

# ネコおよびイヌの One-Way Mixed Lymphocyte Culture 反応手技の検討

誌名	日本獣医畜産大学研究報告 = The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College
ISSN	03738361
著者	増永, 朗 日比, 芳美 松野, 浩子
巻/号	35号
掲載ページ	p. 87-91
発行年月	1986年12月

## ネコおよびイヌの One-Way Mixed Lymphocyte Culture 反応手技の検討

増永 朗・日比芳美・松野浩子・江島博康  
黒川和雄・七戸博和\*・仲間一雅\*

日本獣医畜産大学 第一外科学教室

\*日本医科大学 実験動物施設

**要約** 今回我々は、ネコおよびイヌの骨髄や臓器の移植を前提として、 $^3\text{H}$ -チミジンの DNA への取り込みを利用した Mixed Lymphocyte Culture (MLC) の反応手技について検討を行い、以下のような結論を得た。

(1) 細胞数は、MLC の Effectation cell, Stimulating cell はそれぞれ  $2 \times 10^6/\text{ml}$  ずつが至適であった。コントロール培養においては  $2 \sim 5 \times 10^6/\text{ml}$  が実用細胞数であった。

(2) マイトマイシン-C (MMC) 処理は、 $2 \times 10^6/\text{ml}$  の細胞濃度に対し  $25 \mu\text{l}$  の MMC で 40 分間処理するのが適当であった。

(3) 添加  $^3\text{H}$ -チミジン量は、 $0.8 \mu\text{Ci}/\text{well}$  が最適であった。

(4) コントロール培養における Phytohemagglutinin (PHA) および Concanavalin-A (ConA) 添加至適量は、PHA は、 $5 \sim 10 \mu\text{g}/\text{well}$ , ConA は  $8 \sim 16 \mu\text{g}/\text{well}$  であった。

キーワード: Lymphocyte, MLC, イヌおよびネコ。

日獣畜大研報, 35, 87~91, 1986.

リンパ球混合培養 (Mixed Lymphocyte Culture, MLC) は、1964 年に Bain<sup>1)</sup> が初めて報告して以来、急速に発展してきた。MLC は、組織適合抗原の非適合者どうしのリンパ球を混合培養すると、リンパ球が幼若化するという現象をとらえて組織適合性の有無を検討するものである。この MLC 反応の発現機構には不明な点が多いが、同種抗原に対するリンパ球の認識機構とその分化成熟過程を解析する手段として、あるいは臓器移植のための組織適合性を検査する手段として広く用いられている。

動物においては、ウシ<sup>2)</sup>、イヌ<sup>3)</sup>、ネコ<sup>4), 11)</sup>等において検討されている。

今回著者らは、ネコとイヌの移植前の組織適合性検査法確立を目的としてその反応手技について検討したので報告する。

### 実験材料および方法

#### 1. 採血

採血は臨床上健康なネコおよびイヌの頸静脈から 20 ml 採血した。血液は直ちにコルベン内で攪拌して脱線

血を作成した。イヌ血液は、ミクロフィラリア (mf) 陰性のものを使用した。

#### 2. リンパ球の分離採取

採取した血液は遠心分離し、血清除去したのち、PBS で希釈し、Ficoll-Isopaque (比重 1.077, 武藤化学) を用いた比重遠心分離法<sup>7)</sup>にてリンパ球を採取した。採取したリンパ球は、培地にて 2 回洗浄したのち、細胞数を算定し実験に供した。

#### 3. 培地

培地には RPMI-1640 (Gibco) を用い、10% 同種非働化血清、80 mg/l ゲンタマイシン、20 mM/l Hepes、2 g/l 重炭酸ナトリウム、2 mM/l L-グルタミンを添加した。

#### 4. マイトーゼン

PHA-P (Difco) 5 mg を 5 ml の PBS に溶解し、使用まで  $-70^\circ\text{C}$  に保存した。使用直前に培地にて、20  $\mu\text{l}$  あたり 2.5, 5, 10  $\mu\text{g}$  になるように希釈して実験に供した。

ConA (Sigma) も PHA 同様、使用直前に培地にて 4, 8, 16, 24  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  になるように希釈した。

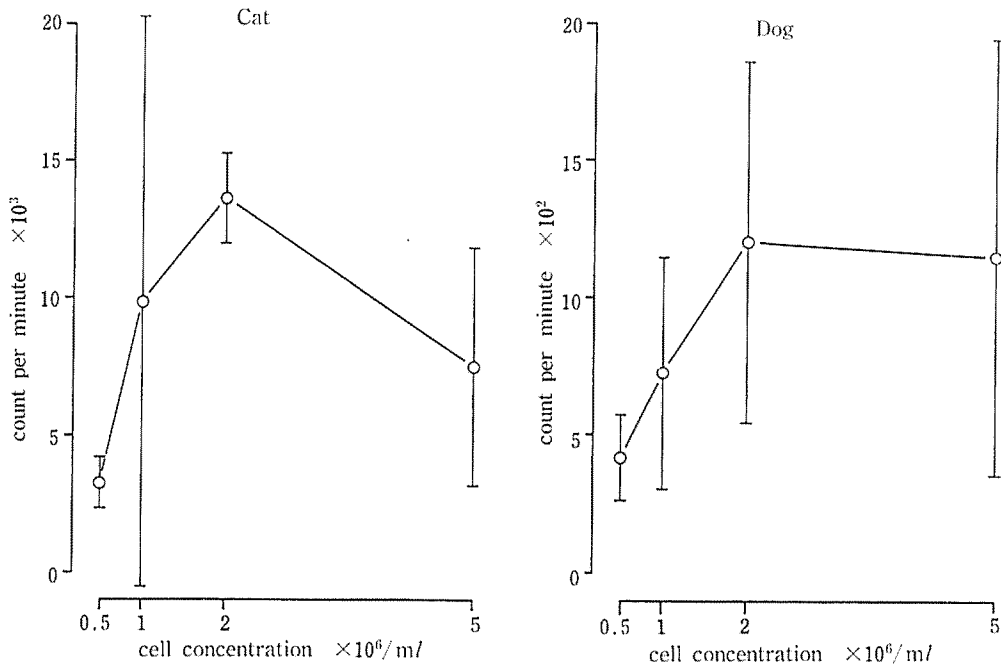


Fig. 1. Comparison of responsibility of MLC reaction in various concentration of lymphocyte.

Table 1. Inhibitory effect rate of MMC treatment against stimulation cultures.

Lymphocyte (number)	Treatment		
	non-MMC	MMC <sup>1</sup>	MMC <sup>2</sup>
Dogs (2 × 10 <sup>6</sup> /ml)	5,302*	146	137
Cats (2 × 10 <sup>6</sup> /ml)	3,125	396	116

1: MMC treatment, 20 μg/ml, for 30 min.

2: MMC treatment, 25 μg/ml, for 40 min.

\*: The numbers mean value of Stimulation index (SI).

$$SI = \frac{\text{Stimulation culture (cpm)}}{\text{Control culture (cpm)}} \times 100$$

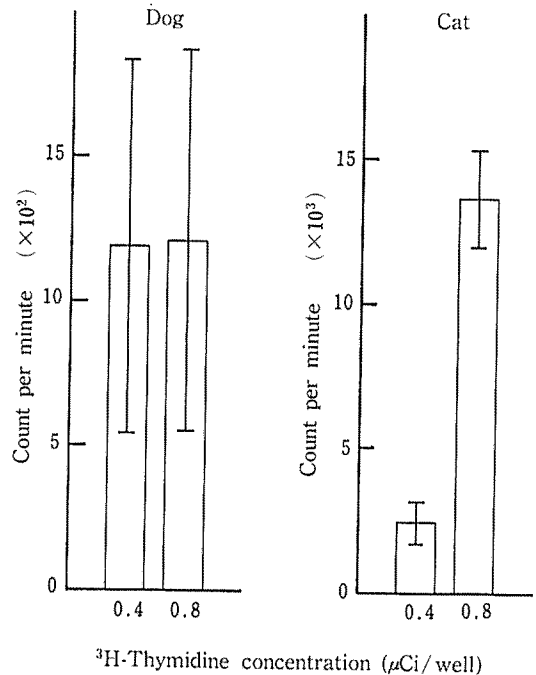


Fig. 2. Response of MLC on different concentration of <sup>3</sup>H-thymidine.

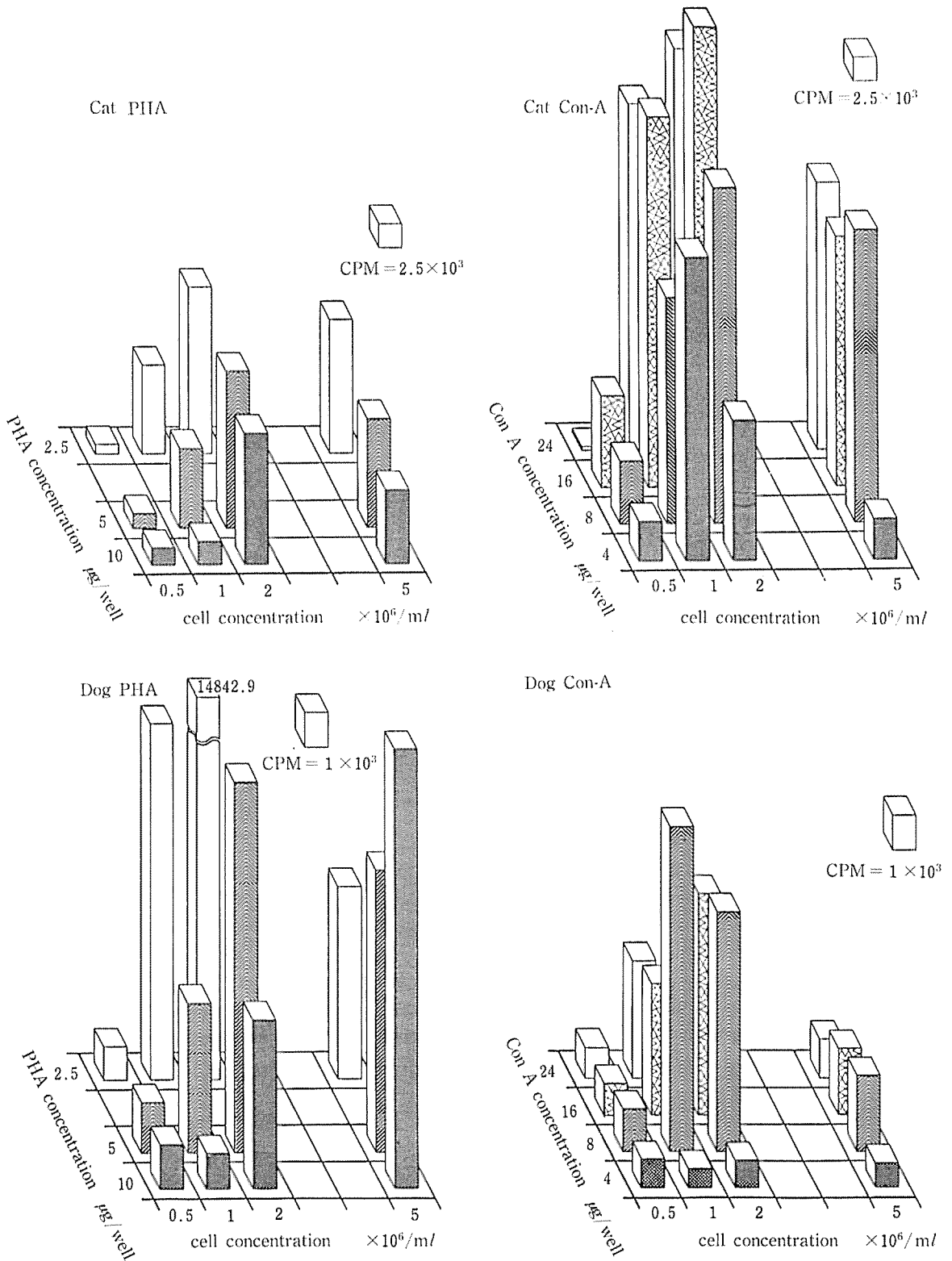


Fig. 3. Correlation of lymphocyte response between cell concentration and mitogen concentration.

### 5. $^3\text{H}$ -チミジン

$^3\text{H}$ -チミジン (Amersham Japan KK) は使用まで冷蔵保存しておき、PBS にて  $0.4 \mu\text{Ci}/1 \mu\text{l}$  になる様に希釈した。

### 6. MLC 反応手技

今回行った MLC は岩本ら<sup>9)</sup>の方法に若干の変更を加えて行った。すなわち、リンパ球を分離洗浄し、細胞数を算定したのち、刺激細胞は、MMC 処理を行った。その後、反応細胞と  $100 \mu\text{l}$  ずつを丸底マイクロプレート (NUNC) に入れ、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  下で7日間培養した。培養終了の16時間前に  $^3\text{H}$ -チミジンを添加し、培養終了後、セルハーベスター (ラボサイエンス) で細胞をハーベストし、液体シンチレーター  $3 \text{ml}$  と共にシンチレーションカウンターで  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込み量を測定した。コントロール培養は、刺激細胞か反応細胞のどちらか  $100 \mu\text{l}$  と培地  $100 \mu\text{l}$  およびマイトージェン  $20 \mu\text{l}$  を MLC と同様のプレートに入れ同条件で4日間培養し、 $^3\text{H}$ -チミジンの取り込み量を測定した。

## 結 果

1. MLC における細胞数は、0.5, 1, 2 および  $5 \times 10^6/\text{ml}$  のそれぞれについて検討した。Fig. 1 に示すとおり、ネコ、イスのいずれにおいても  $2 \times 10^6/\text{ml}$  ずつの細胞数で培養を行うのが最も高い CPM 値を示した。

2. MMC 処理は、細胞数  $2 \times 10^6/\text{ml}$  あたり  $20 \mu\text{g}$  で30分と  $25 \mu\text{g}$ 、40分で処理し、PHA と ConA に対する反応性を検討した。Table 1 に示すように  $25 \mu\text{g}$  で40分処理が最も低い CPM 値を示した。

3. 添加  $^3\text{H}$ -チミジン量は、ウェルあたり  $0.4 \mu\text{Ci}$  と  $0.8 \mu\text{Ci}$  の2種の濃度について検討した。ネコは  $0.8 \mu\text{Ci}/\text{well}$  の方がより高い CPM 値を示した。一方イスは両者の濃度に差はみられなかった (Fig. 2)。

4. コントロール培養における細胞濃度は、0.5, 1, 2 および  $5 \times 10^6/\text{ml}$  について検討を行った。その結果は Fig. 3 に示すとおりであり、 $2 \times 10^6/\text{ml}$  の細胞濃度が最も適していた。

5. コントロール培養における PHA および ConA 濃度は、Fig. 3 に示すとおり PHA は、 $5 \sim 10 \mu\text{g}/\text{well}$ 、ConA は、 $8 \sim 16 \mu\text{g}/\text{well}$  が高い CPM 値を示した。

## 考 察

今回行った MLC 反応の条件の検討は、細胞数は  $2 \times 10^6/\text{ml}$  宛の反応細胞と刺激細胞の反応が最も高い CPM 値を示した。この値は Stiff<sup>9)</sup>らの報告と類似している。著者らの成績では  $1 \times 10^6/\text{ml}$  において比較的高い CPM

値を得ている。また、 $5 \times 10^6/\text{ml}$  においても  $2 \times 10^6/\text{ml}$  と近い値を示しており、検体によっては  $2 \times 10^6/\text{ml}$  よりも高い値を示すものもあった。しかしながら実用的な点、例えば採血量は少なくすむなどを考慮すると  $2 \times 10^6/\text{ml}$  の方が良いと思われた。また刺激の効率を高めるために刺激細胞の数を反応細胞より多くする方法もある。今回行った実験においては Effector と Stimulator の比を 1 : 1 としたが十分高い反応性を有していた。

MMC 処理は、岩本ら<sup>9)</sup>の方法の  $2 \times 10^6/\text{ml}$  の細胞濃度あたり  $20 \mu\text{g}$  の MMC での30分処理では、マイトージェンに対する反応性はネコは 200%、イスは 46% 残存しており、完全に抑制されたとは言いがたい。そこで  $25 \mu\text{g}$ 、40分の処理を行ったところ、反応性はそれぞれ 17% と 38% となり、良好な結果が得られた。Stiff<sup>9)</sup>らは岩本ら<sup>9)</sup>の方法よりも低濃度で行っており、今回の著者らの結果とは一致しない。これは製剤の違いによるものかもしれない。さらにこれよりも高濃度で行えば、完全に反応性を抑制することも可能と考えられるが、培養中に Effector cell の抑制を来す可能性もあり、今回行った程度の処理が適当と思われる。

添加  $^3\text{H}$ -チミジン量は、今回  $0.4 \mu\text{Ci}/\text{well}$  と  $0.8 \mu\text{Ci}/\text{well}$  の2濃度について検討した。添加  $^3\text{H}$ -チミジンの量は報告によりさまざまである。本法の開発当時に比較して最近では  $^3\text{H}$ -チミジンの添加量は少なくなる傾向がある。これはシンチレーションカウンターの精度向上によるものではなからうか。

著者らの得たコントロール培養における至適細胞数およびマイトージェンの添加量は NAKANISHI ら<sup>9)</sup>の報告と一致する。これらの至適域はイスの状態によりかなり幅があるようである。しかし、今回決定した細胞濃度、マイトージェン量で、その反応性を誤って判定することはなかった。また、マイトージェンに対する反応性は、KRISTENSEN<sup>9)</sup>らや、TAYLOR<sup>10)</sup>らの報告とよく類似していた。すなわち、イスは両者に差はなかったが、ネコは、PHA に比べて ConA に対する反応性の方が高かった。従って、どちらか一方のマイトージェンを使って判定する場合には、ConA を使用の方が良いと考えられた。

採血時の抗凝固法は、脱線血を使用するのが望ましいと思われた。なぜなら、ヘパリン処理で採血したネコ血液はリンパ球分離過程の洗浄中にフィブリンの析出をみることが多々あり、リンパ球の回収は不可能となる。また、保存剤が入っていないヘパリン Na を用いても MLC 反応性に悪影響が出るという報告<sup>9)</sup>もある。このようなことから、操作の簡略化の点ではヘパリン処理血の方がよいが、培養細胞にとっては脱線血を用いる方が

よいと思われた。

本論文の要は第 102 回日本獣医学会に発表した。

謝辞: 稿を終るにあたり, 本実験に対し終始, 御指導をいただいた日本医科大学微生物学免疫学教室の野呂瀬嘉彦先生に深謝します。また多大なる協力を頂いた第 1 外科学教室の各位にお礼申し上げます。

### 文 献

- 1) BAIN, B., and LOWENSTEIN, L. (1964). Genetic studies on the mixed leukocyte reaction. *Science*, 145, 1315.
- 2) GOLDMANN, S. F., and FLAD, H. D. (1975). Histocompatibility Testing in dogs. 1. A semi-micro mixed lymphocyte culture (MLC) technique for histocompatibility matching in dogs. *Tissue Antigens*, 5, 145-154.
- 3) 岩本逸夫・河野陽一・笹月健彦 (1977). ヒト MLC 反応の標準操作法, 免疫実験操作法, II-9, 1963~1970.
- 4) KRISTENSEN, F., KRISTENSEN, B., and LAZARY, S. (1982). The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 3, 203-277.
- 5) 長野豊美 (1981). MLC に及ぼす因子. 移植, 16, 240~245.
- 6) NAKANISHI, A., AIMI, K., EJIMA, H., and KUROKAWA, K. (1986). Measurement of Blastogenesis of canine peripheral blood lymphocyte against PHA by glucose consumption test. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 48 (1), 53-60.
- 7) 岡部竜也・土屋達行 (1982). リンパ球培養検査: A. 培養方法と成績判定法. *Medical Technology*, 10 (8) 臨増, 793~801.
- 8) SPLITTER, G. A., EVERLITH, K. M., and USINGER, W. R. (1981). Bovine mixed lymphocyte response: Effect of selected parameters on cell response. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2, 215-232.
- 9) STIFF, M. I., and OLSEN, R. G. (1984). Feline one-way mixed lymphocyte reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 7, 1-9.
- 10) TAYLOR, D. W., and SIDDIQUI, W. A. (1977). Response of enriched population of feline T and B lymphocyte to mitogen stimulation. *Am. J. Vet. Res.*, 38 (12),
- 11) WOLFE, J. H., HASKINS, M. E., and ZMIJEWSKI, C. M. (1984). Mixed lymphocyte reactivity in cats. *Transplantation*, 37 (5), 509-513.

## Studies of Mixed Lymphocyte Culture Technique in Cats and Dogs

Akira MASUNAGA, Yoshimi HIBI, Hiroko MATSUNO,  
Hiroyasu EJIMA and Kazuo KUROKAWA  
Kazuhiro Shichinohe\* and Kazumasa Nakama\*

First Department of Surgery, Nippon Veterinary and Zootechnical College, Tokyo

\*Department of Laboratory Animal Science, Nippon Medical School, Tokyo

### ABSTRACT

The One-Way Mixed Lymphocyte Culture (MLC) condition was performed by a microtechnique assay for cats and dogs.

Selected parameters of the MLC were examined to assess their influences. The findings indicate that maximal MLC response was present at days 7 with  $2 \times 10^5$  responder to  $2 \times 10^5$  stimulator cells per well and stimulator cells treated by  $25 \mu\text{g}/2 \times 10^6$  cells/ml Mitomycin-C at 40 minutes for inhibition of blastogenesis. During the final 18 hours of incubation  $0.8 \mu\text{Ci}/\text{well}$  of  $^3\text{H}$ -thymidine was added. Cell was collected on glassfiber filter paper with a semiautomatic cell harvester and assayed for radioactivity by liquid scintillation. Each sample was counted for count per minute (cpm) of triplicate wells.

Only Stimulator and Responder cells were performed stimulation and nonstimulation culture against PHA and Con-A. Optimum conditions of control culture were  $2 \times 10^5/\text{well}$  cells and  $5 \sim 10 \mu\text{g}/\text{well}$  PHA concentration,  $8 \sim 16 \mu\text{g}/\text{well}$  Con-A concentration. Responsibility of cat lymphocytes against Con-A was bigger than that against PHA.

**Key words:** Lymphocyte, MLC, Dog and Cat.

Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll., No. 35, 87~91, 1986.