

HUMAN LYMPHOCYTE MITOGENIC FACTOR EXTRACTED FROM
ASCARIS SUUM

Ascaris suum から抽出されたヒトリンパ球
細胞分裂促進因子

SUMIKO SASAGAWA, Ph.D. 笹川澄子

KAZUO SUZUKI, Ph.D. 鈴木和男

TOSHIO FUJIKURA, M.D. 藤倉敏夫



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION

財団法人 放射線影響研究所

A Cooperative Japan - United States Research Organization

日米共同研究機関

ACKNOWLEDGMENT

謝 辞

The authors would like to gratefully acknowledge Dr. Roswell K. Boutwell, Chief of Research, for his encouragement and criticisms on the manuscript. The authors would like to express the deepest appreciation to Dr. Bernard Pirofsky, Professor of Medicine and Microbiology, Chief, Division of Immunology, Allergy and Rheumatology, Oregon Health Sciences University, for his suggestions on this study. Also, the authors would like to express the appreciation to Dr. Anthony V. Pisciotto, former Vice-Chairman of RERF, for his suggestions on the experiments.

本論文に対し激励と批判をいただいた研究担当事 Roswell K. Boutwell 博士に謝意を表す。本研究に対し提言をいただいた Oregon 保健科学大学免疫・アレルギー・リウマチ学部門部長兼内科学・微生物学教授 Bernard Pirofsky 博士に対し深く感謝の意を表す。また、諸実験に対し提言をいただいた放影研元副理事長 Anthony V. Pisciotto 博士に感謝する。

A paper based on this report was accepted for publication by:

本報告に基づく論文は下記の雑誌に受理された。

Experimental Parasitology

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放影研業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is not intended to supplant regular journal publication.

放影研業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は通例の誌上発表論文に代わるものではない。

The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.

放射線影響研究所（元ABCC）は、昭和50年4月1日に公益法人として発足したもので、その経費は日米両政府の平等分担により、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって運営されている。

HUMAN LYMPHOCYTE MITOGENIC FACTOR EXTRACTED FROM *ASCARIS SUUM*

Ascaris suum から抽出されたヒトリンパ球
細胞分裂促進因子

SUMIKO SASAGAWA, Ph.D. (笹川澄子); KAZUO SUZUKI, Ph.D. (鈴木和男);
TOSHIO FUJIKURA, M.D. (藤倉敏夫)

Department of Radiobiology

放射線生物学部

SUMMARY

Ascaris suum extract (ASE) was found to contain a mitogenic factor which stimulates human lymphocytes. ASE (100 μ g protein/ml) induced an increase in [3 H]-thymidine incorporation into human lymphocytes, at a level similar to that obtained with pokeweed mitogen (11 μ g/ml). Stimulation of mitosis appeared to be more effective with T lymphocytes than non-T lymphocytes. The mitogenic activity of ASE was reduced only by 27% when treated at 56°C for 30 minutes or when immersed into boiling water for one minute. ASE was fractionated into four protein peaks by Sephacryl S-200 column chromatography. Lymphocyte mitogenic activity was observed in the first half of the first protein peak. Allergic activity assessed by the passive cutaneous anaphylaxis test in rats was observed in the latter half of the same peak. These results suggest that ASE contains both an allergen and a mitogenic substance.

INTRODUCTION

Parasites and culture fluids of their larvae have been shown to contain various biologically active substances. There are allergenic substances which stimulate IgE production,¹⁻⁴ stimulate or suppress lymphocyte functions,^{5,6} and interact with granulocytes.⁷⁻¹⁰ These activities are considered to be linked synergistically with the initiation of immunologic cellular response during parasitic infections. Extract produced from *Ascaris suum*, a nematode parasite, induces allergic bronchial asthma and systemic anaphylaxis in dogs.^{11,12} The culture fluid of *Ascaris suum* larvae stimulates a specific blastogenic

要 約

Ascaris suum 抽出液 (ASE) はヒトリンパ球を刺激する細胞分裂促進因子を含むことが見いだされた。ASE (100 μ g protein/ml) はヒトリンパ球の [3 H] チミジン取り込みの増加を誘発した。それはポークウィードマイトジェン (11 μ g/ml) の細胞分裂促進作用に匹敵し、また非Tリンパ球よりTリンパ球に対してより効果的であるように思われた。ASEの細胞分裂促進活性は、56°Cで30分処理あるいは沸騰水中で1分処理を行ったとき27%の活性低下を示したにすぎなかった。ASEはSephacryl S-200カラムクロマトグラフィーによって四つの蛋白質ピークに分けられた。リンパ球細胞分裂促進活性は最初の蛋白質ピークの前半部分に観察された。ラット受動皮膚アナフィラキシー試験によって評価されたアレルギー活性は同一ピークの後半部分に観察された。これらの結果は、ASEがアレルギーと細胞分裂促進物質の両方を含むことを示唆する。

緒 言

寄生虫及びその幼虫の培養液は、種々の生物学的活性物質を含むことが証明されている。IgE産生を刺激し、¹⁻⁴ リンパ球機能を刺激あるいは抑制し、^{5,6} また顆粒球と相互作用する⁷⁻¹⁰ アレルゲンがある。これらの活性は、寄生虫感染時に免疫学的細胞反応の開始と協同的に関連していると考えられている。線虫の *Ascaris suum* から作られた抽出液はイスにアレルギー性気管支喘息及び全身性アナフィラキシーを誘発する。^{11,12} *Ascaris suum* 幼虫の培養液は、*Ascaris suum* に感染したブタから得られたリンパ球

response in lymphocytes obtained from *Ascaris suum*-infected swine.¹³ ASE contains eosinophil and neutrophil chemotactic factors,¹⁰ and inhibits human blood clotting.¹⁴

The current study reports that ASE contains a mitogenic factor affecting human lymphocytes in addition to allergenic properties.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of ASE. *Ascaris suum* obtained from a slaughterhouse were thoroughly washed in physiological saline and distilled water and then lyophilized. The dried worms were minced and homogenized in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The homogenate was stirred for 24 hours and centrifuged at 12,000 ×g for 30 minutes at 4°C. The supernatant was used as ASE. The protein concentration in the extract was determined by Lowry's method.¹⁵

Lymphocyte separation and fractionation.

Lymphocytes were separated from peripheral blood of healthy donors, according to Böyum's method,¹⁶ using Ficoll-metrizoate (Lymphoprep, Nyegaard and Co., Oslo). The cells were suspended in RPMI-1640 supplemented with 20% autologous plasma and 1 mM glutamine. T and non-T lymphocytes were fractionated by the method of Sakane and Green.¹⁷ Monocyte-depleted lymphocytes were suspended in Hanks balanced salt solution (HBSS). The suspension and neuraminidase-treated sheep red blood cells (SRBC) suspended in fetal bovine serum were mixed. The lymphocyte-SRBC suspension was incubated on ice for one hour, and then harvested and layered onto Lymphoprep. After centrifugation at 350 ×g for 30 minutes at 4°C, the pellet fraction and unrosetted cells at the interface were collected separately. To remove SRBC from T lymphocytes, pellet cells from the Lymphoprep gradients were mixed for several seconds in one volume of HBSS and two volumes of distilled water. Separated T and non-T lymphocytes were washed three times in HBSS and suspended in RPMI-1640 supplemented with 20% autologous plasma and 1 mM glutamine.

Lymphocyte culture. Cells were added to microtiter wells (round-bottom type, NUNC) in 200 μl volumes containing 2×10^5 lymphocytes in the presence of either 7.6 μg/ml phytohemagglutinin (PHA, Wellcome Res. Lab), 11 μg/ml pokeweed

で特異的な幼若化反応を刺激する.¹³ ASE は好酸球及び好中球の走化性因子を含み,¹⁰ またヒト血液の凝固を阻害する.¹⁴

本研究では、ASE がアレルゲン特性のほかに、ヒトリンパ球に作用する細胞分裂促進因子を含んでいることを報告する。

材料及び方法

ASE の調製. 屠殺場から得た *Ascaris suum* を生理食塩水及び蒸留水で十分に洗浄した後、凍結乾燥した。乾燥した *Ascaris suum* を破碎し、Dulbecco の磷酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) 中でホモジェナイズした。このホモジェネートを24時間攪拌した後、12,000×g、4°C で30分間遠心分離した。上清をASEとして用いた。抽出液の蛋白質濃度はLowry法¹⁵で測定した。

リンパ球分離及び分画. リンパ球はBöyum法¹⁶に従いFicoll-metrizoate (Lymphoprep, Nyegaard and Co, Oslo) を用いて健康な供血者の末梢血から分離した。20%自己血漿及び1mM グルタミンを含むRPMI-1640中に細胞を浮遊させた。Sakane とGreenの方法¹⁷によりTリンパ球と非Tリンパ球を分画した。単球除去リンパ球はHanks平衡塩類溶液(HBSS)中に浮遊させた。この浮遊液と牛胎児血清中に浮遊させたノイラミニダーゼ処理ヒツジ赤血球(SRBC)を混合した。リンパ球-SRBC浮遊液を氷上で1時間放置した後採取し、Lymphoprep上に重層した。350×g、4°Cで30分間遠心分離した後、ペレット分画と界面の非ロゼット形成細胞をそれぞれ収集した。Tリンパ球からSRBCを除去するために、Lymphoprep勾配のペレット細胞をHBSSと蒸留水が1対2の溶液中で数秒間混合した。分離したTリンパ球と非Tリンパ球をHBSSで3回洗浄し、20%自己血漿及び1mM グルタミンを含むRPMI-1640中に浮遊させた。

リンパ球培養. 細胞は7.6μg/ml フィトヘマグルチニン(PHA, Wellcome Res. Lab), 11μg/ml ポークウィードマイトジェン(PWM, GIBCO), 種々の濃度のASE, あるいはPBS 10μl の存在下で、 2×10^5 個

mitogen (PWM, GIBCO), varying concentrations of ASE, or PBS 10 μ l. The cultures were made in triplicate and incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator for two to eight days.

Measurement of [³H]-thymidine incorporation. An index of DNA synthesis of lymphocytes was determined by the incorporation of [³H]-thymidine, according to the method of Kolberg and Sletten.¹⁸ The lymphocytes were pulsed with 1 μ Ci of [³H]-thymidine/well (5 Ci/mmol, The Radiochemical Center, Amersham, England) for 17 hours, then were washed and harvested onto a glass fiber filter. The relationship between the time of exposure and incorporation of radioisotope was examined and 17 hours of exposure was found to be optimal. Radioactivity incorporated into the cells was measured with a liquid scintillation counter (LCS-671, Aloka).

Column chromatography. Five milliliters of ASE (2 mg protein/ml) was applied to a Sephacryl S-200 column (2.5 \times 77 cm) equilibrated with PBS and eluted by the same buffer. The eluate was collected in 7-ml fractions at a flow rate of 53.4 ml/hr. The protein concentration in each fraction was determined by absorbance at 280 nm. The molecular weight was calibrated with the aid of marker proteins, cytochrome c, chymotrypsinogen A, egg albumin, and bovine serum albumin (Boehringer Mannheim).

Homologous passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test. This test was conducted according to the method of Strejan and Campbell³ to detect IgE antibody responsible for immediate-type antigen-antibody reactions. Male Sprague-Dawley rats weighing 200-250 g were immunized subcutaneously with 1 mg protein of ASE and intraperitoneally with 3×10^{10} *Bordetella pertussis*. Booster immunization was given subcutaneously with 0.1 mg protein of ASE seven days later. Anti-ASE serum was obtained 14 days after the first immunization. The challenge was given 24 hours after the sensitization of the rat back skin by the diluted anti-ASE serum. Each test solution of 0.1 ml was injected intradermally on the sensitized skin site and 1 ml of 0.5% Evans blue solution was injected intravenously. One hour after the challenge, assessment of this test was made by measuring the Evans blue leakage, and was expressed as units of square millimeter. The area was determined by multiplying the

のリンパ球を含む 200 μ l の量でマイクロタイター ウェル (丸底型, NUNC) に入れた. 培養は 3 重で行い, 5% CO₂ 恒温器中で 37°C, 2~8 日間インキュベートした.

[³H]チミジン取り込みの測定. リンパ球の DNA 合成の指標は Kolberg と Sletten の方法¹⁸ に従って [³H]チミジンの取り込みにより決定した. リンパ球を 1 ウェル当たり 1 μ Ci の [³H]チミジン (5 Ci/mmol, The Radiochemical Centre, Amersham, 英国) で 17 時間パルス標識した後, 洗浄しグラスファイバーフィルター上に採取した. 被曝時間と放射性同位元素取り込みの関係を調べたところ, 17 時間被曝が最適であった. 細胞への放射能取り込みは液体シンチレーション計数器 (LCS-671, Aloka) で測定した.

カラムクロマトグラフィー. 5 ml の ASE (2 mg protein/ml) を PBS で平衡化した Sephacryl S-200 カラム (2.5 \times 77 cm) に乗せ, 同じ緩衝液で溶出した. 溶出液は流速 53.4 ml/hr で 7 ml ずつ収集した. 各分画の蛋白質濃度は 280 nm における吸光度で測定した. チトクロム c, キモトリプシノーゲン A, 卵白アルブミン及び牛血清アルブミン (Boehringer Mannheim) のマーカー蛋白質を用いて分子量を検定した.

同種受動皮膚アナフィラキシー (PCA) 試験. 即時型抗原抗体反応を引き起こす IgE 抗体を検出するため, Strejan と Campbell の方法³ に従って本試験を行った. 体重 200~250 g の雄 Sprague-Dawley ラットに ASE 1 mg protein で皮下免疫及び 3×10^{10} 個の *Bordetella pertussis* で腹腔内免疫を行った. 7 日後 ASE 0.1 mg protein で皮下に追加免疫を行った. 最初の免疫から 14 日後に抗 ASE 血清を得た. 希釈した抗 ASE 血清でラット背部皮膚を感作した後 24 時間で抗原を投与した. 感作部位に 0.1 ml の各試験溶液を皮内に注射し, 0.5% Evans 青溶液を静脈内に注射した. 抗原投与 1 時間後, Evans 青の漏出を測定し mm² 単位で表示した. 青染部分の

longitudinal diameter (mm) by the horizontal diameter (mm) of the blueing round.

RESULTS

Lymphocyte stimulations by ASE, PHA, and PWM. Table 1 shows the [^3H]-thymidine incorporation induced by the exposure of lymphocytes to 100 μg protein/ml of ASE, 7.6 μg /ml of PHA, and 11 μg /ml of PWM. PHA and PWM were used as standard mitogens to determine the effect of ASE and a mode of ASE action, since PHA acts on T lymphocytes (the effect is observed on the second day of this culture system), and PWM acts on both B and T lymphocytes (on the fifth day). The effect of ASE was compared with those of PHA and PWM both in two- and five-day cultures. ASE stimulation, in the two-day culture, was very weak compared with other two mitogens of PHA and PWM, although it was stronger than the PBS-added control group. ASE had a marked stimulatory effect which is equivalent to that of PWM in the five-day culture.

縦直径 (mm) に横直径 (mm) を乗じて面積を測定した。

結 果

ASE, PHA 及び PWM によるリンパ球刺激. 表 1 は 100 μg protein/ml の ASE, 7.6 μg /ml の PHA 及び 11 μg /ml の PWM により誘発されるリンパ球の [^3H] チミジン取り込みを示す. PHA と PWM は, ASE の効果と作用様式を測定するための標準マイトジェンとして用いられた. その理由は PHA は T リンパ球に作用し (この培養システムでは 2 日目に効果が観察される), PWM は B リンパ球と T リンパ球の両方に作用する (5 日目に効果が観察される) からである. ASE の効果は 2 日間培養及び 5 日間培養の両方で PHA 及び PWM の効果と比較した. 2 日間培養で ASE による刺激は PBS 添加対照群よりも強かったが, PHA と PWM の二つの分裂促進剤と比較すると極めて弱かった. ASE は 5 日間培養では, PWM の刺激効果に相当する著明な刺激効果を示した.

TABLE 1 LYMPHOCYTE STIMULATIONS BY PHA, PWM, AND ASE

表 1 PHA, PWM 及び ASE によるリンパ球刺激

Mitogens	[^3H]-Thymidine incorporation cpm/ 2×10^5 cells	
	Two-day culture	Five-day culture
PBS 10 μl	584 \pm 183	2382 \pm 1070
PHA 7.6 μg /ml	110906 \pm 34489	56527 \pm 2249
PWM 11 μg /ml	39796 \pm 12171	92693 \pm 10070
ASE 100 μg protein/ml	1994 \pm 731	79324 \pm 10331

Lymphocytes (2×10^5 cells/well) were incubated with PHA, PWM, and ASE in a 37°C, 5% CO₂ incubator for two and five days. Culture was made in triplicate for each experiment and pulsed with 1 μCi of [^3H]-thymidine 17 hours prior to harvest. The data represent the mean \pm SE of five experiments.

リンパ球 (2×10^5 cells/well) は 37°C, 5% CO₂ 恒温器の中で PHA, PWM 及び ASE とともに 2 日間及び 5 日間インキュベートした. 培養は各実験につき 3 重で行い, 細胞採取 17 時間前に [^3H] チミジン 1 μCi でパルス標識した. データは 5 回の実験の平均 \pm 標準誤差を表す.

Time-course of lymphocyte stimulation of ASE. Lymphocyte stimulation by ASE was observed over the culture period of two to eight days. [^3H]-Thymidine incorporation induced by ASE increased with culture time, showing a peak in the five-day culture and decrease in the seven-day culture. The stimulation effect of PWM decreased

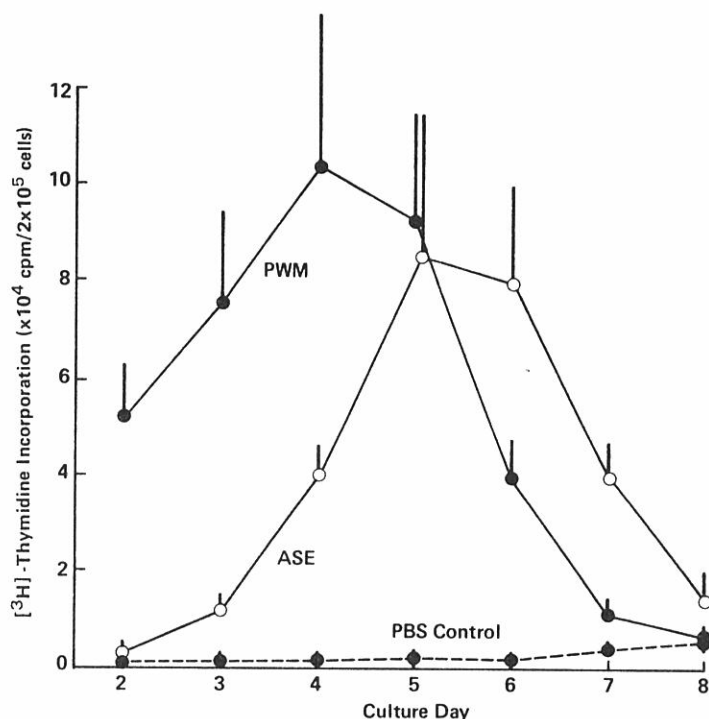
ASE のリンパ球刺激の時間的経過. ASE によるリンパ球刺激を 2~8 日間の培養期間中観察した. ASE 誘発 [^3H] チミジン取り込みは培養時間の経過とともに増加し, 培養 5 日目でピークに達した. そして 7 日目で減少に転じた. PWM の刺激効果は,

immediately after a maximum increase in [^3H]-thymidine incorporation in the four-day culture (Figure 1). ASE seemed to develop its effect slowly.

培養4日目に [^3H] チミジン取り込みが最大になり、その後低下した(図1). ASE は緩徐に効果を発現するよう思われた.

FIGURE 1 TIME COURSE OF LYMPHOCYTE STIMULATION BY ASE

図1 ASEによるリンパ球刺激の時間的経過



Lymphocytes (2×10^5 cells/well) were incubated for each culture time with ASE 100 μg protein/ml, and PWM 11 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The culture was made in triplicate for each person and pulsed with 1 μCi of [^3H]-thymidine 17 hours prior to harvest. Each point represents the mean \pm SE of four experiments.

リンパ球 (2×10^5 cells/well) は ASE 100 μg protein/ml 及び PWM 11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とともに各培養時間インキュベートした。培養は各被検者につき3重で行い、細胞採取17時間前に [^3H] チミジン 1 μCi でバルス標識した。各点は4回の実験の平均 \pm 標準誤差を表す。

Correlation between ASE concentration and lymphocyte stimulation. To determine whether the response of lymphocytes is induced by the mitogenic effect of ASE on the cells, this experiment was done. In concentrations ranging from 12.5 to 100 μg protein/ml, ASE was tested for the lymphocyte stimulating effect in the five-day culture. As shown in Table 2, ASE induced a concentration-dependent increase in [^3H]-thymidine incorporation.

ASE 濃度とリンパ球刺激との相関。リンパ球の反応がそのリンパ球に対する ASE の細胞分裂促進効果によって誘発されるのかどうかを調べるために、本実験を行った。ASE は 12.5~100 μg protein/ml の濃度で、5日間培養のリンパ球刺激効果について検討した。表2に示すように、ASE は濃度依存的な [^3H] チミジン取り込み増加を誘発した。

TABLE 2 CORRELATION BETWEEN ASE CONCENTRATION AND LYMPHOCYTE STIMULATION

表 2 ASE 濃度とリンパ球刺激の間の相関

Concentration $\mu\text{g protein/ml}$	$[^3\text{H}]$ -Thymidine incorporation $\text{cpm}/2 \times 10^5 \text{ cells}$
0	2847 \pm 804
12.5	37418 \pm 16955
25	57144 \pm 14690
50	69145 \pm 14463
100	85506 \pm 18350

Lymphocytes (2×10^5 cells/well) were incubated with each concentration of ASE. Culture was made in triplicate for each experiment, incubated for five days, and pulsed with $1 \mu\text{Ci}$ of $[^3\text{H}]$ -thymidine 17 hours prior to harvest. The data represent the mean \pm SE of five experiments.

リンパ球 (2×10^5 cells/well) は各濃度の ASE とともにインキュベートした。培養は各実験につき 3 重で行い、5 日間インキュベートし、細胞採取 17 時間前に $[^3\text{H}]$ チミジン $1 \mu\text{Ci}$ でパルス標識した。データは 5 回の実験の平均 \pm 標準誤差を表す。

Selectivity of ASE lymphocyte stimulation for T and non-T lymphocytes. In the cell preparations containing both T and non-T lymphocytes, ASE produced an effect equivalent to that of PWM in the five-day culture (Table 1). Selectivity of ASE effect on T and non-T lymphocytes was then determined. Table 3 shows that lymphocyte-stimulating activity of ASE was more dominant with T lymphocytes than non-T lymphocytes in the five-day culture, while no selectivity was observed in the two-day culture.

Heat-stability of ASE. ASE was adjusted to 2 mg/ml in protein concentration and stored at -20°C , 4°C for seven days, 20°C for two days, 56°C for 30 minutes, or in boiling water for one minute. Each ASE sample at a concentration of $100 \mu\text{g protein/ml}$ was added to lymphocytes. Lymphocytes, stimulated with ASE samples preserved at 20°C , 56°C , and in boiling water, incorporated 10%-27% less $[^3\text{H}]$ -thymidine than those stimulated with -20°C ASE samples. The 4°C ASE sample had the same stimulatory effect as the one kept at -20°C .

T リンパ球及び非 T リンパ球に対する ASE リンパ球刺激の選択性。T リンパ球と非 T リンパ球の両方を含む細胞標本では、ASE は 5 日間培養で PWM の効果と同等の効果を示した (表 1)。そこで T リンパ球と非 T リンパ球に対する ASE 効果の選択性を検討した。表 3 は、ASE のリンパ球刺激活性が 5 日間培養では非 T リンパ球より T リンパ球に対して優勢的であり、一方、2 日間培養ではなんら選択性が観察されなかったことを示す。

ASE の熱安定性。 ASE を蛋白質濃度 2 mg/ml に調整し、 -20°C 、 4°C で 7 日間、 20°C で 2 日間、 56°C で 30 分間、あるいは沸騰水中で 1 分間放置の処理をした。100 $\mu\text{g protein/ml}$ の濃度の各 ASE 標本をリンパ球に添加した。 20°C 、 56°C 及び沸騰水中処理の ASE で刺激されたリンパ球は、 -20°C 処理の ASE で刺激されたリンパ球より $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みが 10%~27% 少なかった。 4°C 処理 ASE は、 -20°C で保存された ASE と同程度の刺激効果を有していた。

TABLE 3 SELECTIVITY OF MITOGENIC EFFECT OF ASE
ON T AND NON-T LYMPHOCYTES表3 Tリンパ球及び非Tリンパ球に対する
ASEの細胞分裂促進効果の選択性

Mitogens	[³ H]-Thymidine incorporation cpm/2 × 10 ⁵ cells	
	Two-day culture	Five-day culture
PBS 10μl		
T	853 ± 349	1448 ± 243
Non-T	984 ± 346	1527 ± 270
PHA 7.6 μg/ml		
T	62951 ± 16605	102957 ± 32515
Non-T	15511 ± 7133	68413 ± 12745
PWM 11 μg/ml		
T	14887 ± 3318	12130 ± 2602
Non-T	9123 ± 2601	57627 ± 7520
ASE 100 μg protein/ml		
T	2912 ± 1464	47909 ± 21581
Non-T	2859 ± 715	19078 ± 9547

T: T lymphocytes; Non-T: non-T lymphocytes

T: Tリンパ球; non-T: 非Tリンパ球

Lymphocyte preparations (2 × 10⁵ cells/well) were incubated with PHA, PWM, and ASE for two and five days. Culture was made in triplicate for each experiment and pulsed with 1 μCi of [³H]-thymidine 17 hours prior to harvest. The data represent the mean ± SE of three experiments.

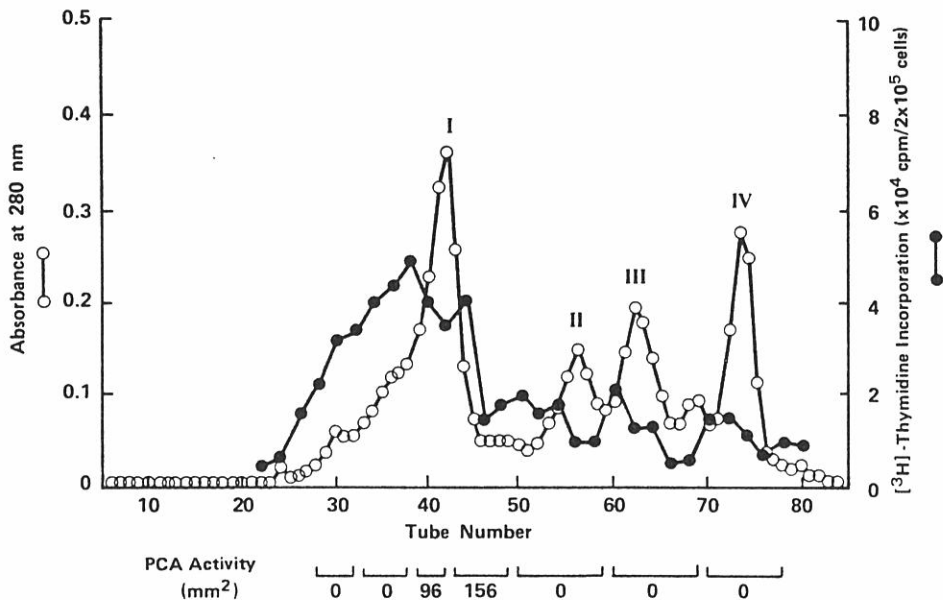
リンパ球標本(2 × 10⁵ cells/well)はPHA, PWM及びASEとともに2日間及び5日間インキュベートした。培養は各実験につき三重で行い、細胞採取17時間前に[³H]チミジン1 μCiでパルス標識した。データは3回の実験の平均±標準誤差を表す。

Column chromatography of ASE. ASE was separated into four protein fractions by Sephacryl S-200 column chromatography (Figure 2). The fractions were designated as Peaks I, II, III, and IV in the order of their elution from the column. In the first half of Peak I, lymphocyte-stimulating activity was especially evident (fraction numbers 28-40). The other three peaks showed little activity. In the rat PCA test, the latter half of Peak I induced a positive reaction (Figure 2). No PCA-inducing activity was observed in the first half of Peak I nor in Peaks II, III, or IV. By calibrating molecular weight, Peak I was found between bovine serum albumin (MW 68,000) and cytochrome c (MW 12,500). Molecular weights of other peaks were less than 10,000.

ASEのカラムクロマトグラフィー。ASEはSephacryl S-200カラムクロマトグラフィーにより四つの蛋白質ピークに分けられた(図2)。各分画はカラムからの溶出の順にピークI, II, III及びIVと呼称された。リンパ球刺激活性はピークIの前半部分で特に著明であった(分画番号28-40)。その他の三つのピークは活性をほとんど示さなかった。ラットのPCA試験で、ピークIの後半部分は陽性反応を示した(図2)。ピークIの前半部分、ピークII, III及びIVではPCA誘発活性は全く観察されなかった。分子量検定により、牛血清アルブミン(MW 68,000)とチトクロムc(MW 12,500)の間にピークIが観察された。その他のピークの分子量は10,000以下であった。

FIGURE 2 GEL FILTRATION OF ASE ON SEPHACRYL S-200

図2 ASEのSephacryl S-200によるゲル濾過



Five milliliters of ASE (2 mg protein/ml) was applied to a column (2.5 × 77 cm) equilibrated with PBS. Elution was carried out with PBS. Fractions of 7 ml were collected. Bovine serum albumin, egg albumin, and cytochrome c were eluted at tube numbers 29, 33, and 42, respectively. The 10 μ l aliquots of the eluates were used for the test of [³H]-thymidine incorporation into lymphocytes. The samples tested were not fixed with the amount of proteins. The other 10 μ l of aliquots were used for PCA. Units were expressed as mm² which was calculated by multiplying the longitudinal diameter (mm) by the transverse diameter (mm) of the blueing round.

5ml の ASE (2mg protein/ml) を PBS で平衡化したカラム (2.5×77cm) に乗せた。溶出は PBS で行った。分画は 7ml ずつ収集した。牛血清アルブミン、卵白アルブミン及びチトクロム c はそれぞれチューブ番号 29, 33 及び 42 で溶出された。溶出液の 10ml ずつをリンパ球の [³H] チミジン取り込み試験に用いた。試験標本は蛋白質質量で固定されなかった。別の 10 μ l を PCA 試験に用いた。単位は青染部分の縦直径 (mm) に横直径 (mm) を乗じて計算した mm² で示した。

DISCUSSION

In this study, ASE induced a remarkable incorporation of [³H]-thymidine into human lymphocytes. The effect of ASE was almost as large as that of PWM in the five-day culture, although the response developed more slowly than with PWM. Table 3 obtained from the experiment using T and non-T lymphocytes showed that ASE stimulates T lymphocytes more than non-T lymphocytes. However, the mode of stimulating action of ASE was different from that of PHA, and also from that of PWM. ASE developed its stimulating action on T lymphocytes more slowly than PHA. The effect of ASE on non-T lymphocytes in the five-day culture was weaker

考 察

本研究で、ASE は著明なヒトリンパ球の [³H] チミジン取り込みを誘発した。ASE の効果は、その反応は PWM 誘発反応よりも遅く発現したが、5 日間培養では PWM の効果と同程度であった。T リンパ球及び非 T リンパ球を用いた実験から得られた表 3 は、ASE が非 T リンパ球よりも T リンパ球を刺激することを示している。しかし、ASE の刺激作用のタイプは PHA 及び PWM の刺激作用のそれとは異なっていた。ASE は PHA よりも緩徐に T リンパ球に対する刺激作用を示した。5 日間培養での ASE の非 T リンパ

than that of PWM, whereas the effect of ASE on lymphocytes containing both T and non-T lymphocytes was equivalent to that of PWM. ASE is assumed to contain a mitogenic substance which stimulates predominantly T lymphocytes with a mode of action different from PHA. Ballet et al¹⁹ reported on parasite-derived mitogenic activity of human T cells in *Plasmodium falciparum* continuous cultures in which T cells were the predominant target cells of this mitogenic activity. Soluble egg antigen of *Schistosoma mansoni* has been reported to activate antigen-specific suppressor cells.²⁰ Dominant stimulations of parasite-derived mitogenic activities on T lymphocytes might be related to this cell type, necessary for the immunity during parasite infections.

Peak I from Sephacryl S-200 column chromatography showed the molecular weight ranged from 12,000 to 68,000, and had two kinds of activities, i.e., lymphocyte-mitogenic activity in the first half of the peak and rat PCA-inducing allergenic activity in the latter half. Allergenic components of *Ascaris*, *Nippostrongylus*, *Toxocara*, and *Toxocara canis* have been reported to be proteins having a molecular weight of 10,000 to 50,000.²¹ Fractionation and characterization of the allergenic component of *Ascaris* have shown the allergen fraction to be a glycoprotein with molecular weight of 12,000 to 14,000.^{22,23} Peak I, obtained through column chromatography in the present study, appears to be similar to that allergen fraction.^{22,23} On the other hand, the fraction containing lymphocyte-mitogenic activity seemed to be composed of larger molecular weight substances than the allergen fraction. These data indicate that ASE contains both an allergen and a mitogen and that these two appear to be separable and different substances.

Nematode infections induce IgE-mediated hypersensitivity in man and animals.² Suemura et al^{24,25} demonstrated that a soluble IgE-potentiating factor is derived from T lymphocytes of *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats and that this factor selectively promotes differentiation of IgE-bearing B lymphocytes. ASE lymphocyte-mitogenic factor is also assumed to be involved in IgE production which is caused by *Ascaris suum* infection. The factor might stimulate T lymphocytes to increase the number of cells which recognize *Ascaris* and transmit the

球に対する効果は PWM の効果より弱かった。T リンパ球と非 T リンパ球の両方を含む細胞標本に対する効果は PWM の効果と同等であった。ASE は PHA とは異なる作用様式で主に T リンパ球を刺激する細胞分裂促進物質を有すると考えられる。Ballet ら¹⁹ は *Plasmodium falciparum* 連続培養で T 細胞が主な標的細胞である寄生虫由来ヒト T 細胞の細胞分裂促進活性を報告した。*Schistosoma mansoni* の可溶性卵抗原は抗原特異的抑制細胞を活性化することが報告されている。²⁰ T リンパ球に対する寄生虫由来細胞分裂促進活性の刺激は、寄生虫感染時の免疫に必要なこの細胞種と関連があるかもしれない。

Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィーのピーク I は分子量範囲 12,000~68,000 を示し、2 種類の活性、すなわちピーク前半部分のリンパ球細胞分裂促進活性と後半部分のラット PCA 誘発アレルギー活性を有した。*Ascaris*, *Nippostrongylus*, *Toxocara* 及び *Toxocara canis* のアレルギー成分は分子量 10,000~50,000 の蛋白質であると報告されている。²¹ *Ascaris* のアレルギー成分の分画と特性付けは、アレルギー分画が分子量 12,000~14,000 の糖蛋白であることを示した。^{22,23} 本研究でカラムクロマトグラフィーにより得られたピーク I はそのアレルギー分画^{22,23} に類似しているように思われる。一方、リンパ球細胞分裂促進活性を含む分画はアレルギー分画よりも大きい分子量の物質から構成されているように思われた。これらのデータは、ASE がアレルギーと細胞分裂促進因子の両方を含むこと、またこれら二つは分離可能な異なる物質であるらしいことを示唆している。

線虫感染はヒト及び動物に IgE 媒介過敏症を誘発する。² Suemura ら^{24,25} は、可溶性 IgE 増強因子が *Nippostrongylus brasiliensis* 感染ラットの T リンパ球に由来すること、そしてこの因子は IgE 担体 B リンパ球の分化を選択的に促進することを証明した。ASE リンパ球細胞分裂促進因子も *Ascaris suum* 感染によって引き起こされる IgE 産生に関連すると考えられる。その因子は、*Ascaris* を識別し、その情報を B リンパ球に伝える細胞の数を増やすために

information to B lymphocytes, which results in amplified transmission of the information to B lymphocytes and in a high level of IgE production. Whether ASE mitogen acts on subpopulations of T lymphocytes unlike PHA, and whether the mitogen is a segment or polymer of the allergen might be clarified by future studies, if the individual components are isolated and purified. ASE mitogen is expected to be used as a tool for clarifying IgE production and its related immune phenomena.

Tリンパ球を刺激するかもしれない。そしてその結果、Bリンパ球への情報伝達が増強されIgE産生レベルが高まると思われる。ASE細胞分裂促進因子がPHAと異なり、Tリンパ球のサブポピュレーションに作用するかどうか、そしてこの細胞促進因子がアレルゲンの一部又は重合体であるかどうかは、各構成物質が分離され精製されれば、将来の研究によって解明されるかもしれない。ASE細胞分裂促進因子は、IgE産生及びその関連免疫現象を解明する手段として用いられることが期待される。

REFERENCES

参考文献

1. FUJITA K, TSUKIDATE S: Preparation of a highly purified allergen from *Dirofilaria immitis*. Reaginic antibody formation in mice. *Immunology* 42:363-70, 1975
2. SADUN EH: Homocytotropic antibody response to parasitic infections. In *Immunity to Animal Parasites*. Ed by Soulsby. New York, Academic Press, 1972. pp97-129
3. STREJAN G, CAMPBELL DH: Hypersensitivity of *Ascaris* antigens. IV. Production of homocytotropic antibodies in the rat. *J Immunol* 101:628-37, 1968
4. STROMBERG BE: IgE and IgG1 antibody production by a soluble product of *Ascaris suum* in the guinea-pig. *Immunology* 38:489-95, 1979
5. VICKERY AC, KLEIN TW, FRIEDMAN H: Modulation of lymphoid cell blastogenic responsiveness to mitogens by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *Proc Soc Exp Biol Med* 168:33-7, 1981
6. AMADOR JF, WRIGHT P: *Schistosoma mansoni* miracidial fluid inhibits human lymphocyte functions. *Immunology* 47:695-9, 1982
7. MACKENZIE CD, JUNGERY M, TAYLOR PM, OGILVIE BM: The in vitro interaction of eosinophils, neutrophils, macrophages and mast cells with nematode surfaces in the presence of component or antibodies. *J Pathol* 133:161-75, 1981
8. AURIAULT C, CAPRON M, CAPRON A: Activation of rat and human eosinophils by soluble factor(s) released by *Schistosoma mansoni* Schistosomula. *Cell Immunol* 66:59-69, 1982
9. TANAKA J, TORISU M: Anisakis and eosinophil. I. Detection of a soluble factor selectively chemotactic for eosinophils in the extract from Anisakis larvae. *J Immunol* 120:745-9, 1978
10. TANAKA J, BABA T, TORISU M: *Ascaris* and eosinophil. II. Isolation and characterization of eosinophil chemotactic factor and neutrophil chemotactic factor of parasite in *Ascaris* antigen. *J Immunol* 122:302-8, 1979
11. GOLD WM, KESSLER G-F, YU DY: Role of vagus nerves in experimental asthma in allergic dogs. *J Appl Physiol* 33:719-25, 1972
12. YAMATAKE Y, SASAGAWA S, YANAURA S, KOBAYASHI N: Allergy induced asthma with *Ascaris suum* administration to dogs. *Jpn J Pharmacol* 27:285-93, 1977

13. URBAN JF, DOUVRES FW: In vitro development of *Ascaris suum* from third- to fourth-stage larvae and detection of metabolic antigens in multi-well culture systems. J Parasitol 67:800-6, 1981
14. CRAWFORD GPM, HOWSE DJ, GROVE DI: Inhibition of human blood clotting by extracts of *Ascaris suum*. J Parasitol 68:1044-7, 1982
15. LOWRY OH, ROSENBROCH NJ, FARR AL, LANDELL RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 129:265-76, 1951
16. BÖYUM A: Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 21(Suppl 97):77-85, 1968
17. SAKANE T, GREEN I: Protein A from *Staphylococcus aureus* – a mitogen for human T lymphocytes and B lymphocytes but not L lymphocytes. J Immunol 120:302-11, 1978
18. KOLBERG J, SLETTEN K: Purification and properties of a mitogenic lectin from *Lathyrus sativus* seeds. Biochim Biophys Acta 704:26-30, 1982
19. BALLETT JJ, DRUILHE P, QUERLEUX MA, SCHMITT C, AGRAPART M: Parasite-derived mitogenic activity for human T cells in *Plasmodium falciparum* continuous cultures. Infect Immun 33:758-62, 1981
20. ROCKLIN RE, TRACY JW, KHOLY AE: Activation of antigen-specific suppressor cells in human *Schistosomiasis mansoni* by fractions of soluble egg antigens nonadherent to Con A Sepharose. J Immunol 127:2314-8, 1981
21. HOGARTH-SCOTT RS: The molecular weight range of nematode allergens. Immunology 13:535-7, 1967
22. AMBLER J, DOE JE, GEMMELL DK, ROBERTS JA, ORR TSC: Biological techniques for studying the allergenic components of nematodes. I. Determination of allergenic component of *Ascaris suum* extracts. J Immunol Methods 1:317-28, 1972
23. AMBLER J, MILLER JN, JOHNSON O, ORR TSC: Characterization of an allergen extracted from *Ascaris suum*. Determination of the molecular weight, isoelectric point, amino acid and carbohydrate content for the native allergen. Immunochemistry 10:815-20, 1973
24. SUEMURA M, ISHIZAKA K: Potentiation of IgE response in vitro by T cells from rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. J Immunol 123:918-24, 1979
25. SUEMURA M, YODOI J, HIRASHIMA M, ISHIZAKA K: Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. I. Mechanism of enhancement of IgE response by IgE potentiating factor. J Immunol 125:148-84, 1980