

免疫走査電顕による多核白血球 C3b レセプターの分布

—健康成人について—

佐賀 徳博・松田 英彦 (北海道大学医学部眼科学教室)

要 約

健康成人の末梢静脈血から多核白血球を分離し、カバーガラス上に培養し、抗 CR1モノクローナル抗体、40 nm 金コロイド結合二次抗体を用い日立 H-800付属走査型電子顕微鏡にて鏡検し正常好中球で C3b レセプターの分布を検討した。金粒子は拡大することによってその数を数えることが可能であり、金粒子が数個から十数個集まって膜面に散在するもの(金粒子数の平均±標準偏差=59.5±36.8, n=146)、金粒子が十数個から数十個集まって2~3カ所に見られ多くはラッフル (ruffle) 上に認められるもの (121.7±63.8, n=45)、および細胞の一極に見られるもの(74.1±47.4, n=59)の3つの型に分けられた。まとめて1個の細胞が持っている金粒子数の分布をグラフにすると2%の有意水準で正規分布を示し、その平均および標準偏差は74.1±50.6 (n=250)であった。好中球 CR1レセプターは細胞膜面にいくつかの塊となって存在しかつその数および分布は異なっていた (日眼会誌 93:1019-1024, 1989)

キーワード: C3b レセプター, 多核白血球, 好中球, 免疫走査型電子顕微鏡

Distribution of C3b Receptors on Polymorphonuclear
Leukocytes from Normal Healthy Adults by Scanning
Immunoelectron Microscopy

Tokuhiro Saga and Hidehiko Matsuda

Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine

Abstract

The distribution of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes cultured from normal healthy volunteers was examined by scanning immunoelectron microscopy with mouse anti-CR1 monoclonal antibody and 40nm-goat anti-mouse IgG antibody. The distribution was categorized into three types; first, Au-particles clustered in numbers of several to ten or more on polymorphonuclear leukocytes (mean±S.D.=59.5±36.8, n=146), second, tens of the particles mostly on two or three ruffles of the cells (121.7±63.8, n=45), and third, particles assembled at one part of the cells (74.1±47.4, n=59). The distribution of Au-particles on all polymorphonuclear leukocytes showed a normal distribution curve (74.1±50.6, n=250, p<0.02). These results show that polymorphonuclear leukocytes had some tendencies but no uniformity of distribution of C3b receptors on their plasma membrane when they were cultured. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93:1019-1024, 1989)

Key words: C3b receptors, Polymorphonuclear leukocytes, Neutrophils, Scanning immunoelectron microscopy

別刷請求先: 060 札幌市北区15条西7丁目 北海道大学医学部眼科学教室 佐賀 徳博

(平成元年6月28日受付, 平成元年7月26日改訂受理)

Reprint requests to: Tokuhiro Saga, M.D. Dept. of Ophthalmol., Hokkaido Univ. School of Med., N15 W7, Sapporo 060, Japan

(Received June 28, 1989 and accepted in revised form July 26, 1989)

I 緒 言

ベーチェット病は原因不明であるが、発作期で病巣部に好中球が集積することから本病患者好中球には何らかの異常があるものと推測される。我々はいくつかの患者末梢血好中球の微小管の異常を報告してきた¹⁾²⁾。C3b レセプターはFc レセプターと共に細菌貪食を効率的に行い感染防御に重要な役割を果たしている³⁾⁴⁾。また、細胞膜に存在するこのC3b レセプターの膜内移動はアクチンフィラメントによって制御されており⁵⁾⁶⁾、一方アクチンフィラメントの変化は微小管を含めての細胞内骨格の変化を引き起こすと推測されている⁷⁾。ベーチェット病においては血清中の補体価が眼発作を起こす前に減少し、発作期に上昇する⁸⁾といわれており、最近では溶連菌感染の本病との関わりが注目されている⁹⁾。従ってベーチェット病において患者好中球のC3b レセプターに異常があるか否かその分布を調べることは意味がある。しかしながら、正常好中球で蛍光抗体法を用いてその分布を見た報告^{10)~12)}はあるが、その分布をより詳しく観察できる免疫走査電子顕微鏡で見た報告はなく、今回は金コロイ

ドを用い走査電子顕微鏡で観察できる至適条件を設定し、正常好中球でC3b レセプターの分布を検討した。

II 対象と方法

健康成人3名の末梢静脈血10mlを採血し、比重遠沈法にて多核白血球を分離、15%牛胎児血清添加RPMI1640を用いカバーガラス上にて2時間30分インキュベーションした。0.3937モルサッカロース添加0.0667モル磷酸緩衝0.25%グルタルアルデヒド溶液(pH 7.4)にて15分室温にて固定、水素化ホウ素ナトリウム0.5mg/ml (Dulbecco's PBS (-), 以下PBS)にて還元しPBSで洗滌後、正常ヤギ血清(MILES社)を滴下、PBSで洗滌後抗CR1マウスモノクローナル抗体(DAKOPATTS社)を滴下、室温で30分インキュベーションした。0.1%牛血清アルブミン-20mM トリス緩衝液(pH 8.2) (以下Tris)で洗滌し、40nm金コロイド結合ヤギ抗マウスIgG抗体(JANSSEN PHARMACEUTICA社)を滴下、Trisで洗滌、さらにサッカロース加リン酸緩衝2.5%グルタルアルデヒド溶液(pH 7.4)で固定した。エタノール系列で脱水し、酢酸イソアミルで置換した後、炭酸ガスによる

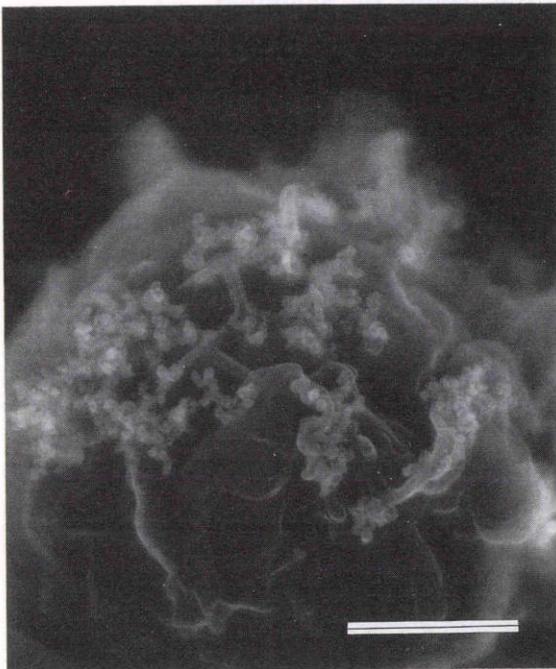


図1 細胞膜上に金粒子が認められ、各粒子を数えることが可能である。×22,500。スケールは1 μ mを示す。



図2 金粒子が数個から十数個集まって膜上に見られる。矢頭は金粒子の集積を示す。×15,000。スケールは1 μ m。

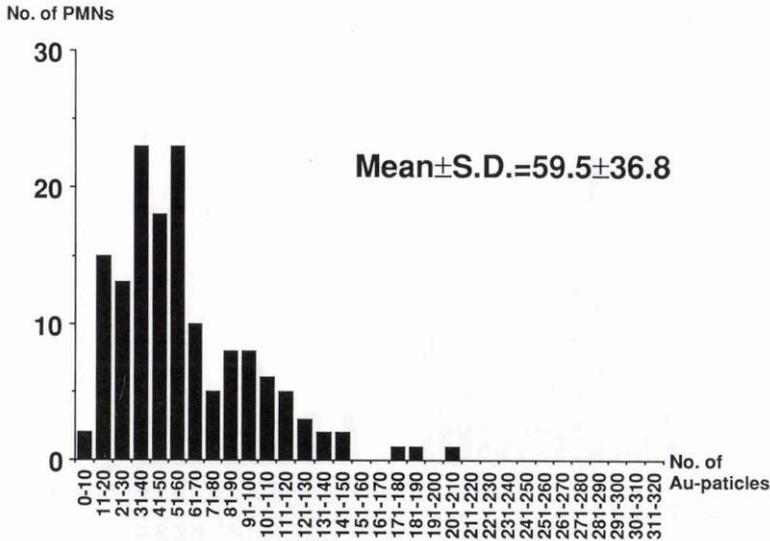


図3 図2で見られるような多核白血球に認めた金粒子の数をかぞえて、どのくらいの金粒子を有する細胞が多いかを横軸に金粒子数を縦軸に多核白血球数をとってグラフにしたもので、4%の有意水準で正規分布をなしている。mean±S.D.

臨界点乾燥を施し金パラジウムを蒸着，日立 H-800 付風走査型電子顕微鏡にて鏡検した。

電顕写真の撮り方は細胞全体が撮影できる倍率で，更に直接倍率20,000倍で細胞を数カ所に分けて撮影し，2倍に引き伸ばして印画紙に焼き付け，金粒子の付着パターン及び粒子数を算出した。3名のうち1名では培養時間30分，1時間30分についても同様に観察した。

抗 CR1 抗体の非特異的沈着の有無をみるために，抗 CR1 抗体の代わりに正常マウスモノクローナル抗体 (IgG1, COULTER CORPORATION 社) を，金コロイド結合抗マウス IgG 抗体のそれを見るために Tris を用い，以下同様に処理し検討した。

III 結 果

総数で250個の細胞を観察した。付着した金粒子は細胞膜がカバーガラスに対して斜めになっている場所に多数を認めた時はその数を正確に算出することはできなかった。しかしながら，多くの場合金粒子は拡大すると図1のように見え解析が可能だった。金粒子の分布から3つの型に分けた。第1の型は金粒子が数個から十数個集まって膜面に散在するものであり(図2)，多核白血球1個が有する金粒子数の分布を調べるために，認められた金粒子の数を10個ごとに分け，各々多核白血球が何個あったかを，横軸に金粒子数を縦軸に

細胞数をとってグラフに表すと金粒子数の平均および標準偏差は59.5±36.8で，4%の有意水準で正規分布

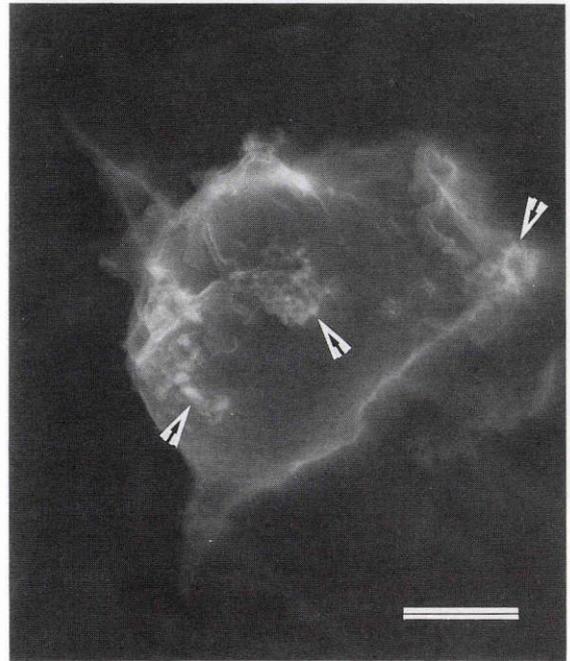


図4 金粒子が十数個から数十個集まって，ラッフル上に見られる。矢頭は金粒子の集積を示す。×15,000。スケールは1μm。

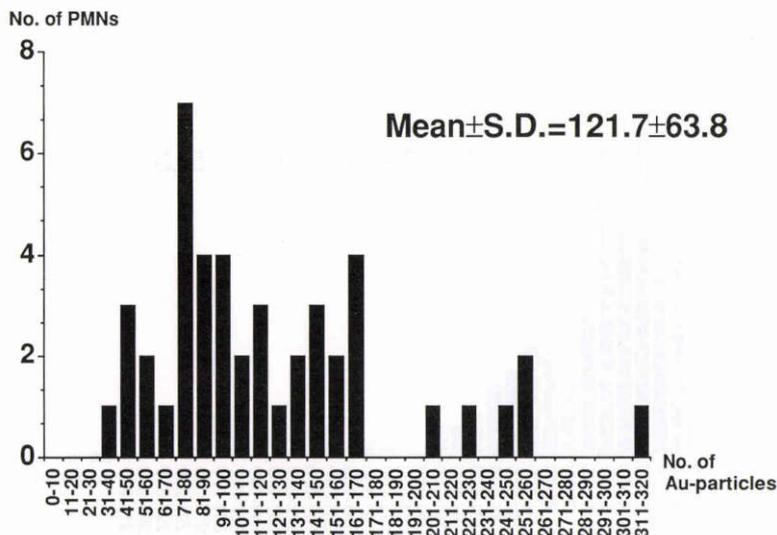


図5 図4でみられる型の多核白血球の金粒子数の分布を示している, mean±S.D.



図6 金粒子が細胞の一極に限局して見られる. 矢頭は金粒子の集積を示す. $\times 15,000$. スケールは $1\mu\text{m}$.

を示した(図3). この型の細胞は146個認められ観察総数の半分以上を占めた. 第2の型は金粒子が十数個から数十個集まって2~3カ所に見られるもので, 多くはラッフル(ruffle)上に認めた(図4). 金粒子数の

平均および標準偏差は 121.7 ± 63.8 ($n=45$)であった(図5). 第3の型は細胞の一極に見られるもので(図6), 金粒子の平均および標準偏差は 74.1 ± 47.4 ($n=59$)であった(図7). 以上3つの型をまとめて1個の細胞が持っている金粒子数の分布をグラフにすると(図8)2%の有意水準で正規分布を示し, その平均および標準偏差は 74.1 ± 50.6 ($n=250$)であった. 抗CR1抗体の代わりに正常マウスモノクローナル抗体を, 金コロイド結合抗マウスIgG抗体の代りにTrisを用いた際, 金粒子は観察されず, 抗体の非特異的沈着は認められなかった.

培養時間が30分では金粒子は全く観察されなかった. 1時間30分では金粒子を認めたが2時間30分のものに比べ少なかった.

IV 考 按

補体レセプターには4種類(CR1, CR2, CR3, CR4)があり, そのうち好中球に存在し, オプソニン化された外来の抗原に対し特異的に貪食を行う際重要な働きをするのがC3bレセプター(CR1)である¹³⁾. これまで蛍光抗体法により調べた結果^{10)~12)}ではこのレセプターは膜面にいくつかの塊となって存在するが, 今回の実験は細胞の分離, 培養などの方法が蛍光抗体法によるものとは異なっていたが, やはり膜面に均一にはあるわけではなく, いくつかの塊となって存在していた. 多核白血球1個あたりのC3bレセプターの数

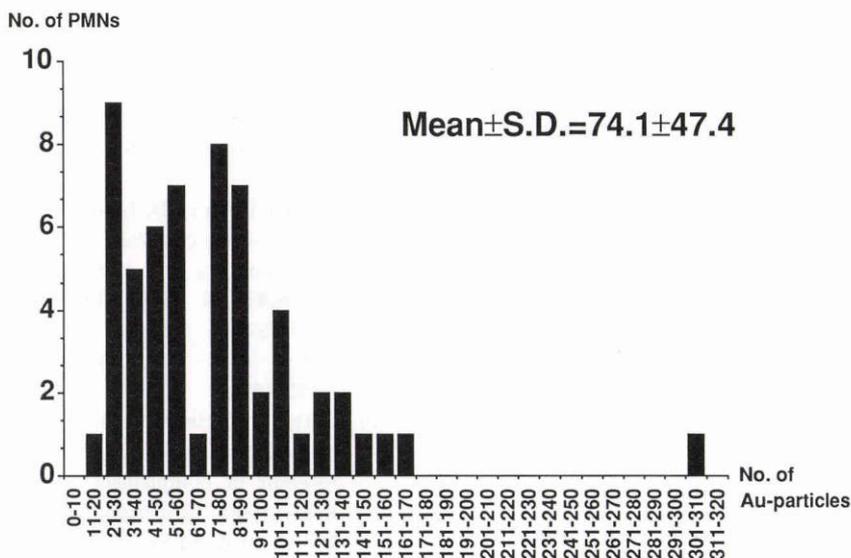


図7 図6で見られる型の多核白血球の金粒子数の分布を示している。mean±S.D.

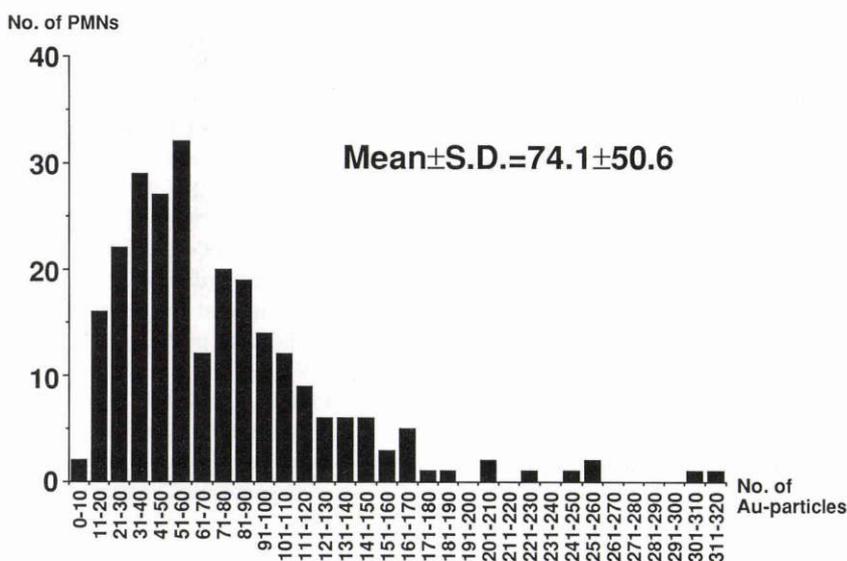


図8 図3, 図5, 図7をまとめたもので, 観察した250個の細胞の金粒子数の分布を示す。2%の有意水準で正規分布を示している。mean±S.D.

度や細胞分離の際の実験条件によって, また報告によって違いが見られ, 刺激を与えずかつ4℃あるいは0℃という低温では少ないもので4,000~5,000¹⁴⁾, 多いものでは86,000¹⁵⁾と大幅な開きがある。しかしながら報告によって数の一致は見ないものの, 37℃で培養した場合やN-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanineやphorbol myristateなどの物質で処理されると3倍から10倍増加するといわれている。

我々の得た結果からレセプターの数を推測することは不可能であるが, 最高の効率で抗体がレセプターを認識した場合を仮定して見ると, 40nmの金粒子に抗体が30個ついており, その半分が膜に接しているとするで使用した抗体はdimericなので, 多核白血球1個あたり, 多くても平均2,200前後と考えられ今までの報告と比べて少ない結果となる。今回の方法では培養時間が30分の場合には金粒子は観察されず, 1時間30分で

認められかつ2時間30分の方が多かったことから、この実験条件では何らかの原因でレセプターが細胞質内に取り込まれた後に膜上に発現したと考えられるが、1つはその発現量そのものが少なかった場合、もう1つは観察されたものはC3bレセプターには間違いのないとしても、条件設定が適切ではなく、実際にもっとレセプターが存在するのに検出されなかったことが考えられる。いずれにしても詳細は不明であり今後の検討が必要と思われる。

結果として蛍光抗体法による光学的顕微鏡の観察よりも、金コロイドを用いた走査型電子顕微鏡による方が細かい観察が可能であること、少なくともC3bレセプターは膜面に均一ではなくいくつかの塊になって存在し、かつ細胞によってレセプターの膜面上の数は一定ではなく、その分布が異なっていることを確認できたことが重要と思われる。

文 献

- 1) **Saga T, Matsuda H**: Microtubules in neutrophils of patients with Behçet's disease. *Jpn J Ophthalmol* 28: 239-247, 1985.
- 2) **Saga T, Matsuda H, Aso S**: Microtubules in neutrophils of patients with Behçet's disease—Immunofluorescence microscopic study—. *Jpn J Ophthalmol* 31: 315-323, 1987.
- 3) **Wilton JMA, Renggli HH, Lehner T**: The role of Fc and C3b receptors in phagocytosis of inflammatory polymorphonuclear leucocytes in man. *Immunology* 32: 955-961, 1977.
- 4) **Schifferli JA, Ng YC, Peters DK**: The role of complement and receptor in the elimination of immune complexes. *New Eng J Med* 315: 488-495, 1986.
- 5) **Fries LF, Siwik SA, Malbran A, et al**: Phagocytosis of target particles bearing C3b-IgG covalent complexes by human monocytes and polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 62: 45-51, 1987.
- 6) **Jack RM, Fearon DT**: Altered surgace distribution of both C3b receptors and Fc receptors on neutrophils induced by anti-C3b receptor or aggregated IgG. *J Immunol* 132: 3028-3033, 1984.
- 7) **Alberts B, Bray D, Lewis J, et al**: *Molecular biology of the cell* (2nd ed), New York, Garland Publishing, Inc, 673, 1989.
- 8) 小暮美津子, 原 弘子, 嶋田孝吉: ペーチェット病における補体. *日眼会誌* 75: 1260-1268, 1971.
- 9) 特集ペーチェット病 1988, *最新医学* 43: 259-293, 1988.
- 10) **Petty HR, Smith LM, Fearon DT, et al**: Lateral distribution and diffusion of the C3b receptor of complement, HLA antigens, and lipid probes in peripheral blood leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6587-6591, 1980.
- 11) **Lambris JD, Ross GN**: Assay of membrane complement receptors (CR1 and CR2) with C3b- and C3d-coated fluorescent microspheres. *J Immunol* 128: 186-189, 1982.
- 12) **O'shea JJ, Brown EJ, Seligmann BE, et al**: Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3di in human neutrophils. *J Immunol* 134: 2580-2587, 1985.
- 13) 吉田健三: 補体レセプター (CR1, CR2, CR3) の測定法. *臨床免疫* 19: 591-601, 1987.
- 14) **Fearon DT, Collins LA**: Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. *J Immunol* 130: 370-375, 1983.
- 15) **Fyfe A, Holme ER, Zoma A, et al**: C3b receptor (CR1) expression on the polymorphonuclear leukocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 67: 300-308, 1987.