

免疫学的治療 好中球の subpopulation — 臍帯血好中球での検討 —

(分担研究： 新生児の感染症に関する研究)

岩瀬 帥子,* 増田 清和, 木下 洋

要 約

13例の臍帯血について好中球の subpopulation とその走化能を測定し、健康成人と比較検討した。好中球は、カト抗ヒト赤血球IgG抗体で感作した赤血球によりFc receptorを表現するEAロゼットを形成させ、ロゼット形成好中球とロゼット非形成好中球の2つの subpopulation に分画した。好中球走化能は、modified Boyden 法により、3 μ m ポリカーボネイトフィルターとアクリル製フラインド走化能チャンバーを用いて測定した。ロゼット形成率は、健康成人が60.1 \pm 4.3% (16例)、臍帯血が34.2 \pm 8.7% (13例) で有意の差を認めた ($p < 0.01$)。臍帯血の好中球走化能は、ロゼット形成好中球では43 \pm 2であるのに対してロゼット非形成好中球では18 \pm 1と、低下を認めた。これらの結果から、臍帯血の好中球の subpopulation のうちロゼット非形成好中球が好中球走化能と密接な関連をもち、この低下が新生児期の易感染性の一因となっていることが推定された。

見出し語： 臍帯血好中球, 走化能, 新生児感染症

研究 方法

対象は昭和62年1月から同年3月まで本院産婦人科にて分娩した新生児のうち、感染症や重症仮死、重症呼吸障害などの合併症のなかった13例(男児7例・女児6例)の臍帯血で、平均在胎週数は38週(28週から41週)、児の出生平均体重は3,030g(1,700gから3,500g)である。対照として健康成人16例(男11例・女5例)の静脈血を用いた。これらの臍帯血について好中球の subpopulation とその走化能を調べ、健康成人と比較検討した。

1) 感作赤血球の作成は Alsever 液中に保存した

健康成人赤血球(O型)を phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄後、 $1 \times 10^9/ml$ に調整した。PBS にて1:4,000 に希釈したカト抗ヒト赤血球IgG抗体を、前者と等量混和、恒温槽中に37 $^{\circ}$ C 30分にて静置し、洗浄後 RPMI 1640 溶液にて $4 \times 10^8/ml$ に調整した。好中球の分離は、ヘパリンを10単位/全血1mlの割合で加えたプラスチック注射器により臍帯静脈血あるいは健康成人静脈血から採取し、採血後速やかに Boyum の方法に基づいて Ficoll-Hypaque およびテクストラン沈降法を用いて行った。

2) 残渣赤血球は低張性溶血にて除去し、分離好

* 関西医科大学小児科学教室

中球はRPMI 1640溶液中で $10 \times 10^6/ml$ に調整した。次に感作赤血球と分離好中球を50:1の割合で混和し、20℃10分にて遠沈後20℃15分間静置した。静置後血球を再浮遊し、その中から部分標本を採取し、スライドグラスにのせクリスタルバイオレットで染色し、 $\times 400$ 倍で鏡検した。

3) 好中球1個に3個以上の赤血球が付着したものをロゼット形成好中球とし、好中球250個算定し、その比率を求めた。再浮遊液は、比重の異なる2つのFicoll-Conray溶液を3mlずつ重層した液に静かに重層し、1,500G 25分4℃にて遠沈し、ロゼット形成好中球とロゼット非形成好中球に分離した。分離した好中球をそれぞれ集めて10%胎児牛血清付加McCoy 5A溶液にて $1 \times 10^6/ml$ に調整した。

4) 走化能の検討はアクリル製フラインドウエル走化能チャンバー(Neuroprobe)および3 μm の小孔を持つポリカーボネイトフィルターを用いて行った。走化性因子にはエンドトキシン活性化血漿を用い、自己血漿である臍帯血の血漿と対照血漿である健康成人の血漿0.4mlずつを、あらかじめ生理食塩水に溶解し-80℃に保存した大腸菌リポポリサッカライド(Sigma)20 μg と混合し、56℃30分で不活化した。走化能測定時にはこれに1.6mlの10%胎児牛血清付加McCoy 5A溶液を加えて、走化能チャンバーの下室に200 μl を注入し、上室には200 μl の好中球浮遊溶液を注入して37℃45分静置した。測定はおのおのチャンバーを三重施行した。

5) 静置後フィルターを取り出し、下面を表にしてスライドグラスにのせ80%、70%、50%のエタノール中に連続的に浸して固定した。固定後Wright液およびhematoxillin液で染色し $\times 1,000$ 倍で鏡検し、10視野算定し、その平均値で結果を表した。

結 果

13例の臍帯血および16例の健康成人の分離好中球のロゼット形成率の比較を図3に示した。

1) 健康成人ではロゼット形成率の平均は $60.1 \pm 4.3\%$ であり、臍帯血では $34.2 \pm 8.7\%$ と有意な低下を認めた($p < 0.01$)。

2) 健康成人および臍帯血の非分画好中球、ロゼット形成好中球、およびロゼット非形成好中球のそれぞれの走化能の比較を図4に示した。

3) 臍帯血の非分画好中球の走化能はエンドトキシン刺激自己血漿では 23 ± 2 、ロゼット非形成では 18 ± 1 であり、健康成人の非分画好中球走化能 32 ± 2 ($N = 10$)に比較して低下を認めた。反対にロゼット形成好中球の走化能は、健康成人に比べて上昇を認めた。在胎週や出生体重との相関は見られなかった。

考 察

新生児の易感染症と感染の重篤化の原因として、Millerらは好中球走化能の低下が大きく関与していることを述べた。

1) 我々はこれまでに51-クロミウム標識好中球を用いた方法で、新生児期の好中球走化能やエンドトキシン刺激好中球付着能は健康成人に比較して著明に低下していることを報告した。好中球には走化能の点からみて、少なくとも2種類のslow cellとfast cellのあることが、シネビデオアッセイやZigmondの方法で確認されている。

2) 今回臍帯血の好中球を抗ヒト赤血球IgG抗体で感作した赤血球によりロゼットを形成させ、その形成率および2つのsubpopulationのそれぞれの走化能を測定した。その結果、臍帯血のロゼット形成率は、健康成人に比べて有意に低下していること、またこれらのロゼット形成好中球がロゼット非形成好中球に比べて優れた走化能を示すことが判った。

3) これらの結果から、良好なロゼット形成好中球の比率が低い臍帯血では、走化能が健康成人と比較して低値であることが理解できる。このことは、Fc receptorを表現するロゼット形成の成否が好中球走化能を決定する一因になっていると考えられ、新生児期における易感染症の原因を明らか

にする上で好中球の subpopulation は、今後さらに重要視されると考えられる。また、感染症の治療を行ううえで一つの指標となる研究であると考えている。

結 語

新生児の易感染性に関する免疫学的機序について

ではまだ未解決の部分が多い。

我々は、好中球の subpopulation と走化能を通して、この機序を明らかにしようとした。これを明らかにすることによって免疫学的治療の確立と評価の指標が得られるよう期待している。

ロゼット形成率算定とロゼット形成および非形成好中球の分画

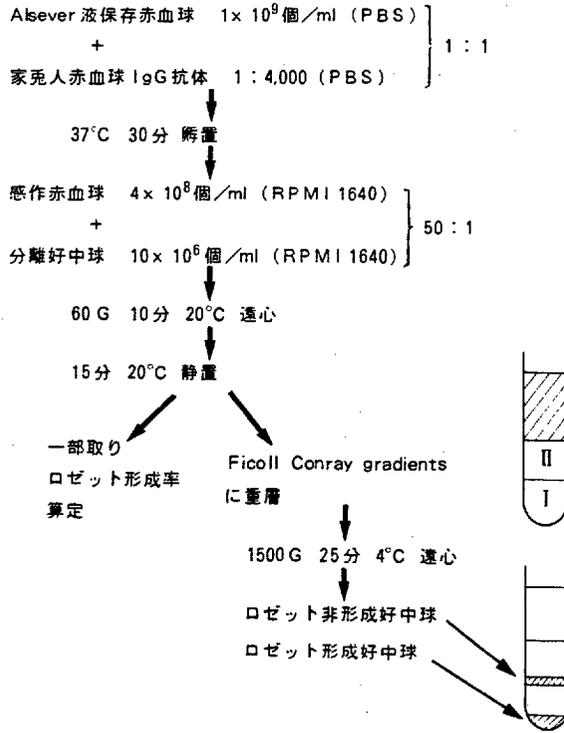


図1.

走化能の測定

上室：分画好中球あるいは非分画好中球 200 μC

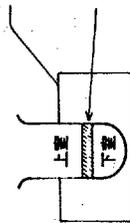
1 x 10⁶個/ml・10%胎児

牛血清付加McCoy 5A 溶液

下室：エンドトキシン活性化血漿 200 μC

アクリル製ブラインドウェル
走化能チャンバー

ポリカーボネイトフィルター
(小孔 3 μm)



37°C 45分 解置

固定 (80%、70%、50% エタノール)

染色 (Wright 液と Hematoxylin 液)

鏡検 (× 1000 倍)

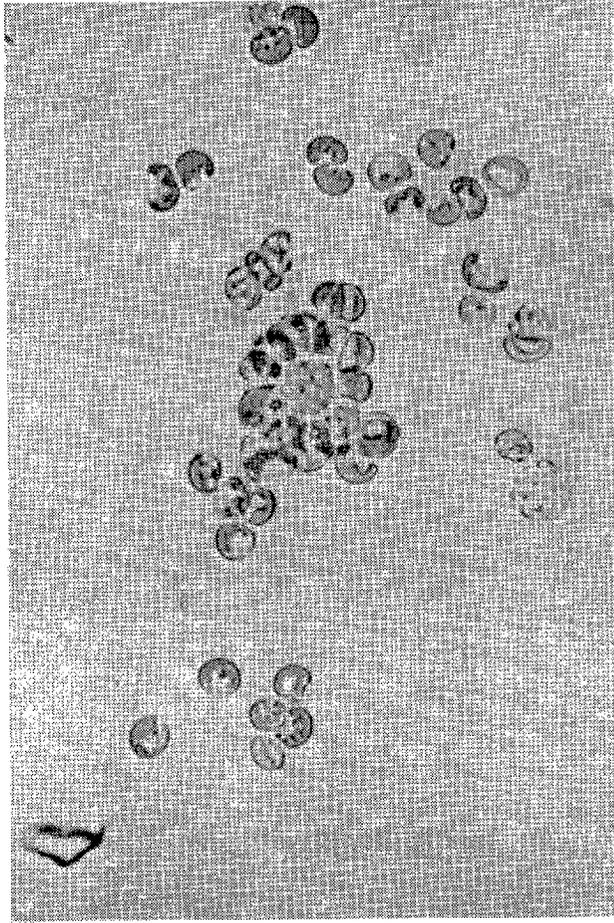


図 2.

ロゼット形成率の比較

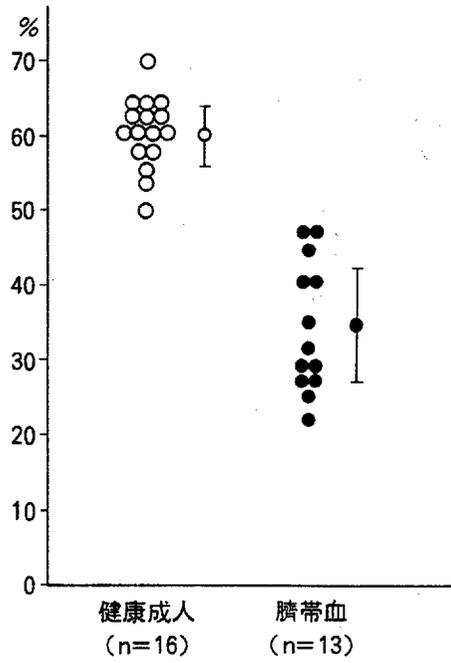


図3.

走化能の比較

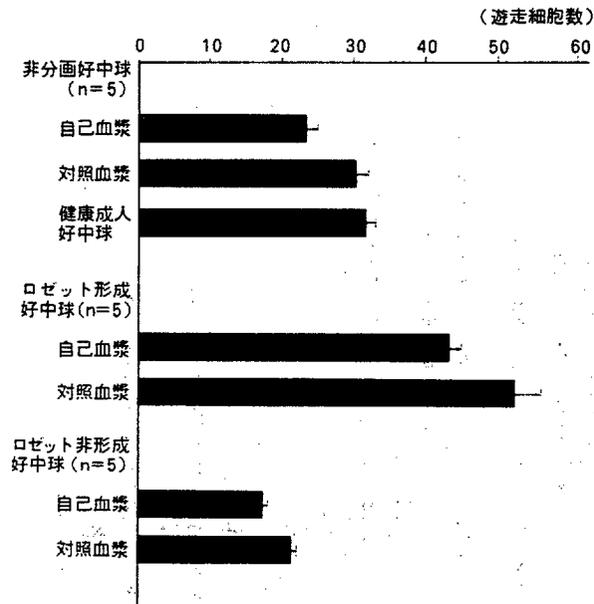
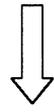


図4.



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



要約

13例の臍帯血について好中球の subpopulation とその走化能を測定し、健康成人と比較検討した。好中球は、カト抗ヒト赤血球 IgG 抗体で感作した赤血球により Fc receptor を表現する EA ロゼットを形成させ、ロゼット形成好中球とロゼット非形成好中球の 2 つの subpopulation に分画した。好中球走化能は、modified Boyden 法により、3 μ m ポリカーボネイトフィルターとアクリル製ブラインド走化能チャンバーを用いて測定した。ロゼット形成率は、健康成人が $60.1 \pm 4.3\%$ (16 例)、臍帯血が $34.2 \pm 8.7\%$ (13 例) で有意の差を認めた ($p < 0.01$)。臍帯血の好中球走化能は、ロゼット形成好中球では 43 ± 2 であるのに対してロゼット非形成好中球では 18 ± 1 と、低下を認めた。これらの結果から、臍帯血の好中球の subpopulation のうちロゼット非形成好中球が好中球走化能と密接な関連をもち、この低下が新生児期の易感染性の一因となっていることが推定された。