

P503

時間蛍光分解法を応用した高感度血中サイトカイン測定法の開発

京大医¹、京大遺伝子実験施設²
早稲田理工³、CREST⁴

池川雅哉¹、田代 啓²、本庶 佑¹
袁 景利³、松本和子^{3,4}

(目的) これまで我々は、従来のImmunoassay法では測定できなかったヒトの血中、マウスなどの実験動物血中SDF-1濃度を測定するため、時間蛍光分解法を応用した高感度血中SDF-1測定法を開発し、SDF-1の生理的タンパク量や分布についての考察を行ってきた¹⁾。また、SDF-1の抗エイズ作用に注目し²⁾⁻⁶⁾、日本のエイズ臨床例の血液サンプルをこの方法を用いて解析し、エイズ発症の分子生物学的メカニズム解明のため興味深い知見を得た¹⁾。本研究では、血液循環中に可溶性因子として存在し、微量で生物活性を持ち種々の病態に関与するばかりでなく、すでに治療応用されているサイトカインを対象にこの測定系を応用し、ヒトおよび実験動物中サイトカインの生理的正常値を決定し、種々の臨床、実験サンプルの測定を可能にすることを目的とした。

(実験) 測定項目として、上記の条件を満たすIL-2およびGM-CSFを選び、それぞれの異なる2種類のエピトープを認識する抗体を用いて、サンドイッチELISA法の原理に基づき、それぞれ1次抗体、2次抗体とした。SDF-1 TR-FIA同様、松本らによるβ-diketoneキレート剤BHHCT^{7),8)}を用い、これで標識したEuを固層で時間蛍光分解的に解析した。血液は、健康日本人ボランティアを対象に、抗凝固剤を用いて採血後、遠心分離し血漿を得た。

(結果・考察) 上記の方法に従い、高感度の測定が可能となり (Fig.1)、再現性においても優れた結果を得た。この測定法では、IL-2およびGM-CSFの両者において従来のELISA法より感度が著しく改善したばかりではなく、正常血漿サンプルにおいても測定可能なシグナルが得られることが明らかとなった。以上の検討から時間蛍光分解法を応用した高感度血中サイトカイン測定法により血漿中サイトカイン濃度の推定が可能となり、正常ヒト血中サイトカイン量を決定するための標準化について若干の考察を加えた。

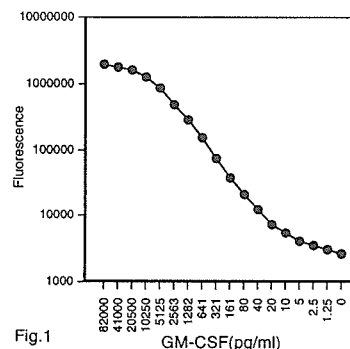


Fig.1

(文献) 1) M.Ikegawa et al. (in preparation) (2000) 2) K.Tashiro et al. Science, 261, 600 (1993) 3) M. Shirozu, Genomics, 37, 273 (1996) 4) Bleul C.C. et al., Nature, 382, 829 (1996) 5) Oberlin E et al. Nature, 382, 833 (1996) 6) Winkler C. et al., Science, 279, 389 (1998) 7) J.Yuan et al. Anal Chem. 70, 596 (1998). 8) J.Yuan et al. Anal. Biochem. 254, 283 (1997).

P504

時間分解蛍光イムノアッセイによる血清中のサイトカインの測定 — 運動強度とサイトカイン濃度の関係について —

○木村博子^{1,4)}、長尾夫美子²⁾、松本和子^{3,4)} (1. 順天堂大法医, 2. 順天堂大免疫, 3. 早大理工, 4. JST)

運動が免疫機能に様々な影響を及ぼすことはよく知られている。特に運動強度が免疫応答に与える影響を調べるために、漸増負荷運動中の運動負荷による血漿サイトカインの濃度変化と、ある一定強度の運動終了後のサイトカイン濃度の経時変化を検討した。サイトカインは種々の細胞性免疫を発現させたり、抗体産生の調節機能に関与する作用物質として知られている。サイトカインのうち、急性期炎症反応に関与し身体運動によっても血液中に放出されることが知られている interleukin-1α (IL-1α), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interferon-γ (INF-γ) を新しいラベル剤 (BHHCT-Eu³⁺) を用いた時間分解蛍光イムノアッセイで測定した。イムノアッセイはサンドイッチ法で行い、ビオチン標識抗体に BHHCT-Eu³⁺ 標識ストレプトアビジン-BSA を反応させた後、Eu の蛍光強度を測定した。IL-1α, INF-γ, TNF-α の検出感度は 1.5-5 pg/mL であった。これらは同じ抗体を用いた ELISA の最小検出濃度よりもそれぞれ、約 1桁高感度に検出できたことになる。この方法で4段階に調節した運動強度 (30%VO_{2max}=完全に有酸素で行える強度, 50%VO_{2max}=無酸素作業閾値よりも少し軽い強度, 70%VO_{2max}=無酸素作業閾値よりも少し強く乳酸値が 2-4 mmol/L になる強度, 80%VO_{2max}=乳酸値が 4 mmol/L 以上になるような強度) がサイトカイン濃度に及ぼす変化を調べたところ、IL-1αは有酸素運動の段階では増加するが、運動強度が増加すると元のレベルに減少することがわかった (Fig. 1)。また、一定強度の運動後は、TNF-αが強い運動終了後に増加する傾向を示し (Fig. 2)、INF-γは弱い運動終了後2時間の回復期に増加していく傾向がみられた (Fig. 3)。運動後のサイトカイン濃度の増加は主に筋線維の損傷に起因すると考えられている。これまでに IL-β, IL-1ra 濃度が運動後に増加したとする報告はあるが、IL-1αに関しては検出されていない。IL-1αの増加は運動後に見られる他のサイトカインとは異なるパターンを示すため、別の意義があると考えられ、今後の研究課題としたい。

