

# 犬血球表面免疫物質検出法の改良

*Modification for a detection method of canine blood cell surface IgG, IgM and complement*

土屋 亮

麻布大学獣医学部

Ryo Tsuchiya

School of Veterinary Medicine, Azabu University

**Abstract:** Different methods for the preparation of IgG-, IgM- and complement (C3)-positive canine platelets were investigated. Flow cytometry of FITC-conjugated anti-dog IgG, anti-dog IgM and anti-dog C3 polyclonal antibodies was used to detect platelet surface-bound immunological components.

Platelets that were positive for IgM only were identified, but platelets positive for only either IgG or C3 were not found. Platelets positive for IgG, IgM and C3 ('IgG/IgM/C3 positive platelets') were prepared by incubating endotoxin (LPS) with platelet rich plasma (PRP) for 30 minutes at room temperature.

We considered that IgG/IgM/C3 positive platelets could be used as a common positive control in IgG, IgM and C3 detection assays. To be a common positive control, FITC-conjugated antibodies must bind specifically to their targets on the IgG/IgM/C3 positive platelets. Preincubation of IgG/IgM/C3 positive platelets with eight times excess of non-labeled anti-dog IgG, IgM or C3 antibodies specifically blocked binding by FITC-conjugated anti-dog IgG, IgM or C3 antibodies.

These results suggest that IgG/IgM/C3 positive platelets could be utilized as a common positive control in assays for the detection of platelet surface IgG, IgM and C3.

## 1. 目的

免疫介在性血小板減少症および免疫介在性溶血性貧血は、犬に多発する疾患であるが、その診断はもっぱら免疫抑制療法に対する症状改善の有無によっている現状にある。しかしながら、この疾病において最も信頼性が高い診断方法は、血小板あるいは赤血球（血球）表面の免疫物質すなわち免疫グロブリン（IgG, IgM）や補体第3因子（C3）の検出であり、ラジオイムノアッセイやフローサイトメトリーあるいはELISAなどの免疫学的方法で測定されている。

この検出技術の信頼性を確認するためには測定のと度、陰性ならびに陽性コントロール血球（IgG, IgMあるいはC3結合既知の血球）が必要である。文

献的にIgGおよびIgM陽性コントロール血球は、自己抗体強陽性犬の血清を保存してその自己抗体を健康犬血球に結合させたり<sup>1)</sup>、あるいは症例犬の陽性血球そのものを固定して保存する<sup>2)</sup>などの方法で入手されている。しかしながらC3陽性コントロールの入手については、文献的にも確立された方法は見受けられない。いずれにしても、安定的に均質なIgG, IgMおよびC3陽性コントロール血球を入手することは極めて困難な状況である。

そこで本研究では、血小板表面結合免疫物質の検出に利用することを目的に、血小板表面IgG, IgMならびにC3陽性コントロールの作製法について検討した。

## 2. 方法

### (1) IgG陽性血小板作製の試み

Jouらが開発した赤血球表面に蛋白を化学的に結合させるクロスリンク法を応用して<sup>3)</sup>、犬のIgG陽性血小板の作製を試みた。使用する血小板は、健康な犬の全血を2,500G・1分間遠心して多血小板血漿 (PRP) を分離し、この中の血小板を3% BSA加0.15Mリン酸緩衝生理食塩液pH7.4 (PBS) で3回遠心洗浄して得た。また、精製犬IgGはROCKLAND社のwhole molecule dog IgGを用いた。作製したIgG結合血小板は、最終的にPBSで3回の遠心洗浄を行い、 $40 \times 10^4/\mu\text{l}$ になるようにPBSに再浮遊させた。

### (2) IgM陽性血小板作製の試み

犬の全血あるいはPRPを長時間放置すると、血小板には非特異的にIgMが結合することが知られている<sup>4)</sup>。そこで、IgM陽性血小板を得るためにこの現象を応用して、EDTA処理PRPを冷蔵庫内に48時間静置した。その後の血小板洗浄と再浮遊は、前述のとおり行った。

### (3) C3陽性血小板作製の試み

精製犬C3は市販されておらず、また犬血清等からの精製も非常に困難と思われた。そこで、PRPにエンドトキシン (LPS) を添加すると、LPSは活性化C3と血小板に結合する現象<sup>5)</sup>を応用し、PRPに最終濃度5mg/mlのLPS (E-coli O127; 血清型B8) を添加して室温にて30分間インキュベートした。その後の処理は、前述のとおり行った。

### (4) 血小板表面IgG, IgMおよびC3の検出法

上記の方法により得られた $40 \times 10^4/\mu\text{l}$ 濃度の血小板浮遊液15 $\mu\text{l}$ 、PBS 260 $\mu\text{l}$ およびFITCラベル抗犬IgG、抗犬IgMまたは抗犬C3抗体15 $\mu\text{l}$ を加えて混和し、遮光下にて室温で30分間静置して反応させた。反応させた血小板はPBSで1回遠心洗浄後、1%アジ化ナトリウム加PBS 250 $\mu\text{l}$ でさらに1回遠心洗浄を行い、最後に9mMホルマリン加PBSで室温にて30分間静置して固定した。

血小板表面IgG, IgMおよびC3は、コールター社のフローサイトメーターEpics XLを用いてFITC蛍光強度によって検出した。フローサイトメーターのFITC検出感度は陰性コントロールが陽性率5%未満になるように設定し、FITC陽性血小板率10%以上

を血小板表面IgG, IgMまたはC3陽性と判定した。なお、FITCラベル抗体は次の市販品を用いた。

- FITCラベル抗犬IgG 兎ポリクローナル抗体：P.A.R.I.S.社
- FITCラベル抗犬IgM 山羊ポリクローナル抗体：BETHYL社
- FITCラベル抗犬C3 山羊ポリクローナル抗体：BETHYL社

### (5) 各FITCラベル抗体の標的抗原特異結合の確認

結果に示すとおりIgM単独陽性血小板は作製できなかったものの、IgGおよびC3の単独陽性血小板は入手できなかった。しかしながら、C3陽性血小板試作段階において、IgG/IgM/C3いずれも陽性の血小板が得られた。そこで、これを利用して、次の手順により各抗体の標的物質結合の特異性 (非標的物質との交差反応が起こらない) を評価した。

血小板浮遊液に上記3種のFITCラベル抗体を作用させる際、FITCラベル抗体と由来の同じ非ラベル抗犬IgG、抗犬IgMおよび抗犬C3 (FITCラベル製品と同一メーカー製) をFITCラベル抗体の8倍量添加し、30分後に上記の血小板表面IgG, IgMおよびC3の検出操作を行った。8倍量の非ラベル抗体は、標的物質に対するFITCラベル抗体の結合を競合的にブロックするはずであり、また仮に非標的物質に対するFITCラベル抗体の結合をブロックすれば、その抗体は非標的物質と交差反応することを示す。

## 3. 結果と考察

### (1) IgG陽性血小板

クロスリンク法により試作したIgG陽性血小板は、FITCラベル抗IgG抗体が強く結合したが、同時にIgMおよびC3もわずかに結合していた (データは示さない)。また、クロスリンク操作の過程において、多くの血小板が消失し、陽性血小板として保存するには血小板数が不十分であった。すなわち、良好なIgG単独陽性血小板は得られなかった。

### (2) IgM陽性血小板

PRPの長時間冷却保存によって試作したIgM陽性血小板について、3種のFITCラベル抗体の結合を調べたところ、抗IgM抗体のみが強く結合した (IgM陽性血小板: Figure 1)。

## (3) C3 陽性血小板

PRPにLPSを10分間作用させると血小板にはFITCラベル抗IgMおよび抗C3抗体が結合し、30分間以上作用させるとFITCラベル抗IgG、抗IgMおよび抗C3抗体のいずれもが強く結合した(IgG/IgM/C3陽性血小板; Figure 2)。LPS作用時間の短縮によりC3単独陽性の血小板が得られるか否か試みたが、C3とIgMの結合は常に同時に起こった。すなわち、C3単独陽性血小板は得られなかった。

## (4) 3種FITCラベル抗体の標的抗原特異性

非ラベル抗犬IgG抗体は、IgG/IgM/C3陽性血小板へのFITCラベル抗IgG抗体をほぼ完全に阻害したが、抗IgMおよびC3いずれのFITCラベルの結合にも影響しなかった(Figure 3)。また、非ラベル抗IgM抗体および抗C3抗体も同様に、標的物質に対するFITCラベル抗体の結合のみを阻害した(Table 1)。すなわち、今回用いた3種のFITCラベル抗体は、標的以外の血小板表面免疫物質(IgG, IgMおよびC3)

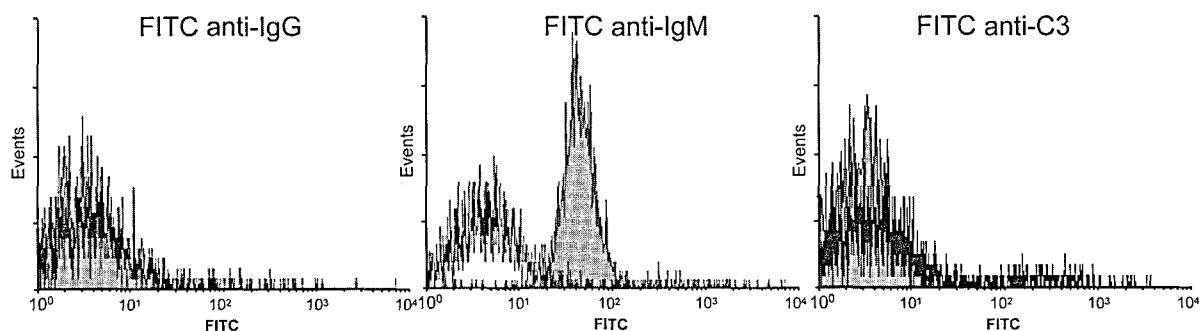


Figure 1 Fluorescence histograms of IgM positive platelets. Black and white: Negative control. Grey: IgM positive control. IgM positive platelets were prepared by storage of platelet rich plasma for 24 hours at 4 °C.

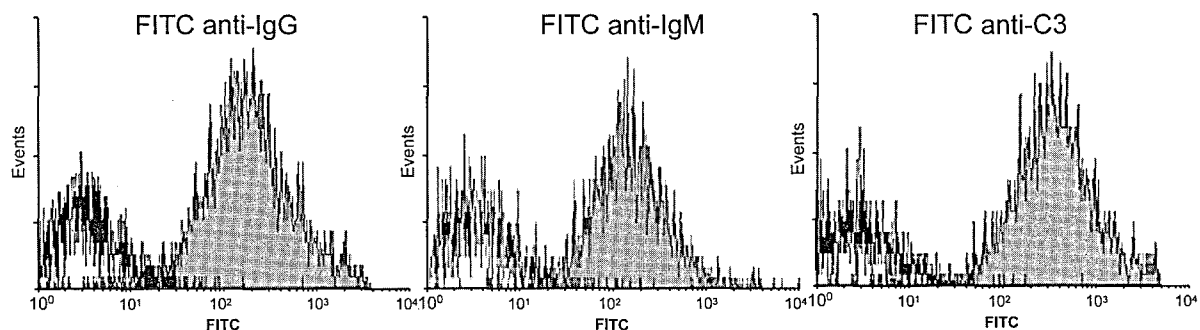


Figure 2 Fluorescence histograms of IgG/IgM/C3 positive platelets. The positive platelets were prepared by adding lipopolysaccharide to platelet rich plasma. Black and white: Negative control. Grey: IgG/IgM/C3 positive platelets.

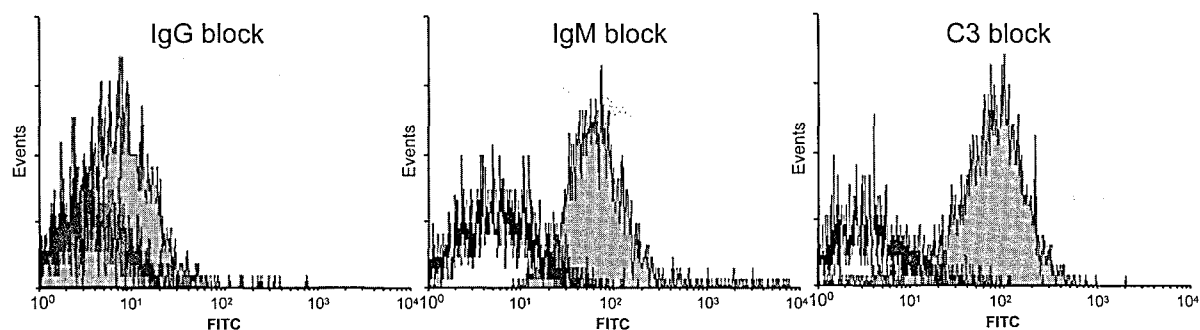


Figure 3 Effect of IgG blockage on FITC conjugated antibody bindings to IgG/IgM/C3 positive platelets. FITC conjugated antibodies to the positive platelets were blocked by eight times excess of non-labeled anti-IgG antibodies. Black and white: Negative control. Grey: IgG/IgM/C3 positive platelets.

Table 1 Effect of platelet surface IgG, IgM and C3 blockage on FITC conjugated antibody binding.

FITC conjugated antibodies	IgG block	IgM block	C3 block
anti dog IgG	-	+	+
anti dog IgM	+	-	+
anti dog C3	+	+	-

Platelet surface IgG, IgM and C3 were blocked by pretreatment with eight times excess of same antibodies to the FITC conjugated antibodies.

+: positive, -: negative binding of FITC conjugated antibodies.

との間で交差反応は起こらないことが確認された。

また、それぞれの FITC ラベル抗体の特異結合性が確認されたことにより、これらの FITC ラベル抗体を用いて血小板表面 IgG, IgM あるいは C3 検出を行う際に、IgG/IgM/C3 陽性血小板は、共通の陽性血小板として利用可能であることが示唆された。さらにこの陽性血小板は、1%パラホルムアルデヒドで室温にて30分間固定してから冷蔵することで長期保存が可能であった。

PRP に LPS を添加することにより IgG/IgM/C3 陽性血小板は容易に入手でき、長期の保存も可能なことから、今後の血小板表面 IgG, IgM および C3 検出において、有用なものと思われた。

#### 4. 要約

犬血小板表面の免疫物質 IgG, IgM および補体 (C3) 陽性コントロールの作製法を検討した。これらの血小板表面免疫物質は、FITC ラベル抗犬 IgG 抗体、抗犬 IgM 抗体あるいは抗犬 C3 抗体を結合させ、フローサイトメトリーを用いて検出した。

IgG, IgM および C3 それぞれ単独陽性血小板の作

製を試みたが、得られたのは IgM 陽性血小板のみであった。多血小板血漿にエンドトキシン (LPS) を加えたところ、IgG, IgM および C3 いずれも陽性の血小板が得られた。この IgG/IgM/C3 陽性血小板を、IgG, IgM および C3 検出のいずれにも共通する陽性コントロールとして使用することを考えた。そのためには、上記の3種 FITC ラベル抗体が、それぞれの標的物質に特異的に結合することが前提となる。

そこで、FITC ラベル抗体の8倍量の非ラベル抗犬 IgG, 抗犬 IgM あるいは抗犬 C3 抗体を10分前から作用させて結合をブロックしたところ、3種類の FITC ラベル抗体は標的免疫物質のブロック処理によってのみ結合が阻害され、他の免疫物質との交差反応は否定された。

以上の結果から、これらの抗体を用いることを前提とすれば、IgG/IgM/C3 陽性血小板は、3種の免疫物質のいずれにも共通する陽性コントロールとして利用できることが示唆された。

#### 文 献

- 1) Lewis DC, McVey DS, Shuman WS, Muller WB, *Am J Vet Res* 56: 1555-1558, 1995.
- 2) Scott MA, Kaiser L, Davis JM, Schwartz KA, *Am J Vet Res* 63: 124-129, 2002.
- 3) Jou Y, Mazzaferro PK, Mayers GL, Bankert RB, *Methods in Enzymology* 92 (Immunochemical technique part E. Monoclonal antibodies and general immunoassay methods), Langone JJ et al Eds: 257-265, 1983.
- 4) Lewis DC, Meyers KM, *Am J Vet Res* 55: 602-605, 1994.
- 5) Meyers KM, Boehme M and Inbar O, *Am J Vet Res* 43: 1721-1728, 1982.