

# 抗胸腺細胞血清のリンパ球諸反応に及ぼす影響

岡山大学医学部第一外科教室（指導：田中早苗教授）

小 川 潔

〔昭和52年7月7日受稿〕

## 緒 言

すでに寺田<sup>1)</sup>は Methylcholanthrene をマウスの背部皮下に注射する発癌実験において、注射後1、2週の早期より脾細胞中の羊赤血球に対する溶血斑形成細胞数が減少し、発癌時を越えて長く持続することを明らかとしている。この溶血斑形成細胞は Miller, Mitchell, Nossal らの研究により抗体産生細胞に分化増殖する骨髄由来細胞 (B-細胞) であるが、これが分化増殖して抗体産生細胞になるためには胸腺由来の T-細胞がいわゆる helper cell として協力する必要があることが証明されている。<sup>2-4)</sup> 他方 Burnet や Thomas らにより免疫監視機構<sup>5)</sup> (immunological surveillance system) を哺乳類だけが有していて、体細胞とは異った抗原構成をもつ細胞たとえば癌細胞をこの機構が非自己と認識して拒絶消去するという概念が提起され、大方の承認をえている。この免疫監視機構の中核は胸腺依存性の T-リンパ球が占めるとされている。寺田の発癌実験における溶血斑形成細胞数の低下は、T-リンパ球の障害によることが考えられよう。発癌後、自家腫瘍にたいして抗腫瘍性 (concomitant immunity) がまず局所リンパ節に生じ次第に増強するが、あるレベルを越えて腫瘍が増大すると抗腫瘍性が低下消失してくる。<sup>6)</sup> 自然発生乳癌マウスでは乳癌が体重の 1/10 を越えて増大してくると、抗腫瘍性が低下してくる。<sup>7)</sup> 人癌においてもほぼ同様なことが言えるものと考えられる。<sup>8)</sup> この抗腫瘍性をしめす免疫学的指標として in vitro では標的自家腫瘍細胞にたいす

るリンパ球の殺細胞テスト、抗原刺激により免疫リンパ球の放出する lymphokines, 就中マクロファージ遊走阻止因子や白血球遊走阻因子の測定が行われている。<sup>9)</sup> また、これら特異的細胞性免疫の基盤である T-リンパ球を中心とした細胞の非特異的機能の検査も良い指標となる。非特異的免疫能も進行癌では低下してくる。PPD によるツベルクリン反応をはじめとする recall antigens による皮内反応、DNCB による接触性過敏性反応、in vitro での phytohemagglutinin や concanavalin A, poke weed mitogen などにたいするリンパ球の幼若化反応が細胞性免疫の非特異的機能をしめす指標として賞用されている。<sup>9)</sup>

以上の免疫学的指標はいずれも T-リンパ球が中心をなすものと一般に考えられているが、十分に証明されているわけではない。本論文においては、これら非特異的、特異的細胞性免疫に T-リンパ球がやはり主体を占めていることを、T-リンパ球にのみ作用することが認められている phytohemagglutinin と抗胸腺細胞血清を用いて明らかにしたので報告する。

## 実験材料ならびに実験方法

### 1. 実験動物

岡山大学マウスコロニー及び藤井医化学試験動物取扱所よりえた成熟 AKR マウス (体重 20 g 前後のもの)、生後 2 週前後 C<sub>3</sub>H マウス、生後 2 週前後の DDS マウス、200~500 g の雑系モルモットおよび 2 kg 前後の雑系家兎を用いた。

## 2. 実験腫瘍

岡山大学癌源病理部門でCbマウスの腹腔内で継代移植された Ehrlich 腹水癌細胞を用い、腹腔内継代5~7日目の純培養状態のものを $500 \times 10^4$ コ C<sub>3</sub>H系マウスの背部皮下に移植する。同じく癌源病理部門で Ehrlich 癌細胞より株化された JTC-11細胞<sup>10)</sup>は、20%牛血清加 YLE 培養液で継代維持する。

## 3. 溶血斑形成細胞 (PFC) 数の測定法

### (1) 感作法

採血後14日以内の綿羊脱線維血 (日本バイオテスト, 椎橋製) をマウス尾静脈より注射する。3回生理的食塩水を同量加え、3000 RPM 5分間遠沈してえた洗浄羊赤血球を生理的食塩水で $4 \times 10^9$ /mlに調整し、その0.2mlを尾静脈より注射して感作する。

### (2) PFC 数の算定法<sup>11)</sup>

感作翌日を第1日として、日を追って5~10匹ずつのマウスを屠殺し、無菌的に脾臓摘出する。冷い Eagle 液 (MEM) 中で細切した脾臓を30分静置後#80メッシュで濾過する。濾液を10分間遠沈 (1000 RPM) して、Eagle 液に浮遊させ脾細胞浮遊液をつくる。クリスタル紫にて脾有核細胞数を200~500× $10^4$ /mlに調整する。脾細胞浮遊液1mlと2倍濃度の Eagle 液4mlと45℃に温めた1.4% Difco agar (DEAE-Dextran 1mg/ml加) を混和し、さらに Eagle 液で4倍に希釈した抗原羊赤球1mlを加え、静かに混和する。1.4% bottom layer agar 上に3.5mlずつ均等に広げ一検体につき3枚の試料を同時に作製する。1時間37℃に保温し、モルモット血清を Eagle 液で10倍に希釈して各試料上に静かに加え、更に37℃30分加温後室温に3時間放置し、溶血斑数を肉眼的に数え、脾有核細胞数 $10^6$ 当りの溶血斑数を算定する。

### 4. 脾細胞の細胞分画法

木下<sup>11)</sup>の方法に準ずる。日本薬局法アラビアゴム末30gを蒸留水100mlに加温溶解し、3000 RPM 15分間遠沈して上清を採取する。食塩0.2% W/V, EDTA-Na<sub>2</sub>0.1% W/Vを加え、飽和 NaOH にて PH 7.4に補正する。このアラビアゴム原液を生理的食塩水で希釈し、ボームの浮秤で比重を測定し (15℃), A液 (比重1.072), B液 (1.068), C液 (1.064), D液 (1.045) を作製する。遠沈管にA液, B液, C液, D液各1mlを静かに重層させ界面をつくる。脾細胞浮遊液は局方ガーゼ2枚で濾過して ACD 液に浮遊させたものを4ml D液上に重層する。冷却遠心分離器を用い、5500 RPM (3300G) 15分遠沈すると

リンパ球個々の細胞比重に応じて境界面に明瞭な層を形成する。D液とC液との界面層をI分画, CとBとの間をII分画, BとAとの間をIII分画とする。I~III分画をそれぞれ採取し、冷 Eagle 液にてアラビアゴムを洗浄し1500 RPM 15分間遠沈する。この操作を3回繰り返してI~III分画脾細胞として試料に供する。

## 5. Phytohemagglutinin (PHA) の調整法

Phytohemagglutinin-M (Difco) を Eagle 液5mlに溶かしたものを100% PHAとして用いた。使用に先だち綿羊血液遠沈沈渣 (3000 RPM, 5分) 1mlを加えて、4℃12時間静置した。

## 6. 抗胸腺細胞血清 (ATS) の作製法

### (1) 同種抗胸腺細胞血清 (ATS) の作製

J. C. Cerotini<sup>12)</sup>の方法により、AKR成熟マウスに1週間隔で3回免疫する。幼若 C<sub>3</sub>H マウスの胸腺を生理的食塩水中で細切して30分静置後メッシュでこして、1000 RPM 10分遠沈し生理的食塩水に再浮遊する。 $10^6$ コ生胸腺細胞を腹腔内に注射する。第1回目免疫に際しては、北里研究所高津先生より供与された百日咳ワクチンを $10^8$ 菌体/マウスの割でアジュバントとして加える。3回目免疫より1週後に採血し3000 RPM 10分間遠沈し血清分離して-20℃に保存する。これを同種 AKR 抗 C<sub>3</sub>H ATS 原液とする。

### (2) 異種抗胸腺細胞血清 (ATS) の作製

R. H. LEVEY<sup>13)</sup>の方法に準ずる。幼若 DDS マウスより胸腺細胞を採取し生理的食塩水に浮遊させる。 $10^6$ コ生胸腺細胞を家兎耳静脈より注射し、2週間後同量の胸腺細胞を静脈注射する。2回目免疫より1週後採血する。血清分離後56℃30分加熱し、非動化して、-20℃保存する。赤血球での吸着は行わない。

### (3) 抗胸腺細胞血清による細胞の前処理法

Micro-cytotoxicity test<sup>14)</sup>に準ずる。リンパ球浮遊液 ( $1 \times 10^6$ /ml) と同量の ATS を加えて室温30分静置後、1000 RPM 10分遠沈し、上清を捨て生理的食塩水を加え洗い再び遠沈 (1000 RPM, 10分) 上清をすてる。最終濃度10倍希釈モルモット補体を加え、20分37℃を保つ。4℃で遠沈して補体を除き、ATS 処理リンパ球とする。

## 7. PHA および ATS の各種免疫機能に及ぼす影響

### (1) PHA 処理による脾細胞の PFC 数の変化

20%子牛血清加 Eagle 液10mlにPHA最終濃度2%, 1%, 0.1%となるように調整し、脾細胞浮遊液1mlを加えて37℃3時間加温する。Eagle 液で

2回洗浄し1000 RPM 10分間遠沈して上清を除きPHA 処理脾細胞浮遊液とする。緬羊赤血球による感作、非感作対照 AKR マウス脾細胞を経日的に採取し、PHA で処理し、それぞれの PFC 数を測定する。

(2) PHA 処理による脾細胞分画の PFC 数の変化  
上述の PHA 処理脾細胞と同様な方法で感作および非感作 AKR マウス脾細胞分画を PHA で処理し、それぞれの分画について PFC 数を測定する。

(3) 抗胸腺細胞血清 (ATS) の in vitro での細胞障害性

テラサキの Micro-cytotoxicity test<sup>15)</sup>に準じた。流動パラフィンを各 well に約 1  $\mu$ l 注入する。次いで段階的に希釈した ATS、正常 AKR マウス血清あるいは家兔正常血清を 1  $\mu$ l あて各 well に注入し、 $-20^{\circ}\text{C}$  に保存する。

胸腺細胞 (T-細胞) は、エーテル麻酔屠殺後胸腺摘除し生理的食塩水中にて細切30分浮遊させ、メッシュで濾し 1000 RPM 10分遠沈して採取する。Barbital Buffer (PH 7.2) に浮遊させ  $1 \times 10^6/\text{ml}$  に調整する。

脾細胞 (S-細胞) リンパ節細胞 (L-細胞) は、胸腺細胞と同様の処理を行い  $1 \times 10^6/\text{ml}$  に調整する。

骨髄細胞 (B-細胞) は大腿骨髄組織を生理的食塩水に30分浮遊させ、胸腺細胞と同様の処理を行い  $1 \times 10^6/\text{ml}$  に調整する。

調整した各細胞を用意してあるプレートの各 well に 2  $\mu$ l 分注し、振盪混和後30分室温に静置する。Barbital Buffer を約 3  $\mu$ l 注入して室温10分静置する。上清を捨てた後、モルモット補体を Barbital Buffer で5倍に希釈して 2  $\mu$ l 分注する。振盪混和後20分  $37^{\circ}\text{C}$  に保つ。5分間  $4^{\circ}\text{C}$  を保ち反応を止める。上清を捨てた後、2% EDTA を加えた 0.3% トリプンブルー液約 3  $\mu$ l 注入して振盪混和後室温に5分静置してリンパ球を沈める。倒立顕微鏡にて染色性より生死の判定をし、0%より100%まで11段階に分けた。

(4) ATS 処理による PHA リンパ球幼若化反応の変化

ATS 処理は Terasaki の Microcytotoxicity test に準ずる。(上述 6-(3))

リンパ球は  $\text{C}_3\text{H}$  マウスのリンパ節より採取し、三輪<sup>16)</sup>の方法に準じて PHA 幼若化反応を行う。 $\text{C}_3\text{H}$  マウスを屠殺し、無菌的に腋窩、頸部、鼠径部のリンパ節を摘出し、Hanks 液中で細切し室温で30分間放

置する。よく攪拌後 #150 メッシュで濾過し、濾液を 1000 RPM 10分間遠沈する。上清を除去し、再び Hanks 液を加え遠沈し  $10^6/\text{ml}$  になるよう Hanks 液に浮遊させる。98%以上生存しているものを実験に供する。浮遊液中の95%が小リンパ球である。ATS 処理あるいは非処理のリンパ球  $10^6/\text{ml}$  を PHA-M 1% (v/v) 加 20% 仔牛血清 TC-199 で72時間、 $37^{\circ}\text{C}$  で静置培養後、塗沫標本をつくり、May-Giemsa 法で染色後 at random に100個のリンパ球を数えて、 $8 \mu \times 8 \mu$  以上の中大リンパ球の頻度を PHA 幼若化率とする。

(5) ATS 処理による脾細胞 PFC 数の変化

緬羊赤血球による感作あるいは非感作  $\text{C}_3\text{H}$  の脾細胞を上述のごとく ATS で処理し、Cunningham<sup>17)</sup>の方法に準じて PFC 数を測定する。

(6) ATS 処理による担癌マウス・リンパ球のマクロファージ遊走阻止活性 (MIF) の変化

Ehrlich 腹水癌細胞  $500 \times 10^4$  個/匹を5匹の  $\text{C}_3\text{H}$  マウスの背部皮下に移植し5日目の局所腋窩リンパ節細胞を前述の如く採取し、ATS 処理、非処理のものをつくる。MIF の測定は湯村、内田ら<sup>18)</sup>の方法に準拠する。Ehrlich 癌細胞を Hanks 液で洗浄の後 1g あたり Hanks 液 5ml を加えて  $20^{\circ}\text{C}$ 、7チップ、150mA で10分間超音波破壊する。3000 RPM 30分遠心してその上清を抗原原液としアンブルに分注して  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存する。MIF 測定時に蛋白濃度 100 mcg/ml 前後の至適添加抗原量に希釈する。指示細胞にはモルモットの腹腔内浸出細胞を用いる。4~6日前に滅菌流動パラフィン 20ml を腹腔内に注射したモルモットを脱血、屠殺し、Hanks 液で腹腔を洗浄する。洗浄液を 800 RPM、5分、250 G で遠沈し、上層のパラフィンを吸引除去し、下層の腹腔内浸出細胞を Hanks 液で 2~3 回洗浄する。60% がマクロファージであるが、これを 20% 仔牛血清加 TC-199 (Cephalothin 100  $\gamma/\text{ml}$  含有) 中に  $2 \sim 5 \times 10^6/\text{ml}$  に浮遊させる。抗原液、リンパ球浮遊液、腹腔浸出細胞浮遊液の調整の完了後に、毛細管直接法で MIF を以下のごとく測定する。リンパ球浮遊液と腹腔内浸出細胞浮遊液を 1:4 に混合し、一端を閉鎖したヘマトクリット毛細管に引圧法で充満し、250 G、5分遠沈する。毛細管を細胞層と上清の境で切断し、細胞層の毛細管開口部を内側に向け、2本づつを容量 1ml の Mackness 型の極小シャーレの底にシリコン・グリースで固定し、抗原添加培養液を充たしカバー・ガラスでふたをし、 $37^{\circ}\text{C}$ 、24時

間培養する。対照には抗原非添加培養液を充たす。培養終了時に毛細管端より遊走してくる扇形の遊走細胞の面積を測定する。

$$\frac{\text{抗原添加時の遊走面積}}{\text{抗原非添加時の遊走面積}} \times 100 (\%)$$

を遊走指数 (Migration index, MI 値) とし、一検体につき 2~4 本の遊走面積の平均値をとり、MI 値が 85% 以下を MIF 陽性とする。

(7) ATS 処理による担癌マウス・リンパ球の殺腫瘍作用の変化<sup>1)</sup>

MIF 測定の場合と同様に Ehrlich 癌細胞移植 10 日目の局所腋窩リンパ節を 5 匹の C<sub>3</sub>H マウスより採り、リンパ節細胞を同種 ATS で処理し、20% 仔牛血清加 YLE 液で  $8 \times 10^5$ /ml とする。リンパ球浮遊液 5 ml に JTC-11 細胞  $2 \times 10^4$ /ml, 5 ml を加えて、最終混合総量を 10 ml とする。この 1.5 ml づつをとって 6 本の短試験管に分注し、37°C で 24, 48 時間静置培養する。培養終了時に 3 本づつの短試験管を任意にとり出し、培養液を捨て、1.5 ml のクリスタル紫をそれぞれ加えて 37°C, 30 分間加温する。ついで、短試験管の管壁に付着している細胞をラバー・クリーナーで剥脱させ、よく混ぜて均一の細胞浮遊液をつくる。この浮遊液の一滴を Bürker-Türk の血球計算盤にとり、1 本の短試験管につき 6 回以上 JTC-11 細胞数を算定する。3 本の短試験管内の JTC-11 細胞数の平均値を JTC-11 細胞数とする。

表 1 PHA 処理による脾細胞の PFC の変化

PHA 濃度 (%)	感作後日数									
	1	2	3	4	5	6	7	9	14	
0 (対照)	0.1	1.4	5.5	15	4.5	3.0	2.5	2.5	0.6	
0.1	3.4	2.8	7.4	19	5.8	2.2	1.4	0.8		
1	2.5	2.4	9.2	32	6.4	2.2	3.0	0.9		
2	3.4	2.6	8.4	56	4.8	4.1	2.5	1.8	1.2	

## 実験結果

### 1. PHA 処理による脾細胞の PFC 数の変化

PHA 非処理対照群では、PFC は経日的に増加し、第 4 日を頂点として再び減少する。PHA 処理群では、第 1 日では付加 PHA 濃度には関係なく、対照群の 2~3 倍の PFC 増加を示す。第 2, 3 日では同様に約 2 倍の PFC 増加を示す。第 4 日では付加 PHA 濃度に応じて、0.1% では約 1.5 倍、1% では 2 倍、2% ではほぼ 4 倍の PFC 増加を示している。第 5 日以後は一定の傾向を示さない (表 1)。

### 2. PHA 処理による脾細胞分面の PFC 数の変化

I, II, III 各分面細胞数は、非感作対照ではほぼ同数であるが、羊赤血球による感作第 5 日目より、III 分面細胞数が I 分面細胞数より多くなる。

I~III 分面細胞を混合したのみの対照は、第 4 日を頂点とする PFC を示す。

I 分面のみを 2% PHA 処理し、PHA 非処理 II, III 分面を加えたものを I 分面 PHA 処理として用い、同様に II 分面 PHA 処理、及び III 分面 PHA 処理の試料を作製すると、感作第 4 日目では第 III 分面 PHA 処理は第 I 分面 PHA 処理のほぼ 2 倍の PFC を示す (図 2)。

### 3. 抗胸腺細胞血清 (ATS) の in vitro での細胞障害性

#### (1) 同種 AKR 抗 C<sub>3</sub>H マウス ATS の細胞障害性

同種 AKR 抗 C<sub>3</sub>H マウス ATS は C<sub>3</sub>H マウスの胸腺細胞を 2 倍稀釈で 100% 障害する。4 倍稀釈では 90%, 8 倍稀釈で 80%, 16 倍稀釈で 70%, 32 倍稀釈で 30%, 64 倍稀釈で 10% 障害する。128 倍, 256 倍稀釈 ATS は胸腺細胞を障害しない。骨髄細胞に対しては、同種 ATS は全く障害作用を示さない。脾細胞に対しては、16 倍稀釈までの濃度の ATS が 30% の障害作用を示すが、64 倍稀釈では障害を示さない。

対照として用いた AKR マウス正常血清では胸腺、骨髄、脾いずれの細胞も障害をうけない。以上より同種 AKR 抗 C<sub>3</sub>H マウス ATS は、C<sub>3</sub>H マウスの T

(PFC/10<sup>6</sup>脾細胞)

細胞に特異的であると考えられる。

#### (2) 異種家兎抗マウス ATS の細胞障害性

表 2 PHA 処理による脾細胞分面の PFC の変化

PHA 処理の分面	感作後日数			
	2	3	4	5
I	1.40	7.2	6.2	10.5
II	0.43	3.0	2.1	8.5
III	0.65	8.8	12.0	13.0
対照 (無処理)	0.65	11.7	40.0	17.1

図1 ATSの胸腺細胞に対する細胞障害性

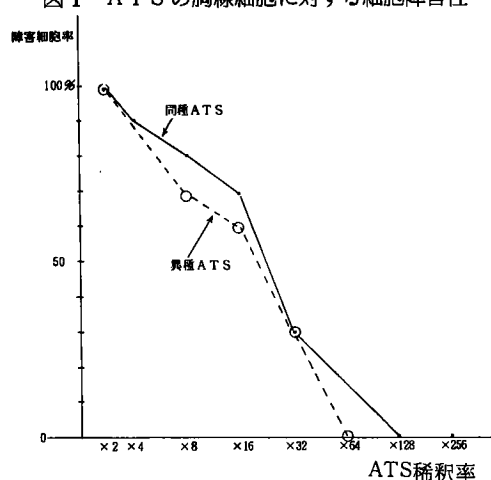
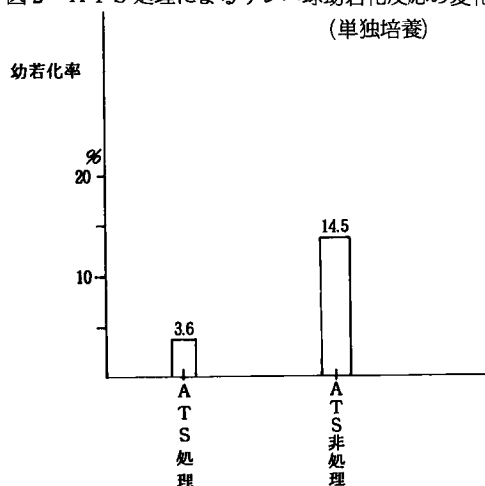


図2 ATS処理によるリンパ球幼若化反応の変化 (単独培養)



異種家兔抗マウスATSも同種ATSと同様の特異性を示した。DDSの胸腺細胞は2倍稀釈の異種ATSで100%障害される。16倍稀釈では60%、32倍稀釈では30%障害されるが、それ以下の濃度では障害されない(図1)。脾細胞は16倍稀釈異種ATSで30%の障害をうける。リンパ節細胞は16倍稀釈までは30%の障害をうける。骨髄細胞も16倍稀釈までは30%の障害をうける。以上より異種家兔抗マウスATSはB細胞にも多少細胞障害性を示すといえる。

4. ATS処理によるPHAリンパ球幼若化反応の変化

同種ATS処理後のC<sub>3</sub>Hマウス脾のリンパ球単独培養での幼若化率は、3.6%とPHA加ATS非処理対照群の14.5%に比較して低い値を示す(図2)。

5. ATS処理による脾細胞PFC数の変化

図3 ATS処理によるPFCの変化

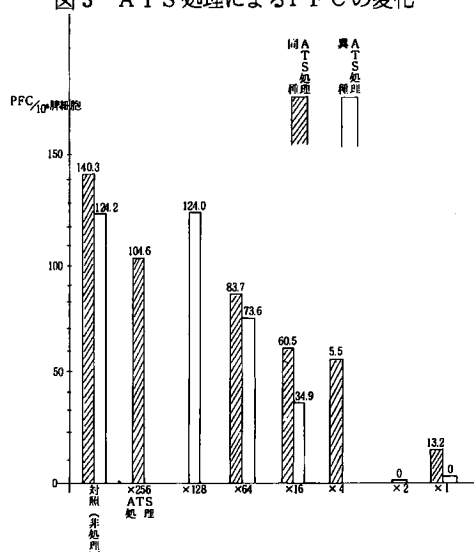
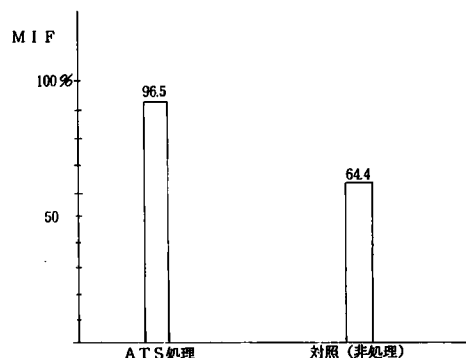


図4 ATS処理によるMIFの変化

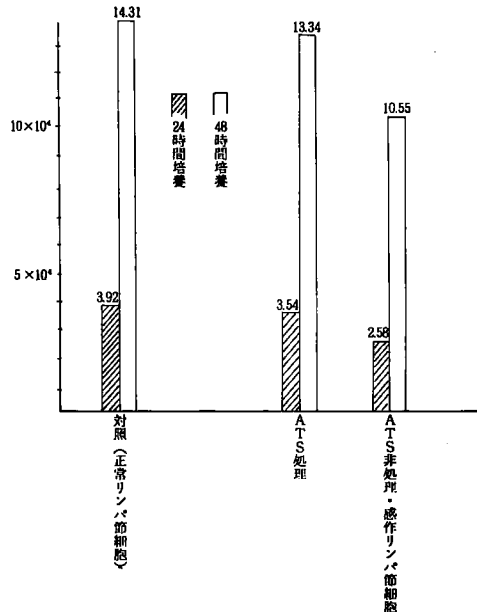


(1) 同種AKR抗C<sub>3</sub>HマウスATS処理による変化  
ATS非処理対照では、10<sup>6</sup>脾細胞当たり140.3となるに比較して、稀釈しない同種ATS処理ではPFCは13.2/10<sup>6</sup>脾細胞と著しく減少した。同種ATSを4倍稀釈として処理すればPFCは55.0となり、16倍稀釈すれば60.5になり、64倍稀釈すれば83.7と漸増する。256倍稀釈同種ATSを用いればPFCは104.6とほぼ対照に近い値を示す(図3)。

(2) 異種家兔抗マウスATS処理による変化

異種ATSを用いた場合も同様の傾向を示す。異種ATS原液及2倍稀釈液の処理でPFCをゼロにする強い障害性を示す。16倍稀釈異種ATS処理ではPFCは34.9であり、64倍稀釈では73.6、128倍稀釈では124.0となり、ATS非処理対照PFCの123.2と近似の値を示す(図3)。

図5 ATS処理による担癌マウスリンパ球の殺腫瘍作用の変化



#### 6. ATS処理による担癌マウスリンパ球のマクロファージ遊走阻止活性 (MIF) の変化

Ehrlich 癌移植後5日目のリンパ節リンパ球ではMI 64.4%と強いMIF活性がみられる。これに反して異種ATS処理群では96.5%と非感作リンパ節細胞群と同様MIFが陰性となる(図4)。

#### 7. ATS処理による担癌マウスリンパ球の殺腫瘍作用の変化

Ehrlich 癌細胞移植10日目の局所腋窩リンパ節細胞をJTC-11細胞に加えて24, 48時間培養すると、それぞれ1mlあたり $2.58 \times 10^4$ ,  $10.55 \times 10^4$ 個と増殖が抑えられているが、同種ATSで処理した局所腋窩リンパ節細胞を加えるとそれぞれ $3.54 \times 10^4$ ,  $13.34 \times 10^4$ 個と殺腫瘍効果が減弱し、非処理正常マウスリンパ節細胞混合培養時の $3.92 \times 10^4$ 個,  $14.31 \times 10^4$ 個に近づいている(図5)。

### 考 按

リンパ球は免疫担当細胞として分化し、T-細胞とB細胞に二大別されることは周知である。そして一般には、免疫応答もT細胞によるものが細胞性免疫、B細胞の産生する血清抗体によるものが液性免疫と二大別されている。しかし、免疫生物学の細胞レベルを中心とした近年のめざましい研究により、両種の免疫現象は抗原認識の段階から免疫反応発現など

の各段階において相互に影響しあう非常に複雑なものであることが明らかにされている。T, B細胞の協働による免疫反応の典型例が溶血斑形成細胞(PFC)の産生である。Claman<sup>20)</sup>らはX線照射同系マウスに胸腺あるいは骨髄細胞をそれぞれ単独に、またはこれらを混合して移入し、羊赤血球で免疫後に出現するPFC数を測定している。胸腺あるいは骨髄細胞を単独移入したのでは溶血抗体の産生は認められないが、両者を混合して移入すると著明な抗体産生が生じてくる。その後、抗血清やT<sub>H</sub>クロモゾーム・マーカーの使用によって、PFCは骨髄細胞(B-細胞)であることが明らかとされている。羊赤血球に寛容となっているT-細胞はB-細胞の羊赤血球にたいする反応を促進できないことから、T-細胞にも抗原特異性のあることが証明されている。B細胞の抗体産生を助けるという意味で、かゝるT細胞はhelper T細胞と呼ばれている。

1960年Nowell<sup>21)</sup>がインゲン豆(Phaseolus Vulgaris)の抽出液が人末梢血リンパ球の幼若化、細胞分裂を促すことをみて以来、種々のレクチンがリンパ球を非特異的に幼若化せしめることが知られ、mitogenの中に一括されている。これら非特異的mitogenはT細胞のみを活性化、幼若化させるT-cell mitogenとB細胞のみを特異的に活性化するB-cell mitogenに大別されている。T-cell mitogenとしてはconcanavalin Aと共に上述のインゲン豆よりの抽出物であるphytohemagglutinin(PHA)が代表的なものであり、T細胞の細胞膜に結合して1-2分から、1時間内に代謝が亢進して、20時間後にはDNA合成が促進され、リンパ球は幼若化し大型のリンパ芽球様となり、36時間前後で分裂する。

他方、木下らは比重遠心法でリンパ組織リンパ球をI, II, IIIの3分面に分けPHAを加えて培養し、出現してくる大型の幼若化細胞をみている。第III分面に限って培養開始時0-5%であった大型細胞がPHA加2時間培養後に35-45%に上昇していることから、PHA反応細胞(T細胞)は第III分面に多く含まれている“重い小型のリンパ球”であろうと報告している。本実験で、羊赤血球で免疫されたマウスの全脾細胞をPHA処理したり、あるいは第III分面を2%PHA処理してこれを残りのPHA非処理I, II分面を加えてPFC数を算定すると、PFC数が著明に増加してくることをみた。第III分面に集中してくる重い小型の細胞がhelper T-細胞となりPHAにより活性化、分裂増加して、B-細胞のPFC

への分化を促進せしめたものとして説明がつく。すなわち、PFCの産生にはT細胞が重要な役割を演じていることが推定される。このことは次の抗リンパ球血清の実験によってさらに明らかとされよう。

T、B細胞の区別には種々の方法があるが、マウスの場合には Reif & Allen<sup>21)</sup>に始まるリンパ球表面の $\theta$ 抗原の有無で区別するのが便利である。 $\theta$ 抗原は胸腺細胞やT細胞にのみ存在しており、骨髄細胞やB細胞、プラズマ細胞には存在せず、 $\theta$ 抗原がマウスのT細胞のマーカーとして賞用されるゆえんである。 $\theta$ 抗原は2つの対立遺伝子よりなる単一の座で決定される抗原であり、AKRマウスなどにみられる $\theta$  AKR (Thy-1.1)とC<sub>3</sub>Hマウスなどにみられる $\theta$  C<sub>3</sub>H (Thy-1.2)とがある。AKRマウスとC<sub>3</sub>Hマウスは同一のH-2<sup>k</sup>に属しているので相互の胸腺で免疫してやると、それぞれ抗 $\theta$  C<sub>3</sub>H抗血清、抗 $\theta$  AKR抗血清をつくることができる<sup>21)</sup>。Tリンパ球の表面の $\theta$ 抗原の濃度は、Tリンパ球の成熟過程で種々であるが、その濃度はさておき、 $\theta$ 抗原のリンパ組織分布をみると、胸腺リンパ球で100%、胸管細胞で80-85%、リンパ節65-70%、脾30-35%、腹腔内リンパ球30-35%、バイエル板20-25%、末梢血中リンパ球ではその70%前後に $\theta$ 抗原が証明される<sup>21)</sup>。本実験で、作整使用した同種AKR抗C<sub>3</sub>Hマウス-ATS (抗胸腺血清)でも、胸腺細胞に100%、脾細胞に30%に殺細胞性をしめし、骨髄細胞には全く殺細胞性をしめせず、ATSとしては力価の高いT細胞のみを障害する満足すべきものと考えられる。AKR抗C<sub>3</sub>H ATSで無処置C<sub>3</sub>Hマウスの脾細胞を処理した後PHA加で培養すると、ATS未処理PHA加培養時の対照に比し1/4に幼若化率が低下している。このことはPHAが $\theta$ 抗原(+)のTリンパ球に選択的に作用して幼若化を惹起することをしめしている。羊赤血球を抗原とするJerneのPFC産生の場合にも、羊赤血球感作C<sub>3</sub>Hマウスの脾細胞を前もってAKR抗C<sub>3</sub>HマウスATSで処理しておくと、PFC数は10<sup>6</sup>コあたり140.3→13.2と約1/10に著減している。PFC数の減少はATS添加濃度に依存している。PHA前処理の場合と同様に、helper T-cellがATS処理により非活性化、減少したものと考えられる。PHA処理、ATS処理の結果はPFC産出にT細胞の協力が必須であることを明らかにしたものとえよう。他方、家兎をマウスの胸腺で免疫してつくった家兎抗マウスATSは骨髄細胞をも30%に障害にするので、T細胞のみでなくB細胞を

障害する抗 $\theta$ 抗体以外の抗体を含有している。異種家兎抗マウスATS処理の前処理でも、AKR抗C<sub>3</sub>HマウスATS処理の場合と同様の成績がえられ、PFC数の減少はやはり濃度依存性である。

T細胞はその表面の $\theta$ 抗原の濃度が様々であると同様、機能やそのsubpopulationにおいても多様性である。前述の羊赤血球抗原や蛋白抗原にたいして作用するhelper T細胞の他に、遅延型過敏性反応や移植免疫や腫瘍免疫のごとき、細胞性免疫を惹起するeffector T-細胞がある。遅延型過敏性反応の成立している場合にはeffector T-細胞もhelper T-細胞も共に増強しているといわれているが、effectorである感作T細胞が同時にhelper細胞としての機能をもっているのかどうか、あるいは細胞性免疫の成立の過程でeffector T-細胞のみならずhelper T-細胞も同時に出現してくるのが十分に明らかではないが、両細胞の出現には解離があるという報告が多い<sup>27-29)</sup>、また最近抗体産生を抑制方向に調節する suppressor T-細胞がとりあげられ、免疫学をさらに複雑なものにしている<sup>29)</sup>。

移植免疫や腫瘍免疫のさい、effector T-細胞を対心の標的と同種donor細胞や標的腫瘍細胞に加えて培養すると、effector細胞が標的細胞に群集接着してこれを破壊する。このeffector細胞の付着には免疫学的特異性があり、その付着率は標的細胞破壊と正の相関をしめし、宿主に成立している免疫の程度に比例するといわれている<sup>21)</sup>。リンパ球の標的細胞障害作用は免疫リンパ球を前もって抗リンパ球血清や抗 $\theta$ 血清で処理しておく、強く低下するが抗マクロファージ血清で処理しておいたのでは殆ど影響を受けないこと、抗マウスグロブリンで被覆したカラムを通してB細胞を除いても障害性は低下しないことなど、effector細胞はTリンパ球であるというものが多い。折田ら<sup>31)</sup>はEhrlich癌細胞の背部皮下移植10日目のマウス局所腋窩リンパ節細胞を標的株化Ehrlich癌細胞JTC-11に加えたさいの細胞障害性を走査電顕でみている。Micro billiの短い粗なT-細胞と思われるリンパ球が癌細胞表面に接着している。本実験では、同種AKR抗C<sub>3</sub>HマウスATSでEhrlich癌細胞移植10日目の殺腫瘍効果の強い局所腋窩リンパ節細胞を前処理してやると、殺腫瘍効果の消失することを明らかにしたわけである。やはり、Ehrlich癌細胞移植時のeffector細胞はTリンパ球といえよう。もちろん、このeffector細胞の作用には補体の付加は必要でない。最近、non-T細胞に

よる標的細胞破壊がいくつか報告されているが、いずれも helper T-細胞の助けを借りたり、おそらくは helper 細胞とも killer 細胞とも異なる次に述べる lymphokines を放出する T-リンパ球の助けを借りて、標的細胞を破壊するものである。<sup>34)</sup>

lymphokines とは 1969年 Dumonde らが提唱したもので、細胞性免疫における effector molecules ないしは soluble mediators と目されているものである。主に免疫 T-リンパ球を対応の抗原と共に培養するさい、リンパ球内で新たに生合成され、培養液中に放出遊離される種々の生物活性をもつ一群の可溶性物質の総称である。B 細胞より生成される従来の免疫グロブリンとは別個のものであり、マクロファージに作用するもの、多核白血球に作用するもの、培養株細胞に作用するものなど20種あまりのものが報告されている。<sup>35)</sup> lymphokines の中測定が容易で臨床にも広く供せられているものに macrophage migration inhibitory factor (MIF) がある。細胞性免疫の成立している宿主の免疫 T-リンパ球が対応の抗原(たとえば PPD、腫瘍抗原など)に接すると、リンパ球内で MIF が特異的に生合成され遊離してくる。この MIF が indicator cell であるマクロファージの receptor ( $\alpha$ -fucose) に付着して膜面が変化し、ガラス面への粘着性が増加して遊走能が低下し、一部では、マクロファージが凝集を起して運動性が低下し、毛細管より出る扇形の面積が減少することになる。この面積を抗原非添加群のそれと比較するものである。マウスに同種リンパ球を腹腔内移植するさい、脾細胞を用いると effector 細胞も MIF 産生細胞も有意に誘導されるが、リンパ節細胞の移植では effector 細胞に比し、MIF 産生細胞の方が、はるかに高率に誘導される。比重法により、リンパ球を分画すると、effector 細胞は小型および中型のリンパ球で、MIF 産生細胞は中型ないし大型のリンパ球であるといわれている。<sup>36)</sup> 本実験においては、Ehrlich 癌細胞移植5日目の局所リンパ節リンパ球には強い MIF があるが、ATS で前処理しておく

MIF は消失する。腫瘍免疫のさい出てくる MIF 産生細胞も  $\theta$  抗原(+)の T 細胞であるといえよう。

以上 PHA、抗リンパ球血清を用いた実験成績より、helper 細胞も、PHA 反応細胞も、effector 細胞も、そして MIF 産生細胞も、いずれもが T-リンパ球であるといえることをしめしたわけである。これら細胞の相互関係や異同が今後の焦点になるものと思われる。

## 結 論

T-リンパ球にのみ作用すると考えられる phytohemagglutinin と抗胸腺細胞血清を用いて、マウスの羊赤血球に対する溶血斑形成細胞、担癌マウスリンパ球の殺腫瘍作用、担癌マウスの MIF 産生細胞、及びマウスリンパ球単独培養での幼若化率に対する影響を検討し、つぎの結論をえた。

1) 溶血斑形成細胞は、phytohemagglutinin により増加し、抗胸腺細胞血清により減少したことから、PFC は T-細胞の影響下にある。

2) 担癌マウスリンパ球の殺腫瘍作用が、PHA により増加し、ATS により減少したことから抗腫瘍免疫は、T-細胞が主導権を握っている effector 細胞である。

3) 担癌マウスの MIF 活性が ATS により著しく低下することから、T-細胞が MIF 活性を生み出す中心的役割を演じていると考えられる。

4) マウスリンパ球単独培養でのリンパ球幼若化率が ATS を用いると低下することから、幼若リンパ球は T-細胞であると推論されよう。

T-細胞の各種役割が明らかになりつつあるが、本実験でその一部を検索した。

(稿を終るにあたり、恩師田中早苗教授、折田薫三講師、研究室の諸氏に深甚の謝意を表する。)

本論文の一部は、昭和47年10月第8回日本移植学会総会で発表した。

## 文 献

- 1) 寺田紀彦：Methylcholanthrene 投与後発癌過程における宿主の免疫系ないしは生体防禦機構について。岡山医学会誌, 85: 241, 1973.
- 2) Miller, J. F. & Mitchell, G. F.: Cell to cell interaction in the immune response. I. Hem-



- olysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **128**: 801, 1968.
- 3) Mitchell, G.F. & Miller, J.F.: Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **128**: 821, 1968.
  - 4) Nossal, G.J.V., Cunningham, A., Mitchell G.F. & Miller, J.F.A.P.: Cell to cell interaction in the immune response. III. Chromosomal marker analysis of single antibody-forming cells in reconstituted, irradiated, or thymectomized mice. *J. Exp. Med.*, **128**: 839, 1968.
  - 5) Burnet, M.: Immunological surveillance. Pergamon, Press, Oxford, 1970.
  - 6) Orita, K., Tomoyasu, S., Kaneda, S., Miwa, H., & Konaga, E.: Time-lapse changes in the concomitant immunity of lymphoid cells from different regions of Ehrlich tumor bearing mice and alterations in blastformation rate by PHA-stimulation. *Acta Med. Okayama*, **26**: 81, 1972.
  - 7) Ohsugi, N.: Antitumor activity of lymphoid cells from spontaneous mammary tumor bearing mice on the autochthonous primary culture tumor cells. *Acta Med. Okayama*, **25**: 229, 1971.
  - 8) Orita, K., Kobayashi, M., Konaga, E., Hiramatsu, M., Kokumai, Y. & Tanaka, S.: Growth-inhibition effect of lymph node cells from cancer patients on autochthonous tumor cell. *Acta Med. Okayama*, **27**: 133, 1973.
  - 9) 折田董三: 癌患者における T 細胞の機能テストとその診断的意義. *臨床科学*, **10**: 268, 1974.
  - 10) 浜崎充彦: 長期培養されたエールリッヒ腹水癌細胞 (JTC-11) の性状について. *岡山医学会誌*, **76**: 830, 1964.
  - 11) Jerne, N.K., & Nordin, A.A.: Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, **140**: 405, 1963.
  - 12) 木下喜博, 木村英一: IX. 抗体産生機構. A. 細胞レベルにおける分離法と検出法. 免疫アレルギー学実験法 (進藤宙二) 文江堂, 東京, P. 493, 1971.
  - 13) Cerotini, J.C., Nordin, A.A., & Brunner, K.T.: Specific in vitro cytotoxicity of thymus-derived lymphocytes sensitized to alloantigens, *Nature*, **228**: 1308, 1970.
  - 14) Levey, R.H., & Medawar, P.B.: Nature and mode of action of autilymphocytic autiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **56**: 1130, 1966.
  - 15) Terasaki, P.I.: Microdroplet lymphocyte cytotoxicity test; in *Manual of tissue typing techniques*, NIH, Bethesda, 1972.
  - 16) Orita, K., Miwa, H., Shinoda, K. and Tanaka, S.: Suppressed blastformation of lymphocyte in cancer bearing patients, with special reference to the cancers of digestive tract. *Acta Med. Okayama*, **27**, 37, 1973.
  - 17) Cunningham, A.J.: A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature*, **207**: 1106, 1965.
  - 18) 湯村正仁, 内田善夫, 国米欣明, 折田董三, 田中早苗: MIF 活性測定法—担癌生体リンパ球の MIF 活性測定法を中心として. *臨床免疫*, **5**: 643, 1973.
  - 19) Konaga, E.: Action mechanism in vitro of sensitized regional lymph node cells on target cells. I. Anti-growth effect of regional lymph node cells of Ehrlich cancer transplanted mouse and that of normal lymph node cells induced PHA, on Ehrlich cancer cell line. *Acta Med. Okayama*, **25**, 269, 1971.
  - 20) Claman, H.N.: Human thymus cell cultures—evidence for two functional populations. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**: 236, 1966.
  - 21) Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leu-

- kocytes. *Cancer Res.*, **20**: 462, 1960.
- 22) Bloom, B. R.: In vitro approaches to the mechanism of cell-mediated immune reactions: Advances in Immunology, **13**: 101, 1971.
  - 23) Reif, A. E., Allen, J. M. V. & Raff, M. C.: Theta isoantigen as a marker of thymus-derived lymphocytes in mice. *Nature*, **224**, 378, 1969.
  - 24) Schlesinger, M.: Anti- $\theta$  antibodies for detecting thymus-dependent lymphocytes in the immune response of mice to SRBC. *Nature*, **226**: 1254, 1970.
  - 25) Raff, M. C. & Owen, J. J. T.: Thymus derived lymphocyte: Their distribution and role in the development of peripheral lymphoid tissues of the mouse. *Eur. J. Immunol.*, **1**: 27, 1971.
  - 26) Nomoto, K. Mashiba, H., Takeya, K.: Immune response against hamster erythrocytes in the low responder mouse strains. I. Strain difference in the antibody response to primary antigenic stimulation and its disappearance after pre-sensitization with the antigen in Freund's complete adjuvant. *Jap. J. Microbiol.*, **16**: 43, 1972.
  - 27) Liew F. Y. & Parish, C. R.: Lack of correlation between cell mediated immunity to the carrier and the carrier-hapten helper effect. *J. Exp. Med.*, **139**: 779, 1974.
  - 28) Dennert, G.: Evidence for non-identity of T killer and T helper cells sensitised to allogenic cell antigens. *Nature* **249**: 358, 1974.
  - 29) Turk, J. L. & Parker, D.: Further Studies on B-lymphocyte suppression in delayed hypersensitivity, indicating a possible mechanism for Jones-Mote hypersensitivity. *Immunology*, **24**: 751, 1973.
  - 30) 多田富雄: Suppressor T-cell. 代謝, **12**: 553, 1975.
  - 31) 橋本嘉幸, 北川恒代: 感作リンパ球による標的細胞破壊反応. 蛋白質 核酸 酵素, **19**: 907, 1974.
  - 32) Golstein, P. Wigzell, H., & Biomgren, H.: Cells mediating specific in vitro cytotoxicity. II. Probable autonomy of thymus-processed lymphocytes (T cells) for the killing of allogenic target cells. *J. Exp. Med.*, **135**: 890, 1972.
  - 33) Orita, K., Yamamoto, I. & Murakami, T.: Scanning electron microscopy of contactual interaction of sensitized lymphocytes with homologous target cells. *Acta Med. Okayama*, **25**: 1, 1971.
  - 34) Van Boxell, J. A., Paul, W. E., Frank, M. M. & Green, I.: Antibody-dependent lymphoid cell-mediated cytotoxicity. Role of lymphocytes bearing a receptor for complement. *J. Immunol.*, **110**: 1027, 1973.
  - 35) Dumondo, D. C.: "Lymphokines": Molecular mediators of cellular immune responses in animals and man. *Proc. R. Soc. Med.*, **63**: 899, 1970.
  - 36) 青木隆一: 遅延型アレルギーの化学的伝達体—lymphokines—. 代謝, **12**: 695, 1975.
  - 37) 折田董三: マクロファージ遊走阻止試験. 癌と化学療法, **2**: 699, 1975.
  - 38) Tigelaar, R. & Gorczynski, R. M.: Separable populations of activated thymus derived lymphocytes identified in two assays for cell mediated immunity to murine tumor allografts. *J. Exp. Med.*, **140**: 267, 1974.

## Effects of antilymphocyte serum on various reactions of lymphocytes

Kiyoshi Ogawa

Department of Surgery, Okayama University Medical School,

Okayama, Japan

(Director : Prof. Sanae Tanaka)

### ABSTRACT

Using phytohemagglutinin (PHA) and/or Antilymphocyte serum (ATS) that are considered to act only on T-lymphocytes, a study was made of the effects of these substances on plaque forming cells (PFC) for sheep red cells in spleen of mice and the antitumor activity of cancer-bearing mice as well as the blastformation rate of mouse lymphocytes against PHA *in vitro*, and the following results were obtained.

- 1) From the fact that PFC proliferate in the presence of PHA but they decrease in number in the presence of ATS, PFC seem to be under the control of T-cells.
- 2) As the antitumor effects of cancer-bearing mouse lymphocytes is enhanced by PHA but it is decreased by ATS, it may be said that T-cells play a leading role in the antitumor immunity as effector cells.
- 3) Since MIF activity of cancer-bearing mouse is decreased markedly by ATS, it seems that T-cells play the most important role in producing MIF.
- 4) Since the blastformation rate of mouse lymphocytes against PHA decreases in the presence of ATS, it may be assumed that the lymphocytes undergoing blastformation are T-cells.

Various roles of T-cells are now being clarified, while the present experiment is a step toward the clarification of such roles.