ヒト血清 GcMAF の定量化技術の開発とマクロファージ活性化能の評価

【目的】血清中の GcMAF を定量することは、ヒト血清 GcMAF 療法の有効性を証明するために必要不可欠である。しかしながら、定量に必要な検量線を作成するには高純度の GcMAF が必要である。そこで、Gc protein に高い親和性を有する 25(OH)D3 カラムを用いて調製･精製した高純度の GcMAF を用いて ELISA による GcMAF 量の定量法の構築を試みた。また、β-Galactosidase と Sialidase で酵素処理した 1f1f 型ヒト血清のマクロファージ貪食活性を評価した。

【ELISA 実験】96 穴に anti-human gc globulin をアプライし、4℃で一晩静置した。PBS で洗浄し、5% BSA でブロッキング後 GcMAF、血清をアプライし 4℃で 4h 静置した。PBS で洗浄後 HRP-labeled HPA lectin で標識し PBS で洗浄後、TMB 試薬を 30 min 反応させた後 1 N HCl をアプライし 450 nm の吸光度を測定した。

【マクロファージ貪食実験】マウス頸椎脱臼により腹腔からマクロファージを単離し、5.0 × 105 cells/well で 24 穴プレートに分注しカバーガラスに 37℃で 1 h 定着させた。定着後、新しい培地と交換し 37℃で 15 h 培養した 15 h 培養後、sample をそれぞれの濃度で添加し、37℃で 3 h 反応させ、0.5% オプソニン化 SRBC を加え 90 min 貪食させ、ギムザ染色、検鏡にて評価した。

【GcMAF 定量結果】ELISA による GcMAF の定量では、Tween 20 を含む PBS を洗浄に使った際には 1 pg/ml まで希釈した GcMAF でも吸光度の値が高すぎて正確な定量ができなかった。そこで、洗浄溶液に Tween20 を加えず、またブロッキング溶液を PBS(Tween 20 含有)から 5% BSA に変更したところ、GcMAF 濃度 10 ng/ml の吸光度の値を 0.2 に抑えることができた。さらに、抗体の反応時間や濃度、ブロッキング条件を検討し、相関係数 r2 = 0.8974、の検量線が得られた。

【ヒト血清 GcMAF のマクロファージ貪食活性】0.1 ng から 10 ng にかけて濃

度依存的に活性が見られ、10 ng では Gc(1f1f)MAF よりも高い活性を示した。10 ng 以降では濃度依存的に活性が減少し、0.1 ng から 10000 ng にかけてベルシャープ型で活性が見られた。

【まとめ】ELISA 法を用いて GcMAF を定量することに成功した。今後は、本手法を用いてヒト血清中の GcMAF を定量する予定である。また、ヒト血清 GcMAF はマウス腹腔マクロファージの貪食活性を高めることが示された。