

## 原 著

## 末梢白血球分裂誘起剤としてのPhytohemagglutinin (PHA) の自家製造法

米村 勇 丸山三千代  
信州大学医学部法医学教室

## OWN - MAKING METHOD OF PHYTOHEMAGGLUTININ AS MITOGENIC REAGENT FOR PERIPHERAL LEUKOCYTES

Isamu YONEMURA and Michiyo MARUYAMA

Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine,  
Shinshu University

(Director : Prof. K. NODA)

Key words: PHAの自家製造法 (own-making method of PHA), インゲン豆の品種と分裂誘起能 (Phaseolus vulgaris and mitogenic activity)

## I 緒 言

phytohemagglutinin (PHA) は、植物種子から抽出される比較的粗製の糖蛋白質と見なされるもので、その名の示すように赤血球凝集素として前世紀の末頃から知られており、その後ヒト血液型に特異的なPHAも種々発見された。1960年頃、Nowell (1) によりインゲン豆 *Phaseolus vulgaris* から抽出されたPHAには、ヒト正常リンパ球の分裂を誘起する作用があることが初めて報告され、続いてこのPHAを用いて末梢血から染色体標本を簡単に得る方法がMoorheadら(2)により同年に確立された。以後生体における染色体分析は容易に行なえるようになり、現在では臨床面でも広範に用いられている。またPHAを添加した末梢リンパ球は、*in vitro* で免疫グロブリンを産生することが判り(3)、免疫学の分野でもPHAの作用が注目され始めている。

PHAの化学的性状については殆んど不明であり、その所見も研究者によりまちまちである(4)(5)が、赤血球で吸収を繰返すと白血球分裂誘起能は余り変わらないが、赤血球凝集素価は激減することから、少くともこの2つの因子は別個のものとしてされている。比較的精製されたPHAは市販されており、精製法も発表されている(6)が、これらは凝集および分裂誘起の両因子を含んでいる。末梢白血球培養による染

色体研究には、この2つの因子を分離精製したものをを用いる必要はなく、インゲン豆から食塩水で抽出したままの粗製のPHAで十分であることから、宇多小路(7)は簡単な自家製法を考案している。これによると大量のPHAが極めて容易に入手でき、染色体研究のためのPHAの製法としては便利な方法である。しかし、種子の品種によってはこの方法では分裂誘起能のあるPHAを抽出できない事が多い。そのため著者らは宇多小路の方法を改良して、種子の品種に無関係に高力価のPHAを得る方法を考案したので詳述し、さらにインゲン豆の品種と力価、この方法で得られるPHAの問題点について述べる。

## II 材料および方法

A 材料：使用したインゲン豆の種子(菜豆)は、1970年長野県松本市近郊で収穫された穂高菜豆、アルプス菜豆、丸莢尺五寸菜豆(ケンタッキーワンダー)、トッククロップの4品種と、1969年に収穫された穂高菜豆(以後越年穂高と称す)を種苗業者から入手し、すべて1970年12月にPHA抽出を行なった。穂高、アルプス、丸莢尺五寸は蔓あり種、トッククロップは蔓なし種である。蔓なし種はこの他に江戸川、本金時、中長うずら、山城黒三度等も松本市近郊で栽培されているが、種苗店に在庫品がなかったためトッククロップのみを用いた。

B 方法

1 種子10gを水道水でよく洗滌する。この時浮上する種子は除く。

2 約200mlの蒸留水に浸し、冷蔵庫内(4℃)に2日間放置しよく吸水させ、十分に膨潤軟化せしめる。

3 あらかじめ冷蔵庫内で冷やした生理食塩水100mlを少しずつ加えながら、冷やした乳鉢を用いて種子数粒(4粒ぐらいが良い)ずつすり潰し、冷蔵庫内に放置する。

4 5時間後に沈澱のみを取り出して、冷乳鉢で少量ずつ完全にすり潰し再び上澄と混ぜ合わせて2日間冷蔵庫内に放置する。その間、時々攪拌してPHAの抽出を促す。

5 最後によく攪拌し、冷蔵沈管を用いて3000rpm, 10分間遠沈する。

6 上澄を冷生理食塩水で20倍に稀釈し、濾過滅菌する。

7 濾液を少量ずつ滅菌アンプルに封入して、deep freezer または冷蔵庫の氷室内に保存し、用時融解し、全血培養の場合は培養液5ml, 全血0.5mlに対してPHA 0.25ml添加すれば十分である。

III 結果

4品種のインゲン豆から得たPHAの白血球分裂誘起能を検するため、末梢血の全血培養を行なった。著者らの培養方法は、TC-Medium 199(千葉血清製)100mlに対してヘパリン2000単位、力価1g/5mlのストレプトマイシン0.5ml, 30万単位/1mlのペニシリン0.04mlを加えたもの4ml及びAB型ヒト血漿1mlから成る培養液に、全血0.5ml, PHA 0.25mlを加えて37℃で48時間培養し、PHAを含んだ上記培養液約2.5ml(最初量の半分)を追加して更に24時間培養。以後は、普通の方法で低張処理、エ

タノール・酢酸(3:1)固定、スライドグラス上に展開して標本を作製した。このようにして得られた標本では、図1~5のように多数の大型化したリンパ芽細胞(blast)が見られる。この標本に基づいて各種PHAによってblast化した細胞の出現率を算定したところ、表1のごとく平均73.6%(72.5~74.8%)であった。

培養72時間目に50μg/ml濃度のコルヒチンを培養瓶1本につき0.025ml添加し、37℃に15時間静置したものは図6に示すように、多数の有糸分裂像が見られる。

IV 考察

PHAの製法に特に重要な点は、種子の吸水およびすり潰した粥状物からの抽出時間である。インゲン豆には種皮および胚乳の固いものが多く、宇多小路の方法のように1夜水に浸しただけでは十分に吸水膨化しないので、乳鉢ではすり潰し難い。また、食塩水での抽出時間も1夜では不足である。著者らの実験では2日間水に浸せば、種子の吸水、膨化は十分に行なわれ、越年種子も含めてどの種子も軟くなり、容易にすり潰せる。5時間程後に再び沈澱をすり潰すこと、および食塩水抽出時間を2日間に延ばすことで、どの種子からも非常に力価の高いPHAが得られるようになる。

種子の品種とPHAの力価に関しては、品種産地などの違いにより著しい差があると言われている(7)が、表1に示したように著者らの方法で得たPHAには力価の差は殆んどみられないことから、これらはおそらく品種による種皮および胚乳の固さ、あるいは吸水力の差に基因するものであろう。PHAの品種間の力価を比較するためにblast化率を算出したが、blastの判定基準をどのようにとるかによってその値は大巾に変わる。表1におけるblast, small

表1 各種PHAによるblast化細胞の出現率の比較

Kinds of p. vulgaris	No. of cells counted	Blast (%)	Small lym-phocyte (%)	Mitotic phase (%)	Undicid-able (%)
穂高菜豆	645	72.3	3.9	0.3	23.5
越年穂高菜豆	687	72.5	6.8	0.9	19.8
アルプス菜豆	649	74.5	6.7	0.5	18.3
丸莢尺五寸菜豆	681	74.4	4.6	0.6	20.4
トップクロープ菜豆	647	74.8	4.2	2.1	18.9

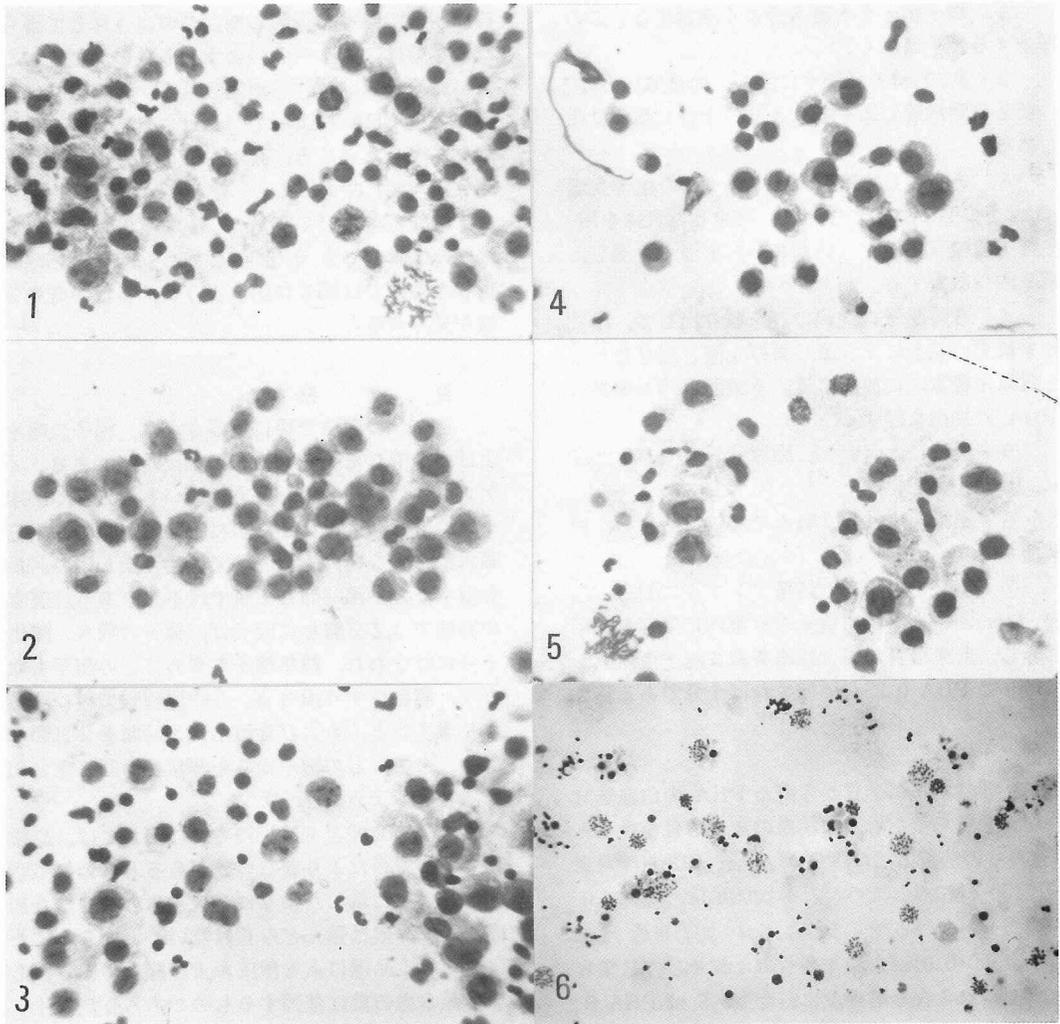


図1 穂高粱菜豆 PHA 添加培養  
 図2 越年穂高粱菜豆 PHA 添加培養  
 図3 アルプス菜豆 PHA 添加培養

図4 丸莢尺五寸菜豆 PHA 添加培養  
 図5 トップクロープ菜豆 PHA 添加培養  
 図6 PHA (アルプス) 添加培養 (コルヒチン処理)

lymphocyte, mitotic phase, undecidable の区分の基準は次のように設定した。

blast : 核が肥大し、Giemsa 染色でや、淡く赤味を帯びて染まり、核内に数個の核小体が見られ、細胞質の肥大したもの。標本中細胞質が脱落しているものも核の性状がこれに該当する場合は、blast とした。

small lymphocyte : 核は小型で Giemsa 液で極めて濃く染まり、細胞質の少ないもの。すなわち、PHA に反応していない細胞と見なされるもの。

mitotic phase : 有糸分裂中のもので前期、中期後期、終期などの染色糸または染色体構造の認められるもの。

undecidable : 核および細胞質に blast 化傾向が見られ、核の大きさおよび染まりの濃さは中程度であるが、核内に核小体が確認できないため典型的な blast とは言えないもの。および、核の形が図8~12に示すように不整形のもの。

undecidableの範疇に入れた中型のリンパ球の起源については、花岡ら(8)は PHA に反応した小リンパ球が blast 化して4~5回分裂を繰返した後、中

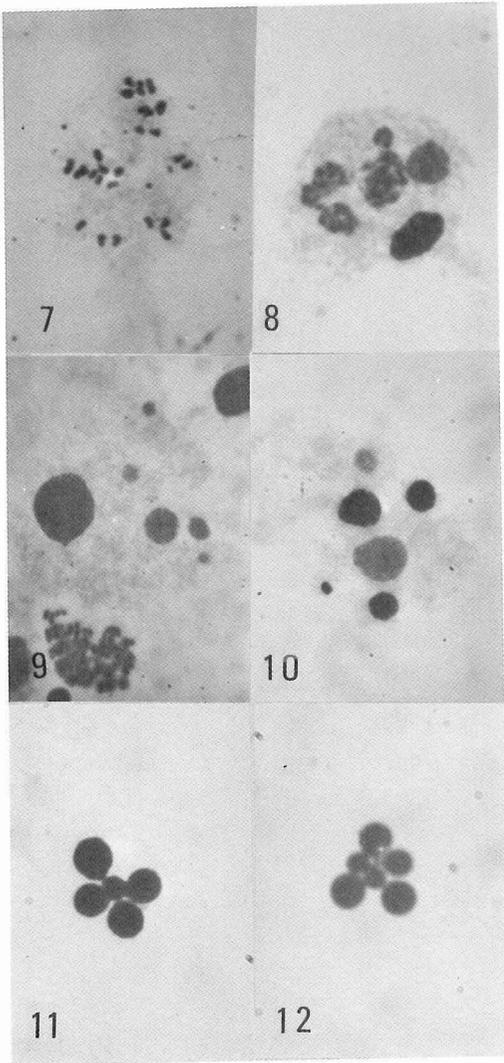


図8 多極分裂の終期像  
 図9, 10 多極分裂に基因すると思われる多核細胞像。図7, 8を経て形成されるものと思われる。  
 図11, 12 多極分裂に基因すると思われる多核細胞像。図9および10を経て形成されるものと思われる。

リンパ球を主とした成熟型にvari, その後間もな殆んど死滅すると言っている。従ってこれらの中リンパ球は PHA に反応した結果生じたものと考えられる。また、この範疇に入れた核の不整な細胞(図9~12)には分裂の際、核が不均等に分れたり、あるいは多極分裂を起こした結果生じたものと考えられる多核細胞(図9, 10)を含む。さらに図11, 12のごとくほぼ正円状の核が数箇互に密着または核に細い核質の連絡の認められるものも含むが、これは一見、白血球をや、低温で培養した場合などに多発するといわれるロゼット(9)に似ているが、構成核が密着または連絡しており、周囲の細胞質生状は審かではないが、1箇の細胞の核のごとき態を示しているので多核細胞の1種、または何らの理由で図9, 10のような多核細胞が変性したもすなわち図7, 8, 図9, 10を経て形成された能性もあり、これらは総て多極分裂の結果形成されたものと考えられる。事実、コルヒチン処理した標では染色体周囲の細胞質の形から中期核板の人工な分層ではなく、完全な1箇の細胞と思われるにかゝらず、染色体数が極端に少いものや多極分の終期像など珍らしい像が標本中のところどころ認められた(図7, 8)。このような異常分裂が皆らの粗製 PHA によるものであれば、その出現率は正常分裂に比べて非常に低いとはいえ、この P<sub>st</sub> を染色体研究に利用する場合支障となることも考えられ、異常分裂誘起因子を除去することを考えなければならない。異常分裂および誘起因子については現在検討中である。このような問題はあがるが、いずれにしても undecidable とした中型リンパ球および異常分細胞は PHA に反応した結果生じたものと考えられるので、PHA の力価を blast 化率によらず P<sub>st</sub> に反応した細胞の出現率に基づいて表わせば、st, mitotic phase, undecidable の3者を相対して4品種(越年種子を加えて5種類)の平均値は、94.8%におよび、どの PHA も非常に高い力価を有していることが判る。

### V 結 語

著者らの改良した製法によると、Phaseolus vulgaris の品種には殆んど関係なく高力価の PHA が容易に得られるのでこの方法を推奨する。ただひとつ低頻度ではあがるが核の不均等分裂や多極分裂と思われる異常分裂像が出現することが問題となるが、異常分裂の種類、発生機序および粗 PHA 中にあると思われる誘起因子の性状、簡単な除去法

については、現在検討中である

### 文 献

- 1) Nowell, P. C. : Phytohemagglutinin : an initiator of mitosis in culture of normal human leukocytes. *Cancer Res.* , 20 : 460—468 , 1960
- 2) Moorhead, P. S. and Nowell, P. C. : Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* , 20: 613—616, 1960
- 3) Ripps, C. S. and Hirschhorn, K. : The production of immunoglobulins by human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* , 2 : 377—398, 1967
- 4) Rigas, D. A. and Head, C. : The dissociation of phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris* by 8. OM urea and the separation of the mitogenic from the erythroagglutinating activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 34 : 633—639, 1969
- 5) Goldberg, M. L. , Rosenau, W. and Burke, G. C. : Fractionation of phytohemagglutinin, I. Purification of the RNA and DNA synthesis-stimulating substances and evidence that they are not proteins. *Proc. nat Acad. Sci.* , 64: 283—289, 1969
- 6) Rigas, D. A. , and Osgood, E. E. : Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* , 212 : 607 - 615, 1955
- 7) 宇多小路 正 : 人染色体研究のための Phytohemagglutinin ( PHA ) の簡単な製法, *医学のあゆみ* , 66 : 78—80, 1968
- 8) 筒井 功, 花岡正男 : 培養リン巴胚球の由来とその運命, その2, *細胞増生モデル*, *日血会誌* , 30 : 87—88, 1967
- 9) 中井準之助他編 : *組織培養* ( 8 版 ) , 275 頁 朝倉書店, 東京, 1970

(1971. 12. 23 受稿)