

## 5・6 先天性代謝異常患者由来のリンパ球の株化と長期培養

熊本大学医学部

松田 一郎

ヒトリンパ球に Epstein-Barr Virus (EBV) を試験管内で感染させると、リンパ球は(中でも B cell) transform し、次々と増殖を重ね、その培養株を樹立することが出来る。この方法を使い、主として米国で、先天性代謝異常症の患者のリンパ球の細胞株が樹立され、それを使用してこの研究が報告されるようになって来た。この方法の利点は(1)標体の採取が容易である。(2)長期間の継代培養が可能である。(皮膚線維芽細胞では一般に20代以上は無理と思われる。)(3)増殖が早く、必要な細胞数を得るのに、日数が短縮出来る。(4)Dimethyl sulfoxide を入れて-70℃に生きたまま保存出来、そこからまた増殖させることが出来る。

この結果各種先天性代謝異常株のバンク化も可能である。また外国との細胞株の交換なども可能である。(5)軟寒天中で細胞を培養し1個のリンパ球から増殖させ、クローニングすることも可能である。以下我々は正常及び数種の先天性代謝異常患者由来リンパ球を株化し、少く検討を加えたので報告する。

### 研 究 方 法

#### (1) 株の樹立,

まず患者の末梢ヘパリン血, 10 ml を採取し, Ficoll-Conray を使用して, リンパ球を分離した。細胞を培地 (RPMI, 1640+20%FCS) に  $10^6/ml$  になるように浮遊させた。この 90.8 ml に, EBV (B578:7-7) の浮遊液を 0.2 ml を加えて, 感染させた。培地の  $1/2$  を 3~4 日毎に交換し, 株の樹立を行った。平均 4 週間で可能であった。

#### (2) lysosomal enzyme の測定

これら樹立した株について, 4 methyl-umberfeayl substrate を用いて,  $\alpha$ -L-fucosidase, N-acetyl- $\beta$ -hesosaminidase,  $\beta$ -glucro-  
idase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase, mannosidase などを測

定した。(Matsud I. et al., Humangenetics 30, 69, 1975)

(3) fucosidosis 患者由来の培養リンパ球株について

fucosidase 活性が0であることを確かめたいので、 $^3\text{H}$ -fucose の取り込みをみた。 $^3\text{H}$ -fucose (New England Nuclear) を  $50 \mu\text{ci}/\text{ml}$  の割合に培養液中加入し、6, 12, 24, 72時間後にそれぞれ細胞を洗い freez and thaw を3回行ない、 $10.000 \mu\text{g}$  を遠沈し、その上清に5倍容の ethanol を加え ethanol soluble と ethanol insoluble の分画に分けて count した。

### 研 究 結 果

(1) 正常人から株化して得たリンパ球についての growth curve は図Iの如くで、1日目2日目の増殖は logarithmic であり、3日目はまだ cell growth は認められたが、その growth rate はやや低下する傾向を示した。4日目はほぼ maximum であり、以後細胞の増殖はみられなかった。通常は3日目で sub culture した。

(2) lysosomal enzyme の活性をみると、fucosidase, hexosaminidase は細胞増殖を伴って活性上昇を示した。一方  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase はほとんど変化がなかった。 $\beta$ -glucuronidase は1日目軽度に減少したが後はほぼ一定の値を示した。

mannosidase は細胞増殖時にはほとんど変化を認めなかったが3日目から活性値が徐々に低下した。(図2)

(3)  $^3\text{H}$ -fucose の取り込みの結果は、ethanol soluble 分画では、fucosidosis 患者由来のリンパ球が、ethanol insoluble 分画では正常人由来のリンパ球がそれぞれ高値を示した。

### 結 語

リンパ球の株化と、保存は今後疾患の診断や治療法の検討など実際面に役立つ他に、遺伝生化学的研究にも大いに利用出来るものと思われる。

図1 培養リンパ球の growth curve

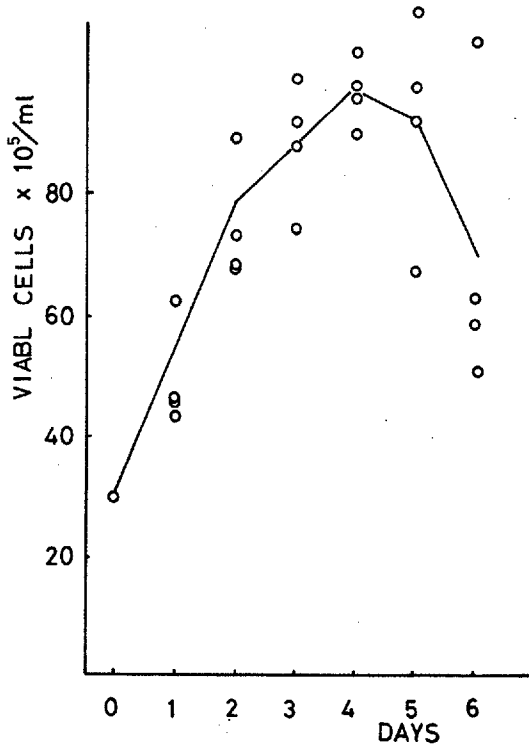
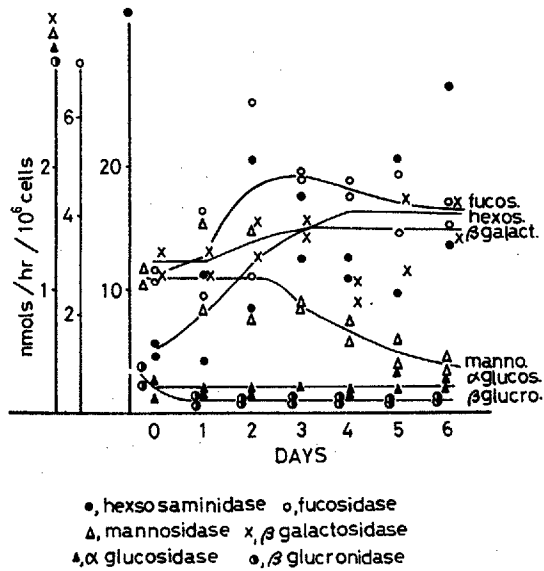
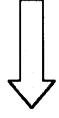


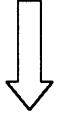
図2 培養リンパ球の lysosomal enzyme





## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



ヒトリンパ球に Epstein-Barr Virus(EBV)を試験管内で感染させると、リンパ球は(中でも B cell)transform し、次々と増殖を重ね、その培養株を樹立することが出来る。この方法を使い、主として米国で、先天性代謝異常症の患者のリンパ球の細胞株が樹立され、それを使用してこの研究が報告されるようになって来た。この方法の利点は(1)標体の採取が容易である。