Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Role of a soluble cytotoxic factor in concanavalin A-induced cellular cytotoxicity to rabbit erythrocytes

能勢, 眞人

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1979-02-28
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙0615
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000615

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・（本籍）　能勢眞人（京都府）

学位の種類　医学博士
学位記番号　医博ろ第532号
学位授与の要件　学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付　昭和54年2月28日

学位論文題目　ROLE OF A SOLUBLE CYTOTOXIC FACTOR IN CONCANAVALIN A INDUCED CELLULAR CYTOTOXICITY TO RABBIT ERYTHROCYTES
ウサギ赤血球に対するconcanavalin A－induced cellular cytotoxicityにおけるsoluble cytotoxic factorの役割

審査委員　主査　教授　京極方久
教授　杉山武敏　教授　木幡陽

論文内容の要旨

I　緒　言

Tリンパ球は，自己免疫，腫瘍免疫あるいは同種移植免疫における標的細胞傷害作用に重要な役割を演じている。しかしこのTリンパ球による細胞傷害機構はなお不明な点が多く，近年mitogen依存性のTリンパ球介在性細胞傷害反応がその解析の極めて有用な手段としてPerlmannらをはじめとする多くの研究者により用いられて来た。中でもconcanavalin A（以下Con A）依存性の細胞傷害反応は，Con Aを介した活性化リンパ球と標的細胞との結合が標的細胞破壊をうながすのに本質的なものであるとされ，この系にsoluble cytotoxic factor（以下SCF）が関与するという事実は現在まで報告されていない。一方，他の実験系において，phytohemagglutininや可溶性抗原でTリンパ球を長時間刺激し，その培養上清を精製・濃縮することによって，その中にlymphotoxinと呼ばれるSCFが存在することが，GrangerらやWaksmanらにより既に明らかにされている。しかしこの様なSCFが実際Tリンパ球による俊敏かつ強力な細胞傷害反応の中でいかなる役割を果しているか，またSCFがいかなる機構により標的細胞を破壊せしむるかについては現在なお明らかでない。

本稿において著者らは，ウサギ赤血球を標的細胞に用いることにより，極めて感度の高いCon A依存性のリンパ球介在性細胞傷害反応系（concanavalin A－induced cellular cytotoxicity，以下Con ACC）を確立した。そしてこの系においてリンパ球より放出されるSCFがこの標的細胞破壊機構の主役を担っていることを明らかにし，リンパ球と標的細胞とのConAを介した結合はこのSCFの作用をより有効にしているにすぎないことを示唆した。さらに，このSCFが標的細胞膜レセプターとの結合を介して標的細胞破壊をうながすことを明らかにし，この結合機構に複合糖質が関与

している可能性を示唆した。

II 材料及び方法

Effector：SD系ラット脾細胞よりUnanueの方法に従ってリンパ球を分離した。これをprimary lymphocytesとし，一部を10 μg/mlの濃度のConA存在下あるいは非存在下で24時間培養後，cytotoxic effector lymphocytes（以下CEL）およびそのコントロールとし，それぞれの培養上清の超遠沈上清をSCFおよびそのコントロールとした。

細胞傷害反応：新鮮ウサギ赤血球をsodium ^{51}chromateでラベル後標的細胞とし，これにEffectorとしての①primary lymphocytes＋Con A②CEL③methyl－α－mannosideで処理後のCEL（treated CEL）④SCFを，それぞれ24時間作用させた後，各々のcytotoxicityを標的細胞より特異的に放出された^{51}Crのrelease percentで表わした。一方，treated CELによる細胞傷害作用を形態的にとらえるため，Kederらの方法に準じてpoly－L－lysineを被ったプラスチックシャーレにウサギ赤血球monolayerを作り，その上にtreated CELを作用させ位相差顕微鏡で観察した。

III 結　　果

ウサギ赤血球に対するCon ACC：primary lymphocytesと標的細胞を種々の濃度のCon A存在下で反応させると，10 μg/mlの濃度で最大のcytotoxicityを認めた。この系にmethyl－α－mannosideを加えCon Aの細胞表層の糖質への結合を阻止すると，cytotoxityは完全に阻害された。

しかし，ひとたびCon Aで活性化したCELとの反応系にmethyl－α－mannosideを加えても，またCELの膜表面になお結合しているCon Aを取り除くためあらかじめmethyl－α－mannosideで処理したtreated CELをEffectorに用いても，著明なcytotoxicityの低下は認められず，Effectorと標的細胞とのCon Aを介した結合そのものがこの細胞傷害機序の本質ではないと考えられた。一方Con A存在下でのリンパ球の培養上清に標的細胞に対し顕著なcytotoxicityを認め，このSCFがCon A CCにおける標的細胞破壊に本質的な役割を果していると推察された。

CELの単一細胞レベルでの細胞傷害反応：SCFのCon A CCにおける役割をさらに検討するために，treated CELをウサギ赤血球monolayer上で反応させた。培養開始後数分間でtreated CELは赤血球の隙間をぬってシャーレ底面のpoly－L－lysineに固着され，24時間後にはそれらの約5％にプラークの形式を認めたが，いづれのCELにも赤血球との結合像は見られなかった。以上の所見からCELより放出されるSCFそのものが周囲の赤血球の傷害を引き起こし，SCFはC－Con A CCにおいて本質的な役割を果たしていると考えられた。

SCFの性状：SCFはslow actingで，標的細胞の特異的な^{51}Crの放出が起こるまでに作用開始後6時間以上を要した。SCFの細胞傷害活性はウサギ赤血球によりその細胞数に依存して吸収され，また前もってSCFを2時間吸着させた標的細胞は24時間後に有意な傷害を生じた。これらの所見は，SCFがウサギ赤血球膜上のある種のレセプターとの結合を通じて標的細胞に傷害を及ぼす可能性を示唆している。

SCFの細胞傷害反応に対する単糖の阻害効果：SCFと標的細胞との反応系に種々の単糖を加え

ると，N－acetylglucosamine，ついでmannose，galactoseに，それぞれの濃度に比例してSCFのcytotoxicityの阻害が認められた。さらにこれらの単糖はSCFの標的細胞への吸着をも阻害した。

Ⅳ 考　　察

従来Con A CCにおけるCon Aの役割は，リンパ球の活性化およびリンパ球と標的細胞とのCon Aを"dridge"とする結合であると考えられ，この反応系にはいかなる標的細胞を用いてもリンパ球のSCF放出の事実を見出すことは出来なかった。著者らのウサギ赤血球を標的細胞に用いた実験結果から，Con Aで活性化したリンパ球より放出されるSCFがCon A CCの本質であり，リンパ球と標的細胞とのCon A "bridge"による相互の近接がSCFの作用をより有効にしていると考えられる。

ウサギ赤血球は，従来のリンパ球介在性の細胞傷害反応の標的細胞として用いられてきた種々の有核細胞に比して，細胞膜レベルでSCFの作用機序を論じ得る点で極めて有用である。SCFの標的細胞への吸着実験あるいはウサギ赤血球による吸収実験から得た所見から，SCFは赤血球膜上のある種のレセプターと反応することが考えられ，さらに単糖によるこれらの阻害実験から，このレセプター構造にN－acetylglucosamineやmannoseを末端残基とする複合糖質が関与している可能性が示唆された。このことは，近年Remoldのマクロファージ遊走阻止因子の結合基がマクロファージ膜上のα－L－fucose残基であるという報告や，Ashwell一派のasialo－glycoproteinが肝細胞膜上のgal－actosyl receptorに認識されるという報告などと類似している。SCFの作用機構に複合糖質が関与するという所見は，従来現象学的にしか論じ得なかったリンパ球介在性細胞傷害機構の分子レベルでの解析を進める上で今後極めて重要であると考える。

Ⅴ 結　　語

concanavalin A－induced cellular cytotoxity において，ウサギ赤血球を標的細胞とする簡便かつ感度の高い方法を確立した。同時にこの系にsoluble cytotoxic factor（SCF）を検出し，これがこの細胞傷害反応に本質的な役割を果していることを明らかにした。SCFの細胞傷害活性はウサギ赤血球に吸収され，また吸着し，SCFが赤血球膜表面のレセプターを介して作用していることが示唆された。またある種の単糖は，SCFによる細胞傷害反応およびSCFのウサギ赤血球への吸着を阻害した。SCFの細胞傷害機構におけるこれらの所見の意義について考察した。

論文審査の結果の要旨

免疫学的機序によって細胞が破壊されるいわゆるimmunocytolysis機構は大きく2つに分けられる。即ちアレルギー反応の分類（Coombs）のⅡ型とⅣ型に属するもので前者には補体依存性cytolysis，opsonization，immunoadherence ADCCらが属し，後者は所謂effector（killer）Tによる反応である。これらのimmunocytolysis反応は人間の自己免疫，腫瘍免疫あるいは同種移

植免疫において重要な役割りを演じているのみならず，正常個体でも種々の原因により発生した異常細胞を破壊して個体の恒常性を保つ上にも働いているものである。

これらのimmunocytolysisの中でも主役の一つと信じられている lffector T細胞による 細胞傷害機構は不明の点がなお多く，近年諸種のmitogen 依存性のTリンパ球介在性細胞傷害反応がその解析に用いられるようになった。この中Con A依存性のものにおいてはCon Aを介した活性化リンパ球と標的細胞との結合が標的細胞の破壊をうながすのに必須のものとされ，この系にはsoluble cytotoxic factor（SCF）= lymphotoxin が関与するとの報告は未までなかった。さらに他のPHAや特異抗原で活性化された他のリンパ球からはSCFが放出されるとの報告があるが，その物質の標的細胞破壊機序については現在なお明らかにされていなかった。

申請者はこの点に注目し，新にウサギ赤血球を標的細胞に選ぶことによって，極めて感度の高いCon A依存性のリンパ球介在性細胞傷害反応系を確立し，その系においては活性化されたリンパ球から放出されるSCFが存在し，それがこの系の標的細胞破壊機構の主役を演じていることを明らかにした。そしてリンパ球と標的細胞がCon Aを介して結合することがこのcytolysisに不可欠のものではなく，単にeffectorと標的細胞の間の距離を短くすることによってSCFの効果を大にしているに過ぎないことをも明らかにした。更にこのSCFはslowactingであり，その活性はウサギ赤血球に吸収され，また吸着されることから赤血球膜上にある種のレセプターと反応することが考えられ，さらにいくつかの単糖による阻害実験から，このレセプターにはN－acetylglucosamine や mannose を末端残基とする複合糖質が関与している可能性が示唆された。

これらの成果は，これまで充分解明されていなかったCon Aにより誘導されたeffector Tによる標的細胞破壊機序において，soluble cytotoxic factorが主役を演じ，細胞同志の結合は不可欠ではなく，さらにそのSCFは標的細胞表面のGluNacやマンノーズ残基を持つ糖蛋白を構成成分とするレセプターに働くという事実を明らかにして，これまで現象学的にしか論じ得なかったリンパ球介在性細胞傷害機構の分子レベルでの解析を進める上での重要な手がかりを与えたもので，免疫学とくに免疫病理学の発展に寄与するところは計り切れない程の重大な発見であり業績である。よって本申請者は医学博士の学位を得る資格があると認める。