

リンパ球膜の抗原性に関する研究

第 1 編

リンパ球膜の分離・精製法の検討と家兔感作実験

岡山大学平木内科教室 (主任: 平木潔 教授)

小 橋 秀 広

(昭和50年12月27日受稿)

I 緒 言

リンパ球を膜表面形質の差を利用して、胸腺由来リンパ球 (thymus-derived lymphocyte) と骨髄由来リンパ球 (bone marrow-derived lymphocyte) の二種類に大別しよう¹⁾ことが判明して以来、ヒト²⁾やマウス³⁾でT細胞、B細胞の分類が試みられるとともに、リンパ球膜表面 receptor の mitogen に対する反応性が種々^{4)~6)}調べられてきた。これらのT細胞、B細胞の組織分布についても研究が展開されるようになってきたが、胸腺にはT細胞がリンパ腺や脾臓には、T、B両細胞が存在することが明らかになってきた。

ところで、リンパ球の膜表面形質の差が本当に免疫学的活性の差の表現に連なりうるかどうかを検討する目的で、著者は胸腺ならびにリンパ腺からリンパ球膜を分離して、家兎へ静注もしくは皮下注射することによって生ずる宿主リンパ組織の変化と抗体発生の検討をおこなったので報告したい。

II 材料と方法

1) リンパ球膜の分離法:

腸間膜リンパ腺は成牛、胸腺は仔牛を屠殺直後に摘出して水中に保ってもち帰り、リンパ腺ならびに胸腺周辺の脂肪と血管結合組織を十分に剝離する。リンパ腺と胸腺の縦軸にそって、1 mmの厚さにスライスし、あらかじめ0℃に冷却した生食液の中で、試験管の口で叩きながら、リンパ球を組織からはずした。このリンパ球浮遊生食液を18 meshの plastic 罫で濾過し、リンパ球 5×10^8 /10 ml に対して、0.001 M ZnCl₂ 90 ml を加えて、室温10分放置、これに5 ml の1% Tween-20を加えながらゆっくり攪拌2分後

に0.01 M ZnCl₂を5 mlの割合で加え4℃に数時間放置する。次にプラスチック容器に入れたままで、dryice-acetone 中で急冷し、次の実験に供えて-80℃の超低温槽に貯蔵する。恒温槽に100℃の熱湯を用意しプラスチック容器をこれに浸して急速に溶解せしめ、氷塊消失とともに恒温槽からとり出して氷水に浸す。0℃のリンパ球浮遊生食液を氷水中に保った Potter-Elvehjem 型 Teflon-homogenizer (loose fitting) で5分間 homogenize する。このリンパ球 homogenate 110 ml に対し同量の60%蔗糖液を加えて攪拌する。Polystyrene 遠心管を用いて、この混合液55 ml を、45%蔗糖液40 ml の上に重層する。400 × g, 30分遠心して上清を他の遠心管へ移す。リンパ球膜の収量を増すためにこの中間層をもう1度45%蔗糖40 ml に重層して1000 × g, 20分間遠心し、この上清を先の上清と一緒にする。

集めた上清を8000 × g, 20分遠心し、沈渣を35%蔗糖液5 ml に溶解し、40-65%の連続蔗糖密度勾配液5 ml の上に重層、日立 RP 40型超遠心機で、25,000 × g 60分遠心すると、リンパ球膜は中間層に白色の帯として回収される。

蔗糖を除くために、リンパ球膜標品を、cellulose tube に入れ、蒸留水で2日間透析した後、真空凍結乾燥して、-80℃の超低温槽に保存した。精製段階のリンパ球膜は逐一、位相差顕微鏡で純度を形態的に追跡した。

2) 分離リンパ球膜の観察と化学組成の検討: 超薄切片のための電子顕微鏡観察には分離精製した新鮮リンパ球膜を glutaraldehyde, osmium 二重固定を型通りおこなった後に Epon 包埋し Ultratome I LKB 4800で超薄切片にして醋酸ウラニール、鉛二重染色をおこない、JEM-7型電子顕微鏡 (80 KV) をもち

いた。リンパ球膜を構成する蛋白の分析をおこなうためにリンパ球膜10mgを2% (W/V) SDS, 6 M Urea, 1% (V/V) 2-mercaptoethanol, 50 mM, PH7.8 磷酸緩衝液を含む溶解液1 mlに加え、50℃, 30分間加熱して、溶解せしめた。このリンパ球膜溶解液を40P型日立超遠心機でRPS50ローターを用いて100,000×g, 60分遠心してその上清をリンパ球膜溶解液とした。Sephadex 4B (Pharmacia) は、Sephadex column K26/100 (2.6×91.5cm)に充填して0.01M 磷酸緩衝液 (PH.7.4) または0.01M 磷酸緩衝液 (PH7.4) に1% (W/V) SDS, 1 mM 2-mercaptoethanol 0.1 mM EDTAを加えて上昇法で7.15 ml/hの流速で3 ml宛に分画した。VoはBlue Dextran 2000 (Pharmacia) で決定した。各分画の蛋白量はO. D. 280 nmで測定した。分子量測定のためには、ヒトγ-globulin (M. W. 160000), ヒト transferrin (M. W. 88000), ヒト albumin (M. W. 67000), ovalbumin (M. W. 45000), cytochrome C (M. W. 12900) を指標にした。O. D. 280 nmでの最大吸収をVeとしVoに対する比Ve/VoをX軸にとり、各指標物質の既知の分子量を対数でY軸にとると、ほぼ直線上に並ぶ。SDS-Disc電気泳動は、1% SDS加5% acrylamide gelにリンパ球膜溶解液50 μlを添加して7 mA/gelで210分間展開した。このacrylamide gelをトリクロル酢酸液で12時間固定したのちcoomassie brilliant blue染色を施した。

アミノ酸は、この凍結乾燥リンパ球膜を6 N HClで加水分解後、柳本自動アミノ酸分析装置で分析した。

3) 家兎感作実験：

分離した仔牛胸腺リンパ球膜を2500 γ/kg体重の割合で生食液に懸濁して、体重1.48～1.55 kgの幼若家兎の耳静脈に週1回ずつ合計2回静注感作した。さらに別の実験系として分離したリンパ球膜4 gを、SDS 0.24 g, 2-mercaptoethanol 0.11 g, glycerin 2.0 gを含む0.1 M 磷酸緩衝液 (PH7.8) に溶解させ、4℃1昼夜おき4℃7600×g, 20分間遠心、上清をcellulose tubeに入れ、0.02 M iodoacetateを含む0.2 M, PH7.4 磷酸緩衝液で透析、透析液を数回交換する。透析液に、2-mercaptoethanolがまったく出現しないのを確認したのち、リンパ球膜溶解液をLowry-Folin法にて蛋白濃度を定量し、蛋白量5000 γ/mlに濃縮した。リンパ球膜溶解液と同容量のFreunds' complete adjuvantと混和し、1羽あたり5000 γの割合で体重2.4～4.7 kgの家兎背部

皮内に2週間に1回の割合で合計3回感作した。

これらの各感作群家兎の体重を定期的に測定するとともに、耳静脈血について白血球数、白血球分類、ヘマトクリット値についても測定した。屠殺した家兎の諸臓器は10%ホルマリン生食液にて固定後パラフィン切片としてH-E染色を行ない、組織像について検討した。抗膜抗体の検出はimmuno-electrocytotoxicity法あるいはOuchterlony法を用いて、リンパ球膜溶解液を抗原として沈降線の出現の有無で観察した。

III 成 績

健康成牛の腸間膜リンパ腺は乳白色を呈しており、時に入手される断面が赤褐色の充血を呈したリンパ腺は使用しなかった。胸腺は生後数日以内の仔牛からえたために、常に実質性であった。リンパ腺、胸腺とともに、薄くスライスして生食液を満したシャーレの中でリンパ球を叩き出したために、線維成分の混入はごくわずかで、これをplastic網で濾過してえられたリンパ球浮遊液は乳白色を呈しており、位相差顕微鏡下、99%が大小リンパ球でしめられており、細網細胞や赤血球はほとんど見当たらない。0.001 M ZnCl₂を加え、1% Tween-20と0.01 M ZnCl₂時点では、リンパ球膜の透過度がおちて、細胞質と核の透過度に差ができるために、一見細胞膜と細胞質ならびに核の間に間隙を生じたように観察される(写真1)。この状態でPotter-Elvehjem型Teflonhomogenizerを用いてhomogenizeしても、細胞質からの細胞膜の分離が容易でない。そこで一旦-80℃に急冷して再び急速に融解してこの操作をおこなうと、リンパ球膜は容易に破壊してうすい膜片が0.01 M ZnCl₂混合溶液中に浮遊してくるのを位相差顕微鏡下に確認できる(写真2)。homogenizeが過度になって核まで破壊すると、リンパ球浮遊液の粘度が上昇して寒天状の透明泥状液になり、せっかく分離したリンパ球の収量が減量する。その為Teflon homogenizerはtight fittingよりもloose fittingを選ぶべきであることが判明した。最終的に細胞膜をなお保有したリンパ球が数%残るが、これらのリンパ球はhomogenizeを反復しても膜抵抗が強いので次の蔗糖勾配遠心法で除去することにする。リンパ球膜、核、細胞質を含んだ0.01 M ZnCl₂液を45%蔗糖液に重曹して400×g, 30分遠心すると核と細胞質成分はほとりのぞかれて、リンパ球膜を主体として少量のmitochondriaその他の細胞小器官

小橋 秀広論文附図

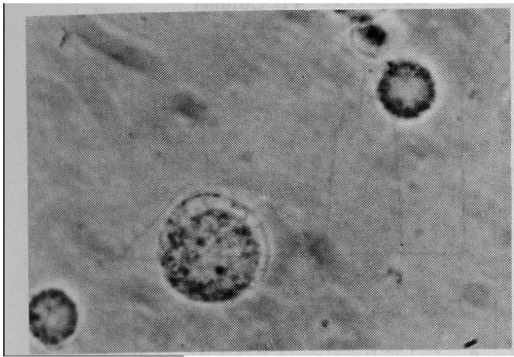


写真 1

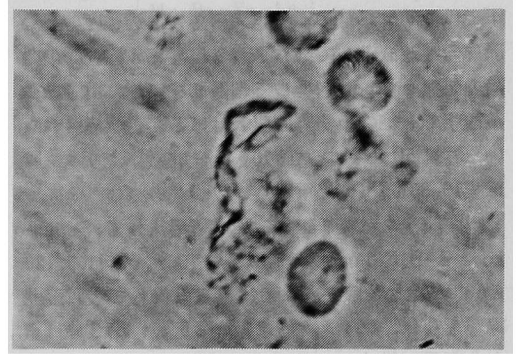


写真 2

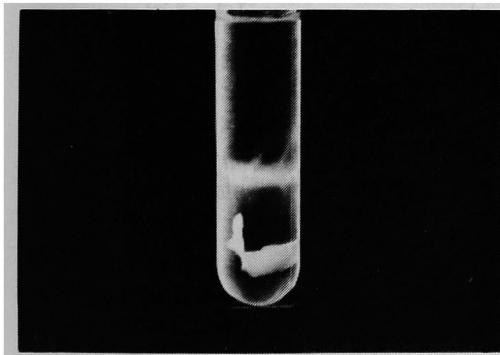


写真 3



写真 4

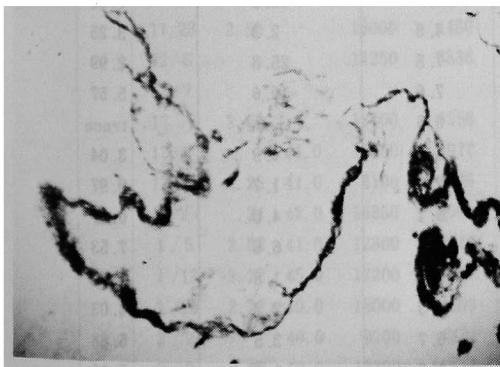


写真 5

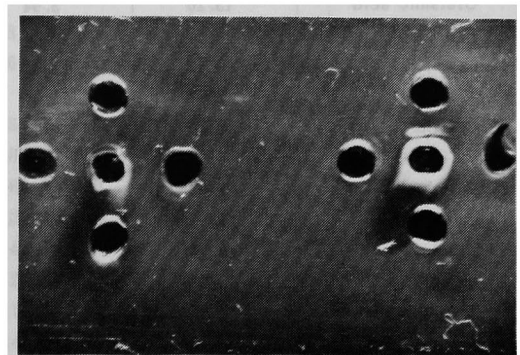


写真 6

を残すに止まる。40—65%蔗糖密度勾配をおこなって、中間層(写真3)、すなわち40%蔗糖の直上に乳白色の白濁層としてえたリンパ球膜は、位相差顕微鏡下では、リンパ球の $\frac{1}{2}$ ～ $\frac{1}{3}$ 大の薄い、透過度の高い膜片の浮遊液として観察される(写真4)。この段階の試料をEpon包埋して超薄切片にした電子顕微鏡観察でも細胞小器官の混入はほとんど認められない(写真5)。リンパ腺10g(湿重量)よりリンパ球膜15—30mg(乾燥重量)の収量があった。

腸間膜リンパ腺リンパ球膜を可溶化して、Sephadex 4B Columnでゲル濾過すると、分画105, 120と150に最大吸収を有する鋭利な3峰性の吸収度曲線がえられ、第1, 2峰は吸光度低く、第3峰は蛋白含有量が最大で、分子量は約15000と推定された

写真7

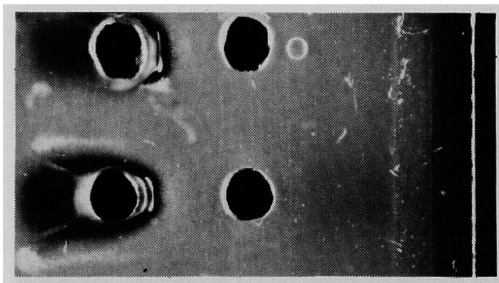


Fig. 1 Gel Filtration of Solubilized Crude Calf Thymocyte Membranes by Sepharose 4B Column

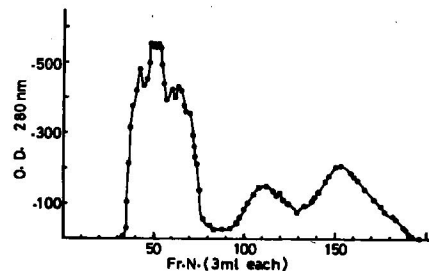


Fig. 2 Gel Filtration of Solubilized Bovine Intestinal Lymphnode Lymphocyte Membranes by Sepharose 4B Column

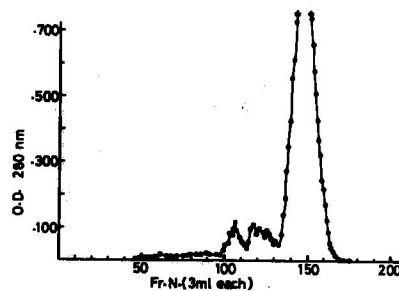


表1 リンパ球膜のアミノ酸組成

	成年腸間膜 リンパ腺 リンパ球膜	仔牛胸腺 リンパ球膜	リンパ球膜	筋 膜	赤血球膜
Asparatic acid	9.48 %	10.19 %	9.5 %	9.0 %	6.89 %
Threonine	5.12	2.13	5.8	3.6	3.27
Serine	5.67	5.75	7.2	3.8	4.09
Glutamic acid	13.26	3.94	11.7	12.5	7.30
Proline	4.85	trace	4.8	2.3	3.25
Glycine	10.12	13.32	7.8	25.8	2.99
Alanine	9.77	11.34	7.6	10.6	5.57
Cystine	0.46	trace	0.6	trace	trace
Valine	6.25	44.24	6.9	4.9	3.04
Methionine	1.42	trace	2.0	1.7	0.97
Isoleucine	5.04	0.98	5.1	4.0	0.87
Leucine	8.74	2.13	9.7	6.6	7.53
Tyrosine	2.34	trace	3.3	1.8	1.92
Phenylalanine	3.59	trace	4.3	2.7	4.03
Lysine	6.01	2.46	6.7	3.5	5.88
Histidine	1.72	3.12	1.9	1.2	5.11
Ammonia				7.3	3.21
Arginine	6.05	0.32	5.0	5.9	3.81

家兎 No	月/日	体重 kg	ヘマト クリット		白血球リンパ球		白血球分類(%)								備 考
			%	/cmm	/cmm	好 中 球					Mo Bo Eo Ly				
						I	II	III	IV	V					
45	11/4	2.9	47.5	4100	2132	1	7	22	13	1	3	0	0	52	5000γ SDS-TM (809072) +Adj SDS-TM + Adj 下り 死亡
	11/5														
	11/7					0	3	14	16	11	8	7	2	46	
	11/14	3.1	45.0	9500	3040	2	5	21	20	12	4	0	4	32	
	11/17	3.15		7300	2847	0	15	27	14	2	1	0	2	39	
	11/21														
	11/22			3850	770	4	26	27	9	2	2	0	0	20	
	11/24														
46	11/4	3.25	39.0	4950	2129	1	9	15	16	8	4	0	4	43	(201072) 5000γ SDS-LM + Adj SDS-LM + Adj SDS-LM + Adj
	11/7														
	11/14	3.05	42.0	8450	1606	2	6	28	26	15	1	3	0	19	
	11/21														
	11/22	3.05	42.0	18800	3296	11	14	24	13	10	5	1	5	17	
	11/28	2.95		21760	4576	6	12	22	22	12	3	0	1	21	
	12/6	2.95	41.0	9100	1092	3	15	31	21	9	7	0	1	12	
	12/7														
	12/13	3.05		16950	3560	10	21	25	16	5	1	1	0	21	
	12/15	3.10	45.0	19600	4704	5	5	32	20	6	2	0	1	24	
	12/22	2.90	39.0	16700	4342	0	9	29	25	5	2	2	2	26	
	12/29	2.70	42.0	12600	1890	3	18	44	13	4	4	0	0	15	
	1/5	2.86	41.0	12250	1470	4	14	26	24	18	1	0	1	12	
	1/12	2.80	40.0	17850	2321	2	14	28	26	12	5	0	0	13	
	1/19	2.78	41.0	9150	3111	2	17	29	10	4	3	0	1	34	
	2/2		36.0	14150	1981	4	17	25	23	11	5	1	0	14	
	2/9	3.30	39.0	11400	4218	4	13	23	11	4	6	1	1	37	
47	11/4	2.35	37.0	7700	2310	3	12	23	16	14	0	1	1	30	(201072) SDS-LM + Adj SDS-LM + Adj EMG SDS-LM + Adj
	11/7														
	11/14	2.55	45.0	8450	2769	0	9	28	16	10	2	2	0	33	
	11/21														
	11/22	2.60	49.0	9500	2565	11	15	29	9	3	1	2	3	27	
	11/25														
	11/28	2.50		16000	4480	13	13	27	18	2	2	2	2	28	
	12/6			11250	3838	8	16	16	15	5	5	0	0		

	12/6	3.0		11000	4180	2	10	25	16	6	2	0	0	38	SDS-LM + Adj
	12/13	3.15		13900	6950	7	16	21	11	3	2	0	1	50	SDS-LM + Adj
	12/15		44.0	15900	7632	5	6	16	16	3	5	0	1	48	
	12/22	2.75	43.0	11200	4816	1	8	11	15	18	1	1	1	43	
	12/29	2.75	43.0	13500	4625	4	17	23	14	3	4	0	0	35	
	1/5	2.88	41.0	12200	5734	2	14	16	11	4	2	0	4	47	
	1/12	2.98	42.0	28250	12419	1	4	14	18	15	3	0	1	44	
	1/19	2.98	41.0	11400	5700	3	10	16	13	6	1	1	0	50	
	2/2		40.0	14100	5217	1	8	28	16	9	1	0	0	37	
	2/9	3.26	38.0	9250	3423	2	6	20	22	9	2	0	2	37	
53	12/22	2.7	41.0	12500	10500	3	6	5	1	1	0	0	0	84	SDS-LM + Adj
	12/29	2.8	39.0	13500	9315	0	5	14	9	3	0	0	0	69	
	1/5	2.58	37.0	19800											
	1/12	2.44	41.0	15040	8422	2	5	13	14	6	4	0	0	56	SDS-LM + Adj
	1/19	2.42	41.0	10750	6558	3	11	9	8	1	6	1	0	61	
	2/2	2.4	43.0	15150	2221	2	23	34	10	9	7	0	1	14	SDS-LM + Adj
	2/9	2.7	40.0	8900	5073	1	6	16	10	5	3	0	0	57	
54	12/22	2.4	40.0	12900	10449	0	0	3	8	5	2	0	1	81	
	12/29	2.3	40.0	10050	6432	1	6	8	10	4	6	0	0	64	SDS-LM + Adj
	1/5	1.9	36.0	20700	2691	6	16	29	26	9	0	0	0	13	
	1/12	2.1	35.0	6350	2350	0	1	10	24	21	7	0	1	37	SDS-LM + Adj
	1/19	1.95	30.0	13800	2208	11	27	31	12	1	2	0	0	16	
	2/2	1.2	29.0	18300	7588	6	15	23	12	4	4	0	0	36	死亡

(図1)．これに対して胸腺リンパ球膜では分画60で最大吸収を，分画115と150で中等度の吸収度を示す3峰性のパターンをうることができた(図2)．

腸間膜リンパ腺リンパ球膜(以下LMと略)のSDS-Disc電気泳動ではCoomassie blue染色で3本の太い染色帯と6本の細い染色帯が認められ，分子量既知の指標物質の泳動像から計算すると，もっとも太い濃厚な染色帯は分子量15000と推定され，分子量10万以上ならびに1万以下の蛋白成分は認められなかった．

これに対して胸腺リンパ球膜(以下TMと略)では3本の太い染色帯と7本の細い染色帯が認められ，分子量既知の指標物質から計算すると，もっとも太い濃厚な染色帯は分子量15000と推定され，分子量10万以上ならびに1万以下の蛋白成分は認められなかった．

LMのアミノ酸組成は，glutamic acid, glycine, alanine, asparatic acid, leucineが多く，lysineは6.01%であったが，TMはvalineの含量が44.24%と著明に増加して，glutamic acid, proline, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, lysine, arginineが相対的に減少していた(表1)．

まずSDSで可溶化したLM(以下SDS-LMと

略す)の5000 γ をFreund complete adjuvant(以下FCAと略)に混じて，家兔背部皮内に感作した群(SDS-LM群)の体重は，感作1～2週後に軽度の体重減少を示す例が多いが，衰弱はみとめられず，ヘマトクリット，白血球数は軽度増加傾向が観察された．リンパ球数は相対的に低下例が多いため，一定の傾向を認めがたいが，感作リンパ球百分率とともに減少した(表2)．

SDSで可溶化したTM(SDS-TM)の5000 γ を同じくFCAを混じて感作したSDS-TM群でも，感作にもとづく体重の減少は殆んどみられず，ヘマトクリット，白血球数にも一定の傾向を見出すことは困難であったが，一過性にリンパ球数，リンパ球百分率は減少した(表3)．剖検時，胸腺と脾臓は萎縮性でリンパ腺も後腹膜リンパ腺をやっとみつけることができる程度であった．組織学的にもいずれのリンパ組織もリンパ球の消失がいちちるしく，胸腺の皮質と髄質の境は不明で脂肪変性がつよく，リンパ球が残存して胸腺実質と考えられる部分の胸腺全体に対する面積比は，正常家兔で100%であるのに対して16%にすぎなかった．脾臓でもリンパ濾胞が萎縮して，正常家兔のリンパ濾胞は脾臓面積の34.1%であるのに対して8.7%にすぎなかった．リ

表3 SDS-TM 群

家兔 No	月/日	体重 kg	ヘマトクリット 白血球リンパ球		白血球分類(%)									備 考	
			%	/cmm	/cmm	好 中 球					Mo	Ba	Eo		Ly
						I	II	III	IV	V					
34	9/23	4.60		11850	5952	12	8	16	5	0	6	1	2	50	(180972)
	11/1	4.60													SDS-TM + Adj
	11/4	4.40		6500	2145	0	2	9	21	11	6	17	1	33	
	11/10	4.24		13450	5649	1	7	16	17	13	3	0	0	42	
	11/17	4.20		12450	4109	4	8	12	19	18	2	0	3	33	SDS-TM + Adj
	11/24	4.05	39	17150	5317	3	7	22	20	16	1	0	0	31	
	12/1	4.12	40	9550	2725	4	8	20	18	5	3	2	1	39	SDS-TM + Adj
	12/4														
	12/8	4.05	40	11450	5267	3	7	24	11	4	2	2	1	46	
	12/15	4.00	40	15900	4770	2	16	27	17	4	4	0	0	30	
	12/22		38	12800	3712	5	5	21	23	8	5	4	0	29	
	12/29	3.78	38	9850	3250	1	7	24	21	10	1	3	1	32	
	1/5	4.02	38	10400	4888	0	6	12	18	8	2	6	1	47	
	1/12	4.10	39	10400	6656	0	9	12	9	3	4	0	0	64	
	1/19	3.70	38	10550	4642	1	7	19	20	7	3	0	0	44	
	2/2		37	9400	3666	0	11	25	20	2	1	0	0	39	
2/9	4.22	40	9750	5182	1	8	25	9	2	1	0	0	53		
35	9/23	4.70		10550	5275	12	8	16	5	0	6	1	2	50	(180972)
	11/1	4.80													SDS-TM + Adj
	11/4	4.60		9100	3003	1	7	22	19	5	10	0	0	33	
	11/10	4.46	39	7400	1628	2	4	19	24	21	4	2	2	22	
	11/17	4.58		8300	1245	3	8	28	27	14	4	0	1	15	
	11/17														SDS-TM + Adj
	11/24	4.50	35	15920	2547	1	14	32	20	7	5	3	1	16	
	12/1	4.40	39	16500	4290	3	16	28	19	4	1	0	1	26	
	12/4														SDS-TM + Adj
	12/8	4.35	40	9500	3235	1	4	26	19	9	5	0	1	34	
	12/15	4.30	43	7950	2385	1	11	20	21	13	4	0	0	30	
	12/22	4.05	39	12000	4800	2	3	13	21	17	1	1	4	40	
	12/29	3.95	40	10050	3216	3	6	20	20	11	5	2	1	32	
	1/5	4.00	38	10250	3280	6	14	18	18	7	2	2	1	32	
	1/12	3.90	42	12200	5246	1	7	19	16	12	5	0	0	43	
	1/19	3.80	38	9300	2883	3	9	27	19	6	4	1	1	31	
2/2		39	10000	3300	3	14	34	12	0	4	0	0	33		
2/9	4.10	39	11900												
44	11/1	3.00	44.0	6250	1375	3	19	26	21	6	0	2	1	22	(180972)
	11/3														SDS-TM + Adj
	11/4	3.25	42.5	9200	2205	1	7	16	22	23	6	0	0	24	
	11/10	2.80	39.0	9100	1911	3	10	20	24	21	0	1	1	21	
	11/17	3.00		10560											SDS-TM + Adj
	11/24	2.80		13250	2253	2	6	27	33	12	3	0	0	17	
	11/25														EMG
	12/1	2.70	35.0	6700	1943	3	11	26	18	10	1	0	2	29	
	12/4														SDS-TM + Adj
12/8	2.80	44.0	10050	1809	8	16	29	19	6	4	0	0	18		

	12/15	3.00	40.0	7150	1073	9	9	22	22	21	1	0	1	15
	12/22	2.72	36.0	7200	2592	6	8	21	17	10	2	0	0	36
	12/29	2.68	40.0	12350										
	1/5	2.96	42.0	9500	2185	4	16	28	19	6	4	0	0	23
	1/12	2.86	44.0	27600	10664	1	6	16	20	11	4	0	2	39
	1/19	2.90	42.0	7150	2717	1	8	26	15	4	5	0	3	38
	2/2		43.0	9400	2444	1	11	26	20	10	4	0	2	26
	2/9	3.15	40.0	6500	1885	3	13	24	19	8	4	0	0	29

表4 LM群

家兎 No	月/日	体重 kg	ヘマト クリット %	白血球 リンパ球 /cmm /cmm	白 血 球 分 類(%)										備 考	胸 腺	脾 臓
					好 中 球					Mo Ba Eo Ly							
					I	II	III	IV	V								
71	8/25	2.4	35	6750	3780	3	4	21	10	2	0	1	3	56	下半身不随屠殺	400mg	800mg
	8/29	2.0	41	8750	2713	2	8	31	19	6	2	0	0	31			
	9/1	1.8	32	6600	858	0	2	31	37	15	1	0	0	13			
72	8/25	2.2	31	9600	6048	3	7	16	8	0	3	0	0	63	2.5mg/kg (第2回)	250mg	800mg
	8/29	2.2	39	7500	7500	2	14	13	7	2	1	0	2	59			
	9/1	2.2	35	10050	3718	0	8	22	21	6	2	0	2	37			
正常																2400mg	810mg

表5 TM群

家兎 No	月/日	体重 kg	ヘマト クリット %	白血球 /cmm	リンパ球 /cmm	白 血 球 分 類 (%)										備 考	胸 腺	脾 臓
						好 中 球					Mo	Ba	Eo	Ly				
						I	II	III	IV	V								
63	2/16	1.55	34	8200	3016	4	16	24	14	3	1	0	0	38	3.875mg I.V. TM			
	2/23	1.70	40	7300	2190	6	21	30	5	2	5	0	0	30	4.0 mg I.V. TM			
	3/2	1.52	50	5150	2884	7	16	10	1	0	9	0	1	56	下痢			
	3/7																	
64	2/16	1.48	39	8050	5152	0	3	15	8	7	5	0	0	64	3.7 mg I.V. TM			
	2/23	1.45	40	13150	5918	5	23	22	4	0	1	0	0	45	4.0mg I.V. TM 下痢			
	3/2	1.58	43	11000	6050	3	8	15	10	2	0	6	1	55	下痢			
	3/9	1.30	47	7400	2294	3	19	22	13	5	5	2	0	31	下痢 屠殺			
65	2/16	1.52	42	7850	4553	2	8	16	9	4	2	0	0	58	3.8 mg I.V. TM			
	2/23	1.72	40	9450	4820	5	16	17	7	1	3	0	0	51	4.0 mg I.V. TM			
	3/2	1.65	40	4750	2708	4	15	18	4	1	0	0	1	57				
	3/9	1.20	33	7850	2591	12	20	16	12	1	5	0	0	33	下痢 屠殺			
66	2/16	1.54	29	6700	3886	3	7	14	10	3	4	1	0	58	3.85 mg I.V. TM			
	2/23	1.38	33	8350	4426	3	10	17	11	1	4	0	1	53	3.0mg I.V. TM 下痢			
	3/2	1.16	43	14300	6149	2	9	20	19	1	7	4	0	43				
	3/5	1.10													下痢 死亡			
67	2/16	1.65	38	9500	5320	2	7	18	9	6	1	0	1	56	4.0 mg I.V. TM			
	2/23	1.90	42	5915	5915	3	6	14	4	2	2	0	0	70	検血後下半身不随			
	2/24														死亡直前屠殺			

ンパ腺でもリンパ球は粗で、リンパ濾胞の面積比は正常家兎50.4%に対して17.4%に減少していた。

分離した LM, TM を SDS で可溶化することなく、そのまま耳静脈より注入する LM 群では、体重

の減少とともに、リンパ球数、リンパ球百分率の減少が確実に認められ、2回の感作によって胸腺重量は400~250mgと、正常家兎(2400mg)の胸腺に比較して高度の萎縮が証明された。ただし脾臓は、正

常家兎の810 mg に対して800 mg とほとんど変化を認めなかった(表4)。一方 TM 群では比較的幼若な家兎を用いたが、体重の自然増加は感作によって抑制され、2回目の感作でむしろ減少した。しかも下痢を反復しているそうし、死亡に頻する家兎で占められた。剖検によって肉眼的にも胸腺や脾臓の萎縮が確認され、後腹膜リンパ腺をはじめとして、いずこにもリンパ腺腫脹はなく、むしろ萎縮性であった。

ちなみに胸腺重量は1回感作で死亡した67を除いて 395.00 ± 247.18 mg (M $\pm$ S.D.) (180 mg ~ 750 mg) と減少しており、脾臓重量も 575.00 ± 155.45 mg (450 mg ~ 800 mg) に減量していた(表5)。これらのリンパ組織を H-E 染色で観察すると、胸腺では小リンパ球が極度に減少して、皮髄の境界が明らかでなく、実質に対する脂肪織の増加が優勢でリンパ球の存在する実質の割合は29.8%にしか過ぎなかった。脾臓でも脾リンパ濾胞の縮小が観察され特に胸腺依存領域と思われる部分のリンパ球が粗で細網細胞が目立った。このリンパ濾胞がしめる面積を脾全体の面積に対比すると、18.7%に減少していた。リンパ腺についてもリンパ球の減少が著しく、リンパ濾胞の面積比は22.4%にすぎなかった。

immunoelectrosyneresis を用いての抗原、抗体反応の検出では、可溶化胸腺リンパ球膜ならびに可溶化リンパ腺リンパ球膜のいずれに対しても、沈降線を証明しえ(写真6)、また Ouchterlony 法でも明らかに沈降線を見出した(写真7)。

IV 考 察

赤血球膜⁹⁾を分離するときには、血色素の混入に注意をはらって、PHや温度、緩衝液、洗浄回数に工夫が必要であるが、筋膜⁷⁾の分離に際しては myofibril と筋形質の混入に注意しなければならない。リンパ球膜の分離の場合には mitochondria や microsome は勿論のことであるが、破壊されて流出する核蛋白の混入防止が主眼になる。一旦核膜を破壊すると混入した核蛋白のためにリンパ球浮遊液の粘度が増加し、リンパ球膜の分離操作が失敗に終るからである。300×g で核を、4000×g で mitochondria を、さらに sucrose-tris-HCl buffer の組み合わせと、数回の遠心を反復する密度勾配超遠心法⁸⁾は正統的ではあるが操作が煩雑でありリンパ球膜の純度と収率の増加への期待が比較的薄い。二価イオン $ZnCl_2$ を添加することによってリンパ球膜の流動性が阻害されて、位相差顕微鏡下細胞質と容易に

区別しうようになり、 $ZnCl_2$ の濃度をあげ、Tween-20 を短時間作用さすことによって、核を含む細胞質成分が一見収縮してリンパ球膜と異った屈折率を示してくる。この状態で homogenize することによって核を含めた細胞質成分の破壊が防がれてリンパ球膜の収率が上がるものと考えられる。同様の考えは、硼酸塩と EDTA を含んだ低張液の使用⁹⁾にもみられる。ただ、 $ZnCl_2$ と Tween-20 の前処置が過度になるとリンパ球膜は細胞質とともに意外に強靱になり、超音波処理、glass homogenizer, war-ing blender 等、種々の細胞破壊の方法を試みたが、リンパ球の形は保たれたままで、反復する homogenize に手間どって処理不能におちいった。そこでリンパ球浮遊液を-80℃で急速に凍結して保存後、再び homogenize を開始するために溶解した際、リンパ球の Viability 確認のために位相差顕微鏡下で観察したところ、意外にリンパ球膜が分離していることに着目した。以後-80℃での凍結と急速融解の組み合わせに loose filtering の Teflon homogenizer を併用することによって、迅速にしかも技術的に簡易に純度の高いリンパ球膜を分離することが可能となった。この際急速融解のために加温するが、完全に融解する迄は容器内の液温は0℃に保たれている為膜をもったリンパ球の viability は不変であった。蔗糖密度勾配の際、35%蔗糖と40%蔗糖の間にリンパ球膜が浮上することから、リンパ球膜の比重は1.1270~1.1764の間にあることになる。リンパ球膜の比重はふつう、1.076~1.078近くと考えられている¹⁰⁾し、Ferber 等¹¹⁾はリンパ球膜を1.088~1.092へ集めようとし、Allan & Crumpton⁸⁾は1.14、Marique & Hildebrand¹²⁾は1.115に、Demus¹³⁾も24%および33%蔗糖の上層(比重1.099~1.141)にリンパ球を集めようとしているので、著者の方法で集まるリンパ球膜の比重はやや重いことになる。これは Warren¹⁴⁾によれば、分離したリンパ球膜には Tween-20 の附着は無視できるということになるので溶媒に使用した Zn^{+} の関与が考えられる。

収量は Allan & Crumpton⁸⁾はリンパ腺湿重量対乾燥膜標品の割合で0.1%としているが、われわれの成績では0.15~0.3%であった。Ferber 等¹²⁾は蛋白回収量として計算すると全細胞 homogenate の1.7%であったという。

集ったリンパ球膜標品は位相差顕微鏡下では、ほぼ純粋な膜破片であることが確かめられ、電子顕微鏡でも mitochondria や microsome などの細胞微

小器管の混在は否定された。

分離したリンパ球膜の蛋白量はブタ腸間膜リンパ腺リンパ球膜では57%, 仔牛腸間膜リンパ球膜では1.7%¹³⁾ ブタ胸腺リンパ球膜では0.03%という成績があるが、著者のアミノ酸組成分析値からは腸間膜リンパ球膜では7.8%, 胸腺リンパ球膜では2.3%で、それらの主要構成蛋白体の推定分子量は15000 daltonと計算されたが、Lodoulis ら¹⁴⁾が分離したラット胸腺リンパ球膜では11700であったというのではほぼ似た成績となる。

膜構成蛋白のアミノ酸組成はリンパ腺リンパ球膜に比較して、胸腺リンパ球膜では valine が著明に増加していた。この相違が T-cell の集団である胸腺と B-cell の豊富なリンパ腺とのリンパ球膜の抗原性の差につながるのかも知れない。しかし一方では glycine や isoleucine などの多少の増減はあっても、リンパ腺リンパ球膜と著者らがかって報告したラット筋膜、赤血球膜での分析値と比較した場合、種属ならびに臓器特異性をこえて、はなはだ酷似している点は驚異的である。

抗リンパ球血清、抗胸腺細胞血清の免疫活性に關しては多数の報告¹⁰⁻¹²⁾がみられる。しかしながら分離リンパ球膜の感作実験の報告は未だみられない。抗リンパ球グロブリン (ALG) は白血球数の減少とリンパ腺の傍皮質領域のリンパ球消耗をおこすとされている。著者は分離リンパ球膜を異種動物に投与したのであるから、当然宿主体内には抗腸間膜リンパ腺リンパ球膜抗体と抗胸腺リンパ球膜抗体が産生されており、事実、immunoelectrosyneresis や Ouchterlony 法で沈降線を証明することができた。ところがこの抗体はそのまま in vivo で宿主動物の自己リンパ組織に対して上記の抗リンパ球グロブリン類似の傷害を及ぼしたと考えられる。この考えは、リンパ球膜抗原の投与による自己免疫機序の発生を示唆している。Watanabe ら¹⁵⁾は抗リンパ球血清、抗胸腺細胞血清のリンパ球抗原 determinant はリンパ球細胞膜の表面に存在する事を ferritin を結合した ALG あるいは ATG と補体をリンパ球に反応させて電顕的に証明している。この事実からも、抗リンパ球、あるいは抗胸腺リンパ球血清の抗体活性の責任の一端は抗リンパ球膜抗体、抗胸腺リンパ球膜抗体に転嫁しうる可能性が示されたことになる。即ち LM あるいは TM を FCA とともに家兎背部皮下に感作した場合にも、静注法で感作した場合でも末梢血リンパ球、胸腺、脾臓、リンパ腺のリンパ球プー

ルの減少をきたす事が判明した。但し静注法と皮下感作法とでは観察期間がことなるし、抗原量も違うので反応の差を一律に論ずる事は困難であるが、皮下感作群の方が長期にわたるだけあってリンパ球の疲憊はより高度であった。静注法でも2回の感作で3週間という短い観察期間にしては、リンパ球プールの減少は甚だ高度といわざるをえない。この際興味の焦点は、LM と TM の抗原性の差である。末梢血リンパ球を指標とした限りにおいては、確かに TM の抗原性が LM のそれより優れていた。

これは Sepharose 4 B Column や SDS-Disc 電気泳動での両者の膜構成蛋白の差とアミノ酸組成の違いに由来している可能性が大である。組織学的に Tリンパ球依存領域と Bリンパ球依存領域の動向を明確にすることは困難であったが、胸腺リンパ球膜を抗原とした場合には、Tリンパ球依存領域のリンパ球減少がよりはっきりとしていたように思われる。第二篇ではこの点を中心にマウスを用いて明らかにしてみたい。

V 結 語

成牛腸間膜リンパ腺と仔牛胸腺から、リンパ球を集め、ZnCl₂ と Tween-20 を溶媒として、-80℃より急速に温める方法を用いてリンパ球膜を破壊した。リンパ球膜の粗分画を蔗糖密度勾配遠心法を併用して、リンパ球膜の精製をおこなった。分離したリンパ球膜は比重 1.1270 と 1.1764 の間に集まり、収量はリンパ腺 (湿重量) の 0.15~0.3% (リンパ球膜乾燥重量) でその純粋性は位相差顕微鏡と電子顕微鏡で確かめた。標品に含まれる蛋白量は 7.8%, 2.3% で、Sepharose 4 B Colum での分画の吸収度曲線でも、又 SDS-Disc 電気泳動のパターンでも、さらにはアミノ酸組成でも腸間膜リンパ腺リンパ球膜と胸腺リンパ球膜とは異なっていた。

分離した胸腺リンパ球膜あるいは腸間膜リンパ腺リンパ球膜を感作した場合、皮下感作法でも、静注法でも、末梢血リンパ球数の減少を認めることができる。たゞし静注法では感作抗原量が少くて、かつ短期間の間にリンパ球の減少が観察された。組織学的には、胸腺リンパ球膜感作群のいずれも、リンパ組織の萎縮が著明で胸腺では皮髓の境界が不明瞭となって実質が減少し、脾臓やリンパ腺ではリンパ濾胞の縮少が著明であった。これらの事実は異種リンパ球膜に対する抗体が家兎宿主内で産生され、これが宿主の胸腺をはじめとするリンパ組織に交叉反応

性を示したために生じた一種の自己免疫性リンパ組織病が発症したと考えられ、胸腺とリンパ腺の差はひいては、Tリンパ球膜とBリンパ球膜の抗原性の差の表現と推察された。

恩師平木潔教授に感謝します。

本論文の要旨は第35回、36回日本血液学会で発表した。また本研究は文部省科学研究費補助費877166ならびに厚生省特定疾患重症筋無力症調査研究費の援助を受けている。

文 献

- 1) Roitt, I. M., Greaves, M. F., Torrigiani, G., Brostoff, J. and Playfair, J. H. L.: The cellular basis of immunological responses. *Lancet*, **2**, 367-371, 1969.
- 2) 吉田孝人: ヒトとマウスのT-細胞, B-細胞. *日本臨床*, **33**, 187-194, 1975.
- 3) 有森茂, 小橋秀広, 多田慎也: 重症筋無力症患者のT, B細胞のプールと機能の相関. *アレルギー*, **23**, 772-774, 1974.
- 4) 有森茂, 小橋秀広, 多田慎也他: 全身性エリテマトーデス患者のT, B細胞のプールと機能の相関. *アレルギー*, **24**, 116-119, 1975.
- 5) 小橋秀広他: Sjogren 症候群患者のT B細胞のプールと機能の相関, *アレルギー*, **24**, 116-119, 1975.
- 6) 有森茂, 中田安成, 大西武生: 抗筋膜抗体と抗赤血球膜抗体の患者血清における陽性率: 医学と生物学, **83**, 67-70, 1971.
- 7) 有森茂, 六車昌士, 大西武生, 中田安成: 改良筋膜分離法によるダイコクネズミの分離筋膜の形態学的観察と化学分析. *医学と生物学*, **82**, 193-196, 1971.
- 8) Allan, D. & Crumpton, M. J.: Preparation and characterization of plasma membrane of pig lymphocytes. *Biochem. J.*, **120**, 133-143, 1970.
- 9) Warley, A. and Cook, G. M. W.: The isolation and characterization of plasma membranes from normal and leukemic cells of mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 55-68, 1973.
- 10) Tabbi, K.: Purification of lymphocytes. *Lancet*, **1**, 1392, 1973.
- 11) Ferber, E., Resch, K., Wallach, D. F. H. and Imm, W.: Isolation and characterization of lymphocyte plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **266**, 494-504, 1972.
- 12) Marique, D. and Hildebrand, J.: Isolation and characterization of plasma membranes from human leukemic lymphocytes. *Cancer research*, **33**, 2761-2767, 1973.
- 13) Demus, H.: Subcellular fractionation of human lymphocytes. Isolation of two plasma membrane fractions and comparison of the protein components of the various lymphocytic organelles. *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 93-106, 1973.
- 14) Warren, L., Glick, M. C. and Nass, M. K.: Membranes of animal cells. I. Methods of isolation of the surface membrane. *J. Cell Physiol.*, **68**, 269-287, 1966.
- 15) Ladoulis, C. T., Misra, D. N., Estes, L. W., and Gill, T. J.: Lymphocyte plasma membranes. I. Thymic and splenic membranes from inbred rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **356**, 27-35, 1974.
- 16) James, K. and Milne, I.: The effect of anti-lymphocytic antibody on the humoral immune response in different strains of mice. *Immunology*, **23**, 897-909, 1972.
- 17) Kind, L. S. and Macedo-Sobrinho, B.: Enhanced immunogenicity of immunosuppressive rabbit antimouse thymocyte sera. *Transplant.*, **14**, 317-320, 1972.
- 18) Girardet, R., Friedman, E. A. and Karlson, K. E.: Rabbit anti-rat lymphocyte serum-induced lymphopenia in thoracic duct lymph and peripheral blood. *Surgery*, **76**, 267-271, 1974.
- 19) Watanabe, S., Mikata, A., Tadakuma, T., Niki, R. and Kageyama, K.: Surface membrane of lymphocytes. 1. Confirmation of antigenicity of lymphocytes. *Acta Path. Jap.*, **21**, 491-497, 1971.

Studies on the antigenicity of lymphocyte membrane
Part I. The purification method of lymphocyte membrane
and its immunization experiment on the rabbit
by

Hidehiro KOBASHI

Okayama University Medical School
Second Department of Internal Medicine

The lymphocyte membrane was isolated from the calf thymocytes and the bovine intestinal lymphnode lymphocytes through a pretreatment with ZnCl_2 and Tween-20 combining with a freeze-thawing procedure been followed by sucrose density gradient centrifugations. The recovery of lymphocyte membrane from the original lymphoid organ weight was 0.6 per cent (dry weight) and 0.9 per cent, as the lymphnode lymphocyte membrane (LM) and the thymic lymphocyte membrane (TM), respectively. Protein content in these preparations were 7.8 per cent and 2.3 per cent, in the LM and the TM, respectively. An amino acid content in the TM showed increased valine and leucine levels than the LM. Gel filtrations, using a Sepharose 4B column, of solubilized lymphocyte membranes revealed that the TM had higher protein content of larger molecular fractions than the LM. Disk electrophoresis also differentiated polypeptide bands between the LM and the TM. The morphological studies on these membrane preparations by a phase contrast microscope and an electron microscope demonstrated the purity of the membranes which was free from the contaminations of the microorganella.

A rabbit was immunized with either one of lymphocyte membrane (TM or LM) with (intracutaneously) or without (intravenously) Freund's complete adjuvant. The circulating lymphocytes decreased more rapidly after the immunization of the TM than of the LM. The thymus, spleen, and lymphnode were atrophic macroscopically in the both groups. Histologically, however, more reduced lymphocytes in the tissue were observed in the group treated with the TM resulting a reduced cortical area with increased fatty degeneration in the thymus, been combined with a reduced lymphfollicular area in the spleen as same as the lymphnode than the group treated with the LM.

Although a further elucidation is necessary, the lymphocyte membrane has shown specific antigenicity depending on the origin of the membrane upon the heterologous lymphoid organs.