

In vitro lymphocyte transformation における transfer factor の増幅効果と標的細胞

岡 田 昌 彦
高 橋 豊
渡 辺 徹
常 田 ひろみ
崎 山 幸 雄
松 本 脩 三
(北大医学部小児科)

緒 言

Transfer Factor (TF) の臨床応用に関する実際的な知識の蓄積がすすむ一方、TF の生化学的性状または免疫学的特性の解明についても研究がなされてきた。しかしながら、Lawrence, H.S. の報告以来、論議の焦点となっている ① TF による特異的な DTH 移入の可能性、② TF の作用機序における標的細胞、③ *in vitro* における適切な TF 活性の assay 系、などに關しては現在なお解決されていない問題である。TF の生物学的活性の解明と力価の均質化を得るためには安定した *in vitro* または実験動物での assay 系が確立される必要がある。これまでわれわれは TF の免疫学的活性解明のため、mitogen による Lymphocyte transformation (LT) に作用する TF の効果、TF の標的細胞などについて検討してきた¹⁾²⁾。今回さらに TF 分画の LT 効果および LT 増幅効果を有する分画のアミノ酸分析についても検討を加えたので報告する。

方 法

①細胞分離 i) 健常成人のヘパリン加末梢血より Ficoll-Conray 法により peripheral blood mononuclear cell(PBMN)を分離した。ii) PBMN を 2×10^6 cells/ml 10%自己血清加 RPMI-1640 に浮遊させ petri dish に注入し 5% CO₂ 培養器で 37°C, 60分間培養した。その後 petri dish に非付着性の細胞を 1×10^7 cells/ml になるよう 10% FCS 加 MEM に調整し、Nylon wool column (NWC) に浸透させた後、5% CO₂ 培養器で 37°C, 60分間培養後、10% FCS 加 MEM で流出した。この操作を 2回繰返して得た細胞を T cell とした。② Mitogens: PHA (Difco, Lab.) は $1 \mu\text{g/ml}$, Con A (Sigma, Co.) は $50 \mu\text{g/ml}$ を用いた。③ TF: 赤十字北海道血液センター調整の Lot を用いた。その 1 単位は 5×10^8 個相当の白血球より抽出されたものであり、これを 10ml の RPMI-1640 に溶解して用いた。④ TF 分画の作製: TF を

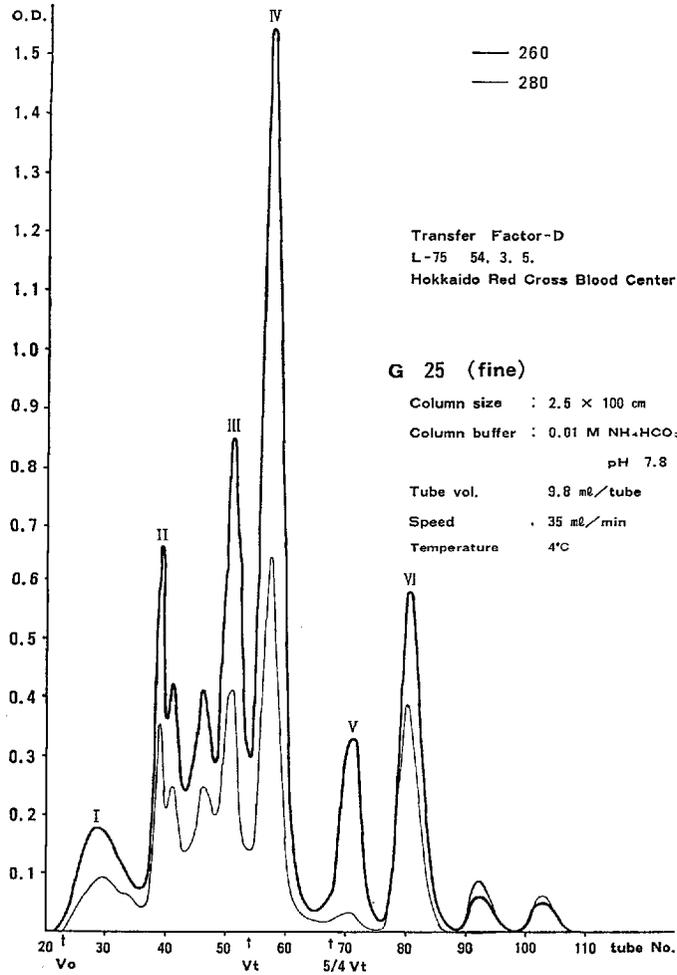


図 1

Sephadex G-25 カラムを用い 4°C pH 7.8, 0.01 M NH₄HCO₃ Buffer にて流出し I から VI の分画を得た (図 1)。それぞれの分画を一旦凍結乾燥後、各分画が TF 1 単位相当の蛋白量になるよう希釈調整して用いた。⑤ TF のパルス : PBMN, T cell をそれぞれ 1 × 10⁶ cells/ml RPMI-1640 に調整し、その 1 ml に上記の TF 溶液を 30, 60, 100, 200 μl 加え 5% CO₂ 培養器で 37°C, 60 分間培養後 RPMI-1640 で 2 回洗浄した。⑥ 細胞培養および LT の測定 : おのおのの細胞は 10% ヒト非働化 AB 血清加 RPMI-1640 で 5 × 10⁵ cells/ml に調整し 1 × 10⁵ cells/well を Mitogen とともに U 字型 microplate で 3 日間培養した。Harvest の 16 時間前に ³H-thymidine 1 μCi を加えたのち、cell harvester で濾過しその取込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。⑦ TF 分画のアミノ酸分析 : Sephadex G-25 カラムで得たピークのうち、IV, V 分画について 6N HCl を加え 110°C, 24 時間加水分解を行った後、自動アミノ酸分析器によりアミノ酸の含有量を測定した。

表1 The surface markers of the lymphocyte and the mitogen responsiveness

	E-RFC	EAC-RFC	Peroxidase	LT (PHA) cpm
PBMN	54.0±1.8%	33.8±8.9%	14.3±4.2%	141.669*±7.853
NWC 1×	73.0±0.4	19.4±6.9	0.8±1.1	63.102 ±6.813
NWC 2×	87.8±3.3	7.1±2.6	0.5±0.7	40.267 ±4.737
Mφ	N.D.**	N.D.	66.5±11.9	N.D.

* cpm mean±S.D.

** not done

表2 PBMN に対する TF の効果

① TF との Coculture (PBMN)

		TF (0)	TF (10μl)	TF (20μl)
I) PHA (1μg/ml)	Case 1	66.808±12.691	20.179±1.929	8.507±1.777
	Case 2	110.708±30.564	81.326±7.328	40.203±4.333
	Case 3	141.669±7.863	109.785±7.793	84.247±4.926
II) Con A (50μg/ml)	Case 1	87.581±5.250	12.156±3.757	11.128±1.291
	Case 2	83.097±1.736	60.969±13.596	23.703±1.108
	Case 3	111.367±30.564	26.944±9.894	23.760±11.111

② TF とパルス後の LT (PBMN)

		TF (0)	TF (200μl)
I) PHA (1μg/ml)	Case 1	66.808±12.691	58.439±6.855
	Case 2	110.708±30.564	110.953±25.429
	Case 3	34.884±8.175	44.729±11.193
II) Con A (50μg/ml)	Case 1	87.581±5.250	72.588±18.142
	Case 2	111.367±3.896	110.860±22.656
	Case 3	46.206±7.243	48.409±5.443

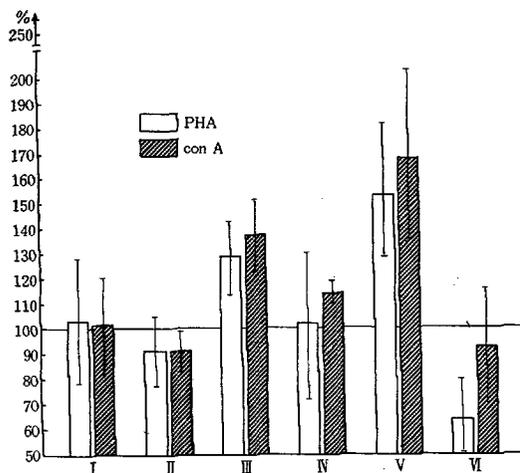


図2 The augment effect of TF (Fr.) pulsed to T cell

表3 T cell に対する TF の効果

① Coculture (T cell)

		TF (0)	TF (10 μ l)	TF (20 μ l)
I) PHA (1 μ g/ml)	Case 1	48.735 \pm 7.852	10.124 \pm 980	3.532 \pm 1.431
	Case 2	38.957 \pm 1.495	27.770 \pm 2.854	13.437 \pm 1.340
	Case 3	30.620 \pm 2.994	*21.439 \pm 1.275	**16.219 \pm 957
II) Con A (50 μ g/ml)	Case 1	20.195 \pm 3.741	4.919 \pm 1.065	2.190 \pm 629
	Case 2	9.859 \pm 2.270	4.008 \pm 793	1.783 \pm 364
	Case 3	11.243 \pm 1.901	*6.278 \pm 884	**5.924 \pm 582

* TF 1 μ l, ** TF 2 μ l

② TF パルス (T cell)

Case 1	blank	PHA	Con A
PBMN	1.145 \pm 159	184.663 \pm 8.975	114.008 \pm 1.620
T cell	234 \pm 38	55.105 \pm 11.525	81.356 \pm 29.539
T cell (TF 10)	320 \pm 182	59.332 \pm 23.241	112.904 \pm 7.151
T cell (TF 30)	290 \pm 32	87.946 \pm 17.577	124.195 \pm 22.383
T cell (TF 60)	275 \pm 36	143.801 \pm 10.591	138.419 \pm 3.643
Case 2			
PBMN	1.214 \pm 485	125.739 \pm 1.411	93.103 \pm 11.665
T cell	412 \pm 85	27.191 \pm 8.521	28.608 \pm 3.455
T cell (TF 50)	418 \pm 53	31.262 \pm 7.287	34.207 \pm 10.751
(TF 100)	383 \pm 34	36.958 \pm 4.823	30.223 \pm 8.103
(TF 200)	514 \pm 92	50.504 \pm 6.432	39.275 \pm 7.511
Case 3			
PBMN	1.577 \pm 217	267.265 \pm 43.909	147.028 \pm 28.586
T cell	325 \pm 47	40.816 \pm 4.257	22.096 \pm 1.214
T cell (TF 10)	238 \pm 14	48.466 \pm 10.397	41.082 \pm 12.549
T cell (TF 100)	409 \pm 97	54.320 \pm 17.951	35.238 \pm 1.437
T cell (TF 200)	411 \pm 28	80.615 \pm 5.297	54.561 \pm 4.133

結 果

① PBMN と、NWC を1回あるいは2回通過させて得た細胞の E-RFC, EAC-RFC, ペルオキシダーゼ陽性細胞の比率は表1の如くであった。PHA に対する T cell の LT は PBMN の LT の約30%と減少した。Con A についてもほぼ同様の LT の減少を認めた。② PBMN に対する TF の coculture およびパルスの効果：(表2)。LT に際し同時に TF を加えた系では TF のいずれの濃度にてても LT の減少傾向が認められた。また TF でパルス後 LT をみた系でも一定の傾向はみられなかった。③ T cell に対する TF の coculture およびパルス効果：(表3)。T cell と TF の coculture では LT の有意な増幅は認められなかったが T

表4 TF 分画, IIIおよびVの LT 増幅効果
PHA 1 $\mu\text{g/ml}$

	peak	mean c.p.m.	S.D.	P.
Case 1	cont	28.953	± 5.593	N.S. <0.01
	III	50.975	± 18.362	
	V	54.321	± 436	
Case 2	cont	27.049	± 3.676	N.S. <0.01
	III	31.904	± 2.436	
	V	51.075	± 5.498	
Case 3	cont	58.239	± 10.410	N.S. <0.01
	III	58.174	± 10.877	
	V	108.405	± 16.514	
Case 4	cont	40.267	± 4.737	N.S. <0.05
	III	46.258	± 6.477	
	V	51.509	± 5.159	

N.S. : not significant

Con A 50 $\mu\text{g/ml}$

	peak	mean c.p.m.	S.D.	P.
Case 1	cont	3.757	± 414	N.S. <0.01
	III	5.034	± 2.114	
	V	6.673	± 1.095	
Case 2	cont	24.299	± 5.669	<0.05 N.S.
	III	37.323	± 3.644	
	V	31.669	± 8.872	
Case 3	cont	19.294	± 4.894	N.S. <0.1
	III	23.938	± 364	
	V	37.823	± 7.205	
Case 4	cont	12.467	± 1.415	N.S. <0.1
	III	27.787	± 6.671	
	V	17.197	± 2.860	

N.S. : not significant

cell と TF のパルスに関しては PHA, Con A とともに LT の増幅が認められた。この時パルスに用いた TF の濃度は30~200 $\mu\text{l/ml}$ で有効であった。④ TF 各分画の LT 増幅効果：(図2, 表4)。T cell を標的細胞として TF 各分画の LT 増幅効果をみた。対照の LT に対する分画 I から VI のパルス後の LT を%で表わした。IIIおよびV分画に PHA, Con A それぞれ LT 増幅効果がみられた。しかし統計処理ではV分画のみに危険率5%以下で LT の有意な増幅が認められた。⑤ TF 分画 III, V のアミノ酸分析の結果：(図3, 図4)。III分画では加水分解前 Phenylalanine, Arginine, Glycine の低いピークがみられたが加水分解後はこれ

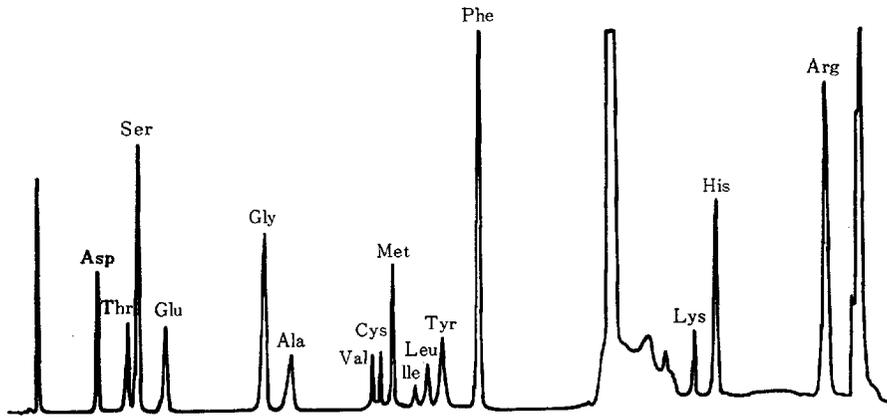


図3 The amino acid analysis of hydrolysed fraction III

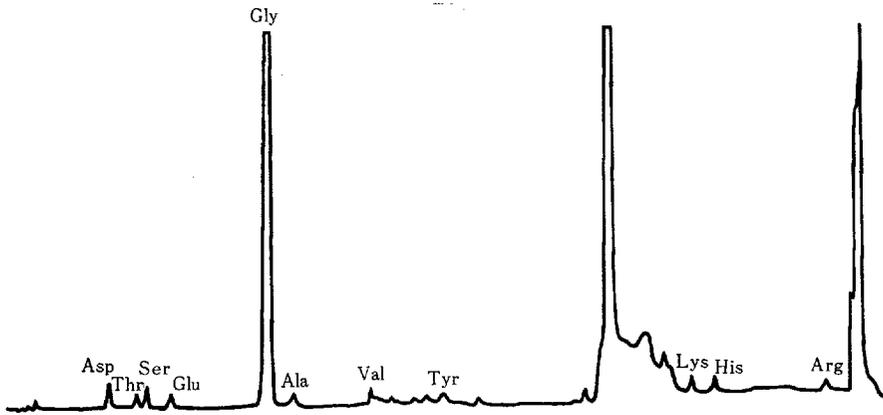


図4 The amino acid analysis of hydrolysed fraction V

らのピークはより明らかとなり, Phe. 24.6%, Arg. 18.9%, Gly. 9.0%が含まれていた。一方, V分画では加水分解前は明らかなピークはみられなかったが, 加水分解後は Gly. の大きなピークの出現を認め, その含有量は85.0%を占めていた。

考 察

TF の *in vitro* における LT への効果をみる測定法はこれまでも幾多の検討がなされてきた。TF は *in vivo* で non immune lymphocyte を immune lymphocyte に変換すると考えられ, その傍証として Ascher, M.S. らは TF がヒトリンパ球培養において PHA や PPD による LT を増幅することを報告した。しかしその後の追試により抗原を用いた LT の測定系で TF の LT 効果に関する報告は一定していない。その理由として用いた Mitogen, 抗原

の違いや TF の donor と recipient の関係あるいは培養条件などが考えられてきた。一方、TF で LT 増幅効果が認められたとする報告ではその培地に MEM-S が用いられていることが Uotila, A. らにより指摘され、培地中に含まれていない L-serine や Glycine などのアミノ酸が TF により補充される結果、細胞の代謝が促進され LT 増幅が生ずるのであろうと説明された。われわれはこれまで ①完全培地である RPMI-1640 を使用したにもかかわらず PBMN より付着細胞を除去して得た T cell を TF で短時間パルスした後 mitogen とともに培養することにより安定した LT の増幅が認められたこと¹⁾。② plastic dish の付着細胞と TF をパルスした後に T cell と組合せて LT を行った場合にはこうした LT の増幅は認めなかったことから、T cell が TF の標的細胞であることを報告してきた²⁾。今回、この T cell を標的細胞として Sephadex G-25 カラムより得た TF 各分画の LT に対する効果を検討した。得られた分画のうちⅢ, Vに LT 増幅効果があること、とくに V分画は有意の LT 増幅効果があることが知られた。また V分画のアミノ酸分析では多量の Glycine が含まれていることが分った³⁾。TF の分画に関しては *in vivo* での特異的な DTH を移入する分画と *in vitro* の測定法で活性をもつ分画は必ずしも一致しておらず、各分画の生化学的性状も含め今後さらに検討する必要があるものと思われる。

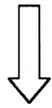
結 語

今回の実験から、① TF が T cell を標的細胞としてその LT を増幅させる効果をもつこと。② Sephadex G-25 カラムより得た TF 各分画のうち V分画に有意の LT 増幅効果が存在すること。③ V分画には多量の Glycine が含まれていること。

などが明らかとなった。

文 献

- 1) 崎山幸雄, 高橋 豊, 岡田昌彦, 常田ひろみ, 松本脩三: トランスファ・ファクターの *in vitro* におけるリンパ球幼若化現象増強効果について。厚生省特定疾患, 「免疫不全症候群」調査研究班, 昭和54年度研究報告書, 1980。
- 2) 岡田昌彦, 高橋 豊, 常田ひろみ, 崎山幸雄, 松本脩三: *In vitro* lymphocyte transformation における transfer factor の増幅効果と標的細胞。医学のあゆみ, 114: 443, 1980。
- 3) 岡田昌彦, 高橋 豊, 渡辺 徹, 常田ひろみ, 崎山幸雄, 松本脩三: *In vitro* transformation における transfer factor の増幅効果と標的細胞。第10回日本免疫学会総会記録, 熊本, p. 455, 1980。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



結語

今回の実験から、TF が T cell を標的細胞としてその LT を増幅させる効果をもつこと。

Sephadex G-25 カラムより得た TF 各分画のうち V 分画に有意の LT 増幅効果が存在すること。V 分画には多量の Glycine が含まれていること。

などが明らかとなった。