

ヒト末梢血単球の検討

第 1 編

ヒト末梢血単球の分離と同定

岡山大学医学部第二内科教室（主任：木村郁郎教授）

高 杉 健 太

（昭和55年11月12日受稿）

Key words：末梢血単球の分離

比重遠沈法による末梢血単球の分離

牛アルブミンによる末梢血単球の分離

緒 言

今日、細胞性免疫の研究の発展は著しいものがあり、これらは主にリンパ球を中心として進められてきた。しかし近年ではヒト免疫応答における単球、マクロファージの役割についても注目されるようになった。従って特に *In vitro* における単球の研究にはヒト末梢血から純粋に、そして多量の単球を得る為の分離方法が必要となった。さらにリンパ球系の免疫応答と区別して考える為に単球とリンパ球の鑑別を明瞭にする必要も生じてきた。従来単球の分離方法としてはガラス板吸着法^{1), 2)} 比重遠沈法^{3)~9)} などの報告がみられるが、いずれの方法も単球の純粋度、回収率、*viability* など必ずしも満足すべきものとはいえない。著者は操作が簡便で単球に対する障害性の少ない比重遠沈法による分離方法について検討を加えたので報告する。

材 料 及 び 方 法

白血球浮遊液：健康人静脈血よりヘパリン加血10mlを加えて室温に40分間静置し、6%デキストラン1.0mlを加えて室温に40分間静置して白血球層を取り、280g、10分間遠沈後沈査に10%ウシ胎児血清（FCS）加TC-199 1.0ml中に細胞を再浮遊させた。

アルブミン重層液比重遠沈法：35%ウシアルブミン液（Miles社）にPH7.4リン酸緩衝生食液（PBS）を加えて各種濃度液を調製した。な

お35%ウシアルブミン液の比重は17°Cで1.083であった。各濃度のアルブミン液1.0mlを直径8mm、長さ100mmのガラス試験管に三層に静かに重層し、その最上部にFCS加TC-199液中に浮遊させた白血球浮遊液1.0mlを重層した。種々の条件の遠沈加速度、遠沈時間にて分離したのちには図1の如く、上段からI、II、III、IV

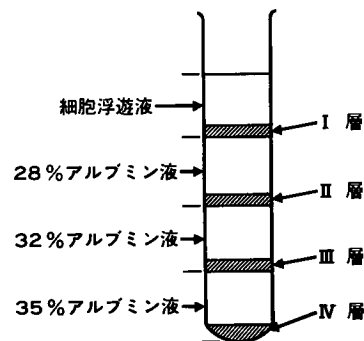


図1. アルブミン重層液と細胞採取分画の4つの分画に分けて採取した。各分画採取後にFCS加TC-199液を加えて遠沈し、沈査にFCS加TC-199液0.2mlを加えて細胞を浮遊し、細胞数を計測すると共にスライドグラスに塗抹してMay-Giemsa染色し、300個以上の細胞について分類した。細胞数に単球百分率を乗じて単球絶対数を求め、遠沈分離前の白血球浮遊液中の単球数と比較して、単球の回収率を計算した。各種遠沈条件の検討においては、健康人3人の末梢血を1組の実験単位とし、数値は3検体の平均値で表わした。また細胞数はいずれも末梢

血10mlより分離された絶対数で表わした。

至適な単球分離の条件を検討する為に、20℃にて28-32-35%、30-32.5-35%、32-33.5-35%の各アルブミン濃度重層液、280g、400g、490gの遠沈加速度、40分、50分、60分の遠沈時間の諸条件の組合せについて検討した。

二段階比重沈法：ヘパリン加静脈血を66.8% Conray 400（第一製薬）5容、蒸留水5容、9% Ficoll 400（Pharmacia Fine Chemical社）溶液24容の混合液に重層し、280g、30分間遠沈したのち中間層のリンパ球層を分離除去したのち、残りの細胞を1.0ml FCS加 TC-199液に浮遊し、28-32-35%アルブミン重層液上に重層し400g、40分間遠沈した。各分画について前述の方法で細胞数と単球百分率を求めた。

Ficoll-Hypaque 比重遠沈法：Synderman, Rら¹⁰⁾の方法に準じた。9% Ficoll 24容と Sodium Metrazoate Solution (Nyegaard社) 10容の混合液に等量の健康人ヘパリン加静脈血を重層し20℃にて400g、35分間遠沈し中間層に集まる細胞を採取した。細胞数を算出すると共に塗抹標本を作製し、May-Giemsa染色及び Peroxidase (Mc Junkin社)と May-Giemsaの重染色を行い、300個以上の細胞について分類し単球百分率を求めた。残りの細胞は10% FCS加 TC-199中に単球数 3.5×10^5 /mlに調製浮遊し、食食反応用に供した。

Zymosan 食食反応：新鮮ヒト血清1.0mlに ZymosanA (Sigma社) 0.5mgを加えて37℃、45分間反応させたのち遠沈洗滌後 PRMI-1640 3.0ml中に再浮遊させた。Ficoll-Hypaque 比重遠沈法にて分離した単球浮遊液と Zymosan 浮遊液とを等量混合し100gにて3分間遠沈したのち、37℃にて20分間反応させた。細胞を再浮遊して、その一滴をスライドグラスにとり、カバーグラスをかけパラフィンにて包埋し、1000倍位相差顕微鏡にて細胞300個以上をかぞえ、Zymosan粒子を食食している細胞の百分率を求めた。

成 績

遠沈加速度を400g、遠沈時間を40分間とし、各種組合せのアルブミン重層液について検討した(図2)。アルブミン濃度28-32-35%、30-

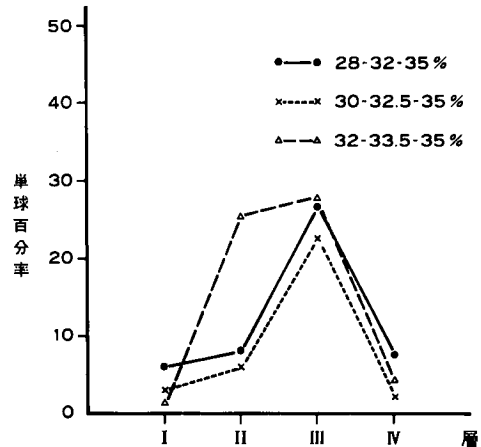


図2 アルブミン重層液比重遠沈法による単球の分離：アルブミン濃度による影響

32.5-35%重層液では単球はIII層にそれぞれ26%、22.5%と最も高率に集り、その絶対数は 3.5×10^5 、 2.9×10^5 /末梢血10mlであった。32-33.5-35%重層液ではII層に25.4%、III層に27.7%に集った。このことから遠沈加速度が400gであれば単球は32%から33.5%アルブミン層に集ることがわかった。

28-32-35%アルブミン重層液にて遠沈時間を40分として遠沈加速度(g)による影響を検討した(図3)。280gでは単球は全層にわたって

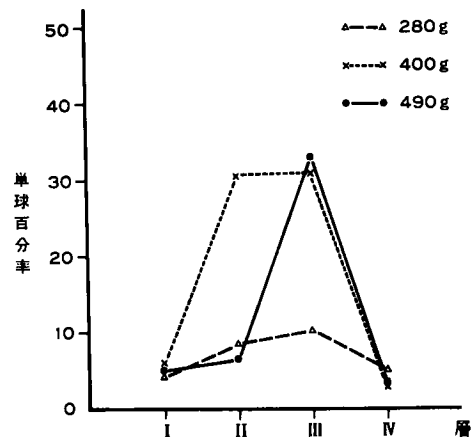


図3 アルブミン重層液遠沈法による単球の分離：遠沈加速度の影響

4.5~8.6%存在した。400gではII層に30.5%、III層に31.8%と広い幅のピークを認めた。490gではIII層に33.6%と単一のピークを認めた。単

球絶対数は490gにて分離したⅢ層が最も多く平均 3.7×10^5 であった。

28-32-35%アルブミン重層液を使用し、遠沈加速度を490gとして遠沈時間の影響をみた(図4)。第Ⅲ層における単球の百分率は40分

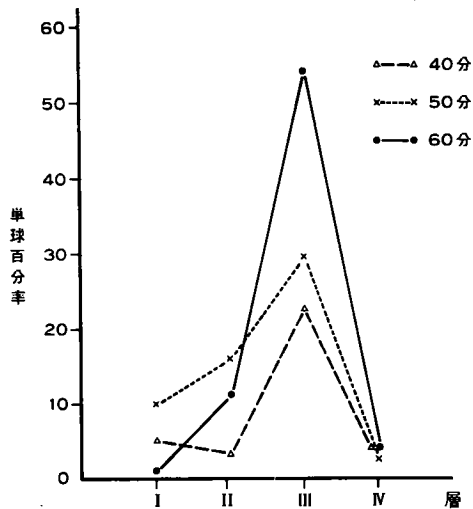


図4 アルブミン重層液遠心法による単球の分離遠心時間の影響

で25.0%, 50分で29.5%, 60分で54.0%と遠沈時間が増加するに従って高率となった。60分間遠沈後Ⅲ層に集る単球の絶対数は平均 7.0×10^5 と最も多かった。

6例の健康人の末梢血をアルブミン重層液にて490g, 60分間遠沈し、IからIV層までに分割採取し各層の細胞構成をみた(図5)。第一層には全細胞数の0.3%が集り、その95.0%はリンパ球で、単球は5.0%であった。第二層は全細胞の2.0%が集り、86.5%がリンパ球で単球は11.0%であった。第Ⅲ層は全体の5.0%の細胞が集り、単球が54.0%と最も高率となり、リンパ球39.2%, 好中球5.9%であった。全体の細胞数の92.6%は第Ⅳ層にあつまり、そのうち好中球は67.8%と最高率であり、リンパ球25.1%, 単球3.8%, 好酸球と好塩基球が3.5%であった。単球の絶対数はⅣ層に最も多く集るが、Ⅳ層中にしめる単球の割合は4%と極めて低率である。単球の純度が最も高く絶対数も比較的多いのはⅢ層で、純度は54%, 絶対数は 7.0×10^5 であった。Ⅲ層への単球の回収率は13.1~39.2%(平均22.0%)であった。

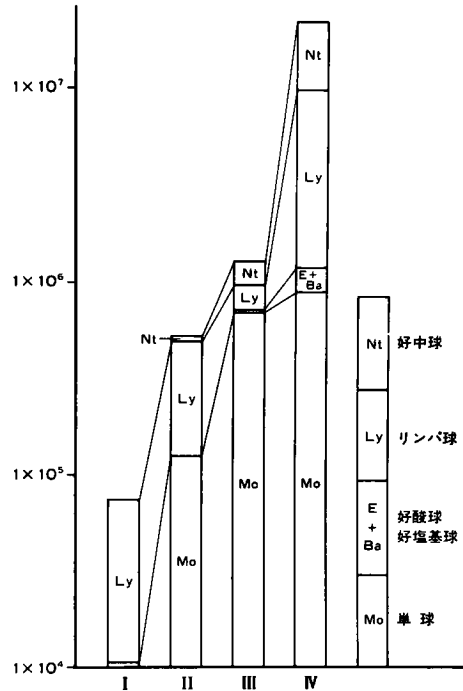


図5 アルブミン重層液比重遠沈法にて分離した各層の細胞構成

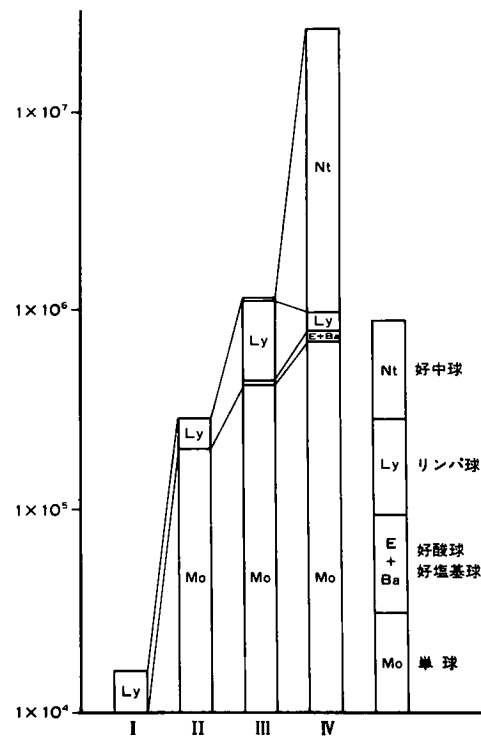


図6 二段階法にて分離した各層の細胞構成

6例の健康人の末梢血を二段階比重遠沈法にて分離し各層の細胞構成を検討した(図6)。第I層にはConray-Ficoll比重遠沈法で分離した全細胞数の0.06%しか細胞はなく、その98.1%はリンパ球であった。第II層は全細胞の1.0%が集り、単球が76.0%と最高率を示し、リンパ球が22.6%、好中球が1.2%であった。第III層は全細胞の4.2%が集り、単球38.5%、好中球36.5%、リンパ球23.1%、好酸球と好塩基球2.2%であった。全体の細胞の94.8%は第IV層に集り、そのうち好中球が85.6%と圧倒的に多く、リンパ球8.6%、単球2.7%、好酸球と好塩基球2.4%であった。単球の絶対数はIV層が最も多いが、しかし、純度は2.4%と低率であった。II層においては単球数は 2.0×10^5 と少いが純度は76.0%とこれまでの分離方法では最高であった。第II層における単球の回収率は2.3~7.9%(平均4.5%)であった。なお前述のいずれの方法においてもTrypan blue染色によるviabilityは92%以上であった。

健康人24例の末梢血をFicoll-Hypaque比重遠沈法にて分画採取された単核球層の細胞構成はリンパ球が最も多く79.0±7.0%(平均±標準偏差)で、単球は18.9±7.5%、好中球は2.2±2.6%、好酸球と好塩基球は0%であった。単球の回収率は73.0%であった。本法にて分離した単核球層中の単球の同定を3つの方法において行った(表I)。May-Giemsa染色法のみでは前述の如く単球は18.9±7.5%で、PeroxidaseとMay-Giemsaの重染色法では19.8±6.2%、Zymosan粒子を貪食した細胞は18.1±7.5%であった。各方法の単球百分率の間には推計学上有意の差は認められなかった。

考 案

末梢血液中から単球を純粋に分離する方法は今までにガラス板付着法^{1), 2)} Ficoll-Hypaque比重遠沈法^{3), 4), 9)} ウシアルブミン溶液比重遠沈法^{5), 6), 7)} 蔗糖勾配遠沈法⁸⁾あるいは鉄を貪食させたのち比重遠沈を行う方法などが報告されている。

ガラス板吸着法は回収率の悪さ、付着した細胞を剝離する為の細胞の損傷、培養条件による

表1 Ficoll-Hipozue 比重遠沈にて分画採取された細胞層中単球百分率: 各種検査法による。

	平均値	標準偏差
May-Giemsa 染色による単球	18.9±7.5	
Peroxidase, May-Giemsa 重染色による単球	19.8±6.2	
Zymosan 貪食細胞	18.1±7.5	

検体数 24例

付着細胞中の単球の純度の低下²⁾ β-リンパ球の付着、さらに抗原に感作された単球はもはやガラスに付着しなくなる^{11), 12)} ことなどの問題点が多く、本法にて分離された単球の機能をもってその個体の単球機能全体を論ずることは危険であろう。

鉄貪食法は一度貪食されたのちに分離する為に、単核球層から単球を除く方法としては良いが、集めた単球を機能検査の為に使用することは不適である。

比重遠沈法は手技が簡単なこと、単球への直接的損傷の少いことから、単球分離には良い方法と考えられる。

Boyum, A.³⁾ はFicoll-Hypaque 比重遠沈法にてヒト末梢血より21%の単球と77%のリンパ球とからなる単核球層を分離している。しかし、Synderman, R.¹⁰⁾ ははじめFicoll-Hypaque 比重遠沈法ではこれ以上の純度の単球の分離に成功していない。Bennett, W.E.⁷⁾ はアルブミンによる比重遠沈法にてウシ末梢血より高純度な単球層を分離しており、Huber, H. ら⁶⁾ は本法に準じてヒト末梢血より59%の純度の単球層の分離を報告している。Holm, G. ら⁵⁾ もウシアルブミン液の比重遠沈法にて約70%以上の単球層を得たとしている。しかし、このHuber, H.らとHolm, G. らの両者の方法を詳細に検討してみると、ウシアルブミン濃度は28%, 27%とほぼ同じであるにもかかわらず、遠沈加速度はそれぞれ2400g, 400gとあまりにもかけ離れているのに気付く。著者はこの両方法ともに追試したが報告された成績とはほど遠い結果しか得られなかった。その原因としては使用したウシアルブミン液の違いによるものかもしれないが、それぞれの濃度液の比重についての記載がないので比較することは出来なかった。

Loos, H.⁴⁾ は三種類の違った Ficoll-Hypa-

que 溶液を重層する方法で単球の純度が $75 \pm 2\%$ と非常に良好な成績を報告している。著者の追試では Loos. H らの I 液, II 液を調製するも、比重は論文中に記載されている結果とは異なり、分離には失敗した。なお Ficoll-Hypaque 溶液中ではリンパ球をはじめ単核球が凝集塊をつくるのがわかり、本法による単球の分離を困難にさせた一因と考えられた。

以上著者は今日まで文献上に見られた方法について追試したが満足すべき成績がえられなかった。そこでこれらの報告を参考にして細胞毒性のないウシアルブミン液を使用し、かつ従来の成績で単球の比重はリンパ球より重く、好中球より軽いことがわかっていたので、三種類の濃度の液を重層して遠沈することを考え、今回遠沈条件について検討を加えた。

まず単球の比重を決めるために、28%, 30%, 32%, 33.5%, 35%のアルブミン溶液を作製し、3組づつ組合せた重層液にて検討した。単球純度は30-32.5-35%重層液にてIII層に22.5%, 28-32-35%重層液にて同じIII層に26.5%のピークをなした。32-33.5-35%重層液ではII層に25.4%, III層に27.7%の幅広いピークがみられた。したがって単球百分率は最高であったが、絶対数においては28-32-35%重層液の 3.5×10^5 /末梢血10 mlが最も多かったので以後の実験は28-32-35%アルブミン重層液を使用した。

28-32-35%アルブミン重層液を使用し、遠沈時間を40分として遠沈加速度の影響をしらべた。遠沈加速度が増加するに従って、III層における単球の百分率が上昇してピークが急峻となった。490 gにてIII層の単球の百分率は33.6%, 絶対数 3.7×10^5 となり、最も良い条件であることがわかった。

遠沈時間の影響を検討する為に、28-32-35%アルブミン重層液にて490 g, 60分間遠沈にて、健康人末梢血6例について各層に集る細胞の絶対数と細胞構成について検討した。単球の純粋度をみるとI層は平均1.1%, II層11.0%, III層は54.0%, IV層は3.8%であった。純粋度ではIII層が最も多かったが、絶対数はIII層で 7.1×10^5 とIV層の 9.1×10^5 と比較して少なかった。しかしIV層における単球の純粋度は3.8%と非常

に悪かった。今回の著者の目的は単球をより純粋に、更に多量に集めることであるので、III層を採取し以後の実験に供した。従って単球の回収率は平均22%とあまり良好とは言えなかった。

比重遠沈法で細胞を分離する場合、好中球と単核球層を分離することは容易である。しかし単球とリンパ球を分離するのが大へん困難であることがわかった。そこでリンパ球の混入を防ぐため、まず Ficoll-Hypaque 比重遠沈法にてあらかじめリンパ球層である中間層を分離除去したのち、残りの細胞を28-32-35%アルブミン重層液にて400 g, 40分間遠沈分離した。本法にて得られた細胞構成は図6の如くであり、II層における単球の純粋度は平均76%と高率であった。

しかし絶対数は 2.0×10^5 と少く、III層, IV層への単球の移動が多く、回収率は平均4.5%にすぎなかった。

単球の比重は好中球よりも軽く、リンパ球よりも重いので3層のアルブミン液を重層することにより、上層にリンパ球を、下層に好中球を、中間層に単球を集めるべく検討を加えた。しかし単球の中にはリンパ球の比重と共通の比重をもつ population が存在することが今回の成績から窺われ、比重のみにて両細胞を分離することが困難であることが判った。

日常診療において単球とリンパ球を塗抹標本にて形態学的に鑑別することの困難な場合が多々ある。もし単球とは貪食する機能を有する単核球であると定義すれば、末梢血においては塗抹標本にて同定される単球百分率の約2倍の高率に存在するのであろうという報告^{1,3)}もある。そこで著者は健康人24例について、比較的手技が簡単で単球を多く含む単核球層が得られる Synderman, R.¹⁰⁾らの方法にて得た単核球において、形態学的、細胞組織化学的、機能的検出法にて単球の百分率を求めた。即ち May-Giemsa 染色にては平均18.7%, Peroxidase 顆粒を胞体に有する単核球を May-Giemsa 染色にて馬蹄形で繊細な核を有し、明らかに単球と思われる細胞は19.8%, そして Zymosan 粒子を貪食している細胞は18.1%であった。以上3種類の方法では Peroxidase と May-Giemsa 重染色

による方法が最も高率であったが、各方法における単球百分率には推計学上有意の差は認めなかった。このことはZucker-Franklin, Dらの成績とはかなり違ったものであったが、貪食させた粒子がZymosanに比してLatexという比較的小さな粒子であったことによるのかもしれない。

健康人においては、貪食能によって単球をリンパ球と鑑別する場合と、塗抹標本による場合との間に有意の差は認めなかったが、癌などある種の疾患においては両方法における単球百分率に大きな差が認められた。即ち塗抹標本による単球百分率よりも貪食細胞百分率が有意に低率であった。このことは単球の貪食能の低下を意味しており、このような疾患患者においては貪食能の有無は必ずしもリンパ球と単球の鑑別の決め手にはならないことが判明した。

結 論

牛アルブミンを使用した比重遠沈法によりヒ

ト末梢血単球を純粋に、そして大量に得る方法について検討した。

1) アルブミン重層液を28-32-35%, 遠沈加速度490 g, 遠沈時間60分の条件が最も良く、第III層に単球純粋度で54%, 単球絶対数で 7.0×10^5 , 単球回収率では22.0%であった。

2) Conray-Ficoll 比重遠沈法でリンパ球を除いた後の細胞について同様に検討した結果は、アルブミン重層液28-32-35%, 遠沈加速度400g, 遠沈時間40分で最も良く、第II層に単球純粋度で76.0%, 単球絶対数で 2.0×10^5 , 単球回収率で4.5%であった。

3) 単球の比重は好中球よりも軽く、リンパ球よりも重いので3層のアルブミン液を重層することにより、上層にリンパ球を、下層に好中球を、中間層に単球を集めるべく検討を加えたが、単球にはリンパ球の比重と共通の比重をもつpopulationが存在することが窺れ、比重のみにて単球を分離することが困難であることが判った。

文 献

1. Levis, W.R. and Robbins, J.H.: Method for obtaining purified lymphocytes, glass-adherent mononuclear cells and population containing both cell types from human peripheral blood. *Blood*. **40**, 77-89, 1972.
2. Koller, C.A., King, G.W., Hurtubise, P.E., Sagohe, A.L. and Lobuglio, A.F.: Characterization of glass adherent human mononuclear cells. *J. Immunol.* **111**, 1610-1612, 1973.
3. Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Med. [Suppl]* **97**, 77-89, 1968.
4. Loos, H. Schut, B.B., Doorn, R. Hoksbergen, R. Riviere, A. and Meerhof, L.: A method for the recognition and separation of human blood monocytes on density gradients. *Blood*. **48**, 731-742, 1976.
5. Holm, G. and Hammarström, S.: Hemolytic activity of human blood monocytes. Lysis of human erythrocytes treated with anti A serum. *Clin. Exp. Immunol.* **13**, 29-43, 1973.
6. Huber, H. and Fudenberg, H.H.: Receptor sites of human monocytes for IgG. *Int. Arch. Allergy*. **34**, 18-31. 1968.
7. Bennett, W.E. and Cohn, Z.A. The isolation and selected property of blood monocytes. *J. Exp. Med.* **123**, 145-160. 1966.
8. Brubaker, L.H. and Evans, W.H.: Separation of granulocytes, monocytes, erythrocytes and platelets from human blood and relative tagging with diisopropylfluorophosphate (DFP). *Jlin. Med.* **73**, 1036-1041. 1969.
9. Loos, H. Schut, B.B. Kipp, B. Doorn, R. Meerhof, L.: Size distribution, electronic recognition and co-

- unting of human blood monocytes. *Blood*. **48**, 743–753. 1976.
10. Synderman, R. Altman, L.C. Hausman, M.S and Mergenhausen, S.E.: Human mononuclear leukocyte chemotaxis : A quantitative assay for fumoral and cellular chemotactic factors. *J. Immunol.* **108**, 857–860, 1972.
 11. Dekaris, D. Silobrcic, V. Mazuran, R and Lovrencic M.K.: Inhibition of monocyte Spreading. A direct *in vitro* test for assessing delayed-type *Hypersensitivity* in Man. : *Clin. Exp. Immunol.* **16**, 311–320. 1974.
 12. Mazuran, R. Mujagic, H. Malenica, B. and Silobrcic, V.: *In vitro* detection of cellular immunity to melanoma antigens in man by the monocyte spreading inhibition test. *Int. J. Cancer.* **17**, 14–20. 1976.

Isolation of monocytes in human peripheral blood

Part 1 by discontinuous density gradient

Kenta TAKASUGI

Department of Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. I. Kimura)

The isolation of monocytes in human peripheral blood by discontinuous density gradients was studied. Discontinuous density gradients were obtained by successive layering of bovine serum albumins into three layers in 10ml glass tubes. Buffy coat cells were layered on top of a gradient and centrifuged under various conditions of centrifugation. Optimal isolation was achieved by centrifugation on a three layer of 35—32—28% bovine serum albumin at 490g for 60 minutes. The purity, yield and recovery of monocytes at the interface between 35% and 32% bovine serum albumin were 54.0%, 7.0×10^5 and 22.0% respectively.

After centrifugation on Conray-Ficoll mixtures, the interface fraction containing lymphocytes was removed and the bottom fraction containing monocytes and other cells was centrifuged under various condition. The optimal condition was on a three layer of 35—32—28% bovine serum albumin at 400g for 40 minutes. The purity of monocytes by this method increased to 75% but the yield and recovery declined to 2.5×10^5 and 4.5% respectively.

From these data I concluded that isolation of monocytes from blood only on density gradients was difficult because of a partial overlap between monocytes and lymphocytes in the density distribution profiles.