

〔原著〕 細胞障害性 T 細胞による同種骨髄拒絶と veto 細胞による拒絶反応の抑制

中 村 博 敏*

(平成 4 年 3 月 31 日受付, 平成 4 年 5 月 29 日受理)

要 旨

細胞障害性 T 細胞 (CTL) による同種骨髄拒絶の機序と, CTL に対する抑制細胞である veto 細胞による拒絶反応の抑制について検討した。同種骨髄を拒絶したマウス (C57BL/6; B6) 脾細胞より CTL がクローニングされた。分離された CTL クローンは, ドナー骨髄の主要組織適合性抗原 (MHC) に特異的な細胞障害性を示した。この CTL クローンを致死量を照射した B6 に養子免疫し, 移植骨髄に対する拒絶の機序を検討した。移植骨髄の増殖を $^{125}\text{IUdR}$ 摂取率で測定すると, 骨髄の増殖の有為な抑制を認め *in vitro* と同様な特異性を示した。更に, 特異性が CTL の細胞障害の段階にあるのかを調べるため, 異なる MHC の骨髄を混合して移植を行った。この結果, CTL が特異性を有する骨髄の増殖を有為に抑制したが, 特異性を有しない骨髄の生着には影響を及ぼさず, 骨髄拒絶が細胞障害の段階で MHC 特異的であることが示された。次に, ドナー由来の veto 細胞により骨髄拒絶が抑制されるかどうかについて検討した。T 細胞除去骨髄を IL-2 とともに培養すると高度の veto 活性が誘導され, この活性は主に Thy 1.2^+ , NK1.1^+ 細胞に存在した。B6 に致死量以下の照射後, 同種骨髄を移植すると移植骨髄は拒絶されるが, この培養細胞を IL-2 と共に *in vivo* に投与すると, 骨髄生着率の有為な増加を認めた。この効果は MHC に特異的であることより veto 細胞によると考えられた。以上の成績より, 同種骨髄移植において, ホスト CTL がドナーの MHC に特異的に移植骨髄の拒絶が可能であり, さらにドナー由来の veto 細胞は拒絶に関与する CTL を抑制し, MHC に特異的な耐性の獲得に関与すると考えられた。

Key words: Allogeneic bone marrow transplantation, Graft rejection, Cytotoxic T cell, Veto cell

略語一覧: ABM: activated bone marrow, cGy: centigray, CML: cell-mediated lympholysis, Con A: concanavalin A, CTL: cytotoxic T lymphocytes, $^{125}\text{IUdR}$: 5- ^{125}I -iodo-2'-deoxyuridine, FCM: flow cytometry, MHC: major histocompatibility complex, GvHD: graft-versus-host disease, MLC: mixed lymphocyte culture, MoAb: monoclonal antibody, rhIL-2: recombinant human interleukin 2

* 千葉大学医学部内科学第二講座

Hirotohi NAKAMURA: Graft Rejection by Cytotoxic T Cells and Suppression of Graft Rejection by Veto Cells in Murine Allogeneic Bone Marrow Transplantation.
The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260.
Received March 31, 1992, Accepted May 29, 1992.

I. 緒 言

同種抗原に対する免疫反応は、臓器移植の成立にとって大きな障害である。通常、このような同種抗原に対する反応は、移植臓器の拒絶として現れるが、同種骨髄移植においては、移植骨髄の拒絶とともに移植骨髄に存在する免疫担当細胞による移植片対宿主病 (Graft-versus-Host Disease; GvHD) として現れる。GvHD は、移植骨髄より成熟T細胞を除去することにより防止できるが、この際、移植骨髄の拒絶の頻度の増加が問題となる¹⁻⁶⁾。

この同種骨髄の拒絶の機序として hybrid resistance では natural killer (NK) 細胞が報告されてきた^{7-11,15)}。また、他の機序として、放射線抵抗性の細胞障害性T細胞 (cytotoxic T cell; CTL) の関与も報告されている¹²⁻¹⁹⁾。

Reisner らは、サルを用いた実験で、同種骨髄移植後のサルの脾臓より移植骨髄に特異的な細胞障害活性を有するホスト由来のT細胞をクローニングしており¹⁶⁾、また、臨床的にも Kernan らが、HLA 不一致の同種骨髄の拒絶に先だってドナー抗原に特異的な細胞障害活性を有するホスト由来のT細胞の出現を報告している¹⁴⁾。この様に、T細胞、特に放射線抵抗性 CTL が同種骨髄の拒絶に関与していると考えられるが、この CTL がどのような機序で骨髄の拒絶に関与しているか明かでない。

また、このような移植片を拒絶する反応を逆に抑制するような機序についても報告されている。Natural suppressor 細胞は、生後間もないマウスや全リンパ節照射を受けたマウスの脾臓に存在し、in vitro において MHC に非特異的に MLR を抑制し²⁰⁾、また、in vivo において GvHD を抑制することが報告されている²¹⁾。クローニングされた natural suppressor 細胞は、NK 細胞と表面マーカー等共通点が多いが、NK 活性を有していない²¹⁾。一方、別の抑制性の細胞として、veto 細胞が骨髄や胸腺に存在すると報告されている。Veto 細胞は、MHC に特異的に CTL の誘導を抑制するが、この特異性を決定するのは、veto 細胞表面に存在する抗原であり、これに反応する CTL のみが抑制されるとされる²²⁻²⁴⁾。したがって、ドナー由来 veto 細胞を導入することにより、ホスト CTL による同種骨髄の拒絶反応が抑制されることが考えられる。

II. 材料および方法

マウス：今回使用した主なマウスとそのハプロタイプを表1に示す。C57BL/6 (B6), BALB/c, C3H, (C57

表 1. 使用した主なマウスと H-2

マウス	H-2
C57BL/6 (B6)	b
C3H	k
BALB/c	d
DBA/2	d
(C57BL/6xDBA/2)F ₁ (BDF ₁)	b/d
(C57BL/6xC3H)F ₁ (B6C3F ₁)	b/k
(B10. BRxB10. D2)F ₁ (BRxD2F ₁)	k/d

BL/6xC3H)F₁, B10, B10. BR, B10. D2, B10. A は Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より購入した。B10. AKM, B10. MBR, B10. GD, B10. Q は、David Sachs 博士 (National Cancer Institute, NIH) より供与を受けた。骨髄の採取には、8~12週齢のマウスを用いた。また、骨髄移植には、12~14週齢のマウスをレシピエントとして用いた。

骨髄移植：C57BL/6 (B6) を線量率 115cGy/min で 650~1,025cGy 照射し 3~6 時間後、T 細胞除去を行った^{10⁷} 個の同種骨髄細胞を尾静脈より輸注した。骨髄細胞のT細胞除去は、骨髄細胞をハイブリドーマ HO-13-4 (anti-Thy 1 MoAb)²⁵⁾、C3PO (anti-Lyt 1 MoAb)²⁵⁾、83-12-5 (anti-Lyt 2 MoAb)²⁷⁾ の培養上清をそれぞれ10倍希釈となるように混合したものと供に 4°C で 30 分反応させた後、さらに補体 (Guinea pig complement; C', Gibco, Grand Island, NY, USA) と供に 37°C で 30 分反応させる操作を 2 回繰り返した。

CTL クローンの分離：B6 を 650cGy 照射後、BDF₁ または B6C3F₁ からの骨髄を T 細胞除去後尾静脈より輸注した。7 日後、脾臓を摘出し細胞浮遊液を作製後、輸注骨髄細胞と同系の脾細胞を 2,000cGy 照射し、これを刺激細胞として、10% T cell growth factor (TCGF; Con A 刺激ラット脾細胞培養上清) を加えた 10% FBS 加 RPMI1640 を用い培養を行った。2 週後、細胞を回収し、96 穴のプレートに 0.5 細胞/穴の割合で添加し、同様に刺激細胞および TCGF を毎週補い増殖してくる細胞を CTL クローンとした。

移植骨髄の増殖能の測定 (¹²⁵IUdR 摂取率)：致死量を照射したマウスの脾細胞内への 5-¹²⁵I-iodo-2'-deoxyuridine (¹²⁵IUdR, Amersham Corp., Buckinghamshire, UK) の摂取率を測定して、移植骨髄細胞の増殖の指標とした。方法は、B6 を 1,025cGy 照射後 10⁷ 個の T 細胞除去骨髄を尾静脈より輸注した。5 日後、各々のマウスに、10⁻⁷M の 5-fluoro-2'-deoxyuridine (Sigma, St. Louis, MO, USA) を腹腔内に投与し、1 時間後 0.5μCi

の ^{125}I UdR を腹腔内に投与した。18時間後、脾臓を摘出し取り込まれた ^{125}I の放射活性をガンマカウンターにて測定し、 ^{125}I UdR 摂取率を算出した²⁸⁾。

フローサイトメトリー (Flow cytometry; FCM) : FCM は、Becton Dickinson FACS II (BDIS, Mountain view, CA, USA) を用いて行った。蛍光標識は、まず細胞を 2.4G2 (ラット抗マウス Fc 受容体モノクローナル抗体)²⁹⁾ を用い Fc 受容体による非特異的な抗体の付着を阻害した後、直接法または間接法により行った。また、2重染色の場合は、FITC で標識された抗体と反応させた後、2回洗浄し、biotin で標識した抗体と反応させた後に洗浄し、texas red avidin を用いて蛍光標識した。なお、1次抗体として FITC 標識されていない抗体を使用したときには、goat antimouse immunoglobulin-FITC (gamma specific, Fisher Biotechnology, Pittsburgh, PA, USA) または、MAR 18.5-FITC と反応させた後にこれらの Fab 部分をブロックするために、さらに過剰の一次抗体と反応させた。なお、MAR18.5-FITC を使用する時には、2.4G2は使用しなかった。2.4G2は、J. Titus 博士 (National Cancer Institute, NIH) より供与を受けた。また、texas red avidin, anti-Leu1-FITC, anti-Thy1-FITC, anti-L3T4-FITC, anti-Lyt2-FITC は、Becton Dickinson Immunocytometry System (Mountain View, CA, USA) より購入した。95-5-49 (anti-human CD2 MoAb), 32-2-12 (anti-H-2^d MoAb), 36-7-5 (anti-H-2^k MoAb) は、David Sacks 博士より供与を受けた。NK1.1および Mac-1 は、それぞれ American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) より購入したハイブリドーマ PK136 および M1/70. 15. 11. 5 の培養上清を用いた。2C11 (抗マウス CD3抗体) は、Jeff Bluestone 博士 (University of Chicago, Chicago, IL, USA) より供与を受けた。

細胞障害性試験 : 細胞障害性試験³⁰⁾は、Con A (Sigma) 存在下で3日間培養し芽球化した脾細胞を sodium chromate (^{51}Cr) で標識し、標的細胞とした。一定量の標的細胞をさまざまなエフェクター細胞標的細胞比で4時間培養し、放出される ^{51}Cr の放射活性をガンマカウンターで測定し、以下の計算式により細胞障害活性を求めた。

$$\% \text{細胞障害活性} = \frac{\text{実験放出} - \text{自然放出}}{\text{最大放出} - \text{自然放出}} \times 100\%$$

また、得られた CTL クローンの細胞障害活性の阻害に用いたモノクローナル抗体 31-3-4 (anti-K^d), 34-1-2 (anti-K^d D^d), 28-16-8 (anti-I-A^d), 34-2-12 (anti-D^d) は、David Sacks 博士より供与を受けた精製抗体を200~

500倍に希釈して用いた。

ダブルドナーキメラマウス : ダブルドナーキメラマウスの作製は、B6を1,025cGy 照射し4時間後 C3H および BALB/c からの T細胞除去骨髄それぞれ 10^7 個を混合し輸注した。CTL クローンの輸注は照射直後に行った。キメラの判定は、6週後末梢血単核細胞を抗 H-2 モノクローナル抗体で蛍光標識し FCM で測定した。

IL-2刺激骨髄細胞 (Activated bone marrow; ABM) の作製 : T細胞除去の骨髄を 1,000u/ml の rhIL-2 (Cetus Co., Emeryville, CA, USA) とともに4~5日間培養し、増殖してくる細胞を洗浄し、これを ABM として各種実験に用いた。

Veto 活性の測定 : B6の脾細胞 4×10^6 個を反応細胞、2,000cGy 照射した BRxD2F₁ 脾細胞 2×10^6 個を刺激細胞として2ml の培養液中に浮遊しリンパ球混合培養を行った。ABM はリンパ球混合培養の2日目に添加した。5日後、培養細胞を回収し、H-2^k および H-2^d に対する細胞障害性試験を行い、H-2に特異的な抑制効果を veto 活性とした。

ABM による同種骨髄拒絶反応の抑制 : B6を650~700 cGy 照射後、 10^7 個の BDF₁ 骨髄を移植した。ABM (BDF₁ または、B6C3F₁) は 10^7 個を第1日目と第3日目に輸注した。rhIL-2を投与する場合には、移植後25,000u を1日3回6日間腹腔内投与した。ドナー細胞の生着は、移植後6週目に末梢血単核球を抗 H-2^d モノクローナル抗体で蛍光標識し陽性率を FCM を用いて測定した。

III. 結 果

(1) 照射線量と移植骨髄拒絶

レシピエントの移植骨髄に対する拒絶反応の放射線感受性および骨髄を拒絶しうる最大の放射線量を決定するために、B6 を各線量で照射後骨髄を移植し、 ^{125}I UdR 摂取率を測定して照射線量と骨髄拒絶の関係をみた。700~750cGy の照射を受けた後 F₁ 骨髄を輸注したマウスの ^{125}I UdR 摂取率は、同系の骨髄を輸注されたマウスに比して低値であるが有為な増加を認めた。しかし、650cGy 照射を受けたマウスでは、取り込みを認めず輸注骨髄の拒絶を示していると考えられた(図1)。以上の結果より650cGy を骨髄拒絶可能な最大照射線量として以下の実験に用いる照射線量とした。

(2) 移植骨髄拒絶マウスからの T細胞のクローニング

上記の結果に基づき、B6を650cGy 照射後、T細胞除去 BDF₁ または B6C3F₁ 骨髄を輸注し、7日後に脾臓を摘出し CTL をクローニングした。その結果、

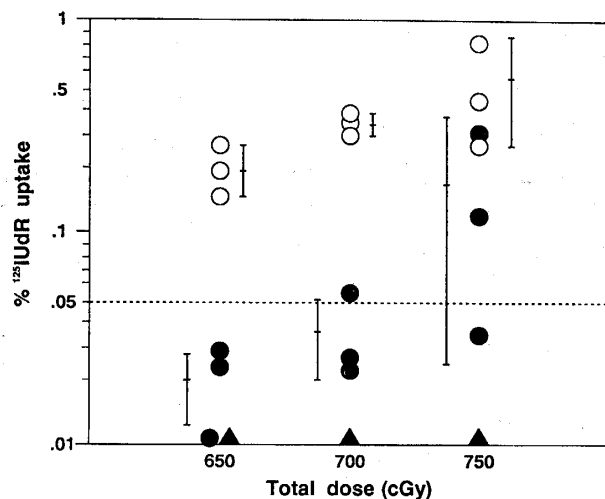


図 1. 照射線量の移植骨髄の増殖に及ぼす影響。B6を照射後、 10^7 個のT細胞除去同種 BDF₁ 骨髄 (●) または、同系 B6 骨髄 (○) を輸注した。6日後、脾を摘出し $^{125}\text{IUDR}$ 摂取率を測定した。各群3匹のマウスの $^{125}\text{IUDR}$ 摂取率の平均±標準偏差, Radiation control (▲) は、3匹のマウスの平均値を示した。

BDF₁ を輸注したマウスより4クローン、B6C3F₁ 骨髄を輸注したマウスより2クローンが分離された。すべてのクローンは、Thy1⁺, CD8⁺, CD4⁻ の表面マーカーを示した (図2)。なお、H-2 に対するモノクローナル抗体を用いた結果では、すべてのクローンがレシピエント (H-2^b) 由来であった (データ省略)。BDF₁ 骨髄を輸注した B6 より得られた CTL クローンは H-2^d に特異的な細胞障害活性を示し、NK 活性は認められなかった (表2)。この細胞障害活性は、K^d に対するモノクローナル抗体により阻害されることより、これらの CTL は K^d に特異的に反応することが示された (表3)。B6 C3F₁ 骨髄を輸注した B6 より分離されたクローンのうちクローン5は K^k に特異的であり、クローン6は、D^k と反応し、および K^a と交叉反応を示した (表4)。以上の結果より、これらのクローンは、H-2 を特異的に認識する CTL クローンと考えられた。このうち、K^d に

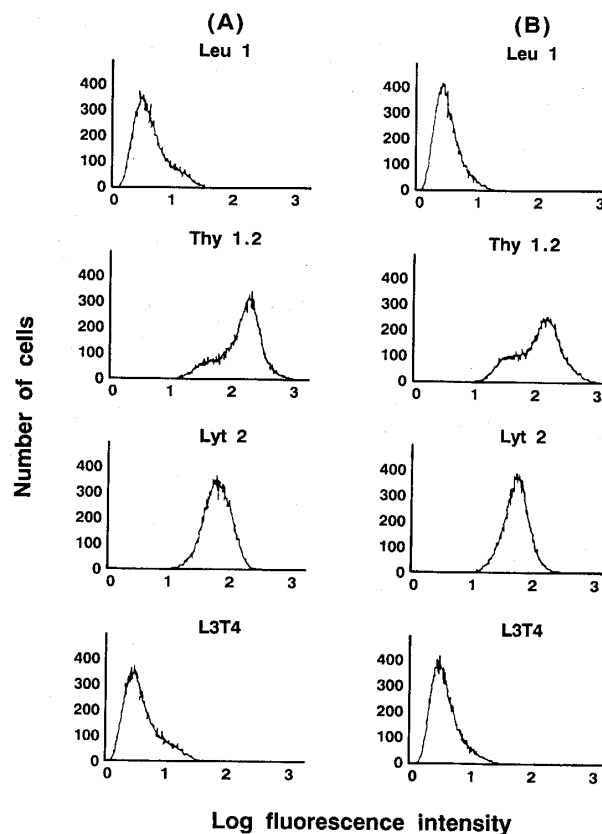


図 2. CTL クローンの表面マーカー。(A) BDF₁ 骨髄を移植した B6 より分離した CTL クローン; (B) B6C3F₁ 骨髄を移植した B6 より分離した CTL クローン。Leu 1は、陰性コントロールとして用いた。

特異的なクローン2および K^k に特異的なクローン5を *in vivo* の実験に用いた。

(3) CTL クローンによる移植骨髄の増殖抑制

これらの CTL クローンが移植骨髄の増殖を抑制するかどうかを検討するため、B6 を 1,025cGy 照射後 CTL クローンを輸注し4時間後に BDF₁ または、B6C3F₁ 骨髄を輸注した。5日後、輸注骨髄の増殖を $^{125}\text{IUDR}$ 摂取率により測定した。BDF₁ 骨髄を輸注した B6 マウスの $^{125}\text{IUDR}$ 摂取率は、H-2^d に特異的なクローンを

表 2. 分離されたクローンの MHC 特異性

Cloned CTL ^a	% Specific ^{51}Cr release E : T (10:1) for targets (H-2 haplotypes : KID)					
	B 10 (bbb)	B 10. BR (kkk)	B 10. D2 (ddd)	B 10. GD (ddb)	B 10. A (kkd)	YAC-1 (kkd)
Clone 1	-0.6	2.6	34.0	39.9	4.4	3.7
Clone 2	-2.9	7.4	30.8	45.9	0.6	-1.3
Clone 3	-7.8	6.0	52.4	70.9	-5.9	0.1
Clone 4	-8.6	2.1	52.1	70.4	2.0	-2.0

^a BDF₁ 骨髄を移植した B6 マウスより分離したクローン

表 3. 抗 MHC モノクローナル抗体による CTL の細胞障害活性の阻害

Cloned CTL ^a	% Specific ⁵¹ Cr release (E : T 4:1) for antibodies (specificity)				
	Media	31-3-4 (K ^d)	34-1-2 (K ^d , D ^d)	28-16-8 (I-A ^d)	34-2-12 (D ^d)
Clone 1	25.7	-1.4	0.5	27.3	24.7
Clone 2	26.0	0.9	-2.4	23.4	22.8
Clone 3	21.4	5.0	-2.9	16.8	17.0
Clone 4	79.6	71.3	-5.0	67.4	67.6

^a BDF₁ 骨髄を移植した B6 マウスより分離したクローン

表 4. 分離されたクローンの MHC 特異性

Cloned CTL ^a	% Specific ⁵¹ Cr release (E : T 10:1) for targets (H-2 haplotypes; KID)						
	B 10 (bbb)	B 10. BR (kkk)	B 10. D2 (ddd)	B 10. A (kkd)	B 10. AKM (kkq)	B 10. MBR (bkq)	B 10. Q (qqq)
Clone 5	-0.8	69.4	3.0	24.8	61.7	3.8	2.8
Clone 6	-4.3	69.8	10.7	18.0	3.2	1.3	90.0

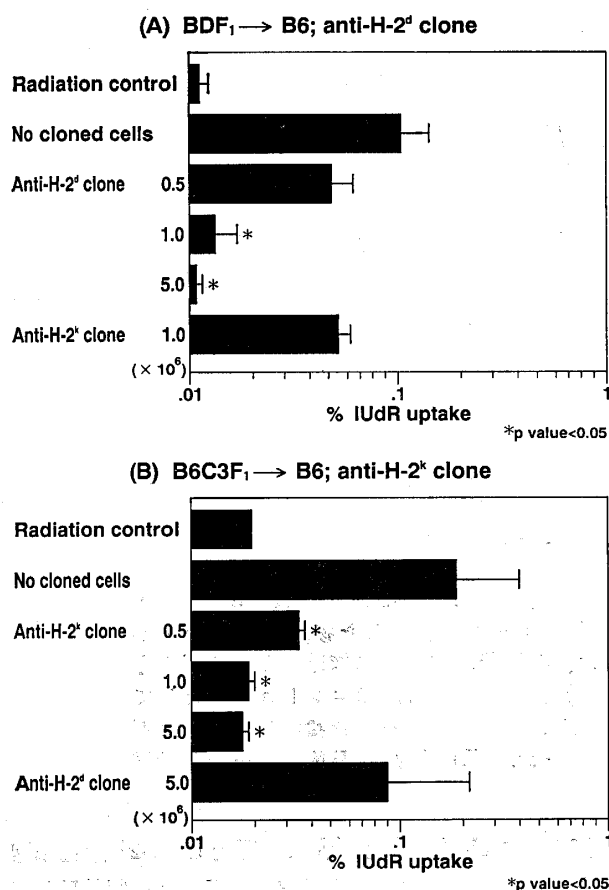
^a B6C3F₁ 骨髄を移植した B6 マウスより分離したクローン

図 3. CTL クローンによる移植骨髄の増殖の抑制。B6 を 1,025 cGy 照射後 CTL クローンを輸注した後 (A) BDF₁ 骨髄, (B) B6C3F₁ 骨髄を移植し, ¹²⁵IUDR 摂取率を測定した。図は各群 5 匹のマウスの ¹²⁵IUDR 摂取率の平均値 ± 標準偏差。

輸注した群で, H-2^k に特異的なクローンを輸注した群に比して有為に低値であった (図3A)。逆に, B6C3F₁ 骨髄を輸注した B6 では, H-2^k 特異的なクローンを輸注した群で, H-2^d に特異的なクローンを輸注した群に比して ¹²⁵IUDR 摂取率の有為な低下を認めた (図3B)。この結果は, CTL による移植骨髄の増殖抑制が H-2 に特異的であることを示している。次に, *in vivo* における CTL の H-2 に対する特異性が活性化の段階にあるのか, または, 細胞障害の段階にあるのかを明らかにするためダブルドナーキメラマウスを作製し, これらのクローンによる骨髄拒絶の機序と長期の生着に対する影響を検討した。この結果, CTL クローンを輸注されなかった B6 は, 末梢血中に両方のドナー由来の細胞を認めたが (図4C), H-2^k 特異的なクローンを輸注した B6 では, 主に H-2^{d+} 細胞を認め (図4D), 逆に, H-2^d 特異的なクローンを輸注した B6 では, 主に H-2^{k+} 細胞を認めた (図4E)。この結果より, CTL がエフェクターレベルで MHC 特異的に移植骨髄を拒絶することが示された (表5)。

(4) ABM の veto 活性

Veto 活性の測定は, B6 (H-2^b) 対 BRx2D2F₁ (H-2^{k/d}) の MLC に BDF₁ または, DBA/2 よりの ABM を添加し, H-2^d および H-2^k に対する CTL の反応の抑制を細胞障害性試験を行い H-2^d に対する特異的な抑制を veto 活性として測定した (図5)。BDF₁ または, DBA/2 の ABM を添加すると H-2^d に対する CTL の抑制を認め, H-2^k に対する抑制は, 軽度であった。

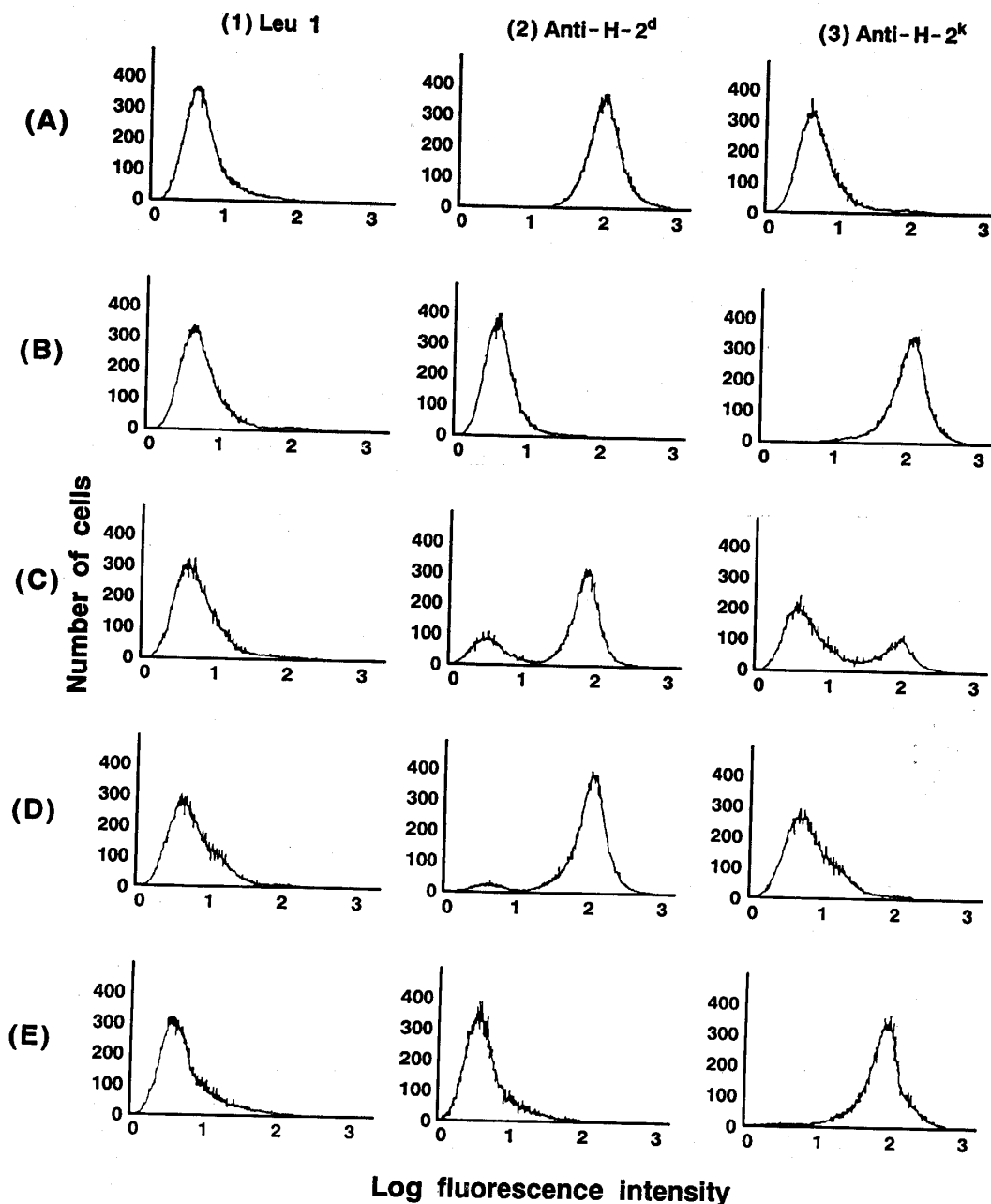


図 4. CTL クローンのダブルドナーキメラズムに及ぼす効果。B6 (H-2^b) を 1,025cGy 照射後 3×10^6 個の H-2^d または H-2^k 特異的 CTL クローンを輸注した後, BALB/c (H-2^d) および C3H (H-2^k) 骨髄を混合し移植した。6 週後, 末梢血単核球のキメラズムを FCM にて測定した。(A) 無処置 BALB/c, (B) 無処置 C3H, はコントロールとして示した。(C) BALB/c および C3H 骨髄を移植し, CTL クローンを輸注しなかったダブルドナーキメラマウス。(D) H-2^k 特異的クローン, (E) H-2^d 特異的クローンを骨髄移植前に輸注したダブルドナーキメラマウス。

また, 同系の B6 よりの ABM は, 軽度の非特異的な抑制を示した。

次に, この抑制が, ^{51}Cr 放出試験時に存在する BDF₁ ABM による cold target inhibition の可能性を否定するために BDF₁ ABM を加えた MLC よりのエフェクターを回収し抗 H-2^d 抗体および補体で処理する事で H-2^d 陽性細胞を除去した後に細胞障害性試験を行った

(図 6)。抗 H-2^d 抗体と補体で処理をし H-2^d 陽性細胞を除去した後も H-2^d に対する CTL の抑制効果を認めることより, ABM の効果は cold target inhibition ではなく veto 活性によると考えられた。

(5) ABM の表面マーカー

Veto 活性を示す細胞を同定するためにまず, FCM による解析を行った (図 7)。ABM は, 主に Thyl.2⁺,

表 5. ダブルドナーキメラリズム^a

Cloned cells injected (n)	% Positive cells ^b	
	H-2 ^{d+}	H-2 ^{k+}
No cloned cells (9)	74.5±2.4	16.0±3.0
Anti-H-2 ^k clone (10)	84.5±1.5	2.1±0.7 ^c
Anti-H-2 ^d clone (5)	7.3±2.2 ^c	76.0±2.2

^a B6(H-2^b) を 1,025cGy 照射後 3×10^5 個の H-2^d または H-2^k 特異的 CTL クローンを輸注し、4 時間後に BALB/c (H-2^d) および C3H (H-2^k) 骨髄を混合し移植した。6 週後、末梢血単核球のキメラリズムを FCM にて測定した。

^b 平均値±標準偏差

^c $p < 0.05$

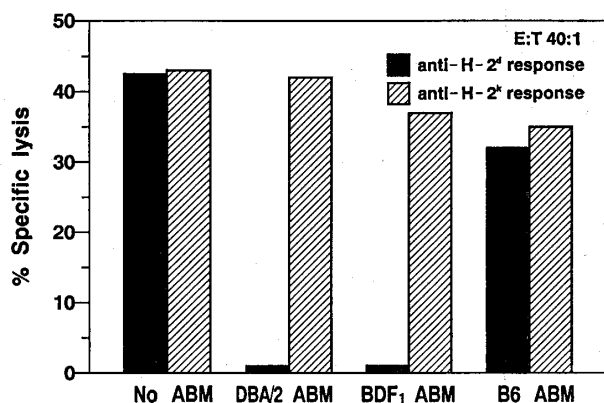


図 5. ABM による CTL の抑制効果

B6 脾細胞を BRxD2F₁ 脾細胞を刺激細胞として MLR を行い 48 時間後に DBA/2, BDF₁, B6ABM をそれぞれ添加した。さらに 72 時間培養を行い、H-2^d および H-2^k 陽性細胞を標的として ⁵¹Cr 放出試験を行い CTL に対する抑制効果を測定した。

Mac-1⁻ と Thy1.2⁻, Mac-1⁺ の 2 群により構成されていた (図 7A)。Thy1.2⁺ 細胞は、NK1.1⁺ であり (図 7B), CD3, CD4, CD8 陰性であった (図 7C)。次に、veto 活性がどの細胞群に存在するかどうかを検討するため、ABM を抗 Thy 1 抗体と補体にて処理をした後、MLC に添加し veto 活性の有無を検討した (図 8)。ABM より Thy1⁺ 細胞を除去することにより、veto 活性が消失し、Thy1⁺ 細胞に veto 活性が存在すると考えられた。また、同時に、H-2 非特異的抑制も消失し、この非特異的抑制も Thy1⁺ 細胞に存在すると考えられた。

(6) ABM による骨髄生着の促進

以上の結果に基づきドナーと同じ H-2 を有する ABM がレシピエントの拒絶反応を抑制し移植骨髄の生着を促進するかどうかについて検討した。B6 を 650~700c-

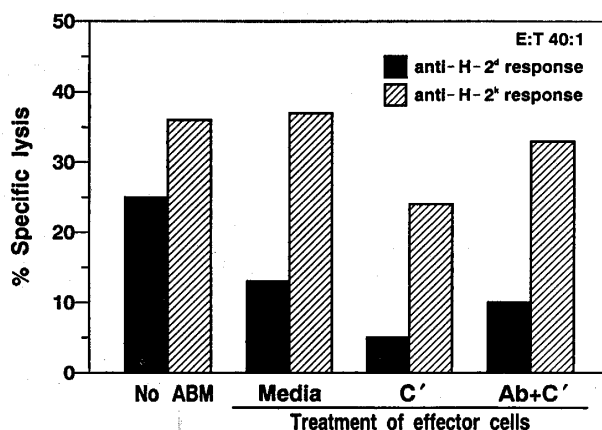


図 6. ABM の veto 活性

B6 脾細胞を BRxD2F₁ 脾細胞を刺激細胞として MLR を行い 48 時間後に BDF₁ABM を添加した。さらに 72 時間培養を行い、エフェクターを回収し培養液、補体、抗 H-2^d モノクローナル抗体と補体で処理した後、H-2^d および H-2^k 陽性細胞を標的として ⁵¹Cr 放出試験を行った。

Gy 照射後 ABM を輸注し、骨髄移植を行った。一部のマウスでは、移植後 IL-2 を腹腔内に 6 日間投与した。6 週後 FCM にてキメラの状態を検討した (図 9)。致死量以下の照射し BDF₁ 骨髄を移植した群では、移植骨髄は拒絶され、生着を認めなかった。BDF₁ および B6C3F₁ ABM の輸注は、ドナー骨髄の生着に特に影響を及ぼさなかった。しかし、BDF₁ ABM を骨髄とともに輸注し、さらに rhIL-2 を腹腔内投与した群では、約半数のレシピエントにおいてドナー骨髄の生着を認めた。この効果は、BMT の後 rhIL-2 を投与した群では認めず、また、B6C3F₁ ABM では、rhIL-2 を投与しても生着の促進は認めなかった。

IV. 考 察

移植骨髄の拒絶は、T 細胞除去骨髄移植を成功させるための障害の一つである。本研究は、CTL による移植骨髄拒絶の機序を検討し、さらにその CTL に対する MHC に特異的な抑制性細胞である veto 細胞をドナー T 細胞除去骨髄より誘導し、これにより移植骨髄の拒絶の抑制が可能であるかどうかを検討した。

マウスの骨髄拒絶に関与する宿主側の要因は、650 cGy の照射に対して抵抗性であり、それ以上の照射により抑制された。650cGy の照射後同種骨髄を移植を受けた B6 の脾臓より CTL がクローニングできた。この結果は、サルモデルにおいて同種骨髄移植を受けて 5 日後のサルの脾臓よりドナーの MHC に特異的な CTL クローンを分離できたとする Reisner らの報告¹⁶⁾と一

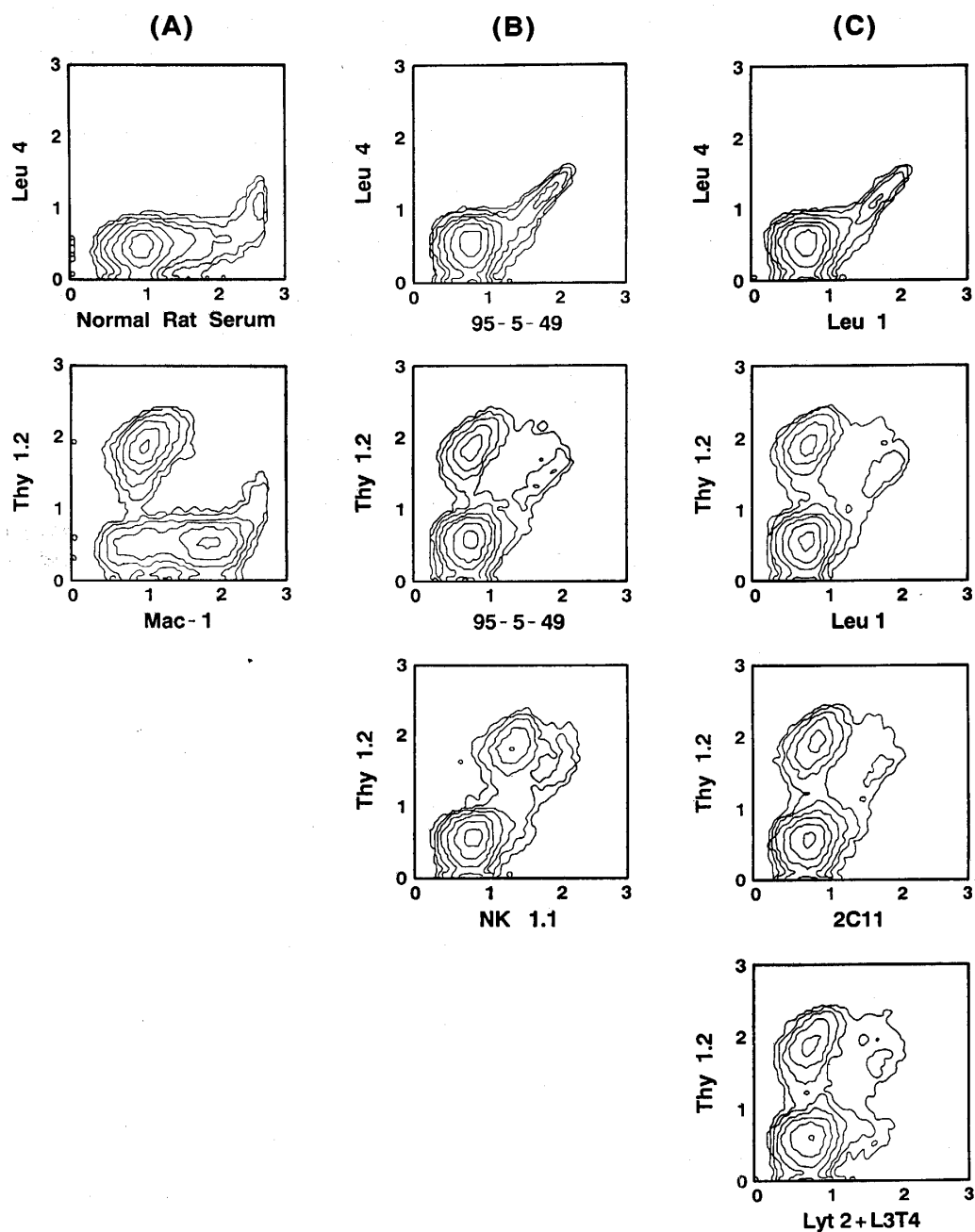


図 7. 二重染色による ABM の表面マーカーの解析。ABM を (A) 抗 Mac-1 および抗 Thy 1.2 (B) 抗 NK1.1 および抗 Thy1.2 (C) 2C11 (anti-CD3), 抗 Lyt2, 抗 L3T4 および抗 Thy1.2 モノクローナル抗体を用いて蛍光標識をし FCM を行った。正常ラット血清および抗 Leu1, 抗 Leu4, 95-5-49 (抗ヒト CD2) モノクローナル抗体は陰性コントロールとして用いた。

致する。興味あることに、分離された CTL クローンはすべて Thy1^+ , CD8^+ , CD4^- であった。このことは、骨髄拒絶において MHC クラス I 拘束性の CD8^+ CTL が重要な役割を果たしていることが示唆される。しかし、 CD4 に対するモノクローナル抗体をマウスに投与することにより拒絶反応が抑制されたとの報告もあり³¹⁾, CD4^+ 細胞も拒絶に関与していることが考えられ、培養条件により CD8^+ 細胞を選択的に増殖させた可能性も

否定はできない。これらの CTL クローンは、ドナーの MHC に特異的であり、NK 活性は認められなかった。

次に、この CTL クローンを致死量を照射した B6 に養子免疫し、同種骨髄の拒絶に関する機序について検討した。CTL クローンを輸注後、移植骨髄の増殖を $^{125}\text{IUdR}$ 摂取率で測定すると、骨髄の増殖の有為な抑制を認め、*in vivo* においても *in vitro* と同様な特異性を示した。

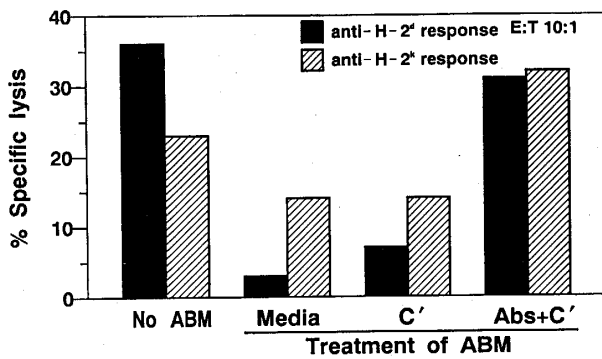


図 8. Veto 細胞の同定

B6 脾細胞を BRxD2F₁ 脾細胞を刺激細胞として MLR を行い、48 時間後に BDF₁ABM を培養液、補体、抗 Thy1 モノクローナル抗体と補体で処理後 MLR に添加した。更に 72 時間培養を行い、H-2^d および H-2^k 陽性細胞を標的として ⁵¹Cr 放出試験を行った。

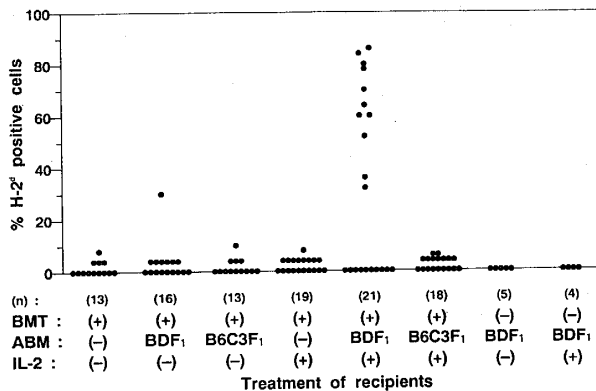


図 9. 650~700 cGy 照射後 T 細胞除去 BDF₁ 骨髄を BDF₁ABM または B6C3F₁ABM とともに移植した B6 の FCM による末梢血単核球の H-2^d 陽性細胞の比率。図に示された群では、25,000u の rhIL-2 を 1 日 3 回 6 日間腹腔内投与をした。各点は、それぞれのマウスを示し、4 回の実験の集計を示した。

しかし、Sneider らは、CTL と CTL が特異的に認識する抗原を混合して CTL と同系のマウスの皮膚に注入したところ、“innocent bystander”である皮膚に潰瘍を形成することを報告している³⁴⁾。¹²⁵IUdR 摂取率の結果からは、このような抗原特異的な反応の結果として起こるサイトカインの放出等の非特異的な細胞障害³²⁻³⁶⁾による骨髄抑制の可能性を否定できない。

CTL の in vivo における特異性が活性化の段階にあるのか、または細胞障害の段階に存在するのか、また、長期の生着に及ぼす効果を検討するため、ダブルドナーキメラマウスを作製した。このモデルでは、異なる MHC 抗原を有する細胞が混在して移植片となるために、移植片拒絶の機序の特異性が検討可能となる。投与

された CTL クローンは、その特異性を有する移植骨髄のみの増殖を抑制し、もう一方の特異性を有しない MHC の骨髄に対しては、明かな影響は認められなかった。

以上より、CD8⁺CTL が細胞障害の段階においてドナーの MHC に特異的に同種骨髄の拒絶が可能であると考えられた。

次に、CTL の特異的サプレッサー細胞である veto 細胞が、ドナーに特異的な CTL を抑制し移植骨髄の生着を促進するかどうかについて検討した。

Azuma らが報告³⁷⁾したように、T 細胞除去骨髄細胞を IL-2 とともに培養した ABM に、CTL に対する抑制細胞を誘導できた。この抑制は、軽度の非特異的な抑制効果とともに、大部分は、ABM の MHC に特異的な抑制であり、ABM 中に veto 細胞が存在すると考えられた。

ABM は、主に Thy1.2⁺ Mac-1⁻ と Thy1.2⁻ Mac-1⁺ の 2 群により構成されていたが、Thy1⁺ 細胞に veto 活性が存在し、培養前は、抗体と補体により Thy1⁺ 細胞は除去されていることより、Rammensee らの報告³⁸⁾のように、veto 細胞は IL-2 存在下で培養する事により Thy1⁻ より Thy1⁺ になると考えられる。また、Thy1⁺ 細胞は、NK1.1⁺ CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ であり NK 細胞と同様な表面形質を有した。

ABM が、高度の veto 活性を有するという結果に基づき、B6 に致死量以下の照射を施した後に、T 細胞除去骨髄を ABM とともに移植することにより、T 細胞除去同種骨髄の拒絶が、ABM により抑制されるかどうかを検討した。In vivo において ABM は、rhIL-2 を投与された時のみに骨髄拒絶を抑制し、移植骨髄の生着を促進した。ドナー骨髄と共通の MHC 抗原を有しない ABM は、骨髄の拒絶反応を抑制せず、このことは、rhIL-2 を投与しても同様であった。この、骨髄生着の促進は、MHC 特異的であることより、veto 細胞による骨髄拒絶反応の抑制が in vivo においても可能であることを示唆すると思われる。MHC に対する特異性が、in vitro および in vivo において存在することは、これらの細胞が、機能的に natural suppressor 細胞と異なると考えられる。マウスに輸注された ABM が IL-2 に依存していることは、in vivo における LAK 活性が IL-2 の投与を必要としている事³⁹⁾と同様であり、また in vitro における veto 活性は LAK 活性と関連していること（データ省略）、また同様な表面形質を有することより、共通の細胞が LAK と veto 活性を呈すると考えられる。

以上の結果より, *in vivo* において CD8⁺CTL が細胞障害の段階でドナーの MHC に特異的に同種骨髄を拒絶し, ドナーと共通の MHC を有する veto 細胞は, ドナー MHC に特異的に反応する CTL を抑制することにより拒絶反応を防止し, ドナーに特異的な耐性の獲得に関与することが示された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり御指導を賜りました千葉大学医学部第二内科学教室吉田尚教授に深甚の謝意を表します。また終始直接御指導を賜った千葉大学医学部第二内科講師小池隆夫博士, 千葉大学医学部附属病院輸血部副部長浅井隆善博士, 千葉大学医学部第二内科助手王伯銘博士に心から感謝いたします。なお本論文は学位審査論文である。

SUMMARY

Mechanisms of allogeneic marrow graft rejection by host cytotoxic T cells (CTL) and suppression of graft rejection by veto cells were studied.

CTL clones were isolated from spleens of mice rejecting bone marrow after sublethal irradiation. All clones isolated were cytolytic with specificity for MHC encoded gene products of the allogeneic marrow donor. When cloned cells were transferred *in vivo* into lethally irradiated recipients, results utilizing splenic ¹²⁵IUDR uptake indicated that the MHC-specific cytotoxic clones could suppress marrow proliferation. In order to characterize the effector mechanism, two marrow grafts differing at the MHC from each other were mixed and inoculated into lethally irradiated mice following transfer of the isolated CTL clone.

Results directly demonstrated an ability of CTL of host MHC type mediate graft rejection with specificity for MHC gene products. Based on these results, suppression of graft rejection by veto cells was studied. The incubation of T-cell-depleted marrow with interleukin 2 significantly increased veto activity and this activity existed in the Thy1⁺, NK1.1⁺, Mac-1⁺ population. These cells, inoculated together with IL-2 *in vivo*, enhanced engraftment of MHC-mismatched, T-cell-depleted marrow.

文 献

- 1) Martin PJ, Hansen JA, Buckner CD, Sanders JE, Deeg JD, Stewart P, Appelbaum FR, Clift R, Fefer A, Witherspoon RP, Kennedy MS, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R and Thomas ED: Effects of *in vitro* depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood* **66**: 664-672, 1985.
- 2) Hale G and Waldmann H: Depletion of T-cells with Campath-1 and human complement: analysis of GvHD and graft-failure in a multicenter study. *Bone Marrow Transplant* **1**: 93, 1986.
- 3) Patterson J, Prentice HG, Brenner MK, Gilmore M, Janosy G, Ivory K, Skeggs D, Morgan H, Lord J, Blacklock HA, Hoffbrand AV, Apperley JF, Goldman JM, Burnett A, Gribben J, Alcorn M, Pearson C, McVickers I, Hann IM, Reid C, Wardle D, Gravett PJ, Bacigalupo A and Robertson AG: Graft rejection following HLA-matched T-lymphocyte depleted bone marrow transplantation. *Br J Haematol* **63**: 221-230, 1986.
- 4) Gale RP and Reisner Y: Graft rejection and graft-versus-host disease: mirror images. *Lancet* **1**: 1468-1470, 1986.
- 5) Van Bekkum DW and Vriesendorp HM: Reciprocal interference of host-versus-graft and graft-versus-host reactions. *Lancet* **2**: 862-863, 1986.
- 6) Blazar BR, Soderling CCB, Robinson LL and Valleria DA: Short course total-lymphoid irradiation combined with total-body irradiation to facilitate engraftment of T cell-depleted marrow across a major histocompatibility barrier in mice. *Transplantation* **46**: 324-327, 1988.
- 7) Cudkovicz G and Bennett M: Peculiar immunology of bone marrow allografts: I. Graft rejection by irradiated responder mice. *J Exp Med* **134**: 83-102, 1971.
- 8) Cudkovicz G and Bennett M: Peculiar immunology of bone marrow allografts: II. Rejection of parental grafts by resistant F1 hybrid mice. *J Exp Med* **134**: 1513-1528, 1971.
- 9) Kiessling R, Hochman Ps, Haller O, Scheerer GM, Wigzell H and Cudkovicz G: Evidence for a similar or common mechanisms for natural killer cell activity and resistance to hematopoietic grafts. *Eur J Immunol* **7**: 655-663, 1977.
- 10) Warner J and Dennert G: Bone marrow graft rejection as a function of anti-body directed natural killer cells. *J Exp Med* **161**: 563-576, 1985.
- 11) Murphy WJ, Kumar V and Bennett M: Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency (SCID): evidence that NK cells can mediate

- the specificity of mallow graft rejection. *J Exp Med* **165** : 1212-1217, 1987.
- 12) Aizawa S, Sado H, Kamisaka H and Kubo E: Cellular basis of the immunohematologic defects observed in short-term semiallogeneic B6C3F1-C3H chimeras: Evidence for host-versus-graft reaction initiated by radioresistant T cells. *Cell Immunol* **56** : 47-57, 1980.
 - 13) Dennert G, Anderson CG and Warner J: T killer cells play a role in allogeneic bone marrow graft rejection but not in hybrid resistance. *J Immunol* **135** : 3729-3734, 1985.
 - 14) Kernan NA, Flomenberg N, Dupont B and O'Reilly RJ: Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-identical marrow transplants for leukemia, *Transplantation* **43** : 842-847, 1987.
 - 15) Murphy WJ, Kumar V and Bennett M: Acute rejection of murine bone marrow allografts by natural killer cells and T cells: differences in kinetics and target antigens recognized. *J Exp Med* **166** : 1499-1509, 1987.
 - 16) Reisner Y, Ben-Bassat I, Douer D, Kaploon A, Schwartz E and Ramot B: Demonstration of clonable alloreactive T cells in a primate model for bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** : 4012-4015, 1986.
 - 17) Butturini A, Seeger RC and Gale RP: Recipient immune-competent T lymphocytes can survive intensive conditioning for bone marrow transplantation. *Blood* **68** : 954-956, 1986.
 - 18) O'Reilly RJ, Collins NH, Kernan N, Brochstein J, Dinsmore R, Kirkpatrick D, Siena S, Keever C, Jordan B, Shank B, Wolf L, Dupont B and Reisner Y: Transplantation of marrow-depleted T cells by soybean lectin agglutination and E-rosette depletion: Major histocompatibility complex-related graft resistance on leukemic transplant recipients. *Transplant Proc* **17** : 455-459, 1985.
 - 19) Lapidot T, Singer TS, Salomon O, Terenzi A, Schwartz E and Reisner Y: Booster irradiation to the spleen following total body irradiation: A new immunosuppressive approach for allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* **141** : 2619-2624, 1988.
 - 20) Strober S: Natural suppressor (NS) cells, neonatal tolerance, and total body lymphoid irradiation: Exploring obscure relationships. *Annu Rev Immunol* **2** : 219-237, 1987.
 - 21) Strober S, Palathumpat V, Schwadron R and Hertel-Wulff B: Cloned natural suppressor cells prevent lethal graft-versus-host disease. *J Immunol* **138** : 699-703, 1987.
 - 22) Miller RG: An immunological suppressor suppressor cell inactivating cytotoxic T-lymphocyte precursor cells recognizing it. *Nature* **287** : 544-546, 1980.
 - 23) Muraoka S and Miller RG: Cells in bone marrow and in T cell colonies grown from bone marrow can suppress generation of cytotoxic T lymphocytes directed against their self antigens. *J Exp Med* **152** : 54-71, 1980.
 - 24) Muraoka S, Ehman DL and Miller RG: Irreversible inactivation of activated cytotoxic T lymphocyte precursor cells by "anti-self" suppressor cells present in murine bone marrow T cell colonies. *Eur J Immunol* **14** : 1010-1016, 1984.
 - 25) Marshak-Rothstein A, Flink P, Raulet DH, Bevan MJ and Geffer M: Properties and applications of monoclonal antibodies directed against determinants of the Thy-1 locus. *J Immunol* **122** : 2491-2497, 1979.
 - 26) Leo O, Segal DM, Shevach EM and Bluestone JD: Activation of murine T lymphocytes with monoclonal antibodies: Detection on Lyt2 positive cells of an activation antigen not associated with the T cell receptor complex. *J Immunol* **139** : 1214-1222, 1987.
 - 27) Mark C, Figueroa F, Nagy ZA and Klein J.: Cytotoxic monoclonal antibody specific for the Lyt-1.2 antigen. *Immunogenetics* **16** : 95-97, 1982.
 - 28) Hakim FT and Shearer GM: Abrogation of hybrid resistance to bone marrow engraftment by graft-versus-host-induced immune deficiency. *J Immunol* **137** : 3109-3116, 1986.
 - 29) Moser M, Mizuochi T, Sharrow SO, Singer A and Shearer GM: Graft-vs-Host reaction limited to a class II MHC difference results in a selective deficiency in L3T4+ but not in Lyt-2+ T helper cell function. *J Immunol* **138** : 1355-1362, 1987.
 - 30) Gress RE and Hodes RJ: Generation of the alloreactive T-cell repertoire: Interaction of T-cell genotype and maturation environment. *Proc Natl Acad Sci USA* **79** : 4728-4732, 1982.
 - 31) Cobbold SP, Martin G, Qin S and Waldmann H: Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. *Nature* **323** : 164-166, 1986.
 - 32) Mason DW, Dallman MJ, Arthur RP and Morris PJ: Mechanisms of allograft rejection: the roles of cytotoxic T-cells and dela-

- yed-type hypersensitivity. Immunol Rev 77: 167-184, 1984.
- 33) Tilney NL, Kupiec-Weglinski J and Storm TB: T cells and their products in host responsiveness to organ allografts. In: Meryman HT, ed. New York: Liss, 21, 1986.
- 34) Snider ME and Steinmuller D: Nonspecific tissue destruction as a consequence of cytotoxic T lymphocyte interaction with antigen specific target cells. Transplant Proc 19: 421-423, 1987.
- 35) Prowse SJ, Lafferty KJ and Sellins K: Cytotoxic T cell-mediated graft rejection is lymphokine dependent. Transplant 17: 1552-1554, 1985.
- 36) Bradley JA, Mason DW and Morris PJ: Evidence that rat renal allografts are rejected by cytotoxic T cells and not by nonspecific effectors. Transplantation 39: 169-175, 1985.
- 37) Azuma E, Kaplan J: Role of lymphokine-activated killer cells as mediators of veto and natural suppression. J Immunol 141: 2601-2606, 1988.
- 38) Rammensee H-G, Fink PJ and Bevan MJ: Functional clonal deletion of class I-specific cytotoxic T lymphocytes by veto cells that express antigen. J Immunol 133: 2390-2396, 1984.
- 39) Mule JJ, Shu S and Rosenberg SA: The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo. J Immunol 135: 646-652, 1985.

健保適用

アレルギー性疾患 慢性肝疾患に……

■グリチルリチン製剤

強力ネオミノファーゲンシー

健保略称 強ミノC

●作用
抗アレルギー作用, 抗炎症作用, 解毒作用, インターフェロン誘起作用, および肝細胞障害抑制・修復促進作用を有します。

●用法・用量 ①通常成人には1日1回5~20mlを静脈内に注射する。なお, 年齢, 症状により適宜増減する。
②慢性肝疾患に対しては, 1日1回40mlを静脈内に注射する。年齢, 症状により適宜増減する。

●効能・効果
①小児ストロフルス, 湿疹・皮膚炎, 蕁麻疹, 皮膚掻痒症, 口内炎, フリクテン, 薬疹・中毒疹
②慢性肝疾患における肝機能異常の改善

包装 20ml/10管・30管, 5ml/5管・50管
※使用上の注意は, 製品の添付文書をご参照下さい。

●内服療法には **グリチロン錠** 包装 1000錠, 2100錠, 5000錠

中村 博敏 会社 ミノファーゲン製薬本舗 営業本部 〒107東京都港区赤坂8-10-22 TEL 03(3402)6201