Natural killer 細胞活性測定法

押 味 和 夫・狩 野 庄 吾

Assay of Natural Killer Cell Activity

Kazuo Oshimi, Shogo Kano

*Department of Medicine, Division of Clinical
Immunology, Jichi Medical School,*

Tochigi 329-04, JAPAN

Key words: NK cell, assay method.

I. は じ め に

Natural killer (NK) 細胞はヒト, マウス, ラット等の末梢血, 脾臓, リンパ節等に存在し, 抗原や mitogen の刺激なしに“自然に”キラー活性を有している正常未感作リンパ球である. このリンパ球はヒトでは IgG の Fc 部分に対するレセプターを持ち, T と non T の双方にその活性を認める^{1,2)}. NK 細胞の生体内での働きについては不明の点が多いが, 最近腫瘍の発生に対する防禦機構 (いわゆる免疫学的監視機構) の 1 つとして重要な働きをしているのではないかと考えられており³⁾, さらにウィルス等の感染に対する防禦機構としても重要な役割を担っているのではないかと考えられている⁴⁾.

ここでは著者らが現在行っているヒトの NK 細胞活性測定法について紹介し, あわせていくつかの実験をもとにヒト NK 細胞活性測定上の問題点を指摘したい.

II. 必要な器具および試薬

1. 機 器

炭酸ガス培養器 (われわれは培養室に1台, R.I. センターに1台置いて使っている)

クリーンベンチ

冷却遠心器

オートクレーブ

乾熱滅菌器

培養液除菌用加圧濾過装置

2. 器具および試薬

Ficoll-Conray 液 (比重 1.077)

Hanks 液 (GIBCO) または PBS (一)

培養液 199 (日水製薬)

RPMI 1640 粉末培地 (GIBCO)

Fetal Calf Serum (FCS) (Flow-大日本製薬)

(56°C 30 分非動化後使用)

2-mercaptoethanol (2-ME) (Sigma)

結晶ペニシリン G (100 万 u/vial)

硫酸ストレプトマイシン (1 g/vial)

L-グルタミン (和光純薬)

Eagle の MEM 用の essential and non-essential amino acids (Flow-大日本製薬)

Na₂ ⁵¹Cr O₄ 1 mCi/vial (日本アイソトープ協会)

ツ反用プラスチック注射器

Eppendorf Micropipette 100 μ l 用 (Eppendorf)

Eppendorf Micropipette 用黄色チップ (Eppendorf)

Hamilton PB 600-1 Dispenser (Hamilton- 日本クロマイト工業)

Linbro Tissue Culture multi-well plate, round bottom (Flow-Linbro, 大日本製薬, 76-013-05)

図1 NK細胞活性測定法

Falcon polypropylene 2059 tube (Falcon, 17×100 mm)

ネジ付きガラス試験管 (Corning-イワキ, 16×125 mm, 16×100 mm)

プラスチックシャーレ Nunclon® (Nunc, 5 cm 直径)

Detergent 7X (Flow-Linbro)

Titertek® supernatant collection system (Skatron-Flow, 大日本製薬)

プレス, フォーク, ラック

harvesting frame, transfer tube

Erythrosine (和光純薬)

各種ピペット類

III. 測定法 (図1)

1. エフェクター細胞の準備

ヘパリン採血したヒト末梢血を通常の Ficoll-Conray 液を用いてリンパ球分離する。Autoclave にて滅菌した Corning 社製ネジ付きガラス試験管 16×125 mm に約 3 ml の Ficoll-Conray 液を入れ、そのうえに Hanks 液または PBS (-) で 2 倍に希釈した末梢血を重層さ

せ、1,500 rpm 30 分室温で遠心する。遠心後単層に分離したリンパ球を 16×100 mm のガラス試験管に採取し、Hanks 液または PBS (-) で 1,800 rpm 10 分、つづいて 1,000 rpm 10 分 4°C で 2 回遠心洗浄し、リンパ球数を $2 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整する。このときの培養液は 10% FCS 添加 199 を用いる。ついで autoclave した黄色チップを付けた Eppendorf のピペットで $100 \mu\text{l}$ ずつ triplicate で Linbro microculture plate, round bottom (76-013-05) に入れ、これを NK 活性測定のエフェクター細胞とする。1 well あたりのリンパ球数は 2×10^5 である。

2. 標的細胞の準備と ^{51}Cr 放出試験

^{51}Cr 放出試験の標的細胞としてはヒト NK 細胞に感受性のたかい細胞株である K 562 や MOLT-4 (主に K 562) を用いている。まず *in vitro* で継代培養している K 562 細胞の viability を 0.2% エリスロシン液 (和光純薬) で数えて、生細胞 1×10^6 を Falcon 社製の polypropylene tube (17×100 mm) にとり、1,000 rpm 10 分遠心後上清を約 0.2 ml 前後残して除去し、これに mixer で細胞を浮遊させるようにする。

日本アイソトープ協会より購入した 1 mCi/vial の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ に 2 ml の培養液 199 (ペニシリン, ストレプトマイシン添加) を加え 4°C に保存しておき, 使用の際約 40~50 μCi に相当する ^{51}Cr をツ反用プラスチック注射器にとり, 上記の K 562 に加え 1 1/2~2 時間, 37°C 培養器中で培養し ^{51}Cr を標識する. ^{51}Cr の半減期は 28 日と短いため購入した ^{51}Cr はなるべくすみやかに使いきるようにしている. 1 1/2~2 時間の標識後培養液 199 で 4 回洗浄し, 最後に 4 ml の 199 (10% FCS 添加) に浮遊させ, ツ反用プラスチック注射器を Hamilton の PB 600-1 dispenser に固定し, これに ^{51}Cr を標識した K 562 を吸引する. できるだけ空気を除くようにする (K 562 は沈殿しやすいため吸引前に十分混ぜること). Linbro の microculture plate にあらかじめ入れておいたエフェクター細胞中に標的細胞を注入する. Hamilton の dispenser は 1 回の押出しで約 0.02 ml 排出されるため, 1 well につき 2 回押出すと 0.04 ml すなわち 1×10^4 個の ^{51}Cr 標識 K 562 が排出される (エフェクター: 標的細胞 E:T=20:1). エフェクター細胞を well に入れてから標的細胞を加えるまで時間がたっている場合には, 細胞が沈んでいるため, エフェクターと標的細胞が十分混ざるようにツ反用注射器の針先を十分培養液に入れて注入した方がいい. 後述するように % 特異的 ^{51}Cr 放出値を算出するためには maximum ^{51}Cr release, spontaneous ^{51}Cr release を測定する必要があるため, Linbro の microculture plate の一部をこれにあてる.

Maximum ^{51}Cr release とは ^{51}Cr を標識した標的細胞から最大限放出される ^{51}Cr 量であり, 蒸留水に 8% detergent 7X を加えた液を 0.1 ml ずつ triplicate で well に入れ, これに ^{51}Cr を標識した K 562 を加えて培養した後に放出された ^{51}Cr 量を maximum ^{51}Cr release とみなしている.

Spontaneous ^{51}Cr release とはエフェクター細胞を加えないで標的細胞単独培養時に自然に放出される ^{51}Cr 量であり, 10% FCS 添加培養液 199 を 0.1 ml ずつ well に入れ, そこに ^{51}Cr 標識標的細胞を加え一定時間培養後放出 ^{51}Cr 量を測定したものである. Microculture plate のエフェクター細胞に標的細胞を加えた後, 37°C の 5% CO_2 培養器中で通常 4~6 時間培養する. 後述するように培養時間の違いで放出される ^{51}Cr 量に差があるため, 一連の実験では決った培養時間を設ける必要がある.

3. 収 穫

一定時間培養後培養液中に放出された ^{51}Cr を収穫するため, Titertek supernatant collection system を用いている. このシステムは大量の検体を収穫するのに便利である. 先端に円形の濾紙 (disc filter) のついた円筒形の absorbing element が 48 個並んだ harvesting frame をプレートにのせ, プレスで徐々に圧迫すると液は disc filter を通して absorbing element に吸着され, disc filter は well の底に残るため細胞は absorbing element に吸着されずに液のみが吸着される. この absorbing element をラックとフォークを用いて transfer tube に移しそのままガンマカウンターで測定する.

4. キラー活性の算出法

% 特異的 ^{51}Cr 放出値は以下の式で算出する.

$$\frac{\text{Experimental } ^{51}\text{Cr release} - \text{Spontaneous } ^{51}\text{Cr release}}{\text{Maximum } ^{51}\text{Cr release} - \text{Spontaneous } ^{51}\text{Cr release}} \times 100$$

Experimental ^{51}Cr release はエフェクター細胞に ^{51}Cr 標識標的細胞を加え一定時間培養後の放出 ^{51}Cr カウント, spontaneous ^{51}Cr release および maximum ^{51}Cr release は前述したとおりである. 通常 % 特異的 ^{51}Cr 放出値を NK 細胞活性値とみなしている.

5. 標的細胞として用いる細胞株の維持

K 562 などヒトの NK 細胞に感受性のたかい細胞は *in vitro* で継代培養している細胞株である. 容器は 5 cm 直径の乾熱滅菌したガラスシャーレまたはプラスチックシャーレ Nunc (Nunc 社) を用いている. 培養液は RPMI 1640 に 5% FCS, 5×10^{-5} モル 2-ME, ペニシリン G 100 u/ml, ストレプトマイシン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 mM L-グルタミン, Eagle の MEM 用 essential & nonessential amino acids を加えたものを使用している. 培養液は 2~3 日に 1 回交換する. 細胞の増殖や viability は随時倒立位相差顕微鏡で確認している. なおこれまで述べてきた操作はすべて無菌的に行うこと.

IV. NK 活性測定上の問題点^{5,6)}

1. 標的細胞の NK 感受性

表 1 に示すようにヒト NK 細胞に対する感受性は標的細胞の種類により著しく異なっている. われわれが検討した 16 種類の細胞の中では K 562 がもっとも感受

表 1 標的細胞の NK 感受性. ^{51}Cr 放出試験の標的細胞として用いる細胞株によって NK に対する感受性が著明に異なっている. E : T = 20 : 1.

Target cell lines	% specific ^{51}Cr release	
	Donor I	Donor II
MOLT-4B (ALL, T cell)	19.7	37.0
TALL-1 (lymphosarcoma, T cell)	1.5	2.8
BALL (ALL, B cell)	5.4	14.1
P3HR-1 (Burkitt, B cell)	5.5	17.2
Ohta (ALL, null cell)	2.7	4.9
K562, clone 2 (CML)	30.3	61.1
clone 6 (CML)	35.3	69.0
Hattori (breast ca.)	20.0	—
JN501 (nasopharyngeal ca. B cell)	6.8	18.6
SEKI / CI-II (melanoma)	5.0	16.5
OAT (oat cell ca.)	0.8	0.3
Okajima (gastric ca.)	0.5	—
Sumiya (normal B cell line)	4.4	6.6
Suzuki (normal B cell line)	1.5	4.8
EL-4 (mouse T cell lymphoma)	1.2	4.6
YAC-1 (mouse T cell lymphoma)	0.8	1.0

図 2 2種類の標的細胞に対する5名の正常人のNK細胞活性. エフェクター細胞数をふやすに従いキラー活性の上昇を認める.

性がたかい. Stockholm の Karolinska 研究所の Dr. George Klein より分与していただいた K 562 は clone 2 と clone 6 の2種類だが, 1回の実験で clone 6 の方がやや感受性がたかいという結果を得たため, 以後の実験ではすべて clone 6 を使用している.

2. エフェクター細胞

正常 donor の NK 活性にも個人差や性差, 年齢差がある. 末梢血, 骨髓, リンパ節など臓器によっても活性に差がみられる. エフェクター細胞の数をふやすとキラー活性は上昇するが, ある数以上のエフェクター細胞ではキラー活性は平坦化する. 図2に示すように E : T

図3 ^{51}Cr 放出試験における % キラー 活性の経時的変化。
(donor は正常人4名)

40:1, 20:1, 10:1 で K 562, MOLT-4 に対する NK 活性をみるとこれらの E:T 比では3点の % NK 活性を結ぶ線がほぼ直線になるため, 多数の患者の NK 活性を測定する場合その中央の 20:1 だけで測定している。しかし正確には実験のつど少なくとも3つの E:T 比で行い直線になる範囲を見出し, 一定数の細胞の中にエフェクター細胞がどの程度の割合で含まれているかを計算する必要がある (lytic unit の計算については文献⁷⁾を参照のこと)。

また同一個人からのリンパ球でも実験のたびに NK 活性がばらつくことがある。これは実際に個人の NK 活性が変化するという可能性と, より強い可能性として用いる標的細胞側に問題があるのではないかと考えられている。

3. 培養時間

図3に示すように培養時間の延長とともにキラー活性も上昇するが, 用いる標的細胞により異なったパターンを示す。MOLT-4 の場合培養時間の延長とともに maximum ^{51}Cr release に対する spontaneous ^{51}Cr release の割合が著増するため, 計算上は % キラー活性の低下となってあらわれる。K 562 の5時間培養では通常 spontaneous release が maximum release の10%前後であるが, これが異常にたかい場合にはデータ

を棄却すべきである。

4. 収穫法の問題点

Titertek supernatant collection system は大量の検体を短時間で収穫するためには非常に便利であるが, いくつかの欠点がある。まず1wellあたりの培養液が多すぎるとデータがばらつくこと。われわれはエフェクター細胞 0.1 ml, 標的細胞 0.04 ml 計 0.14 ml にしているが, 0.2ml 以上ではばらつきが大きくなる。つぎに, 収穫時 microculture plate のうえに載せた harvesting frame の absorbing element はプレスのアクリル樹脂板によって全体に均等に圧迫されるはずであるが, 実際には両端が中央より強く圧迫されるため plate の両端のデータがたかく出ることがある。この点に関しては現在改良中とのことである。もう1つの欠点は高価なことである。microculture plate 1枚を収穫するために4,500 円の費用がかかる。Titertek supernatant collection system を使用しない方法として, microculture plate を遠心して上清を採取しカウントする方法や, ^{51}Cr 放出試験を試験管内で行う方法がある。試験管法はエフェクター細胞と ^{51}Cr 標識標的細胞を試験管で一定時間培養した後, cold Hanks 液を一定量加えて攪拌し遠心して一定量の上清を取り, これをカウントする方法である。いずれの方法も Titertek supernatant collection system に比し時間がかかり大量の検体を処理しにくい欠点がある。また試験管法は標的細胞数およびエフェクター細胞数とも microculture plate 法に比べ多量必要となる。

V. おわりに

以上ヒトの NK 細胞活性の測定法につき現在われわれが行っている方法を中心に述べた。近年 microculture 法で培養した検体を大量に収穫できる方法が開発されたため, ^{51}Cr 放出試験は非常に便利になったが, いまだいくつかの問題点が残されている。NK 細胞が生体内で免疫学的監視機構の一員として重要な役割を担っている可能性が強いことから, 今後の NK 細胞研究のためにもより正確で安価な microassay 法が必要とされる。

文 献

- 1) West, W.H., Cannon, G.B., Kay, H.D., Bonnard, G.D. and Herberman, R.B.: Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes

against a myeloid cell line: characterization of effector cells. J. Immunol., 118: 355~361, 1977.

- 2) Gupta, S., Fernandes, G., Nair, M. and Good, R.A. : Spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by human T cell subpopulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75 : 5137~5141, 1978.
- 3) Kiessling, R. and Haller, O. : Natural killer cells in the mouse : an alternative immune surveillance mechanism? *Contemporary Topics Immunobiol.*, 8 : 171~201, 1978.
- 4) Santoli, D. and Koprowski, H. : Mechanisms of activation of human natural killer cells against tumor and virus-infected cells. *Immunol. Rev.*, 44 : 125~163, 1979.
- 5) 押味和夫・権田信之・隅谷護人・狩野庄吾・高久史磨 : ヒト Natural Killer 細胞活性測定上の問題点. *臨床免疫*, 11 : 73~78, 1979.
- 6) Oshimi, K., Gonda, N., Sumiya, M. and Kano, S. : Effects of corticosteroids on natural killer cell activity in systemic lupus erythematosus. *Clin. exp. Immunol.*, 40 : 83~88, 1980.
- 7) Brunner, K.T., Engers, H.D. and Cerottini, J.C. : The ^{51}Cr release assay as used for the quantitative measurement of cell-mediated cytotoxicity *in vitro*. In *in vitro* method in cell-mediated and tumor immunity. B.R. Bloom and J.R. David, editors. Academic Press, Inc., New York, p. 423~428.