

氏 名 (本籍) ^す鈴 ^き木 ^{ひろ}勃 ^し志

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 1 3 5 9 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 5 6 年 9 月 9 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 4 6 年 3 月
 東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 リンパ球培養における全血培養法の微量化と
 赤血球及び単球の影響について

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 後 藤 由 夫 教 授 涌 井 昭

 教 授 橘 武 彦

論文内容要旨

はじめに

リンパ球はレクチンや特異抗原の刺激により増殖することが知られている。ヒト末梢血リンパ球のレクチンに対する反応は、人体の免疫状態を把握する場合に極めて有用である。また免疫反応にはMφの関与、血中に存在するリンパ球幼若化阻止及び促進因子が以前から知られている。従って、通常用いられているFicoll-Isopaqueにより分離されたリンパ球の反応性は、必ずしも生体の免疫反応を表現しているとは限らない。そこで、血中のリンパ球と血清を分離せず、ヒト末梢血に直接レクチンを加える、いわゆる全血培養法を試みた。その特徴として1) 比較的少量の血液で済む、2) 手技が簡単、3) 短時間で培養系に移行させ得る、4) より生理的条件である事が挙げられる。しかし、全血法では赤血球や単球などによる影響が考えられ、これらの点に対する検討が必要である。本研究では、全血培養法及び培養終了時のリンパ球反応に及ぼす影響の検討とを行なった。

材料と方法

レクチンとしては、PHA-P, Con A, PWMを用いた。リンパ球回収の薬剤として文献的にみられる酢酸、三塩化酢酸、低張食塩水、蒸留水、サポニンとホルマリンにつき検討した。全血培養は、男女各6名の静脈血の2倍稀釈系列を作り、PHAも同様に終濃度 $3.75 \sim 60 \mu\text{g}/\text{ml}$ となる様2倍稀釈系列を作り、プレート上に $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し、両者の全ての組合せを作った。CO₂ incubatorで3~7日間培養し、³H-TdRの24時間パルスをした。赤血球の影響をみるために、赤血球とリンパ球 $1.5 \sim 6 \times 10^7$ 、リンパ球 $0.5 \sim 4 \times 10^4$ となる全ての組合せをプレート上に作り、同時に培養した。また赤血球膜を分離し、PHA刺激の実験系に加えた。赤血球に結合した、いわゆるinsoluble PHAとその後上清中に含まれるsoluble PHA刺激に対する反応も検討した。単球への依存性については、insoluble PHAとsoluble PHA刺激より検討した。また、全血培養と分離リンパ球培養とを健常人17名について同時に行ない検討した。

成績・考按

酢酸や三塩化酢酸による回収では、溶血が不十分で、グラスフィルターのかっ色調が非常に強く、低張食塩水や蒸留水ではかっ色調は弱い、赤色調が認められ、またリンパ球の回収率は生食を100%とした場合、80%以下であった。従って、これらの薬剤や低張食塩水、蒸留水では、溶血及びリンパ球の回収が不十分であった。これに対し、サポニンとホルマリン即ち溶血剤と細

胞固定剤との組み合わせでは、回収率が90～98%と高く、吸引時のフィルターの色調も非常に薄く、使用に耐えられると思われた。結局、回収率の安定性から、サポニン0.1%、ホルマリン1%の組み合わせが至適条件であった。全血培養法によるPHAに対する反応は、PHA濃度60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 16倍稀釈血液、5日間培養が最適であった。16倍稀釈血液の条件下にCon A, PWMについて至適濃度及び培養期間を検討した。Con Aでは20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で5日間培養、PWMでは40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で7日間培養が至適条件であった。リンパ球と赤血球の種々の細胞濃度の組合せを作り、PHA 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で刺激した結果、リンパ球が多い場合には、より少ない赤血球の添加で、リンパ球が少ない場合には、より多い赤血球の添加で高い反応値が得られ、しかも赤血球を加えないコントロールよりも高い反応値を示した。全血培養の条件の16倍稀釈血液中のリンパ球に相当する 1×10^4 ないし 2×10^4 の条件では、やはり16倍稀釈血液中の赤血球に相当する 3×10^7 で、それぞれ42.359 cpm, 76.665 cpmと最高値を示した。また、リンパ球が 2×10^4 の条件でも、赤血球が 1.5×10^7 と半分の条件では58.419 cpmと76%に反応が低下し、全血法により、リンパ球反応を評価する場合には、赤血球数も考慮する必要があると考えられた。赤血球膜を400 $\mu\text{g} \cdot \text{prot.}/\text{ml}$ の条件下で加えても、やはりリンパ球反応は2～5倍増加した。Insoluble PHAによる刺激では、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でinsolubleとした条件から、5000 cpmとリンパ球反応が増加し、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で31,000 cpmの最高値が得られた。Soluble PHAでは15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで急激に反応が増加し、PHAの刺激形態より、リンパ球刺激効果が異なるものと考えられた。リンパ球反応の単球に対する依存性は、insoluble PHA刺激よりもsoluble PHA刺激においてより強く、insoluble PHA刺激においても、低濃度のPHAと赤血球を結合させた場合、高濃度のPHAを結合させた場合よりも強かった。従って全血法においても、単球は重要な働きをしているものと考えられた。培養条件は異なるが、全血培養と分離リンパ球の培養とを同時に行ない、比較したところ相関係数0.79と1%以下の危険率で有意の正の相関を示した。この事から、全血培養法は、レクチンによりT細胞を刺激するルーチンの検査法として十分耐えられると考えられた。

審査結果の要旨

ヒト末梢血リンパ球のレクチンに対する反応の測定は人体の免疫状態を知るのに有用である。この研究は、リンパ球と血清を分離せずに、末梢血に直接レクチンを加える全血培養法を試み、培養終了時のリンパ球回収の条件、赤血球や単球のリンパ球反応に及ぼす影響について検討したものである。方法としては、レクチンとしてPHA-P, Con A, PWMを用い、リンパ球の回収には酢酸、三塩化酢酸、低張食塩水、蒸留水、サポニン、ホルマリンなどを用いた。全血培養は男女各6名の静脈血とPHAの2倍希釈系列を作ってプレートに分注、両者のすべての組合せを作り、炭酸ガス培養器内で3～7日間培養、 ^3H -TdRを24時間パルスした。さらに赤血球膜、単球に対する依存性も検討しつぎの成績を得たという。リンパ球の回収には十分な溶血と高いリンパ球の回収率が必要であり、この目的にはサポニン0.1%とホルマリン1%の組合せが最適である。全血培養は16倍希釈血液、PHA 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Con A 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で5日間培養、PWMは40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で7日間培養が至適である。赤血球や赤血球膜を加えてPHAで刺激すると数倍以上のリンパ球反応の増強がみられ、単球に対する依存性はsoluble PHA刺激でより著明になる。分離リンパ球培養と全血培養とは相関係数0.79と有意の正相関を示すという。

この研究はレクチンによりT細胞を刺激する検査法としての全血培養法を確立したものであり、学位授与に値する。