

◎原 著

JE-6B rotor (Beckman)による末梢血白血球分離の検討

周藤 眞康, 松原扶美恵, 荒木 洋行
貴谷 光, 谷崎 勝朗

岡山大学医学部三朝分院内科

要旨: JE-6B rotor (Beckman)を用いて counterflow centrifugation elutriation による末梢血白血球の分離を試み, 若干の検討を加えた。1. flow rate が低い場合はリンパ球が大部分を占めたが, flow rate の増加とともに頻度は減少した。2. flow rate の増加とともに, 好塩基球の頻度が増加し, 9-10ml/min では頻度のみでなく細胞数の増加も認められた。各 fraction におけるヒスタミン含有量も同様の傾向が認められた。3. 好中球の peak は flow rate 13ml/min であり以後減少を示した。4. 最終段階で好酸球が増加傾向を示し Chamber 内で最も高値を示した。以上の結果より counterflow centrifugation elutriation による末梢血白血球細胞分離は, in vitro における実験に有用な手段である可能性が示唆された。

キーワード: 逆流負荷遠心法, JE-6B ローター, 細胞分離, 好塩基球

Counterflow centrifugation elutriation, JE-6B rotor, Cell separation, Basophils

緒 言

末梢血白血球の細胞分離の方法はいろいろ行われているが¹⁾⁻⁴⁾, cell damage を起こすことなく, より in vitro の実験に適した状態で細胞分離をすることはなかなか困難である。著者らは, JE-6B rotor (Beckman)を用いて counterflow centrifugation elutriation (逆流負荷遠心法)⁵⁾⁻⁷⁾による末梢血白血球分離を行い, 若干の検討を加えた。

対象ならびに方法

対象は健康人 5 例である。0.1 M EDTA 2.5 ml 添加試験管に静脈血 17.5 ml 採取し, 採取後室温に 1 時間放置したのち, 500 r. p. m. 8 分間遠心し buffy coat を作成した。buffy coat をコック B より sample reservoir に注入したのち, flow rate 4.5 ml/min で buffer を流し sample

を rotor に移した。rotor から sample が出始めるとその流出液を分取し (8 分間), さらにコック A を C に切替 10 分間 wash out し, 以後細胞分離を行った。方法は flow rate を 1 ml ずつ増加させそれぞれ 4 分間ずつ分取し, 最終 flow rate は 15.0 ml/min とした。なお sample の温度は 4 °C, 回転数は 2,000 r. p. m. 一定とした (図 1)。なお buffer は M/10 Phosphate Buffer に 0.14 M NaCl, 2.0% (w/v) bovine serum albumin (BSA) とし最終 pH は 7.2, 浸透圧は 325 mOsm/kg H₂O に調整した⁵⁾。また細胞分類は末梢血好酸球好塩基球直接算定用希釈液を用いて行った⁸⁾。各 fraction におけるヒスタミン量は 100 °C, 1 時間煮沸後細胞内に含まれるものを含めた総ヒスタミン量として表わした。

結 果

Counterflow centrifugation elutriation に

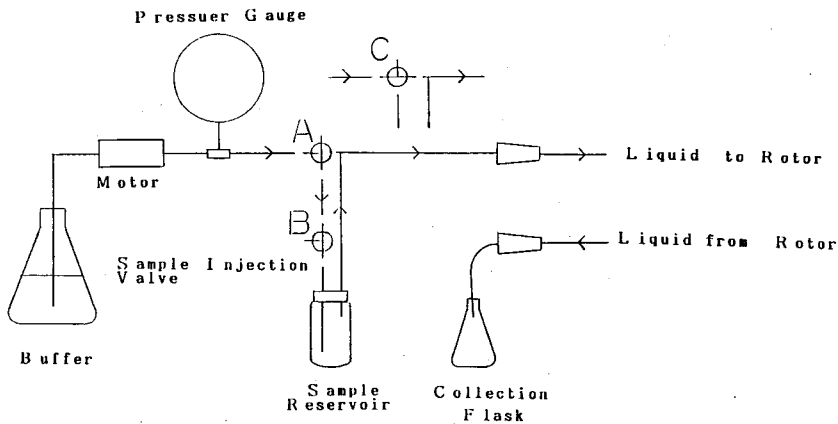


図1. Counterflow Centrifugation Elutriationによる細胞分離

よる各 fraction の細胞数の平均は flow rate 4.5 ml/min すなわち wash out 時に 4.64×10^6 と最も多く、以後減少し、11, 12, 13, 14 ml/min でやや細胞数が多い傾向がみられた。また flow rate 6.0 ml/min から chamber までの合計細胞数の平均は 11.53×10^6 であり、buffy coat からの回収率は 60.6% であった (図2)。

Counterflow centrifugation elutriation による各 fraction の細胞を検査すると、リンパ球では低い flow rate でより頻度が高く以後 flow rate の増加とともに次第に低下していく傾向がみられた。好中球は低い flow rate では低い値を示し flow rate 10 ml/min 以後急速に purity

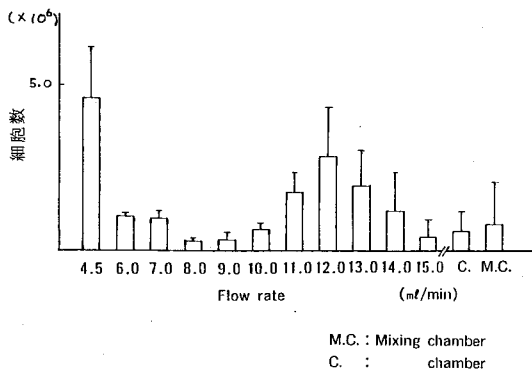


図2. 各 fraction における細胞数

が高くなり 13 ml/min を peak として以後次第に低下していく傾向がみられた。また好酸球は低い flow rate では出現せず、flow rate 12 ml/min 以後急速に頻度が高値を示し chamber 内で peak を示した。一方好塩基球は末梢血中では $0.90 \pm 0.52\%$ であったが、flow rate 9 ml/min で $11.80 \pm 1.95\%$ と最も高値を示し、以後次第に減少した (図3)。

各 fraction における好塩基球の頻度と細胞数を検討すると、好塩基球は flow rate 4.5 ml/min すなわち wash out 時に頻度は 1.54% と低値を

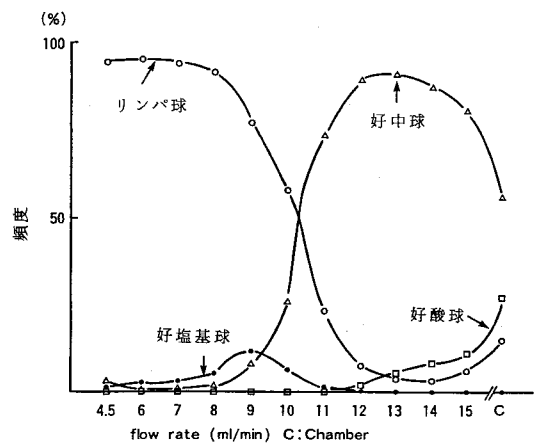


図3. 各 fraction における細胞の頻度

示したが、細胞数は 0.74×10^6 と最も高値を示した。以後細胞数は減少したが、flow rate 9.0ml/min で再び高値を示し以後減少した。flow rate 12.0ml/min 以後は頻度、細胞数ともほとんど認められなかった。また flow rate 6.0ml/min から Chamber までの合計好塩基球数の平均は 1.51×10^5 であり、buffy coat からの好塩基球の回収率は 50.4%であった (図4)。

各 fraction におけるヒスタミン含有量を測定すると、flow rate 4.5ml/min すなわち wash out 時に最も多く以後減少したが、flow rate 9.0-10.0ml/min で好塩基球の頻度および細胞数とも同様に再び多くなり 12.0ml/min 以後では

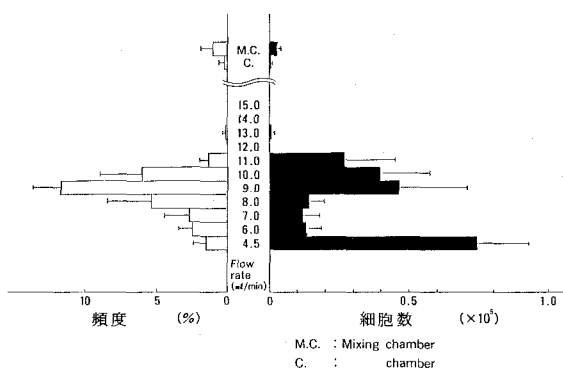


図4. 各 fraction における好塩基球の頻度と細胞数

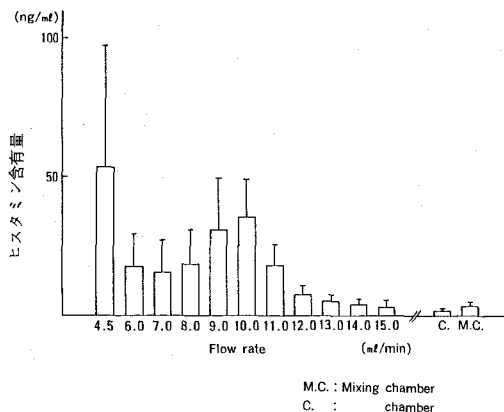


図5. 各 fraction におけるヒスタミン含有量

減少している傾向がみられた (図5)。

以上の結果より我々は counterflow centrifugation elutriation により 3つの fraction に分離し実験を行っている。第1相は flow rate 4.5ml/min, 第2相は flow rate 6.0ml/min より 11.0ml/min まで, 第3相は flow rate 12.0ml/min 以後とした。各 fraction における主要細胞の頻度は第1相ではリンパ球が大部分を占めているが、第2相ではリンパ球、好中球が大部分を占め、また好塩基球が 3.7% と他の fraction に比べ高値を示した。第3相では好中球が大部分を占め、好酸球が少数認められた (図6)。

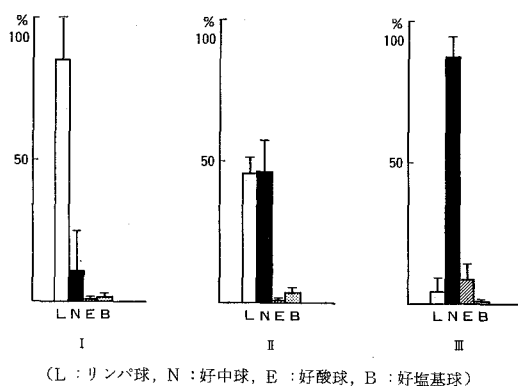


図6. 各 fraction における細胞の出現頻度 (L: リンパ球, N: 好中球, E: 好酸球, B: 好塩基球)

考 案

末梢血白血球を用い in vitro での実験を行う場合、細胞に対する damage が大きな問題点となる。特に末梢血では好塩基球に対する影響が最も大きいと思われる。好塩基球は 1型アレルギー反応において大きな役割を果たし種々の抗原に対し化学伝達物質を遊離するといわれているが^{9), 10)}、種々の機械的あるいは化学的刺激に対しても他の細胞に比べ反応性が強く、cell damage を受けやすい¹¹⁾。末梢血白血球を用いた実験はいろいろ試みられているが、これらの実験では Dextran¹²⁾⁻³⁾、Hypaque-Ficoll⁴⁾ が使用されており、in vitro での実験において spontaneous な化学伝達物質の遊離を起こしやすい可能性も否定はできない。

著者らはJE-6B rotor (Beckman) を用いて counterflow centrifugation elutriation による細胞分離を試みた。各 fraction における細胞の頻度は flow rate が低い場合はリンパ球が大部分を占めたが、flow rate の増加とともに頻度は減少し逆に好塩基球の頻度が増加した。しかも頻度のみでなく細胞数の増加も認められ、各 fraction におけるヒスタミン含有量も同様の傾向が認められた。さらに flow rate が増加すると好塩基球は減少しはじめ、代りに好中球が増加しはじめた。好中球の peak は flow rate は 13ml/min であり以後減少を示した。最終段階で好酸球は増加傾向を示し chamber 内で最も高値を示した。なお単核球は末梢血中の血液細胞では大きい細胞であるが、今回の検討では一定の傾向がみられなかった。

結 語

JE-6B rotor (Beckman) を用いて counterflow centrifugation elutriation による細胞分離を試みた結果、この分離方法が in vitro における実験に有用な手段である可能性が示唆された。

参考文献

- Lichtenstein, L.M., Osler, A.G.: Studies on the mechanisms of hypersensitivity phenomena IX. Histamine release from human leukocytes by ragweed pollen antigen. *J. Exp. Med.* 120, 507-530, 1964.
- Siraganian, R.P. and Hook, W.A.: Histamine release and assay methods for the study of human allergy; in Rose, Friedman, *Manual of clinical immunology*, American Society for Microbiology, Washington pp808-821, 1980.
- Morita, Y., Inokuma, S. and Miyamoto, T.: Trapidil, a coronary vasodilator, inhibits IgE-mediated histamine release from human basophils. *Int. Archs Allergy Appl. Immunol.* 71, 289-292, 1983.
- Macglashan, D.W. and Lichtenstein, L.M.: The purification of human basophils. *J. Immunol.* 124, 2519-2521, 1980.
- Jemionek, J. F., Contreras, T. J., French, J.E. and Shields, L. J.: Technique for increased granulocyte recovery from human whole blood by counterflow centrifugation elutriation. I. In vitro analyses. *Transfusion.* 19, 120-128, 1978.
- Glick, D., Redlich, D. V., Juhos, E. T. and McEwen, C. R.: Separation of mast cells by centrifugal elutriation. *Exp. Cell Research.* 65, 23-26, 1971.
- 井上 達, 久保幸穂: Counter Current Elutriator と FACS の使用. *Tissue Culture Reseach Communications Preliminary Issue.* 42-45, 1981.
- 木村郁郎, 谷崎勝朗: 好塩基球および好酸球の適切な同時直接算定法の考案とその臨床評価. *医学の歩み*, 69, 25-28, 1969.
- Gell, P.G.H. and Coombs, R. R. A.: *Clinical aspects of immunology.* Blackwell Scientific Publication, Oxford pp317-317, 1963.
- 木村郁郎: 気管支喘息—その病態と好塩基球—The role of basophil in bronchial asthma. *アレルギー診療 メディカルレビュー社*, 大阪 pp119-131, 1986.
- Neijens H. J., Dogenhart, H. J., Raatgeep, R and Kerrebijn, K. F.: The correlation between increased reactivity of the bronchi and of mediator releasing cells in asthma. *Clin Allergy* 10, 535-539, 1980.

Separation of peripheral leukocytes by counterflow centrifugation elutriation

Michiyasu Sudo, Fumie Matsubara, Hiroyuki Araki, Hikaru Kitani and Yoshiro Tanizaki

Division of Medicine, Misasa Hospital,
Okayama University Medical School

Separation of peripheral leukocytes was carried out in 5 healthy subjects by counterflow centrifugation elutriation with JE-6B rotor. 1. Number of lymphocytes was predominant at low flow rate (4.5ml/min) of counterflow centrifugation elutriation. 2. As flow rate was increased (9-10ml/min), the purity and number of basophils, and histamine content in the

fraction were gradually increased. 3. The purity and number of neutrophils were gradually increased, and the purity was reached the peak at 13ml/min. 4. The purity and number of eosinophils were gradually increased at the late stage of the centrifugation elutriation. The results obtained here might suggest that cell separation by counterflow centrifugation elutriation is more useful for experiments, especially allergy testing, in vitro.