

毒性試験講座

10

免疫毒性 — 金属 —

静岡県立大学教授
公衆衛生学

荒川 泰昭

3.9 金 属

荒川 泰昭

はじめに

金属と生体とのかかわりを特に“有害影響”の面から把握すると、そのなかには生理的量の欠乏による障害も過剰による障害も含まれることになる。事実、金属欠乏による栄養障害、ホルモンバランスの乱れ、器官の組織傷害、機能障害などから免疫担当細胞の数や機能が障害を受けることは多分に考えられる。しかし、従来からの“毒性”という概念は、一般的には臓器、組織、細胞の性質ならびに機能に対して生理的量の過剰による障害をさし、生理的量の欠乏による機能障害は栄養学的領域にゆだねられる。したがって、本稿では“免疫毒性”という概念も同様に生理的量の過剰による免疫機能障害としてとらえ、議論するに留める。すなわち“免疫毒性”という概念を化学物質曝露による免疫系への有害影響としてとらえる。一般に金属の免疫系への有害影響には、免疫反応を亢進する場合と抑制する場合とがあり、前者はアレルギー疾患や自己免疫疾患の原因となり、後者は感染症や発がんなどの原因となることが考えられる(図 3.9.1)。そして、免疫系に変化を与える金属は用途あるいは用量に応じて免疫療法薬(図 3.9.3, 3.9.4 は抗腫瘍作用, 図 3.9.5 は抗炎症作用を示す)^{45, 48, 58)} となったり、免疫毒(図 3.9.6, 3.9.7, 3.9.8)^{6, 10-14)} となったりする。⁵⁹⁾

したがって、この免疫毒性にかかわる金属もまた免疫修飾物質(immunomodulators)あるいは免疫関連反応物質(immune-interacting compounds)として総合的に取り扱う方が妥当かもしれない。いずれにせよ、このような免疫応答への修飾をでき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、より特異的な検索法の選択が要求される。現在ヒトにおいて使用されている主な免疫能パラメーターを表 3.9.1 に、また動物実験において使用される免疫能パラメーターを表 3.9.2 に整理した。しかし、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な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。以下、これらの研究を進めていく上でまずチェックしてみなければならない代表的な検索法について解説を試みる。

なお、紙面の都合で割愛させていただいた他の試験法については、一般の免疫実験法などの解説書を参照されたい。

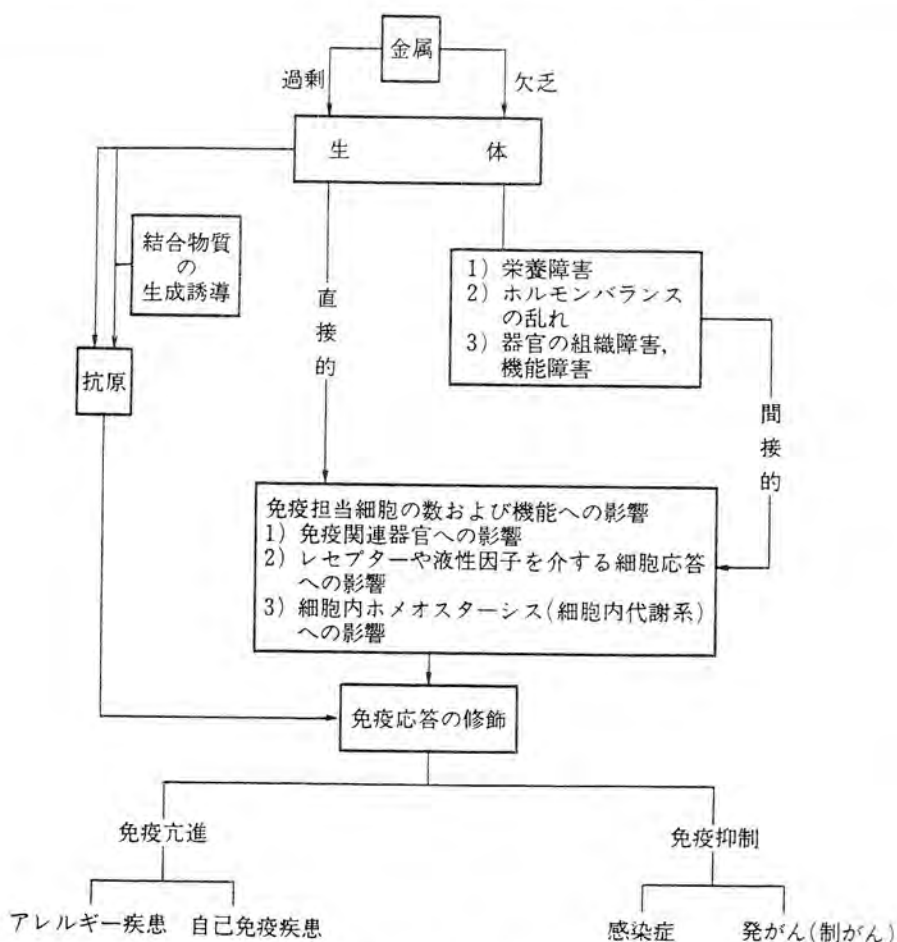


図 3.9.1 金属と免疫系とのかわり

免疫毒性試験法

(A) *in vivo* 実験

幼若ラット（雄性 and/or 雌性, Wistar 系, 40～50 g), 幼若マウス（雄性, Swiss, 10～12 g), 幼若モルモット（雄性, Hartley strain, 200～225 g), 日本白色うさぎ（雄性, 3.5～4.0 月齢, 2.0～2.3 kg), 日本うずら（70～80 g）などが1群を10匹として用いられる。

被験物質の投与は以下のように行うが、投与実験終了以後はそれぞれの実験目的に準じて処理する。

(a) 経口投与実験 (Oral Treatment Studies) 飼料は被験物質と市販飼料との混合によって調整する。すなわち、水溶性の被験物質は問題ないが、水に難溶性あるいは不溶性の物質はまずエタノール¹⁻³⁾あるいはサラダ油⁴⁾などで溶かした後、よく混合し、ラット、マウスおよび日本うず

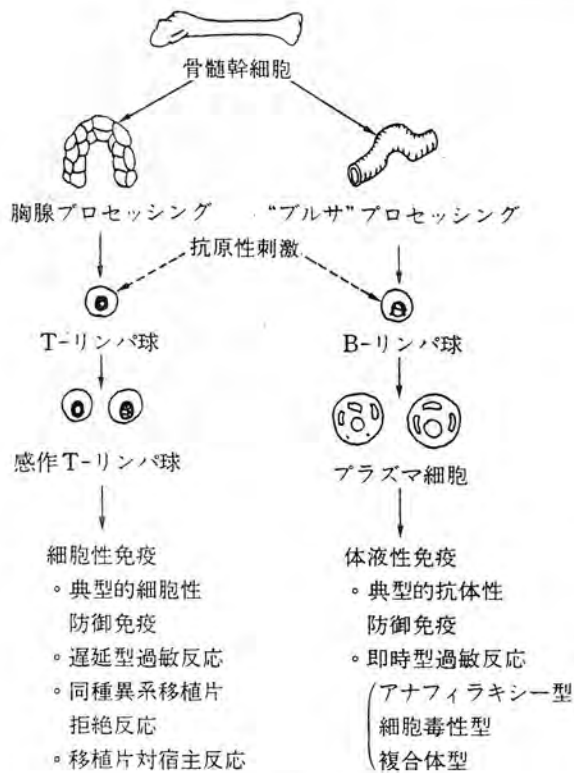
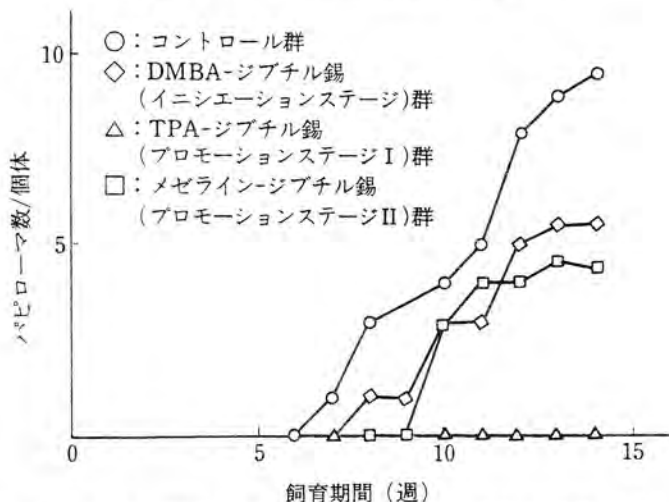
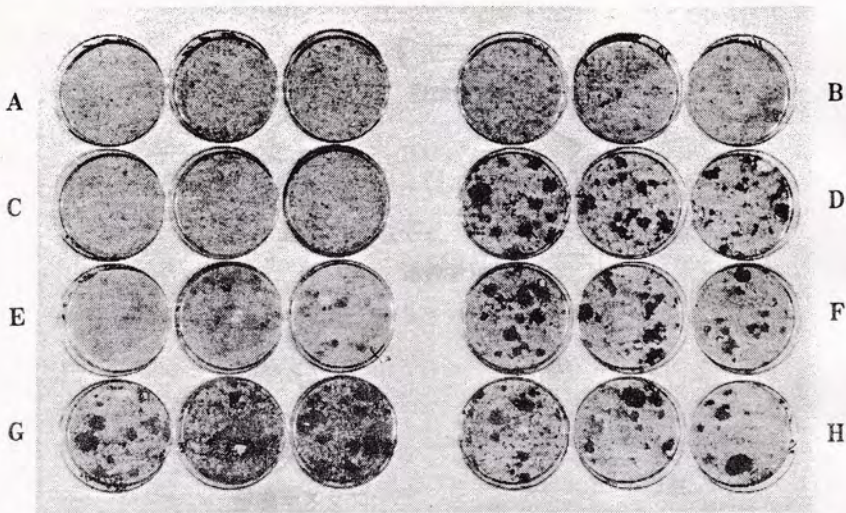


図 3.9.2 免疫担当細胞の分化・成熟過程



マウスはジメチルベンズアンスラセン (DMBA, 100 nmol) でイニシエートされ、ホルボールエステル (TPA, 5 μ g) およびメゼライン (mezeirin, 2.5 μ g) でプロモートされた。ジブチル錫 (5 μ g) はイニシエーターおよびプロモーターで処理する30分前に投与された。ジブチル錫によって TPA によるプロモーションステージ I が完全に抑制される。

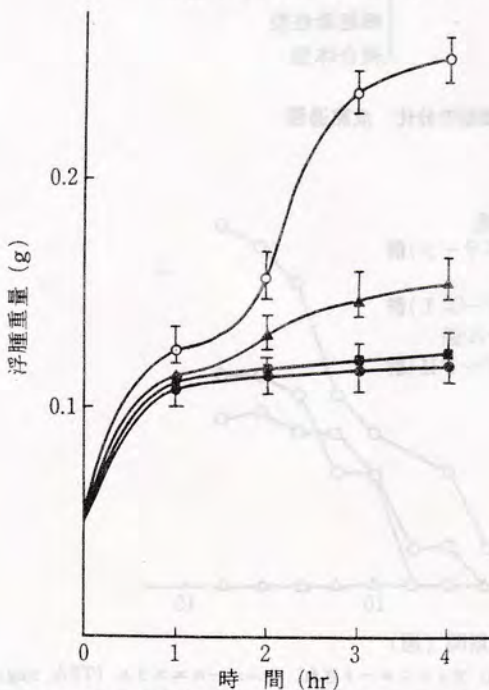
図 3.9.3 マウス皮膚2段階発がん (イニシエーションおよびプロモーション) システムに対するジブチル錫の阻害作用



細胞 (1×10^4) はメチルコランズレン (MCA, $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$) でイニシエートされ、ホルボールエステル (TPA, $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$) でプロモートされた。ジブチル錫は MCA あるいは TPA のどちらかと同時に添加された。

A: 全ネガティブコントロール, B: MCA のみ (プロモーションブランク), C: TPA のみ (イニシエーションブランク), D: MCA-TPA (ポジティブコントロール), E: [MCA+ジブチル錫 ($3 \times 10^{-7}\text{M}$)]-TPA, F: MCA-[TPA+ジブチル錫 ($3 \times 10^{-7}\text{M}$)], G: [MCA+ジブチル錫 ($3 \times 10^{-8}\text{M}$)]-TPA, H: MCA-[TPA+ジブチル錫 ($3 \times 10^{-8}\text{M}$)].

図 3.9.4 BALB/c 3T3 細胞の2段階 (イニシエーションおよびプロモーション) トランスフォーメーションシステムに及ぼすジブチル錫の影響



カラゲナン ($0.5 \text{ mg}/0.05 \text{ ml}$) あるいは生理食塩水 (ブランクコントロールとして) がラット下肢足底に注射された。有機錫 ($1.0 \text{ mg}/\text{kg}$) およびハイドロコチゾン ($10 \text{ mg}/\text{kg}$) は起炎剤注射の1時間前に経口 (p.o.) 投与された。各時間における測定値は生理食塩水による測定値によって補正されている。

(○) ポジティブコントロール群, (●) ジブチル錫投与群,
(▲) トリフェニル錫投与群, (■) ハイドロコチゾン投与群

図 3.9.5 カラゲナン惹起のラット足浮腫に対する有機錫およびハイドロコチゾンの抑制効果

表 3.9.1 ヒトに利用される主な免疫能パラメーター

(A) 細胞性免疫能

- 1) 末梢血リンパ球
末梢血T細胞数 (T_G, T_M の絶対数と比率)
- 2) 末梢血リンパ球幼若化反応
mitogen (PHA, ConA, PWM など) による反応
混合リンパ球培養
免疫抑制細胞 (単球, T細胞) の活性
- 3) リンパ球内酵素活性 (adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase)
- 4) 遅延型皮膚反応
前感作を要するもの
DNCB (接触性皮膚炎), PPD (ツベルクリン反応)
その他いわゆる recall antigen として Candida, mumps, SK-SD, dermatophyton など
前感作を要しないもの
PHA 皮膚反応
- 5) 標的細胞障害試験 (cytotoxicity)
 - a) 非特異的細胞障害試験: natural killer (NK) 細胞, マクロファージ
 - b) 抗体依存性細胞障害試験: K細胞, マクロファージ
 - b) mitogen 刺激リンパ球による細胞障害試験

(B) 液性免疫能

- 1) 末梢血リンパ球
末梢血B細胞数
- 2) 血中免疫グロブリン量 (IgG, IgM, IgA)
- 3) 血清補体価
- 4) 液性免疫抑制因子の測定
- 5) 抗体産生能
SRBC に対する抗体ブランク形成 (PFC) 反応 (IgM 産生の測定)
- 6) 末梢血リンパ球幼若化反応
mitogen (LPS など) による反応

(C) マクロファージ機能

- 1) 細胞数 (非特異的エステラーゼ染色細胞)
- 2) 食作用
- 3) 腫瘍細胞障害作用
- 4) マクロファージ遊走阻止試験 (MIT)
白血球遊走阻止試験 (LMIT)
(がん組織からの抽出抗原に対して)
- 5) 酵素活性 (ectoenzyme)

表 3.9.2 実験動物において利用される免疫能パラメーター

(A) 組織病理所見

- 1) 血液学検査: 免疫担当細胞の数の算定, リンパ球の subpopulation (末梢血リンパ球, 胸腺細胞, 骨髄細胞)
- 2) 体重あたりの相対的臓器重量の測定: 胸腺, 脾臓, 膝窩リンパ節, ファブリーキウス嚢, 副腎, 肝臓, 腎臓, 睾丸。
- 3) 組織病理学的検査: リンパ組織, 胸腺, 脾臓, 骨髄, 副腎, 肝臓, 腎臓など
酵素組織化学的検査 (マクロファージの非特異的エステラーゼ染色など)
免疫組織化学的検査 (細胞内免疫グロブリン, 細胞表面抗原の酵素免疫法による染色など)

(B) 細胞性免疫能

in vivo

(表 3.9.2 つづき)

1) 遅延型過敏反応

- a) 接触性皮膚炎
- b) ツベルクリン反応
- 2) 同種異系移植片拒絶反応
- 3) 移植片対宿主反応
- 4) *Listeria monocytogenes* 感染に対する抵抗性
- 5) NK (natural killer) 細胞活性

in vitro

- 1) mitogen (PHA 及び Con A) によるリンパ球幼若化反応
- 2) 混合リンパ球培養によるリンパ球幼若化反応
- 3) モルモット赤血球を用いるロゼット形成能

(C) 体液性免疫能

in vivo

- 1) SRBC に対する胸腺依存性抗体産生
- 2) LPS に対する胸腺非依存性抗体産生

in vitro

- 1) ブラーク形成 (PFC) 反応
 - a) T細胞依存性抗原 (SRBC) に対して
 - b) T細胞非依存性抗原 (LPS) に対して
- 2) mitogen (LPS) によるリンパ球幼若化反応

(D) マクロファージ機能

in vitro

- 1) 炭素粒子に対するマクロファージの食作用
- 2) 腹腔細胞数及び非特異的エステラーゼ染色細胞数の測定
- 3) マクロファージ遊走阻止試験 (MIT)
白血球遊走阻止試験 (LMIT)

(E) アレルギー反応

- 1) 即時型 (アナフィラキシー型) 過敏反応
好塩基球, 肥満細胞
IgE 測定
- 2) 遅延型 (細胞性免疫型) 過敏反応
接触性皮膚炎
ツベルクリン反応
同種移植片拒絶反応
- 3) 細胞障害型 (抗体依存性)
マクロファージ, 多形核白血球
IgE, IgM の測定
- 4) 抗原抗体複合体型 (Arthus 型)
多形核白血球, 血小板
IgG, IgM の測定

(F) 自己抗体産生

血清中抗核抗体, 抗 DNA 抗体

(G) 易感染性

in vitro

- 1) 好中球, マクロファージの食作用
- 2) 感染細胞に対する細胞障害試験: 細胞障害性 T細胞, 活性化マクロファージ, キラー細胞

(表 3.9.2 つづき)

3) 抗体産生

(H) 発がんおよび制がん

in vivo

- 1) マウス皮膚での二段階発がん (イニシエーションおよびプロモーション) システム^{48, 52-58}。
- 2) 各種担がん動物による制がんスクリーニングシステム^{6, 46-49}。
- 3) 免疫監視細胞 (T細胞, 特にK細胞, NK細胞, マクロファージの量ならびに機能測定)

in vitro

- 1) BALB/c 3T3 細胞の幼若化反応
二段階発がん (イニシエーションおよびプロモーション) システム^{48, 52-58}。

らに対してはあら粉 (meal) あるいは固形物として、また、モルモットに対しては 3 mm 小球 (pellet) として調整する。また、ゾンデによる直接胃中投与の場合には不溶性物質はあらかじめ CMC⁵⁾ 中で懸濁した後、投与する。

ラット、マウス、モルモットはプラスチックケージ内で、また、日本うずらはスクリーン底のケージ内で、室温 23°C±2、相対湿度 50~60% の条件下で飼育する。飼料および水は常時供給する。各個体の体重および食餌摂取量は毎週記録する。通常の実験期間は 2~6 週とするが、これは目的に準ずる。

(b) 静脈注射実験 (Intravenous Treatment Studies) 水溶性の被験物質は生理食塩水に溶かすが、水に難溶性、あるいは不溶性の物質に対しては solutio petit あるいは intralipid を溶媒として使う。すなわち、solutio petit 溶液作成の場合は、まず被験物質を 99.5% エタノールに溶かし、次にグリセロールを混ぜ、最終的にこの液を 25-ゲージ針注射筒で蒸留水中に注入しながらよく混ぜる。そして、最終的に 26% エタノール、33% グリセロール、42% 蒸留水となるように調整する。この溶液中の被験物質の結晶の存否は遠心分離 (10,000 g, 10 min) 後、polarization microscopy でチェックする。intralipid 溶液作成の場合は被験物質を 99.5% エタノールに溶かし、intralipid で注意深く混ぜる。この脂肪エマルジョンは最終的には 2% のエタノールを含むように調整するが、約 2 時間は安定である。溶液中の被験物質の結晶の存否は同様に polarization microscopy でチェックする。しかし、一般的には、まず 99.5% エタノールで溶かし、エタノール/生理食塩水=1/2~1/3, v/v となるように注射筒内で生理食塩水と注意深く混ぜるだけで充分である^{1, 2)}。ただし、調整溶液中のエタノールの最終濃度は 20~30% 以下にすべきである (この濃度は動物に影響を与えず、かつ被験物質が結晶を生じない濃度であること)。この調整溶液を、ラットでは尾静脈より、また、ウサギでは耳静脈よりゆっくりと注射する。各個体の体重は注射直前および屠殺直前に記録する。

(c) 腹腔内注射実験 (Intraperitoneal Treatment Studies) 水に難溶性、不溶性物質は、Tween-80/蒸留水/エタノール (1:97:2, v/v) 混合溶媒⁶⁾ あるいは CMC⁵⁾ で浮遊液を作成する。

(d) 皮下注射実験 (Subcutaneous Treatment Studies) 上記 (b) 静脈注射および (c) 腹

腔内注射実験での調整に準ずる。

(B) *in vitro* 実験

(a) 末梢血リンパ球の採取 末梢血リンパ球はヘパリン添加静脈血から Ficoll-Isopaque (Lymphoprep) 比重遠沈法を用いて分離する。本法は現在最も広く使われている方法であり、リンパ球の cytotoxic 活性をみる assay 系においては比重遠沈法操作により影響を受けるとする報告もあるが、mitogen に対するリンパ球幼若化においてはその影響は無視し得ると思われる。胸腺細胞 (T細胞) はまず胸腺を摘出し、ステンレスメッシュ (220 μ) 上でハサミで細かく切りながら RPMI 1640 培養液で洗い出すことによって採取する。骨髄細胞 (B細胞) は、大腿部骨髄窩より RPMI 1640 培養液で洗い出すことによって採取する⁶⁾。

(b) 細胞浮遊液の調整⁶⁾ 採取された細胞はペニシリン (50 U/ml) およびストレプトマイシン (50 μ g/ml) を添加した 2 mM L-glutamine 含有の RPMI 1640 培養液中に浮遊させ、細胞塊 (cell clumps) を除くために 25-ゲージ針を通す。さらに細胞は 2 度洗浄後、5~15% Fetal Bovine Serum (heat-inactivated, 56°C, 30 min) を含む培養液に再浮遊させる。そして細胞数を計測することにより細胞濃度を $1\sim5\times10^6$ cells/ml に希釈調整する。

(c) 被験物質溶液の調整⁶⁾ 水溶性の被験物質は生理食塩水に溶かすが、水に難溶あるいは不溶性の物質はエタノールあるいはジメチルスルフォキシド (DMSO) などに溶かす。ただし、培養液中での溶媒の最終濃度は、エタノールで 0.5% 以下、DMSO で 0.01% 以下とする (この濃度以下では、細胞の生存に影響を与えない)。

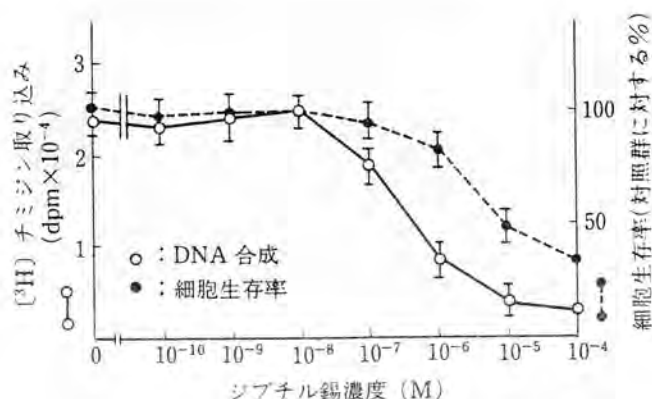
一般的に使用する被験物質の培養液中での濃度は $10^{-8}\sim10^{-4}$ M である。

(d) 細胞生存率 (Cell Viability)⁶⁾ 細胞生存率は白血球用メランジュールを用いて一定量 (0.1ml) のリンパ球浮遊液を吸い取り、0.05% nigrosin 生理食塩水溶液あるいは 0.04% エリスロシン (erislosin) PBS 溶液 (1.0 ml) で希釈かつ染色後、染色したリンパ球 (死細胞) を白血球用血算板 (Bürker) を用いて測定する。細胞生存率は一視野における総細胞数に対する生細胞数の割合 (%) で表わす。

(e) 総細胞数⁶⁾ 白血球用メランジュールを用いて一定量の細胞浮遊液 (0.1ml) を吸い取り Turk's 溶液 (1.0 ml) で有核細胞を染色後、白血球血算板を用いて測定する。

(C) 体重あたりの相対的臓器重量の測定

投与実験終了直後、各個体の体重を測定し、屠殺する。解剖後、胸腺、脾臓、膝窩リンパ節、ファブリーキウス嚢、副腎、肝臓、腎臓などの臓器重量を測定し、体重あたりの相対的臓器重量の変化を記録する。本法は動物を用いる実験の中で、被験物質と免疫系とのかかわりを総合的にかつ直接的に把握できる、最も有効な検索法の一つである。すなわち被験物質の免疫担当器官 (胸腺、脾臓、膝窩リンパ節、骨髄など) への傷害を直接的に把握できる。特に、胸腺は細胞性免疫の中核臓器であり、かつ最初に出現するリンパ臓器である。この胸腺の相対的体重変化、例えば萎縮や肥大を確認できれば、T細胞の分化・成熟過程での障害、それに伴うT細胞介在性の免疫機能の障害



胸腺細胞 (1×10^6 cells/ml) は種々の濃度 ($10^{-10} \sim 10^{-4}$ M) のジブチル錫と24時間培養され、 $[^3\text{H}]$ チミジンはハーベットの4時間前に添加された。

図 3.9.6 胸腺細胞の DNA 合成および細胞生存率に対するジブチル錫の影響

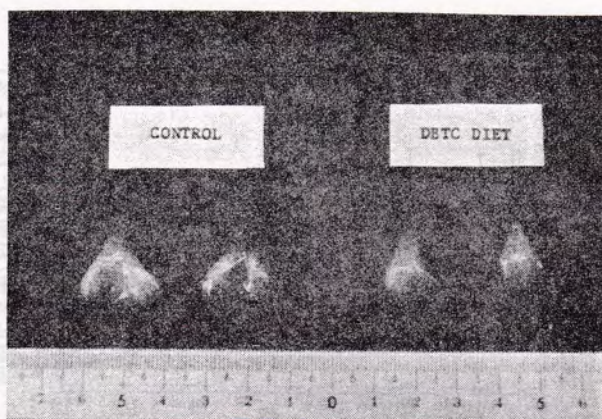
などが容易に推測できる。ただし、この胸腺萎縮には、グルコルチコイドの遊出増大によるストレス⁸⁾、いわゆる“Starry sky”現象（例えば、マクロファージによる核濃縮リンパ球の食作用など）に由来する間接的な萎縮もあり、(1) 副腎摘出動物および非摘出動物による比較、(2) 副腎の相対的重量の変化、(3) 副腎皮質の活性亢進による組織学的変化や、(4) 胸腺皮質のリンパ球破壊の有無などのチェックが必要である。そしてまた、被験物質の免疫系へのより特異的な影響を把握するには、少なくとも動物の成長や食餌摂取量が被験物質によって影響を受けないような条件、すなわち他の毒性が発現しないような条件下で実験を行うべきである。

有機錫特にジブチル錫⁹⁻¹⁴⁾やジオクチル錫¹⁵⁾は選択的に、かつ著しく胸腺萎縮を誘発する（図 3.9.7）。この胸腺萎縮は 100 ppm ジブチル錫含有 NMF 固形飼料経口投与の場合 1 週間以内で観察され、対象群の40%にまで低下する（カゼイン飼料の場合はジブチル錫 5 ppm 含有で同程度に低下する）。しかし、正常食に戻るとこの萎縮は速やかに回復する。この萎縮現象は量依存性であり、かつ可逆性である（図 3.9.8）。

(D) 組織病理学的検査

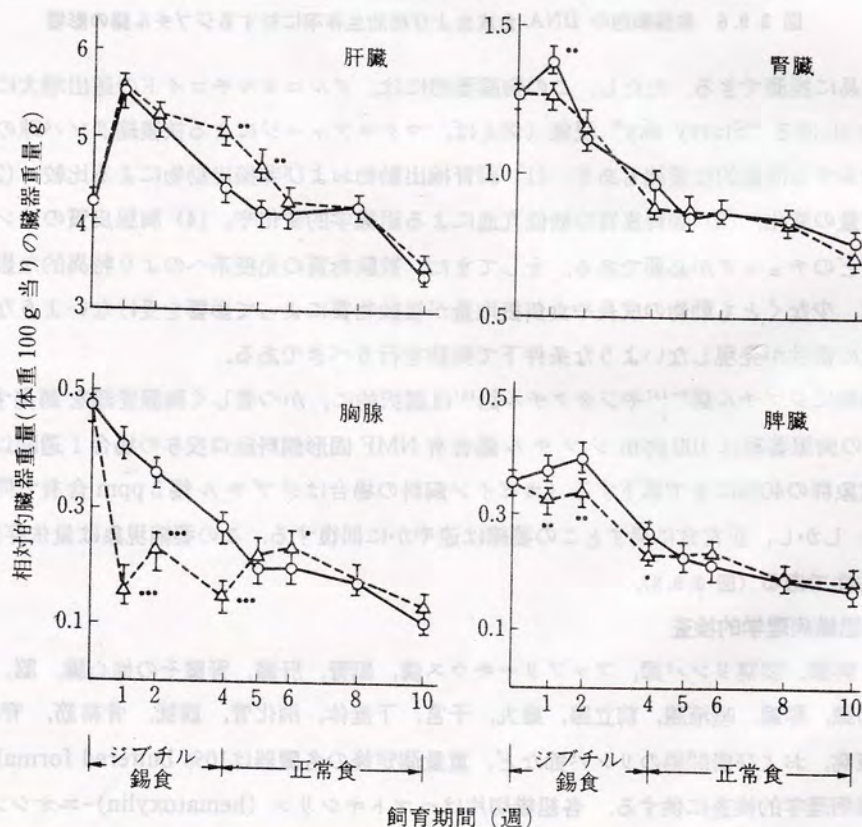
胸腺、脾臓、膝窩リンパ節、ファブリーキウス嚢、副腎、肝臓、腎臓その他心臓、脳、性腺、甲状腺、肺臓、膵臓、唾液腺、前立腺、睪丸、子宮、下垂体、消化管、膀胱、骨格筋、脊椎コード、乳腺、腋窩、および腸間膜のリンパ節など、重量測定後の各臓器は10% buffered formalin で固定し、組織病理学的検査に供する。各組織切片はヘマトキシリン (hematoxylin)-エオシン (eosin) および PAS など検査目的に合った色素で染色する。それぞれの詳しい手法については他の成書を参照されたい。

胸腺は、組織学的には、主に上皮性の構造を有する細胞とリンパ球成分とから成っており、この上皮性成分が胸腺内 T リンパ球の分化成熟を調節している。そして、胸腺実質は薄い結合組織性の被



Wistar 系幼若ラット（3週齢，40～45g，雄性）は正常食（NMF 固形飼料）および 100 ppm ジブチル錫含有飼料で2週間飼育された。左側：対照群，右側：投与群

図 3.9.7 ジブチル錫による胸腺の萎縮



Wistar 系幼若ラット（3週齢，40～45g，雄性）は初めの4週間，100 ppm ジブチル錫含有飼料にて飼育され，その後6週間は正常食（NMF 固形飼料）で飼育された（Δ：100 ppm 投与群）。対照群（O）は終始，正常食で飼育された。

・： $p < 0.05$ ，・・： $p < 0.01$ ，・・・： $p < 0.001$ 。

図 3.9.8 ジブチル錫経口摂取による相対的臓器重量の変化

膜と、さらにそれから小葉間にのびた結合組織によって囲まれている。これら結合組織内には血管、リンパ管、神経、組織肥満細胞、骨髓球、脂肪細胞などが認められる。胸腺実質はリンパ球が主として密集している皮質と、リンパ球が比較的少ない、いわゆる細網細胞および比較的太い血管の多い髄質とに分けられる。そして、髄質には胸腺特有のハッサル小体 Hassall's corpuscle が散在する。この胸腺は加齢とともに胸腺実質が皮質から次第に減少して脂肪組織に置き換えられていく。この生理的な退縮はさらに飢餓、感染、X線照射、副腎皮質ステロイド剤の影響など種々の原因による病的退縮が加味される。この病的退縮の本質的な変化としては、リンパ球系細胞の減少と細網細胞の相対的増加が挙げられる。

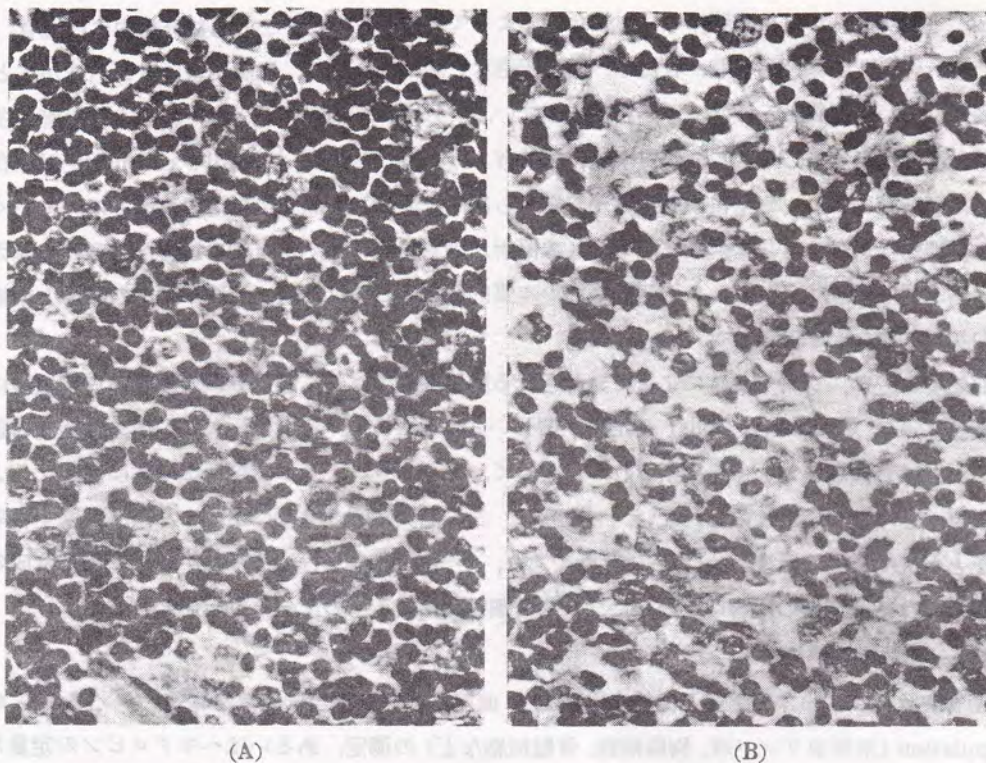
前述のように、ジブチル錫によって誘導される胸腺萎縮では特に細胞分裂の激しい皮質領域におけるリンパ球 (immature cells) の消失が著しい (図 3.9.9)⁹⁻¹⁴⁾。しかし、この消失は程度の差はあるが、髄質領域においても観察される。そして、グルココルチコイドの遊出増大に起因するような皮質リンパ球の破壊はみられない。ちなみに、この消失は図 3.9.6 に示すように、細胞生存率の低下と DNA 合成の阻害が共に量-依存性であり、かつ互いに平行することから、DNA 合成の阻害さらには細胞増殖の阻害に起因した二次的な細胞死によるものであらうと思われる。

(E) 血液学的検査

動物実験では、投与実験終了直後に採取した血液は、免疫担当細胞数の算定、リンパ球の sub-population (末梢血リンパ球、胸腺細胞、骨髓細胞など) の測定、あるいはヘモグロビンの定量などに供す (図 3.9.2 参照)。また、ヒト血液では T 細胞と B 細胞、さらに T 細胞群では細胞表面に免疫グロブリン G をもつ T_G 細胞と免疫グロブリン M をもつ T_M 細胞の絶対数とその比率を算定する。また、血清を用いて Technicon Autoanalyzer method (N 9 a) による glucose の定量、automated phenazonediacetylmonoxime technique による血中尿素窒素の定量¹⁶⁾、glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) 活性や glutamic-pyruvic transaminase (GPT) 活性の測定¹⁷⁾、alkaline phosphatase (AP) 活性の測定¹⁸⁾ などを行う。

(F) リンパ球幼若化反応 (Lymphocyte Transformation あるいは blastoid transformation)

本反応は細胞性免疫の機能を知るパラメーターとしては最も代表的なもので、広く利用されている。通常、多クローン性の活性化が起こる非特異的マイトーゲン (mitogen) を用い、これに対するリンパ球幼若化能の程度を測定することによって免疫能状態を推測する。植物レクチンであるコンカナバリン (Concanavalin A: Con A) やフィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin: PHA) は T 細胞を、また、*E. coli* の細胞壁リポ多糖 (LPS) は B 細胞をそれぞれ活性化する。T 細胞および B 細胞の両方を活性化できるポークウィードマイトーゲン (pokeweed mitogen: PWM) もしばしば用いられる。リンパ球幼若化能はリンパ球の増殖を [³H]-チミジンの取込み (DNA 合成) で測定する⁶⁾。この DNA 合成の増大は 24 時間以後でないと起こらないが、RNA 合成は反応開始 6~8 時間後に活性化するので、[³H]-ウリジンの取込み (RNA 合成) を測定し、判定する場合もある⁶⁾。このリンパ球幼若化反応は再現性に富み、標準化し得る利点を有する。金属曝露における



(B)において完全なリンパ球の消失がみられる。(Hematoxylin-eosin, $\times 400$)

図 3.9.9 対照群ラット (A) および 100ppm ジブチル錫で2週間飼育したラット (B) からの胸腺皮質領域

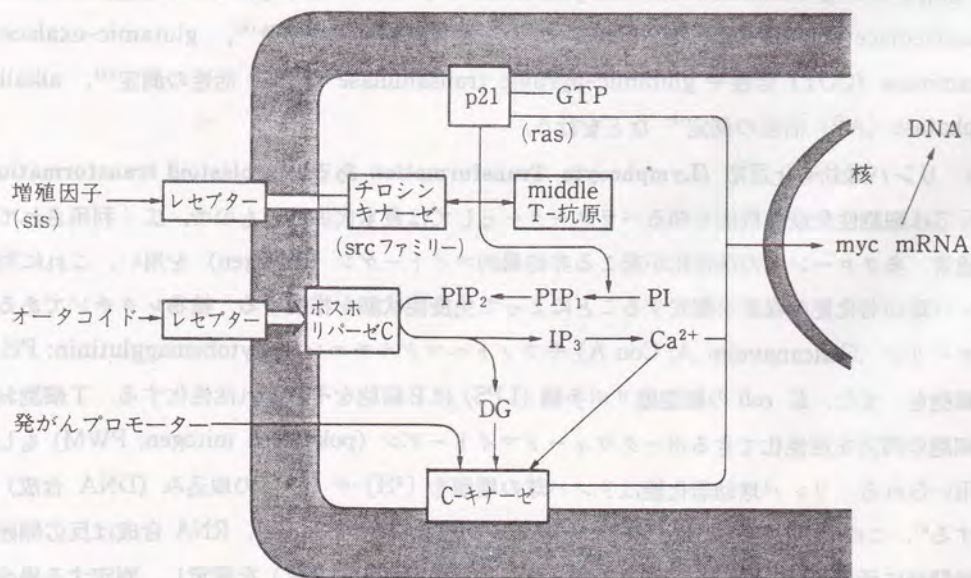
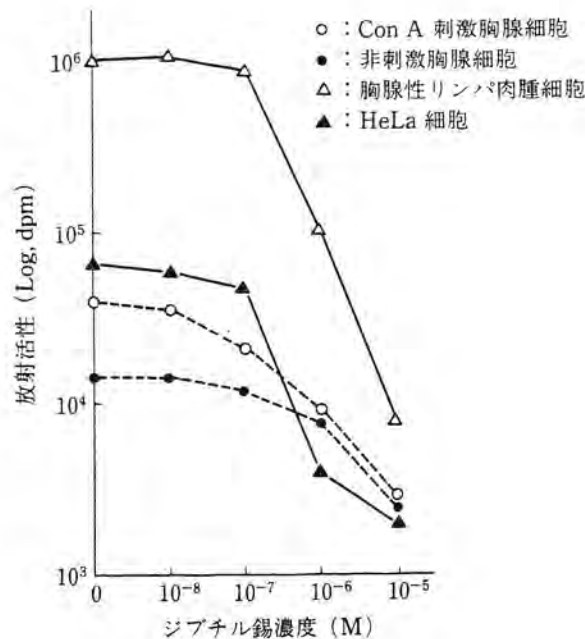


図 3.9.10 細胞増殖とトランスフォーメーション

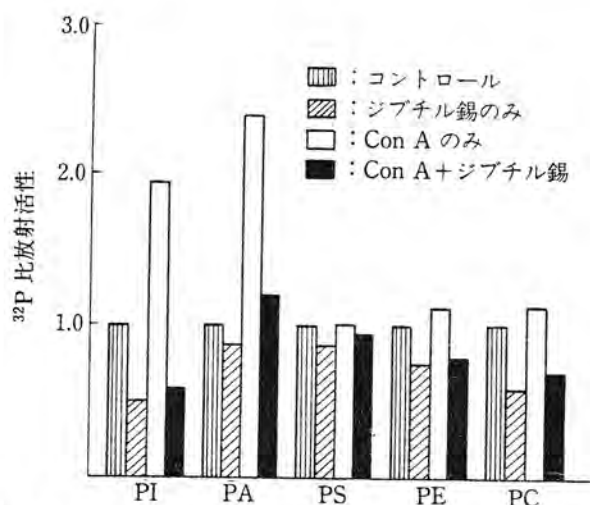
免疫応答修飾の検索法としても有力である。有機錫特にジアルキル錫は末梢血リンパ球や胸腺細胞のT細胞性マイトゲン (Con A あるいは PHA) による幼若化を著しく抑制する^{6, 10-13, 19}。この阻害効果を細胞膜の変化から DNA 合成に至る一連の生化学的初期反応を中心に, *in vitro* において経時的に観察すると, まず DNA 合成や RNA 合成の増大が細胞死を生じないレベル (1×10^{-7} M) のジブチル錫で著しく阻害される (図 3.9.11)。Ca²⁺取込みの増大は阻害されない。リン脂質の合成増大が抑制され, 特にホスファチジルイノシトール (PI) 代謝回転 (図 3.9.12) やアラキドン酸の遊出増大 (図 3.9.13) が抑制される^{6, 20, 45-50}。さらにホスホリパーゼCの基質である PIP₂ の膜におけるオーダーリング (ordering) が有意に増大し (図 3.9.14)^{20, 52-58}, かつホスホリパーゼ A₂ の阻害たん白であるリポコルチンのリン酸化が抑制される (図 3.9.15)^{21, 50, 51}。したがって, このジブチル錫のもつ細胞増殖抑制作用はホスホリパーゼ活性化の阻害を中心とした膜応答系の傷害に起因したものであろう^{45, 58}。

塩化水銀で処理されたマウスにおいてもT細胞性マイトゲン反応が抑制される²²。このT細胞性傷害は, 解糖系の速度制限酵素である胸腺ビルビン酸キナーゼの阻害に関連している。また, カドミウム処理のヒトリンパ球で PHA に対する応答が抑制される²³。鉛曝露においては, T細胞性マイトゲン (Con A, PHA) 誘導の幼若化は影響されず, B細胞性マイトゲン (LPS) に対する応答が抑制される²⁴という報告もあれば, 逆に鉛処理マウスでは Con A や PHA に対する幼若化が増強され, LPS に対する応答は影響を受けないという報告もあり²⁵, 混乱している。しか



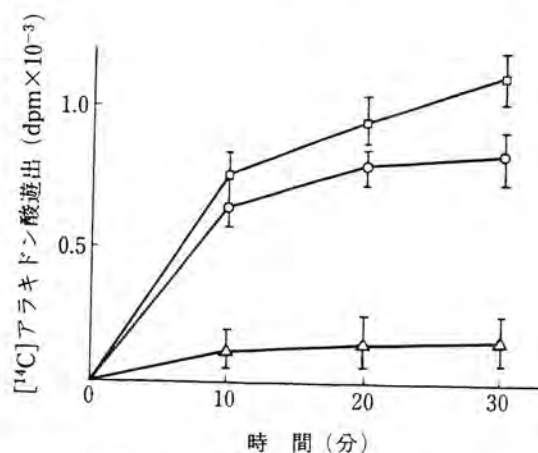
各細胞 (1×10^6 cells/ml) は種々の濃度のジブチル錫と24時間培養され, [³H]-チミジンはハーベットの4時間前に添加された。

図 3.9.11 増殖細胞の DNA 合成に対するジブチル錫の影響



^{32}P -リン酸 ($10\mu\text{Ci}/\text{ml}$) で予めラベルされたラット胸腺細胞 ($3 \times 10^6 \text{ cells}/\text{ml}$) はジブチル錫 ($5 \times 10^{-7} \text{ M}$) および Con A ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) の存在, 非存在においてさらに5分間インキュベートされた。各リン脂質成分の値はコントロールを1とした比放射活性で表している。
 PI: ホスファチジルイノシトール, PA: ホスファチジン酸, PS: ホスファチジルセリン,
 PE: ホスファチジルエタノールアミン, PC: ホスファチジルコリン。

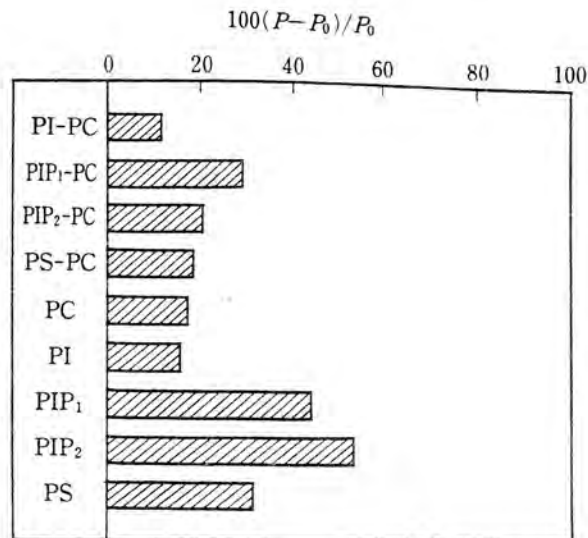
図 3.9.12 リン脂質代謝に対するジブチル錫の影響



[^{14}C] アラキドン酸の遊出は 10^{-6} M ジブチル錫 (Δ) および 10^{-6} M モノメチル錫 ($\square$) の存在ならびに非存在 ($\circ$) において Con A ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激後, 経時的に測定された。図中の各測定値はそれぞれの時間における Con A 非刺激の場合の値で補正されている。

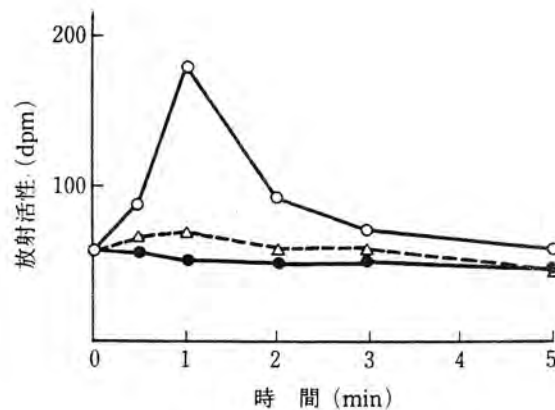
図 3.9.13 アラキドン酸遊出に対するジブチル錫の影響

し, *in vivo* での慢性低レベル曝露は首尾一貫して免疫応答の抑制と関連している。臨床的には, がんの進行度が PHA に対するリンパ球幼若化能と相関しており, マイトーゲン反応低下の著しい症例は予後不良のことが多い。リンパ球幼若化能は, 他の免疫状態を知るパラメーターとしても利用され得る。その一つは血清中に存在する免疫抑制因子の存在を検索する方法である。例えば担がん



DPH を含む各リン脂質ベシクルはジブチル錫 (10^{-4} M) の存在, 非存在において 25°C で 5~7 分間インキュベートされた。メンブレンオーダーは fluorescence polarization によって測定され, 各測定値の変化の割合 $100(P-P_0)/P_0$ として表わされている。すべてのリン脂質ベシクルは総量として $18\mu\text{g/ml}$ のリン脂質を含む。混合ベシクルの場合, PC に対する各リン脂質の比は $1/2$ である。

図 3.9.14 種々のリン脂質ベシクルのメンブレンオーダーに及ぼすジブチル錫の影響



(●) コントロール, (○) fMet-Leu-Phe,
(Δ) ジブチル錫+fMet-Leu-Phe

^{32}P で予めインキュベートされた好中球はジブチル錫 (10^{-7} M) の存在, 非存在において fMet-Leu-Phe (10^{-8} M) で刺激された。 ^{32}P -ラベルされたリポコルチンは全身性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus, SLE) の患者の血清によって免疫沈殿する。

図 3.9.15 リポコルチンのリン酸化に及ぼすジブチル錫の影響

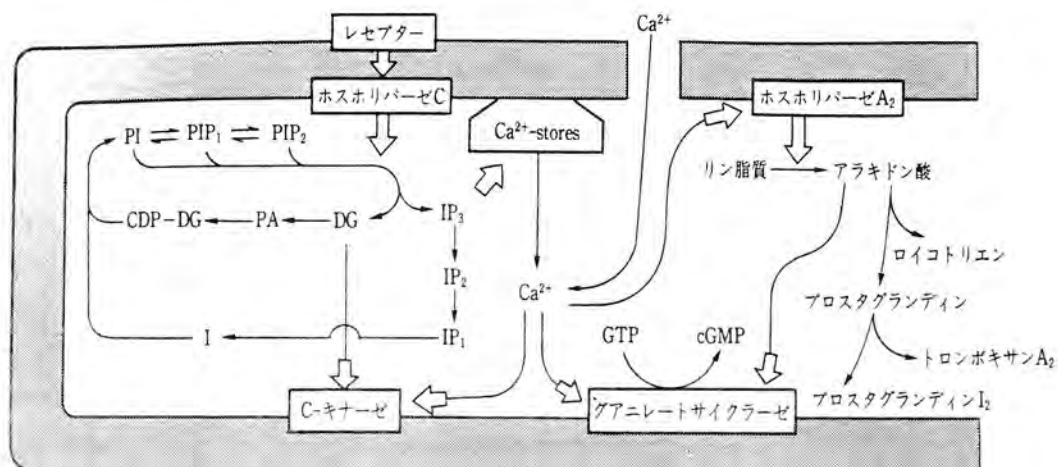


図 3.9.16 リン脂質代謝回転および Ca^{2+} 動員と共役する情報伝達系

に伴う免疫抑制因子の出現が報告されている²⁶⁾。他の一つは Con A にて前処理された免疫担当細胞のリンパ球幼若化反応に対する抑制能を測定することに使われる。例えば、マイトゲンである Con A は末梢血単核細胞と培養することにより、非特異的な免疫抑制作用を有する細胞を誘導し得る。すなわち、免疫抑制能活性の獲得をチェックすることができる。以下に、一般的なマイトゲン誘導によるリンパ球幼若化反応の実験例を示す。

試験管に (B)(b)(p. 126) のように調整したリンパ球浮遊液を $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml 入れ、マイトゲン (PHA の場合: $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, Con A の場合: $5 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加え、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター内で 72 時間培養する。培養開始より 48 時間後、 $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の $[6\text{-}^3\text{H}]$ -チミジン ($5.0 \text{ Ci}/\text{mmol}$, RCC Amersham, England) を加え、さらに 24 時間培養する。培養終了後、リンパ球は Acrodisc filter ($1.2 \text{ m}\mu$, Gilson 社) 付注射筒で吸引採取するか、またはセルハーベスター (ミニマッシュ AM 78, Dynateck 社) でガラスフィルター上に吸着させる。10% トリクロル酢酸 (TCA) で細胞を洗浄後、0.6 ml の Soluene-350 (Packard 社) および 5 ml の Dimilume-30 (Packard 社) のシンチレーターで均一融解した後、液体シンチレーションカウンター (Packard 社) で、その放射活性を測定する⁶⁾。

また、微量培養のためにはマイクロテストプレート (Falcon 社) の小穴 (well) 中に 4×10^5 cells/0.15 ml のリンパ球浮遊液を分注し、試験管法と同じ条件で 72 時間培養する。微量化の場合のマイトゲンの至適濃度は、PHA (PHA-P, Difco Lab., Detroit, Mich.) で $5 \mu\text{g}/\text{well}$, Con A (Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio) で $2 \mu\text{g}/\text{well}$, LPS (Difco Lab., Detroit, Mich.) で $0.25 \mu\text{g}/\text{well}$ である。また、 $[6\text{-}^3\text{H}]$ -チミジンは well あたり $0.25 \mu\text{Ci}/20 \mu\text{l}$ medium を加える。

(G) 混合リンパ球培養 [mixed lymphocyte reaction (あるいは culture);

MLR あるいは MLC]

本反応は同種のリンパ球を混合して培養すると、主としてT細胞が他方のリンパ球上に存在する抗原を認識して幼若化を示す反応である。この同種抗原はヒトでは遺伝的に HLA の D-locus により支配を受けている。また、マウスでの組織適合抗原は H-2 である。MLR の手技は当初無処置のままリンパ球を混合して行われていたが (two-way), この方式ではどちらが刺激を与え、どちらが刺激を受けて幼若化を示すのか判定することができないため、一方のリンパ球を Mitomycin C 処理や X 線照射して反応をとめて stimulator cell とし、他方を responder cell として用いるのが普通である。

金属曝露における本反応への影響をみると、カドミウム処理のヒトリンパ球において同種異形の MLR が抑制され²³⁾、塩化水銀処理のマウスにおいて MLR 応答が抑制される²²⁾。また、鉛においても抑制がみられる (表 3.9.3)²⁴⁾。以下に動物を用いた MLR を紹介する。

H-2 組織適合因子の異なる 2 種の純系 A および B マウスの脾細胞をとり出し、それぞれの one-way MLR を行う。脾細胞の浮遊液調整は別の項を参照されたい。A マウス脾細胞の B マウス脾細胞に対する one-way MLR では、A および B マウス脾細胞 (15×10^6 cells/0.25 ml) をそれぞれ 2 本ずつ、また、B マウス脾細胞の A マウス脾細胞に対する one-way MLR では同濃度の B および A マウス脾細胞をそれぞれ 2 本ずつ培養試験管に入れる。マイトマイシン C $50 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ を加え、よく混合してからキャップをきつく締めて 37°C 、30 分加温する。加温後 5 ml のハンクス液を加え、よく混合した後、1000 rpm、10 分間遠心し、上清を捨てる。この操作を再度繰り返して細胞を洗う。上清を捨てた後、完全培養液 (RPMI 1640) を 3 ml ずつ加え、これに 15×10^6 cells/0.25 ml の反応細胞を加え、混合した後、キャップをゆるくして 37°C 、80% 湿度、5% CO_2 インキュベーターにて 72 時間培養する。培養終了 24 時間前に各培養試験管に $1 \mu\text{Ci}$ の ^3H -チミジンを加える。培養終了後、セルハーベスターでガラスフィルターに細胞を吸着させ、液体シンチレーションカウンター (Packard 社) で、その放射活性を測定する。

(H) ロゼット形成能 (Rosette Formation)

リンパ球が異種動物の赤血球と結合してロゼットを形成する反応である。

胸腺リンパ球のほとんどすべてがロゼット形成性であり、特にヒツジ赤血球 (SRBC) とのロゼット形成率は末梢血リンパ球に比べて著しく高い。そして、①リンパ組織の胸腺依存性部位にその性質をもつリンパ球が局在すること、②T細胞の特異的マイトーゲンである PHA に反応性のリンパ球がロゼット形成性であること、③細胞表面に免疫グロブリン決定基や補体レセプターをもつリンパ球 (B細胞) とは別の population のリンパ球であることなどから、本反応は大局的にはT細胞の性質を反映しているといえる。

このリンパ球と赤血球との組み合わせはヒトおよび動物の種類によって異なる。例えば、ヒトのリンパ球とロゼットを形成するのは何も SRBC に限らない。サル、ヒト (Bromelain 酵素処理し

表 3.9.3 動物の免疫機能に及ぼす金属の影響

細胞性免疫	影 響			
	ジブチル錫	鉛	カドミウム	水銀
<i>In vivo</i>				
・遅延型過敏反応 (DTH)				
a) ツベルクリン反応	+	+	+	
b) 接触性皮膚炎		+	+	+
・同種異系移植片拒絶反応	+			
・移植片対宿主反応	+			
・ <i>Listeria monocytogenes</i>	+			
感染に対する抵抗性				
・細胞障害能		+	+	
<i>In vitro</i>				
・マイトゲン (PHA および Con A)	+	±	+	+
によるリンパ球幼若化反応				
・混合リンパ球培養による		+	+	+
リンパ球幼若化反応 (MLR)				
・モルモット赤血球を用いる	+			
ロゼット形成能				
体液性免疫				
<i>In vivo</i>				
・SRBC に対する胸腺依存性抗体産生	+			
・ <i>E. coli</i> LPS に対する胸腺	—			
非依存性抗体産生				
<i>In vitro</i>				
・SRBC に対するブランク形成 (PFC)	—	+	+	—
・マイトゲン (LPS) によるリンパ	—	±		
球幼若化反応				
炭素粒子に対するマクロファージの食作用	—	±	±	

たもの)、イヌの赤血球がかなり高い反応性を示し、モルモット、マウス、ウサギ、トリのものでも程度は弱いがロゼットを作る。また、ラットリンパ球ではモルモット赤血球がよい。以下に、基本的な試験管法を紹介するが、微量化する場合によってはマイクロプレート法^{27, 28)}をお勧めしたい。

リンパ球浮遊液 (5×10^5 cells/0.1ml 牛胎児血清) と SRBC (2×10^7 cells/0.1ml 牛胎児血清) とを同量混合し、室温ないし 37°C で 5 分間反応させた後、 $200 \times g$ で 5 分間ゆるく遠沈し、試験管をそのまま 4°C 冷蔵庫あるいは氷水中で 1 時間 (あるいは実験の都合で over night) 静置する。上清を捨て、牛胎児血清 0.1ml を加えて cell pellets をゆるやかに再浮遊させた後、0.1% トルイジンプール溶液 1 滴を加える。表面に SRBC が 3 個以上結合している有核細胞をロゼット陽性細胞と判定し、試験管あたりの有核細胞総数 100 個に対するロゼット形成細胞数の比率を算定する。このとき、トルイジンプールを加えるところで、浮遊液をスライドガラスに 1 滴とって同時に塗抹標本を作り、Giemsa あるいは peroxidase 染色して、非リンパ球細胞 (主として単球) の混入率を算定しておくと、次式に従って全リンパ球に対するロゼット形成リンパ球の比率 (%C) がより

正確に算定できる。

$$C = \frac{A}{100 - B} \times 100$$

A (%) : ロゼット陽性細胞, B (%) : リンパ球以外の細胞の混入

一般に頻用される比重遠心法で得られたリンパ球 preparation には単球が混入している (健康正常人血液中のリンパ球と単球の比率は 6:1 ぐらい)。がん患者などでリンパ球減少症があれば、さらにこの単球の比率は無視できない。したがって、正確にリンパ球中の T 細胞の比率を算出するためには、混在するリンパ球以外の細胞を差引いて算出する必要がある。

ロゼット形成は 37°C だけの反応では良い結果は得られず、低温 (4°C あるいは氷水中) での反応を併用する。ただし、赤血球と混合後、直ちに低温にするよりも室温ないし 37°C で 5 分ほど置いた方がよい。また、培養液は生理食塩水 (Saline) あるいは血清 (牛胎児血清: fetal calf serum, FCS がよい) を用いる。欧米では一般に生理食塩水で良い結果を得ているが、本邦ではむしろ血清を使用した方がよいという報告が多い。いずれにせよ、血清の存在は反応を安定化させるようである。

ヒト胸腺細胞を用いた *in vitro* での有機錫曝露実験では、ジブチル錫 0.5 µg/ml、あるいはジオクチル錫 12.5 µg/ml の濃度 (これらの濃度は cell viability に影響を与えない) において、SRBC とのロゼット形成が著しく抑制される。また、100 ppm ジブチル錫含有 NMF 固形飼料で 1 週間以上飼育したラットからの胸腺細胞のモルモット赤血球とのロゼット形成も、対照群の 1/2 以下に抑制される (表 3.9.3)^{10,13)}。

(I) リンパ球内の酵素活性の測定

リンパ球の細胞内代謝、とりわけ酵素系に異常があれば、その結果としてリンパ球の分化、成熟あるいは免疫機能が障害されるであろうことは十分予想される。したがって、リンパ球の機能を酵素活性でもって測定し、診断パラメーターに応用する。原発性免疫不全症がリンパ球の adenosine deaminase (ADA) 活性欠損を伴うことに着目し、この ADA 活性^{29,30)}と purine nucleoside phosphorylase (PNP)^{31,32,33)}を測定する。臨床的には肺がん患者からの末梢血リンパ球 ADA 活性は健常者に比し低く、PNP 値は高値を示す。また、ADA/PNP 比にて両群を比較すると、担がん患者群では著しい低値を示す。両酵素の活性化の意味するところは今後の検討が必要とされるが、免疫能パラメーターの一つとして用いることができよう。

有機錫曝露の場合、*in vivo* (例えば、ラットにおける 100 ppm ジブチル錫、1 週間以上の経口投与) および *in vitro* (リンパ球と 10⁻⁷~10⁻⁶ M ジブチル錫との培養) の実験において、胸腺細胞ならびに末梢血リンパ球の ADA 活性は、ともに対照群の 1/2 以下に低下する。

(J) 遅延型皮膚反応 (Delayed-Type Hypersensitivity; DTH 反応)

本反応は細胞性免疫能をチェックできる代表的指標の一つで、その手技の簡便さから広く用いられている。前感作を要するものとして代表的なものに dinitrochlorobenzene (DNCB) に対する接触性過敏反応がある。本反応は定量性に富む利点を有するが、判定までに 2 週間を要すること、局

所における副作用（癬痕および色素沈着）を残す欠点がある。臨床的に DNCB 皮膚反応の測定はがん患者などの予後の推察に役立つ。他にツベルクリン (PPD), *Candida*, mumps, SK-SD, dermatophyton などの recall antigen による皮膚反応がある。しかし、これら recall antigen に対する生体の反応性は自然感作の程度にも影響され、一様ではない。したがって、現在のところ細胞性免疫能の把握には DNCB 反応と共に recall antigen をいくつか組み合わせて施行し、総合判定する方法がとられている。そして、これら反応の程度が免疫療法剤による反応効果や予後と相關することから、それらの判定に利用される。この DTH 反応は金属曝露における免疫応答修飾の評価にも利用することができる（表 3.9.3）。ジブチル錫やジオクチル錫のようなジアルキル錫は 100 ppm, 1 週間以上の連続経口投与でラットに著しい胸腺萎縮を誘発するが、このとき DTH 応答を始め皮膚移植片拒絶反応、移植片対宿主反応 (graft versus host responses), T 細胞性マイトゲンによる幼若化反応など T リンパ球介在性の免疫応答が著しく抑制される [表 3.9.3 (p.136)]。カドミウム曝露を受けたマウスでは DTH 応答の開始が阻害されるが、進行中の DTH 応答も抑制される³⁴⁾。また、鉛処理のラットやマウスにおいてもこの DTH 応答は抑制される。

また、鉛、金、銀、白金、カドミウム、水銀、ニッケル、コバルト、クロムなどの金属はそれぞれ自体で接触性皮膚炎の過敏症を誘発する³⁵⁾。

一方、感作を要せず、簡便にかつ反復して宿主免疫能全般を知る方法として、PHA 皮膚反応がある。T 細胞の非特異的な mitogen である PHA は皮内注射 24~48 時間後に紅斑および硬結径がピークを示す皮膚反応を生じる。本反応も他の細胞性免疫能パラメーター（リンパ球幼若化能, DNCB 反応）とよく関連した動きを示す。そして、臨床的にはがんの進行度や予後の推察に役立つが、金属による免疫応答修飾の把握にも利用できるものと思われる。以下に動物実験において頻用されるツベルクリン遅延型過敏反応についてその実験例を紹介する。

ツベルクリンに対する遅延型過敏反応 (Delayed-Type Hypersensitivity to Tuberculin)

雄性 Wistar 系ラットや雌性モルモットを被験物質を含む試験飼料で 3 週間飼育した後、完全 H-37 Ra アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) の 0.1ml をうしろ足裏の膨らみ (food pad) に皮下注射し、前感作を行う³⁶⁾。そして、遅延型過敏反応はツベルクリン (PPD) の皮内注射によって試験する。すなわち、ラットの場合は実験開始より 5~6 週間後に PPD の希釈液 0.1ml 中 10 μ g で、また、モルモットの場合は 5~7 週間後に PPD の 2.5 μ g でそれぞれ皮膚テストを行う。皮膚反応の腫脹（直径や厚み）は PPD テストの 24 および 48 時間後にカリパー (caliper) あるいはノギスで測定する。実験終了後、動物を屠殺し、胸腺、脾臓、副腎、活性化した膝窩リンパ腺などの重量を測定する。そしてまた皮膚反応部位を採取し、組織病理学的検査に供する。

本反応は、細胞性免疫能をチェックするために *in vivo* においてよく使われる検索法の一つである。この遅延型アレルギー反応には、T 細胞とマクロファージが関与する。抗原を認識した T 細胞は二次感作の際に増殖し、MIF (macrophage inhibitory factor) を放出する。この放出によっ

て抗原注射部位に集まってきたマクロファージが血管から滲出し、周辺組織を破壊する。そのために発赤、腫脹が生ずると考えられている。

(K) 同種異系移植片拒絶反応 (Allograft Rejection)

近親交配の Wistar (WAG) および (WAG×B) F₁ ハイブリッドラットを用いる。二つの供与体として Wistar (WAG×B) F₁ ハイブリッドラットからの尾-皮膚移植片をジエチルエーテルで麻酔した受容体の WAG ラットの尾移植床に移植する³⁷⁾。二つの系統間の皮膚同種異系移植片はおよそ10日後に拒絶されるので、この親である WAG および B 系統は一つの重要な組織適合性部位で明らかに異なる。さらにこの拒絶過程の検討をより容易にするために、自己移植片を移植する。動物が移植片を取り除かないようにグラスチューブを尾にはめ、3日後に取り除く。移植片の状態を毎日立体顕微鏡で観察し、首尾よく移植できた移植片に対する同種異系移植片拒絶反応の時間を測定し、二つの同種異系移植片に対する平均拒絶時間を算出する。

(L) 標的細胞障害試験 (Cytotoxicity)

細胞性免疫能を検索する方法の一つである。理想的には特異抗原をもつ細胞に対する免疫担当細胞の特異的細胞障害能を測定できればよい。例えば、生体のもつがんに対する抵抗力を的確に知るにはがん細胞を標的とする細胞障害試験が最も有効である。しかし、臨床的にがん特異抗原が十分判明していない現状では測定不可能である。したがって、生体のもつ非特異的な細胞障害能の測定に頼らざるを得ない。現在、主に免疫能パラメーターとして使われている細胞障害試験としては、表 3.9.1 (p.123) のように三つに分けられる。その中で、natural killer (NK) 細胞およびマクロファージによる非特異的細胞障害試験が最も注目されており、生体防御機構における多くの情報を提供している。ヒト NK 細胞は末梢血および脾に主として存在し、インターフェロンの調節を受け、免疫学的監視機構を担う重要な細胞である。一方、マクロファージは細胞性免疫反応において重要な働きをする T 細胞分泌のリンホカイン、ならびに種々の細菌製剤などにより活性化され、抗腫瘍性を獲得し得る。

他に、細胞障害性試験として、抗体依存性細胞介在性反応 (antibody dependent cell mediated cytotoxicity; ADCC) およびマイトゲン (PHA) 依存性細胞介在性反応がある。前者の ADCC は抗体に感作された細胞が Fc レセプターを保有する細胞により障害を受ける反応である³⁸⁾。すなわち、ADCC は Fc レセプターを介するものであり、食食細胞 (単球-マクロファージ) ならびにリンパ球 subset の一つである null cell が担当細胞 (K 細胞) とされている。この反応はがん患者や全身性エリテマトーデス (SLE)、慢性関節リウマチ (RA) など自己免疫疾患において低下する。後者の PHA 依存性細胞障害反応は T 細胞と adherent 細胞との関与が示唆され、がんの進展につれて低下する。以上のように、例えば、がん細胞を標的としての細胞障害反応を考えてみても、この反応は担がん生体の免疫能の変動を抗腫瘍活性という面から把握し得る点で重要である。しかし、細胞障害性反応は測定法の段階で標的細胞の選択、免疫担当細胞の調整法などの因子によって影響を受けることから、いくつかの解決すべき問題を残している。

金属曝露によるこの反応への影響についてはカドミウムや鉛でよく検討されており、カドミウム処理マウスでは肉腫がん細胞に対するマクロファージ介在性の細胞障害能が著しく低下している³⁹⁾。逆に、鉛処理マウスではマクロファージの食食活性そのものは著しく低下するが、同種異系のがん細胞に対する細胞障害能は変化しない⁴⁰⁾。そして鉛曝露マウスでは、MSV-あるいはMSB-誘導がんに対する細胞障害能はむしろ増大する〔表 3.9.3 (p.136)]⁴⁰⁾。

この細胞障害能の活性増大はおそらく初期がんの増殖増大と関連する抗原表現の増大に起因したものであろう。

- (1) 胸腺あるいは末梢血リンパ球 (2.5×10^5 cells/0.05 ml) に 0.05 ml の抗T血清 (実験群) あるいは正常ウサギ血清 (対照群) を混合し、37°C、10分間培養した後、さらに補体としてモルモット血清を 0.01 ml 加え 30 分間培養する。0.5%トリパン青染色法により染色細胞 (死細胞) の割合を算定し、次式を用いて細胞障害率 (cytotoxic index) を算出する。

$$\text{C.I. (\%)} = \frac{\text{実験群可染\%} - \text{対照群可染\%}}{100 - \text{対照群可染\%}} \times 100$$

- (2) 一般的には ^{51}Cr 遊離試験法を利用する。すなわち、あらかじめ標的細胞となる細胞を ^{51}Cr で標識 (^{51}Cr を取り込ませる) し、Nunc 社製U型マイクロプレートのウェル内で、 10^4 個の標的細胞と 50×10^4 個の検討したい細胞 (エフェクター細胞) とを 0.2 ml の10%牛胎児血清加 RPMI 1640 培養液中に混合したものを、guarduplicate ずつ作り、8~12時間 37°C で培養後、標的細胞から、放出された ^{51}Cr を含む培養上清を Titer-tec 社の Supernatant Collection System で採取し、ウェルタイプガンマカウンターで測定する。標的細胞からの ^{51}Cr の自然放出 (Spontaneous Release) は標的細胞を試験用培養液とのみ培養したものから、また、最大放出 (Maximum Release) は 0.5% NP-40 と培養したものから得る。Percent Cytotoxicity は下記の式によって計算する。

検索目的によって異なるが、標的細胞には種々のがん細胞、自己白血病細胞、マイトーゲンにより幼若化したリンパ球などが用いられ、また、エフェクター細胞には natural killer 細胞、マクロファージ、K細胞などの免疫担当細胞が用いられる。また、標的細胞の免疫学的な意味での感受性をみたいときには、それぞれの試験において標的細胞の HLA タイプが明らかになっている場合には抗 HLA 抗体を用いた ADCC 反応を、また不明である場合には抗ヒトリンパ球抗体を用いた ADCC 反応を併せて検討する。

Percent Cytotoxicity

$$= \frac{\text{Test Release} - \text{Spontaneous Release}}{\text{Maximum Release} - \text{Spontaneous Release}} \times 100$$

(M) 抗体産生能 (Antibody Formation)

プラーク形成細胞試験 (Plaque forming cell assay: PFC Assay) 被験ラットに20%ヒツジ赤血球 (Sheep red blood cell; SRBC) 浮遊液の 0.5 ml を実験終了日から数えて5日前に i. p.

投与し、感作する。Alsever's solution の SRBC 浮遊液は3度洗浄する。一次の直接（おそらく IgM）PFC 反応は、Jerne および Nordin の方法⁴¹⁾に従って測定する。まず、脾臓の重量を測り、それを一定量の cold Eagle's medium 中でハサミで細断する。この組織細片を 225 μ のステンレスメッシュ（あるいはナイロン篩）に通した後、さらにこの細胞浮遊液を25-ゲージ針の注射筒で吸引して細胞の塊を除く。細胞浮遊液は Eagle's medium で 1/10 および 1/40 に希釈し、脾臓あたりの有核細胞総数を計測する。そして、Eagle's medium と 1.4%アガロース生理食塩水溶液との等量（0.75 ml）混合溶液を 6 cm ディスポーザブルペトリ皿のゲルの下層に分注する。そして、1 ml の 1.4%アガロース生理食塩水溶液、1 ml の Eagle's medium、0.09 ml の 20% SRBC 浮遊液および 0.1 ml の希釈脾細胞浮遊液を含む試験溶液を二つのプレートの上層に十分に満たす。このプレートを 37°C で1時間培養した後、新しく 1/20 に希釈したモルモット補体を 1 ml 加える。さらに室温で1時間培養した後、プラークを計測する。そして、脾細胞の 1×10^6 個あたり、あるいは全脾臓あたりの直接 PFC 数を算定する。

本反応は SRBC などの特異抗原で動物を感作し、その感作動物から得た脾細胞中の特異抗体産生細胞の数を計測するものである。この方法では主に IgM 抗体産生細胞を検出できる。抗 IgG 抗体を用いれば IgG 抗体産生細胞も検出でき、抗体産生の二次反応に適用できる。また、T細胞依存性抗原（SRBC など）と T細胞非依存性抗原（LPS など）のそれぞれによる PFC を比較すれば、被験物質の T細胞に対する影響の違いをより浮き彫りにすることができる。

本反応に対する金属曝露の影響は鉛、カドミウムなどで現れている〔表 3.9.3 (p.136)〕。鉛では、*in vivo* の抗体応答は変化しないが、*in vitro* の PFC 応答は抑制される⁴²⁾。カドミウムでは *in vitro* の一次 PFC 応答が同じような実験条件下で抑制されるという報告⁴²⁾と、逆に亢進するという報告^{43,44)}があり、議論の余地が残されている。有機錫^{10,13)}ではほとんど PFC 応答は影響を受けず、また、水銀²²⁾も高濃度でない限り影響を受けない。

(N) *in vivo* 食作用 (Carbon Clearance)

コロイド状の炭素浮遊液 (11/143 a, Gunther Wagner, Pelikan Werke Hannover, Germany) を 40 mg/ml に希釈し、それを体重 100 g あたり 20 mg の用量でラット尾静脈に注射する。5, 10, 20分後、ジエチルエーテルで軽く麻酔したラットの retro-orbital plexus より 20 μ l の血液を取り、これを 2 ml の蒸留水に移す。そして、比色計の 650 nm で optical density を測る。その後、ラットを屠殺し、体重および胸腺、脾臓、肝臓の各臓器重量を測定する。食作用 index K は Biozzi の式を用いて計算する。

$$K = [\log(OD)_1 - \log(OD)_2] / [t_2 - t_1]$$

OD_n: 時間 t_n における optical density

食作用 index; α : 体重および臓器重量の差で補正する。

$$\alpha = (W/WLS) \times k^{1/3}$$

W: 体重

WLS: 肝臓と脾臓の重量和

本反応は *in vivo* における炭素粒子のクリアランスによってマクロファージの食作用活性を測定するものであるが、ジアルキル錫曝露の場合は全く影響が現れなかった〔表 3.9.3 (p.136)〕。すなわち、生後2日より週3回7週間、ジオクチル錫を 0, 5, 15 mg/kg の用量で胃内投与したラットでは、食作用 index (補正值) はコントロール群の値と全く同じであった。マクロファージ機能に対する他の金属曝露の影響をみると、鉛では食作用活性が著しく抑制される⁴⁰⁾という報告もあるが逆の報告もあり、この領域に関しては混乱している。カドミウムにおいても全く同様に、その効果は無作用から活性増大あるいは抑制へと広範に変動する。この理由として、マウスやラットの腹腔内マクロファージの食能は *in vivo* での化学物質や薬物の乱入に対して非常に感受性が低く、したがって、免疫毒性試験に用いるには感度が低すぎるかもしれないことが挙げられる。

おわりに

“免疫毒性”という概念は金属を含めて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形成されつつあるが、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いまだ十分には確立されていない。したがって、現状ではここに挙げたいくつかのパラメーターを組み合わせる施行してゆくことが必要である。そしてまた、今後の課題として新しいより特異的な免疫能パラメーターの開発ならびに確立が要求される。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。

文 献

- 1) ARAKAWA, Y., et al.: *J. Chromatogr.*, **207**, 237 (1981)
- 2) ARAKAWA, Y., et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **60**, 1 (1981)
- 3) ARAKAWA, Y., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 543 (1984)
- 4) ARAKAWA, Y., et al.: *J. Chromatogr.*, **216**, 209 (1981)
- 5) ARAKAWA, Y., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 59 (1984)
- 6) ARAKAWA, Y.: "Tin and Malignant Cell Growth" chapter 9, p.83 (ZUCKERMAN, J.J. ed., CRC Press, Florida) 1988.
- 7) BOYUM, A.: *Nature*, **204**, 793 (1964)
- 8) SELYE, H.: "The Physiology and Pathology of Exposure to Stress" First edition, p.286 (Acta Inc. Medical Publishers, Montreal) 1950.
- 9) ARAKAWA, Y., et al.: *J. Toxicol. Sci.*, **5**(3), 258 (1980)
- 10) 荒川泰昭: 第一回金属の関与する生体関連反応シンポジウム講演要旨集, p.100 (日本薬学会主催) 1982.
- 11) ARAKAWA, Y.: *J. Pharm. Dyn.*, **6**, S-23 (1983)
- 12) 荒川泰昭, 他: 医学のあゆみ, **136** (3), 177 (1986)
- 13) 荒川泰昭, 他: 第一回重金属ワークショップ“金属の免疫毒性”講演要旨集 p.9 (日本衛生学会主催) 1984.
- 14) 荒川泰昭, 他: 微量栄養素研究, 第6集 (1989)
- 15) SEINEN, W., et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **35**, 63 (1976)
- 16) CERIOTTI, G., et al.: *Clin. Chim. Acta*, **11**, 519 (1965)

- 17) REITMAN, S., et al.: *Amer. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56 (1957)
- 18) BESSEY, O.A., et al.: *J. Biol. Chem.*, **164**, 321 (1946)
- 19) ARAKAWA, Y., et al.: *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, S-2 (1987)
- 20) ARAKAWA, Y.: *Main Group Metal Chemistry*, **12**, 37 (1989)
- 21) ARAKAWA, Y.: *Main Group Metal Chemistry*, **12**, 31 (1989)
- 22) DIETER, M.P., et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **68**, 218 (1983)
- 23) KASTELAN, M., et al.: *Exptl. Cell Biol.*, **49**, 15 (1981)
- 24) LAWRENCE, D.A.: *Infect. Immun.*, **31**, 136 (1981)
- 25) BLAKLEY, B.R.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **62**, 183 (1982)
- 26) URUSHIZAKI, I., et al.: *Cann.*, **68**, 413 (1977)
- 27) TACHIBANA, T., et al.: *Jap. J. Exp. Med.*, **43**, 227 (1973)
- 28) 橋 武彦, 他: 免疫実験操作法 (Ⅲ). 日本免疫学会編, p.683 (1973)
- 29) TUNG, R., et al.: *J. Clin. Invest.*, **57**, 756 (1976)
- 30) HIRSCHHORN, R., et al.: *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **9**, 287 (1978)
- 31) GIBLETT, E.R., et al.: *Lancet*, **1**, 1010 (1975)
- 32) SIEGENBEEK, L.H., et al.: *Clin. Chim. Acta*, **74**, 271 (1977)
- 33) VIRELIZIER, J.L., et al.: *J. Pediat.*, **92**, 358 (1978)
- 34) KOJIMA, A., et al.: *Japan J. Med. Sci. Biol.*, **34**, 281 (1981)
- 35) CHANDRA, R.K.: *Immunology Today*, **4**, 322 (1983)
- 36) FLAX, M.H., et al.: *J. Immunol.*, **89**, 496 (1962)
- 37) BAILEY, D.W., et al.: *Transplant Bull.*, **7**, 424 (1960)
- 38) PERMANN, P., et al.: *Transplant. Rev.*, **13**, 91 (1972)
- 39) NELSON, D.J., et al.: *Environ. Res.*, **28**, 154 (1982)
- 40) KERKVLIT, N.I., et al.: *Immunopharmacol.*, **4**, 213 (1982)
- 41) JERNE, N.K., et al.: *Science*, **140**, 405 (1963)
- 42) LAWRENCE, D.A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **57**, 439 (1981)
- 43) CAY, B.S.: *JAMWA*, **36**, 143 (1981)
- 44) FUJIMAKI, H., et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **62**, 288 (1982)
- 45) 荒川泰昭: 蛋白質・核糖・酵素, **36**(3), 462 臨時増刊号 “動物細胞におけるリン脂質代謝” (1991)
- 46) ARAKAWA, Y.: Proceeding of the Second International Symposium on the Effect of Tin upon Malignant Cell Growth, p.4 (Scranton, PA, U.S.A.) 1985.
- 47) ARAKAWA, Y.: Proceeding of the Third Symposium on Roles of Metal in Biological Reactions, Biology and Medicine, p.5 (Nagoya, Japan) 1986.
- 48) ARAKAWA, Y.: Proceeding of the Third International Symposium on the Effect of Tin upon Malignant Cell Growth, p.5 (Padua, Italy) 1986.
- 49) ARAKAWA, Y.: Ibid. c-9 (Padua, Italy) 1986.
- 50) ARAKAWA, Y.: Proceeding of the Fourth International Symposium on the Effect of Tin upon Malignant Cell Growth, (Scranton, PA, U.S.A.) 1988.
- 51) 荒川泰昭: 日衛誌 (*Jpn. J. Hyg.*), **40** (1), p.540 (1985)
- 52) 荒川泰昭: 日衛誌 (*Jpn. J. Hyg.*), **44**(1), p.437 (1989)
- 53) ARAKAWA, Y.: Proceeding of NATO Advanced Research Workshop on the Effect of Tin upon Malignant Cell Growth, (Brussels, Belgium) 1989.
- 54) ARAKAWA, Y.: Proceeding of Second Meeting of the International Society for Trace Element Research in Humans (ISTERH), (Tokyo, Japan) 1989.
- 55) ARAKAWA, Y.: *J. Trace Elements in Exptl. Med.*, **2** (2,3) p.114 (1989)
- 56) ARAKAWA, Y.: Proceeding of 1st A.N.A.I.C. International Chemical Conference on Silicon and Tin, (Kuala Lumpur, Malaysia) 1989, in “Chemistry and Technology of Silicon and Tin” (Oxford University Press) (1991).
- 57) ARAKAWA, Y.: Proceeding of the Fifth International Conference on the Organometallic and Coordination Chemistry of Germanium, Tin and Lead (Padua, Italy) 1986
- 58) ARAKAWA, Y.: Proceeding of Sixth International Conference on the Organometallic and Coordination Chemistry of Germanium, Tin and Lead (Brussels, Belgium) 1989.
- 59) ARAKAWA, Y.: Sugiyama Chemical & Industrial Laboratory Annual Report, 151 (1990)