ヒトリンパ球刺激培養上清による細胞電気泳動試験*

橋本信也**・揚塩正樹**・堀田正一**・能勢俊一**
松本尚美**・小林敏子**・阿部正和**

Summary

Change of surface charge of the tanned sheep erythrocytes added with supernatants of human lymphocytes stimulated with antigens, mitogens or immunopotentiators was investigated. In supernatants of the sensitized lymphocytes stimulated with PPD, percentage slowing of electrophoretic mobility of sheep erythrocytes were increased. In normal lymphocytes cultured with PHA and Con A, there were high percentage slowings in electrophoretic mobility test, and in immunopotentiators such as OK-432, PSK, LVS, methyl B₁₂, poly-A:U, poly-I:C and NaIO₄, percentage slowings were not significantly changed.

Percentage slowing was reduced in RA lymphocytes stimulated with PHA, but not changed in SLE lymphocytes. In normal lymphocytes incubated with Lentinan, percentage slowing value was similar to the result obtained by Con A, but it was low in lymphocytes from the patients with collagen diseases and malignancies.

In SLE lymphocytes added with DNA from calf thymus and RA lymphocytes added with human IgG, electrophoretic mobility of sheep erythrocytes delayed.

Key words: electrophoretic mobility test, tanned sheep erythrocyte, stimulated lymphocyte supernatants, immunopotentiators, collagen diseases.

はじめに

細胞電気泳動試験 (cell electrophoretic mobility test, EMT) は1970年 Field and Caspary によってマクロファージ電気泳動試験 (MEM) としてはじめて報告された¹⁾。その後 Pritchard らによる改良が試みられ²⁾、臨床面でも応用されるようになった。方法の原理は、感作リンパ球を特異抗原で刺激して培養すると、種々の生物学的活性を有する因子 (lymphokines) が遊離されるが、この因子の一つはマクロファージの電気泳動を遅延させるというものである。この因子に対して Field らは macrophage slowing factor と名づけた。この場合、マクロファージは indicator cell として用いられているわけであるが、マクロファージの多様性による電気泳動的不均一性は、この方法の問題点の一つとして指摘されていた。この問題を解決するために、Shenton らは受身血

球凝集反応に用いるタンニン酸処理ヒツジ赤血球を indicator cell として使用し、この方法をタンニン酸処理ヒツジ赤血球電気泳動試験 (tanned sheep erythrocyte electrophoretic mobility test, TEEM) と名づけた³⁾。

ヒツジ赤血球は電気泳動的に均一であり、タンニン酸処理することにより微量の蛋白質を吸着して電気泳動的变化を的確に捉えることができるから、indicator cell として優れていることがわかり、今日広く普及するようになった。MEM も TEEM も原理的には同じのものであり、indicator cell をマクロファージにするかタンニン酸処理ヒツジ赤血球にするかによる違いであり、一般に細胞電気泳動試験と呼ばれるようになった。

我々もこの方法を用いて、ヒトリンパ球を特異抗原、あるいは非特異的 mitogen で刺激し、その培養上清をタンニン酸処理ヒツジ赤血球に加えて細胞電気泳動を行い、若干の知見を得たので報告する。

* Electrophoretic mobility test by stimulated lymphocytes supernatants.

** Nobuya Hashimoto, Masaki Ageshio, Masakazu Horita, Shunichi Nose, Naomi Matsumoto, Toshiko Kobayashi, Masakazu Abe, 東京慈恵会医科大学第3内科学教室。
(受付 1983年1月11日, 受理 1983年2月22日)

材 料 と 方 法

1. ヒトリンパ球の分離

ヒトリンパ球はヘパリン加静脈血より Ficoll Conray 法による比重遠沈法により分離した. Ficoll-Conray 液は9% Ficoll 溶液 12 容と Conray 400 溶液 5 容とを混和し, 遮光冷所保存して使用した. 分離されたリンパ球は TC 199 溶液 (ペニシリン 100,000単位/ml, ストレプトマイシン 500 mg/ml が加えられ pH 7.2~7.4 に調整されたもの) に浮遊した.

2. リンパ球刺激剤

Phytohemagglutinin (PHA-P, Wellcome 社), Concanavarin A (Con A, EY Lab.), OK 432 (Picibanil, 中外製薬), PSK (Krestin, 三共製薬), Levamisole (LVS, 協和醗酵), Methyl B₁₂ (ユーザイ), Poly A-Poly U (ヤマサ醤油), Poly I-Poly C (ヤマサ醤油), Sodium Periodate (NaIO₄, Merck), Lentinan (味の素), DNA (コウシ胸腺, Sigma), ヒト IgG (KABI).

3. Indicator cells

EMT 用 indicator cell として tannic acid treated sulphosalicylic acid stabilized sheep erythrocytes (EIC, Behringwerke 社製) が用いられた. また自家作製のタンニン酸処理ヒツジ赤血球は Stavitsky の方法に準じ⁴⁾, 2.5% ヒツジ赤血球と 40,000 倍タンニン酸溶液とを37°C, 10分 incubate し, その 0.1 ml を用いた. EIC も自家作製タンニン酸処理ヒツジ赤血球も細胞電気泳動用 indicator cell としていずれも 2.5% 浮遊液が用いられた.

4. 細胞電気泳動

細胞電気泳動法の操作および条件はすでに報告したとおりである^{5,6)}. 細胞電気泳動装置は杉浦研究所製 細胞電気泳動度測定用顕微鏡 I 型を用いた. 本実験で用いた泳動管は円筒型であり, 泳動条件は 35 V, 200 μ A, 25 °C で行った. 緩衝液は Hannig らの考案した 0.015 M triethanolamine 溶液であり, その組成は以下に示すとおりである⁷⁾. 0.015 M triethanolamine, 0.01 M glucose, 0.004 M potassium acetate, 0.24 M glycine, 0.03 M sucrose を 2,000 ml の蒸留水に溶解し, 酢酸にて pH 7.2 に調整した.

細胞電気泳動試験は, Porzolt⁸⁾ や Shenton⁹⁾ の方法に準じて行った. Indicator cell の泳動遅延率 (% slowing) は次の式によって計算された.

$$\% \text{ slowing} = \frac{t_e - t_c}{t_c} \times 100$$

t_e : リンパ球刺激培養上清による indicator cell の平

均電気泳動時間 (秒).

t_c : リンパ球非刺激培養上清による indicator cell の平均電気泳動時間 (秒).

実 験 結 果

1. Indicator cell の検討

細胞電気泳動試験に用いる indicator cell の電気泳動度を測定した成績を Table 1 に示す. 未処理新鮮ヒツジ赤血球 100 個の平均電気泳動度は $-1.54 \pm 0.14 \mu\text{se}/\text{V}/\text{cm}$, 自家作製タンニン酸ヒツジ赤血球 300 個の平均電気泳動度は -1.55 ± 0.10 , EIC 510 個のそれは -1.57 ± 0.12 であった. 因みに EIC に PHA あるいは Con A を37°C, 45分加えた場合にも泳動度は変化しなかった.

Table 1. Mean electrophoretic mobility of sheep erythrocytes

Cells	Counted cell number	Electrophoretic mobility ($\mu\text{se}/\text{V}/\text{cm}$)
Fresh sheep erythrocytes	100	-1.54 ± 0.14
Tanned sheep erythrocytes	300	-1.55 ± 0.10
EIC*	510	-1.57 ± 0.12
EIC+PHA	100	-1.58 ± 0.14
EIC+Con A	100	-1.57 ± 0.18

* Tannic acid treated sulphosalicylic acid stabilized sheep erythrocytes.

2. PPD 刺激正常リンパ球培養上清による EMT

Fig. 1. % Slowing of EMT in PPD positive and negative subjects.

正常健康成人のうち、ツベルクリン反応陽性者25名、陰性者8名よりそれぞれリンパ球を分離し、リンパ球 $10^6/0.1\text{ ml}$ と PPD $100\text{ }\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ とを加え 37°C , 60分 incubate し、その培養上清をタンニン酸ヒツジ赤血球に加え細胞電気泳動を行った。ツベルクリン反応陽性リンパ球を PPD で刺激して得た培養上清による EMT の % slowing は平均 $20.64 \pm 3.03\%$ 、ツベルクリン反応陰性者では $-1.25 \pm 3.85\%$ であった (Fig. 1)。

3. PHA 刺激正常リンパ球培養上清による EMT

正常健康成人リンパ球に PHA $30\text{ }\mu\text{g}$ を加えて 37°C , 60分 incubate し、その上清に EIC を加えて細胞電気泳動を行った成績は既に報告したとおりである⁹⁾。15例についての平均遅延率は 19.0% であった。同様の実験を automated analytical particle electrophoresis として開発された Laser Zee 3000¹⁰⁾ で行った結果を Fig. 2 に示す。PHA 非添加リンパ球の培養上清を EIC に加えた平均電気泳動度は $1.283\text{ }\mu\text{sec/V/cm}$ であったが、PHA 刺激リンパ球上清を加えた EIC の平均電気泳動度は $1.076\text{ }\mu\text{sec/V/cm}$ と低下し、約 16% の遅延率を示した。

Fig. 2. EMT in normal lymphocytes stimulated with PHA by Laser Zee System 3000.

4. Con A 刺激正常リンパ球培養上清による EMT
まづリンパ球刺激に用いる Con A 濃度について検討した。Con A 濃度 $5\text{ }\mu\text{g}$ を正常健康成人リンパ球に加えた培養上清による EMT の平均遅延率は $8.55 \pm 2.47\%$ 、Con A $10\text{ }\mu\text{g}$ では $8.15 \pm 1.84\%$ であった (Fig. 3)。次に Con A 濃度 $5\text{ }\mu\text{g}$ で刺激培養時間を1時間と48時間で検討してみると、その平均遅延率は前者で $8.55 \pm 2.47\%$ であるのに対し、48時間培養では $9.60 \pm 2.52\%$ であった (Fig. 3)。

Fig. 3. Effect of incubation time and concentration of Con A on % slowing.

5. 各種免疫調節剤刺激正常リンパ球培養上清による EMT

1) OK-432: 正常健康成人リンパ球に OK-432 を加え 5% CO_2 の下で 37°C , 24 時間培養し、その培養上清について EMT を行った。OK-432 濃度を $1/400\text{ KE}$, $1/80\text{ KE}$, $1/40\text{ KE}$, $1/20\text{ KE}$, $1/10\text{ KE}$ にして遅延率への影響を検討した。Fig. 4 に示す如く平均遅延率はそれぞれ -1.77 , -5.90 , -0.34 , 0.66 , 1.83% であった。

2) PSK: PSK $1\text{ }\mu\text{g}$ を正常健康成人リンパ球に加えて、その培養上清について EMT を行った。12 例の平均遅延率は $0.94 \pm 6.70\%$ であった (Fig. 5)。

3) Levamisole: LVS $1\text{ }\mu\text{g}$ で正常健康成人リンパ球

Fig. 4. Effect of concentration of OK-432 on % slowing of EMT.

Fig. 5. % Slowing of EMT in the normal lymphocytes stimulated with immunopotentiators.

を刺激した培養上清による EMT の平均遅延率は、0.83 ± 2.21% であった (Fig. 5).

4) Methyl B₁₂ : Methyl B₁₂ 10 μg 刺激正常リンパ

球培養上清では平均遅延率 0.75 ± 13.37% であったが、22 例における遅延率に大きなバラツキが認められた (Fig. 5).

5) Poly A:U : Poly A:U 2 μg で正常健康成人リンパ球を刺激し、その培養上清による EMT の平均遅延率は -1.36 ± 1.28% であった (Fig. 5).

6) Poly I:C : Poly I:C 2 μg 刺激正常リンパ球上清では平均遅延率 2.34 ± 0.77% であった (Fig. 5).

7) Sodium periodate : NaIO₄ 5 mM で正常リンパ球を刺激した培養上清による EMT の平均遅延率は 2.78 ± 5.30% であった (Fig. 5).

6. 免疫調節剤刺激リンパ球の Con A 前処理による影響

正常健康成人リンパ球に予め Con A 5 μg を加えて 37°C, 1 時間 incubate し、そのリンパ球に更に OK-432 1/10 KE, PSK 1 μg, LVS 1 μg をそれぞれ加えて 5% CO₂ のもとで 37°C, 24 時間培養し、これらの培養上清を用いて EMT を行った. その平均遅延率はそれぞれ 9.63 ± 3.29, 6.56 ± 6.23, 5.36 ± 4.81% であった (Fig. 6).

Fig. 6. % Slowing of EMT in the normal lymphocytes stimulated with con A and immunopotentiators.

7. 各種疾患患者リンパ球刺激培養上清による EMT
1) SLE および RA 患者リンパ球の PHA 刺激.
全身性エリテマトーデス (SLE) 患者リンパ球 (6

Fig. 7. % slowing of EMT in PHA stimulated lymphocytes from RA & SLE patients.

例). 慢性関節リウマチ患者リンパ球 (10 例) をそれぞれ PHA 30 μ g とともに 37°C, 1 時間培養し, その培養上清を用いて EMT を行った. 結果は Fig. 7 に示す如く, 平均遅延率は SLE で $16.03 \pm 8.48\%$, RA で $14.36 \pm 7.85\%$ であった.

2) SLE および RA 患者リンパ球の Con A 刺激.

Fig. 8. % Slowing of EMT in Con A stimulated lymphocytes from RA & SLE patients.

同様に SLE 患者 (5 例) と RA 患者 (8 例) のリンパ球を Con A 5 μ g で 1 時間刺激し, その培養上清による EMT では, 平均遅延率はそれぞれ 11.16 ± 1.66 , $9.46 \pm 1.89\%$ であった (Fig. 8).

3) 癌患者リンパ球の OK-432, PSK および LVS 刺激.

化学療法あるいは放射線治療施行中の癌患者 (肺癌, 乳癌, 子宮癌, 喉頭癌, 肝癌) リンパ球を OK-432, PSK, LVS でそれぞれ刺激して得た培養上清で EMT を行った. 結果は Fig. 9 に示す如く, OK-432 刺激では対照の 1.83% に対し, 癌患者リンパ球では平均遅延率は $-6.07 \pm 3.67\%$ であった. PSK 刺激では $-4.16 \pm 8.27\%$, LVS では $-2.27 \pm 4.39\%$ を示した.

Fig. 9. % Slowing of EMT in the lymphocytes from normal human and cancer patients stimulated with OK-432, PSK and LVS.

8. Lentinan 刺激リンパ球培養上清による EMT.

Lentinan 10 μ g を正常健康成人リンパ球に加えその培養上清で EMT を行ったときの平均遅延率は $7.41 \pm 4.64\%$ であった (Fig. 10).

次に膠原病患者 (SLE 4 例, RA 8 例, 多発性筋炎 1 例, 進行性強皮症 3 例, Sjögren 症候群 2 例) リンパ球を Lentinan で刺激した培養上清では平均遅延率 $0.81 \pm 4.01\%$ を示した (Fig. 10). その疾患別遅延率を Table 2 に示す. 更に各種悪性腫瘍患者リンパ球を Lentinan で刺激した培養上清について行った EMT の

Fig. 10. % Slowing of EMT in the lymphocytes from the normal, collagen diseases and malignancies stimulated with Lentinan.

Table 2. % Slowing of EMT in the lymphocytes from collagen diseases and malignancies stimulated with Lentinan.

Diseases	No.	% Slowing	Mean $\pm$ SD
SLE	4	0.793	0.81 ± 4.01
RA	8	0.741	
PM	1	10.78	
PSS	3	-0.12	
Sjögren	2	-2.85	
Gastric ca	2	-0.59	-1.32 ± 2.72
Pulm. ca	2	-3.40	
Breast ca	2	-0.05	
Pancreas ca	1	-4.76	
Colon ca	1	1.28	
Clear cell ca	1	0.31	
Pharyng. ca	2	1.20	
Hodgkin	1	4.39	
Non Hodgkin	2	-3.80	
Myeloma	5	-2.66	

平均遅延率は $-1.32 \pm 2.72\%$ であった (Fig. 10, Table 2).

9. DNA 添加リンパ球培養上清による EMT

正常健康成人リンパ球に DNA 100 μ g を加えて培養

Fig. 11. % Slowing of EMT in normal and SLE lymphocytes stimulated with DNA.

し、その上清で EMT を行くと、遅延率は $-24.01 \pm 3.59\%$ となり、EIC の泳動は明らかに速くなった (Fig. 11). SLE 患者リンパ球では平均遅延率 $-12.70 \pm 6.10\%$ を示した。因みに EIC に DNA のみを加えて細胞電気泳動を行うと、遅延率は -24.33% となり、DNA 添

Fig. 12. % Slowing of EMT in normal and RA lymphocytes stimulated with IgG

加正常リンパ球培養上清による遅延率 -24.01% と変らないことが認められた。

10. IgG 添加リンパ球培養上清による EMT

ヒト IgG $100\ \mu\text{g}$ を正常リンパ球に加えて培養した上清による EMT の平均遅延率は $31.76 \pm 5.30\%$ であった。RA 患者 8 例のリンパ球について同様のことを行くと、その平均遅延率は $39.84 \pm 7.16\%$ と大きくなった (Fig. 12)。なお IgG 単独で EIC に加えたときの遅延率は 32.93% で IgG 添加正常リンパ球培養上清による EMT の遅延率と変らなかった。

考 察

感作リンパ球と対応抗原とを *in vitro* で反応させると、種々の生物学的活性を有する因子 (lymphokines) が遊離されることはよく知られている。この因子をモルモットマクロファージに作用させ、マクロファージの細胞電気泳動的变化を観察する方法はマクロファージ細胞電気泳動試験として 1970 年、Field and Caspary によって始めて報告された¹⁾。マクロファージはモルモット腹腔内に流パラを投与し、4~10日後に採取して得られたものを使用するが、Pritchard らは自己のリンパ球との interaction を防ぐため、200 rad の放射線照射を行った Mod-MEM test を推奨した²⁾。しかしマクロファージは電気泳動的に不均一性が強く indicator cell として不適当であることが指摘された。Shenton らはこの点を詳細に検討し、モルモット腹腔内より採取したマクロファージを、大きさ、パラフィン油滴存在の有無により 7 つのタイプに分類し、タイプ 4 (直径 $16\ \mu$, パラフィンを 2~3 滴貪食したもの) が indicator cell としてもっとも適当であることを報告した¹¹⁾。このことから彼らは MEM test ではマクロファージの選択は十分吟味すべきであることを強調した。しかし、実際問題としてマクロファージをこのように選択しながら MEM-test を行うことにはかなりの困難さを伴い、この点を解決したのがタンニン酸ヒツジ赤血球である。

Indicator cell としてタンニン酸ヒツジ赤血球を用いることを最初に報告したのは Porzolt らである^{8,12)}。この方法は直ちに Jenssen and Shenton によって追試され¹³⁾、更に Shenton らによって詳細に MEM-test との比較検討が行われた³⁾。MEM-test にせよ EMT にせよ indicator cell の泳動遅延を惹き起す因子が何であるかという問題は興味のあるところである。現在、この因子は electrophoretic slowing factor といわれ lymphokines の 1 種であると考えられているが、Shenton らに

よれば、マクロファージ遅延因子もタンニン酸ヒツジ赤血球泳動遅延因子もほぼ同じ物理化学的性質をもった分子量 $13,000 \sim 15,000$ の物質であるという³⁾。同様のことは Jenssen らも検討しており、MEM test において、モルモット感作リンパ球と PPD との培養上清を Sephadex G-75 で分画すると、マクロファージ泳動遅延活性因子は、分子量 $13,000$, $14,000$, および 10 万以上の 3 つの分画に認められたという¹⁴⁾。

一方、赤血球に種々の抗原性物質が吸着することは古くから知られており、Boyden は、Middlebrook-Dubos 反応を検討中、赤血球をタンニン酸溶液で処理すると、蛋白質抗原を容易に吸着することを見いだした¹⁵⁾。Stavitsky はこの方法を用いてジフテリア抗毒素の検出を行い、 $0.001\ \mu\text{g}/\text{ml}$ という微量の抗体を定量しうることを報告した⁴⁾。こうした事実からヒントを得て、感作リンパ球刺激培養上清中に遊離された lymphokines をタンニン酸処理ヒツジ赤血球に吸着させて、その表面荷電密度の変化を電気泳動的に捉えようと考えたことは、極めて理にかなったものといえよう。かくして Behringwerke 研究所の Ax によりタンニン酸処理スルフォサリチル酸安定化ヒツジ赤血球 (tannic acid treated sulphosalicylic acid stabilized sheep erythrocytes, ETS) が作られ、EMT 用 indicator cell (EIC) としてマクロファージに代って広く使用されるに至ったのである。本法に羊赤血球を用いることにより、マクロファージ使用の煩雑さはなくなり、結果の再現性も図られるようになった¹⁶⁾。

そこで我々も本実験を行うにあたっては、まず indicator cell の検討を行った。Stavitsky の方法に準じて作成したタンニン酸処理ヒツジ赤血球と Behringwerke より供給された EIC の平均電気泳動度との間には差がなかった。タンニン酸処理をしない新鮮ヒツジ赤血球の泳動度とも差のみられないことから、タンニン酸処理による赤血球表面の荷電密度への影響はないことが認められ、Harlos and Weiss らの所見と一致した¹⁷⁾。また PHA や Con A 添加による EIC の電気泳動的变化を調べてみると、添加後 1 時間では影響がみられなかった。同様のことは Holtz らも認めておりヒトリンパ球に PHA を加えて 3 日後の幼若化を起こしたときには泳動度の低下がみられるが、PHA 添加後 3 時間位までは泳動度に変化がみられなかったという¹⁸⁾。

そこで次に、リンパ球を特異抗原、非特異的 mitogen あるいは免疫調節剤で刺激して得た培養上清を EIC に加えて、EIC の細胞電気泳動的变化を検討した。まづツ

ベルクリン陽性者リンパ球に PPD を加えて得た上清について行った EMT の遅延率は $20.64 \pm 3.03\%$ (25 例の平均) であったが、ツベルクリン陰性者 (5 例) リンパ球に PPD を加えた上清による EMT では遅延率 $-1.25 \pm 3.85\%$ と明らかにツベルクリン反応陽性者リンパ球で遅延率の増加が認められた。このことは、感作リンパ球と PPD との *in vitro* の反応により、上清中に EIC 泳動遅延因子が存在することを示唆するものである。

非特異的 mitogen である PHA で正常リンパ球を刺激した場合の平均遅延率は $19.00 \pm 3.65\%$ であり、反応時間を長くすることによって遅延率も増大した⁹⁾。そこで同様のことを最近開発された automated analytical particle electrophoresis (Laser Zee System 3000) を用いて行ってみると、PHA 非添加リンパ球培養上清による EIC の泳動度は $1.283 \mu\text{sec/V/cm}$ 、PHA 刺激リンパ球培養上清では $1.076 \mu\text{sec/V/cm}$ と 16% の遅延率が認められた。自動化細胞電気泳動装置は西独や米国で活発に研究開発が行われており¹⁹⁾、我が国においてもこの種の装置の研究が望まれるところである。マイクロコンピューターを装着したこれらの自動化細胞電気泳動装置は、数分間で $10^4 \sim 10^6$ 個の細胞電気泳動度を測定し直ちに histogram を記録するという驚異的なものであり、今後装置の改良が進むにつれて普及することであろう。

次に Con A で正常リンパ球を刺激した場合について検討した。Con A 濃度 $5 \mu\text{g}$ 、 $10 \mu\text{g}$ では反応時間が 1 時間では有意の差がみられず、また反応時間 1 時間と 48 時間では PHA 同様、反応時間が長くなると遅延率は増加した。

OK-432 (Picibanil) で正常リンパ球を刺激した場合の EMT を濃度別に調べてみたが、1/400 KE から 1/10 KE までの間で著明な遅延率の変化はみられなかった。1/10 KE OK-432 刺激リンパ球培養上清を加えて EIC で僅かに泳動遅延の傾向が認められたが、有意とはいえない。同様に PSK (Krestin), Levamisole, Vit B₁₂, Poly A:U, Poly I:C, NaIO₄ について行った結果でも、いずれも著明な遅延率の増加は認められなかった。これらの免疫調節剤のうち、Vit B₁₂ に対する反応性は多少異なり、遅延率 -26.02% から 23.43% まで極めて広い範囲にわたったことは特徴的であったが、その理由は不明である。これら免疫強化剤、免疫調節剤を用いて種々の細胞性免疫能を検討した諸家の成績をみると、悪性腫瘍患者に OK-432 を投与した場合、投与後の患者リ

ンパ球の PHA, Con A に対する反応性は増加したという報告²⁰⁾、とくに差はなかったという報告²¹⁾、更に 3 M KCl 癌組織抽出抗原を用いた LMT で OK-432 投与群と非投与群とを比較したとき投与群で遊走指数が軽度低下をみたという報告²¹⁾ などがある。PSK についても PSK 1 mg 刺激リンパ球 5 日培養後、³H-thymidine のとり込みが増加したという報告²²⁾があり、LVS 10^{-8} mg 刺激でリンパ球の PHA に対する反応性は増加したという²³⁾。更に methyl B₁₂ は LPS によるリンパ球幼若化反応にはほとんど影響を及ぼさないが、Con A による刺激には亢進を示したという²⁴⁾。また体液性免疫能や細胞性免疫能を促進するといわれる Poly A:U についても、SLE 患者リンパ球を刺激して ³H-thymidine のとり込みをみた報告では反応が促進するといわれ²⁵⁾、インターフェロンを誘導するとされている Poly I:C で SLE 患者リンパ球を刺激すると、同様に ¹⁴C-thymidine のとり込みが促進するといわれている²⁵⁾。また、NaIO₄ でマウス脾細胞を刺激すると MIF の遊離が認められたという²⁶⁾。このような各種免疫調節剤、強化剤を用いた成績と今回の我々の EMT による結果が一致しなかったことは、刺激物質の濃度、反応時間、リンパ細胞の種や由来臓器の差によることが考えられ、今後 EMT についてこの点を精細に検討する必要がある。なおリンパ球を Con A であらかじめ刺激しておき、更にこれに OK-432, PSK, LVS を加えて行った EMT でも、OK-432 を加えた場合のみ Con A 単独刺激に比してやや平均遅延率の増加をみたが有意とはいえない結果であった。

次に各種疾患患者リンパ球で検討した。まづ SLE 患者リンパ球を PHA で刺激した成績では遅延率 16.03% で正常リンパ球の場合とほぼ同じ値を示した。SLE 患者リンパ球を PHA で刺激した諸家の成績をみると、正常対照と変らないという報告^{27-30, 34)} 軽度の反応低下がみられたという報告³¹⁾ があって一定していない。また RA 患者リンパ球を PHA で刺激した場合の EMT の成績は平均遅延率 14.36% で正常リンパ球の 19% に比してやや低値を示した。RA 患者リンパ球を PHA で刺激して ³H-thymidine とり込みを検討した成績をみると、SLE 同様正常リンパ球と変らないという報告^{32, 33)} もあるが、反応性は低下するという報告の方が一般には支持されている^{34, 35)}。

同様のことを Con A について行ってみると、SLE 患者リンパ球では EMT の遅延率 11.16%、RA 患者リンパ球では 9.46% を示し、正常リンパ球の遅延率 8.55% より僅かに高い値を示した。この点についても、

Con A 刺激 SLE,あるいは RA リンパ球の ^3H -thymidine とり込みをみた報告によると, 正常対照と比して余り変化ないか低いという^{25,34)}.

悪性腫瘍患者リンパ球に OK-432, PSK, LVS などの免疫強化剤, 調節剤を加えた培養上清で EMT を行った成績は, 正常対照に比して明らかに泳動遅延率の低下が認められた. このことは正常リンパ球では免疫強化剤添加によって培養上清中に electrophoretic slowing factor が遊離されないか, 遊離されても極く僅かであるのに対し, 癌患者リンパ球では, これら免疫強化剤添加によって EIC の泳動を促進する factor が遊離する可能性が示唆されるが, その機序は現在のところ不明である. 前にも述べたように免疫強化剤を加えた癌患者リンパ球の *in vitro* における反応性はさまざまであり, その亢進, 低下にはいろいろな因子が関与することが想像され一概に結論を下すことは困難であり, 今後更に詳細な検討が必要である.

上にのべた免疫強化剤とやや異った結果は Lentinan に対する反応性である. Lentinan は *Lentinus edodes* より抽出された多糖体であるが, 正常リンパ球を Lentinan で刺激して得た培養上清による EMT の遅延率は 7.41% で, Con A のそれとほぼ同じ値であるが, 膠原病患者リンパ球では 0.81%, 悪性腫瘍患者リンパ球では -1.32% と全く EIC の泳動遅延は認められなかった. このことは正常リンパ球では Lentinan 添加により electrophoretic slowing factor の放出がみられたが, 膠原病や悪性腫瘍リンパ球ではその放出がみられないことを示唆している. 一般に Lentinan は正常動物の細胞性免疫能には影響を与えず, 細胞性免疫能の低下した担癌動物ではそれを亢進させる作用があるといわれている³⁶⁾. 我々の実験結果では癌患者末梢血リンパ球を Lentinan で刺激しても EIC の泳動が影響を受けなかったことは EMT が細胞性免疫能のある一面だけを捉えているのかもしれないし, 対象となった担癌患者の病像, 治療状態などにも左右されていることが想像される.

次に SLE 患者リンパ球をコウシ胸腺由来の DNA で刺激した培養上清による EMT の成績を考察する. この場合, 正常リンパ球に DNA を加えた培養上清による EMT の遅延率は -24.01%, DNA 単独で EIC に加えたときの遅延率は -24.33% と両者ともに泳動の促進がみられた. しかし SLE 患者リンパ球に DNA を加えた培養上清による EMT では遅延率は -12.70% と泳動促進が抑制された. 一般に SLE リンパ球は DNA で感作されていることが知られており, MIT や LIT の

結果でも陽性を示すことが報告されている^{37,38)}. また RA 患者リンパ球に IgG を加えて培養した上清による EMT の遅延率は 39.84% と著明に高値を示した. この場合, 正常リンパ球に IgG を加えた遅延率は 31.76%, IgG 単独でも 32.93% と大きい値を示すことは注意すべきことである. しかし, RA リンパ球の IgG 添加による遅延率は, 正常リンパ球に IgG を加えたときに比して, 約 25% の遅延を示したことになり, EMT の有用性を物語るものと思われる. SLE 同様, RA リンパ球を IgG で刺激した MIT や LIT の成績も陽性報告が多いことはよく知られていることである^{39,40)}.

これまで述べてきた成績は, すべて末梢血全リンパ球について行ったものである. これらリンパ球は T リンパ球, B リンパ球別に行う検討が当然必要であろう. また免疫強化剤や調節剤でリンパ球を刺激する際, その濃度や反応条件など基礎的検討も吟味されねばならない. いずれにせよ EMT の研究は我が国ではその緒についたばかりである. 現在, 大川ら⁴¹⁾, 岩口ら⁴²⁾によっても精力的な研究が行われており, 細胞電気泳動装置の改良と相まって, 将来, 臨床免疫学領域の有力な武器になることが期待される.

結 論

細胞電気泳動試験 (EMT) によりヒトリンパ球に PPD, PHA, Con A, OK-432, PSK, LVS, methyl B₁₂, Poly A:U, Poly I:C, NaIO₄, Lentinan, DNA, IgG を加えて培養し, その上清を EIC に加え, EIC の電気泳動的变化を検討した.

ツベルクリン反応陽性リンパ球に PPD を加えたとき遅延率の増加がみられた. PHA, Con A 刺激正常リンパ球でも遅延率の増加がみられた. OK-432, PSK, LVS, Poly A:U, Poly I:C, methyl B₁₂, NaIO₄ 添加リンパ球培養上清では EMT に著明な変化はみられなかった.

PHA 刺激 SLE リンパ球でも EMT の遅延率に変化はみられなかったが, PHA 刺激 RA リンパ球では軽度の低下がみられた. Con A 刺激 SLE および RA リンパ球培養上清による EMT では, 正常リンパ球の遅延率よりやや高い値を示したが著明な差とは考えられなかった.

OK-432, PSK, LVS 添加癌患者リンパ球の培養上清による EMT では, むしろ正常リンパ球に比して遅延率の低下がみられた.

Lentinan 添加正常リンパ球培養上清による EMT の

遅延率はCon A 刺激正常リンパ球のそれとほぼ同じ値を示したが、膠原病患者および悪性腫瘍患者リンパ球では逆に低値を示し、とくに悪性腫瘍リンパ球でその傾向が強かった。DNA 添加 EIC では泳動促進がみられたが、SLE リンパ球に DNA を加えたときの EMT では泳動促進が抑制された。IgG 添加 EIC では泳動遅延がみられたが、RA リンパ球に IgG を加えたときの EMT では泳動遅延は更に著明であった。

本論文は第27回～第31回電気泳動学会春季大会および第28回～第31回電気泳動学会総会において発表したものをまとめたものである。

文 献

- 1) Field, E.J. and Caspary, E.A. : *Lancet* **ii** : 1337, 1970.
- 2) Pritchard, S.A.V. et al. : *Brit. J. Cancer* **28** (Suppl 1) : 229, 1973.
- 3) Shenton, B.K. et al. : *J. Immunol. Methods* **14** : 123, 1977.
- 4) Stavitsky, A.B. : *J. Immunol.*, **72** : 360, 1954.
- 5) 橋本信也他 : 生物物理化学, **18** : 241, 1974.
- 6) 橋本信也 : 臨床検査, **23** : 888, 1979.
- 7) Hannig, K. : *Method in microbiology*, vol **5 B** (ed. by Norris & Ribbons) N.Y. Academic Press, 1971, p. 513.
- 8) Porzolt, F., et al. : *Behring. Inst. Mitt.*, **57** : 128, 1975.
- 9) 橋本信也他 : 医学のあゆみ, **110** : 409, 1979.
- 10) 橋本信也 : 生物物理化学, **24** : 209, 1980.
- 11) Shenton, B.K., et al. : *Brit. J. Cancer* **28** (Suppl 1) : 215, 1973.
- 12) Porzolt, F., et al. : *Z. Immun. Forsch.*, **147** : 357, 1974.
- 13) Jenssen, H.L. and Shenton, B.K. : *Acta Biol. Med. Germ.*, **34** : 29, 1975.
- 14) Jenssen, H.L., et al. : *Acta Biol. Med. Germ.*, **35** : 1499, 1976.
- 15) Boyden, S.U. : *J. Exp. Med.*, **93** : 107, 1951.
- 16) Ax, W. : *Immunodiagnosis and Immunotherapy of Malignant Tumor* (ed. by Flad, H. D., Herfath, Ch. and Betzler, M.) Springer Verlag, Berlin 1979, p. 169.
- 17) Harlos, J.P. and Weiss, L. : *Int. J. Cancer* **21** : 413, 1978.
- 18) Holtz, G. and Kühnl, P. : *Z. Immun.-Forsch.*, **144** : 11, 1972.
- 19) Preece, A.W. and Light, P.A. : *Cell Electrophoresis in Cancer and Other Clinical Research*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam 1981, p. 257.
- 20) 星野 孝他 : 臨床免疫, **8** : 1105, 1976.
- 21) 谷内 昭他 : 癌と化学療法, **5** : 87, 1978.
- 22) Ohno, R. et al. : *Gann*, **67** : 713, 1976.
- 23) Wybran, J. and Govaerts, A. : *Europ. J. Cancer* **13** : 469, 1977.
- 24) 滝本義一他 : 医学のあゆみ, **112** : 588, 1980.
- 25) Senyk, G. et al. : *Arth. Rheum.* **17** : 553, 1974.
- 26) Bressler, J.P., et al. : *Cell. Immunol.*, **54** : 274, 1980.
- 27) Patruco, A. and Rothfield, N.F. : *Arth. Rheum.* **10** : 32, 1967.
- 28) 矢野啓介他 : 臨床免疫, **5** : 343, 1973.
- 29) Goldman, J.A. et al. : *J. Clin. Invest.*, **51** : 2669, 1972.
- 30) Horwitz, D.A. : *Arth. Rheum.*, **15** : 353, 1972.
- 31) 大久保充人他 : 日本内科学会誌, **57** : 758, 1968.
- 32) Kacaki, J.N. and Bullock, W.E. : *Lancet* **i** : 1289, 1968.
- 33) Waxman, J. et al. : *Arth. Rheum.*, **16** : 499, 1973.
- 34) 谷本潔昭, 堀内淑彦 : 日本臨床, **36** : 950, 1978.
- 35) 荏原忠夫 : 免疫と疾患, **1** : 439, 1981.
- 36) 椎尾 剛 : 第34回日本癌学会総会記事, p. 83, 1975.
- 37) Bartfeld, H. and Atovatan, T. : *Arth. Rheum.*, **14** : 369, 1971.
- 38) Abe, T. et al. : *Arth. Rheum.*, **16** : 688, 1973.
- 39) Froland, S.S. and Gaarder, P.I. : *Lancet* **i** : 1071, 1971.
- 40) Rothenberger, W. : *Klin. Wschr.* **50** : 1019, 1972.
- 41) 大川公康他 : 生物物理化学, **25** : 187, 1981, **26** : 60, 1982, **26** : 300, 1982.
- 42) 岩口孝雄他 : *Gann*, **65** : 561, 1974.