Blastogenic Response in the Rat Lymphocyte Using Glucose Consumption Test

Isao IKARASHI, Naomi SUNOUCHI, Shunji TOYOHARA,
and Kiyonori TAUCHI

*Imamichi Institute for Animal Reproduction, 1103 Fukaya,
Dejima-mura, Niihari-gun, Ibaraki 300-01, Japan*

(Received 25 October 1989/Accepted 19 December 1989)

To estimate the immune function of the rat, the blastogenic response of rat lymphocytes in blood drawn from the vena cava was investigated. The recovery rate of lymphocytes from venous blood was $33.2 \pm 2.23\%$ and their viability rate was $99.8 \pm 0.25\%$. Three kinds of mitogens (phytohemagglutinin-M, concanavalin A and pokeweed mitogen) at three different concentrations (high, middle and low) were added to lymphocyte suspensions, and the suspensions were cultured under 5% CO₂ incubation. Cultured suspensions were served for glucose consumption test and values were calculated (glucose consumption test-stimulation ratio (GCT-SR)). Incidence of blast cells was also observed by morphology. In both the GCT-SR and blast cell incidence, the highest values, 41.2% and 50.8%, respectively, were obtained after stimulation with phytohemagglutinin-M at the concentration of 0.1 ml/ml. The results were statistically analyzed by the variance of means. On both the GCT-SR and blast cell incidence, values obtained in each condition (kind of mitogens on the concentration used) were all statistically significant (all $P < 0.01$). The correlation coefficient between the GCT-SR values and the blast cell incidence was 0.97 ($P < 0.01$). From these results, we concluded that the glucose consumption test using rat blood lymphocytes can be used as a safe and simple method to measure the immune function of rats.

グルコース消費試験を用いたラット静脈血 リンパ球幼若化反応の検討

五十嵐 功・簾内直美・豊原俊治・田内清憲

財団法人動物繁殖研究所

生体の免疫機能を検討する場合、ヒト[6, 7]を始めとし、ウシ[9, 20]、ウマ[24]、ブタ[8, 22]、ヒツジ[2]、イヌ[12]、ネコ[4]等の家畜においても、リンパ球幼若化能を指標とすることが多い。これらの検討に使用するリンパ球は、主として末梢血から分離している。しかし、マウスおよびラットの実験用小動物では、脾臓あるいは腸間膜リンパ節などのリンパ器官由来リンパ球

を使用する場合が多く[5, 14, 23]、静脈血リンパ球を使用して幼若化反応をみた報告はなく、prostaglandin合成を調べた報告[17]があるのみである。

リンパ器官からリンパ球を分離する方法は、リンパ球収量が多いという利点がある反面、分離時間および細胞の生存率の点で問題がある[18]。また、リンパ球幼若化反応の成績判定法として、形態学的観察法、放射性物

質の取り込み測定による方法および培地中のグルコース消費量の測定による方法がある [22]。これらの方法のうち、形態学的観察法は、経済的ではあるが、多量の血液と成績判定に熟練を要し、再現性と客観性に難点があり、多数検体処理は困難とされている。また、放射性物質を使用する方法は、高価な装置と設備が必要であるとともに、放射能汚染対策も問題となる。しかし、グルコース消費試験法は、測定装置があれば、微量の血液で測定可能であり、しかも判定が容易で再現性と客観性が良好であり、多数検体の処理が可能とされている。

ラットのような小動物でリンパ球幼若化能を検討する場合、微量の血液を用い、しかも多数の検体を容易に処理できることが望ましい。そこで著者らは、リンパ球が多いといわれている静脈血 [13] からリンパ球を回収して培養し、リンパ球幼若化誘発に用いられることが多い3種類の mitogen について、それらの濃度とグルコース消費量の関係を検討した。また、グルコース消費試験の成績の妥当性を確認するため、グルコース消費量と培養リンパ球のギムザ染色標本の形態学的観察から算出した幼若化細胞出現率との関係を検討した。

材料および方法

供試動物：Wistar-Imamichi ラット10週齢♂5匹を、リンパ球採取用動物として供試した。これらのラットは、室温 24 ± 2 ℃、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数12~15回/hr、照明時間は5~19時の14時間、ケージは金網製、飼料（船橋農場MM-3）および飲料水（自家水道水）は自由摂取の条件下で飼育した。

リンパ球の分離：Ficoll-conray を用いた比重遠心法 [19] で行なった。分離剤は、Ficoll 400 (Farmacia) 9 w/v % 水溶液と Conray 400 (第一製薬) 33.3 v/v % 水溶液を24:10の割合で混合し（比重1.078）、スターラーで1昼夜攪拌後、高圧蒸気滅菌したものを使用した [18]。まず、供試ラットをエーテル麻酔し、ヘパリン（ノボインダストリーA/S）濃度30~50 unit/ml となるように後大静脈から8 mlずつ採血した。このうち1 ml を血液学的検査に供し、白血球数および白血球百分比を算定した。残り7 ml の血液を Dulbecco's PBS (一) で2倍希釈し、高圧蒸気滅菌したリンパ球分離用鉄カルボニール（iron carbonyl, 和光純薬）を40 mg/ml 濃度に加えた。これを37℃で1時間培養して鉄粉を単球に貧食させ、Ficoll-conray に静かに重層し、1800 rpm 20分間遠心分離し、リンパ球浮遊原液を作製した [15]。この浮遊原液を PBS (一) で3回洗浄後、培養液でリ

ンパ球濃度 $2 \sim 3 \times 10^6$ 個/ml に調製し、リンパ球浮遊液として滅菌マイクロスピツ（日本バイオテック）にそれぞれ1 ml ずつ分注し、密閉保存した。

培養方法：リンパ球浮遊液に培養液と所定濃度の mitogen を加え、37℃で96時間炭酸ガス培養した。培養液は、RPMI-1640（ニッスイ）を基礎培養液とし、これに HEPES (N-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethan sulfonic acid, SIGMA) 25 mM、ペニシリン G カリウム（明治）100 unit/ml、硫酸ストレプトマイシン（明治）0.2 mg/ml、ラット血清0.1 ml/ml、10%重炭酸ナトリウム（和光純薬）0.04 ml/ml の割合で添加したものをを用いた。なおラット血清は、Wistar-Imamichi SPF ラット♂10週齢を炭酸ガス麻酔し、腹大動脈から無菌的に採血し、3000 rpm 10分間遠心分離後、56℃30分間非働化した。

Mitogen：Phytohemagglutinin-M (PHA-M, 50 mg/ml, DIFCO), concanavalin A (ConA, SIGMA) および pokeweed mitogen (PWM, Biosys, S. A.) を使用した。ただし、添加濃度は3段階 (high, middle および low) すなわち PHA-M は0.2, 0.1 および0.05 / ml, ConA および PWM は20, 10, および5 μ g/ml となるように培養液に加えた。

グルコース消費量の側定：グルコース消費量 [3, 16] を用い、リンパ球培養液遠心上清中のグルコース濃度を測定した。すなわち、培養液を1000 rpm で10分間遠心分離し、hexokinase を用いた酵素法によりアンコールアナライザーで遠心上清中のグルコース濃度を測定し、次式により、グルコース消費量から求めた刺激率 (GCT-SR) を求め、幼若化の指標とした。

$$GCT-SR = \frac{G_{cont} - G_{stim}}{G_{cont}} \times 100\%$$

ただし、

GCT-SR : glucose consumption test stimulation ratio

Gcont : glucose concentration in control culture

Gstim : glucose concentration in stimulation culture

幼若化細胞の出現率：培養細胞を3:1メタノール酢酸により固定後塗抹し、pH 6.8のPBS (一) で40倍希釈したギムザ液で5分間染色し、培養細胞を200個以上数え、次式により幼若化細胞 (blast cell) の出現率を算出した。

Table 1. Total leucocytes counts, lymphocytes ratio and lymphocyte count from rat venous blood

Rat no.	Total leucocyte count ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	Lymphocyte ratio (%)	Lymphocyte count ($\times 10^2/\text{mm}^3$)
1	89	92.1	82
2	104	89.4	93
3	98	91.8	90
4	83	81.9	68
5	114	92.1	105
Mean	97.6	89.5	87.6
S. D.	12.2	4.4	13.7

Table 2. Values of GCT-SR after stimulation with mitogens at three concentrations

mitogen	high ¹⁾	middle ²⁾	low ³⁾
PHA-M	35.7 $\pm$ 10.61% ⁴⁾	41.2 $\pm$ 7.55%	33.3 $\pm$ 3.94%
ConA	23.8 $\pm$ 6.46	11.9 $\pm$ 4.78	2.1 $\pm$ 1.55
PWM	5.6 $\pm$ 4.35	3.8 $\pm$ 3.23	8.3 $\pm$ 6.70

1) PHA-M : 0.2ml/ml, ConA and PWM : 20 μ g/ml2) PHA-M : 0.1ml/ml, ConA and PWM : 10 μ g/ml3) PHA-M : 0.05ml/ml, ConA and PWM : 5 μ g/ml4) Mean $\pm$ S. D.

$$\text{幼若化細胞の出現率} = \frac{\text{幼若化した細胞数}}{\text{観察した培養細胞数}} \times 100\%$$

データの解析: GCT-SR 値および幼若化細胞の出現率のデータ解析は, mitogen の種類 (PHA-M, ConA, PWM) および mitogen の濃度 (high, middle および low) を要因とし, 繰り返しのある 2 元配置法の分散分析で行なった。ただし出現率の解析は, 生の出現率データおよび正規分布により近似させるため逆正弦変換した出現率の両者について解析した。なお, 統計的に有意となった各要因および 2 要因間交互作用については, 水準平均値間の詳細な比較を Tukey の方法で行なった [25]。また, 各 mitogen の各濃度における GCT-SR 値と幼若化細胞出現率間の相関係数を計算し, 相関図を作製した。

成 績

Table 1 に, Wistar-Imamichi ラット 10 週齢 ♂ 5 匹の静脈血の白血球数, 白血球百分比およびそれらから算出したリンパ球数を示した。なお, リンパ球浮遊液中のリンパ球数と Table 1 のリンパ球数から算出したリン

パ球回収率は 33.2 $\pm$ 2.23% であり, その生存率は 99.8 $\pm$ 0.25% であった。

Table 2 に, 各 mitogen の各濃度における GCT-SR 値の平均値および標準偏差を示した。

PHA-M では, middle の平均値が最大で, low が最小である。ConA では, 平均値の大きさは濃度の濃い順と一致し, high が最大で, low が最小である。PWM では, どの濃度の平均値も小さいが, low が最大で, middle が最小である。また全体としては, PHA-M の middle が最大の 41.2% であり, ConA の low が最小の 2.1% である。分散分析の結果, mitogen の種類間の差, mitogen の濃度間の差および両者の交互作用は, いずれも 1% の危険率で有意であった。

分散分析の結果が有意のため, mitogen の種類および濃度ごとの平均値について, すべての組合せでふたつの平均値間の差の検定を行った。Fig. 1 に, 検定結果を階段図として示した。PHA-M では, high と middle 間に 5% の危険率で, middle と low 間に 1% の危険率で有意差が認められているが, high と low 間には有意差がない。ConA では, 各濃度間にいずれも 1% の危険率で有意差が認められている。PWM では, 各濃度間に有意差がない。また, PHA-M の各濃度の平均値

PHA-M:high(35.7%)								
1)	*	PHA-M:middle(41.2%)						
2)	ns	**	PHA-M:low(33.3%)					
	**	**	**	ConA:high(23.8%)				
	**	**	**	**	ConA:middle(11.9%)			
	**	**	**	**	**	ConA:low(2.1%)		
	**	**	**	**	**	ns	PWM:high(5.6%)	
	**	**	**	**	**	ns	ns	PWM:middle(3.8%)
	**	**	**	**	ns	**	ns	PWM:low(8.3%)

ns : no significant difference * : significant difference at a 5% level ** : significant difference at a 1% level
() : mean of GCT-SR(%) 1) Significant difference at a 5% level between the mean of GCT-SR(%) from PHA-M:high and that from PHA-M:middle 2) No significant difference between the mean of GCT-SR(%) from PHA-M:high and that from PHA-M:low 3) Significant difference at a 1% level between the mean of GCT-SR(%) from PHA-M:middle and that from PHA-M:low, and so on

Fig. 1. Summation of statistical difference of means of GCT-SR values in Table 2 (by Tukey's method)

Fig. 2. Blast cells and karyoschisis in lymphocyte culture after stimulation with a mitogen (PHA-M) at 0.1ml/ml

Fig. 4. Correlation between GCT-SR value and the incidence of blast cells

した相関図を示した ($n=50$)。相関係数 r は 0.97 ($P \leq 0.01$) で、GCT-SR 値を X 、幼若化細胞出現率を Y とすると回帰直線 $Y = 1.04X + 6.98$ が得られた。

考 察

今回我々は、従来ラットのリンパ球培養実験系ではほとんど用いられなかった静脈血リンパ球を材料とし、幼若化能に関する一連の検討を行なった。その結果、後大静脈から採血し静脈血からのリンパ球の回収率およびその生存率は比較的良好であった。したがって、ラットのような実験用小動物においても、ヒトおよび各種家畜の場合と同様に、静脈血由来リンパ球の培養が十分可能と思われる。

グルコース消費試験は、すでにヒトにおける日常検査法 [6] として確立されている。リンパ球の幼若化能を調べる正確な方法として、放射性同位元素の ^3H [1, 26] あるいは蛍光色素の ethidium bromide [10] を用いて判定する方法がある。しかしグルコース消費試験は、放射性物質あるいは特別な装置や施設を必要としない点で安全かつ簡便な方法といえる。また今回得られた GCT-SR 値は、形態学的に調べた各種 mitogen の幼若化細胞出現率との間で強い相関関係が認められ、成績の一致度が高かった。したがって、ラットの実験系においても、グルコース消費量を指標にし、微量の血液を用いて多数検体の幼若化能を判定し、各種の比較検討が容

易にできるものと思われる。

今回使用した 3 種の mitogen のうち、PHA-M と ConA は T-cell 刺激、PWM は B-cell 刺激 mitogen といわれている。GCT-SR 値から推定したリンパ球幼若化能に対する各 mitogen の最適濃度は、PHA-M では 0.1 ml/ml, ConA では 20 $\mu\text{g/ml}$ であった。しかし PWM では、各濃度とも幼若化能が低く、しかも濃度間に有意差がなかった。今後さらに、PWM の異なる濃度あるいは他の B-cell 刺激 mitogen についても検討する必要があると思われる。

要 約

ラット静脈血由来リンパ球を幼若化反応に利用するため、後大静脈から採取した静脈血からリンパ球を回収した。リンパ球の回収率は $33.2 \pm 2.23\%$ であり、その生存率は $99.8 \pm 0.25\%$ であった。このリンパ球浮遊液に 3 種類の mitogen (phytohemagglutinin-M, concanavalin A および pokeweed mitogen) の各 3 濃度を加えて炭酸ガス培養し、グルコース消費試験による GCT-SR 値 (glucose consumption test-stimulation ratio) および形態学的に測定した幼若化細胞の出現率を求め、mitogen の種類およびそれらの濃度の影響を検討した。その結果、GCT-SR および幼若化細胞の出現率に与える mitogen の種類とそれらの濃度の影響および両者の交互作用は、いずれも 1% の危険率で統計的に有意であり、phytohemagglutinin の 0.1 ml/ml の GCT-SR 値および幼若化細胞の出現率が最大で、それぞれ 41.2% および 50.8% であった。また、GCT-SR 値と幼若化細胞の出現率との間に相関係数 $r = 0.97$ という強い相関関係が得られ、両者の成績の一致度が高かった。したがって、ラットの静脈血由来リンパ球を用いるグルコース消費試験により、安全かつ簡便にしかも微量の血液で多数検体について、リンパ球の幼若化能を調べることが可能である。

稿を終えるに臨み終始親切な御指導、御校閲を賜った財団法人動物繁殖研究所副所長滝沢隆安博士に深謝いたします。また、本論文作成に御協力をいただいた、コンピュータ室長今井節夫氏および第四研究部研究員五十嵐 洋氏に感謝します。

文 献

- [1] Bach, F. H. and Voynow, N. K. (1966). One-way stimulation in mixed leukocyte culture. *Science*, **153**, 545-547.
- [2] Burrelles, C., Wells, P. W., and Sutherland, A. D. (1978). Reactive of ovine lymphocyte to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen during preg-

- nancy and in the imediate post-parturient period. *Clin. Exp. Immunol.*, **33**, 410-415.
- [3] Decock, W., Decree, J., Van Wauwe, J., and Verhaegen, H. (1980). Measurement of mitogen stimulation of lymphocytes with a glucose consumption test. *J. Immunol. Method*, **33**, 127-131.
- [4] Goituka, R., Hirota, Y., Hasegawa, A., and Tomoda, I. (1987). The decline in the production of interleukin 2 in cats spontaneously infected with feline leukemia virus. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 7-14.
- [5] Hornicek, F. J., Reese, D. H., Lo, H. K., Malinin, T. I., and Malinin, G. I. (1988). Periodic acid induced blastogenesis of lymphocytes is independent of phosphoinositide turnover. *Biochem Biophys Commun.*, **154**, 606-612.
- [6] 伊保澄子・倉 文明・星野 孝 (1983). グルコース消費試験による PHA 幼若化率の判定. 免疫実験操作法Ⅷ. pp. 4123-4126, 日本免疫学会編.
- [7] 伊保澄子・星野 孝・高橋隆幸 (1983). PHA 幼若化反応に対する人抑制性 T 細胞の簡易測定法. 免疫実験操作法Ⅷ. pp. 4127-4132, 日本免疫学会編.
- [8] Inoue, T., Tsukamoto, H., Goto, N., and Matsumura, K. (1987). Application of ethidium bromide fluorescence assay to measurement of blastogenesis of swine lymphocytes. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 681-686.
- [9] Ishikawa, H. (1987). Obserbation of lymphocyte function in perinatal cows and neonatal calves. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 469-475.
- [10] 伊藤善久・河合 忠 (1983). エチジウムブロマイド蛍光法を用いたリンパ球幼若化反応試験の基礎的検討及び臨床応用. 臨床検査, **27**, 928-931.
- [11] 河合 忠・近藤泰正・河野均也・賀屋秀男 (1970). リンパ球幼若化反応の検索. 臨床検査, **14**, 1422-1428.
- [12] Kudo, T., Kato, Y., Masuno, H., Honjo, H., and Kitazawa, K. (1987). The effect of repeated acupuncture stimulation on canine lymphocyte response. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 1009-1013.
- [13] 国枝哲夫・黒澤 努・杉山芳宏・花上 仁・今道友則・四方淳一 (1987). 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. 実験動物, **36**, 109-116.
- [14] Locniskar, M., Nauss, K. M., and Newberne, P. M. (1983). The effect of quality of dietary fat on immune system. *J. Nutr.*, **113**, 951-961.
- [15] Lohrmann, H-P., Novikovs, L., and Graw, R. G. J. (1974). Stimulatory capacity of human Tand B lymphocytes in the mixed leukocyte culture. *Nature*, **250**, 144-146.
- [16] MacHaffie, R. A. and Wang, C. H. (1967). The effect of phytohemagglutinin upon glucose catabolism in lymphocytes. *Blood*, **29**, 640-646.
- [17] Marshall, L. A. and Johnston, P. V. (1985). The influence of dietary essential fatty acids on rat immunocompetent cell prostaglandin synthesis. *J. Nutr.*, **115**, 1572-1580.
- [18] 村上正人・沢田梅彦 (1985). リンパ球分離法. 細胞性免疫機能のすべて, pp 72-76, 月刊 Medical Technology 編, 医歯薬出版, 東京.
- [19] 中川俊郎 (1979). リンパ球検査. 1. 分離法. 臨床検査, **23**, 1101-1105.
- [20] Nagahata, H., Noda, H., and Abe, T. (1987). Changes in blastogenic response of bovine acute clinical mastitis. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 1148-1150.
- [21] 岡部龍也・土屋達行 (1985). リンパ球培養検査. A. 培養方法と成績判定法. 細胞性免疫機能のすべて, pp 162-170, 月刊 Medical Technology 編, 医歯薬出版, 東京.
- [22] Onyekaba, C. (1988). DNA repair in lymphocytes from humans and rats with chronic iron overload. *Microbiologica*, **11**, 201-205.
- [23] Pietorangelo, A., Cossarizza, A., Monti, D., Ventura, E., and Franceschi, C. (1988). In vitro blastogenesis of porcine peripheral blood lymphocytes. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **154**, 698-704.
- [24] Tajima, M., Fujinaga, T., Koike, T., Okamoto, Y., and Otomo, K. (1987). Assay for equine peripheral blood lymphocytes blastogenic response using ethidium bromide. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 567-570.
- [25] 滝沢隆安 (1985). 獣応用統計学. pp 153-156, 学窓社, 東京.
- [26] 土屋達行・河野均也 (1979). 芽球化反応. 臨床検査, **23**, 1110-1114.