Comparison in Lymphocyte Subpopulation between Arterial and Venous Bloods of Rat

Tetsuo KUNIEDA, Tsutomu KUROSAWA*, Yoshihiro SUGIYAMA*,
Hitoshi HANAUE*, Tomonori IMAMICHI** and Jun-ichi SHIKATA*

*Imamichi Institute for Animal Reproduction, 100, Nisshin-cho 3-chome,
Ohmiya-shi, Saitama, Japan, *The First Department of Surgery,
Teikyo University School of Medicine, *11-1, Kaga 2-chome,
Itabashi-ku, Tokyo, and **Department of Physiology,
Nippon Veterinary and Zootechnical College,
7-1, Kyonan-cho 1-chome, Musashino-shi,
Tokyo*

(Received 8 October 1985/Accepted 12 November 1986)

Lymphocyte subpopulation as well as other hematological properties were compared between arterial and venous bloods of Wistar-Imamichi rats. Lymphocyte subsets were defined with four monoclonal antibodies which were specific to the respective cell surface glycoproteins. Using these monoclonal antibodies, subsets of B lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, and suppressor and cytotoxic T lymphocytes in the peripheral lymphocytes were identified. The blood samples were taken from aorta abdominalis and venae cava caudalis. The population of these subsets were enumerated by a laser flow-cytometry system. The result showed that there was no significant difference in hematological properties between the arterial and venous blood except in leukocyte count and hemoglobin concentration. The difference in leukocyte counts was thought to depend mainly on the fluctuation of the lymphocyte counts. However, no significant difference was recognized in the proportion of positive cells to each monoclonal antibody. It was concluded that the difference in leukocyte counts found between the arterial and venous bloods of the Wistar-Imamichi rat did not produce any effects on the proportion of the subpopulation in the peripheral lymphocytes, and the lymphocyte subpopulations in both arterial and venous bloods were substantially equivalent to each other.

ラットにおける動脈血、静脈血間のリンパ球 サブポピュレーションの比較

国枝哲夫・黒澤 努*・杉山 芳宏*・花上 仁*・今道友則**・四方 淳一*

財団法人動物繁殖研究所
* 帝京大学医学部第一外科
** 日本獣医畜産大学生理学教室

動物における一般的な血液学的検査では、採血部位の
相違が種々の測定値に影響を与えることが知られてい

る。特に白血球は、体内における動態が赤血球などに比
べて複雑であり、ラットについても採血部位によってそ

の数は大きく変化する。したがって、採血部位の違いがリンパ球サブポピュレーションにどのような影響をあたえるかを明らかにするため、モノクローナル抗体およびレーザーフローサイトメトリーをもちい、測定の諸条件を検討するとともに、Wistar-Imamichi ラットにおける動脈血と静脈血の血液学的性状とリンパ球サブポピュレーションの比較を行った。

材料と方法

1. 動物：動物は、財団法人動物繁殖研究所（土浦研究所）にて繁殖、飼育されている Wistar-Imamichi ラットの 6 週齢雄 11 匹を用いた。

2. 飼育環境：Barrier System による飼育条件下で、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50～60%，換気回数 1 時間に約 13 回（HEPA フィルターでろ過した清浄空気）、照明時間 14 時間（午前 5 時～午後 7 時点灯）に設定された動物室で飼育した。飼料は標準配合飼料[22]、および固形飼料 MM-2（船橋農場）を高圧蒸気滅菌器を用い 120°C （圧力 1.2 kg/cm^2 ）で 20 分間滅菌し、2：1 で混合したものを給与した。飲水は 60 分間高圧蒸気滅菌したものを自由に摂取させた。

3. 採血方法：動物をペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射（ $6 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 体重）にて麻酔し開腹の後、まず後大静脈の左腎静脈分枝部より、デスポーザブル注射器を用いて 2 ml 採血し、静脈血とした。ついで腹部大動脈より 2 ml 採血し、動脈血とした。抗凝固剤は 5% EDTA-2K 溶液を用い、あらかじめ採血用の注射器に約 0.1 ml を吸引しておいた。

4. 血液学的検査：赤血球数および白血球数は、採血された血液を希釈液 CK-32（東亜医用電子）にてそれぞれ 50,000 倍、および 500 倍に希釈した上で、トーア自動血球計数装置 CC-108（東亜医用電子）を用いて測定した。ヘマトクリット値および平均赤血球容積（MCV）は、トーア MCV ヘマトクリット測定装置 MH-301（東亜医用電子）を用いて、電気抵抗方式にて測定した。ヘモグロビン濃度は、トーア自動血色素濃度測定装置 HB-100（東亜医用電子）を用い、シアントヘモグロビン法にて測定した。白血球百分率は採血時に作製した塗抹標本をメタノール固定の後、Giemsa 染色によって染色し、顕微鏡下で算定した。

5. リンパ球サブポピュレーションの測定：

a) モノクローナル抗体：ラットリンパ球サブセットの同定には、各サブセットに特異的な 4 種のモノクロ

ーナル抗体 MAS 010, MAS 1131, MAS 041, MAS 029（Sera-lab 社）を用いた。これらのモノクローナル抗体は、W3/13, W/25, OX8, OX4 の各クローンより産生されており、いずれも IgG である。

各モノクローナル抗体の特性は以下のとおりである。

W3/13 抗体に対する抗原は、胸腺細胞、末梢 T リンパ球、好中球および脳に存在しているが、末梢 B リンパ球に存在していないことが報告され[24]、末梢リンパ球のうち W3/13 モノクローナル抗体に陽性の細胞は T リンパ球であると考えられている。

W3/25 抗体に対する抗原は、胸腺細胞、マクロファージおよび末梢 T リンパ球の一部に存在していることが報告され[15, 24]、末梢リンパ球のうち、W3/25 モノクローナル抗体に陽性の細胞は、ヘルパー T リンパ球と考えられている[15, 23]。

OX8 抗体に対する抗原は胸腺細胞、末梢 T リンパ球の一部、および NK 細胞の大部分に存在していることが報告され[3, 6]、末梢リンパ球のうち、OX8 陽性細胞はサプレッサーおよび細胞障害性 T リンパ球であると考えられている[3, 7, 15]。

OX4 抗体に対する抗原は、主要組織適合系遺伝子複合体（MHC）のクラス II 抗原である Ia 抗原（I 領域関連抗原）であると考えられ[16]、ラットの末梢 B リンパ球の大部分に存在し、胸腺細胞、マクロファージの一部にも存在するが、末梢 T リンパ球には存在しないことが知られている[2, 16]。したがって、末梢リンパ球のうち、OX4 陽性細胞は B リンパ球であると考えられる。

b) サンプルの調整：レーザーフローサイトメトリーのためのサンプルの調整は、従来の方法[19]に若干の変更を加え以下の方法で行なった。

全血 $100 \mu\text{l}$ に、PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含, pH 7.4-7.6) にて 50 倍希釈したモノクローナル抗体 $100 \mu\text{l}$ を加え、 4°C で 30 分間放置した。その後 PBS で 2 回洗浄し、二次抗体として 40 倍希釈した Fluorescein Isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（Tago 社） $100 \mu\text{l}$ を加え、さらにラットの血しょう $25 \mu\text{l}$ を加えて、 4°C で 30 分間放置した。再び PBS で洗浄した後、Fetal Calf Serum (Filton 社) $5 \mu\text{l}$ を加えたうえで溶血剤 (NH_4Cl 4 g/l , KHCO_3 1 g/l , EDTA-4 Na 0.037 g/l) 2 ml を加え、室温で 3～5 分間放置した後測定した。陰性コントロールには、上記モノクローナル抗体の代りに、20 倍希釈したマウス IgG（Cappel 社）を用いた。

c) フローサイトメリーシステム：サンプルの測定にはレーザーフローサイトメトリーシステム、オーソスベク

トラムⅢ（オーソダイアグノスティックシステムズ社）を用いた[19]。

細胞の光学的情報としては、前方散乱光、90°散乱光、波長 515～620nm の緑色蛍光の 3 つのパラメータを用いた。

d) 測定方法：オーソスペクトラムⅢを用いての測定は以下の手順で行った。

前方散乱光と 90° 散乱光をパラメーターとするサイトグラムを表示させ、サイトグラム上で、いくつかに分離した細胞集団のうち、リンパ球を表す細胞集団についてのみ蛍光強度を測定した。その結果を X 軸を蛍光強度とし、Y 軸を細胞数としたヒストグラムとして出力し、細胞自体の非特異的蛍光を、モノクローナル抗体による特異的な蛍光と区別するために、陰性コントロールにおいて、陽性領域の細胞が全細胞数の 1 % 以下となるように陽性領域を設定し、この条件を用い、各モノクローナル抗体で調整されたサンプルの陽性細胞の全細胞に対する比率を測定した。

6. 統計学的処理：測定した値について、対応する 2 試料間の t-検定 (Paired sample t-test) を用い、動、静脈血間の差を検定した。

成 績

各個体より得られた動脈血、静脈血について測定した赤血球数、ヘマトクリット値、MCV、ヘモグロビン濃度を Table 1 に示した。赤血球数ヘマトクリット値、MCV、ヘモグロビンの各測定値とも、動脈血と静脈血の間には有意の差は認められなかった。白血球数、および白血球百分率を Table 2 に示した。白血球数は、動脈血が $2.55 \pm 0.93 \times 10^3/\mu\text{l}$ 、静脈血が $4.52 \pm 1.09 \times 10^3/\mu\text{l}$ であり、静脈血の値が動脈血の値に比較し有意に高かった ($p < 0.01$)。リンパ球数は、動脈血が $1.97 \pm 0.74 \times 10^3/\mu\text{l}$ 、静脈血が $3.84 \pm 1.02 \times 10^3/\mu\text{l}$ であり、やはり静

Fig. 1. A laser flow-cytometry system used.

Cells traveled through a flow channel are illuminated by focused argon laser beam. Light scattered by the cells is collected in forward and right-angle directions. the fluorescent light emitted from the cell are measuaed by a detector positioned at a right-angle.

脈血の値が動脈血の値に比較し有意に高かった ($p < 0.01$)。また、単球でも、動脈血が $0.06 \pm 0.02 \times 10^3/\mu\text{l}$ 、静脈血が $0.09 \pm 0.03 \times 10^3/\mu\text{l}$ であり、静脈血の値が動脈血の値に比較し有意に高かった ($p < 0.05$)。好中球、好酸球、好塩基球数は、動脈血、静脈血間に有意の差は認められなかった。

レーザーフローサイトメトリーより得られたサイトグラムを、Fig. 2 に示した。各サンプルとも Fig. 2-1) と同様のサイトグラムが得られ、血球は A, B, C, D の 4 クラスターに分離した。また、従来の方法[19]でサンプルを調整したところ、Fig. 2-2) に示したように、サイトグラム上での各クラスターの分離は困難であった。

次に、サイトグラム上の A クラスターをリンパ球を表す集団とし、A クラスターに含まれる細胞のみについ

Table 1. RBC, Ht Hb, and MCV of arterial and venous bloods in Wistar-Imamichi rat

	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Ht (%)	Hb (g/dl)	MCV (fl)
Arterial blood ¹⁾	5.88 ± 0.82	38.0 ± 7.0	11.3 ± 2.1	61.4 ± 3.4
Venous blood ²⁾	6.19 ± 1.35	36.5 ± 4.6	11.3 ± 0.9	61.6 ± 3.2

All values are expressed as Mean $\pm$ S. D. of 11 rats.

1) Arterial blood was taken from aorta abdominalis.

2) Venous blood was taken from venae cara caudalis.

No significant difference recognized between arterial and venous bloods.

P values were determind by paired sample t-test.

Fig. 2. Two-dimensional cytograms from Orthe Spectrum III
Right-angle v. s. forward narrow-angle scattered light of rat leukocytes.
1) A cytogram obtained from the sample prepared by a modified method as described.
2) A cytogram obtained from the sample prepared by a conventional method.
The four clusters represent:
A, lymphocytes; B, monocytes; C, granulocytes; and D, erythrocytes and platelets.
A gate window (marked in +) is provided to define cluster A.

Table 2. Total and differential leukocyte counts of arterial and venous bloods in Wistar-Imamichi rat

	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Differential Leukocyte Counts ($\times 10^3/\mu\text{l}$)				
		Neutrophils	Lymphocytes	Monocytes	Eosinophils	Basophils
Arterial Blood ¹⁾	$2.55 \pm 0.93^{**}$	0.51 ± 0.20 (20.0 $\pm$ 3.4%)	$1.97 \pm 0.74^{**}$ (76.8 $\pm$ 4.1%)	$0.06 \pm 0.02^*$ (2.8 $\pm$ 1.6%)	0.01 ± 0.02 (0.4 $\pm$ 0.6%)	N. D.
Venous Blood ²⁾	$4.52 \pm 1.09^{**}$	0.61 ± 0.19 (14.45 $\pm$ 5.3%)	$3.84 \pm 1.02^{**}$ (84.4 $\pm$ 4.5%)	$0.09 \pm 0.03^*$ (2.1 $\pm$ 0.8%)	0.01 ± 0.02 (0.2 $\pm$ 0.3%)	N. D.

All values are expressed as Mean $\pm$ S. D. of 11 rats. N. D.-Not detected.
1) Arterial blood was taken from aorta abdominalis.
2) Venous blood was taken from venae cava caudalis.
* Significant difference recognized between arterial and venous bloods. ($p < 0.05$)
** Significant difference recognized between arterial and venous bloods. ($p < 0.01$)
P values were determined by paired sample t-test.

て、蛍光強度をパラメーターとして得られたヒストグラムを Fig. 3 に示した。これらのヒストグラムのプロフィールに、各サンプルとも同様であった。
フローサイトメトリーにて測定した、各モノクローナル抗体と反応させたサンプルにおける、全リンパ球中の

陽性細胞の比率および、W3/25陽性細胞と OX8 陽性細胞との比を Table 3 に示した。動脈血および静脈血の各モノクローナル抗体に対する陽性細胞の比率は、W3/13では、 $55.2 \pm 12.7\%$ および $52.2 \pm 17.6\%$ 、W3/25では $43.5 \pm 9.2\%$ および $39.7 \pm 10.9\%$ 、OX8 では 13.9 ± 4.9

Table 3. Percentages of lymphocytes, obtained from arterial and venous bloods, labelled by W3/13, W3/25, OX4, and OX8 mouse anti-rat monoclonal antibodies, and ratio of W3/13/OX8

	percentages of cells labelled (%)				W3/25/OX8
	W3/13	W3/25	OX8	OX4	
Arterial blood ¹⁾	55.2±12.7	43.5±9.2	13.9±4.9	37.4±5.9	3.05±0.68
Venous blood ²⁾	52.2±17.6	39.7±10.9	13.3±3.6	42.2±8.6	3.32±0.72

All values are expressed as Mean±S. D. of 11 rats.

1) Arterial blood was taken from aorta abdominalis.

2) Venous blood was taken from venae cava caudalis.

No significant difference recognized between arterial and venous bloods.

P values were determined by paired sample t-test.

W3/13 positive cells correspond to rat T lymphocytes.

W3/25 positive cells correspond to rat helper T lymphocytes.

OX8 positive cells correspond to rat cytotoxic and suppressor T lymphocytes.

OX4 positive cells correspond to rat B lymphocytes.

W3/13/OX8 ratio represents the ratio of Helper/Non-helper.

% および $13.3 \pm 3.6\%$, OX4 では $37.4 \pm 5.9\%$ および $42.2 \pm 8.6\%$ であり, それぞれ動脈血と静脈血の間で有意の差は認められなかった。また, W3/25 陽性細胞と OX8 陽性細胞の比においても, 有意の差は認められなかった。

考 察

白血球数が動静脈血間で有意に差があることに關して, マウスおよびイスにおける報告[1, 9]では, いずれも静脈血の値が, 動脈血の値に対して有意に高くなっており, 今回の結果とはほぼ一致する。しかし一方では, ラットにおける右心室および左心室より採血した血液の間で白血球数の差は見られなかったとの報告もある[17]。これは, 体内において白血球には循環プールの他に血管内停滞プールや骨髄内貯蔵プールなどがあり, 採血部位, 時間, 生理的狀態などにより, 白血球数は容易に変動する[20]ためと考えられる。また, Table 2 に示したように, 静脈血のリンパ球数は動脈血のリンパ球数に対して有意に高く, 好中球数には有意の差が認められない。このことより上記の動, 静脈血間の白血球数の差は, 主にリンパ球数の変動によるものであることが示唆された。循環血中におけるリンパ球の動態においては末梢リンパ器官, リンパ管の存在や, リンパ球の再循環などがあり, これらの要因が, 動脈血, 静脈血間のリンパ球の分布にも影響を与えていることが推測される。

また, 本研究では, 開腹手術の後に静脈血, 動脈血の順に採血したが, 採血に伴う循環血流量の急激な低下

や, 開腹手術による胸管リンパ流量の変化などにより, リンパ球の動, 静脈血における分布が生理的狀態とは異なった状態となっていることも考えられる。また, 麻酔による循環血流量の変化などの影響も考慮に入れる必要があるものと思われる。したがって, 本研究において動脈血と静脈血との間でリンパ球数に有意の差が見られることは, これらの多数の要因の相互作用の結果と考えられる。

Fig. 2-1) のサイトグラム上において, ラット血液中の細胞成分は, 細胞の大きさと細胞内部の顆粒密度から A, B, C, D の 4 クラスターに分けられた。このうち D は, 細胞の大きさから, 溶血の結果生じた赤血球ゴーストと血小板と考えられる。残りの A, B, C が白血球に対応し, リンパ球, 単球, 顆粒球の集団と考えられる。ラット白血球において細胞の大きさは, リンパ球, 顆粒球, 単球の順で大きくなっており[18], また細胞内の顆粒密度は, 顆粒球がリンパ球, 単球に比して多いものと考えられる。したがって, サイトグラム上で A がリンパ球, B が単球, C が顆粒球を表すクラスターであると推定される。

リンパと考えられるクラスターのサブポピュレーションにおける, 各モノクローナル抗体による陽性細胞の比率に, 動脈血と静脈血の間で有意の差は認められなかったことにより, リンパ球各サブポピュレーションには動, 静脈血間で差はないものと思われた。

また, W3/25 陽性細胞をヘルパー T リンパ球, OX8 陽性細胞をノンヘルパー T リンパ球とすると, このヘルパー/ノンヘルパー比においても動脈血と静脈血の間に

は有意の差は認められない。

以上より、本研究における白血球数およびリンパ球数は、腹部大動脈より採血された動脈血の値が、後大静脈より採血された静脈血の値に対して有意に低い、その変化はリンパ球サブポピュレーションに影響をあたえていないものと思われた。しかし動静脈血間の白血球および、リンパ球数の差異に関しては、採血方法も吞めて、その原因について今後さらに検討する必要があるものと思われた。

また本研究においては、モノクローナル抗体とレーザーフローサイトメトリーを用いて、ラットのリンパ球サブポピュレーションを測定するに当たっての諸問題も検討したので以下に述べる。

本研究において、Fig. 2-1) のサイトグラム上でAクラスターをリンパ球をあらわす集団としたが、その単一性については、ヒトリンパ球では各クラスターへの他細

胞の混入は1%程度であることが報告されている[10, 19]。したがって、ヒトにおいてはサイトグラム上でリンパ球をあらわすクラスターの単一性は、測定上特に問題はないものと思われる。しかし、ラットにおいては、単球とリンパ球の形態がヒトに比べて類似していることが知られている[18]。したがって、リンパ球をあらわすクラスターへの単球の混入が、ヒトの場合より多い可能性も考えられ、この点については今後詳細に検討する必要があるものと思われた。

本研究に用いられた各モノクローナル抗体が Wistar-Imamichi ラットにおいても、各リンパ球サブセットに対応した抗原を認識してかどうかについては、ヒストグラムのプロファイルより検討した。すなわち、本研究において得られた各抗体のヒストグラム (Fig. 3) は、これまでに報告されているヒストグラム[15, 16, 24]とよく一致しており、したがって Wistar-Imamichi ラット

Fig. 3. Fluorescence histograms of Lymphocytes labeled with the indicated monoclonal antibodies. Samples were incubated with indicated monoclonal antibodies. Control labeling was incubated with mouse IgG. The cutoffs for determining the percentage of cells labeled are marked on the profiles with arrows.

においても、各モノクローナル抗体はそれぞれ対応するリンパ球サブセットに特異的な抗原を認識しているものと推測された。

オーソ社のスペクトラムⅢでは、前述のように、90°散乱光を利用することによってサイトグラム上で各細胞をその形態的特徴から分類することができる。その結果、他のレーザーフローサイトメトリーのように事前にFicoll-Hypaque 比重遠心法などで単核球を分離する必要もなく、全血をサンプルとして用い、赤血球を溶血させた上で測定することが可能となっている。しかし、ラットにおいては、サンプルの調製に当って従来のヒトやマウスに用いられている方法[19]では、溶血剤を加えた後に血球成分が凝集してしまい、サイトグラム上での各細胞の同定が困難となる場合がある (Fig. 2-2))。そこで本研究においては、若干の変更を加え、前述の方法にてサンプルの調製を行ったところ、血球成分が凝集することもなく、良好な結果が得られた。したがって、ラットリンパ球サブポピュレーションを測定する場合には、この改良法を用いることが望ましいと考えられる。ただしこの方法で行う場合、溶血後時間を置くとサイトグラム上での同定が困難となるので、溶血剤添加後2~3分で溶血を確認した後ただちに測定する必要があるものと思われた。

要 約

Wistar-Imamichi ラットにおいて、動脈血と静脈血の血液学的性状を比較するとともに、リンパ球サブポピュレーションの比較を行った。材料には、腹部大動脈および後大静脈より採血された血液を用いた。リンパ球サブセットの同定には、各サブセットに特異的な膜表面糖蛋白質を抗原決定基とする4種類のモノクローナル抗体を用いた。これらのモノクローナル抗体によって、各末梢リンパ球中のBリンパ球、Tリンパ球、ヘルパーTリンパ球、サブプレッサーおよび細胞障害性Tリンパ球の各サブセットを同定し、そのポピュレーションを、レーザーフローサイトメトリーシステムを用いて測定した。血液学的測定において、動脈血、静脈血間に有意の差があったのは、白血球数とヘモグロビン濃度であった。そのうち、白血球数の差は主にリンパ球数の違いによるものと思われた。しかし、各モノクローナル抗体による、リンパ球中の陽性細胞の比率には有意の差は認められなかった。以上の成績より、Wistar-Imamichi ラットにおいて動脈血、静脈血間に見られた白血球数の違いは、末

梢血におけるリンパ球サブポピュレーションの違いによるものではないことで示唆された。

文 献

- [1] Ambrous, C. M., and Ambrous, J. L. (1959). Regulation of the leukocyte level. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **77**, 445-486.
- [2] Barclay, A. N. (1981). The localization of poluation of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues. *Immunology*, **42**, 593-601.
- [3] Brideau, R. J., Carter, P. B., McMaster, W. R., Mason, D. W., and Williams, A. F. (1980). Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.*, **10**, 609-615.
- [4] Cantor, H., and Boyse, E. A. (1975). Functional subclass of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. *J. Exp. Med.*, **141**, 1376-1389.
- [5] Cantor, H., Shen, F. W., and Boyse, E. A. (1976). Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. *J. Exp. Med.*, **143**, 1391-1401.
- [6] Cantrell, D. A., Robins, R. A., Brooks, C. G., and Baldwin, R. W. (1982). Phenotype of rat natural killer cells defined by monoclonal antibodies marking rat lymphocyte subsets. *Immunology*, **45**, 97-103.
- [7] Dallman, M. J., Mason, D. W., and Webb, M. (1982). Role of host and donor cells in the rejection of skin allografts by T cell deprived rats injected with syngenic T cells. *Eur. J. Immunol.*, **12**, 511-518.
- [8] Doell, B. H., and Hegarty, P. V. J. (1970). The hemoglobin concentration of peripheral and central blood of the laboratory rat. *Br. J. Haematol.*, **18**, 503-509.
- [9] Goldie, H., Jones, A. M., Ryan, H., and Simpson, M. (1954). Leukocyte counts in the blood from the tail and the heart of the mouse. *Science*, **119**, 353-354.
- [10] Ip, S. H., Rittershaus, C. W., Healey, K. W., Struzziero, C. C., Hoffman, R. A., and Hansen, P. W. (1982). Rapid Enumeration of T lymphocytes by a flow-cytometric immunofluorescence method. *Clin. Chem.*, **28**, 1905-1909.
- [11] Ishii, Y., Matsumura, A., Yuasa, H., Narita, H., Takami, T., and Kikuchi, K. (1983). Two distinct antigenic markers for rat thymus and T cells defined by monoclonal antibodies. *Immunology*, **48**, 743-755.
- [12] 伊藤喜久 (1983). レーザーのフローサイトメトリーへの応用. 臨床検査, **27**, 985-991.
- [13] 伊藤喜久・原田弘智・河合 忠・中野康平 (1983). レーザーフローサイトメトリーによるT細胞サブセットの自動解析. 臨床検査, **27**, 817-820.
- [14] Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- [15] Mason, D. W., Arthur, R. P., Dallman, M. J., Green, J. R., Spickett, G. P., and Thomas, M. L. (1983). Function of rat T-lymphocyte subsets

- isolated by monoclonal antibodies. *Immunol. Rev.*, **74**, 57-82.
- [16] McMaster, W. R., and Williams, A. F. (1979). Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur. J. Immunol.*, **9**, 426-433.
- [17] Quimby, F. H., and Goff, L. G. (1952). Effect of source of blood sample on total white cell count of the rat. *Am. J. Physiol.*, **170**, 196-170.
- [18] Ringer, D. H., and Dabich, L. (1979). Hematology and clinical biochemistry. In *The Laboratory Rat* (volume I), pp. 105-121. Baker, H. J., Lindsey, J. R., and Weisbroth, S. H. (edit.), Academic Press Inc., New York.
- [19] 佐藤三郎 (1984). リンパ球サブセット解析のための周辺機器の開発. *最新医学*, **39**, 106-110.
- [20] Schalm, O. W., Jain, N. C., and Carrol, E. J. (1975). *Veterinary Hematology*. pp. 471-538, Lea & Febiger, Philadelphia.
- [21] Upton, P. K., and Morgan, D. J. (1975). The effect of sampling technique on some blood parameters in the rat. *Lab. Anim.*, **9**, 85-91.
- [22] 若藤靖匡・外尾亮治・天尾弘実・高橋和明・今道友則 (1984). Wistar-Imamichi rat の SPF 化に伴う産仔数の増加と胚・胎仔の損失現象について. *実験動物*, **33**, 165-171.
- [23] White, R. A. H., Mason, D. W., Williams, A. F., Galfre, G., and Milstein, C. (1978). T lymphocyte heterogeneity in the rat: separation of functional subpopulation using a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.*, **148**, 664-673.
- [24] Williams, A. F., Galfre, G., and Milstein, C. (1977). Analysis of cell surface by xenogeneic myeloma-hybrid antibodies. Differentiation antigens of rat lymphocytes. *Cell*, **12**, 663-673.