

## アラマブルーを用いた稚仔魚の脾臓細胞幼若化の簡便測定法

八木 基明<sup>1</sup>, 榎本 六秀<sup>2</sup>, 矢田 修<sup>1</sup>, 旗先 好一<sup>2</sup>  
 中原 登<sup>2</sup>, 原 研治<sup>1</sup>, 橘 勝康<sup>1</sup>, 榎本 六良<sup>1</sup>

## A rapid and simple assay to determine the blastogenesis of fish larval splenocytes using Alamar Blue

Motoaki YAGI<sup>1</sup>, Mutsuhide TSUCHIMOTO<sup>2</sup>, Osamu YADA<sup>1</sup>, Kouichi HATASAKI<sup>2</sup>,  
 Noboru NAKAHARA<sup>2</sup>, Kennji HARA<sup>1</sup>, Katsuyasu TACHIBANA<sup>1</sup> and Mutsuyosi TSUCHIMOTO<sup>1</sup>

A rapid and simple colorimetric assay to determine the blastogenesis of fish larval splenocytes using Alamar Blue was studied. Splenocytes were separated by Percoll gradient from Japanese flounder (one year old), then the blastogenesis of splenocytes stimulated by mitogen (concanavalin A, pokeweed mitogen, or lipopolysaccharide) as detected using Alamar Blue. The relationship between number of splenocytes and specific absorbance at 72h incubation exhibited a positive, highly significant correlation of  $p < 0.001$ . Optimum condition of this assay at  $5 \times 10^5$  cells/well of separated splenocytes with mitogen (concanavalin A 100  $\mu$ g/ml, pokeweed mitogen 10  $\mu$ g/ml, or lipopolysaccharide 1  $\mu$ g/ml) for 72h at 25°. Splenocytes separation procedure was not required for this blastogenesis assay. Blastogenesis of each splenocyte from larva of Japanese flounder, Japanese parrotfish, and tiger puffer was detectable by this Alamar Blue assay. These results suggested that colorimetric assay using Alamar Blue might be of benefit in a host defense test of cultured fish larva against viral and/or bacterial infections.

**Key words:** 幼若化 blastogenesis, アラマブルー Alamar Blue, 稚仔魚 fish larva, 脾臓細胞 splenocytes

近年, 増養殖漁業では, 種々の感染症が多発し, 種苗生産や養殖漁業に甚大な被害を与えている<sup>1,2)</sup>。その対策として, 抗生物質や抗菌剤が投与されているが, それらの対処にも限界があり, 感染症にかかりにくい健康な種苗の生産が求められている。そこで種苗の健康度や耐病性の評価が必要であるが, 幼若種苗の免疫機能の測定方法の研究は比較的少なく, 特に全長1cm以下の稚仔魚期の健康度や耐病性の評価は極めて難しいのが現状である。

ところで魚類の免疫機能を測定する方法は, 一般的に哺乳類の免疫機能を測定する方法が用いられている。すなわち細胞性免疫機能の測定では貪食細胞である好中球やマクロファージを用いた貪食能<sup>3,4)</sup>やリンパ球を分裂促進物質で培養したときの幼若化が指標として用いられている<sup>5,6)</sup>。一方, 体液性免疫機能の測定では羊赤血球や細菌などを抗原として魚を免疫したときの抗体産生が指標として用いられている<sup>7,8)</sup>。これらの免疫機能の測定の中で貪食能や抗体産生の測定は一般の研究室で行えるが, リンパ球の幼若化については放射性同位元素である<sup>3</sup>Hチミジンの取り込みを用いた手法が一般的である<sup>9)</sup>。しかしながらこの方法では特殊な施設が必要であり, また廃棄物の処理の難点もあり一般の研究室で行うことは非常に困難である。また一部では, リンパ球の幼若化時に細胞のデヒドロゲナーゼ活性が上昇することを利用したMTTを用いた方法も用いられている<sup>6)</sup>。この方法は, 幼若化を吸光度の上昇で測定することができるが, 実験操作が極め

て煩雑であるという問題がある。ところが近年, 哺乳動物のリンパ球幼若化の測定のために開発された細胞増殖測定薬であるアラマブルーはそれ自体を培養液に添加し吸光度を測定するだけという簡単な操作で行え, これまでの測定法に比べ一般の研究室で迅速かつ簡便に行えることから注目され利用されつつある<sup>10)</sup>。

そこで本研究では, 種苗の生体防御能の一つとして脾臓細胞の幼若化能の測定を一般の研究室で行うための簡便な方法について検討した。

## 実験方法

## 供試魚

長崎市水産センターでふ化したヒラメ1年魚(魚体重200~300g)とTable 2に示す様なヒラメ(8週令 全長  $3.7 \pm 0.4$ cm), イシダイ(4週令  $0.7 \pm 0.1$ cm), トラフグ(4週令  $0.8 \pm 0.1$ cm)の各稚仔魚を用いた。

## ヒラメ1年魚脾臓細胞のマイトーゲンによる幼若化

脾臓細胞の幼若化はAhmedらの方法<sup>10)</sup>に準じて行った。ヒラメ1年魚の後脳部を切断後失血死させ, 脾臓を無菌的に摘出した。これを海産魚の浸透圧となるよう, 0.53%NaClを添加したRPMI1640培地(FRPMI培地)中でピンセットを用い組織をほぐし遠心分離(1,500rpm, 15min)した。遠心後沈

\*1 〒852-8521 長崎市文教町1-14 長崎大学大学院海洋生産科

\*2 〒852-8521 長崎市文教町1-14 長崎大学水産学部

殿に5%牛胎児血清, ペニシリンG, ストレプトマイシンを添加したFRPMI培地(CFRPMI培地)で再浮遊させ27Gのツベルクリン針中を勢いよく通過させ, Single Cell浮遊液とし, Percoll濃度勾配遠心で赤血球を除去後, 再びFRPMI培地を用い脾臓細胞浮遊液とした。なお, 細胞数の測定は浮遊液のメイ・ギムザ染色とトリパンブルー染色細胞の計数で行った。96穴マイクロテストプレート(FALCON, No.3072)に脾臓細胞浮遊液100 $\mu$ lと各マイトーゲン溶液50 $\mu$ l(コンカナバリンA: ConA C-0412, SIGMA社, ポークウイドーマイトーゲン: PWML-9379, SIGMA社, リボポリサッカライド: LPS, *E. coli*, SIGMA社)を加え, 炭酸ガス培養装置(25%CO<sub>2</sub>)内で48時間培養した。培養後, アラマーブルー(Alamar Biosciences社製)20 $\mu$ lを添加して24時間培養した。これをマイクロプレートリーダー(測定波長570nm及び副波長600nm)で測定した。

#### 稚仔魚の脾臓細胞の調整と幼若化

各稚仔魚より実体顕微鏡下で無菌の注射針を用いて脾臓を摘出した。これをFRPMI培地で4回以上洗浄した後, ヒラメ1年魚と同様にピンセットでほぐし, 27G注射針を通過させ, Single Cell浮遊液を調整し, ヒラメ1年魚と同様に培養した。なお, 稚仔魚の脾臓細胞については濃度勾配遠心による赤血球の除去操作を行わなかった。

#### 結 果

##### 各マイトーゲンで培養した脾臓細胞数の経時的変化及び細胞数と吸光度の関係

ヒラメ脾臓細胞を各種マイトーゲン添加と無添加で培養を行い, 経時的に細胞数の変化を測定したところ, マイトーゲン無添加では3日間の培養を通して細胞数の顕著な変化は認められなかった。一方, マイトーゲン添加では培養時間の経過に呼応して細胞数が増加し, その増加の程度はPWM 10 $\mu$ g/ml, ConA 100 $\mu$ g/ml, LPS 1 $\mu$ g/mlの順で高かった(Fig.1)。各培養72時間目の細胞数とアラマーブルー添加による吸光度の関係は, 細胞数の増加に呼応してその吸光度はほぼ直線的に上昇し, 両者の間には有意な正の相関関係( $r=0.9914$ ,  $n=12$ ,  $p<0.001$ )が認められた(Fig.2)。

##### 最適マイトーゲン濃度

脾臓細胞を種々のマイトーゲン濃度で培養した結果をTable 1に示した。ConAでは, 10~250 $\mu$ g/mlで培養したところアラマーブルー添加による吸光度は, ConAの濃度の上昇に伴い直線的に上昇し, 100 $\mu$ g/mlで最大の吸光度0.166を示し, 250 $\mu$ g/mlでは低下した。PWMでは, 1~100 $\mu$ g/mlで培養したところ, 吸光度は10 $\mu$ g/mlで最大の吸光度0.178を呈し, その後濃度の上昇とともに徐々に低下した。また最大の吸光度を呈した10 $\mu$ g/mlの値は無添加の場合の約2.1倍であった。LPSでは, 0.01~10 $\mu$ g/mlで培養したところ, 吸光度はLPSの濃度の上昇に伴い緩やかに上昇し, LPS 1 $\mu$ g/mlで最大の吸光度0.128を示した。これはマイトーゲン無添加の

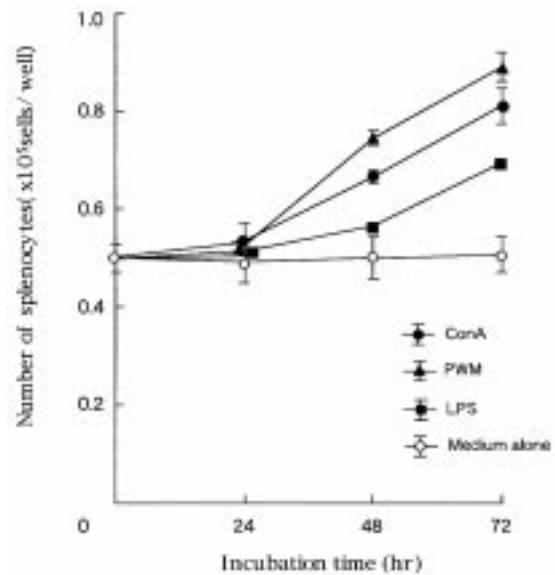


Fig. 1 Kinetics of mytogen stimulated splenocyte blastogenesis of Japanese frounder.

Splenocytes cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were incubated with or without ConA(100 $\mu$ g/ml), PWM(10 $\mu$ g/ml), or LPS(1 $\mu$ g/ml). The cells were then incubated at 25 for each incubation time in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air. Results are means  $\pm$  SD for triplicate cultures. Representative data obtained in 3 independent experiments.

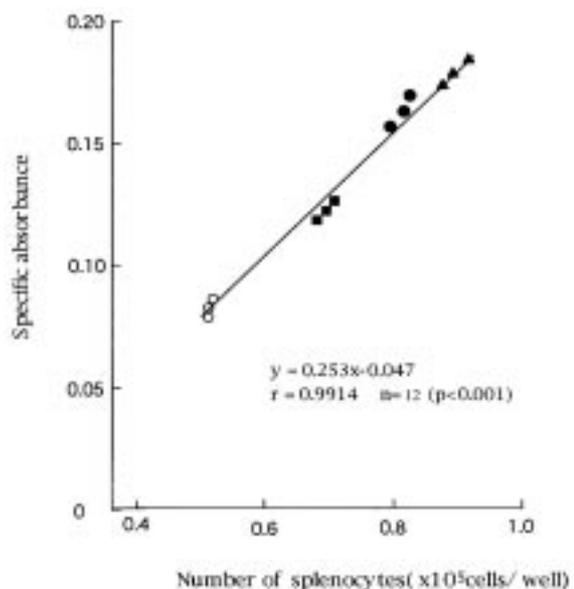


Fig. 2 Relationship between cells number and specific absorbance. Each point shows number of splenocytes and specific absorbance after 72 h incubation.

培地のみ吸光度の1.5倍であった。LPS 10 $\mu$ g/mlでは吸光度は低下した。各マイトーゲンで培養したヒラメ脾臓細胞のアラマーブルーによる最適な発色を呈したマイトーゲン濃度は, ConA 100 $\mu$ g/ml, PWM 10 $\mu$ g/ml, LPS 1 $\mu$ g/mlであった。

**Table 1.** Dose-response effects of ConA, PWM, and LPS on splenocyte blastogenesis of Japanese flounder

Dose (μg/ml) <sup>a</sup>	Specific absorbance±SD		
	ConA	PWM	LPS
Medium alone	0.085±0.002 <sup>b</sup>		
0.01	ND <sup>c</sup>	ND	0.092±0.001
0.1	ND	ND	0.101±0.003
1	ND	0.138±0.011	0.128±0.004
10	0.091±0.007	0.178±0.007	0.105±0.010
25	0.108±0.005	0.156±0.005	ND
50	0.125±0.006	0.122±0.012	ND
100	0.166±0.016	0.098±0.001	ND
250	0.122±0.022	ND	ND

<sup>a</sup>Splenocytes cells( $5 \times 10^5$  cells /well) were incubated with or without different amounts of ConA, PWM, or LPS. The cells were then incubated at 25°C for 72 h in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air. Alamar Blue was added to 24 h post culture set up. The optical density was measured with a Titertec Multiskan plate reader at 570 nm and 600 nm.

<sup>b</sup>Mean±SD of triplicate cultures. Representative data obtained in 3 or more independent experiments.

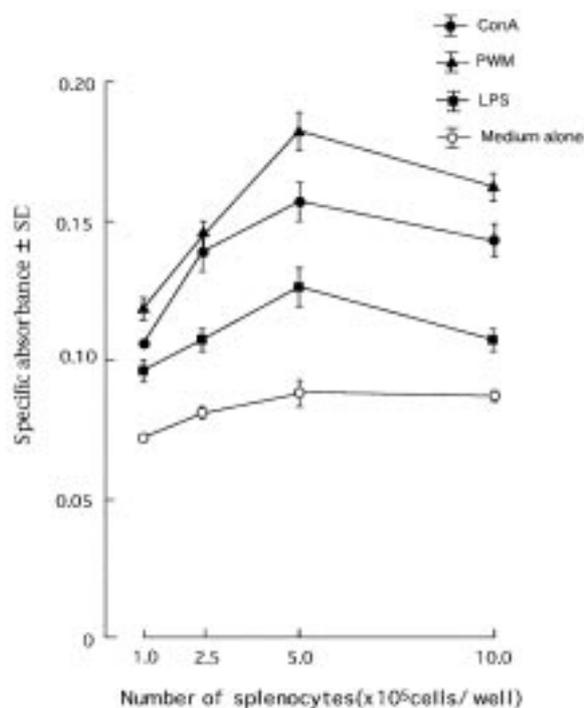
<sup>c</sup>ND, not done.

**最適培養細胞数**

最適培養細胞数を決定するために、種々の脾臓細胞で各種マイトーゲン添加培養した結果をFig.3に示した。脾臓細胞数 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ cells/wellでマイトーゲン無添加培地のみで培養したところアラマブルー添加による吸光度は脾臓細胞の上昇に伴い緩やかに上昇し、 $1 \times 10^5$ cells/wellでの吸光度は0.072を示したのに対し、 $10 \times 10^5$ cells/wellでは吸光度は0.087であった。ConA100 μg/mlでは、細胞数の増加に呼応して吸光度は上昇し、 $10 \times 10^5$ cells/wellでは吸光度は若干低下した。本条件で最大の吸光度 (0.157) を示した脾臓細胞数は $5 \times 10^5$ cells/wellで、同じ脾臓細胞数における培地のみでの培養による吸光度の約1.8倍を呈した。PWM10 μg/mlでは、細胞数が $5 \times 10^5$ cells/wellまでは細胞数の増加に伴って吸光度は上昇し、 $10 \times 10^5$ cells/wellでは吸光度は低下した。このときの最大の吸光度 (0.182) を呈した脾臓細胞は $5 \times 10^5$ cells/wellで、培地のみでの培養による吸光度の約2.1倍であった。LPS1 μg/mlでは、細胞数の増加に呼応して吸光度は上昇し、 $10 \times 10^5$ cells/wellでは吸光度は低下した。このときの最大の吸光度を示した脾臓細胞数は $5 \times 10^5$ cells/wellで、培地のみでの培養による吸光度の約1.4倍であった。各マイトーゲンで培養した種々の脾臓細胞数による吸光度の変化を総じてみると、すべての細胞数でマイトーゲン添加によって吸光度は上昇したが、その上昇の程度は $5 \times 10^5$ cells/wellで最も高く至適であった。

**赤血球存在、非存在下におけるヒラメ脾臓細胞の幼若化**

仔稚魚から脾臓細胞を調整する場合、採取可能な細胞数が極めて少ないため赤血球の除去作業は極めて困難である。そこで調整脾臓細胞より赤血球を除去しなかった赤血球存在下と、除去した非存在下で幼若化の検討を行った結果をFig.4



**Fig. 3** Effect of splenocyte number on mitogen stimulated blastogenesis of Japanese flounder.

Mononuclear cells ( $5 \times 10^5$  cells /well) were incubated with or without ConA(100μg/ml), PWM(10μg/ml), or LPS(1μg/ml). The cells were then incubated at 25 for 72 h in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air. Alamar Blue was added to 24 h post culture set up. The optical density was measured with a Titertec Multiskan plate reader at 570 nm and 600 nm. Results are means ± SD for triplicate cultures. Representative data obtained in 3 independent experiments.

に示した。培地のみでの培養、ConA100 μg/ml添加培養とともに、赤血球存在下 (赤血球割合約50%) は非存在下 (赤血球割合5%未満) に比較して若干高い吸光度を示したが、脾臓細胞数の増加に伴う吸光度の変化は先に述べた傾向とほぼ同様であった。

**稚仔魚の脾臓細胞数**

魚体の小さな稚仔魚での測定の可否を検討するため、ヒラメ (8週令)、イシダイ (4週令)、トラフグ (4週令) の各稚仔魚から採取した脾臓細胞をTable 2に示した。各魚種より採取された脾臓細胞数は、ヒラメ $11.5 \times 10^5$ cells/尾、イシダイ $3.3 \times 10^5$ cells/尾、トラフグ $4.6 \times 10^5$ cells/尾であった。

**各稚仔魚脾臓細胞のマイトーゲンによる幼若化**

ヒラメ (8週令)、イシダイ (4週令)、トラフグ (4週令) の各稚仔魚の脾臓細胞を各マイトーゲンで培養した結果をTable 3に示した。ConA (100 μg/ml) で培養したところ、吸光度は無添加の培地に比較してヒラメで約2.9倍、イシダイで約2.7倍、トラフグで約2.2倍の吸光度を呈した。PWM(10 μg/ml)では、ヒラメで約3.0倍、イシダイで約2.7倍、トラフグ

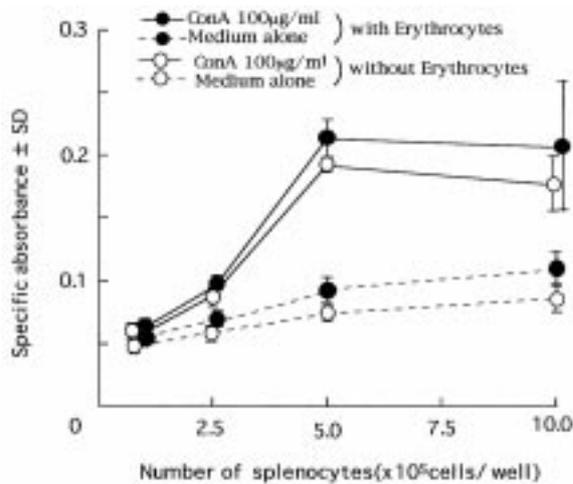


Fig. 4 Effect of presence of erythrocytes on mytogen stimulated splenocyte proliferation of Japanese flounder.

Indicated numbers of splenocytes with or without erythrocytes were incubated with or without ConA (100µg/ml). The cells were then incubated at 25 °C for 72 h in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air. Alamar Blue was added to 24 h post culture set up. The optical density was measured with added to 24 h post culture set up. The optical density was measured with a Titertec Multiskan Plate reader at 570 nm and 600 nm. Results are means ± SD for triplicate cultures in three independent experiments.

Table 2. Total body length and number of splenocytes

Specimen	n	Total body length (cm)	Spleen mononuclear cells (10 <sup>5</sup> cells/ larva)
Japanese flounder	9	3.7±0.4 <sup>a</sup>	11.5
Japanese parrotfish	48	0.7±0.1	3.3
Tiger puffer	23	0.8±0.1	4.6

<sup>a</sup>Mean ±SD of total larvae

Table 3. Mitogen induced splenocyte blastogenesis

Mitogen <sup>a</sup>	Japanese Flounder	Japanese parrotfish	Tiger puffer
Medium alone	0.097±0.015 <sup>b</sup>	0.099±0.005	0.091±0.032
ConA(100µg/ml)	0.288±0.042	0.267±0.006	0.217±0.062
PWM(10µg/ml)	0.295±0.086	0.273±0.003	0.242±0.028
LPS(1µg/ml)	0.155±0.035	0.142±0.003	ND <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Splenocytes (5 × 10<sup>5</sup> cells /well) from each larva were incubated with or without ConA, PWM, or LPS. The cells were then incubated at 25°C for 72 h in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air. Alamar Blue was added to 24 h post culture set up. The optical density was measured with a Titertec Multiskan plate reader at 570 nm and 600 nm.

<sup>b</sup>Mean±SD of triplicate cultures. Representative data obtained in 2 or more independent experiments.

<sup>c</sup>ND, not done.

で約2.4倍の吸光度を呈した。LPS (1 µg/ml) では、ヒラメで約1.6倍、イシダイで約1.4倍の吸光度であった。

## 考 察

稚仔魚の脾臓細胞の幼若化を一般の研究室で簡便に測定する方法を確立するため、細胞増殖測定用色素アラマープルーを用いた方法での確立を試みた。

ConA, PWM, LPSの各マイトーゲンで脾臓細胞を培養したところ、マイトーゲンの種類によって異なった幼若化の様相が認められた。ヒトリンパ球をConA刺激するとT細胞が、PWMではT細胞とB細胞が幼若化するとされ、LPSではマウスリンパ球のB細胞が幼若化するとされている<sup>11)</sup>。本研究で用いたヒラメ脾臓細胞がT細胞とB細胞などに分化しているか否かは明確ではない。ともあれ、マイトーゲンの種類による幼若化の差が示唆された。一般にリンパ球の幼若化の測定に使われている [<sup>3</sup>H] チミジンを用いた方法<sup>9)</sup>は、幼若化に伴うDNA合成時に [<sup>3</sup>H] チミジンがどれだけDNA塩基として取り込まれるかをRIの放射活性で測定している。しかし [<sup>3</sup>H] チミジンはその管理のみならず、廃棄物処理が難しく一般の研究室では用いることが不可能である。一方、MTTを用いた方法<sup>6)</sup>は細胞の幼若化時に上昇するデヒドロゲナーゼの活性をMTTを基質としてその分解産物として形成されるホルマザンの増加に伴う吸光度の変化を測定しており、これが幼若化程度を反映するとされている。しかしこれは操作が煩雑であり、熟練が必要とされている。本研究で用いたアラマープルーは動物細胞の増殖時に上昇するデヒドロゲナーゼ活性の上昇を、アラマープルーの還元に伴う吸光度の変化で測定するとされ<sup>10)</sup>、先のMTTと比較して操作が簡便に行えるという利点をもっている。また、培養終了時における細胞数と吸光度の間には直線性の高い有意な正の相関関係が認められ、アラマープルーによる発色でヒラメ脾臓細胞の幼若化反応を測定可能であると考えられた。

そこでアラマープルーを用いてヒラメ脾臓細胞の幼若化を測定するための至適条件を検討したところ、各マイトーゲン濃度はConA100 µg/ml, PWM10 µg/ml, LPS1 µg/ml, 脾臓細胞数5 × 10<sup>5</sup> cells/wellの条件が至適と考えられた。マイトーゲン濃度が最適濃度における脾臓細胞数10 × 10<sup>5</sup> cells/wellで培養したところ、吸光度は5 × 10<sup>5</sup> cells/wellより低下していた。これは細胞数に対して培地中の栄養素が不足したため72時間の培養では細胞活性がそれほど上昇しなかったためであろうと考察した。

アラマープルーを用いた脾臓細胞幼若化の測定は細胞の持つ酵素活性による吸光度で測定するため、培養液中に赤血球が混在すると吸光度測定の妨げになると考えられた。そこでヒラメ1年魚の脾臓細胞を用いて赤血球存在下と非存在下で検討を行ったところ、赤血球の存在下でも非存在下条件とほぼ同様の幼若化現象が認められ、十分測定が可能であると考えられた。

本法を用いてヒラメ(8週令)、イシダイ(4週令)、トラフグ(4週令)の各稚仔魚から脾臓細胞の採取を試み、各稚仔魚の脾臓細胞を各マイトーゲンで培養したところ、すべての魚種の脾臓細胞が各マイトーゲン刺激によって幼若化が認め

られた。これらのことより、本方法を用いることでヒラメのみならず、イシダイやトラフグの稚仔魚でも幼若化の測定が可能であると考えられた。

#### 文 献

- 1) 西岡豊弘, 古澤 徹, 水田洋之助: 種苗生産過程の海産魚介類における疾病発生状況 (1989~1994年). 水産増殖, 45, 285-290 (1997).
- 2) 室賀清邦: 海産魚介類の仔稚魚におけるウイルス性および細菌性疾病. 魚病研究, 30, 71-85 (1995).
- 3) F.Salati, Y.Ikeda, and R.Kusuda: Effect of *Edwardsiella tarda* Lipopolisaccharide Immunization on Phagocytosis in the Eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 201-204 (1987).
- 4) 楠田理一, 田中卓史: *Streptococcus sp.* に対するプリマクロファージの食菌作用に及ぼす抗体および補体のオプリーニン効果. 日水誌, 54, 2065-2069 (1988).
- 5) C. J. LoPresto, L. K. Schwarz, and K. G. Burnett: An *in vitro* culture system for peripheral blood leucocytes of a Sciaenid fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 5, 265-273 (1995).
- 6) J. G. Daly, A. R. Moore, and G. Olivier: A colorimetric assay for the quantification of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) splenocyte mitogenesis. *Fish Shellfish Immunol.*, 5, 265-273 (1995).
- 7) T. Nakanishi: Ontogenetic development of the immune response in the marine teleost *Sebastiscus marmoratus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 473-477 (1986).
- 8) 中西照幸: カサゴ *Sebastiscus marmoratus* の免疫応答。 . 養殖研究所研究報告 No. 3, 81-89 (1982).
- 9) M. J. Marsden, S. H. Hamdani, and C. J. Secombes: Proliferative responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, T and B cells to antigens of *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.*, 5, 199-210 (1995).
- 10) S. A. Ahmed, R. M. Gogal Jr., and J. E. Walsh: A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the blastogenesis of splenocytes: an alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods*, 170, 211-224 (1994).
- 11) 豊島 聡, 木元雅夫, 今井康之: 細胞増殖, 「続生化学実験講座5 免疫生化学研究法」(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, 1986, pp.193-213.