蛍光顕微測光によるリンパ球 DNA 濃度と免疫反応

熊本大学医学部整形外科

本 村 喜代二 (大学院)

北 川 敏 夫 (教授)

Correlation between DNA contents of Lymphocytes measured by Microfluorometry and Immunological Response

by

K. Motomura and T. Kitagawa

Department of Orthopedic Surgery Faculty of Medicine
Kumamoto University, Kumamoto

We stimulated peripheral lymphocytes with various antigens for 72 hr, and compared the value of Growth Fraction (G. F) with the morphological blastoid transformation rate. As a result, G. F. value is slightly higher than the morphological rate and the former is objectively reliable one.

Still more, G. F. indicated us that Polyvinylpyrrolidone, Dextran and Lipopoly-saccharides were excellent stimulators for B cell (G. F=0.4).

Rosette formation with Sheep-RBC doesn't need the synthesis of newly formed DNA of lymphocytes as like those stimulated by PHA.

Clinically, we think that G. F. of Lymphocytes is a very useful immunological parameter, but should take more many parameters as possible to secure more exactly the host-immunity status.

ま え お き

現在の悪性腫瘍の治療は外科的療法, 化学療法, 放射線療法に加え免疫療法が重要視されるに至った。特に化学療法に常についてまわる宿主免疫能の抑制は, われわれもこれを何らかの方法で把握する必要がある。今までに Rosette¹⁵⁾¹⁶⁾ 形成, PHA による芽球形成¹⁸⁾, 放射性同位元素¹³⁾ のとりこみによるリンパ球の DNA 合成等, 色々な方法が報告されている。これらはいずれも免疫担当細胞の T cell 機能をみており, その片輪たる B cell を把握するには ECA¹⁵⁾ を使用する Rosette 形成が行われるが S-RBC の感作が複雑で容易に行い難いのも事実である。そこでわれわれは, PHA によりプラスト化したリンパ球が DNA の合成を開始し, 元来の DNA 量 (2C) の 2 倍 (4C) になる事に着目し, B cell stimulator を加えてリンパ球を培養し 72 hr 後に DNA 合成期にあるリンパ球の比率 (Growth Fraction=G.F) を求め,

それを従来の形態学的数値との比較検討を行い, B cell の Growth Fraction を求め, 従来報告されている B cell の比率と比較した。

一方, 以前よりわれわれが行っている S-RBC による Rosette formation⁹⁾ も, これら抗原と同様に DNA 合成を必要とする免疫反応かどうかを, G.F にて検討した。更にこれら G.F や Rosette 形成が臨床上一いかなる変動を示すか追及した。

材料および方法

ヒト症例として健康人 24 名, 良性腫瘍 9 例, 悪性腫瘍 8 例で, 実験動物群として Donryu-Rat を用い, 腫瘍 (Walker's Carcinosarcoma) 移植群 10 匹, 無処置群 8 匹にて各々末梢血リンパ球を分離 (Lymphoprep にて), RPMI-1640 にて培養し, これに抗原として PHA-P (20 μ g/ml), Con-Canavalin A (1 g, 10 μ g), Dextran (MW 57,500, 176,000, 500,000 の 3 種を 1 mg/ml) Polyvinylpyrrolidone

=PVP (MW 40,000, 700,000 の2種を 500 mg/ml) Lipopolysaccharide=LPS (10 μ g/ml, 100 μ g/ml) を使用し 72 hr 培養後, 形態学的芽球形成率と蛍光顕微測光による G.F を求めた. 染色は Feulgen 染色¹⁴⁾ を行い計測は Nikon SPM-RFL を使用した.

一方 Rosette³⁾⁵⁾¹⁶⁾ は橘らの原法に基づき Set し 24 hr 後に Rosette 形成率と, そのリンパ球の G.F を求め一部は更に 72 hr まで培養しその時点での G.F を求めた.

結 果

表-1-A はヒトのリンパ球を各種抗原で刺激しその G.F と形態学的芽球形成率を比較したもので, ヒトの B cell stimulator としては Dextran (MW 500,000) と P.V.P. (MW 700,000) が 40%前後を示し文献上の EAC による Rosette 形成率と近似値を示している. また形態学的芽球形成率よりも G.F の値がより高く出ている.

表-1-B は Rat リンパ球のそれであるが, B cell stimulator として P.V.P., Dextran の他に L.P.S. も有効である. またヒトの場合と同様 G.F が形態学的芽球形成率よりも高くでている.

表-2 は, Rosette formation と G.F との関係を示したもののだが, 24 hr 後の反応にて 50~60%のリンパ球が Rosette を形成しているが, その時点の G.F は, 採血直後の G.F と大差なく, 従って Rosette formation の完成にはリンパ球の DNA 合成は直接必要ないものと考えられ, Rosette formation は, これらリンパ球の膜構造に由来するものと考えられる. 然るに先の実験でリンパ球の DNA 合成には約3日間を要する事が判っているので, われわれはこれら Rosette 形成リンパ球を更に 72 hr まで培養し, その時点でリンパ球の G.F を求めたところ, その値は 70%前後に達し PHA や Con-A などの T cell stimulator による G.F より高くでた事から, 単に S-RBC は T cell のみを刺激したのか, または B cell も刺激したのか今後その解釈には検討が必要と思われる.

以上 G.F にスポットをあてリンパ球免疫反応を追及してきたが, これら因子を臨床症例についてみると, まず表-3-A は, Reticulum cell sarcoma の例で手術後臨床的には小康状態を維持しているが, 各パラメーターも大きな変動をみていない. ただピシバニ

表1-A Growth fraction と形態学的数値との相関 (ヒト)

() 内が形態学的芽球形成率 単位%

	健康人	良性腫瘍	悪性腫瘍
PHA	43.7 (41.6)	44.3 (38.2)	38.6 (30.1)
Con-A	35.4 (31.6)	29.9 (30.1)	39.6 (26.3)
Dext (MW. 57,500)	27.3 (20.4)	24.3 (21.1)	21.4 (22.1)
Dext (" 176,000)	36.0 (26.0)	28.1 (28.3)	34.4 (30.1)
Dext (" 500,000)	43.6 (32.6)	34.6 (31.2)	38.1 (29.9)
PVP (" 40,000)	12.3 (6.1)	16.3 (8.6)	9.6 (10.6)
PVP (" 700,000)	40.1 (29.6)	34.1 (25.1)	28.3 (19.4)
コ ン ト ロ ー ル	9.8	10.2	11.1

表1-B Growth Fraction と形態学的数値との相関 (Rat)

() 内が形態学的芽球形成率 単位%

	未処置群	腫瘍群
PHA	54.6(39.6)	50.0(34.2)
Con-A1 μ g	41.2(32.9)	37.3(31.1)
Con-A10 μ g	58.8(39.3)	51.2(41.6)
Dext	13.1(10.2)	18.1(17.3)
Dext	26.5(24.1)	56.9(52.1)
Dext	36.4(28.1)	48.1(43.1)
PVP	26.6(27.6)	29.8(25.2)
PVP	46.4(32.1)	50.0(39.7)
LPS10 μ g	31.0(29.4)	29.6(31.1)
LPS100 μ g	18.2(11.1)	22.1(16.4)
コ ン ト ロ ー ル	13.2	11.4

ール使用後4カ月にわたり徐々に各因子の上昇をみているが, それ以降はまた, 旧に復している.

表-3-B は, Osteosarcoma の例で入院後より今日まで約3カ月にわたって追及したもののだが, 大きな変化としては, クレスチン投与開始後, 約2週間で Rosette 形成率は急上昇を示し, 手術後1週間で 28%と最低におちこみ, その1月後には術前に復し以降安定している.

PHA による芽球形成率や G.F は, 全体として大きな変動を示さないが, ADR や H-D-MTX 療法等,

表2 Rosette formation と G. F.

	採血時の GF	24hr 後の Rosette 形成率	24hr 後の GF	72hr 後の GF
健康人	9.8±2.14%	59.3±8.76%	11.3±3.31	70.6±4.9%
良性腫瘍	10.2±2.21	54.6±7.01	11.2±2.90	73.1±6.6
悪性腫瘍	11.1±2.41	49.5±8.43	14.1±2.30	70.2±6.1

表3-A

Case 1. Reticulum Cell Sarcoma

表3-B

表4 制癌剤使用時のリンパ球の Growth Fraction* (PHA 刺激後72hrで計測)

*DNA 合成期にある細胞 (S+G₂・M)

コントロール	7.8%
PHAのみ	47.1
MMC 使用群	29.8
EnX	35.9
ADR*	22.
5FU	38.2
BLM	45.2

* ADR では2C (Diploid) 以下も22%存在した

考 察

顕微蛍光測光 (Microfluorometry) は近年 DNA の計測のみならず、神経終末における Monoamine の定量や各種微量物質の定量等広い分野で応用されている。本実験で使用された Feulgen 染色は 1924 年 Feulgen により報告され、その後 Lessler⁸⁾ らにより、Shiff reagent と DNA の定量的結合関係が証明され、かつ結合量に比例した蛍光量を発する性質が判るに到り Leuchten-berger⁹⁾ らにより Microspectrophotometry が普及し、近年 Böhm²⁾ らにより Microfluorometry が応用されるに到ってきた。元来、哺乳類のリンパ球を始めとする細胞の DNA は一定であるとする Constant theory が Garcia⁴⁾ らにより報告されてから、本法による生体細胞の DNA 分布の把握の重要性が位置づけられたといっても過言でない。通常細胞の DNA 量は Diploid (2C)⁵⁾ であるが、これが分裂直前になると2倍の tetraploid (4C) になる事は周知であるが、腫瘍の悪性化に伴い DNA 量も 8C, 16C とその変動が大きくなる事が Leuchten-berger¹⁰⁾ や Avtandilov¹¹⁾ により報告されている。同様にリンパ球も抗原の認識に伴ってその DNA 量は 2C から 4C になる事が Tomonaga¹⁷⁾ らにより報告されている。各種抗原刺激後も同様にそれに感受性のあるリンパ球は DNA 合成を開始するわけでその合成を開始したリンパ球の比率を Growth Fraction として私達は追及したわけで

制癌剤使用により一時的低下傾向を示しており、G.F が制癌剤によって抑制を受ける事を示している。

私達は今までに制癌剤は腫瘍細胞の DNA 合成を抑制すると共に、リンパ球の DNA 合成も阻害し、その結果 G.F も低下する事を報告しました。

表-4 が各制癌剤のリンパ球の G.F に及ぼす影響である。

以上リンパ球の免疫反応を G.F から検討したが、本法は数的に客観性が高い点は、データーとしても信頼度が高いと考えられる。

ある。この G.F. は、悪性腫瘍患者らで低下する事、即ちリンパ球の免疫能の低下が Vankas¹⁹⁾ により報告されているが同様の現象は抗癌剤使用時にもみられる事は先に述べた。従ってわれわれ治療するサイドとしては少くとも宿主の免疫能を何らかのパラメーターで把握する事が不可欠でこの一法として蛍光顕微測光による G.F. の把握は有効な手段と考えられる。今回の目的である B cell stimulator としては大沢¹¹⁾ らを初め数多くの抗原が報告されているが、われわれの G.F. の値からは、人間では Dextran, PVP が, Rat では LPS が有用である事が確認された。従って臨床的なスクリーニングとして T cell を PHA で, B cell を Dextran にて刺激培養し双方の G.F. を求めその変動をつかめば個々の治療に対する生体の免疫状態の把握が可能であると考えられる。S-RBC を用いた Rosette formation も T cell の変動を知る重要な手段であるが, Rosette 形成では PHA による Blast formation と異なりリンパ球の DNA 合成は行われていない。

従って同じ免疫学的応答でも, PHA による Blast 化と, Rosette とは、異なる面をついている可能性もある。Greaves⁷⁾ らが soluble PHA は T cell を刺激するが Insoluble PHA は B cell も刺激すると報告している通り、われわれが S-RBC をリンパ球と共に 72 hr 培養した後の G.F. は 70%以上と単に T cell のみを刺激した G.F. より大きいことから、S-RBC は B cell も刺激しているのかもしれない。また臨床症例の検討から、全ての抗癌剤の宿主免疫能に及ぼす影響を 1つのパラメーターで把握することは困難で、薬剤により鋭敏に反応するパラメーターが存在するようである。たとえば免疫強化剤のビンバニールやクレスチンは Rosette formation に、よりよく反応し、アドリアシンやメソトレキセート etc. は、DNA 合成面からとらえたリンパ球の G.F. によく反映されるようである。従って宿主免疫能の把握にはより多くのパラメーターを同時にみる事が必要と思われる。

ま と め

1. リンパ球の免疫反応をその G.F. から追及し各種抗原による刺激度や抗癌剤による抑制度等、宿主免疫能の推移を知るのに蛍光顕微測光は有用な手段である。

2. B cell の stimulator としては、ヒトでは PVP, Dextran が Rat では更に LPS が有効であり、その G.F. の値は、文献上の B cell の比率に近似している。

3. S-RBC による Rosette formation には、DNA 合成は必要としない。

4. 臨床的にはより多くの免疫パラメーターを採用すべきで、各治療に即しての変動を長い経過の中の流れとしてとらえる必要がある。

References

- 1) Avtandilov, G. G.: Cancer 38: 254-258, 1976.
- 2) Bohm, N.: Histochemi. 16: 100-118, 1968.
- 3) Coombs, R. R. A.: Int. Arch. allergy 39: 658-663, 1970.
- 4) Garcia, A. M.: Histochemi., 3: 170-177, 1962.
- 5) Garcia, A. M.: Acta Histochemi. 17: 240-258, 1964.
- 6) Gordon, J.: Cline. Exp. Immunol 6: 681-688, 1970.
- 7) Greaves, M. F.: Trans. Rev. 11: 87-130, 1972.
- 8) Lessler, M. A.: Internal Rev. Cytol. 2: 231-247, 1953.
- 9) Leuchtenberger, C. G.: Cytol. Met. 219 278, Western Res. Univ. Press. 1956.
- 10) Leuchtenberger, C.: Am. J. Path. 49: 65 85, 1964.
- 11) Osawa, T. 代謝: 12: 583-592, 1975.
- 12) Pentycross, C. R.: J. Clin. Path. 21: 175-178, 1968.
- 13) Scher, I. J.: Exp. Med. 138: 1545-1563, 1973.
- 14) Sec, S.: 蛋白質, 核酸酵素 10: 81-99, 1965.
- 15) Stjernsward, J.: Lancet June 24: 1352-1356, 1972.
- 16) Tachibana, T.: Jop. J. Exp. Method 43: 227-230, 1973.
- 17) Tomonaga, S.: 解剖誌学会記録 p. 77, 1969.
- 18) Trubowitz, S.: Cancer 19: 2019-2023, 1966.
- 19) Vankas, F. J.: Nat. Can. Inst 51: 17-24, 1973.

質 問

宮崎医大 木村 千似

活動性 R A 関節液中のリンパ球について、われわれは DNA 合成の促進傾向をみたが、Tumor でその

悪性度によっては似たような現象がみられるであろうか？

発 言

熊大整外 本村喜代二

原則としては悪性腫瘍の細胞性免疫能は低下しており、リンパ球免疫能の発現には DNA 合成が伴う事から、その DNA 合成能は RA と異なり低下していると

考えられます。とりわけ制癌剤を使用いたしますと、これら薬剤による DNA 合成抑制も相乗した形となり更に、リンパ球の DNA 合成は抑制されます。そういう意味ではリンパ球に対して、抑制の少ない薬剤選択も抗腫瘍効果の大小と共に重要な選択要因となると考えます。