

# ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会：The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 6 No. 1 (通巻11号)2001

## 目次

第7回免疫毒性研究会報告	1
第8回日本免疫毒性学会学術大会予告	1
薬剤による免疫毒性 —腎臓—	2
千葉大学大学院薬学研究科 医薬品情報学 上田 志朗	
医薬品の免疫毒性試験に関する国際的動向	4
日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会 免疫毒性ワーキンググループ長 中村 和市	
ライフスタイルおよび精神的健康状態が NK細胞活性におよぼす影響	5
大阪大学大学院医学系研究科社会環境医学講座 櫻井知真子、森本 兼曩	
ピルとエイズ	7
クリニック 玲 タケダ 武田 玲子	
「免疫毒性試験プロトコール」第5回 マウス脾臓細胞、胸腺細胞、 リンパ節細胞の調整法	8
三共株式会社安全性研究所 木村 努、間 哲夫	
ラット末梢白血球の計数及び百分比	10
武田薬品工業株式会社 土井 久子、吉岡 勝	
ラット免疫グロブリンクラス (IgM, IgG, IgA) の測定法	11
帝国臓器製薬株式会社安全性研究部 久田 茂、永嶋 雅	

を伴って発表されました。ワークショップでは澤田先生、牧先生の座長のもと「医薬品の免疫毒性評価手順を検討するための協同研究」と当会のメインテーマに直接繋がる基礎的研究を8グループの先生方が発表されました。

さらに、招待講演に米国College of Veterinary MedicineのSteven D. Holladay助教授による“Developmental immunotoxicity induced by dioxins”、特別講演に千葉大学の斎藤隆教授による“アレルギー性疾患の誘導とFcレセプター”と基礎と臨床の懸橋となる御講演をいただきました。2日目には、「臨床例による薬剤・化学物質による免疫毒性—症例を中心に—」を主題としてシンポジウムが各分野の臨床医師により発表されました。臨床例における実際の免疫毒性に接し、免疫毒性の予測、予防の重要性と会員一同の研究の進展への期待が大きいことが実感できました。

第8回日本免疫毒性学会は香山不二雄自治医科大学教授のもと宇都宮で開催されますが、基礎から臨床の多くの研究者が集い21世紀の社会に貢献する免疫毒性学会の第一歩が刻印されることを祈念しております。

## 第7回免疫毒性研究会報告

実行委員長 上田 志朗

第7回 免疫毒性研究会すなわち最後の免疫毒性研究会を「基礎から臨床へ」を主要テーマに、20世紀最後の年、2000年9月25日、26日千葉市の千葉大学内けやき会館にて開催させていただきました。

研究会直前の幹事会にて年来の課題であった、研究会から学会への移行を提案することが承認され、総会にて討議され賛成多数で決定されました。このことは20世紀から21世紀に向けての当会の発展を予測し促すことと信じます。

研究会そのものは、一般演題21題が盛んな討論

## 第8回日本免疫毒性学会学術大会 (予告)

産業衛生学会 アレルギー・免疫毒性研究会共催

日時：平成13年9月17日(月)～18日(火)

場所：栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市本町1-8)

大会長：香山不二雄(自治医大)

連絡先：0285-58-7336

シンポジウム、ワークショップに関しては遺伝子組み替え薬品、食品に関するアレルギー等に関しての企画を考えていますが、まだ未定です。

学会前の週末は近く的那須、日光で楽しんでいただき、本年度が日本免疫毒性学会としてはじめての開催になりますので月曜午後からふるってご参加をお願い致します。



## 薬剤による免疫毒性 — 腎臓 —

上田 志朗

(千葉大学大学院薬学研究科 医薬品情報学)

## 薬剤性腎障害の分類

薬剤性腎障害は主として障害を受ける部位により、糸球体性と尿細管性に分類される。現在、日本で透析導入の2大原因である慢性糸球体腎炎や糖尿病性腎症などは主として糸球体が障害を受け、一般に腎疾患と言うと糸球体に病変の主体があることが多いが、薬剤性腎症の場合は尿細管に病変の主体がある頻度が高くなる。これは、糸球体にある各種細胞におけるよりも尿細管の上皮細胞において薬剤が濃縮されたり代謝を受けたりすることが多いためと考えられる。尿細管性の場合、病名としては間質性（本来は尿細管・間質性）と銘々されることが多くなる。

また、病変の出現の仕方により急性と慢性とに分けられる。急性の場合は、病変が急速に出現・進展し患者さんの症状も多彩でより早期に発見されるが、慢性の場合は緩徐に進行し症状が現れにくいことが多くなる。どんな臓器でもそうだが、急性が慢性に、慢性が急性に移行する場合もある。

さらに発症機序によりアレルギー性と中毒性に分類される。アレルギー性とは免疫機構が大きく関与して発症する場合で、多くの場合、薬の量に依ることはなく患者さんの体質（免疫機構の特殊性等）により発症するかしないか決定される。中毒性とは患者さんの体質には関係無く、ある一定以上の量を負荷すると必然的に腎臓に障害が出てくるような場合で、シスプラチン腎症などがそのよい例である。

以上の分類を使用して薬剤性腎症の一つを表現すると、セフェム系抗生物質などが原因で時に発症する『アレルギー性急性尿細管・間質性腎炎』（一般には間質性腎炎）と言うことになる。

上記分類以外にも腎臓障害が起きた原因をより広く分類し、腎臓を中心として、腎前性・腎性・腎後性と分類する場合がある。これは急性に腎機能低下が起きた際によく使用される。腎前性とは腎臓に流入する血液量が急速に減少して腎が虚血状態になり腎機能が低下するのが代表的で、NSAIDsによる腎機能低下はこれに分類される。腎性とは腎臓そのものに障害の原因があり腎機能が

低下するもので多くの薬剤性腎症はこれに属す。腎後性とは腎盂以降に原因があり腎機能が低下する場合を言うが、この原因は尿の流出障害がある時で、抗コリン剤使用による尿閉（腎臓で尿は生成され、膀胱に尿が溜まっているが排尿できない状態）や抗癌剤治療時腫瘍組織崩壊後の尿酸排泄増加による尿酸結石により両側尿管が閉塞した場合などが薬剤が関与するものでは有名である。このような腎後性腎機能低下も広い意味で薬剤性腎症と言ってよい。

本文においては、薬剤性腎障害の発症機序に免疫機構が関与する場合を取り上げ、具体的症例を提示する。

【症例-1】 37歳 女性：ブシラミンによるネフローゼ症候群（膜性腎症）

1985年1月 この頃より両手の朝のこわばり、手指関節痛を自覚。

1985年3月 上記症状に加え、両膝関節痛出現。次第に増強するため、近医受診。リウマチ反応陽性。慢性関節リウマチと診断される。注射用ならびに経口用金製剤処方されるも皮疹が出現し、かつ効果が十分でなかったため中止。

1987年8月 ブシラミン300mg/日開始。

1987年10月 皮疹・嘔気出現のため一時同剤中止。

1988年1月 ブシラミン200mg/日で減量再開。

1988年5月 中旬より両下腿浮腫が徐々に出現。尿検査にて蛋白尿。

(3+)、ネフローゼ症候群を疑われ、某病院紹介され、入院となる。1日尿蛋白6.4g、血中総蛋白4.9g/dl、血中アルブミン2.3/dl、総コレステロール420mg/dlと典型的ネフローゼ症候群であった。腎生検組織診断は膜性腎症であった。ブシラミン中止にて約3カ月で蛋白尿陰性となる。

ブシラミン、D-penicillaminは薬剤によるネフローゼ症候群のうち膜性腎症（免疫複合体が糸球体糸球壁に沈着）の原因薬剤として日本において最も頻度が高い。これらの薬剤が抗原となって、免疫複合体が形成されることは否定されており、通常生体内に存在する免疫複合体に作用し複合体の大きさを小さくするなどし、糸球体への沈着を促進させることにより腎症を惹起すると考えられている。



[症例-2] 42歳 女性：プロピルチオウラシル-顕微鏡学的結節性動脈周囲炎（ANCA関連腎炎）

1990年11月 甲状腺機能亢進症（バセドウ氏病）の診断にてプロピルチオウラシル300mg服用開始。

1994年1月 手指に紫斑出現、皮膚生検にて血管炎の所見ありこの際、蛋白尿と血尿を指摘された

1994年3月 肉眼的血尿出現、クレアチニン上昇（2.3mg/dl）入院。蛋白尿（2+）、尿潜血（3+）、抗核抗体（-）、抗好中球細胞質抗体（ANCA）陽性（222単位）

腎生検組織診断：半月体形成性腎炎、顕微鏡学的結節性動脈周囲炎

プロピルチオウラシル中止しメチルプレドニゾン・パルス療法後プレドニゾンとシクロフォスファミドにて治療し、腎機能および尿所見改善。

多くの疾患に関連してANCA関連腎炎の発症が報告されているが、薬剤が関与するものとしてはプロピルチオウラシルが有名である。またANCA関連腎炎の発症機序はまだ明確になっていない。

[症例-3] 74歳 男性：リファンピシンによる急性間質性腎炎

1998年3月10日

2か月におよぶ発熱、咳、喀痰を主訴として、H病院初診。胸部X線写真・CT・喀痰培養にて肺結核と診断される。

4月20日 肺結核に対してイソニアジド・リファンピシン・エタンブトールの三者併用療法が開始される。

4月21日 一時軽快していた発熱が再出現、全身に皮疹出現。薬剤アレルギーによるものと診断され全ての薬剤は中止された。腎機能・肝機能は正常で、末梢血液像にて好酸球17%と増加を認めた。

5月11日 皮疹改善したため、リファンピシンのみ再度処方される。

5月13日 発熱・発疹あり、続いて尿量の減少あり。尿蛋白（+）、尿潜血（+）、尿沈渣WBC30-50/F、WBC14700/μl

（好酸球20%）、クレアチニン2.01mg/dl、尿素窒素 38mg/dl

5月27日 クレアチニン2.88mg/dl、尿素窒素46mg/dlと改善しないため腎生検施行。腎生検組織診断：急性間質性腎炎

診断はリファンピシンによる薬剤性急性間質性腎炎とし、薬剤服用中止し、ステロイドは原病を考慮して使用せず、他の抗結核薬に変更し経過を見ることとなる。8月1日クレアチニンは1.30mg/dlまで改善。

腎毒性薬剤における腎障害は輸液法などの予防法の確立や綿密な観察により、その発生頻度は低下してきているが、アレルギーの関与する薬剤性間質性腎炎は予測も難しく大きな問題となっている。薬剤がハプテンとなってアレルギー反応が惹起され、その反応が尿管細管で起きた場合が薬剤性間質性腎炎と考えられる。ハプテンとなりうる薬剤の代表はペニシリン系やセフェム系抗生物質である。他にキノロン系抗菌剤、NSAIDs、H<sub>2</sub>ブロッカー、漢方薬成分など多くの薬物がハプテンになりえる。アレルギー反応が起きる場所により、喘息、皮疹、結膜炎、関節炎、肺炎、肝炎、腎炎などいろいろな疾患が表現形として出てくる。薬剤性間質性腎炎の場合は、薬剤が尿管細管あるいは基底膜の蛋白と結合し免疫系から異物と認識され抗体や感作リンパ球が尿管細管細胞や基底膜に攻撃を加え尿管と間質においての炎症がはじまる。この炎症の発症・進展には補体や各種のサイトカインも関与する。アレルギー反応は全身性に起きることが多いので、アレルギー性間質性腎炎の随伴症状として発熱、発疹、関節痛、下痢などが高頻度に認められる。腎機能低下に伴う乏尿や尿の混濁や血尿が見られることもある。原因薬剤服用後どのくらいの時間がたったら出現するのかが問題になるが、答えとしては多くの場合服用開始後1ヶ月以内であるが、数日から数年後に起きてもよい。治療としては一般にステロイド剤を用いるが、薬剤を中止するだけでも多くの症例は改善に向かう。

以上、免疫毒性・アレルギーが関与する薬剤性腎症につきその代表例を列挙した。特に、アレルギー性薬剤性間質性腎炎の発症予測法、予防法、早期発見法の確立が望まれている。



## 医薬品の免疫毒性試験に関する国際的動向

中村 和市

(日本製薬工業協会 医薬品評価委員会  
基礎研究部会 免疫毒性ワーキンググループ長)

医薬品の免疫毒性試験ガイダンス/ガイドラインに関する動きが活発である。欧州医薬品審査庁(EMA)の医薬品委員会(CPMP)は、1999年12月16日付で免疫毒性ガイダンスを含んだ反復投与毒性試験ガイダンスの改定案を公表、各方面からコメントを求めたのち2000年7月27日付で同ガイダンスを最終化している。最終化されたEMAの免疫毒性ガイダンスでは、全ての新規医薬品の免疫毒性について血液・病理学的検査以外に骨髓細胞数、リンパ球サブセットの分布およびNK細胞活性の検討、あるいはT細胞依存性抗原に対する1次抗体産生能を調べることが盛り込まれている(案の段階では、骨髓細胞数とT細胞依存性抗原に対する1次抗体産生能の検討)。米国食品医薬品庁(FDA)の医薬品評価研究センター(CDER)はまだガイダンス案を公表していないが、第2回アジア・トキシコロジー学会(会期:2000年8月23~25日)では通常行なわれている反復投与毒性試験において免疫抑制が疑われる所見が認められた場合にヒツジ赤血球に対する抗体産生能とリンパ球サブセットの分布を検討することを提案している。しかし、FDAの内部調整を経て、最終的にどのようなガイダンス案となるか不透明なところがある。製薬協 医薬品評価委員会 基礎研究部会は、これまで医薬品の免疫毒性評価に対して積極的な取り組みを行ってきた。今期、同部会の第2分科会(臨床病理、毒性病理、免疫毒性の3ワーキンググループ)は化学物質等安全性試験受託機関協議会所属各社にも呼びかけ医薬品の免疫毒性評価手順を検討するための共同研究を行った。その内容については、第7回免疫毒性研究会(会期:2000年9月25~26日)のワークショップでも取り上げていただいた。なお、共同研究の第1回連絡会は、奇しくもEMAのCPMPが免疫毒性ガイダンス案を公表した1999年12月16日に開かれている。現在、最終とりまとめを行っており、製薬協としての考え方もまとまりつつある。

日・米・欧がそれぞれに医薬品の免疫毒性評価手順を検討している状況を考え、製薬協 基礎研究部会は各極で将来異なった内容のガイダンス/ガ

イドラインが出来上がってくることを予想した。そこで、ICH(International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)の新規トピックとして免疫毒性試験を厚生省(当時)と共同提案することを決め、コンセプト・ペーパー案を作成した。コンセプト・ペーパー案では、各極における免疫毒性ガイダンスの動向、皮膚感作性試験におけるlocal lymph node assayの位置付けなどについて述べ、今後医薬品の免疫毒性評価方法に関する国際的調和を図るべきであると記載した。そして、2000年11月7日のICHの運営会議において厚生省とともにICH新規トピックとして免疫毒性試験を共同提案するに至った。ところで、ICHにおける医薬品承認申請用のCTD(Common Technical Document)のガイドライン(当時は案の段階であったが、現在は最終化されている)では、毒性試験の概要文において局所刺激性試験(皮膚感作性試験が含まれる)、抗原性試験および免疫毒性試験の記載順序が示されている。CTDのガイドラインでは承認申請の際に要求される試験が書かれているわけではないが、運営会議においては、コンセプト・ペーパー案の内容とともに、既存のICHガイドラインがこれらの試験を網羅していない点についても述べた。結果的には、FDAのガイダンス案が未公表であったことから、新規トピックとしての採用決定は持ち越された。しかし、FDAはガイダンス案を近く公表すると明言し、同ガイダンス案を考慮に入れて2001年5月に予定されているICH運営会議において再度審議されることになった。今後、時期については微妙なところがあるが、いずれ免疫毒性試験がICHのトピックになる可能性は高いのではなからうか。

医薬品の皮膚感作性試験に関しても大きな動きがある。FDAは1999年12月28日付でモルモットを用いた皮膚感作性試験(maximization testなど)の代替法としてマウスlocal lymph node assay(LLNA)を認知した。一方EMAのCPMPは、2000年9月21日付で局所刺激性試験ガイダンスの改定案を提示したが、その中で皮膚感作試験においてモルモットを用いた方法に加えてマウスLLNAが記載されていた。話は前後するが、LLNAの原法については、ラジオアイソトープ(RI)が用いられることから、実施の難しい製薬企業の施設が多かった。そこで、製薬協の免疫毒性ワーキンググループでは1999年4月から、それまでに論文になっていたRIを用いない種々の方法の比較検討を開始し



た。その内容については、第7回免疫毒性研究会で発表させていただいた通りである。この成果をもとに、製薬協 基礎研究部会は、2000年12月15日付でEMEAのCPMP宛に非RI法のLLNAについても認めるようコメントを送付した。その結果、2001年3月1日付で最終化されたガイダンスには以下の1文が加わった。‘The use of non-radioisotope endpoint assays assessing cell proliferation may be acceptable provided they give reproducible and reliable results.’ 適当な陽性対照物質をおくことによって、非RI法のLLNAのデータも受け入れられると解釈してよいだろう。

2001年4月以降、国立医薬品食品衛生研究所の澤田純一機能生化学部長を中心としたICHに対応するための研究班が編成される予定であり、日本でも医薬品の免疫毒性試験に関する検討が本格化するものと思われる。今後とも、日本免疫毒性学会において、活発な御議論を御願ひしたいと考えております。(2001年3月30日)

## ライフスタイルおよび精神的健康状態がNK細胞活性におよぼす影響

櫻井知真子、森本 兼囊

(大阪大学大学院医学系研究科社会環境医学講座)

### A. 緒言

Natural Killer(NK)細胞は明らかな抗原による感作なしに標的細胞を殺すことができるリンパ球の一種である。このリンパ球は急性ウイルス感染の初期に働く細胞性免疫の主役であり、また、腫瘍の発生、増殖を阻止する上でも、免疫機能の重要な一端を担うことが示唆されている。NK細胞活性は、明らかな疾病のない健常者においても、その活性値に大きな個人差が存在する。我々は健常者ヒト集団を対象にNK細胞活性の測定を実施し、その活性に影響をおよぼす環境要因について検討を重ねてきた。その結果、個人個人の生活習慣を含むライフスタイルが大きく影響していることが明らかとなった<sup>1)</sup>。また、近年、精神神経免疫学の発展に伴い、神経系および内分泌系と免疫系が相互に密接に調節しあっていることが明らかとなってきている<sup>2)</sup>。免疫系の細胞上にはさまざまなホルモンや神経ペプチドの受容体が存在することが知られており、これらの物質により、免疫機能が修飾されることが明らかとなってきた。神経系、内分

泌系と免疫系との相互連関が理解されるにつれ、人間の精神状態、心理面の変化が免疫系の機能に影響を与えることも証明されつつある。そこで、我々の研究においても、精神状態とNK細胞活性との関連について検討をおこなっている。今回は、阪神淡路大震災被災者を対象におこなった調査により、ライフスタイルと心的外傷後ストレス障害(PTSD: Posttraumatic stress disorder)の症状がNK細胞活性に有意に関連していることが明らかとなったため、その結果を報告する。

### B. 方法

#### 1. 対象者

調査対象は神戸市と周辺の都市および大阪市に所在する企業の従業員で阪神大震災を経験した男性155名である。女性従業員のNK細胞活性測定者は少数存在したが、活性値には性差がみられ、また、少数で解析が困難であったため除外した。調査は阪神大震災から1年2ヶ月経過した平成8年3月からはじめ、7月で終了した。

#### 2. NK細胞活性測定法

対象者の末梢静脈血をヘパリン添加試験管に採取し、NK細胞活性の測定を行った。

測定法には<sup>51</sup>Cr遊離法を用いた。採取した静脈血からFicoll-Paque比重遠沈法にて単核細胞を分離しEffector細胞とした。Target細胞となるガン細胞には慢性白血病由来の細胞株であるK562を使用した。<sup>51</sup>Crで標識したtarget細胞のK562細胞と単核細胞を96穴のマイクロカルチャープレートにて混合し、4時間、37度、5%CO<sub>2</sub>下で培養した後、単核細胞中のNK細胞により攻撃破壊されたtarget細胞から遊離されてくる<sup>51</sup>Crの放射活性をγカウンターで測定した。以下に示した式にて%特異的<sup>51</sup>Cr放出値を算出し、この値をNK細胞活性とした。NK細胞活性=(エフェクター細胞を加えた時の<sup>51</sup>Cr遊離—自然遊離)÷(最大遊離—自然遊離)×100。Effector細胞とTarget細胞を混合培養する際の比率であるET比(effector target比)は5:1,10:1,20:1の三種類を設けたが、すべてのET比で同様の結果が得られたため、10:1の結果についてのみ報告する。

#### 3. 精神的健康状態およびライフスタイルの評価

精神的健康状態およびライフスタイルの評価は自記式質問票にておこなった。PTSDに関する症状については、アメリカ精神医学会のDSM-IVの診断基準に従い、19項目からなる質問票を作成して評価した。19項目それぞれの質問に対し、あてはま



る場合を1点、あてはまらない場合を0点として合計点を算出し、PTSDスコアとした。点数の高いほど、PTSD様症状を持つ傾向があるものとして評価した。ライフスタイルについては、各生活習慣について調査するとともに、森本の8つの健康習慣（運動、飲酒、喫煙、睡眠、朝食、栄養バランス、主観的ストレス、労働時間）より、各習慣について望ましいと思われる習慣を維持している場合は1点、維持していない場合には0点を与え、合計点を健康習慣指数（HPI:Health Practice Index）とし、これを包括的にみたライフスタイルの状況として評価した。

C. 結果

まず、ライフスタイルとNK細胞活性との関係について検討した。HPIの点数別に対象者を3つの群に分類した。すなわち、0-3点をライフスタイルが不良、4-5点を中庸、6-8点を良好と分類し、NK細胞活性値を比較した。その結果、ライフスタイルが良好な群は不良な群、および中庸な群に比較して有意に高い活性値を示した（図1）。また、PTSD症状とNK細胞活性値の関連を検討した。その結果、PTSDスコアが高い人（症状の多い人）の方がスコアが低い人に比し、NK細胞活性値が有意に低い結果が得られた（図2）。次に、PTSD症状とライフスタイルが独立にNK細胞活性に影響しているかを検討するため、NK細胞活性を従属変数とした分散共分散分析をおこなった。ライフスタイル、PTSD症状、年齢、職種を独立変数として解析した結果、ライフスタイルおよびPTSD症状が有意に寄与していた。一方、年齢、職種は有意ではなかった。よって、PTSD症状、ライフスタイルは、それぞれが共にNK細胞活性に影響していることが明らかになった。

以上の結果から、ヒト集団を対象として環境曝露のNK細胞活性値への影響を評価する際には、個人個人のライフスタイルおよび精神状態の影響も考慮することが重要と思われた。

D. 文献

1) Kusaka Y, Kondou H, Morimoto K. Healthy lifestyles are associated with higher natural killer cell activity. *Prev. Med.* 1992;21:602-615.

2) Ader R, Felten DL, Cohen N, Ed., *Psychoneuroimmunology.* (Academic Press, San Diego, ed.2, 1991)

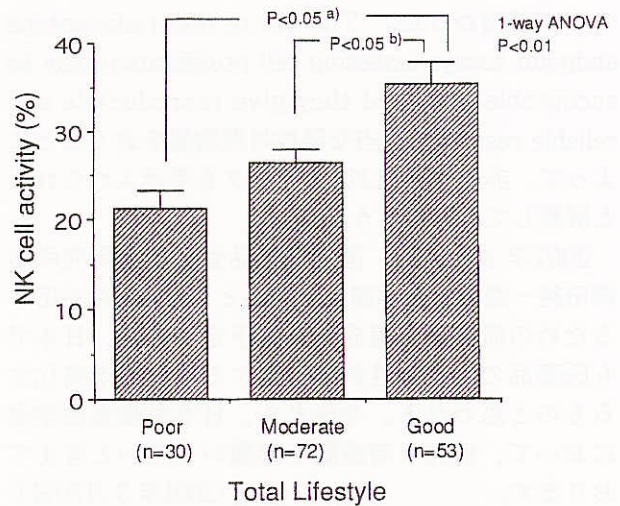


図1 ライフスタイルとNK細胞活性の関係  
対象者をHPIスコアにより3群に分類した。データは平均値とSE。

a) Poor vs Good ( $P < 0.05$  by Bonferroni's multiple comparison test)  
b) Moderate vs. Good ( $P < 0.05$  by Bonferroni's multiple comparison test)

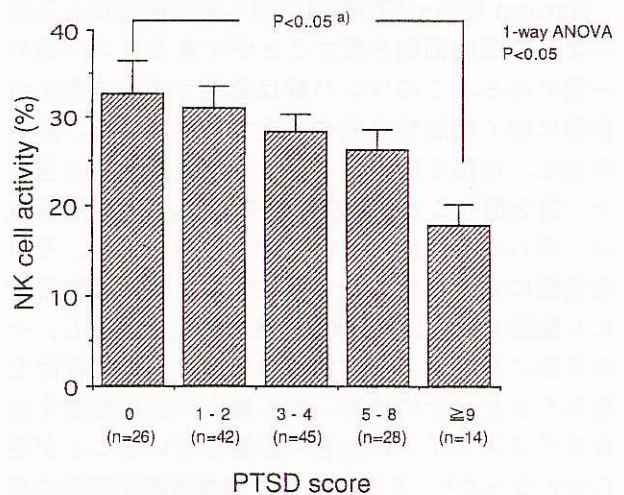


図2 PTSDスコアとNK細胞活性の関係  
対象者をPTSDスコアにより分類した。データは平均値とSE。

a) 0 vs  $\geq 9$  ( $P < 0.05$  by Bonferroni's multiple comparison test)



## ピルとエイズ

武田 玲子

(クリニック 玲 タケダ)

“ピルを使うとエイズが増えるか”という問題は日本におけるピル認可の際、公衆衛生審議会でも問題になったが、先進的？女性たちの“早くピル認可を”という声におされて、多くの論議がなされないまま、ピルとエイズは関係ないという結論が出され、ピルは日本で認可されてしまった。

ピルとエイズは、ほんとうに関係ないのだろうか？ピルを服用すると同時にエイズを予防するとして、コンドームがすすめられている。コンドームはバリアーによる避妊具であり、完全に装着すれば精子をシャットアウトし、同時に当然のことであるが、エイズウイルスの往来をさまたげる。したがって避妊にピルをというより、コンドームを完全に装着する教育こそ、避妊にもエイズ予防にも役立つ。日本では、コンドームの使用人口が多い。しかし、このうちの何人がコンドームのきちんとした装着法の教育を受けているだろうか？エイズが問題になる以前は、コンドームの正確な使い方が、白昼、公衆の面前であるいは、学校の教材として取り上げられることは、まず皆無だったといえるであろう。コンドームは、日本では、ひっそりと二人、あるいは、一人で使い方を学習し、あるいは、学習することもなく不完全なやり方で、使い続けられている。ピルをという前に、どうやってコンドームを使うかを男女が一緒に学ぶというほうが、両性の特に女性の健康に役立つのである。女性のといった訳は、コンドームは、避妊およびエイズ予防のほか、子宮頸ガン（ウイルス感染が引き金になることがわかった）の予防にも役立つからである。

ピルが免疫を抑制してエイズを増やすことも考えられる。女性は月経周期で免疫力が変わる。子宮頸部のS-Cジャンクションにとりついて子宮頸ガンを発症させるパピローマウイルスは排卵期に最も取り付きにくい。これは排卵期に免疫力が最高になるためと考えられている。排卵期に免疫力が高まるのは、受精時に受精卵やそのホストである母体の感染を防ぐ合目的な意味があるのかもしれない。

ピルとエイズの関係を議論した多くの論文がある。結論はまちまちであるが、これらの論文の質も多種多様である。この中から、ピル服用者のエイズ罹患のリスクを計算できるほど十分なデータを持つ論文を選び出し、その論文の質に注目し、

メタ-アナリシスを行ったWangらの論文が1999年5月に出版された。Wangらはメド-ライン（1986年1月から1997年10月）と、エイズ-ライン（1986年から1997年10月まで）、その他、エイズに関する文献目録、エイズ専門家から得られた文献からえられた591の論文を精査した。発表論文に加えて、著者達にもコンタクトをとり、リスクを計算することができる新たなデータがないかを質問している。この中でHIV-1感染の経口避妊薬使用/不使用のオッズ比を報告している論文と、オッズ比が計算可能なデータを備えている論文28を選び出しメタ-アナリシスをおこなった。28論文全体のオッズ比は1.19であったが、7つのコホート研究では1.32であり、21の横断研究では1.21であった。Wangらは、更に、これらの論文の質を検討した。コホートか横断研究か、何年間のピル使用か（スタディの追跡中ずっと、現在の使用、過去に使ったことがある、など）比較対照群との類似性、パブリッシュされたか否かで重みをつけて論文の評価をおこなった。そうやって評価したベターな論文（20）では、オッズ比は、1.27となり、ベストな論文（8）では、1.60となった。スタディが行われた地域をアフリカに限る論文（14）では、オッズ比は1.45となり、ベストな論文（7）ではオッズ比は1.65となった。アフリカは異性間性行為によるHIV感染が最大の地域である。

経口避妊薬によって、HIV感染しやすくなるいくつかの機構が考えられる。エストロゲンとプロゲステロンは免疫系の制御に影響を与え、感染病理に影響を与える。経口避妊薬服用者における細胞性免疫と液性免疫の不足が確認されている。このことは、風疹やヘルペスの罹患リスクの上昇に反映される。生殖器に限定すると、カンジタ膣炎や、クラミディア頸管炎が経口避妊薬使用者に多い。このことで膣や頸部の細胞がHIV感染を起こしやすくなると考えられるが、経口避妊薬は、さらに、膣や頸部の表面の性質を変えることもHIV感染しやすくなる原因である。子宮頸部の外反や膣壁が薄くなってHIVウイルスの侵入を容易にする。免疫機構との関係は不明であるが、経口避妊薬の使用者は子宮頸部のHIV-1感染細胞が剥がれ落ちやすくなるという調査報告があり、これもHIV感染をひろげるとなる。

少し主張が違うが、経口避妊薬と性感染症に関して、日本のセックスワーカーについての調査研究（木本絹子等）がある。この調査でも経口避妊薬服用者はカンジタやヘルペスに有意にかかりやすく、クラミディアにもかかりやすい傾向があることがわかった。面接調査の結果、経口避妊薬服



用者はコンドームを完全には着用していないことが多かった。ピル服用のため、コンドーム装着がおろそかになるというのである。

ピルが免疫にどのような影響をもたらすかという研究は少ない。ピルがアレルギーを増やすことや、ピルやピルと同じ成分を使うhormone replace therapy (HRT) によって、喘息が増えるという報告がありピルが免疫に与える影響について更なる研究が待たれる。

免疫毒性試験プロトコール 第5回

マウス脾臓細胞、胸腺細胞、  
リンパ節細胞の調製法

木村 努、間 哲生  
(三共株式会社安全性研究所)

A. 解説

免疫担当細胞を調製するためには、脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄などの器官が用いられるが、本稿では、マウスの脾臓、胸腺、リンパ節からの細胞調製法につき記す。これらの器官を無菌的に取り出し、氷冷下短時間の間に、培養液または緩衝液中で均一な細胞浮遊液を調製することが必要とされる<sup>1,2)</sup>。

B. 実験材料

1. 解剖器具等

解剖用ハサミ、解剖用ピンセット、無鉤ピンセット (脾臓をほぐす際に使用)

(煮沸滅菌するか、オートクレーブで滅菌したもの)

プラスチックシャーレ、試験管 (disposable)

駒込ピペット、ピペット (滅菌済みのもの)

エッペンドルフピペットおよびチップ

セルストレイナー(2350、FALCON、70 $\mu$ m、Nylon)またはガーゼ

コルク板 (解剖用)

2. 培養液

・10%牛胎児血清(FCS)-RPMI-1640培養液

・Eagle-MEM培養液

3. 器材および試薬類

光学顕微鏡

血球計算盤またはセルカウンター (コールターカウンターなどの自動血球計数器)

トリパンプルー溶液 (0.2% w/v 生理食塩水)

Türk液 (0.01% Gentiana Violet-3%酢酸水溶液)

C. 実験操作手順

1. 脾臓細胞の調製

1) マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、ハサミで腋下静脈を切断し十分に放血する。

2) 酒精綿で消毒済みのハサミとピンセットを用いて、腹部正中線に沿って腹壁を切開する。ピンセットで脾臓を持ち上げ、ハサミで血管や結合組織を切り離す。

3) 脾臓を、培養液 (10%FCS-RPMI液) を少し入れたプラスチックシャーレ (通常氷冷しておく) 中にいれる。

4) 脾臓をピンセットで丁寧にほぐす。この操作は氷冷下で短時間の間に行う。この後の細胞浮遊液を取り扱う操作も氷冷下で行う (ただし、T細胞を除く操作等を行う時は細胞を冷やさないほうがよい)。この段階で、脾臓の結合組織・脂肪組織等が混じるので、駒込ピペットで細胞をほぐした後、セルストレイナーまたはガーゼで濾過する。

5) 細胞浮遊液をプラスチックシャーレから試験管に移し、駒込ピペットで再度細胞をほぐした後、Eagle-MEM液を用いて4 $^{\circ}$ C、950 rpmで8分間、2度遠心洗浄する。(赤血球を除く必要がある時は、この後溶血処理などを行う。)

6) 細胞浮遊液の一部を希釈して、セルカウンターを用いて計数する。血球計算盤を用いる時は、Türk液で適宜希釈して (具体的には1/10、1/100等)、有核細胞数を顕微鏡下で計数する。生細胞数の計数には、Eagle-MEM液で適宜希釈して、トリパンプルー溶液を1:1の割合で加え、血球計算盤を用いて顕微鏡下で行う。(生細胞数の計数に当たっては、駒込ピペットで細胞をほぐす際、泡立ててしまうとリンパ系細胞が死んでしまうのですばやく行うこと。)

7) 細胞を培養液に浮遊させ、一定の細胞濃度に調整する。

2. 胸腺細胞の調製

胸腺細胞浮遊液には、リンパ節細胞と血液細胞が混入しないようにする。(リンパ節を誤って摘出しないためには、0.1 mlの墨汁・黒色インキ等 (生理食塩水で5倍希釈) をマウスの腹腔内に投与し、



傍胸腺リンパ節の位置を予め確認しておくといよい。リンパ節は黒くなるので識別できる。)

- 1) マウスの後大静脈をハサミで切断し十分に放血する。
- 2) マウスを仰向けにして四肢をピン等で固定し、胸部～腹部を酒精綿で消毒した後、皮膚正中を切開し、ついで両側前肢へとY字型に切開する。新しいハサミとピンセットを用い、先ずピンセットで剣状突起を持ち上げながら、ハサミで腹壁、横隔膜、両側の肋軟骨部の順に切り開き、胸骨を中心にした胸部前壁を取りさり、胸腔上部を露出させる。その後、胸腺を注意深く摘出する。この時、周囲の脂肪や結合組織は丁寧に取り除く。
- 3) 胸腺を培養液 (10%FCS-RPMI液) を少し入れたプラスチックシャーレ (氷冷しておく) 中に入れる。胸腺に血液がついている場合にはすすぎ用の培養液中で充分すすぐ。
- 4) 胸腺をピンセットで丁寧にほぐし、細胞浮遊液を氷冷下で調製する。駒込ピペットで細胞をほぐし、遠心分離する方法は脾臓細胞の調製と同様である。
- 5) 細胞を培養液に浮遊させ、血球計算盤またはセルカウンターで細胞数をカウントし、一定の細胞濃度に調整する。

### 3. リンパ節の細胞調製

リンパ節は脂肪組織よりやや灰色～黄色がかった色調をしており、触れるとコリコリする感じがする。まわりの脂肪組織をはがし、10%FCS-RPMI液 (氷冷しておく) 中に入れ、脾臓の場合と同様に細胞浮遊液を調製する。マウスの場合、腸管膜リンパ節が比較的大きいので使われるが、鼠蹊リンパ節、膝窩リンパ節を使うこともある。リンパ節の位置を前もって確かめるため、Freund完全アジュバントを足蹠に注射したマウスを解剖するとよい。

- 1) マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、四肢を伸ばしてコルク板にとめる。
- 2) ハサミとピンセットを用い皮膚を皮下織からはがし、皮膚をコルク板にピンでとめる。
- 3) リンパ節は結合組織と脂肪中に埋もれているので、ピンセットで探し出す。
- 4) 腸管膜リンパ節をとるには、腹腔を開け腸をつまみあげて、上行結腸の腸管膜にある腸管膜リンパ節 (mesenteric lymph node) を露出させる。
- 5) 膝窩リンパ節 (popliteal lymph node) をと

るにはマウスをうつぶせにおき、頭を術者の向こう側になるように置く。マウス後肢の、かかとにハサミで3 mm程切れ目を入れ、切れ目から皮膚を手でつかんで皮膚を裏返すように、後肢の付け根に向かって引っ張り上げる。そうすると、膝関節の裏側の膝窩が露出する。膝窩リンパ節は、膝窩の上端の筋肉組織に埋もれている。筋肉の外層を切って膝窩リンパ節を露出させる。

- 6) リンパ節は培養液 (10%FCS-RPMI液) を少し入れたプラスチックシャーレ (氷冷しておく) 中に入れる。この際、余分な脂肪は取り除くこと。
- 7) リンパ節をプラスチック製注射器のピストン (テルモ、1 mlツベルクリン用) の背中側 (ゴムのついていない側) の平らな部分で押しつぶして、リンパ節細胞を培養液中に分散させる。
- 8) 解離した細胞は遠心管に入れて、5～6分間静置し、細胞塊を沈ませる。浮遊細胞を遠心管に移して、Eagle-MEM液を用いて4℃、950 rpmで10分間遠心洗浄する。細胞を数回洗い脂肪を取り去る。
- 9) 細胞を培養液に浮遊させ、血球計算盤またはセルカウンターで細胞数をカウントし、一定の細胞濃度に調整する。

### D. 留意事項

- 1) 脾臓細胞浮遊液を調製する際には、赤血球が混じるので放血を充分行う事が重要である。必要に応じて溶血処理を行う。また、脾臓は組織学的にリンパ様細胞以外の間質系細胞の比率が多いので、自動血球計数器で細胞数をカウントする際には、どのような種類の細胞をカウントしているのかを、血球計算盤と顕微鏡を用いてあらかじめ確認しておく必要がある。
- 2) 脾臓細胞浮遊液に細胞塊がある場合は、よく混合し、しばらく放置した上清を用いるとよい。

### E. 参考文献

- 1) 細菌学実習提要 (改訂5版)、医科学研究所学友会編、丸善。p.337～340。1977年
- 2) 細胞免疫実験操作法 (今井、川口、原田共訳)、理工学社刊、p.1～15。1982年  
Selected Methods in Cellular Immunology, Barbara B.Mishell, Stanley M.Shiigi.



## ラット末梢血白血球の計数及び百分比

土井 久子、吉岡 勝  
(武田薬品工業株)

## A. 解説

末梢血白血球数の増加からは感染あるいは炎症反応等が、減少からは骨髄における前駆細胞産生低下、あるいは抗生物質や抗ガン剤等の薬物による影響が推察できる。末梢血白血球は好中球、好酸球及び好塩基球等の顆粒球、リンパ球並びに単球で構成されている。これらの細胞の百分比と白血球数から各細胞数を算出することにより、影響を受けた白血球の種類を知ることができる。

末梢血白血球の計数には一般に自動分析装置を用いられる。これはシスメックス、バイエルメディカル等から販売されている。百分比算出は、自動分析装置を用いてパターン認識法あるいはフローサイトメトリーにより分類する方法と血液塗抹標本を鏡検する方法がある。

## B. 実験材料等

## ① 全血

抗凝固剤はEDTA・2Naを使用する。  
必要量は次の通り。

自動分析装置による白血球計数用・・・数百 $\mu$ L  
(測定機により異なる)

塗抹標本作成用・・・約4 $\mu$ L (用手法)、約200 $\mu$ L (塗抹遠心機を用いる場合)

## ② 試験管

自動分析装置で測定する場合は、専用の試験管が販売されている。真空採血管のまま測定できる機器も多い。

## ③ 精度管理血球 (自動分析装置を用いる場合)

測定機に対応した管理血球が機器メーカーから販売されている。

## ④ 染色試薬 (血液塗抹標本作製用)

・メタノール

標本の固定に用いる。

・pH6.8-Soerensenリン酸緩衝液 (Buffer)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.73gと $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.54gを精製水に溶解し10Lとする。

・May-Gruenwald染色液

Bufferで3倍希釈する。用時調製。

・2.5 v/v% Giemsa染色液

Giemsa液をBufferで希釈する。用時調製。

・約0.01 v/v%酢酸水溶液

May-Giemsa重染色の調色に用いる。用時調製。

・キシレン

標本の透徹に用いる。

・封入剤 (Fischer Permount等)

標本の封入に用いる。

## ⑤ 器具 (血液塗抹標本作製用)

スライドガラス、カバーガラス、染色壺8個、ステンレス製染色かご

## C. 実験操作手順

## 自動分析装置を用いる場合

## ① 精度管理

精度管理血球を数回測定し、測定値をメーカー提示の参考値あるいは施設で定めた許容値と比較することにより機器の精度管理を行う。

## ② 試料の測定

多くの機器では、細胞分画の設定は動物種毎にプログラム固定されているため、実験者は動物種を選択して試料をセットするだけでよい。詳細は機器のマニュアルに従う。

## 血液塗抹 (May-Giemsa重染色) 標本の作製及び鏡検の方法

## ① 血液の塗抹

スライドガラス上に血液を約4 $\mu$ L排出し、カバーガラスを用いてほぼ一様の厚さになるように薄く塗抹する。塗抹遠心機を用いる場合は血液を約120~200 $\mu$ L排出する。塗抹後、2時間以上風乾させる。

## ② 固定

メタノールで5分間固定する。

## ③ 染色

それぞれの溶液を入れた染色壺に、スライドガラスを入れた染色かごを順に浸漬する。洗浄操作では、染色かごを壺の中でゆっくり2回上下させる。

④ May-Gruenwald染色液 5分間

⑤ Giemsa染色液 5分間×3槽

⑥ pH6.8-Soerensenリン酸緩衝液 1回洗浄×2槽

⑦ 酢酸水溶液 1回洗浄

⑧ 精製水 1回洗浄

⑨ 標本の風乾 数時間

⑩ 封入

⑪ 標本をキシレンに浸漬し、透徹する。

⑫ 標本をキシレン容器より取り出し、濾紙の上に置く。

⑬ ガラス棒を用いて、封入剤を塗抹面に載せる。

⑭ カバーガラスをかける。この時気泡などが入らない様注意する。



## ⑮ 数時間放置して乾燥させる。

なお、②～④の操作はプレパラート自動封入機を用いてもよい。

## ⑯ 鏡検

- ・光学顕微鏡下（弱拡大：対物10～20倍）で予備観察し、細胞の重なりが少なく、ほぼ均等に塗抹されている部分を観察部位に選定する。
- ・観察開始位置にマジックで印をつける。
- ・光学顕微鏡下（強拡大：対物40～100倍）で観察する。
- ・標本1枚あたり100個の白血球を観察し、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球及び単球の5種類に分類する。
- ・それぞれの識別方法の目安を示す。

	核	細胞質	備考
リンパ球	円形、腎形。濃染し、内部構造の観察が困難な場合もある。	無色透明から淡青色に染色される。面積は非常に小さいものもある。	
好中球	不定形。ラットでは通常リング状によじれているが、分葉していることもある。	無色透明から水色に染色される。May-Giemsa染色では顆粒は観察されない。	
好酸球	不定形。	赤色の顆粒が認められる。	
好塩基球	不定形。	青色の顆粒が認められる。	ラットでは通常認められない。
単球	不規則円形、腎形。リンパ球に比べ淡染で繊維網状構造を示す。	水色に染色。核周囲に紫紅色の微小顆粒を認めるものもある。	リンパ球との識別には輪郭の不明瞭さ、核の構造、大きさに着目する。

\*好中球はさらに杆状核白血球と分葉核白血球に分けることもある。また、自動分析装置の種類によっては幼若細胞も計数しているものがある。

## D. 参考データ

参考までに当社の背景データ（10週齢 Crj:CD(SD)IGSラット）を示す。

項目名	雄	雌
白血球数 (x100個/ $\mu$ L)	74-169	51-136
リンパ球 (%)	81-96	84-97
好中球 (%)	3-17	2-14
好酸球 (%)	0-3	0-3
好塩基球 (%)	0-0	0-0
単球 (%)	0-2	0-2

雌雄各178例（白血球数）、各150例（百分比）の5%点～95%点を示した。

白血球数：電気抵抗検出方式（シスメックスE-5000）、百分比：鏡検

## E. 留意事項

## 1. 試料の保存安定性

自動分析装置で測定する場合、採血後約6時間以内に使用する。塗抹標本作製する場合、塗抹は採血後速やかに、固定までを当日中に実施する。

## 2. 塗抹標本の染色程度の調節

上に示した条件で染色が不十分な場合は染色時間を長くする。染色液の濃度を上げると、核の構造や顆粒の観察が困難になる可能性がある。

## 3. 白血球数測定への干渉要因

自動分析装置で測定した白血球数が高値の場合、赤芽球数が含まれている可能性がある。この場合は、塗抹標本を鏡検し、白血球を200個算定する間に観察される赤芽球数から白血球数と赤芽球数の比率を算出し、機器で測定した白血球数を補正する。

## F. 参考文献

- 1) 金井 泉：臨床検査法提要、改訂第30版、金原出版、1993
- 2) 小宮正文：図説・血球の見方
- 3) 日野志郎、臨床血液学、p159、医歯薬出版、1987

## ラット免疫グロブリンクラス

## (IgM、IgG、IgA)の測定法

久田 茂、永嶋 雅子  
(帝国臓器製薬株式会社 安全性研究部)

## A. はじめに

各クラスの免疫グロブリン（免疫グロブリンクラス）の血清中濃度は、酵素免疫測定法（ELISA）により少量の血清試料を用いて容易に測定できる。SPF動物では、血中抗体の多くは腸内細菌であるグラム陰性菌のリポ多糖類（LPS）あるいは莢膜抗原である多糖類（PS）に対する抗体と考えられ、T非依存性にIgM抗体産生細胞に分化する。一方、これらの抗体のクラススイッチにはT細胞由来のサイトカインが必要とされる。脾臓辺縁帯B細胞の多くはこのようなT非依存性抗体産生細胞と言われている<sup>1)</sup>。

これらの事実から、血清免疫グロブリン濃度の変化は免疫毒性の発生に伴って必ず発生する鋭敏な指標とはいえないが、IgMクラスの変動がB細胞機能の変化を反映し、IgGあるいはIgA濃度の変化がT細胞機能の変化を反映する可能性が考えられる。したがって、反復投与試験において、病理組織学的所見と併せて免疫グロブリンクラス濃度の変化を検討することにより、発生した免疫毒性の特性をより詳細に把握することが出来ると考えられる。

本稿では、サンドウィッチELISA法により容易にラット免疫グロブリンクラスの測定が可能なキットを用いた測定法を紹介すると共に、参考までに、免疫グロブリン濃度の変化しなかった例お



よび変化した例（ラット及びマウス）について紹介し、反復投与試験における免疫グロブリンクラス濃度測定の意義について考えてみたい。

## B. 実験材料等

Bethyl社 (www.bethyl.com) の測定キットを用いる測定法について以下に紹介する。同キットはフナコシあるいはコスモバイオより入手可能である。

### 1. 定量キット

#### 1. 種類

1. Rat IgM ELISA Quantitation Kit (Bethyl、カタログ番号E110-100)
2. Rat IgG ELISA Quantitation Kit (Bethyl、カタログ番号 E110-128)
3. Rat IgA ELISA Quantitation Kit (Bethyl、カタログ番号 E110-102)

#### 2. キット内容

- 1) ヤギまたはウサギ抗ラットIgM (IgG、IgA) アフィニティ精製抗体
- 2) ラット標準血清 (rat Ig reference serum)
- 3) ヤギまたはウサギ抗ラットIgM (IgG、IgA) 抗体-HRP

### 2. 試薬類

- 1) 固相化抗体希釈液：0.05M 重炭酸緩衝液 (pH9.6)
- 2) ブロッキング液：1% BSA-TBS  
Tris Buffered Saline with BSA Pouch (Sigma、製品番号 T6789)
- 3) 血清試料および標準血清希釈液：1% BSA-TBS (0.05% Tween 20添加)  
上記の1% BSA-TBSにTween20を0.05%となるように添加する。
- 4) 反応停止液：2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 5) 洗浄液：Tween加TBS (0.05M Tris、0.14M NaCl、0.05% Tween 20、pH 8.0)
- 6) 酵素基質液  
TMB Microwell Peroxidase Substrate System、(KPL、カタログ番号50-76-00)

### 3. 器材類

- 1) 96ウェルマイクロプレート  
Nunc C Bottom Immunoplate 96 well (Nunc、製品番号 446612)

## C. 操作手順

以下の分注における希釈倍数は、今回確認したロットのものについて記した。

1. アフィニティ精製抗体を固相化抗体希釈液で100倍に希釈する。
2. 上記の抗体液を100 $\mu$ Lずつマイクロプレー

トの各ウェルに加えて室温に60分間静置する（固相化）。

3. Tween加TBSで2回洗浄する。
4. 1% BSA-TBSを200 $\mu$ Lずつ各ウェルに加えて、室温に30分間静置する。
5. Tween加TBSで2回洗浄する。
6. 希釈液（1% BSA-TBS with 0.05% Tween20）で標準血清および血清試料を以下のように希釈する。

#### 1) 標準血清

IgM：1.3mg/mLの標準血清を650～10400倍に希釈する。

(2000、1000、500、250、125、62.5 ng/mL)

IgG：13.22mg/mLの標準血清を26440～1692160倍に希釈する。

(500、250、125、62.5、31.25、15.6、7.8ng/mL)

IgA：0.24mg/mLの標準血清を240～15360倍に希釈する。

(1000、500、250、125、62.5、31.25、15.6ng/mL)

#### 2) 血清試料

標準血清の濃度範囲内で希釈する。

7. プレート毎に上述の段階希釈した標準血清を100 $\mu$ Lずつデュプリケートで各ウェルに加え、さらに適度に希釈した試料血清を同様にデュプリケートで各ウェルに加える。60分間室温に静置する。
8. Tween加TBSで2回洗浄する。
9. 酵素標識抗体をIgMは60000倍、IgGは100000倍に、IgAは80000倍に希釈し、100 $\mu$ Lずつ各ウェルに加えて室温で60分間静置する。
10. Tween加TBSで3回洗浄する。
11. 酵素基質液を調製し、100 $\mu$ Lずつ各ウェルに加えて、室温で5～30分間静置する。反応停止には2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を100 $\mu$ Lずつ各ウェルに加える。
12. マイクロプレートリーダーを用いて450nmにおける吸光度を測定する。

## D. 濃度算出法

X軸を濃度、Y軸を吸光度（対数目盛）として標準曲線を作成し、直線性の良好な濃度範囲で近似曲線を求め、その数式から各々のサンプルの濃度を算出する。

## E. 留意事項

1. 市販抗体を使用する場合  
市販の抗体、酵素標識抗体および標準血清を用



いて測定する場合には、固相化のための抗体および酵素標識抗体の希釈倍数、ならびに測定濃度範囲を抗体のロット番号毎に決定する必要がある。我々は、抗体の固相化には重炭酸緩衝液 (pH 9.6)、ブロッキングには1% BSA-PBS、ウェルの洗浄には0.05% Tween 20加PBS、発色基質液としてはo-フェニレンジアミン液 (OPD 40mg、過酸化水素 10 $\mu$ L、pH4.7クエン酸緩衝液 100mL) を用いてきた。固相化用の抗体を比較的高濃度に設定し、酵素標識抗体を極めて高希釈で用いることがポイントと思われる。

## 2. 測定値は相対値

IgGには複数のサブクラス抗体を含むために、免疫毎に得られる抗体の特異性が異なる可能性がある。今回、我々は同一の血清試料について、我々の従来法とキットによるELISA法による測定結果を比較してみた。その結果、IgG濃度の測定値は両者間で結果がばらつき、相関性が低かった。一方、IgM濃度の測定値は同一ではないものの両者間で高い相関性が得られた。以上の検討からELISAにより得られたIgクラスの測定値は相対値として扱う必要があるものと考えられた。さらに、飼育条件、週齢などにより免疫グロブリン濃度は大きく変動するので、しっかりした対照群を設定する必要があると思われる。

## F. 血清免疫グロブリンクラスの測定例

以下に免疫グロブリンクラスの測定例について、弊社経験例から紹介する。ラットCY試験以外は弊社の従来法による測定結果を示した。

### 1. Medroxyprogesterone acetate (MPA) および Hydrocortisone (HC)

雌Crj:CD(SD)ラットに10週齢時からMPAを0、1および10mg/kg/dayの用量で、HCを10mg/kgの用量で28日間強制経口投与した。

MPA投与群ではそのglucocorticoid様作用により副腎皮質が用量依存的に萎縮すると共に、胸腺、脾臓、および膝窩リンパ節の重量が用量依存的に低下した。病理組織学的には軽～中度の胸腺皮質の萎縮が高頻度で発生したが、末梢リンパ性器官への影響は軽度であり、脾臓PALSあるいはリンパ節傍皮質領域の軽度萎縮が低頻度で認められた。一方、血清IgMおよびIgGクラスの濃度変化は認められなかった (図1)。HC投与群では副腎皮質の萎縮は認められなかったが、他の変化はMPA投与群と同様に認められた。

したがって、MPAおよびHCの主な標的は胸腺細胞であり、末梢リンパ性器官への影響はT細胞を中心に軽度と考えられた。(久田、第13回日本毒性病理学会)

### 2. cyclophosphamide (CY)、ラット

6週齢の雄Crj:CD(SD)IGSラットにCYを3mg/kg/dayの用量で28日間強制経口投与して、溶媒投与群と比較した。

CY投与群では胸腺および脾臓重量の変化は認められなかったが、病理組織学的に脾臓およびリンパ節における胚中心の減少あるいは消失、ならびに脾臓における辺縁帯の萎縮が観察された。一方、CY投与群でIgMクラスの顕著な低下、ならびにIgGおよびIgAクラスの軽度な低下が認められた (表1)。これらの変化はいずれもCY 3mg/kgの連続投与における免疫毒性の主要な標的がB細胞系であることを示すと思われた。

### 3. cyclophosphamide、マウス

雌雄のCB6F1マウスにCYを50および150mg/kg/weekの用量で週1回、5回強制経口投与し (投与開始時10-11週齢)、最終投与の翌日に安楽死させて検査した。CY投与群には胸腺および脾臓重量の用量依存的な低下が認められ、病理組織学的には胸腺皮質の軽度萎縮、ならびに脾臓およびリンパ節におけるリンパ小節の萎縮が認められた。さらに150mg/kg群では脾臓におけるPALS、辺縁帯あるいは脾索の萎縮、およびリンパ節傍皮質領域の萎縮が認められた。一方、IgMおよびIgGクラスは用量依存的に低下し、150mg/kgにおけるIgGの低下は50mg/kg群に比してより明らかであった (図2)。この例は、ラットへの3mg/kgの連日投与に比して、マウスに高用量 (50、150mg/kg) のCYを週1回間欠投与した場合にT細胞への毒性がより強く発現することを示すと考えられた。(久田、第27回日本トキシコロジー学会)

## G. まとめ

免疫グロブリンクラス濃度は、少量の血清試料を用いてELISA法により容易に測定可能である。免疫グロブリン濃度は全ての免疫毒性の発現に伴って必ず変動する鋭敏な免疫毒性パラメータではない。しかし、反復投与試験において病理組織学的検査と併せて評価することにより、発現した免疫毒性の特性をより詳細に理解することが可能と考えられる。

表1 Cyclophosphamide (CY)投与ラットにおけるIgM、IgGおよびIgA濃度 (mg/L)

CY (mg/kg)	IgM	IgG	IgA
0	456.0 $\pm$ 58.1	870.1 $\pm$ 207.7	47.3 $\pm$ 9.0
3	240.4 $\pm$ 52.9**	616.9 $\pm$ 345.8	33.8 $\pm$ 4.6**

\*\*P<0.01.



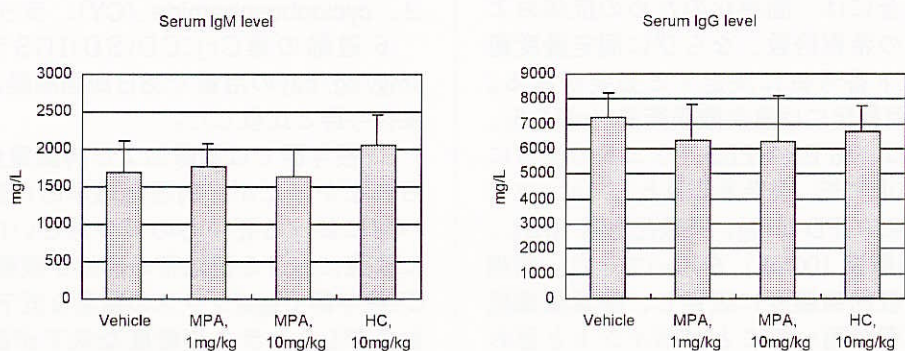


図1 Medroxyprogesterone acetate (MPA) およびHydrocortisone (HC)投与ラットにおける血清IgMおよびIgG濃度

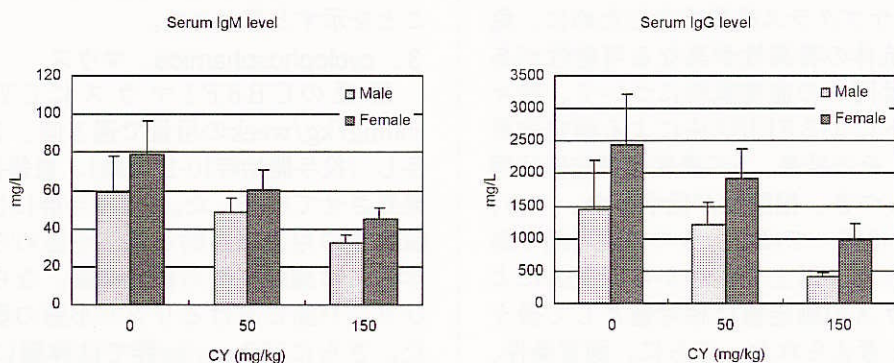


図2 50および150mg/kgのcyclophosphamide(CY)を週1回、5回投与したCB6F1マウスにおける血清IgMおよびIgG濃度

#### H. 参考文献

- 1) Haschek, W.A. and Rousseaux, C.G. (eds.) (1998) Fundamentals of Toxicologic Pathology. Academic Press, San Diego, pp244-245.
- 2) Vos, J.G. et al. (1979) Quantification of total IgM and IgG and specific IgM and IgG to a thymus-dependent (LPS) and thymus-independent (tetanus toxoid) antigen in the rat by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Ann. N.Y. Acad. Sci., 320:518-534.
- 3) Hedger, M.P. et al. (1994) Measurement of immunoglobulin G levels in adult rat testicular interstitial fluid and serum. J. Androl., 15: 583-590.
- 4) Vos, J.G. et al. (1982) Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in immunotoxicity testing. Environ. Health Perspect., 43: 115-121.
- 5) Salauze, D. et al. (1994): Quantification of total IgM and IgG levels in rat sera by a sandwich ELISA technique. Comp. Haematol. Int., 4:30-33.
- 6) 東京大学医科学研究所学友会編 (1988) 微生物学実習提要、丸善、pp311-315.

#### 編集後記

いよいよ日本免疫毒性学会の船出の年を迎えました。本学会が発展するためには、学会員の皆様の学会での活発な議論や情報交換を通じて相互のレベルの向上がはかられ、また同時に海外の研究者にインパクトのある成果を提供することではないかと考えております。4月のネイチャー誌に“Cinderella goes to the ball”という記事があり“自然免疫”が脚光を浴びてきたことが述べられていました。時代のブームを先取りするため独自のテーマで生き抜きたいものです。ImmunoTox Letterもそのための一助としておおいに利用していただきたいと考えております。さらに会員の数を増やしていくことも考慮に入れ、会員の皆様の自由で闊達なご意見を心よりお待ちしております。(藤巻秀和記)

編集・発行：日本免疫毒性学会  
発行日：平成13年5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