

《原 著》

微量全血培養法によるリンパ球幼若化測定について

中村 護* 白井 将文** 米沢 健三***
 沢井 義一* 河田 泰*

1. はじめに

近年担癌生体をはじめとし、多くの疾患において免疫能を測定する重要性が認められ、さまざまな方法が報告されている。その1つに、リンパ球の Phytohemagglutinin (PHA) 等の Mitogen に対する反応を測定する方法がある。本法の測定は血液からリンパ球を分離して行なうのであるが、全血のまま培養して PHA に対する反応を測定する方法は Junge ら¹⁾ Park ら²⁾, Pellegrino ら³⁾により報告されている。全血培養法によればリンパ球分離に要する操作がなく、また少量の血液で行なえるなどの利点がある。われわれは全血法により PHA および Pokeweed mitogen (PWM) による幼若化測定について検討したので報告する。

2. 方 法

末梢血を、ヘパリンを加えて採血し滅菌された試験管に入れる。培地は RPMI 1640 (Flow Lab) 2 ml に fetal calf serum (Gibco) 0.4 ml を加えたものを使用する。PRMI 1640 には L-glutamine 2 mM (Flow Lab), Hepes buffer 20 mM (Flow Lab.)

を加える。培地の pH は 7.2-7.4 が適当である。また、抗生物質として Streptomycin (52 µg/ml) Kanamycin (64 µg/ml) を加える。PHA-P (Difco No. 3110-56) は 1 Vial を蒸留水 5 ml にて溶解しその 10 µl を使用する PWM (Difco 536) も 1 Vial を蒸留水 5 ml に溶解し、その 10 µl を Standard dose として使用する。非使用時は -20°C にて保存する。

培養液を 16×125 mm の滅菌された試験管 (Falcon) に入れ、これに末梢血 50 µl を加え PHA, PWM をそれぞれ 10 µl を標準量として加える。control には PHA, PWM を加えない。これらの試験管を 37°C にて約 4 日間培養し、incubate 終了約 6 時間前に DNA 合成に取り込まれる tracer として ¹²⁵I-deoxyuridine (UdR: RCC 製) 約 0.5 µci を加え 6 時間培養する。培養終了後、冷却した生食水 2 ml を加え 3,000 rpm 5 分間冷却遠心機にて遠心し上清を捨てる。この操作を 3 回くり返し次いで冷却した 10% トリクロール酢酸 2 ml を加え同様に 3,000 rpm 5 分間にて 2 回遠心し、沈澱物をウェル型シンチレーションカウンターにて測定する。結果は PHA または PWM を加えない Control と、加えたものの比を Stimulation index (SI) として示す。

すなわち、

$$SI = \frac{\text{PHA または PWM を加えた血液のカウント} - \text{バックグラウンドカウント}}{\text{Control 血液のカウント} - \text{バックグラウンドカウント}}$$

となる。

* 東北大学医学部附属病院放射線科

** 同 泌尿器科

*** 同 薬剤部

受付: 51 年 11 月 19 日

最終稿受付: 52 年 5 月 4 日

別刷請求先: 仙台市星陵町 1 番 1 号 (〒980)

東北大学医学部附属病院放射線科

中 村 護

測定は duplicate または triplicate にて行ないその平均値を用いる。これらの方法により、PHA, PWM の最適使用量, 血液量, Incubation 時間について検討した。

3. 結 果

1. Incubation 時間

血液 50 μ l を使用し 1~9 日間培養し, SI を求めた。PHA では Fig. 1a のごとく, 1 日目はほとんど上昇せず, 2 日目から次第に SI が高くなり 4 日目に最高値を示し, その後次第に低下する。PWM も同様の傾向であり, 4 日目の SI が最高値を示した (Fig. 1b)。

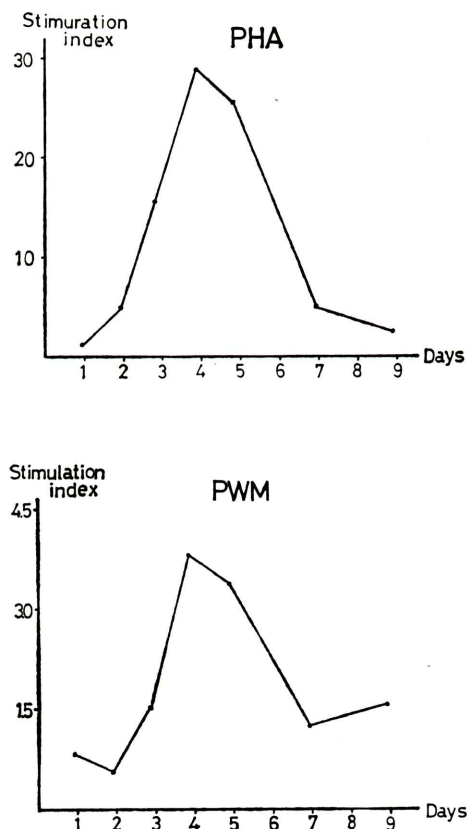


Fig. 1a, b Effect of incubation time of blood on response to PHA (a) and PWM (b).

2. 使用血液量

PHA, PWM は標準量を使用し血液量 10, 50, 100, 200, 300 μ l について SI を算出した。培養日数は 4 日である。Fig. 2a, b のごとく, 10 μ l の少量においても反応しているが, PHA, PWMともに血液量 50 μ l の SI が高値であった。

3. PHA, PWM の使用量

PHA, PWM について Standard dose の 1/8, 1/4, 1/2, 1, 2, 3, 5, 10 倍量について測定した。PHA については Fig. 3a に示すごとく, 1/4~3 倍量において SI が高値であり 5 倍以上では SI は抑制された。

PWM については Standard dose の 1~2 倍に

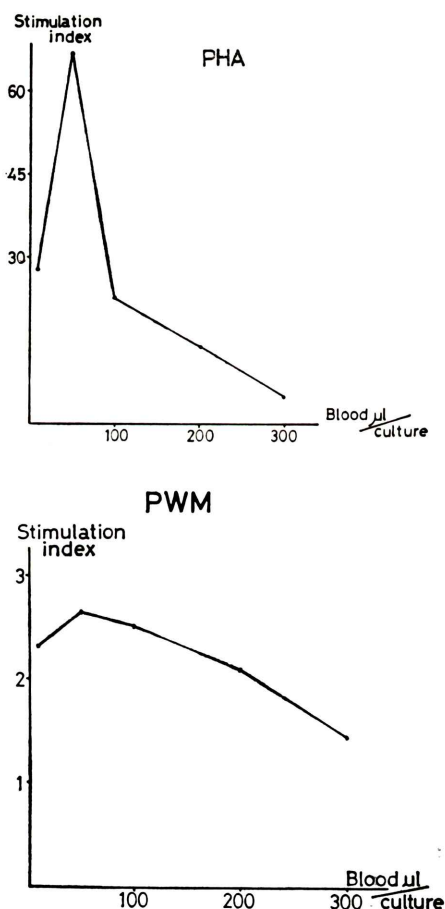


Fig. 2a, b Effect of volume of blood on response to PHA (a) and PWM (b).

において SI が高く、5 倍以上では PHA と同様に SI は低下した (Fig. 3b).

SI 値を得る場合はその値が高値を示す条件が望ましいので以上の結果から培養時間約 4 日、使用血液量は $50\mu\text{l}$, PHA, PWM は Standard dose

$10\mu\text{l}$ を標準的な培養条件とした.

以上の条件における正常人 14 例の SI は PHA は $20.1\sim 90.0$, 平均値 \pm 標準偏差は 46.7 ± 26.4 , PWM $2.0\sim 15.6$, 平均 5.4 ± 3.6 であった. 正常人 担癌生体における結果を Table 1 に示す. SI はカ

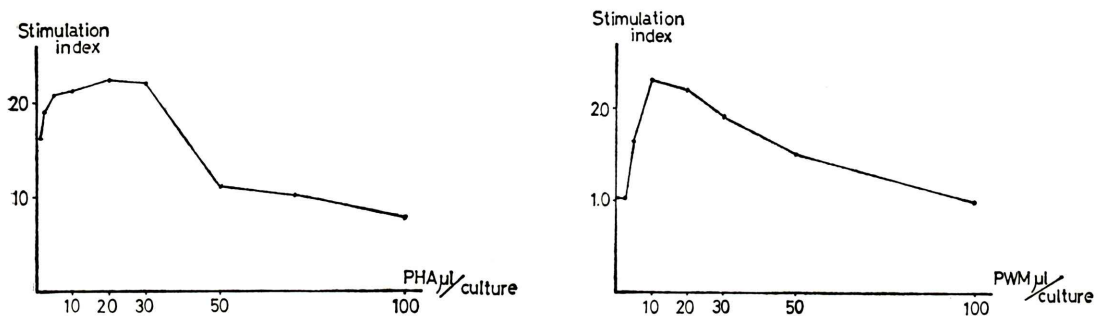


Fig. 3a, b Effect of concentration of PHA (a) and PWM (b) on stimulation index.

Table 1 Stimulation index in healthy persons and patients with cancer.

Case	Counts/minute			Stimulation index	
	Stimulated		Unstimulated	PHA	PWM
	PHA	PWM			
1. normal	2949.5	337.0	45.7	64.5 ± 9.6	7.4 ± 1.2
2. normal	4557.0	650.0	218.0	20.9 ± 1.4	3.0 ± 0.2
3. normal	3004.5	592.5	121.0	24.8 ± 2.3	4.9 ± 0.5
4. normal	3097.0	318.5	37.0	83.7 ± 13.8	8.6 ± 1.5
5. normal	10537.5	647.0	121.0	87.1 ± 8.0	5.3 ± 0.5
6. normal	5498.5	849.5	166.8	33.0 ± 2.6	5.1 ± 0.4
7. normal	10381.0	1423.3	278.3	37.3 ± 2.3	5.1 ± 0.3
8. normal	9813.5	1069.0	462.8	21.2 ± 1.0	2.3 ± 0.1
9. normal	5824.0	1008.0	64.7	90.0 ± 11.3	15.6 ± 2.0
10. normal	4038.0	549.3	98.3	41.1 ± 4.2	5.6 ± 0.6
11. normal	11883.0	928.0	178.0	66.8 ± 5.0	5.2 ± 0.4
12. normal	8873.5	864.3	441.0	20.1 ± 1.0	2.0 ± 0.1
13. normal	15473.3	1035.5	375.3	41.2 ± 2.2	2.8 ± 0.2
14. normal	11815.3	1069.0	532.4	22.2 ± 2.8	2.0 ± 0.1
15. ca. of urinary bladder	4225.0	1001.5	302.5	14.0 ± 0.8	3.3 ± 0.2
16. renal tumor*	3730.0	813.0	196.0	19.0 ± 1.4	4.1 ± 0.3
17. ca. of penis**, ***	4939.5	866.5	720.5	6.9 ± 0.3	1.2 ± 0.1
18. renal tumor*	3933.0	2271.5	710.5	5.5 ± 0.2	3.2 ± 0.1
19. malign. lymphoma*, ***, ***	977.5	668.5	421.0	2.3 ± 0.1	1.6 ± 0.1
20. esophageal ca.**, ***	384.0	461.5	669.0	0.6 ± 0.04	0.7 ± 0.04

* operation

** cancer chemotherapy

*** radiation therapy

Table 2 Variation within the assays

No.	Stimulated with PHA	Unstimulated
1	10118 cpm	511 cpm
2	11637	503
3	12418	589
4	12699	542
5	13742	526
6	10166	565
7	13076	494
8	10936	529
Mean±S.D.	11815.25±1302.99	532.38±32.09
Stimulation index	22.2±2.8	
C.V. %	12.6%	

ウント数の比であるのでその値とともに標準偏差を示した。同一測定時の再現性について PHA, Control 8 本ずつ測定を行なったがその変動係数は 12.6% であった (Table 2)。

4. 考 案

全血法によればリンパ球以外に赤血球, 多核白血球, 血清などが含まれており, それらのリンパ球幼若化に対する影響が問題になるが, 赤血球については Park ら²⁾ は特に影響されないとしており, Newlin ら⁴⁾ によれば赤血球の存在によりむしろ幼若化が促進することを報告している。すなわち, 赤血球が PHA を吸着することにより, リンパ球と PHA の反応に際してその量を調節することになり, また PHA に含まれている toxic substance を赤血球が吸着するのではないかとしている。

Yachnin⁵⁾ は赤血球と血小板の存在は, PHA, PWM による幼若化を増強することを報告している。したがって, リンパ球分離法による場合, これらの混入が起こり得るので値の解釈には注意を要するとしている。また, 多核白血球は幼若化を促進するとされている²⁾。

血清についてはその中に含まれている anti-HLA cytotoxic antibody が PHA により引き起こされた DNA 合成を阻害する可能性があることが報告されている^{3,6)}。それ以外に癌患者の血清中

には PHA による blastogenesis を低下させる因子が含まれていると報告されている⁷⁾。

全血法においては, リンパ球を分離して行なう方法に比して他の血液成分の影響を受けるが, その反面分離法に比して分離の際に生ずる可能性のあるリンパ球の Subpopulation の比率の変動がないこと, また操作による細胞障害が少ないという特徴がある。また, 使用血液量が 1 試験管当たり 50 μ l で済むため採血量が少量で良く, くり返しの検査などに有利と考えられる。担癌生体などでは全血のまま用いればリンパ球を分離して一定の数に対する幼若化を測定する方法に比してリンパ球減少があることが多いのでさらに SI が低下して表現されることになる。使用血液量は Fig. 2 のごとく 10 μ l においても反応しているが 50 μ l が最も SI の値が高く適当と考えられた。

また, incubation 時間は Fig. 1 のごとく約 4 日が最も SI が高値を示した。PHA, PWM の使用量は Fig. 3 のごとく Standard dose 10 μ l の 1/4 から 3 倍まで比較的広い範囲において SI が高く, PWM では Standard dose 1~2 倍で SI が高かった。これら Mitogen の反応については個人差があり, 1 種類の濃度では十分ではないという報告もある。Lauder ら⁸⁾ は, PHA 7 種類の濃度について行っておりその 3 点において control と癌患者の差を認めている。Whitehead ら⁹⁾ は乳癌患者において PHA 3 種の濃度について行っており PHA の Suboptimal dose の結果が患者の予後判定に役立つと報告している。すなわち, 予後の良いと思われる腫瘍が小さく所属リンパ節および遠隔転移の見られない T1-2 NoMo 群において Suboptimal dose に対する反応が低下している 2 例が 6 か月以内に再発したという。

リンパ球には T および B リンパ球の 2 つの Subpopulation があることが知られており, PHA は T-cell を PWM は T および B cell を activate すると報告されている。

したがって PHA の幼若化による幼若化反応は T リンパ球の機能を反映しているとされており, PWM は T および B リンパ球の機能を示してい

と思われるが、PWM の SI は PHA の SI に対して低値であり、PWM の量を増加しても Fig. 3 ごとく SI は高くならない。PWM は T および B リンパ球を activate しているのに、SI が低値を示すのは全ての T、B 細胞と反応しているのではないため一つの原因と思われる。Janossy ら¹⁰⁾のマウスによる実験によれば PWM は T 細胞の 11~17%、B 細胞の 17~22% を activate しているにすぎないことを報告している。今回報告した全血法によるリンパ球の幼若化測定法は使用血液量が少量で良く、また tracer として γ -emitter である ^{125}I -UdR を使用しているのも、 ^3H thymidine を使う方法に比してサンプルの処理が簡単であり、PHA、PWM によるリンパ球幼若化測定に有用な方法と思われた。

5. 結 語

PHA、PWM によるリンパ球幼若化測定を全血のまま行なった。培養時間は約 4 日間、血液量は、50 μl 、PHA、PWM の使用量はおのおの 1 vial を蒸溜水 5 ml に溶解しその 10 μl を用いるのが適当であった。正常人 14 例の SI は、PHA 46.7 ± 26.4 、PWM 5.4 ± 3.6 であった。

終わりに、御指導をいただいた星野文彦教授、松沢大樹教授に深く感謝いたします。また、本研究の一部は厚生省ガン助成金（班長寛弘毅教授）の支援によるものであることを付記し、班長および関係の方々に謝意を表します。

文 献

- 1) Junge U, Hoesktra J, Wolfe L et al: Microtechnique for quantitative evaluation of in vitro lymphocyte transformation. Clin exp Immunol 7: 431-437, 1970
- 2) Park BH and Good PA: A new micromethod for evaluating lymphocyte responses to phytohemagglutinin. Proc Nat Acad Sci USA, 69: 371-373, 1972
- 3) Pellegrino MA, Ferrone S, Pellegrino A et al: A rapid microtechnique for in vitro stimulation of human lymphocytes by phytohemagglutinin. Clin Immunol and Immunopathology 2: 67-73, 1973
- 4) Newlin CM: Proceedings of fifth leucocyte culture conference. Response of rat peripheral blood lymphocytes fractionated by density gradient centrifugation to phytohemagglutinin and in the mixed interaction. Academic Press 1970, pp 441-453.
- 5) Yachnin S: The potentiation and inhibition by autologous red cells and platelets of human lymphocyte transformation induced by pokeweed mitogen, concanavalin A, mercuric chloride, antigen and mixed leucocyte culture. Clin exp. Immunol 11: 109-124, 1972
- 6) Ceppellini R, Bonnard GD, Coppo F et al: Mixed leucocyte cultures and HL-A antigens. Transplantation Proc 3: 58-70, 1971
- 7) 漆崎一朗, 後町洋一, 長井忠則: 宿主抵抗と血清因子. 医学のあめみ 91; 418-425, 1974
- 8) Lauder I and Bone G: Lymphocyte transformation in large bowel Cancer. Br J Cancer 27: 409-413, 1973
- 9) Whitehead RH, Bolton PH and Newcombe RG et al: Lymphocyte response to PHA in breast cancer: correlation of predicted prognosis to different PHA concentration. Clin Oncology 1: 191-200, 1975
- 10) Janossy J, Greaves MF, Doenhoff, MJ et al: Lymphocyte activation, V, quantitation of proliferative responses to mitogens using defined T and B cell populations. Clin exp Immunol 14: 581-596, 1973

Summary

Whole blood method for evaluating lymphocyte responses to PHA and PWM

Mamoru NAKAMURA*, Masafumi SHIRAI**, Kenzo YONEZAWA***,
Yoshikazu SAWAI*, Yasushi KAWADA*

Dept of Radiology, **Dept. of Urology, and Hospital Pharmacy*, School of Medicine, Tohoku University*

Lymphocyte responses to phytohemagglutinin (PHA) and pokeweed mitogen (PWM) were evaluated using whole blood without cell separation. The proliferative responses of peripheral lymphocyte to a mitogen such as PHA are generally considered to be a property of thymus dependent lymphocytes. Pokeweed mitogen is considered to stimulate thymus and bone marrow cells. It is possible to know functional state of T and B cells with these mitogens. Whole blood method did not

need isolation of lymphocytes from a large volume of blood.

The volume of blood for one culture tube was only 50 μ l. This method is suitable to evaluate immunological function because of its simplicity. In healthy persons, stimulation index to PHA ranged from 20.1 to 90.0 (mean \pm S. D., 46.7 ± 26.4) and stimulation index to PWM ranged from 2.0 to 15.6 (mean \pm S. D., 5.4 ± 3.6).