flow cytometry を用いた食細胞の貪食能の測定 (II)

塩月一英・原 昭典・町 淳二・横山三男*

Flow cytometric assay of phagocytosis

Kazuhide Shiotsuki・Akinori Hara・Junji Machi・Mitsuo Yokoyama*

食細胞は微生物に対する生体の感染防御機構のなかで中心的な役割を果たしている。食細胞の貪食、殺菌機構の解明については、これまで末梢血中の好中球が主として用いられてきた。しかし、単球の食作用の解析には、末梢血から単球を純粋に分離できても回収率が低いこと、プラスチック表面への単球の付着能を利用して分離すると細胞の生物活性に変化をきたすことなどの問題点があるので新しい術式が必要とされてきた。

flow cytometry (FCM) は、前方散乱光および側方散乱光によって表示されるサイトグラムでリンパ球、好中球および単球の識別ができる。また、蛍光色素で標識した粒子が細胞に貪食されると、レーザー光によって励起された蛍光の強度を求めることによって貪食能の測定が可能である。そこで、flow cytometry を用いて単球と好中球の貪食能を比較した。

方 法

① ヒト好中球の分離：健康人のヘパリン加末梢血から dextran 沈降法および percoll 比重遠心法で顆粒球を分離し、洗浄後、10% FCS 加 Krebs-Ringer 液(KRP) 液に 2×10^6 cells/ml となるように浮遊させた。cytospin で塗抹標本作製し、May-Gimsa 染色を行い、好中球の純度をカウントした。好中球の純度は98%であった。

② ヒト単核球の分離：健康人のヘパリン加末梢血を Ficoll-Triosil 比重遠心法で単核球層を分離し、洗浄後、10% FCS 加 KRP 液に浮遊させた。cytospin で塗抹標本作製し、①と同様に単球の純度を決めたのち、単球数が 2×10^5 cells/ml となるように調整した。

③ 粒子のオプソニン処理：貪食能の測定に使用した粒子は、FITC 標識の fluorescent monodisperse carboxylated microspheres $2 \mu\text{m}$ (Polysciences 社, Warrington, PA) で、粒子のオプソニン化には、ヒト新鮮血清の含有量の異なる KRP 液を加え、 37°C で30分間反応させた。粒子を 4°C , $3,000 \times g$, 10分間遠心したのち、 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml となるように KRP 液で調整した。

④ 貪食能の測定：それぞれの細胞浮遊液 0.2 ml に粒子浮遊液を等量加え 37°C および 4°C で、それぞれ反応させたのち、細胞を 0.2% EDTA および 10% FCS 加 PBS 液 (pH 7.4) で洗浄し、細胞を 1% glutaraldehyde 加 PBS 液 (pH 7.4) 2 ml に浮遊させた。好中球および単球の貪食率は flow cytometry で測定した。

⑤ flow cytometry による貪食能の分析法：flow cytometry は Spectrum-III (オーソ社) を使用した。フローセル中を通過する細胞に 488 nm でアルゴンレーザーを照射し、前方散乱光および 90° 側方散乱光を計測し、サイトグラム上で好中球および単球を識別した。FITC で標識した粒子を食細胞と混合し、レーザー光で照射し粒子を取り込んだ食細胞から発する蛍光強度を測定した。粒子を加えない細胞からの蛍光をバックグラウンドとして、蛍光強度の増大した細胞の全細胞数に対するパーセントを貪食率として表した。

結 果

各濃度のヒト新鮮血清を含む KRP 液と粒子を混合し 37°C で30分間反応させたのち細胞との比(細胞：粒子)が1：10となるように調整し、 37°C および 4°C で30分間反応させたときの蛍光強度の増大した細胞の割合(貪食率)を図1に示した。30%以上の新鮮血清を含む KRP 液と混合した粒子を食細胞に加え、 37°C および 4°C で5分から45分間反応させたときの貪食率を調べた結果を図2に示した。好中球は粒子と 37°C で15分間以上、単球は30分間以上反応させたとき、それぞれの細胞の貪食率は maximum に達した。単球は 4°C で粒子と反応させたとき、好中球に比べ貪食率が高い値を示した(図1, 2)。つぎに、粒子を新鮮血清および 56°C , 30分間の熱処理血清(非働化血清)をいづれも30%含む KRP 液と 37°C , 30分間インキュベートしたのち細胞に加えた。その結果、非働化血清は新鮮血清とインキュベートした粒子に比べ細胞による貪食率が著明に低下していた(図3)。食細胞と粒子の混合比を1：1から1：100とし、 37°C , 30分間インキュベートしたときの貪食率は混合比が1：10以上で貪食率がプラートに達した。顕微鏡下で観察すると、好中球は 37°C で反応させた場合、粒子を貪食したが、単球は 37°C および 4°C いずれの条件下でも粒子とロゼットを形成し、粒子を貪食している細胞数が少なかった。

考 察

flow cytometry を用いて好中球および単球の貪食率を比較した。非働化した血清は新鮮血清と反応させた粒子と比較して flow cytometry で分析した食細胞の貪食率つまり蛍光強度の増大した細胞の割合が低値を示した。このことから食細胞が粒子を効率よく貪食するためには補体の存在が必要と考えられた。

単球は好中球と同じく細胞膜上に IgG の Fc 分画や補体分画に対するリセプターをもっている。しかし、単球は好中球に比べて、オプソニン化した粒子を取り込む速度および貪食率が低いことが知られている。また、単球の細胞膜上の補体リセプターは補体成分でオプソニン化された異物を細胞膜上に固定させる性質があり、異物

* Department of Immunology, Kurume University School of Medicine 久留米大学医学部免疫学教室

図1 粒子のオプソニン化に用いた新鮮血清の量による好中球 (PMN) と単球 (MO) の食食率 (蛍光強度の増大した細胞の割合)

粒子を新鮮血清の含有量の異なる KRP 液で 37°C, 30 分間インキュベートしたのち, 好中球および単球と 37°C, および 4°C で 30 分間反応させ, それぞれの条件での食食率を flow cytometry で測定した。

図2 反応時間による食食率

新鮮血清 30% 含む Krebs-Ringer 液で粒子を 37°C, 30 分間インキュベートしたのち, それぞれの細胞と 37°C および 4°C で 5 分から 45 分間反応させた。

図3 新鮮血清 (FS), 非働化血清 (IAS) および Krebs-Ringer 液 (C) と粒子をインキュベートしたのちの好中球と単球の食食率

物を食食するためにはリセプターの関与が必要であるといわれている。今回の実験の結果でも, 好中球は補体リセプターを介して粒子を食食するが, 単球は補体リセプターを介して粒子とロゼットを形成するが, 粒子の取り込みが少ないことがわかった。このことは flow cytometry では食細胞による粒子の食食能を測定するにあ

図4 それぞれの細胞とオプソニン化した粒子の混合比と食食率

たって“食食”“付着”の識別ができないため, 食細胞の食食能を flow cytometry で測定する方法は, 好中球の食食能の定量には適していたが, 単球の食食能の測定には不適當であることがわかった。