

マウス LAK 細胞の細胞内画分の細胞傷害性に関する研究

佐々木 成 弘

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任: 関山三郎教授)

〔受付: 1992年12月24日〕

〔受理: 1993年1月7日〕

Abstract: The cytotoxic activity of subcellular fractions in LAK cells derived from normal spleen cells of inbred WHT/Ht mice was investigated. The cytotoxic activity of LAK cells, determined by ^{51}Cr - release assay with syngeneic tumor cells as a target, was found to reach the maximum level of 44.2% at the 5th day of cultivation with 8,000 units of rIL-2/ml culture. LAK cells lysed by sonication under hypotonic conditions were fractionated into 4 subcellular fractions. The mitochondrial fraction contained a component which, even at low concentration, had an immediate cytotoxic effect. The microsomal and cytosol fractions also contained a component which acted with a larger quantity of proteins and a longer period of incubation time than the factor of the mitochondrial fraction. These observations suggested that at least two types of cytotoxic substances, which have different subcellular localizations and mechanisms of action, are present in LAK cells.

Key words: lymphokine activated killer cells (LAK cells), subcellular fractions, cytotoxic factor

緒 言

生体の癌に対する防御機構は Burnet¹⁾ の免疫学的監視機構の概念提唱に始まり, T細胞を中心とした細胞性免疫の研究が行なわれた。1970年代には, 生体の免疫応答はTおよびB細胞やマクロファージなどの細胞相互の関連下に成立していることが明らかになった。これと同時期に様々なサイトカインが発見され, BCGなどの細菌製剤や非特異的免疫刺激物質による腫瘍の治療研究が行なわれた。これらを背景に1980年代には biological response modifier (BRM)²⁾ の概念が導入され, 現在幅広く臨床

応用が行なわれている。そのなかでも interleukin 2 (IL-2)³⁾ は cytotoxic T lymphocytes (CTL) の分化と誘導, natural killer (NK) 細胞の増殖と細胞傷害活性の増強, lymphokine activated killer cells (以下LAK細胞と略す) の誘導, interferon (IFN)- γ やリンホトキシンなどのリンホカイン産生の誘導など, 抗腫瘍性に働く調節性サイトカインとして注目されている。とりわけ in vitro で IL-2 と培養されたリンパ球は, major histocompatibility complex (MHC) 非拘束性で幅広い腫瘍細胞を傷害することが報告され^{4,5)}, これを契機に IL-2 による癌治療の研

Cytotoxicity of subcellular fractions of murine LAK cells.

Seikou SASAKI

(Second Department of Oral and Maxillo-Facial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 18:23-35, 1993

究は精力的に行なわれるようになり、IL-2とともに *in vitro* で培養した細胞傷害活性の高いリンパ球、LAK細胞を癌患者に移入する養子免疫法が開始された^{6,7)}。

一方、古くからリンパ球の細胞内には顆粒が存在し、その顆粒が細胞傷害に関与すると意味付けられてきた^{8,9)}。リンパ球が腫瘍を破壊する過程で、その本体は何かということを解明することは興味のもたれるところであり、ひいては癌免疫療法の発展につながると考えられる。

そこで今回、最終 effector 細胞のひとつであるLAK細胞を *in vitro* で正常脾細胞から誘導し、細胞内画分の細胞傷害性について検討を行なった。

材料および方法

1. 実験動物

近交系WHT/Htマウス、8-12週齢、雌を使用し、固形飼料（オリエンタル酵母工業）と水を自由にあたえ飼育した。

2. 腫瘍

近交系WHT/Htマウスに自然発生し、同系マウスの胸部皮下に継代移植している扁平上皮癌を使用した。

3. 腫瘍細胞浮遊液の調製

近交系WHT/Htマウスに継代移植している腫瘍をマウスから無菌的に摘出し、ダルベッコ phosphate buffered saline, pH 7.4 (ニッスイ、以下PBSと略す)で洗浄後、剪刀で細切し#150白金メッシュで濾過した。PBSで細胞浮遊液とした後0.25%トリプシン (DIFCO, U.S.A.)を加え攪拌し500×gで3回遠心洗浄し再度PBSに浮遊させて使用した。腫瘍生細胞数の算定は0.2%トリパンプルー染色を行ないその際のviabilityは各ロットとも90%以上だった。

4. 脾細胞浮遊液の作製

エーテル麻酔で屠殺したWHT/Htマウスより無菌的に脾臓を摘出し、培養液を入れたガラスシャーレ上でピンセットを用いてほぐし#150白金メッシュで濾過して単細胞とした。

これを500×gで3回遠心洗浄したのち、培養液に浮遊させて0.2%トリパンプルー染色を行ない生細胞を算定し一定数に調整した。

5. LAK細胞の誘導 (Fig.1)

1) 培養液

培養液はL-グルタミン、25mM HEPES 含有のRPMI-1640 (GIBCO)を使用した。これに非働化ウシ胎児血清(最終10% FBS GIBCO)およびペニシリンGカリウム100単位/ml、ストレプトマイシン100μg/mlを添加しpH 7.4となるように調整した。

2) 培養法

前述のようにして得た脾リンパ系細胞1×10⁸個/10mlをプラスチックフラスコ (FALCON 3054, U.S.A.)に浮遊させた。これに recombinant IL-2 (シオノギ製薬より供与、以下 r IL-2 と略す)を2000単位/ml, 4000単位/ml, 8000単位/ml添加し37°C, 5%CO₂のインキュベーター内で静置培養した。培養期間は3日, 5日, 8日の3群を設定し、培養後ただちにLAK細胞を回収して比重遠心法で死細胞を除去した。すなわち、回収したLAK細胞を500×gで遠心し4mlの培養液に浮遊させ、マウスリンパ球比重分離液 (M-SMF, 比重1.090±0.001, 日本抗体研究所) 3mlに静かに重層し、1,200×g, 20分間遠心した。遠心後中間層のリンパ球分画を回収し培養液で500×gで3回遠心洗浄後、培養液に再浮遊させた。生細胞数の算定は0.2%トリパンプルー染色を行ないその際のviabilityは各ロットとも90%以上だった。

Spleens were excised from WHT/Ht mice.
↓
suspended in RPMI1640 medium supplemented with 10% FCS,
100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin
↓
Splenocytes were placed into culture flasks at 1×10⁸ cells/10 ml
medium supplemented with rIL-2 (2000U/ml, 4000U/ml, 8000U/ml).
↓
cultured for 3, 5 or 8 days
↓
LAK cells were harvested and separated with M-SMF (mouse lymphocyte
isolate solution: Japan Antibody Institute) to remove dead cells.
↓
washed three times with RPMI1640 medium
↓
ASSAY

Fig. 1 Preparation and generation of LAK cells

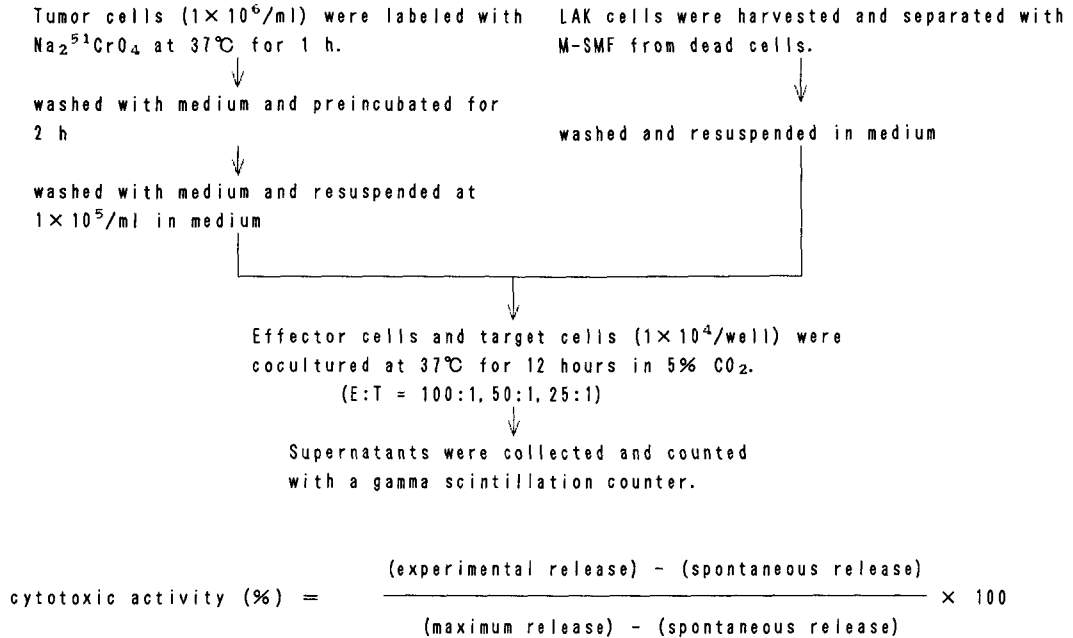


Fig.2 ^{51}Cr release assay

6. ^{51}Cr release assay¹⁰⁾ (Fig. 2)

1) 腫瘍細胞の ^{51}Cr 標識

先に集めた腫瘍細胞を10% F B S 添加 EAGLE'MEM, pH 7.4 (ニッスイ, 以下MEMと略す) で 1×10^6 個/ml の濃度に調整し細胞 1×10^6 個/ml あたり 3.7 MBq の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (第一ラジオアイソトープ研究所) を加え, 37°C , 5% CO_2 下で時々振盪させながら 60 分間培養し標識した。反応後 MEM で 3 回遠心洗浄後, 20 ml の MEM を加え 37°C , 5% CO_2 下で 2 時間前培養を行った。これを MEM で 3 回遠心洗浄後, 1×10^6 個/ml の濃度に再浮遊させた。

2) 細胞傷害活性測定

96-well round-bottomed microtiter plate (Falcon, U.S.A.) に target 細胞(T)として ^{51}Cr で標識した腫瘍細胞を 1×10^4 個/0.1 ml, effector 細胞(E)として培養期間, r 1 L - 2 濃度の異なる L A K 細胞を E : T 比 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1 となるように混合し総量 0.2 ml とした。その後 37°C , 5% CO_2 下で 12 時間培養し, 上清を Titertek の上清採取システム (Skarton, Norway) により採取し, 培養上清

に含まれる放射活性をガンマカウンター (アロカ, Auto well gemma system ARC-1000) にて測定した。測定は各検体とも triplicate で

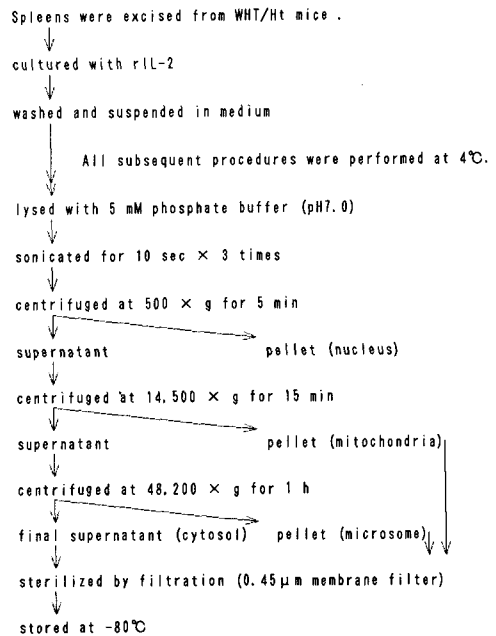


Fig.3 Subcellular fractionation of LAK cells

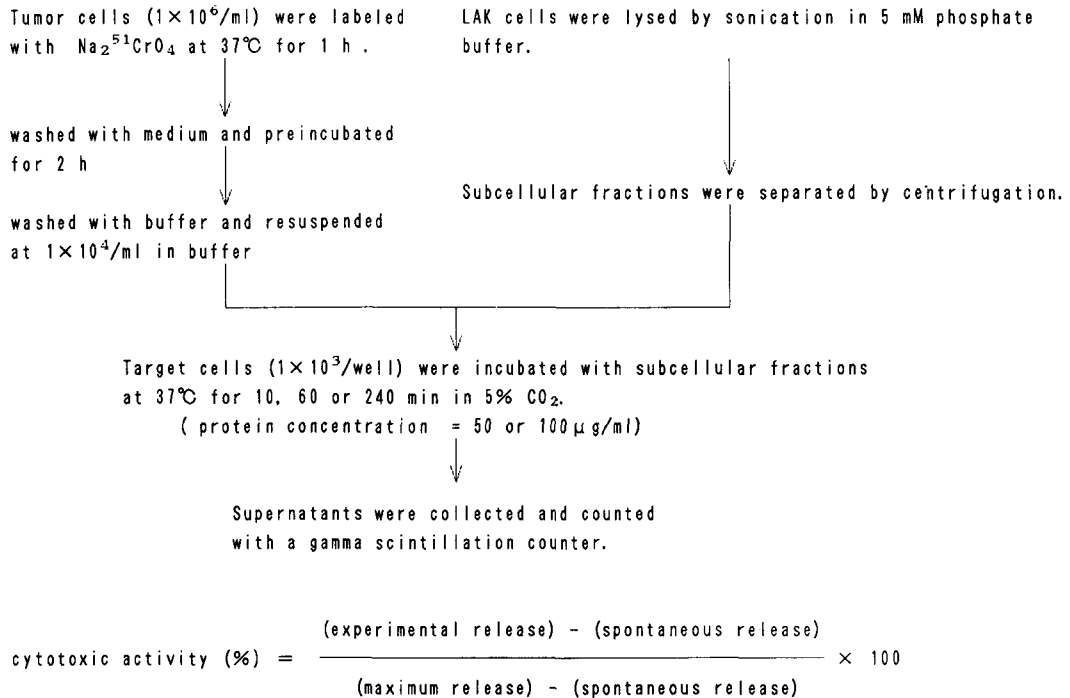


Fig. 4 ^{51}Cr release assay for subcellular fractions of LAK cells

行なった。標識細胞からの最大遊離は、0.2% Triton X (半井科学薬品工業) にて細胞を融解して測定し、自然遊離は effector 細胞の代わりに MEM を 0.1 ml 加えた条件で遊離した放射活性を測定した。細胞傷害活性は以下の式で求めた。

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = \frac{\text{実験群遊離cpm} - \text{自然遊離cpm}}{\text{最大遊離cpm} - \text{自然遊離cpm}} \times 100$$

7. 細胞内画分の調製法 (Fig.3)

はじめに LAK 細胞の細胞分画を行なった。 1×10^8 個の LAK 細胞を 5 mM phosphate buffer (pH 7.0) 中で超音波処理し(10秒3回), $500 \times g$ 5分, $14,500 \times g$ 15分, $48,200 \times g$ 60分の順に遠心を行ない4分画を得た。核画分以外は $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過して assay に用いた。蛋白定量は Bradford 法で行なった。

8. 細胞内画分の細胞傷害活性測定法 (Fig.4)

LAK 細胞の細胞内画分の上記腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を 10分, 60分, 4時間の ^{51}Cr

release assay で測定した。すなわち、腫瘍細胞を $1 \times 10^6/\text{ml}$ あたり 3.7 M Bq の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で標識したのち 1×10^3 個/ $0.1 \text{ ml}/\text{well}$ で播種し、細胞内画分を $50 \mu\text{g}$, $100 \mu\text{g}$ に調整して NaCl を最終濃度 0.15 M になるように加えた。腫瘍細胞は 5 mM phosphate buffer, pH 7.0 (0.15 M NaCl , 5 mM CaCl_2 を含む) に浮遊させた。対照として新鮮正常マウス脾細胞より同様に調製した細胞内画分を使用した。一部の実験には 5 mM CaCl_2 非添加群を設定し細胞内画分のカルシウムによる影響を測定した。

9. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

細胞傷害に関与する蛋白を同定するため正常マウス脾細胞と LAK 細胞のミクロソーム画分、細胞質画分について泳動パターンの比較検討を行なった。泳動用ゲルは 12.5%, 濃縮用ゲルは 5% を用い試料を $80 \sim 100 \mu\text{g}$ 添加して トリス-グリシン緩衝液で 30 mA の定電流で泳動した。泳動後 Coomassie brilliant blue 染色を行なった。分子量を決定するために低分子量

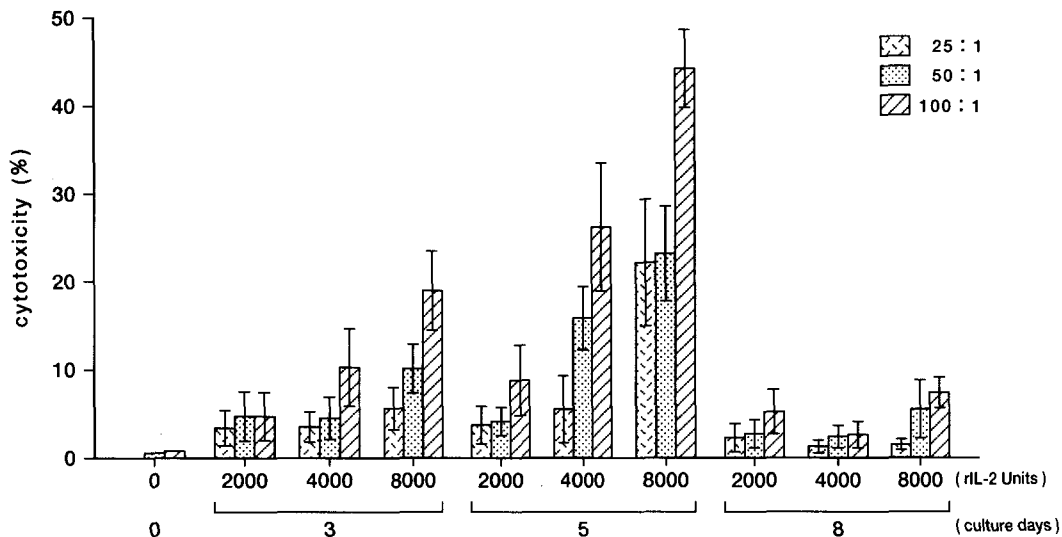


Fig.5 Cytotoxic activity of LAK cells. Normal spleen cells were cultured with rIL-2 concentration of 2,000, 4,000, or 8,000 units/ml for 8 days. These LAK cells were tested for cytotoxic activity against syngeneic tumor cells as effector : target ratios of 100 : 1, 50 : 1 and 25 : 1 in 12-hr ⁵¹Cr release assay.

Table 1 Cytotoxic activity of LAK cells

E/T ratio	Culture days		3				5			8		
	0	rIL-2 Units	2000	4000	8000	2000	4000	8000	2000	4000	8000	
25 : 1 ^a	0		3.4±2.0 ^b	3.5±1.7	5.6±2.4	3.7±2.1	5.5±3.8	22.2±7.2	2.3±1.6	1.3±0.7	1.5±0.6	
50 : 1	0.6±0.8		4.7±2.8	4.5±2.4	10.1±2.8	4.1±1.6	15.9±3.6	23.2±5.4	2.7±1.6	2.4±1.3	5.5±3.3	
100 : 1	0.8±1.1		4.7±2.7	10.3±4.4	19.0±4.5	8.8±4.0	26.3±7.3	44.2±4.4	5.2±2.5	2.6±1.5	7.4±1.7	

a : The number of target cells is 1×10⁴.

b : mean (%) ± S. E.

マーカーキット (Pharmacia, Sweden) を用いた。

実験結果

1. 腫瘍細胞に対するLAK細胞の細胞傷害活性

E : T比 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1 で実験を行なったところ, 細胞傷害活性はすべての場合で培養3日目ですでに現われ, その効果は5日間の培養で最大となった。またほとんどの場合, 細胞傷害活性は, rIL-2の濃度と, target細胞に対するeffector細胞の割合に応じて上昇した。最大値を示したのはE : T比

100 : 1 で rIL-2 8000 単位添加の5日間培養群でその値は44.2%だった。5日間培養群は3日間培養群に比べ高い細胞傷害活性を示したが, 8日間培養群では3日目培養群よりも活性が低下していた。そこでLAK細胞の可溶化には, rIL-2 8000 単位添加の5日間培養群を使用することにした。(Fig.5, Table 1)。

2. 細胞内分画の蛋白質定量

LAK細胞は遠心分離法により4画分に分離された。LAK細胞1×10⁸個からの各画分の収量は, 核画分は1.9mg, ミトコンドリア画分は1.85mg, ミクロソーム画分は2.0mg, 細胞質画分は3.0mgであった。

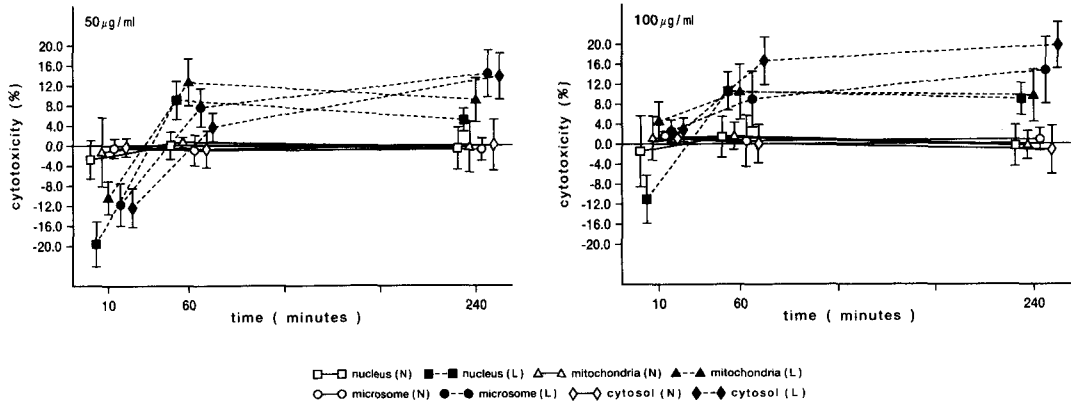


Fig. 6 Cytotoxic activity of subcellular fractions of LAK cells and normal spleen cells

N : normal spleen cells

L : LAK cells cultured with 8,000 units/ml rIL-2 for 5 days.

These subcellular fractions were tested for cytotoxic activity against fresh syngeneic tumor cells in 10 min, 60 min, 240 min ⁵¹Cr release assay.

Table 2 Cytotoxic activity of subcellular fractions of LAK cells and normal spleen cells

proteins (µg/ml)	50			100		
	10	60	240	10	60	240
nucleus (N)	-2.7±3.8 ^a	-0.5±2.7	-0.6±4.2	-1.4±7.1	1.4±4.1	-0.4±4.1
nucleus (L)	-19.6±4.5	9.0±3.8	5.0±2.3	-11.0±4.8	10.6±5.7	8.9±3.2
nucleus (L*)	-	-	-	-	-	1.2±0.7
mitochondria (N)	-1.2±6.9	0.6±0.5	-0.3±5.1	1.2±4.4	1.6±2.7	-0.2±2.8
mitochondria (L)	-10.3±3.3	12.6±4.7	9.1±4.4	4.6±3.9	10.5±5.5	9.6±5.2
mitochondria (L*)	-	-	-	-	-	0.6±0.4
microsome (N)	-0.5±1.9	-1.0±3.0	-0.8±2.5	1.7±0.9	0.6±5.1	0.9±2.2
microsome (L)	-11.7±4.2	7.6±3.8	14.5±4.7	2.6±2.2	9.0±5.6	14.6±6.6
microsome (L*)	-	-	-	-	-	1.0±0.6
cytosol (N)	-0.3±1.8	-0.8±3.7	0.1±5.0	1.1±1.3	0.1±3.8	-1.2±4.8
cytosol (L)	-12.3±3.8	3.6±2.9	13.8±3.8	2.9±2.4	16.7±4.8	19.7±4.6
cytosol (L*)	-	-	-	-	-	1.4±0.9

N : normal spleen cells

L : culture with 8,000 units/ml rIL-2 for 5 days

L* : culture with 8,000 units/ml rIL-2 for 5 days without CaCl₂

a : mean (%) ± S. E.

* : p < 0.05

** : p < 0.01

3. 細胞内画分の細胞傷害活性

1) 細胞傷害活性の経時的変化

細胞内画分の 50 µg 添加群では、正常マウ

ス脾細胞の細胞内画分は 4 画分とも、全実験時間を通じていずれも活性を示さなかった。これに対し LAK 細胞の細胞内画分では、腫瘍細胞

と混合培養後 10 分から 60 分ですべての画分で有意に活性の上昇を認め ($p < 0.01$), 60 分から 240 分ではミクロソーム画分 ($p < 0.05$) と細胞質画分 ($p < 0.01$) で有意にさらなる活性の上昇を認めた。最大値を示したのは 240 分のミクロソーム画分の 14.5% で、ついで 240 分の細胞質画分が 13.8% であった。

100 μg 添加群では、正常マウス脾細胞の細胞内画分は 50 μg 添加群と同様に 4 分画とも活性を示さなかった。これに対し、LAK 細胞の細胞内画分では 10 分から 60 分でいずれの画分でも活性が上昇し、核画分 ($p < 0.01$), ミクロソーム画分 ($p < 0.05$), 細胞質画分 ($p < 0.01$) で有意差が認められた。60 分から 240 分では有意差は認められなかったものの、ミクロソーム画分と細胞質画分で活性の上昇が認められた。また、最大値を示したのは 240 分の細胞質画分

の 19.7% で、ついに 240 分のミクロソーム画分の 14.6% であった。一方、 CaCl_2 非添加群の LAK 細胞の細胞内画分では 100 μg , 240 分の assay で活性を示さなかった。(Fig.6, Table 2)。

2) 細胞傷害活性の蛋白濃度による変化

細胞内画分と腫瘍細胞を混合培養して 10 分後の細胞傷害活性は、正常マウス脾細胞ではすべての画分で蛋白濃度を変えても活性を示さなかった。これに対し、LAK 細胞の細胞内画分 100 μg の添加ではミトコンドリア画分、ミクロソーム画分、細胞質画分で、コントロールよりわずかに活性が上昇した。60 分後の細胞傷害活性は、正常マウス脾細胞では、すべての画分で蛋白濃度を変えても活性を示さなかったのに対し、LAK 細胞の細胞内画分では、50 μg の添加でいずれもコントロールよりも高値を示

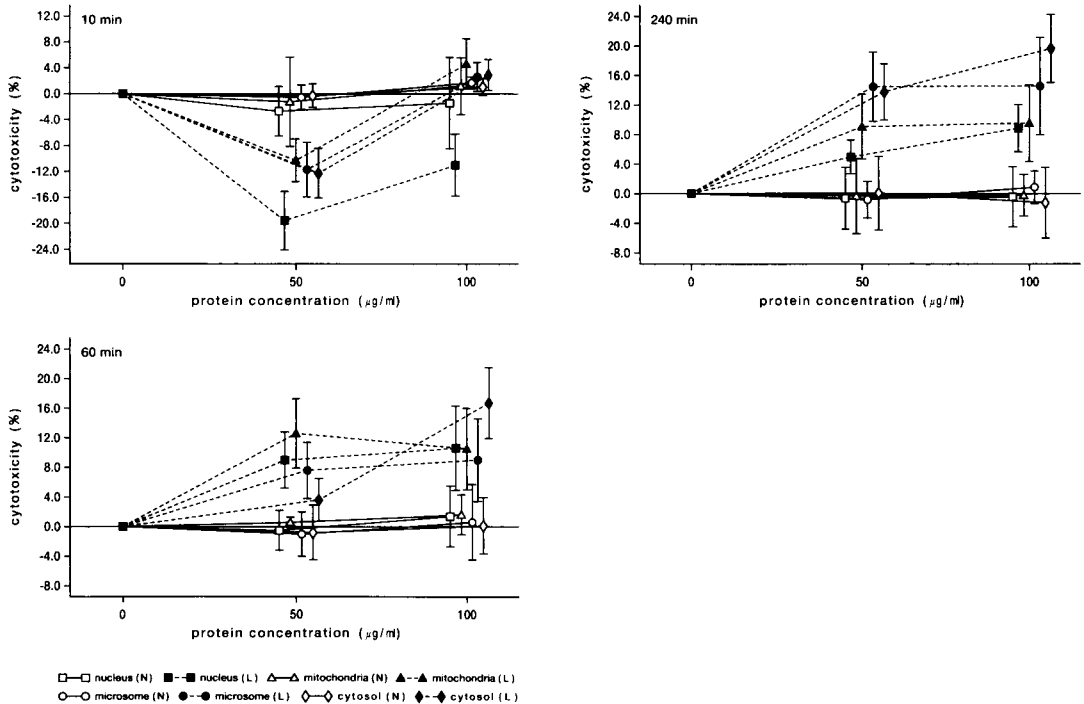


Fig.7 Cytotoxic activity of subcellular fractions of LAK cells and normal spleen cells
 N : normal spleen cells
 L : LAK cells cultured with 8,000 units/ml rIL-2 for 5 days
 These subcellular fractions were tested for cytotoxic activity against fresh syngeneic tumor cells in 10 min, 60 min, or 240 min ^{51}Cr release assay.

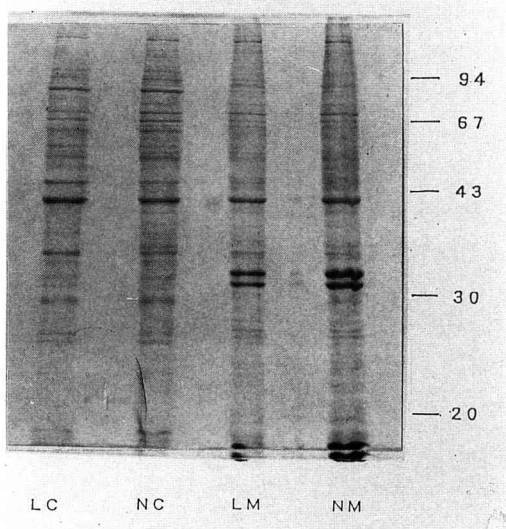


Fig. 8 SDS-PAGE analysis of subcellular fractions of LAK cells and normal spleen cells SDS polyacrylamide slab gel of subcellular fractions. A 80-100 μ l volume of each fraction was an equal volume of 2 \times SDS-PAGE sample buffer and boiled for 3 min. The samples were then applied to a 5 and 12.5% polyacrylamide slab gel.

LC : LAK cell cytosol
 NC : normal spleen cell cytosol
 LM : LAK cell microsome
 NM : normal spleen cell microsome
 NM : normal spleen cell microsome

し、最大値はミトコンドリア画分の12.6%であった。100 μ gの添加では核画分、ミクロソーム画分、細胞質画分が活性の上昇を示し、ミトコンドリア画分ではわずかに低下した。そのうち細胞質画分の50 μ g添加と100 μ g添加では有意な活性の上昇がみられ ($p < 0.01$)、なおかつ16.7%と最大値を示した。240分後の細胞傷害活性は、正常マウス脾細胞では、すべての画分で蛋白濃度を変えても活性を示さなかったのに対し、LAK細胞の細胞内画分では、50 μ g添加と100 μ g添加ともすべての画分で正常脾細胞よりも高値を示した。このうち核画分と細胞質画分の場合では、50 μ g添加と100 μ g添加でいずれも有意な活性の上昇が認められた ($p < 0.05$)。最大値を示したのは細胞

質画分の19.7%であり、ついでミクロソーム画分の14.6%であった (Fig.7, Table2)。

4. SDS-PAGE 電気泳動による細胞内画分の分析

正常マウス脾細胞、LAK細胞のミクロソーム画分、細胞質画分の泳動パターンを比較検討した。その結果、ミクロソーム画分では正常脾細胞とLAK細胞の間に著明な差はみられず、いずれも120 KD, 69 KD, 67 KD, 40 KD, 32 KD, 31 KDの6本のメインバンドが認められた。また細胞質画分の正常脾細胞とLAK細胞で著明な差はみられず、120 KD, 86 KD, 69 KD, 67 KD, 65 KD, 56 KD, 54 KD, 44 KD, 40 KD, 33 KDの10本のメインバンドがあった (Fig.8)。

考 察

生体の癌に対する防御機構の研究は、1963年 Burnet の免疫監視機構¹⁾の概念提唱に始まり、1970年代にはBCGをはじめとした細菌製剤や非特異的免疫刺激物質による腫瘍の治療研究が開始された。さらに1980年代になって、腫瘍宿主間の相互関係をかえることによって癌の治療効果を上げるという、広い意味での免疫療法BRM²⁾という概念が導入されてきた。このBRMは、これまでに知られたBCGなどの免疫賦活剤やeffector細胞、またそれらが産生するサイトカイン、抗体、免疫調節因子など、その範囲は極めて広く多種多彩なものが含まれている。

IL-2³⁾は、活性化されたhelper T細胞やcytotoxic T細胞、およびNK活性を示すlarge granular cellから産生されるリンホカインのひとつで、T cell growth factor (TCGF)といわれていたものである。1976年Morganら¹¹⁾は、骨髓細胞培養にPHAで刺激したリンパ球上清を加えるとT細胞が選択的に増殖することを、またT細胞をこのPHA上清により長期継代培養しうることを報告した。1979年の国際リンホカインワークショップで、このようなTCGF活性を有する可溶性因子をインターロ

イクン2 (IL-2) と呼ぶことが提唱された。さらに1983年, Taniguchiら¹²⁾によってヒトIL-2遺伝子の全塩基配列が決定され, 遺伝子工学的手法によりrIL-2の大量生産が可能となった。

IL-2はT細胞の増殖維持に重要なリンホカインであるが, 1) 抗原と反応したCTL前駆細胞のCTLへの分化を誘導する, 2) NK細胞を増殖させ細胞傷害活性を増強する, 3) LAK細胞を誘導する, 4) B細胞刺激因子としてB細胞の増殖を導く, 5) IFN- γ , リンホトキシン, B細胞刺激因子などのリンホカインの産生を誘導するなど, 多くの生物活性を持っており抗腫瘍免疫, 抗感染免疫機構において重要な役割を果たしていると考えられている。

1981年, 米国National Cancer InstituteのLotzeら⁴⁾, Grimmら⁵⁾のRosenberg一門は, *in vitro*でIL-2と培養した健常人や癌患者の末梢血リンパ球が, NK活性に抵抗性を示す新鮮癌細胞や培養系同種癌細胞に対して, 非特異的に細胞傷害活性を示すことを相次いで報告しLAK細胞と命名した。このLAK細胞は直接腫瘍細胞を破壊することができ, しかもMHCの拘束を受けず, 広い範囲の腫瘍細胞を破壊し, 正常組織の細胞に対しては傷害を与えないという優れた特性を持っていたため, rIL-2でリンパ球を培養してLAK細胞を誘導し, 再び患者へ移入するという養子免疫療法が世界中で試みられている。しかしながら, これまでのLAK細胞の養子免疫療法の成績には偏りが見られ, 様々な問題点が指摘されていることも事実である。それらを大別すると担癌に伴う免疫抑制因子の産生や抑制性マクロファージの関与などの担癌宿主側の要因¹³⁾と, いかにして活性の強いLAK細胞を誘導するかというリンパ球培養方法, 移入する細胞数や投与方法, 移入後のLAK細胞の体内分布動態などのeffector側の要因¹⁴⁾にわけられ, 現在それらについて様々な観点から研究が行なわれている。このような臨床治療を目的とした研究の一

方で, キラー活性を有するリンパ球の標的細胞傷害過程が徐々に明らかにされると同時に, その本体は何かということを解明することは興味のあるところである。そこで今回, 最終effector細胞のひとつであるLAK細胞を誘導し, その細胞内画分の細胞傷害活性について検索した。

LAK細胞とは, NK細胞に抵抗性を示す腫瘍細胞を傷害し, MHC非拘束性で広範囲に腫瘍細胞を傷害する, いわゆるLAK活性を有する細胞と解釈されてもいるが, 本研究では, rIL-2の単独刺激によって誘導した細胞をLAK細胞とすることとした。

LAK細胞の誘導に用いられるリンパ球の由来臓器は, 末梢血リンパ球, 脾細胞, 腫瘍浸潤リンパ球が多い。今回の実験では正常マウスの脾細胞を使用した。マウスを使った実験系では一般的である。担癌と正常の脾細胞では免疫応答が異なると考えられ, 担癌ではLAK誘導に抑制的に働くマクロファージの存在や負の免疫応答¹⁵⁻¹⁸⁾が報告されていることから本研究では正常脾細胞を使用した。

添加するrIL-2濃度は報告によって様々であり, 細胞播種数や培養液の量, rIL-2の製造会社によって異なってくるようである。今回の実験では2000, 4000, 8000単位の3群を設定したが, これは従来の報告と同程度からやや高めの添加濃度である。今回の実験ではLAK細胞の細胞傷害活性は, rIL-2濃度にほぼ比例していた。このことからLAK細胞の細胞傷害活性は, 培養液中に添加するrIL-2の濃度によって決定されると考えられた。

培養日数は8日目までとし, 細胞傷害活性の測定は3日目, 5日目, 8日目の3群について行なったところ, 細胞傷害活性は3日目ですでに出現しており, 5日目にピークがあり, 8日目では低下していた。一般にLAK細胞の細胞傷害活性は, 培養後2~3日目に生じ, 3~5日目に最大を示すようになる。また標的細胞は異なるが, Grimmら⁵⁾によって報告されたLAK活性の誘導の経時的変化とほぼ同様の所見が

観察された。

LAK細胞の前駆細胞についてはT細胞由来、NK細胞由来、およびその両者から由来するという説がある¹⁹⁾。今回の実験ではリンパ球サブセットの検索は行なわなかったが、精製されていない脾細胞が培養日数やrIL-2濃度によって細胞傷害活性が異なることは、LAK細胞の前駆細胞が不均一な幼若リンパ球細胞集団から細胞傷害活性を持った成熟した細胞へ変化したのではないかと推察された。しかしこれについてはさらに検討する必要があると考えられる。

本実験では、LAK細胞の細胞傷害活性の測定として⁵¹Cr release assayを用いた。細胞傷害試験としては他に、マクロファージ遊走阻止試験²⁰⁾、白血球誘導阻止試験²¹⁾、microcytotoxicity test²²⁾などがある。⁵¹Cr release assayは手技も比較的容易で、少量に細胞を用いて定量的な測定が可能であり、再現性も良好といわれている。反面、放射性物質を使用するので取り扱いがやや煩雑で実験の場所が限られるという不便さもある。

LAK細胞の細胞傷害活性を測定する⁵¹Cr release assayの混合培養時間は、多くの場合4時間で行なわれているが、本実験では4時間、8時間では活性が得られず、16時間では自然遊離値が著しく上昇したため適度な細胞傷害活性が得られ、かつ自然遊離値が最大遊離値の30%を越えない12時間を培養時間として実験を行なった。これは今回用いた標的細胞が低抗原性の癌細胞²³⁾で、LAK細胞にlysisされにくいとめと考えられた。

⁵¹Cr release assayのE:T比は、100:1、50:1、25:1の3種類の比率について検討したところ、LAK細胞の細胞傷害活性はほぼE:T比に比例していた。これは阿部²⁴⁾の免疫マウス脾細胞由来の特異的CTLを用いた実験結果と同様であった。これにより、抗腫瘍作用の強弱はeffector細胞の量的大小によって決定されると考えられた。本実験と同種同系の癌細胞を用いた阿部²⁴⁾の報告では、E:T比40:1

で53.6%の細胞傷害活性を示したのに対し、本実験ではE:T比100:1で44.2%であったことから、今回の実験で誘導されたLAK細胞の細胞傷害活性は特異的CTLの半分程度の細胞傷害活性を有していたと思われた。

細胞分画を行なうにあたりLAK細胞を破碎しホモジネートを作製した。細胞の破壊方法としてはホモジナイザーやブレンダーを用いる方法、超音波処理などが一般的である。Ishiura²⁵⁾は、最近注目されているCTLの細胞傷害因子(Perforin)を低張リン酸バッファー中で超音波処理し、2段階のクロマトグラフィーで精製したと報告している。そこで本実験でもこれと同様の操作で細胞を破碎しホモジネートを作製した。

多くのキラー細胞は細胞質に顆粒を含んでいることは以前から知られており、その顆粒が標的細胞との相互作用により放出され、標的細胞傷害の最終段階に作用する因子であると意味付けられてきた^{8,9)}。1984年には、マウスの細胞傷害活性T細胞株のホモジネートから密度勾配遠心法で分離した細胞質顆粒に富んだ分画が、標的細胞の細胞膜に穴をあけることが報告された²⁶⁾。そこで本実験ではLAK細胞の細胞内画分を遠心分離法で分画することにした。

微量活性物質や酵素の活性測定法には、酵素反応の時間経過や酵素濃度と反応速度などの検討を加えるのが一般的である²⁷⁾。そこで本実験では、正常マウス脾細胞の細胞内画分を対照群、LAK細胞の細胞内画分を実験群として、腫瘍細胞に対するそれぞれの細胞内画分の細胞傷害活性を、経時変化と蛋白濃度変化について検討した。

正常脾細胞の細胞内画分は、すべての画分で、全実験時間を通じて活性を示さなかった。LAK細胞の細胞内画分は、腫瘍細胞と混合培養後10分から60分までは、すべての画分で活性の上昇があり、60分から240分までは、ミクロソーム画分と細胞質画分はさらに活性が上昇していた。また、核画分とミトコンドリア画分では活性が減弱していた。これは細胞内画分の

50 μ g, 100 μ gの添加でも同様の傾向であった。このことから、LAK細胞のミクロソーム画分と細胞質画分は、なんらかの細胞傷害活性をもった物質に富んだ画分ではないかと推察された。

細胞傷害活性の蛋白濃度による変化については、正常脾細胞はすべての画分で活性が見られなかった。LAK細胞の細胞内画分は、腫瘍細胞と混合培養後10分では、100 μ gの添加でミトコンドリア画分ですずかに活性を示していた。60分では、50 μ gの添加でミトコンドリア画分が12.6%と最大値を示し、ついで核、ミクロソーム、細胞質画分の順であった。100 μ gの添加では細胞質画分が16.7%と最大値を示し、ついで核、ミトコンドリア、ミクロソーム画分の順であった。240分では、50 μ gの添加でミクロソーム画分が14.5%と最大値を示し、ついで細胞質、ミトコンドリア、核画分の順であった。100 μ gの添加では細胞質画分が19.7%で最大値を示し、ついでミクロソーム、ミトコンドリア、核画分の順であった。これらのことからミトコンドリア画分には、微量で比較的即効性に細胞傷害をもたらす物質が含まれているのではないかと推察された。また、ミクロソーム画分と細胞質画分は、時間の経過に伴って細胞傷害をもたらす物質に富んだ画分ではないかと推察された。

小泉²⁸⁾はPercoll密度勾配を用いた細胞分画により2種類の細胞傷害物質を分離し、それらは異なった顆粒に存在することを報告している。また最近、effector細胞の機能発現にかかわる生理活性物質が次第に明らかにされ²⁹⁾、リンパ球の細胞内における活性物質の局在が異なることが示され、今回の実験からもその可能性が示唆された。

可溶性蛋白質の分離方法としては、塩析、分子ふるい、遠心分離、クロマトグラフィーなどがあり、目的とする蛋白質の性質や特徴によって使い分けられる。遠心分離法は試料溶液のみを遠心する分画遠心法と、溶媒で密度勾配を作ってから遠心する密度勾配遠心法とに大別さ

れる³⁰⁾。分画遠心法の長所としては、比較的温和な条件での処理なので試料に対する機械的、化学的な破損が少ない、試料の損失が少なく分画後の濃度が薄くならない、操作が容易であるなどがあり、反面、異なる粒子を1回の遠心操作で完全に分けることができないといった欠点がある。しかし、細胞成分の分画法としては、欠点に比べて長所が著しいので、本研究では分画遠心法を用い実験を行なった。

細胞成分の分画遠心法の遠心条件は、核画分で概ね600~1,000 \times g, 5分, ミトコンドリア画分で概ね9,000 \times g, 10分, ミクロソーム画分で概ね105,000 \times g, 60分とされている。T細胞の細胞傷害因子について、いち早く研究を進めてきたPodackらの研究グループの一員であるLowreyら³¹⁾は、ヒトLAK細胞から、遠心分離法と密度勾配遠心法を用いて細胞傷害因子を分離し、その性状について詳細に報告している。本研究では、この報告に基づいて分画遠心法の遠心条件を設定し、ミクロソーム画分と細胞質画分は、48,200 \times g, 60分の遠心操作で得られた沈澱と可溶性画分とした。この遠心条件は、一般的な条件よりも低い設定であり、本来の可溶性画分に含まれる細胞成分が、本研究ではミクロソーム画分に混入した可能性も否定できない。今回の実験では、ミクロソーム画分と細胞質画分に含まれる活性物質が同一物質かどうかはわからなかった。これは分画遠心法の分離精度と遠心条件によると考えられ、crudeな分画を用いた実験では得られた現象を総合的にとらえ何らかの傾向をつかむことが肝要と思われた。

SDS-PAGEによる泳動パターンの解析では、正常脾細胞とLAK細胞のミクロソーム画分には6本のメインバンドがあり類似したパターンが示された。また、それらの細胞の細胞質画分には10本のメインバンドがありパターンは類似したものだ。crudeな分画のSDS-PAGEによる分析では、そのcrudeな中でも優勢に含まれる蛋白質がまずはじめに検出される。正常脾細胞とLAK細胞との間で差が見られなかつ

たのは、細胞を構成する主要な蛋白成分は正常脾細胞とLAK細胞は互いに類似したものであり、LAK細胞に含まれる細胞傷害因子が微量で作用すると考えられ、生理活性物質のもつ一面を裏付けするものだった。

生体の免疫応答は全身と局所で異なることや、腫瘍拒絶が免疫担当細胞間の複雑な作用によってもたらされることなど³²⁾、こういった生理活性物質だけでは説明のつかないことも多く、今後の研究が必要と思われた。

結 論

近交系WHT/Htマウスの正常脾細胞からin vitroでLAK細胞を誘導し、LAK細胞の細胞内画分について⁵¹Cr release assayを行なったところ、次のことが明らかになった。

1. LAK細胞の細胞傷害活性は培養後3日目ですでに現れ、培養5日目rIL-2濃度8000単位、E:T比100:1のとき44.2%で最大だった。一方、新鮮正常脾細胞は活性を示さなかった。
2. LAK細胞の細胞傷害活性はE:T比とrIL-2濃度にほぼ比例していた。
3. LAK細胞には局在の異なる2種類またはそれ以上の細胞傷害活性物質があり、それらはミトコンドリア画分と、ミクロソーム、細胞質画分に含まれていた。
4. ミトコンドリア画分には微量で比較的即効性に作用する活性物質が含まれており、ミクロソーム画分と細胞質画分には蛋白質質量と時間に伴って作用する活性物質の存在が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇意なる御指導と御校閲を賜りました恩師関山三郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始御親切な御指導、御鞭撻を頂いた当講座結城勝彦助教授に衷心より感謝の意を表します。近交系WHT/Htマウスを提供して下さいました東北大学医学部放射線医学講座坂本澄彦教授に深謝いたします。更に、研究の場を提供して下さいました本学歯

学部口腔化学講座太田稔教授に深謝いたします。また、本研究の遂行に際し、たび重なる御助言を頂きました同講座教室員各位に深謝いたします。併せて口腔外科学第二講座医局員各位に心より謝意を表します。

本論文の要旨は、1992年11月20日第37回日本口腔外科学会総会において発表した。

参 考 文 献

- 1) Burnet, M.: Immunological factors in the process of carcinogenesis, *Brit. med. Bull.* 20: 154-158, 1964.
- 2) Oldham, R.K.: Biological response modifiers. *JNCI* 70: 789-796, 1983.
- 3) 羽室潤爾: インターロイキン。第一版講談社サイエンティフィック, 東京, 86-126ページ, 1984.
- 4) Lotze, M.T., Grimm, E.A., Mazumder, A., Strauzer, J.L., and Rosenberg, S.A.: Lysis of Fresh and cultured Autologous Tumor by Human Lymphocytes cultured in T-cell Growth Factor. *Cancer Res.* 41: 4420-4425, 1981.
- 5) Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z., and Rosenberg, S.A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon, Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155: 1823-1841, 1982.
- 6) Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J.T., Seipp, C.A., Simpson, C., and Reichert, C.M.: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 313: 1485-1492, 1985.
- 7) Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Change, A.E., Avis, F.P., Leitman, S., Linehan, W. M., Roberston, C.N., Lee, R.E., Rubin, J.T., Seipp, C. A., Sympton, C.G., and White, D.E.: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 316: 889-897, 1987.
- 8) Adelstein, E.H., Barret, B.A.-L., and Senhauser, D.A.: Ultrastructure of lymphocyte tumor cell interaction with localization of cell-bound antibody by ferritin labeling. *Cancer Res.* 36: 302-308, 1976.

- 9) Matter, A.: Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*. 36: 179 - 190, 1979.
- 10) 菊池浩吉: ^{51}Cr 標識細胞傷害試験, 日本免疫学会編: 免疫実験操作法IV 第1版, 前田印刷, 金沢, 349 - 351 ページ, 1972.
- 11) Morgan, D.A., and Ruscetti, F.W.: Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193: 1007 - 1008, 1976.
- 12) Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. and Hamuro, J.: Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302: 305 - 310, 1983.
- 13) 西岡安彦, 曾根三郎, 小倉剛: 特集I 免疫学的排除機構からのエスケープ, IL-2 応答性と癌による免疫回避機構: 臨床免疫, 22: 199 - 208, 1990.
- 14) 田口鐵男, 木本安彦: インターロイキン2, 特集: BRM-癌への臨床応用の現状と展望, 最新医学 42: 325 - 331, 1987.
- 15) Fukazawa, H.: Immune responses of lymphocytes to spontaneous carcinoma cells of mice. *J. Iwate Med. Ass.* 32: 911 - 916, 1980.
- 16) 船木康博: マウス自然発生癌可溶性抗原に対するリンパ球の免疫応答に関する研究, 岩医大歯誌, 12: 24 - 34, 1987.
- 17) 小野実: マウス自然発生癌の可溶性抗原の性状に関する研究, 岩医大歯誌, 13: 283 - 289, 1988.
- 18) 宮野敦志: マウス自然発生癌の腫瘍抗原の免疫原性に関する研究, 岩医大歯誌, 14: 6 - 16, 1989.
- 19) 押味和夫: LAK細胞の多様性, 臨床免疫, 21: 633 - 642, 1989.
- 20) 杉山知之, 中川潤, 村井裕夫: マクロファージ遊走阻止試験 (MIT), 臨床病理, 45: 22 - 23, 1981.
- 21) 杉山知之, 中川潤: LIFの測定, 矢田純一, 藤原道夫: 新リンパ球機能検索法, 第1版, 中外医学社, 東京 140 - 146 ページ, 1987.
- 22) 菊池浩吉: Microplate による Microcytotoxicity test. 日本免疫学会編: 免疫実験操作法IV 第1版, 前田印刷, 金沢, 360 - 361 ページ, 1972.
- 23) Hewitt, H.B., Blake, E.R. and Walder, A.S.: A critique of the evidence for active host defense against cancer, based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin. *Br. J. Cancer*. 33: 241 - 259, 1976.
- 24) 阿部美智夫: 特異的, 非特異的免疫賦活時におけるマウス自然発生癌の免疫応答, 岩医大歯誌, 16: 15 - 24, 1991.
- 25) Ishiura, S., Anraku, H., Kamo, I., Koizumi, H., Arahata, K. and Sugita, H.: Isolation of a Ca-dependent erythrolytic protein (Perforin) from cytotoxic T-lymphocytes. *J. Biochem.* 102: 9 - 12, 1987.
- 26) Podack, E.R. and Konigsberg, P.J.: Cytotoxic T cell granules; Isolation, biochemical and functional characterization. *J. Exp. Med.* 160: 695 - 710, 1984.
- 27) 高河原勇: 活性測定法-酵素反応速度論, 堀尾武一, 山下仁平編: 蛋白質・酵素の基礎実験法, 第一版, 南江堂, 東京, 383 - 408 ページ, 1981.
- 28) 小泉宏隆: 細胞傷害性Tリンパ球に存在する細胞傷害分子, パーフォリンおよびセリンエステラーゼの生化学的特性, アレルギー 38: 41 - 48, 1989.
- 29) 中嶋啓雄, 山口希: 分子レベルにおける免疫系細胞の生体防御機構; 細胞傷害活性T細胞, ナチュラルキラー細胞の機能発現にかかわる酵素および生理活性物質, 医学のあゆみ, 153, 189 - 193, 1991.
- 30) 桂 勲: 遠心法, 日本生化学会編: 新生化学実験講座1; タンパク質I, 分離・精製・性質, 第一版, 東京化学同人, 東京, 131 - 142 ページ, 1990.
- 31) Lowrey, D.M., Hameed, A., Lichtenheld, M., and Podack, E.R.: Isolation and characterization of cytotoxic granules from human lymphokine (interleukin 2) activated killer cells. *Cancer Res.* 48: 4681 - 4688, 1988.
- 32) 高橋 衛: マウス自然発生癌の腫瘍内浸潤リンパ球に関する研究, 岩医大歯誌, 17: 16 - 32, 1992.