ノ ー ト

リンパ球とグリセリンおよびアルブミン溶液中の フルオレッセイン蛍光偏光スペクトルの比較

橋 本 康 男・篠 崎 直 美

横浜船員保険病院内科 横浜市保土ヶ谷区釜台町 137 (〒240)

(1990 年 6 月 28 日受理)

A Comparative Study on Fluorescein Fluorescence Polarization Spectra between Lymphocytes and Glycerol or Albumin Solutions

Yasuo HASHIMOTO and Naomi SHINOZAKI

Department of Internal Medicine, Yokohama Seamen's Hospital, 137 Kamadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240

(Received June 28, 1990)

1. 緒 言

リンパ球がレクチンによって活性化するとき、リンパ球に種々の生物学的変化がおこる事は広く知られている^{1,2,3)}。いわゆる細胞質粘性の変化もその中の一つであるが³⁾、それは次の様な方法で測定される。フルオレッセイン分子を細胞内に導入し、細胞を蛍光標識し、その蛍光偏光度を測定する。蛍光偏光度は、フルオレッセイン分子のブラウン運動の程度を意味するが、更に正確に表現すれば、蛍光偏光度はフルオレッセイン分子と微細構造を構成しているタンパク質との相互作用及びフルオレッセイン分子間の相互作用などを反映する。リンパ球の活性化によってリンパ球の微細構造も変化し、その変化が蛍光偏光度に反映される。細胞内のフルオレッセイン分子の状態をより正しく理解するため、我々は2種類のモデル系、即ちグリセリン溶液とアルブミン溶液を用いて、同じ様な測定条件で蛍光偏光度を求めて、リンパ球の蛍光偏光度の意味、更にリンパ球内のフルオレッセイン分子の状態について、若干の考案を行った。

2. 対照と実験材料

末梢血リンパ球は健常人 4~5 人から採取した。ダルベッコりん酸緩衝液 (Dulbecco's PBS, 以下 D's PBS と略す) は阪大微研, フルオレッセイン・ディアセテート (Fluorescein diacetate, FDA) はイーストマン・コダック社, 牛血清アルブミン (以下 BSA と略す) とグリセリンは和光純薬, フルオレッセイン (free acid) (以下フルオレッセインと略す) 及びフルオレッセイン・2 Na (以下ウラニンと略す) はシグマ社より購入した。他の機材の入手方法は既に報告した⁴⁾。

3. 方 法

3.1 リンパ球分離

人末梢血をカルボニル鉄粉で処理し、比重遠心法でリンパ球を分離し、細胞濃度を 5×10^6 cells/ml に調整し、リンパ球浮遊液を作成した。詳細なリンパ球の分離法は既に報告した⁴⁾。

3.2 リンパ球の蛍光偏光度の測定

リンパ球の蛍光偏光度の測定には偏光装置についた日立 MPF-4 型蛍光分光光度計を用いた。励起波長を 470

nm に設定し、スリット巾を 20 nm とし、測定波長をスリット巾 10 nm で、5 nm おきに 500 nm から 550 nm まで変動させた。0.6 μ M の FDA を含む D's PBS 3 ml に 10^6 個のリンパ球を浮遊させ、1 cm キュベットに移し、既述の蛍光分光光度計の恒温セルホルダーにとりつけ、蛍光偏光度を測定した。細胞内蛍光成分はあらかじめ濾過法で求められた細胞外液の蛍光成分を細胞浮遊液の蛍光成分から差し引いて求めた。蛍光分光光度計のグレーティング・ファクター (grating factor) を G とし、細胞内の蛍光強度の平行成分と垂直成分を各 $I_{\parallel}$, $I_{\perp}$ とすると細胞の蛍光偏光度 (P) は $P = (I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}) / (I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp})$ から求められる。リンパ球の蛍光偏光度の観測波長依存性は次の様に求められた。励起波長を 470 nm (スリット巾 20 nm) と 450 nm (スリット巾 20 nm) の 2 種類に設定し、測定波長を 500 nm から 550 nm まで 5 nm おきに変動させ、スリット巾 10 nm で蛍光偏光度を測定した。各観測波長において、6~7 回の測定を行い、その平均と標準偏差を求めた。リンパ球の蛍光偏光度の詳細な測定法は既に報告した⁴⁾。

3.3 グリセリン溶液の蛍光偏光度の測定

98.5% のグリセリン液に D's PBS (pH 7.4, 290 mOsm/kg, Ca (-)) を加えて 67% のグリセリン溶液を作り、それに高濃度のフルオレッセイン液又はウラン液を極微量加えて、種々のフルオレッセイン濃度を示すグリセリン溶液を作成した。グリセリン溶液の蛍光偏光度の観測波長依存性は次の様に求めた。励起波長を 470 nm (スリット巾 10 nm) 及び 450 nm (スリット巾 10 nm) に設定し、観測波長をスリット巾 5 nm で、5 nm 又は 10 nm おきに 500 nm から 550 nm まで変動させ蛍光偏光度を測定した。1 cm キュベット中に 3 ml のグリセリン水溶液を入れ、1 回の測定ごとに良く混和し、励起光による蛍光色素の分解の影響を防いだ。測定温度は 27°C である。

3.4 BSA 溶液の蛍光偏光度の測定

BSA を D's PBS (pH 7.4, 290 mOsm/kg, Ca (-)) に溶かし、濃度を 6×10^{-5} M に調整した。微量のフルオレッセインを加えて、種々の濃度のフルオレッセイン溶液を作成した。フルオレッセイン含有 BSA 溶液の蛍光偏光度の観測波長依存性は、グリセリン溶液の蛍光偏光度の測定の場合と同じ条件で行った。

4. 結 果

4.1 リンパ球の蛍光偏光度の観測波長依存性

Fig. 1 は非刺激リンパ球の蛍光偏光度の観測波長依存性を示す。各ポイントは 6~7 回の実験の平均と標準

Fig. 1 Emission wavelength dependence of fluorescence polarization values of unstimulated lymphocytes. The fluorescence polarization values of lymphocytes were measured from 500 nm to 550 nm by the emission monochromator. The excitation wavelength was set at 470 nm (—●—) or at 450 nm (---○---) with a slit width of 20 nm.

偏差である。蛍光偏光度は観測波長領域 (500 nm~550 nm) において観測波長に移動するにつれて低下する傾向を示し、最低値は 505 nm から 515 nm の間にあった。励起光が 450 nm の場合の蛍光偏光度は 470 nm のそれに比してより高い値を示す。

4.2 フルオレッセイン含有グリセリン溶液の蛍光偏光度の観測波長依存性

Fig. 2 はフルオレッセインを含む 67% グリセリン溶液の蛍光偏光度の観測波長依存性を示す。各値は 3 回の測定の平均値である。フルオレッセイン濃度が 1×10^{-6} M から 3.3×10^{-5} M の間では、蛍光偏光度は観測波長に影響されず一定であったが、フルオレッセイン濃度が 1×10^{-4} M の場合、観測波長が 515 nm より短波長に移動するに従って蛍光偏光度は著しく低下した。励起光が 470 nm と 450 nm の場合の蛍光偏光スペクトルを比較すると、フルオレッセイン濃度が 1×10^{-6} M の場合、両者の間に差はないが、 1×10^{-4} M の場合、励起光が 470 nm の場合の蛍光偏光スペクトルの方が、450 nm のそれに比して有意に低い。

4.3 BSA 溶液の蛍光偏光度の観測波長依存性

Fig. 3 は、BSA 濃度が 6×10^{-5} M で、フルオレッセイン濃度が 2.5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 3.3×10^{-6} M, 1×10^{-5} M の場合の BSA-PBS 溶液の蛍光偏光度の観測波

Fig. 2 Emission wavelength dependency of fluorescence polarization values of 67% glycerol solution (pH 7.4) at four concentrations of fluorescein (free acid). The fluorescence polarization values of 67% glycerol solution were measured from 500 nm to 550 nm by the emission monochromator with a slit width of 5 nm. The measurement was performed at four concentrations of fluorescein (free acid); 10^{-6} M (●), 10^{-5} M (◐), 3.3×10^{-6} M (○) and 10^{-4} M (◑). The excitation wavelength was set at 470 nm (—) or 450 nm (---) with a slit width of 10 nm.

長依存性を示す。BSA-PBS 溶液のフルオレッセイン濃度が低下するに従って、蛍光偏光度は高くなった。上記のフルオレッセイン濃度において、観測波長が 525 nm より短波長に移動するに従って、蛍光偏光度は急激に低下した。

5. 考 察

リンパ球の細胞質の蛍光偏光度を測定する方法が開発されて以来、その蛍光偏光度の蛍光スペクトルが^{2, 3}の研究によって報告された^{3, 6, 7)}。我々は新しい測定方法で、リンパ球の蛍光偏光スペクトルを求めたが、我々の結果は Cercek^{3, 7)} 及び木下ら⁶⁾の結果と異なり、Meisingset ら⁷⁾の結果と一部一致した。

6. 要 約

リンパ球の蛍光偏光スペクトルと、種々の条件のグリセリン溶液とアルブミン溶液の蛍光偏光スペクトルを測

Fig. 3 Emission wavelength dependency of fluorescence polarization values of bovine serum albumin solution (6×10^{-5} M, pH 7.4) at four concentrations of fluorescein (free acid). The fluorescence polarization values were measured from 500 nm to 550 nm by the emission monochromator with a slit width of 5 nm. The measurement was performed at four concentrations of fluorescein (free acid); 2.5×10^{-7} M (●), 10^{-6} M (◐), 3.3×10^{-6} M (○), and 10^{-5} M (◑). The excitation wavelength was set at 470 nm with a slit width 10 nm.

定した。グリセリン溶液とアルブミン溶液においても蛍光強度が高くなると蛍光偏光度が低下した。リンパ球の蛍光偏光スペクトルのパターンはアルブミン溶液と、高濃度 (10^{-4} M) 蛍光色素を含むグリセリン溶液のそれに類似した。この様にモデル系での測定結果が細胞を用いた場合の結果と類似しているため、前報の測定法が有用であると思われる。

7. 謝 辞

本論文を作成するに当たり、貴重な御助言を頂きました大阪大学理学部物理学教室、木下修一先生に深謝致します。

文 献

- 1) P. A. Insel, H. R. Bouren, P. Coffino, and G. M. Tomkinson: Science **190**, 896 (1975).
- 2) M. Inbar, M. Shinitzky, and L. Sachs: FEBS Letters **38**, 268 (1974).

- 3) L. Cercek, and B. Cercek: *Europ. J. Cancer* **13**, 903 (1977).
- 4) 橋本康男, 篠崎直美: *分光研究*, **38**, 95 (1989).
- 5) L. Cercek, B. Cercek, and C. H. Ockey: *Biophys. J.* **23**, 395 (1978).
- 6) S. Kinoshita, T. Fukami, Y. Ido, and T. Kushida: *Cytometry* **8**, 35 (1987).
- 7) K. K. Meisingset, and H. B. Steen: *Cytometry* **1**, 272 (1981).