Protein A プラーク法による リゾチーム分泌単球の検出法

日野田 裕治・藤田 英雄・谷内 昭

A detection method of lysozyme-secreting monocytes by a protein A plaque assay

Yuuji Hinoda, Hideo Fujita and Akira Yachi

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College, Sapporo

【Summary】

The detection of lysozyme-secreting monocytes was studied by a protein A plaque assay using the Cunningham chamber. When the optimal concentrations of anti-lysozyme serum and Guinea Pig serum for the plaque formation were selected, the number of plaque forming cells reached maximum after 3 hours incubation. Under these conditions $18.4 \pm 8.0\%$ of separated mononuclear cells by Ficoll-Conray method were found to form plaques. This data indicated that the sensitivity to detect the lysozyme-secreting cells was markedly improved in comparison with the method using an agarose layer. The removal of adherent cells from mononuclear cells decreased the number of plaques. It was thus ascertained that the plaque forming cells were made up of monocytes.

Key words: Protein A plaque assay, Lysozyme, Monocyte

【概 要】

カニンガムチェンバーを用いた protein A プラーク法によってリゾチーム分泌単球の検出を試み以下の結果を得た。

1. 出現プラーク数は抗リゾチーム血清および補体の至適濃度において、incubation 時間3時間でプラトーに達した。
2. これらの条件下に Conray-Ficoll 法で分画される末梢血単核細胞の $18.4 \pm 8.0\%$ がプラークを形成し、従来のアガロース法に比較して著明な検出感度の改善を認めた。
3. 単核細胞から付着性細胞を除去することにより出現プラーク数は著明に減少し、プラークが単球に由来するものであることが確認された。

I. 緒 言

末梢血単球が細胞内にリゾチームを保有することは、組織化学的方法によって早くから明らかにされていた¹⁾。しかしその分泌動態については1974年 Gordon ら²⁾が

札幌医科大学第1内科

単球培養上清中のリゾチームを種々の条件下に測定するに及んではじめて詳細な情報が得られた。これに対してまったく新しいアプローチとして、最近 Smith ら³⁾は protein A プラーク法を応用し、個々の細胞レベルでリゾチーム分泌が観察できる可能性を示した。今回筆者らは、Smith らの報告したアガロース法にかえてチェンバ

表 1 Effect of antibody concentration and incubation time on plaque formation of lysozyme-secreting cells

No.	plaques/ 10^5 mononuclear cells			
	antibody concentration			
	1:200	1:400	1:600	1:800
1	21,736	31,391	17,802	13,802
2	18,571	19,302	12,573	10,497
3	15,935	16,069	13,535	4,067

No.	plaques/ 10^5 mononuclear cells			
	incubation time (hr)			
	1	2	3	4
1	7,001	23,536	34,204	34,096
2	18,148	18,802	22,993	21,032
3	16,735	20,869	21,403	20,203

一法を用いることにより検出感度の改良を試みたので報告する。

II. 対象および方法

1. 対 象

健康成人および当科入院患者 15 名 (28~56 歳) を対象としたが、悪性腫瘍、膠原病患者は含まれていない。

2. 方 法

1) Protein A プラーク法

末梢血より Ficoll-Conray 法で分離した単核細胞 2×10^5 個/ml の $100 \mu\text{l}$ 、教室の今井ら⁴⁾の方法により protein A (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) を結合したヒツジ赤血球の 20% 浮遊液 $50 \mu\text{l}$ 、抗リゾチーム血清 (Hoechst, Germany) の 1:50 希釈 $25 \mu\text{l}$ 、モルモット血清の 1:4 希釈 $25 \mu\text{l}$ を混合し、その $100 \mu\text{l}$ を Cunningham chamber (TAKAHASHI GIKEN GLASS) に封入した後、 37°C 3 時間 incubate し光顕下に出現プラーク数を算定した。medium はすべて MEM を用い、実験操作はチェンバー封入直前まで常に 4°C で行った。

2) 付着細胞の除去

単核細胞 RPMI 1640-10% FCS 浮遊液 ($1 \sim 2 \times 10^6$ /ml) の 3 ml を径 60 mm のプラスチックシャーレに入れ、 37°C 1 時間 incubation 後非付着細胞を回収した。

図 1 Percentage of plaque forming cells in peripheral blood mononuclear cells

III. 成 績

1. プラーク形成に及ぼす抗体濃度および incubation 時間の影響

プラーク形成に及ぼす抗リゾチーム抗体濃度の影響を 3 名を対象として、最終濃度に 1:200, 1:400, 1:600, 1:800 にわたり検討したところ、1:400 で出現プラーク数が最大となった。また表示していないが、補体濃度は最終濃度 1:32 で出現プラーク数が最大となった。つぎにこれらの条件のもとで incubation 時間の影響を 1 時間から 4 時間にわたり検討した結果、出現プラーク数は 3 時間で最大となった。以下の実験はこれらの条件下に行った (表 1)。

2. 末梢血単核細胞に含まれるリゾチーム分泌細胞の割合

12 名についてリゾチーム分泌細胞数を算定したところ、末梢血単核細胞中に占める割合は $18.4 \pm 8.0\%$ であった (図 1)。

3. プラーク形成に及ぼす付着細胞の影響

本法によって出現するプラークが単球由来であることを確認するために、6 名を対象として単核細胞より付着細胞を除去し、プラーク数の変化を観察した。その結果単核細胞 10^5 個あたりのプラーク数は、単核細胞分画では $13,251 \pm 4,620$ であるのに対し、非付着細胞分画では $3,502 \pm 2,103$ となり、付着細胞の除去によりプ

表 2 Effect of removal of adherent cells on plaque formation of lysozyme-secreting cells

No.	plaques/ 10^5 mononuclear cells						mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	4	5	6	
MNC	6,695	13,664	12,366	11,175	20,721	14,889	13,251 $\pm$ 4,620
NAC	1,177	1,872	5,807	2,127	6,078	3,951	3,502 $\pm$ 2,103

MNC : mononuclear cells

NAC : nonadherent cells

ラーク数の著明な減少を認めた (表 2)。

IV. 考 案

protein A プラーク法は免疫グロブリン分泌細胞の検出にはじめて用いられ⁵⁾その後急速に普及したが、最近リゾチーム³⁾やアルブミン⁶⁾分泌細胞の観察にも応用され個々の細胞レベルでの分泌動態の解析に今後有力な方法の1つとなると思われる。

本稿では protein A プラーク法を用い、単球のリゾチーム分泌を観察したが、実験の基本原則が補体依存性の溶血反応であり、まず抗血清および補体濃度を検討した。抗リゾチーム血清は最終濃度 1 : 400、モルモット血清は 1 : 32 が至適であった。また抗血清と補体のどちらか一方を加えなければプラークはまったく出現しなかった。つぎに incubation 時間による出現プラーク数の変化をみると、今回の検討では約 3 時間で最大になることが示された。これらの条件下で末梢血単核細胞中のリゾチーム分泌細胞数の割合を検討したところ 18.4 $\pm$ 8.0% であり、この結果は Smith ら³⁾の 0.7~3.5% という値に比較すると約 10 倍の検出感度であるが、成績の相違

する理由は彼らも指摘しているようにアガロースとリゾチームとがなんらかの不要な反応をおこすためと推察される。本法で検出されるプラークのリゾチーム特異性については以下の点から明らかであろう。1. 抗リゾチーム血清または補体の非存在下ではプラークはまったく検出されない。2. 免疫グロブリンとの交叉反応がわずかにあったとしても、免疫グロブリン分泌細胞は筆者らの検討したところでは至適条件下で単核細胞中の 0.5% 程度にすぎず問題とならない。またプラークが単球に由来することは、附着細胞を除去することによって出現プラーク数が著明に減少することからも確認された。

リゾチームの機能については抗菌作用以外いまだほとんど知られていないが、近年軟骨基質の proteoglycan の分解作用⁷⁾、腫瘍細胞の増殖抑制作用⁸⁾等が報告されており、免疫学的に単球機能と関連して重要な役割を演ずる可能性もある。本法は細胞レベルでのリゾチーム分泌に与える種々の因子を解析するうえで、またリゾチーム分泌能を有する細胞の同定等にも応用しうると考えられる。

文 献

- 1) Robert, S.B., Paquale, E.P. & Stuart, C.F. : Lysozyme in bone marrow and peripheral blood cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 14 : 167~170, 1966.
- 2) Gordon, S., Todd, J. & Cohn, Z.A. : In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, 139 : 1228~1248, 1974.
- 3) Smith, C.I.E. & Hammarström, L. : Detection of muramidase (lysozyme)-secreting leucocytes at the single-cell level by a protein A plaque assay. *Scand. J. Immunol.*, 11 : 79~84, 1980.
- 4) 今井浩三・谷内 昭 : 各種抗体検定のための protein A を利用したロゼット法。免疫実験操作法,
- 日本免疫学会編, 金沢, 1979, pp. 2375~2380.
- 5) Gronowicz, E., Coutinho, A. & Melchers, F. : A plaque assay for all cells secreting Ig by a given type or class. *Eur. J. Immunol.*, 6 : 588~590, 1976.
- 6) Smith, C.I.E. & Hammarström, L. : Detection of albumin-secreting hepatocytes at the single cell level by a protein A plaque assay. *Eur. J. Immunol.*, 9 : 570~571, 1979.
- 7) Davies, P. & Allison, A.C. : Secretion of macrophage enzymes in relation to the pathogenesis of chronic inflammation, *Immunobiology of the Macrophage*, edited by Nelson D.S., Academic Press, London, 1976, pp. 448.

- 8) Osserman, E.F., Klockars, M., Halper, J. & Fischel, R.E. : Effect of lysozyme on normal and transformed mammalian cells. *Nature*, 243 : 331~335, 1973.
-