

## ラット単離小腸上皮細胞に対する Natural cytotoxicity の検討

岡山大学医学部第一外科学教室 (指導: 折田薰三教授)

富 岡 憲 明

(平成 6 年 3 月 9 日受稿)

**Key words:** isolated epithelial cells, rat small intestine, natural cytotoxicity, NK susceptibility

### 緒 言

Natural Killer (NK) 細胞は免疫学的記憶と組織適合性抗原 (MHC) の拘束を欠き、各種の標的細胞を障害するという特徴を持っている。NK 細胞の分化、形態、表面マーカー、機能、そして感受性細胞について多くの報告があるが NK 細胞が本来持っている役割については不明のことが多い。

感受性細胞については腫瘍細胞、ウイルス感染細胞のほかある種の正常細胞にも NK 細胞が細胞障害活性を有していることが知られている。皮膚上皮細胞、胎児胸腺細胞、再生肝細胞、骨髄細胞などの正常細胞が感受性を持っていることが報告されており<sup>1~3)</sup>、これらはすべて分化増殖能の高い細胞である。このことは NK 細胞が生体内でそれぞれの器官の免疫学的調節系として重要な役割を果たしている可能性を示唆している<sup>4)</sup>。

小腸上皮細胞も生体内で絶えず分化増殖を繰り返している。そこで今回、ラット単離小腸上皮細胞が NK 感受性を持っているか否かについて、我々の研究室より報告したラット皮膚上皮細胞に対する spontaneous cell-mediated cytotoxicity<sup>1)</sup> と比較検討したので報告する。

### 材 料 と 方 法

#### 1. 実験動物

8~16週齢の近交系雌性 WKA (RT1<sup>K</sup>) および Lewis (LEW, RT1<sup>L</sup>) ラットを静岡県実験

動物農業協同組合より購入し使用した。

#### 2. 培養液

RPMI1640培養液に25mM HEPES 緩衝液を添加したものを使用した。

#### 3. 脾細胞の調整

ラットより採取した脾臓を、リン酸緩衝液 (PBS) の中で粉碎し、150μメッシュフィルターにて濾過し夾雜物を除去した後、0.75% NH<sub>4</sub>Cl トリス緩衝液にて処理し赤血球を除去した。PBS にて 3 回洗浄後、培養液に浮遊し試験管内殺細胞試験の攻撃細胞として以下の実験に使用した。

#### 4. 単離小腸上皮細胞の作成 (図 1)

ラットを12時間絶食にした後、ジエチルエーテル麻酔下に開腹し小腸口側約20cmを切離した。切離された小腸内腔を生理食塩水50mlにて洗浄後、縦切開を加えて粘膜を露出し約 5 cm の細片とした。つづいて 2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 半井化学薬品 K.K.) と 0.5mM Dithiothreitol (DTT, SIGMA CHEMICAL COMPANY) を含む PBS の中で、37°C・20分処理した。そして細片を軽く震盪することによって細胞を遊出し、その上清を 150μメッシュフィルターを通過させ単離小腸上皮細胞を得た。細胞は PBS で 3 回洗浄後、トリパンブルー染色で viability を判定し、最終的に培養液に浮遊し以下の実験に使用した。

#### 5. 単離小腸上皮細胞の <sup>51</sup>Cr 標識

単離した小腸上皮細胞浮遊液 (2~3 × 10<sup>6</sup> 個/0.5ml) を200μ Ci の Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (科研科学)

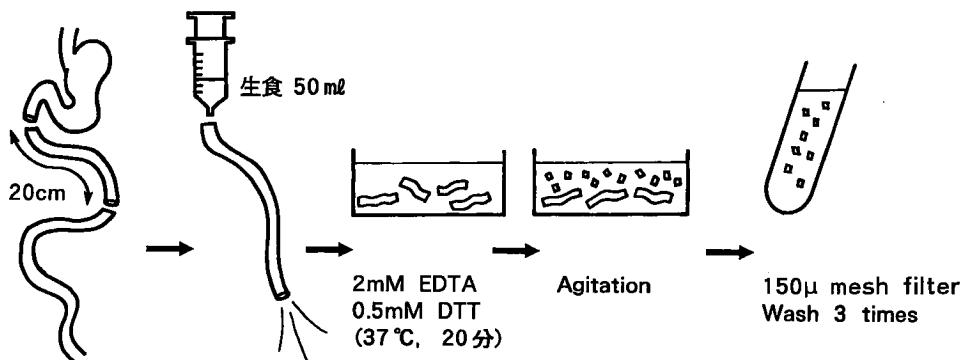


図1 単離小腸上皮細胞の作製

細片した小腸を 2mM EDTA と 0.5mM DTT により 37°C にて 20 分消化して、粘膜より上皮細胞を遊出させて単離浮遊液を作製した。

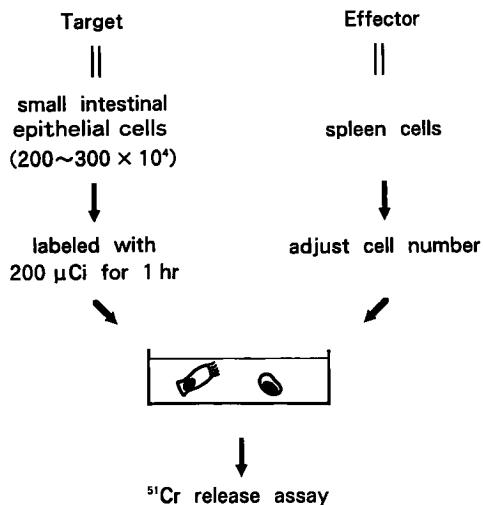


図2 Method of In Vitro Cytotoxicity Assay  
単離小腸上皮細胞 ( $2 \sim 3 \times 10^6$  個) を  $200 \mu\text{Ci}$  の <sup>51</sup>Cr で 1 時間標識して、上皮細胞 ( $1 \times 10^4$  個/well) と脾細胞を種々の Effector : Target cell 比で試験管内で 4 ~ 12 時間培養して、小腸上皮よりの <sup>51</sup>Cr の遊出量を測定した。

と plastic tube 中で混合し、37°C・5% CO<sub>2</sub> の条件にて 1 時間標識した。標識後、培養液にて 3 回洗浄し残存 <sup>51</sup>Cr を除去した。

#### 6. In vitro cytotoxicity assay (図2)

小腸上皮細胞に対する cytotoxicity の測定には <sup>51</sup>Cr 放出試験を用いた。<sup>51</sup>Cr 標識小腸上皮細胞浮遊液 ( $10^6$  個/ml) 0.1ml と正常脾細胞浮遊液 ( $5 \sim 100 \times 10^6$  個/ml) 0.1ml を U-bottomed micro-

plate (Nunclon, A/S Nune, Denmark) に種々の E/T 比になるよう分注した。そして 37°C・5% CO<sub>2</sub> の条件で 4 ~ 12 時間培養し、上清を 0.1 ml 採取し遊出した <sup>51</sup>Cr 量をガムマウェルカウンターにて測定した。% cytotoxicity は以下の式を使用した。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{test release} - \text{spontaneous release}}{\text{total release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

#### 7. Cold target inhibition test

<sup>51</sup>Cr で標識した小腸上皮細胞に、同種および同系の非標識小腸上皮細胞を 1 : 40 の割合で混合し標的細胞とした。攻撃細胞は正常脾細胞を用いて殺細胞能を測定した。

## 結 果

### 1. 単離小腸上皮細胞の性質

我々の用いた EDTA-DTT 処理による小腸上皮細胞の単離方法によると、単離小腸上皮細胞の収穫は小腸 20cmあたり 1000 ~ 2000 万個の細胞が得られ、その浮遊液は図 3 のごとく比較的純粋な上皮細胞が単離されている。リンパ球の混入率は 1 % 以下であり、viability はトリバシブルー染色で判定すると 70 ~ 90 % であった。次に cytotoxicity assay に上皮細胞を用いる場合、標的細胞としての有用性が問題になるが、<sup>51</sup>Cr の総標識量は単離小腸上皮細胞  $10^4$  個あたり 1 ~ 3 万 cpm であった。また spontaneous release は 4 時間で 35.1%，8 時間で 43.8%，12 時間で 48.2

表1 単離小腸上皮細胞の性質

<sup>51</sup> Cr 総標識量 <sup>a</sup> (cpm)	Spontaneous release (%) <sup>b</sup>			
	4 hr	8 hr	12 hr	
Exp. 1	13237	32.4	43.8	46.9
Exp. 2	10878	37.2	43.2	49.4
Exp. 3	23745	32.4	40.8	42.6
Exp. 4	27184	38.4	47.0	50.4
Exp. 5	21775	35.0	44.2	51.8
Mean ± SD <sup>c</sup>	19363.8 ± 6256.4	35.1 ± 2.4	43.8 ± 2.0	48.2 ± 3.2

a; 小腸上皮細胞 (2~3×10<sup>6</sup>個) を 200 μCi の <sup>51</sup>Cr で 37°C, 1 時間標識した時に 1×10<sup>4</sup>個の小腸上皮細胞に取り込まれた <sup>51</sup>Cr の量

b; <sup>51</sup>Cr により標識された小腸上皮細胞 (1×10<sup>4</sup>個/well) を単独で培養したときに自然遊出した <sup>51</sup>Cr の量

c; 平均値および標準偏差を示す

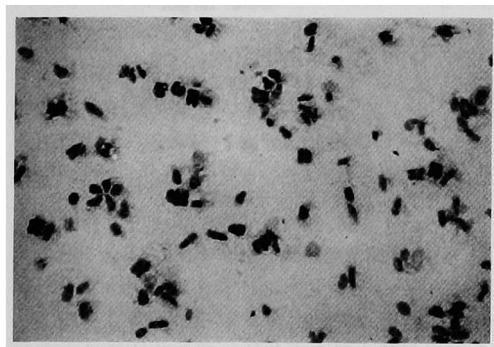


図3 単離小腸上皮細胞の顕微鏡像  
(H-E 染色, 400倍)

%であった(表1)。

### 2. 種々の培養時間による細胞障害活性

小腸上皮細胞を標的とする cytotoxicity assay の至適条件を決定するため、まず培養時間を検討した。図4はE/T比を100:1とした時のSyngenicまたはAllogenic target cellに対するWKA脾細胞の細胞障害活性である。4時間培養にてSyngenic target cellに対して13.5%, Allogenic target cellに対して13.7%の細胞障害活性を示し、8時間、12時間と培養時間に比例して上昇した。またSyngenicとAllogenicの間で差を認めなかった。細胞障害能の評価はSpontaneous release のより少ない4時間培養が適当であると考えられた。

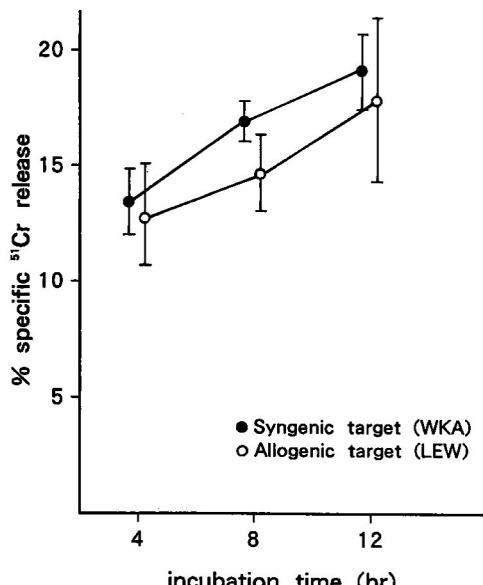


図4 小腸上皮細胞に対する細胞障害活性 I

時間的変化 (E:T 比 100:1)

WKA ラット脾細胞 (1×10<sup>6</sup>個/well) を WKA または LEW ラットの 小腸上皮細胞 (1×10<sup>4</sup>個/well) と混合培養して、培養後 4, 8, 12 時間の遊出された <sup>51</sup>Cr の量を測定した。

### 3. 種々の E/T 比による細胞障害活性

次に至適 E/T 比を検討するために、4時間培養にて E/T 比を変え Syngenic または Allogenic target cell に対する WKA 脾細胞の細

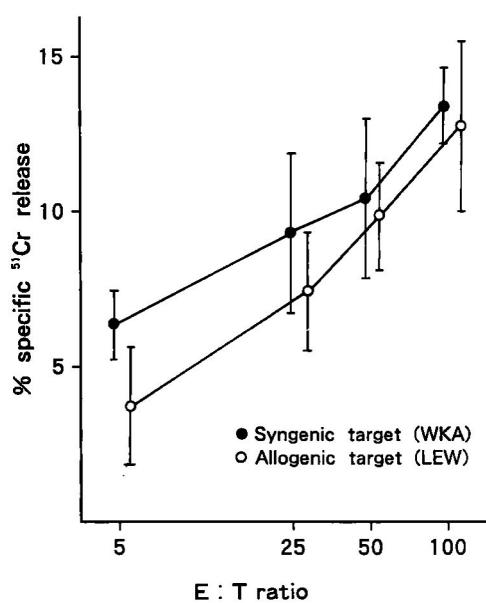


図 5 小腸上皮細胞に対する細胞障害活性 II  
E:T 比による変化 (4 hr assay)  
 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  個/well の WKA ラット脾細胞を WKA または LEW ラットの小腸上皮細胞 ( $1 \times 10^4$  個/well) と混合培養して、培養後 4 時間の遊出された  $^{51}\text{Cr}$  の量を測定した。

胞障害活性を示した (図 5)。E/T 比に比例して細胞障害活性が上昇した。また Syngenic と Allogenic の間に差を認めなかった。

#### 4. Cold target inhibition test

Syngenic target cell と Allogenic target cell に対する脾細胞の細胞障害活性に差がないことより、その系特異性を調べるために E/T 比 100:1, 4 時間培養にて Cold target inhibition test を行った。図 6 左は攻撃細胞に WKA 脾細胞を、 $^{51}\text{Cr}$  標識的細胞に WKA 単離小腸上皮細胞を用いた Syngenic な組み合わせとしたものである。 $^{51}\text{Cr}$  非標識的細胞を加えない時の細胞障害活性は 13.7% であり、 $^{51}\text{Cr}$  非標識的細胞として WKA または LEW の小腸上皮細胞を 100:1:40 で加えた時の活性はそれぞれ 4.3% (抑制率 68.6%), 3.4% (同 75.2%) と著明に抑制された。また図 6 右は  $^{51}\text{Cr}$  標識的細胞に LEW 単離小腸上皮細胞を用いた Allogenic な組み合わせである。同様な傾向の抑制が示さ

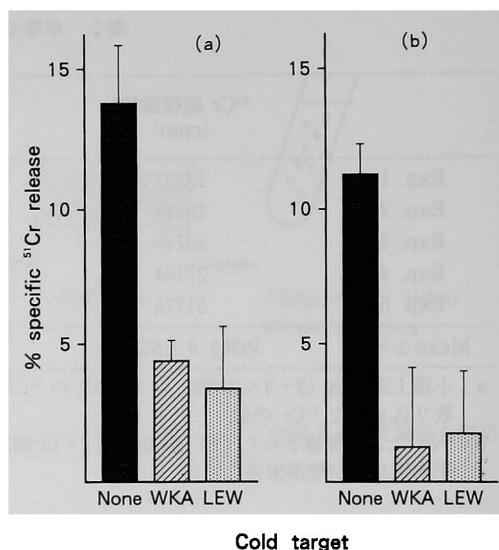


図 6 Cold Target Inhibition Test

左図 (a) は  $^{51}\text{Cr}$  標識的細胞に WKA ラット小腸上皮細胞を用いて、WKA または LEW ラットの非標識細胞を Hot:Cold 比が 1:40 の割合で加えて E:Hot T:Cold T が 100:1:40 にて 4 時間培養した。  
右図 (b) は  $^{51}\text{Cr}$  標識的細胞に LEW ラット小腸上皮細胞を用いて図 (a) と同様の実験をおこなった。

れた。単離小腸上皮細胞の殺細胞感受性はラット系に非特異的であり MHC 非拘束性であることが示唆された。

#### 考 察

NK 細胞は細胞障害性 T 細胞とは異なり、免疫学的記憶と MHC 拘束を欠き、同種、同系の様々な標的細胞を破壊できるのが特徴とされている。また NK 細胞活性は「非特異的」と称されるが厳密には必ずしもそうではない。腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、正常細胞のうち多種のものが NK 細胞の標的になり得るか否か検討されている<sup>1-4)</sup>。NK 感受性細胞はまだ充分な定義付けはなされていないが、ある特定の種類の細胞に限られているようである。Pointek<sup>5)</sup> や Carlow<sup>6)</sup> 等は NK 細胞と組織適合性抗原の関係について検討し、classIMHC 抗原と NK 細胞感受性の逆相関を示唆している。つまり生体内で classIMHC 抗原を失った有害な細胞を攻

表2 皮膚細胞に対する cytotoxicity assay との比較

	<sup>51</sup> Cr Labeling	Spontaneous release	Cytotoxicity	Cold target inhibition
Skin	1 ~ 2 × 10 <sup>4</sup> cpm /300 μCi (2 hr)	30% (12 hr)	20~30% (12 hr)	strain non-specific
Small intestine	2 × 10 <sup>4</sup> cpm /200 μCi (1 hr)	35.1% (4 hr) 43.8% (8 hr) 48.2% (12 hr)	13.0% (4 hr) 14.9% (8 hr) 17.9% (12 hr)	strain non-specific

撃破壊する性質を NK 細胞が持っているとしており、細胞障害性 T 細胞との相補的な役割が想定されている。また一方では再生途上にある肝内には NK 細胞が存在し、その細胞が再生肝細胞に対して NK 活性を示す報告がある<sup>3)</sup>。更に田中等<sup>1)</sup>は単離された皮膚上皮細胞に対しても NK 活性が存在すると報告し、皮膚上皮の恒常性を保つ一役を担っていると推測している。これらの報告を含めて NK 細胞の役割のひとつに、生理的に増殖を絶えず行っている細胞が恒常性を維持するための調節機能として NK 細胞が存在するとの推測がなされている。

小腸上皮細胞は、正常細胞のうち感受性を有するとされている皮膚上皮細胞、再生肝細胞と同様分化増殖能の高い性質を持った細胞である。さらに、NK 活性を有する小腸上皮内リンパ球の存在<sup>7~9)</sup>は、このような組織において NK 細胞による免疫反応がなんらかの調節機構として働いていると充分に考えられることである。

そこで、今回の実験における単離小腸上皮細胞の性質を、田中等<sup>1)</sup>が報告した皮膚上皮細胞に対する cytotoxicity と比較してみると(表2)，<sup>51</sup>Cr の総標識量については両者とも充分な<sup>51</sup>Cr の取り込みが得られたが、小腸においてより少ない<sup>51</sup>Cr 量、より少ない培養時間で標識が可能であった。spontaneous release については、皮膚と比較してやや高い傾向が認められた。培養液中で小腸上皮細胞は皮膚上皮細胞と比べその取り扱いに注意が必要であると考えられた。cytotoxicity については逆に、皮膚と比較して低い測定値が得られた。小腸上皮細胞は cytotoxicity の感受性を持っているものの皮膚上皮細胞

と比べるとその感受性は低いと考えられた。cold target inhibition test では両者ともラット系に非特異的であり MHC の拘束は受けていないものと考えられた。これらのことより小腸上皮細胞は皮膚上皮細胞と類似した性質の殺細胞感受性を持っており、以上の免疫反応は NK system に属すると考えられた。

小腸上皮細胞の免疫反応についての報告は少なく、Bland 等<sup>10)</sup>はマウスにおいて Ia 陽性の小腸上皮細胞が抗原提示細胞としての役割を持ち得ることを報告している。皮膚上皮細胞にも抗原提示細胞としての役割を持つ細胞が含まれていることが報告されている<sup>11)</sup>。小腸上皮細胞も皮膚上皮細胞と同様に外来抗原にさらされる環境にあり、生理学的にも絶えず分化増殖を繰り返しており、この両者が免疫学的にも類似した性質を持っていることが推測できる。

今回、ラット小腸上皮細胞が試験管内殺細胞試験の標的細胞として使用可能であり、ラット正常脾細胞が同種、同系小腸上皮細胞に対して殺細胞活性を有することを報告した。

稿を終えるに臨み、御指導御校閲を賜りました恩師折田薰三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、直接御指導頂きました国立岡山病院田中信一郎博士に厚く感謝いたします。

なお、本論の要旨は第26回日本移植学会総会(岡山)において報告した。

## 文 献

- 1) Tanaka S, Ota T, Amamiya S, Kobatake T and Orita K : Spontaneous cell-mediated cytotoxicity (SCMC) against rat skin epidermal cells. *Transplant Proc* (1983) **15**, 1662—1663.
- 2) Nunn ME, Herberman RB and Holden HT : Natural cell-mediated cytotoxicity in mice against non-lymphoid tumor cells and some normal cells. *Int J Cancer* (1977) **20**, 381—387.
- 3) 安保 徹, 伊藤公志, 沢田秀明 : NK 細胞をめぐって—最近の知見から. *臨床免疫* (1987) **19**, 361—376.
- 4) Kiessling R and Haller O : Natural killer cells in the mouse ; an alternative immune surveillance mechanism? *Contemp Top Immunobiol* (1978) **8**, 171—201.
- 5) Piontek GE, Taniguchi K, Junggreen HGL, Gronberg A, Kiessling R, Klein G and Karre K : YAC-1 MHC class I variants reveal an association between NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or in vivo passage. *J Immunol* (1985) **135**, 4281—4288.
- 6) Carlow DA, Payne U, Hozumi N, Roder JC and Czitrom AA : Class I(H-2K)gene transfection reduces susceptibility of YAC-1 lymphoma targets to natural killer cells. *Eur J Immunol* (1990) **20**, 841—846.
- 7) Tagliabue A, Befus AD, Clark DA and Bienenstock J : Characteristics of natural killer cells in the murine intestinal epithelium and lamina propria. *J Exp Med* (1982) **155**, 1785—1796.
- 8) Chai JY and Lillehoj HS : Isolation and characterization of chicken intestinal intra-epithelial lymphocytes showing natural killer cell activity against tumor target cells. *Immunology* (1988) **63**, 111—117.
- 9) Rudzic O and Bienenstock J : Isolation and characteristics of gut mucosal lymphocytes. *Lab Invest* (1974) **30**, 260—266.
- 10) Bland PW and Whiting CV : Antigen processing by rat intestinal villus enterocytes. *Immunology* (1989) **68**, 497—502.
- 11) Tanaka S and Sakai A : Stimulation of allogenic lymphocytes by skin epidermal cells in the rat. *Transplantation* (1979) **27**, 194—199.

**Natural cytotoxicity against isolated epithelial cells of  
rat small intestine**

**Noriaki TOMIOKA**

**First Department of Surgery,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. K. Orita)**

The natural cytotoxicity against isolated epithelial cells of rat small intestine was studied. The isolation of intestinal epithelial cells was easily performed using EDTA and DTT digestion with good viability. The cells were labelled by  $^{51}\text{Cr}$  sufficiently to be usable for the *in vitro*  $^{51}\text{Cr}$  release assay. The cytotoxic activity of spleen cells to syngeneic and allogeneic epithelial cells was 13.5% and 13.7%, respectively. Cold inhibition assays revealed that the susceptibility of isolated epithelial cells to killing is non-specific for lineage and no restriction with major histocompatibility complexes was noticed. These findings correspond to the cytotoxicity against skin epidermal cells, in which skin cells are killed by normal spleen cells by natural killer systems. Therefore, the isolated epithelial cells of rat small intestine can become the target of natural killer cells, suggesting that rapidly differentiating cells may be controlled by natural killer systems.