

ヒト末梢単核球における赤血球膜成分に 対する receptor 保有細胞について

細 井 進
三 河 春 樹
(京都大学医学部小児科)

ヒトリンパ球は各種動物の赤血球に対する receptor を保有している。羊赤血球は Tリンパ球と結合し、マウス赤血球は Bリンパ球の一部と結合する。Tリンパ球の中でより未熟な一部の細胞は自己赤血球とも結合することが知られている。これらの性質はヒトリンパ球の sub-population のマーカーとして用いられ臨床免疫学の発展に大きく寄与してきた。通常胎児牛血清中で当該赤血球と混合し、4°C にて2時間静置した後、rosette 形成細胞を数えている。われわれは超音波処理にて破壊されたヒト赤血球膜成分に対する receptor が一部のヒト末梢単核球に存在することを知り、検討を加えて来たので報告する。

方 法

1) FITC 又はローダミン標識赤血球膜の作製

図1に FITC またはローダミン標識赤血球膜の作製方法を示す。ヘパリン加ヒト末梢血に6%デキストランを加え室温にて1時間放置し、赤血球を沈降させた後 PBS pH 7.4にて3回

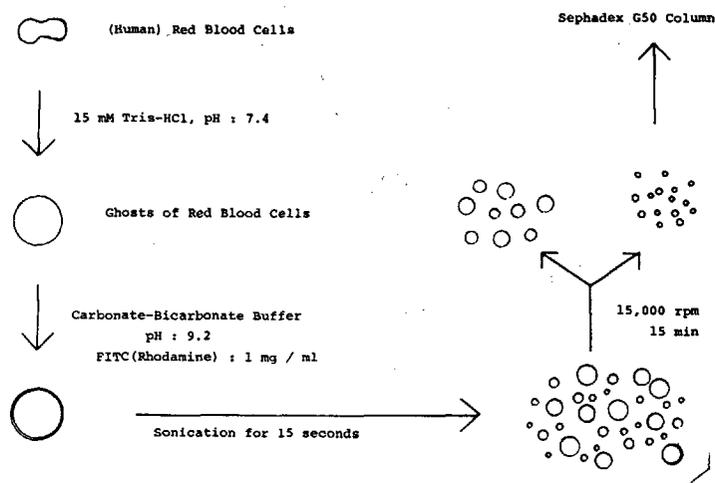


図1 Preparation of FITC (Rhodamine)-conjugated Vesicles of Red Blood Cells

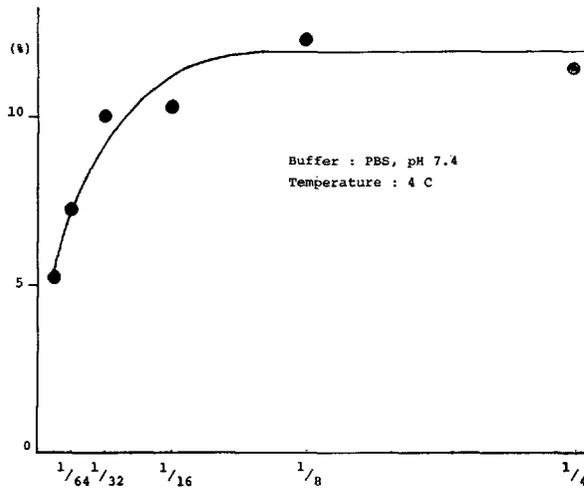


図2 Relationship of the dilutions of FITC-conjugated-HRBCV to the labeled cells in PBM

洗浄する。容量にて30倍以上の15 mM Tris-HCl, pH 7.4にて溶血し ghost を0.9% NaClにてよく洗浄する。0.05 M Carbonate-Bicarbonate pH 9.2にて FITC または ローダミンを標識する。PBS pH 7.4にて充分遊離色素を洗浄した後、超音波処理にて標識 ghost を破壊し15,000 rpm 15分間遠心し上清を得る。Sephadex G50カラムを通すことにより、遊離の色素を除き最初の洗浄赤血球量の PBS pH 7.4に浮遊させる。

2) 赤血球膜成分に対する receptor 保有細胞の検出法

ヘパリン加ヒト末梢血より Ficoll-Paque 比重遠心法にて単核球を得、0.1% BSA 加 PBS pH 7.4にて洗浄後、同液または0.1% BSA 加 MEM 培養液に $5 \times 10^6/ml$ となるように浮遊する。50 μl の細胞浮遊液と 50 μl の FITC または ローダミン標識赤血球膜浮遊液とを混合、4°C または 37°C 1時間静置後 4°Cにて2回洗浄し、蛍光顕微鏡にて陽性細胞を数える。

結 果

1) 蛍光色素標識赤血球膜の希釈度と陽性細胞数との関係

PBS pH 7.4, 4°C の条件における FITC 標識ヒト赤血球膜浮遊液の希釈度と陽性単核球数との関係を図2に示す。16倍希釈まで陽性細胞は増加するが16倍以下の希釈で一定の値に達し、約12%の末梢血単核球が細胞表面に蛍光を示す。MEM 培養液, 37°C の条件でも同様の傾向を示すが、この条件では約10%の単核球が細胞内に蛍光色素を貪食しているのが認められる(図3)。また、PBS, 4°C の条件で表面に蛍光を示す細胞は比較的小さく、小リンパ球と思われるのに対し、MEM 培養液37°C の条件で蛍光色素を貪食している細胞は比較的大型であり、単球と思われた。以降 FITC 標識赤血球膜浮遊液は10倍希釈にてローダミン標識物は20倍希釈にて用いた。

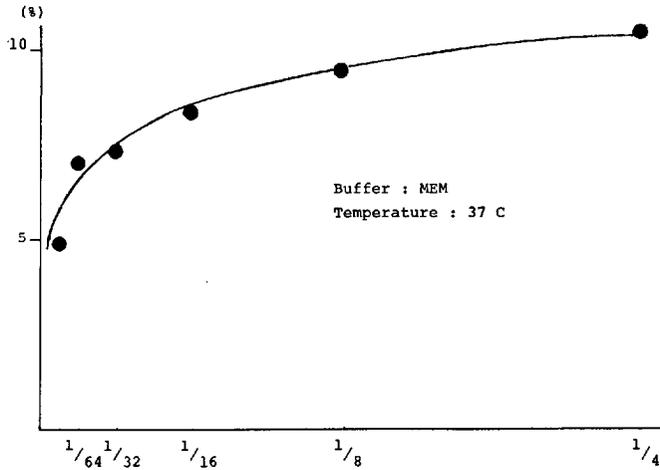


図3 Relationship of the dilutions of FITC-conjugated-HRBCV to the labeled cells in PBM

2) FITC 標識赤血球膜とローダミン標識赤血球膜による阻止テスト

ヒト赤血球膜成分に対する receptor の特異性を検定するために、FITC 標識標本とローダミン標識標本を用いて阻止テストを行った。すなわち、細胞浮遊液を予め FITC 標識標本と 4°C 1 時間混合静置した後、ローダミン標識標本を加えさらに 1 時間静置後 2 回洗浄し、FITC の蛍光を持つ細胞とローダミンの蛍光を持つ細胞とをそれぞれ数えた。又逆に、ローダミン標識標本と反応させた後に FITC 標識標本を加え同様に蛍光を持つ細胞を数えた。図 4 に示すように先に FITC 標識物を加えた場合、ローダミンの蛍光を示す細胞は全く認められず完全に阻止されている。一方、予めローダミン標識物を加えた場合、FITC の蛍光を示す細胞は 5% であり完全には阻止されていないが、約 50% の抑制が認められた。このことはヒト赤血球膜成分とヒト単核球との結合は特異的な receptor を介した結合であることを示している。この receptor がヒト赤血球膜成分に特異的なものであるか、または種を問わず赤血球膜共通の成分に対するものであるかを検定するため、FITC 標識牛赤血球膜成分とローダミン標識ヒト赤血球膜成分を用いて同様に阻止テストを行った。図 5 に示すように完全な阻止または抑制が認められヒト赤血球に特異的ではなく各種動物の赤血球に共通した膜成分に対する receptor であると考えられた。

3) 4°C における陽性細胞数への Buffer の影響

4°C で 1 時間静置した場合の陽性細胞数は図 6 に示すように PBS pH 7.4 の場合 10% 前後であるのに対し、MEM 培養液を用いた場合 17% 前後に陽性細胞が増加する。このことより赤血球膜成分に対する receptor には少なくとも 2 種類存在しているように思われる。後で述べる FITC 標識抗ヒト免疫グロブリンを用いた二重蛍光染色法の結果などから、PBS において結合する receptor は B リンパ球の一部に存在し、MEM 培養液中では B リンパ球の一部と単

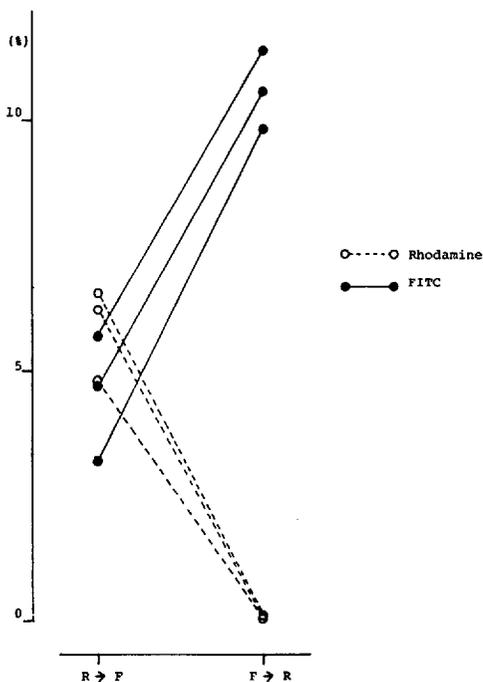


図4 Reciprocal inhibition tests with FITC-conjugated and Rhodamine-conjugated HRBCV. (PBS, 4°C)

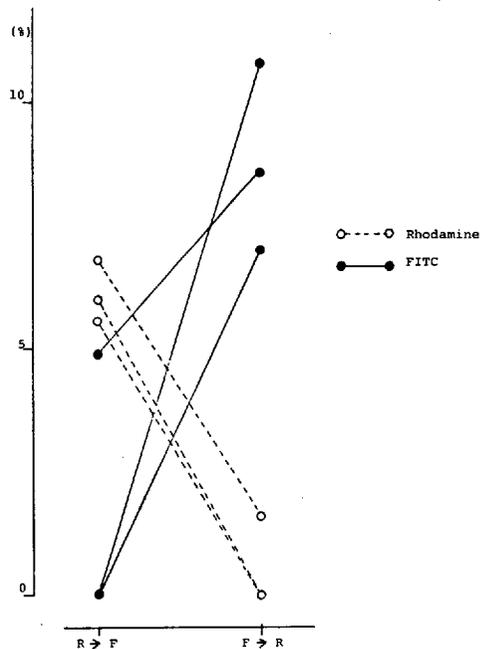


図5 Reciprocal inhibition tests with Rhodamine-conjugated HRBCV and FITC-conjugated ORBCV. (PBS, 4°C)

球が赤血球膜成分と結合すると思われる。

4) 末梢血白血球各分画における赤血球膜成分に対する receptor 保有細胞 (図7)

ヘパリン加末梢血に6%デキストランを加え赤血球を沈降させた後、白血球をFicoll-Paque比重遠心法にて多核白血球と単核球に分け、それぞれについてreceptor保有細胞を測定した。多核白血球は4°Cにおいて赤血球膜成分と結合せず、37°Cにおいても細胞内へ取り込まない。一方単核球分画は条件により異なるが7.8%~26.5%はreceptorを保有している。単核球をナイロンウールカラムによって素通り分画と付着性分画に分けた所、素通り分画には、receptor保有細胞は少なく、付着性分画の14.7%にreceptor保有細胞が存在している。羊赤血球とrosetteを形成させたのちFicoll-Paque比重遠心法にてT分画とnon-T分画に分けた場合、T分画には3%しか保有細胞が存在しないがnon-T分画の60%はreceptor保有細胞であった。次に、F(ab')₂にしたFITC標識抗ヒト免疫グロブリンとローダミン標識ヒト赤血球膜成分を用いた二重染色法の結果、表面にIgMを持つBリンパ球の69%、IgGを持つBリンパ球の11%はヒト赤血球膜成分に対するreceptorを同時に持つことがわかった。表面にIgAを持つBリンパ球については数が少なく、receptor保有細胞の割合は不明であった。以上の結果より、4°Cにて赤血球膜成分と結合する殆どどの細胞はBリンパ球であり、逆にBリンパ球の一部のsubpopulationに赤血球膜成分に対するreceptorが存在することが明らか

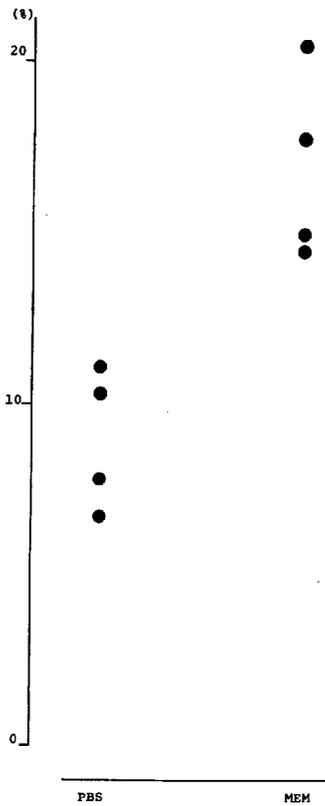


図6 Effects of the buffers

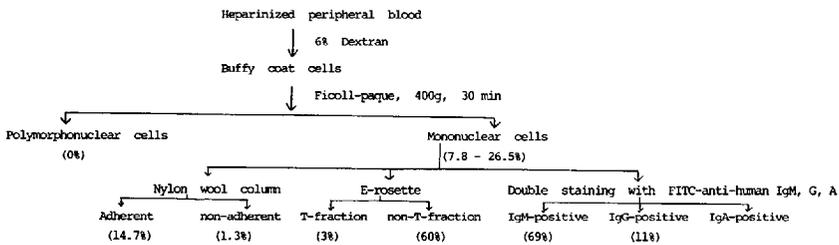


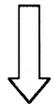
図7 Relationship between Cells having the Receptor to Human RBC Membrane and Fractionated Peripheral Blood Cells

になった。単核球を MEM 培養液にて 37°C 2 時間培養し単球をカバーグラスに付着させ、赤血球膜成分に対する貪食の有無を調べた結果、カバーグラスに付着した単球はヒト赤血球膜成分を貪食し得ることが分かった。

考 察

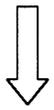
ヒト末梢血単核球の内 B リンパ球の一部はヒト赤血球と牛赤血球の膜成分に対する receptor

を保有し、4°C PBS pH7.4 の条件にて検出することができた。また、MEM 培養液中ではヒト単球も同様に赤血球膜成分を結合し、37°C では貪食し得ることが明らかになった。現在のところこれらの赤血球膜成分に対する receptor の生物学的意義については不明であるが、Bリンパ球のある subpopulation に存在することはこれらのマーカーとして有用であり、Bリンパ球の分化成熟の過程についての研究に何らかの意味を持つものと考えられた。一方、単球に自己赤血球を含めた赤血球膜成分に対する receptor が存在し、貪食もし得るということは老化赤血球の処理機構との関係で興味あることと考えられた。今後、赤血球膜成分の内、何がBリンパ球または単球との結合に関与しているのかを明らかにすると同時に、receptor 保有Bリンパ球の機能的特徴を調べることにより、ヒトBリンパ球の分化との関係を明らかにしていく予定である。このことにより、先天性免疫不全症の中でBリンパ系の機能異常の一部について、その発症機序をより明らかにすることが可能となるように思われる。



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



ヒトリンパ球は各種動物の赤血球に対する receptor を保有している。羊赤血球はTリンパ球と結合し、マウス赤血球はBリンパ球の一部と結合する。Tリンパ球の中でより未熟な一部の細胞は自己赤血球とも結合することが知られている。これらの性質はヒトリンパ球の sub-population のマーカーとして用いられ臨床免疫学の発展に大きく寄与してきた。通常胎児牛血清中で当該赤血球と混合し、4 にて2時間静置した後、rosette形成細胞を数えている。われわれは超音波処理にて破壊されたヒト赤血球膜成分に対する receptor が一部のヒト末梢単核球に存在することを知り、検討を加えて来たので報告する。