

# Polyclonal mitogenにより活性化された T細胞とB細胞に対するFDG集積の増大

小豆島正典、寺崎一典<sup>\*1</sup>、泉澤 充、高橋徳明、堤 玲子<sup>\*2</sup>  
佐藤成大<sup>\*2</sup>

岩手医科大学歯学部歯科放射線学講座

<sup>\*2</sup>岩手医科大学医学部細菌学講座

020-8505 岩手県盛岡市内丸 19-1

<sup>\*1</sup>岩手医科大学サイクロトロンセンター

020-0173 岩手県岩手郡滝沢村字留ヶ森 348-58

## 1. はじめに

FDG は、悪性腫瘍のみならず良性腫瘍および炎症性病変にも集積することが多くの症例で報告されており<sup>1,2)</sup>、このことがFDG PETの specificity を低下させる原因の一つとなっている。これらの病巣では、癌細胞の断片、あるいは炎症により障害を受けた細胞などをマクロファージが貪食し、T細胞に対し抗原提示しT細胞を活性化させると共に、二次的にB細胞も活性化させられていると考えられる。筆者らは、ヒツジ赤血球抗原を提示するマウスのマクロファージを介して活性化された、マウス脾細胞由来リンパ球に対し、FDG集積が増大することを明らかにしている<sup>3)</sup>。しかしながら活性化される前のT細胞とB細胞に対するFDG集積の違いや、B細胞の活性化によってFDG集積が増大するか否かなど、いくつかの不明点があった。本研究では、リンパ球をT細胞とB細胞に分け、polyclonal mitogenによる活性化前後のFDG取り込みを調べると共に、培養癌細胞のHeLa S3のそれとを比較した。

## 2. 材料と方法

### 2.1 マウス脾細胞の採取と培養

マウス(C57BL/6J)(6週齢)から脾臓を摘出し、冷PBS(phosphate-buffered saline)の中で押しつぶし、単離脾細胞浮遊液を調整した。10%FBS(fetal bovine serum)と50 $\mu$ M ME、5mM HEPESを添加したRPMI 1640培地を用い37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下で静置培養を行った。2時間後プラスチック付着細胞を除き、大部分がリンパ

球からなる脾細胞を得た後、再び RPMI 1640 培地で培養を行った。リンパ球を活性化させるため polyclonal mitogen である Concanavalin A (Con A) ( $4 \mu\text{g/ml}$ ) あるいは Lipopolysaccharide (LPS) ( $4 \mu\text{g/ml}$ ) 存在下で 48 時間培養し、それぞれ T 細胞と B 細胞を活性化させた。一方、polyclonal mitogen を加えず培養した細胞群をコントロール群とした。

## 2.2 HeLa S3 細胞の培養

ヒト子宮頸癌由来の培養細胞 HeLa S3 (RCB0191、理化学研究所) を用い、10% FBS 添加 MEM (Eagle's minimal essential medium) 培地を用い、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下で培養を行った。

## 2.3 FDG 投与と T 細胞・B 細胞の分取

マウス脾細胞と HeLa S3 を入れた培養フラスコを NMCC (滝沢) に運び、FDG を  $1.48 \text{ MBq/ml}$  ( $0.04 \text{ mCi/ml}$ ) 投与し  $37^\circ\text{C}$  で 20 分間培養した。300 G で 7 分間遠心後、上清を取り除き、2% FBS-PBS を加え、さらに遠心し上清を除いた。Con A を加えた群とコントロール群には、Pan T cell isolation Kit (Miltenyi Biotec, USA)、LPS を加えた群とコントロール群には、B cell isolation Kit (Miltenyi Biotec, USA) を用い、分離カラム (LS; Miltenyi Biotec, USA) と専用マグネットを用いて、T 細胞と B 細胞の negative selection を行った。これらリンパ球の分取率の確認には、細胞の一部をそれぞれ anti CD90-PE (Immunotech, France) と anti CD45R-FITC (Immunotech, France) で標識し Flow Cytometry (FCM) (FACSCalibur, BD, San Jose, USA) を用いて行った。HeLa S3 細胞に対しては、2% FBS-PBS で 3 回洗浄した。各々細胞群に取り込まれた FDG を、ガンマーカウンター (ARC-2000, Aloka, Tokyo) を用いて測定した。

# 3. 結果

## 3.1 T 細胞と B 細胞の分取

マウス脾細胞を polyclonal mitogen と共に 48 時間培養し、磁気ビーズによる negative selection を行った前後の FCM を Fig.1 と Fig.2 に示す。Con A で刺激した群では、T 細胞 isolation 前に CD90 陽性リンパ球が 45% あったが、isolation 後には 85% になった。同様に LPS で刺激した群では、B 細胞 isolation 前に CD45R 陽性リンパ球が 84% あったが、isolation 後には 93% に上昇した。

## 3.2 T 細胞と B 細胞に対する FDG 集積

negative isolation によって得られた T 細胞と B 細胞に対する FDG 集積を調べ、さらに HeLa S3 のそれとを比較した。Mitogen で刺激する前の T 細胞と B 細胞に対する FDG 取り込みは、それぞれ  $2.7 \times 10^3 \text{ cpm}/10^6 \text{ cells}$ 、 $2.8 \times 10^3 \text{ cpm}/10^6 \text{ cells}$  と同程度であったが、HeLa S3 の  $235.1 \times 10^3 \text{ cpm}/10^6 \text{ cells}$

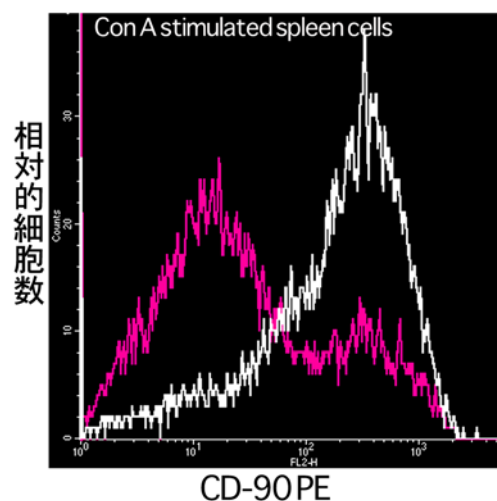


Fig.1 negative isolation によって得られた T 細胞のヒストグラムプロット  
赤線は isolation 前、白線は isolation 後の FCM を示す。

と比較し約 1/85 にすぎなかった。しかしながら、T 細胞を Con A で、B 細胞を LPS で刺激すると FDG 取り込みはそれぞれ  $345.3 \times 10^3$  cpm/ $10^6$ cells、 $222.7 \times 10^3$  cpm/ $10^6$  cells と増大し、HeLa S3 の FDG 集積と同等もしくはそれ以上の集積を示した。

#### 4. 考 察

過去の研究では、細菌による腸炎やウイルスによる急性ヘルペス性脳炎に FDG PET を行くと、これらの病巣に FDG が集積することが報告されている<sup>1,2)</sup>。これらの成績は、病巣の実質の他にマクロファージや顆粒球、リンパ球などの免疫担当細胞にも FDG が集積している可能性を示している。一方、Kubota ら<sup>4)</sup>は FDG が腫瘍組織中の腫瘍細胞のみならず幼弱肉芽組織やマクロファージにも取り込まれ、癌組織による FDG 集積の約 24 %は、非腫瘍性因子によるものであることを報告している。本研究では、リンパ球を T 細胞と B 細胞に分け、両者に対する FDG 集積の違いを調べた。リンパ球は、通常細胞周期の G0 期にある静止状態の細胞として存在する。Polyclonal mitogen で刺激されると、細胞は迅速に G1 期に入って細胞周期が進む。mitogen 刺激する前の T 細胞と B 細胞に対する FDG 集積を調べたところ、培養癌細胞の HeLa S3 のそれと比較し、極めて低い集積を示していた。これは、T 細胞と B 細胞が G0 期に入っていたためと思われる。さらに T 細胞を Con A で B 細胞を LPS で刺激すると、急激に FDG 集積が増大し、HeLa S3 と同等もしくはそれ以上の集積を示した。これは mitogen によりこれらリンパ球が G0 期から G1 期に入り細胞周期が進んだためと思われる。筆者らは以前 HeLa S3 の細胞周期と FDG 集積との関連性を報告している<sup>5)</sup>。この中で HeLa S3 は、S 期と G2/M 期で FDG 集積が増大し、G1 期ではピーク時の約 40 %まで低下することを明らかにしている。これらの成績から、リンパ球においても、細胞分裂の準備段階において S 期～G2/M 期におけるグルコース代謝亢進期が存在し、FDG が集積したと推測される。FDG は mitogen 刺激前の T 細胞と B 細胞に同程度で取り込まれ、大きな違いは認められなかった。T 細胞は細胞性免疫、B 細胞は液性免疫という機能的違いがあるものの、グルコース代謝に関しては差がないことが示された。また mitogen 投与により FDG 集積が増大したが、特に T 細胞の増大率が高かった。これは、リンパ球が活性化している場合、T 細胞の方が B 細胞より FDG が取り込まれやすいことを示すものではない。なぜならば、それぞれの活性度は用いた polyclonal mitogen の濃度に依存しているからである。癌組織では、癌抗原や癌細胞の断片などによりリンパ球が活性化されていると考えられるが、実際の癌組織における T 細胞と B 細胞の取り込み量の違いなど、その詳細は不明である。

今回の研究から、FDG PET で得られる SUV には、FDG 集積の細胞周期依存性のほか、リンパ球を含めた非腫瘍性細胞による取り込みや、腫瘍組織における癌細胞と間質との割合も大きく関与していると思われる。こ

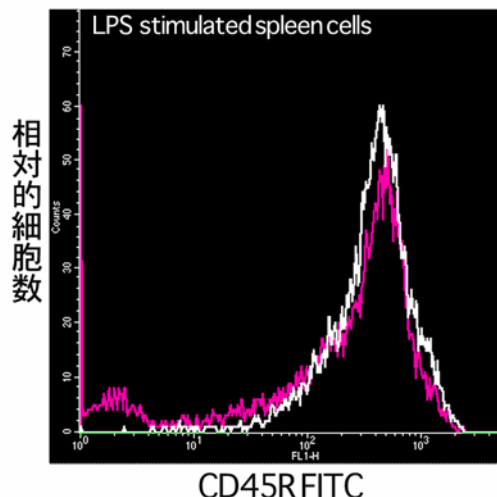


Fig.2 negative isolation によって得られた B 細胞のヒストグラムプロット  
赤線は isolation 前、白線は isolation 後の FCM を示す。

これらの因子のうちどの因子が SUV に大きく影響するのか、今後の研究課題である。

## 文 献

- 1) Bakheet SM, Powe J, Eaat A, Rostom A. Benign causes of  $^{18}\text{F}$ FDG uptake on whole body imaging. *Semin Nucl Med*, 28:352-358, 1998
- 2) Shreve PD, Anzai Y, Wahl RL. Pitfalls in oncologic diagnosis with FDG PET imaging: physiologic and benign variants. *Radiographics*, 19:61-77, 1999;
- 3) M. Shozushima, Reiko TSUTSUMI, Kazunori TERASAKI, Shigehiro SATO, Ryuji NAKAMURA, Kimio SAKAMAKI, Augmentation effects of lymphocyte activation by antigen-presenting macrophages on FDG uptake, *Ann Nucl Med*, 17:555-560, 2003
- 4) Moriguchi H, Shozushima M. Cell cycle dependency of FDG and  $^{67}\text{Ga}$  citrate uptake in HeLa S3 cells. *Dent J Iwate Med Univ*, 27:270-278, 2002(in Japanese).
- 5) Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Ido T, Tamahashi N. Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake. *J Nucl Med*, 35:104-112, 1994