

# ImmunoTox Letter

免疫毒性研究会：The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 5 No. 1 (通巻9号)2000

## 目次

### 第6回免疫毒性研究会の報告

東北大学大学院医学系研究科病理学講座 名倉 宏

### 第7回免疫毒性研究会予告(2)

#### 免疫毒性学という学問体系の構築を目指して

静岡県立大学 食品栄養科学部 公衆衛生学研究室  
大学院 生活健康科学研究科 生体衛生学研究室 荒川 泰昭

#### 珪肺症患者にみられる自己抗体

##### — アポトーシスの抑制とT cell活性化の役割

川崎医科大学 衛生学 植木 絢子  
急性薬物性肝障害モデルの免疫毒性学的再検証—  
サイトカイン介在性について

昭和薬科大学衛生化学研究室 北條博史

### 「免疫毒性試験プロトコル」第3回

#### モルモットMaximization Test

(財)食品薬品安全センター-秦野研究所 安全性試験室 金澤 由基子

#### Local Lymph Node Assay

株式会社資生堂 基礎研究センター-薬劑開発研究所 畑尾 正人

#### マウスを用いるPopliteal Lymph Node Assay (PLNA)

三共株式会社 安全性研究所 間 哲生, 木村 努

## 第7回免疫毒性研究会予告(2)

日時：平成12年9月25日(月)、26日(火)

会場：千葉大学構内 けやき会館大ホール他  
千葉市稲毛区弥生町1-33

主催：免疫毒性研究会

協賛：日本トキシコロジー学会

実行委員長：上田志朗

(千葉大学大学院薬学研究科医薬品情報学教授)

主要テーマ：『免疫毒性の基礎から臨床へ』

招待講演：Steven Holladay, Associate Professor,  
Anatomy and Toxicology  
College of Veterinary Medicine, Virginia  
Polytechnic Institute

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)

皮膚、肝臓、血液、腎臓、呼吸器等

その他特別講演、ワークショップ、一般演題

### <一般演題>

#### 一般演題申し込み：

申し込み締め切りは7月15日(土曜日)

抄録用紙等は会員の方には5月中旬に発送  
いたします。

また、非会員の方は下記事務局に  
FAX, TEL等にて御請求ください。

#### 参加費

会 員：事前登録 3,000円(当日4,000円)

非会員：事前登録 6,000円(当日7,000円)

懇親会：事前登録 5,000円(当日6,000円)

予約参加申し込み方法(申込期限は8月31日(木)  
ですが送金先等は事務局にお問い合わせください。

#### 問い合わせ先：事務局

〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町1-33

千葉大学大学院薬学研究科医薬品情報学教室

佐藤紀子、大谷まど香、渡部さえ子、上田志朗

TEL：043-290-2996 または 3022 (ダイヤルイン)

FAX：043-290-2996 または 3022

振込み先：千葉緑町郵便局 No. 00190-6-196066

第7回免疫毒性研究会

## 第6回 免疫毒性研究会の報告

名倉 宏

東北大学大学院医学系研究科病理学講座

第6回免疫毒性研究会を、『免疫毒性と内分泌』  
を主要テーマとして、1999年9月20、21日に仙台  
市で開催した。仙台という地理的条件にもかかわらず、  
120人以上の参加者と21題の一般演題が寄せられ、  
当初の目的が達せられた。

主要テーマにあわせ、招待講演に英国Edinburgh  
大学のJ. Ian Mason教授による“The role of the  
cytochrome P450 and steroid dehydrogenase gene  
families in steroid metabolism and action”, 特別講  
演に東北大学の笹野公伸教授による“Endocrinology  
からIntracrinologyへ”が行われ、この分野にお  
ける最新の情報が紹介された。免疫機能の攪乱を  
起こす毒性物質群の多くがステロイ

ド作用を有する事から、会員に今後の研究に重要な指針を提供するとともに、大きな感銘を与えた。

国立環境研究所の藤巻秀和先生と帝京大学の沢基保先生によるシンポジウム『Th1/Th2パラダイム』、国立医薬品食品衛生研究所の澤田純一先生とヤンセン協和(株)の牧栄二先生によるワークショップ『アレルギー性の予知試験』では、免疫毒性の分野でのこれらの今日的課題について、それぞれの分野での第一線で活躍している研究者を中心に最先端の研究成果と技術の進歩が話され、活発な討論が行われた。

免疫毒性学は、さまざまな化学物質がヒトや動物の免疫系を介しその諸機能や形態に障害作用を示す機序を解明する学問領域であるが、それはいうまでもなく、医薬品や食品の安全性の検証のために最も重要な領域である。さらに今日では、我々を取り巻く環境汚染物質と健康問題とも密接な係わりを有する事が注目されている。しかも、その免疫系への直接作用ばかりでなく、神経内分泌系を介しての免疫系への作用機序も解明されつつあり、『免疫系の神経内分泌制御』も免疫毒性研究の重要なキーワードであることを、仙台の研究会で十分理解していただけたものと思う。

最後に、この第6回研究会開催に当たり、全面的に御支援頂きました免疫毒性研究会運営委員会の先生方、及び当日研究会運営に従事してくれました笹野公伸教授はじめ東北大学病理学講座のメンバーに心から感謝申し上げたい。

## 免疫毒性学という学問体系の構築を目指して 荒川 泰昭

静岡県立大学 食品栄養科学部 公衆衛生学研究室  
大学院 生活健康科学研究科 生体衛生学研究室

今から25年ほど前になるだろうか、東京大学医学部衛生学教室に在任し始めた頃より、これからの予防医学は後追い対策ではなく前向き対策が必要であり、健康障害要因を検索、評価する手法としての毒性学も従来からの大量・短期暴露でのLD<sub>50</sub>レベルの一般急性毒性学的評価ではなく、微量・長期暴露での慢性毒性学的評価が必要であることを感じ始めた。とくに免疫系では化学物質過敏症、花粉症、アトピー性皮膚炎などの発症要因が、また脳神経系ではパーキンソン氏病、アルツハイマ

ー病などの発症要因が環境化学物質の微量・長期暴露(潜行型環境汚染)によるものではないかと疑われた。そこで、毒性学の領域に免疫学的評価や脳神経学的評価を取り入れた免疫毒性学や脳神経毒性学なる学問体系を構築出来ないかと考え始めた。当時、社会医学領域ではメチル水銀の水俣病、カドミウムのイタイイタイ病、ガソリン・アンチノック剤の四エチル鉛障害、それに森永砒素ミルク事件など、金属による環境汚染問題が主流であったため、とりあえず時流に合わせて微量元素あるいは金属の免疫毒性の研究から始めた。

猿まねが大嫌いな私は5-10年先に問題化する環境化学物質は何かと先取りを考え、自然界や食物連鎖を通して安定に残存し得る物質として酸素、炭酸ガス、水などに対して安定な物質をポーリングの電気陰性度などを駆使して選出し、さらに産業界において水銀、鉛に替わって頻用され得る物質を重ね合わせて、有機錫を取り挙げた。海外から2年がかりで標準化合物を集め、ガスクロ、液クロで分析法を作り、有機錫の研究をスタートさせた。やがてその3年後には、この研究が有機錫の食品衛生上の問題点を懸念するWHO特別委員会や海洋汚染を問題視する米国商務省標準局(NBS)、米国海軍研究所、ロックフェラー大学などからの招聘、講演、研究協力依頼などへと発展し、国際的規模の有機錫海洋汚染に関する研究の発端となった。そして、これがさらに国際海洋会議、国際有機錫シンポジウムなど種々の国際会議開催へと発展し、現在、この有機錫による海洋汚染は生態系の破壊からさらに環境ホルモン(内分泌攪乱化学物質)の問題へと発展(?)している。

また、時を同じくして手掛けた台湾政府要請のPCB中毒事件は現在のダイオキシンの問題へと発展し、5年間にわたる東京都(美濃部都知事)委託のプラスチック添加剤の安全性評価の研究は可塑剤、安定剤などにおいて、20年後の現在問題視されている環境ホルモンの全てを包含する結果となっている。

ここでは紙面の都合で、これまでの研究の中から微量元素あるいは金属の欠乏や過剰による免疫毒性や脳神経毒性の一端を紹介させていただく。すなわち、微量元素の欠乏症としては最も顕著な免疫不全や脳機能障害を誘発する亜鉛欠乏症を、また過剰症としては免疫毒性、中枢神経障害、そして最近では環境ホルモンとして内分泌攪乱など、

最も顕著で多彩な症状を誘発する有機錫中毒症を選び、亜鉛欠乏と有機錫暴露の免疫毒性ならびに脳神経毒性における症状発現が非常に類似していることに着目し、その類似症状発現の接点を考察する。

免疫系においては、亜鉛欠乏は主としてT細胞の数の減少や機能の抑制を誘発し、T細胞依存性の免疫能を低下させる。しかも、この亜鉛欠乏による免疫不全の特徴は胸腺ならびに胸腺依存性リンパ組織の選択的萎縮とそれに伴う細胞性免疫の不全である。一方、ジブチル錫、ジオクチル錫などのジアルキル錫や、トリブチル錫、トリフェニル錫、トリシクロヘキシル錫などのトリアルキル錫も重篤な免疫障害を誘発する。とくにジブチル錫やジオクチル錫は胸腺ならびに胸腺依存性部位を選択的に萎縮させ、T細胞依存性の免疫機能を抑制する。この抑制作用の強さはジブチル錫、ジオクチル錫>トリブチル錫>トリフェニル錫の順であり、かつこの作用はこれら物質がもつ他の酸化リン酸化反応の抑制や脳浮腫よりも鋭敏である。両者の類似症状発現の接点はその発症要因の共通点から推察して、胸腺萎縮に関してはT-リンパ球の(1)リン脂質代謝系の阻害(有機錫の場合は核ではなく、ゴルジ体や小胞体領域への集積による)、(2)DNA合成阻害、(3)細胞増殖抑制、(4)細胞死による萎縮などが考えられ、また免疫機能の低下に関しては胸腺萎縮というT-リンパ球の量的異常と(5)亜鉛を活性中心とする胸腺ホルモンの活性低下などによる胸腺におけるT-リンパ球の分化、成熟過程の異常(質的異常)による免疫応答系の混乱が考えられる。

脳神経系においては、亜鉛欠乏は記憶学習障害や嗅覚障害などを誘発する。また、トリメチル錫、トリエチル錫、トリブチル錫などのトリアルキル錫暴露においても同様に記憶学習障害や嗅覚障害などを誘発する。これらの症状の併発はまさにアルツハイマー病の併発症状そのものであるが、亜鉛欠乏と有機錫暴露の両者の類似症状発現の接点はその発症要因の共通点から推察して、記憶学習障害に関しては海馬亜鉛の消失にある。すなわち、亜鉛欠乏あるいは有機錫暴露による(1)海馬のCA3, CA4領域の苔状線維(mossy fiber)・シナプス終末に多量に局在する亜鉛の欠乏あるいは消失、(2)亜鉛の消失によるカルシウムチャンネルの調節異常とそれに伴うカルシウムホメオス

タシスの崩壊(亜鉛はカルシウムチャンネルのモジュレーター)、(3)記憶学習システムの崩壊、(4)神経細胞死などが考えられる。また、嗅覚障害に関しては、嗅球、嗅上皮など嗅覚系における(1)副甲状腺ホルモン(PTH)の著増によるアデニルシクラーゼの活性化とそれに伴うcAMP過剰産生、(2)cAMPの過剰増大によるcAMP依存性カルシウムチャンネルの調節異常、(3)カルシウムチャンネルの調節異常に伴うカルシウムの過剰集積と、(4)それに伴う神経細胞(顆粒ニューロン)の死が共通要因として挙げられる。

また、胸腺が免疫系-内分泌系-神経系に相互に関与していることが考えられることから、有機錫招来の胸腺萎縮にみられる化学的胸腺摘出(chemical thymectomy)あるいは不全状態が免疫機能の障害ばかりでなく、神経、内分泌系に作用し、学習・記憶などの脳機能の障害の誘発や加齢促進、さらには個体老化の促進などを誘発することが示唆される。現在、この観点からも検討を加えているが、神経内分泌系への影響を示唆するいくつかの興味ある知見を得ている。

以上の例でも解かるように、元来、免疫毒性という概念は化学物質による免疫系への有害影響を研究する分野として構築されるべきものであろうが、これからの免疫毒性学は免疫領域だけからの把握では到底不十分であり、脳機能や内分泌の領域をも抱き込んで把握し、構築してゆかねばならないことを痛感する。そして、免疫修飾物質(immunomodulators)あるいは免疫関連反応物質(immune-interacting compounds)の免疫系への修飾を出来るだけ正確に把握するためには、それぞれの反応進行状態に合った、より特異的な検出法の選択が要求される。現在、ヒトならびに実験動物において種々の免疫能パラメーターが使用されているが、現在のところヒトにおいてそれぞれの免疫応答における進行状態を的確に、しかも特異的に把握できる試験法は未だ十分には確立されていない。従って、現状ではいくつかのパラメーターを組み合わせて施行してゆくことが必要であろう。そして、あくまでも免疫毒性(広義には免疫応答の修飾)評価は最終的にはヒトにおいて成されなければならないものであるから、動物からのデータは常にヒトへの外挿を念頭において評価されなければならない。そして、今後の課題として最も要求されることは新しい、より特異的な免疫

能パラメーターの開発とその確立である。そして、さらにそれぞれのパラメーターから産出されるデータを蓄積すると共に、これらのデータを解釈できる学問体系を確立してゆかねばならない。

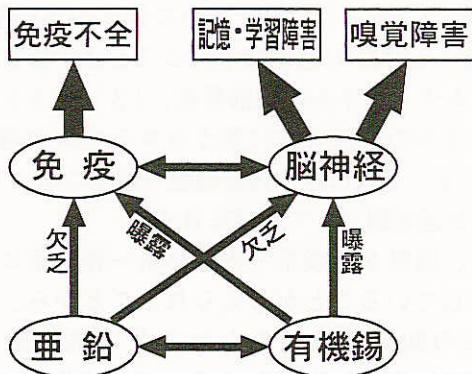


図 免疫ならびに脳神経の毒性発現にみる亜鉛欠乏と有機錫曝露の類似症状発現の接点

## 珪肺症患者にみられる自己抗体

### — アポトーシスの抑制とT cell活性化の役割

植木 絢子

川崎医科大学 衛生学

#### 1. はじめに

最近、Fas-Fas リガンド系を介するapoptosisの異常が自己免疫成立と深く結びついていることが判明した。私共は、珪酸および珪酸塩化合物曝露によって生じる自己免疫の成立機序について検討してきたが、珪肺症患者Fas-Fasリガンド系を介するアポトーシスが低下している可能性があること、珪酸および珪酸塩化合物が体内でリンパ球の活性化を反復している可能性が示唆されるので、これらについてまとめてみたい。

#### 2. FasとFasリガンド

多細胞生物が個有の制御機構の中に持っているプログラムが働いて起る死がapoptosisであり、Kerr & Wyllie らが、necrosisと異なる細胞死の概念として提唱したこと、apoptosisを誘導するシグナルの1つにFas-Fas リガンド系があることは周知の通りである。1989年米原らはヒトの線維芽細胞FS7の表面抗原を認識してFS7をはじめヒト細胞に細胞死を起すモノクローナル抗体を作り、抗Fas抗体と命名し、1991年長田らが Fas抗原のcDNAクロ

ーニングに成功した。一方、ドイツのTrauthらは、ヒト細胞にapoptosisを起す抗APO-1抗体を1989年に報告していたが、このAPO-1抗原がヒトFas抗原と同一であることが後に確認された。FasがTNF受容体ファミリーに属する分子であることから、特異的なリガンドの存在が予想されたが、1994年須田らが細胞障害性T細胞 (CTL)の細胞融解物からFasリガンド (FasL)の精製に成功した。FasLの細胞外領域は、TNFファミリーと相同性を示し、Fasに反応してapoptosisを誘導し、細胞内領域にはTNFファミリーとの相同性がなく機能が不明であったが、1999年 Bossi & Griffithsが、新しく合成されたFasLは細胞内ライソゾームの中に貯えられてから細胞膜表面に運ばれ、この際にFasLの細胞内領域が不可欠であることを報告している。

Fasが広範囲の細胞に分布しているのに対し、FasLは胸腺、脾臓、リンパ節などのリンパ組織および精巣と角膜で強く発現しており、後二者では、CTLによる破壊から自身の細胞を守るために働くと考えられている。Fas 遺伝子に変異があつてFasの mRNAが発現しない特殊なマウスである lpr マウスでは、生後数ヶ月してからCD4, CD8 ダブルネガティブ T細胞が多数出現して自己抗体の産生が起り、Systemic lupus erythematosus (SLE)様の自己免疫疾患が発症する。一方、Fas リガンド遺伝子の変異によりFasL分子が機能を発揮できない gld マウスでもlpr マウスと同様の異常を表すことが明らかとなった。

Fas-FasLシステムの生理的役割は、少なくとも2つ考えられ、1つは自己反応性T細胞の除去であり、もう一つは、細胞障害性T細胞によるウイルス感染細胞や移植片等の標的細胞にapoptosisを誘導することである。Fas分子には未だ不明の機序によって、膜貫通部位を欠く可溶性 Fas (sFas)が産生され、このsFasはFasLとの結合能を持つために、細胞膜上でのFasとFasLの結合を妨げ、apoptosisに抑制的に働くと考えられている。この説を証明するものとして、SLE患者血清中にはsFas濃度が健康人に比して高いことが確認されていて、SLE患者では自己反応性クローンの除去に支障があることが推測される。

#### 3. 珪肺症患者におけるFas, Fasリガンド

Informed consent の得られた珪肺症、SLE, PSS患者および健康人ボランティアから提供された血

液を用いて、血清中のsFasおよびsFasリガンドの濃度をELISA法にて、又リンパ球膜表面のFas(mFas)をflow cytometryにより測定した。Fas : sFas濃度は既に報じられている如く、SLE患者では健常人に比して有意に上昇していたが、PSS患者では差を認めなかった。一方、珪肺症患者群ではsFas濃度が有意に高かった。悪性腫瘍を伴わず、臨床的に自己免疫疾患の症状を伴わないヒトでのsFasの上昇を観察したのは本研究が初の報告である。又、末梢血液より抽出したRNAを用いてRT-PCRを行ったところ、珪肺症患者ではmFasよりsFasのmRNAの発現が高く、上述の血清中sFas蛋白の上昇と一致する結果を得た。一方、mFasについては、珪肺症、SLE、PSS患者、および対照群での発現に差を認めなかった。FasL : 細胞表面に発現した膜型FasLは、matrix metalloproteinaseにより可溶化され(soluble FasL; sFasL)、sFasLはFasとの結合能をもつ。SLE患者では対照群に比して有意にsFasLが上昇していたが、PSSおよび珪肺症患者では特に変化を認めなかった。sFasLの出現する意味については不明の点が多いが、FasLの発現の少ない組織でのapoptosisを促し、局所での炎症を鎮静化させる作用をもつとする説がある。この様な視点から考えると、apoptosisに抑制的なsFasが上昇している珪肺症患者で、apoptosisに促進的なsFasLが上昇していないことは理にかなっており、全体として珪肺症患者ではFas-FasL系を介するアポトーシスが低下していると推察される結果をえた。しかしながら、SLE患者ではsFas、sFasLともに上昇しており、この生理的役割は不明である。

#### 4. 珪酸および珪酸塩化合物によるリンパ球の polyclonal activation と activation-induced cell death.

珪酸および珪酸塩化合物(例: chrysotile asbestos)を急性細胞毒性が見られない濃度(50-100  $\mu$ g/ml)で健康ヒトリンパ球とin vitroにて反応させると、polyclonal activation が起こり、特にTcR V $\beta$ 5.3陽性リンパ球が活性化された。この時、TUNEL陽性細胞が反応4日目に最も上昇し、この期に一致して、今まで急上昇していたFas陽性細胞が激減することが判明した。これらの結果から、生体内に沈着した珪酸や珪酸化合物が、リンパ球を繰り返し活性化している可能性が示唆される。

#### 5. まとめ

免疫反応を担うリンパ球とくにT細胞は、担当する特異抗原やスーパー抗原によって活性化され、クローンが肥大するが、この過程で既にfeed back機構が働き始め、これらの細胞の大半を死に至らしめることによってクローンの大きさを元に戻す計画が開始する。その手段の一つが細胞膜上に発現を強めてゆくFas, FasL分子である。活性化されたリンパ球の中に自己反応性クローンが含まれていても、feed back機構が正常に働いていれば殆ど問題なく事態は鎮静化する。しかしこの時、feed back機構を抑制する因子が作用すると、肥大化したクローンの中に含まれる自己反応性クローンはそのまま肥大化の方向へ進み続け、自己抗体の産生や自己組織の破壊に至るといふ説が一般に受け入れられているものである。血清sFas濃度の上昇が認められる珪肺症患者においても、自己抗体陽性率が70%以上と高率であることは、上記の考え方に良く合致する。珪肺症患者に於てもアポトーシスの低下から自己反応性クローンの除去が不全となり、各種の自己抗体産生に到ることが考えられる。又、古くから珪酸および珪酸塩化合物はアジュバント作用を持つと言われてきた。従って、polyclonalなリンパ球活性化が自己反応性T細胞を刺激する可能性が示唆される。即ち、珪肺症患者ではアポトーシスの不全と体内で反復されるリンパ球の活性化の2つの因子が、自己抗体産生の誘因ではないかというのが結論である。

#### 急性薬物性肝障害モデルの免疫毒学的再検証—サイトカイン介在性について

北條博史

昭和薬科大学衛生化学研究室

はじめに

代表的な薬物性肝障害物質である四塩化炭素やアセトアミノフェンが肝障害を起こす機構は、これらの化合物が肝ミクロゾームのシトクロムP-450により代謝活性化されてラジカルとなり、脂質膜の過酸化あるいはタンパク質や核酸と反応して肝細胞壊死を引き起こすためと理解されてきた。しかし最近薬物性肝障害の発現の過程にはいくつかの炎症性サイトカインが起炎あるいは消炎的に関与する可能性が議論されている。ここでは、薬物性急性肝障害モデルにおけるサイトカインの役

割に関する報告を整理し考察する。また起炎薬物の投与方法によってはartificialなサイトカイン誘導がみられた私達の実験例についても述べる。

#### 薬物性肝障害におけるKupffer細胞およびサイトカインの炎症促進作用

Kupffer細胞は肝に固着しているマクロファージ系細胞で、異物刺激により活性化するとサイトカインをはじめとする種々のメディエーターを産生する。薬物が肝細胞を障害するときKupffer細胞由来のこれらのメディエーターが関与するか否かについて、Kupffer細胞機能阻害剤を用いて調べられた。四塩化炭素あるいはアセトアミノフェン投与の一日前にマクロファージ機能阻害剤のGadlinium chlorideを投与すると、肝障害の顕著な減弱がみられた(1,2)。同様な結果は他のマクロファージ機能阻害剤でもみられたことから、Kupffer細胞由来メディエーターはこれら肝障害性薬物による肝実質細胞の壊死に促進的役割を果たすものと推測された。

Kupffer細胞で産生される炎症性サイトカインであるTNF $\alpha$ とIL-1 $\alpha$ の薬物性肝障害への関与についてもかなりの研究報告がある。それらの中には、抗TNFレセプター投与によりラット四塩化炭素肝障害の減弱が起こり(3)、あるいは抗TNF $\alpha$ 抗体や抗IL-1 $\alpha$ 抗体によりマウスアセトアミノフェン肝障害の減弱が起るなど、それらの多くはTNF $\alpha$ あるいはIL-1 $\alpha$ が組織障害に促進的に作用することを支持している(4)。他方、炎症性サイトカインの薬物性肝障害促進作用を否定する報告もある。例えば、アセトアミノフェンを投与したマウスの肝においては肝障害の前にTNF $\alpha$ のタンパクとmRNAのいずれも発現が認められないこと、またTNF $\alpha$ およびlymphotoxin遺伝子ノックアウトマウスと正常マウス間でアセトアミノフェンによる肝障害が同程度である(5)、というものである。しかし後者の実験のように、ある遺伝子をノックアウトしてその分子の生理的役割を調べる方法は、炎症反応過程で複数の作用点が示唆されるTNF $\alpha$ (6)の場合などでは、結果の解析が困難であり適当とはいえない。

免疫介在性の急性肝障害モデルの障害機構にも言及すると、D-galactosamineと微量LPSの併用系ではTNF $\alpha$ が、Propionibacterium acnesによるprimingと微量LPSによるeliciting系では、TNF $\alpha$ および細胞障害性リンパ球(NK, NK-T, CTL)の両者がアポトーシスを誘起することが示唆され、同

様にT細胞マイトージェンであるconcanavalin(Con) A肝障害系でもTNF $\alpha$ がアポトーシスに介在するといわれている。四塩化炭素による肝細胞死はネクローシスによるものとされてきたが、最近部分的にはアポトーシスも起ることが報告されている。

#### 薬物性肝障害におけるサイトカインの炎症抑制作用

炎症は起炎刺激に始まり一連の反応が時間に依存して進行する。IL-6は当初TNF $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ と共に炎症促進性サイトカインと見なされたが、その後Con A肝障害を抑制することが報告され、さらに私達を含む複数のグループによりIL-6が四塩化炭素肝障害を抑制することが示された(7,8)。またIL-10に関してもD-galactosamine/LPS肝障害やCon A肝障害、および四塩化炭素肝障害を抑制する(9)ことが判明し、前二者については起炎性サイトカイン産生抑制が主要な機序と説明され、後者ではコルチコステロン依存的にIL-6が誘導されるが、その炎症抑制機序は未だ明らかでない。

#### 四塩化炭素の投与経路の違いによるIL-6の誘導とその肝障害修飾性

私達は四塩化炭素の投与ルートの相違による組織障害発現とIL-6誘導性について検討してきた。その結果、1) 四塩化炭素の皮下あるいは腹腔内投与系では4~8時間をピークに血中にIL-6が誘導されるのに対し、経口投与ではほとんど誘導されず、一方肝障害マーカー酵素の血中逸脱は経口投与系に比べ、皮下および腹腔内投与系では低いレベルである、2) 皮下投与系で四塩化炭素に対する溶媒コーン油を増加させるとIL-6の誘導は低下し、逆に肝障害が増悪する、3) 少量のdexamethasoneの前投与でIL-6誘導は顕著に低下し肝障害は増悪する、など、四塩化炭素によるIL-6の誘導と肝障害の間には密接な逆相関性が存在することから、この早期に誘導されるIL-6は肝障害の進展に抑制的に働いている可能性を推察している(10)。

#### おわりに

薬物による肝障害機序を正しく理解することは、医薬品や環境化学物質の毒性評価あるいは抗肝炎薬の評価モデルの選択上重要である。本稿では、薬物性肝障害、特に四塩化炭素およびアセトアミノフェン肝障害が、薬物による直接的な組織障害だけでなく、同時に誘導されるサイトカインが炎症を促進的に、あるいは抑制的に調節する可能性を述べた。また四塩化炭素の投与経路によっては

IL-6が高レベルに誘導され、これが肝障害に抑制的に働く可能性を示した。これら薬物性肝障害におけるサイトカインの関与についてはまだまだ不確定な部分が多く、今後さらに詳細に検討する必要がある。

#### 参考文献

1. M.J. Edwards, et al. Toxicol. Appl. Pharmacol., 119, 275-279 (1993).
2. D.L. Laskin, et al. Hepatology, 21, 1045-1050 (1995).
3. M.J. Czaja, et al. Gastroenterology, 108, 1849-1854 (1995).
4. M.E. Blazka, et al. Toxicol. Appl. Pharmacol. 133, 43-52 (1995).
5. F. Boess, et al. Hepatology, 27, 1021-1029 (1998).
6. Y. Yamada and N. Fausuto. Am. J. Pathology, 152, 1577-1589 (1998).
7. M. Sato, M. Sasaki, H. Hojo, Arch. Biochem. Biophys., 316, 738-744 (1995).
8. A. Katz, et al. Cytokine, Cell. & Mol. Therapy, 4, 221-227 (1998).
9. M.G. Swain, et al. Am. J. Physiol. 276, G199-G205 (1999).
10. T. Kasakura, et al. XXVth Symposium on Toxicol. Environ. Health Sci. 抄録集 p86 (1999).

## 免疫毒性試験プロトコール 第3回

### モルモット Maximization Test

金澤 由基子

(財)食品薬品安全センター-秦野研究所 安全性試験室

#### A. 解説

モルモットを用いる皮膚感作性試験として、最も広く行われている方法が Magnusson and Kligman によって開発された Maximization test である<sup>1)</sup>。この試験方法は、動物を用いた遅延型アレルギー反応を調べるものとして、国内「医薬品毒性試験法ガイドライン」<sup>2)</sup>、「医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン」<sup>3)</sup>や、ISO 基準「医用材料の生物学的評価」(10993-10)<sup>4)</sup>等に掲載されている。

ガイドラインによって投与検体の調製法などに違いがあるが、ここでは、医薬品ガイドラインの内容を基本に置いて述べる。

#### B. 実験材料等

##### 1. 動物

通常500g以下の健康な若齢白色モルモット(1~3か月齢)が用いられる。雌雄どちらでも使用可能であるが、雌を使用する場合は、妊娠していない未経産のものを用いる。

##### 2. 動物数

通常、被験物質投与群に10匹、陰性(溶媒)対照群に5匹用意する。国内の申請資料として用いる場合には、陽性対照群(5匹)を設定する必要がある。

##### 3. 陽性対照物質

陽性対照物質として、次のような物質が用いられている。

1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (DNCB, CAS No. 97-00-7)、potassium di-chromate (CAS No. 7778-50-9)、p-phenylenediamine (CAS No. 106-50-3)、neomycin sulfate (CAS No. 1405-10-3)、nickel sulfate (CAS No. 7786-81-4)。

##### 4. 試薬

- 1) Freund's Complete Adjuvant (FCA)
- 2) 蒸留水(局方注射用水)
- 3) 10%ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)のワセリ

ン軟膏：ワセリンを加温融解したところに1/10量(w/w)のSLSを加え、均一な軟膏とする。

- 4) 被験物質溶解用溶媒（感作投与用と惹起投与用）

## 5. 器具

- 1) ルアーロック付きガラスシリンジ（10mL）をポリエチレンチューブでつないだもの：2組 あるいはホモジナイザー
- 2) 皮内投与用ガラスシリンジ（1~2mL）およびディスポシリンジ
- 3) 感作貼付用パッチ：FRPフィルムなどで裏打ちしたろ紙（約2×4cm）を動物数分
- 4) 惹起貼付用パッチ：FRPフィルムなどで裏打ちしたリント布（約1.5×1.5cm）あるいはフィンチャンパー（内径8mm）を必要数
- 5) 粘着性伸縮包帯
- 6) 動物用バリカン
- 7) シェーバー
- 8) マイクロピペット、チップ

## C. 実験操作手順

### 1. 投与試験液の調製

- 1) 蒸留水とFCAとの1:1の油中水型(W/O)乳化物の作製

蒸留水を入れたガラスシリンジと等量のFCAを入れたガラスシリンジをフランジを介してポリエチレンチューブで接合し、一方から他方へ交互に混合液を往復させる操作を繰り返す。この操作により、液の粘稠度が高まり、内筒を押すのに抵抗が生じ、かつ液が白濁してくる。水に一滴たらしめて、拡散しなければ混和は完全である。ガラスシリンジの代わりにホモジナイザーを用いても良い。

### 2) 被験物質溶液の調製

予め被験物質を溶解するための溶媒を検討しておく。感作皮内投与のためには、蒸留水や生理食塩液、オリーブ油など刺激性の少ないものを、惹起投与のためには、揮発性が高く、かつ刺激性のない溶媒（エタノール、アセトンなど）を選択する。溶媒には、それ自身が感作性を有するものもあるので、感作用と惹起用の溶媒は別種にした方がよい。予め予備試験を行い、それぞれの溶媒および投与経路において、被験物質溶液が刺激性を示さない

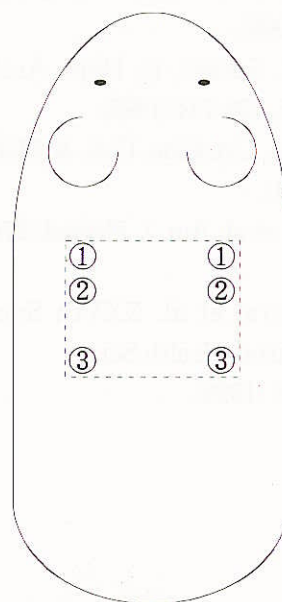
最高濃度を調べておく。予備試験によって決定した濃度（皮内投与によって刺激性を示さない最高濃度）の被験物質溶液を調製する。

### 3) 被験物質とFCAとの混合物の調製

2)で調製した被験物質溶液の2倍濃度の溶液とFCAの等量混合乳化物を調製する。2)の溶媒が水系でない場合には、単に混合しただけの均一な溶液のままでも良いが、その混合液に蒸留水を少し加えて、乳化物を作製しても良い。

## 2. 感作

- 1) 皮内投与の前日に肩甲骨上部皮膚の毛を刈っておく。2×4cmの区画を3つの部位（図参照）に分け、下記に示した試験液をそれぞれ0.1mLずつ、左右対称に皮内投与する。



### 皮内投与用試験液

- ①（前方） 蒸留水とFCAとの1:1乳化物  
 ②（中央部） 被験物質溶液  
 ③（後方） 被験物質とFCAとの1:1乳化物  
 あるいは混合物

- 2) 感作皮内投与の7日後、あらかじめ剪毛および剃毛しておいた皮内投与部位に10%SLS軟膏を開放塗布する。翌日、SLSを拭き取った後、下記に示した試験液をそれぞれ0.2mLずつ、感作貼付用パッチおよび粘着性伸縮包帯を用いて48時間閉塞貼付する。

感作貼付用試験液 1) ②の溶液



3. 惹起

感作貼付開始日から2週間後に、あらかじめ剪毛および剃毛しておいた左右側腹部あるいは背部に、以下に示した試験液（段階希釈溶液と溶媒対照）をそれぞれ0.1mLずつ惹起用パッチに吸収させて24時間閉塞あるいは開放適用する。

惹起用試験液

刺激性を示さない最高濃度から段階希釈した被験物質溶液および溶媒対照液

D. 評価

開放適用後、24時間および48時間、閉塞適用の場合は貼付物剥離後24時間および48時間における各塗布部位の皮膚反応を観察し、以下に示したDraizeの判定基準に基づいて判定する。

皮膚反応の分類

反応	評点
紅斑および痂皮形成	
紅斑なし	0
ごく軽度の紅斑	1
明らかな紅斑	2
中～強度の紅斑	3
強い紅斑～痂皮形成	4
浮腫形成	
浮腫なし	0
ごく軽度の浮腫	1
明らかな浮腫	2
中等度の浮腫	3
強度の浮腫	4

各惹起濃度ごとに評点1以上を示した動物を陽性として、陽性率および平均評価点を次式から求める。

陽性率(%)：(群の陽性動物数/群の動物数)×100

平均評価点：群の評点の合計/群の動物数

E. 留意事項

1. FCAと蒸留水との乳化物はできにくいので、最初に、FCAを必要量入れ、蒸留水をその2/3程度にして乳化を行うとしっかりした乳化物ができる。それに残りの蒸留水を加え

て乳化すると比較的うまく調製できる。

2. FCAと被験物質溶液との混合物の調製では、水系溶媒でない場合に無理に水を加えて乳化させなくても、単に混合物の状態で皮内投与しても、感作性の強度に大きな差がないことを経験している。
3. 動物の毛刈りには、動物用バリカンを使用しているが、ヒト用でも問題ない。また、二次感作および惹起の際には、毛刈りに加え、シェーバーで剃毛しているが、脱毛剤で処理する場合もある。その場合は脱毛剤の刺激性や残留性に注意する。
4. 皮内投与の際、投与位置を一定にするために、10cm角の厚紙の中心を2x4cmに切り抜き、左右の縁にマジックインキで点(6点)を打ったものを使用するのも一法である。
5. FCAの入っている試験液では、ディスプレイのゴムが劣化し、内筒が動かなくなるので、ガラスのシリンジを使用した方が良い。
6. 粘着性包帯はあまりきつく巻き過ぎると動物が呼吸困難となり、弱ってしまうことがあるので注意する。
7. 惹起適用において、背部を用いる場合、開放適用の方が閉塞適用より多くの適用部位を確保できるので開放適用の方が有用だと言われているが、両側腹部を用いると閉塞適用でも8点確保できる。開放適用より閉塞適用の方が反応が強く表れるので、皮膚感作性があるかどうかを調べるような試験では、閉塞適用の方が適していると思われる。
8. 惹起適用を開放で行う場合には、直径1.5cm程度のプラスチック製の円筒を検体数分用意し、スタンプインクで適用部位に丸い輪をスタンプしておく。その部位にマイクロピペットで0.05～0.1mL塗布する。試験液が流れない様、円筒を当てたままで塗布しても良い。適用後、ドライヤーの冷風で乾燥させる。
9. 惹起後の判定では、伸びてくる毛が判定の障害となるので、赤くならない程度に適宜シェーバーをかける。
10. 評価には種々の考え方があるので、目的に応じた評価を行うことが望ましい。例えば、感作性の強度を他の物質と比較するためであれば、最低感作濃度を求めることが有用である。(最低感作濃度とは、感作濃度を多段階設

定し、惹起濃度を一定にして実験を行い、陽性反応を示した最も低い感作濃度を意味する。)しかし、そのためには、動物数が多くなることから、代わりに最低惹起濃度を求める方法がある。(最低惹起濃度とは、感作濃度を一定にし惹起濃度を多段階設定して実験を行い、陽性反応を示した最も低い惹起濃度を意味する。)最低惹起濃度は最低感作濃度と必ずしも一致しないが、指標となり得る。また、平均評価点が1に近い値を示した惹起濃度を指標とすることもある。

被験物質を実際に使用する際に感作性を示すかどうかを調べるためであれば、実際の使用濃度一点での試験で十分である。

11. 陽性対照物質のDNCBを0.1%オリーブ油溶液で感作、0.1%エタノール溶液を閉塞適用で惹起したとき、惹起開始48時間目での判定では、陽性率100%、平均評価点4~7を示した。

## F. 参考文献

1. Magnusson, B. and Kligman, A. M.: The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Derm.* 52: 268-276 (1969)
2. 医薬品毒性試験法ガイドライン (1989) 薬審1第24号
3. 医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン (1995) 薬機第99号
4. International Standard ISO 10993-10 (1995), Biological evaluation of medical devices- part 10: Tests for irritation and sensitization

## Local Lymph Node Assay

畑尾 正人

株式会社資生堂 基盤研究センター 薬剤開発研究所

### A. 解説

Local Lymph Node Assayはマウスを用いた接触感作性試験法で、感作誘導時のリンパ節細胞の抗原特異的な増殖反応を評価する方法である。Kimberらによって1989年に発表されて以来、様々な検討がなされてきた(1, 2)。その後、1992年にOECDガイドラインにマウスを用いたスクリーニング方法として収載されたが(3)、1998年には米国

National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) / National Institute of HealthのNational Toxicology Program主催で科学的妥当性評価会議が行われた結果、スクリーニング試験としてではなく独立の感作性試験 (Hazard Identification Test) としての評価を得るに至った(4)。

Local Lymph Node Assayは従来の感作性試験であるGuinea Pig Maximization Testと比較して、試験期間が短い、 $^3\text{H}$ -thymidineの取り込みにより定量的なデータが得られる、着色性の化学物質に対して適用できる、動物に対する負荷が低い等の長所がある一方で、放射性同位体の使用、感度がやや低い、交差反応を評価できない等の短所がある(5)。放射性化合物により汚染された動物の廃棄の問題から、*ex vivo*での方法やサイトカイン産生を評価する等の他のend pointを用いた方法が提案されているが(6, 7, 8)、公式に認められている方法は*in vivo*での増殖活性を評価するLocal Lymph Node Assayだけである。

本標準試験法は1998年の前記会議にて評価パネル (Peer Review Panel) により合意が得られた条件を基本として作成したものである(4)。

## B. 実験材料

### 1. 動物

試験に用いられるマウスは原著では雌のCBA/CaあるいはCBA/J系統のものが使用されている。他の系統のマウスあるいは雄のマウスについては総合的な検討がなされて系統差、雌雄差がないことが確認されるまでは用いない。動物は個体識別ができるように飼育し、試験開始時および終了時に体重を測定する。

### 2. 試薬

#### 1) 溶媒

溶媒として用いられる例を以下に示す。アセトン/オリーブオイル4:1(v/v)、アセトン、メチルエチルケトン、メチルエチルケトン/パラフィンオイル4:1(v/v)、ジメチルスルフォキサイド、N,Nジメチルホルムアミド、プロピレングリコール、生理食塩水、50%アセトン生理食塩水。

#### 2) 放射性化合物

$^3\text{H}$ -methyl thymidineはPBSにて80Ci/mLの

濃度に使用時に調製する。希釈後の濃度については $\beta$ -シンチレーションカウンターにより確認する。

### 3) その他

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、トリクロロ酢酸 (TCA)、シンチレーションカクテル

## C. 実験操作手順

### 1. 実験デザイン

第1日：被検物質溶液を調製し、マウス両耳介に適量を塗布する。

第2日：被検物質溶液を調製し、マウス両耳介に適量を塗布する。

第3日：被検物質溶液を調製し、マウス両耳介に適量を塗布する。

第5日： $^3\text{H}$ -methyl thymidine溶液250 $\mu\text{L}$ をマウス尾静脈から投与し、5時間後にマウスを $\text{CO}_2$ により屠殺、耳介リンパ節を切除する。マウスごとにリンパ節細胞の単細胞浮遊液を調製、トリクロロ酢酸を添加し、終夜でインキュベートを行う。

第6日：リンパ節細胞を回収し、 $\beta$ -シンチレーションカウンターにて放射活性を測定する。

### 2. 被検物質の調製と塗布

・被検物質の溶解性によって適切な溶媒を選択し、以下に示す濃度域の3ないし5連続濃度域について被検物質溶液を調製する。

100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1.0%、0.5%、0.25%、0.1%

最大濃度は溶解度および刺激性を考慮して、刺激性がなく、毒性を示さない最大濃度を用いることが望ましい。刺激物質は擬陽性を生じる可能性があり、毒性を示す物質は擬陰性を生じる可能性がある。被検物質の調製については使用時に調製することが望ましいが、安定性の良好で溶解性も良好な物質についてはその限りではない。また、溶解の際の熱処理についても熱安定性を考慮する必要がある。

・被検物質溶液および溶媒対照は片耳あたり25 $\mu\text{L}$ を両耳の耳介の背側に1日1回の頻度で塗布する。使用する動物数は統計処理が可能となるよう3匹以上とする。

### 3. 細胞浮遊液の調製

切除したリンパ節はプランジャーを用いてPBS中に懸濁させた後にステンレスゲージ (200 mesh) を通して単細胞浮遊液にする。細胞浮遊液はPBSを加えて、4 $^{\circ}\text{C}$ 、10分間、190gで遠心処理を行う操作を2回繰り返して洗浄する。その後、高分子を沈殿させるため、5%トリクロロ酢酸を3mL加えて4 $^{\circ}\text{C}$ で終夜インキュベートする。インキュベートの終わった細胞浮遊液は4 $^{\circ}\text{C}$ 、10分間、190gで遠心処理を行って回収し、再度5%トリクロロ酢酸1mLに再懸濁させた後、放射活性の測定を行う。

### 4. 放射活性の測定

再懸濁させた細胞浮遊液をシンチレーションバイアルに移した後、10mLのシンチレーションカクテル (Optiphase mp) を加え、約30分後に $\beta$ -シンチレーションカウンターで放射活性を測定する。

## D. データ処理

データ処理についてはマウスの個体ごとに測定した放射活性データの統計処理を行い、有意差検定を行う。感作性の基準としては被検物質の誘導する放射活性が溶媒対照の3倍以上のもの ( $\text{SI} \geq 3$ ) を陽性とするが、放射活性の被検物質濃度依存性も考慮に入れる。

## E. 留意事項

### 1. NIEHS科学的妥当性評価会議での合意事項

- ・マウスは雌のCBA系統を用いる。
- ・動物は個体識別ができるようにしておく。
- ・試験の開始前後で体重を測定する。
- ・リンパ球の増殖活性は個体ごとに測定する。
- ・統計解析を行う。
- ・中程度の感作性を示す物質を陽性対照として用いる。
- ・増殖性の評価には $^3\text{H}$ -methyl thymidineまたは $^{125}\text{I}$ -iododeoxyuridineを用いる。
- ・判定基準は被検物質の示す放射活性が溶媒対照の3倍以上 ( $\text{SI} \geq 3$ )、統計的有意差、被検物質の濃度依存性を考慮する。
- ・被検物質投与部位から考えた、採取すべき所属リンパ節の説明図をプロトコールに加える。

## 2. 操作上の留意点

- ・放射性化合物および放射性化合物に汚染された動物、器具等については安全性に留意して取り扱い、法的に定められた方法により処理を行う。
- ・トリクロロ酢酸は危険物であるため、取り扱いには防護具を使用する。

## F. 参考文献

1. Kimber, I., Hilton, J. and Weisenberger, C., The murine local lymph node assay for identification of contact allergens: A preliminary evaluation of in situ measurement of lymphocyte proliferation. *Contact Dermatitis*, 21, 215-220 (1989)
2. Basketter, D. A., Roberts, D. W., Cronin, M. and Scholes, E. W., Comparison of the local lymph node assay with the guinea pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 65-69 (1992)
3. OECD Guideline for Testing of Chemicals No.406, Skin Sensitization, Adopted by the Council on 17th July 1992, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris (1992)
4. The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals / Compounds. NIH publication No.99-4494 (1999)
5. 畑尾正人 感作性試験. *Altern. Animal Test. Experiment.* 5, 284-290 (1998)
6. Hatao, M., Hariya, T., Katsumura, Y. and Kato, S., A modification of the local lymph node assay for contact allergenicity screening: measurement of interleukin-2 as an alternative to radioisotope-dependent proliferation assay. *Toxicol.* 98, 15-22 (1995)
7. Hariya, T., Hatao, M. and Ichikawa, H., Development of a non-radioactive endpoint in a

modified local lymph node assay. *Fd. Chem. Toxicol.* 37, 87-93 (1998)

8. Shibata, M., Hariya, T., Hatao, M., Ashikaga, T. and Ichikawa, H., Quantitative polymerase chain reaction using an external control mRNA for determination of gene expression in a heterogeneous cell population. *Toxicol. Sci.* 49, 290-296 (1999)

## マウスを用いるPopliteal Lymph Node Assay (PLNA)

間 哲生, 木村 努

三共株式会社 安全性研究所

## A. 解説

PLNAは、マウスまたはラットの膝窩リンパ節 (PLN) における局所反応によって化合物の免疫毒性を検出する試験法である。足蹠皮下への投与によって免疫学的副作用 (自己免疫・アレルギー) を誘発する多くの化合物がPLN細胞の増加を引き起こすことが知られている。また、投与が1回で済み、1週間程度で結果が得られる簡便さがPLNAの利点として挙げられる。

殆どの陽性化合物の場合、PLN細胞数のピークが投与6~8日目であることから通常、投与7日目に判定を行う (図1)。評価の指標としては、PLN重量を基にした Weight index または細胞数を基にした Cellularity index が主に用いられるが、一般には Cellularity index の方が高感度である。ここでは、マウスを例に PLN cellularity index を用いる評価法について述べる。

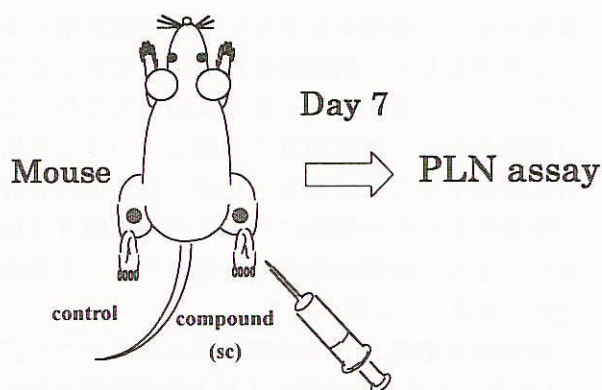


図 1

## B. 実験材料等

## 1. 細胞浮遊液および洗浄液

- 1) 10% ウシ胎児血清 (FCS) 添加 RPMI 1640 Medium
- 2) リン酸緩衝生理食塩液 (PBS, pH7.2~7.4)

## 2. 実験器材

- 1) 24穴平底プレート (3047, FALCON)
- 2) 35×10 mm culture dish (3002, FALCON)
- 3) セルストレイナー (2350, FALCON)
- 4) 血球計算盤あるいはセルカウンター

## C. 実験操作手順

## 1. 被験物質の投与

- 1) 保定者はマウスの背側の皮膚をつかみ、投与者に腹側を向ける。
- 2) 27 G注射針の針先をマウス後肢のかかと側から挿入し、被験物質の溶液50  $\mu$ lを足蹠皮下へゆっくり注入する。片方の後肢には被験物質を投与し、もう一方の後肢は溶液 (50  $\mu$ l) 投与あるいは無処置として対照にする。

## 2. 膝窩リンパ節 (PLN) の採材

- 1) 投与7日目に頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、すぐにハサミで腋下静脈を切断して放血する。
- 2) 背側を上に向け、後肢のかかと裏から、肢と平行にハサミを入れ、皮にV字型に3 mm程度の切れ込みを入れる (図2-1)。
- 3) 切れ込み部分の皮をつかんで、皮膚を裏返すように、尻部へ向けて皮をはがす (図2-2)。
- 4) 膝関節を伸ばすと膝部の窪みからPLNが露出するので、先曲りピンセットで、つまむようにして取り出す (図2-3)。うまく露出しないときは、有鉤ピンセットでPLN周辺の組織を切開して取り出す。なお、採材後のPLNに余分な脂肪や筋肉組織が付着している場合があるので、それらをピンセットで丁寧に取り除きPBSですすぐ。

## 3. 細胞浮遊液の調製およびセルカウント

- 1) 24穴プレートの各穴に、あらかじめ10% FCS-RPMI液を500  $\mu$ lずつ入れておく。
- 2) 採材したPLNを個別に、各穴に入れ、ディスプレイ注射筒 (1 ml) のピストン部分を用いて、よくPLNを押しつぶす。

3) 浮遊液をセルストレイナーに通して濾過し、35×10 mm culture dish へ移す。この際、細胞のロスが出ないように移した後の穴を10% FCS-RPMI 液(500  $\mu$ l)で2回程度洗い、それらをセルストレイナーを通してculture dishへ移すとよい。

4) 得られた個別の細胞浮遊液を適宜希釈して、血球計算盤またはセルカウンターで細胞濃度を測定し、PLN 1個当りの細胞数を算出する。

## 4. 判定

得られたPLN細胞数から、個体毎に、以下のPLN cellularity index を算出する。

PLN cellularity index =

$$\frac{\text{被験物質投与側のPLN総細胞数}}{\text{溶媒投与 (または無処置) 側のPLN総細胞数}}$$

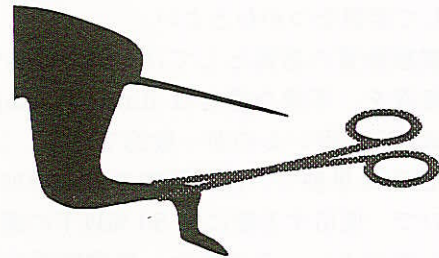


図2-1

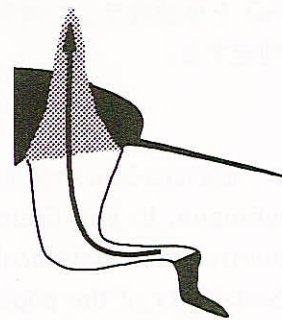


図2-2

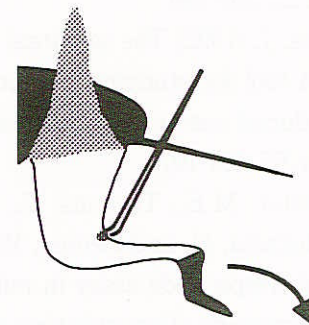


図2-3

投与群の平均 index 2以上が陽性判定の目安となっている。また、溶媒のみを投与した対照群と index を比較して有意差の有無を検討することも重要である。

陽性反応が得られた場合、フローサイトメトリーによるリンパ球解析を行い、投与により増加した細胞群を同定することは、結果を考察する上で意義があると思われる。フローサイトメトリーの手法については、ImmunoTox Letter Vol.4 No.1 (1999)、「免疫毒性試験プロトコール」第1回 ② ラットリンパ組織および末梢白血球のフローサイトメトリー (中村和市著) を参考にされたい。

#### D. 留意事項

1. 膝窩リンパ節の位置を確認しづらい場合は、一度、被験物質の代わりに低濃度のエバンスブルー溶液などを足跡に投与し、30分後に採材して要領をつかむとよい。
2. 被験物質の溶媒としては可溶な場合は生理食塩液を、不溶な場合は dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いるのが一般的である。しかし、DMSO は単独で、非特異的な細胞増加を起こすので、使用する際には 50 %以下の濃度に抑えるのがよい。この場合、被験物質を投与しない側の足は無処置として index を算出し、片足に DMSO を単独投与した対照群と index を比較して判定する。

#### F. 参考文献

1. Bloksma, N., Kubicka-Muranyi, M., Schuppe, H.C., Gleichmann, E. and Gleichmann, H. (1995) Predictive immunotoxicological test systems: Suitability of the popliteal lymph node assay in mice and rats. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 369-396
2. Descotes, J. (1992) The popliteal lymph node assay: A tool for studying the mechanisms of drug-induced autoimmune disorder. *Toxicol. Lett.*, 64/65, 101-107.
3. Kammüller, M.E., Thomas, C., De Bakker, J.M., Bloksma, N. and Seinen, W. (1989) The popliteal lymph node assay in mice to screen for the immune disregulating potential of chemicals - A preliminary study. *Int. J.*

*Immunopharmacol.* 11, 293-300

4. Hurtenbach, U., Gleichmann, H., Nagata, N. and Gleichmann, E. (1987) Immunity to D-penicillamine: genetic, cellular, and chemical requirements for induction of popliteal lymph node enlargement in the mouse. *J. Immunol.* 139, 411-416
5. Aida, T., Kimura, T., Ishikawa, N. and Shinkai, K. (1998) Evaluation of allergenic potential of low-molecular compounds by mouse popliteal lymph node assay. *J. Toxicol. Sci.* 23, 425-432
6. Shinkai, K., Nakamura, K., Tsutsui, N., Kuninishi, Y., Iwaki, Y., Nishida, H., Suzuki, R., Vohr, H.W., Takahashi, M., Takahashi, K., Kamimura, Y. and Maki, E. (1998) Mouse popliteal lymph node assay for assessment of allergic and autoimmunity-inducing potentials of low-molecular-weight drugs. *J. Toxicol. Sci.* 24, 95-102

#### 編集後記

好評の「免疫毒性試験プロトコール」第3回と、新幹事に就任された先生方に新しい免疫毒性学への思い、最新の研究展開などについて原稿を寄せていただきました。日本の免疫毒性学が世界の中でユニークでしかも学問領域のレベルが高いと認められるように会員の皆様と共に取り組んでいきたいと考えております。ImmunoTox Letterへの投稿をお願いします。(藤巻秀和記)

#### 編集・発行：免疫毒性研究会

発行日：平成12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