

膠原病患者末梢血単核細胞からの トランスフェリンの放出異常

岡山大学医学部第三内科学教室 (指導: 太田善介教授)

波 多 野 誠

(平成元年 8 月 11 日受稿)

Key words : human peripheral blood mononuclear cells, lymphocyte proliferation, transferrin release, transferrin receptor, IL-2 receptor

緒 言

トランスフェリン (TF) はヒト血清中に 2~4 mg/dl の濃度で存在する主要な鉄結合タンパク質である。TF は免疫学的には鉄不飽和の状態で静菌作用を有すること^{1),2)}、顆粒球・花粉結合タンパク質であること³⁾などが知られているが、また一方でリンパ球の増殖における必須な因子の一つでもある^{4),5)}。この TF は活性化された T 細胞や B 細胞上に発現された TF レセプターに結合することにより鉄イオンを細胞内に供給しリンパ球の増殖を可能にする作用を有する^{6),7)}。

TF は *in vivo* では主として肝細胞により産生されることが知られているが、さらに末梢血単核細胞 (MNC) も TF を産生することが autoradiography 法を用いて⁸⁾、T 細胞が TF を放出することが蛍光抗体法を用いて⁹⁾明らかにされている。また近年、Lum らは complementary DNA (cDNA) を用いた *in situ* hybridization 法により CD 4 陽性細胞が TF を産生することを証明した¹⁰⁾。

ヒトリンパ球の *in vitro* 培養系には通常、異種である胎児ウシ血清の形で TF は補給されている。しかしウシ TF はヒト TF に比べてヒト TF レセプターに対しての親和性が低い¹¹⁾、培養系に存在するヒト TF が *in vitro* におけるリンパ球の増殖に重大な影響を及ぼしているものと考えられる¹²⁾。そこで今回の実験では酵素免疫測定法による TF 定量法を開発し、ヒト MNC の無刺激及び mitogen 刺激培養上清中の

濃度の測定を試みた。また従来全身性エリテマトーデス (SLE)、慢性関節リウマチ (RA) 患者の MNC は mitogen に対する反応性の低いこと、またこの低反応性は主として IL-2 産生能の低下に起因する^{13),14),15)}との報告がなされている。しかし、MNC より放出され、培養上清中に存在する TF 量も *in vitro* における患者 MNC の増殖に影響する重要な一因子ではないかと考え、健常人、SLE、及び RA 患者の MNC の無刺激及び phytohemagglutinin (PHA) 刺激培養上清中の TF 濃度を経時的に測定した。さらに MNC の無刺激及び PHA 刺激培養上清中の TF 濃度と同時に、tritiated thymidine (³H] TdR) 摂取率、培養細胞上の TF レセプター発現率、IL-2 レセプター発現率を測定し比較検討した。

材 料 と 方 法

1. 対 象

健常人 27 例及び、患者としては全身性エリテマトーデス分類のための改訂基準 (1982 年) により診断された SLE 患者 13 例とアメリカリウマチ協会旧診断基準で classical または definite を満足する RA 患者 15 例を対象とした。

2. 方 法

1) MNC の分離と培養

MNC は型の如くへリン加静脈血より Ficoll-Hypaque 比重遠沈法にて分離した。MNC は RPMI MEDIUM 1640 (GIBCO) の 15ml にて 5 回洗滌した。MNC は 10% の非働化胎児ウシ血清 (FCS, GIBCO) と penicillin G (明治製薬)

100U/ml, streptomycin (明治製菓) 100 μ g/ml を含む RPMI 1640 で 1×10^6 cells/ml に調整し, PHA-P (DIFCO), pokeweed mitogen (PWM, GIBCO), concanavalin A (ConA, SIGMA) を種々の濃度で添加あるいは非添加にて, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator 中で培養し, 経時的に培養液を採取した. 上清中の TF 濃度測定のためには培養後遠沈 (3,000rpm, 5 分間) し, 上清を採取後測定まで -20 $^{\circ}$ C にて保存した. また細胞を含んだ培養液中の TF 濃度は細胞を含んだままの培養液を凍結融解の操作を 3 回繰り返した後, 測定に供した.

2) 培養上清中の TF 濃度の測定

培養上清中 TF 濃度の測定は酵素免疫測定法により行った. 測定にあたっては, アフィニティー精製ヤギ抗ヒト TF 抗体 (EY ラボラトリーズ) を用いてビオチン・アビジン・システムによるサンドイッチ法にて施行した. すなわち, 炭酸緩衝液 (pH9.6) でアフィニティー精製ヤギ抗ヒト TF 抗体 (EY ラボラトリーズ) を 2,000 倍に希釈し, 平底 96 マイクロタイタープレート (三光純薬) の各穴に 200 μ l ずつ分注して 4 $^{\circ}$ C で一晩静置した. 各穴を 1% の Bovine serum albumin (BSA) を含む phosphate buffered saline (PBS) 300 μ l にてブロッキングしたのち 0.05% の Tween 20 を含む PBS にて 3 回洗滌し, 検体あるいは 10% FCS 加 RPMI 1640 に希釈した標準血清 (MBL) を 50 μ l ずつ加え室温で 3 時間静置した. 0.05% Tween 20 PBS 溶液で 3 回洗滌した後, ブロッキング液で 1,000 倍に希釈したビオチン標識アフィニティー精製ヤギ抗ヒト TF 抗体 (EY ラボラトリーズ) を 50 μ l ずつ加えて室温で 2 時間反応させた. さらに 3 回洗滌後, ブロッキング液で 1 μ g/ml に希釈したペルオキシダーゼ標識アビジン (MBL 社) を 50 μ l ずつ加え室温で 30 分間静置した. 5 回洗滌した後, ABTS (2,2'-azino-di [3-ethyl-benzthiazoline sulfonate (6)]) 基質溶液 (KPL) を 50 μ l ずつ加え発色させ, 吸光度を MICRO-ELISA READER (DYNATECH) を用いて 405nm にて測定した. TF 濃度は 0.8~250ng/ml の範囲で測定可能であった.

3) [³H] TdR 摂取率の測定

MNC を 10% FCS 加 RPMI 1640 にて 1×10^6 cells/ml に調整し, そのうち 200 μ l をマイクロテストプレート (Falcon #3042) にて培養し, 培養終了前に 5 μ Ci/ml の [³H] TdR を加え, 8 時間 pulse を行った. 培養終了後にラボマッシュ LM-101 (ラボサイエンス) にて細胞をガラスファイバー紙上に洗滌採取して液体シンチレーション・カウンターにて [³H] TdR 摂取率を測定した.

4) MNC 中の TF レセプター陽性細胞, IL-2 レセプター陽性細胞の同定

ヒト TF レセプターを認識する Ortho-mune OKT9 (Ortho Diagnostic System) 及びヒト IL-2 レセプター (CD25) を認識する MX-Ta 60 a (協和メデックス) を用いて免疫膜蛍光抗体法で測定した.

5) 統計学的処理

得られたデータは paired t test あるいは相関係数の有意検定を用いて検定した.

結 果

1. ヒト末梢血単核細胞 (MNC) 培養上清中の TF 量

1) PHA 添加による影響 (Fig. 1-a, Fig. 1-b): 健常人 3 例の MNC を無刺激及び PHA 2 μ l/ml の刺激下で培養し, 経時的にその培養上清中の TF 濃度を測定した (Fig. 1-a). 培養開始時の濃度は 9.8 ± 3.2 ng/ml (Mean $\pm$ SEM, n = 3) で, 無刺激では培養開始 5 日後に最高値の 15.5 ± 3.3 ng/ml に達し, 7 日後にはやや減少した. 一方, PHA で刺激した場合 36 時間後, 最高値の 12.2 ± 3.3 ng/ml に達した後, 5 日後まで減少して 8.6 ± 3.3 ng/ml となり, 7 日後にはやや上昇した. 細胞内濃度 (Fig. 1-b) は細胞を破壊する目的で凍結融解の操作を繰り返したため, 上清中の濃度より低値となったため計算上負の値を示した場合もあったが細胞内 TF 濃度の時間的経過を示しているものと考えられる. PHA の有無にかかわらず培養当初は急激に細胞内濃度は減少し, 無刺激例では細胞外への放出がピークに達した時期に一致して, 5 日後に最低値 - 3.5 ± 1.1 ng/ml に達した. PHA 刺激例では培養

開始48時間後に最低値 -2.2 ± 2.1 ng/mlに達し、培養期間中のすべての測定時において無刺激の場合より高値を示した。

2) ConA 添加による影響 (Fig. 2-a, 2-b) : 健康人3例のMNCを無刺激及びConA10 μ g/mlの刺激下で培養した。上清中濃度はConA刺激時には1日後に 5.3 ± 1.0 ng/mlにまで増加し、いったん減少した後3日後に最高値 5.4 ± 1.3 ng/mlとなり、再び5日後に 4.6 ± 0.9 ng/mlまで減少し、また再び増加した。ConA刺激時の細胞内濃度は培養開始後急激に低下し、3日後には最低値 -1.3 ± 0.7 ng/mlに達した後増加し、無刺激の場合より高値を示した。これはPHA刺激時

とほぼ同様の経過であった。

3) PWM 添加による影響 (Fig. 3-a, 3-b) : 健康人6例のMNCを無刺激及びPWM10 μ l/mlの刺激下で培養した。上清中濃度はPWM刺激時には32時間後に最高値 13.1 ± 2.2 ng/mlに達した後減少した。細胞内濃度はPWM刺激時には32時間後に最低値の -6.0 ± 2.9 ng/mlまで減少した後増加し、無刺激時の細胞内濃度より高値であった。PHA, ConAの場合と若干異なるものの同様の経過を示した。

4) 培養温度の影響 (Fig. 4) : 健康人2例のMNCを 1×10^6 cells/mlに調整し、無刺激及びPHA刺激下で37℃と4℃にて培養を試みた。培

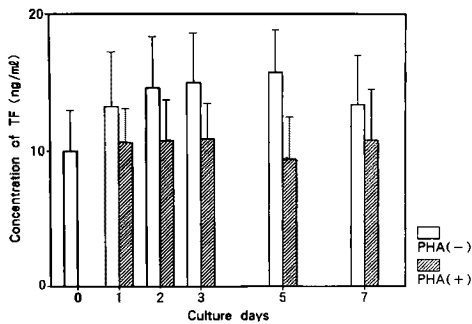


Fig. 1-a Transferrin concentration in culture supernatants of human peripheral blood mononuclear cells with or without phytohemagglutinin (PHA). Results represent mean $\pm$ SEM of 3 experiments.

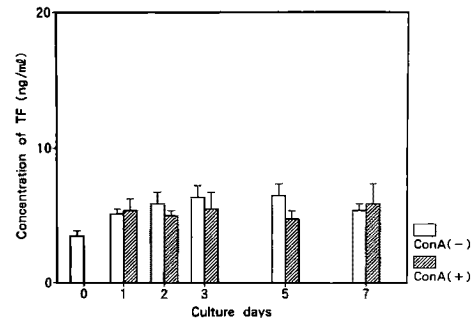


Fig. 2-a Transferrin concentration in culture supernatants of human peripheral blood mononuclear cells with or without concanavalin A (ConA). Results represent mean $\pm$ SEM of 3 experiments.

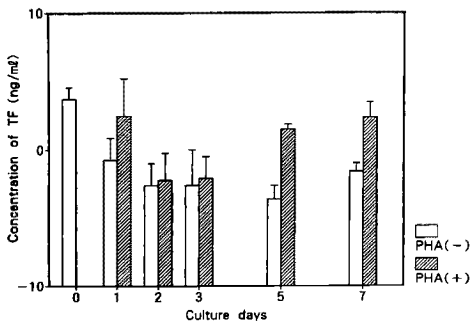


Fig. 1-b Intracellular transferrin concentration of human peripheral blood mononuclear cells cultured with or without phytohemagglutinin (PHA). Results represent mean $\pm$ SEM of 3 experiments.

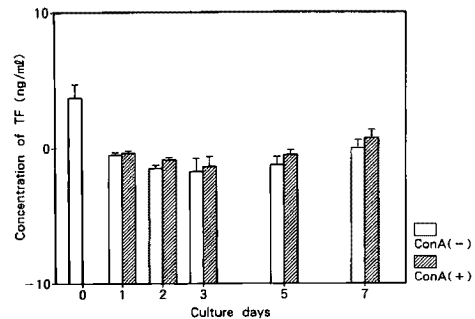


Fig. 2-b Intracellular transferrin concentration of human peripheral blood mononuclear cells cultured with or without concanavalin A (ConA). Results represent mean $\pm$ SEM of 3 experiments.

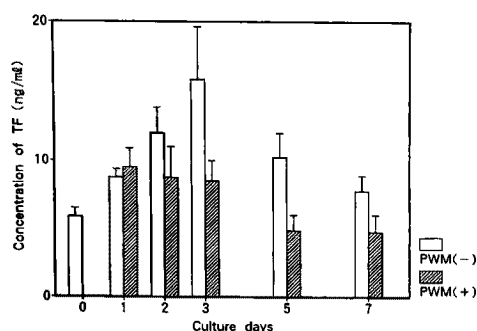


Fig. 3-a Transferrin concentration in culture supernatants of human peripheral blood mononuclear cells with or without pokeweed mitogen (PWM). Results represent mean $\pm$ SEM of 6 experiments.

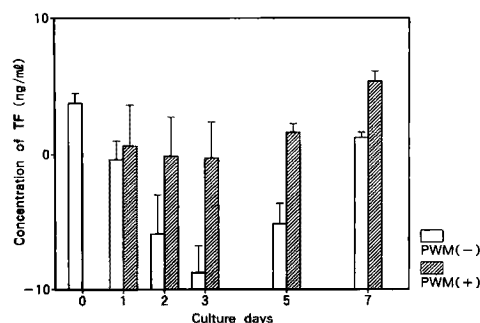


Fig. 3-b Intracellular transferrin concentration of human peripheral blood mononuclear cells cultured with or without pokeweed mitogen (PWM). Results represent mean $\pm$ SEM of 6 experiments.

養上清中 TF 濃度は 4℃においては37℃に比べて低値であり、特に培養3日後の培養上清中への TF の放出は認めなかった。

5) 鉄イオン濃度の影響 (Fig. 5) : 健常人5例より分離した MNC を Ferric citrate の最終濃度が 0, 0.01, 0.1, 1.0mM に調整した培養液に 1×10^6 cells/ml の濃度で浮遊し、それぞれ無刺激及び PHA 刺激下で培養し、培養開始 0, 3, 5 日後に上清を採取し、その TF 濃度を測定した。無刺激の場合培養開始 3 日後、5 日後ともに鉄イオン濃度が高いほど TF 濃度は低値であった。しかし PHA で刺激した場合は無刺激に比べ低値を示したが鉄イオン濃度の影響は認めな

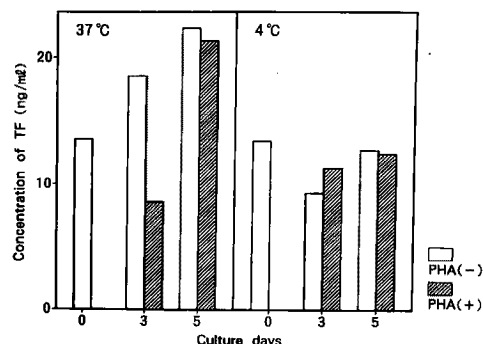


Fig. 4 Effect of temperature on transferrin release from human peripheral blood mononuclear cells cultured in the presence or absence of phytohemagglutinin (PHA). The results showed a representative data of 2 separate experiments.

かった。

2. MNC 培養上清中 TF 濃度と $[^3\text{H}]$ TdR 摂取率の関係 (Table 1)

健常人3例より分離した MNC を 1×10^6 cells/ml に調整し、PHA の濃度を 0, 0.1, 2.0, 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ の4群に分けて培養し、それぞれ培養開始 0, 3, 5 日間後に上清を採取し、その TF 濃度を測定した。また培養終了前8時間に 5 μCi の $[^3\text{H}]$ TdR を pulse し、培養終了時の uptake を同時に測定した。

TF 濃度は PHA が 2.0 $\mu\text{l}/\text{ml}$ の濃度で低値の傾向は認めたものの培養3日後において PHA の濃度 0.1 と 2.0 $\mu\text{l}/\text{ml}$ で有意差 ($p < 0.05$) を認めたのみであった。上清中 TF 濃度と $[^3\text{H}]$ TdR 摂取率との相関は摂取率のカウント (dpm) を対数に変換し、相関係数 r を求めると、PHA 濃度 0 $\mu\text{l}/\text{ml}$ では $r = 0.307$, 0.1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ では $r = 0.437$, 2.0 $\mu\text{l}/\text{ml}$ では $r = 0.298$, 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ では $r = 0.393$ であった。いずれも統計学的に有意な相関関係は認めなかった。

$[^3\text{H}]$ TdR 摂取率は PHA が 2.0 $\mu\text{l}/\text{ml}$ の濃度で最も高値を示したため以後の実験では PHA は 2.0 $\mu\text{l}/\text{ml}$ の濃度で使用した。

3. 健常人及び SLE, RA 患者 MNC 培養上清中の TF 量 (Fig. 6)

健常人及び SLE, RA 患者 MNC を 1×10^6 cells/ml に調整した後、無刺激と PHA (2.0 $\mu\text{l}/$

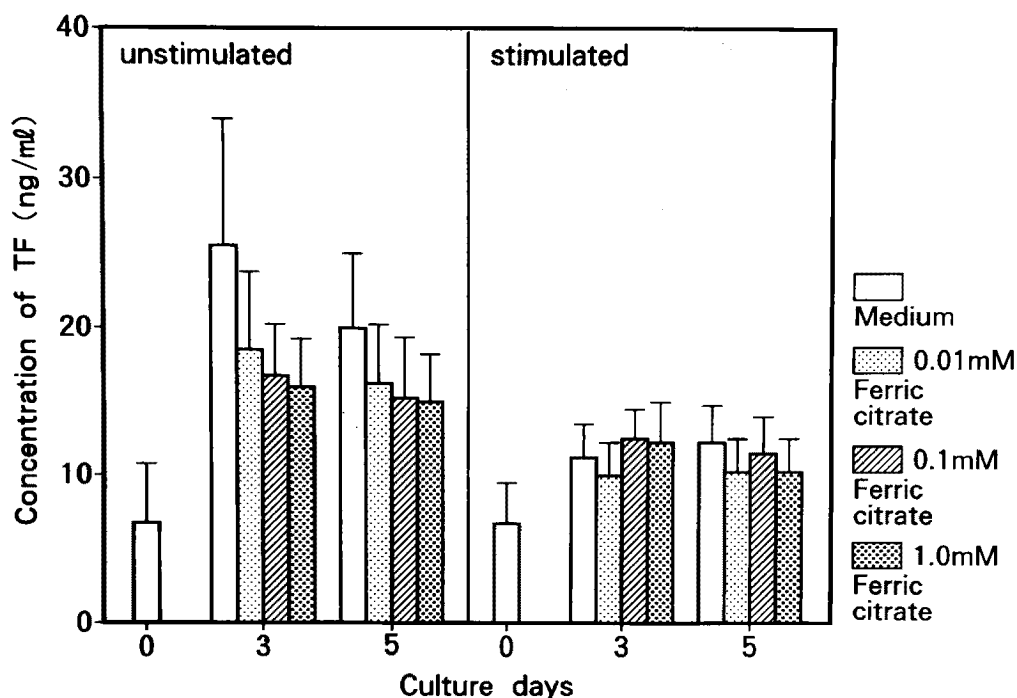


Fig. 5 Effect of ferric citrate on transferrin release from human peripheral blood mononuclear cells unstimulated or stimulated with phytohemagglutinin (PHA). Results represent mean $\pm$ SEM of 5 experiments.

Table 1 Simultaneous measurement of transferrin release and DNA synthesis by human peripheral blood mononuclear cells unstimulated or stimulated with three different concentrations of phytohemagglutinin (PHA).

Concentrations of PHA (μ l/ml)	Transferrin release (ng/ml)			[3 H] TdR uptake (dpm)		
	Culture days			Culture days		
	0	3	5	0	3	5
0.0	10.5	23.4	25.8	213	382	4,504
0.1	10.5	22.2	22.7	213	25,420	23,519
2.0	10.5	19.4	24.1	213	75,747	18,328
10.0	10.5	24.7	23.8	213	63,002	17,042

ml) による刺激下で培養し、培養開始 0, 3, 5 日後に上清を採取し、その TF 濃度を測定した。健常人の培養開始時の濃度が 7.1 ± 1.2 ng/ml (Mean $\pm$ SEM, $n=14$) 無刺激の場合 3 日後に 14.1 ± 2.6 ng/ml, 5 日後に 13.0 ± 2.8 ng/ml となり、0 日と 3 日後、0 日と 5 日後の濃度に有意差 ($P < 0.05$) を認めた。PHA 刺激の場合、無

刺激の場合と比べて TF 濃度の増加の程度は少なく 3 日後で 11.0 ± 2.3 ng/ml, 5 日後で 10.8 ± 2.8 ng/ml であり、いずれも 0 日における濃度と有意差はなかった。SLE 患者の場合、無刺激時、PHA 刺激時とも健常人に比べて TF 濃度の増加が少ない傾向にあり、無刺激 0 日か 8.6 ± 4.2 ng/ml ($n=10$), 5 日後で 9.8 ± 2.8 ng/ml, 5 日後に

は減少し $7.7 \pm 2.4 \text{ ng/ml}$ であった。PHA による刺激 3 日後に $7.0 \pm 2.2 \text{ ng/ml}$, 5 日後には $7.9 \pm 2.6 \text{ ng/ml}$ であった。無刺激時, PHA 刺激時ともに 0 日と 3 日後, 5 日後の TF 濃度に有意差はなかった。RA 患者の場合, 0 日の濃度は $9.7 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$ ($n=10$) であり, 無刺激では 3 日後に $15.5 \pm 2.5 \text{ ng/ml}$, 5 日後に $13.4 \pm 2.1 \text{ ng/ml}$ で, 0 日と 3 日後の濃度に有意差 ($p < 0.02$) を認めた。PHA 刺激時には 3 日後に $10.3 \pm 1.9 \text{ ng/ml}$ と濃度増加の程度は少ない傾向にあり, 5 日後に $13.7 \pm 2.5 \text{ ng/ml}$ と上昇し, 3 日後と 5 日後の濃度に有意差 ($p < 0.05$) を認めた。

4. 健康人及び SLE, RA 患者 MNC 培養上清中 TF 濃度と ^3H TdR 摂取率, TF レセプター発現率, IL-2 レセプター発現率の関係 (Table 2, 3)

健康人 6 例, SLE 患者 6 例, RA 患者 6 例より MNC を採取し, $1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ に調整したの

ち無刺激及び PHA ($2.0 \mu\text{l/ml}$) 刺激培養を行った。3 日後に培養上清を採取しその TF 濃度の測定を行い, 細胞は洗浄後間接蛍光抗体法を用いて膜表面への TF レセプターと IL-2 レセプターの発現率を測定した。また同時に培養終了前 8 時間に $5 \mu\text{Ci}$ の ^3H TdR を pulse し, 培養終了時に uptake を測定した (Table 2)。 ^3H TdR 摂取率は対数に変換したのち, 健康人, SLE 患者, RA 患者ごとにそれぞれの測定項目間の相関関係につき検討した (Table 3)。その結果 table 3 に示すように健康人では ^3H TdR 摂取率と TF レセプター発現率, IL-2 レセプター発現率の間, TF レセプター発現率と IL-2 レセプター発現率の間に有意な正の相関を認めた。SLE 患者では ^3H TdR 摂取率と TF レセプター発現率, IL-2 レセプター発現率の間, TF レセプター発現率と IL-2 レセプター発現率の間に有意な正の相関を認めた。RA 患者では ^3H

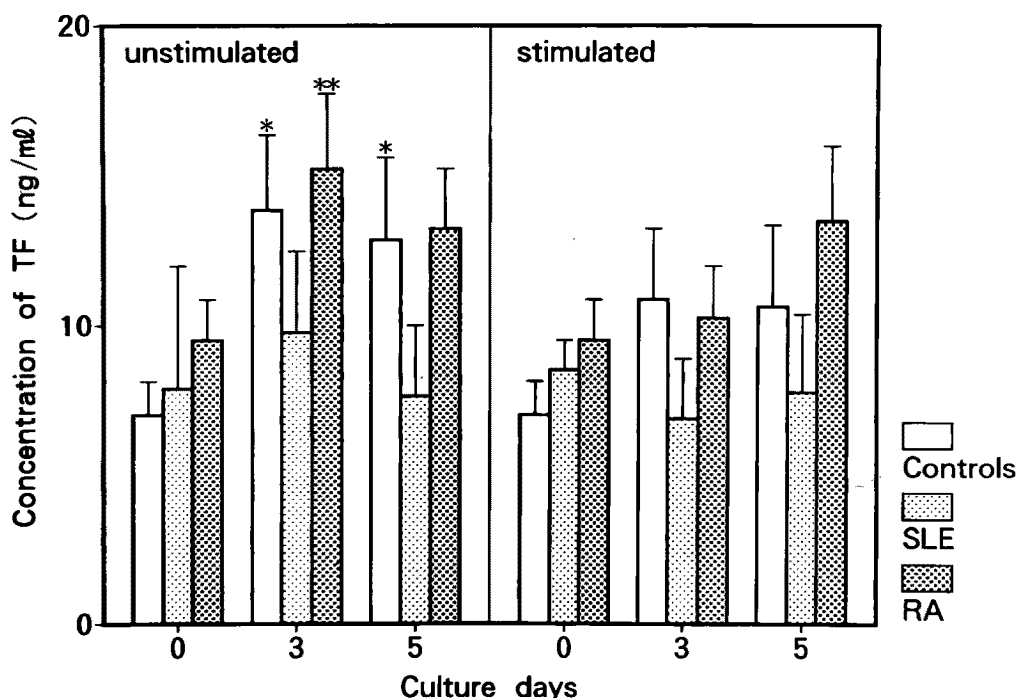


Fig. 6 Transferrin release by peripheral blood mononuclear cells from healthy controls, systemic lupus erythematosus (SLE) patients and rheumatoid arthritis (RA) patients unstimulated or stimulated with phytohemagglutinin (PHA). Results represent mean $\pm$ SEM of 10 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ compared with the concentration of day 0.

TdR 摂取率と TF レセプター発現率, IL-2 レセプター発現率の間, TF レセプター発現率と IL-2 レセプター発現率の間に有意な正の相関を認めた。しかし, 培養上清中 TF 濃度と他の測定項目の間には健常人, SLE, RA 患者のいずれも

統計学的に有意な相関関係は認めなかった。

考 察

in vitro における細胞の培養にあたっては種々の栄養素が必要である。これらの栄養素は一般

Table 2 Simultaneous measurement of transferrin concentration in culture supernatants with expression of transferrin and IL-2 receptors and DNA synthesis of peripheral blood mononuclear cells from healthy controls and patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) cultured with or without phytohemagglutinin (PHA). Results represent mean $\pm$ SEM of 6 experiments.

Donors	Culture days	PHA ($2\mu\text{l/ml}$)	Transferrin release (ng/ml)	TFR (%)	IL-2 R (%)	[^3H] TdR uptake (dpm)
controls	0	—	9.7 $\pm$ 1.4	0.1 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	333 $\pm$ 35
	3	—	17.5 $\pm$ 3.2	0.5 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.3	516 $\pm$ 207
	3	+	14.2 $\pm$ 2.4	29.7 $\pm$ 5.9	43.4 $\pm$ 7.8	123,336 $\pm$ 18,253
SLE	0	—	11.3 $\pm$ 2.1	0.4 $\pm$ 0.2	0.0 $\pm$ 0.0	1,347 $\pm$ 146
	3	—	14.8 $\pm$ 2.5	0.6 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.3	911 $\pm$ 199
	3	+	13.5 $\pm$ 2.2	16.7 $\pm$ 7.2	31.4 $\pm$ 12.6	92,213 $\pm$ 20,871
RA	0	—	8.9 $\pm$ 1.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	314 $\pm$ 52
	3	—	13.6 $\pm$ 1.5	1.3 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 1.0	797 $\pm$ 215
	3	+	13.3 $\pm$ 1.4	16.6 $\pm$ 5.0	29.5 $\pm$ 7.3	92,462 $\pm$ 14,850

SLE : systemic lupus erythematosus

RA : rheumatoid arthritis

TFR : percentage of transferrin receptor positive cells

IL-2 R : percentage of IL-2 receptor positive cells

[^3H] TdR : tritiated thymidine

Table 3-a Correlation coefficients and those significance (p value) between transferrin concentration in culture supernatants, DNA synthesis and expression of transferrin and IL-2 receptors of peripheral blood mononuclear cells from healthy controls cultured for 3 days with or without phytohemagglutinin.

	TF (ng/ml)		[^3H] TdR (dpm)		TFR (%)		IL-2 R (%)	
	C	S	C	S	C	S	C	S
TF (ng/ml)			0.013	n. s.	0.014	n. s.	0.090	n. s.
[^3H] TdR (dpm)					0.866	<0.001	0.898	<0.001
TFR (%)							0.956	<0.001

C : correlation coefficient

S : significance (p value)

TF (ng/ml) : transferrin release

[^3H] TdR (dpm) : tritiated thymidine uptake

TFR (%) : percentage of transferrin receptor positive cells

IL-2 R (%) : percentage of IL-2 receptor positive cells

n. s. : not significant

Table 3-b Correlation coefficients and those significance (p value) between transferrin concentration in culture supernatants, DNA synthesis and expression of transferrin and IL-2 receptors of peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) cultured for 3 days with or without phytohemagglutinin.

	TF (ng/ml)		³ H TdR (dpm)		TFR (%)		IL-2 R (%)	
	C	S	C	S	C	S	C	S
TF (ng/ml)			0.006	n. s.	0.019	n. s.	0.106	n. s.
³ H TdR (dpm)					0.550	<0.05	0.657	<0.01
TFR (%)							0.879	<0.001

Table 3-c Correlation coefficients and those significance (p value) between transferrin concentration in culture supernatants, DNA synthesis and expression of transferrin and IL-2 receptors of peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis (RA) cultured for 3 days with or without phytohemagglutinin.

	TF (ng/ml)		³ H TdR (dpm)		TFR (%)		IL-2 R (%)	
	C	S	C	S	C	S	C	S
TF (ng/ml)			0.277	n. s.	0.018	n. s.	0.107	n. s.
³ H TdR (dpm)					0.795	<0.001	0.820	<0.001
TFR (%)							0.767	<0.001

に血清の形で培養液中に補給されており、ヒトのリンパ球系細胞の培養にはウシ胎児血清が広く用いられている。近年、血清に代わるものとして、serum-free media が広く用いられるようになってきたが、この成分の一つとして、TF がインスリンとならんで必須のものとして¹⁶⁾、TF は、細胞表面の特異的、高親和性 TF レセプターとともに細胞の鉄取り込み効率を高めることにより、分裂細胞にとって必須の栄養素となっている¹⁷⁾。実際、T 細胞が分裂増殖する際には細胞表面にはこの TF レセプターが出現すること^{6),18)}、このレセプターに対する抗体により T 細胞の分裂増殖がブロックされることが証明されている⁶⁾。

従来 TF は肝細胞で産生され¹⁹⁾、循環血中に放出されるものと考えられていた。最近の報告では中枢神経系をはじめとして肝以外の組織においても産生されることが報告されている^{20),21)}。リンパ球系細胞においても最近 Lum らが TF の cDNA を用いた in situ hybridization 法により、mitogen 刺激後の CD 4 陽性 T 細胞が TF を産

生することを報告した¹⁰⁾。さらに彼らは同様の方法で mitogen 刺激による T 細胞の増殖にあたって TF レセプターは IL-2 が IL-2 レセプターに結合した後に発現し、TF は TF レセプターが発現した後に産生されてくることを明らかにした¹⁰⁾。TF は IL-2 による T 細胞増殖刺激後、細胞増殖に必要な鉄を細胞内に取り込むため産生されるものと考えられるが、循環血液中に TF が充分量存在する *in vivo* においては局所での TF 産生の意義は明かではない。しかし、異種である胎児ウシ血清の形で TF が補給される *in vitro* 培養系においてはヒト TF がリンパ球の増殖に大きな影響を及ぼすことが知られている¹²⁾。

今回の実験ではまず、ヒト MNC 培養系においてヒト TF の培養液中の濃度を明らかにするため、TF の酵素免疫測定法を開発し、ヒト MNC 培養上清中と細胞内のヒト TF 濃度を測定した。その結果、無刺激の培養に際しては細胞内の TF 濃度が減少すると同時に上清中濃度が上昇し、細胞内から上清中へ TF が放出されることが明らかとなった。上清中の TF 濃度は mitogen 刺

激培養においては mitogen の種類によって多少の差は認められたが、培養開始15~32時間は無刺激培養時と同様の濃度の変化を示し（結果は示していない）、その後は無刺激培養時の濃度より低値を示した。一方、細胞内濃度は48時間以降 mitogen 刺激培養の濃度が高値を示した。放出された TF がすでに細胞内に蓄えられていたものか新たに合成されたものかは区別できないものの無刺激培養でも放出されること、また mitogen 刺激培養、無刺激培養とも培養開始後しばらくは同様の濃度変化を示すこと、mitogen 刺激培養開始後 TF 合成までには時間を要することより、培養開始時の上清中への TF 放出はおもに細胞内に蓄えられていた TF によるものと考えられる。その後 mitogen 刺激培養で TF 濃度が低値をとるのは細胞の増殖にともなって細胞表面の TF レセプターへの結合や細胞内への取り込みが増加しているためと考えられる。これは細胞内濃度が mitogen 刺激時には無刺激に比して高値をとっていることから裏付けられる。以上、すでに MNC より TF が産生されたり放出されることは定性的に証明されていたが、MNC からの TF の放出を量的変動によって明らかにすることができた。

培養開始時の TF の放出は 4℃では認められなかったが、この結果は TF の放出が何らかの細胞代謝に依存して行われているものであって、単に拡散したり漏れ出たものではないことを示している。

PHA 刺激時の培養上清中 TF 濃度と PHA 濃度を比較して検討したが、PHA 濃度 2.0 μ l/ml で TF 濃度が低値の傾向は認めたが有意差は一部に認めたのみであった。また [3 H] TdR 摂取率との相関を検討したが正の相関を示す傾向は認められたものの統計学的に有意な相関関係は認めなかった。Fig. 1 と同様に DNA 合成の盛んな時期に一致して PHA 刺激時の培養上清中の TF 濃度が無刺激培養時より低値を示していた。これらの結果は PHA 刺激による培養においては単核細胞の増殖にともなって細胞表面の TF レセプターへの結合や細胞内への取り込みが増加するため、また増殖にあたって新たに T 細胞から産生された TF の量が放出された総量に比して

少ないため上清中の TF 濃度が細胞の増殖を直接反映せず、このような結果となったものと考えられる。

以上の結果から TF が *in vitro* においては autocrine または paracrine system を介してリンパ球増殖因子として利用されている可能性があるものと考えられる。単核細胞が自らの増殖に必要な鉄イオン獲得のために TF を細胞外に放出するとすれば、高い細胞外鉄イオン濃度条件（生理的濃度の範囲内）では上清中への TF 放出が抑制された現象は合理的であると解釈できる。

さて、SLE, RA 患者の MNC が種々の mitogen に対する反応性が低いことは古くより報告されており^{22),23),24),25)}、この低反応性については IL-2 の産生能の低下に原因が求められていた^{13),14),15)}。さらに、IL-2 と同様 MNC より放出されるヒト TF も *in vitro* においては患者 MNC の増殖に影響を及ぼしている可能性がある。そこでこの関係を明らかにするために、健常人及び SLE, RA 患者 MNC で培養上清中の TF 濃度を測定した。この結果、SLE 患者では無刺激時、PHA 刺激時ともに健常人の培養上清中の TF 濃度 kinetics とは異なり、TF の上清中への放出は少なかった。RA 患者 MNC を無刺激で培養した場合には健常人と同様の kinetics を示したが、PHA で刺激した場合には健常人とは異なった kinetics を示した。このように、SLE, RA 患者 MNC では培養上清中の TF 濃度の kinetics が健常人 MNC とは相違することから、MNC 内に蓄えられている TF 量の減少かあるいは何らかの TF 放出異常が存在することが患者 MNC の mitogen に対する低反応性の一因となっている可能性も示唆された。さらに詳細に検討するため、健常人及び SLE, RA 患者 MNC を培養開始時と72時間の培養終了時に上清中の TF 濃度、MNC 表面の TF 及び IL-2 レセプターの発現率、 $[^3\text{H}]$ TdR 摂取率を同時に測定した。SLE 患者においては MNC 分離時すでに正常人に比して有意 ($P < 0.05$) に $[^3\text{H}]$ TdR 摂取率が高値であった。従来より SLE 患者では *in vivo* ですでに活性化されたリンパ球の存在が証明されているが、すでに *in vivo* で TF を放出し

てしまっているために TF の細胞内への蓄積量が少なく、これが SLE 患者で TF の上清中への放出が少ない結果となった一因と考えられる。また、PHA で刺激して培養した場合の TF 放出量の差は、TF を産生すると報告されている CD4 陽性細胞の SLE 患者における質的量的変化が原因となっている可能性もある。ところで、健康人、SLE、RA 患者ともに $[^3\text{H}]$ TdR 摂取率と TF 及び IL-2 レセプター発現率には有意な正の相関関係を認めたが、培養上清中 TF 濃度と他の測定項目には健康人、SLE、RA 患者のいずれも統計学的に有意な相関関係は認めなかった。このように MNC 培養上清中 TF 濃度は種々の細胞増殖パラメーターとは相関が認められず、培養上清中の TF 濃度は MNC 増殖を直接反映していなかった。この結果は、細胞内に蓄えられていたものが放出されて上清中に存在している TF を主として測定していること、また MNC 増殖にしたがって、TF が細胞表面の TF レセプターと結合したり、細胞内に取り込まれるため、上清中の TF 濃度が減少することが原因と考えられる。今後、患者 CD4 陽性細胞の TF 産生能について検索するためには mitogen 刺激後新たに MNC により産生される TF のみを測定し検討する必要がある。

結 語

酵素免疫測定法による TF 定量法を開発し、

ヒト MNC の無刺激及び mitogen 刺激培養上清中の TF 濃度測定を試みた。その結果、培養開始後細胞内の TF が減少するとともに上清中濃度が上昇し、細胞内から上清中へ TF が放出されることが明かとなった。放出された TF は主として細胞内に蓄えられていたものと考えられた。mitogen 刺激培養においては細胞増殖にともなって上清中 TF 濃度は無刺激培養に比して低値を示した。これは細胞表面の TF レセプターへの結合や、細胞内への取り込みが増加するためと考えられた。TF の放出は 4℃ では認められず、何等かの細胞代謝に依存して放出が行われるものと考えられた。高い細胞外鉄イオン条件では TF の放出は抑制された。以上より *in vitro* では TF が autocrine または paracrine を介して細胞増殖因子として利用されている可能性が示唆された。

SLE、RA 患者 MNC を培養し上清中 TF 濃度を測定した。SLE、RA 患者では上清中の TF 濃度 kinetics は正常人と異なっており、MNC 内に蓄えられている TF 量の減少か、何等かの TF 放出異常の存在が患者 MNC の mitogen に対する低反応性の一因と考えられた。

稿を終るにあたり御指導と御校閲を賜った恩師太田善介教授に深甚の謝意を表します。また、終始多大の御指導と御援助をいただいた西谷皓次博士に深謝致します。

文 献

- 1) Bullen JJ, Rogers HJ and Lewin JE: The bacteriostatic effect of serum on *Pasteurella septica* and its abolition by iron compounds. *Immunology* (1971) **20**, 391—406.
- 2) Weinberg ED: Infection and iron metabolism. *Am J Clin Nutr* (1977) **30**, 1485—1490.
- 3) Sass-Kuhn SP, Moqbel R, Mackay JA, Cromwell O and Kay AB: Human granulocyte/pollenbinding protein. *J Clin Invest* (1984) **73**, 202—210.
- 4) Imrie RC and Mueller GC: Release of a lymphocyte growth promoter in leucocyte cultures. *Nature* (1968) **219**, 1276—1277.
- 5) Tormey DC and Mueller GC: Biological effects of transferrin on human lymphocytes in vitro. *Exp Cell Res* (1972) **74**, 220—226.
- 6) Neckers LM and Cossman J: Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) **80**, 3494—3498.

- 7) Neckers LM, Yenokida G and James SP : The role of the transferrin receptor in human B lymphocyte activation. *J Immunol* (1984) **133**, 2437—2441.
- 8) Soltys HD, and Brody JI : Synthesis of transferrin by human peripheral blood lymphocytes. *J Lab Clin Med* (1970) **75**, 250—257.
- 9) Nishiya K, Chiao JW and De Sousa M : Iron binding proteins in selected human peripheral blood cell sets : Immunofluorescence. *Br J Haematol* (1980) **46**, 235—245.
- 10) Lum JB, Infante AJ, Makker DM, Yang F and Bowman BH : Transferrin synthesis by inducer T lymphocytes. *J Clin Invest* (1986) **77**, 841—849.
- 11) Tsavealer L, Stein BS and Sussman HH : Demonstration of the specific binding of bovine transferrin to the human transferrin receptor in K562 cells : Evidence for interspecies transferrin internalization. *J Cell Physiol* (1986) **128**, 1—8.
- 12) Gaston JSH, Bacon PA and Strober S : Enhancement of human T-lymphocyte growth by human transferrin in the presence of fetal bovine serum. *Cell Immunol* (1987) **106**, 366—375.
- 13) Linker-Israeli M, Bakke AC, Kitridou RC, Gendler S, Gillis S and Horwitz DA : Defective production of interleukin 1 and interleukin 2 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J Immunol* (1983) **130**, 2651—2655.
- 14) Combe B, Andary M, Klein B, Clot J and Sany J : Regulation of interleukin-2 production in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* (1987) **14**, 226—229.
- 15) Combe B, Pope RM, Fischbach M, Darnell B, Baron S and Talal N : Interleukin-2 in rheumatoid arthritis : production of and response to interleukin-2 in rheumatoid synovial fluid, synovial tissue and peripheral blood. *Clin Exp Immunol* (1985) **59**, 520—528.
- 16) Barnes D and Sato G : Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal Biochem* (1980) **102**, 255—270.
- 17) 木村一郎 : トランスフェリン. *日臨* (1986) **44**, 156—162.
- 18) Pelosi E, Testa U, Louache F, Thomopoulos P, Salvo G, Samoggia P and Peschle C : Expression of transferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human T-lymphocytes. *J Biol Chem* (1986) **261**, 3036—3042.
- 19) Aisen P and Listowsky I : Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem* (1980) **49**, 357—393.
- 20) Skinner MK and Grisold MD : Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. *J Biol Chem* (1980) **255**, 9523—9525.
- 21) Bloch B, Popovici T, Levin MJ, Tuil D and Kahn A : Transferrin gene expression visualized in oligodendrocytes of the rat brain by using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) **82**, 6706—6710.
- 22) Rosenthal CJ and Franklin EC : Depression of cellular-mediated immunity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (1975) **18**, 207—217.
- 23) Utsinger PD : Lymphocyte responsiveness in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (1976) **19**, 88—91.
- 24) Lockshin MD, Eisenhauser AC, Kohn R, Weksler M, Block S and Mushlin SB : Cell-mediated immunity in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* (1975) **18**, 245—250.
- 25) Sillverman HA, Johnson JS, Vaughan JH and McGlamory JC : Altered lymphocyte reactivity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (1976) **19**, 509—515.

Transferrin release by human peripheral blood mononuclear cells

Makoto HATANO

Third Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Z. Ota)

The concentration of human transferrin(TF) in culture supernatants and intracellular TF contents of normal human peripheral blood mononuclear cells (MNC) after incubation with or without mitogens (PHA, ConA, PWM) for different periods of time were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. TF concentrations in culture supernatant tended to gradually increase from the beginning of MNC culture to a peak at day 3 to 5. In contrast, intracellular concentrations of TF were decreased after MNC culture in parallel with the increase of TF concentration in the supernatants. The presence of mitogens mostly diminished TF concentrations in culture supernatant at the time when DNA synthesis maximally occurred. Transferrin release from MNC cultured at 4°C was minimal. A higher iron ion concentration of the culture medium suppressed the TF release from MNC. These results suggested that TF was actually released from MNC when cells were resting but in active metabolism at low iron concentration. In addition, the kinetics of TF release by MNC from systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) patients were different from that of healthy controls. Low spontaneous TF release from SLE MNC through the culture and higher TF release from RA MNC in PHA stimulation after culture for 5 days were observed. These abnormalities found in SLE and RA might be one of causes of the low responsiveness of MNC in these patients to various mitogens.