

# ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会：The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 6 No. 2 (通巻12号)2001

## 目次

第8回日本免疫毒性学会学術大会報告	1
第9回日本免疫毒性学会(予告)	1
会計報告	2
学会の歩み(資料)	3
座長のまとめ	4
ワークショップ報告	7
「免疫毒性試験プロトコル」第6回 Affymetrix GeneChipを用いた 遺伝子発現解析	8
国立医薬品食品衛生研究所 中村 亮介、手島 玲子、澤田 純一 DiOC18色素を用いたフローサイト メトリーによるNK細胞活性の測定	10
塩野義製薬株式会社 金崎佳世子、中村 和市 お知らせ	12

## 第8回日本免疫毒性学会学術大会報告

平成13年9月17、18日の両日、免疫毒性研究会から日本免疫毒性学会となって初めて開催される第8回学術大会が、香山不二雄(自治医科大)大会会長の運営により、栃木県総合文化センターにて、121名の参加者の下に、「今世紀のバイオ食品、バイオ医薬品の展望」をテーマに開催された。今回の海外からの招待講演は、オランダよりWageningen University & Research CenterのHarry A. Kuiper教授をお招きし、現在最も感心のある遺伝子組換え食品の安全性評価の方策について、それらの持ち合わせる抗原性の評価も含めご講演頂いた。ご講演は、先ず諸外国における遺伝子組換え作物の安全性評価の法的規制の現況について報告があり、次いで新しく発現したタンパクの安全性評価、引いては全遺伝子組換え食物の安全性評価について言及され、更に遺伝子組換えによる意図しない作用の検出とその特徴、遺伝子組換え作物の抗原性の検出方法、最後に組換え植物のマーカー遺伝子のヒトや動物の消化管微生物への移入について考慮すべき点が述べられ、今後の検討課題も含めて意義のある講演であった。シンポジウムは学術大会初日に「遺伝子組換え食品とアレルギー」と題して行われ、先ず組換え食品の安全性確保に関する国内外の規制当局の動きについて、事例を交え詳細な発表があり、食物アレルギーの臨床では、臨床症状の発現と食物摂取の関係について報告があり、食物アレルギーの治療における難しさと易しさが示された。シンポジウムの最後は、遺伝子組換え食品のアレルゲン性試験について、その詳細が報告され、聴講者においては食物アレルギーの全貌が理解でき、得るところの多いセッション

であったと思われる。ワークショップは昨年と同じく「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、製薬協における共同研究の成果が報告された。最初は低分子化合物の抗原性試験としてマウス膝窩リンパ節試験についての報告があり、引き続き昨年病理・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を行ったが、今年は得られている成績を再評価し、病理学的所見とフローサイトメトリー、血液・病理学的所見と特異抗体産生能、フローサイトメトリーと特異抗体産生能のそれぞれの相関性について報告され、更に被検物質の投与期間についての考察も行われた。今回の製薬協における共同研究の成果は、今後の医薬品開発における免疫毒性試験法の検討に貴重な情報を提供し得るものと考ええる。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、当学会の趣旨に沿うものであった。

## 総会報告

第8回日本免疫毒性学会学術大会総会において以下の事項が行われた。

1. 香山不二雄大会会長より、当学術大会が「日本免疫毒性学会」となり初めての大会である旨宣言された。
2. 会計報告：平成12年度収支決算報告ならびに平成14年度予算案が示され、承認された。
3. 学会会則(案)および改選役員：学会移行に伴う「日本免疫毒性学会会則」に関する幹事会案が示され、承認された。また、改選役員の紹介も行われた。
4. 次会第9回日本免疫毒性学会学術大会予告：大会会長 荒川泰昭教授(静岡県立大食品)が紹介された。

(記：牧幹事)

## 第9回日本免疫毒性学会予告(1報)

会期：平成14年9月19日(木)、20日(金)

会場：グランシップGranShip

(Shizuoka Convention & Art Center)

(JR東静岡駅前)〒422-8005 静岡市池田79-4

TEL:(054)203-5713 FAX:(054)203-6710

共催：日本衛生学会、日本微量元素学会ほか

主要テーマ：

「免疫の病的老化」

—環境因子による粘膜免疫と胸腺免疫の病的老化—

「保健機能食品と免疫—その有効性と安全性」

発表形式：一般演題は口演発表とポスター展示発表

演題申込締切日：7月1日(月)

学会長(組織委員長)：大沢 基保(帝京大・薬学)

年会長(実行委員長)：荒川 泰昭(静岡県立大)

*ImmunoTox Letter*

免疫毒性研究会 平成12年度（2000年度） 収支決算報告

(単位：円)

収 入	予 算	決 算	備 考
前年度（H11年度）繰越金	2,000,000	2,290,935	内訳（会員数260名＋1社、2001年3月31日現在） 一般会員；4,000×226＝904,000（未納28） 学生会員；2,000×5＝10,000（未納1） 賛助会員；20,000×1＝20,000 一般会員；4,000×17
H12年度会費	1,040,000	934,000	
前年度以前会費	0	68,000	
預金利子	2,000	1,840	
雑収入	0	0	
収入合計	3,042,000	3,294,775	

支 出	予 算	決 算	備 考
第8回学会運営補助	600,000	600,000	交通費他 切手代 第5巻1、2号 文具、アルバイト代、振込手数料等 次年度（2001年度）への繰越額
会議費	250,000	172,637	
通信費	200,000	80,610	
ImmunoTox Letter 印刷費	200,000	196,980	
事務費	200,000	37,112	
予備費	200,000	0	
次年度への繰越見込み額	1,392,000	2,207,436	
支出合計	3,042,000	3,294,775	

収支報告につき、平成13年8月22日、高橋道人監事により監査を受け、さらに9月17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14年度（2002年度） 予算案

(単位：円)

収 入	予 算	備 考
前年度（H13年度）繰越金	2,000,000	内訳（会員数257名、2001年6月30日現在） 一般会員；4,000×251＝1,004,000 学生会員；2,000×6＝12,000 賛助会員；20,000×1＝20,000
H14年度会費	1,056,000	
預金利子	2,000	
雑収入	0	
収入合計	3,058,000	

支 出	予 算	備 考
第10回学会運営補助	600,000	交通費他（H13年度予算と同額） 切手代（H13年度予算と同額） （H13年度予算と同額） 文具、アルバイト代、振込手数料等 （H13年度予算と同額） 次年度（2003年度）への繰越見込み額
会議費	300,000	
通信費	150,000	
ImmunoTox Letter 印刷費	300,000	
事務費	200,000	
予備費	100,000	
次年度への繰越見込み額	1,408,000	
支出合計	3,058,000	

予算案につき、平成13年9月17日の総会にて承認を受け予算となっております。

## 資料

## 免疫毒性研究会／日本免疫毒性学会の歩み

9月の総会において、日本免疫毒性学会の発足が宣言されました。つきましては、学会の発足に当たり、免疫毒性研究会以来の学会の歩みを会員の皆様のご参考までに資料としてまとめてみました。今後とも、免疫毒性研究と学会の発展のために会員の皆様のご尽力をお願い申し上げます。

日本免疫毒性学会・事務局 大沢 基保

免疫毒性研究会（設立1994.6.1）

第1回研究会（1994/10/14）

昭和大学・東京（吉田武美幹事）

サブテーマ：免疫毒性研究の概念と展開

招待／特別／基調講演：

免疫毒性研究の課題（大沢基保、帝京大）

免疫毒性試験法の国際的動向

（三森国敏、国立衛試）

医薬品開発から見た免疫毒性

（牧 栄二、ヤンセン協和）

大気汚染物質と免疫機能

（藤巻秀和、国立環境研）

第2回研究会（1995/9/25）

昭和大学・東京（牧 栄二幹事）（吉田武美幹事）

サブテーマ：免疫毒性試験の方法

招待／特別／基調講演：

化学物質・薬物の免疫毒性学的評価の視点

（M.I.Luster、アメリカ/NIEHS）

ミニシンポジウム：

リスクアセスメント指標としての免疫毒性

（谷川 武、東大）

（吉田貴彦、東海大）

（香山不二雄、産医大）

ワークショップ：ラットを用いる免疫毒性試験法

一般演題：18

第3回研究会（1996/9/25-26）

昭和大学・東京（牧 栄二幹事）（吉田武美幹事）

サブテーマ：免疫毒性とリスクアセスメント

粘膜免疫と免疫毒性

招待／特別／基調講演：

化学物質・薬物の毒性の免疫病理学的評価とリスクアセスメント

（J.G.Vos、オランダ/RIVM）

バイオ医薬品の安全性評価と免疫毒性

（J.A.Cavagnaro、アメリカ/FDA）

粘膜免疫と免疫毒性（名倉 宏、東北大）

ミニシンポジウム：気道免疫における免疫毒性

（大利隆行、東大）（津田 徹、産医大）

ワークショップ：

ラットを用いる免疫毒性試験法/評価

一般演題：19

第4回研究会（1997/9/30-10/1）

東邦生命ホール・東京（高橋道人幹事）

サブテーマ：免疫毒性の機序

アレルギー

招待／特別／基調講演：

化学物質・薬物による自己免疫とその機序

（E.Gleichmann、ドイツ/ジュッセルドルフ大）

サイトカインと病態：その制御へのアプローチ

（浅野茂隆、東大）

ミニシンポジウム：

生活環境アレルギー：その作用と病態

（村中正治、湯河原厚生年金病院）

（池澤善郎、横浜市大）

（上野川修一、東大）

（日下幸則、福井医大）

ワークショップ：

免疫毒性・アレルギー性試験の最近の動向

一般演題：22

第5回研究会（1998/9/21-22）

千里ライフサイエンスセンター・大阪（森本兼囊幹事）

サブテーマ：ライフスタイルと免疫影響

化学物質アレルギー

招待／特別／基調講演：

ライフスタイルとアレルギー・免疫毒性

（森本兼囊、阪大）

化学物質アレルギー：機序とリスク評価

（I.Kimber、イギリス/Zeneca）

化学物質過敏症（石川 哲、北里大）

ミニシンポジウム：

神経・内分泌を介した免疫毒性

（堀 哲郎、九大）（菅野 純、国立衛研）

（早川 智、日大）

（香山不二雄、自治医大）

（坂部 貢、東海大）

ワークショップ：抗原性試験のあり方

一般演題：19

第6回研究会（1999/9/20-21）

良陵会館・仙台（名倉 宏代表幹事）

サブテーマ：免疫毒性と内分泌系

招待／特別／基調講演：

ステロイドの代謝と作用におけるステロイド代謝酵素遺伝子群の役割

（J.I.Mason、イギリス/Edinburgh大）

EndocrinologyからIntracrinologyへ

（笹野公伸、東北大）

ミニシンポジウム：

Th1/Th2パラダイムと免疫毒性  
(大沢基保、帝京大)  
(内藤嘉之、神戸市立中央病院)  
(小坂忠司、残農研)  
(吉野 伸、佐賀医大)  
(野原恵子、国立環境研)

ワークショップ：アレルゲン性の予知試験

一般演題：21

第7回研究会 (2000/9/25-26)

千葉大学・千葉 (上田志朗幹事)

サブテーマ：免疫毒性—基礎から臨床へ

招待／特別／基調講演：

ダイオキシンによる免疫発生毒性  
(S.D. Holladay、アメリカ/Virginia Polytech)  
アレルギー性疾患とFc receptor  
(齋藤 隆、千葉大)

ミニシンポジウム：

臨床例における薬剤・化学物質による免疫毒性—  
症例を中心に—

(田邊恵美子、東邦大)  
(高森幹雄、千葉大)  
(横須賀収、千葉大) (井関 徹、東大)  
(上田志朗、千葉大)

ワークショップ：

医薬品の免疫毒性評価手順を検討するための共同研究

一般演題：21

日本免疫毒性学会 (発足2001.4.1)

第8回学術大会 (2001/9/17-18)

栃木総合文化センター・宇都宮 (香山不二雄幹事)

サブテーマ：

今世紀のバイオ食品、バイオ医薬品の展望

招待／特別／基調講演：

遺伝子組換え食品の安全性評価戦略  
(H.A. Kuiper、オランダ/Wageningen大)

ミニシンポジウム：

遺伝子組換え食品とアレルギー  
(一色賢治、国立食品研)  
(河野陽一、千葉大)  
(手島玲子、国立衛研)

ワークショップ：

医薬品の免疫毒性評価手順を検討するための共同研究

一般演題：21

第9回学術大会 (2002/9/19-20)

グランシップ・静岡 (荒川泰昭幹事)

座長のまとめ

今回は、第8回日本免疫毒性学会の一般講演について座長を務められた各先生にまとめと称して、免疫毒性学の問題点とこれからの展望の参考になるような点を含蓄したご意見をいただきましたので以下に紹介します。

座長：大槻剛巳 (川崎医科大学)

OP 1-3

本セッションは、薬剤免疫毒性評価における、抗原性、骨髄毒性、ならびにNK細胞活性の検討について、新規法の開発を試みた研究結果の報告であった。OP-1 (日本ロシュ (株) 研究所 井上ら) では、従来、抗原性評価にかかる期間を短縮する目的で、実験系における抗原提示細胞の機能を増強することへの検討が紹介された。目標としては、マウス樹状細胞を *in vitro* 抗原性評価系において増殖・分化させ、抗原提示細胞として薬剤の抗原性評価において定常的に使用する系を確立することであり、今回の報告は、前段階としてのマウス樹状細胞の増殖に関するサイトカインの効果を検討したものであった。演者らはGM-CSF、IL-4、TNF $\alpha$ 、IL-6、Flt-3 ligandを組み合わせて用いることにより、特にGM-CSFとTNF $\alpha$ によってIa陽性、CD40陽性の樹状細胞の増殖を得られたと報告した。骨髄細胞より誘導される樹状細胞は、ミエロイド系やリンホイド系、また形質細胞様などの区分があり、誘導するサイトカインもその別があるようで、目標に向けての条件設定には多くの課題もあるであろうが、今後の発展性を感じる報告であった。OP-2 (塩野義製薬 永田ら) は、従来、形態学により細胞を分類し、薬物による骨髄毒性を検討していたものを、フローサイトメトリーを利用することにより、分化マーカーのみならず機能マーカーによる評価も加えての発表であった。演者らは塗抹標本観察に遜色ない結果を報告され、加えて、使用する抗体によっては、今後、一層の詳細な検討も可能になるように感じられ、更なる解析が望まれた。OP-3 (塩野義製薬 金崎ら) では、NK細胞活性の測定において従来の<sup>51</sup>Cr標識からDiOC18色素による標識に変更することにより、ラジオアイソトープ不要の系を確立し、同時にフローサイトメトリー解析で行うことにより、細胞数や細胞の生死の判別も併用できる利点を応用する試みが紹介された。本法の確立には、従来法との比較等の問題は残されているものの、限られた検体での最大限の情報を得るための試みは大きく評価されるものと思われた。これら3題は、薬剤の免疫毒性評価の将来に向けて、迅速、正確、かつ精度高くまた応用範囲を拡げることを目標とした試行であり、将来への発展性が示唆されており、残され

た検討課題克服後の報告も期待したいものであった。

座長：野原恵子（国立環境研究所）

OP 4-6

ここでは、リンパ球幼若化反応を利用した環境化学物質の免疫毒性評価（OP-4 摂南大 坂崎ら）、SRBC免疫ラットの免疫グロブリン濃度及びリンパ系器官に対するindomethacin及びcyclophosphamideの影響（OP-5 帝国臓器製薬 久田ら）、Popliteal lymph node assay (PLNA) の実施における薬物の溶媒についての検討（OP-6 日本バイオリサーチセンター 山田ら）の3題が発表されました。後2題は免疫毒性の*in vivo*試験法に関連する研究で、帝国臓器製薬グループの研究では、昨年製薬協主催の共同研究で行われたindomethacinの抗体産生への影響に関して、他のグループと異なる傾向を認めたことから追加検討が行われました。結果は抄録に譲るとしてこの稿では感想を述べさせていただきますと、このように*in vivo*実験で異なる結果が得られた場合、やはりメカニズムの裏づけが重要になると感じました。日本バイオリサーチセンターグループでは、被験物質を溶かした溶媒のPLNAへの影響を明らかにする目的で検討が行われましたが、用いる被験物質によって溶媒の効果も異なる可能性を考える必要があると思います。一方最初の演題は*in vivo*試験に関するもので、BまたはT細胞マイトジェンによるマウス脾臓細胞の幼若化反応に対する影響を、それぞれ255種類の環境化学物質について調べた結果が発表されました。この研究は非常に多くの化学物質の影響を明らかにした力作でしたが、このような*in vitro*試験で検出された影響が*in vivo*の免疫毒性とどの程度関連をもつのか、今後の課題として大変に興味をもたれました。さらに最近スタートしたトキシコジェノミクスの手法も取り入れ、今回報告されたような細胞レベル、生体レベルでの知見と、遺伝子・タンパクレベルでの知見を統合していくような取り組みも必要と思います。

座長：日下幸則（福井医科大学）

OP 7-9

OP-7（国立感染症研 小西ら）は、哺乳時のトリブチルスズ（TBT）曝露が細菌・真菌感染抵抗性に及ぼす影響をマウスを用いて調べたものである。リステリア感染でもCandida albicansによる真菌感染でも出産直後に15ppm以上の塩化トリブチルスズを飲水で3週間哺乳させられた群で、宿主抵抗性に強く影響が見られた。哺乳を通しての曝露が感染抵抗性に影響を及ぼした。また5ppmでは無影響量であることを報告した貴重な発表である。OP-8（静岡県立大 鈴木ら）は、有機スズ化合物

による胸腺細胞のアポトーシス誘導機構の解析を、ラットにトリブチルスズ含有飼料を1週間投与して行ったものである。摘出した胸腺からDNAを抽出し電気泳動を行ったところ、DNAの断片化が観察された。active gel法で調べたところ18kDaのDnaseが活性化されていた。またカスパーゼ活性の上昇及びFasLの発現量の増加がみられ、トリブチルスズによる胸腺のアポトーシスの誘導はFas/FasLを介して起こり18kDaのDnaseによりDNAの分解が起こる、と報告された。OP-9（日本医大 李ら）は、有機リン農薬のDDVPを用いてYT細胞（human NK cell）、PBL(peripheral blood lymphocyte)、human LAK細胞の活性が抑制されるのは、5種類のGranzyme活性を介して起こることを報告した。今後、有機リンがヒトNK細胞に対して最も作用が強いメカニズムを研究する必要があると思われる。

座長：荒川泰昭（静岡県立大学）

OP 10-13

OP-10（福井医科大学 佐藤ら）では医師の職業性アレルギーの素因あるいは先行因子としてラテックス、ホルマリンなどによる感作を取り上げ、医学生を対象に観察した研究である。アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、蕁麻疹、アトピー性皮膚炎などの既往のある医師の多くが職業性アレルギーを経験しており、医学生時代のラテックス、ホルマリンなどへの感作が将来における医師の職業性アレルギーの素因あるいは先行因子となる可能性があることが示唆された。OP-11（北里研究所 坂部ら）では化学物質過敏症としてシックハウス症候群を例に取り上げ、環境化学物質の長期微量暴露による中毒あるいは病態生理を免疫（毒性）学的にプロファイリングした研究である。化学物質過敏症の誘因として室内空気汚染によるものが全体の約60%を占め、小児アトピー性疾患の既往歴があるもの（約40%）ではその約半数が化学物質過敏症を発症後にアトピー性疾患を再発した。Tリンパ球のサブクラス、末梢単核球のDNAヒストグラムなどにおいて有意の異常が認められ、免疫（毒性）学的プロファイルの有用性が示唆された。OP-12（大阪大 辻田ら）では分泌型IgA（sIgA）とアレルギー症状発現との関連性の有無を調べるために、アレルギー症状有訴者を対象にしてスギ花粉、ダニ等のアレルゲンに対する唾液中の特異的IgAならびに血清中のIgE濃度を測定した研究である。喘息様症状のある被験者のみにアレルゲン特異的IgAの増加が見られたが、皮膚、鼻、眼でのアレルギー症状発現には（従来からIgEクラスの抗体産生に由来する免疫応答（I型アレルギー）（遺伝的制御の関与あり）が主に関与すると言われているが）、粘膜免疫（とくに局所免疫）系における分泌型IgA産生は関与しないことが示唆された。OP-13（旭川医

科大 吉田ら)では生活環境、大気汚染などの環境リスク評価のために設定した種々の免疫指標(抗麻疹抗体価、総IgE抗体価、抗原特異的IgE抗体価、IL-4/IFN- $\gamma$  mRNA発現比率)について、その有効性を検証するために今回は東京都多摩地区の東久留米および多摩保健センターにおける3歳児健診の幼児を対象にして、調査票、大気汚染常時測定局のデータなどを参考にしながら、検討した研究である。抗体産生応答、抗麻疹抗体価、mRNA発現比率などにおいて生活環境因子による有意の変動が確認され、環境リスクの有無を評価する指標としては期待されるが、その特異性や感受性などにおける免疫指標としての有効性や再現性についてはさらに検証が必要であろう。切望されている分野だけに今後の追加検証を期待したい。

座長：坂部 貢(北里研究所)

#### OP 14-17

第2日目演題14~17を担当した。担当したセッションでは、主として未だ不明な点が多い内分泌攪乱作用を有する化学物質の免疫毒性作用について、興味ある報告と議論がなされた。OP-14(千葉大 上野ら)では、医療現場で日常的に使用されている血液バック、点滴セットなどから溶出することが確認されているフタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)が、胎仔期・授乳期に母体を介してF<sub>1</sub>に移行し、成熟後のF<sub>1</sub>の細胞性免疫機能を低下させる等、マウスを用いてDEHPの継代的免疫毒性作用について興味ある報告を行い、医療製品からの内分泌攪乱化学物質曝露の危険性について新たな警鐘を鳴らした。OP-15(国立環境研 野原ら)では、マウスを用いてダイオキシン(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)の抗体産生抑制のメカニズムについて報告し、ダイオキシンにより脾臓における胚中心の形成が阻害されることを明らかにした。さらにTh2細胞からのIL-5産生の低下を確認し、ダイオキシンによるTh2細胞の分化抑制が抗体産生の低下に関与する可能性を示唆し、ダイオキシンの免疫毒性作用の理解に興味ある知見を提供した。OP-16(国立感染症研 小西ら)ではマウスを用いて、代表的な内分泌攪乱化学物質の一つであるビスフェノール(BIS)投与が、大腸菌感染に対する非特異的な生体防御機構にどのような影響を与えるかについて検討した。その結果、BIS投与は、好中球の殺菌機能に影響を及ぼし、腹腔における大腸菌クリアランス機能が低下すること、さらに常存性マクロファージの機能にも影響を及ぼす可能性を示唆した。OP-17(ポーラ化成工業 廣川)では、分化ステージの異なる各種B細胞株を用いて不明の点の多いB細胞系の女性ホルモン感受性機構、即ち代表的な女性ホルモンであるエストラジオール(E)に対する感受性を受容体(R)・転写因子の分子生物

学的解析手法を用いて明らかにした。その結果、B細胞の分化ステージにおけるE感受性には、ER $\beta$ が深く関与していることが示唆され、これらの結果は女性ホルモンのB細胞系に対する作用機構を知る上での重要な基礎的知見であるばかりでなく、多くの内分泌攪乱化学物質がエストロゲン作用を有することからも、興味ある報告であった。

座長：井上智彰(日本ロシュ(株)研究所)

#### OP18-21

OP-18(川崎医科大 大槻ら)では、樹立骨髄種細胞株を用いたThalidomide(Thal)の骨髄細胞増殖動態への効果について発表された。細胞株の増殖率が高いほどIL-6Rの発現が高く、TNF $\alpha$ の発現が低い傾向にあった。また、Thalにより増殖抑制がかかる細胞株では、TNF $\alpha$ に対するantisense oligonucleotides(AON)、Thalにより増殖促進がみられる細胞株では、IL-6Rに対するAONによりそれぞれThalの作用が無くなった。これらの結果から、臨床応用に当たって、Cytokines等の作用を含めて、よりメカニズムに応じた検討が必要であることが示唆された。OP-19(残留農薬研 林ら)では、ジフェニルヒダントインによるマウス胸腺でのapoptosis誘導について発表された。胸腺の重量および細胞数は、高用量の80mg/kg/dayにおいて低下し、20および40mg/kg/dayにおいて胸腺細胞のapoptosisが認められた。Apoptosisの検出は、一般毒性試験、従来からの免疫毒性試験では行われておらず、新しいパラメータであるが、実際の免疫毒性評価にどのように取り入れるか、今後の検討が期待された。OP-20(塩野義製薬 日野ら)では、出生前のラットへの薬物投与による仔の特異抗体産生能への影響の評価法について発表された。生後のSRBC免疫によるPFC反応は、9日齢で全例に出現し、その後増加し、28日齢以降プラトーに達した。Dexamethasoneの妊娠7から20日までの投与で、生後14日齢でPFCの低下が認められており、28日齢では回復している。極わずかな低下を示す場合、免疫系が発達途中である時期に低下がより明確に認められているようである。今後のデータの蓄積により、よりの確かな次世代への免疫毒性評価に貢献するものと考えられる。OP-21(千葉大 上田ら)では、マウス加速型馬杉腎炎モデルにおける免疫抑制剤の糸球体病変治療効果と尿細管間質病変に与える影響について発表された。家兎IgGを免疫したマウスに抗GBM家兎血清を投与することによって作製した腎炎モデルに免疫抑制剤を投与し、腎病変に与える影響について調べられた。シクロスポリン、タクロリムスにおいては、糸球体病変は改善したが、血清BUN、Creがより上昇し、尿細管間質病変も悪化した。これらの薬物の糸球体腎炎への臨床応用には、解決すべき問題があることが示

唆され、より個々の病変に応じた治療の可能性について示された。

## ワークショップ報告

### 「医薬品の免疫毒性評価手順を検討するための共同研究」

当ワークショップは昨年引き続き「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、日本製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部会（製薬協）が低分子化合物の抗原性試験法として検討を行ってきたマウス膝窩リンパ節測定（PLNA）法を使用する際の問題点と今後の課題について成績を交え報告し、更に、製薬協が化学物質等安全性試験受託研究機関協議会（安研協）と共に実施した医薬品の免疫毒性評価手順を検討するための共同研究の成果が報告され、討議された。

まず、PLNA法については、次のようなプロトコールで実施されている。即ち、Th2型指向性マウス（A/J系もしくはBALB/c系）の両後肢足蹠皮下に被験物質もしくは溶媒のいずれかを投与し、7日後に膝窩リンパ節を採取してcellularity indexを算出する。更に、一部の動物においては初回投与10日後に初回投与の1/10濃度の被験物質ならびに溶媒で2回目の投与を行い、その2日後に膝窩リンパ節を採取し、二次応答を調べる。また、それぞれの測定時にフローサイトメトリーによるリンパ球サブセット解析を行い、リンパ節の組織学的検査を行っている。今回の報告では、35種の薬剤について検討し、ヒトにアレルギー性副作用が認められている薬剤とPLNA反応との間に良好な相関性があることを示した。また、アレルギー性副作用を示す薬剤では、一次応答に比べ二次応答が高応答を示したが、刺激性物質ではこのような応答は認められなかった。リンパ球サブセット解析の結果、アレルギー性副作用を示す薬剤では二次応答時にB細胞の比率が上昇しているが、刺激性物質では明確な変化は認められていない。さらに、組織学的検査によりアレルギー性副作用を示す薬剤の投与では膝窩リンパ節に胚中心の形成が認められた。以上の報告内容について討議した結果、PLNA法は低分子化合物の抗原性試験法として利用できると考えられた。しかし、本法においては、代謝物が抗原性を示す本体である場合、検出できないことが予想され、今後の検討課題として残された。また、刺激性物質においては類似の反応を示すことから、刺激性との兼ね合いで濃度設定にも考慮を払う必要があると結論された。

次に、医薬品の免疫毒性評価手順の検討は、昨

年、動物の免疫系に対して何らかの影響を及ぼすことが知られている薬剤（塩酸プロメタジン、インドメタシン、5-フルオロウラシル、塩酸ノルトリプチリン、ハロペリドール、プロプラノロール、ジフェニルヒダントイン）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各種試験の位置付けを行ったが、今回は既に得られている成績を再評価し、病理学的所見とフローサイトメトリー（FCM）の相関性、血液・病理学的所見と特異抗体産生能の相関性、FCMと特異抗体産生能の相関性について報告され、更に被験物質の投与期間（14日間と28日間の比較）についての考察も行われた。

最初に、病理学的所見とFCMの相関性については、重量変化が著しい脾臓と胸腺では、低・中用量においてFCMの変化が認められ、最大耐量（MTD）の高用量においてFCMの変化と共に病理学的変化が発現することが示された。また、これらの臓器においてCD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>細胞の減少に伴ってNK-P1A<sup>+</sup>細胞の減少も認められていることから、病理学的変化が認められている場合、NK細胞の減少の可能性も考慮する必要があることが考察された。

血液・病理学的所見と特異抗体産生能の相関性については、特異抗体産生能に抑制が見られる場合、脾臓においても病理学変化が現れるが、病理学的変化があっても必ずしも抗体産生能の変化に結びつかないことが示された。また、胸腺のみの変化では、抗体産生能の低下には至らないと考えられた。血液学的検査においては、抗体産生能との相関性を示唆する成績は得られなかった。

FCMと特異抗体産生能の相関性については、脾臓および胸腺の各リンパ球サブセットと特異抗体産生能が比較されたが、相互の関連性は見いだされなかった。従って、脾臓および胸腺の各リンパ球サブセットの減少が免疫機能の一つである特異抗体産生能の抑制を必ずしも示唆するものではないと考えられた。

被験物質の投与期間（14日間と28日間の比較）については、使用した薬剤により異なり、28日間投与でのみ免疫毒性所見が得られる薬剤や、14日間投与においてより顕著に免疫毒性所見を示す薬剤があり、投与期間については一定の結論を出すには至らなかった。被験物質の投与期間については、28日間投与が推奨されているが、臨床における予想投与期間等も考慮する必要があると考えられた。

今回の製薬協における共同研究の成果は、今後の医薬品開発における免疫毒性試験法の検討に貴重な情報を提供し得るものと考えられた。

（記：牧幹事・澤田幹事）

## 免疫毒性試験プロトコール 第6回

Affymetrix GeneChipを用いた  
遺伝子発現解析

中村 亮介、手島 玲子、澤田 純一  
(国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部)

## A. 解説

近年、DNAチップおよびDNAマイクロアレイを用いた研究が徐々に増加してきている。DNAチップとDNAマイクロアレイという言葉はよく混同されるが、厳密には両者は区別されるべきものである<sup>1)</sup>。DNAマイクロアレイはStanford方式ともよばれ、アレイヤー(スポッター)を用いてスライドガラス上にcDNAをスポットし、これに蛍光標識したcDNAをハイブリダイズする技術である。比較的安価であり、現在アレイ技術の主流となっている。一方のDNAチップは、この技術を開発した会社名からAffymetrix方式ともよばれ、光化学反応を用いてガラス基盤上に直接オリゴDNAを固層合成することにより、高密度にプローブを配置したアレイを用いる<sup>2)</sup>。スプライシングアイソフォームを検出したり、GCリッチな領域を外すことでバックグラウンドを低減させたりと多くのメリットを持つが、現状では少々高価なことが欠点といえる。本稿では、主にAffymetrix社のGeneChipを用いた遺伝子発現解析について述べる。

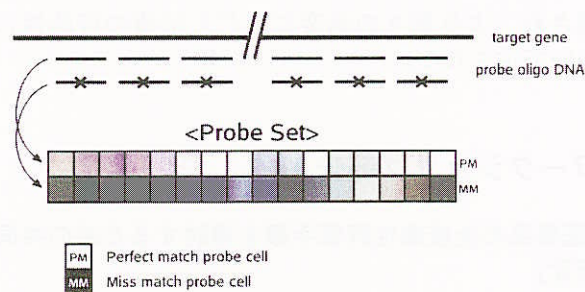
Affymetrix方式の最大の特徴は、上述したようにオリゴDNAをプローブとすることである。当然のことながら、短い(25残基程度)オリゴDNAをプローブとして用いる以上、偽のtranscriptがプローブにミスハイブリダイズする危険性が高くなる。このためAffymetrix方式では、一つのターゲット遺伝子に対し16種類のプローブを用意している(図1)。さらに、25残基のプローブ配列の中央にミスマッチな塩基が来るようにしたものを用意し、完全にマッチした配列のシグナルとの差を取ることで、偽のシグナルを差し引いている。この値をAverage Differenceといい、GeneChipにおける重要なパラメータとなっている。

以下に、ラット培養マスト細胞株RBL-2H3細胞に対するステロイド(dexamethasone)の影響を解析した例を示しながら解説する。

## B. 実験方法

## 1. 細胞

ラット培養マスト細胞株(RBL-2H3細胞)を10% FCS含有DMEM培地を用い、ポリスチレン製75cm<sup>2</sup>培養フラスコ(Corning)中で培養する。2×10<sup>6</sup>



$$\text{Avg Diff} = \frac{\sum (\text{PM} - \text{MM})}{\text{Pairs in average}}$$

## 図1 GeneChipの原理

1つのターゲット遺伝子に対し、16種類のオリゴDNAプローブを用意する。その際に中央の一残基に変異を導入したミスマッチプローブも同時に用意し、完全マッチのプローブセルの蛍光強度からミスマッチセルの蛍光強度を差し引く。この値を平均したものがAverage Difference (Avg Diff)である。

cells/mLとなるよう、3日に1度セルスクレイパー(Falcon)で接着したRBL-2H3細胞をはがし、新しいフラスコに継代する。

## 2. 試薬と機器

DexamethasoneはSigmaより購入した。RNAの調製にはTRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies)を用い、SuperScript Choice system (Invitrogen Life Technologies) およびT7-(dT)<sub>24</sub>プライマー(GENSET Corp)により逆転写を行なった。in vitro転写反応にはBioArray HighYield (ENZO)を、clean upにはRNeasy Mini (QIAGEN)を用いた。

GeneChipアレイはRat Genome U34A array (Affymetrix)を用いた。ハイブリダイゼーションカクテル試薬として、Acetylated BSA (Invitrogen Life Technologies)、Herring sperm DNA (Promega)を用いた。蛍光色素としてstreptavidin-phycoerythrin (SAPE; Molecular Probes) およびビオチン化ヤギanti-streptavidin IgG (Vector laboratories)を用い、GeneChip Fluidics Station (Affymetrix)により染色・洗浄を行なった。アレイスキャナにはGeneArray (Hewlett Packard)を用いた。

## C. 実験操作

## 1. RNAの抽出

Dexamethasone (100nM)により、1×10<sup>7</sup>個のRBL-2H3細胞を37℃で20時間処理する。PBSで2回洗浄後、TRIzol Reagentによりtotal RNAを抽出する。RNeasy Mini (QIAGEN)を用いてもよいが、組織からRNAを抽出する場合にはTRIzolの方がよいとされている。なお、先にmRNAを調製するプロトコルもある。

## 2. 逆転写反応

Affymetrixのプロトコルでは5 μg以上あれば可



能とされているが、著者らは余裕がある限り20 $\mu$ gのRNAを使用している。20 $\mu$ gから始める場合、total RNAの濃度は2.2 $\mu$ g/ $\mu$ L (20 $\mu$ g/9 $\mu$ L)以上が要求される。T7プロモータを付加したオリゴdTプライマーを用いて、SuperScript Choice systemにより逆転写し、二本鎖cDNAを得る。PCI処理によりこれを精製し、12 $\mu$ LのDEPC処理水に溶解する。

### 3. in vitro転写によるcRNAの増幅

12 $\mu$ Lのうち3.3 $\mu$ Lを用いてBioArray HighYieldにより37 $^{\circ}$ C、7時間のin vitro転写反応を行ない、ビオチン標識されたcRNAを増幅する。RNeasy MiniによりRNAを精製し、吸光度により濃度を測定する。この段階でのRNAの純度としては、A260/A280の比が1.9~2.1程度であることが望ましい。

### 4. RNAの断片化処理

20 $\mu$ gのRNA (1~32 $\mu$ L)に5 $\times$ RNA Fragmentation Bufferを8 $\mu$ L加え、DEPC処理水により全量を40 $\mu$ Lにして94 $^{\circ}$ C、35分間処理する。5 $\times$ RNA Fragmentation Bufferの組成は次の通り。1M Tris acetate (氷酢酸でpH8.1) 4.0mL、0.64g MgOAc、0.98g KOAcをDEPC処理水に加え、全量20mLとし、0.2 $\mu$ mフィルタを通す。室温で保存可。断片化の前後におけるRNAのサイズを電気泳動により確認する。

### 5. ハイブリダイゼーション

4で得られた断片化RNAには、2の逆転写反応の鋳型として用いたビオチン非標識体が少量含まれている。非標識RNAはビオチン標識RNAと競合してアレイに結合し、SAPEによる染色を妨害する要因になると考えられる。3の終了時に20 $\times$ (3.3/12)=5.5 $\mu$ gの非標識体の混入が見積もられるため、これを補正したうえで、15 $\mu$ gのビオチン標識cRNAを用いてハイブリダイゼーションを行なう。

著者が用いたアレイはRat Genome U34A array (RG-U34A)で、これはラットの既知遺伝子と機能既知ESTのすべて(8800種)が載っている。コントロール遺伝子および断片化したcRNAを60rpm、45 $^{\circ}$ C、16時間ハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションカクテルの組成は以下の通り。断片化cRNA 15 $\mu$ g、control oligonucleotide B2 15fmol、control cRNA (BioB, BioC, BioD, cre)それぞれ0.45, 1.5, 12.5, 30fmol、herring sperm DNA 30 $\mu$ g、acetylated BSA 150 $\mu$ g、2 $\times$ MES hybridization buffer 150 $\mu$ L、DEPC処理水で全量300 $\mu$ Lにする。

### 6. 染色および洗浄

Affymetrix Fluidics Stationにより、アレイの染色および洗浄を行なう。このステップはほぼオートメーション化されており、実験者はパソコンに設定を入力するのみである。RG-U34Aは高密度ア

レイであり、一つのプローブセルは24 $\mu$ m四方という大きさである。非常に小さなセルの蛍光を感度よく検出するため、ビオチン標識cRNAをSAPEで染色し、ここにビオチン標識抗アビジンIgGを結合させ、さらに再度SAPEで染色するという増感手法が用いられている。

### 7. スキャン

アレイスキャナGeneArrayにより、Ar<sup>+</sup>レーザ488nm単色光励起の共焦点系で、染色したRG-U34Aの蛍光画像を取得する。4733 $\times$ 4733pixelの16bitデータで、2回のスキャン画像を平均してノイズを低減している。

### D. 解析

DNAチップ技術を用いて発現解析を行なう場合、実験台で手を動かす作業よりも、コンピュータの前で解析している時間や手間の方がはるかに大きいものである。

解析には、著者らはAffymetrixシステム標準の解析ソフトAffymetrix SuiteおよびMicrosoft Excelを用いているが、データ量が膨大になれば、GeneSpring (Silicon Genetics)などの本格的バイオインフォマティクスツールが必要になると思われる。スキャンした画像はSuiteにより自動的にグリッドがかけられ、個々のプローブセルの蛍光強度が読みとられる。統計処理の後、前述のAverage Difference (Avg Diff) や、シグナルの信頼度 (Absolute Call)、比較解析した場合はコントロールに対する発現比 (Fold Change) などのパラメータが、GenBankのIdentifierとともにマトリクスシートの形で表示される。著者らはこのデータを元に、Excelによりさらに統計処理を加えている。顕著な発現変化を示す遺伝子を数十個から百個程度同定するためにはこの程度で十分といえるが、疾病の遺伝子診断に用いるなどの場合には、相当数のアレイを用い、GeneSpringなどによりクラスタリング解析を行なうことが必要となろう<sup>3)</sup>。

図2は、RBL-2H3マスト細胞をdexamethasoneで処理した際の遺伝子発現変化を示すものである。Avg Diffの平均値が2,500になるようノーマライズした上で、検出限界以下の数値を検出限界値で置き換え、横軸にコントロール、縦軸に処理後のAvg Diffをプロットした。ほとんどの遺伝子は刺激の前後で発現量が大きく変化していないことが分かるが、中には100倍以上発現が上昇するものや、30分の1以下に減少するものなどがあつた。また、いわゆるhouse-keeping geneの一つGAPDHは、処理の前後でAvg Diffは約25,000で変化はなかった。

なお、DNAチップに限らず、遺伝子発現の網羅的解析を行なう際に最も困難な作業は、個々の遺伝子に関するアノテーションであろう。現在のと

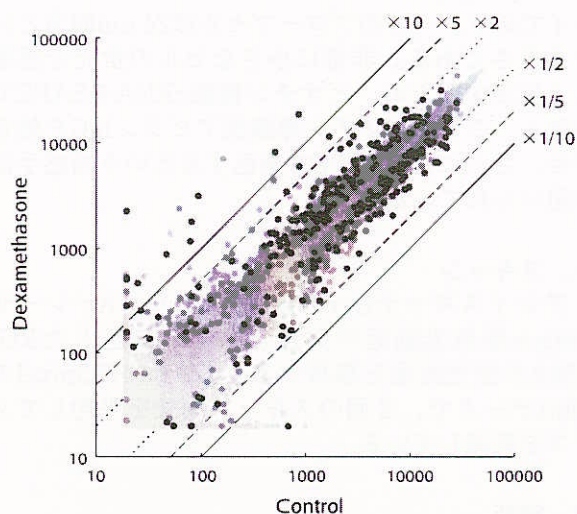


図2 Dexamethasone処理によるRBL-2H3細胞の遺伝子発現変化

横軸にcontrol、縦軸にdexamethasone処理20時間後におけるRBL-2H3細胞の遺伝子発現プロファイルをプロットした。点の色が濃いほどシグナルの信頼度が高いことを示す。傾き1の直線から外れるほど、発現の変化率が大きい。

ころ、酵母やショウジョウバエなどゲノムシーケンズが終了した一部の種、また哺乳動物に関してはマウスについては整備が進みつつあるが<sup>4)</sup>、公的データベースなどの今後の整備が強く望まれる。

#### F. 今後の展望

著者らは現在のところRBL-2H3マスト細胞に関してはdexamethasoneの影響を解析したのみであるが、今後他の免疫毒性を示す化合物に関するデータが集まれば、それぞれの遺伝子をクラスタリングすることにより、各化合物を遺伝子発現プロファイルを元に分類することができるようになる。新規の免疫毒性化合物の作用メカニズムを考えると、網羅的解析による遺伝子発現のパターン分析から、その化合物が既知のどの化合物と類似した作用を持つかが推定できるようになると期待される。

#### G. 参考文献

- 1) The chipping forecast. *Nat. Genet., supplement* 21 (1999)
- 2) Lockhart, D.J. et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 14, 1675-1680 (2000)
- 3) Alizadeh, A.A. et al., Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-511 (2000)
- 4) The Gene Ontology Consortium, Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25-29 (2000)

## DiOC18色素を用いたフローサイトメトリーによるラットNK細胞活性の測定

金崎佳世子、中村 和市  
(塩野義製薬株式会社 新薬研究所)

### A. 解説

これまで、NK細胞活性は一般に<sup>51</sup>Crで標識した標的細胞を用いて測定されてきたが、ラジオアイソトープの取り扱いの問題があった。近年、ラジオアイソトープを用いず、NK細胞活性を測定する方法が数多く提唱されている。

例えば、<sup>51</sup>Crの代わりに蛍光物質であるeuropiumを標的細胞に取り込ませ、その放出量を測定する方法<sup>1)</sup>、細胞内酵素によって蛍光を発するようになる物質 (calcein-AMなど) で標的細胞を標識し、その蛍光強度の変化を測定する方法<sup>2)</sup>、蛍光色素で標的細胞あるいはエフェクター細胞を標識後、propidium iodide (PI) あるいは7-aminoactinomycin D (7-AAD) などで二重染色を行いフローサイトメータによって死細胞を検出する方法などである。フローサイトメトリーにおいて細胞を標識するために用いられる蛍光色素としては、PKH-2やPKH-26、3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiOC18)、carboxyfluorescein diacetate (CFDA) などが挙げられる。この4種の蛍光色素のうち、PKH-26はFL2で、また他の3種はFL1で検出される。さらに、これらFL1で検出される3種の蛍光色素の中で、細胞を最も強くかつ比較的均一な蛍光強度に染色し、また非標識細胞との共培養下でも非標識細胞を染色しにくい色素はDiOC18と言える<sup>3)</sup>。

Piriouら<sup>4)</sup>はヒト等由来末梢血単核球 (PBMC) のNK細胞活性について、DiOC18でK562細胞株などを標識後、死細胞を検出するためにPIを用いフローサイトメトリーで調べている。本稿では、Piriouらの方法をもとに、ラット脾臓NK細胞活性についてDiOC18でYAC-1細胞を標識後、7-AADで死細胞を検出する方法について報告する。また、このときPE標識抗ラットNKR-P1A抗体を用いればNK細胞数も同時に測れるので、併せて報告したい。

### B. 実験材料等

#### 1. 試薬類

- 1) 3,3'-Dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiOC18) : DMSOで3 mMに調整、遮光下4℃で保存。
- 2) 培養液  
RPMI-1640培地 (penicillin G, streptomycin, 2 mM L-glutamine含有) +10%ウシ胎児血清 (56℃で30分間加温し、非動化処理したもの)
- 3) Hanks' balanced salt solution (HBSS)
- 4) 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) : HBSSで1 mg/mLに調整、遮光下4℃で保存。

- 5) Phycoerythrin (PE) 標識抗ラットNKR-P1A抗体 (クローン10/78)
- 6) Formaldehyde
- 7) リンパ球比重分離液 (M-SMF)

## 2. 標的細胞

YAC-1細胞は、上記培養液を用い継代培養を行った。継代2または3日目に標的細胞として実験に供した。

## 3. 器材

フローサイトメータ (Becton Dickinson; FACScan)  
遠心機

## C. 実験操作手順

### 1. エフェクター細胞の調製

ラットを頸椎脱臼によって安楽死させ脾臓を摘出後、脾臓細胞浮遊液を一定の細胞濃度に調整する。

### 2. 標的細胞の標識

YAC-1細胞を $1 \times 10^6$  cells/mLに調整し、細胞浮遊液 1 mLに対し 1 mM DiOCを $10 \mu\text{L}$ 添加後 $37^\circ\text{C}$ で15分間培養する。その後HBSSによって遠心 (フラッシング) 洗浄を3回行う。

### 3. 培養

- 1) 脾臓細胞および標識した標的細胞を $50 \mu\text{L}$ ずつ混合して遠心し、 $37^\circ\text{C}$ で4時間共培養する。このとき、標的細胞数を一定にし、エフェクター細胞浮遊液の濃度を変えることでE:T比を5:1、25:1、125:1に調整する。
- 2) 一部の標的細胞に対しては、formaldehydeを最終濃度3%となるように加え $37^\circ\text{C}$ で30分間培養し、細胞死を誘導する (このときの死細胞の割合を最大細胞死とする)。

### 4. NK細胞の染色

脾臓細胞と標的細胞の共培養後、300倍希釈したPE標識抗ラットNKR-P1A抗体を $100 \mu\text{L}$ 加え、遮光下 $4^\circ\text{C}$ で30分間培養する。

### 5. 測定

HBSSにて遠心洗浄を3回を行い、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の7-AADを $25 \mu\text{L}$ 添加してフローサイトメータにて測定する。

## D. NK細胞活性の求め方

1. 標的細胞は、DiOC18で標識することで蛍光を発するようになりFL1で検出される (図1)。なお、DiOC18で標識されなかった集団についてはFSC、SSC共に強度が非常に弱く、細胞ではないことを確認している。さらに、PE標識

NKR-P1A+細胞はFL2で、死細胞は7-AADを用いるのでFL3で、それぞれ検出される。

2. DiOCで標識した標的細胞はFSCとFL1のドットプロット上で認識されるので、その細胞集団に対しゲーティングを行い (図2)、その領域 (すなわち標的細胞) 中の死細胞の割合をFL3のヒストグラムによって検出する (図3)。また、FSCとSSCのドットプロット上でエフェクター細胞が認識できるので、このエフェクター細胞 (図2の色の濃いドット) 群が標的

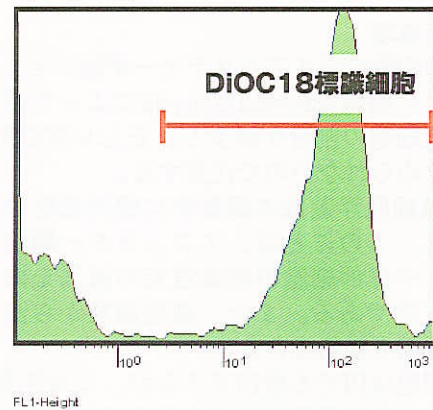


図1 DiOC18による標識

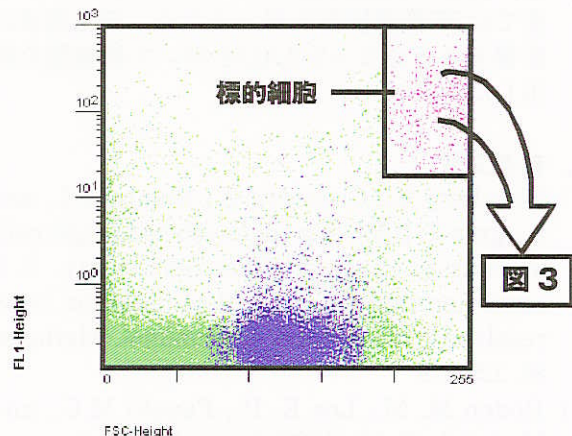


図2 標的細胞のゲーティング

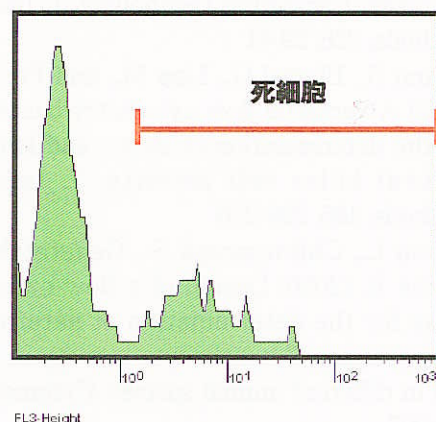


図3 標的細胞中の死細胞の検出

細胞のゲートに入らないように注意する。

3. NK細胞活性 (%) は、(エフェクター細胞と共培養した時の細胞死-自然細胞死) ÷ (最大細胞死-自然細胞死) ×100として表わす。
4. PE標識抗NKR-P1A抗体を用いることで、1個の脾臓あたりのみならず1個のNK細胞あたりのNK細胞活性も求めることができる。さらに別のチューブで抗CD3抗体などを用い、同一脾臓細胞浮遊液中の各リンパ球サブセットの割合を求めても良い。

#### E. 留意事項

1. 標的細胞のバイアピリティーが低いと、エフェクター細胞やformaldehydeによって誘導される死細胞の割合が減少し、正しいNK細胞活性が求められないので注意する。
2. 脾臓細胞浮遊液の調製中に標的細胞の標識を行う。このことは、エフェクター細胞の活性低下や標的細胞の標識蛍光の減弱を抑えるのに有効である。また、細胞調製から測定までの時間も節約できる。
3. 死細胞はPIでも検出できるが、この色素はFL2領域にも蛍光強度を示すためPEあるいはFITC標識抗体と同時に用いることはできない。本法ではPE標識抗体を用いるため、FL2領域に影響を及ぼさない7-AADを用いて死細胞を検出した。

#### F. 参考文献

- 1) Blomberg K., Granberg C., Hemmila I., and Lovgren T. (1986) Europium-labeled target cells in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. J. Immunol. Methods, 86, 225-229
- 2) Roden M. M., Lee K. H., Panelli M.C., and Marincola F. M. (1999) A novel cytolysis assay using fluorescent labeling and quantitative fluorescent scanning technology. J. Immunol. Methods, 226, 29-41
- 3) Johann S., Blumel G., Lipp M., and Forster R. (1995) A versatile flow cytometry-based assay for the determination of short- and long-term natural killer cell activity. J. Immunol. Methods, 185, 209-216
- 4) Piriou L., Chilmonczyk S., Genetet N., and Albina E. (2000) Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species. Cytometry, 41, 289-297

## お知らせ

武田薬品工業(株) 医薬研究本部  
薬物機能第二研究所 研究者を若干名募集

職 種：薬物候補化合物の安全性評価、特に、免疫毒性及び一般毒性の評価・研究

資 格：修士卒以上の方で、免疫学及び毒性学、生理学、薬理学等の専門知識・技術を有する実務経験者（GLP関連業務経験者が望ましい）。

年 齢：40歳位まで

勤務地：大阪市淀川区  
研究内容その他の情報は弊社ホームページをご覧ください。

<http://www.takeda.co.jp/jinji/>

応 募：履歴書、研究概要郵送。

平成14年1月31日(木)まで。

宛 先：〒540-8645 大阪市中央区道修町4-1-1

本社人事グループ TEL 06-6204-2133

## 編集後記

21世紀の幕開きの年2001年も残りわずかになってきました。今年の学会はこれまでの免疫毒性研究会から日本免疫毒性学会という名称に変更した第一回目の学会に相応しく活気にあふれた学会であったという印象があります。ImmunoTox Letterもこれまでの内容よりさらに学会を盛り上げる内容にしようと思いを迎え頭を悩ませています。皆様から事務局への刺激的な投稿を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12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

