1. Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity における

リンフォトキシンの役割について

矢野 啓介・大藤 眞・Zoltan J. Lucas*

The Roles of β -Lymphotoxin in antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity

Keisuke Yano, M.D., Tadashi Ofuji, M.D. and Zoltan J. Lucas, M.D.*

Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School, Okayama

** Department of Surgery, Stanford University Medical Center, California, USA*

【Summary】

We investigated roles of α - and β -lymphotoxins in antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) utilizing a homologous human system; skin fibroblasts with known HLA type, allo-antiserum and blood lymphocytes. Under assay conditions using optimal amounts of priming anti-HLA antibody, maximal killing of 60-80% was achieved within 6 hours. At this time, only β -LT was present in supernatants of lytic culture; α -LT was not detected. The amounts of β -LT, as well as the kinetics of appearance, paralleled the extent and kinetics of ADCC killing by lymphocytes. Allo-antibody directed to HLA determinants not on the target cells elicited neither lysis nor β -LT release.

Antisera were prepared to β -LT-containing supernatants or to partially purified α -LT. Anti- β -LT serum inhibited essentially only β -LT. Anti- α -LT inhibited from 13-38% of the total activity of standard β -LT preparations. We interpret this as either indicating a 13% contamination of the anti- α -LT with anti- β -LT activity or a 13% contamination of the standard β -LT preparation with α -LT. Both immune sera inhibited EA-rosette formation. In addition, anti- α -LT serum inhibited E-rosette formation. Anti- β -LT serum was markedly effective in inhibiting ADCC. Inhibition by anti- α -LT correlated with its anti- β -LT titer rather than with its anti- α -LT titer. Adsorptions to spleen cells essentially did not reduce the ability to block ADCC and totally removed EA-rosette inhibiting activity.

These data suggest that β -LT plays a important role in ADCC target destruction.

Key words: ADCC, α - and β -lymphotoxin,
anti-lymphotoxin-antibody

I. は じ め に

活性化リンパ球によって産生される可溶性の物質のう

ち、継代培養細胞、特にマウス線維芽細胞 L 929 株に対して強い障害性を有する因子^{1,2)}は、リンフォトキシン（以下 LT と略す）と総称され、種々の研究がなされている。Hiserodt ら³⁾は、LT 活性因子を分子量の差によって数種類に分け、それらは小分子の LT が重合してできた

もので、基本的には同一族であると考えている。しかし、Walker ら⁴⁾は、PHA 刺激リンパ球によって産生される LT は、その分子量、産生時期、熱に対する安定性の差によって、 α -LT と β -LT の 2 種に分けられ、さらに、 α -LT に対する抗体は β -LT 活性を中和できないことから、抗原性も異なった別の物質であると考えている。ところが、これらの LT の本来の機能が何であるのか、現在のところ、まったく不明であり、その産生細胞に関しても、 α -LT については、適当に刺激すれば、T 細胞、B 細胞、null 細胞のいずれも産生しうる⁵⁾ので、産生細胞から、LT の機能を推測することもできない。

一方、antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) は、effector cells の Fc receptor を介して発現されてくると一般的に理解されている⁶⁾が、標的細胞の障害機構に関しては、まったく知られていない。そこで、この障害機構の解明のために、LT に着目し、ADCC 反応上清中に LT 活性が存在するか否か、存在するとすれば、いずれの LT か、さらに、これらの LT に対する抗体が、ADCC に影響を及ぼすか否かを検討した。

II. 材料と方法

1. Lymphotoxin Assay

この方法については、以前に詳述⁷⁾してあるので参照されたい。略記すると、まず、マウス線維芽細胞 L 929 株の monolayer を microtiter plate (Falcon, #3034) の各 well に作製し、Actinomycin D ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) にて処理したのち、試料を添加し、18 時間 incubate した。反応後、Na-K ポンプを利用して、K と同じ動態を示すルビジウム 86 (^{86}Rb ; $20 \mu\text{Ci}/\text{ml}$) を、残存細胞にとりこませ (^{86}Rb pulse technique)、傷害率を求めた。このとき、50% killing を示すために必要な LT の量を 1 単位とし、これを基準にして LT 量の比較を行った。

2. ADCC assay

HLA type の判明しているヒト線維芽細胞を、セシウム 137 (^{137}Cs) 照射器にて、2,000 R 照射し、その 1,000 個を microtiter plate (Falcon #3034) の各 well に植え 1 晩培養し monolayer を得た。これに、適当に希釈した同種抗 HLA 抗体 $0.2 \mu\text{l}$ を実験群に添加し、20 分間反応させたのち、標的細胞とは異なった HLA type のヒトから得たマクロファージ除去リンパ球を加え、1~20 時間反応させた。反応後、付着リンパ球を振盪除去し、前述の ^{86}Rb pulse technique にて、残存細胞を算定し、ADCC 活性を求めた。また、 ^{86}Rb にて pulse する前

に、LT 活性測定のための上清を少量採取した。

3. ロゼット形成による細胞分画⁵⁾

正常ヒト末梢単核球から、ベトリ皿付着法にてマクロファージを除去し、ヒツジ赤血球 (E)、抗ウシ赤血球抗体感作ウシ赤血球 (EA)、補体感作 EA (EAC) を用いてロゼットを形成させ、Conray-Ficoll 法にて、E-rosette forming cells (E-RFC)、non-E-RFC、EAC-RFC、non-EAC-RFC、EA-RFC、non-EA-RFC の 6 分画を得た。

4. 抗 LT (s) 抗血清の作製

1) 抗 α -LT 抗体の作製：ヒト扁桃腺リンパ球を、5% fetal calf serum (FCS) を含む medium にて $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、PHA を加えて 5 日間培養し、上清を採取後 Amicon にて約 50 倍に濃縮した。これを Sephadex G-100 column にて分画し分子量 75,000 に相当する LT 分画を得、さらに、DEAE-cellulose column を通し、結合しない LT 分画を集め濃縮し、精製 α -LT とした。この精製 α -LT の $1.6 \sim 5.1 \times 10^6$ 単位を、初回は同量の complete Freund's adjuvant とともに、以降は、同量の incomplete Freund's adjuvant を混じて、10~14 日間隔で家兎の皮内、皮下に注射し、最終回 (6 回目) は、booster として、 α -LT のみを腹腔に注射し、1 週間後に採血し、 56°C 、30 分にて不活化したのち、各種実験に用いた。

2) 抗 β -LT 抗体の作成：ヒトの脾リンパ球を PHA 存在下で 24 時間培養し、上清を採取後ただちに Amicon にて、約 50 倍に濃縮し、その著しい不安定性からこれ以上の精製は行わず、その 1×10^5 単位をとり、抗 α -LT 抗体作製と同様の方法で家兎に免疫して作製した。

このようにして得られた、抗 LT (s) 抗体の性質を調べてみると、表 1 に示すように、抗 α -LT 抗体は β -LT をほとんど中和しないが、E-rosette を 100%、EA-rosette を 76% 阻止し、抗 β -LT 抗体は、 α -LT を中和せず、E-rosette をも阻止しないが、EA-rosette は完全に阻止された。

III. 結 果

1. 本実験に用いた ADCC の特徴

本実験に用いた ADCC の特徴は、標的細胞、抗 HLA 抗体 (Dr. R. Payne, Stanford Univ. より供与)、effector 細胞がいずれもヒト由来で、完全に homologous なことである。

この homologous な系の ADCC における抗体の特異性について、検討するために、HLA type の判明してい

表 1 Properties of anti-LTs antisera

	anti- α -LT ab.	anti- β -LT ab.	preimmune
neutralization of α -LT	120*	3*	0
neutralization of β -LT	16*	28*	0
blockade of E-rosetting	98%	0	0
blockade of EA-rosetting	76%	100%	0

*units blocked by 1 ul of anti-LTs antisera

表 2 Allo-antibody specificity of ADCC

target	anti-HLA antibodies		
	anti-HLA-A3	anti-HLA-A2	anti-HLA-A29
ZL fibroblast (HLA-A2, A3) #	70 $\pm$ 2*	72 $\pm$ 11	18 $\pm$ 1
SW fibroblast (HLA-A3, A29)	69 $\pm$ 4	16 $\pm$ 1	38 $\pm$ 7

*mean percent lysis $\pm$ SEM of ADCC killing

HLA type of effector cells was HLA-All, AW33

図 1 Optimal condition for ADCC

る標的細胞 (ZL; HLA-A2, A3) (SW; HLA-A3, A29) とその各 HLA に対する抗体を用いて, ADCC 反応を行ったところ, 表 2 のように, 標的細胞の HLA type に対応した抗体によってのみ, 強い ADCC 活性が得られ, 標的細胞上の HLA 抗原と結合した抗体を介して, ADCC が発現していることが確かめられた。

この系の effector target 比, 抗体の最適濃度を求めてみると, 図 1 に示したように, effector cells の数が標的細胞の 50 倍以上で, 抗体の最終希釈が 1/140 以下において, 強い ADCC 活性がみられた。これまでの報告に比べ, effector cells が多数必要なのは, 標的細胞が effector cells に比べ非常に大きいためと考えられる。

2. Effector cells の特徴

Homologous な ADCC 系における effector cells に

表 3 Characterization of effector cells in ADCC

cell population	percent lysis $\pm$ SEM
M ϕ depleted	55 $\pm$ 7
E-RFC	28 $\pm$ 6
non-E-RFC	74 $\pm$ 5
EAC-RFC	23 $\pm$ 9
non-EAC-RFC	74 $\pm$ 5
EA-RFC	41 $\pm$ 29
non-EA-RFC	62 $\pm$ 6

について検討するために, 6 つの分画細胞を用いて ADCC を行った。その結果, 表 3 に示すように, E-RFC, EAC-RFC 分画はほとんど ADCC 活性を示さなかったが, non-E-RFC, non-EAC-RFC は強い活性を示し, この系の effector cells は, T, B 細胞のいずれでもないらしいことが示唆された。ところが, Fc receptor 陽性細胞の関与については, EA-RFC 分画があまり強い ADCC 活性を示さず, non-EA-RFC がかなり強い活性を示しており, 分画後も Fc receptor が占拠されている可能性があり, 分画方法に問題があると思われた。

3. ADCC 活性と LT 活性

Effector cells を添加後経時的に ADCC 活性と上清中の LT 活性を測定してみると, 図 2 のように, ADCC 活性は effector target 比が 50 では, 6 時間でピークに達し以下プラトーを形成し, LT 量は ADCC 活性と平行して増加し, このとき両者間には $r=0.82$ という強い相関がみられた。次に, ADCC 反応上清中の LT の性質を

図 2 Kinetic curve of ADCC activity and LT production

検討するために、抗 LT (s) 抗体を用いて中和試験を試みた。その結果、表 4 に示すように、この LT 活性は、抗 β -LT 抗体によってのみ中和され、ADCC 活性に比例して、 β -LT が産生されてくることが証明された。

4. 抗 LT (s) 抗体の ADCC に及ぼす影響

ADCC 反応の標的破壊における β -LT 関与の可能性をさらに確かめるために、約 30 単位の LT を中和できる抗 LT (s) 抗体を加え、ADCC に及ぼす影響について調べた。その判定には、下式で求めた Protection Index (P.I.) を用いた。

$$P.I. = 1 - \frac{\text{percent lysis with anti-LTs antiserum}}{\text{percent lysis without anti-LTs antiserum}}$$

その結果、表 5 のように、抗 β -LT 抗体を添加したときのみ、 $P.I.=1.0$ となり強い ADCC 活性阻止作用がみられ、ADCC 反応における β -LT の役割がさらに確かめられた。ところが、抗 β -LT 抗体を作製した抗原は、非常に粗であるため、この抗 β -LT 抗体中に、Fc receptor をはじめとするリンパ球表面蛋白に対する抗体が混在していることは、この抗体が EA-rosette を阻止することからも明らかである。この作用による ADCC 活性阻止を除外するために、種々のヒト由来の細胞にて、抗 β -LT 抗体を吸収し、ADCC に対する効果を調べたところ、表 6 のように、脾リンパ球で 3 回吸収したのちも、この抗 β -LT 抗体は $P.I.=0.7$ と強い ADCC 阻止作用を有していた。この吸収後の抗 β -LT 抗体は、EA-rosette をまったく阻止できず、 β -LT に対する中和力を 3/4 残存していた。この実験からも、ADCC 反応における β -LT の関与が強く示唆された。

IV. 考 案

以上の結果をまとめてみると、ADCC 反応上清中に出現する LT 活性は、 β -LT に由来し、その産生量は ADCC 活性と強い正の相関を示し、また、抗 β -LT 抗体

表 4 LT activities in ADCC are neutralized by anti- β -LT antibody

source of LTs	amount of LT tested	amount of LT neutralized	
		Anti- α -LT ab.	anti- β -LT ab.
ADCC supernatants	$1.3 \pm 0.3^*$	0	1.1 ± 0
standard α -LT	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0	0
standard β -LT	6.1 ± 2.0	1.6 ± 0.6	5.7 ± 0.3

* LT amount in units

表 5 Antiserum to β -LT inhibits ADCC activity

	protection index*	
	anti- β -LT ab.	anti- α -LT ab.
preimmune serum	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
immune serum	1.0 ± 0	0.3 ± 0.1

* protection index = $1 - \frac{\text{percent lysis with anti-LTs antiserum}}{\text{percent lysis without anti-LTs antiserum}}$

表 6 Effect of adsorption of anti-LTs antisera on protection Index

antiserum	adsorbed on	protection index	
		anti- β -LT ab.	anti- α -LT ab.
preimmune	0	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1
immune	0	1.0 $\pm$ 0	0.3 $\pm$ 0.1
	HeLa	0.8 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1
	human fibro.	1.0 $\pm$ 0	0.2 $\pm$ 0.1
	spleen cells (once)	0.6 $\pm$ 0.3	0
	spleen cells (3times)	0.7 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1

が ADCC 活性を阻止できることなどから、 β -LT が ADCC 反応における標的細胞破壊に重要な役割を果たしているものと考えられる。しかし、抗 β -LT 抗体の ADCC 活性阻止作用については、この抗体が effector cells の Fc receptor を阻害するために生じた可能性を否定できない。ところが、EA-ロゼット形成を阻止できる抗 α -LT 抗体は ADCC 活性を阻止できず、また、抗 β -LT 抗体をヒト脾細胞にて、3回吸収したのちも、ADCC 活性阻止作用がみられることから、抗 Fc receptor 抗体の関与は考えられない。

この論文でとりあつかっている β -LT は、PHA で活性化されたリンパ球が、刺激後 12~24 時間の間に産生してくる分子量が 45,000 の可溶性の物質で、熱や保存に非常に不安定で、37°C、10 時間にて、その作用の 60% を失う。そして、刺激後 24 時間以後に産生され、熱に非常に安定で分子量が 75,000 の α -LT とは、抗 α -LT 抗体で中和されないことから、抗原的にも異なった物質であると考えられている。

これらの LT (s) が、lymphocyte mediated cytotoxicity (LMC) において、重要な役割を演じている可能

性を示した 2~3 の報告がみられる。すなわち、Walker & Lucas⁸⁾, Gately et al.⁹⁾, Hiserodt et al.¹⁰⁾ らは、個別に、LT に対する抗体が、PHA、特異抗原、アロ抗原によって活性化されたリンパ球の LMC 作用を抑制すると報告している。しかしながら、彼らは、T 細胞によって媒介される LMC について研究しており、ADCC 反応に関するものは、認められていない、さらに、Hiserodt et al.¹⁰⁾ は、PHA で 3 日間刺激したリンパ球の LMC は、抗 α -LT 抗体で阻止されるが、1 日間刺激したリンパ球による LMC は抑制しないと述べ、異なった type の LMC には、異なった LT が作用する可能性を示唆している。PHA 刺激にて活性化されたリンパ球は、24 時間以内には β -LT を産生し、それ以後は α -LT を産生することをあわせ考えるとじつに興味深い。

このように、LMC にはなんらかの型で、LT が関与しているという事実がみつげだされつつあるが、ADCC 反応において β -LT が重要な役割を演じているという、われわれの成績を加え、LT の本来の機能として、LMC への関与が、さらに大きく、クローズアップされた。

文 献

- 1) Ruddle, N.H. and Waksman : Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. I. Characterization of the phenomenon. *J. Exp. Med.*, 128 : 1237, 1968.
- 2) Granger, G.A. and Williams, T.W. : Lymphocyte cytotoxicity in vitro : Activation and release of a cytotoxic factor. *Nature*, 218 : 1253, 1968
- 3) Hiserodt, J.C., Yamamoto, R.S. and Granger, G. A. : The human LT system. III. Characterization of a high molecular weight LT class (complex) composed of the various smaller MW LT classes and subclasses in association with Ig-like molecules, *Cell. Immunol.*, 38 : 417, 1978
- 4) Walker, S.M., S-C. Lee and Lucas, Z.J. : Cytotoxic activity of lymphocytes. VI. Heterogeneity of cytotoxins in supernatants of mitogen-activated lymphocytes. *J. Immunol.*, 116 : 807, 1976
- 5) Yano, K. and Lucas, Z.J. : Cytotoxic activity of lymphocytes. VII. Cellular origin of α -lymphotoxin. *J. Immunol.*, 120 : 385, 1978.
- 6) Perlmann, P., Perlmann, H. and Wigzell, H. : Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro. Ind-

- uction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells. *Transplant. Rev.*, 13 : 91, 1972.
- 7) 矢野啓介, Lucas, Z.J. : ^{86}Rb を用いた細胞傷害試験, 免疫実験操作法 VI, 1791, 1977.
- 8) Walker, S.M. and Lucas, Z.J. : Role of soluble cytotoxins in cell-mediated cytotoxicity. *Transplant. Proc.*, 5 : 137, 1973.
- 9) Gately, M.K., Mayer, M.M. and Henney, C.S. : Effect of antilymphotoxin on cell mediated cytotoxicity. Evidence for two pathways, one involving lymphotoxin and the other requiring intimate contact between the plasma membranes of killer and target cells. *Cell. Immunol.*, 27; 82, 1976.
- 10) Hiserodt, J.C. and Granger, G.A. : Inhibition of human lymphocytemediated mitogen-induced cytotoxicity of murine L 929 cells by heterologous anti-human lymphotoxin antisera in vitro. *J. Immunol.*, 119 : 374, 1977.

2. NK 細胞, K 細胞の作用機序

小 出 幸 夫*・吉 田 孝 人**

I. は じ め に

ヒトそしてマウスにおいて発見された natural killer (NK) 細胞は同系, 同種そして異種の腫瘍細胞を明らかな感作なくして障害する¹⁻³⁾. そこでこれが免疫学的監視機構の役割を担っているのではないかとの期待のもとに多くの研究が積み重ねられてきた. また, 最近では移植された造血幹細胞を障害または制御する細胞が NK 細胞と類似した性格をもつことも報告され, 腫瘍免疫以外の領域でも NK 細胞は注目を集めている⁴⁾.

さらに, Roder ら⁵⁾はページ・マウスにおいて T 細胞, マクロファージの機能が正常であるにもかかわらず NK 活性のみを欠如していること, そしてヒトにおいて

も Chediak-Higashi 症候群がページ・マウスに相当して NK 活性が低下していることを発見し⁶⁾, NK 細胞の experiment of nature としての立場も出てきた.

ヒトにおいては, このような NK 細胞の性格は antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) の担当細胞である K 細胞のそれとほとんど共通しており, 現在までの方法では両者を明確に分離することは困難である. それゆえ, NK 細胞と K 細胞の比較分析を行うことは NK 細胞の作用機序を知るうえで重要である.

II. NK 細胞と K 細胞の性格

ヒト NK 細胞と K 細胞の性格をまとめ表 1 に示した. NK, K 細胞とも, 用いた標的細胞, 実験方法によりその

表 1 ヒト NK 細胞と K 細胞の性格

	NK 細胞	K 細胞
T-cell markers	± (Low affinity E-RFC)	±
Complement receptors	± (A few NK or K cells might possess the receptors)	±
IgG-Fc receptors	+++	+++
Surface membrane immunoglobuline	—	—
Phagocytosis	—	—
Adherence capacity	—	—
Aggregated Ig	Inhibition	Inhibition
Effect of aging	—	—

*浜松医科大学輸血免疫部, **同 微生物学教室