

全血利用 chemiluminescence による顆粒球機能および血中オプソニン活性の測定

外岡 立人 大川 正人 松本 隆任
上野 範博 松本 脩三
(北海道大医学部小児科)

貪食細胞の機能を把握する手段として、chemiluminescence (CL) を利用する方法は極めて有用である¹⁾。この CL には内因性 CL と luminol を介した CL (luminol 依存性 CL) の 2 種類があるが、その発光量の多さからいって、臨床的には最近後者が用いられている。この luminol 依存性 CL の原理は、貪食などにより活性化された貪食細胞が O_2^- , 1O_2 ・OH, H_2O_2 などの活性酸素を産生して、それらが luminol を酸化することにより光粒子を放出させることに基づいている。すなわちこの系における発生光粒子量と貪食細胞の活性程度は良く相関する。また産生される活性酸素は細胞内における殺菌機構の重要な担い手であるため、この luminol 依存性 CL を測定することにより、貪食細胞の殺菌機能を間接的に評価できる。一般的に CL は purify した貪食細胞、すなわち主に好中球について応用されている。しかしながらこの方法は臨床検査法としては比較的複雑で、また好中球分離の操作が結果に多大な影響を与える。今回われわれは全血をそのまま利用して、顆粒球機能と血中オプソニン活性を同時に測定する目的の CL 測定法を開発した。この方法は微量の血液 (0.1 ml) で測定可能で、さらに短時間 (約20分) で結果が得られるという長所を持っている。

材 料 と 方 法

1) 検体：正常成人から静脈血0.5 ml を得た。ヘパリン10単位/ml を含む培地 (MEM buffered with 50 mM HEPES) 2 ml を加えて CL 測定まで 4 °C で保存した。

2) CL 誘導物質：① Zymosan (Sigma 社) —15分間 boiling 後、50 mg/ml の濃度で培地に浮遊した。② Aggregated gamma globulin (Agg) —ヒト gamma globulin 製剤 (ミドリ十字) を30分間63°Cで加熱後、pH 8.0の PBS に aggregates を溶解した。③ Sheep red blood cells (SRBC) —市販の製品を2回洗った後、培地に5%の濃度で浮遊した。

3) CL の測定：Aloka 社製の BLR 102 を用いた。培地に浮遊した検体を 0.5 ml 測定管に入れ、30分間37°Cで加温した。次に luminol (1 mg を 8 μ l の triethylamine で溶解し、それに PBS 1 ml を加えて作成した) 10 μ l を加え、測定室内 (37 °C) に10分間ふ置した。そして1分間 background CL を測定後、CL 誘導物質を 10 μ l 加えた。CL は接続した記録計で経時的に記録して、CL の強さは刺激後の最も高い CPM, すなわち peak CL で表現した。

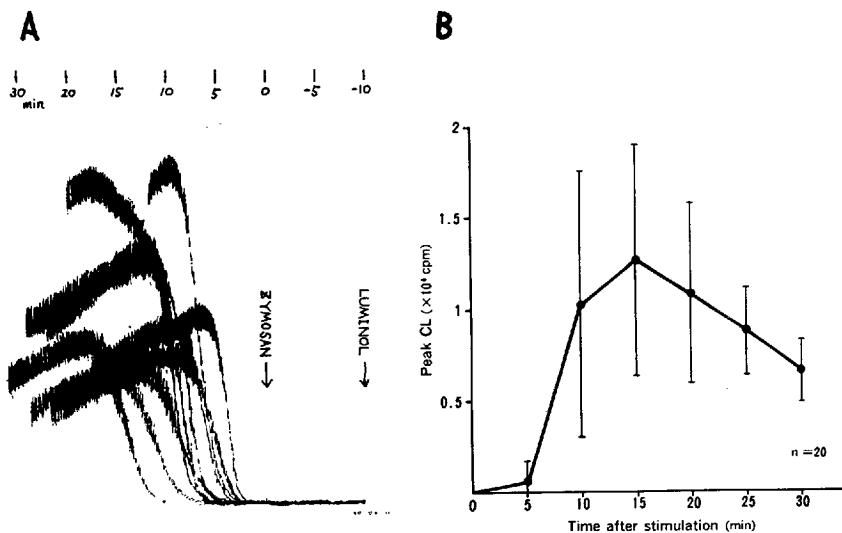


図1 正常成人における Zymosan 誘発全血 CL。 A. 実際の記録例。
B. 成人20例における CL を5分毎に $M \pm SD$ で表した。

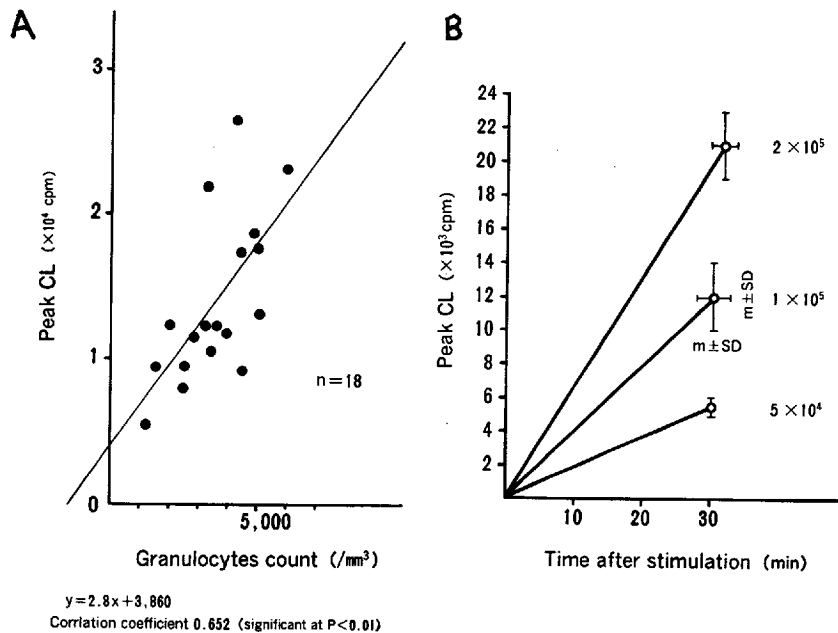


図2 顆粒球数と全血 CL の関係。 A. 各検体中に含まれる顆粒球数と peak CL の関係。 B. 全血中の顆粒球数を変化させて、peak CL との関係を検討した。

結 果

①正常成人における全血 CL カイネティクス (図1): luminol を添加した検体に zymosan を加えると15分以内に CL を認め始め、20分以内に peak CL を検出する。その peak CL とそれを呈するまでの時間は各個体によりばらつきが多い。これらのばらつきは、各個体における顆粒球数と血中オプソニン活性のばらつきに起因するものと考え以下の分析を行った。

②顆粒球数と全血 CL の関係 (図2): peak CL と血中顆粒球数の関係を見ると、図Aに示したごとく、1%以下の危険率で有意に相関する。また検体中の顆粒球数を変化させて、その peak CL との関係を見ると、図Bに示したごとく、比例関係にある。すなわち peak CL は検体中の顆粒球数によって規定されていると確認される。

③血漿の全血 CL に対する役割 (図3): 図Aに示したごとく、血漿濃度は peak CL とそれを呈するまでの時間に影響する。peak CL を呈するまでの時間と検体中の血漿濃度の関係を見ると図Bに示したごとく、20%から2.5%の間で両対数グラフ上直線関係にあった。すな

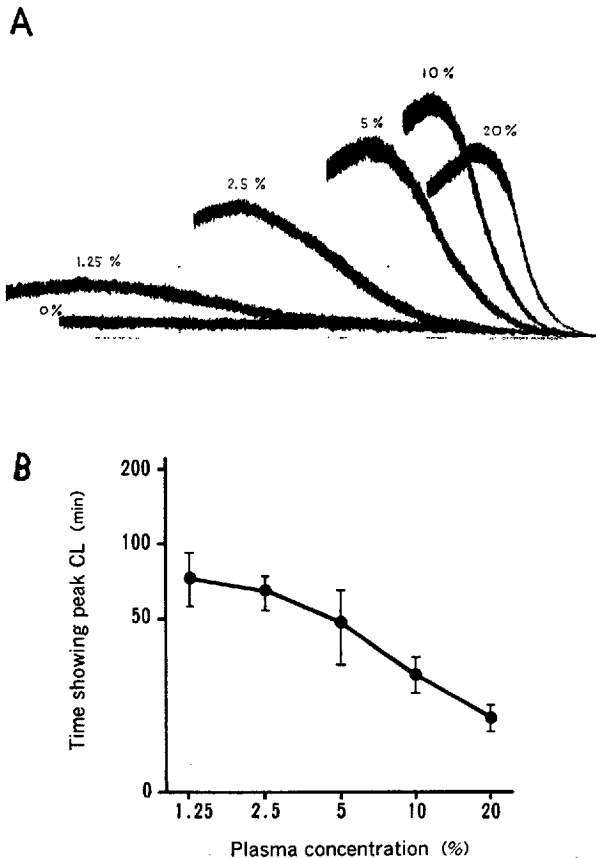


図3 血漿の全血 CL に対する役割。A. 検体中の血漿濃度を変化させて、その CL カイネティクスを検討した。B. 血漿濃度と peak CL を呈するまでの時間の関係を両対数グラフ上に表した。

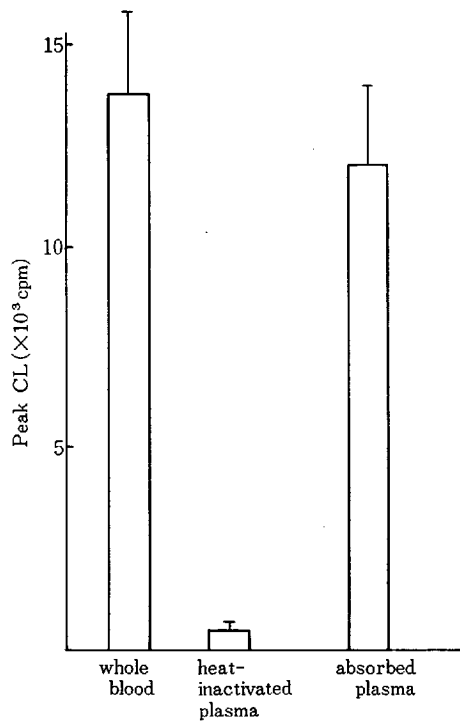


図4 Zymosan 誘導 CL における血漿の役割。全血中の血漿を加熱非働化血漿又は4℃, 1時間 Zymosan で吸収した血漿で置きかえて CL を検討した。

わち peak CL を呈するまでの時間は血漿濃度, 多分オプソニン活性, によって規定されていると考えられる。次にこの血漿の CL に対する効果因子について分析検討した。

④補体および特異抗体の全血 CL における役割: オプソニン活性として, 非特異的オプソニン (補体: C_3b) と特異的オプソニン (特異抗体) の2種類があるが, これらの全血 CL における役割を, 各種 CL 誘導物質を用いて検討した。

1) zymosan 誘導 CL (図4): 特異抗体を吸収する目的で, 血漿を zymosan で4℃, 1時間吸収しても, その血漿は吸収前の血漿と等しく全血 CL に対し効果を発現する。一方血漿を56℃, 30分間加熱するとその効果は消失する。すなわち zymosan 誘導 CL に対する血漿の役割は, 補体系による zymosan のオプソナイズであると考えられる。

2) Agg 誘導 CL (図5): Agg 10 μ g 刺激による全血 CL には血漿成分を必要としない。すなわち Agg がオプソナイズされる必要がない事を示唆する。

3) SRBC 誘導 CL (図6): SRBC 浮遊液10 μ l を全血に添加すると CL を呈するが, この場合補体系と特異抗体により SRBC がオプソナイズされる必要性のある事が明らかとなった。すなわち非働化血漿および4℃, 1時間 SRBC で吸収した血漿で全血の血漿を置きかえると, SRBC による CL は認められなくなる。一方吸収血漿は zymosan CL に対しては効果

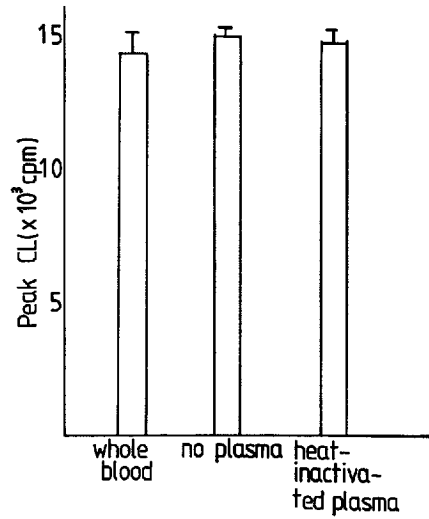


図5 Agg 誘導 CL における血漿の役割。
血漿成分は Agg 誘導 CL に必要ないことが示された。

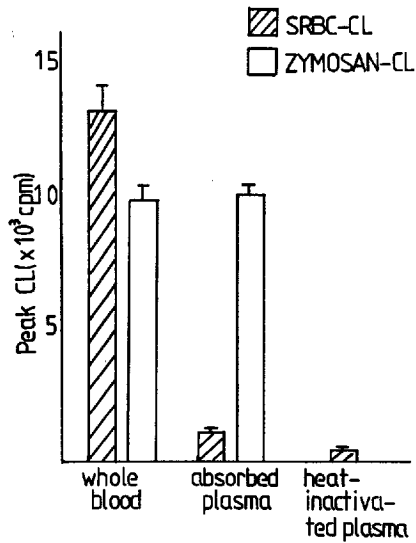


図6 SRBC 誘導 CL における血漿の役割。
全血中の血漿を非働化血漿又は SRBC で 4℃, 1 時間吸収した血漿で置きかえて, SRBC および Zymosan 誘導 CL を検討した。

を発現する。

⑤単位顆粒球相当の peak CL (図7)：臨床的に顆粒球機能を評価するためには、一定数の顆粒球について CL を測定する必要がある。全血 CL 法における peak CL が顆粒球数によ

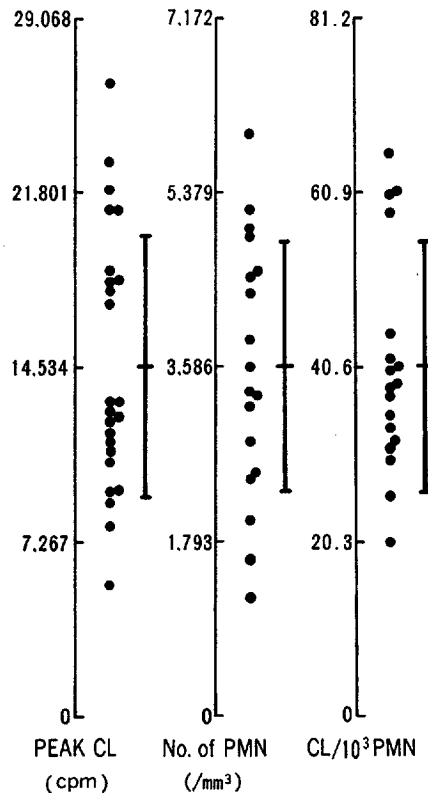


図7 全血 peak CL, 各個体における顆粒球数, および顆粒球 10^3 コ相当の peak CL のばらつきを比較した。各個体間における顆粒球数のばらつきに比較し, 他2者のそれは同程度かやや小さい。

って規定されている事から (オプソニン活性が低下していない場合, 低下している場合はオプソナイズされた zymosan などを用いる), 一定数顆粒球あたりの peak CL 値を計算上求め, それを比較する事で臨床的に顆粒球機能を評価する事を試みた。實際上, 全血 (0.1 ml) の呈する peak CL 値と検体中の顆粒球数から peak CL/ $1,000$ コ顆粒球を求めた。図に示す如く, 正常成人18人の示す peak CL/ $1,000$ コ顆粒球のばらつきは, 耳採血検査における顆粒球数のばらつきとほぼ同程度であり, 臨床検査上応用可能と考えられる。また全血 peak CL 値のばらつきも, それらよりやや大きい検査上応用できると考えられる。

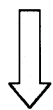
考按および結語

顆粒球機能を評価する手段として, 近年 CL は広く用いられている¹⁾²⁾。また血中のオプソニン活性さらには細菌に対する特異抗体活性の測定にも応用されている³⁾⁴⁾。これらの方法では通常分離した顆粒球を用いるが, この操作は臨床検査としてはいく分複雑であり, かつ血液

量も少量ではできない。今回われわれの報告した方法は、先きに Kato らが発表したものであるが⁵⁾、多くの利点を有している。極めて少量の検体 (0.1ml) で測定可能であり、かつ短時間で結果が得られるのは臨床応用上最大の長所である。単位顆粒球あたりの peak CL を求める事により、食食機能としての顆粒球自身の CL が評価可能であり、また peak CL を呈するまでの時間を測定する事により、CL 誘導物質に対するオプソニン活性 (補体系と特異抗体) も把握可能である。特に後者は当方法の持つ利点の一つであり、CL 誘導物質として細菌などを用いる事によりその特異抗体の測定も可能と考えられる。従来の CL 測定が顆粒球機能の評価のために主として用いられてきたが、当方法は全血の食食機能を in vivo に近い状態で把握するものであり、そしてそのカイネティクスを分析する事により多くの情報が得られ、臨床検査上多くの利点があると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Easmon, C.S.F. et al. : Immunology. **41** : 67~74, 1980.
- 2) Welch, W.D. : Infect. Immun. **30** : 370~374, 1980.
- 3) Hemming, V.G. et al. : J. Clin. Invest. **58** : 1379~1387, 1976.
- 4) Anderson, D.C. et al. : J. Infect. Dis. **141** : 370~381, 1980.
- 5) Kato, H. et al. : Klin. Wochenschr. **59** : 203~211, 1981.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



貪食細胞の機能を把握する手段として,chemiluminescence(CL)を利用する方法は極めて有用である。この CL には内因性 CL と luminol を介した CL(luminol 依存性 CL)の 2 種類があるが,その発光量の多さからいって,臨床的には最近後者が用いられている。この luminol 依存性 CL の原理は,貪食などにより活性化された貪食細胞が O_2^- , $1O_2 \cdot OH$, H_2O_2 などの活性酸素を産生して,それらが luminol を酸化することにより光粒子を放出させることに基づいている。すなわちこの系における発生光粒子量と貪食細胞の活性程度は良く相関する。また産生される活性酸素は細胞内における殺菌機構の重要な担い手であるため,この luminol 依存性 CL を測定することにより,貪食細胞の殺菌機能を間接的に評価できる。一般的に CL は purify した貪食細胞,すなわち主に好中球について応用されている。しかしながらこの方法は臨床検査法としては比較的複雑で,また好中球分離の操作が結果に多大な影響を与える。今回われわれは全血をそのまま利用して,顆粒球機能と血中オプソニン活性を同時に測定する目的の CL 測定法を開発した。この方法は微量の血液(0.1ml)で測定可能で,さらに短時間(約 20 分)で結果が得られるという長所を持っている。