

# HVJ感染ラット肝細胞に対するNatural Killing(NK)活性増強機序についての1考察

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8900">http://hdl.handle.net/2297/8900</a>

# HVJ 感染ラット肝細胞に対する Natural Killing (NK) 活性増強機序についての一考察

金沢大学医学部病理学第二講座 (主任: 太田五六教授)

原 武 讓 二

(昭和56年2月18日受付)

**Key word** Natural Killing, HVJ 感染肝細胞, NK 増強因子

近年 *in vitro* の実験において、あらかじめ免疫されていないリンパ球が、抗体の関与なしに同種あるいは異種の培養標的細胞を障害する事が見出され、この免疫機構は Natural Killing (NK) と呼ばれており<sup>1)-4)</sup>、HLA の関与する immune T 細胞による反応や標的細胞表面に付着した抗体の関与で起こる Antibody dependent cell - mediated cytotoxicity (ADCC) とは異なる免疫機構と考えられている<sup>5),6)</sup>。しかし ADCC と NK の effector cell の表面マーカーや性状に類似の点が多いため、ADCC と NK の異同に関して尚多くの議論がある<sup>4),7)-9)</sup>。又最近 NK は *in vivo* において、腫瘍細胞やウイルス感染細胞の排除機構の一端を担うのではないかと注目されている<sup>10)-13)</sup>。特にウイルス感染細胞は非感染細胞より NK 作用を受け易いという報告が相次いでなされてお<sup>12),14)-19)</sup>、NK はウイルス感染細胞を崩壊し、ウイルスを胞体外へ放出する事によつてウイルス排除機構に関与するのではないかと考えられている。ウイルス感染により標的細胞に対する NK の増強をもたらす機序としては、現在のところインターフェロン (IF) の関与が最も考えられている<sup>12),14)-18)</sup>。しかし IF の産生にはある程度の時間的経過が必要と言われており<sup>12),16)</sup>短時間反応を用い IF の関与なしにウイルス感染細胞に対する NK の増強を認めたという報告もある<sup>19)</sup>。さらに IF によって増強された NK 活性の持続には、他の因子が関与しているという意見もあり<sup>18)</sup>、ウイルス感染時の NK 増強には IF 以外の関与も示唆される。そこで本研究では、培養肝細胞を標的細胞とし、ウイルス感染で NK が増強するかどうかを試べ、さらに増強するとすればその機

序にはどのような因子があるか、特に IF の有意な産生がないとされている短時間反応と、IF の充分な産生があるとされている長時間反応とで、その増強機序に差がないかどうか検索した。

材料と方法

## I. 材料

標的細胞としては、ラット由来 Coon 肝細胞<sup>20)</sup> (Coon 細胞) と Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) の持続感染した Coon 細胞 (Coon - HVJ 細胞) と YAC 1<sup>21)</sup> (Flow Lab., England) とを用い、培養液としては Coon 細胞と Coon - HVJ 細胞には MEM (GIBCO, USA)、YAC 1 には RPMI - 1640 (日本製薬) に、10% 不活化牛胎児血清 (FCS; GIBCO) と Pc 100U/ml、SM 100 $\mu$ g/ml を補充した。一部実験では Coon - HVJ 細胞に対し、FCS の替わりにニワトリ血清 (Chs; 大日本製薬) を 10% 添加した MEM (Chs. MEM) を用いた。Effector cell は 6~12 週の Wistar 系ラット (静岡実験動物農業協同組合) の脾より採取した。すべてのラットは、Hemagglutination Inhibition (HI) で HVJ に対する抗体価を測定し、抗体の検出されないものを用いた。

## II. 方法

### 1. Coon 細胞への HVJ 感染の方法

HVJ 持続感染 HeLa 細胞 (HeLa - HVJ)  $10^7$  個を MEM に浮遊し、30W で 1 分間超音波粉碎しミリポアで濾過し (Pore size 0.8 $\mu$ , ミリポア社) HVJ 浮遊液 (2 $^{\circ}$ HA/0.5 ml) を作った。 $10^6$  個の Coon 細胞にこの

A Study on the Augmentation Mechanism of Natural Killing (NK) Activity against HVJ-infected Rat Liver Cells. **Joji Haratake**, Department of Pathology (II) (Director: Prof. G. Ohta), School of Medicine, Kanazawa University.

HVJ 浮遊液を 1 ml 添加し、以後ほぼ 1 週毎に継代培養した。HVJ 感染の有無は、逐次ニワトリ赤血球凝集と、蛍光抗体間接法で確認した。

## 2. Effector リンパ球の分離

ラット脾を無菌的に摘出後細切し、ハンクス液 (HBSS) を加え 80 メッシュ (径 177 $\mu$ m) で濾過後、KAC2 (日本抗体研究社) を 10% に添加し、37 $^{\circ}$ C, 95% air, 5% CO<sub>2</sub> で 1 時間反応させ喰食細胞に Silica を取込ませてから、400G30 分間の比重遠心<sup>22)</sup>でリンパ球を採取した。この中のペルオキシダーゼ<sup>23)</sup>陽性細胞は 2% 以下であった。一部リンパ球は、Weston ら<sup>15)</sup>の方法に準じてウサギ抗ラット IgG の IgG-F(ab')<sub>2</sub> (Cappel Lab., USA) で前処理するか、Hallberg<sup>24)</sup>の方法に準じてヒト凝集 IgG で前処理して用いた。また一部リンパ球は Parish ら<sup>25)</sup>の方法に準じ EA, non-EA, EAC, non-EAC に分画した。

## 3. Cytotoxicity assay の方法

### 1) Takasugi - Klein<sup>26)</sup> の方法に準じた assay 法

Coon 細胞, Coon - HVJ 細胞の各々を 0.05% トリプシン (DIFCO, USA), 0.02% EDTA で処理しマイクロプレート (Falcon) の小孔に 100 個ずつ播き標的細胞 (T) とし, effector cell (E) を T:E = 1:200 で加え, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>, 34 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。培養後プレート底に生着する標的細胞を数え, リンパ球を加えないものを対照として次式で % cytotoxicity を求めた。すべての実験は Triplicate で行った。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \left( 1 - \frac{\text{Mean No of tested cells}}{\text{Mean No of control cells}} \right) \times 100$$

尚 assay 系の培養液は原則として FCS 添加 MEM (FCS.MEM) を用いたが、一部で Coon - HVJ 細胞に対する cytotoxicity assay に Chs.MEM を用いた。

### 2) Bean ら<sup>27)</sup> の方法を modify した assay 法

約 20 万個の coon 細胞, Coon - HVJ 細胞各々に 100 $\mu$ Ci (0.1 ml) の <sup>3</sup>H - Proline (NEN; England) を加え, 18 時間培養後にトリプシンと EDTA で処理したものを標的細胞としマイクロプレート各孔に 1000 個ずつ播いた。それにリンパ球を加え 4 時間 (T:E = 1:100) 或いは 24 時間 (T:E = 1:25) 培養した。培養後各孔を洗浄し, トリプシンと EDTA で生着細胞を剥離して microharvester (Bellco; USA) で収穫した。その後細胞を吸着させた濾紙を乾燥し, PPO - POPOP - トルエン液 5 ml を加え, 液体シンチレーションカウンター (Beckmann 社) で 2 分間, <sup>3</sup>H

の取込みを測定した。すべて Triplicate で行い, Back Ground (BG) として PPO - POPOP - トルエン液のみを測定し, 次式で % cytotoxicity を求めた。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \left( 1 - \frac{\text{Mean of tested cpm} - \text{BG cpm}}{\text{Mean of control cpm} - \text{BG cpm}} \right) \times 100$$

### 3) YAC 1 に対する cytotoxicity assay

基本的に Bean ら<sup>27)</sup>の <sup>3</sup>H - proline ラベリング法を用い, 以下のように modify した。約 200 万個の YAC 1 に, 50 $\mu$ Ci (0.5 ml) の <sup>3</sup>H - Proline を加え 18 時間培養後に, マイクロプレート各孔に 1000 個ずつの YAC 1 を播き, T:E = 1:25 の比にリンパ球を加え 4 時間或いは 24 時間培養し, microharvester で収穫後 2) 項と同様にして <sup>3</sup>H の取り込みを測定し, 2) 項と同式で % cytotoxicity を求めた。

### 4) Competitive assay

YAC 1 を標的細胞 (T) とし, Coon 細胞, Coon - HVJ 細胞の各々を Competitor cell (C) として, T:C の比 1:2 或いは 1:4 の比で加え, 同時に T:E = 1:25 の比でリンパ球も加え, 前項 3) の方法に従って反応時間 4 時間と 24 時間の YAC 1 に対する % cytotoxicity を求めた。

### 5) 各種培養上清を YAC 1 に対する cytotoxicity assay 系に添加する実験

約 10<sup>7</sup> 個の Coon - HVJ 細胞を 24 時間培養後に収穫した上清を, 紫外線ランプ (東芝 GL - 15) で 24 時間照射し HVJ を不活化後, 50000G で 1 時間超遠心 (日立) し 1/2 上清を濾過滅菌して実験に供した。Coon 細胞の上清も同じ操作で得た。また約 10<sup>7</sup> 個の Coon 細胞, Coon - HVJ 細胞に 10<sup>8</sup> 個のリンパ球を加えて 4 時間培養後 (Coon - HVJ 細胞のみ) と 24 時間培養後の上清を収穫し, 上記と同じ操作を施した。すなわち上清の試料としては, Coon 細胞, Coon - HVJ 細胞, Coon 細胞とリンパ球混合後 24 時間, Coon - HVJ 細胞とリンパ球混合後 4 時間と 24 時間の各上清 5 種を用いた。これら上清を新たなリンパ球による YAC 1 に対する cytotoxicity assay 系に加え, その後 24 時間培養して cytotoxicity を求めた。尚 5 種の上清を最終的に 1/2 に希釈される様に培養液中に加えた。

### 6) ウサギ抗 HVJ 抗体の IgG - Fab' フラグメントを Coon - HVJ 細胞に対する cytotoxicity assay 系に添加する実験

ウサギ抗 HVJ から IgG の Fab' を作製した<sup>28)</sup>。この Fab' の抗 HVJ 抗体価は 128HI であった。<sup>3</sup>H - proline 法による Coon - HVJ 細胞に対する

Cytotoxicity assay に於いて、effector リンパ球を加える 30 分前に assay 系の中に Fab' を添加し、次にリンパ球を加えて 4 時間或いは 24 時間培養して % cytotoxicity を求めた。

## 成 績

### I Coon 細胞への HVJ 感染の確認

Coon 細胞に HVJ を添加して約 1 ケ月 (4 代継代) 経過すると、Fig.1 左の如く Coon 細胞の 50 % 以上はニワトリ赤血球を凝集し、また右の如く蛍光抗体間接法で程度の差はあるが 100 % の細胞に、顆粒状ないし膜状の抗 HVJ 特異蛍光を認め、HVJ の感染が確認された。以後これを Coon - HVJ 細胞として実験に供した。3 ケ月後、1 年後の継代培養でも蛍光抗体法で 100 % の細胞に蛍光を認めた。

### II リンパ球を加えない時の Coon 細胞と Coon - HVJ 細胞の増殖能の差

HVJ 感染自体により Coon 細胞が死滅し易くなる事も懸念されるので、リンパ球を全く加えないで培養

した時の Coon 細胞と Coon - HVJ 細胞の細胞数を比較した。Fig.2 に示すように、マイクロプレートに各 100 個の細胞を播き 4 時間から 48 時間まで観察したが、両者とも同程度の細胞数を示し (ともに  $n = 6$ )、HVJ 感染のみによって Coon 細胞が有意に死滅し易くなる事はなかった。

### III Coon 細胞と Coon - HVJ 細胞に対するラットリンパ球の細胞障害性の差

ラットリンパ球の Coon 細胞と Coon - HVJ 細胞に対する細胞障害性を Fig.3 に示す。A は Takasugi - Klein の方法に準じ 24 時間 assay したもので、Coon 細胞と Coon - HVJ 細胞に対する % cytotoxicity は各々  $8.5 \pm 8.3 \%$ 、 $32.1 \pm 9.4 \%$  と Coon - HVJ 細胞の方が高かった ( $p < 0.01$ )。B は  $^3\text{H}$  - Proline ラベリング法で assay したもので、左 2 列の 4 時間 assay における Coon 細胞と Coon - HVJ 細胞に対する % cytotoxicity は各々  $0.5 \pm 7.4 \%$ 、 $11.4 \pm 9.0 \%$  と Coon - HVJ 細胞で高く ( $p < 0.05$ )、右 2 列の 24 時間 assay でも Coon - HVJ 細

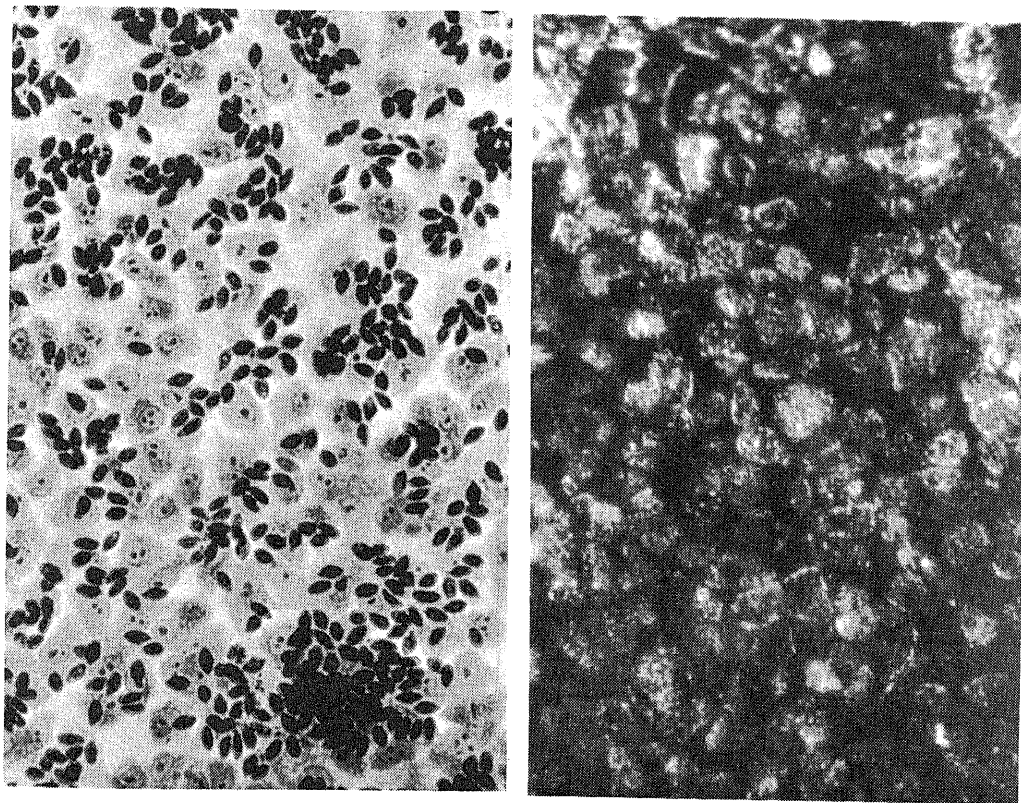


Fig. 1. HVJ-infected Coon cells showing agglutination of chicken red blood cells around them (left), and specific fluorescence of the same cells stained with anti-HVJ by indirect immunofluorescent method (right).

胞の方が高い細胞障害性を受けた。すなわち、反応時間4時間でも24時間でもCoon-HVJ細胞の方が高い細胞障害性を受け、assay法による差はなかった。

#### IV Coon細胞とCoon-HVJ細胞に対し細胞障害性の高いリンパ球の分画

リンパ球をEA, non-EA, EAC, non-EACの4つに分画し、Coon細胞とCoon-HVJ細胞に対する細胞障害性がどの分画に高いか検討した。Fig.4に示

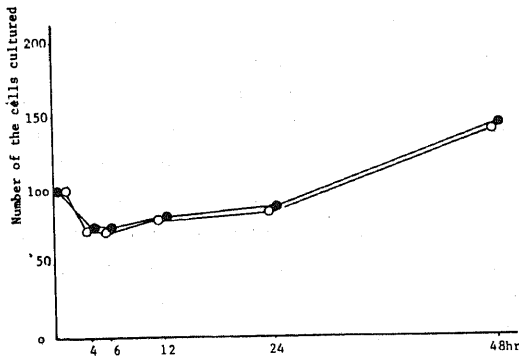


Fig. 2. The number of cultured Coon (●) and Coon-HVJ cells (○) without lymphocytes up to 48 hr. The starting number of each cells in culture are 100.

す如くCoon細胞、Coon-HVJ細胞ともにEA分画、non-EAC分画に高い細胞障害性が見られた。すなわちCoon細胞とCoon-HVJ細胞に対する細胞障害性はともに、IgGのFc部分に対するレセプター(IgG-FcR)を有しC3レセプターのないリンパ球分画に高いと考えられた。

#### V Coon-HVJ細胞に対するリンパ球の細胞障害性に不明の抗体やリンパ球のFcRが関与するかどうか

##### 1. 培養液をChs・MEMにした時のCoon-HVJ細胞に対する細胞障害性への影響

Coon細胞に比してCoon-HVJ細胞が高い細胞障害を受ける時、FCS中の自然抗体(抗HVJ)を介してADCCが起っている事が懸念される。そこでFCSの代わりに、哺乳類のリンパ球によるADCCをmediateしないと言われていたニワトリ血清<sup>29)</sup>をMEMに補充し、FCS・MEMを使った場合と比較した。Fig.5に示すように、どちらの培養液を使っても、Coon-HVJ細胞に対する細胞障害は変わらずFCS中の自然抗体の関与はないと考えられた。

##### 2. リンパ球をウサギ抗ラットIgG抗体のIgG-F(ab)<sub>2</sub>フラグメントで前処理した時のCoon-HVJ細胞に対する細胞障害性

次にHIで検出し得ない程の少量のHVJ抗体が、リ

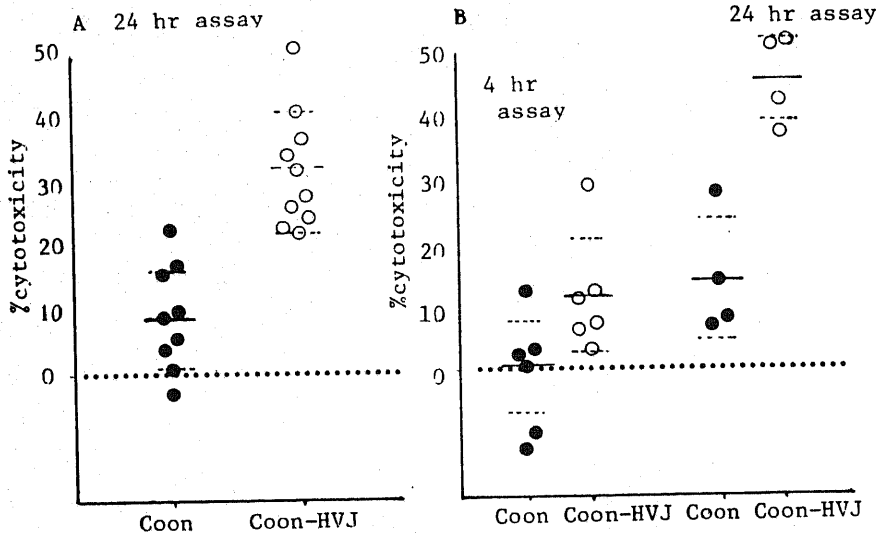


Fig. 3. % cytotoxicity against Coon (●) and Coon-HVJ cells (○) by non-immune rat spleen lymphocytes, assessed by the modified method of Takasugi-Klein (A; T(target): E(effector) = 1:200, 24 hr assay) and <sup>3</sup>H-Proline labeling method (B). In B, the left two columns represent 4 hr assay (T:E = 1:100) and the right two columns 24 hr assay (T:E = 1:25).

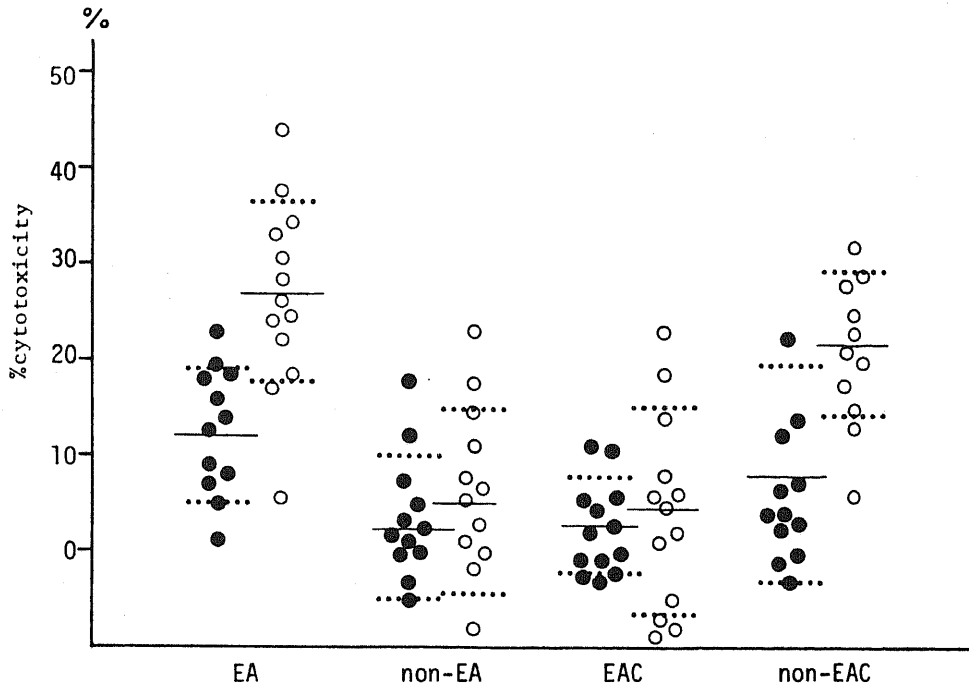


Fig. 4. Effector cell subpopulation in cytotoxicity against Coon (●) and Coon-HVJ cells (○), assessed by the modified method of Takasugi-Klein (T:E= 1:200, 24 hr assay).

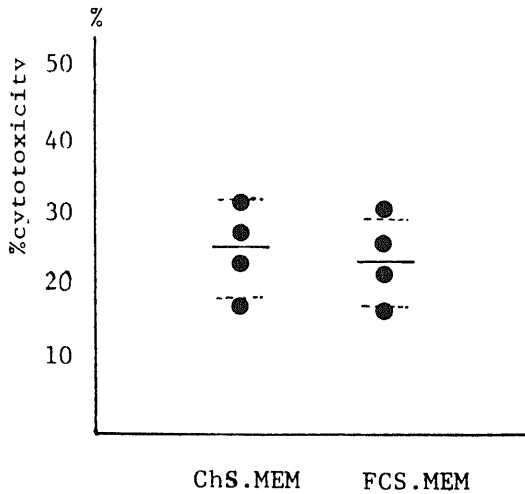


Fig. 5. %cytotoxicity of lymphocytes against Coon-HVJ cells using ChS (left) and FCS (right)-MEM, assessed by the modified method of Takasugi-Klein (T:E = 1:200, 24 hr assay).

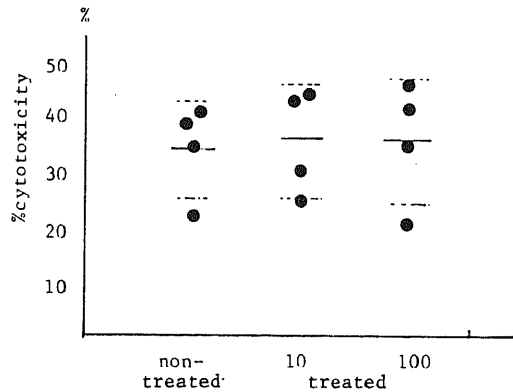


Fig. 6. %cytotoxicity against Coon-HVJ cells by non-treated lymphocytes and those pretreated with IgG-F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabbit antisera against rat IgG, diluted in 10 and 100 µg/ml (by modified method of Takasugi-Klein, T:E = 1:200, 24 hr assay).

リンパ球表面に付着しarmingの形のADCCを起こしている可能性を考え、リンパ球をウサギ抗ラットIgG抗体のIgG-F(ab)<sub>2</sub>で前処理した時と未処理の時とを比較した。Fig.6に示すように2種類の濃度のF(ab)<sub>2</sub>で前処理しても、Coon-HVJ細胞に対する細胞障害性は未処理リンパ球と変わらなかった。

### 3. リンパ球を凝集IgGで前処理した時のCoon-HVJ細胞に対する細胞障害性

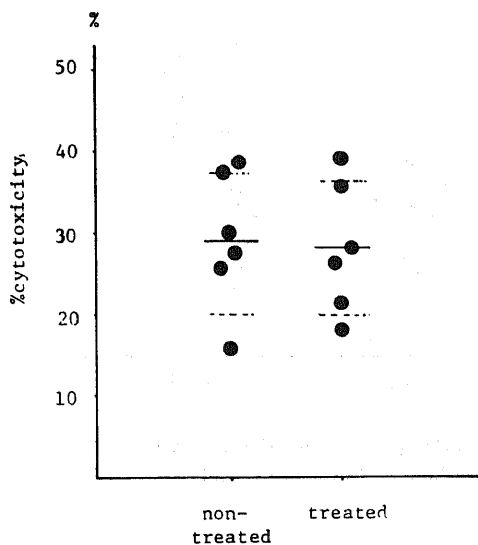


Fig. 7. %cytotoxicity against Coon-HVJ cells by non-treated lymphocytes and those pretreated with human aggregated IgG (500  $\mu$ g/ml), assessed by the modified method of Takasugi-Klein (T:E = 1:200, 24 hr assay).

Fig.7は、リンパ球をヒト凝集IgG (500 $\mu$ g/ml)で前処理し、そのFcRをブロックした時と未処理の時の、Coon-HVJ細胞に対する細胞障害性を比較したものである。凝集IgG処理によっても細胞障害性は変わらず、従ってADCCの時のようなリンパ球表面のFcRの関与はないと考えられた。以上より、Coon-HVJ細胞に対する細胞障害性には抗体やFcRの関与はなく、この反応はADCCではなくNKと考えられる。

### VI Coon-HVJ細胞に対するNK活性増強機序の

4時間と24時間 assayにおける相異について前項までで、Coon-HVJ細胞はCoon細胞に比して4時間でも24時間 assayでもより強いNK活性を受ける事が示された。そこで次に、4時間と24時間とでその増強機序に差がないか検索した。

#### 1. Competitive assay

Fig.8はYAC1を標的細胞、Coon細胞とCoon-HVJ細胞をcompetitor cellとし、competitorのどちらがよりYAC1に対するNK活性を抑制するか調べた成績を示す。A(左側)は反応時間4時間で assayしたものであり、Coon細胞をcompetitorとして加えてもYAC1に対する細胞障害性の抑制は見られなかった。一方Coon-HVJ細胞をcompetitorとした時には、非添加10.9 $\pm$ 1.8%から、6.1 $\pm$ 1.3%, 4.2 $\pm$ 1.3% ( $p < 0.01$ )とCoon-HVJ細胞の量が増すにつれて抑制が見られた。次にBは24時間で assayした結果を示し、Coon細胞をcompetitorとした時のYAC1に対する% cytotoxicityは、非添加29.1 $\pm$ 3.1%からT:C = 1:4で加えた時14.2 $\pm$ 3.5%と抑制された ( $p < 0.01$ )。一方Coon-HVJ細胞をcompetitorとした時は、非添加30.7 $\pm$ 2.7%から、1:4

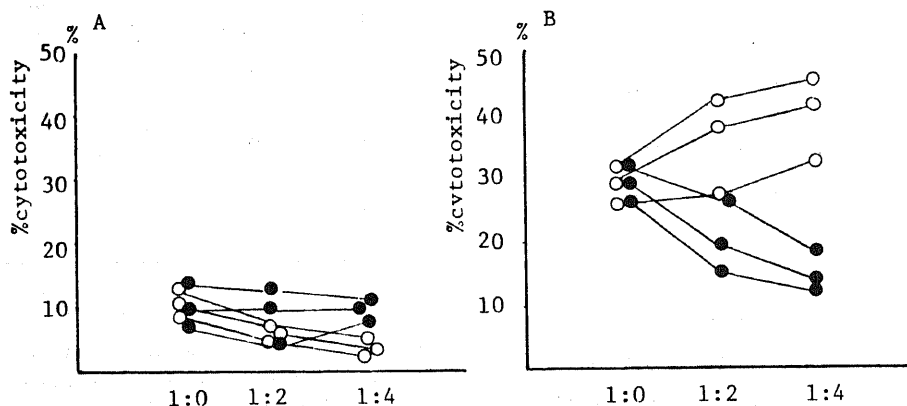


Fig. 8. Competitive inhibition of %cytotoxicity against target YAC1 by Coon (●) and Coon-HVJ cells (○) as competitor cells. A; 4 hr assay, T:E = 1:25. B; 24 hr assay, T:E = 1:25.

で添加した時  $39.4 \pm 6.8\%$  と逆に増加の傾向 ( $p < 0.1$ ) を示した. すなわち 24 時間 assay の結果では, より NK 感受性と考えられる Coon-HVJ 細胞の方が YAC 1 に対する NK 活性を増強するという予想に反する結果を得た. このように Coon 細胞と Coon-HVJ 細胞を competitor として用いると, 各々の 4 時間 assay の成績と 24 時間 assay の成績とが異なる事がわかった.

2. 5 種類の培養上清を YAC 1 に対する NK assay 系に添加した実験

あらかじめ Coon-HVJ 細胞とリンパ球を混合し, 反応 4 時間後と 24 時間後で収穫した培養上清が, 新たなリンパ球による YAC 1 に対する NK 活性にどんな影響を及ぼすか検討し, Fig. 9 にそれを示した. 混合後

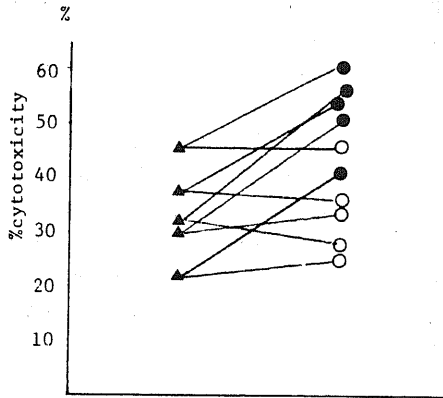


Fig. 9. Influence of the supernates obtained from cultures of Coon-HVJ and lymphocytes for 4 hr (○) and 24 hr (●) upon % cytotoxicity against YAC 1. ▲: no supernates.



Fig. 10. Influence of the supernates obtained from cultures of Coon (□) alone, Coon + lymphocytes (■) and Coon-HVJ (●) alone upon % cytotoxicity against YAC 1. ▲: no supernates. T : E = 1 : 25, 24 hr assay.

24 時間 (●) の上清を添加すると, YAC 1 に対する % cytotoxicity は非添加  $33.5 \pm 9.0\%$  から  $52.6 \pm 7.3\%$  に上昇した ( $p < 0.01$ ). しかし混合後 4 時間 (○) の上清を添加しても, % cytotoxicity の上昇は見られなかった. 次に Fig. 10 のように Coon 細胞や Coon-HVJ 細胞の上清及び, Coon 細胞とリン

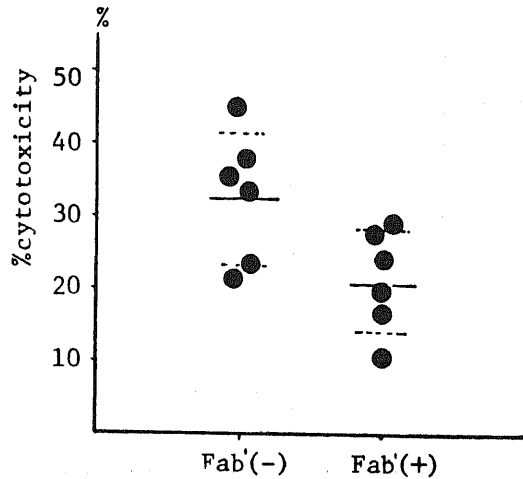


Fig. 11. Effect of IgG-Fab' of rabbit antisera against HVJ on % cytotoxicity against Coon-HVJ, assessed by the proline labeling method (T : E = 1 : 25, 24 hr assay). The final concentration of Fab' was  $10 \times 128$  HI.

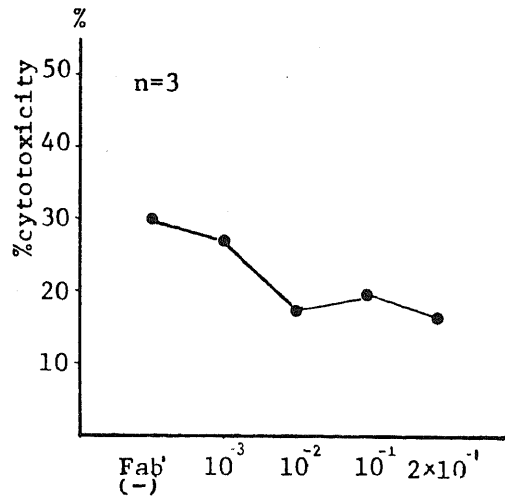


Fig. 12. Effect of the step-wise concentration of IgG-Fab' of anti-HVJ upon % cytotoxicity against Coon-HVJ, assessed by the proline labeling method (T : E = 1 : 25, 24 hr assay). Original concentration of Fab' : 128 HI.



パ球を混合後 24 時間の培養上清を、それぞれ YAC 1 に対する NK assay 系に添加したところ、NK 活性の上昇はなかった。すなわち YAC 1 に対する NK 活性を上昇させる作用は、Coon - HVJ 細胞とリンパ球混合

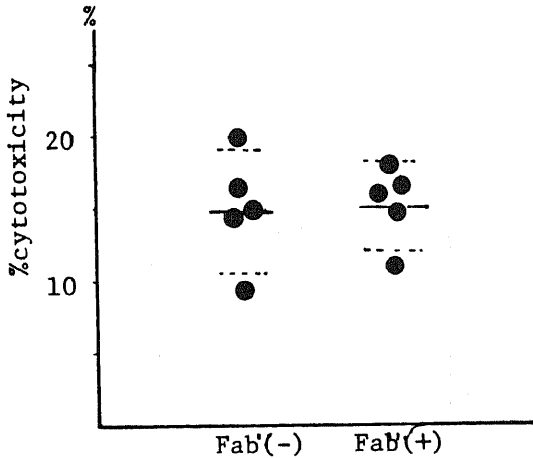


Fig. 13. Effect of IgG-Fab' of rabbit antisera against HVJ on % cytotoxicity against Coon-HVJ, assessed by the proline labeling method (T:E = 1:100, 4 hr assay). The final concentration of Fab' was  $10 \times 128$  HI.

24 時間後の上清のみに見られ、同 4 時間後の上清になく、また Coon - HVJ 細胞のみの 24 時間培養上清にもなかった。

3. HVJ 抗体 (ウサギ) の IgG - Fab' 添加による

Coon - HVJ 細胞に対する NK 活性の変化

次にウサギ抗 HVJ の IgG - Fab' 添加による Coon - HVJ 細胞に対する NK 活性の変化

次にウサギ抗 HVJ の IgG - Fab' フラグメントを添加した時、Coon - HVJ 細胞に対する NK 活性が 4 時間 assay と 24 時間 assay とで異なるかどうか検討した。まず Fig.11 に示すように、24 時間 assay での Coon - HVJ 細胞に対する % cytotoxicity は、Fab' を加えない時  $32.8 \pm 9.0$  % から、Fab' を加えた時 (Fab' の終濃度は  $10^{-1} \times 128$  HI)  $21.4 \pm 7.2$  % と減少した ( $p < 0.05$ )。そこで、培地に加える Fab' の濃度を段階的に変えて、同じく 24 時間 assay した結果を Fig.12 に示す。  $10^{-2}$  までの高い濃度では有意の % cytotoxicity の減少を見るが、  $10^{-3}$  の時の % cytotoxicity は Fab' 無添加の時に近く、 % cytotoxicity の減少は Fab' 濃度に依存性であった。

Fig.13 は、 Fig.11 と同じ実験を 4 時間 assay で試みた結果である。4 時間の場合には Fab' の高濃度を添加しても、Coon - HVJ 細胞に対する NK 活性は無添加の時と変わらなかった。すなわち、24 時間 assay における Coon - HVJ 細胞に対する NK 活性は、HVJ 抗

Table 1. Summary of experiments on the NK activity against Coon and Coon-HVJ cells of 4 hr and 24 hr assay. a: unchanged, b: decreased, c: enhanced, N.D.: not done.

	Coon		Coon-HVJ		
	4 hr assay	24 hr assay	4 hr assay	24 hr assay	
NK activity against each cells	low	higher than 4 hr	higher than Coon ( $p < 0.05$ )	higher than Coon ( $p < 0.01$ )	
Effect of each cells as competitor on NK activity against YAC 1	→ a	↘ b	↘	↗ c	
Effect of IgG-Fab' of Anti-HVJ upon NK activity against Coon-HVJ cells	N.D.	N.D.	→	↘	
	Coon	Coon + Ly	Coon-HVJ	Coon-HVJ + Ly for 4 hr	Coon-HVJ + Ly for 24 hr
Effect of the supernates from each cells culture upon NK activity against YAC 1 (24 hr assay)	→	→	→	→	↗

体の IgG - Fab' 添加によって抑制されたが、4 時間 assay における NK 活性は変化しなかった。以上の Coon 細胞及び Coon - HVJ 細胞に対する NK 活性の 4 時間と 24 時間反応の対比を要約すると Table 1 の如くなる。

### 考 察

NK 活性をテストするには、既知の NK 感受性の高い細胞株 (YAC 1<sup>5), 11), K562<sup>3), 19), MOLT 4<sup>9)</sup> 等を標的細胞とする実験系がよく用いられ、この時標的細胞と effector cell は異種である事が多い。しかし生体内での腫瘍細胞やウイルス感染細胞が、宿主 (Auto) の NK 細胞 (NK の effector cell) の作用を果して受けるものかどうかについては、異種系での実験では示唆に乏しいと考えられる。本実験では特にこの点を考えて、同種の系で NK 反応をテストし、しかも今まで NK の標的細胞として用いられた事のないラット肝細胞株 (Coon 細胞) を使用し、HVJ の感染株と非感染株とを対比した。これには、ウイルス性肝炎の *in vitro* モデル実験としての含みもある。</sup></sup>

さて、Coon 細胞及び Coon - HVJ 細胞を標的細胞とし、ラット脾リンパ球を effector cell とする反応系が NK 反応であるかどうかをまず確かめなければならず、次に述べるデータから NK 反応である事が確認されたと考えられる。

1. ラット脾リンパ球の effector 分画を検討すると、IgG - Fc リセプターを有し、C3 リセプターの無い細胞分画に、Coon 細胞及び Coon - HVJ 細胞を障害する活性が強く見られた。この分画は諸家の NK 細胞のマーカーと一致するが<sup>3), 5), 8)</sup>、同時に ADCC 活性を強く有する分画でもあり<sup>9), 30), 31)</sup>、NK と ADCC の両活性を示すリンパ球分画が強くオーバーラップしているという通説に<sup>7), 9), 30)</sup>相反しない所見であった。

2. しかし本実験の反応が、ADCC ではないといういくつかの証拠が挙げられた。即ち、1). 使用ラット (無処置) の血清中に HVJ に対する抗体 (HI 法で検索) が含まれていなかった。2). テスト培養液の補充血清を牛胎児血清からニワトリ血清にかえても、Coon - HVJ 細胞に対する細胞障害性は全く変わらず、従って自然抗体が FCS 中に含まれていて、それによる ADCC 反応が起こっているという可能性は否定された。3). リンパ球をウサギ抗ラット IgG 抗体の IgG - F (ab')<sub>2</sub> で前処理し、自然抗体としてリンパ球表面に付着しているかもしれない抗 Coon 細胞膜抗体や抗 HVJ 抗体をブロックしても、ブロックしない場合と較べて、Coon - HVJ 細胞に対する細胞障害性に差がな

かった。つまりリンパ球の持ち込み抗体による ADCC の可能性が否定された。4). リンパ球を凝集 IgG で前処理し、FcR をブロックしても同様に Coon - HVJ 細胞に対する細胞障害性に変わりがなかった。即ち ADCC 反応であれば、リンパ球の FcR ブロックによって、細胞障害性が阻止される筈である。以上より、Coon 細胞及び Coon - HVJ 細胞に対するラットリンパ球の細胞障害性には、抗体やリンパ球表面の FcR の関与はなく、この反応は ADCC ではなく NK と考えられた。

さてそこで、Coon 細胞及び Coon - HVJ 細胞に対するラットリンパ球の NK 活性は、4 時間 assay に於いても 24 時間 assay に於いても Coon - HVJ 細胞の方で高かった。NK 活性を増強する因子は、今までに数多くの報告がなされているが<sup>6), 10), 32)</sup>、中でも合成二重鎖 RNA の Poly I:C やリポ多糖類、Pyran 等のインターフェロンインデューサーがよく知られている<sup>33)-35)</sup>。又種々のウイルスが、標的細胞側や effector cell 源の生体側へ感染した時にも、NK 活性の増加が見られるという報告が多い。<sup>12), 14)-19), 32)</sup> Santoli ら<sup>14), 16), 32)</sup>は、ウイルス感染によって標的細胞に対するヒトリンパ球の NK 活性が増加するのは、インターフェロン (IF) によると述べており、Welsh<sup>12)</sup> らや Weston<sup>15)</sup> らも同様に、ウイルス感染細胞に対する NK 活性の増高は IF の作用による事を示唆している。この種の IF は、ウイルス感染細胞との反応によりリンパ球側から産生される白血球 IF と呼ばれているもので<sup>36)</sup>、NK 活性を増強する程の有意な量を産生するには、十数時間以上の反応時間が必要と言われている<sup>12), 16)</sup>。しかし Ault ら<sup>19)</sup>は、HeLa 細胞と麻疹ウイルス持続感染 HeLa 細胞 (M - HeLa) とを標的細胞とし、6 時間という短時間の NK assay によっても M - HeLa の方に高い NK 活性を認め、この反応に IF の関与はなかったと述べている。今回の実験では、4 時間でも 24 時間反応でも Coon 細胞に比し Coon - HVJ 細胞の方に高い NK 活性を認めた。そこで HVJ 感染による NK 増強の機序が、これら 2 つの反応時間に於いて同一であるかどうか検討した。

まず NK sensitive として知られている YAC 1 を標的細胞とし、Coon 細胞と Coon - HVJ 細胞を各々 competitor として用いた competitive assay では、4 時間 assay の場合 Coon 細胞には YAC 1 に対する NK 活性を抑制する効果はなく、Coon - HVJ 細胞のみが有意な抑制を示した。この抑制は、Coon 細胞より Coon - HVJ 細胞の方が NK 感受性が高い事と矛盾しない結果である。一方 24 時間 assay では、Coon 細

胞は抑制を示すが、よりNK感受性が高いと考えられたCoon-HVJ細胞の方は、逆にYAC 1に対するNK活性を増強するという一見矛盾した結果を得た。これはおそらく、リンパ球とCoon-HVJ細胞を混合し24時間反応した時、上清中にNK活性増強因子が産生され、標的細胞及びcompetitor cell 両細胞を障害するeffector cellの活性が著しく高まったためではないかと考えた。そこで次に、あらかじめリンパ球とCoon-HVJ細胞とを混合培養し、4時間と24時間後の培養上清に、そのようなNK活性を増強する作用があるかどうかを検索した。

新たなeffector cellとYAC 1とのNK assay系にあらかじめ採取した種々の培養上清を添加し、上清のNK活性増強作用を検討すると、Coon-HVJ細胞とリンパ球の混合培養24時間後の上清のみが、YAC 1に対するNK活性を上昇させ、同4時間後の上清にはないという事実がわかった。更にCoon細胞とリンパ球の混合培養24時間後の上清や、Coon細胞のみ或いはCoon-HVJ細胞のみの培養上清等にはNK活性を増強する作用は見られなかった。つまりCoon-HVJ細胞とリンパ球の混合培養24時間の上清にはNK活性を増強する因子(上清因子)が含まれており、Coon細胞よりCoon-HVJ細胞の方が強いNK活性を受ける(Fig.3)のはこのためであろうと考えられた。ラットのIFや抗IFを精製する事が困難であったため、この上清因子がIFであるかどうか確認できなかったが、HVJは白血球IFのインデューサーである事<sup>37)</sup>からこの因子はIFである可能性が大きいと考えている。

さてここで注目すべき事に、Coon細胞に比べCoon-HVJ細胞の方がより強いNK活性を受けるのは、反応24時間の時だけでなく4時間assayの時も同じである。ところがその4時間培養の上清には、NK活性増強因子は含まれていなかった。これと類似の報告を、前述のようにAultら<sup>19)</sup>が短時間培養(6時間)の成績で述べている。従って、ウイルス感染標的細胞に対するNK活性が非感染細胞に対するNK活性よりも増強する機序は単一ではなく、長時間反応の場合には上清中に産生されるIFの様なNK増強因子が主体をなし、短時間反応の場合には上清中に放出される事のない因子(非上清因子)が主体を占めるのではないかと考えられる。IFによらないNK活性の増強は、ウイルス感染によって宿主細胞膜抗原の変調が起こり、NK細胞からより強く認識されるようになるため起こるといふ考え方が多い<sup>12), 19)</sup>。短時間反応のようなIFの産生が未だ充分でない時期には、このような機

序がNK活性増強の主体を占めている可能性は充分に考えられる。

次にウサギ抗HVJのIgG-Fab'を添加して、Coon-HVJ細胞に対するNK活性を見ると、4時間assayではFab'を添加しない場合と比べて差異がなかったが、24時間ではFab'を添加する事によりNK活性が低下した。即ち、この実験に於いても4時間と24時間assayの成績が異なる態度を示した。つまり、IFの様な上清因子によらないNK増強機序の場合(4時間反応)には、抗ウイルス抗体のFab'を添加しても変化しないが、上清因子によるNK活性増強の場合(24時間反応)には、ウイルス抗体を添加しウイルスの中和や宿主細胞表面に出されたウイルス蛋白をマスクする事により、そのNK活性増強作用が抑制されるのではないかと考えられる。しかし、ウイルス感染細胞とリンパ球のNK反応系に抗ウイルス抗体を添加する実験の報告<sup>19)</sup>は少なく、又リンパ球側への抗体の作用も考慮されねばならない点もあり、その詳細な意義はわからない。ここで強調したいのは、HVJ抗体を添加した時のCoon-HVJ細胞に対するNK活性に及ぼす影響が4時間と24時間assayとで異なるという点である。

以上の4時間反応と24時間反応との対比を簡単にまとめるとTable 1のようになり、ウイルス感染細胞に対するNK活性増強作用の態度が、4時間反応と24時間反応とで異なり、各々違った機序の関与が推測された。

## 結 論

1. Coon細胞及びCoon-HVJ細胞に対するラット脾リンパ球の細胞障害性は、HVJ抗体やFc-Rの関与を必要としないNK反応であると考えられた。
2. Coon-HVJ細胞に対するNK活性は、反応時間4時間でも24時間でもCoon細胞に対するNK活性よりも高かった。
3. YAC 1を標的細胞とし、Coon細胞及びCoon-HVJ細胞をCompetitorとしたcompetitive assayでは、4時間反応の場合Coon-HVJ細胞がYAC 1に対するNK活性を抑制し、24時間反応では逆に増強した。これに対し、Coon細胞は4時間では変化なく24時間で抑制を示した。
4. Coon-HVJ細胞とリンパ球の混合培養24時間の上清は、新たなリンパ球によるYAC 1に対するNK活性を増強したが、混合培養4時間の上清にはこの増強作用はなかった。またCoon細胞とリンパ球混合培養24時間の上清や、Coon細胞のみ及びCoon-

HVJ 細胞のみの培養上清にも NK 活性増強作用はなかった。

5. 抗 HVJ 抗体の IgG - Fab' フラグメントを添加すると, 24 時間反応での Coon - HVJ 細胞に対する NK 活性は減少したが, 4 時間での NK 活性は不変であった。

以上の結果より HVJ 感染肝細胞に対する NK 活性増強の機序は, 4 時間 assay と 24 時間 assay とで異なり, 前者では非上清因子が後者では上清因子が主に作用していると考えられた。

(本研究の一部を第 15 回日本肝臓学会西部会に於いて発表した)

稿を終えるに臨み, 終始御指導御校閲を賜りました恩師太田五六教授に深く感謝の意を表するとともに, 御協力を頂きました野々村昭孝助教授をはじめ第二病理諸先生方に感謝します。また貴重な材料の提供やウイルス学的御指導を賜りました, 本学ウイルス学教室波多野基一教授ならびに小倉壽博士に深謝します。

## 文 献

- 1) Kiessling, R., Klein, E., Pross, H. & Wigzell, H. : Natural killer cells in the mouse. II Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Europ. J. Immunol.*, **5**, 117 - 121 (1975).
- 2) Herberman, R. B., Nunn, M. E., & Lavrin, D. H. : Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer*, **16**, 216 - 229 (1975).
- 3) Altman, A., & Rapp, H. J. : Natural cell - mediated cytotoxicity in guinea pigs : Properties and specificity of natural killer cells. *J. Immunol.*, **121**, 2244 - 2252 (1978).
- 4) Santoli, D., Trinchieri, G., Moretta, L., Zmijewski, C. M., & Koprowski, H. : Spontaneous cell - mediated cytotoxicity in humans. Distribution and characterization of the effector cell. *Clin. Exp. Immunol.*, **33**, 309 - 318 (1978).
- 5) Kiessling, R., Petranyi, G., Karre, K., Jondal, M., Tracey, D., & Wigzell, H. : Killer cells : A functional comparison between natural, immune T cell and antibody - dependent in vitro systems. *J. Exp. Med.*, **143**, 772 - 780 (1976).
- 6) 矢田純一: 細胞障害性リンパ球(キラー細胞)の類とその作用機序. *日臨免誌*, **3**, 113 - 120 (1980).
- 7) Koide, Y., Kwok, R., & Takasugi, M. : Studies of effector cell, antibody, and target cell interactions in natural cell - mediated cytotoxicity. *Int. J. Cancer*, **22**, 546 - 551 (1978).
- 8) Helms, R. A., & Bull, D. M. : Natural killer activity of human lymphocytes against colon cancer cells. *Gastroenterol.*, **78**, 738 - 744 (1980).
- 9) Koren, H. S., & Williams, M. S. : Natural killing and antibody - dependent cellular cytotoxicity are mediated by different mechanisms and by different cells. *J. Immunol.*, **121**, 1956 - 1960 (1978).
- 10) 谷山忠義: Natural killer 細胞と腫瘍抵抗性. 代謝 17 臨時増刊号 *癌 '80*, 1439 - 1447 (1980).
- 11) Kasai, M., Leclercq, J. C., McVay - Boudreau, L. Shen, F. W., & Cantor, H. : Direct evidence that natural killer cells in nonimmune spleen cell populations prevent tumor growth in vivo. *J. Exp. Med.*, **149**, 1260 - 1264 (1979).
- 12) Welsh, R. M. Jr., & Hallenbeck, L. A., : Effect of virus infections on target cell susceptibility to natural killer cell - mediated lysis. *J. Immunol.*, **124**, 2491 - 2497 (1980).
- 13) Sissons, J. G. P., & Oldstone, M. B. A. : Antibody - mediated destruction of virus infected cells. *Advances in immunology*, **29**, 209 - 260 (1980).
- 14) Santoli, D., Trinchieri, G., & Lief, F. S. : Cell - mediated cytotoxicity against virus - infected target cells in humans. I. Characterization of the effector lymphocyte. *J. Immunol.*, **121**, 526 - 531 (1978).
- 15) Weston, P. A., Levy, N. L., & Koren, H. S. : Spontaneous cytotoxicity against virus - infected cells : Cellular immunoadsorption on infected cell monolayers. *J. Immunol.*, **125**, 1387 - 1394 (1980).
- 16) Santoli, D., Trinchieri, G., & Koprowski, H. : Cell-mediated cytotoxicity against virus - infected target cells in humans. II. Interferon induction and activation of natural killer cells. *J. Immunol.*, **121**, 532 - 538 (1978).
- 17) Anderson, M. J. : Innate cytotoxicity of CBA mouse spleen cells to Sendai virus - infected L

- cells. *Infect. Immun.*, **20**, 608-612 (1978).
- 18) **Welsh R. M. Jr.** : Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. I. Characterization of natural killing cell induction. *J. Exp. Med.*, **148**, 163-181 (1978).
- 19) **Ault, K. A., & Weiner, H. L.** : Natural killing of measles - infected cells by human lymphocyte. *J. Immunol.*, **122**, 2611-2616 (1979).
- 20) **Coon, H. G.** : Clonal culture of differentiated rat liver cells. *J. Cell. Biol.*, **39**, 29a (1968).
- 21) **Cikes, M., Friberg, S. Jr., & Klein, G.** : Progressive loss of H-2 antigens with concomitant increase of cell-surface antigen(s) determined by Moloney leukemia virus in cultured murine lymphomas. *J. Nat. Cancer Inst.*, **50**, 347-362 (1973).
- 22) **Böyum, A.** : Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, suppl., **97**, 31-50 (1968).
- (23) 小宮正文: 図説血球の見方, 第7版, 26-28. 東京, 南山堂. 1972.
- 24) **Hallberg, T.** : Inhibition of cytotoxicity of nonimmune human lymphocyte for sensitized chicken erythrocytes by aggregated human IgG. *Scand. J. Immunol.*, **3**, 117-125 (1974).
- 25) **Parish, C. R., Hayward, J. A.** : The lymphocyte surface. I. Relation between Fc receptors, C3 receptors and surface immunoglobulin. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **187**, 46-63 (1974).
- 26) **Takasugi, M., & Klein, E.** : A microassay for cell-mediated immunity. *Transplantation*, **9**, 219-227 (1970).
- 27) **Bean, M. A., Kodera, Y., & Shiku, H.** : Tritiated Proline micro-cytotoxicity assay for the study of cellular and humoral immune reactions directed against target cells grown in monolayer culture. p471-480. In B. R. Bloom & J. R. David(ed), *In Vitro methods in cell-mediated and tumor immunity*, 1st ed. Academic Press, New York, 1976.
- 28) 北川正保, 松岡雄治, 尾上薫: 免疫学・アレルギー学実験法 (進藤由二監修), 第一版, 143-209頁, 東京, 文光堂. 1971.
- 29) **Imir, T., Saksela, E., & Makela, O.** : Two type of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, arming and sensitization. *J. Immunol.*, **117**, 1938-1942 (1976).
- 30) **Ozer, H., Strelkauskas, A. J., Callery, R. T., & Schlossman, S. F.** : The functional dissection of human peripheral null cells with respect to antibody-dependent cellular cytotoxicity and natural killing. *Eur. J. Immunol.*, **9**, 112-118 (1979).
- 31) **Eremin, O., Kraft, D., Coombs, R. R. A., Franks, D., Ashby, J., & Plumb, D.** : Surface characteristics of the human K(killer) lymphocyte. *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **55**, 112-125 (1977).
- 32) **Santoli, D., & Koprowski, H.** : Mechanisms of activation of human natural killer cells against tumor and virus-infected cells. *Immunological Rev.*, **44**, 125-163 (1979).
- 33) **Djeu, J., Heinbaugh, J. A., Holden, H. T., & Herberman, R. B.** : Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol.*, **122**, 175-181 (1979).
- 34) **Oheler J. R., Lindsay, L. R., Nunn, M. E., Holden, H. T., & Herberman, R. B.** : Natural cell-mediated cytotoxicity in rats. II. In vivo augmentation of NK-cell activity. *Int. J. Cancer*, **21**, 210-220 (1978).
- 35) **Djeu J. Y., Heinbaugh, J. A., Holden, H. T., & Herberman, R. B.** : Role of macrophages in the augmentation of mouse natural killer cell activity by poly I:C. *J. Immunol.*, **122**, 182-188 (1979).
- 36) 佐藤武幸, 布施晃, 桑田次男: Natural killer細胞とインターフェロン. *日臨免誌*, **3**, 243-249 (1980).
- 37) 佐藤康彦, 下方董, 西山幸廣, 永田育也: インターフェロンインデューサー, *代謝*, **14**, 1445-1453 (1977).

**A Study of the Augmentation Mechanism of Natural Killing (NK) Activity against HVJ-infected Rat Liver Cell** Joji Haratake, Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **90**, 269–281 (1981)

**Key words:** Natural Killing, HVJ-infected liver cell, NK-augmenting factor

#### Abstract

Direct cytotoxicity of non-immune rat spleen lymphocytes against rat liver cells (Coon cells) and HVJ-infected Coon cells (Coon-HVJ cells) was examined, using 4 hr assay and 24 hr assay.

1. Significantly higher cytotoxicity was demonstrated against Coon-HVJ than Coon cells both in 4 hr assay and 24hr assay.
2. There was some evidence that cytotoxicity might represent NK but not ADCC.
3. In competitive inhibition assay using Coon-HVJ cells as competitor cell, NK activity against target YAC 1 in 4 hr assay was inhibited, whereas that in 24 hr assay was augmented considerably. On the other hand, using Coon cells as competitor, NK activity against YAC 1 was unchanged in 4 hr assay and inhibited in 24 hr assay.
4. The supernate of the coculture for 24 hrs of Coon-HVJ cells and lymphocytes enhanced the NK activity against YAC 1 by fresh lymphocytes, but that of 4 hr coculture did not.
5. The NK activity against Coon-HVJ cells in 24 hr assay was decreased by the addition of IgG-Fab' of rabbit anti-HVJ in dose-dependent manner, but not in 4 hr assay.

It seems, therefor, that the mechanism of augmentation of NK activity against Coon-HVJ cells in 4 hr assay differs from that in 24 hr assay, in which a interferon-like factor, released into the culture medium, may act to produce augmentation of the NK activity. In 4 hr assay, however, such a factor was not demonstrated in the supernates. Other mechanisms e.g. that of a cellular factor may operate.