The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Use of a rapid microwave fixation technique for immunocytochemical demonstration of tumor necrosis factor , interleukin-1α , and interleukin-1β in activated human peripheral mononuclear cells
Author(s)	春名, 伸彦
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37729
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【26】

氏名・(本籍)	春名伸彦（はるな のぶひこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9823 号
学位授与の日付	平成3年6月3日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文名	Use of a rapid microwave fixation technique for immunocytochemical demonstration of tumor necrosis factor, interleukin-1α, and interleukin-1β in activated human peripheral mononuclear cells (活性化ヒト末梢血単核球におけるTNF, IL-1αおよびIL-1βの免疫細胞化学的検出—microwave照射による迅速固定法の応用—)
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 北村 幸彦　教授 濱岡 利之

論文内容の要旨

〔目　的〕

種々のcytokineは，生体の免疫反応をmediateする重要な因子であるが，その局在を免疫化学的に同定するのはきわめて難しい。その理由は，産生されるcytokineは微量のうえに短時間内に細胞外に放出され，細胞内に保持される時間がきわめて短いためと考えられる。したがってこうした物質の正確な局在をみるためには，抗原性を良好に保持しつつ短時間内に目的の物質を不動化させる新しい固定法を導入する必要がある。本研究は，biological response modifier（BRM）で刺激されたヒト単核球におけるTNF，IL-1αおよびIL-1βの産生過程を，秒単位の迅速固定が可能なmicrowave固定法を応用することによって免疫細胞化学的手法で追跡したもので，こうした不安定な生体物質の不動化にmicrowave固定法が有用であることを明かにしたものである。

〔方　法〕

ヘパリン加ヒト末梢血から比重遠沈法にて単核球を分離した。2×10^6/mlに調節した単核球をconditioningの後，最終濃度0.1KE/mlのOK-432（加熱およびペニシリン処理されたStreptococcus pyogens，中外製薬）で刺激培養した。刺激後1.5，3，6，12，および24時間目の細胞をcytocentrifugeして，0.02%poly-L-lysineで被覆したスライドグラスに付着させ，ただちに2%paraformaldehyde，0.05%glutaraldehyde，0.025%$CaCl_2$，0.1M sodiumcacodylate溶液を100μl滴下して500W出力のmicrowave（2.450MHz）を10秒間照射して迅速固定した。また，各刺激時間の培養上清を採取して，TNF，IL-1αおよびIL-1βの上清中濃度をenzyme immunoassay（EIA法）にて測

定した。microwave固定した細胞の免疫染色は，抗OK-432および抗TNF，IL-1α，ならびに抗IL-1β家兎血清（Genzyme社，1,000倍希釈）を一次抗体とするavidin-biotin peroxidase complex法にて行なった。また，controlとして各抗血清をそれぞれの抗原物質で中和したものを用意した。

〔成　績〕

培養中のOK-432は，経時的に単核球の細胞質内に取り込まれてゆくのが観察された。TNFの免疫染色では，刺激後1.5時間の細胞で陥凹した核に接する細胞質に点状の染色として発現し，その後経時的に細胞質内にひろがってゆくのが明瞭に観察された。IL-1αは刺激後3時間から細胞質辺縁の染色としてとらえられ，染色強度は6時間で最強となった。またIL-1βとは異なり，細胞質内のビマン性染色像が見られている。これらの反応は中和抗体を用いnegative controlではまったく見られないことから各cytokineを特異的に検出していると考えられた。また，EIA法で決定された培養上清中の各cytokineのkineticsは，免疫染色でえられた結果と良好な対応を示した。

〔総　括〕

1. Microwave照射固定を用いることにより，活性化したヒト末梢血単核球におけるTNF，IL-1αおよびIL-1β産生過程を免疫細胞化学的に追跡することが可能であることを明らかにした。
2. 単核球はOK-432を貪食したのち，きわめて短時間内にTNF，IL-1αおよびIL-1β の産生を開始し，培養上清中に放出すると考えられた。
3. 各cytokineの細胞内局在には相違があり，TNFとIL-1βが細胞質にビマン性に存在するのに対しIL-1αは細胞辺縁に染色される特徴があった。

論文審査の結果の要旨

本研究はbiological response modifier（BRM）の一つであるOK-432で刺激されたヒト末梢血単核球におけるTNF，IL-1αおよびIL-1βの産生過程を，迅速固定が可能なmicrowave固定法を応用することによって，免疫細胞化学的手法で追跡したものであり，こうした不安定な生体物質の不動化にmicrowave固定法が有用であることを明かにしたものである。この研究により，microwave固定法がcytokineの固定や検出に適する優れた固定法であることが示された。今後の免疫細胞化学的研究に資するところが大きく，学位に値する業績と考える。