96 穴ケモタキシスチャンバーを用いた白血球走化性試験

——マイクロプレートリーダーによる走化性の定量的評価——

塚本芳雄・福谷幸子・大浦 清*

Monocyte chemotaxis by the 96 well assembly—One step quantitative measurement by the micro-plate reader

A new multi-well assembly was used for the *in vitro* chemotaxis assay of human peripheral blood monocytes. N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine caused concentration-dependent migration of the monocyte into the lower surface of the metal flamed membrane filter. Measurement was performed by the micro-plate reader (550~600 nm), and the absorbance showed the complete dependence on the number of migrated cells.

Yoshio Tsukamoto・Sachiko Fukutani・Kiyoshi Ohura*

key words : monocytes, chemotaxis, *in vitro*, multi-well assembly, absorbance

白血球は、炎症巣で貪食・殺菌などの機能を発揮したり免疫反応に携わることにより生体防御の役割を果たすが、白血球が炎症巣に出現するためには、活性化された補体や生体内に侵入した細菌に由来する因子によって誘起される白血球の遊走(走化性)が生じなければならない。

in vitro で白血球の走化性(ケモタキシス)を試験する方法としては、スライドグラスとカバーグラスの間隙で細胞の動きを観察する方法¹⁾、毛細管を利用する方法²⁾、アガロースプレート法³⁾、メンブランフィルター法⁴⁾などがある。1962年に Boyden⁴⁾ がボイデンチャンバーを用いて白血球の走化性を簡単に定量的に測定することができるメンブランフィルター法を報告し、さらに1980年に48穴のケモタキシスチャンバー^{5,6)}が開発されたことにより、試験に要する操作時間が飛躍的に短縮された。

しかし走化性を定量的に評価するためには、一定の培養時間内に走化性因子に向かって遊走した細胞の数を光学顕微鏡で肉眼的に計測するか^{7,8)}、または、接眼レンズに接続したビデオカメラでとらえた顕微鏡像をイメージアナライザーで分析し

たのちに細胞数を計測しなければならない^{5,6)}。いずれにしてもメンブランフィルター上のいくつかの細胞遊走面ごとに、位置をわずかずつ移動させたり焦点を合わせるなどの顕微鏡操作が必要であることにはかわりがなく、走化性試験自体の操作が簡単になり所要時間が短縮されたにもかかわらず、結果を定量的に測定する過程では煩雑な作業を必要とした。

本研究では最近開発された96穴ケモタキシスチャンバーを用いてヒト白血球の走化性試験を行ったところ、少量の白血球で安定した実験結果が得られ、さらに走化性の評価はマイクロプレートリーダーで吸光度を読み取ることによってきわめて短時間内に完了し、正確な定量データが得られたので報告する。

材料と方法

(1) ヒト単球の分離

実験に用いた単球は、健康なヒトの末梢血から Böyum の報告⁹⁾に準じた方法で分離した。血液は heparin (20 units/ml, Nobo) で処理した注射器で各実験ごとに正中皮静脈から採取し、0.02 M phosphate buffered saline (pH 7.2, PBS) で約3倍に希釈したのち、Ficoll-Paque (Pharmacia) 上に重層し、室温(20°C)で400×g 35分間の遠心を行った。単球は血漿と Ficoll-Paque の境界部から採取し、Turk 染色液(ナカライテスク)に浮遊させて血球数計算盤で細胞数を算定した。

(2) 細胞浮遊液の調整

単球は、塚本(1981)¹⁰⁾の報告に基づき、ウシ血清アルブミン(2%, Sigma)と HEPES (20 mM, ナカライテスク)を含む pH 7.0 の Gey's balanced salt solution (Gey's BSA) を用いて、細胞密度が1, 2, 3, 4, および 5×10^6 個/ml となるようにそれぞれ調整した。

(3) 走化性因子の調整

走化性試験の陽性対照としては、N-formyl-

* Department of Pharmacology, Osaka Dental University, 5-31, Otemae 1-chome, Chuo-ku, Osaka 540, Japan 大阪歯科大学薬理学講座

図1 Flamed membrane filter of the 96 well chemotaxis chamber

methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP, Sigma)を用いた。FMLP は、Gey's BSA と Veronal buffer (145 mM NaCl, 1.82 mM Na-5, 5-diethylbarbiturate, 312 mM 5, 5-diethylbarbituric acid, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.15 mM $CaCl_2$, pH 7.0)とをそれぞれ 7 : 5 の割合で混和した溶液(mix sol)を用いて $10^{-11}M$ から $10^{-6}M$ の濃度範囲となるように希釈した。

(4) 走化性試験

走化性試験は 96 穴ケモタキシスチャンパー (Neuro Probe, Model AB 96)を用いて以下の方法で行った。走化性因子溶液および陰性対照(mix sol)をそれぞれ 25 μl ずつ bottom plate の lower well に満たし、あらかじめガasketとメンブランフィルター(孔径: 5 μm)を装着した top plate を bottom plate のうえに載せて両 plate をネジで固定した。つぎに細胞浮遊液を 40 μl ずつ upper well に充填したのち、37°C 飽和水蒸気の条件下で 90 分間培養した。

培養終了後にチャンパーから取り外したフィルターは、37°C に温めた PBS で非付着細胞を洗い落としたのち、フィルター表面に付着している遊走細胞を Diff-Quik 染色液(国際試薬)で固定、染色した。なお、染色後に綿棒または scraper を用いてフィルターの非遊走面を清拭することにより、非遊走細胞を除去した。

(5) 走化性の評価

メンブランフィルター(図1)は、室温で風乾したのち、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, Model 2550 EIA reader, 波長 450~700 nm)を用いて吸光度を測定した。実験はすべて triplicate

図2 Cell dose dependent monocytic chemotaxis to FMLP

Data represents the mean $\pm$ SE of triplicate filters ($A_{600\text{ nm}}$, buffer control: 0.052 ± 0.003).

で行うことにより吸光度の平均値と標準誤差を求めるとともに、3回以上繰り返して実験を行いデータの再現性を確認した。

結果

(1) 細胞密度の影響

FMLP ($10^{-8}M$)を走化性因子として 1×10^6 個/ml から 5×10^6 個/ml の細胞密度に調整した細胞浮遊液を用いて走化性試験を行い、波長 600 nm での吸光度を測定したところ、吸光度は細胞密度に比例して直線的に上昇した(図2)。

(2) 走化性因子の濃度の影響

$10^{-11}M$ から $10^{-6}M$ の濃度範囲の FMLP を走化性因子として 5×10^6 個/ml の細胞密度に調整した細胞浮遊液を用いて走化性試験を行い、波長 600 nm での吸光度を測定したところ、 $10^{-10}M$ 濃度以上の FMLP に対して走化性が認められ、 $10^{-8}M$ をピークとする用量反応曲線が得られた(図3)。

(3) 測定波長による影響

FMLP ($10^{-8}M$)を走化性因子として 5×10^6 個/ml の細胞密度に調整した細胞浮遊液を用いて走化性試験を行い、波長 450, 492, 550, 600, および 700 nm での吸光度をそれぞれ測定したところ、吸光度は波長 550 nm と 600 nm でもっとも高い値を示す緩やかな曲線を描いた(表1)。

図3 Dose dependent monocyte chemotaxis to FMLP

The indicated concentrations of FMLP were tested for monocyte chemotaxis. Data represents the mean $\pm$ SE of triplicate filters (A 600 nm, buffer control: 0.052 $\pm$ 0.003).

考 察

in vitro での白血球の走化性試験は、研究室での細胞機能の研究や白血球機能に異常のある疾患の臨床検査の項目の一つとして広く行われている。走化性を評価するためには、細胞の形態を観察して遊走方向を類推したり、一定時間内にもっとも長い距離を遊走した細胞の移動距離や、一定の距離を移動した遊走細胞の数を計測する必要がある¹⁻⁶⁾。いずれの方法で測定するにしても、顕微鏡下で多数の細胞について個々の形態を観察したり、細胞を染色したあとメンブランフィルターを透明化したり、メンブランフィルター上のそれぞれの細胞遊走面について多数の視野の細胞数を計測するなどの手順と操作は煩雑である。

本実験では96穴ケモタキスチャンバーを用いてヒト単球の走化性試験を行い、安定した正確な定量的データを得ただけでなく、マイクロプレートリーダーを用いて1度に1チャンバー(96 well)単位の吸光度を測定することにより、短時間に大量のサンプルの走化性を評価をすることができた。ヒト単球のFMLPに対する走化性は10⁻⁸Mをピークとした用量反応曲線を示し(図3)、光学顕微鏡下で肉眼的に遊走細胞数を計測したデータと同じ結果が得られた¹⁰⁾。

また、細胞浮遊液中の単球の密度を1 $\times$ 10⁶ 個/

表1 Monocyte chemotaxis measured by the absorbance at various kinds of wavelength

wavelength (nm)	absorbance*
450	0.090 $\pm$ 0.004
492	0.165 $\pm$ 0.009
550	0.210 $\pm$ 0.016
600	0.210 $\pm$ 0.013
700	0.165 $\pm$ 0.012

* Human monocytes (5 $\times$ 10⁶ cells/ml) were tested for chemotaxis to FMLP (10⁻⁸M).

ml から5 $\times$ 10⁶ 個/ml の範囲で変化させたところ、細胞密度が増加するのに伴って吸光度が直線的に増加した(図2)。すなわち吸光度の増加は、フィルター下面まで遊走した細胞数が直線的に増加したことをあらわした。

さらにマイクロプレートリーダーの波長を450 nm から700 nm の範囲で変化させて測定したところ、波長550 nm と600 nm でもっとも高い吸光度を示した(表1)。ちなみに492 nm および700 nm でそれぞれ測定した場合にはわずかに感度が低下するものの、走化性因子の濃度および遊走細胞数に対する用量反応性は550 nm と600 nm で測定した場合と同じ傾向を示した(data not shown)。走化性因子の濃度および遊走細胞数に対するこのような用量反応性は、それぞれ3回以上繰り返し行った実験で明瞭に再現し、96穴ケモタキスチャンバーとマイクロプレートリーダーを用いた試験で得られた結果が信頼できることを示した。

遊走細胞数を肉眼的に計測する方法と比較して、細胞の走化性を吸光度で測定することにより客観的なデータが得られるだけでなく、短時間に多くの検体の評価を行うことが可能となる。また、96穴ケモタキスチャンバーは、従来の48穴チャンバーにくらべて処理できる検体数がたんに2倍となるだけでなく、wellの配置が市販の96穴組織培養プレートと同一であるため、マルチチャンネルピペットを用いて走化性因子および細胞浮遊液を各wellに充填することができる。さらに、金属性のフレームがついたメンブランフィルター(図1)は取り扱いがきわめて便利であることなどは、操作時間をより一層短縮するのに役立つ。

文 献

- 1) McCutcheon, M., Wartman, W.B., Dixon, H.M.: Chemotropism of leukocytes *in vitro*; attraction by dried leukocytes, paraffin, glass and *Staphylococcus albus*. Arch. Pathol. 17: 607-614, 1934.
- 2) Ketchel, M.M., Favour, C.B.: The acceleration and inhibition of migration of human leucocytes *in vitro* by plasma protein fractions. J. Exp. Med. 101: 647-663, 1955.
- 3) Cutler, J.E.: A simple *in vitro* method for studies on chemotaxis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147: 471-474, 1974.
- 4) Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. J. Exp. Med. 115: 453-466, 1962.
- 5) Falk, W., Goodwin, Jr, R.H., Leonard, E.J.: A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. J. Immunol. Methods 33: 239-247, 1980.
- 6) Harvath, L., Falk, W., Leonard, E.J.: Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis. Use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. J. Immunol. Methods 37: 39-45, 1980.
- 7) Tsukamoto, Y., Fukuda, K., Ishikawa, M., Ieiri, M., Uwazumi, K., Mori, M.: *In vitro* effect of histamine on monocyte chemotaxis. Jpn. J. Oral Biol. 24: 523-524, 1982.
- 8) 塚本芳雄, 福田訓子, 森川 裕, 藤本平蔵, 森政和, 梅本俊夫: 歯周病関連細菌と白血球遊走. 炎症 4: 635-637, 1984.
- 9) Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 97(suppl.): 77-89, 1968.
- 10) 塚本芳雄: 自律神経作働性薬の Monocyte 遊走におよぼす影響に関する研究. 歯科医学 44: 138-154, 1981.