その作用機序の解析が必要である。しかし DSG は培養液中では解離しやすく不安定なため in vitro 系における解析はこれまで困難であった。

本研究では DSG の解離部位がメチル基に置換されて培養液中でも安定なデオキシメチルスパガリン(以下, MeDSG)とヒト末梢単核球細胞(以下, PBMN)に対する免疫抑制作用機序を解析した。

## (方法ならびに成績)

## 1) ヒト PBMN の分離

健常なヒト末梢血から Ficoll-Conray を用いた濃度勾配法により PBMN を分離した。以下の実験では細胞を 5% CO<sub>2</sub>, 37°C にて培養した。

## 2) リンパ球混合培養試験(以下, MLR)

マイクロプレート MLR への MeDSG, DSG の添加時期を変えることによりアロ抗原刺激による芽球化に対する免疫抑制効果の動態的解析を行った。アロ MLR の各穴に 1 μg/ml になるように添加した。添加する時期は MLR 開始の当日から 1 日おきとし、第 5 日に <sup>3</sup>H-サイミジンの取り込みを測定した。培養開始から 4 日以内に MeDSG 1 μg/ml を添加した場合には添加時期にかかわらず抑制率は 19.1-28.1% でほぼ一定し、抑制効果の減少はみられなかった。

## 3) 細胞媒介性リンパ球障害試験(以下, CML)

MLR と同様に免疫抑制剤の添加時期を変えることによりアロ抗原刺激によるリンパ球細胞障害性に対する抑制効果の動態的解析を行った。<sup>51</sup>Cr 標識した標的細胞に対する障害性は MeDSG 1 μg/ml を培養開始から 2 日以内に添加した場合にのみ強く抑制され(抑制率 66.8-54.7%)、第 3 日以降に添加した場合の抑制率は 25.5% 以下と低かった。

## 4) インターロイキン 2(以下, IL-2) 産生に対する抑制試験

バルク MLR 中のアロ抗原刺激による IL-2 産生に対する抑制効果を調べた。MeDSG を作用させたアロ MLR の

上清を培養開始から1日おきに回収し含まれているIL-2活性をIL-2依存性細胞CTLL-2を用いて測定し、抑制効果の動態的解析を行った。しかしMeDSG 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を作用させて第2日に回収したIL-2産生に対する抑制率は3.75%と低かった。

#### 5) 抑制性調節細胞の導入試験

MeDSG 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を7日間作用させたバルクMLR中の調整性細胞が新たなCMLを抑制するかどうかを調べた。エフェクター細胞/調節性細胞比を10として調節細胞を新たなバルクMLRの第1, 4, 6日に添加した。しかし $^{51}\text{Cr}$ 標識した標的細胞に対する障害性は抑制されなかった。

#### 6) 細胞表面抗原に対する効果

アロ抗原刺激により5日間培養したバルクMLR中の芽球化細胞の表面抗原であるIL-2レセプター(以下, IL-2R), CD8, CR3, LFA1に対する免疫抑制効果をフローサイトメーターを用いて測定した。

MeDSG 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を作用させた場合, IL-2R<sup>+</sup>細胞はコントロールの69.8%に, CD8<sup>+</sup>LFA1<sup>+</sup>細胞は57.8%に抑制された。

#### (総括)

- 1) ヒトMLR系において, MeDSGはアロ抗原刺激によるPBMNの芽球化の後半を抑制する。
- 2) ヒトCML系において, アロ抗原刺激によるPBMNの細胞障害活性はMeDSGを培養開始直後から第2日までのごく限られた時期に添加した場合にのみ強く抑制された。これは明らかにMeDSGのMLR系に対する抑制機序とは異なっていた。またDSGのMLR系, CML系に対する抑制率は個々の実験で大きく差がみられた。
- 3) アロ抗原刺激での細胞障害性に対するMeDSGの抑制機序は一般的に細胞障害性に重要な役割をなすとされるIL-2に対してではなかった。しかし芽球化細胞表面のIL-2Rに対する抑制効果は存在した。
- 4) MeDSGはCD8<sup>+</sup>LFA1<sup>+</sup>(細胞障害性)細胞を抑制したが, MeDSGの短期間の作用ではヒトCML系に対する抑制性調節性細胞の誘導は不可能であった。

### 論文審査の結果の要旨

アロ抗原刺激下のin vitro系においてヒト末梢单核球細胞に対する免疫抑制deoxymethylspergualin(以下, MeDSG)の作用機序を検討した。MeDSGはリンパ球混合培養試験による单核球細胞の芽球化反応の後半を抑制した。しかし, MeDSGは細胞媒介性リンパ球障害試験ではその活性化過程の前半だけを抑制した。MeDSGはインターロイキン2の産生に対してはほとんど抑制作用を示さなかった。しかしインターロイキン2レセプター陽性細胞に対する抑制効果は認められた。またMeDSGによる直接的な抑制性調節細胞の存在は認められなかった。

以上の結果はMeDSGがアロ抗原刺激下でインターロイキン2に対する抑制や細胞障害性单核球細胞に対する直接的な抑制性調節細胞を導入することなく細胞障害性单核球細胞を強く抑制するという, MeDSGの作用機序を解析したもので学位論文に値する。