

ヒト単球及びBリンパ球機能のモニタリングに関して

—特に自己及び同種赤血球膜成分に対する receptor について—

細 井 進
三 河 春 樹
(京都大学医学部小児科)

免疫応答には各免疫担当細胞間の相互作用が不可欠であることがよく知られている。Interleukin I や Interleukin II などの液性因子の他にマクロファージとTまたはBリンパ球の直接的接触が必要であり、先天性免疫不全症の成立にこの細胞間相互作用の異常が関与していると考えられる。われわれは超音波処理および Trypsin にて処理された自己赤血球膜成分に対する receptor がヒト末梢単核球に存在することを見い出した。自己赤血球膜成分に対する receptor は単球およびBリンパ球に存在しており、免疫担当細胞間の直接的接触によって重要な働きをしていると考えられた。免疫不全症のモニタリングをしていく上で、この receptor の性状を明らかにすることが重要であると考えられたので以下の検討を進めた。

方 法

1) ローダミン標識赤血球膜の作製

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、白血球を殆んど含まない赤血球を得る。PBS pH 7.4にて3回洗浄後、15 mM Tris-HCl, pH 7.4にて溶血し ghost を作製する。0.05 M Carbonate-Bicarbonate pH 9.2にてローダミンを標識し、よくPBSにて洗浄した後、15秒間超音波処理する。15,000 rpm 10分間遠心した上清をさらに Sephadex G50 カラムを通すことにより遊離のローダミン色素を含まない小さな標識赤血球膜成分を得る。

2) ^{125}I 標識赤血球膜成分の作製

未処理の洗浄赤血球または Trypsin 1 mg/ml および Chymotrypsin 1 mg/mlにて処理した赤血球を1)と同様に溶血させ ghost を作製する。15秒間超音波処理した後、15,000 rpm 10分間遠心し上清を得る。おのおのの0.5mlに対し0.5 mCi の ^{125}I を Iodogen 法にて標識した後、Sephadex G50 カラムにて遊離の ^{125}I を除く。

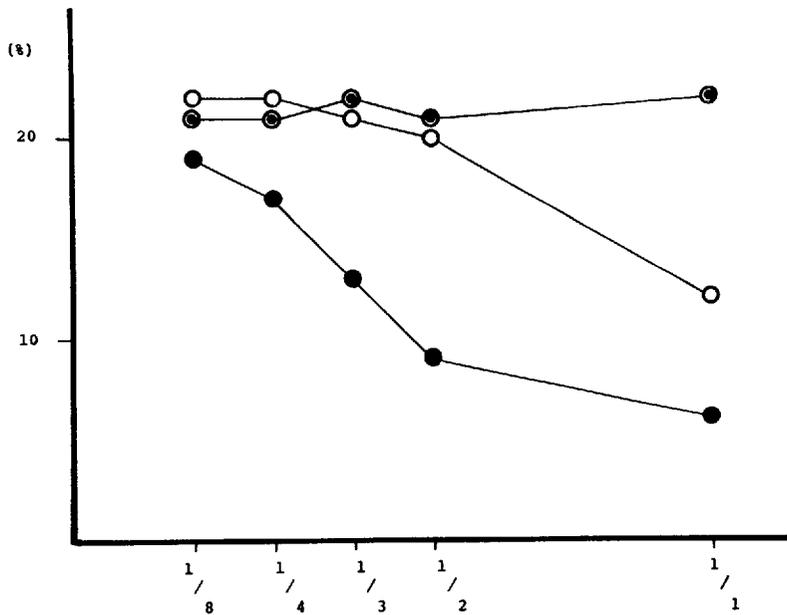


図1 ローダミン標識ヒト赤血球膜成分とヒト単核球の結合に対する未標識羊 (○), 牛 (○) 及びヒト (●) 赤血球膜成分による阻止テスト。縦軸：陽性細胞率，横軸：加えた未標識赤血球膜成分の希釈度

結 果

1) ローダミン標識赤血球膜成分に対する receptor 保有細胞

ヘパリン加末梢血より Ficoll-Paque 比重遠心法にて単核球を得て、PBS に 1×10^7 個/ ml となるように浮遊する。段階希釈したローダミン標識赤血球膜成分浮遊液 $0.1 ml$ と単核球浮遊液 $0.1 ml$ とを混合し、 $4^\circ C$ にて 2 時間放置後、PBS にて 2 回洗浄し螢光顕微鏡にて陽性細胞を数えた。昨年度にも報告したように、16 倍希釈ローダミン標識赤血球膜成分にて、陽性細胞数が plateau に達した。ローダミン標識ヒト赤血球膜成分と同様に作製した未標識羊、牛およびヒト赤血球膜成分による阻止テストの結果を図 1 に示す。羊赤血球膜成分では全く影響を受けないがヒト赤血球膜成分では、8 倍希釈液にても抑制された。また、牛赤血球膜成分にてもやや抑制され、このヒト赤血球膜成分に対して牛赤血球膜成分が交叉性を示すことが考えられた。

(単球および B リンパ球に自己および同種赤血球膜成分に対する receptor が存在する)

単核球を 15% FCS 加 RPMI 培地にて、 $37^\circ C$ 5% CO_2 、1 時間、Petri dish にて incubate し、付着性細胞と非付着性細胞に分けた。非付着性細胞は洗浄後 Sephadex G10 カラムを通した後、PBS に 1×10^7 個/ ml となるように浮遊し FITC 標識ウサギ $F(ab')_2$ 抗ヒト Ig とローダミン標識ヒト赤血球膜成分とを同時に加え、 $4^\circ C$ 2 時間静置後 2 回洗浄し、検鏡した。

表1 Receptor positive cells in subpopulations of human peripheral mononuclear cells

Subject	Adherent cells ^{b)}	Non-adherent cells ^{c)}	
		Surface Ig ⁺ cells	Surface Ig ⁻ cells
A ^{a)}	88%	45%	0.4%
B	92%	78%	0.7%
C	93%	86%	0.6%
D	93%	80%	1.8%

- a) Subject A was the same person from whom RITC-conjugated vesicles of human erythrocytes were obtained.
 b) Which adhered to culture dishes after one hour incubation in RPMI.
 c) Which did not adhere to culture dishes and passed through sephadex G10 column. These cells were incubated with FITC-conjugated rabbit F(ab')₂ anti-human immunoglobulins simultaneously with RITC-conjugated human erythrocyte vesicles.

表2 Receptor positive cells of peripheral mononuclear cells and surface IgM, IgG or IgA positive B lymphocytes

Subject	Mononuclear cells	sIgM ⁺	sIgG ⁺	sIgA ⁺
A ^{a)}	22%	71%	12%	60%
B	33%	98%	24%	75%
C	37%	82%	32%	90%

- a) Subject A was the same person from whom RITC-conjugated vesicles of human erythrocytes were obtained.

付着性細胞は0.02% EDTA を含む冷 PBS にて回収し、洗浄後、ローダミン標識ヒト赤血球膜成分と2時間静置後検鏡した。結果を表1に示す。付着性細胞は、May-Grünwald Giemsa 染色にて87~97%は単球であり、88~93%が receptor を保有していた。一方非付着性細胞のうち、表面免疫グロブリンを持つBリンパ球の45~86%に receptor が存在したが、表面免疫グロブリンを持たないTリンパ球分画では0.4~1.8%であり、Tリンパ球には赤血球膜成分に対する receptor が存在しないと考えられた。また、表2に示すように、Bリンパ球のうち、IgM または IgA 保有細胞の多くに receptor が存在していることが明らかになった。

(ヒト赤血球膜成分に対する Trypsin, Chymotrypsin および Neuraminidase による影響)
 ヒト単核球を PBS に $1 \times 10^7/ml$ となるように浮遊し、Trypsin (1 mg/ml), Chymotrypsin (1 mg/ml) および Neuraminidase (0.1 u/ml) にて処理し、3回洗浄後、ローダミン標識ヒ

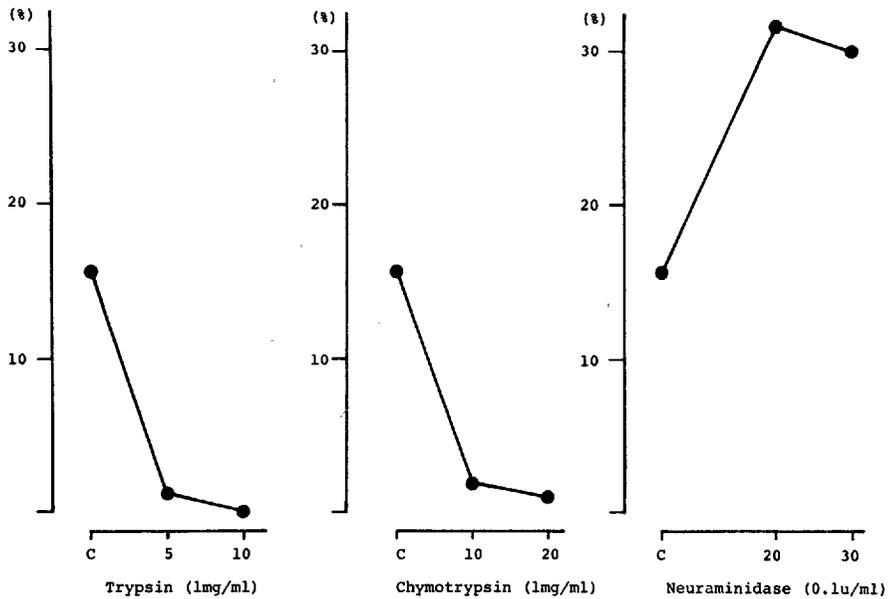


図2 ヒト赤血球膜成分に対する receptor への酵素処理の影響

ト赤血球膜成分と 4°C 2 時間反応させ、各酵素処理の影響を検討した。結果を図 2 に示す。Trypsin または Chymotrypsin 処理にて急速に receptor 保有細胞は減少し、Trypsin の場合 10 分にて、Chymotrypsin の場合 20 分にて全く消失してしまった。

一方、Neuraminidase 処理では逆に receptor 保有細胞が増加するようであった。

2) ¹²⁵I 標識ヒト赤血球膜成分とヒト単核球との結合

(Trypsin 処理したヒト赤血球膜成分がより多くヒト単核球に結合する)

10%ヒト赤血球浮遊液を Trypsin 1 mg/ml, Chymotrypsin 1 mg/ml にて30分間処理した後溶血し、未処理赤血球と同様に ¹²⁵I 標識物を得た。得られた ¹²⁵I 標識物の比活性は殆んど3者ともに同様であった。ヒト末梢単核球 1×10⁷ 個/ml浮遊液0.1mlと ¹²⁵I 標識赤血球膜成分の段階希釈液を2時間 incubate 後、2回洗浄しγカウンターにて測定した。図3に示すように、未処理の赤血球膜成分に比べて Trypsin 処理赤血球膜成分がより多く単核球に結合した。

このことより、未処理赤血球には赤血球膜成分と単核球の receptor との結合を阻害する Trypsin に感受性の物質が存在することが推定された。

(¹²⁵I 標識赤血球膜成分の単核球への特異的結合は約1時間にて plateau に達する)

¹²⁵I 標識ヒト赤血球膜成分と単核球との結合の kinetics を見た。

図4に示すように、非標識赤血球膜にて特異的結合を阻止した場合、結合カウントは時間とともに直線的に増加するのに対して、特異的結合は約60分にて plateau に達した。

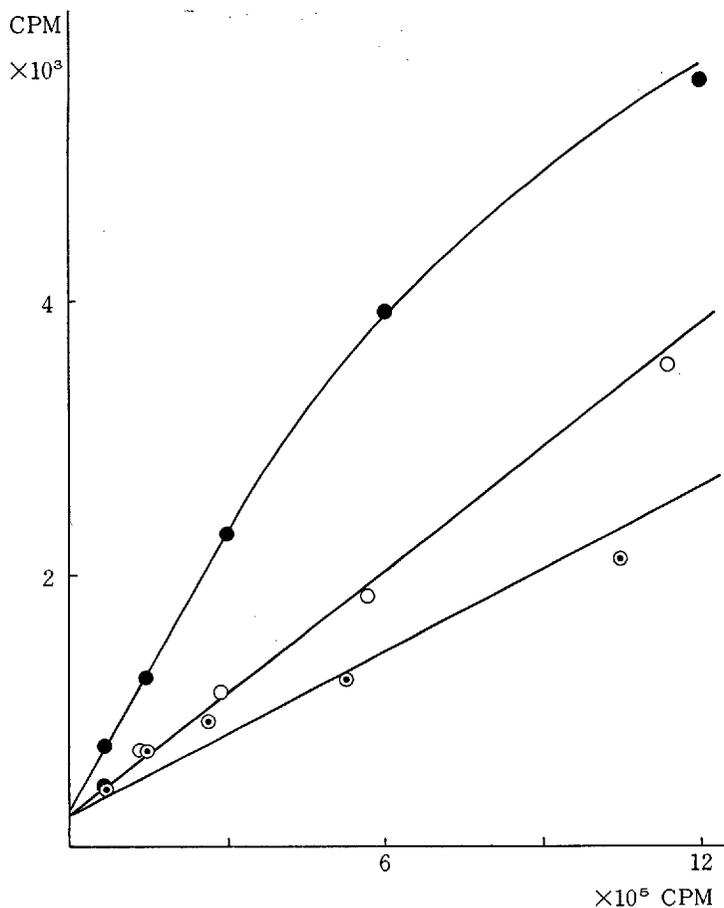


図3 ^{125}I 標識ヒト赤血球膜成分のヒト単核球への結合。(○): 未処理赤血球, (◉): Chymotrypsin 処理赤血球, (●): Trypsin 処理赤血球。横軸: 加えた総カウント, 縦軸: 結合カウント

考 察

ヒト末梢単核球のうち、単球およびBリンパ球の多くに自己または同種赤血球膜成分に対する receptor が存在することが明らかになった。また、この receptor は Trypsin または Chymotrypsin に感受性があり、Neuraminidase には抵抗性があることが分かった。未処理赤血球には、この結合を阻止する Trypsin に感受性のある物質が存在することが推定された。Wiskott-Aldrich 症候群が細胞表面糖蛋白質の異常により発症することが明らかとなったように、免疫担当細胞表面の性状を明らかにすることは免疫不全症の発症機序を解明し、そのモニタリングを行なう上で極めて重要であると考えられる。われわれが見出した自己赤血球膜成分に対する receptor は免疫応答における細胞間相互作用および、老化自己細胞の処理機構との関連において興味を持たれ、今後さらに検討を進めていく必要があると考えられる。

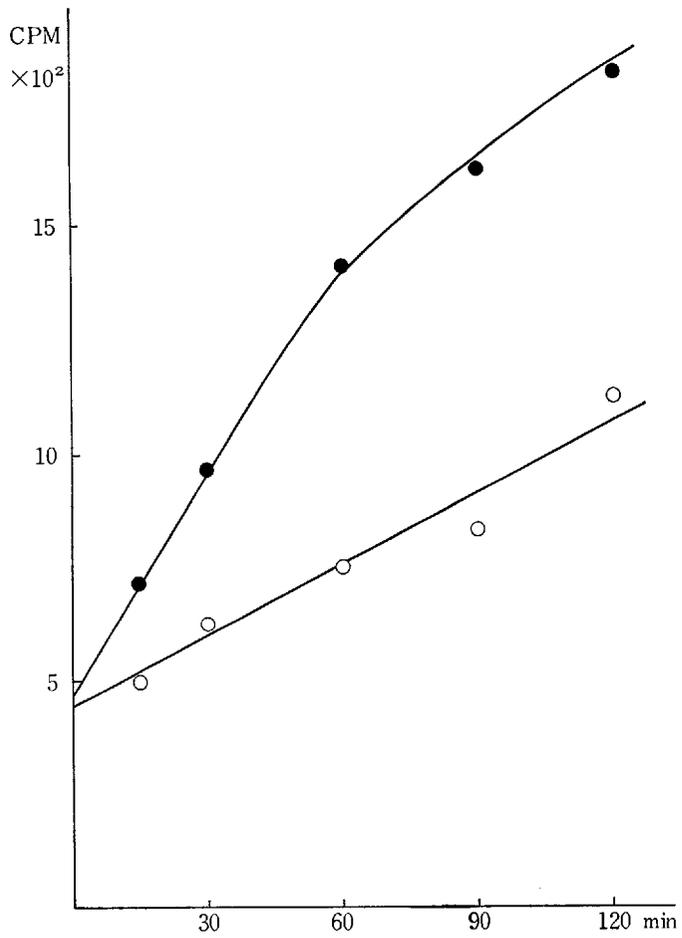
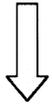
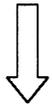


図4 ^{125}I 標識ヒト赤血球膜成分の結合に対する反応時間の影響。
 (○) 未標識物にて特異結合を block した場合



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



免疫応答には各免疫担当細胞間の相互作用が不可欠であることがよく知られている。Interleukin I や Interleukin などの液性因子の他にマクロファージとTまたはBリンパ球の直接的接触が必要であり,先天性免疫不全症の成立にこの細胞間相互作用の異常が関与していると考えられる。われわれは超音波処理および Trypsin にて処理された自己赤血球膜成分に対する receptor がヒト末梢単核球に存在することを見い出した。自己赤血球膜成分に対する receptor は単球およびBリンパ球に存在しており,免疫担当細胞間の直接的接触にとって重要な働きをしていると考えられた。免疫不全症のモニタリングをしていく上で,この receptor の性状を明らかにすることが重要であると考えられたので以下の検討を進めた。