Propidium iodide 蛍光色素を用いたリンパ球の 抗原特異的 IL2 反応性の微量迅速測定

野 間 剛 中 村 靖 吉 沢 いづみ 川 野 豊
埼玉医科大学小児科
同愛記念病院小児科
馬 場 実

Key words : Propidium iodide, アレルゲン特異的 IL2 反応性,
病因抗原, 微量迅速測定

要 旨

アレルギー疾患における病因抗原の検索や病勢の把握の指標として有用であると考えられるリンパ球の抗原特異的 IL2 反応性試験において、測定に必要な採血量を減少させる目的で、テラサキプレートを用いた微量測定系（マイクロ法）を検討した。本法では $2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^4$ という極めて微量の細胞数を用いて測定可能であり、マイクロ法は、従来の方法と同等に、抗原特異的 IL2 反応性が測定された。成績は、従来法の結果と良好な相関 ($r=0.888$, $p<0.001$) を示した。本法の確立により、検査に必要な検体量は従来法の約10分の1に減少可能であると考えられた。本法は、採血量が制限される乳幼児のアレルギー疾患の病因抗原の検索や、病勢の把握に有用であると考えられた。

はじめに

アレルゲンで誘導されるリンパ球の抗原特異的 interleukin 2 (IL2) 反応性の測定は、アレルギー疾患における病因抗原の検索や病勢の把握の指標として有用である^{1)~8)}。これらの方法の臨床の実用化を目的として、大量の検体を簡略かつ迅速に測定するため、propidium iodide (PI) 蛍光色素を用いる測定法を既に報告した⁷⁾⁸⁾。今回、乳幼児期の患児の検査に必要な採血量を軽減する目的で、テラサキプレートを用いた微量測定系（マイクロ法）を検討したので報告する。

対 象

アトピー性皮膚炎患児 (AD : atopic dermatitis) 及び気管支喘息 (BA : bronchial asthma) あるいは他のアレルギー疾患を合併しているアトピー性皮膚炎患児の末梢血単核細胞を用いた。診断は、臨床症状、特異的 IgE RAST スコア、皮膚試験、抗原負荷テストの結果を用いて行った。対照として、相当年齢の上記項目が陰性である非アトピー健康小児及び健康成人を用いた。

方 法

1) アレルゲン刺激による末梢血リンパ球の IL2 反応性の誘導

比重遠心法にて分離した単核細胞 1×10^5 に $10 \mu\text{g/ml}$ のグニ抗原 (Df : Dermatophagoides farinae) (鳥居), $100 \mu\text{g/ml}$ の卵白アルブミン (OVA : ovalbumin) (シグマ), あるいは $5 \mu\text{g/ml}$ の Concanavalin A (Con A) (ファルマシア) を添加し, 10 % ヒトプール血清加 RPMI 1640 培養液 $200 \mu\text{l}$ に浮遊

Abbreviation : IL2 ; interleukin 2, PI ; propidium iodide, AD ; atopic dermatitis, BA ; bronchial asthma, RAST ; radioallergosorbent test, Df ; Dermatophagoides farinae, OVA ; ovalbumin, Con A ; Concanavalin A, LSQM ; Lysing Staining Quenting Medium, SI ; stimulation index

し、96穴丸底プレート（ヌンク）にて、5日間培養後、上清を除去し、5%ヒト血清加 RPMI 1640培養液50 μ lを添加したあと、60穴テラサキプレート（ヌンク）にて培養細胞を4等分して、その2穴に各濃度のリコンビナント IL2（タケダ）を添加し、液量を1穴当り15 μ lに再調製した後、さらに3日間培養した。IL2反応性は、培養後、LSQM [Lysing Staining Quenting Medium: 2倍希釈 PI stock液(1 mg/ml propidium iodide, モレキュラープローブ, 4.9% EDTA, ギブコ)1.5ml, EDTA液(4.9%, pH7.0)7.5ml, Triton X-100(8% v/v: 和光純薬)1.5ml, 2¹⁰希釈 drawing ink (ライカ) 0.1mlから成る] を50 μ l添加後遠心し、37℃, 30分間静置したのち蛍光顕微光度計(Leitz PATIMED, ライカ)を用いて各穴中の検体の蛍光を測定することにより生細胞数を定量し、IL2非添加群と比較することにより IL2 反応性(SI)を評価した。

IL2 反応性(stimulation index: SI) =

$$\frac{\text{IL2 添加時蛍光強度} - \text{細胞非添加時蛍光強度}}{\text{IL2 非添加時蛍光強度} - \text{細胞非添加時蛍光強度}}$$

2) テラサキプレートにおける細胞数と測定蛍光強度との関係についての検討

テラサキプレートを用いて、1穴当りの細胞数を $2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^4$ で変化させて分配し、LSQMを添加後、30分間放置した後、蛍光顕微光度計を用いて、PI色素による各穴の蛍光強度を測定し、1穴当りの細胞数に対する測定された蛍光量を検討した。また、蛍光顕微光度計の電圧の変化により、蛍光強度を変えることにより、測定蛍光強度の検出感度に与える影響について検討した。

3) IL2 反応性に与える IL2 濃度の影響

気管支喘息患児末梢血より分離したリンパ球を、96穴丸底プレートを用いて、ダニ抗原刺激にて5日間培養した後、テラサキプレートにて4等分して、その2穴に各濃度の IL2 を添加後、さらに3日培養した後、LSQMを添加し、各濃度の IL2 により増殖した細胞数を蛍光顕微光度計を用いて定量した。

4) 成績の評価

得られた成績は、対照と比較することにより two-tailed Student's t-test により検定した。IL2 反応性は抗原刺激しない群と比較して統計学的に有意なものを陽性とした。

結 果

1) テラサキプレートにおける細胞数と測定蛍光強度の関係

テラサキプレートにおける細胞数と測定蛍光強度は、直線的に正の相関が認められた(図1)。細胞を添加しない場合の測定蛍光強度(バックグラウンド)は、今回の測定系(図1)においては、測定予想最大蛍光強度の25%以下で測定可能であった。測定時、蛍光顕微光度計の電圧を変化させ、測定蛍光強度を変えて測定した場合、この直線性の変化は認められなかった。同時に、測定蛍光強度を変えることにより、細胞数当たりの蛍光強度を増加することが可能であったことから、測定誤差を減少させることが可能であると考えられた。以上から、検査に用いる細胞数が数千と極めて少ない場合でも、細胞数と測定蛍光強度には極めて良好な相関が得られると考えられた。

2) IL2 反応性に与える IL2 濃度の影響についての検討

添加した IL2 濃度に比例して、リンパ球の IL2 反応性の誘導が濃度依存性に認められた(図2)。特異抗原で誘導される IL2 反応性は、0.5U/mlの IL2 濃度においてほぼ最大値に達した。この濃度は、従来法

Fig.1 Relationship between cell number and fluorescence intensity of the cells on the Terasaki plate.

1: (652 volt, 9 A), 2: (601 volt, 9 A),
3: (550 volt, 9 A), 4: (502 volt, 9 A),
5: (451 volt, 9 A)

Fig.2 Df-, but not OVA-antigen is capable of inducing IL2 responsiveness by patients lymphocytes allergic to mite in an IL2 dose dependent manner.

での結果と一致しており、マイクロ法と従来法で、方法の違いによる IL2 濃度の相違は認められなかった。よって、以後の検査は、従来法と同じく、IL2 反応性が最大平衡値に達すると考えられる 0.5U/ml の IL2 濃度を用いて行った。

3) マイクロ法と従来法との反応性の比較

マイクロ法と従来法において、ダニ抗原刺激により誘導される IL2 反応性を比較した (図 3)。誘導された IL2 反応性の程度は、両法においてほぼ同等で

Fig.3 Correlation of induced-IL2 responsiveness between the micro and theconventional method

あり、良好な相関 ($r=0.888$, $p<0.001$) が認められた。

4) マイクロ法により測定された IL2 反応性の抗原特異性の検討

それぞれ、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、じん麻疹を示す患児を用いて個々の症例におけるアレルギーによって誘導される IL2 反応性を、従来法とマイクロ法で比較検討した (表 1)。いずれのアレルギーにおいても、マイクロ法で得られた反応性は従来法での反応性とほぼ同等であり、従来法で示されたのと同様に、マイクロ法においても、病因抗原で刺激した場合、患児では抗原特異的に IL2 反応性の誘導が可能であると考えられた。すなわち、ダニ抗原で感作された気管支喘息患児 (表 1 FK, SJ) では、Df 刺激により IL2 反応性が誘導されたが、OVA 刺激ではそのような反応は誘導されなかった。一方、成績は示さないが、卵白を病因抗原とし、ダニ抗原に感作されていないアトピー性皮膚炎では OVA 刺激によって IL2 反応性が誘導されたが、Df 刺激ではそのような反応は認められなかった。さらに、ダニ抗原、卵白に感作されているアトピー性皮膚炎患児やじん麻疹の患児では、Df, OVA 両者の刺激により反応が誘導された。健康者ではこのような反応は認められなかった。よって、病因抗原刺激により誘導される IL2 反応性はマイクロ法においても抗原特異的であると考えられた。

考 察

アレルギー患者において、病因抗原の検索や病勢を判定する in vitro の検査方法の一つとして、血中特異 IgE 抗体の測定 (RAST) が広く用いられている。しかしながら、臨床症状との不一致が多く、アレルギーの診断法として、的確な in vitro の検査法が望まれる。アトピー性皮膚炎患児の末梢血単核細胞を、病因抗原で刺激すると、抗原特異的な IL2 反応性が誘導され、この反応は病勢とともに推移していくことから、病因抗原の検索や、病勢把握の指標として有用であることを報告し¹⁻⁸⁾、また、大量の検体を簡略かつ迅速に測定する方法として、さらに propidium iodide (PI) 蛍光色素を用いる測定法を報告した^{7,8)}。この PI 蛍光色素を用いる方法は、PI が doublestrand-DNA に特異的に結合することを利用したものである。測定される PI 蛍光強度の増強は、細胞周期の増殖過程では細胞内の DNA 量が増加していることを示しているが、細胞分裂が終了した段階では、増殖細胞数を反

映すると考えられる。IL2 を添加した培養 3 日後の細胞数をトリパンブルーにて染色後非染色細胞を算定したところ、IL2 非添加群に比較して細胞数の増加を認めたが、その増加率は蛍光強度を用いた本法と一致していた。よって、本法で設定した 3 日間の培養では、蛍光強度の増強は多くの場合増加細胞数を反映していると考えられた。このように蛍光顕微光度計により蛍光強度を測定することにより、生細胞数を極めて短時間に定量できることが可能である。しかしながら、これらの IL2 反応性試験においては、これまで抗原 1 項目につき、約 1×10^6 の単核細胞数を必要とした。乳幼児期のアレルギー疾患において、通常病因抗原の

スクリーニングの検索を行う場合、ovalbumin, ovomucoid などの卵白抗原、 α -casein, β -lactoglobulin などの牛乳抗原、ダニ、スギ抗原などの吸入抗原など、10 数項目をまとめて行う必要があり、個人差はあるものの、少なくとも 4 ~ 8 ml の採血量が必要であった。他の検査の必要性も考えると、この検査の実施でこれだけの血液の採取は、採血対象が乳幼児である場合、患児の負担が大きくなる場合があると考えられる。そこで、測定に必要なリンパ球数を少なくして、採血量を減少させる目的で、今回、微量測定系について検討を加えた。

テラサキプレートを用いた測定系における細胞数と、

Table 1 Induction of IL2 responsiveness of antigen-stimulated lymphocytes from patient with allergy.

Subjects (Age, Sex)	Diagnosis	Causative antigen	Serum IgE level	IgE RAST score (IU/ml)	IL2 responsiveness (SI $\pm$ SE)		
					Stimuli	Conventional method	Micro method
■ (9y, M)	BA	mite	1800	Df (4) EW (0)	-	1.14 $\pm$ 0.02	1.17 $\pm$ 0.01
					Con A	1.40 $\pm$ 0.06*	1.31 $\pm$ 0.01*
					Df	1.49 $\pm$ 0.01*	1.67 $\pm$ 0.03*
					OVA	1.16 $\pm$ 0.03	1.15 $\pm$ 0.05
■ (14y, M)	BA	mite	833	Df (4) EW (0)	-	1.12 $\pm$ 0.02	1.13 $\pm$ 0.01
					Con A	1.56 $\pm$ 0.04*	2.00 $\pm$ 0.05*
					Df	2.16 $\pm$ 0.09*	2.49 $\pm$ 0.11*
					OVA	1.02 $\pm$ 0.01	1.18 $\pm$ 0.01
■ (15y, F)	AD	mite EW	11	Df (0) EW (4)	-	1.19 $\pm$ 0.02	1.16 $\pm$ 0.03
					Con A	1.37 $\pm$ 0.01*	1.48 $\pm$ 0.08*
					Df	1.55 $\pm$ 0.08*	1.69 $\pm$ 0.03*
					OVA	1.70 $\pm$ 0.04*	1.51 $\pm$ 0.07*
■ (6m, F)	Urticaria	mite EW	56	Df (0) EW (4)	-	1.18 $\pm$ 0.07	1.17 $\pm$ 0.02
					Con A	1.64 $\pm$ 0.03*	1.82 $\pm$ 0.01*
					Df	1.89 $\pm$ 0.04*	1.82 $\pm$ 0.03*
					OVA	1.70 $\pm$ 0.04*	1.61 $\pm$ 0.08*
■ (8y, M)	Normal	(-)	ND	Df (0) EW (0)	-	1.01 $\pm$ 0.00	1.06 $\pm$ 0.05
					Con A	1.84 $\pm$ 0.05*	1.77 $\pm$ 0.06*
					Df	1.19 $\pm$ 0.01	1.08 $\pm$ 0.11
					OVA	1.19 $\pm$ 0.02	1.03 $\pm$ 0.03

EW: Egg white, BA: bronchial asthma, AD: atopic dermatitis, *: $P < 0.01$

測定蛍光強度との関係についての検討では、1 穴当りの細胞数が 2×10^3 から 6×10^4 までの検討範囲では、両者に直線的に正の相関が認められた。この直線性は、測定蛍光強度を変化させても変わらなかった。顕微鏡下の観察により、1 穴当たり約 6×10^4 の細胞によりプレートの床面積が満たされたことから、IL2 添加により増殖したリンパ球の数を考慮すると、テラサキプレートでの培養開始時の細胞数は、1 穴当たり 2×10^4 前後が適当であると考えられた。同時に、測定蛍光強度を変えることにより測定感度を増すことが可能であることが示された。このことより、細胞数をさらに少なくすることが可能であると考えられた。

抗原刺激したリンパ球に添加する IL2 濃度の検討では、至適 IL2 濃度は従来法の 0.5 U/ml とほぼ同程度であり、方法の違いによる IL2 濃度の相違はみられなかった (図 2)。Con A 刺激の場合、SI 値が小さくなる場合が認められたが、これは蛍光顕微光度計による実測値の増加からもうかがえるように、IL2 非添加群でも、Con A の mitogen 活性により細胞数がさらにひき続いて増加していることを示していると考えられた。すなわち、測定された IL2 反応性は、見かけ上小さくなくとも考えられた。

マイクロ法と従来法で得られた IL2 反応性を比較した結果からは、両法においてはほぼ同等の IL2 反応性が誘導され、 $r=0.888$, $p<0.001$ の相関が得られた (図 3)。また、その反応性は、従来法で示されたのと同様に、マイクロ法においても抗原特異的であった (表 1)。

以上の結果より、マイクロ法での検討結果は、従来法で求められた結果と同等に扱うことができると考えられた。

今回のマイクロ法の検討により、測定系の微量化が可能となり、従って、従来法の約 10 分の 1 のリンパ球数で測定が可能であると考えられた。すなわち、実際の患児からの採血量は $1 \sim 2 \text{ ml}$ で十分であり、これらの量は一般検査を行った残りの検体からも採取可能な量であると考えられた。従来法に比べ、採血時の患児の負担が軽減されることから、本法による抗原特異的 IL2 反応性の測定は、さらに、アレルギー疾患の病因抗原の検索や病勢の把握に有用な *in vitro* の検査法として有用であると考えられた。

謝辞：本研究の一部は、環境庁ならびに文部省科学研究費によった。

文 献

- 1) Yokota, T., Arai, N., de Vries, J., Spits, H., Banchereau, J., Zlotnik, A., Rennick, D., Howard, M., Takebe, Y., Miyatake, S., Lee, F. and Arai, K.: Molecular biology of interleukin 4 and interleukin 5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells and hemopoietic cells. *Immunol. Rev.* 102, 137-153, 1988.
- 2) 野間 剛, 川野 豊, 吉沢いづみ, 矢田純一: IL2 反応性の測定. 臨床免疫 19(Suppl. 12), 170-178, 1987.
- 3) 野間 剛, 吉沢いづみ, 川野 豊, 伊藤雅彦, 馬場 実, 矢田純一: アレルゲンに対するアトピー患者リンパ球の応答性-年齢による変動, 健康児との比較および診断的意義. アレルギー, 36(12), 1075-1085, 1987.
- 4) Noma, T., Kawano, Y., Yoshizawa, I., Mukouyama, T., Baba, M., and Yata, J.: Ovalbumin antigen specific induction of IL2 responsiveness in lymphocytes from patients with hen-egg allergy and its regulation by the culture supernatant of normal lymphocytes. *Annals of Allergy* 64, 33-41, 1990.
- 5) Yoshizawa, I., Noma, T., Kawano, Y., and Yata, J.: Allergen specific induction of IL2 responsiveness in lymphocytes from asthmatic children. I. Antigen specificity and initial events of the induction. *J. Allergy clin Immunol.* 84, 246-255, 1989.
- 6) Noma, T., Yoshizawa, I., Maeda, K., Ichikawa, K., Baba, M., and Yata, J.: Allergen specific induction of IL2 responsiveness in lymphocytes from asthmatic children. II. Regulation of IL2 Antigen responsiveness by supernatants of normal lymphocytes. *J. Allergy clin Immunol.* 84, 255-262, 1989.
- 7) Noma, T., Yoshizawa, I., Maeda, K., Baba, M., and Yata, J.: Initial events and T cell activation in lymphokine-mediated allergic responses in patients with hen egg allergy. *Ann Allergy* 73: 76-84, 1994.
- 8) 野間 剛, 吉沢いづみ, 中村 靖, 川野 豊, 中島 忠, 伊藤雅彦, 黄 国輝, 前田和一, 池澤善郎,

馬場 実, 矢田純一: PI 蛍光色素を用いたヒト末梢血リンパ球の抗原特異的 IL2 反応性の迅速測定とアレルギー性疾患における病因抗原の検索 アレルギー, 41(9): 1354-1366, 1992.

9) Noma, T., Yoshizawa, I., Kou, K., Nakajima, T., Kawano, Y., Itoh, M., Ichikawa, K.,

Mukouyama, T., Baba, M., and Yata, J. Pattern of cytokine production by Dermatophagoides farinae antigen-stimulated T cells from adolescent patients with bronchial asthma in remission. Pediatric Research, 38(2): 187-193, 1995.

A MICROASSAY SYSTEM FOR MEASURING ANTIGEN-SPECIFIC INDUCTION OF INTERLEUKIN 2 (IL2) RESPONSIVENESS BY LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH ALLERGIC DISEASES.

Takeshi Noma, Yasushi Nakamura, Izumi Yoshizawa, Yutaka Kawano
Depts of Pediatrics, Saitama Medical School
 Minoru Baba
Doai Memorial Hospital

A micro assay system for measuring interleukin 2 (IL2)-responsiveness by allergen-stimulated lymphocytes was developed for detecting causative allergen in children with atopic dermatitis and/or bronchial asthma using a 60 well micro Terasaki plate and propidium iodide (PI) staining. There was a linear correlation between the number of PI-stained cells ($2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^4$) and the fluorescence intensity, indicating that this fluorochromasia assay reflects cell number for the quantitative measurement of lymphocyte proliferation even in a extremely small number of cells. The background was less than 10 percent.

The induced response was observed in lymphocytes from patients with urticaria, atopic dermatitis, and bronchial asthma specifically on stimulation with the antigen causing clinical symptoms. The results obtained by the 60 well micro Terasaki plate were much similar to those in previous reports measured using a 96 well micro plate and PI staining. The present micro-method appears possible to decrease cell number used by approximately one tenth, for screening etiological antigens for the diseases and to easily monitor the clinical activity.

(Accepted: May 19, 1995)