

再生不良性貧血に関する研究

第二編 リンパ球に関する研究

岡山大学医学部第二内科教室（主任：平木潔教授）

三 橋 朝 子

（昭和51年6月25日受稿）

1. 緒 言

特発性再生不良性貧血（以下再不貧と略す）の発生機序に関しては、アレルギー説、ウイルス説、幹細胞障害説その他があるが、未だ決定的ではない。本症患者には、肝炎を合併したり、クロラムフェニコールが明らかな誘因と考えられる場合¹⁾がある他、本症の特異型として知られる赤芽球癆（pure red cell aplasia）に低 γ -グロブリン血症や胸腺腫の合併をみるなど、免疫学的異常の存在を示唆する症例²⁾も報告されており、ステロイドホルモンや ACTH の有効性とも合わせて、本症に対する免疫学的検索の必要性は当然要求されるところである。著者は、再不貧患者の末梢血、一部骨髓のリンパ球について、T, B 細胞の subpopulation と、in vitro での mitogen に対する反応性について検討し、重症度との間に相関を見出したので報告する。

2. 対象と方法

1) 対象：対象とした再不貧患者は、厚生省の診断基準に従って、貧血症状、出血症状ならびに汎血球減少症があり、末梢血液所見で赤血球数300万/cmm以下、色素量10g/dl以下または60% (Sahli)以下、白血球数3000/cmm以下、血小板数5万/cmm以下の条件を満たし、かつ白血病や、その他鉄剤、葉酸、ビタミン B₁₂ の投与で症状が改善されたり、原因がはっきり判明している続発性の症例は除外して、特発性と考えられるもののみを対象とした。即ち昭和49年以降当教室へ入院加療し、一部外来へ通院中の16才から79才迄の25例（うち女性8例、男性17例）で、累積39検体になる。これらの患者の検査時の末梢血液像の平均値±標準偏差は、赤血球数284.55±

103.35×10⁴/cmm, 色素量10.05±3.40g/dl, 白血球数3413.75±1145.27/cmm, 血小板数77105.26±85787.57/cmmで、比較的寛解例を多数含んでいる。対照とした健康人は、20才から40才までの11例である。

2) リンパ球の分離法：ヒト末梢静脈血12mlをHeparin加注射器にて無菌的に採血。生食液36mlを加えて混和し、33.4% conray 400, 10容量と9% Ficoll 蒸溜水溶液24容量の混合液3ml上に6~8mlずつ静かに重層する。これを400×gにて30分間遠沈し、Conray-Ficollの中間にできるリンパ球層を別の試験管に移し、数倍の生食液にて洗滌する。骨髓細胞は患者骨髓より小宮氏骨髓穿刺針にてHeparin加注射器にて1ml吸引採取し、これを10倍の生食液で希釈して、Conray-Ficoll液にて末梢血と同様にリンパ球を分離した。

3) Tリンパ球 (RFC)：集めたリンパ球はgelatin-veronal緩衝液で3回洗滌、ヒツジ赤血球は生食液で3回洗滌したのち、リンパ球数は5×10⁶/ml、ヒツジ赤血球数は1×10⁶/mlの濃度に、それぞれ牛胎児血清中に調整、浮遊させた。リンパ球浮遊液とヒツジ赤血球浮遊液とを一滴ずつ、plasticのspitz-tubeに混合し、37℃15分間incubate後、300×g5分間遠沈。氷中に1時間静置したのち、細胞を再浮遊させ、slide glass上におき、cover glassをかけparaffinにて封入した。標本はDLL 100×10倍の位相差顕微鏡にて検鏡した。リンパ球200個を数え、2個以上ヒツジ赤血球の結合したリンパ球をTリンパ球と判定しT-cellとみなした。

4) Bリンパ球 (SIBC)：分離したリンパ球を生食液にて1回洗滌後、gelatin-veronal緩衝液にて3回洗滌する。リンパ球5×10⁶を0.9mlのTCM-

表1 健康人及び再不貧患者のリンパ球の量と機能

	Lymph /cmm	Tリンパ球 %	Tリンパ球 /cmm	Bリンパ球 %	Bリンパ球 /cmm	solo. c.p.m	PHA-S. I. %	PWM-S. I. %
健康人	2318	64.86	1503	27.16	584	2781	2211	1013
	± 544	± 2.61	± 342	± 4.38	± 133	± 1418	± 820	± 666
N	11	11	11	11	11	11	11	11
再不貧	1803	65.27	1230	19.14	329	814	856	652
	± 696	± 12.55	± 631	± 7.70	± 169	± 258	± 504	± 353
N	38	39	38	36	35	10	10	10

199液に浮遊させ、FITC標識抗ヒトIgG、IgAおよびIgM家兔血清 (Behring-Werke) 0.1mlを加え、0℃30分間反応させる。再びgelatin-veronal緩衝液にて3回洗滌し、最終的に50% glycerine加PBSに浮遊させ、Nikon蛍光顕微鏡下で、膜蛍光陽性細胞の全リンパ球に対する百分率を求めて、各免疫globulin classの陽性率を加算して、Bリンパ球即ちB-cellとした。

5) リンパ球幼若化現象: TCM-199液にて2回洗滌し、15%仔ウシ血清を含むTCM-199液1mlにリンパ球 0.5×10^6 個を浮遊させ、PHA-PあるいはPWMを15 μ g/ml添加、37℃、CO₂ incubator中で3日間培養し、³H-TdR 1 μ Ci (Specific activity 5.0 Ci/mM) を添加、4時間培養した。millipore filter上で培養液を吸引し、乾燥、液体 scintillation vialの底に密着させる。液体 scintillator (PPO 4.0g, POPOP 50mg を toluen 1 ℓ に溶解) 10mlを分注、液体 scintillation counterでcpmを求めた。各々の1検体について3個のvialを作り、そのcpmの平均値を求めた。PHA-PとPWM反応性はmitogenを添加しないで培養した検体(solo culture)のcpmに対するmitogenを添加した検体のcpmの百分率を算出してDNA合成促進率(S.I.)とした。

3. 成 績

健康人と再不貧患者の末梢血リンパ球に関する成績を一括して表1に示した。

健康人の末梢リンパ球数(平均値±標準誤差)は2318±544/cmm(N=11)、Tリンパ球は64.86±2.61%、1503±342/cmm(N=11)、Bリンパ球は27.16±4.38%、584±133/cmm(N=11)で、再不貧患者の末梢リンパ球数は1803±696/cmm(N=39)、Tリンパ球は65.27±12.55%(N=39)、1230±631/cmm(N=38)で、Bリンパ球は19.14±7.70%(N

=36)(0.01>P>0.001)、329±169/cmm(N=35)(P<0.001)と健康人に比して有意に低下していた。健康人のsoloculture cpmは、278±1418 cpm(N=11)、PHA-S. I. は2211±320%(N=11)、PWM-S. I. は1013±666%(N=11)で、再不貧患者ではそれぞれ814±258 cpm(N=10)、856±504%(N=10)、652±353%(N=10)で、PHA-S. I.、PWM-S. I.とも健康人の値に比較して有意に低下していた(P<0.001)。

つきに再不貧患者を重症、中等症、寛解例に分類し、それぞれの項目について平均値±標準偏差を求めた(表2)。重症例は出血傾向強く、赤血球数150万以下の症例で、寛解例は出血傾向なく、赤血球数300万以上で輸血を全く必要としない外来通院例で、中等症はその中間のものである。この分類に従っての集計結果と健康人の値についてt検定をおこなうと、重症例ではTリンパ球数/cmm(0.001<P<0.01)、Bリンパ球%(0.001<P<0.01)、Bリンパ球数/cmm(P<0.001)、PHA-S. I.(0.001<P<0.01)とも有意に低下していた。中等症と健康人との間のt検定では、Bリンパ球%(0.001<P<0.01)、Bリンパ球数/cmm(P<0.001)で有意に低下していた。この関係を図示(図1)すると、Tリンパ球、Bリンパ球ともに実数において重症になるに従って減少することが明らかである。血色素量を三段階に分けてTリンパ球、Bリンパ球との相関をみると(図2)、Tリンパ球%は血色素量が減少するに従って減少し、Bリンパ球%は逆に軽度ではあるが増加した。粒球数に関しては(図3)、Tリンパ球数はやはり粒球数が減少するに従って減少し、Bリンパ球数も極く軽度ながら減少する傾向にある。

T、Bリンパ球を算定するに当たっては、それぞれ、リンパ球膜表面の形質(receptor)の違いをmarkerとしていろいろな方法で検定するわけであるが、い

ずれにしても両者を合計すると100%になるのが妥当と考えられるが、実際には100%以下であったり、逆に100%を超えることがある。(特に腫瘍性性格をもったリンパ球については、従来この偏りが激しい傾向にあるといわれている。)そこで便宜上、T、Bリンパ球の合計が100%以下のときには、細胞表面に

T、Bいずれの marker ももたぬ細胞が存在するからであり、100%以上のときには、1個のリンパ球膜表面に T、B 両細胞の marker を重ねて持っている細胞が存在するからであろうと推定することができる。前者を null cell、後者を both cell と名付けると、健康人(図4)の場合 Tリンパ球が 60.97 ± 7.38

表2 重症度別にみた再生不良性貧血患者リンパ球の量と機能

	Lymph /cmm	Tリンパ球 %	Tリンパ球 /cmm	Bリンパ球 %	Bリンパ球 /cmm	solo. c. p. m	PHA-S. I. %	PWM-S. I. %
重症	1579 ± 770	62.12 ± 14.29	969 ± 478	19.47 ± 8.00	284 ± 121	859 ± 156	849 ± 387	669 ± 416
N	14	14	14	13	13	5	5	5
中等症	1737 ± 751	65.00 ± 12.74	1053 ± 462	18.81 ± 5.93	310 ± 177	746 ± 401	406 ± 181	853 ± 395
N	12	13	11	12	11	3	3	3
寛解	2008 ± 599	70.19 ± 9.92	1499 ± 566	19.80 ± 9.45	381 ± 202	543	1549	804
N	13	13	14	12	12	2	2	2

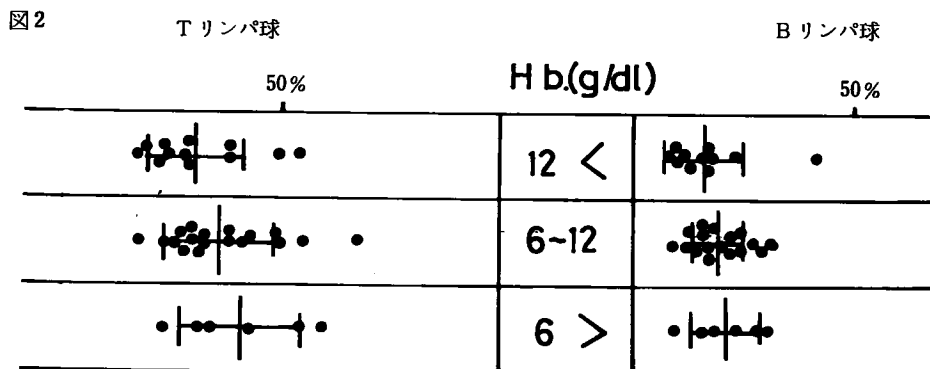
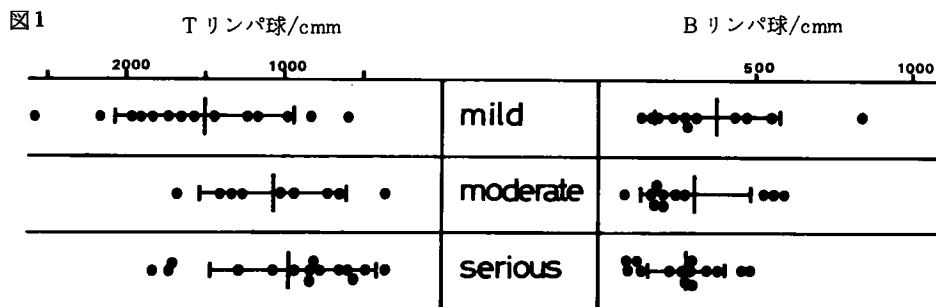


図3

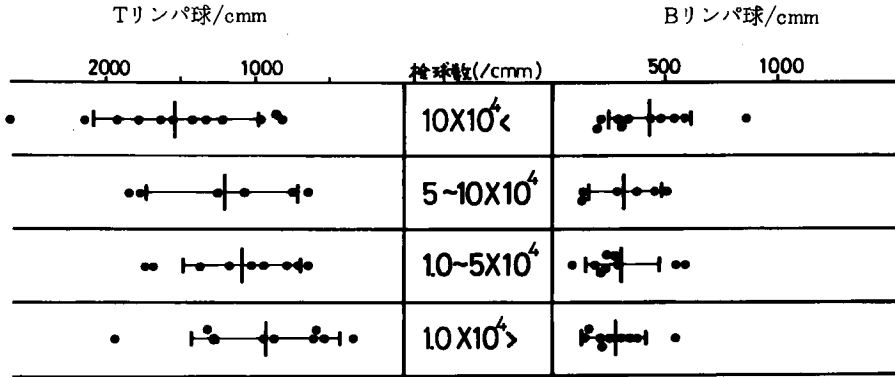
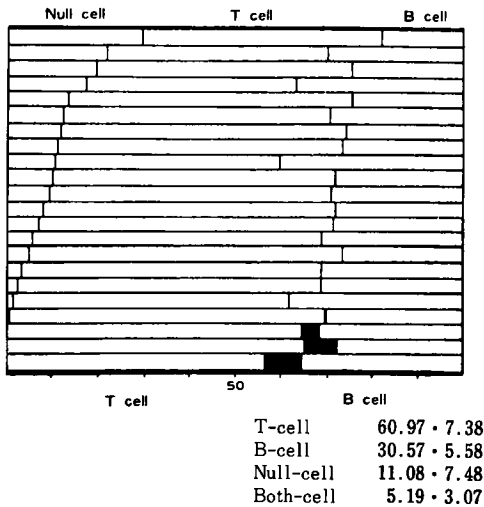


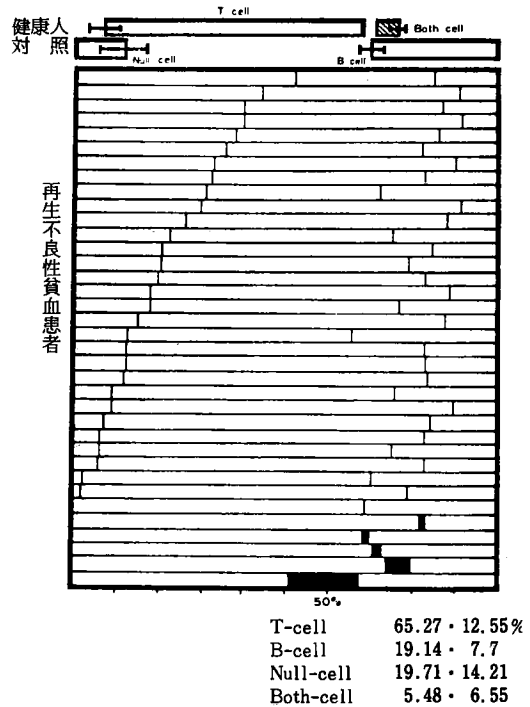
図4 健康人末梢血リンパ球構成 (%)



%, Bリンパ球 $30.57 \pm 5.58\%$ に対して, null cellは $11.08 \pm 7.48\%$ ($N=22$), both cell $5.19 \pm 3.07\%$ である。これに対して再不貧患者(図5)では, Tリンパ球 $65.27 \pm 12.55\%$, Bリンパ球 $19.14 \pm 7.7\%$, null cell $19.71 \pm 14.21\%$ ($N=36$), both cell $5.48 \pm 6.55\%$ と null cellの増加 ($P < 0.05$)が著しい。null cellの多い症例はTリンパ球の減少が著しく, Bリンパ球も減少しており, 重症度からいえば, 死亡例を含めた重症例であることが判明した。逆に both cell が出現するような症例は, むしろ寛解例で, Tリンパ球が増加し, Bリンパ球も増加傾向にあった。

更に再不貧患者を摘脾群と非摘脾群に分けて検討

図5 再生不良性貧血患者末梢血リンパ球構成 (%)



した(表3)。両群での成績をt-検定すると, Tリンパ球/cmm ($0.001 < P < 0.01$)と末梢リンパ球数 ($0.001 < P < 0.01$)が摘脾群で非摘脾群に比較して有意に増加していた(図6)。Bリンパ球はPHA-S.I., PWM-S.I.とともに, 摘脾後減少する傾向があり, γ -globulinはむしろ増加した。性別に観察した結果では, T, Bリンパ球, PHA-S.I.もPWM-S.I.にも有意差を認めなかった。

図6

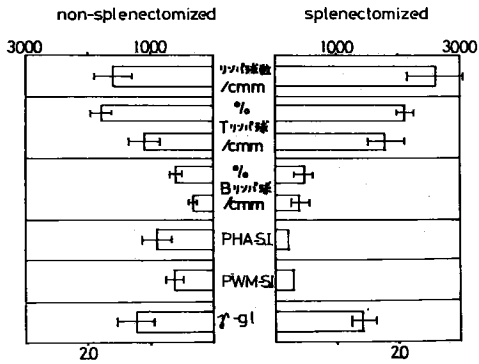


図7 ³H-Thymidine の DNA への取り込み

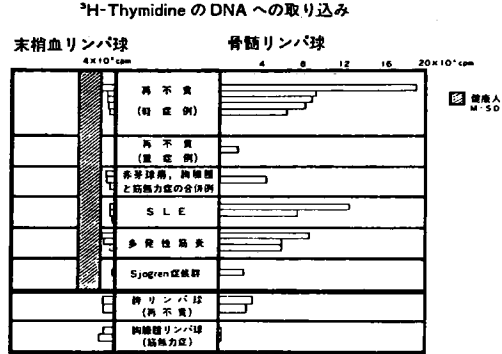


表3 摘脾の有無による再不貧患者のリンパ球の量と機能

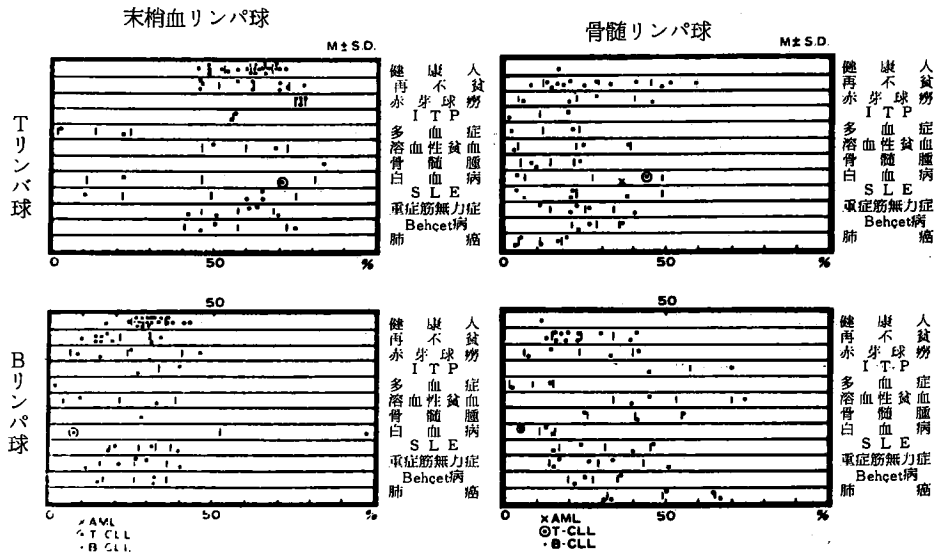
	Lymph /cmm	Tリンパ球 %	Tリンパ球 /cmm	Bリンパ球 %	Bリンパ球 /cmm	solo. c. p. m.	PHA-S. I. %	PWM-S. I. %
非摘脾群	1648	65.13	1093	19.66	314	792	928	688
	± 623	± 12.88	± 487	± 7.55	± 153	± 264	± 477	± 354
N	34	35	34	33	32	9	9	9
摘脾群	2604	69.50	1793	16.87	406	1121	209	327
	± 820	± 11.34	± 618	± 9.84	± 289			
N	5	5	5	5	4	1	1	1

表4 骨髄における T. B. 細胞と mitgen 反応性

	B. M. solo. cpm	Periphe solo. cpm	B. M. PHA cpm	Periphe PHA cpm	B. M. PWM cpm	Periphe PWM cpm	B. M. Tリンパ球 %	Periphe Tリンパ球 %	B. M. Bリンパ球 %	Periphe Bリンパ球 %
K. J.	7960	1121	1985	2346	4876	3672	59.5	83.0	n. d.	n. d.
U. T.	14308	793	1829	3503	4044	3053	16.5	57.0	34.89	30.74
M. H.	1943	1202	3953	3136	4195	1554	46.0	49.5	15.74	16.95
N. T.	10107	538	1827	23388	5786	7431	59.0	n. d.	n. d.	n. d.
K. H.	7059	1083	7007	1223	6503	6813	8.0	75.5	49.29	40.78
N. T.	4762	1468	5864	3291	1668	11818	9.5	76.5	16.63	15.38
U. K.	2538	190	1629	3060	1173	n. d.	8.0	75.0	21.52	24.68
A. S.	7497	246	1162	1748	3337	2551	28.0	40.0	38.73	19.62

K. J., U. T., M. H.: Hypoplastic anemia
 N. T.: Systemic lupus erythematosus
 K. H.: Dermatomyositis
 N. T.: Pure red blood cell anemia
 U. K.: Sjogren's syndrome
 A. S.: Iron deficiency anemia

図 8



3名の骨髓リンパ球での成績を、対照としての全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、鉄欠乏性貧血、Sjögren症候群、赤芽球癆の成績とともに示した(表4)。本症の骨髓中には、他疾患に比して相対的にTリンパ球が高値で、骨髓中Bリンパ球の%は、末梢血のBリンパ球の値と類似していた。soloculture cpmは末梢血のそれに比して圧倒的に高値を示し、PHA cpm、PWM cpmは低値を示した。soloculture cpmに関して末梢リンパ球と骨髓リンパ球を対比して図示すると(図7)、本症の軽症例では、末梢血リンパ球と比較して、圧倒的にH-TdRのとりこみが大きであるが、重症例では末梢血リンパ球とはほぼ同程度にまで減少していた。これを他の疾患に比較すると、本症の軽症例は、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎並びに赤芽球癆に相当しており、重症例はSjögren症候群に似ていた。本症で摘出した脾臓リンパ球のsoloculture cpmは、末梢血リンパ球とはほぼ相同であり、重症筋無力症で摘出した胸腺腫内リンパ球のsoloculture cpmは非常に低下していた。

各種疾患での末梢血リンパ球と骨髓リンパ球のT、Bリンパ球%を図示すると(図8)再不貧患者の骨髓リンパ球にはTリンパ球(28.57±16.12%)が多く、Bリンパ球も24.41±9.54%に増加していた。赤芽球癆の末梢血Tリンパ球は76.37±1.03%と高値を示すが、Bリンパ球は23.55±16.8%、骨髓Tリンパ球は22.00±18.35%、Bリンパ球23.30±17.46

%であった。ITPでは末梢血Tリンパ球55.75±1.06%、Bリンパ球33.58±9.24%、骨髓Tリンパ球10.50±12.72%と減少し、Bリンパ球は57.63±18.15%と著明に増加していた。多血症では末梢血Tリンパ球(13.25±13.78%)、Bリンパ球(1.79%)、骨髓Tリンパ球(11.50%)、Bリンパ球(8.46±8.02%)のいずれも高度に減少していた。自己免疫性溶血性貧血では、末梢血Tリンパ球59.25±13.78%、Bリンパ球21.32±16.92%に対して、骨髓Tリンパ球21.83±17.65%、Bリンパ球52.85±18.54%と骨髓Bリンパ球の増加がみられた。骨髓腫では骨髓Tリンパ球(13.83±8.43%)の減少と骨髓Bリンパ球(54.79±24.80%)の増加がみとめられた。白血病のうち、T-CLLは末梢血でも、骨髓でもTリンパ球の高値、Bリンパ球の低値が認められ、B-CLLでは逆にBリンパ球の高値、Tリンパ球の高度減少が存在し、AMLではTリンパ球の軽度増加がみられた。SLEでは末梢でも骨髓でも、Tリンパ球は減少傾向にあり、骨髓Bリンパ球は増加傾向にあった。重症筋無力症では骨髓Tリンパ球(23.80±10.62%)が軽度増加し、骨髓Bリンパ球は28.85±14.69%であった。Behcet病では骨髓Tリンパ球が28.16±7.37%と増加し、Bリンパ球は末梢血26.11±9.94%、骨髓27.57±7.01%で末梢血と骨髓のBリンパ球が同じレベルであった。肺癌患者の化学療法開始前の骨髓ではTリンパ球10.80±7.02%と低値で、

Bリンパ球は $48.96 \pm 16.88\%$ と高値を示していた。

4. 考 案

中田ら⁸⁾はかつて pneumomediastinography による再生不良性貧血患者の胸腺陰影について検討を加え、陰影の濃淡はあるものの、胸腺陰影自体は正常より大きいことを報告したが、その後赤芽球癆を含めて数例に追試してこれを確認している。その後末梢血リンパ球の subpopulation を検索し、RFC 即ち Tリンパ球が高率であることを認め、本症における胸腺機能亢進状態の存在を強調した⁹⁾。当時の健康人 Tリンパ球%は $33.7 \pm 2.9\%$ で、再不貧患者では $57.6 \pm 4.1\%$ であったので、その差は明らか ($P < 0.001$) であった。本論文で呈示した健康人対照は、Tリンパ球や Bリンパ球と同時に末梢白血球数、PHA, PWM への in vitro での反応性を検討しえた11例に限って集計したものであり、Tリンパ球は $64.9 \pm 2.6\%$, $1502.5 \pm 342.2/\text{cmm}$ と増加しており、Bリンパ球も $27.4 \pm 4.4\%$, $584.2 \pm 133.1/\text{cmm}$ であった。本症では、健康人よりもリンパ球数 ($P < 0.05$), Tリンパ球数/cmm ($P < 0.2$), Bリンパ球% ($P < 0.01$), Bリンパ球数/cmm ($P < 0.001$), soloculture cpm ($P < 0.001$), PHA-S.I. ($P < 0.001$), PWM-S.I. ($P > 0.5$)の数値が減少していた。問題の Tリンパ球の動きを更に浮きぼりにするために、本症を重症度に分別して集計すると、軽症例の Tリンパ球は平均値はほぼ健康人対照と同じで約半数例で健康人平均値以上を示した。しかし中等症、重症例の殆んど全症例が健康人平均値以下の値を示し、おのおのの平均値は中等症よりも重症例の方が低値を示した。この両者は血小板減少程度、赤血球数減少程度ともよく相関していた。普通 Tリンパ球と Bリンパ球は%の上で逆相関を示すものである⁸⁾が、本症では Bリンパ球についても軽症>中等症>重症の順で減少した。この平常でない現象の説明を求めるために、リンパ球細胞膜上に、ヒツジ赤血球とロゼットを形成するための receptor も、膜免疫蛍光法で証明される免疫グロブリン receptor ももち合わせない、いわゆる nomarker cell 即ち null cell¹⁰⁾の%を検討したところ、本症の重症例、致死例ほどその%が増加することが判明し、逆に両者の marker を細胞膜上にもっていると考えざるをえない double marker cell 即ち both cell は寛解例に多いことが判明した。このことと本症における PHA, PWM などの mitogen に対する幼若化現象の

低下とは無関係ではなく、これら mitogen 特に PHA に対する receptor も減少していると推定される。PHA に特異的に反応して in vitro で芽球化反応を起こすのは Tリンパ球であり、PWM に対しては Bリンパ球が対応すると考えられてきた⁸⁾が、ごく最近 PHA に反応する Bリンパ球の存在が報告され¹¹⁾、PWM は Tリンパ球にも Bリンパ球にも結合しうる¹²⁾ことが示唆されている。PWM のリンパ球特異性に疑問が投げられる要素は、今回の著者らの成績でも、Bリンパ球の減少にも拘らず、PWM 反応性が比較的保存されている症例が多いことでも肯定できる。反面 Tリンパ球の増減に巾があっても、PHA-S.I. は殆んど症例で低下していた事実は、soloculture cpm の低下ともあわせて考えると、Tリンパ球系¹⁰⁾では数量的変動の表現よりも、Tリンパ球細胞膜上での receptor の失活が先行することを示唆して充分である。恐らく Bリンパ球についても同じことが結論できると予想される。

有森らは赤芽球癆に重症筋無力症と胸腺腫を伴った症例に、胸腺摘出術後イムランを投与して赤芽球癆を寛解せしめた症例をかって報告¹³⁾したが、本症例は1975年1月末でイムラン50mgを中止して10月現在寛解状態を維持して、骨髄もほぼ正常化している。一方 ITP で免疫異常の証明される症例に vincristine を投与して、プレドニン、イムランの2年以上の長期投与で1万以上に増加しなかった血小板数が15万にまで増加した症例を経験した。顆粒球減少症でプレドニンや ACTH が有効であることはもはや常識であろう。これら三血球系の減少が骨髄造血巢の多様な反応(過形成から脂肪腫まで)を伴って進行する本症において、骨髄リンパ球が増加していることはかつてからよく知られていたが、その subpopulation において Tリンパ球が優位に、Bリンパ球が従に増加していることは、末梢血中の T, Bリンパ球の減少を反映して興味深い。Tリンパ球の細胞障害性¹⁴⁾が確認されている折から、骨髄リンパ球の DNA 合成の亢進 (soloculture cpm の高値)にもかかわらず、PHA や PWM に対する芽球化能が低下していることは、骨髄細胞を特異 target として cytotoxin あるいは cytolytic な反応が起っている可能性が示唆される。

今後更に追求されるべき問題がここに残されている。

脾臓の摘出は、末梢血におけるリンパ球 subpopulation の量的かたよりを是正したが、receptor の

修復には投立っていなかった。組織適合性抗原(HL-A)の研究がすすむにつれて、骨髄移植の適応が明確に規定されるようになりつつある。それにしても minor gene の相違に基づく拒絶反応を防止することを目的として、本症に免疫抑制剤を投与することがすでに試みられている¹¹⁾これらのリンパ球、組織適合性抗原の検索ならびにリンパ球混合培養の成績などを通じて、本症の免疫異常が確認され、胸腺や脾臓の摘出とともに、膠原病と同様の免疫抑制療法の応用の可能性が示唆された。

5. 結 語

16才から79才までの再生不良性貧血患者25名(女性8名,男性17名)について末梢血リンパ球の subpopulation を検討するとともに、同一サンプルから PHA, PWM に対する in vitro での芽球化反応を

³H-TdR の摂取 cpm で評価して健康人と比較した。その結果再不貧では、重症になるに従って末梢リンパ球数とともに T リンパ球, B リンパ球ともに減少し, null cell が増加した。これを反映してか, soloculture cpm とともに PHA に対する反応性が低下したが, PWM に対する反応性は比較的保たれていた。骨髄リンパ球では T リンパ球が主として, B リンパ球も増加しており, soloculture cpm が末梢血より圧倒的に高値を示したが, これも重症例では低下していた。又 PHA ならびに PWM に対する反応性は極度に低下していた。

摘脾術は T, B リンパ球数を是正したが, 膜表面 receptore の修復には役立っていないと考えられた。

恩師平木潔教授, 東海大学医学部有森茂教授の御指導, 御校閲に深謝致します。

文 献

- 1) 柴田昭, 福田光之: 再生不良性貧血の成因. 最新医学, 29: 1039—1047, 1974.
- 2) 中田安成, 野崎宏幸, 多田慎也, 小橋秀広, 有森茂, 山名正俊: 胸腺腫, pure red cell aplasia, 重症筋無力症を合併し, 各種免疫検査異常を示した1例. 臨床血液, 14: 1198—1205, 1973.
- 3) 中田安成, 有森茂, 多田慎也: 本態性再生不良性貧血の胸腺-pneumomediastinography を中心として一. 臨床血液, 14: 757—761, 1973.
- 4) 中田安成, 有森茂, 多田慎也, 小橋秀広: 特発性再生不良性貧血患者末梢血中のリンパ球 subpopulation の検討. 臨床血液, 14: 1075—1079, 1973.
- 5) 有森茂: 免疫異常症と胸腺. 最新医学, 28: 1315—1328, 1972.
- 6) Dickler, H. B., Adkinson, N. F. Jr., Fisher, R. I. and Terry, W. D.: Lymphocytes in patients with variable immunodeficiency and panhypogammaglobulinemia. Evaluation of B and T cell surface markers and a proposed classification. J. Clin. Invest., 53: 834—840, 1974.
- 7) Arimori, S.: Antimembrane antibody: Analysis of its reactivity against the cell surface antigens by gel filtrations and freeze-etching method. Acta Haemat. Jap., 36: 829—856, 1973.
- 8) 有森茂, 小橋秀広, 多田慎也: 重症筋無力症患者の T, B 細胞プールと機能の相関. アレルギー, 23: 772—774, 1974.
- 9) Thomas, D. B. and Phillips, B.: Membrane antigens specific for human lymphoid cells in the dividing phase. J. Exp. Med., 138: 64—70, 1973.
- 10) Geha, R. S. and Merler, E.: Response of human thymus-derived(T) and non-thymus-derived (B) lymphocytes to mitogenic stimulation in vitro. Eur. J. Immunol., 4: 193—199, 1974.
- 11) 有森茂, 中田安成, 多田慎也, 小橋秀広, 郡山健治, 市川幸延, 岩崎一郎, 平木潔: 重症筋無力症, 赤芽球癆, 胸腺腫を合併し, 胸腺摘出後 azathioprine 投与で寛解した1例. 第32回内科学会中四国地方会, 1975.
- 12) Henney, C. S.: Killer T cells. N. Engl. J. Med., 291: 1357—1358, 1974.
- 13) Storb, R., Thomas, E. D., Buckner, C. D., Clift, R. A., Johnson, A., Hefer, A., Glucksberg,

H., Giblett, E. R., Lerner, K. G. and Neiman, P.: Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anemia. *Blood*, 43 : 157—180, 1974.

Study on the hypoplastic anemia.
Part II. Studies on the lymphocytes of the patients
with aplastic anemia
by
Asako MITUHASHI

The Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School,
Okayama.

(Director : Prof. Kiyoshi Hiraki)

Twenty-five patients with aplastic anemia, 8 female and 17 male aged from 16 to 79 year-old, were examined their circulating lymphocyte subpopulations and the responses to mitogens in vitro. T-lymphocyte was identified using sheep erythrocyte rosette-formation test under the Nikon phase contrast microscope. Surface immunoglobulin bearing cell was identified under the Nikon fluoromicroscope as B-lymphocyte using membrane immunofluorescence test. As mitogens in vitro PHA-P (Difco Lab.) and pokeweed mitogen (Grand Island Biol. Co.) were added to the lymphocyte culture during 68 hours in the CO₂ incubator following 4 hours flushing with ³H-TdR. The incorporated cpm was counted with millipore filtration and a liquid scintillation counter (Shimazu).

According to the severity of aplastic anemia, the patients showed decreased circulating lymphocytes, decreased T- and B-lymphocytes with increased null cells. The incorporation of ³H-TdR in vitro in the soloculture decreased remarkably as well as PHA-P responsiveness. Increased bone marrow T-lymphocytes were noticed in those patients. Although the higher cpm of soloculture of the bone marrow lymphocyte was obtained than of the circulating lymphocyte, extremely low responses to PHA-P and pokeweed mitogen were characteristic in the aplastic bone marrow lymphocytes.

The splenectomy corrected T- and B-lymphocytes population in contrast to the persistent low responsiveness to mitogens.

The abnormality of lymphocyte subpopulations and incorporation rate of ³H-thymidin stimulated with pokeweed mitogen and PHA-P might effect on bone marrow cells as cytotoxic or cytolytic.