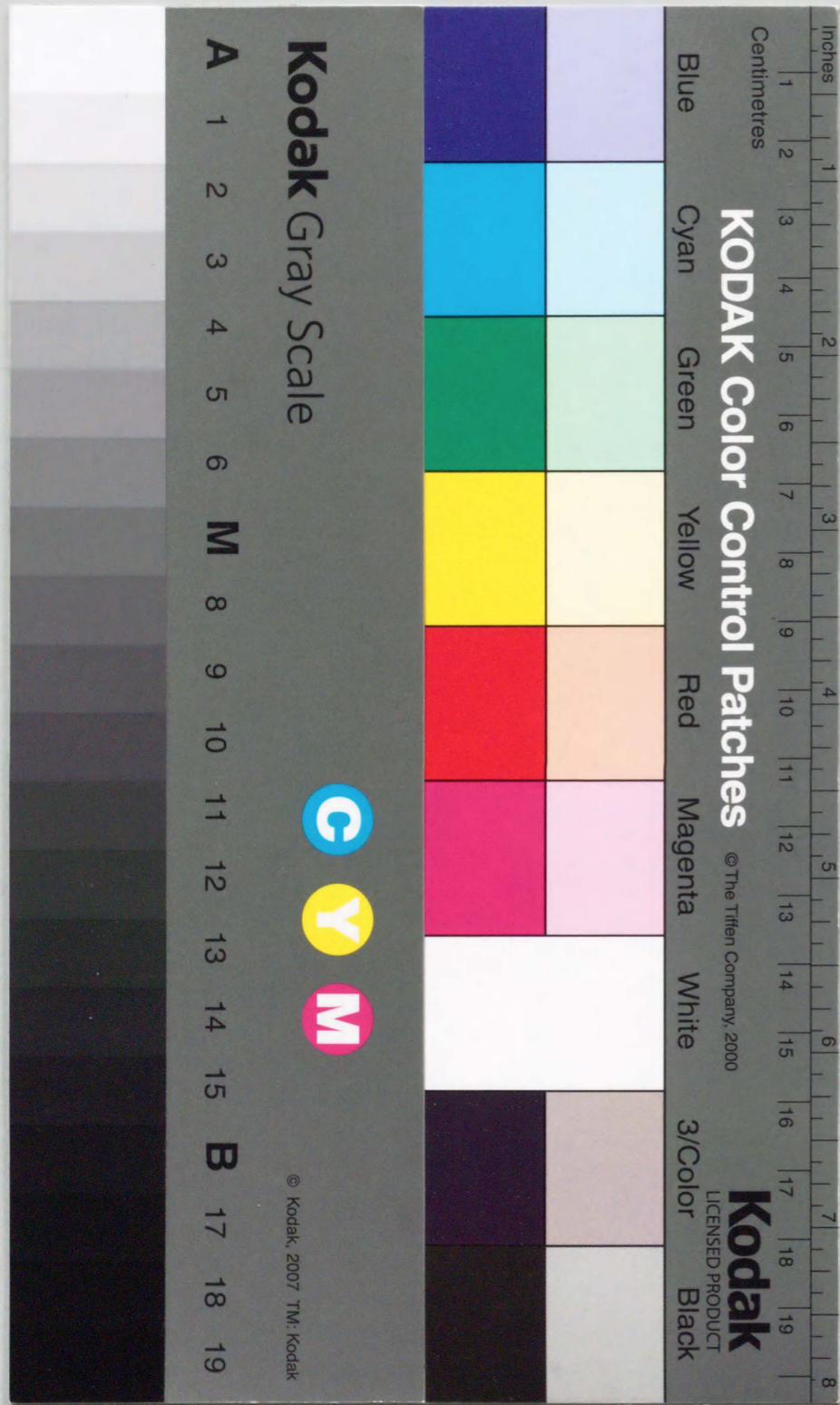


Title	慢性関節リウマチ患者末梢血血清中に認められた細胞傷害性因子
Author(s)	島岡, 康則
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3060204
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University



主論文

① 慢性関節リウマチ患者末梢血血清中に認められた細胞傷害性因子
Serum Cytotoxic Factor in Rheumatoid Arthritis

島岡 康則
YASUNORI SHIMAOKA

大阪大学整形外科教室
Department of Orthopaedic Surgery, Osaka University Medical School

Key Words : 慢性関節リウマチ (Rheumatoid arthritis) ,
細胞障害性因子 (Cytotoxic factor) ,
全身性組織傷害 (Systemic tissue damage) ,
末梢血血清 (Peripheral blood serum)

〔抄録〕

重症活動性RA患者の末梢血血清には、自己末梢血単核球に対し細胞傷害活性を持つものがあることを見いだした。我々はこの血清から細胞障害性物質をゲルろ過により中心分子量900kdに粗精製した。この物質は、TNF- α などのサイトカイン、補体系の物質、また、protease、collagenase、PLA₂などの分解酵素とも異なった。この物質は、生理的濃度で、正常末梢血単核球を傷害し、また、種々のヒト細胞株を非特異的に傷害した。この因子が抽出されたRA患者は、急速かつ高度な関節破壊と強い全身性組織傷害を伴っていた。以上、RA患者末梢血血清中に、RAの全身性組織傷害に関与し、これまでに報告のない特異な細胞傷害を起こす物質を見いだした。

ABSTRACT

The peripheral blood serum of patients with severe active rheumatoid arthritis (RA) was found to have a cytotoxic effect on autologous mononuclear cells. The cytotoxic factor was partially purified and shown to have a molecular weight of about 900 kd, using gel filtration.

The factor differed from cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and also differed from complement components. It also differed from hydrolytic enzyme such as protease, collagenase, and phospholipase A₂. It destroyed normal peripheral blood mononuclear cells in vitro at the same concentration as it found in vivo, and also nonspecifically destroyed such human cell lines as CCRF-CEM, Raji, U-937, and HL-60. Each RA patient with this serum cytotoxic factor had severe systemic tissue disease as well as rapid and severe destruction of most joints. Thus, we have identified a cytotoxic factor in RA serum which causes systemic tissue damage.

〔緒言〕

慢性関節リウマチ (RA) 患者では、関節破壊以外にも、貧血、骨粗鬆症や、種々の器官に見られるフィブリノイド壊死など、さまざまな全身性の組織傷害を認める。局所破壊については、関節軟骨への滑膜組織の侵入など、そのメカニズムが解析されているものもある。ところが、RA患者にみられる全身性の組織傷害については全く不明である。

我々は、今回、重症RA患者の未分画血清そのものが自己末梢血単核球を傷害する例があることを見いだした。またこの細胞傷害が分子量 900 kd の物質によることを見いだした。全身性組織傷害を伴うRA患者に認める因子による、このような細胞破壊はこれまで見いだされていなかったもので、これを報告する。

〔患者及び方法〕

1) 対象患者

大阪大学医学部附属病院にて加療中の37歳から64歳 (平均47 \pm 8.3歳) の女性の慢性関節リウマチ患者7例を対象とした。患者は、いずれもアメリカリウマチ協会の慢性関節リウマチ診断基準 (1987年)¹⁾ をみたす者とした。また、本研究の6ヶ月以内に、いかなるステロイド投与も受けていない者とした。

正常コントロールとしては、炎症性疾患、免疫異常を認めない38歳から47歳の健常者4例 (男2例、女2例、平均年齢43 \pm 4.7歳) を選んだ。

2) 検体血清

末梢血を採取し、凝血させた後 800 g、15分遠沈し、血清を分離した。採取血清は実験まで -80 °C にて凍結保存した。

3) 細胞分離

末梢血をヘパリン加にて採取し、Ficoll/Paque (Pharmacia, Piscataway, NJ) 比重分離法にて、末梢血単核球 (PBMC) を分離した。細胞はリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline、PBS) にて3回洗浄した後、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin、及び、5% 胎児牛血清を含む培養液 RPMI 1640 に浮遊させた。

4) 自己末梢血単核球によるDNA合成

各患者及び健常者より得た PBMC を 0.25% の phytohemagglutinin (PHA,

Wellcome Diagnostics, Dartford, England)にて刺激し、96穴マイクロタイタープレートにて、 1×10^5 /well(200 μ l)の濃度で、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で72時間培養した。このとき、各患者及び健常者の50%自己血清添加群、非添加群を作成した。

培養終了の4時間に、1 μ Ci/wellの³H-thymidine (³H-TdR)を添加し、その取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

5) サイズ排除クロマトグラフィー (Size-exclusion Chromatography) による血清成分の分画

10 mlの血清を、高速液体クロマトグラフィーシステム (high-performance liquid chromatographic gel filtration system (TSK gel G4000 SW, Toso Co., Ltd., Japan))にて分画した。溶離液は0.5 M NaClを含む0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4)とし、流速3 ml/minで、1分毎に各分画を採取した。各分画を、YM5 ultrafiltration membrane (Amicon Co., MA, Ireland)にて1.8 mlに濃縮し、PBSで透析した後、2.0 mlに調整し実験に用いた。

6) 正常末梢血単核球のDNA合成に対する分画成分の影響

健常者より得られた正常PBMCをPHAにて刺激し、 1×10^5 /well(200 μ l)の濃度にて、各分画血清を20 μ l添加した後、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂にて72時間培養した。DNA合成は前述の方法で、同様にして測定した。

7) 細胞傷害性活性

各分画血清の細胞への傷害性を次の2つの方法で評価した。即ち1) トリパンプルー染色による生存細胞数の算定 2) tetrazolium salt dye、3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)²⁾・³⁾を用いた高速比色定量法 (rapid colorimetric assay) である。MTTはミトコンドリアの脱水酵素 (mitochondrial dehydrogenase) で紫色に変色する。即ち、生存細胞のみがMTTを分解し得るので、これにより生存細胞数を評価することができる。実際には、5 μ g/mlの濃度のMTTをPBS中に溶解し、この20 μ lをマイクロプレートの各wellに加え37 $^{\circ}$ C、4時間培養する。この後に0.01 N 塩酸を含むsodium laurylsulfateを50 μ l加えて可溶化し、ImmunoReader NJ-2001 (Nippon InterMed K.K., Japan)にて、570 nmでの吸光度 (optical density, O.D.) を測定した。

標的細胞：検体の細胞障害性を知るための標的細胞として、健常者より得た正常PBMC、及び以下の各種ヒト細胞株を用いた。即ち、バーキットリンパ腫

(Burkitt's lymphoma)より樹立されたリンパ芽球様細胞株 (lymphoblast-like cell line) であるRaji細胞、急性リンパ芽球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia) 患者の末梢血より樹立されたTリンパ芽球系細胞株 (T lymphoblastoid cell line) であるCCRF-CEM細胞、前骨髄急性白血病 (promyelocytic leukemia) 患者の末梢血より樹立された前骨髄球系細胞株 (promyelocytic cell line) であるHL-60、及び、組織球腫 (histiocytic lymphoma) より樹立された単球様細胞株 (monocyte-like cell line) であるU-937を用いた。

測定：0.5 μ g/mlのmitomycin C (MMC)を含む100 μ lの培地に、PBMCは、 2×10^6 cells/wellの濃度で、その他の細胞株については、 2×10^5 cells/wellの濃度で、それぞれ37 $^{\circ}$ Cにて8時間培養した。

この後に、40 μ l (20%) の分画血清、及び60 μ lのRPMI 1640を加え、さらに20時間培養した。ここでトリパンプルー染色により、細胞生存率 (cell viability) を算出した。また同時にMTTを用いた高速比色定量法により、細胞傷害性 (cytotoxicity) を傷害された細胞の百分率で評価し、以下のように算出した。

細胞傷害性 (cytotoxicity)

= damaged cells (%)

$$= \frac{\text{O.D. (positive control)} - \text{O.D. (experimental)}}{\text{O.D. (positive control)}} \times 100$$

8) 熱耐性

分画血清を56 $^{\circ}$ C、30分あるいは、85 $^{\circ}$ C、5分、pH 7.4で熱処理した後直ちに氷冷し、細胞傷害性が失われるかを測定した。

9) 分解酵素活性

protease活性は、Protease Substrate Gel Kit (Bio-Rad, Richmond, CA)⁴⁾を用いて測定した。このゲルキットは、1% agarとbovine caseinを含んでおり、検体がproteaseを含んでいれば、その周囲に透明な円が形成され、その直径から活性が測定される。また、このゲルキットにより、serum plasmin、trypsin、 α -chymotrypsin、及びpronase活性が測定できることが証明されている。このゲルキットにおける最小測定感度はtrypsin換算34 unit/mlであった。

collagenase活性は基質としてfluorescein isothiocyanate (FICT)標識した type I collagen (Koragen Gijutsu Kenshukai, Japan)を基質として用いた溶液法 (solution method) ⁶⁾を用いた。酵素活性は、上清中に分解遊離した FICT標識コラーゲンを495 nm(excitation)、520 nm(emission)にて蛍光強度を測定し評価した。

phospholipase A₂ (PLA₂) 活性は、東城及び小野^{6),7)}の方法に従った。即ち、PLA₂により遊離された脂肪酸を9-anthryldiazomethaneで誘導体化し、これを逆相高速液体クロマトグラフィーで分離し、254nmの紫外部吸収により検出した。margaric acidを内部標準として、各々の脂肪酸量を定量した。反応系には、5 mM CaCl₂、及び、基質として 0.8 mM 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol (Avanti Polar Inc. Co.)、5mM sodium cholate、0.1M NaCl、0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)を含み、これに検体を加えた。PLA₂ 活性は、1分当たりのオレイン酸の放出を nmoles で表した。

10) 統計的解析

測定値の結果は全て平均±標準偏差で表した。

[結果]

1) PBMCのDNA合成に対する自己血清の効果

PHA刺激自己PBMC 1×10⁵ cells / well(200μl)に、各々の自己血清 100 μl (50%)を加えて培養した。健常者では、血清の添加により全例で、³H-TdRの取り込みは上昇した。これに対して、RAでは、7例中4例に、³H-TdRの取り込みの上昇を認め、3例に、³H-TdRの取り込みの明かな減少を認め、DNA合成の抑制が認められた (Fig. 1.)。これより、この3例のRA患者の血清中には、細胞増殖を抑制する、または細胞傷害性に働く物質が含まれると考えられた。

2) 正常PBMCのDNA合成に対する分画血清の効果

健常者1例及び上記のRA患者3例の血清をサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、各々No. 31からNo. 70までの40分画に分離した。この各分画の、PHA刺激正常PBMCのDNA合成に対する効果を調べた。PHA刺激PBMCを、20μlの健常者分画血清 (Fig. 2. -□-)、またはRA患者分画血清 (-■-)を加えて3日間培養し³H-TdRの取り込みを測定した。対照として、培地のみ (● p.c.)で培養したときの³H-TdRの取り込みを測定した。各分画を加えたときの³H-TdRの取り込みが低下している部分は、この分画にDNA合成抑制性の物質が含まれること

を示している。

PHA刺激PBMCを培地のみで培養したときの³H-TdRの取り込みは、128,030±3,327 d.p.m.であった。健常者の分画血清を加えたとき、³H-TdRの取り込みは、いずれの分画においても116,520 d.p.m.以上であり、DNA合成の抑制は認められなかった。RA患者の分画血清を加えたときの³H-TdRの取り込みは2つの分画で抑制された。即ち、Fraction No. 42 (平均分子量 900kd)とFraction No. 56 (平均分子量 280kd)である。Fraction No. 42での抑制は、RA患者3例すべてに強く認められた (平均³H-TdR、1,486±2,144 d.p.m.)。これに対しFraction No. 56での抑制は、軽度であり (平均³H-TdR、80,462±98,020 d.p.m.)、3例中1例では、全く抑制効果を持たなかった。

以下の実験では、最もDNA合成に対する抑制効果の強かった Fraction No. 42について調べた。

3) Fraction No. 42の細胞障害性

MMC処理した細胞に対するFraction No. 42の効果を調べた。40μlのFraction No. 42を各wellに加え、24時間培養後、トリパンブルー染色し、生存細胞数を算定した。このときの生存細胞数を、培養開始前の細胞数に対する比 (細胞生存率、cell viability)で評価した。

生存細胞数は、正常PBMC、Raji細胞、CCRF-CEM細胞、HL-60細胞、及び、U-937細胞で、それぞれ53.9±6.1%、24.5±8.4%、11.1±10.1%、84.3±7.2%、46.1±6.4%にいずれも減少した (Tab. 1.)。従って、Fraction No. 42によりDNA合成抑制というよりは、むしろ細胞の傷害が引き起こされていることが明らかになった。

さらにFraction No. 42の各種ヒト細胞株に対する細胞傷害性をMTTを用いた高速比色定量法で検討した。細胞傷害性は、正常PBMC、Raji細胞、CCRF-CEM細胞、HL-60細胞、及び、U-937細胞で、それぞれ45.2±6.4%、77.6±3.6%、94.6±0.7%、10.4±1.6%、40.6±6.1%であった (Tab. 1.)。標的細胞として用いた細胞株により感受性に差は認めるものの、Fraction No. 42は、すべての細胞を非特異的に傷害した。mitomycin C 処理したCCRF-CEM細胞を24時間培養した後の顕微鏡写真を Figure 3. に示す。Figure 3Aは培地のみで培養したもの、Figure 3Bは Fraction No. 42を40μl 加えて培養したものである。Fraction No. 42を添加することにより、細胞が著しく破壊され、細胞数も明らかに減少している。以下の実験では、最も感受性の高かったこの CCRF-CEM 細胞を標的細胞として、Fraction No. 42の細胞傷害性を調べた。Fraction No. 42の細胞傷害性の濃度依存性を調べた。5μlから40μlの範囲で容量依存性に細胞傷害性が増加し

た (Fig. 4.)。

サイトカインの中でも腫瘍壊死因子 (TNF- α) は、ある種の腫瘍細胞にたいして細胞傷害性を持つことが知られている。そこで我々は、TNF- α の細胞傷害性についても、MTTを用いた同様の手技で調べた。250 U/mlの recombinant human TNF- α (Genzyme, Cambridge, MA)の細胞傷害性は、正常PBMCに対しては、 2.0 ± 2.4 であった。また、CCRF-CEM細胞に対しても同様にその細胞傷害性はほとんど認めなかった (表 1)。

4) Fraction No. 42持つ細胞障害性の熱耐性

Fraction No. 42 の細胞傷害性の熱耐性を検討した。56°C、30分処理でも、その傷害性は全く低下せず、この細胞傷害性は補体系の物質によるものではないと考えられた。また、85°C、5分処理においても傷害性の低下は認められず、Fraction No. 42 の細胞傷害性は熱に対して安定であることがわかった。

5) Fraction No. 42の分解酵素活性

Fraction No. 42によって引き起こされる細胞傷害のメカニズムを知るために、いくつかの分解酵素活性を調べた。もとの全血清、および Fraction No. 42について、protease活性、collagenase活性、及び、PLA₂活性を調べた。いずれの検体にもprotease活性、collagenase活性は検出されなかった。PLA₂活性は、もとの血清では 137.4 ± 28.8 nmol/min/mlと高い活性を認めたが、Fraction No. 42では 2.1 ± 0.8 nmol/min/mlと活性は低く、混入によるものと考えられた。

[考案]

刺激された末梢血単核球のDNA合成が、in vivoで、さまざまなメカニズムによって抑制されることは知られている。ところがRA末梢血血清が、自己の末梢血単核球の生存細胞数を減少させ、非特異的な細胞破壊を引き起こすことはこれまで報告がない。そこで我々は、このような特異な細胞傷害を引き起こす物質が何であるかを検証することにした。この物質は、細胞傷害性を持つサイトカインであるTNF- α やLymphotoxin (TNF- β)とは明らかに異なると考えられた。なぜならば、これらのサイトカインは正常な細胞は破壊せず、腫瘍細胞などの病的細胞のみを破壊するからである。このことをより明確にするために、我々は recombinant human TNF- α を用いて本実験と同条件で、その細胞傷害性を調べた。報告されている生体内での TNF- α 活性は、RA関節液も含めて、高々 25 U/ml^{8), 9), 10)}である。この 10 倍の活性の TNF- α (250 U/ml)を用いたが、細胞はほとんど傷害を受けなかった。また、この物質は、56°C、30分の熱

処理にても失活せず、抗原-抗体-補体系の物質とも異なる考えた。さらに我々は、この物質を粗精製したFraction No. 42の分解酵素活性について検討した。この分画にはprotease活性、collagenase活性は認めなかった。PLA₂活性は 2.1 nmol/min/ml 認め得た。しかし、これは全血清中の活性の1.53%と非常に低い活性であり、Fraction No. 42 の細胞障害性は、PLA₂とも異なると考えられた。これを明確にするために、ヒト関節液及び尿より、別の方法^{7), 11)}で抽出したPLA₂を、Fraction No. 42の100倍活性で用い、同様の実験を行ったが、細胞傷害性は示されなかった。従って、Fraction No. 42 の細胞障害性は、PLA₂によるものではないと結論した。以上、現在のところ、この物質によって引き起こされる細胞傷害のメカニズムは不明である。

この物質はゲルろ過分画では分子量 900kd にピークを持ち、血清中と同濃度で細胞を破壊し、またもとの血清そのものも細胞傷害性を示すことから生体内でも直接細胞を破壊すると考えられた。ただし現在のところ部分精製の段階であるので、その生化学的特性は、まだ解明されていない。

この細胞傷害性因子が抽出されたRA患者3例は、全て激しい全身症状を伴っており、我々の提唱するRA病型分類¹²⁾では、ムチランス型 (mutilating disease、MUD) に分類された。これまで、RAの局所の組織傷害に関しては多くの研究がなされてきた。我々も、罹患関節部近傍骨髄で、IL-1活性、PMN因子 (polymorphonuclear cell factor、PMN factor) 活性が極めて高く¹³⁾、関節破壊を引き起こし得ることを報告した。ところが、RAの全身性組織傷害に関しては、これまでほとんど報告がなかった。本報告は、全身性の組織傷害を説明する因子として、RA末梢血血清中の細胞傷害性物質を見いだしたものである。精製、特性の検討及び臨床的意義に関しては続報を予定している。

[謝辞]

稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御校閲をいただきました、大阪大学医学部整形外科教室小野啓郎教授、環境医学教室越智隆弘教授に深謝致します。また、本実験のPLA₂測定に関し御協力いただいた分子生理化学教室の小松原孝則氏に、御礼を申し上げます。

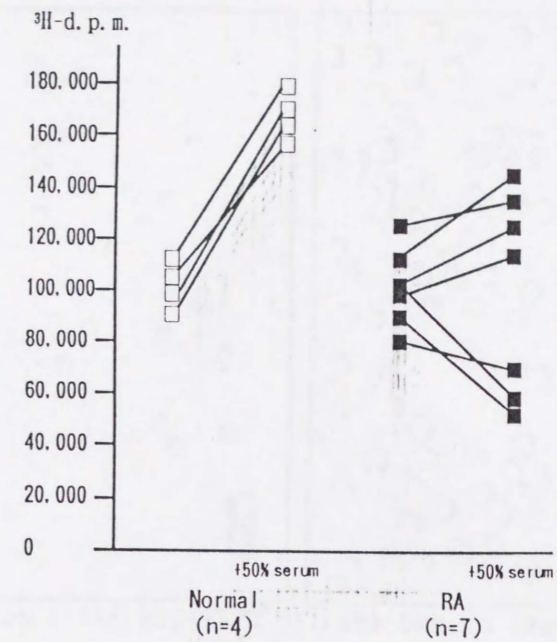
[参考文献]

- 1) Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., McShane D.J., Fries J.F., Cooper N.S., Healey L.A., Kaplan S.R., Liang M.H., Luthra H.S., Medsger T.A. Jr., Mitchell D.M., Neustadt D.H., Pinals R.S., Schaller J.G., Sharp J.T., Wilder R.L. and Hunder G.G. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31: 315-324, 1988.
- 2) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63, 1983.
- 3) Green L.M., Readé J.L., Ware C.F., Devlin P.E., Liang C.-M. and Devlin J.J. Cytotoxic lymphokines produced by cloned human cytotoxic lymphocytes : II. a novel CTL-produced cytotoxin that is antigenically distinct from tumor necrosis factor and α -lymphotoxin. *J. Immunol.* 137: 3488-3493, 1986.
- 4) Bierrum O.J., Ramlau J., Clemmesen I., Ingild A. and Børg-Hansen T.C. An artefact quantitative immunoelectrophoresis of spectrin caused by proteolytic activity in antibody preparations. *Scand. J. Immunol. Suppl.* 2: 81-88, 1975.
- 5) Terato K., Nagai Y., Kawanishi K. and Yamamoto S. A rapid assay method of collagenase activity using ^{14}C -labeled soluble collagen as substrate. *Biochim. Biophys. Acta* 445: 753-762, 1976.
- 6) Tojo H., Ono T., Kuramitsu S., Kagamiyama H. and Okamoto M. A phospholipase A_2 in the supernatant fraction of rat spleen. *J. Biol. Chem.* 263: 5724-5731, 1988.
- 7) Tojo H., Ono T. and Okamoto M. Spleen phospholipase A_2 . *Methods in Enzymology* 197: 390-399, 1991.
- 8) Maury C.P.J. and Teppo A.-M. Tumor necrosis factor in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism.* 32: 146-150, 1989.
- 9) Fukukawa S., Matsubara T., Jujoh K., Yone K., Sugawara T., Sasaki K., Kato H. and Yabuta K. Peripheral blood monocyte/macrophages and serum tumor necrosis factor in Kawasaki disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 48: 247-251, 1988.
- 10) Hopkins S.J., Meager A. Cytokines in synovial fluid : II. the presence of tumour necrosis factor and interferon. *Clin. exp. Immunol.* 73: 88-92, 1988.
- 11) Pruzanski W., Vadas P., Stefanski E., Urowitz M.B. Phospholipase A_2 activity in sera and synovial fluids in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Its possible role as a proinflammatory enzyme. *J. Rheumatol.* 12: 211-216, 1985.
- 12) Ochi T., Iwase R., Yonemasu K., Matsukawa M., Yoneda M., Yukioka M. and Ono K. Natural course of joint destruction and fluctuation of serum C1q levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31: 37-43, 1988.
- 13) Wakitani S., Sakamuro D., Ochi T., Owaki H., Fujimoto M. and Ono K. Polymorphonuclear cell factor found in patients with rheumatoid arthritis. *Biomedical Res.* 9: 395-399, 1988.

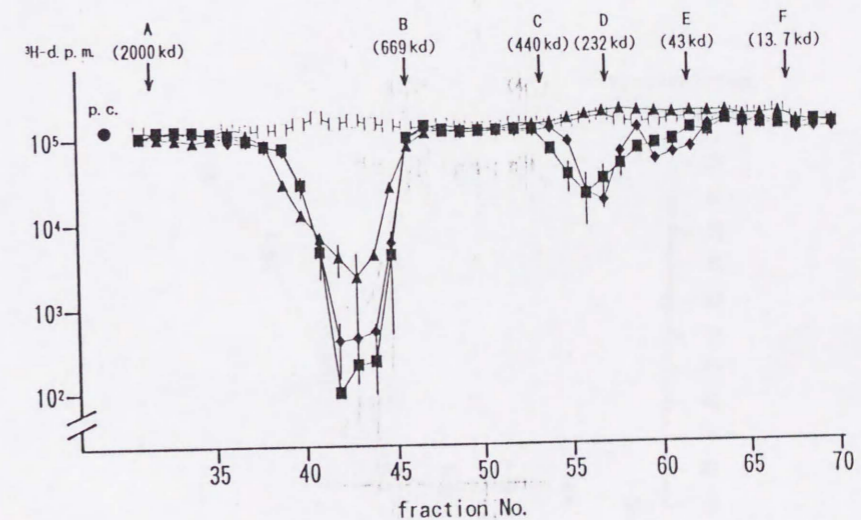
	fraction No. 42 40 μ l (20 %)		TNF- α 250 U/ml
	cell viability (%)	cytotoxicity (damaged cell %)	cytotoxicity (damaged cell %)
PBMC	53.9 \pm 6.1	45.2 \pm 6.4	2.0 \pm 2.4
Raji	24.5 \pm 8.4	77.6 \pm 3.6	1.0 \pm 2.5
CCRF-CEM	11.1 \pm 10.1	94.6 \pm 0.7	2.0 \pm 2.4
HL-60	84.3 \pm 7.2	10.4 \pm 1.6	0.1 \pm 2.8
U-937	46.1 \pm 6.4	40.6 \pm 6.1	20.8 \pm 2.3

[Table 1.] Cytotoxicity of fraction No.42 and TNF- α .

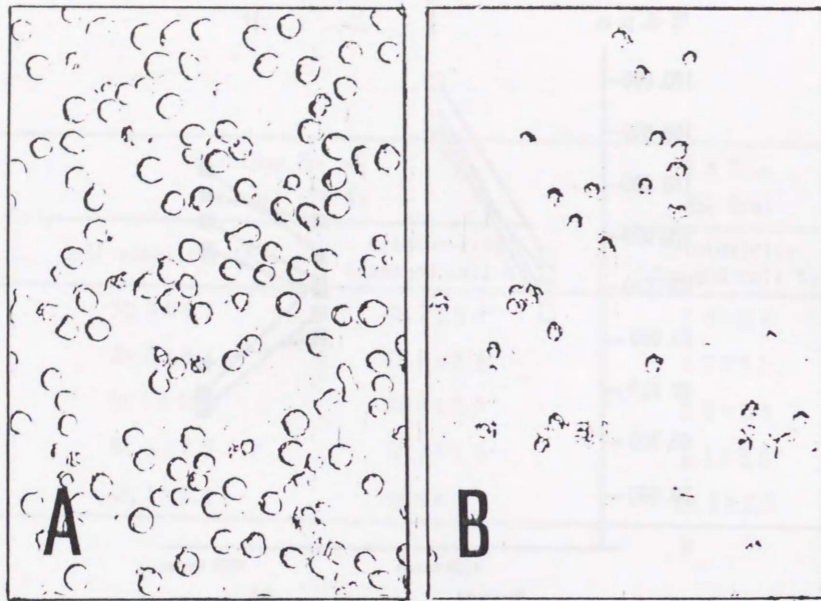
MMC-treated cells were cultured with fraction No.42 or with TNF- α . Cell viability (%) was assessed using trypan blue staining. Cytotoxicity shows the percentage of damaged cells and was assessed using a rapid colorimetric assay employing MTT.



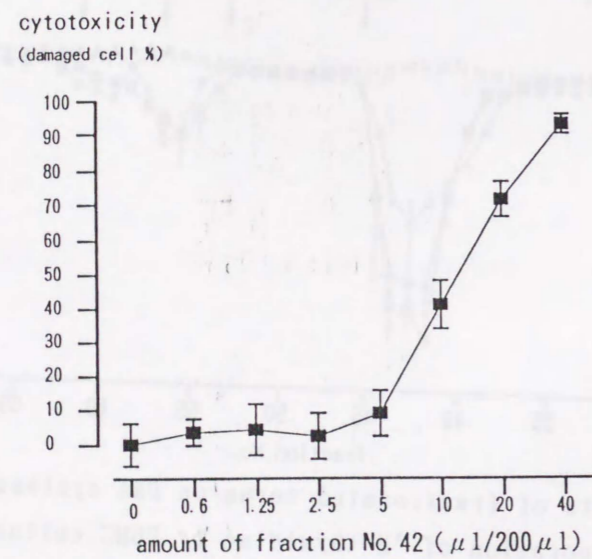
[Figure 1.] Effect of serum on DNA synthesis by autologous PBMC.
 □ : healthy adults (n=4). ■ : RA patients (n=7).
 ; +50% serum : cultures with 50% autologous serum.



[Figure 2.] Effects of fractionated serum on DNA synthesis by PBMC.
 ; ● p.c. : incorporation of 3 H-thymidine by PBMC cultured with medium only.
 ; ■, ◆, ▲ : incorporation of 3 H-thymidine by PBMC cultured with fractions from RA serum.
 ; □ : incorporation in cultures with fractions from a healthy adult.
 ; 'A' to 'F' are the following molecular weight markers : blue dextran 2000 (A), throglobulin (B), ferritin (C), catalase (D), ovalbumin (E), and ribonuclease A (F). Values are the mean \pm SEM of triple wells.



[Figure 3.] Micrograph of MMC-treated CCRF-CEM cells cultured with or without fraction No. 42.
 (A), Cultured for 24 hours with medium only. (B), Cultured with 40 μ l of fraction No. 42. Many cells have been destroyed and their number is decreased. (magnification x 100).



[Figure 4.] Dose-dependent cytotoxicity of fraction No. 42.
 Cytotoxicity was assayed using CCRF-CEM cells as the targets.
 Cytotoxicity increased depending on the amount of fraction No. 42 added to cultures from 5 μ l to 40 μ l.