

調査・技術報告

## アカゲザルのリンパ球サブセット解析における リンパ球分離法の比較検討

小倉 剛<sup>1) 2)</sup>・杉本哲朗<sup>2)</sup>・野口規子<sup>2)</sup>・川島由次<sup>1)</sup>・寺尾恵治<sup>3)</sup>

- 1) 琉球大学農学部生産環境学科亜熱帯動物学講座
- 2) 中外製薬株式会社安全性研究所
- 3) 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター

### はじめに

フローサイトメトリー (FACS) によるリンパ球サブセット解析は、抗ヒト白血球抗体の開発、量販化とともに、現在では免疫学や病理学等の分野で不可欠な検査技術のひとつとなっている。このような FACS の普及に伴い、ヒト臨床領域におけるリンパ球サブセット解析法については、米国臨床検査標準協議会の暫定的ガイドライン H42-T や国内の研究者ら (高橋, 1985; 巽, 1987, 1990, 1993) によって、採血法、抗体パネルの選択ならびにリンパ球分離法など多くの標準化が提案されてきた。

一方、霊長類を用いた医科学研究分野においても、リンパ球のサブセット解析や機能解析のために、ヒトの臨床領域で開発された試薬、抗体ならびにリンパ球分離法を用いた FACS 解析が行われている (Terao *et al.*, 1988; 寺尾, 1990; Bleavins *et al.*, 1993)。ヒトの臨床領域で開発された実験系をサル類に応用する際の問題点のひとつは、用いたヒト用抗体が認識するエピトープの機能がサル類とヒトとで同一か否かという点である。これについては、特にマカク属のサル類を中心に多くの研究が行われてきた (村山, 1986; Ahmed-Ansari *et al.*, 1989; Reimann *et al.*, 1994)。しかし、FACS 解析の際のリンパ球分離

法については、分離法の違いによる解析結果の比較やヒトの実験系をサル類に応用するための工夫など、方法論に焦点を当てた検討が行われていないのが現状である。

さらに、我々はこれまでにヒトのリンパ球分離用試薬を用いた比重遠心法では、アカゲザル (*Macaca mulatta*) やカニクイザル (*Macaca fascicularis*) のリンパ球分画に赤血球が混入することやリンパ球の回収率が低いことをしばしば経験している。このことは、ヒト用のリンパ球分離試薬と分離法がサル類の末梢血リンパ球分離に最適な方法であるか否かの問題を示している。すなわち、ヒト用の分離法では、比較的比重の大きい特定のリンパ球集団が失われ、回収されたリンパ球を用いたサブセット解析に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで今回、医用霊長類として多用されているアカゲザルを用いて、各々リンパ球分離法における FACS 解析結果、赤血球残存率およびリンパ球回収率を比較した。

### 材料および方法

#### 1. 使用動物と採血法:

末梢血は、中外製薬 (株) 安全性研究所ならびに (株) CSK リサーチパークで飼育中の推定年齢 5~6 歳齢のアカゲザル (雌雄計 12 例) から各

個体につき 6 ml を採血した。採血は、午前 10 時～12 時の間に塩酸ケタミンの筋肉内投与による麻酔下で、200IU のヘパリン（ノボ・ノルディスク）を加えた注射筒を用いて行った。

## 2. リンパ球分離法：

今回の実験では、比重遠心法に対する 2 種類の全血法（全血法 A および全血法 B）、ならびに比重遠心法に対する Dextran 併用比重遠心法の主要リンパ球サブセットレベル、赤血球残存率およびリンパ球回収率を比較した。また、全血法では 2 種類の溶血処理（蒸留水添加法および溶血剤添加法）における主要リンパ球サブセットレベル、赤血球残存率およびリンパ球回収率を比較した。

比重遠心法では、ヘパリン加末梢血 2 ml をリン酸緩衝液（pH7.6；PBS）で 5 倍希釈し、リンパ球分離液（Ficoll-Paque； $d=1.077$ ；Pharmacia）3 ml に重層後、400g で 30 分遠心し、リンパ球分画を回収した。回収したリンパ球分画は、PBS で 2 回洗浄し、2% ウシ胎児血清と 0.1%  $\text{NaN}_3$  を含む RPMI-1640 培地（FACS 培地）に最終細胞濃度が  $2 \times 10^6/\text{ml}$  となるよう浮遊させた。

全血法 A では、ヘパリン加血 100  $\mu\text{l}$  に蒸留水 5 ml を添加して低張処理により溶血をおこなった後、2 倍濃度の PBS を 5 ml 加えて等張とした。PBS で一回洗浄した細胞は、FACS 培地に最終細胞濃度が  $2 \times 10^6/\text{ml}$  となるよう浮遊させた。

全血法 B では、後述する方法でモノクローナル抗体を添加した後、FACS 培地で 2 回洗浄し、5 ml の蒸留水で溶血処理をおこなった。

また、全血法での溶血処理の違いによる比較を行うため、蒸留水での溶血法と平行して、0.826%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ （関東化学）を基剤とした溶血剤（久下，1990）による溶血法も併せて行った。全血法 A では血液 100  $\mu\text{l}$  に 5 ml の PBS を加え、270 g で 10 分間遠心後、ペレットに溶血剤を 5 ml 加え、室温に 10 分間放置して溶血処理を行った。全血法 B では、血液 100  $\mu\text{l}$  に抗体を反応させた後、PBS で 1 回遠心洗浄して得たペレットに溶血剤を 5 ml 加えて溶血処理を行った。

Dextran 併用比重遠心法では、2 ml のヘパリ

ン加血に 1 ml の 5%（w/v）Dextran（Dextran T-2000，Pharmacia）を含む PBS を加え、恒温槽内で 37°C，30 分加温し赤血球を沈殿させた。その後、上清を回収し、8 ml の PBS に浮遊させ、比重遠心法と同様に 3 ml のリンパ球分離液に重層し、遠心後のリンパ球分画を回収した。

## 3. モノクローナル抗体とリンパ球サブセットレベルの測定：

リンパ球サブセットの検出は、アカゲザルのリンパ球との交叉反応性が確認されている（Reimann *et al.*, 1994）抗ヒト白血球抗体のうち、PE 標識抗 CD4（Leu-3a）と FITC 標識抗 CD8（Leu-2a）および PE-標識抗 CD20（Leu-16）と FITC 標識抗 CD16（Leu-11a）抗体とをそれぞれ組み合わせた 2 色法染色をおこなった。これらの抗体はすべて Becton-Dickinson から市販されている抗体である。用いた 2 種類の抗体の組み合わせにより、helper / inducer T cell（CD4），suppressor / killer T cell（CD8），pan-B cell（CD20）および natural killer cell（CD16）の 4 種類の主要リンパ球サブセットが定量可能となる。

前述の分離法でそれぞれ回収した細胞浮遊液 100  $\mu\text{l}$  に 10  $\mu\text{l}$  のモノクローナル抗体を添加し、氷上で 30 分反応させた。反応後、細胞は FACS 培地で 2 回遠心洗浄し、200  $\mu\text{l}$  の 2% Paraformaldehyde（関東化学）で固定した。

リンパ球サブセットレベルは、フローサイトメーター（FACScan: Becton-Dickinson）を用いてそれぞれの抗体に陽性の細胞数を計測し、比率を算出した。

## 4. 赤血球残存率の測定法：

各分離法で分離した細胞浮遊液それぞれ 100  $\mu\text{l}$  に、赤血球溶血試薬（クイックライザー II；Sysmex）を添加し、残存赤血球を溶血させた後、血色素量を血液自動血球計数装置（CC-780；Sysmex）にて測定し、赤血球残存量とした。また同時にリンパ球分離処理前の全血中の血色素量を測定し、赤血球残存率を求めた。

**Table 1** Major lymphocyte subset levels, erythrocyte contamination and lymphocyte recovery among three different isolation methods.

	density gradient centrifugal method	whole blood method	
		A	B
Lymphocyte subpopulations			
CD4 <sup>+</sup> cells (%)	36.9±8.1	37.6±10.3	43.4±9.3 **
CD8 <sup>+</sup> cells (%)	40.1±8.7	41.8±7.4	41.5±8.9
CD16 <sup>+</sup> cells (%)	10.7±6.7	11.1±7.4	0.2±0.2 **
CD20 <sup>+</sup> cells (%)	9.8±5.6	9.1±4.5	8.5±4.1
Remain erythrocyte (%)	0.72±0.31	3.45±0.61 **	3.60±1.23 **
Lymphocyte recovery (%)	76.2±12.0	81.7±11.7	72.2±12.1

Density gradient centrifugal method: diluted blood was centrifuged on the Ficoll at 400 g. for 30 min. Whole blood method A: hemolysing RBC in whole blood by distilled water before staining lymphocytes with monoclonal antibody. Whole blood method B: hemolysing RBC in whole blood by distilled water after staining lymphocytes with monoclonal antibody. Values are expressed by mean ± SD of 12 monkeys. \*\*P<0.01 as compared with results obtained in density gradient centrifugal method.

#### 5. リンパ球回収率の測定法：

各分離法で回収した白血球数を血液自動血球計数装置にて測定し、同時に作製したライト染色塗抹標本のリンパ球比率を白血球数に乗じて回収リンパ球数を算出した。リンパ球分離前の全血中の全リンパ球数を同様の方法で算出し、回収されたリンパ球数を全血中の全リンパ球数で除してリンパ球回収率を求めた。

#### 6. 統計解析法：

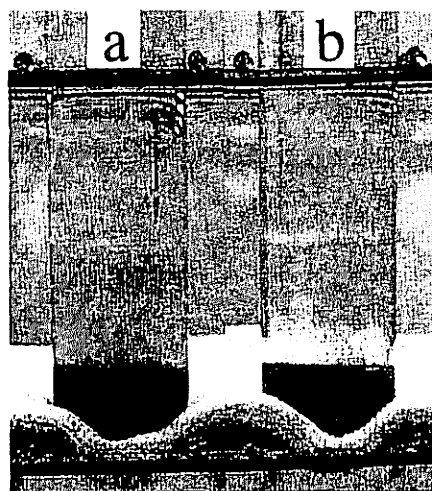
異なる分離法での結果の比較は、Paired-t testを用いて統計学的に比較した。

### 結 果

#### 1. 比重遠心法と全血法との比較：

比重遠心法と全血法（全血法 A、全血法 B）で回収したリンパ球サブセットレベルを Table 1 に示した。今回測定した 4 種の主要サブセットレベルには、比重遠心法と全血法 A との間に差はなかった。また、抗体反応後に溶血処置を行った全血法 B では CD16<sup>+</sup>細胞がほとんど検出されなかった。

比重遠心法で回収されたリンパ球分画中の赤血



**Fig. 1** Red blood cells contamination in lymphocyte position (a) and no contamination (b) after density gradient centrifuge using Ficoll.

球残存率は、全血法 A および全血法 B よりも低い値 (P<0.01) であった (Table 1)。しかし、個体によっては赤血球が良好に分離できない場合 (残存率 1.49%) があった (Fig. 1)。

Table 1 に示すように、リンパ球の回収率には 3 つの方法で有意な差は認められなかった。しか

Table 2 Major lymphocyte subset levels, erythrocyte contamination and lymphocyte recovery in the sample obtained by the density gradient centrifugal method with or without sedimentation of RBC with dextran.

	density gradient centrifugal method	dextran/density gradient centrifugal method
Lymphocyte subpopulations		
CD4 <sup>+</sup> cells (%)	33.1±2.3	35.1±1.0
CD8 <sup>+</sup> cells (%)	43.4±3.7	41.1±3.4
CD16 <sup>+</sup> cells (%)	15.7±8.0	13.4±6.1
CD20 <sup>+</sup> cells (%)	8.7±2.8	10.1±3.3
Remain erythrocyte (%)	2.22±0.64	0.88±0.34*
Lymphocyte recovery (%)	61.3±8.4	42.0±5.8**

Density gradient centrifugal method: See the footnote of Table 1. Dextran / density gradient centrifugal method: density gradient centrifuge after sedimentation of RBC using 5% dextran. Values are expressed by mean ± SD of 6 monkeys.

し比重遠心法に比較して、全血法 A での回収率がわずかに高く、全血法 B での回収率が低い傾向がみられた。

## 2. 比重遠心法と Dextran 併用比重遠心法との比較:

比重遠心法と Dextran 併用比重遠心法との比較では、調べた 4 種の主要サブセットレベルの値に差はみられなかった (Table 2)。一方、赤血球残存量は併用法の方が比重遠心法に比べて低い値 ( $P<0.05$ ) であった。また、リンパ球回収率も Dextran 併用比重遠心法の方が低い値 ( $P<0.01$ ) となった。

## 3. 全血法の溶血処理の違いによる差:

Fig. 2 に 2 種類の溶血処理によるリンパ球回収率を示した。全血法 A および全血法 B とともに、溶血処理に溶血剤を用いた方が、蒸留水を用いた場合よりも高い回収率が得られた。特に全血法 B では溶血剤を用いた場合に有意 ( $P<0.05$ ) に高い回収率が得られた。一方、主要リンパ球サブセットレベルおよび赤血球残存量には、溶血処理法の違いによる差はみられなかった。

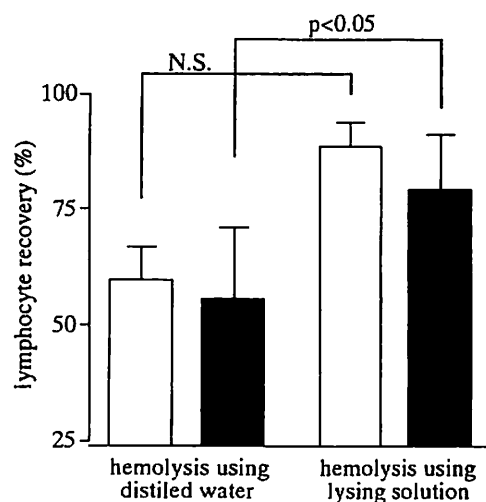


Fig. 2 Comparison of lymphocyte recovery rate between two different hemolysing methods. See the footnote of Table 1. Open column with bar shows mean ± SD ( $n = 3$ ) in the case of staining lymphocyte with monoclonal antibody after hemolysing red blood cells. Closed column with bar shows mean ± SD ( $n = 3$ ) in the case of staining lymphocyte with monoclonal antibody before hemolysing red blood cells.

## 考 察

### 1. 比重遠心法と全血法との比較:

坂東ら (1991) は、ヒト末梢血リンパ球の

FACS 解析において、比重遠心法と全血法では結果が異なることから、この点を十分に考慮して解析する必要性を指摘している。また、ヒトの臨床領域では、比重遠心法でリンパ球サブセットレベルを解析した場合に T リンパ球のサブポピュレーションが損失しやすいことが指摘されている (Iwatani *et al.*, 1982; Renzi & Ginns, 1987)。今回の実験ではこの点を考慮し、まず始めに比重 1.077 の分離剤を用いた比重遠心法と 2 種類の全血法で回収したリンパ球のサブセットレベルを比較し、比重遠心操作によって特定のサブセットが損失するかどうかを検討した。その結果、CD4, CD8, CD20 および CD16 の 4 種の主要リンパ球サブセットレベルには比重遠心法と全血法 A との間に差はみられず、ヒトの場合に懸念されている特定のサブセットの損失は生じないことが確認された。従って、アカゲザルにおいて、リンパ球に物理的な影響を与えずに分離を行う必要がある場合、例えばアポトーシス細胞の検出やセルソーティングを行う場合は物理的ダメージの少ない比重遠心によってリンパ球を分離することが必要になるが、ヒト用に調整された比重 1.077 の分離剤をアカゲザルに適応しても問題ないと考えられた。また、赤血球の残存率については、比重遠心法で平均 1% 以下であり、比重 1.077 のリンパ球分離剤を用いることにより、アカゲザルの大半の個体でリンパ球と赤血球とを良好に分離することができた。おしなべた判断は難しいが、赤血球の残存の点からも比重 1.077 の分離剤で概ね良好に赤血球を分離できると判断できた。一方、大量の個体でリンパ球サブセットを日常的にスクリーニングする場合には、採血量が少なく血球分離操作が簡便な全血法 A が適していると考えられた。

抗体反応後に溶血処置を行った全血法 B では、CD16<sup>+</sup>細胞がほとんど検出されなかった。これは、ヒトにおける全血法でも同様で、血液に直接抗体を反応させた場合、血漿中の免疫グロブリンが細胞表面の IgG-Fc レセプターをブロックし (Perussia *et al.*, 1982)、IgG-Fc レセプターと Leu-11 抗体の結合が阻害されるために生じた結果と考えられている (Paoli *et al.*, 1984)。ヒト

NK 細胞の CD16 抗原に対する抗体として、Leu-11 や Leu-11a を用いる場合には、抗体を反応させる前にあらかじめ血球を PBS で 1~2 回洗浄する必要がある (平田, 1987; 酒井ほか, 1991)、アカゲザルにおいても全血法 B の手順でリンパ球 (白血球) を分離し、Leu-11a 抗体を用いる場合は、抗体反応前に血球を洗浄する必要がある。

## 2. 比重遠心法と Dextran 併用比重遠心法との比較:

比重遠心法では、リンパ球と赤血球を概ね良好に分離できたが、個体によっては、遠心後のリンパ球分画に赤血球が比較的多量に混入する例 (Fig. 1) もあった。また我々はこれまで、比重遠心法によってアカゲザルやカニクイザルのリンパ球を分離する際に、リンパ球分画に赤血球が顕著に混入することをしばしば経験している。このような場合、赤血球のリンパ球分画への混入を防ぐ方法として、あらかじめ Dextran を用いて大部分の赤血球を沈降除去した後、比重遠心操作でリンパ球を分離する Dextran 併用比重遠心法を用いることがある。今回得られた結果から、Dextran 併用比重遠心法は、比重遠心法に比べてリンパ球の回収率を低下させるが、特定のサブセットを損失させずに赤血球を効果的に除去できることが確認された。比重遠心操作で赤血球を除去しきれなかった場合は、大量の赤血球がフローサイトメーターに流入し、解析の対象となるリンパ球の数が相対的に少なくなるという問題がある。さらに、赤血球の混在したサンプルを FACS 解析する場合に、Scatter 画面上でのゲーティングによりリンパ球集団を赤血球集団から分離することが困難となる。このような場合には、FACS 解析前に、混在した赤血球をいかに除去するかが解析結果の信頼性の観点から重要なポイントとなる。従って、Dextran 併用比重遠心法は、リンパ球の回収率をある程度犠牲にしても赤血球の混入を防ぐ必要のある、比重の軽い幼弱な赤血球が多い個体 (特に新生児) やアカゲザルに比べて赤血球の混入が著しいカニクイザルのリンパ球分離の際に、赤血球の混在を防止する有効な方法であると

考えられた。

### 3. 全血法の溶血処理の違いによる差：

全血法でのリンパ球回収率は、比重遠心法よりも高いと考えられるが、今回の結果では比重遠心法とほぼ同程度の回収率であった。全血法においてリンパ球回収率が低下する原因としては、採血からサブセット測定までに行う細胞の洗浄操作による損失と溶血処理による細胞の損失が考えられる。そこで、蒸留水を用いた低張処理による溶血処理法と  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を基剤とした溶血剤による溶血処理法のリンパ球回収率を比較した。その結果、リンパ球回収率は溶血剤で溶血処理を行った場合に高い傾向が見られ、蒸留水による低張処理の過程でリンパ球が破壊される可能性が推測された。FACS 解析を目的とした全血法における溶血処理は、蒸留水の低張処理により行う方法よりも  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を基剤とする溶血剤を用いた方法の方が、溶血過程でのリンパ球への影響が低く、溶血操作も手技によりばらつくことが少ないという点で優れていると判断できた。

最後に、今回は比重遠心法によってリンパ球が比較的良好に分離されることが多いアカゲザルを用いて検討を行ったが、カニクイザルにおいては、アカゲザル以上に比重遠心による分離の困難さを経験している。Percoll の段階希釈法による検討では、カニクイザルの場合も比重 1.077 の分画においてリンパ球を顆粒球と赤血球から概ね分離できるが (Ogura *et al.*, 1995), 分離結果の良否のばらつきはアカゲザルよりも大きい印象があった。今後、これら非ヒト霊長類の血球の比重を動物の性や年齢さらには病態に応じて把握するなど、より詳細な検討が必要であると考えられた。

### 謝 辞

本研究を行うにあたり、様々な技術指導と御支援を戴いた、中外製薬 (株)・創薬第一研究所・富井靖志研究員、同・安全性研究所・小泉富彦研究員をはじめとする研究所員ならびに (株) CSK リサーチパーク・堤秀樹研究員に心より感謝する。

### 要 旨

サル類の末梢血リンパ球サブセットを解析する際のリンパ球分離法の妥当性を明らかにする目的で、Ficoll を用いた比重遠心法、染色前後に溶血処理をおこなう 2 種類の全血法、dextran 処理と比重遠心法との併用法の計 4 法を用いてアカゲザルのリンパ球分離を行い、末梢血リンパ球サブセットレベル、赤血球の残存率およびリンパ球回収率を比較した。得られた結果は以下のとおりである。

1. 4 種の主要リンパ球サブセットレベルには比重遠心法と溶血後に染色する全血法 A との間に差は認められなかった。このことから、ヒトで報告されている比重遠心操作の過程での特定のサブセットの消失は生じないと判断され、比重 1.077 の分離剤を用いた比重遠心法はアカゲザルに適応可能と考えられる。

2. 染色後に溶血処理を行う全血法 B では Leu-11a 抗体で検出される CD16 抗原陽性細胞がほとんど検出されなかった。原因として、染色時に血漿中の IgG による  $\text{Fc}\gamma$  レセプターのブロックが生じた可能性が考えられ、Leu-11a 抗体を用いる場合は、抗体反応前に血球を洗浄する必要がある。

3. Dextran 処理と比重遠心の併用法はリンパ球分画への赤血球の混在を効果的に防止するが、リンパ球の回収率は低下した。しかしながら、特定のサブセットが低下することがないことから、アカゲザルのリンパ球分離法としては有効な方法である。

4.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を基剤とする溶血剤を用いた溶血処理は、蒸留水による溶血処理に比べてリンパ球回収率が高く、安定して良好な溶血が行える処置と判断される。

### 引用文献

- Ahmed-Ansari A, Brodie AR, Fultz PN, Anderson DC, Sell KW, McIure HM. 1989 : Flow microfluorometric analysis of peripheral blood mononuclear cells from nonhuman primates: correlation of phenotype with immune function. *Am. J. Primatol.* 17: 107-131.  
坂東明美, 折田登志子, 松本信也, 米山彰子, 北村聖,

- 中原一彦, 大久保昭行 1991: フローサイトメトリーを用いた比重遠心法と全血法によるリンパ球分画の比較検討. 臨床病理 39: 278-282.
- Bleavins MR, Brott DA, Alvey JD, Iglesia FA 1993: Flow cytometric characterization of lymphocyte subpopulations in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Vet. Immunol. Immunopathol. 37: 1-13.
- 平田稔 1987: Leullia 陽性リンパ球測定における洗浄全血球法と分離リンパ球との比較. 臨床検査 31: 1125-1128.
- Iwatani Y, Amino N, Mori H, Asari S, Ina K, Ennyu K, Miyai K 1982: Effects of various isolation methods for human peripheral lymphocytes on T cell subsets determined in a fluorescence activated cell sorter (FACS), and demonstration of a sex difference of suppressor/cytotoxic T cells. J. Immunol. Methods 54: 31-42.
- 久下栄 1990: 浮遊細胞からの試料作製法—リンパ球を中心として. 臨床検査 34: 645-649.
- 村山裕一 1986: 白血球表面抗原からみた霊長類進化. 霊長類研究 2: 127-136.
- Ogura G, Tamura H, Usami M, Terao K 1995: Standardization of density gradient centrifugal method for lymphocyte surface marker analysis with flow-cytometry in *Cynomolgus* monkeys. Proceedings of the 22th annual meeting of the Japanese society of toxicological sciences. Jpn. J. Toxicol. Sci. 20: 502.
- Paoli PD, Reitano M, Battistin S, Castiglia C, Santini G 1984: Enumeration of human lymphocyte subsets by monoclonal antibodies and flow cytometry: a comparative study using whole blood or mononuclear cells separated by density gradient centrifugation. J. Immunol. Methods 72: 349-353.
- Reimann KA, Waite BCD, Lee-Parritz DE, Lin W, Uchanska-Ziegler B, O'Connell MJ, Letvin NL 1994: Use of human leukocyte-specific monoclonal antibodies for clinically immunophenotyping lymphocytes of Rhesus monkeys. Cytometry 17: 102-108.
- Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G 1982: Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking FcR functions. J. Immunol. 130: 2133-2141.
- Renzi P, Ginns LC 1987: Analysis of T cell subsets in normal adults. Comparison of whole blood lysis technique to Ficoll-Hypaque separation by flow cytometry. J. Immunol. Methods 98: 53-56.
- 酒井寛, 岩谷泰之, 手登根稔, 片山善章 1991: NK cell を識別するモノクローナル抗体の比較検討. 衛生検査 38: 701-705.
- 高橋浩造 1985: Flow cytometry を用いた蛍光標識モノクローナル抗体染色陽性細胞率の算定方法. 最新医学 40: 45-48.
- 巽典之 1987: リンパ球サブセット及び白血病タイプイングにおけるモノクローナル抗体の選択. 臨床免疫 19: 50-58.
- 巽典之 1990: リンパ球サブセット測定フローサイトメトリー実施におけるガイドライン. 大臨技会報 143: 34-41.
- 巽典之 1993: フローサイトメトリーの標準化. 臨床病理 41: 982-989.
- Terao K, Rose LM, Sackett GP, Clark EA 1988: Development of lymphocyte subsets in Pigtailed Macaques. Hum. Immunol. 21: 33-48.
- 寺尾恵治 1990: サル類の免疫系の初期発達と加齢変化. 実験動物 39: 163-167.

## (Summary)

## Comparison of Four Lymphocyte Isolation Methods and Two Hemolysis Methods for Immuno Flow Cytometric Analysis of Peripheral Lymphocyte Subsets in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*)

Go OGURA<sup>1)2)</sup>, Tetsuro SUGIMOTO<sup>2)</sup>, Noriko NOGUCHI<sup>2)</sup>,  
Yoshitsugu KAWASHIMA<sup>1)</sup> and Keiji TERAOKA<sup>3)</sup>

1) *Laboratory of Subtropical Zoology, Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus*

2) *Safety Assessment Laboratory, Chugai Pharmaceutical Co., LTD*

3) *Tsukuba Primate Center, National Institute of Infectious Diseases*

Determination of peripheral lymphocyte subset levels becomes important method for analyzing immune function in nonhuman primates. However, It has been well-known that the separation of peripheral lymphocytes by density gradient centrifuge is relatively difficult in nonhuman primates, because the gravity of red blood cells (RBC) varies among individuals. The purpose of this paper is to compare the major lymphocyte subset levels, the recovery rate of lymphocyte and the contamination of RBC in lymphocyte fraction among four different methods of lymphocyte separation, Method-1: conventional density gradient centrifuge using Ficoll, Method-2: density gradient centrifuge after sedimentation of RBC using 5% dextran, Method-3: whole blood method A; hemolysis before staining lymphocyte, and Method-4: whole blood method B; hemolysis after staining lymphocytes. The lymphocyte recovery rate as well as RBC contamination were also compared between two different hemolysis methods, 1) hemolysis with distilled water and 2) hemolysis with NH<sub>4</sub>Cl

solution. The results obtained are as follows.

I. There was no difference in lymphocyte subset levels between Method-1 and Method-3, indicating that loss of specific lymphocyte subset(s) did not occur during density gradient centrifuge in method-1. The density gradient centrifugal method using Ficoll ( $d=1.077$ ) was able to seem to adapt for rhesus monkeys.

II. CD16-positive lymphocytes could not be detected by method-4. It might be necessary to wash cells to remove IgG in sample before staining with anti-CD16, Leu-11a monoclonal antibody in the case of applying Method-4 to analyzing CD16-positive NK cells.

III. Method-2 was effective to remove RBC from lymphocyte fraction, but the lymphocyte recovery rate was significantly lower as compared to Method-1.

VI. The lymphocyte recovery rate was significantly higher when contaminated RBC were removed by NH<sub>4</sub>Cl solution as compared when RBC were removed by distilled water.

小倉 剛 琉球大学農学部生産環境学科亜熱帯動物学講座  
〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町字千原一番地

Go OGURA Laboratory of Subtropical Zoology, Department of Environmental Science and Technology,  
Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus  
1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan  
e-mail: ogurago@agr.u-ryukyu.ac.jp