

氏 名 (本籍)	菅 原 弘 光
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1 1 7 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科 (博 士 課 程) 病 態 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Characterization of Stress Lymphocytes Emerg ed by Stress Stimuli. (ス ト レ ス リ ン バ 球 の 生 成 と そ の 性 状 の 解 析)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 渡 辺 民 朗 教 授 名 倉 宏

教 授 伊 藤 恒 敏

# 論文内容要旨

## 【目 的】

1953年, Dougherty & Frank らによってアドレナリン刺激を受けた際, 人やマウスの末梢血中に出現する“ストレスリンパ球”と命名された「細胞質が極めて塩基性に乏しく, 細胞質・核比が非常に大きい異型リンパ球」は, ストレスの免疫系に及ぼす効果を考える上で非常に興味深い細胞であると思われる。しかしながら, その形態的特徴以外, この細胞に関する報告は殆どない。本研究では, マウスを用いて, この細胞の生成とその性状について検討を行なった。

## 【材料と方法】

マウス及び腫瘍: 6~8週齢 C3H/He マウスを使用した。腫瘍は C3H 由来腹水型乳癌細胞 FM3A/R を  $2 \times 10^6$  個腹腔内投与を行なった。

試薬:  $\ell$ -アドレナリン  $0.4 \mu\text{g}/\text{mouse}$  腹腔内投与, OK-432, poly I:C をそれぞれ  $5 \text{ mg}/\text{kg}$  静脈内投与を行なった。

拘束ストレス: 1ケージ1匹の状態で7日間飼育した後, 金属メッシュによる17時間拘束ストレス (17:00pm~10:00am) を与えた。

脾及び末梢血単核球の分離: マウスから Ficoll-Hypaque 液を用い, 比重遠心法にて単核球を採取した。

肝非実質細胞の分離: 灌流を行なった肝臓を摘出して金属メッシュを通し, コラゲナーゼ処理後, 同様に比重遠心法にて分離。

抗リンパ球抗体投与による細胞除去 (In vivo depletion) 抗 Thy-1.2, 抗 L3T4, 抗 Lyt-2 腹水型抗体を作製し, 胸腺摘出後にそれぞれ,  $0.2 \text{ ml}$  を2回静脈内投与したマウス, 又抗アシアロ GM1 (aGM1) 抗体 ( $20 \mu\text{l}/\text{mouse}$ ) を静脈内投与したマウスに, それぞれ, FM3A/R とアドレナリンを投与してストレスリンパ球の生成を見た。

免疫組織染色: 末梢血塗沫標本を BAF 固定後, ABC 法を用いて行なった。

フローサイトメトリーによる解析: 単核球を抗 Thy-1 抗体と抗 aGM1 抗体にて PE と FITC の二重染色を行ない, Epics V にて解析した。

化学的末梢交感神経切除: Newborn マウスに6-ヒドロキシドーパミン  $75 \text{ mg}/\text{kg}$  を10日間連続腹腔内投与を行なった。

## 【結果及び考察】

I) Dougherty らの報告以来、ストレスリンパ球の生成は、アドレナリン投与による報告以外殆どなかったが、本研究において、ストレスリンパ球は、アドレナリン投与と同様に、担がん状態 (FM3A/R)、及び細菌製剤 (OK-432)、インターフェロン誘導剤 (poly I : C) などの薬剤投与によっても生成されることが判った。また、アドレナリンをこれら宿主に与えるとさらに増加することから、恐らく、それ自身生体にとってストレスであると同時に、ストレスリンパ球の前駆細胞の生成に寄与していると考えられた。なお、ハイドロコルチゾンでは誘導されなかった。また、実際の生理的ストレス (拘束ストレス) によってもストレスリンパ球の生成が確認できた。したがって、ストレスリンパ球は、ストレス反応に早期から普遍的に現われる異型リンパ球であると思われた。

末梢交感神経切除マウスに FM3A/R とアドレナリン投与を行なったところ、非切除群に比べ、ストレスリンパ球出現の有意な増加が認められた。交感神経切除を行なっても副腎髄質からのアドレナリンは依然として分泌され、生体のホメオスタシスに重要な役割を演じており、また、交感神経切除によって、リンパ球上の  $\beta$  レセプターの density が増加するとされていることから、ストレスリンパ球生成とリンパ球上の  $\beta$  レセプターとの関連性が想定された。

II) 免染組織染色の結果、27例中26例とほぼ全例 aGM1 陽性で、一方、12例中6例と約半数が Thy-1 陽性であることから、ストレスリンパ球は aGM1<sup>+</sup>/Thy-1<sup>+</sup> と aGM1<sup>+</sup>/Thy-1<sup>-</sup> の2つのサブセットから成ることが判った。また in vivo depletion 実験の結果から、前駆細胞も同様に、Thy-1<sup>-</sup>/L3T4<sup>-</sup>/Lyt-2<sup>-</sup>/aGM1<sup>+</sup> の表現型を示すが、一部 Thy-1<sup>-</sup>/L3T4<sup>-</sup>/Lyt-2<sup>-</sup>/aGM1<sup>+</sup> 細胞が含まれることが示唆された。フローサイトメトリーによる末梢血単核球の2カラー分析の結果、Thy-1<sup>+</sup>/aGM1<sup>+</sup> 細胞は、ストレスリンパ球がスメアで見られた場合と同様の増加を示し、Thy-1 の抗原性は dull で、CD4 CD8 共に陰性であることが判った。また、FM3A/R 投与マウスにおいて、肝、脾、骨髓由来の単核球を調べた結果、Thy-1<sup>+</sup>/aGM1<sup>+</sup> 細胞は肝において約10倍の増加を認めたが、脾・骨髓において増加は認められず、免疫染色の結果と同様に、肝において aGM1 陽性細胞の約半数が Thy-1 陽性であったことから、ストレスリンパ球生成と肝非実質細胞との関連性が示唆された。

## 【結 論】

以上の実験結果から、ストレスリンパ球はストレスによって副腎髄質から分泌されるアドレナリンによってストレスの初期から末梢血に出現する異型リンパ球で、肝由来のリンパ球であると結論される。

## 審査結果の要旨

1953年, Frank, Dougherty らによってアドレナリン刺激を受けた際, ヒトやマウスの末梢血中へ比較的早期に異型リンパ球が出現することが明らかにされた。ストレスリンパ球と命名されたこの異型リンパ球は, ストレスの免疫系に及ぼす効果を考える上で非常に興味深い細胞である。本研究は, 形態的特徴以外殆んど報告のないこの異型リンパ球の生成と細胞生物学的性状を明らかにしようと試みたものである。

著者はまず, 過去に Frank らが記載している形態的特徴とアドレナリン刺激後に末梢血中に出現するストレスリンパ球の増加をマウスを用いて追試を行なった。特に, 細胞をモルホメトリックに測定した結果, ストレスリンパ球の細胞質・核比は形態的によく似た正常な LGL に比較しても有意な増大を認め, 明らかに通常見られるリンパ球とは形態的に異なる異型リンパ球であることを確認した。また著者は, マウスにおける拘束ストレス, 担がん状態, 細菌感染及びインターフェロン誘導によって, Frank らが行なったアドレナリン投与と同様, リンパ球の減少にもかかわらずストレスリンパ球の増加が認められることを明らかにした。なお, ハイドロコルチゾンでは誘導されなかった。したがってストレスリンパ球は副腎髄質系の働きによってストレス反応に普遍的に現われる異型リンパ球である可能性を示唆した。また末梢交感神経切除実験によってストレスリンパ球生成と細胞膜上の  $\beta$  レセプターとの関連性を想定した。

さらに著者は, ストレスリンパ球の細胞生物学的性状について詳細な検討を行なった。すなわち, ストレスリンパ球の前駆細胞は抗リンパ球抗体を用いた *in vivo* depletion 実験から Thy-1, aGM<sub>1</sub> 両抗体に陽性 (一部 Thy-1 抗体に陰性) で L3T4, Lyt-2 両抗体には陰性の細胞であることが示唆された。またフローサイトメトリーによる分析及び免疫組織染色によってストレスリンパ球は Thy-1<sup>+</sup>/L3T4<sup>-</sup>/Lyt-2<sup>-</sup>/aGM<sub>1</sub><sup>+</sup> と Thy-1<sup>-</sup>/L3T4<sup>-</sup>/Lyt-2<sup>-</sup>/aGM<sub>1</sub><sup>+</sup> の表現型を示し, Thy-1 の抗原性は dull であることを明らかにした。各ストレス負荷時におけるストレスリンパ球の増加はマウスにアドレナリンを与えることによってさらに亢進した。この成績からストレスリンパ球自体または前駆細胞が生体内にプールされていてストレスを負荷することによって末梢血中に移動してくる可能性を指摘しており, 担がんマウスの脾臓, 肝臓, 骨髄から単離した単核球を調べた結果, ストレスリンパ球と肝臓由来のリンパ球との関連性を示唆した。

以上, 本研究はストレスリンパ球の誘導法ならびに細胞生物学的性状について詳細に解析された初めての実験であり, ストレスによる免疫系の調節機構の研究に新しい知見を加えたものである。したがって, 学位授与に値するものとする。