

消化器癌患者の末梢血 T cell の Helix pomatia A hemagglutinin 結合活性の検討

第 1 編

¹²⁵I 標識 Helix pomatia A hemagglutinin の リンパ球への結合活性測定の基礎的検討

岡山大学医学部第 1 内科教室

安 原 高 士

(昭和61年 3 月18日受稿)

Key word : Helix pomatia A hemagglutinin, 結合活性, 消化器癌,
末梢血リンパ球, neuraminidase

緒 言

悪性腫瘍患者において細胞性免疫能の低下, 特に T cell 機能の低下が指摘¹⁻⁶⁾されている. また, 末梢血リンパ球 surface marker の検討により, 悪性腫瘍患者で末梢血総 T cell 数の減少が報告^{2,3)}される一方 IgG Fc receptor 陽性 T cell の比率は上昇しているという報告⁷⁻⁹⁾もある.

今回, 筆者等は Helix pomatia A hemagglutinin (HP) の末梢血 T cell に対する結合活性の測定法の確立及びヒト消化器癌患者末梢血中 T cell の変動を検討する目的で研究を開始した.

HP は Concanavalin A, Phytohemagglutinin 等と異なり, リンパ球活性化能をもたないレクチン¹⁰⁾で特異的に N-acetyl-D-galactosamine (D-GalNAc) に結合する¹¹⁻¹⁴⁾. 無処理のヒトリンパ球には結合しないが, neuraminidase 処理リンパ球を用いるとほぼ特異的に T cell に結合することが知られている^{15,17)}.

本編では ¹²⁵I 標識 HP ([¹²⁵I]HP) の neuraminidase 処理末梢血リンパ球に対する結合活性測定法の基礎的検討を報告する. さらに,

第 2 編で消化器癌患者の末梢血 T cell の HP 結合活性の臨床的検討を報告する.

方 法

1) HP の標識

HP (Pharmacia Fine Chemicals) の ¹²⁵I 標識は Green Wood 等の方法¹⁸⁾に従った. すなわち, 0.5M Na-phosphate buffer, pH7.5 50 μ l に 1 mCi Na-¹²⁵I/10 μ l-0.1 N-NaOH (Amersham, IMS 30), HP 1 mg/10 μ l, 0.1 % Chloramine T 30 μ l と順次加え60秒間攪拌し反応させた後, 0.24% (W/V) sodium metabisulfite 50 μ l を加え反応を停止した. 更に 0.8% (W/V) KI 50 μ l, 5 % BSA (SIGMA, RIA grade) 0.5 ml を加えた. 反応は室温で行い, 試薬は特にことわらない限り総て 0.05 M Na-phosphate buffer, pH 7.4 に溶解したものをを用いた.

2) 標識 HP の精製

[¹²⁵I] HP の分離は Agarose-Aminocaproyl-D-Galactosamine (P-L biochemicals, inc.) affinity chromatography で行った. すなわち, 上記反応液を PBS で十分に洗浄した Agarose-Aminocaproyl-D-Galactosamine

(0.6 × 13 cm) にアプライし, free の ^{125}I を洗い去った後, [^{125}I] HP を 0.1 M D-GalNAc 溶液にて溶出した. 操作は総て 4°C で行い, カラムの流速は 12 ml/hr とし, 1 ml の分画を採取した. 放射活性は γ -counter で測定し, 得られた [^{125}I]HP の peak を PBS で透析し更に free の ^{125}I を除いた. 透析後, 既知濃度の非標識 HP を standard にして phenol 法で蛋白量を定量し [^{125}I]HP の濃度を決定した. [^{125}I]HP は分注し凍結保存 (-25°C) し, 必要に応じて融解使用した.

3) 末梢血リンパ球分離と neuraminidase 処理

末梢血リンパ球分離は Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals) を用いた比重遠心法で行った. シリコン処理ガラス試験管 (3 × 10cm, 50ml) に Ficoll-Hypaque 12 ml を入れ, その上にトリス緩衝化 Hank 生理食塩水, pH 7.4 (HBSS) で 2 倍に希釈したヘパリン加末梢血 15ml を静かに重層し, 室温で 400 × G, 30 分間遠心した. 遠心後, 中間層のリンパ球を回収し, 4°C の HBSS で 1 回洗浄 (2000 rpm, 5 min) した. 次に NH_4Cl buffer, pH 7.4 (0.155 M NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA) で 1 回洗浄 (4°C, 2000 rpm, 5 min) (混入赤血球を溶血した後, さらに HBSS で 3 回洗浄 (4°C, 2000 rpm, 5 min) した. その後, 0.05 U/ml の neuraminidase (SIGMA, type IV) で 37°C, 45 分間 incubate し neuraminidase 処理リンパ球分画を得た. リンパ球は HBSS で更に 2 回洗浄 (4°C, 2000 rpm, 5 min) の後, 0.2% BSA, 0.02% NaN_3 を含む HBSS に再浮遊した.

4) 末梢血リンパ球の [^{125}I]HP binding assay

上記リンパ球浮遊液 (2×10^6 /ml), 0.5 ml に 0.4 μg [^{125}I]HP/20 μl を加え, 25°C で 1.5 時間振盪 incubate した. その後, assay mixture の 0.4 ml を HBSS 2 ml に移し, 4°C, 2000 rpm で 15 分間遠心し沈殿, リンパ球結合放射活性を γ -counter で測定した. assay は総て duplicate で行った.

5) 末梢血リンパ球 subpopulation と neuraminidase 処理リンパ球の T cell 比率

末梢血リンパ球 T cell 比率の測定には [^{125}I]

HP binding assay と同一の検体を使用した. すなわち, 末梢血リンパ球を分離し, 混入する赤血球を溶血した後, 検体の一部をとり HBSS で 3 回洗浄 (4°C, 2000 rpm, 5 min) 後, HBSS に再浮遊 (1×10^6 /ml) し, 橋らのリンパ球 subpopulation 微量測定法¹⁹⁾を用いて行った. また neuraminidase 処理リンパ球の T cell 比率の測定も同様に neuraminidase 処理リンパ球の一部を HBSS で 2 回洗浄 (4°C, 2000 rpm, 5 min) 後, HBSS に再浮遊 (1×10^6 /ml) し, 橋らのリンパ球 subpopulation 微量測定法で行った.

結 果

1) [^{125}I]HP の精製 (Fig. 1)

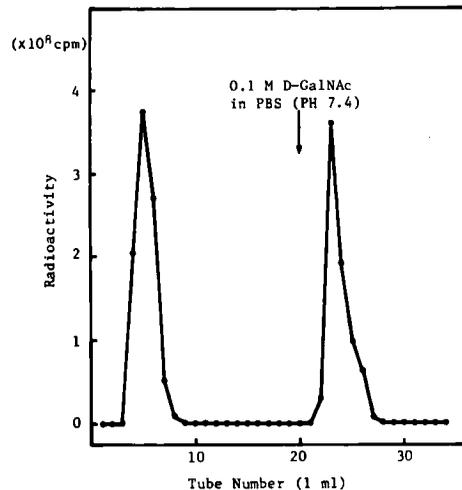


Fig. 1. Purification of ^{125}I -labelled HP using Agarose-Aminocaproyl-D-Galactosamine affinity chromatography. The column size was 0.6 × 12 cm. The flow rate was 12 ml/h. After application of the sample, the column was washed extensively with PBS. The second peak eluted with 0.1 M D-GalNAc (started at arrow) was pooled for ^{125}I -labelled HP binding assay.

chloramine T 法により標識した [^{125}I]HP の分離は Agarose-Aminocaproyl-D-Galactosamine affinity chromatography で行った. Fig. 1. に示す如く, washing buffer により

free の ^{125}I が溶出された後, 0.1M D-GalNAc 溶液により [^{125}I]HP が単一の second peak として溶出された. 標識率は45%であった.

2) [^{125}I]HP binding assay 法の検討

i) HP 結合によぼす HP 量の影響 (Fig. 2)

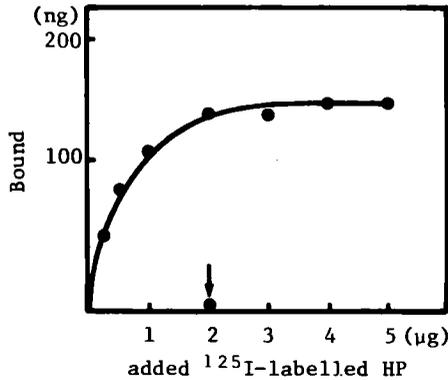


Fig. 2. Effect of ^{125}I -labelled HP concentration on ^{125}I -labelled HP binding to neuraminidase treated human lymphocytes. ^{125}I -labelled HP (0.25-5 μg) was added to 0.5 ml incubation mixture and incubated at 25°C for 90 min. The effect of 0.2 M D-GalNAc on HP binding is also shown (arrow).

リンパ球浮遊液 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) 0.5ml に加える [^{125}I]HP 量を 0.25 μg より 5 μg まで変化させ, 他の条件を一定にして HP 結合量に及ぼす HP 量の影響を検討した. [^{125}I]HP 濃度 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まではリンパ球の [^{125}I]HP 結合量はほぼ直線的に上昇し, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で plateau に達した. 最大結合量は neuraminidase 処理ヒト末梢血リンパ球 1×10^6 あたり 132ng であった. 標準測定法に用いた [^{125}I]HP 0.4 μg を加えた時の結合量は 55ng/ 1×10^6 lymphocytes で最大結合率の41.7%であった. また assay 溶液中に D-GalNAc を最終濃度 0.2M になるように加えると [^{125}I]HP のリンパ球への結合は完全に阻止された.

ii) 反応時間及び温度の影響 (Fig.3)

反応時間を15分より3時間まで変化させHP結合能に及ぼす反応時間の影響を見た. [^{125}I]HP の結合曲線は1.5時間まで上昇し, その後 plateau に達した. 次に反応温度の影響を見る

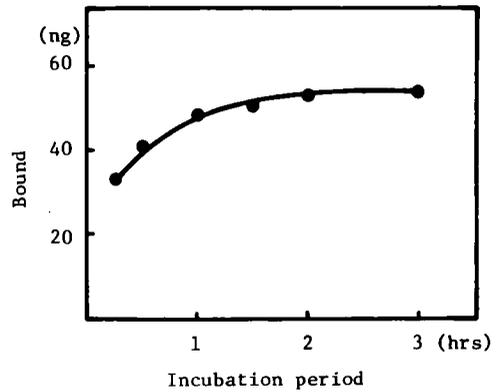


Fig. 3. Time course of ^{125}I -labelled HP binding to neuraminidase treated human lymphocytes. 400 ng of ^{125}I -labelled HP were reacted with 1×10^6 neuraminidase treated lymphocytes in 0.5 ml at 25°C for 15 to 120 min.

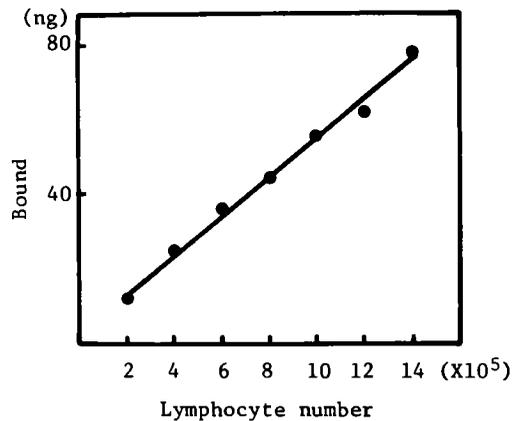


Fig. 4. Effects of lymphocytes number on ^{125}I -labelled HP binding to neuraminidase treated lymphocytes. 400 ng of ^{125}I -labelled HP were reacted with 0.2 to 1.4×10^6 neuraminidase treated lymphocytes in 0.5ml at 25°C for 90 min.

目的で4°C, 25°C, 37°Cの各温度でHP結合能の検討をした. 結合量は25°Cで最大であった. これに比し37°Cで6.2%, 4°Cで17.7%と低値であった. なお25°C, 2時間のincubationのリンパ球の viability は少くとも95%以上であった.

iii) 細胞数の assay に及ぼす影響 (Fig. 4)

assay に使用するリンパ球数を $2 \times 10^5/0.5$ ml より $1.4 \times 10^6/0.5$ ml まで変化させた。 [125 I] HP の結合量は反応液中のリンパ球数に比例して直線的に増加した。

iv) [125 I]HP の結合特異性 (Fig. 5)

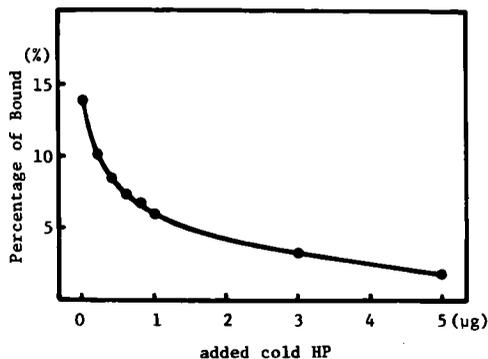


Fig. 5. Displacement curve of lymphocyte bound 125 I-labelled HP by cold HP. Following 400 ng 125 I-labelled HP were preincubated with neuraminidase treated lymphocytes (1×10^6 cells/0.5 ml) at 25°C for 15 min, 0.2 to 5 μ g cold HP were added to assay mixture and further incubated at 25°C for 75 min.

[125 I]HP のリンパ球への結合特異性を非標識 HP を用いて検討した。標準測定法で [125 I]HP をリンパ球に加え 25°C, 15 分 incubate した後、非標識 HP を 0 より 10 μ g/ml まで加え、さらに 75 分 incubate し [125 I]HP の結合量の変化を測定した。非標識 HP を加えない時の [125 I]HP のリンパ球への結合率は 14% で、反応液中の非標識 HP 量の増加に伴い [125 I]HP の結合率は低下した。10 μ g/ml の非標識 HP 存在下での [125 I]HP 結合率は約 2% であった。

v) リンパ球の neuraminidase 処理条件の HP 結合に及ぼす影響

リンパ球浮遊液 (4×10^6 /ml) に neuraminidase を最終濃度 0.025, 0.05, 0.075 (U/ml) となるよう加え、37°C, 45 分間 incubate した。それぞれの処理で得たリンパ球の [125 I]HP 結合量を比較検討したが、結合量に差はなかった。

3) 末梢血リンパ球 neuraminidase 処理の E rosette 形成率に及ぼす影響 (Fig. 6)

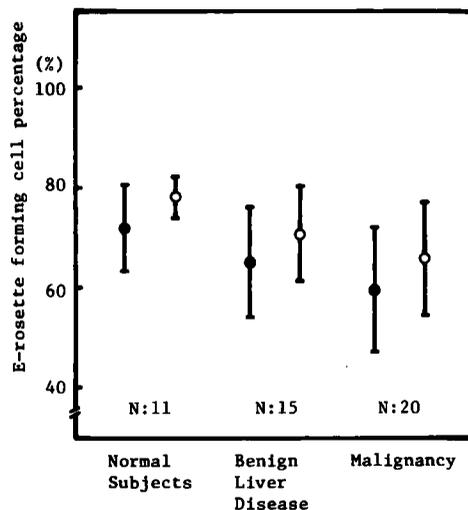


Fig. 6. Effect of neuraminidase treatment of lymphocytes on the percentage of E rosette forming cells. ●; without neuraminidase treatment, ○; with neuraminidase treatment, (M \pm SD), N; number.

neuraminidase 処理前リンパ球の E rosette 形成率は、健常人 $72.0 \pm 8.6\%$ (M \pm SD), 良性肝疾患患者 $65.2 \pm 11.2\%$, 悪性腫瘍患者 $59.5 \pm 12.5\%$ であった。これに対して neuraminidase 処理リンパ球の E rosette 形成率は健常人 $77.9 \pm 4.2\%$, 良性肝疾患患者 $70.6 \pm 9.6\%$, 悪性腫瘍患者 $65.5 \pm 11.6\%$ であり、neuraminidase 処理は E rosette 形成率に影響をきたさないと考えられた。

考 案

悪性腫瘍患者における末梢血 T cell の異常を考察する研究の手段として、T cell の surface marker と考えられる T cell の HP 結合活性の測定法の基礎的検討を行った。

Helix pomatia A hemagglutinin は Helix pomatia のアルブミン腺より単離されるレクチンで分子量は 7900 であり、6 個の subunit より構成されている。各 subunit は分子量約 1300 で 1 個の糖結合部位をもつことが報告¹¹⁻¹³⁾されている。HP は α -D-GalNAc に対して強い結合特異性を示し、糖結合親和力は α -D-GalNAc > α -D-GlcNAc > β -D-GalNAc の

順に減じることが知られている¹⁴⁾。

ヒト赤血球に対する HP の結合特異性を見ると、HP は B 型、O 型赤血球には結合しないが、A 型赤血球には結合し血球凝集を起こす。しかし、B 型、O 型赤血球も neuraminidase 処理により、HP 結合活性を持つようになることが知られている^{12,15)}。

ヒト末梢血リンパ球と HP との相互作用は無処理リンパ球では認められないが、neuraminidase 処理でリンパ球表面のシアル酸をはずすと、HP に対する receptor が出現し HP の結合が可能になることが示されている。しかし、HP にはリンパ球活性化能はない。また HP に対する receptor を有するリンパ球の大部分が T cell であることが知られている^{16,17)}。なお HP は monocyte には結合しないと報告¹⁰⁾されている。

以上の性質をもつ HP を ¹²⁵I で標識し末梢血リンパ球との結合能測定の基礎的検討を行った。HP の標識は chloramine T 法¹⁸⁾で行い標識率は 45%であった。^{[125I]HP}の分離精製は Hammarström 等の方法¹⁵⁾を用いず、Agarose-Aminocaproyl-D-Galactosamine affinity chromatography を用い、良好な結果を得た。

^{[125I]HP} は neuraminidase 処理した後のみリンパ球に結合し、その結合は D-GalNAc により完全に阻害された。また assay 溶液中に非標識の HP を加えることにより ^{[125I]HP} の結合は著明に阻害され、^{[125I]HP} は非標識の HP と同じ結合特異性を有することが確認された。

^{[125I]HP} 結合活性測定にはリンパ球 1×10^6 、^{[125I]HP} $0.4 \mu\text{g}$ を用いることにより結合率 13.8%と充分な^{[125I]HP}の結合を得ることができた。また、^{[125I]HP}量 $4 \mu\text{g/ml}$ で結合量はほぼ plateau に達した。反応溶液中のリンパ球数 $3 \times 10^6/\text{ml}$ までは ^{[125I]HP} 結合量は細胞数に比例して上昇した。以上より ^{[125I]HP} binding の標準測定法として neuraminidase 処理リンパ球 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 、^{[125I]HP} $0.8 \mu\text{g/ml}$ を、25°C で 1.5 時間 incubate することを採用した。なお HP receptor を表出させる為のリンパ球の neuraminidase 処理はリンパ球濃度 4×10^6

/ml, neuraminidase 最終濃度 0.05 U/ml で 37°C, 45 分間の incubate で充分であった。

HP を含め種々のレクチンに対するリンパ球膜表面の receptor の性状にはなお不明な点が多い。Concanavalin A などの強いリンパ球活性化能をもつレクチンは D-mannose, N-acetyl-D-glucosamine に強い結合特異性を示すことが知られている。一方、HP も含めリンパ球活性化能をもたないレクチンは一般に galactose-D-GalNAc に対し強い結合特異性を示すといわれている²⁰⁾。

soy bean agglutinin (SBA) は D-GalNAc > D-galactose の順に結合特異性を持ち、結合特異性が HP に類似している^{21,22)}。同様無処理のリンパ球にはほとんど結合しないが、HP と異なり neuraminidase 処理後の T, B cell 両方に結合活性を有し、リンパ球活性化能をもっている。リンパ球表面の HP 及び SBA に対する receptor の検討で 2 種類の receptor の存在が示唆²³⁾され、一方の receptor は HP, SBA の両方に結合するが、他の receptor は SBA のみに特異的に結合し、HP には結合しないとされている。更に、HP, SBA 両方に結合する receptor は T cell のみに存在し、SBA のみに特異的結合する receptor は T, B cell 両方に存在するとされており、このため HP は T cell のみに結合すると考えられている。

HP は neuraminidase 処理した T cell に特異的に結合するとされているが、最近の検討では健常人の末梢血リンパ球に極く少数の HP に対する receptor をもつ B cell の存在が指摘されている。しかし、B cell の HP 結合活性は T cell のそれに比し弱く、HP 結合活性をもつ B cell は HP receptor をもつ細胞全体の約 1%程度を占めるにすぎない²³⁾。HP receptor を持つ B cell の subset は臍帯血中、慢性 B cell リンパ球白血病で増加することが知られている²⁴⁾が、ヒト癌での上昇は検討されていない。

今回の ^{[125I]HP} binding assay では末梢血リンパ球全体を使用したので assay 系への B cell の影響も否定できない。しかし、健常人では HP 結合活性に B cell の関与は無視し得るものと思われる²⁴⁾。また消化器癌患者の場合に

於ても結合活性を有すると思われる immature B cell²⁴⁾ が特異的に著名に増加しているとは考えられないので、B cell の HP 結合測定に及ぼす影響は少ないものと考えられる。更に B cell の影響を除く為 T cell のみを分離した場合には一部 T cell の未回収の可能性が強く、症例間の比較が困難となると思われるので、今回の研究では末梢血リンパ球全体を $[^{125}\text{I}]\text{HP}$ binding assay に使用した。

なお、第2編で述べるように末梢血リンパ球中の T cell の $[^{125}\text{I}]\text{HP}$ に対する結合活性の計算には、neuraminidase 処理末梢血リンパ球の $[^{125}\text{I}]\text{HP}$ 結合活性と同一検体中の E rosette 形成細胞の比率を用いる為、neuraminidase 処理がリンパ球の E rosette 形成率に与える影響について若干の検討を加えた。リンパ球の neuraminidase 処理により T cell と羊赤血球との rosette 形成がより安定になるという報告²⁵⁾ に一致して、neuraminidase の E rosette 形成率は処理前に比べ軽度上昇の傾向を認めはしたが、上昇率は悪性腫瘍、良性肝疾患、健康人のいずれにおいても有意の差はなく、neuraminidase 処理はヒト末梢血リンパ球の T cell 比率に影響を与えないと考えた。

T cell 機能と HP 結合活性との関連についてはまだ検討が加えられておらず、細胞膜表面糖鎖の変化と細胞機能の関係を研究する上にお

いて T cell subset の HP 結合活性の検討は意義あるものと考えられる。また各種疾患、殊に悪性腫瘍で細胞性免疫機能或いは T cell subset の異常が生じている可能性があり、これ等疾患で末梢血リンパ球の HP 結合活性を測定、比較検討することも意味あることと考えられる。後者について著者等は最近若干の検討を加えたので第2編⁹⁾においてこれを報告する。

結 語

- 1) $[^{125}\text{I}]\text{HP}$ の末梢血リンパ球に対する結合能測定法の基礎的検討を行った。
- 2) ヨードラベル化は HP の結合特異性に影響を与えなかった。
- 3) $[^{125}\text{I}]\text{HP}$ binding assay には 0.5ml の反応溶液中にヒト末梢血リンパ球 1×10^6 個、 $[^{125}\text{I}]\text{HP}$ 0.4 μg を加え、25°C、90分 incubation する方法が適当と考えられた。
- 4) 末梢血リンパ球 neuraminidase 処理は E rosette 形成に有意な影響を与えなかった。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導・御校閲頂いた長島秀夫教授ならびに終始直接御指導下さった有馬暉勝講師に深謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は、第23回日本消化器病学会合同秋季大会で発表した。

文 献

1. 折田薫三：消化管癌と細胞性免疫。最新医学 31, 1902-1910, 1976.
2. Bone, G. and Lauder, I. : Cellular immunity, peripheral blood lymphocyte count and pathological staging of tumours in the gastrointestinal tract. *Br. J. Cancer* 30, 215-221, 1974.
3. Bolton, P.M., Mander, A.M., Davidson, J.M., James, S.L., Newcombe, R.G. and Hughes, L.E. : Cellular immunity in cancer : comparison of delayed hypersensitivity skin tests in three common cancers. *Brit. Med. J.* 3, 18-20, 1975.
4. Garrioch, D.B., Good, R.A. and Gatti, R.A. : Lymphocyte response to P.H.A. in patients with nonlymphoid tumors. *Lancet* 1, 618, 1970.
5. 菊地浩吉, 井口進：細胞性免疫異常および不全と内科疾患—悪性腫瘍。日本臨床 36, 1002-1010, 1978.
6. 漆崎一郎, 新津洋司郎, 石谷邦彦, 池田晃：消化管と免疫—NK 活性など。最新医学 37, 1186, 1982.
7. 新保敏和, 矢田純一, 中川俊郎, 漆畑修, 松元正：ヒト IgG-Fc receptor 陽性 T リンパ球の検出法と各種疾患における変動。臨床免疫 9, 141-145, 1977.
8. 新保敏和, 矢田純一, 日江井歌子, 菅原真智子, 斎藤祺一, 谷村修：悪性固型腫瘍患者における IgG-Fc

- リセプター陽性 T 細胞の意義について. 臨床免疫 9, 487-493, 1977.
9. 安原高士, 有馬暉勝, 成木仁, 国司研介, 洲脇謹一郎, 北昭一, 長島秀夫: 消化器癌患者におけるリンパ球 subpopulation および T cell subsets. 消化器と免疫 3, 174-178, 1979.
 10. Dillner, M.-L., Hammarström, S. and Perlmann, P.: The lack of mitogenic response of neuraminidase-treated and untreated human blood lymphocytes to divalent, hexavalent, or insoluble Helix pomatia A hemagglutinin. *Exp. Cell. Res.* 96, 374-382, 1975.
 11. Hammarström, S. and Kabat, E.A.: Purification and characterization of a blood-group A reactive hemagglutinin from the snail Helix pomatia and a study of its combining site. *Biochemistry* 8, 2696-2705, 1969.
 12. Hammarström, S.: Structure, specificity, binding properties, and some biological activities of a blood group A-reactive hemagglutinin from the snail Helix pomatia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 234, 183-197, 1974.
 13. Hammarström, S.: Snail (Helix pomatia) hemagglutinin. *Methods in Enzymology* 34, 368-383, 1972.
 14. Hammarström, S.: Carbohydrate binding specificity of four N-acetyl-D-galactosamine-specific lectins: Helix pomatia A hemagglutinin, soy bean agglutinin, lima bean lectin, and Dolichos biflorus lectin. *Biochemistry* 16, 2750-2755, 1977.
 15. Hammarström, S.: Binding of Helix pomatia A hemagglutinin to human erythrocytes and other cells. Influence of multivalent interaction on affinity. *Scand. J. Immunol.* 2, 53-66, 1973.
 16. Hammarström, S., Hellström, U., Perlmann, P. and Dillner, M.-L.: A new surface marker on T lymphocytes of human peripheral blood. *J. Exp. Med.* 138, 1270-1275, 1973.
 17. Hellström, U., Hammarström, S., Dillner, M.-L., Perlmann, H. and Perlmann, P.: Fractionation of human blood lymphocytes on Helix pomatia A hemagglutinin coupled to Sepharose bead. *Scand. J. Immunol.* (Suppl. 5) 5, 45-55, 1976.
 18. Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S.: The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89, 114-123, 1963.
 19. 橘武彦, 吉田明子: ヒトの T 細胞, B 細胞微量測定法. 免疫実験操作法 A: 455-462, 1978.
 20. 大沢利昭: mitogen によるリンパ球の活性化, 代謝 12, 583-592, 1975.
 21. Hellström, U., Dillner, M.-L., Hammarström, S. and Perlmann, P.: The interaction of nonmitogenic and mitogenic lectins with T lymphocytes: Association of cellular receptor sites. *Scand. J. Immunol.* 5, 45-54, 1976.
 22. Novogrodsky, A. and Katchalski, E.: Transformation of neuraminidase treated lymphocytes by soybean agglutinin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70, 2515-2518, 1973.
 23. Hellström, U., Perlmann, P., Robertsson, E.S. and Hammarström, S.: Receptors for Helix pomatia A hemagglutinin (HP) on a subpopulation of human B cells. *Scand. J. Immunol.* 7, 191-197, 1978.
 24. Hellström, U., Mellstedt, H., Perlmann, P., Holm, G. and Pettersson, D.: Receptors for Helix pomatia A hemagglutinin on leukaemic lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Clin. Exp. Immunol.* 26, 196-203, 1976.
 25. Galili, U. and Schlesinger, M.: The formation of stable E rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or of sheep red blood cells. *J. Immunol.* 112, 1628-1634, 1974.

**Helix pomatia A hemagglutinin binding activity to peripheral
T-lymphocytes in malignant digestive tract diseases
Part 1: Assay method based on ^{125}I -labelled Helix pomatia A
hemagglutinin binding to peripheral lymphocytes**

Takashi YASUHARA

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. H. Nagashima)

For studying aberrant cellular immunity in malignant digestive tract diseases, Helix pomatia A hemagglutinin (HP) binding activity, a T cell surface marker, to peripheral lymphocytes was studied in patients with digestive tract cancer. In this paper, basic experiments on an assay method based on ^{125}I -labelled HP binding to neuraminidase-treated peripheral lymphocytes are described. HP was labelled with ^{125}I using the chlormine-T method, and the purification of ^{125}I -labelled HP was achieved by agarose-aminocaproyl-D-galactosamine affinity chromatography.

The results show that ^{125}I -labelled HP could specifically bind to neuraminidase-treated lymphocytes as cold HP. The optimum assay condition was determined to be: 1×10^6 neuraminidase-treated peripheral lymphocytes incubated with $0.4 \mu\text{g}$ ^{125}I -labelled HP in 0.5 ml of reaction mixture at 25°C for 90 min with gentle shaking.

In addition, the effect of treatment of peripheral lymphocytes with neuraminidase on E-rosette formation was studied. Enhancement of E-rosette formation by neuraminidase-treatment was not statistically significant.