

## マイトーゼンとしての利用

### マイトーゼンとは

レクチンの細胞に対する生物活性の中で、画期的なものとしてリンパ球との反応があります。リンパ球を非常に低い濃度のレクチンとともに培養すると、リンパ球が増殖し、分裂するようになります。このように静止期にあるリンパ球を成長・増殖する状態へと引き金を引くことはマイトーゼン刺激と呼ばれ、異物（抗原）に対する生体の免疫応答の鍵となる重要な現象です。

マイトーゼンとして主に利用されるレクチンは Con A、PHA-P、PHA-L4、PWM など、これらをリンパ球とともに 48~72 時間培養し、DNA に取り込まれた標識チミジンの増加率を測定することにより検査されます。多くのマイトーゼンレクチンはリンパ球の T 細胞だけを刺激し、B 細胞に対しては活性を持ちませんが、例外として PWM は T 細胞と B 細胞の両方を活性化します。

マイトーゼンレクチンは細胞の抗原特異性とは無関係に、活性化可能なリンパ球のほとんどを活性化できるため、細胞の増殖による変化を追求したり、研究したりするのが容易です。<sup>1) 2) 3) 4)</sup> またレクチンが T リンパ球に対し、細胞傷害活性を誘導させることも明らかとなっています。誘導された T 細胞の細胞傷害活性は抗原非特異的であることから、様々な正常細胞や悪性化細胞に対して発揮されます。<sup>5)</sup>

このようにレクチンによるマイトーゼン活性化は、使用が容易で簡単なことから、エイズを含む様々な病気の患者の免疫能を判定する手段となっています。また種々の免疫抑制効果や免疫療法の効果を調べることにも使われています。さらに最近ではガンの治療法である LAK 療法におけるリンパ球の分裂促進剤としても注目されています。<sup>6) 7)</sup>

### ヒトリンパ球幼若化試験

リンパ球幼若化試験は、疾患患者の末梢血リンパ球の DNA 合成能を測定、比較するのによく用いられます。この反応は一般的な細胞性免疫反応能力を示すと考えられています。

測定方法としては、固定染色標本で染色体の出現した細胞数を数える方法、形態学的に観察する方法等もありますが、<sup>3</sup>H-チミジンの細胞核への取り込みを測定する方法が簡便で客観性があるため、よく用いられます。

### <sup>3</sup>H-チミジンの取り込みによる方法

#### 1. 材料・準備

- ・マイクロタイタープレート
- ・セルハーベスター
- ・グラスファイバーフィルター
- ・カウンティングバイアル
- ・<sup>3</sup>H-チミジン
- ・トルエンシンチレーター (POPO 0.1 g + PPO 5 g / 1ℓ トルエン)
- ・液体シンチレーションカウンター
- ・培養液: RPMI 1640 1.05 g  
NaHCO<sub>3</sub> 0.2 g  
ペニシリン 10,000 Unit  
ストレプトマイシン 10 mg  
ヒトまたはウシ胎児血清 10 ml / 純水 100 ml

フィルターでろ過滅菌後、使用量にあわせて小びんにつめ、密栓して -20°C で保存する。

この状態で 2 ヶ月は保存使用可能。使用時は融解して使い切るようにし、凍結融解は繰り返さない。

- ・マイトーゼン: 培養液で溶解し、濃度 10~50 μg/ml に調製する。

滅菌小試験管に分注、密栓して -20°C で保存する。

この状態で 1 ヶ月は保存使用可能。使用時は融解しフィルターでろ過、使い切るようにする。

## 2. リンパ球の分離

- ① ヘパリン添加血液より Ficoll-Conray 法にてリンパ球を分離する。
- ② CMF-PBS(pH7.0) \* 1 で 3 回洗浄
- ③ 培養液 1 ml に懸濁し、リンパ球数を算定する。
- ④ 培養液で  $5.6 \times 10^5$  個/ml に調製する。

\*1 CMF-PBS: Calcium Magnesium Free PBS (PBS-)

## 3. リンパ球の培養

- ① マイクロプレートの各ウェルに、リンパ球浮遊液を 180  $\mu$ l ずつ分注する。
- ② マイトージェン溶液を各ウェルに 20  $\mu$ l ずつ分注する。
- ③ 5% CO<sub>2</sub> in air 37°C 湿潤状態で、3 日間培養する。
- ④ 培養終了 6~20 時間前に 3H-チミジン を培養液あたりの最終濃度 1  $\mu$  Ci/ml になるように各ウェルに分注する。

## 4. 活性の測定

- ① Labo-MASH 等を用いて食塩水でウェル内をハーベストしつつ、細胞をグラスファイバーフィルター上に集め、これを連続吸引してフィルター上の細胞を洗浄する。(約 20 秒間、生理食塩水約 1.5 ml)
- ② グラスフィルター上の細胞固着部を剥離し、カウンティングバイアルに入れる
- ③ 充分乾燥させた後、液体シンチレーター 5 ml をディスペンサーを用いて各バイアルに分注し、シンチレーションカウンターにて計測する。

本操作法は豊島聰先生(星薬科大学)のご指導をもとに作成

## 文献

- 1) Matsumoto, N., Toyoshima, S., Osawa, T., J. Biochem., 113, 630 (1993)
- 2) Thomas, L. J., et al., J. Biol. Chem., 266, 23175 (1991)
- 3) Yeh, E. T. H., TIGG, 4, 505 (1992)
- 4) Tanaka, M., Muto, N., Gohda, E., Yamamoto, I., Jpn. J. Pharmacol., 66, 451 (1994)
- 5) Elieser, G., TIGG, 6, 435 (1994)
- 6) Rosenberg, 3A., Lotze, M. T., Muul, L. M., N. Engl. J. Med., 313, 1485 (1985)