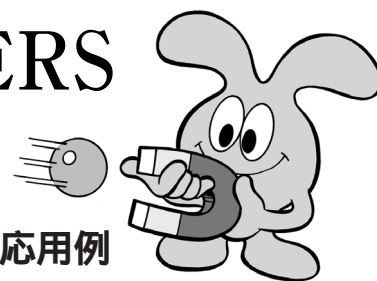


DYNABEADS LETTERS



Dynabeads を用いたポジティブセレクションの応用例 --- ヒトCD 4⁺ helper/killer T 細胞の誘導 ---

東海大学医学部 免疫学教室
西村 孝司

1. 目的

試験管内でヒト末梢血リンパ球を IL - 2 と共に培養した場合、CD 8⁺ T細胞の優先的な増殖のみが認められ、純粋な CD 4⁺ T 細胞を大量に試験管内で増殖させることは難しいとされてきた。しかし、筆者らは最近、FACStarで分離した CD 4⁺ T 細胞を固相化 OKT 3 抗体と IL - 2 で刺激することによって試験管内で長期間純粋な CD 4⁺ T 細胞を培養できることを報告した。ここでは、FACStar を用いず、より簡便、迅速かつ純度よくヒト CD 4⁺ T 細胞を Dynabeads を用いて分離する方法を解説する。この方法は臨床への応用が可能な優れた方法であると考えられる。

2. 原理および利点

ヒト末梢血から分離したリンパ球を OKT 4 MoAb と反応させ、さらに抗マウス抗体が結合した Dynabeads と反応させる。次に、Dynabeads が結合した細胞を磁石を用いてポジティブセレクションを行うことによって簡単に CD 4⁺ T 細胞を純度良く精製できる。また、Dynabeads で分離した CD 4⁺ T 細胞は FACStar を用いて分離した CD 4⁺ T 細胞に比べて、固相化 OKT 3 抗体と IL - 2 に対してより強い反応性を示す利点を有している。

3. 方法

- 1) ヒト血液約 20 ml を採血して、Ficoll - Paque を用いて peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を分離する。
- 2) PBMC (10^7 - 2×10^7) からプラスチックシャーレまたはナイロンウールカラムを用いて M を除去する。
- 3) 15 ml の試験管に M を除去した PBMC を移し、遠心してペレットにした後、OKT 4 MoAb (1 μ g/ml) を加え氷上で15分間インキュベートする。
- 4) Dynabeads M - 450 Sheep anti Mouse IgG 液 (M-450) を必要量 (10 μ l/ 10^6 cells) 取り出し、PBSで2回洗浄後、PBMC に加え室温で 20 分間インキュベートする。この際、PBMC は 0.5 ml の 10 % FCS加RPMI1640 培地に懸濁し、反応中は頻りに攪拌する。ただし、ピペティングしてはいけない。
- 5) 反応終了後、15 ml のチューブに 10 % FCS 加 RPMI 1640 培地 5 ml を壁面から静かに加え、DYNAL MPC (Magnetic Particle Concentrator) - 1 を用いてビーズに結合した CD 4⁺ T 細胞を集める。MPC - 1 に集まらない細胞浮遊液は除去する。(この中には、CD 8⁺ T細胞、CD 4⁺ T 細胞、NK細胞等が含まれる)。この操作を 2 回繰り返す。
- 6) 得られた CD 4⁺ T 細胞の細胞数を Dynabeads が結合したまま計数し、 10^6 /ml の CD 4⁺ T 細胞浮遊液を調整する。

- 7) あらかじめOKT 3 抗体を固相化した 12 well プレートに (6) の CD 4⁺T 細胞浮遊液 2 ml をビーズが結合したまま加える。また、IL - 2 を 500 U/ml になるよう添加する。尚、固相化 OKT 3 はPBSで10 μg/ml に調製したOKT 3抗体を12 well プレートに 0.5 ml/well の割合で加え、37 °C で1時間インキュベートすることによって調製した。(96 well プレートを用いてもよい。)
- 8) 培養 48 時間以後にリンパ球の活発な増殖が認められるので、この段階で1度プレートからリンパ球を回収し、ピペッティングにより細胞をビーズから解離させた後、MPC -1 を用いて、ビーズを除去する。CD 4⁺T 細胞の純度を FACScan で確かめ、CD 8⁺T 細胞や NK 細胞の混在が多い場合には、3) - 5) の操作を繰り返して純度を上げる。
- 9) 増殖させたCD 4⁺T細胞を 10 日以内に 2 - 3 度固相化 OKT 3 抗体と IL - 2 で刺激し、さらに増殖させる。
- 10) CD 4⁺T 細胞の細胞数が 10⁸まで達した段階で、固相化 OKT 3 抗体と IL - 2 の刺激を行い、翌日、大量培養用の培養バッグ(CRTC バッグ; 川澄化学) に移し10⁹レベルまで増殖させる。

4. 応用例

- 2) で OKT 8 MoAB を用いて、同様の操作を行うことによって CD 8⁺T 細胞の大量培養が可能である。
- 5) でビーズに結合しない細胞浮遊液からさらにCD 8⁺Tを除去し、残りの CD 4⁺T 細胞を固相化 OKT 3 抗体と IL - 2 で培養することによって、NK 細胞や T 細胞を簡単に増殖させることができる。

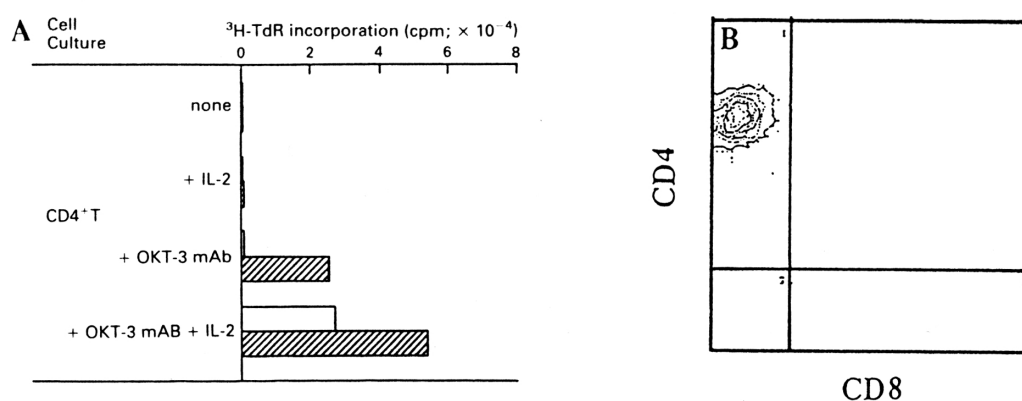


図 1

- (A) ヒト CD 4⁺T細胞をFACStar (□)または Dynabeads (▨)を用いて分離して、各種の刺激に対する増殖活性を検討した。Dynabeads 分離 CD 4⁺T 細胞が固相化 CD 3 抗体あるいは固相化 CD 3 抗体 + IL - 2 に対して強い反応性を示した。これは、CD 4⁺T 細胞が CD 3 と CD 4 を介したシグナルを受けるためと考えられる。
- (B) 試験管内で 14 日間増殖させた T 細胞は殆ど CD 4⁺T 細胞である。

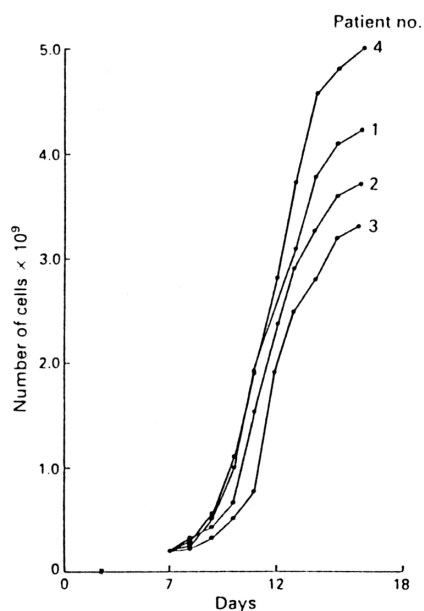


図 2

2 例の大腸癌患者と 2 例の乳癌患者から Dynabeads を用いて CD 4⁺T 細胞を分離し、プレートを用いて 10⁸ まで増殖させ、次に、CRTC 培養バッグを用いて大量培養を行った。全例において著しい CD 4⁺T 細胞の増殖が認められ、リンパ球分離後、15 日以内に 10⁹ レベルの純粋な CD 4⁺T 細胞が得られた。この CD 4⁺T 細胞はキラー活性と IL - 2 産生能を有した CD 4⁺ helper/killer 細胞である。

参考文献

1. Nakamura, Y., Tokuda, Y., Iwasawa, M., Tsukamoto, H., Kidokoro, M., Kobayashi, N., Kato, S., Mitomi, T., Habu, S., and Nishimura, T., Large scale culture system of human CD 4⁺ helper/killer T cells for the application to adoptive tumour immunotherapy. *Br. J. Cancer* **66**, 20, (1992)
2. Nishimura, T., Nakamura, Y., Tsukamoto, H., Takeuchi, Y., Tokuda, Y., Iwasawa, M., Yamamoto, T., Masuko, T., Hashimoto, Y., and Habu, S., Human c - erbB - 2 proto - oncogene product as a target for bispecific antibody - directed adoptive tumor immunotherapy . *Int. J. Cancer*, **51**, 1, (1992)
3. Nishimura, T., Nakamura, Y., Takeuchi, Y., Tokuda, Iwasawa, M., Kawasaki, A., Okumura, K., and Habu, S., Generation, propagation, and targeting of human CD 4⁺ helper/killer T cells induced by anti - CD 3 monoclonal antibody plus recombinant IL - 2. An efficient strategy for adoptive tumor immunotherapy. *J. Immunol.*, **148**, 285,

お問合せは 日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL(03)3593-3211【代】 FAX(03)3593-3216