

<原 著>

Protein A 結合羊赤血球を用いた, プラーク法による 免疫グロブリン分泌細胞の検出

大阪赤十字病院 小児科¹⁾, 同 検査部²⁾, 濱田小児科³⁾

田中晴樹¹⁾ 森田耕輔¹⁾ 鶴和美穂¹⁾ 宋 大光¹⁾ 杉峰啓憲¹⁾ 坂本晴子¹⁾
濱田実保¹⁾³⁾ 葭井操雄¹⁾ 森本武志¹⁾ 住本真一¹⁾ 山本英彦¹⁾ 金岡裕夫¹⁾
新居正甫¹⁾ 伊藤容子²⁾ 河村ゆき江²⁾

Hemolytic Plaque Assay for human Immunoglobulin Secreting Cells using Sheep Red Blood Cells.

Haruki TANAKA¹⁾, Kousuke MORITA¹⁾, Miho TSURUWA¹⁾, Daiko SO¹⁾,
Yoshinori SUGIMINE¹⁾, Haruko SAKAMOTO¹⁾, Miho HAMADA¹⁾³⁾, Misao YOSHII¹⁾,
Takeshi MORIMOTO¹⁾, Shinichi SUMIMOTO¹⁾, Hidehiko YAMAMOTO¹⁾,
Hiroo KANAOKA¹⁾, Masahiko NII¹⁾, Youko ITO²⁾, Yukie KAWAMURA²⁾
*Department of Pediatrics¹⁾, Laboratory branch²⁾ and Hamada Children's Clinic³⁾
Osaka Red Cross Hospital*

Key words : プロテインA, プラーク法, 免疫グロブリン分泌細胞

はじめに

現在, 免疫系の検索は, 自然免疫, 獲得免疫に整理され, 特に前者のToo-like Receptorの解析が進んでいるが, 後者の, 中でも免疫グロブリン産生系の重要さは論を待たないであろう。

歴史的には, Eby¹⁾らにより羊赤血球 (SRBC) を標的とした免疫グロブリン産生が報告され, Gronowicz²⁾らによりProtein A結合SRBCを標的としたマウスでの系が報告された。この後上記方法のヒトに対する応用も証明され³⁾, 我々も1979年より上記方法で検討を加えてきたので報告する。

原 理

SRBCに塩化クロム法 (CrCl₃・6H₂O) でProtein Aを結合し, 免疫グロブリン (Ig) 分泌細胞と混合すると, 産生されたIgがProtein Aと結合し, これに抗Ig抗体を加え免疫学的に

結合させ, さらに補体を加えてSRBCの溶血をプラークとして観察した。(図1)

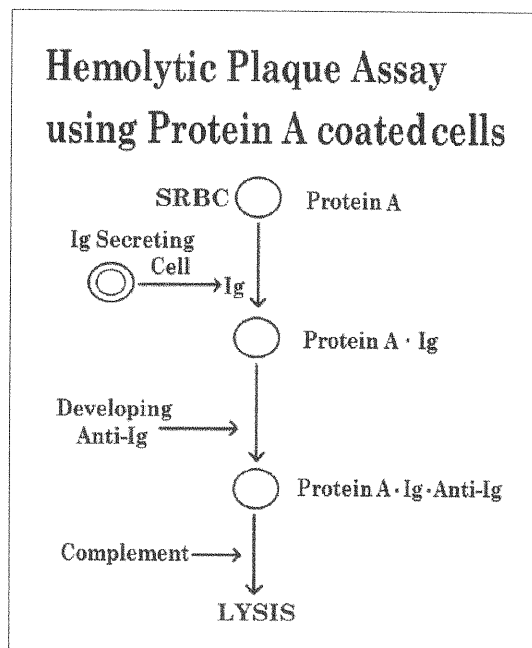


図1 Protein A結合SRBCによるプラーク法の原理

方 法

A) Pokeweed mitogen (PWM) による抗体産生系

1. 培養液RPMI1640に10%FCS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のKanamycin, 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ のPWMになるように調整する。
2. ヘパリン加静脈血を採取し, 分離した単核球を $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整する。
3. 上記単核球40 μl を培養液200 μl に浮遊させ, 96穴のNunc Microwel中で7日間炭酸ガス培養器にて培養した。但し培養4日目に培養液を半量交換した。

B) プラーク産生系

1. Gronowiczらに従い, 生食で3回洗浄したSRBC, 0.5 μg のProtein A, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の塩化クロムを1:1:10で混和し, 30°Cで1時間培養し, Protein A結合SRBCを作成した。
2. 上記A) の培養細胞100 μl とProtein A結合SRBC40 μl , 透析後10倍希釈とした抗ヒト免疫グロブリンを20 μl , モルモット血清をSRBCで吸収した補体を20 μl 混合し, Cunningham Chamberにいれ, 炭酸ガス培養器でOver Nightで培養ののち, プラーク産生細胞 (PFC) を算定した。(図2)

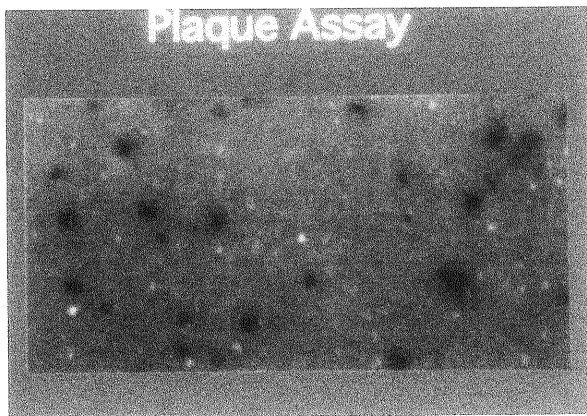


図2 プラークの実際：ほぼ均一なプラーク

3. なお生細胞はトリパンブルーで確認し, 全プラーク数よりPWMなしで培養したブ

ランクを引き, 1×10^6 個の生存リンパ球当たりのプラーク数で表記した。なお顕微鏡にて1プラークに1個のリンパ球しかないことも確認した。(図3)

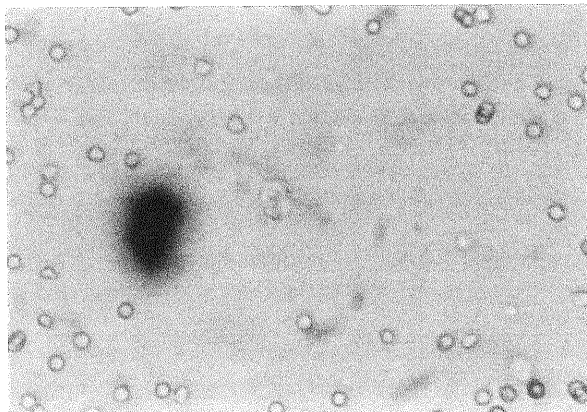


図3 プラークの実際：1個のプラークの顕微鏡写真

結 果

1. まず培養系の基礎的実験として, PWM刺激によるPFCのKineticsを培養3, 5, 7, 9日後のプラーク数で検討した。(図4) IgG, IgA, IgM分泌細胞はいずれも7日目にピーク値を得た。以降すべて7日間培養のうゑ結果を算定した。

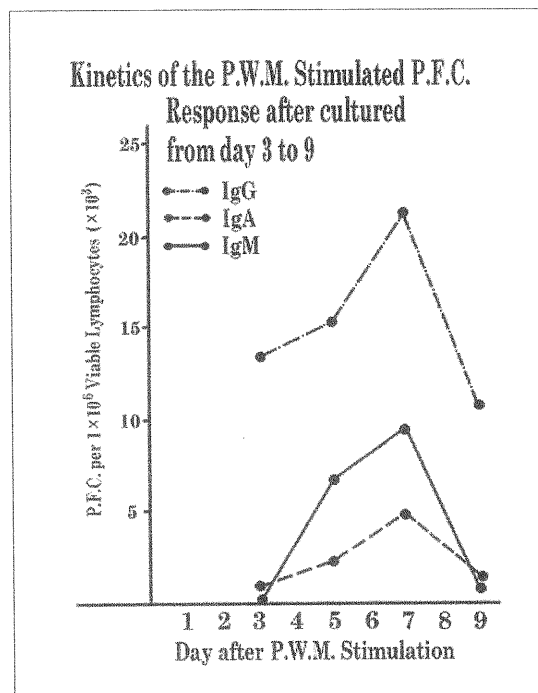


図4 各培養後日数でみるプラーク数

2. 健康成人8名の抗体産生能について検討した。(図5, 表) IgG, IgA, IgMすべてで 10^6 個当たり1万個以上の分泌細胞を確認でき, それまでの方法と比べ感度も高く, 臨床応用に充分可能であると思われた。

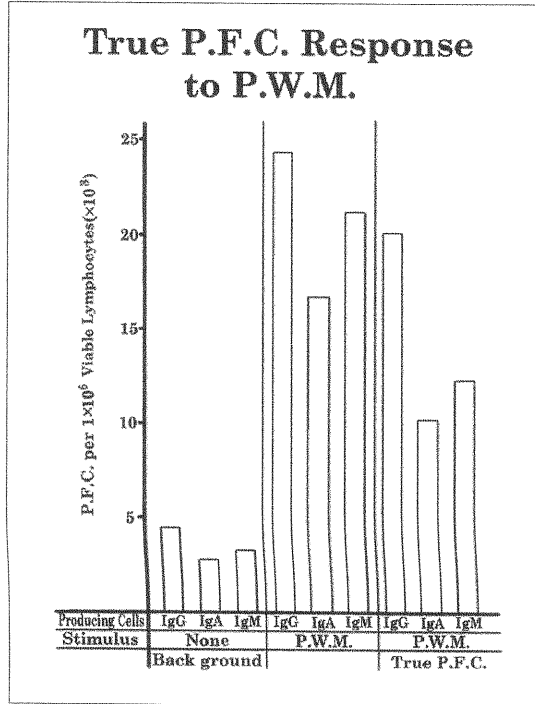


図5 PWMに対するプラーク数の実際

表 健康成人でみるプラーク産生細胞数
但し 1×10^6 個生細胞当たりの産生数

Subject	IgG	IgA	IgM
1	14967	3109	6545
2	13272	5199	6540
3	31956	22492	30516
4	24296	nd	16536
5	12221	3338	8942
6	10754	5637	7101
7	18000	16473	33709
8	27760	22062	26445
Mean	19153	11187	17042
SD	7896	8827	11544

考 察

PWMの系はT細胞とB細胞の協同作用をみているため, 個別の働きそのものを確認できるわけではないが, 臨床的な原発性免疫不全症候群の診断には有用性が高く, 1980年台までは多用されてきた。現在は責任遺伝子の解明と狂牛病問題でFCSが使用不可となり, その有用性にかげりがあるが, cell to cellの反応を直接的に観察できることより, 残されるべきモデルであると思われる。なお最近では, この系を用いて, ホルモン産生細胞の同定に使用されている。⁴⁾

謝 辞

本研究は故山下一氏の多大なご協力のもとに成功した。ここに感謝の意を表明し謝辞とする。また上記正常値は本実験に携わった成人ボランティア8名の協力による。

文 献

- 1) W. C. Eby, C. A. Chong, et al: Enumerating Immunoglobulin-Secreting Cells among Peripheral Human Lymphocytes. A Hemolytic Plaque Assay for a B Cell Function. J. Immunol. 115: 1700-1703, 1975.
- 2) E. Gronowicz, A. Countinho, et al: A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class. Eur. J. Immunol. 6: 588-590, 1976.
- 3) 西川伸一, 平田健雄, et al: Protein A結合ヒツジ赤血球を標的にしたヒト免疫グロブリン産生細胞のプラーク法による検出. 免疫実験操作法VII: 2163-2166, 1978.
- 4) F. R. Boockfor, M. Fidan: Reverse hemolytic plaque assays: versatility in the study of secretion. Methods 33: 273-280, 2004.