

# ImmunoTox Letter

免疫毒性研究会：The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 4 No. 2 (通巻8号)1999

## 目次

おしらせ .....	1
白砂の保養地で開催された、第二回環境起因性 職業性アレルギー免疫疾患国際シンポジウム .....	2
福井医科大学医学科環境保健学講座 日下 幸則	
1999年米国胸部・肺学会国際会議に出席して .....	3
国立環境研究所環境健康部 小林 隆弘	
医療用具の免疫毒性試験の海外動向 .....	4
国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部 澤田 純一	
医薬品の免疫毒性評価の実施手順の検討 .....	4
日本製薬工業協会医薬品評価委員会 中村 和希	
「免疫毒性試験プロトコル」第2回	
①ラットNK細胞活性測定法 .....	5
三菱東京製薬(株)横浜研究所安全性研究所 筒井 尚久	
②ラットにおけるインビボ抗SRBC抗体産生 (スライドグラスを用いるPFCアッセイ) .....	7
国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部 手島 玲子 澤田 純一	
③ラットにおけるリンパ系器官・組織 (胸腺、脾臓、リンパ節)の病理組織学的検査 .....	11
富山化学工業株式会社総合研究所安全性研究所 守田 禎一 旭化成工業株式会社ライフサイエンス総合研究所安全性研究所 佐藤 則博 鳥居薬品株式会社本部安全情報管理室 及川 寿浩	

性ならびに細胞性免疫試験法の長所・短所を明らかにするもので、大変興味深いものであった。特別講演として、東北大・笹野教授から「EndocrinologyからIntracrinologyへ」について講演があり、intracrinologyの解明の重要性と奥深さがよく理解できた。一般演題は21題あり、何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6回免疫毒性研究会において、開催された総会で以下のことが報告・承認された。

1. 会計報告 平成10年度収支決算報告、平成12年度予算案
2. 新幹事の委嘱：次の4名の方々が幹事として新たに委嘱され、就任された。  
荒川泰昭（静岡県立大・食品栄養科学部）  
植木絢子（川崎医大・衛生学）  
日下幸則（福井医大・環境保健学）  
北條博史（昭和薬科大・衛生化学）
3. 次回第7回研究会予告  
実行委員長 上田志朗（千葉大・薬）

## 第6回免疫毒性研究会報告

平成11年9月20、21日両日に第6回免疫毒性研究会が、仙台市長陵会館にて、124名の会員が集い、開催された。今回は海外からの招待講演者として、英国エジンバラ大学のJ.I.Mason教授をお呼びして講演をお願いした。Mason教授からは、チトクロームP450とステロイド脱水素酵素遺伝子ファミリーのステロイド代謝とその作用における役割について、免疫機能に及ぼす作用との関わり合いを交えた講演があった。「Th1/Th2パラダイムと免疫毒性」に関するシンポジウムでは、Th1/Th2バランスと免疫反応の関係についていろいろな角度からの報告があり、Th1/Th2バランスについて知識と考え方を深めるものであった。「アレルギー性の予知試験」に関するワークショップでは、現行の液

## 第7回免疫毒性研究会予告(1報)

日時：2000年9月25日(月)～9月26日(火)

場所：けやき会館（千葉大学）

千葉市稲毛区弥生町1-33 千葉大学構内

組織委員長(会長) 名倉 宏（東北大・医）

実行委員長 上田 志朗（千葉大・薬）

詳細は次回予告等でお知らせ致しますが、日時・場所についてご予約ください。

## 白砂の保養地で開催された、第二回環境起因性職業性アレルギー免疫疾患国際シンポジウム

日下 幸則

福井医科大学医学科環境保健学講座 教授

キエッティは、アドリア海に面した街であった。歴史を百年ほど遡ると、この保養地の興りに行き着くそうだ。アドリア海は、驚くほど静かだった。会場となったホテルに5日間滞在し、朝夕に、海岸通りを散策したが、ついぞ、白い波濤は目にしなかった。白い壁のホテルが、幾つか、この海岸通りに沿って散在していた。イタリアの空港から飛び立ったNATO軍機が、このアドリア海を超えて、対岸のバルカン半島のコソボを爆撃している頃であった。しかし、とても、その情景を想像できないような明るい陽の光を楽しんだ。

この保養地が持つ百年の歴史は、しかし、ローマ帝国の歴史に比べると、赤子のように若いのだろう。アウグスティヌス凱旋門のそびえる辺り、古代ローマの丘に残る政庁遺跡を観光した目には、白い煉瓦の壁と、赤瓦の民家は、とても新しく見えた。学会初日の会場となったキエッティ大学も、ここ30年ほどの歴史しかない、若い総合大学（医学部、薬学部、工学部、文学部）である。その大学が、免疫、老化、環境というキーワードを連ねて、大学の学問、研究の道標としている。ユニセフの指定研究機関ともなっている。本学会も、誠に、そのラインに沿った、大学挙げての催しであった。空軍のパイロットに徴兵されたと胸を張っていた、若い外科医も、学会運営の一人であった。

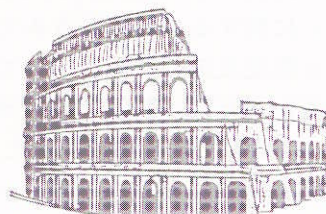
ここキエッティから北へ100kmほど行ったところにあるモデナには、欧州共同体に直属する、免疫毒性予知研究所も置かれている。ここでは、化学性の原材料、工業製品、日常用品として、エンドユーザーに渡るような製品など、それらの持つ免疫毒性、アレルギー性を予知予測する研究所である。この所長による冒頭の総会講演で、学会の幕が切られた。そこでは、予知予測の戦略、開発中のアッセイ法、さらに欧州共同体のポリシーが語られた。

もうひとつ、大西洋の向こう、アメリカ合衆国立産業安全衛生研究所(NIOSH)の免疫毒性部門からも、その長が参加していた。が、そのまとまった講演が聞けなかったのが残念であった。というの

も、増加する新規化学物質、薬品、食品、製品の洪水の中で、その免疫毒性、アレルギー性、感作性を、スクリーニング、予知予測する科学が焦眉の課題である。個別の物質の起こす特異的な免疫アレルギー疾患、その病態とメカニズム、という観点からの調査研究では、この事態に対しては、明らかに限界があるのである。国家的観点、社会医学的観点から、これに備える必要があるだろう。かつて、発癌性、催奇形性に対して取られた対策のように。個別の研究者、個別の大学研究室でも、同様な限界を持っている。

小生の分野でも、羨ましく思えた研究発表があった。やはり、欧州共同体が設立した、イタリアにある環境医学研究所からの講演であった。環境中、生体組織から系統的に、一貫して、様々な金属検出、分析を行い、その免疫毒性、アレルギー性を検討している。そのレビューが、所長からなされた。

また、この学会の特色は、他にも幾つかあった。国際産業衛生学会、免疫学会などとの共催により、このような学際的、応用化学的分野を、関連演題で埋められたこと、と同時に、世界的に増加する喘息やアトピーの分子生物学的到達点がレビューされたこと、さらに悪性腫瘍に対するサイトカイン治療法の現況が報告されたことなどである。誠に、盛りだくさんの欲張った学会であった。日本からは、本学会に先立つ、第一回環境起因性職業性アレルギー免疫疾患国際シンポジウムの学会長であった鹿児島大学衛生学教室の松下名誉教授を初めとして、大阪大学医学部環境医学教室、帝京大学薬学部、川崎医科大学衛生学教室、国立環境研究所などの参加があった。学会長のボスコロ教授は、松下教授の旧知とあって、私たち日本勢を、現地の博物館、ドライブへともてなして下さった。そのお陰で、イタリアの旅は、一層、楽しい思い出となった。我が福井医科大学環境保健学講座からの参加者計二名が、ローマでの空港タクシーに、それぞれの手口で、お金を巻き上げられたことも、今では、懐かしい語り草となりつつある。



## 1999年米国胸部・肺学会国際会議に出席して

小林 隆弘

国立環境研究所 環境健康部

1999年米国胸部・肺学会国際会議は4月23日～28日までの会期において米国カリフォルニア州サンディエゴのコンベンションセンターで開催された。米国以外からも日本やヨーロッパをはじめと世界各国から多くの参加者があった。演題数も6700弱を数え呼吸器関連の研究の最新の成果を知る上では重要な学会である。喘息、炎症、感染関連の演題数はおおよそそれぞれ1500、800、600題とあり免疫が関係すると思われる演題は非常に多い。ここでは免疫毒性に関連し大気環境と免疫についての話題を紹介する。

目立ってきたのが直径が2.5mm以下の粒子状物質(PM2.5)の吸入の健康影響についての発表が増えてきた点である。PM2.5の問題は、米国の6都市の8,000人以上を対象としたハーバード大学による疫学調査の結果PM2.5の大気中濃度変化と日別の死亡率の変化の間により相関が見られることが明らかになったこと、が発端になった。その後、米国の50の都市で200,000人以上を対象とした調査、カナダのトロント、チリのサンチャゴ、ギリシャのアテネでの調査においても同様の結果がみられたことから世界的に関心が高まってきた。昨年(1998年)の本国際会議では、米国ではPM2.5の研究は残渣油を燃焼させたときに生じるフライアッシュ(ROFA: Residual Oil Fly Ash)、日本ではディーゼル排気中に含まれる粒子、ドイツやイギリスでは直径が0.1mm以下の超微粒子、の健康影響の研究が主でありました。本年も米国では研究対象物質が大きく変わってきたとの印象を強く持った。これまでのROFAの研究は依然として継続されているが、ハーバード大学のKoutrakisらにより考案された大気中浮遊粒子状物質の濃縮装置を用い、濃縮した粒子(CAPs: Concentrated Air Particles)を暴露して健康影響を検討した報告が増加した。実際の大気中のPM2.5を捕集して影響を検討することはより重要と思われる。ヨーロッパの研究も次第にその方向に向いていくものと思われた。

大気中の微小浮遊粒子は抗原吸入によるインターロイキン-4(IL-4)の産生や肺胞洗浄液中の好酸球の産生を増加しアレルギー症状を増悪することが

報告されているが、その要因を探る研究が進行している。神経増殖因子(NGF)の遺伝子導入により知覚神経や交感神経の過剰支配が行われているマウス、肥満細胞欠損マウスを用いた解析が行われ、好酸球浸潤の増加に肥満細胞が関与していることが示唆された。気道におけるサイトカイン産生と炎症細胞の浸潤についてもいくつかの報告があった。ヒトを用い100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (日本の環境基準)という低濃度のディーゼル排気暴露実験が行われ、気管洗浄液中でのIL-6やIL-8の増加や生検での血管内皮細胞におけるP-セレクチンの増加が見いだされた。このとき300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の粒子濃度のときに比し気管粘膜への炎症性細胞の浸潤は観測されなかった。炎症という病態にいく前により鋭敏な指標が動いていることが示唆された。

遺伝的素因と粒子状物質に対する感受性について種々の系統のマウスを用いて検討が行われ始めている。系統により初期の炎症に対して感受性が高いもの、初期炎症反応には感受性が低いが急性肺傷害になりやすいもの、急性肺傷害に感受性が高いものなどオゾン暴露のときに見いだされているように関与する遺伝子が多岐にわたることが示唆されている。

微小粒子状物質が吸入された場合、肺胞マクロファージや肺胞II型上皮細胞が影響を受けるものと考えられる。このような細胞の転写因子AP-1やNF- $\kappa$ Bならびに炎症性および抗炎症性のケモカイン、サイトカインがどのような挙動を示すか検討され、MAPキナーゼ経路の関与が示された。AP-1やNF- $\kappa$ Bがらみの報告も少しずつ増加している。微粒子状物質の肺胞マクロファージへの影響のなかで、NF- $\kappa$ BやAP-1とIL-8やヘム酸素添加酵素遺伝子の発現の関係が報告されていた。

微小粒子状物質を含め大気汚染物質がアレルギー関連疾患におよぼす影響を考えるとヘルパーT細胞のTh1/Th2バランスや抗原提示機能の問題は重要な課題であると考えられる。ここでも転写因子に着目した報告が少しずつ出はじめてきている。GATA-3転写因子はIL-5の遺伝子の発現に必須であることが知られているが、このGATA-3転写因子発現する遺伝子導入マウスでは抗原投与による好酸球の浸潤を伴う気道の炎症が強くなることが報告されている。また、気道の過敏性も強く出るという報告もあった。一方、同じTh2サイトカインであるIL-4の産生についてはアンチセンスGATA-3RNA

でIL-5のプロモーターの活性化は阻害されるがIL-4のプロモーターの活性化は阻害されないことからGATA-3だけではIL-4産生には不十分であるとの報告があった。その他Th1/Th2バランスに関するいろいろな観点からの報告があった。

気道における抗原提示細胞のなかで樹状細胞への関心が近年増大傾向にあるが、今学会においては17題の発表があった。樹状細胞の産生するサイトカイン、B7-1などを含む表面抗原の解析、抗原貪食後のリンパ節のT細胞領域への移動、樹状細胞のTh2に選択的なT1/ST2分子との相互作用など多岐にわたる報告があった。

そのほか興味深い発表がたくさんあったがそれらを紹介することは著者の能力をはるかに越えている。学会で出しているCDにて興味ある項目について各研究者が検索してみるのがよいと思う。

世界の国々の研究者を引き寄せる情報量の多さと水準の高さがある学会であった。

## 医療用具の免疫毒性試験の海外動向

澤田 純一

国立医薬品食品衛生研究所  
機能生化学部

筆者は、昨年（平成10年6月）のトキシコロジー学会において、米国FDAのCenter for Devices and Radiological Health (CDRH)が、医療用具全般の免疫毒性試験フレームワークに関するガイダンス案を提出していることを紹介した。その後、このガイダンスは、修正され、本年5月に正式版としてリリースされている<sup>1)</sup>。このガイダンスは、FDAのホームページ(<http://www.fda.gov/cdrh/ost/ostggp/immunotox.pdf>)から、pdfファイルとして自由にダウンロードできるので、興味のある方は早目に手に入れて頂きたい。このガイダンスの中では、医療用具及びその構成成分の材質と人体への接触の度合いに応じて試験項目を考える必要性が指摘されている。また、免疫毒性試験が必要か否かを決定するためのフローチャートと共に、免疫毒性試験項目の例が表の形でまとめられている。本ガイダンスは、医療用具及びその構成成分の免疫毒性及びその試験法に対するCDRHの考え方を示したもので、必ずしも強制的なものではないとされている。

一方、国際標準化機構(ISO)の技術委員会194(TC194)のWG15の下のタスクフォース1(小さな作業委員会)でも、FDA/CDRHガイダンスをとり入れた形で、医療用具の免疫毒性に関する報告<sup>2)</sup>を出している。筆者の感想としては、FDA/CDRHのガイダンスと大きな相違はないように思われる。いずれISOの正式文書として採用するように提案がなされる予定と聞いている。

1) US FDA/CDRH: Guidance for Industry and FDA Reviewers. Immunotoxicity Testing Guidance. May 6, 1999; Fed. Reg., 64 (87):24408 (May 6, 1999)にその通知がある。

2) Report of ISO/TC 194 WG15 TF1 (immunotoxicology): Principle and methods for immunotoxicology testing of medical devices. May 11, 1999

## 医薬品の免疫毒性評価の実施手順の検討

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

日本製薬工業協会（製薬協）の免疫毒性ワーキンググループ（WG）では、医薬品の安全性評価における免疫毒性試験のあり方について既に8年程前から取り組みを始めています。当初はオランダ国立公衆衛生・環境研究所（現在の名称）や米国National Toxicology Programの段階的評価法などの検討を行い、また日本免疫毒性研究会の発足に伴って各試験法のヴァリデーシヨンのための共同研究を実施しその成果を当研究会で発表してきました。さらに、医薬品に限定し最近の免疫毒性試験の国際的動向の把握にも努めています。ここでは、医薬品の免疫毒性評価に関する今期2年間の我々の取り組みについて述べたいと思います。

製薬協の免疫毒性WGでは、今期、製薬協の病理毒性WGならびに臨床病理WGと協力し医薬品の免疫毒性評価の実施手順の検討を行うことになりました。医薬品の免疫毒性評価の実施手順を確立するために、我々はまず一般毒性試験と免疫毒性試験との関係を明確にしておく必要があると考えました。そのためには、病理・血液学的検査と免疫機能検査の感度の違いを把握するとともに、病理・血液学的所見と免疫機能の関連性を検討する

ことが重要であると思います。そこで、当研究会の試験法委員会から御助言を仰ぎながら共同研究を実施することにいたしました。この共同研究では、ラットを用い病理・血液学的検査と胸腺依存性抗原に対する抗体産生能測定試験の感度の違いならびに病理・血液学的検査の結果から免疫機能検査あるいはフローサイトメトリーを実施する際の基準を検討することを主な目的としています。

共同研究の実施概要は以下の通りです。

まず、SDラット（雌、8週齢）に3用量の化合物あるいは媒体（6匹/群）を14日間連続投与します。化合物については、免疫毒性作用の知られているものを複数用いる予定です。化合物・媒体の第1回投与日を Day 0 とし、Day 13 に最終投与を、また Day 14 には病理学的検査のための材料採取、採血、血液学的検査等を行います。それぞれ別のラットを用いて、病理・血液学的検査、plaque-forming cell (PFC) アッセイ、酵素免疫測定法 (ELISA) によるヒツジ赤血球 (SRBC) に対する抗体産生能の測定あるいはフローサイトメトリーによる胸腺、脾臓リンパ球サブセットの解析を行います。尚、ELISA および PFC アッセイのための SRBC 免疫については、それぞれ Day 8、Day 10 に、また採血あるいは PFC アッセイについては Day 14 に行います。病理学的所見についてはピア・レビューを行ったのち、各試験の結果を比較します。ただし、今後必要に応じて試験内容を変更することもあります。

この共同研究を通じまして、医薬品の免疫毒性評価手順に対する方向性を見出していきたいと考えており、また医薬品の免疫毒性評価のシステム作りがなされていくことも期待しています。

共同研究には製薬協・基礎研究部会加盟の製薬企業以外の研究機関の参加も受け付けております。すべての試験に御参加いただく必要はなく、試験項目を自由に選択していただいで結構です。

御協力いただける施設がございましたら、中村和市 [塩野義製薬(株)、Fax: 06-6332-6385] まで御連絡ください。折り返し、詳しい試験計画書および手順書をお送りいたします。

## 免疫毒性試験プロトコール 第2回

### ①ラットNK細胞活性測定法

筒井 尚久

三菱東京製薬株式会社  
横浜研究所 安全性研究所

#### A. 解説

ナチュラルキラー (NK) 細胞は、T細胞やB細胞とは形態的および機能的に区別されるリンパ球であり、抗原感作の有無に関わらず、ウイルス感染細胞やある種の癌細胞を障害する働きを持つ。NK細胞活性測定は、免疫毒性試験において非特異的免疫機能の評価項目の一つに挙げられ、米国 Environmental Protection Agency (EPA) の免疫毒性試験ガイドライン (TSCA 799.9780 Immunotoxicity および OPPTS 870.7800 Immunotoxicity) では、羊赤血球に対する抗体産生試験に引き続いて行いうる追加試験項目として記載されている<sup>1,2)</sup>。

一般的にNK細胞の細胞障害性は、<sup>51</sup>Cr標識した標的細胞を用いて測定される。ここでは、<sup>51</sup>Cr標識したYAC-1細胞 (マウスリンパ腫) を用いたラットのNK細胞活性測定について述べる。

#### B. 実験材料

##### 1. 試薬類

1. Hanks balanced saline solution (HBSS)
2. 赤血球溶解液: 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ /17mM Tris液 (pH 7.2)
3. 培養液: 10%牛胎児血清 (56°Cで30分間加温し、非働化処理を施したもの)、2mM L-glutamine、10mM HEPESを含有するRPMI-1640培地
4.  $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$ : 37MBq/ml、第一化学薬品株式会社、Code No. NEZ-030S
5. Nonidet® P-40 (NP-40) の0.1%水溶液

##### 2. 細胞

YAC-1細胞は、大日本製薬株式会社 (カタログ番号05-558) あるいはAmerican Type Culture Collection (カタログ番号ATCC TIB-160) から購入が可能。上記の培養液で $2 \times 10^5/\text{ml} \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$ の細胞濃度を維持するように継代培養する。

##### 3. 器材

- 1) 96穴丸底マイクロプレート (Costar、カタロ

グ番号 3799)

- 2) 滅菌済の遠沈管、ピペットチップおよびピペット (CostarあるいはFalconなど)
- 3) セルカウンター (日本光電、MEK-5254)
- 4) CO<sub>2</sub>インキュベーター (ヤマト科学、IT-63)
- 5) ガンマカウンター (Packard、COBRA™)
- 6) 放射活性測定用チューブ (Nunc、カタログ番号 443990)
- 7) 遠心機 (日立工機、himac CF7D、RT3S3ローター)

### C. 実験操作手順

#### 1. 脾臓細胞 (エフェクター細胞) 浮遊液の調製

- 1) 脾臓ごとに別々に細胞浮遊液を調製する。
- 2) 脾臓をステンレスメッシュ上に載せ、ハサミで細切した後、HBSSを加えながらプラスチックシリンジの内筒のゴム部分を用いて軽く押しつぶし、20mlの単細胞浮遊液を得る。
- 3) 細胞浮遊液を50ml遠沈管に入れ、120 x gで5分間遠心する。
- 4) 上清を除いた後、3mlの赤血球溶解液を加えよく混和する。室温で約3分間静置後、120 x gで5分間遠心する。
- 5) 赤血球溶解液を完全に除くため、ペレットを20mlのHBSSで2回洗浄する (120 x g、5分間の遠心操作)。
- 6) セルカウンターあるいは血球計算盤を用いて細胞数をカウントし、培養液で細胞濃度を1×10<sup>7</sup>/mlに調製する。細胞塊がある場合にはナイロンメッシュ等を通した上で培養に用いる。

#### 2. YAC-1細胞 (標的細胞) 浮遊液の調製

- 1) YAC-1細胞は継代2~3日後の細胞を使用する。
- 2) 細胞液をフラスコから15ml遠沈管に移し、120 x gで5分間遠心する。
- 3) 上清を除いた後、10mlの培養液を加えよく混和し、セルカウンターあるいは血球計算盤を用いて細胞数をカウントし、培養液で細胞濃度を1×10<sup>7</sup>/mlに調製する。
- 4) 50mlの遠沈管に1×10<sup>7</sup>/mlに調製したYAC-1細胞浮遊液を1ml加え、さらに200μ (7.4MBq)のNa<sub>2</sub>Cr<sup>51</sup>O<sub>4</sub>を加えよく混和した後、CO<sub>2</sub>インキュベーター内 (5% CO<sub>2</sub>、37℃に設定) で1時間培養する。この間、約15分間隔で細胞浮遊液を軽く混和する。
- 5) 培養後、余剰のNa<sub>2</sub>Cr<sup>51</sup>O<sub>4</sub>を除くために40mlの

HBSSで細胞を3回洗浄する (120 x g、5分間の遠心操作)。

- 6) 最後に、培養液を10ml加え、細胞濃度を1×10<sup>6</sup>/mlに調製する。さらに、これを培養液で10倍に希釈し、1×10<sup>5</sup>/mlの細胞浮遊液を培養に用いる。

#### 3. 細胞培養

- 1) 96穴丸底マイクロプレートの各ウェルに1×10<sup>7</sup>/mlに調製した脾臓細胞浮遊液を100μ (ウェル1~3)、50μ (ウェル4~6)、25μ (ウェル7~9) ずつ加え、さらに培養液を50μ (ウェル4~6)、75μ (ウェル7~9)、100μ (ウェル10~12) ずつ加え、各ウェル内の液量を100μにする。これにより、ウェル1~3、4~6、7~9にはそれぞれ1×10<sup>6</sup>、5×10<sup>5</sup>、2.5×10<sup>5</sup>の脾臓細胞が加えられていることになる。
- 3) 次に、1×10<sup>5</sup>/mlに調製したYAC-1細胞浮遊液をウェル1~15に100μずつ加える (1×10<sup>4</sup>/ウェル)。
- 4) 最後に、ウェル13~15に0.1% NP-40を100μずつ加えた後、脾臓細胞とYAC-1細胞の接触を良くするために、マイクロプレートを150 x gで1分間遠心する。
- 5) CO<sub>2</sub>インキュベーター内 (5% CO<sub>2</sub>、37℃に設定) で4時間培養する。

#### 4. 放射活性測定

- 1) 培養後、マイクロプレートを300 x gで10分間遠心する。
- 2) 各ウェルから100μの上清を放射活性測定用チューブに回収し、ガンマカウンターを用いて各サンプルにつき1分間放射活性を測定する。

### D. データ処理

1. 脾臓細胞とYAC-1細胞を加えたサンプル (ウェル1~3、4~6、7~9) を実験遊離値、YAC-1細胞に培養液のみを加えたサンプル (ウェル10~12) を自然遊離値、YAC-1細胞に0.1% NP-40を加えたサンプル (ウェル13~15) を最大遊離値とし、3ウェルの平均値を用いて、以下の式より%細胞障害性を算出する。

$$1. \text{NK細胞活性 (\%細胞障害性)} = (\text{実験遊離値} - \text{自然遊離値}) \div (\text{最大遊離値} - \text{自然遊離値}) \times 100$$

3. ウェル1~3、4~6、7~9の成績は、エフェクター細胞と標的細胞の比率 (E:T) が100:1、

50:1、25:1の場合のNK細胞活性として表される。

4. 必要に応じて、各E:T比と%細胞障害性との間で回帰分析を行い、任意の細胞障害性（例えば15%）として定義づけられる1 lytic unit (LU<sub>15%</sub>)に必要なエフェクター細胞数を求める。

#### E. 留意事項

1. <sup>51</sup>Crの半減期は比較的短く約28日であるので、Na<sub>2</sub>Cr<sup>51</sup>O<sub>4</sub>は実験の日程が決まってから購入する。
2. 最大遊離値を求めるために、0.1% NP-40の代わりに2M HClを使う研究者もいる。
3. 我々の経験では、SD系雌ラット（約10週齢）の脾臓細胞のNK細胞活性をYAC-1細胞を標的細胞に用いて測定した場合には、E:T比がそれぞれ100:1、50:1、25:1の条件で27~39%、14~25%、7.5~14.5%の細胞障害性を示した。
4. 我々の経験では、免疫毒性試験の際に陽性対照物質として広く用いられているサイクロフォスファミドをSD系雌ラット（投与開始時6週齢）に9mg/kgで28日間連続強制経口投与した場合に、サイクロフォスファミド投与群では対照（溶媒投与群）に比べて約70%の%細胞障害性の低下を示した。

#### F. 参考文献

1. US EPA OPPTS (1997) Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Final Rule. Fed. Reg., 62(158), 43820-43864, Aug. 15, 1997; 40 CFR 799.9780.
2. US EPA OPPTS (1998) Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.7800 Immunotoxicity. EPA Pub. No. 712-C-98-351

### ②ラットにおけるインビボ抗SRBC抗体産生（スライドグラスを用いるPFCアッセイ）

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

Jerneらによるplaque forming cell assay (PFCアッセイ)は、抗体を産生している細胞の数を溶血斑として計数する方法として、免疫学において広く用いられている<sup>1,2)</sup>。この方法には多くの変法が報告されており<sup>3,12)</sup>、マウスを用いるPFCアッセイに関しては、

非常に多数の報告がなされている。ここでは、比較的報告例が少ない、ラットを用いてインビボ抗体(IgMクラス)産生能を試験する場合の例を紹介したい。なお、本法では、多数の被験細胞のPFCアッセイが、比較的容易であるスライド法<sup>5,9,10,11)</sup>を用いているが、通常のディッシュを用いる方法<sup>2,9,10,12)</sup>によっても良い。

#### B. 実験材料等

##### 1. ヒツジ赤血球 (SRBC)

SRBCのロットによりPFC数が異なる場合があるので、C.方法に従って、1ロット当たり3匹程度の正常動物を用いて免疫してPFCアッセイを行い、SRBCのロット検定を行っておくことが望ましい。免疫とPFCアッセイには同じロットの血球を用いる。SRBCとしては、採血時にAlsever氏液を添加した保存ヒツジ赤血球が市販されている。採血及び保存状態にもよるが、通常、採血後1ヶ月は使用可能であることが多い。購入後、遠心管に無菌的に分注しておく。採血直後のものよりも、1週間以上後の方がPFCアッセイにはよいとされているが、古すぎるものは溶血しやすい<sup>10)</sup>。使用日に、Eagle's MEM (MEM)培地にて、4回の遠心(3000rpm、5~10min、4℃)により洗浄を行い(ポリスチレン製の遠心管は、小さな傷があると遠心により割れ易いので、注意を要する)、溶血が著しくないことを確認して用いる。免疫の際には、滅菌された培養液(下記)を洗いに用いる。PFCアッセイの前には、packed cells (100%)の状態として氷上に置いておき、直前に室温に戻すとよい。

##### 2. 培養液

筆者らは、炭酸ガスを使用しない通常のふらん器を使用しているため、1M NaOHを用いてpHを7.2に調整したEagle's MEM (2mM L-glutamine及びカナマイシン含有)(以下MEMと省略)を使用している。用いる培養液としては、通常免疫学で繁用される、RPMI-1640、Dulbecco's modified MEM等を用いてもよいが、より廉価であるMEMを用いて問題無い。炭酸ガス培養器を用いる場合には、培養液のbuffer系として必要な、重炭酸ナトリウム(さらに、10mM程度のHEPESバッファーを添加した方がよい)を代わりに添加する必要がある。PFCアッセイに用いる培養液は、必ずしも無菌的である必要はないが、用時調製するか、凍結保存5X濃縮液を使用時に希釈して用いることが望まれる。

### 3. 1% agarose (SeaPlaque)

用いるagarまたはagaroseに関しては、種々の処方<sup>9,10,12)</sup>が知られているが、筆者らは、抗補体作用がなく、低融点であるため取扱いが便利なSeaPlaque agarose (FMC Co.) を単独で用いている。PFCアッセイの直前に上記MEMに加え、煮沸により（または電子レンジで）溶かし、45℃の水浴上に、ガラス試験管（16×125mm）に5mlずつ分注して置いておく。

### 4. モルモット補体

正常モルモット新鮮血より得られた血清を、ヒツジ赤血球で吸収したもの。市販の乾燥補体（デンカ生研社等の製品）を用いればよい。30-40倍希釈（希釈度は予め確認しておく）のMEM溶液を使用直前に作製。

### 5. 2% FCS-MEM

2% (v/v) となるように、非働化したfetal calf serum (FCS) をMEMに加えたもの。脾臓細胞の調製に用いる。この濃度のFCSを用いる限り、脾臓細胞調製液から持ち込まれるFCSは、PFCアッセイの際に用いられる補体の活性を阻害しない。

### 6. 脾臓細胞調製用ディッシュ

ガラス（シリコン処理したものが望ましい）またはプラスチック（培養用の親水処理がされていないもの）のディッシュ（直径約6cm）を脾臓の数だけ用意し、各ディッシュに2% FCS-MEMを10mlずつ分注し氷冷しておく。

### 7. PFCアッセイ用スライドガラスのprecoating

スライドガラスには通常のプロスト付きで洗浄済みのもの（26×76mm；15mm-プロスト）を用いる。煮沸により溶解した0.2% agarose（通常の電気泳動用グレードのagaroseでもよい）水溶液にスライドガラス透明部分を浸し、よくagarose液を切った後、風乾して、保存する（よく乾燥してあれば、少なくとも、室温で2-3ヶ月は保存できる）。この操作は、スライドガラス表面にagaroseの薄膜を被覆しておき、PFCアッセイの際に載せたagaroseが固化した後、離れないようにするために行う。アッセイの前に、下記のトレイに必要な数のスライドガラスを予め並べ、プロスト部分に番号を記しておく。

### 8. スライドガラス用のトレイ

文献5、9、10、11に従って、専用のプラスチック製のトレイを、必要数、用意する。業者に注文してもよいが、アクリル板を有機溶剤で貼り合わせて、自作することも簡単にできる。文献5、9、10のト

レイは1連のものであるが、文献11の2連のものが使いやすい。

### 9. その他

免疫に用いるディスプレイ注射筒及び注射針、解剖用具、水浴（45℃）、ふらん器（または、炭酸ガス培養器）（37℃）、agarose溶解のための電子レンジまたは煮沸用器具（ガラス三角フラスコ、ガラスパーナー、セラミック付き金網、ピーカー）、ガラスまたはプラスチック試験管（有核細胞数計数、agarose/脾臓細胞の混和等に用いる）、試験管用ラック、メラングジュール（白）、血球計算板、colony counter（最も簡便なものとしては、セクスイ製のペン型プラークカウンターがある）、メスピペット、駒込ピペット、マイクロピペット及びチップ等が必要とされる。

## C. 実験操作手順

### 1. 免疫

PFCアッセイを行う4日前に、無菌的に調製した1% SRBC 1ml（約 $2 \times 10^8$ ）をラット尾静脈より、投与する。28日間反復経口投与の場合には、25日目に免疫し、29日目にPFCアッセイという日程となる。各群8匹以上使用することが望ましい。

### 2. 脾臓細胞調製

- 1) 免疫後、4日目に、必要な測定（体重等）を行った後、エーテル麻酔下、脱頸、開腹後、脾臓を摘出する。附着している脂肪組織があれば取り除き、必要に応じて、脾臓重量を測定する。
- 2) 摘出した脾臓を氷冷した2% FCS-MEM（10ml）をいれたディッシュに（脾臓毎に別のディッシュに）移す。
- 3) 脾臓をピンセット（眼科用の先曲がりのものが使いやすい）2本で、大きな塊が無くなるまでほぐす。別法としては、ステンレスメッシュを通す方法や、フロスト付きスライドガラスを2枚用いて、フロスト部分で脾臓を挟んでつぶす様にしてほぐす方法もある。
- 4) 脾臓細胞を15mlプラスチック遠沈管に移す。1分放置後、cell debrisを吸い上げないように注意して細胞液だけを吸い上げ、別の遠沈管に移す。cell debrisに約5mlの2% FCS-MEMを加え混ぜた後、同じ操作を行い上清をまとめる。別法としては、ナイロンメッシュを通して、cell debrisを除いてもよい。この脾臓細胞液を遠心（4℃、1500rpm、5min）する。



5) cell pelletを、遠心により洗った後、10mlの2% FCS-MEMに懸濁する(大体 $3 \times 10^7$ /ml程度の有核細胞密度となる)。10倍希釈の細胞液を製作する。必要に応じて(ロット検定の結果に応じて)、その20倍または40倍希釈の細胞液を製作する場合もある。有核細胞の計数には、9倍量のTurk液(0.01% gentiana violet-3% acetic acid)を加えて(メランジュールを用いてもよい)、血球計算板を用いて行う。この計数は、下記の3.3)及び4)行程の間に行うことができる。

### 3. PFCアッセイ

1) 1% agarose 5 mlに対し、ヒツジ赤血球0.2ml (packed cells)を加え、4% SRBC-agarose液とし、45°Cの水浴にもどす。このSRBC-agarose液は、必要量を一度に作らず、時間をずらして製作する方がよい。

2) 脾臓細胞液0.1mlを試験管(Falcon #2008または10×75mmディスプレイガラスチューブ)が使い易い)にとり、上記SRBC-agarose液0.5mlを加え、vortex mixerを用いてよく混ぜて、スライドガラスの透明部の上に、試験管を逆さまにしたまま動かして、均一の厚さになるようにまく。気泡がある場合には、注射針、パストールピペット等で、はじかせる。脾臓細胞液(0.1ml)を試験管に移す際には、一度に数検体にとどめ、多数の検体を同時に移さない方がよい(抗体産生細胞はガラス壁等に付着しやすい傾向があるため)。agaroseが固化したら直ちに、スライドガラスを、裏向けて、agarose部分が下になるようにする。1検体当たり、スライドガラス2枚以上を使用する。予備のトレイを覆いの代わりに用いるとよい。

3) 37°Cで、90分のincubationを行なう。

4) 希釈した補体を、トレイとスライドガラスの隙間に加え、気泡を除いた後、37°Cで、再び90分、incubationを行なう。

5) PFCの計数を行なう。colony counter等を利用して、plaque数を、2時間以内に計数する。スライドガラス当たりのPFC数及び有核細胞数より、計算により、 $10^6$ 脾臓細胞当たりのPFC数並びに脾臓当たりのPFC数を求める。colony counterが無い場合には、light boxの上で、先の細いマジックペン(水性)を用いて、スライドガラスのagaroseのない面から、溶血斑に点を打

ちながら計数してゆく。通常、スライドガラス当たりのPFC数が200を超さないよう、脾臓細胞を希釈することが望ましい。スライドガラス当たりのPFC数が300を超える場合には、計数が不正確となるので、脾臓細胞の希釈を高める必要がある。

### D. 判定及び参考値

1. F344ラット(日本チャールスリバー)の場合、 $10^6$ 脾臓細胞当たり1000 PFCs前後の値が得られる。
2. 写真撮影用のlight boxや、X線フィルム観察用のシャーカッセン等を用いてスライドガラスをみると、通常の溶血斑(plaque)は、肉眼できれいに識別できる。対照群の検体でplaqueの径が非常に小さい場合には、方法上の問題があると考えた方がよい。

### E. 留意事項

1. 免疫法としては、腹腔内投与の方が初心者には容易であるが、より高いPFC数を一定して得るためには、習熟者による静脈内投与が望ましい。
2. 購入したSRBCが、溶血しやすい場合には、MEMよりもRPMI-1640を用いた方がよい場合を経験している。
3. スライドガラスを用いる方法の原理は、原報のものと全く同じであり、ディッシュの代わりにスライドガラスを使っている。ふらん器を用いる場合には、ふらん器内の空気が対流するタイプが望ましい。また、agaroseのゲルが乾燥しないように、ふらん器内の湿度をほぼ100%に保つ必要がある(水を張ったバットをふらん器の底に置いておけば問題はない)。炭酸ガス培養器で、CO<sub>2</sub>を用いないことも可能である。炭酸ガス培養器を用いる場合には、通常湿度が100%であるので、湿度は問題とならないが、重炭酸ナトリウムのbuffer系を用いるため、agarose液のpH管理が難しいのが欠点となる。煮沸後のagaroseをアルカリでpHを調整したり、pH上昇を防ぐために、煮沸後のagarose水溶液に2倍濃度の加温培養液を加えることが行われている<sup>10,11)</sup>。
4. SeaPlaque agaroseの代わりとしては、通常、Bacto agar (Difco) にDEAE-dextranを添加して用いる<sup>10)</sup>。SeaPlaque agaroseの場合には、42°Cでもゲル化は起きないので、42°Cの水浴を用い

でもよい。

5. SRBCの洗いが不十分な時などには、非常に小さい偽のplaqueがでることがあるので、常に脾臓細胞無しの対照のスライドガラスを、トレイ当たり1枚用意しておくといよい。
6. 脾臓細胞の調製の際の脾臓のほぐし方が、脾臓毎に一定になるように習熟し、また、大きな細胞塊を持ち込まないことが重要である。C. 2. 3) 項で、脾臓をほぐす際に、ステンレスメッシュを用いる方法<sup>11)</sup>もあるが、脾臓の数だけ、メッシュを用意し、洗浄の後、サビがでないよう管理する必要がある。
7. 何らかの理由により、スライドガラスの保存を行いたい場合には、固定用の溶液により処理した後、保存することも可能である<sup>10,12)</sup>。
8. 長期の反復投与の後にPFCアッセイを行う場合には、失敗を避けるため、十分に事前の練習及び準備を行う必要がある。

#### F. 参考文献

1. Jerne, N.K. and Nordin, A.A. (1963) Plaque formation in agar by single antibody producing cells. *Science*, 140: 405.
2. Jerne, N.K., et al. (1963) The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells. In "Cell Bound Antibodies" (ed. by Amos, B. and Koprowski, H.), Wistar Institute Press, Philadelphia, pp.109-125.
3. Sterzl, J. and Riha, I. (1965) A localized haemolysis in gel method for the detection of cells producing 7S antibody. *Nature*, 208: 858-859.
4. Dresser, D.W. and Wortis, H.H. (1965) Use of an antiglobulin serum to detect cells producing antibody with low haemolytic efficiency. *Nature*, 208: 859-861.
5. Mishell, R.I. and Dutton, R.W. (1967) Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J. Exp. Med.*, 126: 423-442.
6. Cunningham, A.J. and Szenberg, A. (1968) Further improvements in plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology*, 14: 599-601.
7. Nossal, G.J.V. et al. (1970) In vitro technique of high sensitivity enabling access to the cells.

*J. Exp. Med.*, 131: 894-916

8. Kennedy, J.C. and Axelrad, M.A. (1971) An improved assay for haemolytic plaque-forming cells. *Immunology*, 20: 253-257.
9. Dresser, D.W. and Greaves, M.F. (1973) Assays for antibody-producing cells. In "Handbook of Experimental Immunology (2nd ed.)", ed. by Weir, D.M., Blackwell Scientific Publ., Oxford, pp.27.1-27.29
10. Jerne, N.K., et al. (1976) Section 26.D. Plaque techniques for recognizing individual antibody-forming cells. In "Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol.5 Antigen-Antibody Reactions in Vivo", ed. by Williams, C.A. and Chase, M.W., Academic Press, New York, pp.335-370.
11. Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H. (1977) *Methods in Immunology* (3rd ed.), W.A. Benjamin, Inc, pp.411-442.
12. 岸本進 (1971) JerneのAntibody Plaque法およびCunninghamの方法. 免疫実験操作法I、日本免疫学会編、pp.123-127 (免疫実験操作法A、p.479-483に相当)。

### ③ラットにおけるリンパ系器官・組織(胸腺、脾臓、リンパ節)の病理組織学的検査

守田 禎一

富山化学工業株式会社  
総合研究所 安全性研究所

佐藤 則博

旭化成工業株式会社

ライフサイエンス総合研究所 安全性研究所

及川 寿浩

鳥居薬品株式会社

学術本部 安全情報管理室

#### A. 解説

化合物の免疫系に与える影響を評価する上で、リンパ系器官・組織の病理組織学的検査の重要度は高い。病理組織学的検査を行う場合、通常は剖検時に採取した器官・組織をホルマリンで固定し、パラフィン包埋及び薄切の過程を経て作製したパラフィン切片を用いる。この切片にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施して、光学顕微鏡下で観察を行う。本プロトコールでは、組織学研究の代表的手法

であるパラフィン切片作製法とH E染色法について紹介するとともに、ラットのリンパ系器官・組織（胸腺、脾臓、リンパ節）の正常組織像について述べる。

## B. 実験材料等

### 1. 試薬および調製方法

#### 1) ヘマトキシリン染色液

ヘマトキシリンは主に細胞核、軟骨などを青紫色に染色し、塩基性色素と呼ばれている。調製方法により数種類のヘマトキシリン液があり、それぞれ染色方法も若干異なるが、この中でも最も代表的なマイヤーのヘマトキシリン液について以下に示す。

##### (1) マイヤーのヘマトキシリン液

ヘマトキシリン	1.0 g
ヨウ素酸ナトリウム	0.2 g
カリウムミョウバン	50 g
抱水クロラール	50 g
結晶性クエン酸(1水和物)	1.0 g

蒸留水約100 mLにヘマトキシリンを加え、加温しながら攪拌・溶解する。完全に溶解したらただちに蒸留水約300 mLを加えて速やかに液温を下げ、ただちにヨウ素酸ナトリウムを加えて攪拌・溶解する。蒸留水約300 mLを加えた後、細かく粉碎したカリウムミョウバンを加えて攪拌・溶解する。カリウムミョウバンおよび抱水クロラールを一度に全量加え、速やかに攪拌・溶解する。蒸留水を加えて全量を1000 mLにメスアップする。

#### 2) エオジン染色液

エオジンは細胞質、結合組織などを紅～赤紅色に染色する代表的な酸性色素であり、やはり数種類のエオジン液があるが、代表例としてエオジン・アルコール液について以下に示す。

##### エオジン・アルコール液

80%アルコール	300 mL
0.2%酢酸水	100 mL
エオジン Y (G)	1.0 g

エオジン Y を酢酸水に溶解し、80%アルコールを混合する。

## C. 実験方法

### 1. パラフィン切片の作製および染色方法

#### 1) 材料採取・固定

解剖時に臓器を摘出した後、速やかに10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、振盪しながら約1週間固定する。この際、固定液の浸透をよくするため、予め臓器に1～2箇所剃刀で断面を入れておく。

#### 2) 脱水・包埋

固定組織を水洗してホルマリンを除去した後、80～100%の上昇エタノール系列に順次浸漬して脱水を行い、続いて組織をキシロールに移してエタノールを置換する。組織を融解したパラフィン(58～60℃)に浸漬してパラフィンを組織に十分浸透させた後、これを冷やしてパラフィンを固化し、パラフィン内に組織が包埋されたブロックを作製する。

#### 3) 薄切

ミクロトームを用いてパラフィンブロックを4 $\mu$ mの厚さに薄切し、得られた切片を約50℃の湯に浮かせて皺をよく伸展させた後、スライドガラスに拾い取り、乾燥させて切片をスライドガラスに密着させる。

#### 4) H E染色

以下にマイヤーのH E染色を例示する。

##### (1) 脱パラフィン

上記の標本をキシロール槽に入れてパラフィンを除去した後、100～70%の下降エタノール系列に順次移して徐々に水に馴染ませ、最後に流水中で水洗する。

##### (2) 染色

水洗後の標本をマイヤーのヘマトキシリン液に3～5分間入れた後、10～20分間、流水中で水洗して調色・色出しを行う。続いてエオジン液に2～4分間入れた後、蒸留水槽で1～2秒間余分なエオジン液を洗い流し、直ちに70～100%の上昇エタノール系列を通してエオジンを脱色・分別しながら脱水を行う。

##### (3) 透徹・封入

十分に脱水された標本をキシロール槽に入れてエタノールを除去し、標本を透明に(透徹)した後、封入剤(ビオライトなど)を標本上に滴下し、標本上の切片を覆うようにカバーガラスを被せて封入する。

## D. ラットのリンパ系器官・組織の正常組織像

### 1. 胸腺 thymus

胸腺は小葉lobule (L) に分かれたリンパ器官で、

胸腺へ出入りする血管を含む結合組織性の被膜capsuleに被われている。血管を含む線維性中隔が被膜から胸腺実質に放散する。被膜と血管の間は基底膜により区分され、抗原を含めた血中成分が胸腺へ入ることを防止する血液胸腺関門blood-thymus barrierを形成している。小葉は、外側部の皮質cortex (C) と内側部の髄質medulla (M) の2層から構築されている (Photo ①, ②)。

皮質では未熟なTリンパ球が密集して活発に増殖しており、皮質上皮細胞cortical epithelial cellの突起がこの間を埋め、大食細胞macrophageが点在している。皮質外層のリンパ球は有糸分裂mitosisにより増え、髄質の方へ押しやられるにつれ小型となる。胸腺皮質でつくられる莫大なリンパ球のうち、大多数は胸腺皮質中で死ぬ。

髄質には上皮性網工がよく発達しており、皮質に比べてリンパ球は少ない。また、髄質には髄質上皮細胞medullary epithelial cellが変性してできたハッサル小体と呼ばれる同心円層板状構造物が含まれる。成熟Tリンパ球は、髄質部の毛細血管後細静脈を経て循環系へ入る。

## 2. 脾臓 spleen

脾臓の表面は薄い結合組織性の被膜capsuleで被われており、実質内に被膜より脾柱trabeculaeが突出し、構造の保持を行っている。脾臓の実質は脾髄であり、リンパ組織である白脾髄white pulp (W) と細網性血液流床である赤脾髄red pulp (R) から成る (Photo ③)。

白脾髄は、中心動脈central arteryを鞘状に囲んで発達したリンパ系組織で、リンパ小節lymph nodule (LN) と動脈周囲リンパ鞘periarterial lymphoid sheath (PALS) からなる (Photo ④)。リンパ小節は、動脈周囲リンパ鞘に連続したBリンパ球主体の結節状リンパ組織で、胚中心germinal centerをみることもある。動脈周囲リンパ鞘は胸腺依存性領域であり、多数のTリンパ球が集まって形成されている。

白脾髄と赤脾髄の境界には辺縁帯marginal zone (MZ) と呼ばれる帯状領域が認められる。辺縁帯は、マクロファージ、TおよびBリンパ球の間の免疫学的情報交換の場として注目されている。辺縁帯と動脈周囲リンパ鞘の間には薄い網状板reticular laminaがあり、両者を区画している。

赤脾髄は特殊な壁構造を持つ毛細血管である脾洞splenic sinusとその隙間を埋める細網組織である脾索splenic cordからなる。脾索は、多数のマクロファージが旺盛な貪食により異物処理を行う場と考えられ

ており、その他に赤血球、顆粒白血球、リンパ球なども認められる。

脾門部から脾内に入った脾動脈の分枝は、被膜から連続して脾柱の中を走り、中心動脈として白脾髄を貫くとともに、枝分かれして一部はリンパ小節とその周辺に分布し、大部分は筆毛動脈として脾索中に入り、辺縁帯及び脾索の毛細血管からの血液は最終的には脾洞に流入する。一方、脾静脈は脾洞の末端から連続して始まり、合流しながら脾柱や被膜内を走り、脾門部に達している。

## 3. リンパ節 lymph node

リンパ節は結合組織の被膜capsuleで被われ、この被膜から小柱trabeculaがリンパ節実質へ入り込む。輸入リンパ管afferent lymphatic vesselはリンパ節の外部で分岐し、被膜をぬけ辺縁洞subcapsular sinus (S) と呼ばれる狭い部分に注ぐ。辺縁洞から出るリンパ液は吻合・分枝を繰り返す髄洞medullary sinusを経て1ないし数本の輸出リンパ管efferent lymphatic vesselの出る門へ注ぐ (Photo ⑤, ⑥)。

皮質cortex (C) では、リンパ球が多数集合しリンパ小節lymph nodule (LN) を形成する。リンパ小節は主にBリンパ球の貯蔵と増殖の場となる。抗原刺激を受けたBリンパ球は、リンパ小節の中心部、胚中心germinal center (G) 内で増殖するため、有糸分裂像mitosisをみることも多い。リンパ小節周囲の傍皮質paracortex (PC) と呼ばれる領域には、主にTリンパ球が分布する。Tリンパ球は毛細血管後細静脈postcapillary venule (PCV) からリンパ節へ入り、輸出リンパ管よりリンパ節を出る。

髄質medulla (M) 部には髄索medullary cordと髄洞がみられ、髄索にはBリンパ球及び形質細胞plasma cellをみることができる。

## E. 留意事項

### 1. パラフィン切片の作製および染色方法

- 1) 標本は、脱パラフィンから封入までの各行程において乾燥させないようにする。
- 2) 固定組織の脱水・包埋、標本の脱パラフィン、脱水・透徹に用いるエタノール系列およびキシロール槽は使用状況に応じて適時新しいものと交換する。
- 3) ヘマトキシリンおよびエオジンの染色時間は、染色液の使用頻度や組織の固定条件等によって異なるため、日常の染色作業あるいは試し染色により標準的な染色時間の目安を把握しておく。

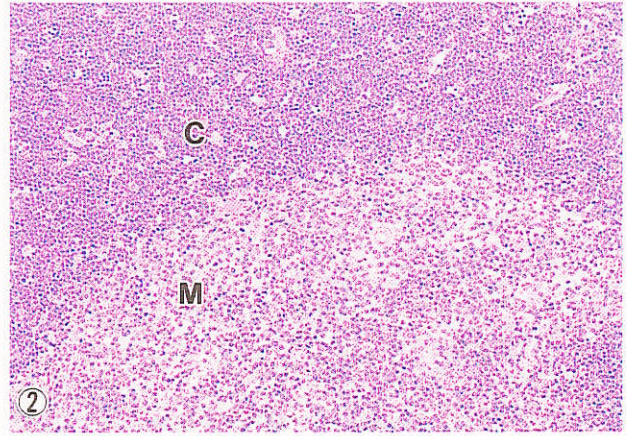
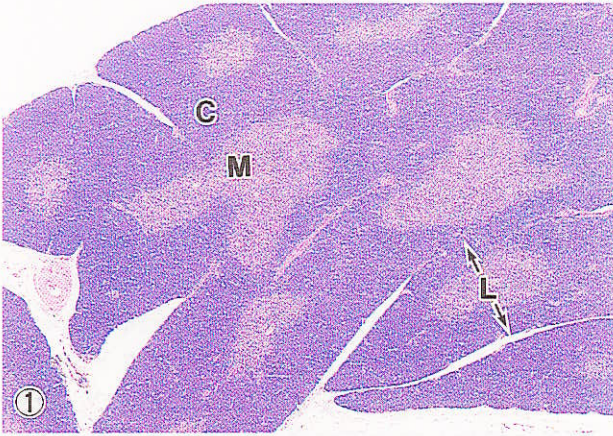


Photo ①,② 胸腺 thymus  
L:小葉 lobule, C:皮質 cortex, M:髄質 medulla

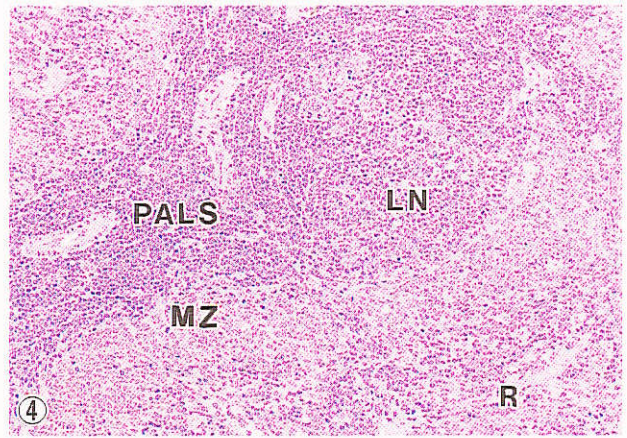
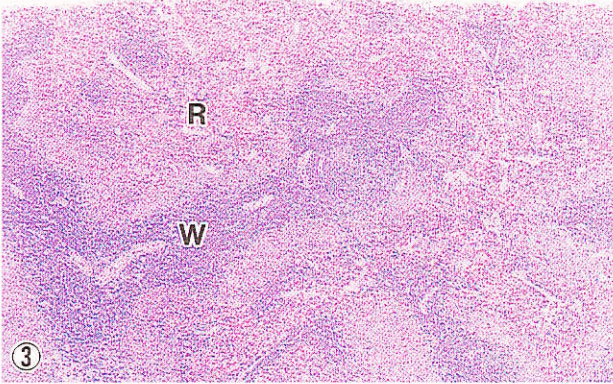


Photo ③,④ 脾臓 spleen  
W:白脾髄 white pulp, R:赤脾髄 red pulp, LN:リンパ小節 lymph nodule,  
PALS:動脈周囲リンパ鞘 periarterial lymphoid sheath, MZ:辺縁帯 marginal zone

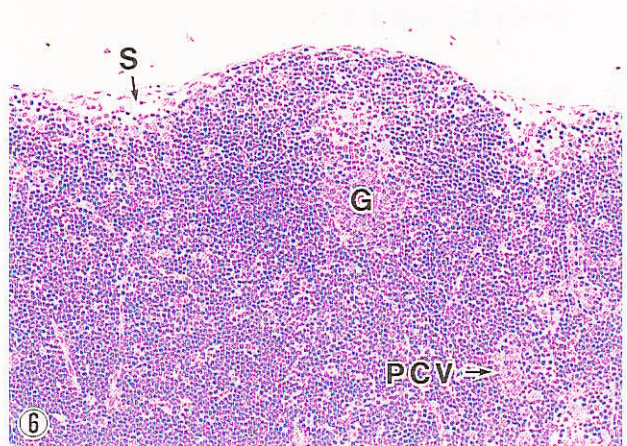
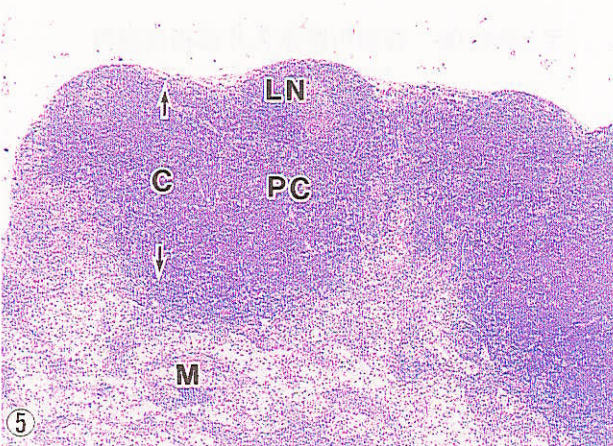


Photo ⑤,⑥ 腸間膜リンパ節 mesenteric lymph node  
C:皮質 cortex, PC:傍皮質 paracortex, M:髄質 medulla  
LN:リンパ小節 lymph nodule, G:胚中心 germinal center,  
S:辺縁洞 subcapsular sinus, PCV:毛細血管後細静脈 postcapillary venule

(動物: Crj:CD(SD)IGSラット、9週齢)

## 2. 組織標本の観察

## 1) 胸腺

(1) 胸腺皮質において、自己抗原を認識するリンパ球はアポトーシスapoptosisによって除外される。アポトーシスに陥った細胞は、組織学的には核の濃染像あるいは核の断片化像としてみることができる。

(2) ラットでは、ヒトやイヌに比べハッサル小体は不明瞭である。

## 2) 脾臓

(1) リンパ小節はリンパ濾胞lymphoid follicleとも呼ばれる。

(2) 通常の固定方法による組織切片では、赤脾髄は赤血球で充満し(赤血球の大部分は脾洞内にあるが、脾索にもまた存在する)、かつ組織全体が収縮しているため、脾洞の輪郭を認めることは難しい。動脈からの灌流固定により、脾洞の形態が明瞭な標本を得ることができる。

(3) 毛細血管末端の構造、脾洞との直接的な連絡の有無、脾索-脾洞間の血流の方向や様式など、脾臓の血液動態については古くから議論のあるところであり、今なお意見の完全な一致は得られていない。

## 3) リンパ節

(1) 傍皮質は深皮質deep cortexあるいは傍皮質帯paracortical zoneとも呼ばれる。

(2) 抗原刺激を受けたBリンパ球は形質細胞plasma cellへ分化・成熟し、流出するリンパ液中へ抗体を分泌する。

## F. 参考資料

1. 齋藤 誠 他.(1990): 染色法のすべて(月刊Medical Technology別冊). 医歯薬出版
2. 藤田尚男、藤田恒夫(1989): 標準組織学総論(第3版). 医学書院
3. 伊東信行(1988): カラーアトラス実験動物組織学. ソフトサイエンス社
4. Boorman, G. A. et al(eds.) (1990): Pathology of the Fischer Rat. Academic press Inc.
5. 飯島宗一 他編(1987): 現代病理学大系18B. 中山書店
6. Wheater, P. R. et al (1992): 機能を中心とした図説組織学(第2版). (山田英智 監訳)、医学書院

## 編集後記

前回より、「免疫毒性試験プロトコル」のコーナーを設け、免疫毒性試験プロトコルを掲載し始めました。今回は、ラットを用いる試験法の追加分として3編のプロトコルを掲載させて頂きました。次回は、アレルギー性試験法を中心にプロトコルを掲載する予定です。これからも、継続的にプロトコルを掲載し、ある程度まとまった段階で、小冊子に編集し直す予定でおります。プロトコ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。生体防御系は、免疫系を中心として神経・内分泌系との連携により巧みに制御されていると考えられています。免疫毒性研究についても角度の変わった取り組みが求められています。2000年を迎え、ImmunoTox Letterへの多くの会員の皆様からの原稿を募集いたします。(澤田純一・藤巻秀和記)

## 編集・発行：免疫毒性研究会

発行日：平成11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、  
澤田 純一、牧 栄二、  
藤巻 秀和

原稿送付先：fujimaki@nies.go.jp

