

# ImmunoTox Letter

免疫毒性研究会：The Japanese Society of Immunotoxicology

Vol. 4 No. 1 (通巻7号) 1999

## 目次

### 第5回免疫毒性研究会の報告

大阪大学医学部環境医学教室

第5回研究会事務局長 竹下 達也

### 第6回免疫毒性研究会予告(2)

東北大学大学院医学系研究科

病理学講座 名倉 宏

### 「免疫毒性試験プロトコール」第1回

#### ①ラット脾細胞の幼若化反応

武田薬品工業株式会社 中村 裕行

#### ②ラットリンパ組織および末梢血白血球のフローサイトメトリー

塩野義製薬株式会社 中村 和希

#### ③ラット骨髓細胞を用いるCFU-GM Assay

大鵬薬品工業株式会社 河内 泰英

三菱化学株式会社 筒井 尚久

#### ④ELISA法を用いるラット抗ヒツジ赤血球抗体の抗体価測定法

塩野義製薬株式会社 永田 雅史

中村 和希

### 第5回免疫毒性研究会の報告

竹下 達也

第5回研究会事務局長

第5回免疫毒性研究会は、平成10年9月21日(月)、22日(火)の2日間、千里ライフサイエンスセンター(大阪)のライフホールにおいて開催された。今回の研究会は、第32回日本産業衛生学会アレルギー・免疫毒性研究会との合同開催として行われた。

1日目は、まず本研究会の実行委員長である大阪大医学部環境医学の森本兼義教授による「ライフスタイルとアレルギー・免疫毒性」の基調講演があった。またシンポジウムは、「神経・内分泌を介した免疫毒性」と題して、5題の発表があった。ストレス、性ホルモンと免疫との関連を中心に充

実した討論が行われた。最後に英国Zeneca Central Toxicology LaboratoryのKimber博士によるChemical Allergyについての特別講演があった。博士の精力的な研究成果の一端が披露され感銘を与えた。

2日目は、午前中の一般演題に引き続いて、午後は北里大医学部の石川 哲教授による「環境化学物質の生体への影響—とくに化学物質過敏症—」と題した特別講演があった。最近注目を集めている化学物質過敏症を中心に含蓄のあるお話をうかがうことができた。ワークショップは「抗原性試験のあり方」と題して代表的な抗原性試験の現状および製薬協アンケート調査の結果など5題の発表が行われた。一般演題は、19題が発表され、活発な質疑が行われた。

今回の参加者は、会員100名、非会員38名であり、前回の研究会にくらべるとやや減少した。しかし初めて東京を離れた研究会であったことを考えるとまずまずではないかと思われる。また、合同開催となった日本産業衛生学会のアレルギー・免疫毒性研究会の会員の方も多数参加されて、相互交流が深まったことは大きな収穫と考えている。開催1日目に行われた懇親会の参加者は48名であったが、事務局等も含めて70名近くが参加し賑やかに行われた。

最大の反省点は、寄付依頼の時期が遅すぎたことである。プログラムの概要は4月までに確定していたので、すぐに動くべきであった。このような不手際にもかかわらず幹事の先生方には多くのお力添えをいただき、深く感謝申し上げる次第である。またポスターの作成が遅れてしまい、1種類のみの作成で終わってしまったのも反省点の1つである。

会場は新大阪駅から地下鉄で15分弱と交通の便が良く、良い会場であったと思う。しかし2日目の午後、研究会会場上空を台風が通過するという思いがけない事態となり、事務局はどうなることかと肝を冷やした。それにもかかわらず、多数の方の御参加を得て、成功裏に終了することができたのは、ひとえに会員の諸先生方の御熱意によるものである。この場を借りて厚く感謝申し上げます。

い。今回は、本研究会の代表幹事である名倉宏教授を実行委員長として仙台において開催されるが、多くの参加者を得て盛会となることを祈念している。

## 第6回免疫毒性研究会予告(2)

日時：1999(平成11)年9月20日(月)～21日(火)

場所：艮陵会館(ごんりょうかいかん)

仙台市青葉区広瀬町3-34 Tel. 022-227-2721

組織/実行委員長(会長)：名倉 宏

(東北大学大学院医学系研究科)

主要テーマ：免疫毒性と内分泌系

招待講演：J. Ian Mason 先生(Edinburgh 大学教授)

題目：The role of the cytochrome P450 and steroid dehydrogenase gene families in steroid metabolism and action

特別講演：笹野 公伸先生

(東北大学大学院医学系研究科教授)

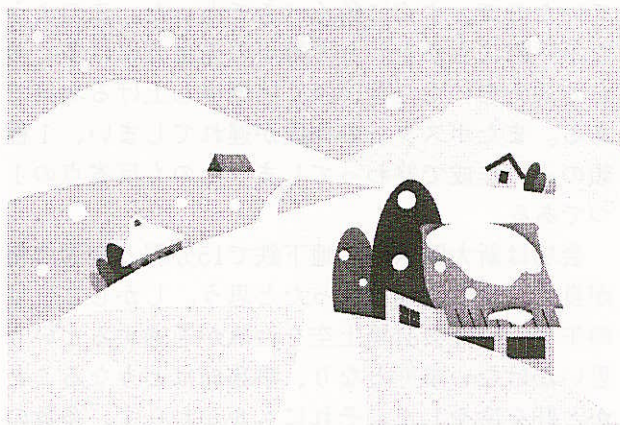
題目：Endocrinology から Incrinology へ

ワークショップ：アレルギー性の予知試験(仮題)

問い合わせ先：東北大学大学院医学系研究科

米地 彩子

Tel. 022-717-7450 Fax. 022-717-5976



## 免疫毒性試験プロトコール 第1回

### ①ラット脾細胞の幼若化反応

中村 裕行

武田薬品工業株式会社

薬剤安全性研究所

#### A. 解説

リンパ球は感作抗原と同一の抗原に接触することにより、活性化(増殖、分化、lymphokine や抗体の産生)を起こす。しかし、各抗原に対する特異的なリンパ球の数が少ないため、抗原刺激ではリンパ球機能を評価するに十分な活性化を起こすことは困難である。一方、mitogen は polyclonal なリンパ球の活性化を引き起こし、また T cell 特異的なもの、B cell 特異的なもの、あるいは T および B cell の両者を活性化するものがあることから、T および B cell の機能をみるのに有用である。

リンパ球の活性化は、細胞内に取り込まれた [<sup>3</sup>H] thymidine の量を測定することにより、DNA 合成の程度をみる方法が一般的に用いられている。ここでは、mitogen による脾細胞への [<sup>3</sup>H] thymidine の取り込みを測定する方法について述べる。

#### B. 実験材料等

##### 1. Mitogen

###### 1) B cell mitogen

(1)Lipopolysaccharide (LPS)、E. coli 026 : B6 由来など

(2)Salmonella typhimurium mitogen (STM)

###### 2) T cell mitogen

(1)Concanavalin A (Con A)

(2)Phytohemagglutinin (PHA)

###### 3) B/T cell mitogen

(1)Pokeweed mitogen (PWM)

##### 2. 培養液

RPMI-1640に10%牛胎児血清(56℃、30分間加温することにより非働化したもの、FCS)および抗生物質(100U/ml ペニシリンG & 100μg/ml ストレプトマイシンまたは50μg/ml ゲンタマイシン)を添加したもの。必要に応じて2mM L-グルタミン、1～5×10<sup>5</sup>M 2-メルカプトエタノール、10～25mM HEPESを添加する。

### 3. その他の試薬

- 1) [<sup>3</sup>H] thymidine, 74~248GBq/mmol (2~6.7 Ci/mmol)
- 2) シンチレーション液

### 4. 器材

- 1) 培養用器材
  - (1)滅菌96穴平底プレート
  - (2)炭酸ガス培養器
  - (3)クリーンベンチ
  - (4)その他、培養に用いる器材は全て滅菌済のものを用いる。
- 2) ハーベスト用器材
 

セルハーベスターおよびグラスフィルターまたはマルチスクリーンアッセイシステム (ミリポア社) など
- 3) 放射能測定用器材
  - (1)液体シンチレーションカウンターまたはベータプレート (ファルマシア社)
  - (2)シンチレーションバイアル

## C. 実験操作手順

### 1. 脾細胞浮遊液の調製

- 1) ラットを麻酔下で放血し、無菌的に脾臓を培養液中に入れる。
- 2) 脾臓より脾細胞を分離する。脾細胞の分離方法を以下に示す。なお、調製した脾細胞浮遊液の一部を用いて予め0.1%エリスロシン染色または0.25%トリパンブルー染色を行い、脾細胞の viability を確認しておく。
  - (1)スリガラス法
 

2枚のスリガラス付スライドグラスを用い、スリガラス部分で脾臓を軽く挟み、圧することにより、脾細胞を培養液中に分散させる。
  - (2)メッシュ法
 

脾臓をステンレスメッシュまたはプラスチック製メッシュ (例: Cell strainer, Falcon 2350) の上に載せ、ハサミで細切した後、スパーテルまたはプラスチック製注射器のピストンなどで軽く押しつぶして、脾細胞を培養液中に分散させる。
  - (3)ピンセット法
 

脾臓をピンセットでほぐしながら、脾細胞をシャーレ中の培養液に分散させる。
- 3) 細胞浮遊液を120g×5分間遠心分離する。
- 4) 細胞を培養液に浮遊させ、細胞数をカウン

トし、一定の細胞濃度に調整する。

- 5) 細胞塊がある場合は、しばらく放置した上清を用いるか、メッシュを通した後、培養に用いる。

### 2. 培養

- 1) 各ウェルに mitogen または培養液100μl および細胞浮遊液100μl を添加し、5%CO<sub>2</sub>、37℃で72時間培養する。
- 2) 培養終了の6時間前に [<sup>3</sup>H] thymidine を加える。
- 3) 測定は通例、triplicate あるいは quadruplicate で実施される。

### 3. 測定

- 1) 培養終了後にセルハーベスターあるいはマルチスクリーンアッセイシステムを用いてグラスフィルター上に細胞をハーベストする。
- 2) フィルターを乾燥させた後、シンチレーション液を加え、液体シンチレーションカウンターあるいはベータプレートでカウントする。

### D. 判定

対照群と薬物処理群との cpm (dpm) を比較する。また、mitogen 添加の cpm 値と mitogen 無添加の cpm 値との差 (Δcpm) や、下式のごとく両者の比である stimulation index (SI) を算出して対照群と薬物処理群の比較が行われる場合がある<sup>1)</sup>。

$$SI = \frac{\text{cpm from cells with mitogen}}{\text{cpm from cells without mitogen}}$$

### E. 留意事項

1. 一般的に用いられている mitogen の濃度は LPS が0.1~50μg/ml、STM が10~100μg/ml、Con A が0.5~20μg/ml、PHA が1~80μg/ml である。mitogen はロットによって反応性が異なる場合があるので、ロットごとに予めその反応性を確認しておく必要がある。
2. background 値が高い場合は、培養液に添加している FCS による可能性がある<sup>1)</sup>。また、用いる FCS によって反応性が異なるので、予め FCS については検定しておく必要がある。
3. 通例、脾細胞は  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cells/well で用いられることが多い。F344/DuCrj ラットの脾細胞を用いた我々の検討では  $1 \times 10^6$  cells/well が至適であった。
4. [<sup>3</sup>H] thymidine は通例 7.4~37kBq/well (0.2~

1  $\mu\text{Ci}/\text{well}$ ) 加えられる。

5. 培養温度の僅かな違いでも増殖の程度に大きな影響が生じるので、注意を要する<sup>2)</sup>。
6. 幼若化試験でよくみられる問題のひとつが微生物の混入である。微生物の混入があるとウェル間の値に大きな変動や高値がみられる。培養中に微生物の混入を起こさないように十分に注意するとともに、顕微鏡で微生物の混入がないことを確認しておくといよい<sup>23)</sup>。また、幼若化や増殖の程度を確認するのも顕微鏡は有用である<sup>1)</sup>。
7. mitogen が添加されていない場合の cpm が薬物により影響を受けると、SI では薬物の影響を正しく評価できなくなることがあるので注意を要する。

#### F. 文献

1. Kruisbeek, A. (1994): Proliferative assay for T cell function. *In* Current Protocols in Immunology (Coico, R., ed.) vol.1, Unit 3.12, John Wiley & Sons.
2. Di Sabato, G., Hall, J., and Thompson, L. (1987): T cell mitogens and polyclonal B cell activators. *In* Methods in Enzymology (Sabato, G., ed), vol.150, pp.3-17, Academic press.
3. Wunderlich, J., and Shearer, G. (1994): Proliferative assays for B cell function. *In* Current Protocols in Immunology (Coico, R., ed.), vol.1, Unit 3.10, John Wiley & Sons.

## ②ラットリンパ組織および末梢血白血球のフローサイトメトリー

中村 和市

塩野義製薬株式会社  
新薬研究所

#### A. 解説

フローサイトメトリーは、細胞1個分の幅の細胞浮遊液の流れにレーザー光線を照射、各細胞からの散乱光あるいは標識蛍光物質から励起される光を瞬時に検出し細胞浮遊液中の細胞の種類等を解析するものである<sup>1)</sup>。

白血球の細胞膜抗原の多くは、細胞の機能、分化、活性化にとって意味のある分子であることがわかっている。このような白血球の細胞膜抗原に

対する抗体を蛍光標識し、これによって細胞を染色後フローサイトメトリーを行なうと細胞浮遊液中の各種白血球あるいはリンパ球サブセットの比率を算出することができる。

ここでは、ラットの代表的なリンパ球サブセットに対する抗体を用いたフローサイトメトリーによってラットリンパ組織および末梢血中に分布する各細胞の比率および数を調べる方法について述べる。

#### B. 実験材料等

##### 1. 血液抗凝固剤

アングロット/ET [日本商事(株)]

##### 2. 細胞洗浄および浮遊液

ハンクス液

##### 3. 赤血球溶解液

0.5%塩化アンモニウム水溶液

##### 4. 蛍光標識抗体

以下に、代表的なものを示す。

- (1)Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ラット CD3抗体 (Clone: G4.18<sup>2)</sup>)
- (2)FITC 標識抗ラット CD4 抗体 (Clone: W3/25<sup>3)</sup>)
- (3)Phycoerythrin (PE) 標識抗ラット CD8抗体 (Clone: OX8<sup>3,4)</sup>)
- (4)FITC 標識抗ラット CD45RA 抗体 (Clone: OX33<sup>5)</sup>)
- (5)FITC 標識抗ラット NK 細胞抗体 (Clone: 3.2.3.<sup>6)</sup>)

##### 5. 蛍光標識抗体希釈液

1%ウシ血清アルブミン、0.1%Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub>加りん酸緩衝生理食塩液 (pH7.2)

##### 6. 死細胞染色液

0.1% 7-aminoactinomycin D (7ADD) 水溶液  
ただし、2重染色を行わない場合は、0.1% propidium iodide (PI) 水溶液を用いてもよい。

##### 7. セル・カウンターあるいは血球計算板

##### 8. フローサイトメーター

##### 9. その他

メッシュ・カップ、ナイロン・メッシュ (5 × 5 cm) など

#### C. 実験操作手順

##### 1. 白血球浮遊液の調製

###### 1) 胸腺、リンパ節の場合

- (1)メッシュ・カップを用いて、ハンクス液中で胸腺、リンパ節から単細胞浮遊液を得る。

(2)ハンクス液で2回遠心(350g、5分間)洗浄する。

(3)セル・カウンターあるいは血球計算板を用いて、白血球の濃度を計数する。また、各試料の白血球の濃度と液量から総白血球数を求める。

(4)ハンクス液で白血球数を $1 \times 10^7$ 個/mlに調整する。

## 2) 脾臓の場合

(1)メッシュ・カップを用いて、ハンクス液中で脾臓から単細胞浮遊液を得る。

(2)ハンクス液で1回遠心(350g、5分間)洗浄する。

(3)細胞浮遊液1容に0.5%塩化アンモニウム水溶液4容を加え赤血球を溶血し、直ちに遠心(350g、5分間)後上清を捨てる。この操作は、白血球の損傷を考慮し手早く行う。

(4)ハンクス液で3回遠心(350g、5分間)洗浄する。

(5)セル・カウンターあるいは血球計算板を用いて、白血球の濃度を計数する。また、各試料の白血球の濃度と液量から総白血球数を求める。

(6)ハンクス液で白血球数を $1 \times 10^7$ 個/mlに調整する。

## 3) 末梢血の場合

(1)予め血液抗凝固剤を添加しておいた注射筒および試験管を用いて動物から採血し血液を得る。

(2)~(6)脾臓の場合と同じ。

## 2. 染色

(1)100 $\mu$ lの細胞浮遊液( $1 \times 10^7$ 個/ml)に対し、100 $\mu$ lの蛍光標識抗体希釈液を加える。

(2)冷蔵庫内で、細胞を30~45分間染色する。

(3)ハンクス液で3回遠心(8,000g、10秒間)洗浄する。

(4)500 $\mu$ lのハンクス液中に細胞を浮遊させる。

(5)予め10 $\mu$ lの0.1% 7AAD水溶液を添加しておいた試験管の中に、ナイロン・メッシュを通過させた細胞浮遊液を加える。

## 3. 測定

フローサイトメーターに蛍光標識抗体で染色した細胞を流す。このとき、以下のような設定あるいはゲーティングを行なう。

(1)測定する細胞数を1試料当たり10,000個に設定する。

(2)Fluorescence (FL) 3上で7AADあるいはPIに強く染まる死細胞を測定しないようにゲーティングする。

(3)最初に測定する個体のそれぞれのリンパ組織を用いて、forward scatterとside scatterの2次元dot plotによって白血球を測定するようにゲーティングする。

## 4. 解析

(1)コンピュータ画面上のマーカーで染色陽性と陰性の間に線を引き、各細胞の比率を求める。

(2)末梢血を除きリンパ組織の総白血球数に各細胞の比率を乗じ、各細胞の絶対数を求める。

## D. 留意事項

### 1. フローサイトメーターの補正

特に2重染色を行なった細胞を測定する場合には、必ずFL1、FL2およびFL3相互の補正を行っておく。この補正は測定結果に極めて重大な影響を与えるものであり慎重に行う。補正値は、同じ機種フローサイトメーターでも機械ごとあるいは機械の調整の度に変わり、また用いる動物がラットとマウスでも異なるので、それぞれに補正を行う必要がある。一度決めた補正値は付属コンピュータのハードディスク等に記憶させておき、以後はこれ呼び出して使う。

以下に、その補正法について述べる。なお、補正には、様々な種類の白血球が多数混在する脾臓細胞を用い、その細胞浮遊液( $1 \times 10^7$ 個/ml)を大量に準備しておく。

(1)無染色の脾臓細胞浮遊液を流し、コンピュータ画面上の強度調整レバーによってFL1、FL2およびFL3の蛍光強度を $10^4$ 程度以下に抑える。

(2)7AAD染色脾臓細胞浮遊液を流し、コンピュータ画面上の(FL2-FL3)調整レバーによってFL2の蛍光強度を $10^4$ 程度以下に抑える。必要に応じて、強度調整レバーによってFL2の蛍光強度を調整する。

(3)PE標識抗CD8抗体で染色した脾臓細胞浮遊液を流し、(FL3-FL2)および(FL1-FL2)調整レバーによって、それぞれFL3、FL1の蛍光強度を $10^4$ 程度以下に抑える。必要に応じて、強度調整レバーによってFL3およびFL1の蛍光強度を調整する。

(4)FITC標識抗CD4抗体で染色した脾臓細胞浮遊液を流し、(FL2-FL1)調整レバーによって、

FL2の蛍光強度を $10^3$ 程度以下に抑える。必要に応じて、強度調整レバーによってFL2の蛍光強度を調整する。

(5)最後に、FITC 標識抗 CD4抗体、PE 標識抗 CD8抗体および7AAD で染色した脾臓細胞浮遊液さらに胸腺細胞浮遊液を流し、CD4 single positive (SP)、CD8SP、CD4CD8 double negative あるいは CD4CD8 double positive 細胞が明瞭に区別できることを確認する。

本補正においてはFL1、FL2およびFL3間の調和が重要であり、例えば操作(4)の後に再度操作(2)、(3)を行い、それぞれの補正を確認してみることも必要である。

## 2. 蛍光標識抗体の希釈倍率

各蛍光標識抗体の希釈倍率については、ロットごとに予め適当な値を決めておく。蛍光強度の上で、蛍光標識抗体で染色される細胞群と染色されない細胞群が明瞭に分離される希釈倍率を選ぶ。

## 3. 測定時の白血球のゲーティングの範囲

「C-3. 測定」の項でも述べたが、測定時には forward scatter と side scatter の2次元 dot plot によるゲーティングを行い、できるだけ多くの白血球に関するデータを取り込むようにする。ただし、個体によっては最初の設定範囲から逸脱する場合もあるので、設定範囲を少し広めにしておき解析の際に再度ゲーティングを行ってもよい。しかし、あまり広く設定すると解析の対象となる細胞数が少なくなるので注意を要する。測定は、個体ごとではなく各リンパ組織あるいは末梢血ごとに実施するほうがゲーティングを何度も行う必要がないので楽である。

## 4. 染色の陽性と陰性の境界

ヒストグラムは、通常二峰性を示す。染色陽性と陰性の峰が近い場合は、二峰間のほぼ中間にある最も低い谷間で境界をつける。また、陽性と陰性の峰が離れている場合は、陽性の峰が陰性側に降り立ったところで境界をつけるとよい。

## E. 参考文献

1. 太田和雄 (監修) (1994) フローサイトメトリー—手技と実際— (第5版)、癌と化学療法社 (東京)
2. Nicolls, M. R., Aversa, G. G., Pearce, N. W., Spinelli, A., Berger, M. F., Gurley, K. E. and Hall, B. M. (1993) Induction of long-term specific tolerance to allografts in rats by

therapy with an anti-CD3-like monoclonal antibody. *Transplantation* 55, 459-468

3. Williams, A. F., Galfre, G. and Milstein, C. (1977) Analysis of cell surfaces by xenogeneic myeloma-hybrid antibodies: differentiation antigens of rat lymphocytes. *Cell* 12, 663-673
4. Brideau, R. J., Carter, P. B., McMaster, W. R., Mason, D. W. and Williams, A. F. (1980) Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 10, 609-615
5. Woollett, G. R., Barclay, A. N., Puklavec, M. and Williams, A. F. (1985) Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 15, 168-173
6. Chambers, W. H., Brumfield, A. M., Hanley-Yanez, K., Lakomy, R., Herberman, R. B., McCaslin, D. C., Olszowy, M. W. and McCoy, J. P., Jr. (1992) Functional heterogeneity between NKR-P1<sup>bright</sup>/*Lycopersicon esculentum* lectin (L.E.)<sup>bright</sup> and NKR-P1<sup>bright</sup>/L.E.<sup>dim</sup> subpopulations of rat natural killer cells. *J. Immunol.* 148 (11), 3658-3665

## ③ラット骨髄細胞を用いるCFU-GM Assay

河内 泰英

大鵬薬品工業株式会社

製薬センター安全性研究所

筒井 尚久

三菱化学株式会社

横浜総合研究所

### A. 解説

骨髄毒性を調べるには、末梢血を用い白血球数や赤血球数を測定する方法と骨髄細胞を用いる方法がある。本 SOP は、骨髄細胞を用い *in vitro* の系で薬剤の影響を調べる方法を示す。

骨髄中には、顆粒球・マクロファージ系の前駆細胞である colony-forming unit granulocyte・macrophage (顆粒球・マクロファージ形成細胞; CFU-GM) や赤血球系の前駆細胞である colony-forming unit erythroid (赤芽球系コロニー形成細胞; CFU-E) などが存在する。ここではそのうち、

ヒトの骨髄毒性で最も重要で、しかも代表的な CFU-GM の培養法に関して記載する。試験物質の暴露法としては、*in vivo* で投与する方法と、無処置動物から採取した骨髄細胞に *in vitro* で処理する方法がある。

## B. 実験材料等

### 1. 試薬および調製方法

#### 1) $\alpha$ -MEM 培養液

#### 2) 10%ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液

以下に示す脱イオン処理を行ってから用いる。

(1)BSA 粉末10g を45ml の蒸留水に静かに重層する。

(2)4℃で一晩放置し、十分に溶解する。

(3)Mixed Bed Resin (AG-501×8(D)) を2g 加え、時々振盪しながら2時間、4℃で脱イオンを行う。

(4)ガーゼで溶液をこす。再度2時間、4℃で脱イオンを行う。

(5)ガーゼで溶液をこし、液量を量る。

(6)蒸留水を加えて50ml とし、さらに2倍濃度の  $\alpha$ -MEM 培養液50ml を加える。

(7)0.45 $\mu$ m ミリポアフィルターで濾過滅菌し、適量に分注して-20℃で保存する。

#### 3) ウシ胎児血清(FCS)

非働化処理 (56℃, 30分) して用いる。血清の影響が大きいため、コロニー数、コロニーサイズなどを指標にロットチェックを行うのが望ましい。

#### 4) 10mM 2-メルカプトエタノール (2-ME)

4.3M の2-ME 0.1ml を培養液14.3ml に加え、良く混合して濾過滅菌しておく。用時調製とする。

#### 5) 造血因子 (リコンビナントマウスGM-CSF)

100-200ng/ml の濃度で培養液に希釈する。

#### 6) 3%メチルセルロース液

(1)濾過滅菌した冷却蒸留水200ml および沸騰蒸留水300ml を用意する。

(2)大型のスターラーを入れた2L 用三角フラスコに沸騰蒸留水を約250ml 注ぎ、メチルセルロース粉末 (粘度1500cp) 30g を加える。残りの沸騰蒸留水でフラスコの口や壁に付着した粉末を流す。

(3)十分攪拌して粉末を溶解した後、冷却蒸留水を何回かに分けて加える。

(4)2倍濃度の培養液500ml を加えて総量1000ml とする。

(5)4℃で一晩ゆっくりと攪拌し脱気する。適当な量に分注し、-20℃で保存する。

### 7) 溶血液

必要に応じて溶血液を用いる。

(1)NH<sub>4</sub>Cl830mg を蒸留水で100ml にする (0.16M NH<sub>4</sub>Cl)。

(2)Triza base 2.06g を80ml の蒸留水に溶解した後、1N HCl で pH 7.65 に調整し、蒸留水を加えて全量を100ml にする (0.17M Tris-HCl)。

(3)0.16M NH<sub>4</sub>Cl 90ml と0.17M Tris-HCl 10ml を混合し、0.1N HCl で pH 7.2 に調整後、-20℃で保存する。

### 2. 骨髄細胞浮遊液の調製

摘出した大腿骨の両端をハサミで切断する。21G 針を付けたシリンジに培養液を適量とり、一方の骨端に回転させながら針を挿入しフラッシングする。このとき、骨髄が逆に飛び出すことがあるので注意を要する。同様の操作を2-3回行い、骨髄細胞をほぼ完全に採取する。一度洗浄した後、必要に応じて溶血液を加え3分間静置し、さらに2回洗浄する。細胞を必要濃度に調整する。

## C. 実験操作手順

### 1. *in vivo* で試験物質を投与する場合

1) 培養開始前日に凍結保存しておいたメチルセルロース溶液を解冻し、4℃で保存しておく。

2) 凍結保存しておいた試薬を解冻し、必要に応じて濾過滅菌しておく。

3) 骨髄細胞浮遊液の細胞濃度を2-4×10<sup>6</sup>個/ml に調整する。

4) 遠心管に下記の液を加え、混合する。容量は比率が同じであれば変更可能である。

細胞浮遊液	0.25ml
培養液	0.20ml
rmGM-CSF 溶液	0.50ml
FCS	1.50ml
10% BSA 溶液	0.50ml
10mM 2-ME	0.05ml
計	3.0ml

5) 4) の混合液にメチルセルロース溶液を2.0ml 加える。この溶液は粘性が高いため、2.5ml シリンジに直接吸い取って添加するのがよい。遠心管の蓋をして上下に激しく振盪し、内容

物をよく混合する。数分間静置して気泡が抜けたら(完全に抜けなくてよい)、35mm 培養皿 2-4 枚に 1 ml ずつ分注する。このとき、間隙のないように底全面に液を伸展する。

- 6) 90-100mm のシャーレ内に上記の培養皿を 2 個ずつ置く。シャーレ内が乾燥しないように、同時に蒸留水を適量入れた培養皿を置く。
- 7) シャーレを 37°C, 5%CO<sub>2</sub>、湿潤下で 7 日間培養する。
- 8) 培養 7 日目に、倒立位相差顕微鏡で培養皿を観察する。40 個以上の細胞から成る集塊をコロニーとしてカウントする。

## 2. *in vitro* で試験物質処理を行う場合

### 1) 短時間処理の場合

- (1) 2-4 × 10<sup>6</sup>個/ml に調整した細胞浮遊液 0.5ml に 20% FBS 含有培養液 4.0ml、処理濃度の 10 倍濃度の試験物質を含む培養液 0.5ml を加えて良く混和し、培養ボトルに移して、適切な条件下に置く。
- (2) 4°C, 1500rpm, 5 分間遠心し、上清を捨てる。
- (3) (2) と同条件で細胞を洗浄する。
- (4) 最初の細胞濃度と同じになるように細胞浮遊液を調整する。
- (5) 以後は、1. の方法に準拠して行う。

### 2) 培養期間を通じて処理する場合

1. (4) に示した混合条件のうち、“培養液”を“25 倍濃度の試験物質を含む培養液”に変更する。その他は 1. の方法に準拠する。

## D. 留意事項

1. 35mm 培養皿はグリッドライン入りを用いた方がカウントが容易である。
2. 今回の条件下ではマクロファージ系のコロニーの割合が高いが、rhG-CSF (5 ng/ml 以上) を用いると、播種細胞数 5 × 10<sup>5</sup>個/ml で顆粒球系のコロニーの割合を高めることが可能である(松村ら、1996: 第 3 回免疫毒性研究会講演要旨集、p37)。

## E. 参考文献

1. 浅野茂隆、池淵研二. ヒト、マウス造血幹細胞および前駆細胞培養法. 細胞工学. 13, 6, 534-542, 1994.
2. 小川峰太郎、西川伸一. 骨髓細胞培養法. 新生物化学実験講座 12. 分子免疫学 I. 257-264,

1989.

## ④ ELISA 法を用いるラット抗ヒツジ赤血球抗体の抗体価測定法

永田 雅史, 中村 和市  
塩野義製薬株式会社  
新薬研究所

### A. 解説

ヒツジ赤血球 (SRBC) は、通常マウスおよびラットに対して強い免疫原性を示すことが知られており、動物の体液性免疫反応によって化合物の免疫毒性を評価する際に免疫抗原として広く用いられている。これまで、SRBC で免疫した動物の特異抗体産生能を調べるには、脾臓細胞中の抗 SRBC 抗体産生細胞数を測定する PFC アッセイが一般的であった。しかし近年、この方法以外に酵素免疫測定 (ELISA) 法によって血清中の抗 SRBC 抗体価を測定することが試みられてきた。ELISA 法では、血清の採取と、抗体価の測定を別の日に行うことができるので一度に多くの例数を処理することが比較的容易であり、また部分採血を行うことによって、抗体価の経時変化を個体レベルで観察することができる等の長所がある。

ここでは、これまでに報告されてきた SRBC 膜抗原の調製方法に改良を加えたものを紹介し、SRBC に対する IgM および IgG サブクラスの抗体価を測定する方法について述べる。

### B. 実験材料等

#### 1. ヒツジ赤血球 (SRBC) 膜抗原抽出用試薬

- 1) A 液: 1mM Na<sub>2</sub>-EDTA / 5mM Tris-HCl (pH 7.0)  
Na<sub>2</sub>-EDTA 0.372g を 5mM トリスアミノメタン塩酸塩緩衝液 (pH 7.0) 1,000ml に溶解したもの。
- 2) B 液: 0.5M NaCl, 1mM Na<sub>2</sub>-EDTA / 0.05M Tris-HCl (pH 7.0)  
NaCl 5.84g と Na<sub>2</sub>-EDTA 0.07g を 0.05M トリスアミノメタン塩酸塩緩衝液 (pH 7.0) 200ml に溶解したもの。
- 3) C 液: 3M KCl  
精製水 500ml 中に、KCl (MW: 74.55) 11.83g を溶解したもの。
- 4) D 液: 0.1w/v% SDS  
精製水 10ml 中に、ラウリル硫酸ナトリウム



- (SDS) 10mg を溶解したもの。
- 5) ヒツジ血液 (アルセバー液保存)
  - 6) ウシ血清アルブミン (BSA)
  - 7) 生理食塩液
2. ELISA用試薬
- 1) 0.1M  $\text{NaHCO}_3$ 水溶液
  - 2) Tween加PBS  
10mMりん酸緩衝生理食塩液 (pH 7.2、PBS) 中に、NaClを0.15M、Tween 20を0.01%となるように添加したもの。
  - 3) 1% スキムミルク水溶液  
非特異吸着のブロッキング用。
  - 4) アフィニティー精製ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットIgM抗体
  - 5) アフィニティー精製ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットIgG抗体
  - 6) 0.05%スキムミルク加PBS  
血清および2次抗体の希釈用。
  - 7) 0.05%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 液  
市販の過酸化水素液 (30%) を蒸留水で600倍希釈したもの。
  - 8) 5-アミノサリチル酸 (5-AS) 発色液  
0.08%の5-アミノサリチル酸水溶液を0.2N NaOHでpH6.0に調整したもの。
  - 9) 0.2および3N NaOH
  - 10) オルソフェニレンジアミン (OPD) 発色液  
OPD Peroxidase Substrate Tablet Set (Sigma、調製方法の詳細は添付書類を参照のこと) を用いて調製する。
  - 11) 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$

### 3. 実験器材

- 1) 吸光光度計
- 2) 96穴マイクロプレート (Greiner社製、Nunc社製 Maxisorp プレート等)

### C. 実験操作手順

#### 1. SRBC ゴーストの作製<sup>1)</sup>

- 1) 100mlのヒツジ血液を冷却遠心 (600g、15分間) した後、上清および白血球層を除去する。
- 2) 赤血球を生理食塩液で2回遠心 (600g、15分間) 洗浄する。
- 3) 赤血球を10倍量のA液に懸濁し、室温で15分間攪拌する。
- 4) 冷却高速遠心 (25,000g、30分間) し、上清を捨てる。

- 5) さらに、赤血球と同量のA液およびB液 (A液—A液—B液—A液—A液の順) で、冷却高速遠心 (25,000g、10分間) による洗浄操作を行う。

#### 2. SRBC膜抗原蛋白抽出

- 1) SRBC ゴーストを5倍量のC液<sup>2)</sup>に懸濁させ、氷水中で60分間超音波処理する。
- 2) 冷暗所で2日間静置後、冷却高速遠心 (25,000g、10分間) を行う。
- 3) 上清を除去し、沈殿物を等量のD液<sup>3)</sup>に懸濁させる。
- 4) 冷暗所で2日間静置後、冷却高速遠心 (25,000g、10分間) を行う。
- 5) 一晚、上清をPBSに対して透析する。
- 6) BSAを標準試料とし、Lowry法によって蛋白濃度の測定を行う。
- 7) 抽出液を分注して $-80^\circ\text{C}$ で保存する。

#### 3. ELISA

- 1) SRBC膜抗原を0.1M  $\text{NaHCO}_3$ 水溶液で希釈する (Greiner社製プレートを用いる場合は $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Nunc社製プレートを用いる場合は $2\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製)。
- 2) 調製した抗原液を $100\mu\text{l}$ ずつ、マイクロプレートの各穴に加え、冷暗所で一晚静置する。
- 3) Tween加PBSで2回洗浄する。
- 4) 1% スキムミルク水溶液を $200\mu\text{l}$ ずつ、各穴に加え、室温で2時間静置する。
- 5) Tween加PBSで1回洗浄する。
- 6) 0.05%スキムミルク加PBSで血清サンプルの系列希釈を行い、 $100\mu\text{l}$ ずつ各穴に加え、室温で2時間静置する。デュプリケートもしくはトリプリケートの実験を行う。
- 7) Tween加PBSで3回洗浄する。
- 8) 二次抗体 (抗IgMあるいはIgG抗体) は、予め最適な希釈倍率を検討する。0.05%スキムミルク加PBSで希釈した二次抗体を、 $100\mu\text{l}$ ずつ各穴に加え、室温で1時間静置する。
- 9) Tween加PBSで4回洗浄した後、基質による発色反応として以下の10) または11) を行う。
- 10) 5-AS発色液を $100\mu\text{l}$ ずつ各穴に加え、 $37^\circ\text{C}$ で1時間静置する。反応停止には3N NaOHを $100\mu\text{l}$ ずつ各穴に加える。吸光度は波長550nm付近で測定する。
- 11) OPD発色液を $100\mu\text{l}$ ずつ各穴に加え、室温で30分間静置する。反応停止には2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ を $50\mu\text{l}$ ずつ各穴に加える。吸光度は波長492nm

付近で測定する。対照波長を設定する場合には540nmとする。

#### D. 結果の判定

1. 一定の吸光度を示す血清希釈倍率を抗体価として計算するために、half maximumを与える血清の希釈倍率を求める。または任意の吸光度値（例えば1や0.2などを設定する）を示す血清の希釈倍率を求める<sup>4)</sup>。

#### E. 留意事項

1. SRBC 膜蛋白の抽出方法を比較した結果、3M KCl による抽出物よりも0.1w/v% SDS による抽出物の方が非特異反応が弱かった。さらに、KCl での抽出後の残留物からの SDS による抽出物の方がさらに非特異反応が弱い一方で、特異反応は強かった。
2. 2% BSA+0.05% Tween20 加 PBS、2% BSA、10%ウマ血清・PBS 希釈液および1%スキムミルク水溶液の4種類のブロッキング試薬を用いて、非特異反応のブロッキングの比較を行った。その結果、1%スキムミルク水溶液が最もブロッキング効果が高かった。また添加時間については1時間よりも2時間の方がより効果的であった。

#### F. 参考文献

1. Marchesi, V. T. and Palade, G. E. (1967) The localization of Mg-Na-K-activated adenosine triphosphatase on red cell ghost membranes. *J. Cell Biol.*, 35, 385-404
2. Van Loveren, H., Verlaan, A. P. J. and Vos, J. G. (1991) An enzyme-linked immunosorbent assay of anti-sheep red blood cell antibodies of the classes M, G, and A in the rat. *Int. J. Immunopharmac.*, 13(6), 689-695
3. Galvin, J. B., Bice, D. E. and Muggenburg, B. A. (1986) Comparison of cell-mediated and humoral immunity in the dog lung after localized lung immunization. *J. Leukocyte Biol.*, 39, 359-370
4. Temple, L., Kawabata, T. T., Munson, A. E. and White, K. L., Jr. (1993) Comparison of ELISA and plaque-forming cell assays for measuring the humoral immune response to SRBC in rats and mice treated with benzo [a] pyrene or

cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21, 412-419

### 編集後記

今回より、新たに免疫毒性試験法コーナーを設け、「免疫毒性試験プロトコール」を掲載し始めました。今回は、以前より要望の強かったラットを用いる試験法を中心に4編のプロトコールを掲載させて頂きました。これからも、継続的にプロトコールを掲載し、ある程度まとまった段階で、小冊子に編集し直す予定であります。プロトコールに関するご意見などがありましたら、試験法委員会 (sawada@nihs.go.jp) まで、ご連絡下さい。また、新しい試験法がありましたら、自薦他薦を問わず、大いに歓迎いたします。

(澤田 純一 記)

### 編集・発行：免疫毒性研究会

発行日：平成11年2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

