

①

腎細胞癌腫瘍浸潤リンパ球の性状、およびそれに及ぼす
インターフェロン α , γ 併用投与の影響

柳谷仁志

弘前大学泌尿器科学講座

(指導：鈴木唯司教授)

本文 8 枚

(要旨)

腎細胞癌 24例を術前 IFN α , γ 併用投与群 13 例と非投与群 11 例に分け、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)サブセットの性状を末梢血リンパ球(PBL)サブセットとともに two color flowcytometryを用いて測定し、TIL, PBL に及ぼす IFN の影響を検討した。その結果、CD3陽性細胞が TIL, PBL共に約 70% を占めたが、TIL においては CD3⁺HLA-DR⁺ (活性化 T細胞)が PBL に比し著しく多かった。CD4 陽性細胞は、IFN 投与群・非投与群のいずれでも PBL に比べ TILで少なかったが、CD4⁺Leu8⁻(helper T 細胞)は、むしろTILで多かった。CD8 陽性細胞は、IFN 投与群でのみ TIL で多くみられ、特に CD8⁺CD11b⁻(cytotoxic T 細胞)が多かった。更に CD4⁺, CD8⁺ のいずれでも、HLADR 陽性細胞は、IFN 投与の有無にかかわらず、PBLに比し TILで多かった。IFN α , γ 併用投与のリンパ球サブセットへの影響をみると、PBLでは IFN投与により CD3⁺HLADR⁺、CD8⁺HLADR⁺、CD16⁺、CD57⁺の増加がみられた。TIL では、IFN 投与群で CD16⁺、特に強い NK 活性を持つ CD16⁺CD57⁺が多い傾向がみられ、また IFN 投与群でのみ、PBLより TIL でCD8⁺CD11b⁻が多くみられた。以上より、IFN α , γ 併用投与の効果が、腫瘍局所における NK細胞、cytotoxic T 細胞に関連していることが推測された。

(緒言)

腎細胞癌に対しては、手術療法以外に有効な治療がなく¹⁾、比較的有効とされているインターフェロン(IFN)療法でも単独での奏効率は 20% 前後とされており²⁾、更にその作用機序もなお解明されていない。著者らは、インターフェロン α (IFN α)とインターフェロン γ (IFN γ)が相乗効果を持つとの報告^{3, 4)}に着目し、腎細胞癌患者に対し IFN α 、IFN γ 併用療法をおこなっているが、その腫瘍局所での免疫学的効果を解明する目的で、術前 IFN α 、 γ 併用投与群と非投与群において腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor Infiltrating Lymphocytes:TIL) サブセットの性状を末梢血リンパ球 (Peripheral Blood Lymphocytes:PBL) サブセットとともに two color flowcytometry で測定し、術前 IFN α 、 γ 併用投与が TIL, PBL に及ぼす影響を検討した。

(対象と方法)

1) 症例

症例は、1991年12月から1994年1月までに弘前大学医学部附属病院および関連病院泌尿器科で、根治的腎摘除術を受けた腎細胞癌症例 24 例 (男性 19例、女性 5例) である。Table 1 に示す如く、年齢は、44才から 76才 (平均 62.3 才)、術前に IFN α 、 γ 併用投与をした群は 13例 (IFN 投与群) で、術前 IFN 非投与群は 11例 (非投与群) であった。なお、IFN 投与群で術前に IFN 投与を受けた以外、症例はいずれも術前に腎動脈塞栓術、化学療法、免疫賦活療法などを受けていない。IFN 投与群で性別では女性の割合が、組織学的細胞型ではclear cell subtype が、組織学的異型度では、grade 1 が多いが、統計学的には2群間に症例の偏りは認められなかった (カイ2乗検定および t 検定)。

2) 術前 IFN 投与法

IFN α は、ヒトリンパ芽球インターフェロン (スミフェロン、住友製薬) を用い、IFN γ は、リコンビナントインターフェロン γ (イムノマックス γ 、塩野義製薬) を用いた。患者の承諾を得て、手術の1週間前から手術前日まで隔日投与で計4回、IFN α 3×10^6 I. U. 筋注および IFN γ 1×10^6 JRU. 点滴静注を行なった。

3) 腫瘍浸潤リンパ球の採取 (Table 2. A)

末梢血中のリンパ球の混入を避けるため Hanks' Balanced Salt Solutionで摘出した腎臓を灌流した後、腫瘍組織を摘出し、細切・洗浄した。これに、collagenase (細胞分離用, 和光)、deoxyribonuclease I type II (Sigma, U. S. A)を加えて single cell suspension として、70 μ Nylon mesh で濾過し、Ficoll Paque (Pharmacia, Sweden)を用いた不連続密度勾配遠心法で、濾過液中の細胞集団からリンパ球に富む分画を採取した。

4) 末梢血リンパ球の採取

インターフェロン投与前・早朝および投与の1週間後・早朝に採血した末梢血 4ml にアンモニウム溶血剤 100mlを加えて溶血させ、遠心分離してリンパ球に富む分画を採取した。

5) two color flowcytometry によるリンパ球サブセットの測定 (Table 2. B)

上記で得られた細胞分画を、FITC (Fluorescein isothiocyanate) 標識モノクローナル抗体 CD3 (Leu 4), CD4 (Leu 3a), CD8 (Leu 2a), CD57 (Leu 7), Leu 8, および PE (Phycoerythrin) 標識モノクローナル抗体 CD4 (Leu 3a), CD11b (Leu 15), CD16 (Leu 11c), HLA DR (Becton Dickinson 社製) と反応させ、Becton Dickinson 社製 FACStar でリンパ球分画内に含まれる細胞の各抗原陽性率を two color flowcytometry で測定した。

6) 比較項目および統計処理

IFN 投与群と非投与群で、以下の項目について括弧内の検定法で比較した。

- ① 非投与群 PBL と IFN 投与群・IFN 投与後 PBL (t-test, Welch の方法)
- ② IFN 投与群・IFN 投与前 PBL と IFN 投与群・IFN 投与後 PBL (paired t-test)
- ③ 非投与群 PBL と非投与群 TIL (paired t-test)
- ④ IFN 投与群・IFN 投与前 PBL と IFN 投与群 TIL (paired t-test)
- ⑤ 非投与群 TIL と IFN 投与群 TIL (t-test, Welch の方法)

(結果)

IFN 非投与群 PBL (control PBL)、IFN 投与群・IFN投与前 PBL (pretreatment PBL)、IFN 投与群・IFN 投与後 PBL (IFN treated PBL)、IFN 非投与群 TIL (control TIL)、IFN 投与群 TIL (IFN treated TIL) のリンパ球サブセットを比較し、次のような結果が得られた。

1) CD3, HLADR (Fig. 1)

CD3 陽性細胞 (T 細胞) は、5 種類のリンパ球すべてで約 70% を占め、差はみられなかった。活性化細胞を表すとされている HLADR は、IFN 投与群・非投与群ともに TIL において PBL の約 2 倍多く発現されており、その主体は、 $CD3^+HLADR^+$ の活性化 T 細胞であった。CD3 陰性細胞では、PBL と TIL で HLADR の陽性率に差はみられなかった。IFN 投与の有無で比較すると、IFN 投与により PBL で $CD3^+HLADR^+$ が増加し、 $CD3^+HLADR^-$ が減少していた。しかし TIL では、IFN 投与の影響は、みられなかった。

2) CD4, Leu8 (Fig. 2)

CD4 陽性細胞 (helper/inducer T 細胞) の割合は、IFN 投与群・非投与群のいずれでも PBL に比べ TIL で低かったが、Leu8 との two color で CD4 陽性細胞の内訳をみたところ、 $CD4^+Leu8^-$ (helper T 細胞) は、PBL よりむしろ TIL で多くみら

れた。CD4⁺Leu8⁺(inducer T 細胞)は、PBL に比べ TIL で少なかった。
Leu8 陽性細胞は、両群ともに PBL に比べ TIL で少なかった。IFN 投与の影響は、
PBL・TIL のいずれでもみられなかった。

3) CD8, CD11b (Fig. 3)

CD8 陽性細胞 (cytotoxic/suppressor T 細胞) は、IFN 投与群で IFN 投与前 PBL
に比べ、TIL で多くみられた。CD11b との two color で検討したところ、IFN 投与
群・非投与群のいずれでも PBL に比べ TIL で CD8⁺CD11b⁺(suppressor T 細胞) が
少なかった。CD8⁺CD11b⁻(cytotoxic T 細胞) は、IFN 投与群のみで、PBL に比べ
TIL で多くみられた。CD11b 陽性細胞は、IFN 投与群で投与前 PBL に比べ TIL で少
なかった。また、IFN 投与群 PBL で IFN 投与後に増加した。

4) CD4, CD8, HLADR (Fig. 4)

CD4 および CD8 陽性細胞の HLADR 発現率をみたところ、CD4 陽性細胞では、IFN 投
与群のみで PBL に比べ TIL で HLADR 陽性細胞が多かった。CD8 陽性細胞では、IFN
投与群・非投与群のいずれでも PBL に比べ TIL で HLADR 陽性細胞が多く、PBL では、
IFN 投与前に比べ、IFN 投与後で HLADR 陽性細胞が増加していた。PBL と TIL で
CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞を比べると、PBL では CD4 優位であったが、TIL では
CD8 優位であった。(fig. 2, 3)

5) CD16, CD57 (Fig. 5)

CD16 陽性細胞(NK 細胞)は、非投与群で PBL に比べ TIL で少なかった。TIL では、
非投与群に比べ IFN 投与群で CD16 陽性細胞が、多い傾向がみられた。また IFN 投与
群の PBL で IFN 投与後に増加していた。CD57 との two color で、NK 細胞の NK 活性
を推定したところ、強い NK 活性をもつとされている CD16⁺CD57⁺ は非投与群 TIL
に比べ IFN 投与群 TIL で多い傾向がみられた。また、ほとんど NK 活性をもたない
とされている CD16⁻CD57⁺と、CD16⁺CD57⁺の比率を比べたところ、非投与群 TIL より
IFN 投与群 TIL で CD16⁺CD57⁺の比率が高い傾向がみられた。CD57 陽性細胞は、IFN
投与群 PBL で IFN 投与後に増加していた。

(考察)

近年、免疫抑制剤や骨髄移植、モノクローナル抗体、サイトカイン、活性化リンパ
球が、アレルギー疾患や自己免疫疾患、免疫不全症、悪性新生物の治療として用いら
れ、疾患によっては著しい効果を上げてきた^{5, 6)}。特に、腎細胞癌に関しては有効な
化学療法がないためインターフェロンを中心とした免疫治療が積極的に試みられてい
るが、その奏効率は 20% 前後と充分でなく²⁾、作用機序も明らかでない。

一方 Rosenberg ら⁷⁾が、Interleukin-2 存在下に増殖した腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)

が in vitro でも in vivo でも強い抗腫瘍効果を持つと報告して以来、TIL についての研究が広く行われているが、未だ不明な点が多い。著者は、腎細胞癌腫瘍局所で直接腫瘍免疫に関わっていると思われる TIL の性状及びインターフェロン α 、 γ 併用投与の TIL への影響を two color flowcytometry でリンパ球サブセットを測定することにより検討した。

1) TIL の性状について

ほとんどすべてのヒト固形癌には、有意のリンパ球浸潤が認められる。これら TIL は、その大半が T 細胞によって構成され、その大部分は結合織内やその周囲に存在し、癌細胞間に浸潤している TIL は少数とされている⁸⁾。伊東ら⁹⁾は、前者は、血液循環する T 細胞を主体とし、後者は、癌抗原ペプチドを認識し、癌局所に停留できる可能性が高いとしている。Finke ら¹⁰⁾は、腎細胞癌 TIL の中に自己腫瘍細胞のみに抗腫瘍活性を示す T 細胞が存在することを証明したが、これは後者に属すると考えられる。TIL が、腫瘍を認識して腫瘍局所でクローナルに増殖したものか否かは、未だ議論の分かれるところである^{9, 11)}。著者の結果より、TIL サブセットは PBL と比べ、いくつかの異なった性状を持つことが証明された。PBL に比べ TIL の CD3 陽性細胞でのみ HLADR 陽性細胞が著明に多くみられたことより、TIL 中の T 細胞は、腫瘍局所で腫瘍の抗原性を認識して活性化していることが示唆された。また、T 細胞の活性化とともに発現率が低下するとされている Leu 8 が、TIL で少ないのもこれを裏付ける所見と思われた。また CD4 陽性細胞(helper/inducer T 細胞)、CD8 陽性細胞(cytotoxic /suppressor T 細胞)ともに TIL で HLADR 陽性率が高かったが、helper T, cytotoxic T 細胞などサブセット毎の活性化の度合いは、今回のデータでは、不明であった。少なくとも CD4陽性細胞、CD8陽性細胞 のいずれか一方のみが、腫瘍局所で活性化しているわけではないようである。CD4陽性細胞は、TIL で少なかったが、その内訳をみると helper T 細胞は、逆に TILで多くみられ、inducer T 細胞が、著しく少なかった。長瀬ら¹²⁾は、正常腎組織中でも helper T 細胞が、inducer T 細胞より多くみられると報告しており、これは、TIL の特徴とは言えないようである。CD8 陽性細胞は、TIL と PBL で差を認めなかったが、内訳をみると、TIL で suppressor T 細胞の割合が低かったことより、腫瘍局所での suppressor T 細胞が腫瘍の増殖を促進する主因とは考え難いと思われた。CD16陽性細胞、特に強い活性をもつ CD16⁺CD57⁺ NK 細胞が TIL で少なく、腫瘍が増殖を続ける一因と思われた。

2) IFN α , γ 併用投与の影響

IFNは、もともと抗ウイルス活性を持つサイトカインとして発見され、IFN α 、IFN β 、IFN γ の3種類が発見されている。IFN α は、直接的抗腫瘍活性に加えて、宿主免疫系を介しての作用として、NK 細胞を活性化する作用を持つとされている¹³⁾。さらに、細胞表面の腫瘍特異抗原の発現増強作用¹⁴⁾や、腫瘍細胞上に発現した Major Histocompatibility Complex (MHC) 抗原の発現増強作用¹⁵⁾などが示唆されている。IFN γ は、マクロファージの活性化¹⁶⁾、他の免疫担当細胞の分化・活性化、腫瘍細胞

MHC抗原の発現増強、細胞間接着分子に対する増強作用など多彩な作用をもつとされている。腎細胞癌に対する臨床的奏効率は、IFN α 単独では20%前後とされており²⁾、IFN γ 単独では、これより低いようである¹⁷⁾。この奏効率を改善するためIFN α とIFN γ の併用療法が考えられているが、これは腫瘍細胞に作用する際の両者の受容体が異なり、in vitroでは、相乗効果がみられたこと^{3, 4)}を論拠とする。著者の結果をみると、PBLでは、CD3⁺HLADR⁺（活性化T細胞）、CD8⁺HLADR⁺（活性化CD8細胞）がIFN α , γ 併用投与により増加しており、IFNが末梢血中のT細胞、特にCD8陽性細胞を活性化すると思われた。また、CD16⁺, CD57⁺, CD11b⁺, CD8⁻CD11b⁺の増加もみられ、NK細胞の増加をも促すと思われた。TILでは、IFN投与群でCD16⁺、特に、強いNK活性をもつCD16⁺CD57⁺が多い傾向がみられ、IFN α , γ 併用投与が、末梢血、腫瘍局所のいずれでもNK細胞を増加、活性化させるものと考えられた。工藤ら¹⁸⁾はIFN療法が有効であった腎細胞癌症例では、IFNの種類には関係なくNK活性の上昇とその持続が認められたとしており、Belldegrunら¹⁹⁾は、TIL養子免疫療法を行った腎細胞癌症例中、有効例では、投与したTILに含まれるNK細胞の比率が高かったと報告している。これらの報告より、腎細胞癌の腫瘍免疫において、MHC非拘束性に殺細胞作用をもつNK細胞がはたす役割が大きいと考えられ、IFNの作用のうちNK細胞の活性化が、抗腫瘍効果に強く反映されていると思われた。また大西²⁰⁾は術前にIFN γ を投与した腎細胞癌症例では投与を行わなかった症例に比べ、TIL中のCD8陽性細胞が多かったと報告しているが、著者の結果でIFN投与群でのみ、PBLよりTILでCD8⁺CD11b⁻ cytotoxic T細胞が、多かったことをあわせて考えると、IFNがMHC拘束性の殺細胞作用をも増強していると推測された。以上より腎細胞癌腫瘍浸潤リンパ球は、腫瘍を認識して活性化したT細胞を多く含むことが示唆され、IFN α , γ 併用投与は、NK細胞、cytotoxic T細胞に関連して腫瘍細胞に作用することが疑われた。

（結語）

- 1) 腎細胞癌腫瘍浸潤リンパ球(TIL)サブセットの性状およびインターフェロン α , γ 併用投与がTILに及ぼす影響についてPBLと共にtwo color flowcytometryで検討した。
- 2) TILはPBLに比べCD3⁺HLADR⁺細胞（活性化T細胞）を多く含んでおり、TIL中T細胞は腫瘍局所で腫瘍の抗原性を認識して活性化していることが示唆された。またCD16⁺CD57⁺ NK細胞は少なく、腫瘍が増殖を続けうる一因と思われた。
- 3) IFN投与群でTILのNK細胞, cytotoxic T細胞が多い傾向がみられ、IFNがこれらに関連して腫瘍細胞に作用することが疑われた。

(文献)

- 1) de Kernion, J. B., Ramming, K. P., Smith, R. B., et al.: The natural history of metastatic renal cell carcinoma: A computer analysis. *J Urol.*, 120:148, 1978.
- 2) Krown, S. E.: Interferon treatment of renal cell carcinoma. Current status and future prospects. *Cancer*. 59:647, 1987.
- 3) Czarniecki, C. W., Fennie, C. W., Powers, D. B., et al.: Synergic Antiviral and Antiproliferative Activities of Escherichia coli-Derived Human Alpha, Beta, and Gamma Interferons. *J. Virol.*, 49:490-496, 1984.
- 4) Hubbell, H. R., Craft, J. A., Leibowitz, P. J., et al.: Synergistic antiproliferative effects of recombinant α -interferons with recombinant γ -interferon. *J Biol Response Mod.* 6:141, 1987.
- 5) Fahey, J. L., Sarna, G., Gale, R. P., et al.: Immune intervention in disease. *Ann Intern Med.* 106:257-274, 1987.
- 6) Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Mule, J., et al.: New approaches to the immunotherapy of cancer using interleukin-2. *Ann Intern Med.* 108:853-864, 1988.
- 7) Rosenberg, S. A., Spiess, P., Lafreniere, R. A.: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with infiltrating lymphocytes. *Science*. 233:1318-1321, 1986.
- 8) Balch, C. M., Riley, L. B., Bae, Y. J., et al.: Patterns of human tumor infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch surg.* 125:200-205, 1990.
- 9) 伊東 恭悟、清藤 大、森田 辰男 他: ヒト腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の clonality と治療、*Medical Immunology*. 24:635-641, 1992.
- 10) Finke, J. H., Rayman, P., Edinger, M., et al.: Characterization of human renal cell carcinoma specific cytotoxic CD8+ T cell line. *J Immunother.* 11:1-11, 1992.

- 11) Mitropoulos, D., Kooi, S., Rodriguez-Villanueva, J. et al.: Characterization of fresh(uncultured) tumor-infiltrating lymphocytes(TIL) and TIL-derived T cell lines from patients with renal cell carcinoma. Clin Exp Immunol., 97:321-327, 1994.
- 12) 長瀬 泰、森山 信男、栗本 重陽 他: 二重染色法によるヒト腎細胞癌浸潤リンパ球サブセットの解析。日泌会誌、85:281-288, 1994.
- 13) Trinchieri, G., Perussia, B.: Immune interferon: A pleiotropic lymphokine with multiple effects. Immunol Today, 6:131-136, 1985.
- 14) Greiner, J. W., Hand, P. H., Noguchi, P., et al.: Enhanced expression of surface tumor-associated antigens on human breast and colon tumor cells after recombinant human leukocyte α -interferon treatment. Cancer Res., 44:3208-3214, 1984.
- 15) 富田 善彦、木村 元彦、西山 勉 他: 腎細胞癌株におけるインターフェロンおよび酸処理による lymphokine-activated killer (LAK) 細胞に対する感受性の変化—腫瘍細胞上におけるクラス I 主要組織適合抗原の発現との関連。日泌尿会誌、82:762-768, 1991.
- 16) DeMaeyer-Guignard, J., DeMaeyer, E.: Immunomodulation by interferons. Recent developments, in Interferon, ed. Gresser, I., Vol. 6, Academic Press, New York pp. 69-86, 1985.
- 17) Quesada, J. R., Kurzrock, R., Sherwin, S. A., et al.: Phase II studies of recombinant human interferon gamma in metastatic renal cell carcinoma. J Biol Response Mod., 6:20-27, 1987.
- 18) 工藤 達也、相馬 博、工藤 真哉 他: 進行性腎細胞癌に対するインターフェロンの治療効果と免疫能の変動。日本癌治療学会誌、25:40-46, 1990.
- 19) Belldegrin, A., Pierce, W., Kaboo, R., et al.: Interferon- α primed tumor infiltrating lymphocytes combined with interleukin 2 and interferon- α as therapy for metastatic renal cell carcinoma. J Urol., 150:1384-1390, 1993.
- 20) 大西 哲郎: 腎細胞癌原発巣浸潤リンパ球 subset の評価と、IFN- γ が及ぼす免疫的効果に関する研究、日泌会誌、82:216-224, 1991.



腎細胞癌腫瘍浸潤リンパ球の性状、およびそれに及ぼす
インターフェロン α , γ 併用投与の影響

柳谷仁志

弘前大学泌尿器科学講座

(指導：鈴木唯司教授)

附表 2 枚、附図 5 枚

Table 1 Clinical characteristics

症例	年齢	性別	IFN投与	組織学的構築型	組織学的細胞型	grade	pT	pN	pM	最大腫瘍径	備考
1	44	男	なし	alveolar	clear cell	1	2	0	0	8 cm	
2	47	男	なし	alveolar	mixed	2	2	0	0	8.6	
3	57	男	なし	alveolar	mixed	1	2	0	0	6	
4	62	男	なし	alveolar	granular cell	1	1	0	0	2	
5	62	男	なし	tubular	clear cell	2	1	0	0	1.2	
6	64	男	なし	alveolar	granular cell	1	3b	1	0	9	静脈内腫瘍塞栓
7	64	男	なし	alveolar	clear cell	1	3a	0	1	6	透析患者, 肺転移
8	65	女	なし	alveolar	clear cell	3	2	0	0	3.5	
9	67	男	なし	alveolar	clear cell	1	2	0	0	4	
10	72	男	なし	alveolar	granular cell	2	3a	0	0	5	
11	72	男	なし	alveolar	granular cell	2	2	0	0	5	
12	52	男	あり	cystic	clear cell	1	2	0	0	6	
13	54	女	あり	alveolar	clear cell	1	2	0	0	8	
14	57	女	あり	tubular	mixed	2	3a	0	0	5	
15	61	男	あり	alveolar	clear cell	1	2	0	0	3.5	
16	62	女	あり	alveolar	clear cell	2	2	0	0	5	
17	63	男	あり	alveolar	clear cell	1	2	0	0	8	
18	63	男	あり	tubular	granular cell	1	2	0	0	5	
19	63	男	あり	alveolar	clear cell	2	2	0	1	10	肺転移
20	65	男	あり	alveolar	mixed	1	2	0	0	3.2	
21	66	男	あり	alveolar	clear cell	1	2	0	1	12	肺転移, 骨転移
22	67	男	あり	alveolar	clear cell	1	2	0	0	2.5	
23	70	男	あり	alveolar	clear cell	1	1	0	0	2	腎嚢胞内の腫瘍
24	76	女	あり	alveolar	clear cell	1	2	0	0	4.2	

Table 2. Isolation of TIL, Staining for flowcytometry

A : 腫瘍浸潤リンパ球の採取法

摘出した腎の腎動脈から HBSS(Hanks'Balanced Salt Solution)を注入して腎静脈からの排液が透明になるまで血液を洗い出す。



被膜、壊死組織、出血巣などを取り除いた腫瘍組織を細切し、RPMI1640で洗浄する。



腫瘍組織 10g あたり collagenase 20mg + RPMI1640 20mlおよび DNase 2mg + PBS 1mlを加えて37℃で振盪しながら2時間インキュベートし、single cell suspension にする。



上清および沈殿を 70 μ Nylon mesh に通し、RPMI1640で2回洗浄する。



Ficoll Paque 12ml に上記 20ml を重層して 1000rpmで 30分間 遠心分離後、中間層をリンパ球に富む分画として採取し、2回洗浄する。

B : two color flowcytometry

上記で得られたリンパ球に富む分画を、細胞成分が 10^7 cells/ml の細胞浮遊液に調整する。赤血球の混入が多い場合は、あらかじめアンモニウム溶血剤で溶血させておく。



FITC 標識モノクローナル抗体 (CD3, CD4, CD8, CD57, Leu 8) と PE 標識モノクローナル抗体 (CD4, CD11b, CD16, HLADR) を組合せて、細胞浮遊液と 4℃で 30 分間反応させる。



0.1% NaN₃ で洗浄して余分な抗体を洗い流す。



1 % パラホルムアルデヒドで固定する。



FACStar(Becton Dickinson 社製) で測定

Fig.1 two color analysis of CD3,HLADR

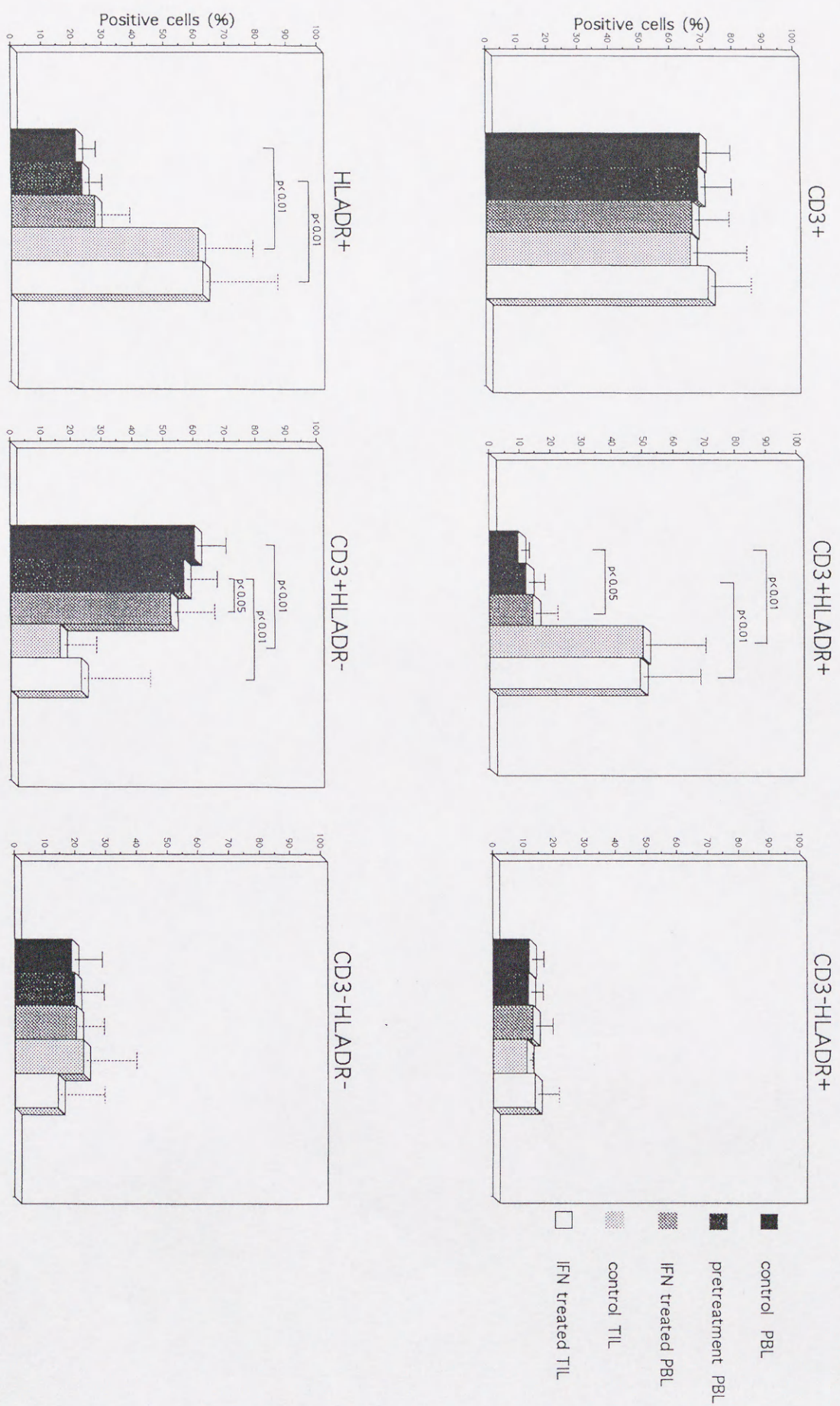


Fig.2 two color analysis of CD4,Leu8

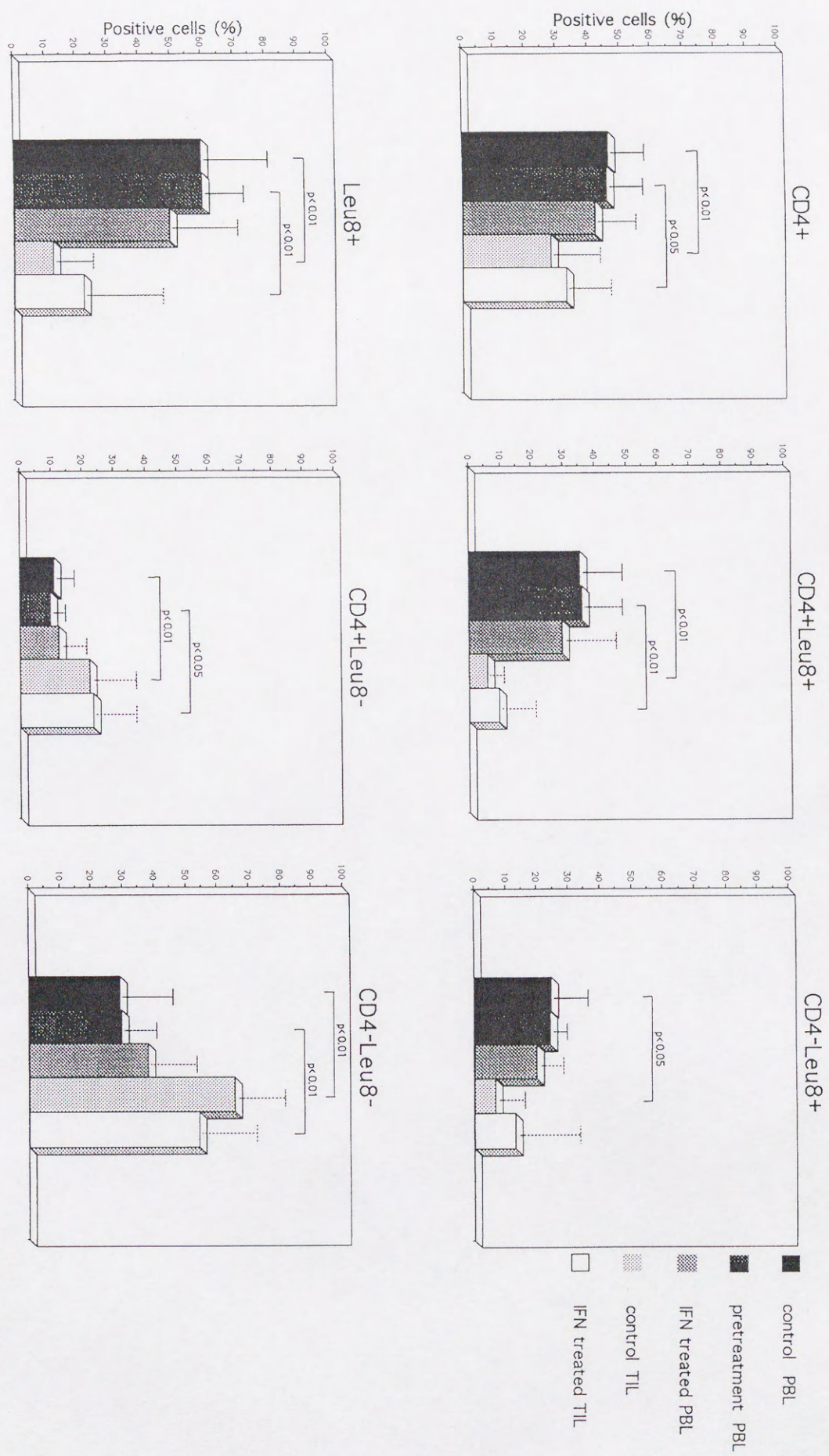


Fig.3 two color analysis of CD8,CD11b

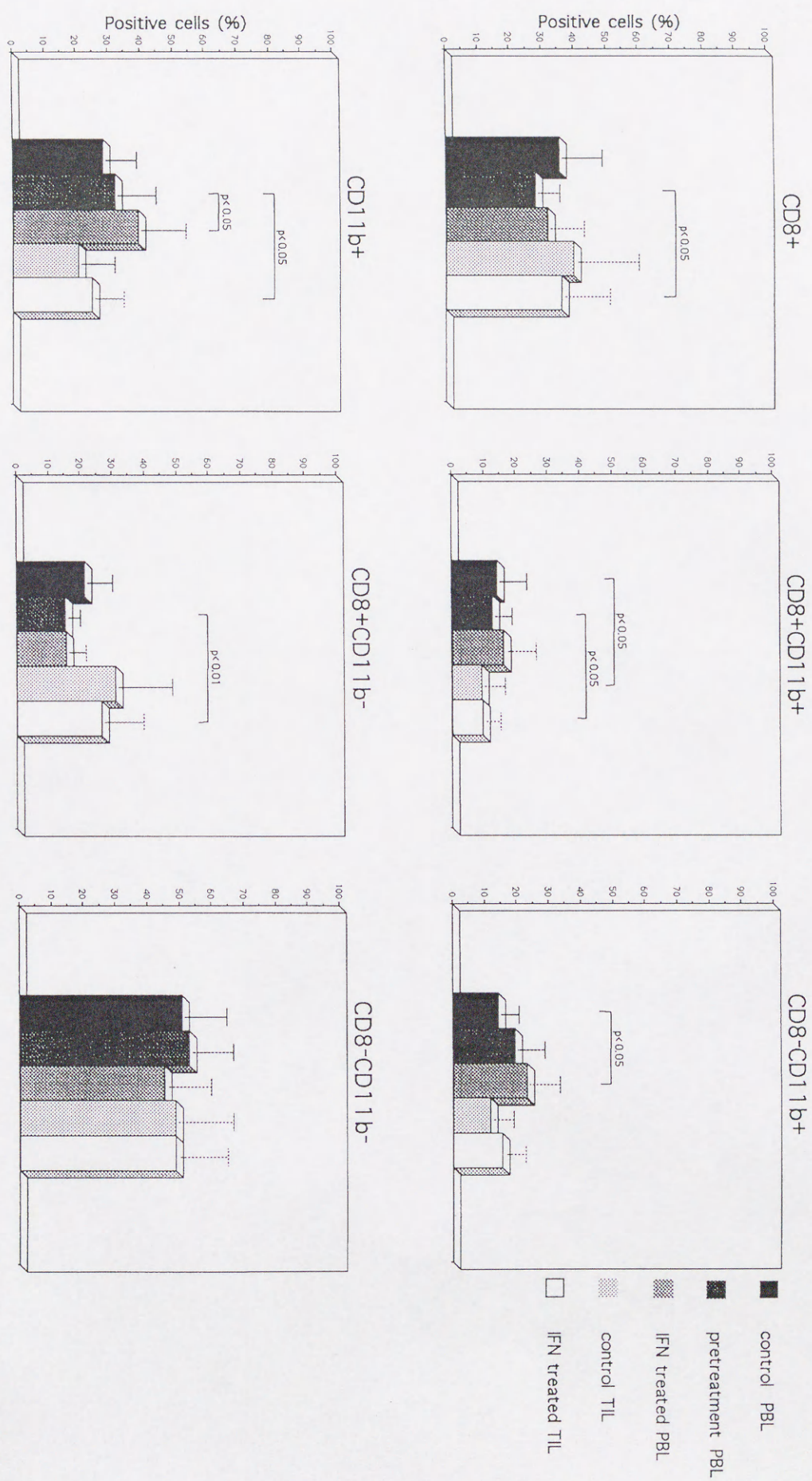


Fig.4 two color analysis of CD4,CD8,HLADR

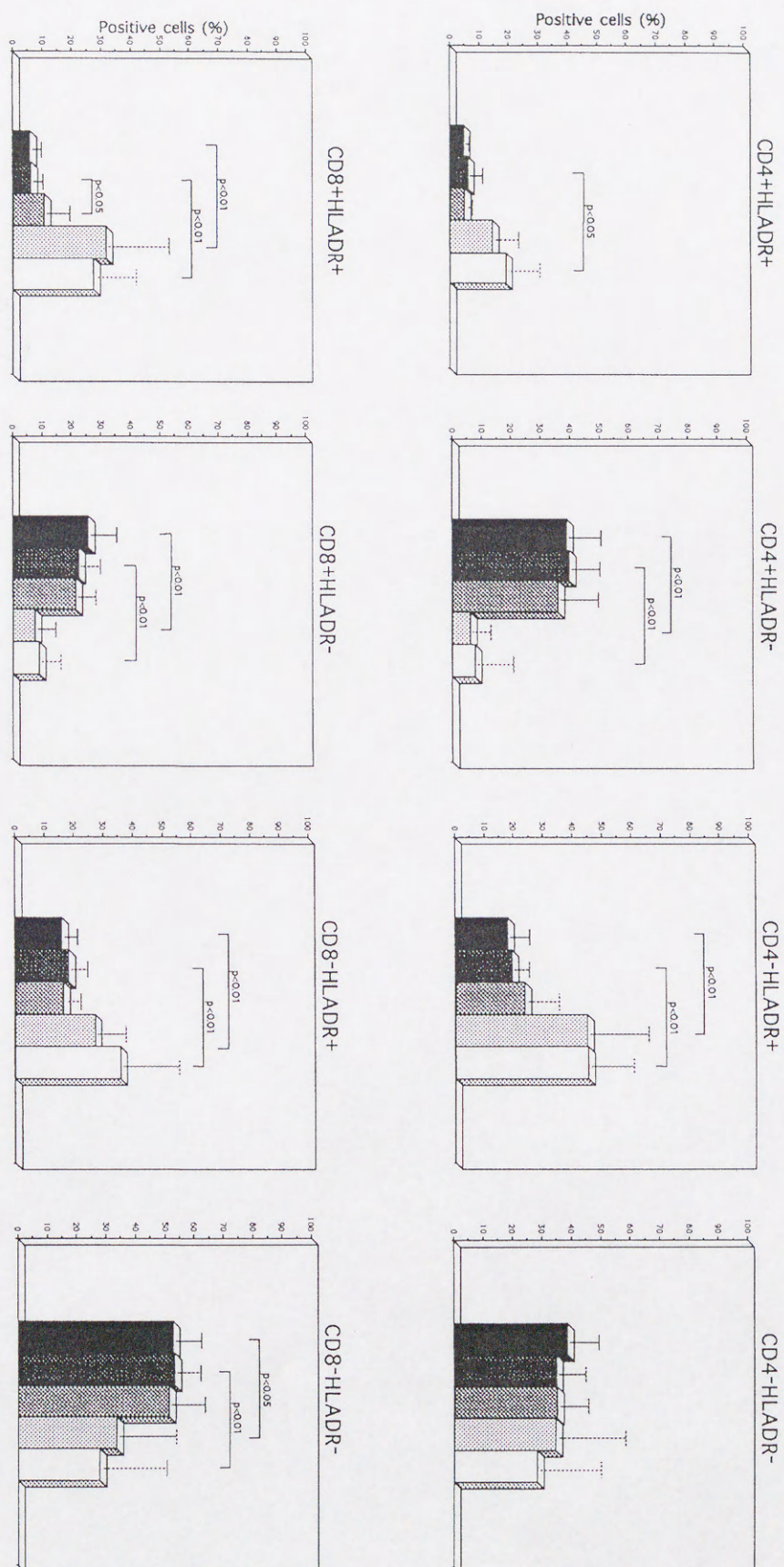


Fig.5 two color analysis of CD16,CD57

