HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ウマ、ウシおよびイヌの末梢血リンパ球幼若化反応における反応性の違いに関する研究
Author(s)	田島, 誉士
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第2639号
Issue Date	1989-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32730
Type	doctoral thesis
File Information	2639.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ウマ、ウシおよびイヌの末梢血リンパ球幼若化反応における反応性の違いに関する研究

北海道大学大学院獣医学研究科博士後期過程
予防治療学専攻、家畜外科学講座
田　島　誉　士

目　次

Ⅰ．緒　言 …… 1

Ⅱ．第１章．末梢血リンパ球幼若化反応における最適マイトジェン濃度とマイトジェン結合部位数との関係
　１．要　約 …… 4
　２．序　文 …… 5
　３．材料および方法 …… 6
　４．結　果 …… 10
　５．考　察 …… 23

Ⅲ．第２章．末梢血リンパ球幼若化反応におけるマイトジェン刺激後の末梢血リンパ球膜流動性
　１．要　約 …… 27
　２．序　文 …… 28
　３．材料および方法 …… 29
　４．結　果 …… 32
　５．考　察 …… 44

Ⅳ．第３章．末梢血リンパ球幼若化反応における細胞内骨格系の関与
　１．要　約 …… 46
　２．序　文 …… 47
　３．材料および方法 …… 48
　４．結　果 …… 49
　５．考　察 …… 58

Ⅴ．総　括 …… 61

Ⅵ．引用文献 …… 64

Ⅶ．謝　辞 …… 73

Ⅷ．英文抄録 …… 74

Ⅰ．緒　言

末梢血リンパ球（PBL）は生体内では抗原刺激により幼若化し、エフェクター細胞、ヘルパー細胞、サプレッサー細胞あるいは抗体産生細胞へと分化・増殖する(利根川，1985；マラックら，1986)。PBLの分化増殖能は生体の免疫応答能を反映しており、したがってPBLの分化増殖能をin vitroで検査することにより、生体の外来抗原に対する抵抗性を知ることが可能となる。しかし、in vitroで抗原を用いて生体内で起こる一連の過程を再現することは、抗原が特異的な刺激物質であるため一般的には困難である(大沢，1975；星野，1979)。

リンパ球幼若化反応は、生体内でのリンパ球の免疫応答能をin vitroで知る上で有用な検査法として、各種動物で広く応用されている反応である。この反応には、いくつかのレクチンがリンパ球刺激物質(マイトジェン)として用いられている(大沢、1985)。マイトジェンは感作・未感作の別なく非特異的にリンパ球の分化・増殖を誘起する。ヒト医学領域では種々のマイトジェンが報告されており(大沢，1985)、獣医学領域においてもそのうちのいくつかがすでに臨床応用されている(KRISTENSEN et al., 1982a)。幼若化反応を臨床検査に応用するためには、健常時のPBLに対するマイトジェンの反応性(PBLの分化・増殖を誘起する程度)と病態時のそれとの差が明確である必要がある。また、その差が明確に得られるような検査法が確立されれば、幼若化反応の診断的価値は上昇する。そのためには、できるだけ高い反応性が得られる条件で幼若化反応を実施すべきであると考えられる。

PBLの幼若化反応において動物種により反応条件は様々であり、特にマイトジェンの最適濃度は各種動物PBL間にかなりの差が認められる(KRISTENSEN et al., 1982a; TAJIMA et al., 1987)。また、各種動物PBLに対するマイトジェンの反応性は、それぞれの最適培養条件下で検査してもかなりの差が認められ

る(KRISTENSEN et al., 1982a)。

生体の免疫応答能の一指標となるリンパ球の分化・増殖能がin vitroでは各種動物PBL間で異なった反応性を示すにもかかわらず、同一環境下で飼育されている動物の感染防御能は臨床上それほど大きくは違わないように思われる(PERRYMAN, 1979)。この観点にたつと、in vitroでの各種動物PBL間のマイトジェンに対する反応性の違いおよび最大幼若化活性を誘起するための最適マイトジェン濃度の違いがいかなる理由によるかを究明することは、比較生物学的に興味深いことであると同時に、幼若化反応を臨床検査法のひとつとして病態の解析に応用するために重要な課題であると考えられる。

一般にリンパ球の活性化は、リガンドがそのレセプターに結合することによって誘起される(マラックら、1986)。リンパ球幼若化反応においても、マイトジェンがリンパ球表面上のレセプターと結合することにより分化・増殖が誘起される(大沢、1985)。マイトジェンとして、フィトヘマグルチニンP(PHA)およびコンカナバリンA(ConA)が獣医臨床領域で頻用されている(KRISTENSEN et al., 1982a)。幼若化反応実施時の最適マイトジェン濃度は各種動物PBL間にかなりの差が認められ、PBLのマイトジェンに対する反応性を良くするためには、単にマイトジェン濃度を高くしても無意味である。なぜならば最大幼若化活性を誘起するために、ヒト(大沢, 1975)、ラット(INBAR et al.,1973)およびブタ(PERLES et al., 1977)ではそのリンパ球表面上マイトジェンレセプターの数パーセントに結合するのみで十分とされているからである。

PBLの幼若化はマイトジェンがPBL表面上に結合した後、その刺激シグナルが細胞内に伝達されて分化・増殖が始る。この外来刺激シグナルが抗原の場合には、エンドサイトーシスによる細胞内への抗原の取り込みによりシグナル伝達されるといわれている(利根川, 1985；マラックら、1986)。マイトジェン刺激の場合には、マイトジェンの細胞内への取り込みは起こらない(大沢, 1975；

大沢，1985)。PBLのマイトジェン刺激に際しては、膜流動性の上昇(豊島ら，1979)、リン脂質のメチル化(MASUZAWA et al., 1973)、カルシウムイオンの細胞内への流入(大沢，1975)、サイクリックヌクレオチド量の変化(大谷，1981)などをもたらすことがマウスやヒトのPBLで報告されている。

マイトジェンによるPBL刺激初期過程における重要な現象として、架橋集合形成やキャップ形成があるといわれている(EDELMAN et al., 1973)。これらの形成が阻止されると、マイトジェン刺激シグナルは細胞内に伝達されないとされている(矢原，1979；斉藤，1981)。そして、架橋集合形成には細胞内小器官である微小線維や微小管などの細胞内骨格系が密接に関与している(矢原、1979)。

以上のことから本論文では、幼若化反応の際に全く異なる最適マイトジェン濃度を有するウマ、ウシおよびイヌのPBLを用い、PBL幼若化の初期過程における諸現象を調べ、上述の原因を追究することを目的とした。

まず第１章では、ウマ、ウシおよびイヌPBL表面におけるPHAあるいはConAの結合部位数を計数し、最大幼若化活性を誘起するために必要なマイトジェン結合部位数と最適マイトジェン濃度との関連性を追究した。

次に第２章においてはウマ、ウシおよびイヌPBLのPHAあるいはConA刺激によるPBL膜流動性の変化と、幼若化反応における反応性との関連性を追究した。

最後に第３章では、ウマ、ウシおよびイヌPBLの細胞内骨格系の幼若化反応への関与の程度と、幼若化反応における反応性との関連性を追究した。

II．第１章

末梢血リンパ球幼若化反応における最適マイトジェン濃度とマイトジェン結合部位数との関係

１．要　約

リンパ球幼若化反応を誘起する最適マイトジェン濃度とマイトジェン結合部位数との関係を検討した。

まず、ウマ、ウシおよびイヌの末梢血リンパ球(PBL)のフィトヘマグルチニンＰ(PHA)あるいはコンカナバリンＡ(ConA)による刺激前後の細胞組成比を調べたところ、いずれのPBLにおいてもＴリンパ球の増加が認められた。したがって、PHAおよびConAはウマ、ウシおよびイヌPBL幼若化反応においてＴリンパ球を特異的に刺激し、増殖を誘起することが認められた。次に、ウマ、ウシおよびイヌのPBL１$\times10^5$個当りのPHAの結合部位総数(ｎ)を計数したところ、それぞれ4.2×10^{11}，12.8×10^{11}および14.0×10^{11}であった。また、ConAに対するｎはそれぞれ23.9×10^{11}，9.4×10^{11}および12.1×10^{11}であった。さらに、最大幼若化活性を誘起するために必要なマイトジェン結合率は、PHAではウマ31.1%、ウシ26.5%、イヌ38.4%、ConAではそれぞれ 48.2%、17.9%、24.5%であった。そこで、PHAあるいはConAの結合部位の分布を観察するためにフローサイトメーターを用いて二重染色解析を行った。その結果、ウマおよびイヌのPBLではＢリンパ球表面上にもConAの結合部位が多数認められた。

これらの結果は、各種動物PBLの最大幼若化活性を得るためには、それぞれ特有の最適マイトジェン濃度を有することを示している。さらに、幼若化反応を行う際の最適マイトジェン濃度とPBL上でのマイトジェン結合数とは、両者が対応して変化することが認められた。

2. 序　文

リンパ球幼若化のための第一段階として抗原やマイトジェンなどの刺激物質がリンパ球表面上のレセプターに結合する必要がある(BANKS & McGUIRE,1975; BANKS et al., 1978; LOOR, 1980)。非特異的幼若化のためのマイトジェンとしてフィトヘマグルチニンP(PHA)、コンカナバリンA(ConA)などが広く一般に用いられている。これらのマイトジェンが、リンパ球を幼若化させるための最適濃度は動物種によりかなり異なる。リンパ球幼若化反応に用いるマイトジェン最適濃度はPHAの場合、ウマ5μg/ml(TAJIMA et al., 1987)、ウシ15μg/ml(MASCOPLAT et al., 1974)、イヌ30μg/ml(KRISTENSEN et al., 1982b)、ヒツジ5～20μg/ml(LARSEN, 1979)、ヒト1～10μg/ml(伊藤ら、1981)、またConAの場合ウシ5μg/ml(NAGAHATA et al., 1986)、イヌ25μg/ml(KRISTENSEN et al., 1982b)、ヒト1μg/ml(伊藤ら、1981)と各種動物 PBL間にかなりの差が認められる。ウマにおいて、特にConAを幼若化反応に用いる場合、リンパ球濃度は他の動物とほぼ同じであるにもかかわらず、その最適濃度は50μg/mlであり、他の動物に比べて高濃度である(BANKS & McGUIRE, 1975; TAJIMA et al., 1987)。これらの濃度の違いは、単にリンパ球表面上の結合部位総数の違いによるものだけなのか、あるいは活性を誘起するために必要な結合率に差があるのかは判明していない。

またPHAおよびConAは、ヒト・マウス(矢野ら、1981)およびイヌ(KRAKOWKA & RINGLER, 1986)のPBL幼若化反応においてはTリンパ球マイトジェンとしての作用を有し、特異的にTリンパ球を刺激し分化・増殖を誘起する。しかしウマおよびウシにおいては、PHAおよびConAがTリンパ球マイトジェンとして作用するという証明はされていない。これらのマイトジェンがTリンパ球のみに結合し活性を誘起するのか、あるいはBリンパ球にも結合するのかはいずれの動

物のPBLにおいても不明である。

以上のことから本章では、まず比重遠心法により採取したウマ、ウシおよびイヌのPBL組成を明確にした後、PBL表面上のPHAおよびConAの結合部位数を、幼若化反応を実施する際に用いる細胞集団全体に関して計数した。次に、最大幼若化活性を誘起するために必要なマイトジェン結合数を求め、最適マイトジェン濃度との関係を検討した。さらに、蛍光活性化細胞選択装置(FACS)によりPBLポピュレーションを選択採取しその細胞表面上の結合部位数を計数した。また、蛍光二重染色を行いマイトジェン結合部位の分布を観察した。

3．材料および方法

1）実験動物

北海道大学獣医学部および北海道大学馬術部に飼養中の臨床上健常と認められるウマ、および北海道大学獣医学部に飼養中の臨床上健常と認められるウシおよびイヌを実験に使用した。各種動物の品種、性別および年齢は以下のとおりである。

ウマ			ウシ			イヌ		
品種	性別	年齢	品種	性別	年齢	品種	性別	年齢
中半血種-1	♀	9	ﾎﾙｽﾀｲﾝ-1	♀	7	雑　種-1	♀	>2
〃　-2	♀	19	〃　-2	♀	9	〃　-2	♀	>2
軽　種-1	♂	7	〃　-3	♀	16	〃　-3	♂	5
〃　-2	♂	9	〃　-4	♀	>4	〃　-4	♂	5
〃　-3	♀	15				ﾋﾞｰｸﾞﾙ	♀	6

2）PBL採取

ウマの頸静脈より抗凝固剤としてヘパリン(20 unit/ml血液)を用い、注射筒にて採取した血液をリン酸緩衝生理食塩液(PBS, pH7.4)でヘマトクリット値が約15～20%になるよう希釈した。この希釈血液6mlをフィコール・コンレイ溶液(比重 1.079)3mlに静かに重層し、400×G、30分間室温で遠心した。中間部の白濁層を回収し0.83% NH_4Cl 20mMトリス塩酸緩衝液で赤血球溶解後、PBSで3回洗浄した(TAJIMA et al., 1987)。ウシおよびイヌのPBLはフィコール・コンレイ溶液の比重をそれぞれ1.087 (NAGAHATA et al., 1982)および1.082(KAWAMURA et al., 1987)として、同様に操作した。最後にPBL濃度が1×10^6個/mlになるように血清無添加のRPMI 1640に再浮遊させて結合実験に供した。

3）PBL組成

採取したPBLのリンパ球サブポピュレーションおよびリンパ球以外の混入細胞を検査した。Bリンパ球はBROSTROMら(1985)の方法に準じ、間接蛍光抗体(IFA)法により表面免疫グロブリン(sIg)陽性細胞として検出した。IFA法では、抗ウマ免疫グロブリン(Ig)(Nordic, Tilburg)、抗ウシIg (Dakopatts, Glostrup)および抗イヌIg(Bethyl, Montgomery)を一次抗体として用い、二次抗体には、フルオレスセイン・イソチオシアネート (FITC)標識抗ウサギIg(Cappel, West Chester)を用いた。また、イヌのTリンパ球は抗イヌThy-1モノクローナル抗体(Serotec, New York)を一次抗体、FITC標識抗マウスIg(Cappel, West Chester)を二次抗体としてIFA法により検出した。ウマおよびウシのTリンパ球はノイラミニダーゼ処理したモルモット赤血球およびヒツジ赤血球を用いたE-ロゼット形成法によりそれぞれ検出した(TARR et al., 1979; GREWAL et al., 1976)。単球お

よび他の混入細胞は、アルファ-ナフチルアセテートエステラーゼ(ANAE)染色(DHINGRAET et al., 1982)およびギムザ染色標本の鏡検によりそれぞれ検出した。

4) ^{125}I-標識マイトジェン

1 mgのPHA(Difco, New York)および2.5mgのConA(Pharmacia, Milwaukee)を、クロラミンT法(McCONAHEY & DIXON, 1966)の変法により1 mCiの Na^{125}I(比活性 17.4Ci/mg, NEN, Boston)で標識した。すなわち、PHAを200 μl, ConAを500 μlの250mMリン酸緩衝液(PB, pH7.5)に溶解し、反応時間はマイトジェン1 mgにつき2分間とした。未反応の^{125}Iはセファデックス G-50カラム(1.5×10cm)でゲル濾過して分離した。溶出液には1%牛血清アルブミン加10mM PBを用いた。

5) 結合実験

^{125}I標識マイトジェンの特性を調べるため、既報の方法に準じてヒトO型赤血球を用いて結合実験を行った。標識マイトジェンをPBSで2.75～25 μg/mlの濃度に希釈した。これらを赤血球凝集活性が得られるマイトジェン量の10倍量の未標識マイトジェンの存在下または非存在下で、ヒトO型赤血球浮遊液に添加した。PHAを用いた場合4℃で60分間(PREASANT & KORNFELD, 1972)、ConAを用いた場合24℃で60分間(SCHNEBLI & BACHI, 1975)培養した。

リンパ球への結合実験は、最大幼若化活性を誘起するマイトジェン量の10倍量の未標識マイトジェンの存在下または非存在下で2.5～95 μg/mlの濃度にRPMI 1640で希釈した^{125}I-マイトジェンをPBL浮遊液に添加し37℃、2時間5%CO_2培養器内で培養した。

培養後PBSで1回洗浄し沈渣の放射活性をガンマーカウンターで計数し

た。この計数値に基づきScatchard plotを行い、解離定数(K_D)および１×10^5PBL当りの結合部位総数(ｎ)を算出した。この際分子量としてPHAは128,000(STECK & WALLACH, 1965)およびConAは108,000(WANG et al., 1971)を用いた。

計数後各々の沈渣を20%馬血清加RPMI 1640に再浮遊させ96穴マイクロプレートに添加して37℃、５%CO_2培養器内で４日間培養した。培養終了24時間前に各穴に0.5μCiの6-^{3}H-チミジン(比活性 5Ci/mmol、Amersham Japan, Tokyo)を添加した。培養終了後、細胞をガラス線維濾紙上に回収し、液体シンチレーションカウンターで^{3}Hの放射活性を測定し、DNAの分裂能を指標として幼若化能を判定した。

6) PBLポピュレーションの分画採取

sIg陽性細胞をIFA法で染色し、FACS(EPICS752, Coulter, Miami)でsIg陰性リンパ球を分画採取した。すなわち、前方散乱光と90°散乱光との二次元ヒストグラムによりリンパ球集団を認識後、sIg陰性リンパ球のみを１×10^6個以上選択採集した。それらのリンパ球を用い上述の方法に準じ結合実験を行い結合部位数を測定した。

7) マイトジェン結合部位の分布状態の観察

OIら(1982)の方法に準じてPHAおよびConAをフィコエルスリン(PE, Upton Biochemicals Ltd., London) で標識した。蛍光二重染色はIFA法において、FITC標識二次抗体の添加と同時にPE標識PHA(PE-PHA)またはPE標識ConA(PE-ConA)を添加し、37℃２時間培養することにより行った。染色したPBLをPBSで３回洗浄後、FACSでPHAあるいはConAの結合部位の分布を観察した。

4．結　果

1）PBL組成

本研究で用いたPBLの組成を表１に示した。各数値は構成細胞の百分比で示した。PBL中のリンパ球はいずれの動物においても80%以上を占めていた。特にウマおよびウシPBLでは、約95％がリンパ球であった。また、イヌPBLでは単球や顆粒球の混入率がウマおよびウシのそれらよりも高かった。sIg陽性細胞であるＢリンパ球は各種動物のPBL中にそれぞれほぼ同比率で含まれていた。

2）幼若化反応実施後の構成細胞比

ウマ、ウシおよびイヌのPBLをPHAあるいはConA刺激した後のPBL構成細胞比を表２に示した。これから、PHAまたはConA刺激によりウマおよびウシPBLではロゼット形成細胞が、イヌPBLではThy-1陽性細胞が著しく増加していることが認められた。一方、sIg陽性細胞はいずれの動物のPBLにおいても特に増加したとは認められなかった。

3）^{125}I-マイトジェンの特性

標識したマイトジェンの比活性は^{125}I-PHAが40.7×10^4 cpm/μg、^{125}I-ConAが6.1×10^4 cpm/μgであった。これらの標識マイトジェンは、赤血球凝集活性およびリンパ球刺激活性は未標識マイトジェンとほぼ同様であった。

また、結合実験において未結合の^{125}I-マイトジェン除去のための洗浄操作は１回で充分であり、それ以上洗浄操作を繰り返し行っても、沈渣の放射活性の著しい減少は認められなかった。したがって、以下の結合実験では洗浄操作は１回とした。

4）赤血球との結合性

ヒトO型赤血球に対する^{125}I-マイトジェンの結合量と^{125}I-マイトジェン濃度との関係を図１に示した。この関係から赤血球上のPHAあるいはConAのｎを算出するとそれぞれ3.54×10^{5}/細胞あるいは1.36×10^{5}/細胞であった。

5）PBLに対する結合性

ウマPBLに対する^{125}I-マイトジェンの結合量と^{125}I-マイトジェン濃度との関係を図２に示した。Scatchard plotの結果は直線を示し、ウシおよびイヌPBLにおいても直線になった。図２からPHAおよびConAの1×10^{5}PBL当りのｎを算出するとそれぞれ、4.23×10^{11}および2.39×10^{11}であった。またK_Dはそれぞれ、48.5×10^{-9}および89.7×10^{-9}であった。

ウマ、ウシおよびイヌPBLにおける PHAおよびConAのK_Dおよびｎを表３に示した。PHAに対してウシおよびイヌPBLは結合親和性がウマより低く、ConAに対してウマおよびイヌのPBLの結合親和性はウシのそれより高かった。

6）マイトジェンのレセプターへの結合と幼若化能との関係

ウマPBLにおけるマイトジェンの結合率と幼若化活性との関係を図３に示した。ウマPBL上の各マイトジェン結合部位総数のうち、PHAではその31.1%、ConAでは48.2%に結合した際に幼若化活性が最も高かった。これを実質結合部位数に換算すると1×10^{5}PBL当りPHAは1.3×10^{11}、ConAは11.5×10^{11}であった。ウマPBL幼若化反応において、10～200μg/mlの範囲で最適ConA濃度の検索を行ったところ、100μg/ml以上の濃度では幼若化活性が抑制された。したがって、結合実験は100μg/ml以下の濃度で行った。

ウマ、ウシおよびイヌPBLにおけるマイトジェンの結合率とマイトジェン最適濃度との関係を表４に示した。PBL表面上の全PHA結合部位数のうち、最大幼若化活性を誘起するために必要なマイトジェン結合率は各種動物PBL間に著し

い差は認められなかった。しかし、実質結合数でみるとウマPBLが最も少なく、イヌPBLが最も多かった。また、PBL表面上の全ConA結合部位数のうち最大幼若化活性を誘起するために必要なマイトジェン結合率および実質結合数はともに３種動物のPBL間にかなりの差が認められた。

7）sIg陰性リンパ球に対する結合性

ウマ、ウシおよびイヌのsIg陰性リンパ球表面上のPHAあるいはConAの結合部位数を表５に示した。PBL中のsIg陰性リンパ球のみにPHAあるいはConAの結合部位が存在すると仮定して、PBL１個当りそれぞれの結合部位数を計算すると、表５の括弧内に示した値となった。この値と表３の結果から算出したPBL１個当りの結合部位数を比較したところ、PHAの結合部位数に関しては３種の動物ともほぼ同じ値となった。

一方、ConAの結合部位数に関しては、ウマおよびイヌPBLの上述の仮定に基づき算出した推測値の方が、実測値よりかなり高い値となった。したがって、ウマおよびイヌのsIg陽性リンパ球にはウシのそれに比べ、かなりの数のConA結合部位が存在することが認められた。

8）FACSによる二重染色解析

PE-PHAを用いた場合のウマ、ウシおよびイヌPBLの二重染色解析の結果を図４に示した。各PBLともわずかにsIg陽性かつPHA陽性の細胞が確認された。

PE-ConAを用いた場合の二重染色解析の結果を図５に示した。ウマおよびイヌPBLではsIg陽性かつConA陽性細胞がウシPBLのそれより明らかに多数確認された。これらの結果は、sIg陰性リンパ球を用いて行った結合実験の結果(表５)とよく一致した。

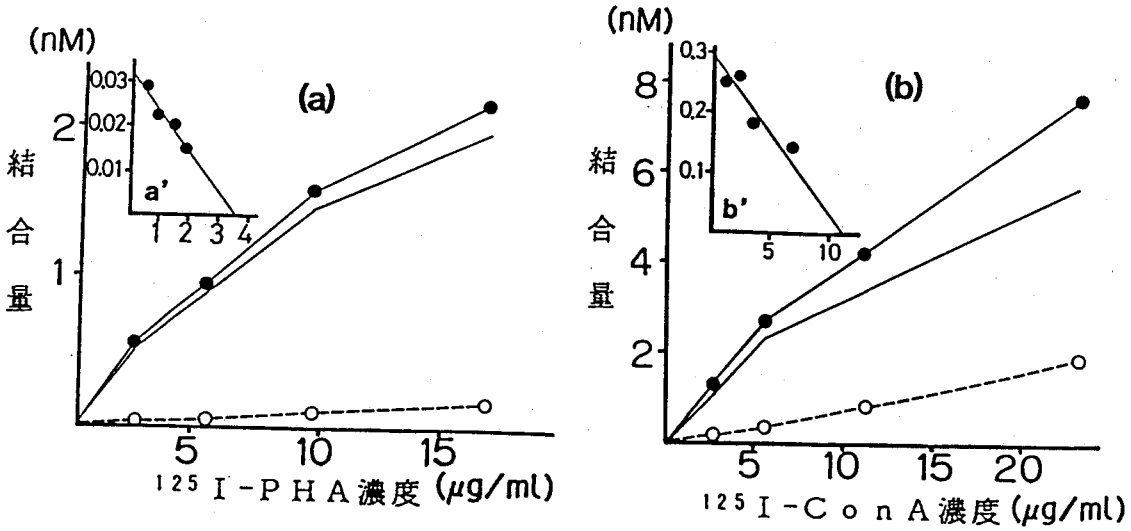

図1．ヒトO型赤血球への^{125}Iマイトジェンの結合性．

——●——：全結合量．　————：特異的結合量．
------○------：非特異的結合量．

(a)^{125}I-標識フィトヘマグルチニンP(^{125}I-PHA)の赤血球への結合量と^{125}I-PHA濃度との関係．

(b)^{125}I-標識コンカナバリンA(^{125}I-ConA)の赤血球への結合量と^{125}I-ConA濃度との関係．

(a')(b')横軸に特異結合したマイトジェンのモル濃度（$\times 10^{-9}$ M)、縦軸に[sB]/[F]をとったScatchard plot．ここで、[sB]は特異結合マイトジェンのモル濃度、[F]は非結合標識マイトジェンのモル濃度を示す．

最小二乗法により直線をひいたところ(a')および(b')の相関係数はそれぞれ0.97および0.92であった。(TAJIMA et al., 1989c より引用)

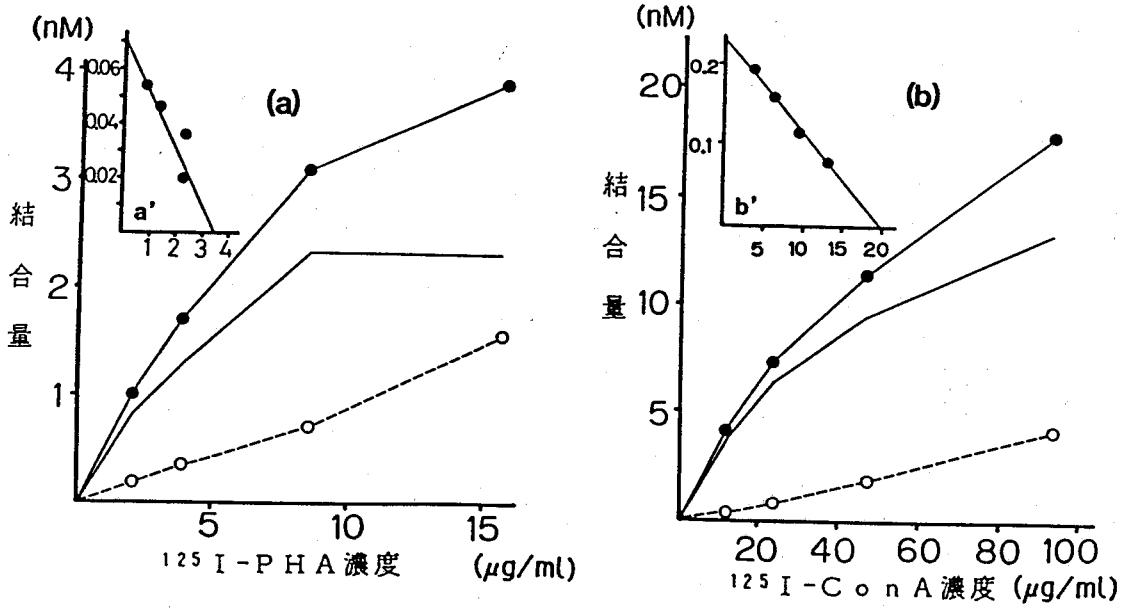

図2．ウマ末梢血リンパ球(PBL)への^{125}Iマイトジェンの結合性．

(a)^{125}I-標識フィトヘマグルチニンP(^{125}I-PHA)のPBLへの結合量と^{125}I-PHA濃度との関係．

(b)^{125}I-標識コンカナバリンA(^{125}I-ConA)のPBLへの結合量と^{125}I-ConA濃度との関係．

図中の表記法は図1と同じである。(a')(b')図1同様にScatchard plotした。それぞれの相関係数は(a')0.88、(b')0.91であった。(TAJIMA et al., 1989c より引用)

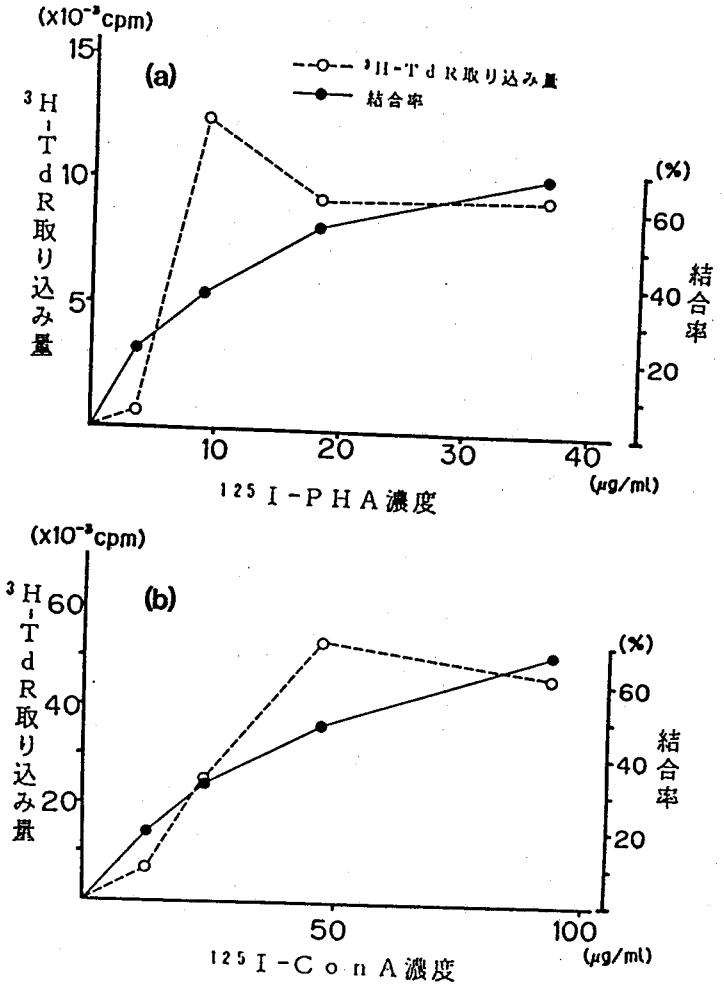

図3．^{125}I-標識フイトヘマグルチニンP(^{125}I-PHA)(a)および^{125}I-標識コンカナバリンA(^{125}I-ConA)(b)のウマ末梢血リンパ球PBL表面上結合部位占有率(結合率)と幼若化活性との関係．

——●——：マイトジェンの結合部位占有率（%）．

------○------：トリチウム-チミジン(^{3}H-TdR)取込量．
(cpm×10^{-3})

(TAJIMA et al., 1989c より引用)

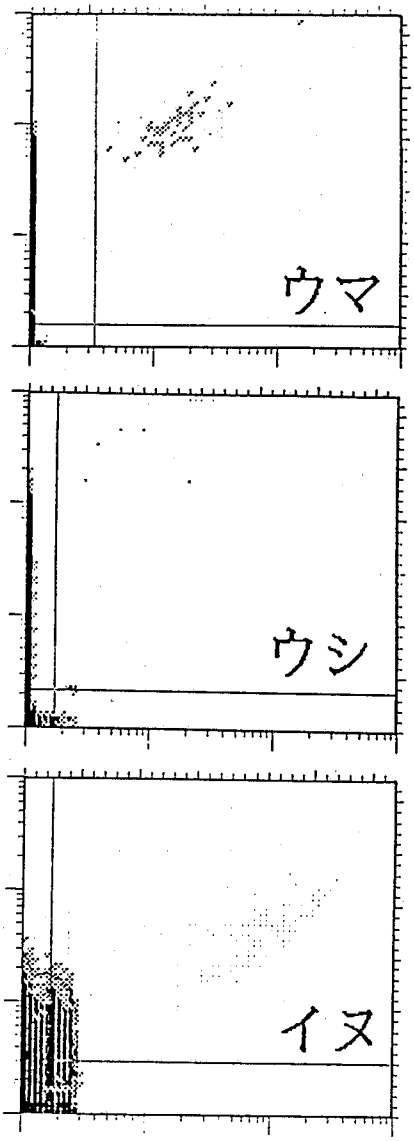

図4．ウマ、ウシおよびイヌ末梢血リンパ球のフルオレスセインイソチオシアネート（FITC）標識抗体とフィコエルスリン（PE）標識フィトヘマグルチニンPとの二重染色解析ヒストグラム．

縦軸：FITCの緑色蛍光強度．

横軸：PEの赤色蛍光強度．

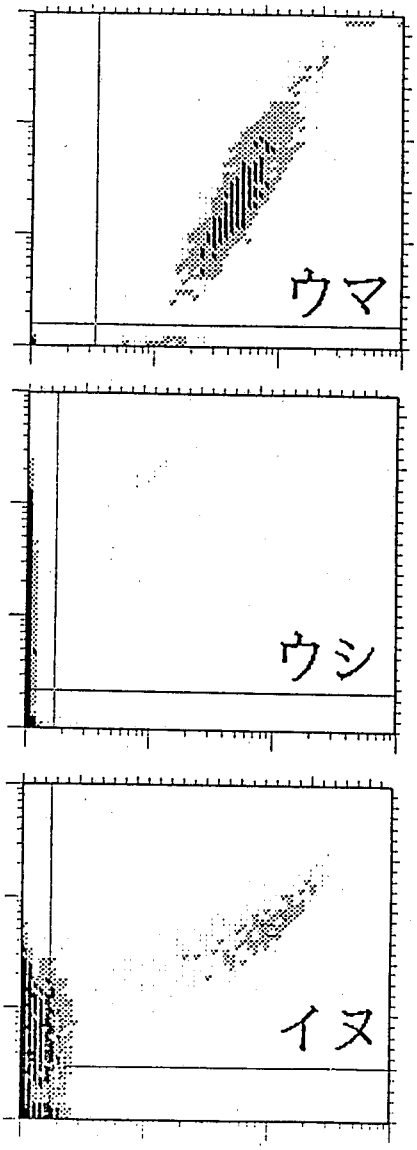

図５．ウマ、ウシおよびイヌ末梢血リンパ球のフルオレスセインイソチオシアネート（FITC）標識抗体とフィコエルスリン（PE）標識コンカナバリンＡとの二重染色解析ヒストグラム．

縦軸：FITCの緑色蛍光強度．

横軸：PEの赤色蛍光強度．

表１．比重遠心法により分離した末梢血リンパ球（PBL）の組成。

PBLの由来	PBL (%)				単球 (%)	顆粒球 (%)
	sIg^+	ER^+又は$Thy\text{-}1^+$	その他	総数		
ウマ	20.6±1.5	34.5±6.0	39.3±6.1	94.3±1.0	3.2±1.3	2.3±0.5
ウシ	28.8±4.5	22.2±3.9	44.0±1.7	95.0±0.8	2.3±0.2	2.7±0.6
イヌ	22.0±3.6	54.1±3.8	5.0±2.4	81.0±2.2	8.8±3.2	10.2±2.7

sIg^+：表面免疫グロブリン陽性細胞。
ER^+：ウマおよびウシPBLにおけるE-ロゼット形成細胞。
$Thy\text{-}1^+$：イヌPBLにおける抗イヌThy-1モノクローナル抗体陽性細胞。
その他：リンパ球中のsIg^-かつER^-または$Thy\text{-}1^-$細胞。
総数：PBL中のリンパ球。
(TAJIMA et al., 1989cより引用)

表2．マイトジェン刺激による末梢血リンパ球(PBL)組成*1の変化。

PBLの由来	マイトジェン	リンパ球 sIg+	リンパ球 ER+又はThy-1+	単球	顆粒球
ウマ	NS*2	100	100	100	100
	PHA*3	99	149	72	80
	ConA*4	88	170	88	85
ウシ	NS	100	100	100	100
	PHA	101	196	88	73
	ConA	90	166	75	71
イヌ	NS	100	100	100	100
	PHA	113	158	90	88
	ConA	104	194	95	91

*1：未刺激PBLの各構成成分を100とした場合の相対値。
*2：未刺激PBL。
*3：フィトヘマグルチニンP刺激PBL。
*4：コンカナバリンA刺激PBL。

表３．末梢血リンパ球(PBL)表面上のマイトジェン結合部位数．

PBLの由来	PHA		ConA	
	K_D*1	n*2	K_D	n
ウ　マ	48.5	4.2	89.7	23.9
ウ　シ	154.0	12.8	29.7	9.4
イ　ヌ	151.7	14.0	124.0	12.1

*1：解離定数（$\times 10^{-9}$）．
*2：PBL 1 $\times 10^5$個当りの結合部位数（$\times 10^{11}$）．
(TAJIMA et al., 1989cより引用)

表4．末梢血リンパ球(PBL)表面上におけるマイトジェン結合部位占有率と最適マイトジェン濃度．

PBLの由来	PHA			ConA		
	占有率*1	結合数*2	最適濃度*3	占有率	結合数	最適濃度
ウ　マ	31.1	1.32	5	48.2	11.52	50
ウ　シ	26.5	3.39	15	17.9	1.68	5
イ　ヌ	38.4	5.38	20	24.5	2.96	25

*1：最大幼若化活性を示すマイトジェン結合部位占有率（%）．
*2：最大幼若化活性を示すマイトジェン結合数（$\times 10^{11}$）．
*3：最大幼若化活性を示す最適マイトジェン濃度（μg/ml）．
(TAJIMA et al., 1989cより引用)

表5．表面免疫グロブリン陰性リンパ球表面上のフィトヘマグルチニンP(PHA)またはコンカナバリンA(ConA)の結合部位数(×10^6個/細胞)．

ﾏｲﾄｼﾞｪﾝ	ウマ	ウシ	イヌ
PHA	8.0(6.0)	21.9(14.6)	42.8(19.1)
ConA	70.6(53.3)	10.7(7.1)	77.1(61.7)

（ ）内は、表面免疫グロブリン陰性リンパ球表面上にのみ各マイトジェン結合部位が存在すると仮定して、ポピュレーション分離していない末梢血リンパ球表面上の各マイトジェン結合部位数を算出した推測値．

5．考　察

本章で示した供試動物に関する結果は、材料および方法に示した供試動物のうち、その代表例としてウマ：中半血種-2、ウシ：ホルスタイン種-1およびイヌ：雑種-3で得られた結果を示した。これは各種供試動物のいずれのPBLにおいても、それぞれほぼ同様の結果が得られたことと、さらに本論文の全章を通じて全ての結果が得られた個体であるとの理由による。ただし、測定誤差を考慮して同一検体につき繰り返し３回の実験を行い、その平均値を結果として示した。なお本研究では、幼若化反応におけるPBLの極微細部分を研究対象としており、これらの対象領域は生物学的に個体差の非常に生じにくい部分と考えられる(LOOR, 1980)。

マイトジェンの^{125}I標識法として本章ではクロラミンT法を応用した。しかし、原法(GREENWOOD et al., 1963)で作出可能な標識物質は極微量である。そこで、できるだけ多量の^{125}I標識物を得るため、反応溶液量を多くし(全量で1 ml)、さらに反応時間も長くした(２分/mg)。これにより高比活性の^{125}I標識マイトジェンをほとんど変性させることなく作製することができた。また、既報の方法(PREASANT & KORNFELD, 1972; SCHNEBLI & BACHI, 1975)でこの標識マイトジェンのヒト○型赤血球表面上の結合部位数を計数したところ、既報の結果とほぼ同値であった。以上の結果から、標識操作によるマイトジェンの変性はほとんどないものと考えられた。

リンパ球幼若化を誘起するためにマイトジェンがレセプターと接触している時間は、最低２時間必要であると報告されている(BANKS & McGUIRE, 1975; BANKS et al., 1978)。そこで本章では、反応時間を２時間と定め37℃、５％炭酸ガス培養器内でPBLの結合実験を行った。これらの条件は、幼若化反応を実際に行う際の環境と同一である。

TOYOSHIMA & OSAWA (1975)はWistaria floribunda mitogen(WFM)を用いた実験でヒトPBL表面上WFMレセプターのわずか5.2%に結合した時に最大幼若化活性が得られたと報告している。また、INBARら(1973)はConAを用いたラットリンパ節リンパ球の幼若化反応で、ConAレセプターのうち６%に結合するだけで最大幼若化活性が得られたと報告している。しかし、表４に示したようにウマ、ウシおよびイヌPBLではさらに多くの結合が必要であった。これらの違いは、上述のようなリンパ球の由来およびマイトジェンの違いによるものも考えられるが、それ以上に実験条件の違いが考えられる。すなわち、TOYOSHIMAらおよび INBARらは結合実験を24℃、30分間の条件で行い、幼若化活性の検定は37℃で行っている。本章では、上述のような理由から37℃、２時間の条件で結合実験を行った。幼若化反応は37℃で行うのでマイトジェン結合数と幼若化能との関係を検定するためには本章で行った方法のほうがより妥当と考えられる。

PERLESら(1977)は、ブタ腸間膜リンパ節リンパ球を用いて、最大幼若化活性が得られる時のレセプター占有率は約20%であり、さらに、PHAレセプターにはK_D値の高いものと低いものの二種類があると報告している。レセプター占有率は本章で得られた結果とほぼ同様であった。しかし、図２に示したように結合実験におけるScatchard plotの結果が直線になったことからウマ、ウシおよびイヌのPHAあるいはConAレセプターはそれぞれK_D値の等しい一種類であると考えられた。

PBLポピュレーションの分布は、ウマ(TARR et al., 1977)およびウシ(GREWAL et al., 1976)のPBLに関してすでに報告されている結果とほぼ同様の結果が得られた。それらの報告によると、ウマおよびウシの全てのＴリンパ球がE-ロゼットを形成するわけではないので、ウマおよびウシの一部のＴリンパ球は表１のその他の欄に含まれているものと考えられた。なおウマ、ウシおよびイヌのサブポピュレーションの同定は現在のところ不可能であり、それら

の分布の性差あるいは年齢差を検討することはできなかった。しかし、ヒトPBLのサブポピュレーションを種々の表面マーカー(OKT3，4，8，11およびLeu7)を用いて検討した報告(KREUZFELDER et al., 1987)によると、サブポピュレーション分布の性差および年齢差は認められない。本章で用いた３種動物PBLに関して同様の結果が得られるかどうかは今後の検討課題である。

表１に示したように、採取したPBL中にはリンパ球以外の白血球が混入していた。マイトジェンの結合部位数および結合部位占有率はリンパ球サブポピュレーションにより異なることは充分考えられる。今回用いたPHAおよびConAによる刺激前後での細胞構成比を比較すると、表２に示したように刺激後においてウマおよびウシではＥ-ロゼット形成細胞が、イヌにおいてはThy-1陽性細胞が著しく増加していた。この結果から、PHAおよびConAがウマ、ウシおよびイヌのリンパ球においてもＴリンパ球マイトジェンとして働くことが確認された。したがって、PHAまたはConAレセプターはＴリンパ球において特に重要な機能を有していると考えられる。また、PHAはヒトPBLにおいてCD8陽性細胞(サプレッサー/細胞障害性-Ｔリンパ球)を特異的に刺激することが報告されている(SERKE et al., 1987)。ウマ、ウシおよびイヌのPBLにおいては前述のようにサブポピュレーション同定のための表面マーカーが確立されておらず、PHAあるいはConAのPBLサブポピュレーション別の機能を明確にすることはできなかった。しかし、表２に示したようにウマおよびウシPBLではPHAあるいはConA刺激によりＥ-ロゼット形成細胞の増加が確認されたので、それらのPBLにおいて両マイトジェンはヒトのCD2陽性細胞(ヒツジ赤血球とのロゼット形成細胞)に相当するサブポピュレーションを刺激することが示唆された。

ところで、本章で対象としたPBL中のＢリンパ球やリンパ球以外の混入細胞にPHAやConAが結合しないという証拠は現在のところ確認されていない。既報の結果(INBAR et al., 1973; TOYOSHIMA & OSAWA, 1975)では、PBL中のリンパ

球以外の混入細胞の存在を無視して、細胞１個当りのレセプター数を算出している。わずかではあるがリンパ球以外の細胞が混入している細胞集団、あるいはポピュレーションに分画分離していないリンパ球集団を用いて行った結合実験から算出した細胞１個当りのレセプター数またはレセプター占有率には、重要な意義が認められないように思われる。それゆえに本章では、マイトジェン結合部位数および結合率を幼若化反応を実施する際の同一条件下でPBL全体に関し計測し、そこから算出される結果も細胞１個当りに換算せず、細胞１×10^5個当りの数として表示した。さらにsIg陰性リンパ球を選択採取し結合実験を行ったところ、ConA結合部位はウマおよびイヌのsIg陽性細胞すなわちＢリンパ球表面上にも多数存在することが認められた。この結論は、PE-ConAを用いたFACSによる二重染色解析によっても確認された。

また、レセプターとはリガンドと結合することによりなんらかの機能を誘発する働きをもつ蛋白であり、その発現は核内のDNAに支配されている。本章では、PHAあるいはConAに対するレセプター蛋白の分離、同定は行っていない。したがって、本章で得られた結果はレセプター数ではなく結合部位(Binding site)数と表現した。

以上の結果から、ウマ、ウシおよびイヌのPBL幼若化反応における最適マイトジェン濃度の違いは、最大幼若化活性を誘起するために必要なPHAあるいはConAの結合数の違いに起因すると考えられた。また、動物種によりマイトジェン結合部位の分布が異なることも、この違いを呈する一因であると考えられた。

本章の内容に関して、その大半はRes. Vet. Sci.(TAJIMAet al., 1989c)に投稿中である。

Ⅲ．第２章

末梢血リンパ球幼若化反応におけるマイトジェン刺激後の末梢血リンパ球膜流動性

１．要　約

ウマ、ウシおよびイヌの末梢血リンパ球(PBL)のフィトヘマグルチニンP(PHA)およびコンカナバリンA(ConA)刺激による膜流動性の変化を、蛍光偏光解消法および電子スピン共鳴法により経時的に測定した。

その結果、PHAあるいはConA刺激のいずれの場合においても、わずかな膜流動性の変化が両方法により観察された。しかし、これらの変化は未刺激PBLにおいても観察される程度の変化であり、 PHAあるいはConA刺激により特異的に生じたものとは判断されなかった。したがって、ウマ、ウシおよびイヌPBLのマイトジェンによる活性化過程において膜流動性の変化は伴っていないものと考えられた。

2．序　文

マイトジェンによるリンパ球活性化(リンパ球幼若化反応)は、次のような過程を経て誘起されるといわれている(LOOR, 1980)。①リンパ球表面上レセプターへのマイトジェンの結合．②膜流動性の上昇．③レセプターの架橋集合による細胞内への活性化シグナルの伝達．このうち②に関しては、多くの研究者が様々な方法で検討を行っている(BARNETT et al., 1974; DODD, 1975; TOYOSHIMA & OSAWA, 1975; MACCECCHINI & BURGER, 1977; FREEDMAN et al., 1981)。一般に、リンパ球幼若化反応において、膜流動性の上昇は重要な役割を担っているとされている(BARNETT et al., 1974; TOYOSHIMA & OSAWA, 1975)。各種動物のリンパ球のマイトジェンに対する反応性の違いは、細胞外からの刺激を細胞内に伝達するために必要と思われる膜流動性の変化の程度に起因するのではないかと推測された。したがって、本章ではウマ、ウシおよびイヌの末梢血リンパ球(PBL)のフィトヘマグルチニンP(PHA)またはコンカナバリンA(ConA)刺激による膜流動性の変化について検討した。

現在のところ、膜流動性は以下のような方法で測定可能とされている。

1．蛍光偏光解消法：蛍光物質をリン脂質二重層内に挿入し、その偏光度を測定し偏光解消の程度から膜リン脂質分子の運動の程度を測定する(西島、1974)．

2．電子スピン共鳴(ESR)法：安定なフリーラジカルを有した分子をリン脂質二重層内に挿入し、その分子の変動磁場内での共振スペクトルから膜リン脂質分子の運動の程度を測定する(HUBBELL & McCONNEL, 1971)．

3．核磁気共鳴法：プロトン分子を用いESR法と同様な原理で膜リン脂質分子の運動の程度を測定する(SEELIG & SEELIG, 1974)．

4．蛍光退色回復法：リン脂質や膜蛋白質を蛍光標識した細胞を顕微鏡下に固

定し、約1μmに絞ったレーザー光を短時間照射して蛍光物質を破壊しスポット状の退色部を作り、その退色部分の蛍光回復速度を測定する(KOPPEL et al., 1980).

それぞれの方法で用いるプローブは独自の相関時間を有し、したがって異なった時間範囲の膜流動性の変化を観察することができる。マイトジェン刺激リンパ球の膜流動性の変化に関し、異なった結果が報告されている一因として上述のような測定法の違いが考えられる。

以上のことから、本章ではウマ、ウシおよびイヌのPBLの活性化過程における膜流動性の変化について、広く一般に利用されている蛍光偏光解消法およびESR法の異なる２つの測定法により検討した。

３．材料および方法

1) PBL採取

第１章と同一の動物を用いウマ、ウシおよびイヌから同一の方法でそれぞれPBLを分離した。分離後、PBLをハンクス緩衝生理食塩液(HBSS, pH7.4)で３回洗浄した。

2) 蛍光標識

1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン(DPH, Sigma, St.Louis)を蛍光プローブとして用いた。2mMのDPH-テトラヒドロフラン溶液を1,000倍量のHBSSに添加し、15分間激しく混和した。このDPH拡散液にPBLを1.6×10^6/mlになるよう浮遊させ、37℃で30分間インキュベートすることによりPBLを蛍光標識した。インキュベート後、PBL浮遊液をHBSSで２回洗浄した。

3）蛍光偏光解消法

恒温装置付き蛍光分光光度計(島津RF-540)を用い蛍光強度を測定した。DPH標識したPBLをHBSSに浮遊させ(1.6×10^6/ml)、２個のセルに2.5mlずつ分注した。一方のセルにPHA(Difco, New York)またはConA(Pharmacia, Milwaukee)を添加してPBLを刺激し、もう一方のセルには対照として同量のHBSSを添加して経時的に蛍光強度を測定した。340 nmの水平および垂直二成分の定常励起光を照射し、428 nmの水平および垂直二成分の放出蛍光($I_{\parallel}$ および$I_{\perp}$)を37℃で測定した。測定値からAraisoら(1986)の方法に準じて次式で求められる定常蛍光異方性(r_s)を算出し、これを膜流動性の指標とした。

$$r_s = (I_{\parallel} - I_{\perp})/(I_{\parallel} + 2I_{\perp})$$

4）PBL膜粘性値の測定

膜粘性値(η：poise)は蛍光異方性からおおよその推定が可能であるが(ARAISO & KOYAMA, 1988)、３種動物PBL膜の正確なηをARAISOら(1986)の方法に準じナノ秒時間分解蛍光偏光解消法により測定した。この際蛍光異方性(r(t))は次式により算出した。

$$r(t) = (I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)) / (I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t))$$

また、r(t)の時間変化を次式により算出した(KINOSITA et al., 1984)。

$$r(t) = (r_0 - r\infty)\exp(-t/\phi) + r\infty$$

但しr_0 は時間 t = 0 における蛍光異方性、$r\infty$は極限蛍光

異方性、ϕはDPH分子の回転相関時間に関する時間定数。

さらに、円錐内揺動運動モデル(LIPARI & SZABO, 1980)によるDPHの揺動角(θ_w)および揺動拡散率(D_w)は次式により算出した。

$$r_\infty/r_0 = \{\cos\theta_w(1+\cos\theta_w)\}^2/4$$

$$D_w\phi(r_0-r_\infty)/r_0 = -\chi^2(1+\chi^2)\{\ln(1+\chi)/2+(1-\chi)/2\}/\{2(1-\chi)\} + (1-\chi)(6+8\chi-\chi^2-12\chi^3-7\chi^4)/24$$

但し$\chi=\cos\theta_w$。

最後にストークス・アインシュタイン方程式をもとにした次式によりηを算出した。

$$\eta = kT / 6D_w V_{eff}$$

但し k はボルツマン定数、T は絶対温度、

V_{eff} はDPH分子の実効体積。

5) スピンラベル

2-(3-カルボキシプロピル)-4,4-ジメチル-2-トリデシル-3-オキサゾリジニルオキシ(5-ドキシルステアリン酸、Aldrich, Milwaukee)をスピンプローブとして用いた。1mMの5-ドキシルステアリン酸－エタノール溶液1μlをガラス製試験管に取り、窒素ガスを噴射してエタノールを蒸発させラベル剤で管壁を被覆した。これに1×10^7/50μlのPBLを添加し、37℃で30分間ゆっくりと振盪させてPBLを標識した。

6）ESRスペクトルの測定

ESRスペクトルは温度調節器(JEOL ES-VT-3A，日本分光)付きスペクトロメーター(JEOL JES-FE3X、日本分光)を用いて測定した。スピンラベルしたPBLとPHAまたはConAを試験管内で反応させ、直ちにヘマトクリット毛細管内に充填した。対照には、他のヘマトクリット毛細管に充填した同一濃度の未刺激PBLを用いた。ESRスペクトルは全て37℃で測定した。

ESRスペクトルからオーダーパラメーター(S)を以下の式により算出し、膜流動性の指標とした(HUBBELL & McCONNEL，1971)。

$$S = (T_{\parallel} - T_{\perp})/(T_{zz} - T_{xx})$$

但し$T_{\parallel}$ および$T_{\perp}$ はそれぞれT_{zz}および$(T_{xx}+T_{yy})/2$.

T_{xx}，T_{yy}および T_{zz}はニトロキシドラジカルの超微細結合定数.

4．結　果

1）蛍光偏光解消法による膜流動性の観察

蛍光標識したウマ、ウシおよびイヌのPBLに最大幼若化活性を誘起する濃度のPHAまたはConAをそれぞれ添加し、その直後から60分間経時的にr_sを測定した。対照として、マイトジェンのかわりにHBSSを添加した未刺激PBLに関しても同様に測定した。その結果を表1、図1および2に示した。

DPH標識した各種動物PBLのr_sのマイトジェン刺激による変化はPHAあるいはConAいずれを用いた場合にも0.015以下であった。マイトジェン刺激PBLにおいて測定されたr_sのわずかな変化は未刺激PBLにおいて測定された変化とほぼ同

程度であった。したがって、マイトジェン刺激PBLにおいて測定されたr_sの変化は、マイトジェン刺激により特異的に生じた変化であるとは判断されなかった。

2）PBL膜粘性値の測定

時間分解蛍光偏光解消法によりDPH標識したウマ未刺激PBL中のDPH分子の偏光解消を測定した結果を図3に示した。

ウシおよびイヌPBLに関しても同様に測定した。これらの時間依存性蛍光減衰曲線より得られたηおよびr_∞の値を表2に示した。3種動物PBLのηは0.5から0.6poiseの間にあった。

また、r_sとηとの関係を図4に示した。両者は直線上にプロットされ、ウマ、ウシおよびイヌのPBLにおいてもr_sからηが推測可能であることが認められた。

3）ESR法による膜流動性の観察

ウマPBLをPHA刺激した際のESRスペクトルの経時的変化を図5に示した。ESRスペクトルは5分毎に40分間観察した。これらのスペクトルからSを算出し、その結果を表3に示した。

図6および7にはESR法による3種動物のPBL膜におけるSの変化を示した。PHAあるいはConAのいずれを用いた場合にも、3種動物PBLのSの変化は0.025以下であった。

これらのわずかな変化は未刺激PBLの変化とほぼ同程度であり、マイトジェン刺激により特異的に生じた変化であるとは断定されなかった。

以上の成績から、ウマ、ウシおよびイヌPBLのηはそれぞれ異なるが、PHAあるいはConA刺激による膜の流動性の上昇は認められなかった。

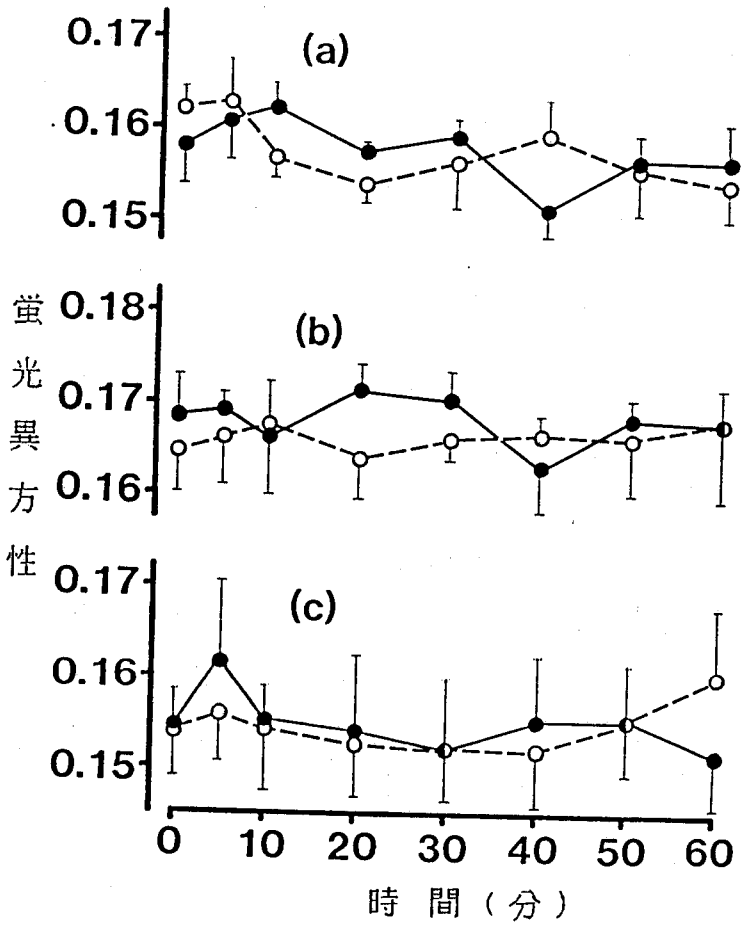

図1．フイトヘマグルチニンP（PHA）刺激によるウマ(a)、ウシ(b)およびイヌ(c)の末梢血リンパ球（PBL）膜中の1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエンの蛍光異方性値の変化。

——●——：PHA刺激PBL。·····○·····：未刺激PBL。

(TAJIMA et al., 1989a より引用)

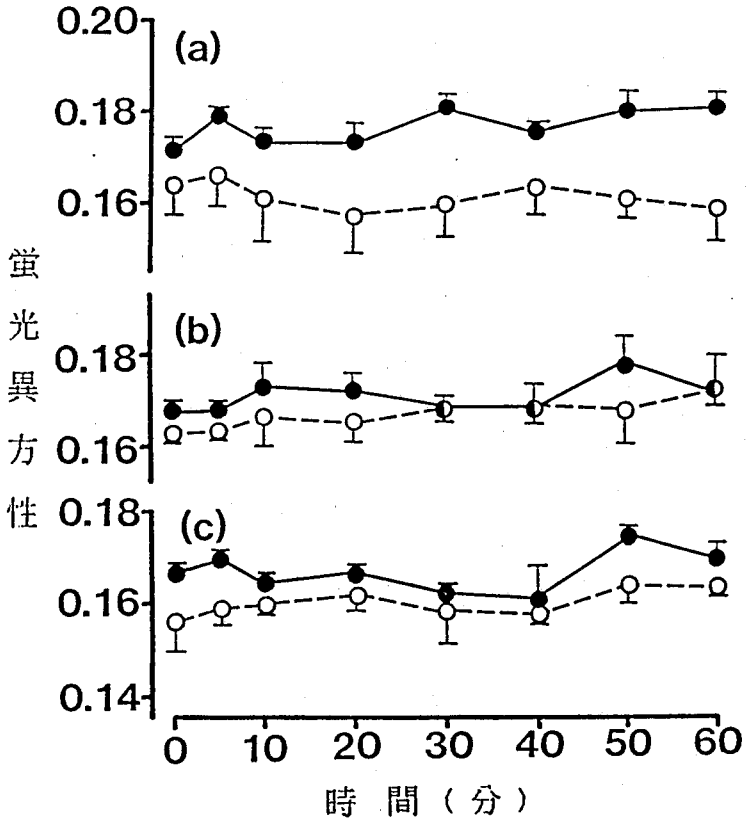

図2．コンカナバリンA(ConA)刺激によるウマ(a)、ウシ(b)およびイヌ(c)の末梢血リンパ球（PBL）膜中の1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエンの蛍光異方性値の変化．

——●——：ConA刺激PBL．------○------：未刺激PBL．

(TAJIMA et al., 1989b より引用)

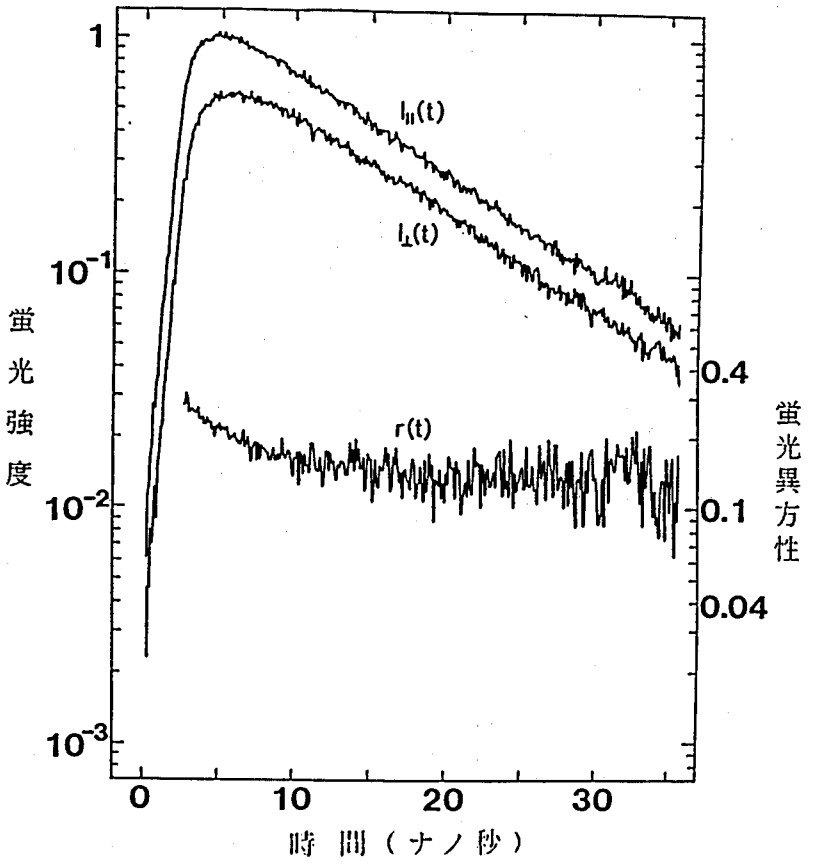

図3．37℃におけるウマ末梢血リンパ球膜中1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエンの蛍光減衰($I_{\parallel}$ (t)および$I_{\perp}$ (t))の時間変化および蛍光異方性(r(t))の変化．

(TAJIMA et al., 1989a より引用)

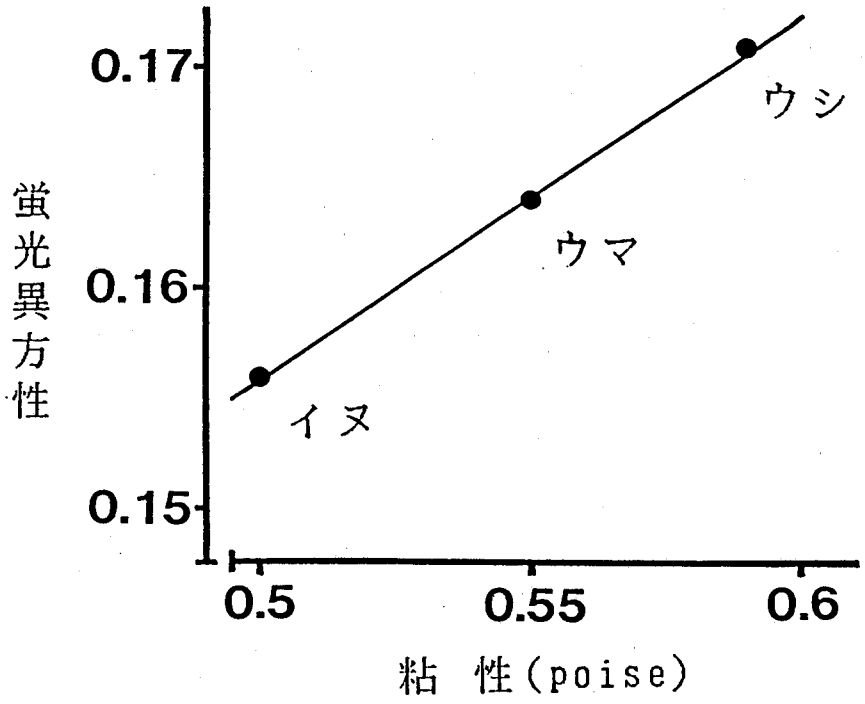

図4．ウマ、ウシおよびイヌの末梢血リンパ球膜中の1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエンの定常蛍光異方性と時間分解蛍光偏向解消法から算出した膜粘性値との関係．

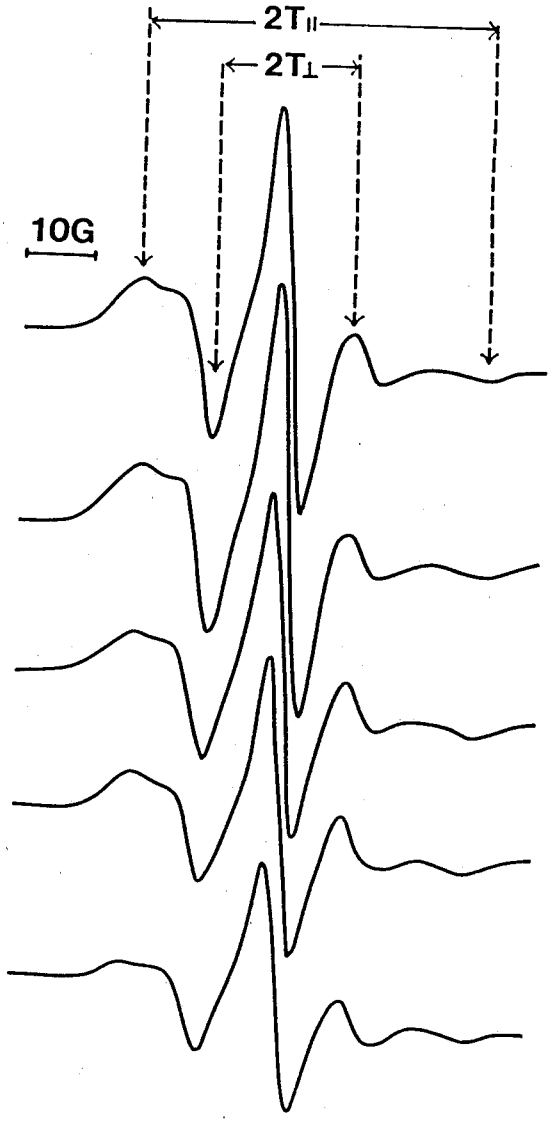

図５．フィトヘマグルチニンＰ（PHA）刺激したウマの末梢血リンパ球膜の５-ドキシルステアリン酸のESRスペクトルの変化．
上から順にPHA刺激０、５、10、15、20分後のスペクトルを表す。
(TAJIMA et al., 1989a より引用)

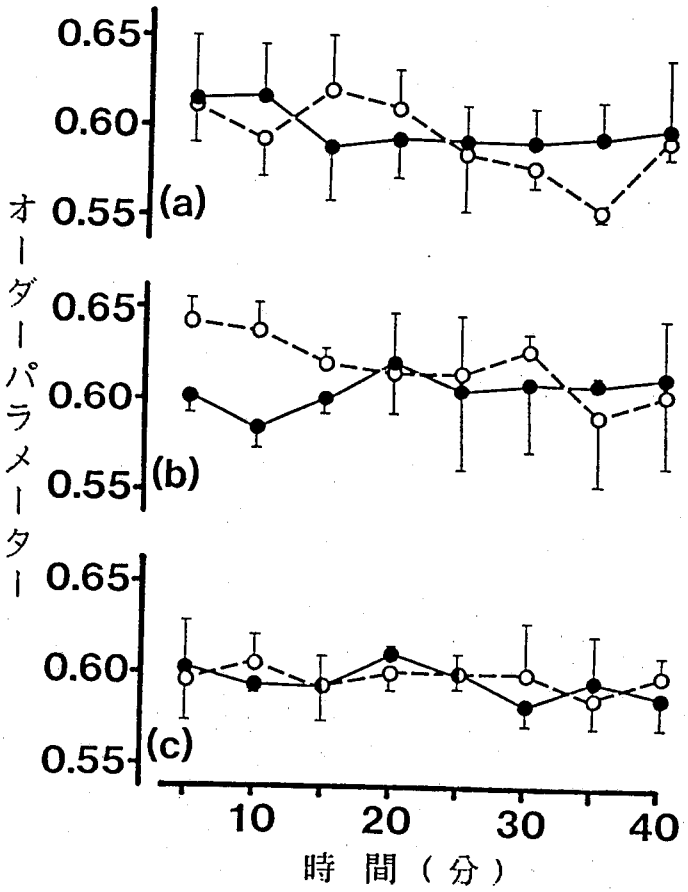

図6．フイトヘマグルチニンP（PHA）刺激によるウマ(a)、ウシ(b)およびイヌ(c)の末梢血リンパ球（PBL）膜中の5-ドキシルステアリン酸のオーダーパラメーター値の変化。

——●——：PHA刺激PBL．------○------：未刺激PBL．

(TAJIMA et al., 1989a より引用)

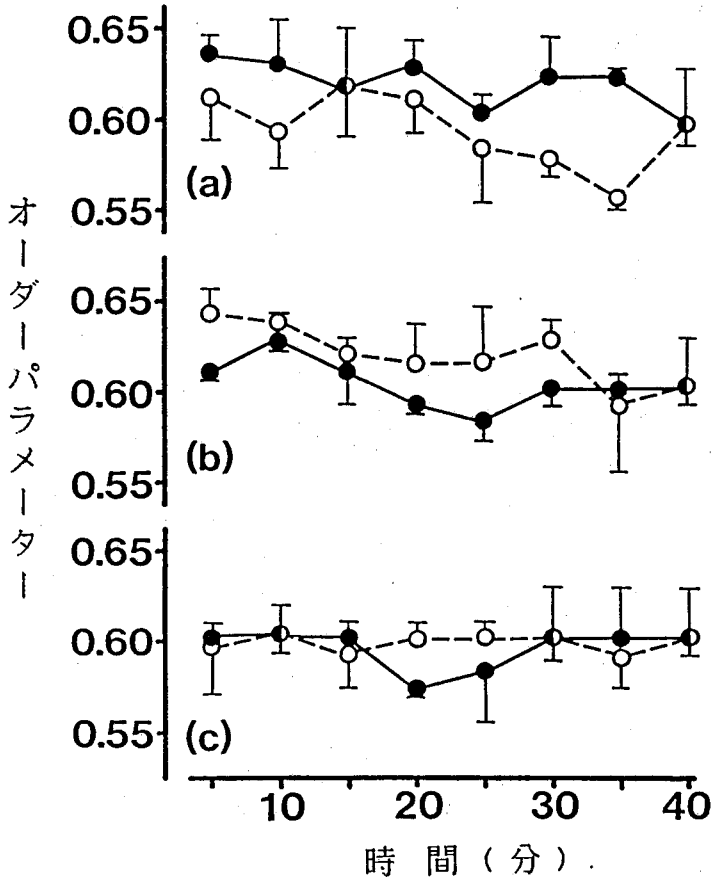

図7．コンカナバリンA(ConA)刺激によるウマ(a)、ウシ(b)およびイヌ(c)の末梢血リンパ球膜中の5-ドキシルステアリン酸のオーダーパラメーター値の変化．

——●——：ConA刺激PBL．------○------：未刺激PBL．

(TAJIMA et al., 1989b より引用)

表1．マイトジェン刺激による蛍光異方性の経時的変化．

PBLの由来	マイトジェン	マイトジェン添加後の時間（分） 0	5	10	20	30	40	50	60
ウマ	Cont.	0.1622±0.002	0.1626±0.005	0.1567±0.002	0.1540±0.002	0.1565±0.005	0.1596±0.004	0.1563±0.005	0.1547±0.004
	PHA	0.1580±0.004	0.1608±0.004	0.1623±0.003	0.1576±0.001	0.1594±0.002	0.1517±0.003	0.1571±0.003	0.1574±0.004
	ConA	0.1712±0.003	0.1789±0.001	0.1739±0.003	0.1739±0.004	0.1819±0.002	0.1766±0.002	0.1815±0.004	0.1825±0.003
ウシ	Cont.	0.1647±0.004	0.1660±0.005	0.1672±0.005	0.1639±0.004	0.1661±0.002	0.1669±0.002	0.1665±0.006	0.1686±0.009
	PHA	0.1682±0.005	0.1691±0.002	0.1663±0.006	0.1715±0.003	0.1706±0.003	0.1632±0.005	0.1688±0.002	0.1684±0.004
	ConA	0.1672±0.001	0.1676±0.001	0.1728±0.005	0.1720±0.004	0.1684±0.002	0.1680±0.006	0.1783±0.006	0.1722±0.003
イヌ	Cont.	0.1539±0.005	0.1556±0.005	0.1541±0.007	0.1527±0.008	0.1521±0.006	0.1522±0.008	0.1557±0.006	0.1605±0.007
	PHA	0.1545±0.004	0.1615±0.009	0.1550±0.004	0.1539±0.006	0.1519±0.008	0.1551±0.008	0.1554±0.006	0.1519±0.007
	ConA	0.1664±0.001	0.1691±0.001	0.1641±0.001	0.1664±0.001	0.1623±0.001	0.1609±0.007	0.1746±0.001	0.1699±0.004

（平均値±標準誤差、n＝3）

Cont：マイトジェンのかわりにハンクス緩衝生理食塩液を添加した末梢血リンパ球（PBL）の蛍光異方性（r_s）．

PHA：フィトヘマグルチニンP刺激PBLのr_s．

ConA：コンカナバリンA刺激PBLのr_s．

表2．ウマ、ウシおよびイヌ末梢血リンパ球(PBL)膜の蛍光異方性のパラメーター、粘性値およびオーダーパラメーター．

PBLの由来	蛍光異方性パラメーターおよび粘性					
	r_s	r_o	r_∞	θ_w	η	S
ウ　マ	0.164±0.004	0.34	0.14	42.4	0.55	0.61±0.02
ウ　シ	0.171±0.001	0.34	0.13	44.0	0.59	0.64±0.01
イ　ヌ	0.156±0.002	0.34	0.13	44.0	0.50	0.60±0.02

r_s：定常蛍光異方性．
r_o：t=0における蛍光異方性．
r_∞：極限蛍光異方性．
θ_w：揺動角度．
η：粘性値(poise)．
S：ESRスペクトルから算出したオーダーパラメーター．
(TAJIMA et al., 1989aより引用)

表３．オーダーパラメーターの経時的変化．

PBLの由来	マイトジェン	マイトジェン添加後の時間（分） 5	10	15	20	25	30	35	40
ウマ	Cont.	0.6111±0.02	0.5926±0.02	0.6204±0.03	0.6111±0.02	0.5834±0.03	0.5787±0.01	0.5556±0.01	0.5972±0.01
	PHA	0.6142±0.04	0.6173±0.03	0.5595±0.03	0.5957±0.04	0.5926±0.02	0.5926±0.02	0.5972±0.02	0.6019±0.04
	ConA	0.6358±0.01	0.6296±0.03	0.6173±0.02	0.6296±0.02	0.6049±0.01	0.6234±0.02	0.6234±0.02	0.5988±0.03
ウシ	Cont.	0.6435±0.01	0.6389±0.01	0.6204±0.01	0.6158±0.02	0.6157±0.03	0.6296±0.01	0.5926±0.04	0.6065±0.04
	PHA	0.6019±0.01	0.5834±0.01	0.6019±0.01	0.6204±0.03	0.6065±0.04	0.6111±0.04	0.6111±0.01	0.6157±0.03
	ConA	0.6111±0.01	0.6296±0.01	0.6111±0.02	0.5926±0.01	0.5834±0.01	0.6019±0.01	0.6019±0.01	0.6019±0.01
イヌ	Cont.	0.5973±0.02	0.6065±0.01	0.5926±0.02	0.6019±0.01	0.6019±0.01	0.6019±0.03	0.5880±0.01	0.6019±0.01
	PHA	0.6019±0.03	0.5926±0.01	0.5926±0.02	0.6111±0.01	0.6019±0.01	0.5834±0.01	0.5973±0.01	0.5880±0.01
	ConA	0.6019±0.01	0.6019±0.01	0.6019±0.01	0.5741±0.01	0.5834±0.03	0.6019±0.01	0.6019±0.03	0.6019±0.03

（平均値±標準誤差、ｎ＝３）

Cont：マイトジェンのかわりにハンクス緩衝生理食塩液を添加した末梢血リンパ球（PBL）のオーダーパラメーター（Ｓ）．

PHA：フィトヘマグルチニンＰ刺激PBLのＳ．

ConA：コンカナバリンＡ刺激PBLのＳ．

5．考　察

本章で用いた膜流動性測定のためのプローブはリン脂質二重層内に入り込み、プローブの動きが膜のリン脂質分子の動きを反映しているといわれている(荒磯ら、1987)。しかしESR法においては、スピンラベル剤のカルボキシル基がその分子構造上膜表面でトラップされ、リン脂質二重層内に深く入り込めないと考えられる。さらに、両プローブの膜内移動時間はほとんど同じである(HUBBELL & McCONNEL, 1971: KINOSITA et al., 1984)。したがって、ESR法において算出されるオーダーパラメーターは、蛍光異方性と比較すると、PBL細胞膜リン脂質二重層内のより表層の膜の動きを反映しているものと考えられる。

図５に示したように、ESRスペクトルの波形がわずかではあるが経時的に変化しているように見える。また、シグナル強度が時間と共に減衰している。これらの変化は、マイトジェン刺激PBLにおいても未刺激PBLにおいても観察された。この原因としては以下のことが考えられる；①ESRスペクトル測定中に、セルとして使用したヘマトクリット毛細管内をPBLが沈降する．②PBL内の様々な代謝活性によりニトロキシドラジカルが分解される．しかし、これらの影響による$T_{\parallel}$ および$T_{\perp}$ の著しい変化は認められなかった。したがって、これらのスペクトルから算出したＳには、著しい変化は認められなかった。

CURTAINら (1978) はヒトPBLのPHAまたはConA刺激によるＳの減少を観察した。また、スピン-スピン相互作用の測定において、PHA刺激によりスピンラベルした PBL膜リン脂質分子の動きが変化したとも報告している(CURTAIN et al., 1980)。NELSON(1967)は、種々の哺乳動物(ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギおよびウシ)の赤血球膜リン脂質組成比には、種差は認められるが年齢差はほとんど認められないと報告している。PBL膜は赤血球膜と異なりかなり複雑な構造を有しており、赤血球膜の概念がそのまま適用できるとは考えられないが、CURTAINら(1978, 1980)の報告ではヒトPBLのPHA

刺激による膜流動性の変化は、スフィンゴリピドの動きに依存していると結論づけている。以上のことから、PHA刺激によるウマ、ウシおよびイヌPBLの膜流動性の変化がヒトPBLのそれより小さくなる原因として、膜脂質組成比の違いおよびアシル鎖における二重結合数の違いが考えられた。

蛍光偏光解消法によりηを求めるためには、極限蛍光異方性および蛍光寿命を知る必要がある(KINOSITA et al., 1984)。しかし、PBLに関してこれらの成績は今だ報告されていない。本章では未刺激PBLの極限蛍光異方性および蛍光寿命を、水素ガスレーザーナノ秒パルス光を用いて光子計数法(ARAISO et al., 1986)により測定した。しかしこの方法を用いた場合、一検体あたりに要する測定時間が非常に長く(約1時間)、マイトジェン刺激後30分以内に生じると思われる膜流動性の変化を観察するには適さないと考えられる。そこで本章では、ηのかわりに定常光により測定できる蛍光異方性を膜流動性の指標とした。すなわち細胞膜においては、ηの減少にともないr_sも減少する(KINOSITA et al., 1984)。このことは図4に示したように、ウマ、ウシおよびイヌPBL膜においても適合することが認められた。その結果、ウマ、ウシおよびイヌのPBLにおいて、PHAあるいはConA刺激による蛍光異方性の著しい変化は認められなかった。また、各種動物未刺激PBLの膜粘性の差は0.1poise以下であり、マイトジェン刺激による膜流動性のわずかな変化はこの差より小さかった。

以上のことから、少なくともウマ、ウシおよびイヌのPBL膜では、マイトジェン刺激によりレセプター蛋白の動きを著しく活発にするような脂質二重層の流動性の上昇はないものと判断された。したがって、ウマ、ウシおよびイヌのPBL幼若化反応において、異なった反応性を示す原因として、3種動物PBLの膜流動性の変化の程度の差は関係ないものと考えられた。

本章の内容に関しては、TAJIMA et al., 1989a および TAJIMA et al., 1989b に発表予定である。

Ⅳ. 第３章

末梢血リンパ球幼若化反応における
細胞内骨格系の関与

１．要　約

ウマ、ウシおよびイヌの末梢血リンパ球(PBL)のフィトヘマグルチニンP(PHA)およびコンカナバリンA(ConA)による幼若化反応における、細胞内骨格系(微小線維および微小管)の役割について微小管重合阻害剤であるコルヒチンおよびビンブラスチンと、微小線維重合阻害剤であるサイトカラシンDを用いて検討した。

ウマおよびイヌPBLの両マイトジェンによる幼若化反応におけるコルヒチンおよびビンブラスチンの50%幼若化回復濃度は、ウシPBL幼若化反応におけるそれらよりも低かった。これは、幼若化反応における微小管の機能が、ウシよりウマおよびイヌPBLにおいて重要な役割を担っていることを示唆していた。一方、サイトカラシンDの50%幼若化回復濃度は、各種動物PBLにおいて、いずれのマイトジェンを用いた場合もほぼ一定であった。このことは、微小線維の機能が３種動物PBL幼若化反応における反応性の違いを呈する一因ではないことを示唆していた。

以上の成績から、ウマおよびイヌPBLの幼若化反応初期過程における微小管の機能は、ウシPBLのそれよりも重要な役割を担っており、そのために３種動物PBL間にPHAあるいはConAによる反応性の違いが生じると考えられた。

2. 序　文

リンパ球幼若化反応において、末梢血リンパ球(PBL)刺激のためのシグナルが細胞表面から細胞内に伝達される必要がある。これは、以下の経路により伝達されるといわれている。①マイトジェンのレセプターへの結合．②膜流動性の変化．③レセプターの架橋集合．DNA合成能により判定したマイトジェンに対する反応性は各種動物により様々である(KRISTENSEN et al., 1982a; TAJIMA et al., 1987)。これは、上述のような幼若化反応の初期段階におけるシグナル伝達機構の違いに起因するのではないかと考えられる。すでに第１章では①に関し、第２章では②に関して検討した。本章では③に関して、レセプターの動きを支配する細胞内小器官の働きと幼若化反応との関連性を調べた。

細胞の構造を維持している微小管や微小線維のような細胞内骨格系は、レセプターの架橋集合や活性化シグナル伝達のためにも重要な役割を果している(EDELMAN et al., 1973; LOOR, 1980)。コルヒチンおよびビンブラスチンは微小管重合阻害剤として、サイトカラシンは微小線維重合阻害剤として使われている(LOOR, 1980)。リンパ球をマイトジェン刺激する前にこれらの薬剤を作用させると、幼若化反応は阻止されるといわれている(EDELMAN et al., 1973; LOOR, 1980; THYBERG et al., 1971; YAHARA & EDELMAN, 1973)。

本章では、これらの幼若化反応阻止薬剤を用いてウマ、ウシおよびイヌPBL幼若化反応の反応性の違いにおける、微小管および微小線維の関与の程度について検討した。

3．材料および方法

1）PBL採取

第1章と同一の動物を用いウマ、ウシおよびイヌから同一の方法でそれぞれPBLを採取した。採取したPBLをハンクス緩衝生理食塩液(HBSS, pH7.4)にて3回洗浄した。洗浄後、PBLを20%ウマ血清加RPMI 1640に1.5×10^{6}個/mlになるように再浮遊させた。

2）リンパ球幼若化反応阻止試験

PBL浮遊液100μlを96穴マイクロプレートに添加し、HBSSで希釈したコルヒチン(半井化学薬品、京都)、ビンブラスチン(杏林製薬、東京)またはサイトカラシンD(Sigma, St.Louis)をそれぞれ20μlずつ10^{-10}～10^{-4}Mになるように添加した。37℃、5%CO_2培養器内で1時間培養した後、フイトヘマグルチニンP(PHA, Difco, New York)あるいはコンカナバリンA(ConA, Pharmacia, Milwaukee)を添加し、さらに96時間培養した。ウマ、ウシおよびイヌPBL幼若化のためのPHA濃度はそれぞれ5、15および20μg/ml、ConA濃度はそれぞれ50、5および25μg/mlとした(KRISTENSEN et al., 1982b; MASCOPLAT et al., 1974; TAJIMA et al., 1987)。

培養終了24時間前に、0.5μCiのトリチウム-チミジン(^{3}H-TdR)を各穴に添加した。培養終了後PBLをガラス線維濾紙上に回収し、PBLに取り込まれた^{3}H-TdRの放射活性を測定した。幼若化回復率は以下の式により算出した。

$$\text{幼若化回復率（%）} = \frac{\text{(阻止剤添加PBLの}^{3}\text{H-TdR取り込み量)}}{\text{(阻止剤無添加PBLの}^{3}\text{H-TdR取り込み量)}} \times 100$$

50%幼若化回復率を指標として、ウマ、ウシおよびイヌPBLに対する阻止剤の影響を比較した。

4．結　果

1）微小管重合阻害剤による幼若化阻止試験

PHAあるいはConAを用いたウマ、ウシおよびイヌ PBL幼若化反応をコルヒチンにより阻止した場合の幼若化回復率は表1および図1に示した。また同様に、ビンブラスチンにより阻止した場合の幼若化回復率を表2および図2に示した。幼若化能が50%回復する時点での濃度(50%幼若化回復濃度)はコルヒチンまたはビンブラスチンのいずれの薬剤を用いた場合にも、ウシPBLにおいて最も高かった。

2）微小線維重合阻害剤による幼若化阻止試験

PHAあるいはConAを用いたウマ、ウシおよびイヌPBL幼若化反応をサイトカラシンDにより阻止した場合の幼若化回復率は表3および図3に示した。サイトカラシンDを用いた場合にはウマ、ウシおよびイヌPBLのいずれの間にも50%幼若化回復濃度の著しい差は認められなかった。

3）50%幼若化回復濃度の比較

ウマ、ウシおよびイヌPBLにおけるコルヒチン、ビンブラスチンおよびサイトカラシンDの50%幼若化回復濃度を表4に示した。幼若化阻止薬剤としてコルヒチンまたはビンブラスチンを用いた場合には、ウシPBLにおける50%幼若化回復濃度は、ウマおよびイヌPBLのそれより著しく高濃度であった。一方、

サイトカラシンDを用いた場合、3種動物PBL間における50％幼若化回復濃度に著しい差は認められなかった。

以上の結果より、ウマおよびイヌPBLの微小管はウシのそれに比べて幼若化反応において、より重要な役割を担っていると考えられた。

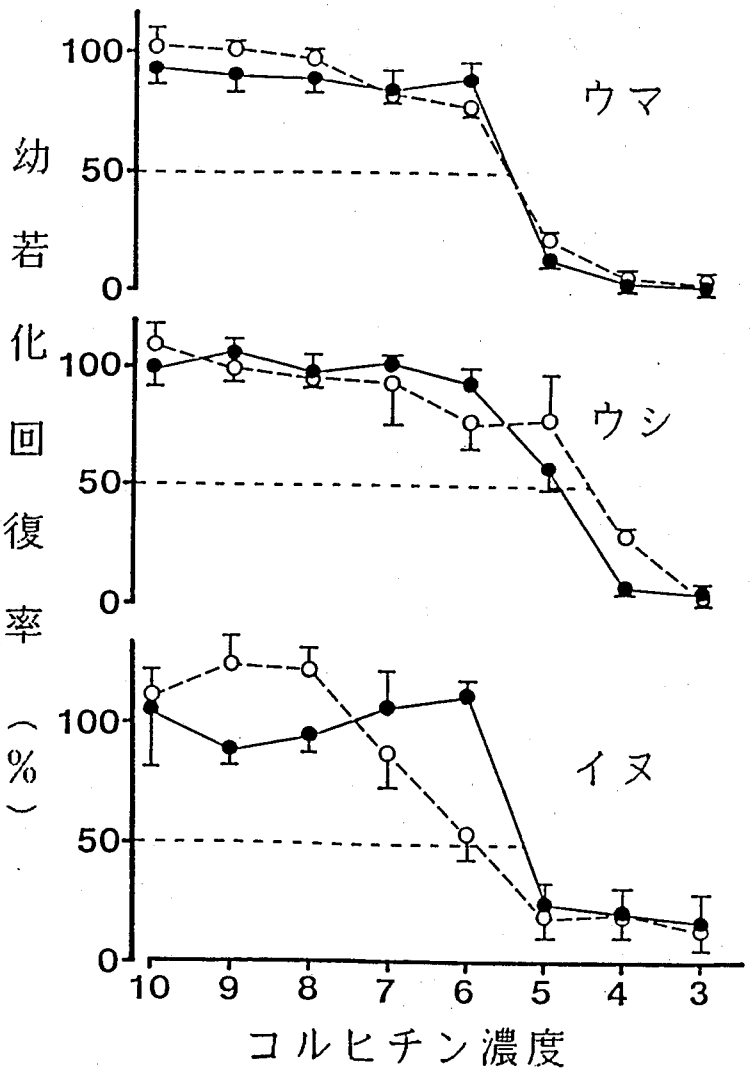

図1．コルヒチンによるウマ、ウシおよびイヌの末梢血リンパ球（PBL）幼若化回復率．

——●——：フィトヘマグルチニンP(PHA)刺激PBL．
·····○·····：コンカナバリンA(ConA)刺激PBL．

コルヒチン無添加でのPHAまたはConAに対する反応性を100とした。コルヒチンの濃度はモル濃度の対数のマイナス(−log[コルヒチンのモル濃度])で表した。(TAJIMA et al., 1989d より引用)

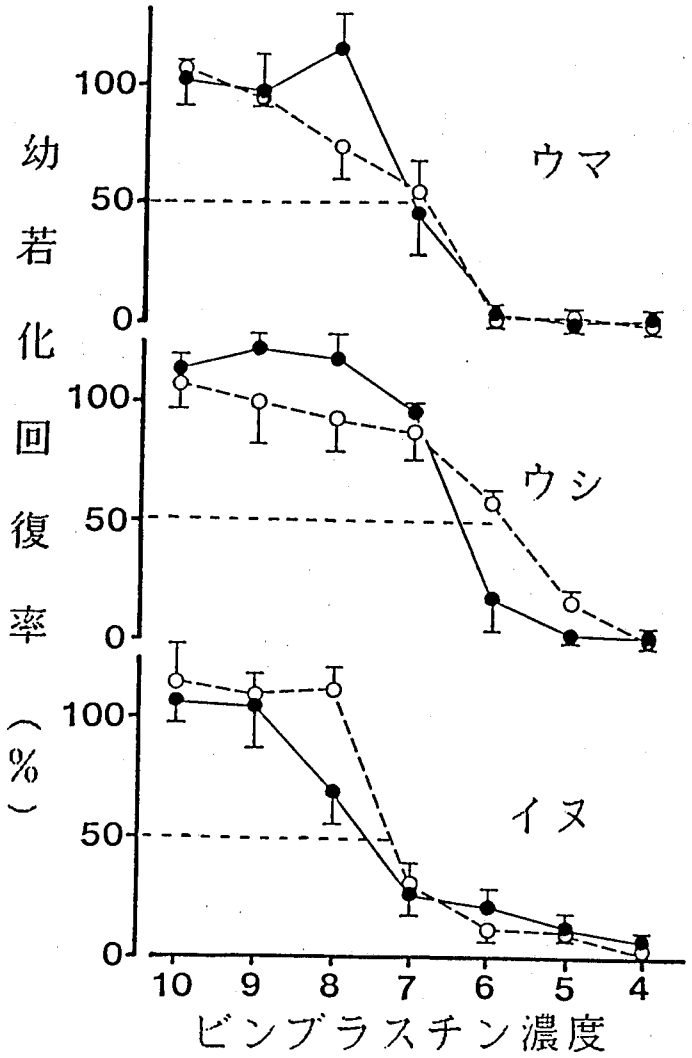

図2．ビンブラスチンによるウマ、ウシおよびイヌの末梢血リンパ球幼若化回復率．

図中の表記法は図1と同じである。

ビンブラスチンの濃度はモル濃度の対数のマイナス(−log[ビンブラスチンのモル濃度])で表した。(TAJIMA et al., 1989d より引用)

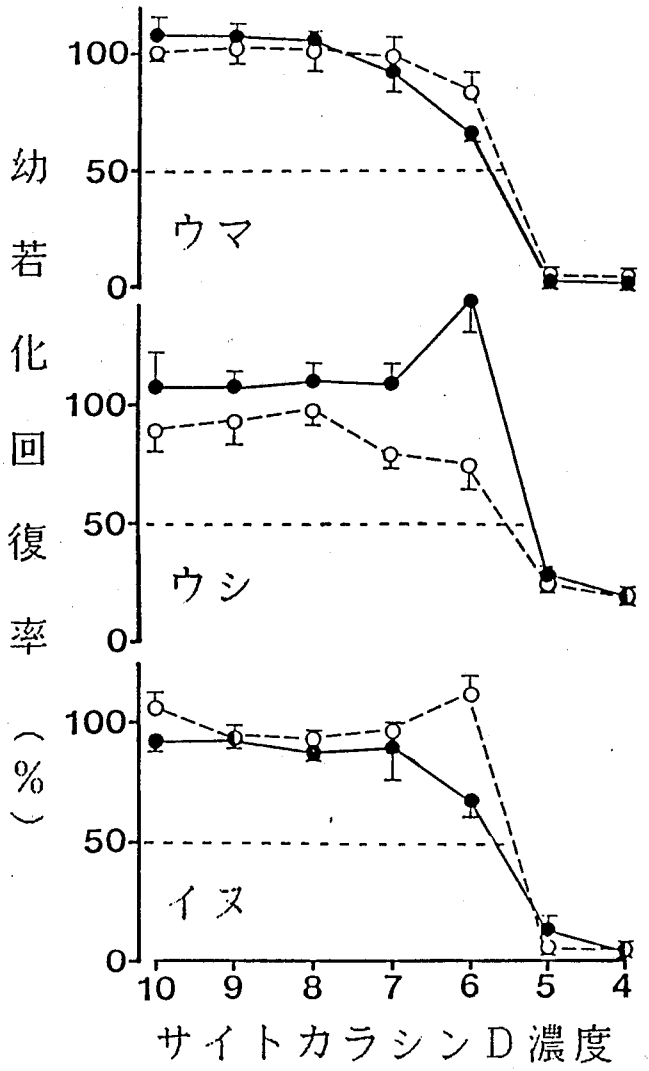

図3．サイトカラシンDによるウマ、ウシおよびイヌの末梢血リンパ球幼若化回復率．

図中の表記法は図1と同じである。

サイトカラシンDの濃度はモル濃度の対数のマイナス(−log[サイトカラシンDのモル濃度])で表した。(TAJIMA et al., 1989d より引用)

表1．コルヒチンによるウマ、ウシおよびイヌ末梢血リンパ球の幼若化回復率（%）．

PBLの由来	ﾏｲﾄｼﾞｪﾝ	コルヒチン濃度（−log［コルヒチン濃度，M］） 10	9	8	7	6	5	4	3
ウマ	PHA	94.5±7.0	92.0±8.3	89.4±3.8	84.5±6.7	89.6±4.6	12.7±0.5	1.5±0.4	0.9±0.2
	ConA	102.6±0.5	101.5±2.8	98.3±0.3	83.2±4.1	77.3±2.6	20.9±1.0	4.5±0.3	3.0±0.7
ウシ	PHA	99.4±6.2	105.2±4.3	97.7±6.7	101.3±2.6	94.2±3.3	57.3±9.2	8.9±1.6	4.5±1.5
	ConA	108.6±8.1	99.0±5.3	96.2±1.7	93.0±6.5	76.7±2.0	78.0±7.4	28.2±2.4	4.5±0.3
イヌ	PHA	104.5±12.5	88.7±5.7	94.7±8.4	105.8±10.4	111.4±3.4	24.4±8.8	20.8±9.3	17.9±7.6
	ConA	111.2±1.3	124.4±11.5	122.1±8.1	86.7±10.9	53.4±9.8	18.4±7.9	21.3±9.6	14.2±7.2

（平均値±標準誤差、n＝3）

PHA：コルヒチン無添加でのフィトヘマグルチニンPに対する反応性を100とした時の相対値．
ConA：コルヒチン無添加でのコンカナバリンAに対する反応性を100とした時の相対値．

表2．ビンブラスチンによるウマ、ウシおよびイヌ末梢血リンパ球の幼若化回復率（%）．

PBLの由来	マイトジェン	ビンブラスチン濃度（−log［ビンブラスチン濃度，M］）						
		10	9	8	7	6	5	4
ウマ	PHA	102.0±9.6	97.5±12.9	117.2±14.8	46.7±11.1	3.8±1.6	1.6±0.2	0.7±0.3
	ConA	107.6±1.8	96.2±4.3	72.6±11.1	54.8±13.6	3.7±0.2	4.2±2.6	0.4±0.3
ウシ	PHA	114.5±2.0	123.8±6.6	119.1±9.2	97.3±2.6	18.0±9.5	2.0±1.0	0.6±0.1
	ConA	108.7±10.4	99.5±10.4	92.8±9.7	87.9±9.5	58.3±5.5	16.7±3.8	0.6±0.1
イヌ	PHA	106.3±7.6	104.6±11.9	69.5±9.4	25.8±3.6	24.0±6.1	13.3±3.1	7.2±0.4
	ConA	114.9±11.5	109.8±6.3	112.6±7.7	28.1±6.7	11.6±2.3	11.5±1.6	2.2±1.2

（平均値±標準誤差、n＝3）

PHA：ビンブラスチン無添加でのフィトヘマグルチニンPに対する反応性を100とした時の相対値．
ConA：ビンブラスチン無添加でのコンカナバリンAに対する反応性を100とした時の相対値．

表3．サイトカラシンDによるウマ、ウシおよびイヌ末梢血リンパ球の幼若化回復率（%）．

PBLの由来	マイトジェン	サイトカラシンD濃度（−log［サイトカラシンD濃度，M］）						
		10	9	8	7	6	5	4
ウマ	PHA	107.9±6.1	107.7±6.0	105.8±1.3	92.1±8.1	66.0±2.7	2.3±0.5	0.8±0.5
	ConA	101.6±1.7	102.2±6.1	101.3±7.9	98.6±8.4	82.9±8.8	4.7±0.3	3.0±0.6
ウシ	PHA	107.7±11.7	107.1±7.4	110.3±7.5	109.5±7.6	144.2±11.1	10.2±3.4	2.3±1.2
	ConA	87.3±6.1	91.9±8.7	97.5±6.6	78.9±4.2	73.9±10.3	7.8±1.5	2.1±0.3
イヌ	PHA	90.8±3.0	90.3±2.2	86.8±4.0	89.6±10.3	67.0±7.3	13.7±3.4	3.7±1.8
	ConA	105.3±8.0	91.4±5.6	92.3±4.4	96.3±2.2	111.7±7.3	5.1±2.1	4.6±2.0

（平均値±標準誤差、n＝3）

PHA：サイトカラシンD無添加でのフィトヘマグルチニンPに対する反応性を100とした時の相対値．
ConA：サイトカラシンD無添加でのコンカナバリンAに対する反応性を100とした時の相対値．

表4．コルヒチン、ビンブラスチンおよびサイトカラシンDの50%幼若化回復濃度．

PBLの由来	コルヒチン		ビンブラスチン		サイトカラシンD	
	PHA	ConA	PHA	ConA	PHA	ConA
ウ マ	3.2×10^{-6}	3.1×10^{-6}	8.7×10^{-8}	1.3×10^{-7}	1.8×10^{-6}	2.6×10^{-6}
ウ シ	1.4×10^{-5}	3.6×10^{-5}	3.8×10^{-7}	1.4×10^{-6}	6.4×10^{-6}	3.2×10^{-6}
イ ヌ	4.8×10^{-6}	1.2×10^{-6}	2.6×10^{-8}	5.4×10^{-8}	2.0×10^{-6}	3.8×10^{-6}

それぞれの濃度はモル濃度で表した。(TAJIMA et al., 1989dより引用)

5．考　察

リンパ球表面の免疫グロブリンに代表されるレセプター蛋白は外来刺激物質と結合すると再配置し、パッチやキャップを形成する(TAYLOR et al., 1971)。パッチやキャップの形成は、リンパ球の分化・増殖のための活性化シグナル伝達にとって必要不可欠な現象のように思われる。なぜなら、キャップ形成を阻止するとリンパ球の活性化(^{3}H-TdR取り込み能で判定するところのDNA合成能)も阻止されるからである(EDELMAN et al., 1973)。

レセプターの再配置においては、微小管および微小線維が重要な機能を有している(DePETRIS, 1975; EDELMAN et al., 1973; LOOR, 1980)。細胞内骨格系である微小管および微小線維は細胞内に広範なネットワークを形成し、細胞形態の維持、有糸分裂およびシグナル伝達に重要な役割を担っている(DePETRIS, 1975; LOOR, 1980)。したがって、PBLのマイトジェン刺激に対する動物種間における反応性の違いは、微小管や微小線維によるマイトジェンレセプター支配の程度の相違に起因するものと推測された。

ビンブラスチン、ビンクリスチン、コルヒチン、コルセミド、ポドフィロトキシンなどは、微小管に結合し重合を阻止することによりキャップ形成を阻害し、幼若化反応を阻止するといわれている(CORTESE et al., 1977; THYBERG et al., 1977)。また、これらの薬剤のキャップ形成阻害効果は、その毒性によるものではないことが判明している(WANG et al.,1975)。さらに、これらの薬剤による幼若化反応阻止効果は、DNA合成能に直接障害を与えるためではないともいわれている(EDELMAN et al., 1973)。

微小線維重合阻害剤としてのサイトカラシンには、数種のサイトカラシンが報告されているが、幼若化反応阻止のためにはサイトカラシンBおよびDが一般に利用されている(YAHARA et al., 1982)。しかし、サイトカラシンBには

グルコース輸送を障害することにより幼若化を阻止する効果も報告されている(MEDRANO et al., 1974; JUNG & RAMPAL, 1977)。一方、サイトカラシンDにはそのような効果はなく(HUME et al., 1978)、幼若化反応における微小線維の役割を調べるためには適したプローブといえる。

ヒト、マウスおよびウサギのリンパ球のConAに対する反応性は、10^{-6}Mのコルヒチンにより約70～80%阻止される(WANG et al., 1975)。また、ヒトリンパ球のPHAに対する反応性は10^{-6}Mのコルヒチンあるいはビンブラスチンにより約75%阻止される(GUNTHER et al., 1976)。これらの結果は、^{3}H-TdR取り込み能により判定したものである。一方、蛍光標識ConAを用いた形態学的観察によると、マウス脾臓リンパ球のConA刺激によるキャップ形成は10^{-4}Mのコルヒチンにより約60～80%阻止される(EDELMAN et al., 1973)。上述のような様々な結果が報告されている原因として、リンパ球由来の相違も考えられるが阻止効果の判定法の違いもその一因と考えられる。したがって本章では阻止薬剤の効果を、^{3}H-TdR取り込み能で判定するところの50%幼若化回復能を基準として、各種動物PBLに関して検討した。

コルヒチンを用いた場合、ウマおよびイヌPBLにおいてはその効果が上述の既報の結果とほぼ同様であったが、ウシPBLにおいては同様の阻止効果を得るためには高濃度のコルヒチンが必要であった。逆に、ビンブラスチンを用いた場合、ウシPBLにおいてはヒトPBLとほぼ同様の効果が得られたが、ウマおよびイヌPBLにおいてはビンブラスチン濃度はウシPBLにおけるそれよりも低かった。また、サイトカラシンDを用いた場合、各種動物PBL間に著しい差は認められなかった。以上の結果から、ウマおよびイヌPBLにおける活性化シグナルの伝達は微小管重合阻害剤により容易に阻止され、幼若化反応が低濃度の阻害剤の存在により障害される。この阻害剤に対する感受性の違いは今後の検討課題である。さらに、微小線維は幼若化反応におけるシグナル伝達機構には特に重要

な役割を担っていないようである。つまり、ウマおよびイヌPBL幼若化反応において微小管は、ウシPBL幼若化反応におけるよりもPHAあるいはConAによる反応性を強く支配していることが示唆された。

本章の内容に関しては、TAJIMA et al., 1989d に発表予定である。

Ⅴ．総　括

末梢血リンパ球(PBL)幼若化反応は、in vitroでPBLの免疫応答能を調べるための有用な検査法である。この検査法は、獣医臨床領域においても広く利用されており、マイトジェンとしてフィトヘマグルチニンP(PHA)およびコンカナバリンA(ConA)が頻用されている。しかし、健常時における各種動物のマイトジェンに対する反応性は異なっており、また反応条件も様々である。したがって本論文では、それぞれ特有の反応性および反応条件を有するウマ、ウシおよびイヌのPBLに関し、PHAおよびConAを用いて幼若化初期機構および動物種差について検討した。

1．ウマ、ウシおよびイヌPBL幼若化反応における最大幼若化活性を誘起するために必要なマイトジェン濃度(最適マイトジェン濃度)とマイトジェン結合部位数の関係を調べた。

1）PHAおよびConAはウマ、ウシおよびイヌPBL幼若化反応においてTリンパ球マイトジェンとして作用すると考えられた。

2）ウマ、ウシおよびイヌPBL表面上のPHAに対する結合部位数はPBL 1×10^5 当りそれぞれ 4.2×10^{11}，12.8×10^{11} および 14.0×10^{11}，ConAの結合部位数は同様に 23.9×10^{11}，9.4×10^{11} および 12.1×10^{11} であった。

3）最大幼若化活性を誘起するためのマイトジェンの最適結合率はPHAの場合マイトジェンの最適濃度とは無関係であったが、ConAの場合マイトジェンの最適濃度の高いPBLでは結合率も高くなることが認められた。

4）PHAあるいはConAにより最大幼若化活性を誘起するための結合部位数は、マイトジェンの最適濃度の高いPBLほど多く必要であった。

5）ウマおよびイヌのBリンパ球表面上には、ウシBリンパ球に比べ多数の

ConA結合部位が存在した。また、PHAの結合部位は上記３種の動物のＢリンパ球表面上にはほとんど存在しなかった。

以上の成績から、ウマ、ウシおよびイヌPBL幼若化反応におけるPHAまたはConAの最適濃度の差異は、最大幼若化活性を誘起するために必要な結合部位数がそれぞれ異なるためと考えられた。

したがって、PBL幼若化反応を臨床検査に応用する際に、その反応性を高めるために不必要にマイトジェン濃度を上げることは無意味なことであると判断された。

２．最適マイトジェン濃度で誘起したPBL幼若化反応の反応性(分化・増殖の程度)がウマ、ウシおよびイヌPBL間で異なる原因を追究するために、幼若化反応初期段階で生じると言われている膜流動性の変化を、３種動物PBLについて測定した。

１）1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエンを用いた蛍光偏光解消法により、PHAあるいはConA刺激したウマ、ウシおよびイヌPBLの膜流動性を経時的に測定したところ、それらの変化は未刺激PBLの膜流動性の変化と比較して、膜流動性の変化は認められなかった。

２）５-ドキシルステアリン酸を用いた電子スピン共鳴法によって同様に測定した。しかし、本方法においてもPHAあるいはConA刺激による３種動物PBLの膜流動性の変化は認められなかった。

以上の成績から、ウマ、ウシおよびイヌPBL幼若化反応初期段階においては、ヒトPBLにおいて一部の研究者により報告されているような膜流動性の変化は伴っていないと考えられた。したがって、３種動物PBL幼若化反応における反応性の違いはPHAあるいはConA刺激後の膜流動性の変化の程度に起因するものではないと推察された。

3．PHAあるいはConAがPBL表面上の結合部位に結合後、結合部位は再配置しパッチやキャップを形成する。これは、幼若化反応におけるマイトジェン刺激シグナル伝達の際に、必要な現象である。そこで、その結合部位の動きを支配する細胞内小器官のうち、微小管および微小線維の機能の役割をウマ、ウシおよびイヌPBLに関し調べた。

1）微小管重合阻害剤であるコルヒチンおよびビンブラスチンによる幼若化反応阻止試験の結果、50％幼若化回復濃度で比較すると、いずれの薬剤を用いた場合にもウシPBLがウマおよびイヌPBLのそれよりも高濃度であった。

2）微小線維重合阻害剤であるサイトカラシンDによる幼若化反応阻止試験の結果、50％幼若化回復濃度で比較すると、３種動物PBL間に著しい差は認められなかった。

以上の成績から、マイトジェンに対する反応性の低いPBLは微小管重合阻害剤の影響を受けやすくマイトジェン刺激シグナル伝達のためのレセプター架橋集合が微小管により強く支配されていると考えられた。また、微小線維は幼若化反応誘起のためのマイトジェン刺激シグナル伝達に際し、重要な役割を担っていないと推察された。

ウマ、ウシおよびイヌPBL幼若化反応におけるマイトジェン(PHAおよびConA)の濃度が特有であるのは、最大幼若化活性を誘起するために必要なマイトジェン結合数が３種動物PBLで異なっており、また結合部位の分布が３種動物PBL独特であるためと考えられた。さらに、PBLに対するマイトジェンの作用の３種動物PBL間における差は、マイトジェン刺激の伝達初期過程における微小管の機能の役割の違いが一因であると考えられた。

Ⅵ. 引用文献

1)ARAISO,T., SHINDOU,Y., ARAI,T., NITTA,J., KIKUCHI,Y., KAKIUCHI,Y. & KOYAMA,T.(1986): Viscosity and order in erythrocyte membranes studies with nanosecond fluorometry. Biorheology, 23, 467-483.

2)荒磯恒久，小山富康 (1987):生体膜の流動的性質と脂質分子運動ー蛍光偏光法を中心として。 日本生理誌, 49, 1-11.

3)ARAISO,T. & KOYAMA,T.(1988): A new analysis method for the membrane viscosity from steady-state fluorescence depolarization. Biorheology, 25, 253-259.

4)BANKS,K.L. & McGUIRE,T.C.(1975): Regulation by antibody of phytolectin induced lymphocyte proliferation. I. Evidence for two mechanisms of suppression. J.Immunol., 114, 1307-1313.

5)BANKS,K.L., McGUIRE,T.C. & DAVIS,W.C.(1978): Regulation by antibody of lectin-induced lymphocyte proliferation : Antibody inhibition of mitogenesis and release of lectin from cell surfaces. Am.J.Vet.Res., 39, 1784-1789.

6)BARNETT,R.E., SCOTT,R.E., FURCHT,L.T. & KERSEY,J.H.(1974): Evidence that mitogenic lectins induce changes in lymphocyte membrane fluidity. Nature, 249, 465-466.

7)BROSTROME,H., HELLSTROM,U., ZIVERTS,I.,OBEL,N. & PERLMANN,P.(1985): A new surface marker on equine peripheral blood lymphocytes. II. Characterization and separation of purified blood lymphocytes with receptors for helixpomatia A hemagglutinin (HP). Vet.Immunol. Immunopathol., 8, 47-61.

8)CORTESE,F., BHATTACHARYYA,B. & WOLFF,J. (1977): Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin. J.Biol.Chem., 252,1134-1140.

9)CURTAIN,C.C., LOONEY,F.D., MARCHAIONIS,I.J. & RAISON,J.K. (1978): Changes in lipid ordering and state of aggregation in lymphocyte plasma membranes after exposure to mitogens. J.Membrane Biol., 44, 211-232.

10)CURTAIN,C.C., LOONEY,F.D. & SMELSTORIUS,J.A. (1980): Lipid domain formation and ligand-induced lymphocyte membrane changes. Biochim. Biophys.Acta, 596, 43-56.

11)DePETRIS,S. (1975): Concanavalin A receptors, immunoglobulins, and θ antigen of the lymphocyte surface. J.Cell Biol., 65, 123-146.

12)DHINGRA,V.K., GUPTA,R.K.P. & SADANA,J.R. (1982): Demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in bovine lymphocytes and monocytes or macrophages. Res.Vet.Sci., 33, 26-30.

13)DODD,N.J.F. (1975): PHA and lymphocyte membrane fluidity. Nature, 257, 827-828.

14)EDELMAN,G.M., YAHARA,I. & WANG,I.L. (1973): Receptor mobility and receptor-cytoplasmic interactions in lymphocytes. Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A., 70, 1442-1446.

15)FREEDMAN,M.H., KHAN, N.R., TREW-MARSHALL,B.J., CUPPLES,C.G. & MELY-GOUBERT,B.(1981): Early biochemical events in lymphocyte activation. II.Selectivity of A23187 for T lymphocytes and the use of an aporlar fluorescent probe (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) to monitor ionophore- and lectin-induced lymphocyte. Cell.Immunol., 58, 134-146.

16)GREENWOOD,F.C., HUNTER,W.M. & GLOVER,J.S.(1963): The preparation of ^{131}I-labeled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem.J., 89, 114-123.

17)GREWAL,A.S., ROUSE,B.T. & BABIUK,L.A.(1976): Erythrocyte rosettes - a marker for bovine T cells. Can.J.comp.Med., 40, 298-305.

18)GUNTHER,G.R., WANG,J.L. & EDELMAN,G.M. (1976): Kinetics of colchicine inhibition of mitogenesis in individual lymphocytes. Exp.Cell Res., 98, 15-22.

19)星野孝 (1979) ：リンパ球と免疫機能. 臨床検査, 23, 675-687.

20)HUBBELL,W.L. & McCONNEL,H.M.(1971): Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. J.Am.Chem.Soci., 93, 314-326.

21)HUME,D.A., HAMSEN,K., WEIDEMANN,M.J. & FERBER,E. (1978): Cytochalasin B inhibits lymphocytes transformation through its effects on glucose transport. Nature, 272, 359.

22)INBAR,M., BEN-BASSAT,H. & SACHS,L.(1973): Temperature-sensitive activity on the surface membrane in the activation of lymphocytes by lectins. Exp.Cell Res., 76, 143-151.

23)伊藤喜久, 笠原忠, 河合忠 (1981) ：リンパ球培養による検査. 臨床病理, 特集45号, 209-218.

24)JUNG,C.Y. & RAMPAL,A.L. (1977): Cytochalasin B binding sites and glucose transport carrier in human erythrocyte ghosts. J.Biol.Chem., 252, 5456-5463.

25)KAWAMURA,M., MAEDE,Y. & NAMIOKA,S. (1987): Mitogenic responsibilities of lymphocytes in canine babesiosis and the effects of splenctomy on it. Jpn.J.Vet.Res., 35, 1-10.

26)KINOSITA,K.Jr., KAWATO,S. & IKEGAMI,A.(1984): Dynamic structure of biological and model membranes: analysis by optical anisotropy decay measurement. Adv.Biophys., 17, 147-203.

27)KOPPEL,D.E., SHEETZ,M.P. & SCHINDLER,M.(1980): Lateral diffusion in biological membranes a normal-mode analysis of diffusion on a spherical surface. Biophys.J., 30, 187-192.

28)KRAKOWKA,S. & RINGLER,S.S.(1986): Activation specificity of commonly employed mitogens for canine B- and T-lymphocytes. Vet.Immunol. Immunopathol., 11, 281-189.

29)KREUZFELDER,E., SHEN,G., RODECK,U., KONIG,E., LUBOLDT,W., KEINECKE, H.O., BROCKMEYER,N. & SCHEIERMANN(1987): Relative and absolute numb er of human lymphocyte subpopulations. A comparison of immunofluorescence microscopy and flow cytometric methodologies with special reference to precision and reference values. J.Immunolog.Methods, 97, 251-258.

30)KRISTENSEN,F., KRISTENSEN,B. & LAZARY,S.(1982a): The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. Dev.Anim.Vet.Sci., 9, 203-277.

31)KRISTENSEN,F., WALKER,C., KRISTENSEN,B., VANDEVELDE,M. & DeWECK,A.L. (1982b): Technical aspects of low ^{3}H-thymidine incorporation by mitogen stimulated canine peripheral blood lymphocytes in vitro. Vet.Immunol.Immunopathol., 3, 557-566.

32)LARSEN,H.J.(1979): A whole blood method for measuring mitogen-induced transformation of sheep lymphocytes. Res.Vet.Sci., 27, 334-338.

33)LIPARI,G. & SZABO,A.(1980): Effect of librational motion on fluorescence depolarization and nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules and membranes. Biophys.J., 30, 489-506.

34)LOOR,F.(1980): Plasma membrane and cell cortex interaction in lymphocyte functions. Adv.Immunol., 30, 1-120.

35)MACCECCHINI,M.L. & BURGER,M.M.(1977): Stimulation of lymphocytes by concanavalin A temperature-dependent effect of fatty acid replacements. Biochim.Biophys.Acta, 469, 33-44.

36)マラック, P., カプラー, J. (1986) : T細胞レセプター. サイエンス, 16, 110-121.

37)MASCOPLAT,C.C., CHEN,A.W., JHONSON,D.W. & ALHAJI,I.(1974): In vitro stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: Standardization and kinetics of the response. Am.J.Vet.Res., 35, 1557-1561.

38)MASUZAWA,Y., OSAWA,T., INOUE,K. & NOJIMA,S. (1973): Effects of various mitogens on the phospholipid metabolism of human peripheral lymphocytes. Biochim.Biophys.Acta, 326, 339-344.

39)McCONAHEY,P.J. & DIXON,F.J.(1966): A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. Int.Arch.Allergy, 29, 185-189.

40)MEDERANO,E., PIRAS,R. & MORDOH,J.(1974): Effect of colchicine, vinblastine and cytochalasin B on human lymphocyte trasformation by phytohemagglutinin. Exp.Cell Res., 86, 295-300.

41)NAGAHATA,H., NODA,H. & KUDO,T. (1982): Optimum density of the separating fluid for centrifugal separation of lymphocytes from bovine peripheral blood. Jpn.J.Vet.Res., 44, 957-960.

42)NAGAHATA,H., NODA,H. & ABE,T. (1986): Evaluation of bovine lympho-

cyte blastogenic response by fluorometric DNA synthesis assay. Jpn. J.Vet.Sci., 48, 23-28.

43)NELSON,G.J.(1967): Lipid composition of erythrocytes in various mammalian species. Biochim.Biophys.Acta, 144, 221-232.

44)西島安則 (1974) : 偏光および偏光解消. 蛍光測定の原理と生体系への応用(蛋白質核酸酵素, 14, 別冊), 92-105.

45)OI,V.T., GLAZER,A.N. & STRYER,L. (1982): Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analysis of cells and molecules. J.Cell Biol., 93, 981-986.

46)大沢利明 (1975) :mitogenによるリンパ球の活性化. 代謝, 12, 臨時増刊号 (免疫) , 583-591.

47)大沢利明 (1985) :レクチンと細胞生物学. 講談社サイエンティフィック、東京

48)大谷周造, 森沢成司 (1981) : リンパ球とCyclic Nucleotide. 臨床免疫, 13, 547-559.

49)PERLES,B., FLANAGAN,M.T., AUGER,J. & CRUMPTON,M.J.(1977): Mechanism of lymphocyte activation: the binding of phytohemagglutinin to the lymphocyte surface. Eur.J.Immunol., 7, 613-619.

50)PERRYMAN,L.E.(1979): Primary and secondary immune deficiencies of domestic animals. Adv.Vet.Sci.Comp.Med., 23, 23-52.

51)PREASANT,C.A. & KORNFELD,S.(1972): Characterization of the cell surface receptor for the Agaricus bisporus hemagglutinin. J.Biol. Chem., 247, 6937-6945.

52)斉藤政樹(1981):膜の生化学ーリンパ球膜の構造と機能ー. 臨床免疫、13, 520-533.

53)SCHNEBLI,H.P. & BACHI,T.(1975): Reaction of lectins with human erythrocytes I. Factors governing the agglutination reaction. Exp. Cell Res., 91, 175-183.

54)SEELIG,A. & SEELIG,J.(1974): The dynamic structure of fatty acyl-chains in a phospholipid bilayer measured by deuterium magnetic resonance. Biochem., 13, 4839-4845.

55)SERKE,S., SERKE,M. & BRUDLER,O.(1987): Lymphocyte activation by phytohaemagglutinin and pokeweed mitogen. Identification of proliferating cells by monoclonal antibodies. J.Immunolog.Methods, 99, 167-172.

56)STECK,T.L. & WALLACH,D.F.H.(1965): The binding of kidneybean phytohemagglutinin by Ehrlich ascites carcinoma. Biochem.Biophys.Acta, 97, 510-522.

57)TAJIMA,M., FUJINAGA,T., KOIKE,T., OKAMOTO,Y. & OTOMO,K.(1987):Assay for equine peripheral blood lymphocytes blastogenic response using ethidium bromide. Jpn.J.Vet.Sci., 49, 567-570.

58)TAJIMA,M., ARAISO,T., KOYAMA,T., FUJINAGA,T., OTOMO,K. & KOIKE,T. (1989a): Membrane viscosity of lymphocytes and effect of activation with phytohemagglutinin (PHA). Biorheology, 26, in press.

59)TAJIMA,M., ARAISO,T., KOYAMA,T., FUJINAGA,T., OTOMO,K. & KOIKE,T. (1989b): Membrane fluidity of equine, bovine and canine lymphocytes during stimulation with concanavalin A. Jpn.J.Vet.Sci., 51, in press.

60)TAJIMA,M., FUJINAGA,T., OKAMOTO,Y., OTOMO,K. & KOIKE,T.(1989c): The relationship between mitogen receptors in peripheral blood lympho-

cytes and blastogenic responses by mitogen. Res.Vet.Sci., in press.

61)TAJIMA,M., FUJINAGA,T., OTOMO,K. & KOIKE, T.(1989d): The inhibitory effects of colchicine, vinblastine and cytochalasin D on lymphocyte blastogenic responses. Jpn.J.Vet.Sci., 51, in press.

62)TARR,M.J., OLSEN,R.G., KRAKOWKA,S., OCKERELL,G.L. & GABEL,A.A. (1977): Erythrocyte rosette formation of equine peripheral blood lymphocytes. Am.J.Vet.Res., 38, 1775-1779.

63)TAYLOR,R.B., DUPPUS,W.P.H., RAFF,M.C. & PETRIS,S.(1971): Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. Nature new Biol., 233, 225-229.

64)THYBERG,J., MOSKALEWSKI,S. & FRIBERG,U. (1977): Effects of colchicine and vinblastine on the phytohemagglutinin-induced transformation of lymphocytes. J.Cell Sci., 27, 183-198.

65)利根川進 (1985) ：免疫系の分子群. サイエンス, 15, 96-105.

66)TOYOSHIMA,S. & OSAWA,T.(1975): Lectins from Wistaria floribunda seeds and their effect of membrane fluidity of human peripheral blood lymphocyte. J.Biol.Chem., 250, 1655-1660.

67)豊島聡、大沢利明 (1979) ：リンパ球の活性化と膜構造の変換. 臨床免疫, 11, 635-643.

68)WANG,J.L., CUNNINGHAM,B.A. & eDELMAN,G.M.(1971): Unusual fragments in the subunit structure of concanavalin A. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 68, 1130-1134.

69)WANG,J.L., GUNTHER,G.R. & EDELMAN,G.M.(1975): Inhibition by colchi-

cine of the mitogenic stimulation of lymphocytes prior to the S phase. J.Cell Biol., 66, 128-144.

70)YAHARA,I. & EDELMAN,G.M. (1973): Modulation of lymphocyte receptor redistribution by concanavalin A, anti-mitotic agents and alterations of pH. Nature, 236, 152-154.

71)矢原一郎 (1979) ：リンパ球活性化における微小管とミクロフィラメントの役割. 代謝, 16, (臨時増刊号, 免疫'79), 1893-1900.

72)YAHARA,I., HARADA,F., SEKITA,S., YOSHIHIRA,K. & NATORI,S. (1982): Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on action in vitro. J.Cell Biol., 92, 69-78.

73)矢野啓介, 盛政公明 (1981) ：マイトゲンおよび特異抗原誘発リンパ球芽球化反応. 臨床免疫, 13, 333-338.

VII. 謝　辞

本稿を終えるにあたり、論文作製および実験遂行上種々の御指導をいただきました北海道大学獣医学研究科家畜外科学講座の藤永徹助教授、大友勘十郎講師および酪農学園大学の小池壽男教授に深く感謝いたします。また、本論文の校閲をしていただき、有益な御助言をいただきました北海道大学獣医学研究科の菅野富夫教授および波岡茂郎教授、北海道大学応用電気研究所の小山富康教授に謝意を表します。

結合実験および幼若化能測定に際し、放射性同位元素取り扱い施設の使用を快く許可してくださいました北海道大学獣医学研究科獣医放射線生物学講座の佐藤文昭教授、ならびに実験遂行上種々の御助言を賜わりました桑原幹典助教授および遠藤大二助手、北海道大学獣医学研究科家畜薬理学講座の伊藤茂男助教授に深謝いたします。

膜流動性の測定に際し、種々の御指導と御助言を賜わりました北海道大学応用電気研究所生理部門の荒磯恒久助教授および金城政孝助手、北海道大学薬学部薬品物理化学講座の加茂直樹助教授に深謝いたします。

最後に、甚大なる協力を惜しまれなかった北海道大学獣医学部家畜外科学講座の教室員各位に感謝いたします。

STUDIES ON THE DIFFERENT RESPONSIVENESSES OF LYMPHOCYTES TO MITOGENS IN EQUINE, BOVINE AND CANINE PERIPHERAL BLOOD

Motoshi TAJIMA

Department of Veterinary Surgery,
Faculty of Veterinary Medicine,
Hokkaido University,
Sapporo 060, Japan.

The blastogenic response of peripheral blood lymphocytes (PBL) provides a reliable index of the immunological potency of PBL in vitro. This method has recently been introduced in veterinary clinical examination. Phytohemagglutinin P (PHA) and concanavalin A (ConA) are mitogens generally available for blastogenic response. But PBL separated from healthy animals have different responsivenesses to mitogens, and there are a species difference in the conditions for the blastogenic response. In this thesis, therefore, the first stage of the mechanism of blastogenic response and the different responsivenesses to mitogens of equine, bovine and canine PBL were investigated.

1. Equine, bovine and canine PBL have their own optimum concentrations of mitogens for inducing maximum blastogenic activity. The relation between optimum mitogen concentration and the

binding sites of PHA or ConA on the surface of each PBL were estimated.

1) PHA and ConA stimulated T lymphocytes to induce blastogenic responses specifically in equine, bovine and canine PBL.

2) The numbers of PHA binding sites on equine, bovine and canine PBL were 4.2×10^{11}, 12.8×10^{11} and 14.0×10^{11} per 1×10^{5} PBL, respectively. Those of ConA were 23.9×10^{11}, 9.4×10^{11} and 12.1×10^{11} per 1×10^{5} PBL, respectively. These differences corresponded to each optimum concentration of mitogens.

3) The ConA binding rates for inducing maximum blastogenic activity corresponded to the optimum concentration of ConA for each PBL. When PHA was used, no correlation was recognized between the binding rates and the optimum concentration of PHA for each PBL.

4) The numbers of PHA or ConA binding sites to induce the maximum blastogenic activity were larger in preparations of PBL having higher optimum concentrations of PHA or ConA.

5) Numbers of ConA binding sites on the surfaces of equine and canine B lymphocytes were larger than those on bovine B lymphocytes. Almost no PHA binding sites were detected on the surfaces of B lymphocytes from these three animals.

These results indicate that the difference in optimum concentrations of PHA or ConA to induce blastogenic responses in equine, bovine and canine PBL depends on the difference of occupied binding sites inducing the maximum blastogenic activity.

2. There is a possibility that, at the first stage of PBL blastogenic response, the membrane fluidity of PBL changes by stimulation with mitogens. The difference in responsivenesses to mitogens for each PBL blastogenic response was thus examined in relation to the degree of fluidization in the PBL membrane after stimulation with the mitogen.

   1) The membrane fluidities of equine, bovine and canine PBL after stimulation by PHA or ConA were estimated using a fluorescence depolarization assay with 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene. No changes of membrane fluidity were detected in any PBL after stimulation with PHA or ConA compared with unstimulated PBL.

   2) The membrane fluidities of PBL in three animals after stimulation by PHA or ConA were further analyzed using an electron spin resonance technique after treatment with 5-doxyl stearic acid. The results obtained by this method were almost the same as those obtained by a fluorescence depolarization assay.

   These results indicate that at the first stage of PBL blastogenic response, no membrane fluidization was recognized after stimulation with PHA or ConA. Therefore, the membrane fluidization may not be responsible for the difference in blastogenic response to PHA or ConA in equine, bovine and canine PBL.

3. After the binding of PHA or ConA to its binding sites, they

are redistributed and form patches and caps. These formations are necessary to transmit signals for the activation of cell functions, such as proliferation and differentiation. Cytomusculature such as microtubules and microfilaments plays an important role in the formation of patches and caps. It is conceivable that the different responsiveness to mitogen in each animal's PBL depends on the degree of the connection of cytomusculature to the mitogen binding sites. The contribution of cytomusculature to blastogenic response was thus examined in equine, bovine and canine PBL.

1) Colchicine and vinblastine were used as inhibitors of polymerization in microtubules, and those concentrations in 50% blastogenic recovery were estimated as an index of the inhibitors. The values were higher in bovine PBL than those in equine and canine PBL.

2) Cytochalasin D was used as an inhibitor of polymerization in microfilaments, and the concentration in 50% blastogenic recovery was estimated as an index of the inhibitor. There was no significant difference in each PBL blastogenic response.

These results suggeste that in equine and canine PBL microtubules may play an important role in the blastogenic response, and that microfilaments made only a small contribution to the blastogenic responses of PBL in these three animal species. It is concluded that contribution of microtubules to the res-

ponsivenesses to PHA or ConA in equine and canine PBL is more important than that in bovine PBL.

In summary, the present studies elucidated (1) that equine, bovine and canine PBL have their own optimum concentrations of mitogens in PBL blastogenic responses, (2)that they have different numbers of mitogen binding sites for inducing maximum blastogenic activities and the distribution of these binding sites is different on each PBL, and (3)that the microtubules contribute to the difference in responsivenesses of PBL to mitogens in the three animal species in the first stage of the transmission of mitogenic signals.