自己癌および同種癌細胞刺激により誘導される

リンパ球の形態的特徴について

村 上 公 輝* 吹 上 忠 祐* 松 岡 浩 明*
鮫 島 靖 浩* 江 浦 正 郎* 猪 川 勉*
石 川 哮* 神 田 敬**

論文要旨

末梢血リンパ球と頭頸部に発現した固形癌より分離した自己癌または同種癌細胞とを混合培養し、さらに遺伝子組み換え型 (rIL-2) で活性化して誘導されたリンパ球の形態的变化を経時的に電子顕微鏡を用いて観察した。また同時にその機能的変化に付いても観察した。

Key words: (recombinant IL-2(rIL-2)), (Autologous MLTC), (Allogeneic MLTC)

はじめに

人癌細胞を障害する effector cell の誘導については多くの報告があり, effector cell の種類も Cytotoxic T lymphocyte (CTL), Natural killer (NK) cell, Lymphokine activated killer (LAK) cell. Mixed lymphocyte culture (MLC) induced killer cell 等が知られている。これら effector cell の形態的特徴については NK, LAK cell の持つ Large granule lymphocyte いわゆる LGL 細胞が記載されているが (1, 2), 他の細胞についての報告はほとんどない。人末梢血リンパ球と自己細胞との混合培養すなわち Autologous mixed tumor cell and lymphocyte culture (Auto MLTC) を行い更に IL-2 で培養を続けることにより, CD3+, 8+ で major histocompatibility antigen complex (MHC) class I 抗原拘束性のある CTL が誘導されることは知られており (3,4,5), われわれも末梢血リンパ球と頭頸部に発現した固形癌から分離した自己あるいは同種癌細胞との MLTC と rIL-2 培養で CTL が誘導されることを確認した (6,7,8)。この誘導 CTL の形態学的特徴を電顕的に明らかにする目的で検討を行いつつある。まだ現段階では電子顕微鏡下に, これが CTL であるという直接的な証明はないが CTL 誘導を目的に行った培養によって末梢血単核球全体がいかに変化するかを観察した。

材料と方法

1) 末梢血リンパ球の採取

末梢血をヘパリン加に採血し Ficoll-Hypaque 比重遠沈法により, リンパ球を分離した。

2) 自己新鮮癌

75歳男性の上顎癌で組織学的には低分化扁平上皮癌を用いた。手術により摘出された腫瘍組織を高濃度の抗生物質 (Penicilin (Pc)-G : 1000 unit/ ml, Streptomycin (SM) : 1000 μ g/ ml, Fungizone : 500 μ g/ ml) を含む滅菌生理食塩水でよく洗浄して, 培養液 (RPMI 1640) に移して細切した。細切片を 800-1000unit/ml の Dispase を含む RPMI1640中で, 室温にて攪拌消化し, 200G メッシュを通して細胞を回収した。この細胞より赤血球と死細胞を除去後, 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO), 10% Fetal calf serum (FCS) 中に凍結保存した。

3) 同種癌細胞

われわれが樹立した上顎癌由来低分化扁平上皮癌細胞 KOIMC-011を使用した。

4) Autologous MLTC cell, Allogeneic MLTC cell の誘導

癌細胞を 100 μ g/ ml の濃度に調整したマイトマイシン C で 37°C 30分間処理し, これと自己リンパ球を stimulator responder ratio=1:10として10% FCS

*熊本大学医学部耳鼻咽喉科教室, **千葉大学医学部耳鼻咽喉科教室

Hiroki MURAKAMI*, Tadahiro FUKIAGE*, Hiroaki MATUOKA*, Yasuhiro SAMEZIMA*, Masao EURA*, Tsutomu IKAWA*, Takeru, ISHIKAWA* and Takashi KANDA**: Electoron microscopic observation of activated lymphocytes by mixed culture with autologous or allogeneic cancer cells and further culture with rIL-2
Department of Otorhinolaryngology, Kumamoto University Medical School*, Department of Otorhinolaryngology, Chiba University Medical School**

表 1 誘導キラー活性 (E/T=40/1)

days for culture	autologous MLTC cell			allogeneic MLTC cell			LAK		
	5	11	18	5	11	18	5	11	18
target									
自己癌	3.6 *	8.7	19.8	5.1	13.7	13.3	10.5	14.4	14.7
KOIMC-011	0	10.1	18.7	1.1	6.7	31.7	15.1	16.1	16.5
Daudi	0.3	40.4	75.8	3.1	42.4	70.6	61.9	59.8	73.6
K 562	1.7	55.0	52.4	14.6	73.7	83.7	71.2	72.3	71.8

*: % lysis

表 2 細胞表面マーカー

days for culture	autologous MLTC cell		allogeneic MLTC cell		LAK	
	11	18	11	18	11	18
CD4/CD3	49.8 *	68.9	75.6	60.1	40.9	40.0
CD8/CD3	83.0	35.9	51.3	42.5	86.8	51.3
CD25/CD3	56.2	46.1	137.0	42.5	33.8	17.3
NKH-1	15.5	12.7	9.3	20.0	33.1	42.0

*: percentage

の RPMI1640 (Pc-G 100unit/ ml, SM 100 μ / ml, 25mM Hepes を含む) に, リンパ球数が 1×10^6 / ml になるように調整し, 5日間インキュベーター (5% CO₂, 37c) 内で混合培養した。更に MLTC 後6日目より武田薬品株式会社より TGP-3 として提供を受けた rIL-2 を800 International Unit/ ml を含む培養液で更に13日間培養した。

5) LAK cell の誘導

リンパ球を 1×10^6 / ml に調整し, rIL-2 800IU/ ml を含む培養液で18日間培養した。

6) 細胞障害性, 細胞表面マーカーの検討

培養5日目, 11日目, 18日目に Autologous MLTC cell, Allogeneic MLTC cell, LAK cell それぞれにつき, 自己癌細胞, 同種癌細胞, K562, Daudi に対する細胞障害性を effector : target = 40 : 1 で4時間 ⁵¹Cr release assay にて調べた。またそれぞれの細胞につき培養11日目, 18日目に細胞表面マーカーの検索を CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, NKH-1 について行った。(株式会社エスアールエルに委託)

7) 電子顕微鏡での観察

培養5日目, 11日目, 18日目において Autologous MLTC cell, Allogeneic MLTC cell, LAK cell のそれぞれにつき電子顕微鏡を使用した観察を行った。電顕試料の作成は 2×10^6 個の細胞を300G にて遠心しペレットをつくり, 培養液を除去後2.5%グルタルアルデヒド, 2%オスニウム酸にて固定後, 酢酸ウラニルにてブロック染色, エタノール系列にて脱水, エポキシ

包埋し超薄切片を二重染色後, 日立 H-300にて観察した。

結 果

1) 細胞障害活性

自己癌に対する細胞障害活性は autologous MLTC cell で培養時間に依存する様な活性の増強が見られた(表1)。allogeneic MLTC cell 及び LAK cell では11日目ですでに plateau に達していた。Stimulator である KOIMC-011に対する細胞障害活性は18日目の allogeneic MLTC cell に simulator に対するキラー誘導が観察された。Daudi, K562等の cell line に対してはいずれの培養細胞でも rIL-2 に依存した誘導が観察され, 5日間の MLTC では抗原による選択的な不完全で, 5日後も尚抗原特異性 CTL クローン以外のキラーが混じっていることが示唆された。

2) 細胞表面マーカー

%で表現される測定値そのものは cell marker negative の死細胞混入のため, 正確性に欠けると考え比率で表現した(表2)。autologous MLTC cell で誘導した細胞は CD4 の増加が強くむしろ CD8は減少していた。NKH-1 は T-LAK または NK に見られる表面マーカーだが, IL-2 に依存性に増加していた。

3) 電子顕微鏡的検索

今回行ったキラー細胞誘導法で以上のような性状を持った細胞が培養日数によって誘導されていた。そこで各時点に於ける活性化リンパ球の電顕像を調べた。

A

B

C

Fig. 1

A

B

Fig. 2

(a) 培養5日目

培養5日目の autologous MLTC cell の電顕像では、混在する死癌細胞と抗原選択を外れた死リンパ球が視野の中に多数あって観察しにくい³が、リンパ球そのものには著明な変化はあまり認められなかった(Fig. 1A)。同様のことが培養5日目の Allogeneic MLTC cell の電顕像でも観察された (Fig. 1B)。しかし rIL-2 のみでの培養5日目の細胞 (LAK cell) では、すでに活

性化した大型化した細胞が多数見られた (Fig. 1C)。この時点では NKH-1 陽性細胞が増加していること、また Daudi, K562 に対するキラー活性がすでに高いことからこれらに対するキラー細胞である可能性が高いと思われる。

(b) Autologous MLTC cell

培養11日目の autologous MLTC cell では IL-2 依存性と思われる直径15-20 μm の大型の細胞が見られ

A

B

Fig. 3

た。細胞表面には microvilli 様突起を持ち、核、細胞質比は比較的小さいが核の切れ込みが明らかに認められた。細胞質内には豊富なミトコンドリア、ゴルジ装置、粗面小胞体などがみられ、顆粒も多数認められた。しかし、小型のリンパ球もこれに混じって同等にみられた (Fig. 2A)。これが培養18日目になると大型の細胞は消え比較的小型のリンパ球がその大多数を占めていた。しかしその細胞質内には多数の顆粒を含むものも多く認められた (Fig. 2B)。

(c) Allogeneic MLTC cell

培養11日目 (Fig. 3A), 18日目 (Fig. 3B) の allogeneic MLTC cell の所見は, autologous MLTC cell とおおよそ同様の変化があり、やはり18日目になると小型の細胞が主体になった。

考 察

これらの対比の中で最も大事な点は MLTC のみでの培養5日目と rIL-2 のみでの培養5日目の対比であり、MLTC の意義を考察する一つの材料と思われる。すなわち autologous MLTC, allogeneic MLTC 培養5日目では恐らくは MLTC によって癌抗原に無縁なリンパ球が死滅する「抗原選択」が起きているものと推察される。しかし、今回の実験系のように5日間の MLTC では抗原特異性のない effector cell もまだ残っていて、培養11日目、18日目で Daudi, K562 などの cell line に対する細胞障害性も上昇していた。さらに autologous MLTC, allogeneic MLTC 培養18日目で自己キラー活性が高いことから、この小リンパ球にキラー活性のあることが示唆されるが、培養11日目に出現した大型の細胞は、その「完全な抗原選択」により外れた NK cell, LAK などの細胞が IL-2 にて活性化されて大きく形態を変化させたものと思われる。今後 MLTC の時間の延長や再度抗原刺激を行うなどの方法を用い抗原特異性 CTL の population を高め検討

を重ねてゆきたい。

SUMMARY

Many kinds of effector cells cytotoxic to cancer cells have been reported, which are designated as natural killer cell, cytotoxic T lymphocyte (CTL), mixed lymphocyte culture (MLC) induced killer, lymphokine (recombinant interleukin 2 : rIL-2) activated killer (LAK) and so on. In this study, the differentiation process of cytotoxic lymphocytes triggered by cancer antigen and lymphokine stimulation has been observed in functional and morphological point of view.

Electron microscopic observation : At culture day 5, LAK cells had microvilli-like processes on the surface, but lymphocytes cultured with autologous (auto CTL) or allogeneic cancer cells (allo CTL) did not have them. At culture day 11, auto CTL with further culture in rIL-2 contained 2 different types of the cells; one was a large, round or oval shaped cell, which has many microvilli-like processes on the cell surface, and the other as small as a normal lymphocyte. The ratio of nucleus to cytoplasm was small. The nucleus was large and irregular with deep invaginations or lobulated formations. Additionally, numerous mitochondria, well developed rough endoplasmic reticulum and numerous granules were mostly seen in the large cells. At culture day 18, number of the large cells were reduced, and the most of the auto and allo CTL were small (approximately 10 μm diameter) with uniform round shape. Killing activity against autologous cancer : The activity of auto CTL, expressed by % lysis, was time-dependently increasing, 3.6 in 5th, 8.7 in 11th and 19.8 in 18th day of culture. Those of allo CTL and LAK reached already plateau at 11th day of culture (13.7 for allo CTL, 14.4 for LAK). Cell surface markers : The ratio of CD4+ to CD3+ cells was time-dependently increasing in auto CTL, but CD8/CD3, on the contrary, decreasing. CD4/CD3 and CD8/CD3 of allo CTL,

however, reached plateau at 11 th day of culture.

参考文献

- 1). Mary B, Tompkins, Victor F Pang et al: Feline cytotoxic large granular lymphocytes induced by recombinant human IL-2, J. of Immunol 143 : 749-754, 1989.
- 2) 押味和夫 : LGL T 細胞. Immunohaematology 10 : 279, 1988.
- 3) F. Vanky, G Stuber et al: Auto-tumor recognition following in vitro induction of MHC antigen expression on solid human tumors: stimulation of lymphocytes and generation of cytotoxicity against the original MHC-antigen-negative tumor cells. Cancer Immunol Immunother 28 : 17-21.
- 4) Ichino Y, Ishikawa T: Cytolysis of autologous fresh osteosarcoma cells by human cytotoxic T lymphocytes propagated with T cell growth factor. Gann 74 : 584, 1983.
- 5) Tadahiro Fukiage, Hiroki Murakami: Killer cells induced by stimulation with allogenic tumor cells and subsequent culture with recombinant interleukin-2. 投稿中
- 6) 猪川 勉 : 頭頸部扁平上皮癌細胞に対する自己リンパ球細胞障害性の研究. 日耳鼻 84 : 1570-1578, 1981.
- 7) 江浦正郎, 猪川 勉 他 : 癌細胞刺激によって誘導された自己癌障害性リンパ球を用いた頭頸部癌治療の研究, 第一報自己癌細胞刺激誘導自己癌障害性リンパ球の経動脈的移入による上頸癌の治療効果. 日耳鼻 91 : 2069-2078, 1988.
- 8) 猪川 勉, 石川 孝 他 : 癌細胞刺激によって誘導された自己癌障害性リンパ球を用いた頭頸部癌治療の研究, 第二報 同種癌細胞刺激による自己癌障害性リンパ球の誘導. 日耳鼻 91 : 2079-2081, 1988.