慢性リンパ性白血病細胞にかんする研究

I. 慢性リンパ性白血病細胞のPHA培養成績について

長崎大学医学部原研内科教室（指導 朝長正允教授）

豊 増 省 三

STUDIES ON LYMPHOCYTES OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA.

I. PHA STIMULATED CULTURE OF LYMPHOCYTES FROM CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Shozo TOYOMASU

Department of Haematology, Nagasaki University School of Medicine

(Director: Prof. Dr. Masanobu Tomonaga)

概要 慢性リンパ性白血病のリンパ球の性格を究明する最初の実験として、6例の慢性リンパ性白血病患者の末梢リンパ球をphytohemagglutinin (PHA)で培養し、その成績を二、三の血液疾患および正常人よりなる対照群のそれと比較した。慢性リンパ性白血病のリンパ球は対照群に比しPHA刺激にまったく反応しないか、少数のリンパ球のみが反応を示した。培養細胞数を少なくすると芽球出現率、³H-thymidineラベル率ともに上昇することを認めた。末梢リンパ球数の多い慢性リンパ性白血病例ではリンパ球の幼若化は認められなかったが、血清γ-グロブリン値と幼若化との相関関係は明らかでなかった。再生不良性貧血患者との交叉培養で、慢性リンパ性白血病患者の血清中にはPHA刺激に対する反応を抑制する因子はないようであった。

I. 緒 言

近年免疫学的知見の拡充とともに、従来不活性な細胞と目されていたリンパ球が免疫学的に重要な役割を占める事実が明らかとなつた。末梢血リンパ球の寿命が今まで考えられていたよりはるかに長いものがあり、これらの細胞が抗体産生細胞として重要な意義をもつことが知られてきた。したがって胸腺を初めとする全身リンパ組織の病変に際して、そのリンパ組織ないし循環リンパ球の病態生理を解明しようとする研究分野は最近最も注目されているものの一つである。一方、抗原刺激に際して末梢血小リンパ球が著しい形態変化を示すことも明らかとなり、ことにphytohemagglutinin(PHA)によつて特異抗原刺激の際と同様の

形態変化がみられることは、これがリンパ球の免疫的能力をそのまま表現すると考えることは問題があるとしても、恐らく免疫的機能を背景とした一つのリンパ球機能を表現するものとして既に多くの研究者に應用されている。

白血病のなかで慢性リンパ性白血病は他と異なり比較的緩慢な経過をとり、臨床症状も穏和で白血病としては特殊な位置を占めるものと思われる。Dameshek らによれば慢性リンパ性白血病はimmunoproliferative disordersの一つで、あるリンパ球クローンの異常増生が不可逆的になつたものとされている。増生したリンパ球は形態的に正常小リンパ球と大差ないが、このリンパ球の機能異常を解明することは、慢性リンパ性白血病の位置

づけの指針となるとともに、リンパ球の機能について多くの知見をもたらさうものと予測される。このような観点から著者は慢性リンパ性白血病の末梢リンパ球を種々の方向から観察すべく計画した。今回は慢性リンパ性白血病6例のリンパ球PHA培養成績を、若干の血液疾患ならびに正常人のリンパ球培養と比較して報告する。

II. 実験方法

a. 末梢血リンパ球PHA添加短期培養法

1) 20mlのヘパリン静脈血を傾斜させた滅菌試験管中で室温下約2時間放置し、小リンパ球浮遊血漿を得る。2) 血漿中の白血球数を $1.0 \sim 6.0 \times 10^8/\text{mm}^3$ に調整する。3) 8.0mlのTC medium 199に小リンパ球浮遊血漿 2.0mlを入れ、PHA-M 0.2ml, PHA-P2 2滴 (いずれも Difco Lab. 製) を添加し 37°C で培養。4) 培養開始後48, 72, 96時間で細胞を採取し標本作製するが、その各2時間前に 0.005% コルヒチン 0.5ml, 1時間前に tritiated thymidine (^3H -TdR) $5\mu\text{C}$ (spec. act. 50mc/mM) を加える。5) 上記各時間に培養液を 1,000回転5分間遠沈し得られた細胞を塗抹、Giemsa 染色およびオートラジオグラフ標本作製 (小西六NR-M2感光乳剤で dipping, 露出7日間, 後染色Giemsa)。6) 各標本について全リンパ球系細胞数に対する芽球様細胞数 (芽球出現率, percent of blastoid cells), ^3H -TdR ラベル細胞数 (^3H -TdR ラベル率, percent of ^3H -TdR labeled cells), 分裂細胞数 (percent of mitoses) を測定する。

b. 培養細胞数の培養成績に及ぼす影響の観察法

(a 1) で述べた操作で得られたリンパ球浮遊血漿を 1,000回転10分間遠沈してリンパ球を分離し、リンパ球数が $0.5 \sim 100 \times 10^8/\text{mm}^3$ の間の種々の値となるように調整して自己の血漿に再浮遊させる。あと (a 3) 以下と同様に行ない96時間目の標本について観察。

c. 血漿交叉培養にかんする実験法

慢性リンパ性白血病および再生不良性貧血例に

ついてbと同様リンパ球を遠沈分離し、TC medium 199で1回洗浄後慢性リンパ性白血病患者のリンパ球を再生不良性貧血患者の血漿に、また後者のリンパ球を前者の血漿にそれぞれ細胞数 $2.0 \sim 4.0 \times 10^8/\text{mm}^3$ となるようにして再浮遊させる。以後 (a 3) 以下と同様。96時間目の標本について観察。

III. 実験材料

a Table 1 に示す慢性リンパ性白血病 6 例, Table 2 に示す若干の血液疾患例, および正常人 15 例 (男 8 例, 女 7 例, 21~44才)

Table 1. Examined cases of chronic lymphocytic leukemia.

Case No.	Age	Sex	RBC $\times 10^5/\text{mm}^3$	WBC $\times 10^3/\text{mm}^3$	Lymphocyte Count $\times 10^3/\text{mm}^3$	7-Globulin g/dl	Lymph node Swelling	Hepato-splenomegaly	Therapy
1	58	F	440	40.0	31.6	1.9	—	—	—
2	50	M	380	17.8	14.8	2.3	+	+	—
3	58	M	400	16.4	12.3	—	—	+	—
4	64	M	383	89.0	80.9	1.6	—	—	Belamethasone Chlorambucil
5	76	M	321	96.4	92.5	—	—	+	—
6	57	M	376	4.3 *110.6	1.0 *88.4	1.8	+	—	Chlorambucil

*Value before therapy

Table 2. Examined cases of several blood diseases.

	Age	Sex	RBC $\times 10^5/\text{mm}^3$	WBC $\times 10^3/\text{mm}^3$	Lymphocyte Count $\times 10^3/\text{mm}^3$	Abnormal Cell Count $\times 10^3/\text{mm}^3$
Acute Granulocytic Leukemia	61	M	340	2.3	0.5	—
	12	M	250	91.8	4.6	87.2
	56	M	374	3.3	1.4	—
	14	F	203	10.3	6.2	2.8
	24	M	282	8.9	3.0	5.7
Acute Lymphocytic Leukemia	7	F	250	4.6	2.1	0.1
	59	M	387	4.2	2.2	0.1
	12	M	182	1.7	1.3	0.3
	11	M	117	10.3	3.0	4.0
Chronic Granulocytic Leukemia	4	M	336	1.8	1.2	0.3
	23	F	436	50.5	2.5	—
	14	M	434	46.0	2.5	—
Multiple Myeloma	36	M	518	16.3	3.0	—
	62	M	351	3.0	1.1	—
	53	M	191	1.0	0.5	—
Malignant Lymphoma, Lymphosarcoma, Reticulosarcoma	68	M	331	7.4	2.2	—
	37	M	540	36.3	3.3	21.1
	63	F	478	6.6	0.9	—
	54	M	483	6.7	1.3	—
	48	M	511	9.2	1.3	—
Hodgkin's Disease	13	M	389	3.9	0.5	—
	44	M	240	3.1	1.1	—
	87	M	470	35.2	1.6	—
	52	M	400	6.7	2.3	0.2
	9	M	108	1.7	1.6	—
Aplastic Anemia	10	M	198	4.5	3.3	—
	23	M	221	3.0	2.3	—
	37	M	225	2.6	1.8	—
	22	F	218	2.1	1.7	—
	20	M	313	2.5	1.8	—
	29	M	226	3.1	2.0	—
	34	M	177	4.1	1.6	—
	35	M	213	1.4	0.8	—
	25	F	284	3.4	2.0	—
	41	F	365	4.4	3.0	—

b. Table 1 中 case 1 の慢性リンパ性白血病例と5例の正常人(男4例, 女1例, 23~44才)

c. Table 1 中 case 1 の慢性リンパ性白血病例とTable 2 中の*の再生不良性貧血例

IV. 実験成績

a. 慢性リンパ性白血病患者および正常人の末梢血リンパ球PHA培養結果はTable 3に, 他の血液疾患例のそれはTable 4に示したが, 慢性リンパ性白血病においては, case 1, 2のみがPHAに弱い反応を示し最高の芽球出現率はそれぞれ39%, 44%であり, 他の4例は芽球様細胞の出現をほとんど認めなかつた. またTable 4に示すように1例のリンパ肉腫症の細胞はPHA刺激にはほとんど反応しなかつたが, 本例の末梢血リンパ球には86%の異常細胞がみられた.

Table 3. Incidence of blastoid cells, ³H-TdR labeled cells and mitoses in PHA stimulated lymphocyte cultures of chronic lymphocytic leukemia and normal subjects.

Culture Times(hrs)		Percent of Blastoid Cells			Percent of ³ H-TdR labeled Cells			Percent of Mitoses		
		48	72	96	48	72	96			
Chronic Lymphocytic Leukemia	Case No.									
	1	17.5	39.0	9.0	12.5	19.5	7.0	0 at any times		
	2	5.0	9.0	44.0	3.0	8.0	16.0			
	3	0 at any times			0 at any times					
	4									
	5									
	6									
Mean	3.8	8.0	8.8	2.6	4.6	3.8				
Normal Subjects (15 Cases)		Mean	37.0	85.6	82.0	28.0	39.8	33.2		
		Range	Min.	25.0	60.0	56.0	20.0	28.0	15.0	0
			Max.	50.0	98.0	99.0	36.0	55.0	57.0	0.1

Table 4. Incidence of blastoid cells, ³H-TdR labeled cells and mitoses in PHA stimulated lymphocyte cultures of blood diseases. (at 72 and 96 hours)

	No. of Cases	Percent of Blastoid Cells		Percent of ³ H-TdR labeled Cells		Mitoses	
		72 hrs Mean Range	96 hrs Mean Range	72 hrs Mean Range	96 hrs Mean Range	72 hrs Range	96 hrs Range
Acute Granulocytic Leukemia	6	53.0 20.0-76.0	54.0 33.0-72.0	26.6 15.0-41.0	25.6 7.0-52.0		
Acute Lymphocytic Leukemia	4	40.4 3.0-64.5	47.0 1.0-68.0	24.1 2.0-48.0	27.9 0-41.5		
Chronic Granulocytic Leukemia	3	54.3 46.0-67.0	33.0 0-40.0	26.8 7.5-47.5	16.7 3.0-26.0		
Multiple Myeloma	3	57.0 49.0-65.0	67.3 52.0-83.0	24.5 21.0-28.0	41.3 35.0-46.0		
Malignant Lymphoma	8	30.9 2.5-55.0	47.0 0-74.0	19.2 0-43.0	27.3 0.5-44.0	0-0.1	0-0.2
Lymphosarcoma	1	2.5	0	0	0.5		
Reticulosarcoma	4	35.0 10.0-50.0	52.7 35.0-73.0	23.3 9.0-43.0	33.1 22.0-44.0		
Hodgkin's Disease	3	36.3 16.0-56.0	55.0 29.0-74.0	21.5 4.5-40.0	28.3 7.0-49.0		
Aplastic Anemia	11	79.7 60.0-97.0	86.2 67.0-100.0	35.9 7.0-46.0	38.3 14.0-62.5	0-0.4	0-5.0

b. 培養開始時の培養液中の細胞数が培養成績にどのように影響するかを検討し慢性リンパ性白血病の成績はTable 5, 正常人のそれはTable 6に示した. 正常人では細胞数を少なくすると³H-TdRラベル率, 細胞分裂は著しく増加するが, 芽球出現率は変わらないのに反し, 慢性リンパ性白血病では0時間の細胞数 14.0×10^6 のとき96時間の芽球出現率は4.0%であつたが, 細胞数を 1.4×10^6 に減少させると芽球出現率は19.0%に増加した.

c. 慢性リンパ性白血病と再生不良性貧血のリンパ球および血漿の交叉培養結果はTable 7に示すように, 血漿を代えても培養成績に差異は認め

Table 5. Relationship between cell count at 0 hour and results of cultures in chronic lymphocytic leukemia. (at 96 hrs)

Cell Count at 0 hr ($\times 10^6$)	Cell Count at 96 hrs ($\times 10^6$)	Percent of Blastoid Cells	Percent of ³ H-TdR labeled Cells	Percent of Mitoses
14.0	2.0	4.0	3.0	0
7.4	9.5	10.5	8.5	0
1.4	3.4	19.0	11.0	0.2

Table 6. Relationship between cell count at 0 hour and results of cultures in normal subjects. (at 96 hrs)

	Cell Count at 0 hr ($\times 10^6$)	Cell Count at 96 hrs ($\times 10^6$)	Percent of Blastoid Cells	Percent of ³ H-TdR labeled Cells	Percent of Mitoses
Case A	13.2	8.8	67	27.5	0.3
	6.7	2.3	92.5	43	1.2
	2.0	0.4	80	51.5	1.5
Case B	10.8	8.2	67	28	0.5
	6.0	4.4	84	36	0.5
	1.0	1.0	84	65	2.1
Case C	13.0	9.3	80	23	0.5
	8.4	6.0	77	25	0.3
	6.9	6.8	84	23.5	0.2
	3.5	2.1	81	49.5	1.4
	1.0	2.3	90	52.5	2.3
Case D	7.4	6.0	85	39	0.5
	2.0	4.7	77	42	0.8
	1.0	0.4	79.5	54	2.8
Case E	20.0	6.0	88	30	0.3
	17.0	3.8	87	27	0.6
	9.1	3.3	95	32.5	0.5
	5.3	3.5	83	34	0.7
	1.4	0.8	96	58	2.9
Mean	10.0	7.2	77.8	22.5	0.4
	5.0-10.0	4.6	83.8	31.9	0.6
	5.0	1.7	83.9	53.2	2.0

Table 7. Cross matching culture of chronic lymphocytic leukemia and aplastic anemia. (at 96 hrs)

Plasma	Lymphocyte	Chronic Lymphocytic Leukemia	Aplastic Anemia
Chronic Lymphocytic Leukemia	Percent of Blastoid Cells	14.5	90.0
	Percent of ³ H-TdR labeled Cells	5.0	60.5
Aplastic Anemia	Percent of Blastoid Cells	16.0	97.5
	Percent of ³ H-TdR labeled Cells	6.5	64.5

なかつた。

V. 考 案

Phaseolus vulgaris (隠元豆) より得られる phytohemagglutinin(PHA) が *in vitro* でヒト末梢血中の小リンパ球を幼若化させリンパ芽球様細胞に変化させることが1960年Nowell¹⁾により報告されて以来、PHAは細胞染色体の研究に応用されるようになったが、他方芽球様細胞に転化し分裂をおこしうるといふ小リンパ球の潜在能力が注目されるようになった。 *in vivo* においても抗原刺激により、 *in vitro* でみられるPHA細胞に相当すべき幼若細胞が出現することが確かめられている。

従来リンパ球系の最終段階の細胞と考えられていた小リンパ球が、ある条件の下でリンパ芽球様細胞に変わり細胞分裂をおこす事実は、小リンパ球に対する見解を一新せしめるに足る発見であると思われる。

PHA刺激によつて出現する細胞は、形態的にはリンパ芽球というよりはリンパ細網細胞ともいふべき大型の幼若な細胞と目され、本細胞を血球 stem cell に擬してその実験的証明を試みようとする報告もみられるが²⁾。 *in vitro* また *in vivo* で本細胞が他の血球細胞に変化したという確証を得るに至っていない。

Quaglino³⁾、市丸⁴⁾らはこの培養細胞の細胞化学的变化を追究し、細胞の幼若化に先行してPAS反応が強くなることを指摘し、リンパ芽球様細胞の増加とともに水解酵素活性が高まる事実と合わせ、小リンパ球の幼若化はglycolysisのエネルギーを利用していると推定している。また培養2日目よりDNA前駆物質のthymidineを核内にとり入れることからDNA合成を行なうことが確かめられ、3～4日目に細胞分裂が認められ、4日目には酸フォスファターゼ活性が高まり、電顕的にリゾゾーム、ゴルジ装置の発達が確かめられている。

このような小リンパ球の幼若化のもつ生物学的意義を解明すべく多くの観察がなされているが、

概して免疫学的に解釈しようとする試みが多い。すなわちツベルクリン、百日咳・腸パラチフスポリオ・天然痘のワクチン、破傷風・ジフテリアのトキシイド、枯草熱の花粉、ペニシリン、その他の細菌の毒素等をPHAの代わりに用いて培養すると、これらの抗原に対する特異抗体を有するヒトの小リンパ球の一部はPHA刺激の場合と同様の形態変化をおこすことより、この幼若化は抗体産生のための変化であろうと考えられ、Fisher⁵⁾はこのリンパ芽球様細胞をImmunoblastenと称した。Elves⁶⁾、Hirshhorn⁷⁾、Huber⁸⁾らはPHAまたは、特異抗原刺激によつて生じた芽球様細胞がγ-グロブリンを産生することを認めたが、Huberらによればここに生じたγ-グロブリンは免疫電気泳動法を用いて検索すると、Ig MよりIg Gが多いと報告されており、リンパ球の幼若化が抗体産生だけを目的としているのかどうか疑問と思われる。またHirshhorn、Huberらによれば、agammaglobulinemia患者の末梢血リンパ球も *in vitro* でPHAに反応し芽球様細胞となるが、この時は培養細胞はγ-グロブリンを産生しないことより、幼若化と抗体産生は別個の現象であり、PHAは単に小リンパ球に抗体産生可能な形態変化をもたらすにすぎないとも考えられる。さらにPHAで感作されたヒトから得た末梢リンパ球は、 *in vitro* でPHA刺激に弱い反応を示すに過ぎないことも認められており、PHAは *in vitro* では小リンパ球に特異抗原として作用しているのではないと思われる。

PHAの作用機序は今日なお不明といわざるを得ないが、幼若細胞に変化しうる小リンパ球の一つの機能を判定する武器として応用するに足るのであり、種々の病的状態におけるPHAに対する反応を明らかにすることがPHA反応の機序解明に役立つものと考えられる。

リンパ組織が系統的に侵される慢性リンパ性白血病や悪性リンパ腫患者は一般的に免疫的能力の低下が予想され、小リンパ球のimmunocompetenceを追究するに好個の材料と考えられる。

Astaldi⁹⁾, Quaglino, Hayhoe¹⁰⁾, Oppenheim¹¹⁾, Elves¹²⁾, Thomson¹³⁾らはすでに慢性リンパ性白血病患者リンパ球についてPHAや特異抗原刺激に対する態度を観察し、その反応が消失するかきわめて低下していることを報告している。

著者の成績でも正常人や他の血液疾患に比し慢性リンパ性白血病のリンパ球はPHA刺激に弱い反応を示すか全く反応せず、48～96時間培養において芽球出現率、³H-TdRラベル率は低値を示し細胞分裂は認められなかつた。Oppenheimの報告によると、慢性リンパ性白血病のリンパ球培養は72時間より120時間の方が芽球出現率が高いとされているが、case 1, 2では120時間目の芽球出現率はそれぞれ1.0, 37.0%で96時間目のそれより低下していた。120時間目の³H-TdRラベル率はcase 1は0%, case 2は23%であつた。これらより慢性リンパ性白血病のリンパ球はPHAに対する反応が特に遅延するとはいひ難いようである。

Elves, Hayhoe, Oppenheimらは慢性リンパ性白血病において末梢リンパ球数の多い例ほどPHA刺激に対する反応が低下していることを指摘しているが、著者の成績もcase 3および治療により末梢リンパ球数が減少していたcase 6を除けば、末梢リンパ球数の少ない症例がPHA刺激に反応を示しているようである。

慢性リンパ性白血病患者は抗体産生能が低下している臨床的事実があり、低γ-グロブリン血症を伴う症例が時にみられる。case 4も種痘後その部に2×5 cmの発赤、腫張、硬結を生じ、潰瘍を形成して約3週間で癒痕化しており、抗体産生能の低下を示す現象の一つと考えられる。γ-グロブリン値とリンパ球培養成績の間にHayhoe, Oppenheimらは相関を見出していないが、Elves¹⁴⁾によれば低γ-グロブリン血症を伴つた慢性リンパ性白血病においては芽球出現率は低下するという。著者の例ではcase 1, 2のPHA刺激にかなり反応したものはγ-グロブリン値はやや高いがいずれも正常範囲であつた。agammaglobulinemia, paraproteinemiaにおいてもPHA培養で芽球様

細胞の出現をみ、またIgAの欠如しているataxia telangiectasiaで、正常に近い芽球出現率を得られること¹⁵⁾。さらにTable 4に示すように多発性骨髄腫でかなり高い芽球出現率をみていること等より、γ-グロブリン値と培養成績とは直接関連づけられないように思われる。血中Ig M値と培養成績の関係をみた報告は知られていない。

ここでとり扱つた慢性リンパ性白血病6例中case 4はbetamethasoneを126日間に77mg, chlorambucilを14日間に56mg, case 6はchlorambucilを60日間に480mg培養開始前に服用していたが、他の4例は未治療であつた。Hayhoeによれば治療により末梢リンパ球数の減少した慢性リンパ性白血病の培養成績は治療前に比し上昇するといわれているが、ここではわずか2例であるが治療後もPHA培養によつて芽球様細胞はほとんど認められずこれらの例では残存リンパ球は正常化していないとも考えられる。

正常人や血液疾患の多くは72～96時間で芽球出現率、³H-TdRラベル率は最高となりその後は低下していくが、慢性骨髄性白血病では96時間目にはかなり減少し、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫、再生不良性貧血等は96時間目に最高となつた。このように疾患により芽球出現率が異なつた曲線を描くことの意味は不明であるが、疾患により幼若化をおこす時期が異なるのか、分裂した芽球様細胞が増加または破壊される割合が疾患別に異なっているためとも考えられる。

Hersh¹⁶⁾らはHodgkin病の末梢リンパ球のPHA反応の低下を報告しているが、Elvesは5例のHodgkin病のリンパ球培養を行ないいずれも正常範囲の芽球出現率を得ている。著者の3例ではやや低値を示した。急性リンパ性白血病や悪性リンパ腫の小リンパ球はPHA反応が少し低下しているが、慢性リンパ性白血病に比し高い芽球出現率を有していることから、これらの疾患においては多くの正常小リンパ球のpopulationの他にPHAに反応しないリンパ球も少数混在していることが予測される。この中でリンパ肉腫症の症例は末梢

血中に多数出現していた異常細胞が培養され、PHA刺激にほとんど反応していない。この所見より慢性リンパ性白血病のPHAに反応しないリンパ球は、形態的にはさほど異常とは認められなくとも腫瘍的性格を有する異常細胞ではないかと考えることもできよう。

慢性リンパ性白血病においてはリンパ球が多いことが培養条件を不利にしているのではないかと考え、細胞数を種々変えた場合の培養成績を正常人の成績と比較した。正常人ではある程度培養細胞数を少なくすると ^3H -TdRラベル率、細胞分裂率は著増するが芽球出現率は常に同程度にとどまっている。これに反し慢性リンパ性白血病においては培養細胞数を減少させると芽球出現率、 ^3H -TdRラベル率ともに上昇し、細胞分裂をみた。この解釈としてHedekov¹⁷⁾らが述べているように、細胞数が多くなるとcrowding effectを生じ培養成績が低下することが考えられ、正常人ではcrowding effectは芽球出現率には影響しないが、慢性リンパ性白血病では芽球出現率、 ^3H -TdRラベル率、細胞分裂率のいずれにも影響を与えていると推論される。したがってある程度少数のリンパ球を培養することにより慢性リンパ性白血病の培養成績は幾分上るのではないかとと思われる。

Oppenheimによると芽球様細胞の絶対数は正常人よりも慢性リンパ性白血病例の培養の方が多いが、後者では芽球様細胞の破壊により芽球出現率はある値より高くなるとされている。細胞数が少なくなるとPHAに反応した細胞が破壊されず分裂して増加し易くなるのではないかという考え方もできる。いずれにせよ培養成績は各種の培養条件の変化を微妙に反映するので慢性リンパ性白血病の培養細胞数の多寡による芽球出現率の変動が正常人と異なることはわずかに1例の実験ではあるが興味あり、今後さらに検討したいと考えている。

慢性リンパ性白血病のリンパ球がPHAや抗原刺激に対し反応が弱い理由として、そのリンパ球に原因があるのか、その血清中にPHA刺激また

はそれに対する反応を抑制する因子があるのかが討論されている。Hayhoe, Elvesらは慢性リンパ性白血病のリンパ球を正常人の血清中でPHA培養を行なつても芽球出現率は増加しないことを見ている。またHayhoeらは正常人のリンパ球を慢性リンパ性白血病の血清中で培養しても培養成績は低下しないことも述べている。これらのことより幼若化を抑える血清中の因子は考えにくい、一方、Holt¹⁸⁾, Astaldiらは正常人のリンパ球を種々の白血病患者の血清中で培養すると芽球出現率が低下することを見、それらの血清中には幼若化を抑える因子があると予想した。また逆にKasahara¹⁹⁾は慢性リンパ性白血病の血清中に、正常人のリンパ球幼若化を促進するblastogenic factorがあると述べている。著者は慢性リンパ性白血病と再生不良性貧血のリンパ球培養をそれぞれ血清を交換して試みた。

再生不良性貧血患者の末梢リンパ球は、CooperらによるとPHAや他の抗原刺激なくしてin vitroで ^3H -TdRでラベルされるものが正常人に比して多いとされているが、市丸らは一般に再生不良性貧血例のリンパ球培養で芽球出現率が著しく高く、ほとんど全ての培養細胞は一樣に大型のリンパ胚球様細胞となることを指摘し、同疾患のリンパ球の特異性を述べている。著者も正常人においては72時間より96時間の方が培養成績はやや低下するが、再生不良性貧血例では96時間目に芽球出現率、 ^3H -TdRラベル率ともさらに上昇し、ここに出現する細胞は正常人や他の血液疾患の場合と異なつて、一樣な大型の細胞で細胞分裂も多いことを認め、再生不良性貧血のリンパ球はPHA刺激に対する反応性がきわめて高いか、その血清中に幼若化を促進する因子があるのではないかと考え、慢性リンパ性白血病との交叉培養に利用した。

その結果再生不良性貧血のリンパ球は慢性リンパ性白血病の血清によりPHA刺激に対する反応を抑制されないし、再生不良性貧血の血清中にも慢性リンパ性白血病のリンパ球の幼若化を促進する因子はないように思われる。また再生不良性貧

血と正常人および、慢性リンパ性白血病と正常人の間でリンパ球と血清の交叉培養を行なつたが、いずれも血清中に特殊の因子は認められなかつた。これらのことより慢性リンパ性白血病のリンパ球自体にPHA刺激に反応しにくい原因があると考えるのが妥当であろう。

慢性リンパ性白血病の末梢リンパ球は、PAS反応が正常リンパ球より高く、したがつて幼若化に要するenergy源をすでに蓄積していると思われるにもかかわらず、培養成績が悪いことより、幼若化にはglycogen蓄積の他に水解酵素が必要であると考えられる。慢性リンパ性白血病の培養リンパ球はPAS陽性度は増加しないし、水解酵素の増加も認められなかつたとQuaglinoは述べている。Hayhoeらは慢性リンパ性白血病においてはPHAに反応する正常のリンパ球と、leukemic lymphocytesの二つのpopulationがあり、後者はPHA刺激に対する反応をおこさせる物質が欠如しているか、水解酵素を作り出すことができないのではないかと考えている。一方、Elvesは慢性リンパ性白血病のリンパ球がPHAに反応しにくい理由として、正常人の末梢リンパ球には短寿命のもの(2週間)と、長寿命のもの(数月~数年)があり、後者のみが免疫刺激に反応しうるが、慢性リンパ性白血病では短寿命のリンパ球の寿命は85日と長くなり、長寿命のそれは逆に300日と短くなつていくというHamiltonの実験成績を基にし、免疫反応に関与しない短寿命のリンパ球が増加したため、培養成績が低下するのではないかと推論している。

著者のリンパ肉腫症例は末梢血中ほとんどのリンパ球は異常細胞であつたが、これと同様に慢性リンパ性白血病のリンパ球を腫瘍細胞と考えるならば、それらは正常の代謝を行ないえない細胞であり、したがつてリンパ肉腫の腫瘍細胞と同様PHA刺激に反応しえないと考えられるかも知れない。

しかしFliedner²⁰⁾が³H-cytidineを用いた実験で明らかにしているごとく、末梢血中リンパ球のR

NA合成は慢性リンパ性白血病の場合でも正常人の場合とほとんど同様に行なわれており、慢性リンパ性白血病の末梢リンパ球の代謝が正常リンパ球と質的に異なつていくという明確な証拠は報告されていないようである。

もしPHA刺激に対する反応能力がリンパ球のimmunocompetenceを反映しているのであれば、慢性リンパ性白血病は免疫反応性の低いリンパ球が増殖した疾患と考えても不都合ではないと思われる。いずれにせよPHAの作用機序の詳細がなお不明である現在、慢性リンパ性白血病のリンパ球PHA培養成績が低下する理由を結論づけることは困難であるが、著者は慢性リンパ性白血病のリンパ球は、異常リンパ球と正常リンパ球の二つのpopulationよりなり、異常リンパ球はPHA刺激に反応し難く、異常リンパ球の占める割合とPHA培養成績が逆相関の関係にあるのではないかと考えたい。現今利用しうる組織化学的検索ないし電顕を用いて異常リンパ球の性格をさらに明らかにして培養成績との関係を吟味し、免疫的機能の裏付けを行なつて慢性リンパ性白血病のimmunoproliferative disordersとしての性格を明確にしたいと考えている。

VI. 結 語

慢性リンパ性白血病、その他若干の血液疾患および正常人の末梢血リンパ球PHA培養を行なつた結果、慢性リンパ性白血病では芽球出現率の低下をみた。しかし培養細胞数を少なくするとある程度芽球出現率、³H-TdRラベル率が上昇することが知られた。交叉培養の結果、慢性リンパ性白血病の血清中にはPHA刺激に対する反応を抑制する因子の存在を推定せしめる結果は得られなかつた。すなわち本病ではリンパ球自体に何らかの欠陥があるものと予想された。

文 献

- 1) Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin: an initiator of mitoses in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.*, 20: 462—466, 1960. —
- 2) Astaldi, G.: PHA in treatment of aplastic anemia. *Lancet*, I: 1070, 1965. —
- 3) Quaglino,

D.: Metabolic changes in short-term 'in vitro' cultures of normal and leukaemic cells: studies with cytochemistry and autoradiography. *Current Research in Leukaemia*: 124—138, 1965. —4) 市丸道人: 培養リンパ球の組織化学的研究. *日血会誌*, 29—3 : 31, 1966. —5) Fisher, R.: Ergebnisse cytologischer und cytochemischer Untersuchungen an Lymphozyten in vitro. *Blut*, XV-3 : 129—133, 1967. —6) Elves, M.W.: The in vitro production of antibody lymphocytes. *Lancet*, I : 1292—1293, 1963. —7) Hirshhorn, K.: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science*, 142 : 1185—1187, 1963. —8) Huber, H.: Studies on protein synthesis of human lymphocytes in vitro. The lymphocyte in immunology and haematopoiesis : 92—98, 1966. —9) Astaldi, G.: PHA in leukemia. *Lancet*, I : 1934, 1965. —10) Hayhoe, F.G.J.: Studies on the transformation in vitro of lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. The lymphocyte in immunology and haematopoiesis : 66—72, 1965. —11) Oppenheim, J.J.: Immunologic and cytogenetic studies of chronic lymphocytic leukemic cells, *Blood*, XXVI-2 : 121—132, 1965. —12) Elves, M.W.: The potential of lymphocytes from patient with leuk-

emia and reticuloses to transform under the influence of PHA. *Acta haemat.*, 37 : 100—108, 1967. —13) Thomson, A.E.R.: Heterogeneity of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet*, II : 200—202, 1966. —14) Elves, M.W.: Failure of lymphocytes from hypogammaglobulinaemic subjects to transform in culture. *Lancet*, II : 1051—1052, 1964. —15) Schuler, D.: Lymphoblastic transformation in ataxia telangiectasia. *Lancet*, II : 753, 1966. —16) Hersh, E.M.: Impaired in vitro lymphocyte transformation in Hodgkin's disease. *N.E.J.M.*, 273—19 : 1006, 1965. —17) Hedeskov, C.J.: Respiration and glycolysis of normal human lymphocytes. *Blood*, XXVIII-2 : 163—174, 1966. —18) Holt, P.J.L.: Response to PHA. *Lancet*, I : 980, 1966. —19) Kasahara, S.: A plasma factor in chronic lymphocytic leukemia which stimulates DNA synthesis and blastogenesis in leukocytes cultures. *Blood*, XXIX-4 : 691, 1967. —20) Flidner, T. M.: Experimental studies on PHA stimulated lymphocytes and autotransfusion of ³H-cytidine labeled lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. The lymphocyte in immunology and haematopoiesis : 198—206, 1966.