

カバーガラスを利用した犬好中球の簡易分離法

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	伊藤, 直之 伊藤, さや子
巻/号	45巻3号
掲載ページ	p. 187-189
発行年月	1992年3月

カバーガラスを利用した犬好中球の簡易分離法

伊藤直之 伊藤さや子

かもめ獣医科医院（八戸市大久保字大塚 17-396, 〒031）

（平成3年6月26日受付・平成3年11月15日受理）

Simple Method for Isolation of Canine Neutrophils Using a Coverslip
 NAOYUKI ITOH and SAYAKO ITOH (Kamome Veterinary Clinic, Ootsuka, Ookubo,
 Hachinohe, Aomori 031)

SUMMARY

A simple method for isolation of canine neutrophils by means of a coverslip was applied to fifteen clinically healthy dogs. The principle of this method is application of neutrophil adherence to a glass surface. The outline of this method consists of the following procedure:

1. Peripheral blood is dropped on a coverslip.
2. Incubation for some minutes at 37°C.
3. Coverslip is rinsed in a physiological saline solution to remove the excess blood.
4. Microscopical examination after staining.

The almost pure canine neutrophils, including viable cells of $99.2 \pm 1.9\%$ were obtained at a 20 minute incubation period. The reproducibility of the result was also satisfactory under this condition.

—Key Words : dog, neutrophil, simple isolation method.

-----J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 45, 187~190 (1992)

要 約

好中球のガラス面への粘着能力を応用して、カバーガラスに粘着させることにより犬好中球を簡便に分離する方法について15頭の犬を用いて検討した。

その結果、末梢血液をカバーガラスに滴下し、37°Cで20分間インキュベーションすることによりほぼ純粋で一定した数の好中球が粘着し、分離することができた。また、3頭の犬を用いて行った再現性の検討でも良好な結果が得られた。—キーワード：犬、好中球、簡易分離法。

-----日獣会誌 45, 187~190 (1992)

血液細胞の中で、微生物の殺滅や異物の除去に重要な役割を果たしている好中球^{13, 16)}の機能を *in vitro* で検索するうえで、末梢血液からほぼ純粋に好中球を分離することが必要とされる。末梢血液からの好中球の分離方法としては密度勾配遠心法^{2, 3, 5, 8, 9, 15)}、沈降速度法^{10, 12)}、赤血球溶解法^{4, 14)}（低張液処理法）および粘着法¹⁾等が単独で、あるいはいくつかの方法の併用で応用されている。

好中球のガラス面への粘着能力¹⁴⁾を応用した GIFFORD と MALAWISTA⁶⁾ によるカバーガラスを用いての好中球の分離方法は特別な器具・器材を必要とせず操作も簡単であることから、日常の臨床検査の中で犬好中球の細胞機能を検索する際に有用で、すでに中瀬ら¹¹⁾により犬の Nitroblue Tetrazolium (NBT) 還元試験に応用されている。しかし、カバーガラスを用いて犬好中球を分離する際のインキュベーション時間やカバーガラスに粘着す

る細胞の数、粘着細胞における生細胞の割合、粘着細胞に占める好中球の割合、さらには再現性に関する検討はなされていないことから、今回これらの事項について検討した。

材料および方法

供試犬

犬好中球をガラス面に粘着させる際のインキュベーション時間の検討に用いたのは7カ月齢から10歳齢の臨床的に健康な犬15頭から得た血液である。さらに、この実験結果から適当と考えたインキュベーション時間での再現性を臨床的に健康な5カ月齢から8歳齢の犬3頭(A, B, C)の血液を用いて検討した。

採血は橈側皮静脈より行い、血液1mlにつき20単位のヘパリンと十分に混合した後、直ちに実験に使用した。

好中球のガラス面への粘着

犬好中球を粘着させるために使用したのは日常の臨床検査で汎用されている大きさ 18×18mm, 厚さ 0.12~0.17mm のカバーガラスである。ただし、製品の相違による成績のばらつきを避けるため、同一メーカーのものを使用した (Matsunami Micro Coverglass)。

血液 25μl をカバーガラス上で直径 10mm の円形に滴下し、乾燥を防ぐため湿潤室に入れ 37°C で一定時間インキュベーションし好中球を粘着させた。なお、1つのインキュベーション時間につき血液をのせたカバーガラスを 3枚用意した。

粘着操作終了後、3枚のカバーガラスを取り出し粘着好中球を剥さないように静かに生理食塩液を注ぎ、余分な血液を洗い流した。次に、カバーガラスに付着している生理食塩液を濾紙で吸い取り、1枚は粘着細胞中の生細胞の割合を、そして他の 2枚は粘着細胞数とそれらに占める好中球の割合を算定するためにそれぞれ使用した。

生細胞の割合

カバーガラスに粘着した細胞における生細胞の割合はトリパンブルーの取り込みを指標として算定した。すなわち、洗浄と濾紙による生理食塩液の吸い取り操作を終了した後、直ちにカバーガラスの細胞粘着面がスライドガラス上に 1滴用意しておいた 0.2% トリパンブルー溶液 (Trypan Blue Stain 0.4%, Sigma Chem. Co., St.

Louis, USA. と生理食塩液を等量混合したもの) と接するようにのせ、室温で 5分間放置した後、顕微鏡下で粘着している細胞 100 個を数え、トリパンブルーの取り込みが認められる細胞を死細胞として生細胞の割合を%で表した。

粘着細胞数と好中球の割合

2枚のカバーガラスに粘着した細胞にはライト・ギムザ染色を行い、乾燥後スライドガラス上に細胞粘着面上になるように固定した。細胞が均一に付着している箇所を 400 倍下で鏡検し、カバーガラス 1枚につき 5視野、カバーガラス 2枚で合計 10 視野内における細胞数を数え、これを粘着細胞数として表した。

好中球の割合は粘着細胞 100 個を観察し、それらに占める形態学的に好中球と考えられる細胞の数を%で表した。

インキュベーション時間の検討

犬好中球をカバーガラスに粘着させる際の 37°C でのインキュベーション時間に関しては 5, 10, 20, 40, 60, 90 および 120 分について検討した。

再現性の検討

適当と考えたインキュベーション時間での再現性を 3頭の犬の血液について検討した。すなわち、同一の血液からそれぞれ 20枚のカバーガラスに細胞を粘着させ、カバーガラス 2枚で 10 視野の細胞数を数えて 1回の測定とし、10回の測定における粘着細胞数および好中球の割合について変動係数 (C. V.) を求めた。

統計処理

成績は平均値±標準偏差 (S. D.) で表し、各平均値間の差の有意性は Student の t-test を用いて検定した。

成績

インキュベーション時間

インキュベーション時間の違いによる粘着細胞数、好中球および生細胞数の割合の変化を表 1 に示した。

粘着細胞数は 40 分まではインキュベーション時間に伴って増加した。しかし、20 分以上のインキュベーション時間では各平均値間に有意差が認められなかった (図 1)。また、40 分以上のインキュベーション時間では

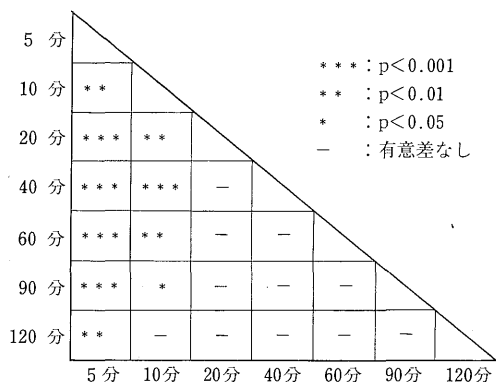


図 1 インキュベーション時間による粘着細胞数の比較

表 1 インキュベーション時間と粘着細胞数、好中球および生細胞の割合の関係

		インキュベーション時間(分)						
		5	10	20	40	60	90	120
粘着細胞数 (個)	平均	117.5	176.7	274.2	330.3	298.5	261.3	262.9
	S. D.	43.6	62.3	85.0	113.2	140.1	138.8	176.2
好中球の割合 (%)	平均	92.7	91.1	92.1	89.8	88.7	85.6	84.7
	S. D.	3.1	3.7	3.0	5.5	5.8	6.1	8.4
生細胞の割合 (%)	平均	99.3	99.1	99.2	98.0	98.3	96.9	97.3
	S. D.	1.5	1.2	1.9	4.8	4.6	4.5	3.6

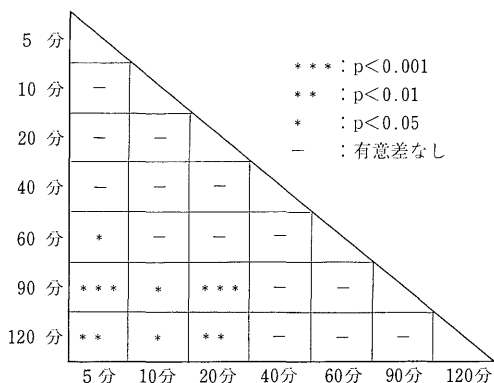


図2 インキュベーション時間による好中球の割合の比較

粘着細胞数に大きなばらつきが認められた(表1).

インキュベーション時間40分まで粘着細胞に占める好中球の割合に有意差は認められなかった(図2)が、60分以上になるとそれまでの値より減少した。

生細胞の割合はインキュベーション時間20分まではほぼ一定であり、その後減少する傾向が認められた。しかし、いずれのインキュベーション時間においても生細胞比率の平均値間に有意差は認められなかった。

再現性

以上の成績から、インキュベーション時間は20分が適当と考えた。3頭の犬(A, B, C)の血液を用いてこのインキュベーション時間における成績の再現性を検討し表2に示す結果を得た。

A, B, Cいずれの血液においても粘着細胞数および好中球の割合の変動係数はそれぞれ4.5~5.8%, 1.3~2.3%と小さかった。

考察

GIFFORDとMALAWISTA⁶⁾によるカバーグラスを用いた好中球の分離方法はその簡便さから日常の臨床検査の中で犬好中球の細胞機能を検索する際に有用性が高いと考えられる。しかし、実際にこの方法を応用して犬好中球の分離をする際の基礎的な事項についての検討がなされていないことから、今回はインキュベーション時間について検討した。

犬好中球をカバーグラスに粘着させるためのインキュベーション時間は粘着細胞数、粘着細胞に占める好中球の割合、および生細胞の割合から20分が最適と考えた。

3頭の犬の血液を用いてこのインキュベーション時間で得られた粘着細胞数およびそれらに占める好中球の割合の変動係数はいずれの犬においても小さく、再現性は良好であった。

以上のことから、犬好中球はその粘着能力を応用して

表2 粘着細胞数および好中球の割合の再現性

測定回数	検 体		
	A	B	C
1	247* (95) [#]	256 (95)	254 (97)
2	269 (98)	231 (96)	254 (96)
3	288 (96)	238 (95)	246 (96)
4	287 (95)	251 (95)	230 (94)
5	275 (96)	255 (94)	264 (94)
6	276 (97)	233 (92)	250 (95)
7	263 (92)	239 (94)	244 (92)
8	282 (94)	267 (94)	231 (92)
9	269 (93)	233 (93)	238 (95)
10	265 (91)	269 (96)	264 (95)
平均	272.1(94.7)	247.2(94.4)	247.5(94.6)
S. D.	12.4(2.2)	14.3(1.3)	12.1(1.6)
C. V. (%)	4.5(2.3)	5.8(1.3)	4.9(1.7)

*:粘着細胞数(個) #:好中球の割合(%)

末梢血液をカバーグラスに滴下し、37℃で20分間インキュベーションすることによりほぼ純粋で一定した数を分離できることが明かとなった。この方法の応用は、従来実施されているNBT還元試験^{8,11)}や貪食試験⁶⁾等定性的試験が中心になると思われる。しかし、今回の実験のように使用血液量と面積を定めて血液を滴下した後、細胞が均一に粘着している箇所を一定の倍率で鏡検し、一定の視野内における好中球数を数えることにより、GIGERら⁷⁾が活用しているような好中球の機能不全症における検査の1つである好中球粘着能の測定等の半定量的な検索へも応用が可能と思われる。

今回、原法⁶⁾では抗凝固剤を使用しないのに対し、採血後の取り扱いが容易であるヘパリン加血液を使用した。抗凝固剤が犬好中球の粘着能に及ぼす影響は明らかにされていないことから、今後検討の必要があると考える。

引用文献

- 1) BENNETT W. E. and COHN Z. A.: *J. Exp. Med.*, 123, 145~159 (1966).
- 2) BUUMAN W. A., VEGT P. A., GROENEWEGEN G., et al.: *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 3, 547~556 (1982).
- 3) CHAMBERS W. H., TAYLOR J. R. and KLESIOUS P. H.: *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 5, 197~202 (1983~84).
- 4) CHODIRKER W. B., BOCK G. N. and VAUGHAN J. H.: *J. Lab. Clin. Med.*, 71, 9~19 (1968).
- 5) DOOLEY D. C., SIMPSON, J. F. and MERYMEN H. T.: *Exp. Hematol.*, 10, 591~599 (1982).
- 6) GIFFORD R. H. and MALAWISTA S. E.: *J. Lab. Clin. Med.*, 75, 511~519 (1970).
- 7) GIGER U., BOXER L. A., SIMPSON P. J., et al.: *Blood.*, 69, 1622~1630 (1987).
- 8) GMELIG-MEYLLIG F. and WALDMAN T. A.: *J. Immunol. Meth.*, 33, 1~9 (1980).