



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

イヌ末梢リンパ球のEthidium
Bromideによる幼若化反応の測定について

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 白木, 豊, 工藤, 忠明, 本所, 久男, 北澤, 馨 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5493

イヌ末梢リンパ球の Ethidium Bromide による 幼若化反応の測定について

白木 豊・工藤忠明・本所久男・北澤 馨

家畜外科学研究室

(1985年7月31日受理)

Measurement of Canine Peripheral Lymphocyte Transformation with Ethidium Bromide

Yutaka SHIRAKI, Tadaaki KUDO,
Hisao HONJO and Kaoru KITAZAWA

Laboratory of Veterinary Surgery

(Received July 31, 1985)

SUMMARY

A fluorescence assay with ethidium bromide (EB) for the evaluation of lymphocyte activation by phytohemagglutinin was investigated. Optimal assay conditions were as follows : peripheral lymphocytes (3×10^5 cells/ml) were cultured in RPMI 1640 (1 ml) containing 15% allogeneic serum, 20 $\mu\text{g/ml}$ PHA. The cultures were incubated for 96 hours at 37°C in a 5% CO_2 /95% air environment. After termination of the culture period, the culture cells isolated by centrifugal force were resuspended in sodium lauryl sulfate (0.125 $\mu\text{g/ml}$) (2 ml) as detergent, then EB (7.5 $\mu\text{g/ml}$) (2 ml) was added as a fluorescent interacting agent. Fluorescence intensity was measured with excitation of 525nm and emission of 600nm. The fluorescence intensity was proportional to the nucleic acid content, and gave reproducible results. There was a highly significant correlation between the EB assay and ^3H -thymidine up take assay.

Res. Bull. Fac. July. Gifu Univ. (50) : 335—341, 1985.

要 約

イヌの末梢リンパ球幼若化能測定に Ethidium Bromide (EB) 蛍光法を応用するための基礎的条件を検討した。

その結果リンパ球培養には同種プール血清を15%添加した RPMI 1640培養液にて、リンパ球濃度 3×10^5 cells/ml, Phytohemagglutinin-P 濃度20 $\mu\text{g/ml}$, 5 % CO_2 37°Cにて96時間を必要とした。培養終了後遠心し、沈渣に Sodium Laurylsulfate 液 (1.25 mg/ml) を2 ml加え、次いで Ethidium Bromide液 (7.5 $\mu\text{g/ml}$)を2 ml加えた後に、蛍光強度を励起波長525nm, 蛍光波長600nmにて測定し、核酸量に比例する安定した蛍光強度が得られた。この成績は ^3H -thymidine 取り込み法と高い相関性を示した。

緒 言

インゲン豆から抽出した Phytohemagglutini (PHA) に、リンパ球の DNA 合成および分裂を促進させる作用のあることを1960年に Nowell¹⁾ が発表して以来、PHA はリンパ球の幼若化反応の測定に用いられてきた^{2,3)}。

リンパ球の幼若化反応の標準的測定法には、培養終了後のリンパ球を形態学的に観察する方法と、放射性同位元素 (RI) にて標識された Thymidine などの DNA 前駆物質の取り込み量を測定する方法がある。前者は客観性、再現性、検体処理能力などの点に問題があり、現在では後者が一般的な測定方法となっている^{4,5)}。しかし、この方法は非密封 RI を使用するため、RI施設の完備している研究施設等でなければ取り扱いが困難である。このため、深町ら⁶⁾は1982年に一般検査室レベルでも測定が可能な、合成された DNA 量を蛍光色素 Ethidium Bromide (2,7-diamino-10-ethyl-9-phenanthridinium bromide) の蛍光強度により直接定量する方法、EB 蛍光法を開発し、注目されている。獣医領域における本法の適用はウシで1984年に報告されているのみである⁷⁾。

著者らはこの EB 蛍光法をイヌに応用するための基礎的条件を検討し、イヌにおいても有用な測定法であると認めたのでここに報告する。

材料および方法

実験動物：1～4歳の雑種成犬(雄9頭、雌13頭、体重6.3～14.5kg)を使用した。何れも最低3ヶ月以上同一条件で使用し、臨床的に健康と認めたものであった。

リンパ球分離：実験犬の外頸静脈より採取したヘパリン加血液(20 u/ml)を燐酸緩衝食塩液(PBS)で3倍希釈し、比重1.080の3mlのFicoll-Conray 分離液に7ml重層し、1,040G、30分間遠心分離後、リンパ球層を採取した^{8,9)}。分離リンパ球は1回目はPBSを、2回目は培養液を用い洗浄した(375G、10分間)。また、リンパ球浮遊液の細胞数とリンパ球純度を算定し、培養リンパ球数を調整した⁸⁾。

リンパ球の培養：培養は伊藤ら³⁾に従った。即ち、培養液は粉末培地 RPMI 1640 (ニッスイ製)を再々蒸留水に溶解し、抗生物質(結晶ペニシリン100u/ml、硫酸ストレプトマイシン100μg/ml)および非働化血清(同種プール血清またはウシ胎児血清(FCS: GIBCO製))を15%加え、7.5%重炭酸ナトリウムにてpHを調整した後0.22μmのメンブランフィルター(MILLIPORE 製)で濾過滅菌した。

細胞数の調整を行なったリンパ球浮遊液を10ml シリコンコート真空採血管(ニプロ)に1.0ml ずつ分注した。マイトージェンとして Phytohemagglutinin-P (PHA-P: DIFCO 製)を培養液で希釈したもの(20μg/ml)を0.1ml 加え、5% CO₂、37℃に孵置した。なおコントロールにはマイトージェンの代わりに培養液を0.1ml 加え、同様に孵置した。

蛍光強度の測定：蛍光強度の測定は深町ら⁶⁾に従い、培養終了後 PBS を約2ml 加え攪拌し、管壁に付着したリンパ球を完全に剝離し、浮遊させた後、2,500rpm で10分間遠心した。

Sodium Laurylsulfate (SDS: 半井化学薬品製)を0.125mg/mlの割合でPBSに溶解した、SDS液2mlをリンパ球沈渣に加え、数回攪拌しながら30分間感作した。次いで、EB (SIGMA 製)を7.5μg/mlの割合でPBSに溶解した、EB液を2ml 加え、攪拌し、測定試料を調整した。試料の蛍光強度を分光蛍光光度計(MPF-4: 日立製)にて測定した。測定時にEBのみの蛍光強度を測定するため、SDS液とEB液を2ml等量混和したものを用意し、同時に測定した。

成績に示した蛍光強度はすべて、それぞれの測定値からEBのみの蛍光強度を減じた値である。刺激指数 SI (Stimulation Index) は次式により算出された。

$$SI = \frac{I_p - I_0}{I_c - I_0} \times 100$$

I_p : PHA 添加培養の蛍光強度

I_c : PHA 無添加培養の蛍光強度

I_0 : EB のみの蛍光強度

³H-thymidine 取り込み法：培養終了16時間前に1μCiの³H-thymidine (AMERSHAM 製: 比放射能24.6 Ci/mmol)を加え、培養終了後フィルターホルダー(柴田化学器械工業)にセットした2.5cmガラスフィルター(WHATMAN 製)上にリンパ球を採集し、PBSおよび蒸留水で洗浄した。そのフィルターをカウンティングバイアルに入れ、可溶剤(NCS: AMERSHAM 製)1mlを加え47℃で1時間静置、冷却した後、液体シンチレーター(ACS-II: AMERSHAM 製)10mlを加え、3日後に液体シンチレー

ジョンカウンター (LS9000 : BECKMAN 製) で崩壊数 (dps) を測定した。

実験成績

I. 蛍光強度測定条件

1. 蛍光強度測定波長

リンパ球培養 (2×10^5 cells/ml, PHA-P $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 72時間培養) 終了後の蛍光強度測定時に、励起波長および蛍光波長のスキャンを行ない測定波長を設定した。7例中最も幼若化の程度が強かった個体の波長スキャン例を Fig. 1 に示した。細胞成分を含まない EB 液のみでは、励起波長490 nm, 蛍光波長615 nm でピークを示したが、核酸量の増加が殆どないと思われる PHA 無添加例ではピークが矢印の方向にシフトし、核酸量が増加している PHA 添加例ではさらにシフトした。シフトは核酸量の多いもの (幼若化の程度の強いもの) 程大きく, Fig. 1 に示した個体では励起波長522 nm, 蛍光波長602nm 迄シフトした。上記の結果より, 伊藤ら¹⁴⁾に従い以後の実験における測定条件を励起波長525nm, 蛍光波長600 nm に定めた。

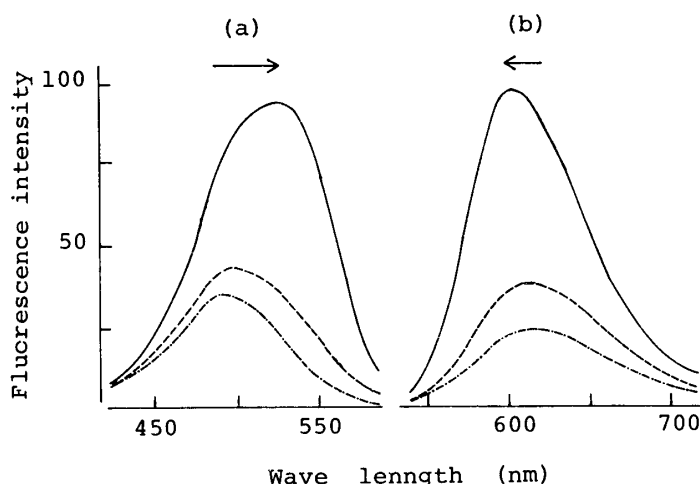


Fig. 1. Fluorescence spectra of free EB (---), and EB-DNA complex in untransformed lymphocytes (----) and transformed lymphocytes (——). Peaks of excitation (a) and emission (b) wave lengths shift free EB to EB-DNA complex of transformed lymphocytes (arrows).

2. リンパ球数と蛍光強度

リンパ球浮遊液 ($n = 7$) を希釈調整し, 得られた種々の細胞数における蛍光強度は各例とも Fig 2 の例に見られるように細胞数 2×10^6 個前後までほぼ直線的に増加した。

II. 培養条件

1. 細胞濃度

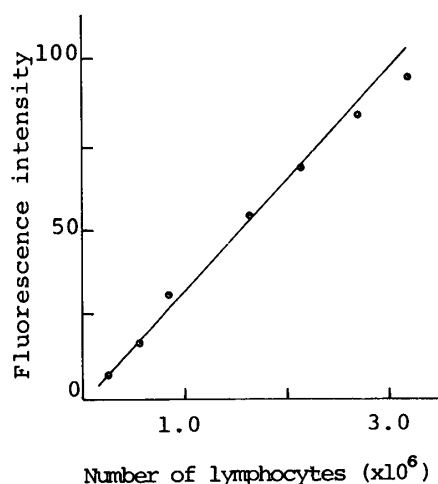


Fig. 2. Relationships between number of lymphocytes and stimulation index.

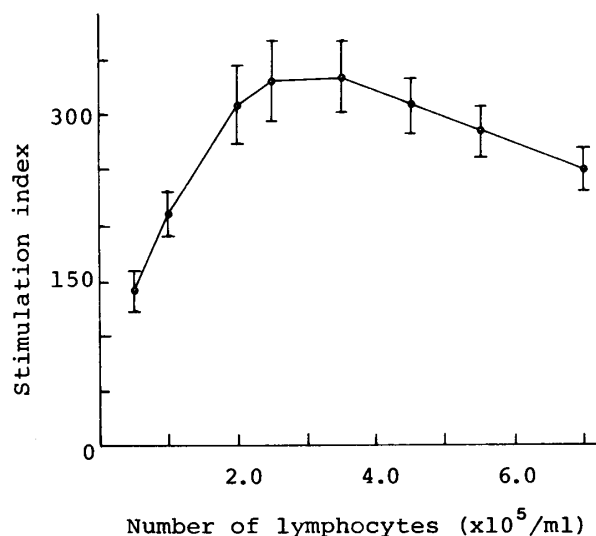


Fig. 3. Effect of number of lymphocytes on stimulation index with PHA. Each point represents the mean and standard error.

種々の細胞数でのリンパ球培養 (PHA-P $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加) によるSI値の変化はFig. 3に示す通りであった ($n=9$)。高いSI値は 3×10^5 cells/ml 前後で得られた。

2. PHA-P 濃度

PHA-P 濃度の変化に伴うリンパ球培養 (3×10^5 cells/ml, $n=8$) により $20\mu\text{g}/\text{ml}$ で最も高いSI値が得られた (Fig. 4)。

3. 培養時間

リンパ球培養 (3×10^5 cells/ml, $20\mu\text{g}/\text{ml}$) に伴う蛍光強度およびSI値の経時変化はFig. 5に示す通りであった ($n=5$)。PHA添加により蛍光強度は48時間から96時間にかけて急速に増加し、120時間まで増加を示した。SIは72時間ではまだ低い値を示していたが、96時間には120時間と有意差のない ($P>0.05$) 値を示していた。

4. 添加血清

非働化同種血清と2種のFCSロットをリンパ球培養液 ($n=7$, 3×10^5 cells/ml, PHA-P $20\mu\text{g}/\text{ml}$, 96時間培養) に添加したところ、SIは同種血清で 373 ± 63 ($m \pm se$)、FCSIで 115 ± 11 および FCS 2で 163 ± 10 を示した。FCSは2種とも同種プール血清より低い値を示した ($P<0.001$)。

III. EB 蛍光法と ^3H -thymidine 取り込み法との相関

同一の条件でリンパ球を培養し (3×10^5 cells/ml, PHA-P $20\mu\text{g}/\text{ml}$, 96時間培養), EB 蛍光法と ^3H -thymidine 取り込み法を比較し, Fig. 6に示す相関が得られた。相関係数 $r=0.82$ を示し, 0.1%の危険率で有意の相関を示していた ($n=20$)。

考 察

EBは、核酸合成阻害剤として古くから動物のトリパノゾーマ症やウイルス感染症の治療薬として用いられてきた物質である¹¹⁾。EBは核酸の塩基対間に結合し、EB-核酸複合体が形成される^{11,12)}。リンパ球中のDNAをEB蛍光強度により定量する、EB蛍光法によるリンパ球幼若化能の測定方法は、1982年にヒトリンパ球幼若化能測定のため開発された、新しい検査法である⁶⁾。獣医学に応用した報告は永幡ら⁷⁾のウシへの応用例が最初であると思われる。

蛍光強度の測定波長はヒト¹⁰⁾、とウシ¹³⁾では異なっているが、今回のイヌの成績はヒトのそれと同じであった。核酸-EB複合体が最大の蛍光強度を示す励起波長、蛍光波長については、種々の値が報告されており^{11,12)}、その原因について塩基構成、塩類濃度、pHなどが上げられている¹³⁾。ウシでは波長の設定実験に、核酸として子ウシ胸腺DNAを、EBにはAldrich Chemical Company Inc. 製を使用しているが、著者らは実際に検査室で測定する場合に最適な条件を設定するため分離末梢リンパ球を融解して使用してお

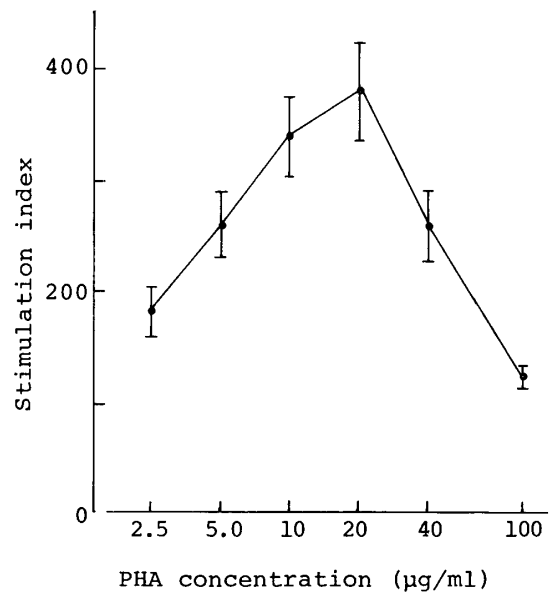


Fig. 4. Effect of various PHA concentrations on stimulation index. Each point represents the mean and standard error.

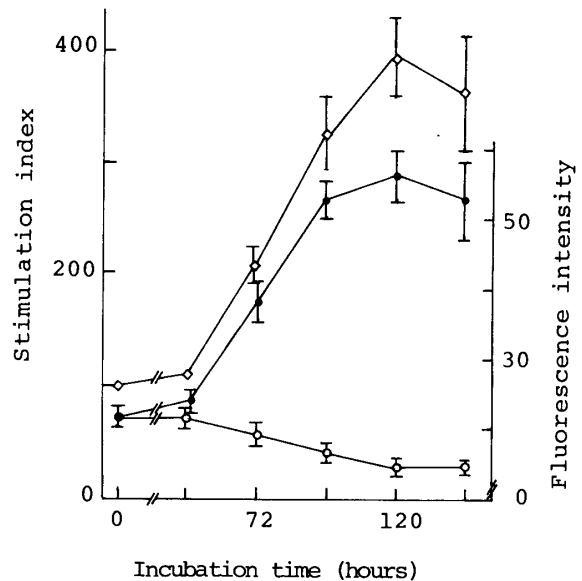


Fig. 5. Effect of different incubation times on fluorescence intensity of lymphocytes with PHA (●) and only medium (○), and stimulation index (◇). Each point represents the mean and standard error.

り、また EB も Sigma 製を用いているため、これらが波長に影響したものと推察される。

ピーク波長は核酸量が増加するにつれて徐々にシフトするが核酸量の増加に伴いその程度は鈍化する^{13,14)}ため、今回は実際に培養を行ない幼若化させたリンパ球を用いて、測定波長を設定した。蛍光強度が正しく核酸量と比例することが重要であり、測定波長をその都度各検体のピーク波長に合わせる必要が必ずしも必須ではないため、測定波長はピーク波長のシフトする範囲の外側が望ましい¹⁴⁾。従って今回の実験においてはシフトした励起波長522nm、蛍光波長602nmより少し余裕を持たせた、励起波長525nm、蛍光波長600nmを適正波長として測定を実施した。波長がシフトして行く程度は核酸量の増加に伴い鈍化を示し、今回設定した波長を超える恐れは殆どなかったものと推察された。

蛍光強度は、ヒト^{6,14)}では 1.25×10^6 個、ウシ¹³⁾では 4×10^6 個まで、リンパ球数と比例するとされており、今回のイヌの成績でも 2×10^6 個前後迄比例していた。これらの差異はEB液の濃度および量に関連するものと考えられる。このため、培養終了後のEB測定時のリンパ球数を蛍光強度が核酸量に比例している範囲にある 10^5 個以下にするためには、培養後の蛍光強度の最大値が培養開始時の10倍以下であるので、培養開始時のリンパ球数を 10^5 個以下にすることが望ましい。今回の実験においても培養開始時のリンパ球数を 10^5 個以下に調整しており、得られた蛍光強度がリンパ球幼若化による核酸の増加量を正確に反映していると考えられた。

イヌでの蛍光強度測定条件は前述のごとくヒトおよびウマの場合と大差はなく、リンパ球培養条件も従来の報告と類似していた。EB蛍光法も培養条件に顕著な差はなく、最終的な測定条件がやや異なるだけであった。しかし培養時の最適リンパ球濃度に、EB蛍光法に特徴的と思われる成績が見られた。

最適リンパ球濃度はヒトと同様に 3×10^5 cells/mlであったが、これは ^3H -thymidine 取り込み法のマクロカルイヤー法で一般的に用いられている $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml に比べ低い濃度³⁻⁵⁾であった。 ^3H -thymidine 取り込み法において、PHA非添加群のdpsは、日内および日差変動があり¹⁵⁾、また種々の条件により変動し⁵⁾、PHA添加群のdpsとは相関しないとされている。従ってリンパ球濃度は若干高い方が、PHA添加群に取り込まれるRIが多くなり、 ^3H -thymidine 取り込み法による刺激指数(PHA添加群のdps/PHA非添加群のdps)も高くなると考えられる。一方、EB蛍光法ではPHA添加群の蛍光強度がリンパ球濃度と比例する¹⁴⁾。このため、PHA添加群において高いSIを得るには、培養液中の細胞数の幾分少ない低リンパ球濃度の培養が良好な成績を示すと考えられる。これらの差が両測定法の最適リンパ球濃度の差として現われたものと考えられる。

今回の成績は、培養時に調整した細胞濃度とその時に算定したリンパ球純度を乗じて得られるリンパ球濃度で示した。従って最適リンパ球濃度 3×10^5 cells/mlにするには、イヌのリンパ球純度は75%前後であるから、 4×10^5 cells/ml 前後の細胞濃度に調整すれば最も高いSIが得られることになる。しかし犬のリンパ球は好酸球および単球と分離し得ない^{8,9)}ため、ヒト等と比べ安定した純度で分離し難く、分離前の白血球百分比により予めリンパ球純度を予測し、細胞濃度を調整しなければならない。

最適培養時間は、ヒト¹⁷⁾とウシ⁷⁾の72時間と比較して24時間延長したが、蛍光強度の経時的变化を見ると、各検体は48時間から96時間にかけて急速に増加し、検体によっては96時間でほぼ限界に達している点では

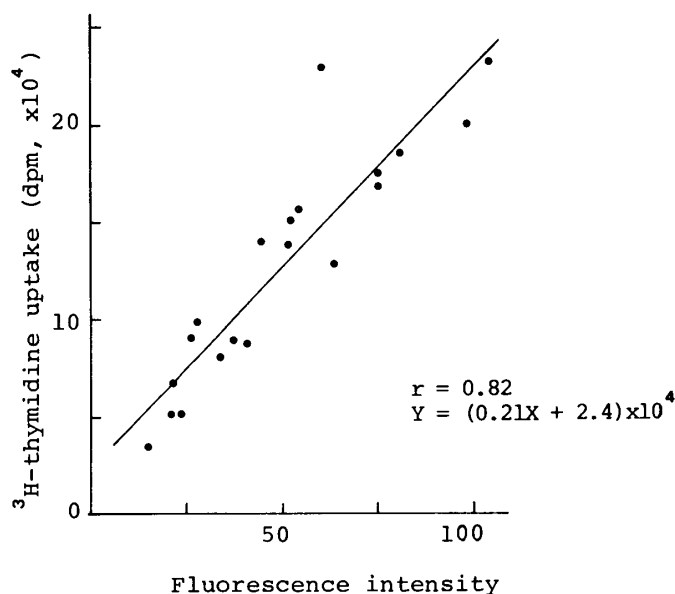


Fig. 6. Correlation between ^3H -thymidine uptake and fluorescence intensity of lymphocytes with PHA.

類似していた。しかし全体的に増加の程度が遅延しているため、SIがピークに達するのは120時間であり、さらに24時間延長していた。即ち、72時間培養におけるイヌのSI (208 ± 36) はヒトや牛より低い値しか得ることができなかったが、120時間培養ではヒトの72時間培養とほぼ等しいSI (395 ± 36) を示していた。これには動物による種差、混入細胞の影響、その他種々の要因³⁻⁵⁾が考えられる。ヒトとウシのSIを比較すると、ヒト $382 \pm 79^{17)}$ 、ウシ $443 \pm 122^{2)}$ で、またウシではPHAよりConA (Concanavalin A) を用いた時の方が高いSI (498 ± 165) を示している⁷⁾。これは動物種により反応の程度に差のあることを示しているのかもしれない。

顆粒球の混入は幼若化反応を抑制する⁴⁾とするものと影響しない^{18,19)}とするものがある。しかし、この顆粒球とは主に好中球を意味しており、好中球が培養48時間以内に殆ど消失するのに対し、好酸球は72時間以後も生残する²⁰⁾ことを考慮すると、好酸球が何らかの影響を与えていた可能性がある。イヌは好酸球の混入が多い^{8,9)}ため今後の検討が必要であろう。

FCSには著しいロット差があることは良く知られている²¹⁻²³⁾。今回は2つのロットを使用したか、何れも良い成績が得られなかった。この成績から、犬のリンパ球幼若化反応にとっては、かなり高い確率で不適なロットが存在すると言える。FCSは高価であり、良いロットを選択するために努力するよりは、安定して良好な成績が得られる同種プール血清の使用が勧められる。

今回のEB蛍光法と³H-thymidine取り込み法との高い相関は、ヒトやウシと同様イヌにおいても前者による幼若化反応の測定が可能であることを証明している。³H-thymidine取り込み法は、添加されるRIの量、時間等が研究者によって区々であり、このことが各研究者の成績に少なからぬ影響を与えていると考えられる。また³H-thymidine取り込み法はRIが添加されている短時間の間に、どれ程の核酸合成が行われたかが成績として示されるのであり、合成された核酸量を測定するEB蛍光法の方が寧ろ正確に幼若化の程度を反映していると言える。さらに³H-thymidine取り込み法を実施する場合の厳しい制約や義務、実験に要する時間、操作、その他安全性、経済性の問題等は予想以上に実験者に過重な負担を強いっている。以上の点より今後のリンパ球幼若化反応測定はこのEB蛍光法や最近開発された非RI法が中心になって行くものと考えられる。

文 献

- 1) Nowell, P. C. : Phytohemagglutinin; An initiation of mitosis in culture of normal human leukocytes. *Cancer Res.* **20** : 462, 1960.
- 2) 河野均也・土屋達行：リンパ球検査3；培養試験。臨床検査 **23**：1110-1114, 1979.
- 3) 伊藤喜久・笠原忠・河合忠：リンパ球培養による検査。臨床病理 特集(45)：209-218, 1981.
- 4) 向田直史・笠原忠・河合忠：リンパ球培養と³H-thymidine取り込み検査。日本臨床 **42**：1318-1322, 1984.
- 5) 螺良英郎・曾根三郎・中山拓郎：細胞性免疫の試験管内テストの意義と限界。日本臨床 **36**：131-136, 1978.
- 6) 深町勇・井上寿子・小平司・中嶋克行：蛍光色素 Ethidium bromide を用いたリンパ球幼若化検査法について。臨床病理30補冊：168, 1982.
- 7) 永幡肇・真田靖幸・武田哲・野田寛：DNA 蛍光定量法を用いたウシリンパ球幼若化能の測定とその応用。第98回日本獣医学会講演要旨：241, 1984.
- 8) 工藤忠明・白木豊・北澤馨：イヌ末梢リンパ球分離のための Ficoll-Conray 液の最適分離比重及び遠心力の検討。医学と生物学：**111**：363-366, 1985.
- 9) 工藤忠明・白木豊・北澤馨：シリカ併用の有無によるイヌ末梢リンパ球の分離。医学と生物学：(投稿中)。
- 10) 葉賀稔・菅井芳郎・白倉卓夫・佐藤東芳・川嶋豊・深町勇：ethidium bromide 蛍光法により検討した加齢に伴うリンパ球幼若化機能の変化。医学のあゆみ **128**：14-15, 1984.
- 11) Leppecq, J. B. & Paoletti, C. : A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* **27** : 87-106, 1967.
- 12) Morgan, A. R., Lee, J. S., Pulleyblank, D. E., Murray, N. L. & Evans, D. H. : Ethidium fluorescence assays, Part 1 : Physicochemical studies. *Nucl. Acid Res.* **7** : 547-569, 1979.
- 13) Nagahata, H., Yokone, h. & Noda, H. : A simple fluorometric microassay of DNA in mononuclear cell preparations using ethidium bromide. *Jpn. J. Clin Chem.* **13** : 109-113, 1984.

- 14) 伊藤喜久・深町勇・中嶋克行・河合忠・中野庸平：ethidium bromide 蛍光法による新しいリンパ球幼若化機能測定法。医学のあゆみ **126**: 21-22, 1983.
- 15) 笠原新平：リンパ球幼若化反応総論。臨床検査 MOOK (3): 87-92, 1980.
- 16) Osa, S. R. & Weksler, M. E. : Demonstration of significant differences in the proliferative capacity of lymphocytes from normal human subjects. Cell. Immunol. **32** : 391-399, 1977.
- 17) 伊藤喜久・河合忠：リンパ球とエチジウムブロマイド結合検査。日本臨床 **42** : 1323-1327, 1984.
- 18) 河合忠・河野均也・近藤泰正・賀屋秀男：リンパ球幼若化現象の検索。臨床検査 **14** : 30-36, 1970.
- 19) Schellekens, P. Th. A. & Eijssvoogel, V. P. : Lymphocyte transformation in vitro. Clin. Exp. Immunol. **3** : 571-584, 1968.
- 20) 河野均也：リンパ球培養法。臨床病理特集 (25) : 164-177, 1976.
- 21) 山根績：培養液の調整の実際と選び方。免疫実験操作法IX : 3051-3059, 1980.
- 22) 中西章男・愛見和宏・江島博康・黒川和男：グルコース消費試験を応用したイヌリンリンパ球幼若化反応の測定。第97回日本獣医学会講演要旨 : 266, 1984.
- 23) 島倉康彦・工藤忠明・本所久男・北澤馨：シバヤギにおけるグルコース消費試験によるリンパ球幼若化能の測定について。岐大農研報 : (50) : 329-334, 1985.