

## 5 豚のリンパ球幼若化試験における簡便法の検討

県中央家畜保健衛生所

藤田 慶一郎、高橋 孝志、福田 修<sup>1)</sup>

畜産酪農研究センター 芳賀分場

野口 宗彦

1) 県北家畜保健衛生所

### はじめに

豚は、その飼養環境から様々なストレスに暴露されている。過度なストレスは、豚の免疫機能を低下させ、日和見的な慢性疾病を誘発することにより生産性の低下をもたらすと考えられている<sup>1,2)</sup>ことから、免疫機能から豚のストレス状態を評価する検査法の確立が望まれている。

豚の免疫機能を測定する検査法の一つにリンパ球幼若化試験(LPA)があげられる。LPAは、生体から採取したリンパ球を、マイトジェンと呼ばれる非特異的な抗原を用いて増殖させることによりリンパ球の幼若化能を測定する検査法である。従来、豚のリンパ球幼若化能は、3H-チミジン取り込み法やMTT法により行われてきた。3H-チミジン取り込み法<sup>3,4)</sup>は、ラジオアイソトープ(RI)を使用する検査系であり専用の施設や特殊な廃棄物処理が必要であることなどから全ての検査機関で実施することは困難であった。一方、Mosmannら<sup>12)</sup>が確立したMTT法は、細胞内のNADHにより還元され生成されたホルマザンの吸光度を測定することにより細胞の活性を評価することが可能であり、この方法はRIを使用しない検査系であるため様々な研究で用いられており、豚のLPAにおいてもIwataら<sup>5)</sup>が検査系を確立している。しかし、MTT法は、試薬添加時に生成されるホルマザンが難溶性であるため溶解作業が必要であることや、溶解に時間を要することなどの問

題があった。近年、細胞増殖測定用の試薬として2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H tetrazolium, monosodium salt (WST8)が開発され市販されている。WST8は、MTTと同様、細胞の脱水素酵素により還元される<sup>6)</sup>ため細胞活性やLPAなど細胞増殖能測定に用いることが可能<sup>7)</sup>である。さらに、WST8を添加後に生成されるホルマザンは水溶性であるため、試薬添加後の作業が不要で簡便<sup>6,7,8)</sup>であることから注目され様々な研究に応用されている。さらに、LPAにおいては、鶏でWST8を用いた検査系<sup>8)</sup>が報告されており、豚においても応用が可能と思われた。

そこで、今回我々は、豚のLPAをより簡便に実施するためWST8を用いた検査法(WST8法)を確立したのでその概要を報告する。

### 材料と方法

#### 1 供試動物

90～120日齢のLWD交雑種肥育豚19頭を今回の調査に供した。

#### 2 リンパ球幼若化試験

供試動物の前大静脈からヘパリン(5単位/ml)加血液5mlを、10ml容注射筒を用いて採取し、Ficoll-Conray液(Histopaque1.077, SIGMA)を用いた比重遠心法<sup>9)</sup>により末梢血単核球を分離し

た。

分離後の末梢血単核球は 10%牛胎子血清、ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml)、ペニシリン (100U/ml)加 RPMI-1640(L-glutamin 加 培養液(ナカライテスク)にて細胞数を調整した後、リンパ球を抗原非特異的に増殖させるマイトジェン添加区、マイトジェン無添加区に分け 96 ウエル平底プレートに 100  $\mu$ l ずつ分注し、37  $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub>条件下にて培養した。なお、マイトジェンは、T 細胞を刺激するフィトヘマグルチニン(PHA、J オイルミルズ)、コンカナバリン A(ConA、J オイルミルズ)を用い、マイトジェン濃度の検討以外の試験においては、培養液の最終濃度が 5  $\mu$ g/ml となるように添加した。

培養後の細胞液は、WST8 法あるいは MTT 法を用いてリンパ球の幼若化能を測定した。

WST8 法では、培養後の各ウエルに WST8(Cell counting kit、Dojindo)を 10  $\mu$ l ずつ添加し、4 時間感作させた後、黄色に発色した各ウエルの吸光度(OD 値)を 450nm の波長下でプレートリーダーにて測定し、ブランクの OD 値を差し引いたものを、各検体の OD 値とした。

MTT 法では、至適とされる 72 時間培養後<sup>5)</sup>の各ウエルに PBS(pH7.4)にて 10  $\mu$ g/ml に調整した MTT 溶解液を 10  $\mu$ l ずつ添加後、37  $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub>条件下で 4 時間感作させた。感作後は、10%SDS を各ウエルに 100  $\mu$ l ずつ添加し、37  $^{\circ}$ C 密閉状態にて一晩静置後、主波長 570nm 副波長 650nm の波長下で各ウエルの OD 値を測定した。

いずれの検査法においても、リンパ球の増殖度を数値化するため stimulation index(SI 値 = マイトジェン刺激細胞の OD 値/マイトジェン非刺激細胞の OD 値)を算出した。

### 3 調査項目

WST8 法の至適な条件を検討するため以下の項目について調査した。

#### (1) 生細胞数と OD 値の相関性(n=3)

各検体について、培養液中の細胞数がそれぞれ 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0  $\times 10^6$ cell/ml となるように調整し、マイトジェン非刺激下で 72 時間培養した。培養後は、WST8 法により各検体の OD 値を測定し、生細胞数との相関性について調査した。

#### (2) 培養時間と生細胞数(n=3)

各検体について、培養液中の生細胞数を、0.125 ~ 4.0  $\times 10^6$ cell/ml に調整し、それぞれ 24、48、72 時間培養した検体を用いて WST8 法により LPA を実施した。

#### (3) 培養液量と WST 添加量(n=5)

培養液量は 100 ~ 200  $\mu$ l で、WST8 添加量は 5 ~ 20  $\mu$ l の条件(表 1)で、WST8 法により LPA を実施し、培養液量と WST8 添加量について調査した(生細胞数: 0.5  $\times 10^6$ cell/ml、培養時間: 48 時間)。

#### (4) 至適マイトジェン濃度(n=3)

培養液中のマイトジェンの最終濃度について 0.08 ~ 100  $\mu$ g/ml の範囲で検討を行った。(生細胞数: 0.5  $\times 10^6$ cell/ml、培養時間: 48 時間)。

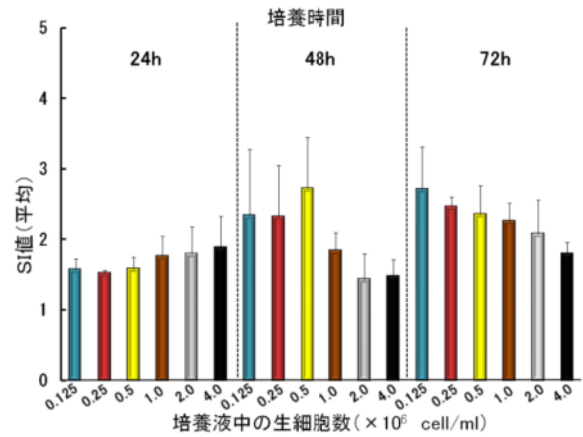
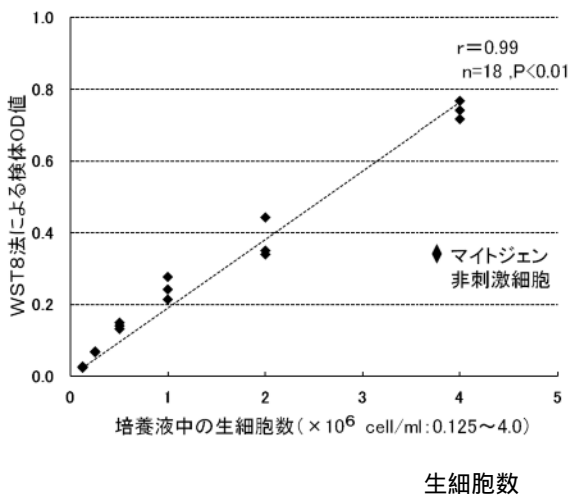
#### (5) MTT 法との相関性(n=3)

培養液中の生細胞数を調査項目(1)、(2)同様 0.125 ~ 4.0  $\times 10^6$ cell/ml の 6 段階に調整した培養液にマイトジェンを添加後、48 時間培養したものについては WST8 法で、72 時間培養したものについては MTT 法で LPA を実施し、両法の測定値の相関性を確認した。

## 結果

### 1 生細胞数と OD 値の相関性

WST8 法により得られた検体の OD 値と培養液中の生細胞数との間には、有意な正の相関が確認された( $r=0.99$ 、 $n=18$ 、 $p<0.01$ )(図 1)。



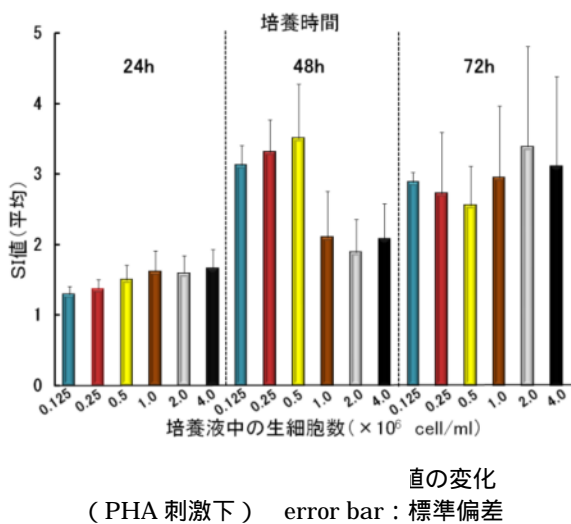
よる SI 値の変化  
(ConA 刺激下) error bar : 標準偏差

## 2 培養時間と生細胞数(n=3)

最大の SI 値が確認されたのは PHA(図 2)、ConA(図3)刺激のいずれにおいても培養時間48時間、生細胞数  $0.5 \times 10^6$  cell/ml の条件下であり、SI 値(平均値 ± 標準偏差)は PHA 刺激で  $3.51 \pm 0.77$ 、ConA 刺激で  $2.72 \pm 0.73$  を示した。

## 3 培養液量と WST8 添加量(n=5)

培養液量と WST8 添加量について検討を行ったところ、最大の SI 値が確認されたのは、PHA、ConA 刺激いずれにおいても培養液量  $200 \mu\text{l}$ 、WST8 添加量  $15 \mu\text{l}$  の条件下であり、SI 値(平均値 ± 標準偏差)は PHA 刺激では  $5.05 \pm 1.2$ 、ConA 刺激では  $4.32 \pm 1.3$  を示した。また、この条件下における検体の OD 値(平均値 ± 標準偏差)は非刺激細胞が  $0.109 \pm 0.01$ 、PHA 刺激細胞が  $0.55 \pm 0.1$ 、ConA 刺激細胞が  $0.472 \pm 0.09$  であった(表 1)。



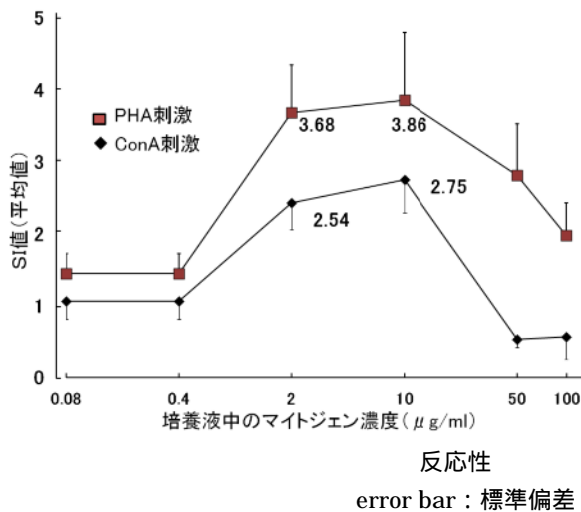
直の変化  
(PHA 刺激下) error bar : 標準偏差

量が LPA に及ぼす影響

培養液量 ( $\mu\text{l}$ )	WST8 添加量 ( $\mu\text{l}$ )	各細胞のOD値(平均)			SI値(平均)	
		PHA 刺激	ConA 刺激	非刺激	PHA	ConA
100	5	0.20	0.15	0.04	4.66	3.54
100	10	0.32	0.26	0.07	4.30	3.61
150	5	0.26	0.24	0.08	3.47	3.17
150	10	0.44	0.35	0.12	3.77	3.06
150	15	0.55	0.42	0.18	2.99	2.26
200	10	0.41	0.20	0.09	4.65	2.30
200	15	0.55	0.47	0.11	5.05	4.32
200	20	0.69	0.61	0.17	3.72	3.61

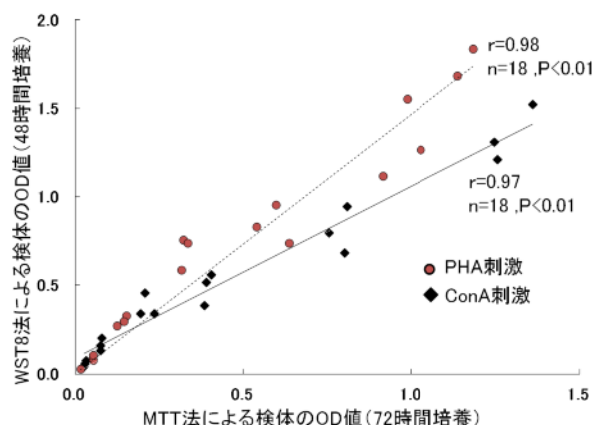
#### 4 至適マイトジェン濃度(n=3)

高いSI値が確認されたのは、PHA、ConA いずれにおいても2 µg/ml、10 µg/ml 下であり、PHA 刺激(平均値±標準偏差)ではそれぞれ 3.68±0.66、3.86±0.93 で、ConA 刺激(平均値±標準偏差)では 2.54±0.36、2.75±0.46 を示した(図4)。



#### 5 MTT法との相関性

マイトジェン刺激細胞において、WST8法(48時間培養)、MTT法(72時間培養)により得られたOD値の間にはPHA、ConA刺激いずれにおいても有意な正の相関が認められた(PHA: r=0.98, n=18, P<0.01, ConA: r=0.97, n=18, P<0.01) (図5)。



#### まとめと考察

リンパ球幼若化能は豚における免疫学的なストレスマーカーとして様々な研究に用いられている。Deguchiら<sup>4)</sup>は、64日齢の腹ちがいの豚同士を群編成したところ26日間にわたりリンパ球幼若化能の抑制が確認されたと報告している。また、Blechaら<sup>10)</sup>は、離乳日齢が豚の免疫能に及ぼす影響について調査し、早期(2,3週齢)に離乳を行った豚では、離乳後にリンパ球の幼若化能の低下が認められたと報告している。さらに、Tuchschererら<sup>11)</sup>は、妊娠末期の母豚に拘束ストレスを負荷したところ生まれた子豚のリンパ球幼若化能が低下したと報告しており、これらのことからリンパ球幼若能はストレスマーカーとして有用である可能性が考えられた。

本調査で用いたWST-8は、細胞内の脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザンを生成する<sup>6)</sup>。このホルマザンの吸光度を直接測定することにより、容易に生細胞数を計測することができるため、MTT法に比較して溶解作業が不要で、実験操作が簡便に行えるという利点を持っている<sup>7)</sup>。今回の調査では、WST8の還元に伴う吸光度と豚から採取した末梢血単核球の生細胞数との間には有意な正の相関が認められたことから、WST8が豚のLPAに応用可能であることが考えられた。

そこでWST8を用いて豚のリンパ球幼若化能を測定するため、至適な細胞数と培養時間について検討を行ったところ、PHA、ConA刺激時いずれにおいても、生細胞数は $0.5 \times 10^6$  cell/ml、培養時間は48時間において平均して最大のSI値が確認され、これらが至適な条件であることを確認した。従来のMTT法<sup>5)</sup>では、細胞数は $2.0 \times 10^6$  cell/ml、培養時間は72時間が至適条件と報告されている。本法は、MTT法と比較して培養時間を24時間短縮し、少ない細胞数での実施が可能であることを確認した。葦澤ら<sup>13)</sup>は、豚の末梢リンパ球の分裂

周期を調査し、PHA 刺激下において、リンパ球の分裂指数は 40～42 時間、60～66 時間にピークを持つ 2 相性の変化で、72 時間では著しく低下していると報告している。今回我々の調査においても、特に PHA 刺激下において  $0.125 \sim 0.5 \times 10^6 \text{ cell/ml}$  では、細胞増殖度を示す SI 値が 48 時間で最大となり 72 時間で低下する傾向が認められた。このことから、WST8 は LPA において、リンパ球分裂時の細胞活性を強く評価している可能性が考えられた。

WST8 法では、試薬の添加量は、培地量の 10% が推奨濃度とされている。我々の調査では、培養液量は 200  $\mu\text{l}$ 、WST8 添加量は 15  $\mu\text{l}$  が至適な条件であり、豚の LPA においては、培地量の 7.5% 程度が推奨される添加量であることが確認された。

LPA においては、リンパ球を増殖させるマイトジェンの濃度について検討を行う必要がある。今回の調査では、T 細胞を刺激する PHA、ConA をマイトゲンとして用いた。PHA は CD4 陽性細胞を、ConA は CD8 陽性細胞<sup>14)</sup> を強く刺激するとされており、両者を用いることで T 細胞の一般的な機能の評価することが可能である。そこで、本法における PHA、ConA の至適な濃度について検討を行ったところ 2～10  $\mu\text{g/ml}$  が至適な濃度であることを確認した。

Miyamoto ら<sup>8)</sup> は、鶏において、WST8 を用いた LPA の検査系を確立したが、MTT 法との相関性が高かったと報告している。我々の調査においても、WST8 法と MTT 法との相関性について確認したところ、PHA、ConA 刺激細胞いずれにおいても測定値の間に有意な正の相関が認められた。

以上から、従来の検査法との相関が高いこと、少ない細胞で実施できること、培養時間を短縮できること、さらに作業工程を省略できることから本法は有用な検査法であることが示唆された。今

後は、本法や他の免疫学的な検査法を用いて豚のストレスが免疫能に及ぼす影響について解明していきたい。

稿を終えるにあたり本調査に御助言、御指導いただいた独立行政法人農業・食品産業技術研究機構動物衛生研究所の菊佳男先生、宗田吉広先生に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Kelley, W.C. 1980. *Ann. Rech. Vet* 11(4):445-478
- 2) Roth, A.J. et al. 2006. *Diseases of Swine*, 9th ed. (Straw, B.E. et al eds), Blackwell Publishing, Iowa
- 3) 出口栄三郎. 1997. 子豚の豚房移動と末梢血リンパ球幼若化反応. *日獣会誌*. 50:713-716
- 4) Deguchi et al. 1998. *J Vet Med Sci*. 60:149-153
- 5) Iwata, H et al. 1993. *J Vet Med Sci* 55(4):697-698
- 6) Ishiyama, M et al. 1997. *Talanta*. 44:1299-1305
- 7) Tominaga, M et al. 1999. *Anal. Commun*. 36:47-50
- 8) Miyamoto, T et al. 2002. *AVIAN DISEASES*. 46:10-16
- 9) 笠原和恵. 1985. 日常検査としての T リンパ球・B リンパ球測定法 <改訂版>. 59-65. 近代出版. 東京
- 10) Blecha, F et al. 1983. *J Anim Sci*. 56:396-400
- 11) Techscherer, M et al. 2002. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 86:195-203
- 12) Mosmann, T et al. 1983. *J Immunol Methods*. 65:55
- 13) 葺澤圭二郎ほか. 1983. 畜産試験場研究報告. 4

0:11-15

14) 萩原克郎. 2009 . 獣医微生物学実験マニュアル.  
196-201. チクサン出版. 東京