

ImmunoTox Letter

免疫毒性研究会：The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 5 No. 2 (通巻10号)2000

目次

おしらせ	1
我国での21世紀の免疫毒性研究	3
東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理学講座 免疫毒性研究会 代表幹事 名倉 宏	
免疫毒性研究会の学会化に寄せて	3
帝京大学薬学部環境衛生学教室 免疫毒性研究会 幹事 大沢 基保	
「免疫毒性試験プロトコール」第4回 マウスリンパ節細胞の サイトカインの定量的PCR	5
株式会社資生堂ライフサイエンス研究センター 柴田 道男	
マウス血液サンプルにおけるサイトカイン 発現レベルのRT-PCRによる解析法	7
帝京大学薬学部環境衛生学教室 大塚 文徳	
マスト細胞MCP-1のイムノアッセイ及び RT-PCRによる定量	9
国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部 奥貫 晴代, 手島 玲子, 澤田 純一	
マウス脾臓細胞を用いた 細胞内サイトカイン検出法	12
財団法人残留農薬研究所 小坂 忠司, 竹内 幸子	
国際学会情報	16

第7回免疫毒性研究会報告

平成12年9月25、26日の両日第7回免疫毒性研究会が、上田志朗(千葉大・薬)実行委員長の運営により、千葉大学けやき会館にて、116名の参加者の下に開催された。今回は海外からの招待講演者として、米国Virginia Polytechnic InstituteのSteven D. Holladay助教授をお招きし、ご講演をお願いした。Holladay助教授からは、ダイオキシン(TCDDとその類似化合物)によって展開される免疫毒性に関して、ダイオキシンの免疫機能に及ぼす影響とヒトへの関わり合いについて、今後の検討課題も交えてご講演頂いた。ワークショップでは「医薬品の免疫毒性評価手順を検討するための共同研究」と題して、製薬協が安研協の参加の下に、代表的な化合物を用いて病理・血液学的所見と免疫機能との関連性を調べ、医薬品の免疫毒性評価に

おけるそれぞれの試験の位置付けについて報告し、各報告毎に活発な質疑応答がなされた。今回の研究報告は今後の医薬品開発における免疫毒性検討に貴重な情報を提供し得るものと考えられ、その意義は大きい。シンポジウムにおいては、臨床例における薬剤・化学物質による免疫毒性について、症例を中心に報告が行われた。それぞれの報告ではヒトにおける薬剤・化学物質の免疫毒性に起因する副作用の激しさが示され、医薬品開発時の免疫毒性検討の重要性が暗示され、聴講者にはそれぞれの立場で感ずるところの多い報告であった。特別講演として、千葉大・大学院医学研究科・遺伝子制御学の齋藤隆教授から「アレルギー性疾患とFc receptor」について講演を頂き、多くのアレルギー性疾患の誘導がFcレセプターを介して行われており、治療応用への重要性和奥深さが理解できた。一般演題は21題の応募があり、いずれの演題においても活発な討議が行われ、当研究会の趣旨に沿うものであった。

総会報告

第7回免疫毒性研究会の総会において以下のことが報告され、承認された。

1. 会計報告：平成11年度収支決算報告、平成13年度予算案(次ページ)
2. 当研究会名称の変更：発足当時の相互に討議する場としての「研究会」は、概ねその目的を達成した現在、更なる飛躍のために名称を「免疫毒性学会」(仮称)とする幹事会提案
3. 次会第8回免疫毒性学会予告：
実行委員長 香山不二雄(自治医大)

(記：牧幹事)

第8回免疫毒性学会(仮称)予告(1報)

日時：2001年9月17日(月)～18日(火)

場所：栃木総合文化センター(宇都宮市)

組織委員長：(学会長) 名倉 宏(東北大学医学部)

実行委員長：(年会長) 香山不二雄(自治医大)

免疫毒性研究会 平成11年度(1999年度) 収支決算報告

収 入

(単位：円)

科 目	予 算	決 算	備 考
前年度(H10年度)繰越金	2,055,140	2,169,315	
H11年度会費	1,020,000	996,000	内訳 一般会員 4,000 × 237=948,000 学生会員 2,000 × 4=8000 賛助会員 20,000 × 2=40,000 未納者(一般：23、学生：2)名
H10年度までの会費	0	38,000	内訳 一般：4,000×9、学生：2,000×1
第6回研究会返還金	0	165,349	
預金利子	2,000	2,895	
雑収入	0	0	
収入合計	3,077,140	3,371,559	

支 出

科 目	予 算	決 算	備 考
第7回研究会運営費	600,000	600,000	
会議費	150,000	184,787	交通費他
通信費	150,000	79,680	切手代、宅配便代
News Letter印刷費	200,000	151,200	No.8の1回のみの発行
事務費	200,000	64,957	文具、アルバイト代、振込料、等
予備費	1,777,140	0	
次年度への繰越金	0	2,290,935	12年度への繰越金
支出合計	3,077,140	3,371,559	

収支報告につき、平成12年8月21日、高橋道人監事により監査を受け、さらに9月25日の総会にて承認を受けております。

免疫毒性研究会 平成13年度(2001年度) 予算

収 入

(単位：円)

科 目	予 算	備 考
前年度(H12年度)繰越金見込み額	2,000,000	
H13年度会費	1,020,000	内訳 一般会員 4,000 × 250=1,000,000 賛助会員 20,000 × 1=20,000
預金利子	2,000	
雑収入	0	
収入合計	3,022,000	

支 出

科 目	予 算	備 考
第9回研究会運営費	600,000	
会議費	300,000	交通費他(幹事の増員のため)
通信費	150,000	
News Letter印刷費	300,000	2回分
事務費	200,000	文具、アルバイト、振込料金、等
予備費	100,000	
次年度への繰越金見込み額	1372000	
支出合計	3,022,000	

予算案につき、平成12年9月25日の総会にて承認を受け予算となっております。

我国での21世紀の免疫毒性研究

免疫毒性研究会 代表幹事 名倉 宏
(東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理学講座)

免疫毒性研究会は、2001年度より免疫毒性学会（仮称）として再出発することが総会で決定された。これまでの7年間にわたる研究活動を通じて、日本国内でも免疫毒性学は一つの学問領域として社会医学のみならず広く自然科学界や製薬業界、行政にも認知させることができ、その概念もほぼ定着したものである。その研究体制や研究組織も整備されつつあり、研究会の当初の目的はほぼ達成されたと考えている。しかし、免疫毒性研究は前臨床段階の研究や技術開発から、さらに国際的には免疫毒性試験のガイドライン化が行なわれつつあり、分子レベルでの基礎研究、および臨床医学や環境保健からの臨床応用が飛躍的に進んだ。日本でもこうした国際レベルでの研究の推進とその組織化、国民の健康福祉への貢献をはかるためにも現在の研究会組織では不十分といわざるを得なく、新しいミレニアムをむかえるにあたって、学会組織として充実を計ることが急務となっている。

従来毒性研究は、毒物が直接に生体の組織細胞に作用した結果惹起される代謝機能や形態変化を観察、検討する急性毒性あるいはいわゆる毒性学が主体となっていたが、近年毒物に対する生体反応とその結果引き起こされる組織細胞の傷（障害）といった慢性毒性が注目されている。前者が毒物の特徴的な化学構造とそれによる生体の構造機能の破壊が毒物の量に依存しているのに対して、免疫毒性は生体の感受性、すなわち、免疫臓器組織の反応性や毒物が作用した記憶（概応）等が重要な影響を及ぼしている。それ故その基礎研究やその臨床や環境保健、薬剤の安全性試験への応用には、毒性学以外の免疫学の基礎研究者や臨床医学者へも研究の輪を広げる必要がある。

その意味でも免疫毒性研究会の学会化は21世紀における日本での免疫毒性研究にとって必然であった。研究会会員の皆様にはその主旨と免疫毒性研究の現状を十分に御理解いただき、21世紀における免疫毒性研究とそれをささえる学会の発展のために、研究活動を推進されるとともに、建設的な御提言と御協力を切にお願いいたします。

免疫毒性研究会の学会化に寄せて

大沢 基保
(帝京大・薬・環境衛生)

さる9月の第7回免疫毒性研究会・総会において、2001年度より免疫毒性研究会は日本免疫毒性学会（仮称）と改称することが承認され、研究会を学会としての活動に発展させることになりました。総会に出席されなかった会員諸氏には、急な展開でとまどわれるかと思いますが、「21世紀の免疫毒性研究」と題する名倉代表幹事の文の中に述べられておりますように、より一層の研究展開のために学会移行を必要とする時期になりましたことをご理解頂きたいをお願い申し上げます。

学会化の話は、免疫毒性研究が学域として社会的に認知されるようになった近年、運営委員会や幹事会でたびたび話題になっていたのですが、昨年末の名倉先生のご発議により、一気に機運が盛り上がり、総会での決定に至りました。

1. 免疫毒性研究を取り巻く状況

免疫毒性研究会は、7年前に有志世話人の呼びかけにより、境界領域研究分野である免疫毒性とその関連事項の研究について、研究領域の異なる研究者間での情報交換、研究協力を通して、免疫毒性の研究概念と方法の開発・確立を目的として設立されました。当時、この分野の研究が国際的に遅れていたわが国にとって、共通の研究対象や方法について研究者が意見や成果を交わす場をつくり、免疫毒性試験のガイドラインが提案されつつある欧米の研究状況からの遅れを取り戻すことが当面の課題でした。

7年の活動を通じ、不十分な面はありますが、この当初の課題はほぼ達成出来たのではないかと考えられます。すなわち、免疫毒性の概念がかなり明確になってきたこと、試験法ワークショップを通して免疫毒性試験法の要点が技術的にも把握され、かつ独自の試みがなされるようになってきたこと、内外の招待研究者の講演を通じ、免疫毒性研究の深さや応用性、また、周辺の研究領域との関連の強さを学ぶことができたこと、さらに、個々の研究者の研究レベルが急速に高まりかつ対象も広がってきたことや共同研究が進んでいること、などがあげられます。

これは当初より250-60名ほどの会員数で、まとまりが良く、単なる成果の発表だけの場ではなく、考え方や方法について気軽に意見を交換しやすいなどの、研究会の長所が生かされた結果ではないかと我田引水的に考えています。

しかし、国際的には免疫毒性試験のガイドライン化が進み、一方、研究内容も基礎的には分子レベル、また、応用的には臨床レベルや環境保健レベルの研究が増え、研究の深さと広がりを増しています。知識的には、Th1/Th2バランスの仮説の展開、各種サイトカイン・ケモカインやその受容体の構造と役割の解明、免疫関連遺伝子の単離、神経-内分泌-免疫系の相関など、また、技術的にはPCR法やフローサイトメトリーの導入など、免疫毒性のバックグラウンドの研究の進展は著しく、それらの知識や技術が、免疫毒性研究に積極的に取り入れられています。今後、ヒト全ゲノムの解読やジーンチップの開発の成果も間もなく組み込まれてくるでしょう。

欧米研究グループの先取り精神は、ヒトでの免疫毒性試験法の開発や環境リスク評価への疫学的応用、化学物質により誘発される自己免疫に関する研究、バイオ医薬品の安全性評価などのプロジェクトへの集中的な取り組みに見ることが出来ます。

これに対して、日本の免疫毒性研究レベルは、前記の研究会の目的を達していますが、研究の組織化、体系化、個々の内容の深さ等において全体としてみるとかなり不十分と言わざるを得ません。しかし、研究会の活動を通じて、若い研究者の方々を中心として、これらの先進的課題に積極的に取り組む試みがなされていることは心強い限りです。

2. 学会としての役割と期待

学会化に伴う免疫毒性研究の次の役割としては、免疫毒性研究の内容を深めて「学」として展開し、かつ、実用面の意義と方法論を確立することがあげられます。そのためには、免疫毒性がらみの研究課題は増えつつある状況からすると、研究の質と量の拡充を図り、とりわけ臨床や衛生現場の医師や研究者、また、毒性学以外の分野の基礎研究者との連携が必要と思われます。

学会になり、規模が拡大すると、研究課題への関心の一体感が薄くなり、コミュニケーションも疎になる傾向があります。学会として、適切な規

模を維持し、まとまりの良さと忌憚のない意見交換により実質的に得るものがある免疫毒性研究会の長所を残しながら、かつ先進的に問題を提起し、活発な論議により学説が形成されていくような場になってほしいと考えています。

1980年代末頃から、免疫毒性に関連する現象に免疫系を攪乱する (disrupt immune system) という表現が用いられていました。しかし、社会問題化した内分泌かく乱化学物質の研究の勢いは、この観点からの免疫毒性の研究の勢いを一気に追い越し、「かく乱」という語の定番になった観があります。しかし、免疫系、内分泌系、神経系などの生体のホメオスタシスに係わる機能の毒性は、ホメオスタシスのかく乱という点で、かなり類似かつ相互に関連する部分が多いと考えられます。そこで、新しい学会名は仮称ですが、「毒性」のイメージをより今日的な概念に置き換えられないかと考え、「免疫攪乱学会」、「生体異物免疫学会」、「環境免疫学会」、「毒性免疫学会」、「免疫異常学会」、「応用免疫学会」などと思いつくままにあげてみましたが、どれも収まりが悪かったり、部分的であったり、広すぎたりして、今のところ「免疫毒性学会または免疫毒性科学会」を超える良いネーミングが思いつきません。

今日、トキシコロジーに関わる知見の増加により、免疫毒性の研究対象も胎児期・乳幼児期あるいは老年期における影響の重要度が増してきました。免疫器官・機能の発生・分化・加齢変化を考慮し、化学物質や薬物の曝露/投与時期によって免疫影響の質と意義を考える必要があります。一方、化学物質過敏症のような、新しいアレルギー様疾患像が浮かび上がってきました。この疾患の発症における免疫学的機序の関与は少ないと考えられていますが、麻酔薬ハロタンによる自己免疫性アレルギーである劇症肝炎の発症には、ハロタン代謝物の蓄積効果が関連するとの報告もあり、揮発性有機物の代謝物の蓄積効果による類似の免疫異常である可能性もあります。さらに、遺伝子組換え産物 (バイオ医薬品、GM食品など) の利用の拡大に対して、アレルギー面の評価においてはまだ未知の部分が残されている----などなど、免疫毒性の研究範囲に入ってくる課題は極めて多いと考えられます。21世紀の開始とともに、これらの課題や免疫毒性研究会の発足時以来の課題を含めて、免疫毒性学の分野で取り組まなければならない課

題が急増することが予想されます。

そのようなNeedsに応える備えとして、学会の種まき (Seeds) 活動が着実に重ねられていくことを期待しています。

免疫毒性試験プロトコール 第4回

マウスリンパ節細胞の サイトカインの定量的PCR

柴田道男

(株式会社資生堂 ライフサイエンス研究センター)

A. 解説

化学物質等の皮膚感作性を評価する方法としては、モルモットを使用するMaximization Test等が汎用されている。これに対し、使用動物数の削減を目指してマウスを用いたLocal Lymph Node Assay(LLNA)が開発され、OECDガイドラインNo.406 (皮膚感作性)にも収載されている⁽¹⁾。さらにその後、スクリーニング方法としてではなく独立の感作性試験としての評価を得るに至っている⁽²⁾。LLNAはモルモットを用いた方法に比べ、検出感度が落ちる反面、評価が客観的で、動物福祉の観点からも望ましいと考えられ、また様々な免疫学的基礎データを得ることもできる利点がある。我々は、LLNAの変法として、アイトープを使用せずに、IL-2の放出量をELISAで測定するex vivo LLNA法 (CII法)を既に報告している^(3,4)。次にex vivo LLNA法の感度をさらに高めるために、感作性の成立に関与する種々のサイトカインのリンパ節細胞における遺伝子発現を指標とする方法を開発した⁽⁵⁾。本法の特長は、蛍光プローブを用いたRT-PCR法によって目的とするサイトカインのcDNA量を精度よく測定する点と、リンパ節細胞のIL-2、IL-4などのサイトカイン遺伝子の発現増加率を、外部標準RNAとして加えたラットpoly(A)⁺RNA由来のGAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) cDNA量を用いて補正するという点である。事前の検討としてTNCBで感作誘導したリンパ節細胞のIL-2の発現をRT-PCRで検出した結果、GAPDHの変動が大きく、内部標準として使用できなかった (図1)。そこで我々は、新たにラッ

トpoly(A)⁺RNAを外部標準として添加することで細胞集団全体での発現量の補正を行うこととした。

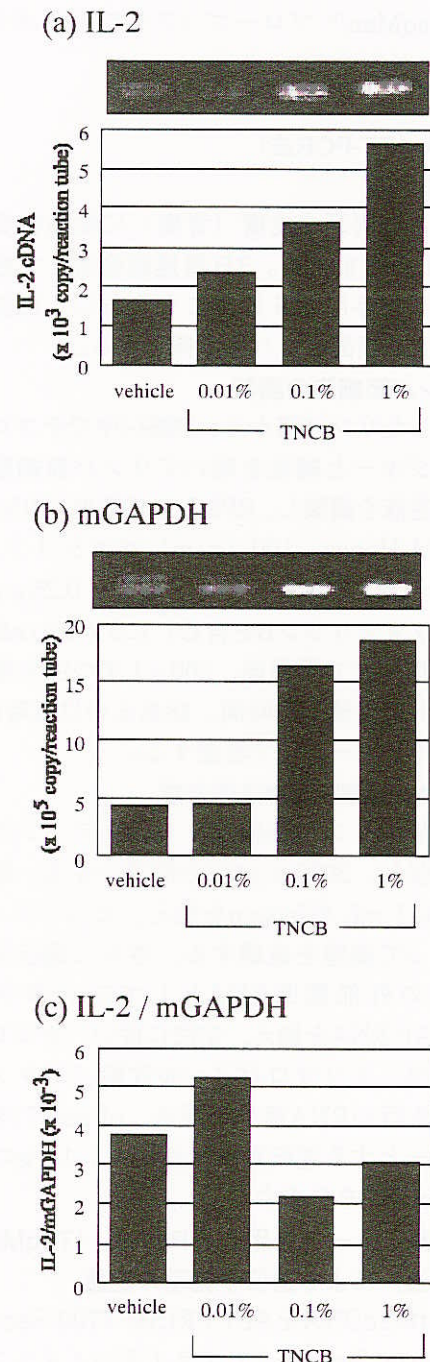


図1 マウスリンパ節細胞のIL-2の発現

B. 実験方法

1. 動物

メス8-12週令のC3H/HeNマウス (日本SLC) を実験に用いた。LLNAの原著では雌のCBA/CaあるいはCBA/J系マウスが使用されている (詳細はImmunoTox Letter Vol. 5, No. 1, p10, 2000を参照)。

2. 試薬

ラット poly(A)⁺ RNA、Isogen (ニッポンジーン)、M-MLV逆転写酵素、oligo(dT)プライマー (GIBCO BRL)、TaqManTM プローブ (アプライドバイオシステムズ)

3. LLNA (RT-PCR法)

(1) 感作誘導

マウスの両耳介皮膚 (背側) に被験物質溶液 25 μL を塗布する。3日間連続塗布して感作誘導し、投与開始 6 日目にも塗布して再誘導する。翌日頸部リンパ節を採取する。

(2) リンパ節細胞の調製

採取したリンパ節から、PBS(-)中でテフロンプランジャーと綿栓を用いてリンパ節細胞の細胞浮遊液を調製し、RPMI-1640培地 (10%FBS、25mM HEPES、100 μg/mL ペニシリン、100 units/mL ストレプトマイシン、0.25 μg/mL アンフォテリシンBを含む) に 5 × 10⁶ cells/mL の細胞密度で懸濁後、200 μL ずつ 96穴培養プレートに播種し24時間、48あるいは72時間CO₂ インキュベーターで培養する。

(3) RNAの調製とcDNAの合成

培養後のリンパ節細胞をピペッティングにより回収し、2000 x gで5分間遠心する。細胞の沈殿に1 mL のIsogenを加え、ピペッティングによって細胞を破壊する。さらに遺伝子発現定量の外部標準RNAとして5 ngのラット poly(A)⁺ RNAを加え、定法に従い、クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿、エタノール沈殿を行いRNA画分を得る。oligo(dT)をプライマーとする逆転写酵素反応で、1 μgのRNAからcDNAを合成する。

(4) 蛍光プローブを用いたPCR法 (TaqManTM PCR法) による遺伝子発現の定量

得られたcDNAをABI PRISM 7700 Sequence Detector System (アプライドバイオシステムズ社) を用いて定量する。この方法の原理を図に示した (図2)。DNAの伸長反応と共に解離するレポーター色素の蛍光が明確に認められるサイクル数と標準試料のコピー数の対数が直線関係になることを利用して試料中のcDNAコピー数を算出する。なお、IL-2、IL-4 およびラットGAPDHのプライマーと蛍光プローブの配列を表1に示した。

図2 定量的PCR法(TaqManTM PCR)

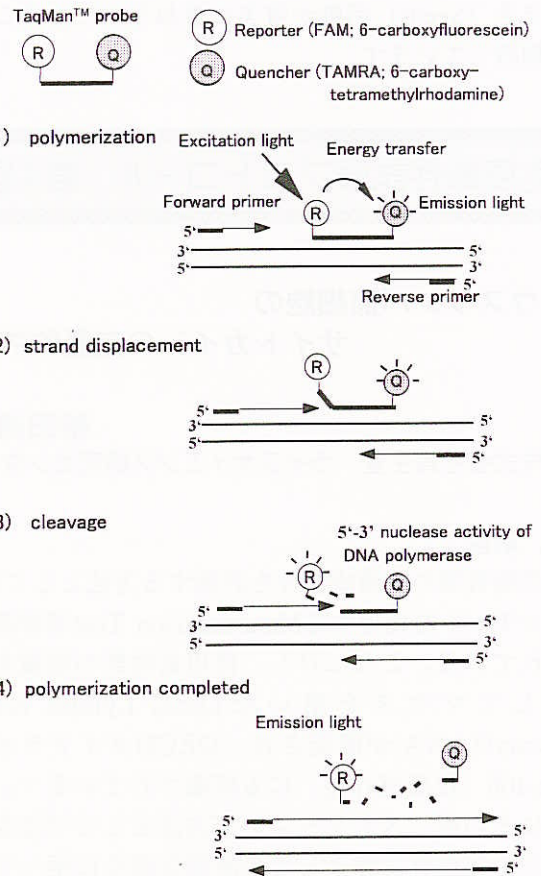


図2 定量的PCR法(TaqManTM PCR)

表1 プライマーと蛍光プローブのDNA配列

rat GAPDH	フォワードプライマー	5'-GTTACCAGGGCTGCCTTCTC-3'
	リバースプライマー	5'-GGGTTCCTCCGTTGATGACC-3'
	蛍光プローブ	5'(FAM)-AACGGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-(TAMRA)p3'
mouse IL-2	フォワードプライマー	5'-TCACAGTGACCTCAAGTCCTGC-3'
	リバースプライマー	5'-TGTTGACAAGGAGCACAAGTGTC-3'
	蛍光プローブ	5'(FAM)-TGTACAGCATGCAGCTCGCATCTGT-(TAMRA)p3'
mouse IL-4	フォワードプライマー	5'-TTGTCTCTCGTCACTGACGCA-3'
	リバースプライマー	5'-TACGAAGCACCTTGGAGCC-3'
	蛍光プローブ	5'(FAM)-TCTCAACCCAGCTAGTTGTTCATCTCTG-(TAMRA)p3'

(5) 定量的PCRの標準試料

本法ではあらかじめ標準試料として、目的とする遺伝子に特異的なDNAの標準試料を調製しておく必要がある。遺伝子が十分に発現している細胞からcDNAを合成し、RT-PCRで十分に増幅した後、アガロースゲル電気泳動を行い、ゲルからPCR産物を切り出して、QIAGEN DNA extraction kitなど適当な方法でDNAを精製する。得られたDNAをプラスミドに組み込み増幅させ、シークエンスを確認した後、標準試料と

して用いる。簡便にはゲルから切り出し精製しただけの試料でも十分に実用できる。

C. データ処理

得られた結果はラットGAPDHの発現量で補正し、溶媒対照群の細胞全体の遺伝子発現に対する増加率(S.I.)として表す。

- a: 試料中のサイトカインmRNA量
 b: 5 ng ラットpoly(A)+RNA中のGAPDH mRNA量
 A: 定量的PCRでのサイトカインDNAの測定値
 B: 定量的PCRでのラットGAPDHの測定値
 c: cDNA合成に用いたmRNA量と試料中の総RNA量の比

$$\begin{aligned} A &= a \times c & B &= b \times c \\ A / B &= (a \times c) / (b \times c) = a / b \\ a &= b \times A / B \end{aligned}$$

Stimulation Index (S.I.): 細胞集団全体でのサイトカイン遺伝子の発現増加量の比
 $S.I. = a(\text{感作性物質適用}) / a(\text{溶媒適用})$
 $b(\text{感作性物質適用}) = b(\text{溶媒適用})$

$$\begin{aligned} S.I. &= \frac{b(\text{感作性物質適用}) \times A(\text{感作性物質適用}) / B(\text{感作性物質適用})}{b(\text{溶媒適用}) \times A(\text{溶媒適用}) / B(\text{溶媒適用})} \\ &= \frac{A(\text{感作性物質適用}) / B(\text{感作性物質適用})}{A(\text{溶媒適用}) / B(\text{溶媒適用})} \end{aligned}$$

D. 留意事項

- 最近では、アプライドバイオシステムズ社から様々なサイトカインに対するプライマーとプローブのセットが売り出されており、簡便である。
- さらに所属リンパ節重量とリンパ節細胞のCD4陽性細胞比の変化率を組み合わせた新しい指標CSI (Corrected Stimulation Index for cytokine mRNA expression) を用いて感作性を評価する方法も考案している¹⁶⁾。

E. 参考文献

- OECD Guideline for Testing of Chemicals No.406, Skin Sensitization, Adopted by the Council on 17th July 1992, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris (1992)
- The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds. NIH publication No.99-4494 (1999)
- Hatao, M., Hariya, T., Katsumura, Y. and Kato, S., A modification of the local lymph node assay for contact allergenicity screening: measurement of interleukin-2 as an alternative to radioisotope-dependent proliferation assay. *Toxicol.* 98, 15-22 (1995)
- Hariya, T., Hatao, M. and Ichikawa, H., Development of a non-radioactive endpoint in a modified local lymph node assay. *Fd. Chem. Toxicol.* 37, 87-93 (1998)
- Shibata, M., Hariya, T., Hatao, M., Ashikaga, T. and Ichikawa, H., Quantitative polymerase chain reaction using an external control mRNA for derermination of gene expression in a heterogeneous cell population. *Toxicol.Sci.* 49, 290-296 (1999)
- Hariya, T., Hatao, M., Shibata, M., Ashikaga, T. and Ichikawa, H., Immunogenicity of environmental haptens - Evaluation of immunogenicity of haptens by cytokine mRNA expressions in LLNA - . *Environ. Dermatol.* 5, 92-101 (1998)

マウス血液サンプルにおけるサイトカイン発現レベルのRT-PCRによる解析法

帝京大学薬学部環境衛生学教室 大塚文徳

A. 解説

環境因子や化学物質による免疫反応の変動を知るためのマーカーとして、ヒトやマウスから採取したサンプル中のサイトカインレベルを測定する必要性が高まっているが、ELISA法による測定では感度的に不十分であるケースが多い。一方、RT-PCRによるmRNA量の測定は高感度であり、種々のサイトカインに関して詳しい実験法の解説¹⁾もあるが、本法は一般的にダイナミックレンジが狭く、定量性に欠けることが指摘されてきた。近年リアルタイムPCR装置によってその定量性が大幅に改善され、おそらくこの装置による方法が今後一般的になっていくものと予想される。しかし、機器が比較的高額であり、測定に至適化にも時間がかかるなどの理由で従来法による測定も現段階では十分有力な選択肢である。我々の研究室では、種々の環境因子によるTh1・Th2細胞のバランス変動を探るために、それぞれのT細胞サブセットが産生するIFN- γ ・IL-4などのサイトカイン発現レベルをRT-PCRで解析する方法を確立したので紹介する。

B. 試薬・機器

1) RNA調製

マウスの血液細胞からのtotal RNA調製にはQuick Prep Total RNA Extraction Kit (アマシヤムファルマシア バイオテック) を用いた。

2) 逆転写、PCR用試薬および機器

最近では逆転写とPCRを同一チューブ内で行うための試薬キットが各社から入手できる。ここではアマシヤムファルマシア社のReady-To-Go RT-PCRビーズ (0.2mlチューブタイプ; 96穴プレート対応) を用いている。また、DNA増幅装置はRoboCycler Gradient 96 (STRATAGENE) を用いた。

3) 電気泳動用試薬・機器

電気泳動用のアガロースはシナガロース (TOHO) を用いている。このアガロースは透明度が高く写真撮影のために都合がよい。現在製造中止になっているが、シーナゲル (TOHO) をアガロースに添加することで同様なゲルを調製可能である。DNAの染色試薬はエチジウムブロマイドを用いた。多検体電気泳動槽 (96穴プレート対応) はElectro-Fast (日本ジェネティックス) を用いている。

4) DEPC処理水

RNAサンプルの希釈や反応液の調製にはDEPC (diethyl pyrocarbonate) を処理してRNaseフリーにした超純水を用いる。DEPC処理水は、最終濃度が0.1%になるように超純水にDEPCを添加し、スターラーで一晩攪拌した後オートクレーブして調製する。

C. 実験操作手順

1) RNAサンプルの調製

Balb/cマウスから心採血によって得た血液に1/100量の0.5M EDTA-2Na (pH7.5) を添加し、溶血・遠心を経て血液細胞を調製する。血液細胞のペレットからQuick Prep Total RNA Extraction Kit によってtotal RNAを単離する。RNA量は希釈サンプルのOD260により定量する。

2) 逆転写およびPCR

1. RT-PCRビーズの入ったチューブに41.5 μ lのDEPC処理水を加え、氷浴上で約5分間静置して試薬を溶解する。
2. RNAサンプル5 μ lを添加する。その際、10-100 ng/5 μ lの範囲で4点程度の希釈系列を作成する。また、内部標準としてG3PDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

mRNAの発現を測定するが、その場合のRNA量は0.1 ng程度が適量である。

3. 1 μ lのoligo(dT)12-18 (0.5 μ g/ μ l) を加え、42 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートして逆転写反応を行った後、95 $^{\circ}$ C、5分間加熱して逆転写酵素を失活させる。
4. 2.5 μ lのプライマーセット (10 pmol each/ μ l; 塩基配列および増幅産物の塩基長は表1参照) を加え、軽く攪拌した後、PCRを行う。反応は95 $^{\circ}$ C、5分の加熱の後、95 $^{\circ}$ C<60秒>、60 $^{\circ}$ C<60秒>、72 $^{\circ}$ C<90秒>の反応を、IFN- γ の場合34サイクル、IL-4の場合で35サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間伸長反応を行う。
5. 反応液に5 μ lの泳動用色素液 (0.5 M EDTA/50% glycerol/0.3% Bromophenol Blue) を添加し、その10 μ lを0.5 μ g/mlのエチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースにアプライして電気泳動を行う。
6. 泳動終了後、トランスイルミネーター上でポラロイド写真を撮影する。必要に応じ、画像処理によってバンド強度を数値化する (図1参照)。

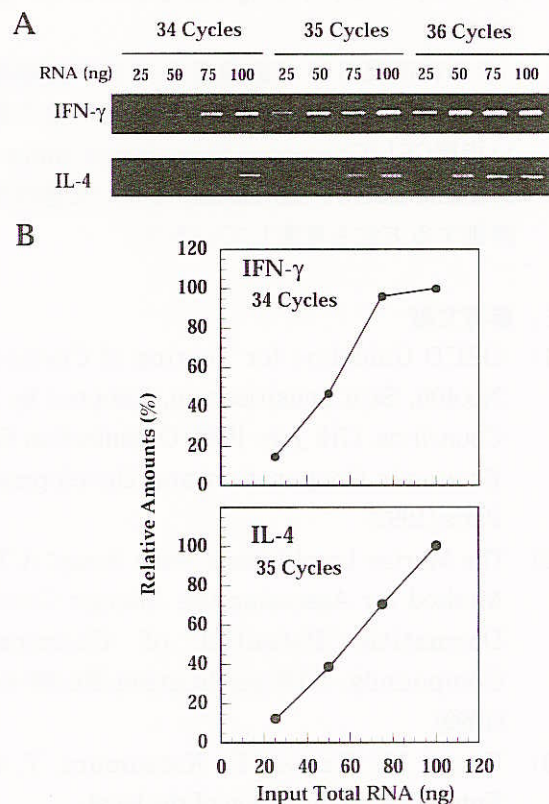


図1 Balb/cマウス血液細胞を用いた解析

A:増幅産物の電気泳動パターン。

B:Aに示した結果の画像解析。

D. 留意事項

1. 本稿では血液細胞からRNAを調製しているが、血液から直接total RNAを調製したい場合やサンプルを採血場所から運搬する必要がある場合には、RNA調製試薬としてISOGEN-LS (ニッポンジーン)が適している。

2. 一般的にRT-PCRによる定量は指数関数的な増幅が起こっているサイクル数で行う必要があるが、存在量が少ないメッセージの場合はアイトープなどを用いない限りRT-PCR産物の検出は難しい。本稿で述べたPCR条件下では、指数関数的というより直線的増幅段階すなわち反応終期に入っているが、インプットRNA量とアウトプットの増幅産物量は相関している (図1)。ただし、用いるPCR試薬や増幅装置の相違によって反応条件が異なることも予想されるので、ここで述べた条件は目安として考え、RNAの希釈系列による定量性の確認と同時に、増幅反応各ステップの時間やサイクル数などをチェックする必要がある。

3. ヒト血液サンプルはマウスのサンプルに比べて検出しにくい傾向があり、往々にしてIFN- γ cDNAしか検出できない。さらにヒトの場合には個体差が著しいことが報告されている⁽²⁾。我々の経験ではマウスの場合も同様に個体差および系統差がある。一方、マウス脾臓細胞から調製したサンプル⁽³⁾ではサイトカインcDNAの検出は比較的容易であり、IL-5 cDNAもクリアに増幅できる。

4. 画像の数値化は、特別な装置がなくても撮影した写真をスキャナーでコンピュータに取り込んで解析できる (300dpi程度の解像度で可)。適当な画像ソフト (PhotoShopなど) で白黒反転し、解析ソフト (NIH Image Ver.1.60など) でバンド強度を数値化する。

E. 参考文献

- 1) James, S. P. Detection of Cytokine mRNA expression by PCR. In Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds.) pp.10.23.1-10.23.10. Greene Publishing and John Wiley & Sons, NY.
- 2) Kruse, N., Pette, M., Toyka, K. and Rieckmann, P., J. Immunol. Methods, 210, 195-203 (1997)

- 3) 大沢基保、大塚文徳 (1991) 免疫細胞：細胞トキシコロジー試験法 (日本組織培養学会編) pp. 179-188、朝倉書店。

表1 RT-PCR用プライマーセット

		増幅塩基長
IFN- γ	forward 5'-TACTGCCACGGCACAGTCATTGAA	405-bp
	reverse 5'-GCAGCGACTCCTTTTCCGCTTCCT	
IL-4	forward 5'-ACGGAGATGGATGTGCCAAACGTCC	279-bp
	reverse 5'-CGAGTAATCCATTTGCATGATGC	
G3PDH	forward 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC	452-bp
	reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

マスト細胞MCP-1のイムノアッセイ 及びRT-PCRによる定量

国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
奥貫 晴代
手島 玲子
澤田 純一

A. 解説

抗体産生や、感作リンパ球の誘導等の直接免疫に関与している免疫担当細胞には、単球、マクロファージ、リンパ球などがある。ここでは特に、アレルギー性炎症反応に深く関与するマスト細胞に着目し⁽¹⁾、後期炎症性シグナルであるケモカインMCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) のマスト細胞からの産生量及びMCP-1 mRNA発現量の測定法について述べる^(2,3)。

サイトカインの測定法としては、イムノアッセイが一般的であり、Biosource、Genzyme-TECHNE、BD PharMingen 等でキットが市販されている⁽⁴⁾。これらを用いることによって簡便な定量的測定が可能である (図1)。また、各種サイトカイン特異的 mRNAを測定するためには、組織もしくは細胞から効率良く Total RNA もしくは mRNA を抽出する必要がある。首尾良くRNAが調製出来た後は、サンプルが少量の場合、ELISA方式の96 well マイクロプレートを用いた mRNA 定量測定キット、または RT-PCR 法によって、発現量を測定することが出来る。ここでは、マウス及びラットの MCP-1 特異的配列をカバーしているプライマーを設計し (図1)、通常の RT-PCR を行うことで特異的遺伝子発現量変化を観測した例 (図2) を紹介したい⁽²⁾。さらに迅速、かつ高精度に PCR 産物の定量

を行う方法として、TaqMan™ PCR 法がある。PCR 反応をリアルタイムで検出出来る ABI PRISM™ 7700 System を用いMCP-1 mRNA 発現量を定量した例(図3)もあわせて紹介する⁶⁾。

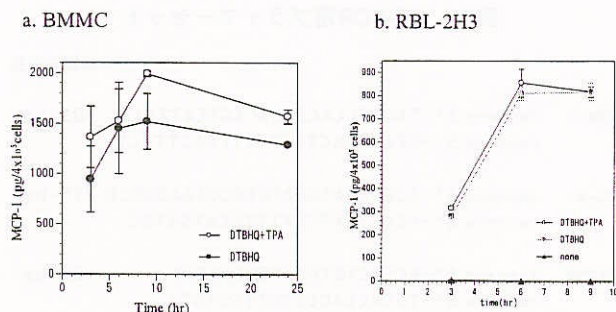


図1 DTBHQ刺激によるMCP-1放出 (イムノアッセイによる測定)

表1 プライマーとプローブ

No	mRNA	Primer/Probe	Sequence
1	mouse MCP-1	forward primer	5'-ACTCACCTGCTGCTACTCATTAC-3'
2		reverse primer	5'-CACACTGGTCACTCTACAGAAGT-3'
3	mouse MCP-1 (for TaqMan)	forward primer	5'-AAGCTCAAGAGAGAGGTCGTGC-3'
4		reverse primer	5'-CATTGGTTCGATCCAGGT-3'
5		probe	5'-(Fam)-CCCCAAGAAGGAATGGGTCCAG-(Tama)-3'

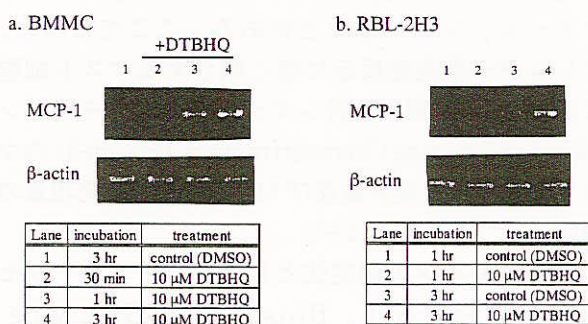


図2 DTBHQ刺激によるMCP-1 mRNAの生成(RT-PCRによる測定)

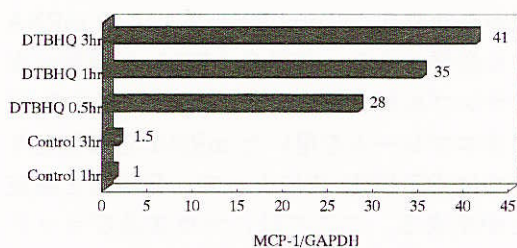


図3 DTBHQ刺激によるBMMCの MCP-1 mRNAの生成 (TaqMan™ PCRによる測定)

B. 実験材料

1. 細胞

1) RBL-2H3 (Rat Basophilic Leukemia 2H3 cells) の調製

RBL-2H3 細胞を 37℃ CO₂ インキュベーター内で 10% fetal calf serum (FCS)-Dulbecco's MEM (DMEM) 5 mL を含む培養フラスコ (T-25, Corning #430372) を用いて培養する。10% FCS-DMEM を用いて 2x10⁴ cells/mL になるよう3日に1回継代を行う。

2) BMMC (Bone Marrow-derived Mast Cells) の調製 Balb/c マウス (雌、10-20 週齢) を頸椎脱臼し、70% エタノールで全身を消毒した後、両足の大腿骨を無菌的に採取し、肉片を取り除く。両骨端を切り取り、2% FCS-DMEM 中で 23G の注射針を用いて骨髓細胞を押し出す。1500 rpm で5分間遠心分離し、細胞を集めた後、有核細胞を測定し、2x10⁷ cells/10 mL になるように 5 ng/mL IL-3 を含む 10% FCS-DMEM で懸濁し、10 cm 直径の培養プレート (Falcon #3003) で培養する。5-7 日の間隔で培養液を加え、この操作を一ヶ月間繰り返すことにより、均一なBMMCを調製する。

2. 試薬と製造元

以下の試薬を使用した。

MCP-1 Immuno Assay Kit (Biosource)、M-MLV reverse transcriptase (RNase H) RT-PCR high (東洋紡)、TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents (PE Biosystems)、TaqMan™ PCR Core Reagent Kit (PE Biosystems)、TaqMan™ probe (PE Biosystems)、DTBHQ (2,5-di (tert-butyl)-1,4-hydroquinone) (Sigma)

C. 実験操作

1. マスト細胞の化学物質による活性化と細胞の調製
1) RNA 調製用BMMC の調製

あらかじめ、1x10⁶ 個の BMMC を 5 ng/mL IL-3 を含んだ10% (v/v) FCS-DMEM 10 mL 中、37℃ CO₂ インキュベーター内にて7日間培養する (最終細胞密度 1x10⁷ cells/10 mL)。7日後、培地に 3 μM DTBHQ を加え 0.5-6 時間刺激を加える。各刺激時間後、細胞をピペッティングにて回収し、1500 rpm で5分間遠心する。次いで、細胞を PBS で1回洗浄する。

2) MCP-1 タンパク測定用 BMMC

24 well flat-bottom microtiter plate (Coster #3524) に最終細胞密度 2×10^5 cells/well になるように BMMC 懸濁液 10% (v/v) FCS-DMEM 1 mL を加え、37°C CO₂ インキュベーターにて 16 時間培養する。3 μ M DTBHQ を加え 0.5-6 時間刺激を与えた後、上清を分取する。

3) RNA 調製用 RBL-2H3 細胞

5×10^6 個の RBL-2H3 細胞を、10% (v/v) FCS-DMEM 20 mL に懸濁し、培養フラスコ (T-75, Corning) 中 37°C にて 16 時間培養を行う (最終細胞密度 1×10^7 cells/20 mL)。16 時間後、3 μ M DTBHQ を加え 1-3 時間刺激を与えた後、細胞を回収して 1500 rpm で 5 分間遠心を行う。細胞は PBS でさらに 1 回洗浄する。

4) MCP-1 タンパク測定用 RBL-2H3 細胞

24 well flat-bottom microtiter plate (Coster #3524) に最終細胞密度 1×10^5 cells/well になるように RBL-2H3 懸濁液 10% (v/v) FCS-DMEM 1 mL を加え、37°C CO₂ インキュベーターにて 16 時間培養する。3 μ M DTBHQ を加え 1-3 時間刺激を与えた後、上清を分取する。

2. MCP-1 のイムノアッセイ

培養上清 100 μ L を使って MCP-1 Immuno Assay Kit (Biosource) を用いた サンドウィッチ ELISA 法にて MCP-1 放出量を測定する。

3. Total RNA の調製

それぞれの細胞に TRIZOL Reagent (Gibco BRL) 1 mL を加え、ピペティングをして細胞を破壊し、エッペンドルフチューブに移す。5 分間室温で放置した後、0.2 mL のクロロホルムを加え 15 秒間激しく手で振る。3 分間室温で置いた後、4°C、12000 rpm で 15 分間遠心する。新しいチューブに水相を移し、0.5 mL イソプロパノールを加え室温で 10 分放置する。4°C、12000 rpm で 10 分間遠心し、70% エタノールで RNA の沈殿を洗った後、さらに 15000 rpm で 5 分間遠心する。RNA の沈殿は、風乾させた後 RNase-free water で溶解し、260 nm 及び 280 nm で吸光度を測定して RNA 量を測定する。

4. RT-PCR 法

調製した Total RNA 500 ng を、25 pmol polyA primer, 1 mM dNTPs, 10 U RNase inhibitor, 20 U RNase H, RTase buffer 20 μ L (M-MLV reverse

transcriptase RT-PCR high) に溶解し、GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer) を用いて 30°C 10 分、42°C 20 分、99°C 5 分 インキュベートする。合成された cDNA 産物を、1x Plus buffer (rTaq), 2.5 U rTaq DNA polymerase, 1 μ mol/L MCP-1 合成プライマー (Table 1) もしくは β -actin プライマー (Stratagene) で 100 μ L にし、94°C 3 分間の熱変性及び 60°C 5 分間のインキュベートの後、72°C 90 秒、94°C 45 秒、55°C (MCP-1) もしくは 60°C (β -actin) 45 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル繰り返し反応させる。それぞれの反応液 10 μ L をアガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、画像解析装置等を用いて解析する。コントロールとして β -Actin Primer Set for RT-PCR (Stratagene) を用い、同様の反応を行う。

5. TaqMan™ RT-PCR 法

調製した Total RNA 500 ng を、oligo(dT) プライマー等を含んだ TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents に溶解し、GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer) を用いて 25°C 10 分、48°C 30 分、95°C 5 分 インキュベートする。合成された cDNA 産物は、ABI PRISM 7700 Sequence Detector System を用いて定量する。cDNA は TaqMan™ PCR Core Reagent Kit 及び独自に合成させた MCP-1 プローブとプライマー (Table 1) もしくは GAPDH プローブとプライマー (PE Applied Biosystems) で終用量 50 μ L にし、50°C 2 分、95°C 10 分のインキュベーションの後、95°C 15 秒、60°C 60 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル繰り返し反応させる。内標準として TaqMan[®] Rodent GAPDH Control Reagents (VIC™ Probe) (PE Applied Biosystems) を用いて同様の反応を行い、それぞれの産生量を求めた後、GAPDH に対する MCP-1 の産生量の比率を計算する。

D. 判定

1. MCP-1 Immuno Assay Kit 及び RT-PCR 法による測定結果の例

RBL-2H3、BMMC 両細胞とも DTBHQ 存在下、顕著な MCP-1 分泌、及び mRNA 産生が見られた (図 1, 図 2)。

2. TaqMan™ RT-PCR 法による測定結果の例

定法の RT-PCR と同様の結果が得られ、より正確

なデータとして処理出来た(図3)。

E. 留意事項

TaqMan™ RT-PCR 法を用いる場合、データのばらつきを極力抑えるため、同時に1サンプルにつき3-4回繰り返すことが必要である。又、定量RT-PCRの主な変動の要因であるRNAの純度を補正する内部標準として、GAPDHなどのコントロールを用い、検量線を作成する必要がある。

F. 参考文献

- 1) Gordon, J.R. Monocyte chemoattractant peptide-1 expression during cutaneous allergic reactions in mice is mast cell dependent and largely mediates the monocyte recruitment response. *J. Allergy Clin Immunol.* 106, 110-116 (2000)
- 2) Teshima, R. et al. Effect of Ca²⁺-ATPase inhibitors on MCP-1 release from bone marrow-derived mast cells and the involvement of p38 MAP kinase activation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121,34-43 (2000)
- 3) Onose, J. et al. Ca²⁺-ATPase inhibitor induces IL-4 and MCP-1 production in RBL-2H3 cells. *Immunol. Lett.* 64, 17-22 (1998)
- 4) Luo, Y. et al. Serologic analysis of the mouse β chemokine JE / monocyte chemoattractant protein-1. *J. Immunol.* 153, 3708 (1994)
- 5) Shibata, M. et al. Quantitative polymerase chain reaction using an external control mRNA for determination of gene expression in a heterogeneous cell population. *Toxicol. Sci.* 49, 290-296 (1999)

マウス脾臓細胞を用いた
細胞内サイトカイン検出法

(財)残留農薬研究所 小坂忠司・竹内幸子

A. 解説

周知のように、サイトカインはリンパ球などの免疫担当細胞の免疫反応機能制御に重要な役割を果たしている細胞間情報伝達物質であり、主に細胞の増殖や分化を制御している可溶性蛋白である。従来、サイトカインの検出については、リンパ球を培養しその培養液中に分泌されるサイトカイン

の濃度をELISA法(酵素標識免疫吸着法)等を用いて測定されてきた。近年、細胞内蛋白輸送を阻害するMonensinやBrefeldin-A等の薬剤を用いた方法が考案されたことで、フローサイトメトリー(Flow cytometry; FCM)を用いた細胞内サイトカインが容易に検出できるようになった^{1,2)}。

ここでは、マウスの脾臓細胞をmitogenや抗原の存在下で培養し、汎T細胞やヘルパーT細胞を例にして、フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン検出法を説明する。(図1,図2)

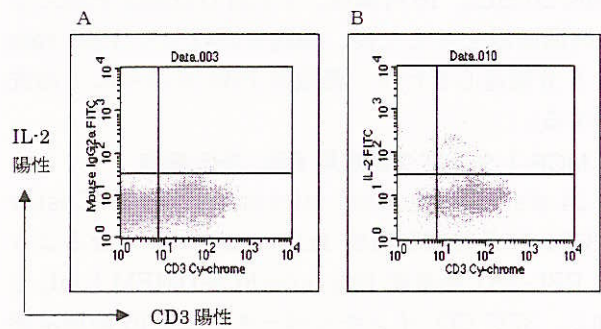


図1 マウス脾臓細胞のサイトカイン検出例

AにはFITC標識のIsotype control immunoglobulinによるバックグラウンド染色を示す。BにはFITC標識抗マウスIL-2抗体での染色であり、FITC陽性のIL-2産生細胞が観察される。

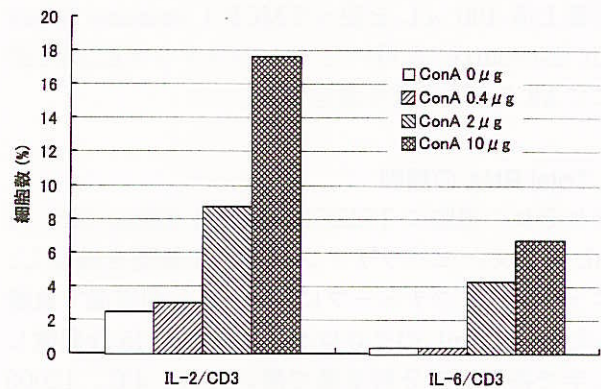


図2 Concanavalin A添加濃度による細胞内サイトカイン発現

抗原投与により免疫したマウス脾臓細胞(活性化細胞)を用いた。2×10⁶個の脾臓細胞を0.4~10 μg/mlの3濃度のConcanavalin A (ConA)添加培養液にて24時間培養した。その際のConcanavalin A添加濃度による細胞内サイトカイン発現の関係を示す。抗原としてヒト肺炎連鎖球菌の荚膜性多糖類と溶解素蛋白の結合体を使用した。リンパ球の染色法は本稿の適正条件を用いて、CD3陽性細胞中のIL-2およびIL-6産生細胞の同時検出を行った。その結果、IL-2およびIL-6産生細胞ともConAの用量にほぼ相関して増加した。

B. 試薬および機器

1. 細胞調製液および培養液

- ・細胞調製液: リン酸緩衝生理食塩液 および5%

牛胎児血清添加RPMI 1640。牛胎児血清はエンドトキシンの混入のないものを選び、熱処理で不活化を行う。

- ・ 培養液：10%牛胎児血清添加RPMI 1640 (含100 U/ml ペニシリン・ストレプトマイシン)
- ・ 赤血球溶解液：0.85%塩化アンモニウム溶液

2. 培養時のリンパ球刺激などに使用する試薬

リンパ球の刺激剤として、ここではT細胞mitogenのConcanavalin Aを挙げたが、実験の性質により抗マウスCD3抗体やその他のmitogen、あるいは特定の抗原（感作抗原と同一のもの）を用いてもよい。

- ・ T細胞mitogen: Concanavalin A (10 μ g/ml; Sigma # C-2010)
- ・ 蛋白輸送阻害剤: Brefeldin A (10 μ g/ml)またはMonensin Na (4 μ g/ml)
Brefeldin A (Sigma # B-7651; DMSOに5 mg/mlにて溶解・保存)
Monensin Na (Sigma # M-5273; DMSOに1 mg/mlにて溶解・保存)

3. 染色時に使用する試薬

- ・ 固定液; FACS Lysing Solution (BD社)または4% Paraformaldehyde PBS (pH 7.4)
FACS Lysing Solution (Becton Dickinson #349202)
Paraformaldehyde (Sigma P-6148; 約50°Cにて溶解)
- ・ 細胞膜透過用緩衝液; FACS Permeabilizing Solution (BD社)、0.1%サポニン添加1%FCS PBS
FACS Permeabilizing Solution (Becton Dickinson #340457)
サポニン(Sigma S-7900)
- ・ ブロッキング液：15%山羊血清添加PBS
- ・ 染色液：1% FCS添加PBS (抗サイトカイン抗体を入れる)

4. 蛍光標識抗体

1) 細胞表面膜抗原染色

本稿では、T細胞のサイトカイン産生細胞を検出するため、汎T細胞(CD3陽性細胞)、ヘルパーT細胞(CD4陽性細胞)を挙げた。通常、表面膜抗原の蛍光標識は以下に述べるサイトカイン染色用の蛍光標

識とは異なる蛍光標識を用いるため、著者らはCy-Chrome標識を選択した。代表的な抗体を以下に示す。

Cy-Chrome標識抗マウスCD4抗体 (Clone RM4-5) (PharMingen 01068A)

Cy-Chrome標識抗マウスCD3抗体 (Clone 145-2C11) (PharMingen 01088A)

2) 細胞内サイトカイン染色

代表として、IL-2とIL-6の検出について説明する。市販の蛍光標識はFITC標識とPE標識が主なものである。サイトカイン染色時には常にそれぞれの使用抗体と同一のIsotype control immunoglobulinを用いたコントロール細胞を用意し、Isotype controlによる弱染色性蛍光発現の対照とする。代表的な抗体を以下に示す。

FITC標識抗マウスIL-2抗体 (Clone S4B6)(Rat IgG_{2a}, PharMingen 01068A)

PE標識抗マウスIL-6抗体 (Clone MP5-20F3)(Rat IgG₁, PharMingen 18075A)

FITC標識 Rat IgG_{2a} Isotype control immunoglobulin (PharMingen 20624A)

PE標識抗 Rat IgG₁ Isotype control immunoglobulin (PharMingen 20615A)

5. 装置および器材

- ・ CO₂インキュベーター、フローサイトメーター、遠心機
- ・ 遠心チューブ (15 ml)、FCM用チューブ (5 ml)、24穴培養プレート、ナイロンメッシュ、時計皿、血球計算板等の器材

C. 実験操作手順

1. 概要

- 1) マウス脾臓細胞の単細胞浮遊液を調製し、細胞を培養する。
- 2) 培養過程で細胞を刺激し (mitogen、抗原など)、サイトカイン産生を促す。
- 3) 細胞内蛋白輸送を阻害し (Brefeldin-Aなど)、サイトカインを細胞内に蓄積させる。
- 4) 細胞染色第1過程で細胞膜表面抗原 (CD4など) を染色する。
- 5) 細胞膜透過処理を行い、細胞膜透過性を高める。
- 6) 抗サイトカイン抗体により、細胞内サイトカイン (IL-2など) を染色する。
- 7) フローサイトリーにて蛍光強度を解析する。

2. 脾臓細胞の調製および培養

1) 細胞調製

- ① マウスをエーテル麻酔下にて屠殺（頸椎脱臼）し、体部をアルコール消毒した後開腹する。開腹後、滅菌ピンセットにて脾臓を摘出する。摘出した脾臓を氷冷した滅菌チューブに移す。
- ② 脾臓を滅菌時計皿に置き、PBS（約1 ml）に浸す。PBS液中にてピンセット（及びステンレスメッシュ）を用いて脾臓をほぐし、単細胞浮遊液を得る。
- ③ 滅菌遠心チューブ（15ml用）に単細胞浮遊液（約5 ml）を移し、約1～2分放置後遠心管底部の細胞塊（Cell debris）を避けて細胞浮遊液のみを吸い上げ、別の遠心管に移す。
- ④ 細胞浮遊液を遠心し（4℃、1500rpm、10分）、上清を除く。赤血球溶解のため、cell pelletを5 mlの0.85%塩化アンモニウム溶液に懸濁し、5分間室温にて静置する。5分後、等量の5% FCS RPMI 1640培地を加える。
- ⑤ 前項の細胞浮遊液を遠心し、cell pelletを5% FCS RPMI 1640培地に懸濁する。もう一度遠心後、同一培地にて洗浄した後、ナイロンメッシュを通す。
- ⑥ 細胞浮遊液一部を採取し、血球計算板にて細胞数を計算する。

2) 細胞培養（培養液の調製以降はクリーンベンチで操作する）

- ① 培養プレートの各ウェルに、1 ml当たり 2×10^6 個の脾臓細胞にて、mitogenの最終濃度が例えば Concanavalin A で10 $\mu\text{g/ml}$ となるように、脾臓細胞浮遊液と培養液中のmitogen濃度を調製する。ここでは、脾臓細胞1容に対してmitogen添加培養液9容の、1容：9容でそれぞれ調製し、説明する。この場合の比率は研究者によって異なる。
- ② 脾臓細胞浮遊液では、培養培地での最終脾臓濃度を調製するため、細胞数を計算後遠心し、1 ml当たり 2×10^7 個の脾臓細胞（培養時最終脾臓濃度の10倍濃度）となるように、cell pelletを培養培地の10% FCS RPMI 1640培地に懸濁する。
- ③ mitogen添加培養液では、Concanavalin Aの最終濃度が10 $\mu\text{g/ml}$ の場合、11.1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でConcanavalin A添加10% FCS RPMI 1640培地を調製する。

- ④ 900 μl （9容）の11.1 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A 添加10% FCS RPMI 1640培地を24穴培養プレートの各ウェルに加える。さらに100 μl （1容）の細胞浮遊液（ 2×10^7 個脾臓細胞；最終脾臓濃度の10倍濃度）を各ウェルに加え、2から3回ピペッターにて軽く攪拌する。
- ⑤ CO₂インキュベーターにて37℃、5% CO₂で24時間培養する。
- ⑥ 培養終了4ないし5時間前に、細胞内蛋白輸送阻害剤Brefeldin-Aを最終濃度が10 $\mu\text{g/ml}$ となるように、各ウェルに加え、2から3回ピペッターにて軽く攪拌する。

3) 細胞内サイトカイン染色（操作③以降の静置ないし反応は暗所で行う）

- ① 培養終了後、培養プレートを氷上に置き、反応を止める。各ウェルごとに軽くピペッティングして培養細胞を採取し、プラスチック試験管（5 ml）に移す。
- ② 冷PBSにて1回洗浄した後、一次抗体の表面膜抗原抗体との非特異的結合（Fcレセプターとの結合）を防ぐため、15%山羊血清添加PBS（200～500 μl 程度）を加え、細胞を懸濁した後、4℃で10分間反応させる。
- ③ 冷1% FCS PBSにて遠心洗浄した後、Cy-Chrome標識抗マウスCD4抗体を含む1% FCS PBS（50～200 μl 程度）を加え、細胞を懸濁する。暗所で4℃、30分間反応させ、リンパ球の表面膜抗原を染色する。
- ④ 冷1% FCS PBSにて遠心洗浄した後、固定液のFACS Lysing Solution (BD社)または4% Paraformaldehyde PBSを加える。FACS Lysing Solution (BD社)では、1 ml加え、室温にて10分間静置する。4% Paraformaldehyde PBSでは、200 μl 程度加え4℃で20分間静置する。
- ⑤ 遠心して上清を除去した後、細胞膜透過用緩衝液のFACS Permeabilizing Solution (BD社)または0.1%サポニン添加1% FCS PBSを加える。FACS Permeabilizing Solution (BD社)では、500 μl 加えて細胞を懸濁し、室温にて10分間静置する。0.1%サポニン添加1% FCS PBSでは、100 μl 程度加えて細胞を懸濁し、室温にて20分間静置する。また、サポニンを用いた細胞膜透過用緩衝液では、サポニンの作用が可逆的の反応なので、以後の⑥の遠心洗浄と染色時に0.1%サポニ

ン添加1%FCS PBSを使用し、⑦の行程では使用しない。

- ⑥ 1%FCS PBSにて遠心洗浄した後、FITC標識抗マウスIL-2抗体/ PE標識抗マウスIL-6抗体を含む1%FCS添加PBS (50~200 μ l程度) を加え、細胞を懸濁する。室温暗所で、30分間反応させ、細胞内サイトカインを染色する。その際、各抗体に対するコントロールとして、培養細胞の一部試料を用い対象となる抗体のIsotype control immunoglobulinと室温暗所で、30分間反応させる。
 - ⑦ 1%FCS PBSにて遠心洗浄し、フローサイトメトリー解析を行う。
- 4) フローサイトメトリー解析
- ① Forward scatterとSide scatterにてリンパ球相当部分をGating (R1) する。
 - ② 次に、①でGating (R1) したPopulationについて、標的とするリンパ球のSubsetを特定するために、表面膜抗原のCD4やCD3陽性細胞のPopulationをドットプロットでGating(R2)する。
 - ③ CD4やCD3陽性細胞のPopulationについて、Isotype control immunoglobulin染色細胞を測定する。Isotype controlで反応する非特異的応答エリアを特定し、陰性と陽性反応の境界線を引く。
 - ④ 同様に、CD4やCD3陽性細胞のPopulationについて、サンプル細胞を測定する。

D. 留意点

- 1) ゴルジ体からの蛋白輸送をブロックする薬剤として、通常Monensin-NaとBrefeldin-Aの2種類が挙げられているが、その作用について両者に差は認められない。蛋白輸送阻害剤の作用時間(細胞との培養時間)は通常2~5時間であり、5時間以内に留める。
- 2) 細胞膜透過処理の検討では、ここでは0.1% saponin処理と市販のFACS Permeabilizing Solution (BD社)を用いる方法を挙げた。Saponinによる細胞膜透過処理では、バックグラウンドが比較的高く、染色にばらつきが見られることがある。Saponin処理の場合には注意が必要となる。我々の経験でも、0.1% saponinの室温30分処理と、Permeabilizing Solution (BD社)の室温10分処理とを比べた場合、後者の細胞膜透過処理によるIsotype control 抗体のバックグラウンドは低く抑えられていた。

3) 細胞の培養時間については、目的とするサイトカインの種類によって、リンパ球を刺激してから産生されるまでの時間が異なる。予備実験や文献などで調査した上で目的とするサイトカインの反応時間を設定することが好ましい。また本実験系では、刺激培養時間を比較したところ、24および48時間培養とも細胞内IL-2検出量に差は認められなかった。

4) 抗サイトカイン抗体の二重染色は、多くの研究者によって使用される手法であり、特にTh1/Th2バランスを調査するために有用である。その場合、目的とするサイトカイン産生時間の違いを目処に実験を進める必要がある。IFN- γ とIL-4の産生についてみると、非免疫の脾臓細胞では両サイトカインは刺激の48時間で産生(ほぼ頂値)が見られるものの、Mitogen投与した脾臓細胞(活性化細胞)や末梢血単球では、Mitogen刺激により2~4時間で頂値となる⁹⁾。このように、用いる細胞や条件によって目的サイトカイン産生時間を検討する必要がある。

E. 利点:

培養液中でのサイトカイン測定では細胞外に分泌されたサイトカインを測定する。一方、フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン検出では分泌される前の細胞内サイトカインを検出する。本法を用いた利点は、個々の細胞のサイトカイン産生を検出することが出来ることにある。すなわち、いずれのサブセットのリンパ球(あるいはサイトカイン産生可能細胞)が特定のサイトカインを産生するかが判明するばかりではなく、小数の細胞においてもある程度量的な推計が可能となる。言い換えれば、リンパ球のサイトカインの分泌型からTh1型とTh2型とを分類し、多量なサイトカイン産生細胞を分類することが可能となる。しかし、サイトカインは免疫された病原体の種類、免疫反応過程の違い等により優位となるサイトカインが異なる。今後これらのことを整理し、免疫毒性の指標としてのTh1/Th2バランスの意義を解析する事が必要と思われる。

F. 参考資料:

- 1) Scander, B., Andersson, J., and Andersson, U. Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure.

Immunol. Rev. 119, 65-93 (1991).

2) Schauer, U., Jung, T., Krug, N., and Frew, A. Measurement of intracellular cytokines. Immunol. Today 17, 305-306 (1996).

3) Scander, B., Hoiden, I., Andersson, U., Moller, E., and Abrams, J.S. Similar frequencies and kinetics of cytokine producing cells in murine peripheral blood and spleen. J. Immunol. Methods 166, 201-214 (1993).

2001年国際学会情報

* 9th International Congress of Toxicology

8-12 July 2001,
Brisbane Convention and Exhibition
Centre, Brisbane, Queensland, Australia

ICT-IX Congress
C/- Intermedia
PO Box 1280
Milton QLD 4064 AUSTRALIA

Fax: +61 (0) 7 3858 5510
Abstract submission deadline: 5 February 2001
Web Site <http://www.uq.edu.au/ICT9/>

* 11th International Congress of Immunology

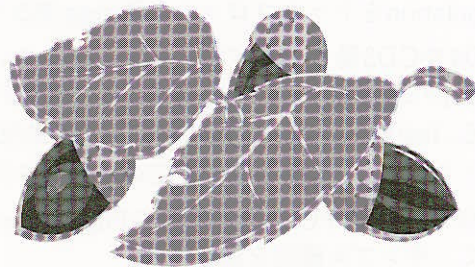
22-27 July 2001,
Stockholm, Sweden

ICI2001
Stockholm Convention Bureau
Box 6911
SE-102 39 Stockholm, Sweden

Fax: +46 8 5465 1599
Abstract submission deadline: 1 February 2001
Web Site <http://www.ici2001.org>

編集後記

免疫毒性研究会から免疫毒性学会への発展に向けて、ImmunoTox Letterも益々パワーアップを図っていかなくてはなりません。異なった対象（環境化学物質、ライフスタイル、食品、医薬品など）の研究や基礎と臨床・応用間の相互理解、また免疫毒性試験プロトコールの蓄積や関連情報の提供などの面において本誌の果たすべき役割は益々大きくなっていくものと考えております。編集委員一同、会員の皆様の自由な投稿を心よりお待ちしております。（中村和市記）



編集・発行：免疫毒性研究会

発行日：平成12年11月

〒199-0106 神奈川県津久井郡相模湖町
寸沢嵐1091

帝京大学薬学部環境衛生学教室内

TEL：0426-85-3753/2 FAX：0426-85-3754

編集発行責任者：名倉 宏

編集委員会：香山不二雄、中村 和市、

牧 栄二、藤巻 秀和

原稿送付先：fujimaki@nies.go.jp