Dialyzable Leukocyte Extracts (DLE) および DLE 中に 含まれる Inosine のリンパ球におよぼす作用

小 松 文 夫

東京医科歯科大学輸血部

笹 川 滋

日本赤十字社中央血液センター

(昭和63年 6 月28日受付)

EFFECTS OF DIALYZABLE LEUKOCYTE EXTRACTS (DLE) AND INOSINE INVOLVED IN DLE ON LYMPHOCYTES

Fumio Komatsu

Blood Transfusion Service, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

Shigeru Sasakawa

Japanese Red Cross Central Blood Center

The dialyzable leukocyte extracts (DLE) may have some effects in vivo, however, the effects of the DLE on lymphocytes were poorly understood, because the crude type of the DLE inhibits the lymphocyte blastformation in vitro. It has not been elucidated whether a substance involved in the DLE may enhance the blastformation or not. In this study, we measured intra-cellular ATP levels of lymphocytes after treating with the DLE or DLE fractions, and found that a fraction of the DLE increased the ATP levels of PHA-stimulated lymphocytes. In this fraction, inosine was involved. Inosine increased the ATP levels of lymphocytes and enhanced the blastformation. It is considered that when DLE show some effects on lymphocytes, inosine involved in the DLE may show important effects.

緒 言

Dialyzable leukocyte extracts (DLE) はヒト末梢白血球の細胞膜を破壊してその内容物のうち透析可能な分子量 1 万以下の物質をブールしたものである。DLE が注目を集めるようになったのは、DLE 中に Transfer factor (TF) 活性が含まれるとされたからである¹⁾²⁾。DLE は臨床的には Wiskott-Aldrich 症候群³⁾や皮膚カンジダ症⁴⁾、亜急性硬化性全脳炎、掌蹠膿疱症、その他の疾患に使用され、疾患によっては有効とする報告もなされるようになった^{5)~8)}。ただし、研究がすすむにつれて DLE は必ずしも TF 活性を含むとは限らず、むしろ TF 以外の種々の生物活性を含むものではないかとして現在では TF 以外の活性の研究がさかんになっている。我々は以前に、DLE の少

量を培養線維芽細胞である BHK や FL 細胞に作用させ、DLE はこれらの細胞の増殖を著明に促進することを見出した⁹⁾。一方 DLE を Molt, K562, Daudi などの白血病系株化細胞に作用させるとこれらの細胞の増殖を抑制してしまう¹⁰⁾。DLE はまたヒト末梢血リンパ球 (PBL) の幼若化反応をも抑制する¹⁰⁾。これらの作用の違いについては以前から気になっていた。今回、我々は DLE をいくつかの分画に分けそれぞれの分画を PBL に作用させて PBL の細胞内 ATP レベルを測定したところ、DLE のある分画は phytohemagglutinin (PHA) 加 PBL の ATP レベルを高めることを見出した。ATP を高める物質として inosine に着目したが、inosine は ATP を高めるだけでなく、幼若化反応を著明に促進し、BHK や

FL細胞, それにK562, Daudi細胞の増殖をも促進した。このことから, DLEがPBLに対して何らかの賦活作用を示すとすれば, DLE中に含まれる inosine の作用が重要であると考えられたので, 以下に実験の結果を報告する。

方 法

DLEの作製: DLEはLawrenceらの方法²⁾に準じて図1の方法で日赤中央血液センターで作製されたRCTF-1を用いた。またこれをフィルトレーンオメガセル(富士フィルターKK)を用いて分子量1,000以下(DLE-S), 1,000~5,000(DLE-M),

図1 DLEの作製法

5,000~10,000(DLE-L)に分画した。これに対して分画する前のDLE(whole)をDLE-Wとして扱った。さらにDLE-WをSephadex G-10ゲル濾過およびGS320(旭化成KK)高速液体クロマトグラフィーによりいくつかの分画に分け, 各分画については分光光度計を用いてそれぞれの水溶液の220nmから320nmまでのUVスペクトルを測定した。Sephadex G-10で分画した各分画パターンを図2に示す。使用に際してはRCTF-1の1vialを1単位(1,000mU)とし, 各分画はすべて1vial中に含まれる量に換算して扱った。

PBLの培養: 健常者から得たヘパリン加末梢血をFicoll-Conray比重遠心法で分離しPBLを集め, これをメディウム(RPMI 1640+10% FCS)で $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し, これにPHA(Sigma Chemical Company)を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 加えて, マイクロプレートに $100\mu\text{l}/\text{well}$ ずつまき, さらに上記のDLE-Wおよび各分画をメディウムで種々の濃度に溶解してそれぞれの $100\mu\text{l}$ を加え, 37°C , 5% CO_2 下で培養した。ハーベストの8時間前に ^3H -thymidine(^3H -TdR)または ^3H -leucineを $0.5\mu\text{Ci}/\text{well}$ 加えてそのuptakeを液体シンチレーションカウンターにて測定した。またPBLに対する inosine, adenine, adenosine, guanosine, 2-deoxyguanosine および hypoxanthine (いずれも

図2 Sephadex G-10カラムによるDLEの分画

東京化成 KK)の影響をもみたが、この場合も上記の DLE と同様に加えた。

K562, Daudi および BHK 細胞の培養：いずれの細胞も市販のもの (Flow 社) を継代培養しつつ実験に用いた。K562 および Daudi のメディウムは RPMI1640+10%FCS とし、BHK のそれは RPMI1640+5%FCS とした。いずれもメディウムで 2×10^4 /ml に調整し、その 100 μ l をプレートにまいた。BHK をハーベストする場合はトリプシン (持田製薬 KK) を 100u/well 加えて細胞を壁からはがしてハーベストした。

細胞内 ATP レベルの測定：ATP 発光法によった。ATP 抽出剤および Luciferin-luciferase は市販のもの (Analytical Luminescence Laboratory Inc.) を用いた。PHA 加 PBL を一定時間培養し、PBS (0.15M, pH 7.4) で 1 回洗浄後、PBS に再浮遊して、その 100 μ l をキューベットにとりこれに ATP 抽出剤を 100 μ l 加えて 15 秒間攪拌し、これを TD4000 (ラボサイエンス社製) にセットし、45 秒後に Luciferin-luciferase を 100 μ l 加えてただちに発光する光量 (relative light unit, RLU) を測定した。

細胞の viability はトリパンブルー染色率で判定した。有意差の検定は t-test によった。

結 果

1. PHA 加 PBL の ^3H -TdR uptake におよぼす DLE の影響

PHA 加 PBL に各種濃度の DLE-W およびその分画を作用させ、48 時間後の ^3H -TdR uptake をみた。図 3 に DLE-W, -S, -M, -L および図 2 に示す分画のうち Y 分画 (Fr-Y) と Fr-B を作用させたときのそれを示す。DLE-W, -S および Fr-Y は作用濃度が高くなるにつれて uptake を強く抑制した。DLE-M は高濃度 (約 33mU/ml 以上) の作用で中等度の抑制を示し、Fr-B は軽度の抑制を示した。DLE-L はとくに uptake に影響を与えなかった。

図 2 に示す他の分画をも作用させたが Fr-Z, -O, -A, -C, -D, -E は高濃度の作用が uptake を軽度抑制し、Fr-A', -F, -G はとくに影響を与えなかった。なお uptake が著明に低下した群の PBL は via-

図 3 PHA 加リンパ球の ^3H -TdR uptake におよぼす DLE およびその分画の影響 (48 時間培養, $n=10$, $M \pm SD$)

bility も低下していた。DLE 中には cold の thymidine が含まれている可能性がありこれが hot の thymidine と競合すること考えられるので、そこで ^3H -TdR のかわりに ^3H -leucine を用いて uptake をみてみたが、uptake の抑制はほぼ同様にみられた。

2. PHA 加 PBL の ATP 値の測定

PHA 加 PBL に DLE-W およびその分画を作用させ、48 時間後に ATP 値を測定した。図 4 に DLE-W, -S, Fr-Y, -B を作用させたときの測定結果を示す。図にみるように DLE-S および Fr-B を作用させたものはコントロール (無作用) に比しある濃度のところで ATP 値は高値を示した (いずれも最大のところで $p < 0.05$ で有意差あり)。この場合 DLE-S, Fr-B の作用で細胞数がコントロール群より増えてはいないので ATP 値の上昇は個々の細胞の ATP レベルが上昇したものと考えられた。DLE-W および他の分画の作用で ATP 値が上昇することはなかった。

3. PHA 加 PBL におよぼす inosine の作用

培養細胞にある物質を作用させてその細胞の ATP レベルを上昇せしめる物質として、まず inosine が考えられるので、つぎに inosine を

図4 PHA加リンパ球にDLEおよびその分画を作用させ48時間培養した後のATP値の測定 (n=10, M±SD)

PBLに作用させてみた。PHA加PBLに各種濃度のinosineを作用させ48時間後に測定したATP値および³H-TdR uptakeを図5に示す。inosineを作用させた群は幼若化が促進し、48時間後の時点でコントロール群 (inosine無作用) に比しATP値およびuptakeはともに高く、最大になるところでともに $p<0.001$ で有意であった。コントロール群は培養5日目あたりからviabilityが低下してくるが、inosine作用群は10日を過ぎても元気でviabilityはなお保たれていた。ただしinosineの濃度がある程度以上になると細胞はかえって弱まった。また、はじめにPHAを加えていなければ上記の効果はなく、inosineの濃度が高くなるにつれてPBLのviabilityは低下した。

Inosineと比較する意味でadenine, adenosine, それにDLEに含まれているとされている¹¹⁾¹²⁾ guanosine, 2-deoxyguanosine および hypoxanthine を作用させた。しかしこれらの物質によってATP値および³H-TdR uptakeが上昇することではなく、adenine, adenosine, 2-deoxyguanosineを作用させた場合50μmol/l以上の濃度でPBLのviabilityが低下した。

図5 PHA加リンパ球にinosineを作用させ、48時間培養した後の³H-TdR uptakeおよびATP値の測定 (n=10, M±SD)

図6 BHK, K562およびDaudiの各細胞にinosineを作用させ48時間培養した後の³H-TdR uptake (n=10, M±SD)

4. BHK, K562およびDaudiの各細胞におよぼすinosineの効果

BHK, K562およびDaudiの各細胞にinosineを作用させ48時間培養したときの³H-TdR uptakeを図6に示す。いずれの細胞もinosineの作

図7 Sephadex G-10カラムで分画したFr-A, -B, -CをさらにGS320カラムで再分画したときのパターン (Fr-B14が inosine と同定された)

用により uptake は上昇し、増殖は著しく促進した。

5. DLE 中の inosine の分析

DLE-S および Fr-B は PHA 加 PBL の ATP 値を上昇せしめたが、このうち Fr-B についてこの中に inosine が含まれるか否かをみた。まず Fr-B および Fr-A, -C を GS320 で再分画した (図7)。つぎにこれらの再分画を UV スペクトルで比定した。その結果 Fr-B の B₁₄ が inosine と同定された。純度99.2%で、RCTF-1の1vial 中には62.3 μ g 含まれることが分かった。この B₁₄ を用いて、先に実験した inosine の濃度と一致させて PHA 加 PBL に作用させたところ、図5に示した結果とほぼ一致する結果が得られた。なお Fr-C の C₁₃ は uracil, Fr-A の A₁₄ は deoxyuridine, Fr-A の A₁₅ と Fr-B の B₁₅ はともに deoxy-inosine と同定された。

考 察

今回の実験は、DLE をいくつかの分画に分け、各分画を PBL に作用させて ATP 値を測定したのであるが、分子量1,000以下の Fr-S および sephadex G-10 で分画した Fr-B が PHA 加 PBL の ATP 値を上昇せしめた。ATP 値を上昇せしめる物質として inosine に着目したが、DLE 中には

inosine が含まれ、また inosine は ATP 値を高めるだけでなく、幼若化反応を著明に促進することが分かった。

まず、inosine の細胞内代謝についてみる。inosine は adenine や adenosine その他の核酸成分に比し細胞膜を透過しやすく、また毒性が少ない。細胞内に入った inosine は purine nucleoside phosphorylase (PNP) により磷酸化されリボース-1-リン酸 (P-1-P) になるが、このとき ATP を必要とせず無機磷酸が利用される。R-1-P はつぎに R-5-P に変化し、さらに phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) を経て各種 nucleotide に変換する。このとき ATP が生成され同時に種々の酵素が活性化される。ATP レベルが上昇すればヘキソキナーゼ活性も働き出して低酸素状態は改善し、細胞の病的状態は修復され、細胞は活発化する。inosine はとくに赤血球の保存に有利である。パネル赤血球の保存にはよく inosine が用いられる。臨床的には放射線や制癌剤の影響で骨髓障害に陥った患者、とくに白血球減少に陥った患者に用いられている。

このように細胞内における inosine の代謝はよく研究され、リンパ球内における代謝も研究されている¹³⁾。とくに PNP 欠損症と inosine の代謝との関係はかなり明確にされている¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、inosine が PHA 加 PBL の幼若化反応を著明に促進するということはあまり知られていない¹⁶⁾¹⁷⁾。

今回の実験を整理してみる。

Inosine を PHA 加 PBL の培養時に作用させると幼若化が早くはじまり、agglutination が促進し、ATP 値はコントロール群に比し有意に高く、³H-TdR uptake は最大になるところでコントロール群の4~5倍に達した。また inosine を作用させた群は viability が長く保たれた。inosine は線維芽細胞 (BHK) および白血病系株化細胞 (K562, Daudi) の増殖をとともに促進した。inosine は Fr-B に含まれていた。Fr-B は PHA 加 PBL の ATP 値を高めたが、³H-TdR uptake を高めることはなかった。

Inosine の PHA 加 PBL に対する作用は著明であったが、しかしはじめに PHA を加えてなけ

ればこのような作用はみられず、むしろ inosine の濃度が高くなるにつれて PBL の viability は低下した。このことより、inosine は休止細胞にはとくに作用せず、PBL の幼若化反応を誘導することはないと考えられる。おそらく inosine は mitogen の刺激を受けて活性化し、すでに幼若化した細胞に対して作用し、その反応を増幅したものと考えられる。PHA で刺激された PBL は PRPP が上昇するが¹⁸⁾、この PRPP の補給として inosine が利用されたのかもしれない。

Fr-B は ATP 値を高めたが³H-TdR uptake を高めることがなかったのは何故か。これはこの分画中に inosine 以外の成分が含まれており、それによって inosine の作用が阻害されたものと考えられる。とくに細胞に deoxynucleotide を作用させると ribonucleotide reductase がフィードバック的に阻害されるので DNA 合成が低下してしまう¹⁹⁾²⁰⁾。DLE はその作製中 DNase で処理されるので種々の核酸成分が DLE 中に含まれることになり、実際に DLE 中には各種 oligonucleotide や nucleoside が含まれ、種々の deoxynucleotide も確認されている¹¹⁾。我々は以前に DLE (DLE-W) は白血病系株化細胞を抑制することをみたが¹⁰⁾、これも上記の種々の成分が作用し中毒性に働いたためではないかと現在考えている。しかし DLE-W は線維芽細胞に対してはその増殖を促進する作用を示す⁹⁾。この作用の違いの理由は未だ明らかではない。おそらくこれは白血球系の細胞と線維芽細胞系の細胞とでは DLE 中の種々の物質を吸収し代謝する能力がかなり異なるためであろうと考えられる。いずれにしても線維芽細胞、白血病系株化細胞、そして PHA 加 PBL に対して促進的に作用するものとして inosine が考えられる。これまで DLE の PBL に対する作用は今ひとつ明確ではなかったが、DLE が PBL に対して何らかの賦活作用を示すとすれば、DLE 中に含まれる inosine の作用が重要であると考えられる。

結 語

DLE 中のある分画を PHA 加 PBL に作用させたとところ ATP の上昇がみられたことから inosine に着目し、DLE 中には inosine が含まれ

ることを確認した。また inosine は PHA 加 PBL の幼若化反応を著明に高めることを見出した。inosine は mitogen の刺激を受けて活性化した PBL に対して作用し、その反応を増幅するものと思われた。

文 献

- 1) Lawrence, H.S.: The transfer of generalized cutaneous hypersensitivity of the delayed tuberculin type in man by means of the constituents of disrupted leukocytes. *J. Clin. invest.*, 33: 951—952, 1954.
- 2) Lawrence, H.S.: The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and tuberculin with disrupted leukocytes. *J. Clin. Invest.*, 34: 219—230, 1955.
- 3) Levin, A.S., Spitler, L.E., Stiltes, D.P. and Fudenberg, H.H.: Wiskott-Aldrich syndrome, a genetically determined cellular immunologic deficiency: Clinical and laboratory responses to therapy with transfer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 67: 821—827, 1970.
- 4) Pabst, H.F. and Swanson, R.: Successful treatment of candidiasis with transfer factor. *Br. Med. J.*, 20: 442—443, 1972.
- 5) Gross, P.A., Patel, C. and Spitler, L.E.: Disseminated cryptococcus treated with transfer factor. *J.A.M.A.*, 240: 2460—2462, 1978.
- 6) Fudenberg, H.H., Wilson, G.B. and Smith, C.L.: Immunotherapy with dialyzable leukocyte extracts and studies of their antigen-specific (transfer factor) activity. *Proc. Virchow-Pirquet Med. Soc.*, 34: 3—87, 1980.
- 7) Steele, R.W.: Transfer factor and cellular reactivity to varicella-zoster antigen in childhood leukemia. *Cell Immunol.*, 50: 282—289, 1980.
- 8) Lawrence, H.S. and Barkowsky, N.: A new basis for the immunoregulatory activities of transfer factor. *Cell Immunol.*, 82: 102—116, 1983.
- 9) 小松文夫, 岡村経一, 笹川 滋, 竹ノ内康司: トランスファーファクターの添加による培養 BHK 細胞(BHK/21)の増殖促進効果。アレルギー, 31: 252—259, 1982.
- 10) 小松文夫, 笹川 滋: Transfer Factor の生物活性—とくに Lymphoid Chalone との類似性について。日本輸血学会誌, 30: 456—464, 1984.
- 11) RCTF-1に関する研究班: RCTF-1に関する研究報告。血液事業 Blood Programme, 6: 487—535, 1983.

- 12) Tomar, R.H., Knight, R. and Stern, M.: Transfer factor: Hypoxanthine is a major component of a fraction with in vivo activity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 58: 190—197, 1976.
 - 13) Thompson, L.F.: Inosine 5'-Monophosphate vs inosine and hypoxanthine as substrates for purine salvage in human lymphoid cells (42119). *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 179: 432—436, 1985.
 - 14) Gelfand, D.W., Nans-Michael, D., Biggar, W.D. and Fox, I.H.: Partial purine nucleoside phosphorylase deficiency. *J. Clin. Invest.*, 61: 1017—1080, 1978.
 - 15) Cohen, A., Doyle, D., Martin, D.W. and Ammann, A.J.: Abnormal purine metabolism and purine overproduction in a patient deficient in purine nucleoside phosphorylase. *N. Engl. J. Med.*, 295: 1449—1454, 1975.
 - 16) Agarwal, R.P., Sagar, S.M. and Parks, R.E.: Adenosine deaminase from human erythrocytes: Purification and effects of adenosine analogs. *Biochem. Pharmacol.*, 24: 693—701, 1975.
 - 17) Polmar, S.H., Wetzler, E.M., Stern, F.C. and Hirschhorn, R.: Restoration of in vitro lymphocyte responses with exogenous adenosine deaminase in a patient with severe combined immunodeficiency. *Lancet*, 2: 743—746, 1975.
 - 18) Hovi, T., Allison, A.C., Raivio, K. and Vaheri, A.: Purine metabolism and control of cell proliferation. *Purine and pyrimidine metabolism*, pp. 225—248, Ciba Foundation Symposium 48, Elsevier, Amsterdam, 1977.
 - 19) van der Kraan, P.M., van Zandvoort, P.M., DeAbreu, R.A., van Baal, J.M. and Jan, A.J.M. Bakkeren: Inhibition of lymphoid cell growth by adenine ribonucleotide accumulation. The role of phosphoribosylpyrophosphate-depletion induced pyrimidine starvation. *Bioch. et Biophys. Acta*, 927: 213—221, 1987.
 - 20) Boss, G.R.: Purine deoxynucleosides and adenosine dialdehyde decrease 5-amino-4-imidazolecarboxamide (z-base)-dependent purine nucleotide synthesis in cultured T and B lymphoblasts. *Biochem. J.*, 242: 425—431, 1987.
-