

ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会：The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 7 No. 2 (通巻14号)2002

目次

第9回日本免疫毒性学会報告	1
第10回日本免疫毒性学会(予告1)	1
会計報告	2
学会会長賞	3
北里研究所 坂部貢他	
学会奨励賞	5
日本大学生物資源 二瓶萩尾他	
座長のまとめ	6
ワークショップ報告	9
Immunotoxicology最前線	
「経口トランスとディーゼル排気微粒子」	12
神戸薬科大学薬理学研究室 吉野 伸	
「免疫毒性とシグナル伝達」	13
塩野義製薬株式会社 金崎佳世子、中村和市	

第9回日本免疫毒性学会学術大会報告

平成14年9月19、20日の両日、第9回学術大会が、荒川泰昭(静岡県立大)大会会長の運営により、静岡のグランシップ(Shizuoka Convention & Art Center)にて、209名の参加者の下に開催された。今回の学術大会では、準備段階において演題登録がオンラインで行われ、演題発表において十分な討議ができるようポスターセッションも設けられた。また、講演要旨集も体裁を改め変形A4版に大型化されて読みやすくなり、更に、今年より優秀な研究に会長賞を、発展を期待したい研究に奨励賞を授与することになった。例年の学術大会にない試みとしては、海外の試験受託機関主催のランチョンセミナーが二日に互り準備された。

今大会では、「免疫の病的老化/環境因子による粘膜免疫および胸腺免疫の病的老化」、「健康機能食品と免疫/その有用性と安全性」、「環境化学物質の免疫系からみた安全性評価」の3つを主要テーマとして発表が行われた。まず、特別講演は、「侵襲抗原による粘膜免疫担当組織の障害」と題して名倉宏先生(東北大医・名誉教授・病理)より、「粘膜免疫のダイナミズム」と題して清野宏先生(東大・医科研・炎症免疫)よりご講演を頂いた。教育講演は、「機能性食品と免疫」と題して上野川修一先生(東大・院・農学生命科学)より、「微量環境化学物質の免

疫系から見たリスク評価/特にダイオキシンを中心として」と題して和田攻先生(埼玉医大、東大医・名誉教授・衛生)よりご講演を頂いた。会長講演は、大会長の荒川先生より「環境因子による胸腺免疫の病的老化」についてご講演頂いた。シンポジウムの「環境・化学物質・免疫毒性」については、ヒ素(櫻井照明先生/東京薬大)、ダイオキシン(野原恵子先生/国立環境研)、喫煙(別役智子先生/北大医・一内)、ディーゼル排気(藤巻秀和先生/国立環境研)を取り上げ、解りやすく解説して頂いた。ワークショップでは「医薬品の免疫毒性評価の進め方、考え方」と題して、合成医薬品とバイオ医薬品に分け、前者は「合成医薬品の免疫毒性試験の国際的ハーモナイゼーション」(中村和市先生/塩野義)ならびに「免疫毒性試験法ガイダンス案」(澤田純一/国立食衛研)について、後者は「バイオ医薬品の種類と免疫毒性にかかわる評価上の留意点」(中澤隆弘先生/日本イーライリリー)ならびに「その免疫毒性に関連した実施上の問題点」(小林孝好/アムジェン)について報告して頂き、各報告毎に活発な質疑応答が行われた。今回の報告は何れも最新の情報を含んでおり、今後の開発医薬品の免疫毒性検討に貴重な情報を提供したものと考えられ、意義のあるものであった。一般演題は23題(口演14題、ポスター・口演9題)の応募があり、いずれの演題においても活発な討議が行われ、当研究会の趣旨に沿うものであった。一般演題の中から優秀な研究に与えられ

第10回日本免疫毒性学会学術大会(予告1)

日時：平成15年9月25日(木)～26日(金)

場所：グリーンホール相模大野(多目的ホール)
神奈川県相模原市相模大野4-4-1

大会長：北條博史(昭和薬科大学)

連絡先：Tel & Fax 042-721-1563

本大会は第10回大会であるため、「免疫毒性研究10年—免疫毒性の新たな展開—」をサブテーマとします。

記念シンポジウムとして「免疫毒性研究の進展と課題」を取り上げるほか、2つのシンポジウム「バイオ医薬品の毒性評価と臨床上の副作用問題」及び「環境要因の免疫毒性、アレルギーと化学物質過敏症」、さらにワークショップを企画しています。また記念大会に相応しい多くの一般演題の申し込みを期待しています。

ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会 平成13年度（2001年度） 収支決算報告

収 入

(単位円)

科 目	予 算	決 算	備 考
前年度（2000年度）繰越金	2,000,000	2,207,436	
H13年度（2001年度）会費	1,020,000	878,000	内訳 一般会員 4,000 × 212 = 848,000 (未納37) 学生会員 2,000 × 5 = 10,000 (未納1) 賛助会員 20,000 × 1 = 20,000
前年度以前会費	0	86,000	一般会員 4,000 × 21 = 84,000 学生会員 2,000 × 1 = 2,000
第8回学術大会運営戻し金	0	207,101	於：宇都宮
預金利子	2,000	529	
雑収入	0	6,000	Immuno Tox Letter バックナンバー、要旨集
収 入 合 計	3,022,000	3,385,066	

支 出

科 目	予 算	決 算	備 考
第9回学術大会運営費	600,000	600,000	於：静岡
会議費	300,000	258,835	交通費他
通信費	150,000	74,660	
News Letter 印刷費	300,000	281,400	第6巻、1, 2号
事務費	200,000	103,423	文具、アルバイト、振込料金、等
予備費	100,000	0	
次年度への繰越金	1,372,000	2,066,748	次年度（2002年度）への繰越
支 出 合 計	3,022,000	3,385,066	

日本免疫毒性学会 平成15年度（2003年度） 予算案

収 入

(単位円)

科 目	予 算	備 考
前年度（2002年度）繰越金	2,000,000	13年度繰越実績 2,066,748円
H15年度（2003年度）会費	1,040,000	内訳（会員数255名＋1社、2002年3月31日現在）
預金利子	1,000	
収 入 合 計	3,041,000	

支 出

科 目	予 算	備 考
第11回学術大会運営費	600,000	
会議費	300,000	交通費他
通信費	150,000	
News Letter 印刷費	300,000	2号分
事務費	200,000	文具、アルバイト、振込料金、等
予備費	100,000	
次年度（2004年度）への繰越見込み	1,391,000	
支 出 合 計	3,041,000	

※平成14年9月19日の総会にて収支報告、予算案ともに承認を受けております。

る会長賞は、厳選の結果、坂部貢先生（北里研究所）他の「微量環境化学物質と胸腺の微細構造—フタル酸エステル類を中心として—」に、発展を期待したい研究に与えられる奨励賞は、二瓶萩尾先生（日大）他の「ギンブナの細胞性免疫に及ぼす環境ホルモンの影響」が受賞した。ランチョンセミナーは、「Regulatory immunotoxicology and immunopharmacology in non-clinical drug development」と題してDr. Mark Wing（ハンチンドン・ライフサイエンス）から、「Routine immunotoxicity testing of pharmaceuticals: Lessons from the first two years」と題してDr. Albrecht Poth（シーベルヘグナー）から発表を頂き、情報提供を受けた。

総会報告

第9回日本免疫毒性学会の総会において以下のことが報告ならびに提案され、承認された。

1. 会計報告：平成13年度収支決算報告、平成15年度予算案
2. 評議員制度の導入について：目的は、「学会運営の公共性と透明性を高めること」と「若い研究者の参加意欲を高めること」にある。今回、幹事会より「評議員制度導入について承認を頂きたいことと、その具体的な方法の策定については幹事会に一任させて頂くこと」の提案
3. 次会第10回日本免疫毒性学会学術大会予告

（記：牧幹事）

学会会長賞

微量環境化学物質と胸腺の微細構造 —フタル酸エステル類を中心として—

坂部 貢

（北里研究所・臨床環境、北里大学大学院医療系研究科）

吉田 貴彦（旭川医科大学・衛生学）

香山不二雄（自治医科大学・保健科学）

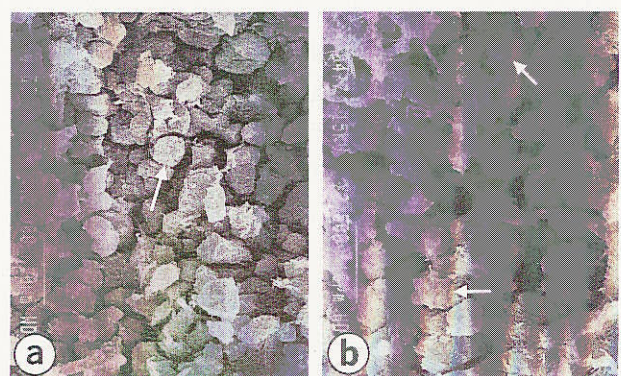
[本研究の目的]

種々の免疫応答に対して、環境化学物質が深くかかわっていることが、ここ10数年来の数多くの研究によって明らかになってきた。特にここ数年は、環境化学物質としての「内分泌攪乱物質」の「免疫応答に対する影響」、即ち「免疫攪乱作用」について注目が集まってい

る。周知のごとく、「内分泌攪乱物質」の多くは、性ホルモン作用を有しているが、性ホルモン（特にエストロゲン類）による免疫応答の制御に関しては、興味深い報告が多い（1, 2）。例えば、卵巣摘出により移植皮膚片への拒絶時間は延長し、逆にエストロゲン（E）投与で短縮する（3）。またPHA、ConAあるいはpokeweedなどのマイトジェンで誘発されるT細胞の幼若化は、E投与によって抑制される（4, 5）。さらに、胸腺組織は、卵巣摘出すると皮質—髓質の胸腺未熟Tリンパ球（胸腺細胞）の数の増加によって肥大し、逆にE投与によって胸腺細胞の死滅（特に皮質に顕著）、胸腺実質の脂肪変性などの結果、著しく萎縮する（6, 7）。このように、性ホルモンの免疫組織・器官に対する研究知見は、「性ホルモン動態の変動と免疫応答」という観点から重要な意味をもつ。そこで、体内ホルモンの生理的環境を乱す「内分泌攪乱物質問題」を考えた時、これらの環境化学物質が、免疫系に対してどのような影響を及ぼすかについて情報を得ることが、当然のことながら必要になってくるが、これまでの報告例は少ない（8）。そこで今回、環境省の内分泌攪乱作用を有する疑いのある物質としてリストアップされていると同時に、厚生労働省の室内濃度ガイドライン値が設定されているフタル酸エステル類について、この物質の一次免疫中枢としての胸腺に対する作用、特に低用量作用について検討した。

[方 法]

- 1) 動物は、エストロゲン（E）高感受性ラットの一種であるBDII/Hanラットを用いた。
- 2) 3週齢にて両側卵巣を摘出し、5週齢時に埋め込み



図一 a：胸腺皮質：コントロール

胸腺細胞の密集像が認められ、アポトーシス像も認められない。
矢印：正常胸腺細胞（拡大：×2,000）

図一 b：胸腺皮質：DBP投与

コントロールと比して、胸腺細胞ポピュレーションの低下が認められ、アポトーシス細胞に特徴的なブレブ形成を呈する胸腺細胞が認められる（矢印）（拡大：×2,500）

投与用サイラステイク・チューブにフタル酸ジ-n-ブチル(DBP)またはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)を充填し、左背部皮下に埋め込んだ(投与量:約30ng/day)。

- 3) 非投与コントロール群には、同チューブにコーンオイルを充填し、同様に皮下に埋め込んだ。
- 4) 8週間の後、屠殺し胸腺を取り出した。取り出した胸腺の右葉部は、4%PLP液にて常法通りに固定し、通常観察(光学、走査・透過型電顕)・組織化学に用いた。
- 5) 残りの左葉部は、周辺の結合組織等を十分に取り除いた後、常法通りにリンパ球分画と上皮分画に分け、それぞれ胸腺細胞のサブセット解析、胸腺ホルモン(Thymosin- α 1)のELISA測定(9)に用いた。

[結果]

- 1) 光学顕微鏡所見: フタル酸エステル類投与群では、胸腺皮質の著明な萎縮(退縮)が認められ、胸腺細胞の密度も減少した。また、小葉間結合組織の軽度脂肪化も認められた。髄質は、非投与コントロール群と比して大きな形態変化は認められなかった。
- 2) 電子顕微鏡所見: フタル酸エステル類投与群では、マクロファージに取り込まれた胸腺細胞のアポトーシスが、被膜直下、皮髄境界に数多く観察され、非投与コントロール群とは明らかに異なる所見を示した(図-a, b)。さらに投与群では、胸腺上皮細胞の細胞質に多数の脂肪滴が観察された。
- 3) 胸腺細胞のサブセット解析では、投与群でダブルポジティブ細胞(CD4⁺CD8⁺)の相対的減少(Control: 84.3%, DBP: 77.5%, DEHP: 80.7%)が認められた。
- 4) 胸腺において胸腺細胞の教育に深い関わりをもつ胸腺因子としてのThymosin- α 1の含有量は、非投与コントロール群(284 \pm 32.6 ng/mg protein)と比して、投与群において著明に減少した(DBP: 132 \pm 24.7 ng/mg protein, DEHP: 172 \pm 28.9 ng/mg protein)。
- 5) 以上の結果より、フタル酸エステル類は、主として胸腺の皮質に作用し、未熟Tリンパ球の分化・成熟に対して、直接的に、あるいは胸腺上皮を介して影響を及ぼすことがわかった。

[結語]

本研究では、いまだ不明な点の多い内分泌攪乱物質の免疫毒性作用について、一次免疫中枢としての胸腺に対する影響をモデルとして検討した。今回投与したフタル酸エステル類も含め、内分泌攪乱物質は何らかのエスト

ロゲン作用を有するものが多い。しかしながら、これら環境化学物質の免疫系に対する影響を調べる以前の問題として、内因性エストロゲンの免疫系に対する作用ですら十分に解明されているとは言えず、今回の研究結果を解明の糸口として今後更なる研究を継続したい。

[参考文献]

- 1) Kawashima I et. al., Localization of sex steroid receptor cells, with special reference to thymulin (FTS)-producing cells in female rat thymus. *Thymus*, 18, 79-93 (1991).
- 2) Olsen J et. al., Gonadal steroids and immunity. *Endocrine Review*, 17, 369-384 (1996).
- 3) Graff RJ et. al., The influence of the gonads and adrenal glands on the immune response to skin grafts. *Transplantation*, 7, 105-111 (1969).
- 4) Wyle FA et. al., Immunosuppression by sex steroid hormones. The effect upon PHA- and PPD-stimulated lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, 27, 407-415 (1977).
- 5) Sakabe K et. al., Sex hormones affect the intracellular activation signal in mitogen-stimulated human blood lymphocytes. *Pathophysiology*, 5, 73-77 (1998).
- 6) Kawashima I et. al., Effects of estrogen on female mouse thymus, with special reference to ER-mRNA and T cell subpopulations. *Pathophysiology*, 2, 235-241 (1995).
- 7) Seiki K et. al., Sex hormones and the thymus in relation to thymocyte proliferation and maturation. *Archives of Histology and Cytology*, 60, 29-38 (1997).
- 8) Sakabe K et. al., Estrogenic xenobiotics affect the intracellular activation signal in mitogen-induced human peripheral blood lymphocytes: immunotoxicological impact. *International Journal of Immunopharmacology*, 20, 205-212 (1998).
- 9) Sakabe K et. al., Inhibitory effect of natural and environmental estrogens on thymic hormone production in thymus epithelial cell culture. *International Journal of Immunopharmacology*, 21, 861-868 (1999).

学会奨励賞

ギンブナの細胞性免疫に及ぼす 環境ホルモンの影響

二瓶菰尾、林津陽平、森友忠昭、中西照幸
(日本大学生物資源科学部獣医学科)

【目的】

環境ホルモンは、生殖システムだけでなく免疫システムにも影響を与えることがこれまで哺乳類で報告されている。魚類は、水中で生活しているために天然水域に存在する環境ホルモンの曝露されやすいこと、下等であるが故に外部環境に左右されやすいこと、哺乳類と相同な免疫システムを持つ最も下等な脊椎動物であることなどから、脊椎動物の免疫機能への環境ホルモンの影響を検討する上で好都合なモデルになり得ると考えられる。しかし、これまでの研究から、各種の環境汚染物質が魚類の非特異的免疫機能を抑制することは知られているが、細胞性免疫に及ぼす影響については不明である。

そこで今回、天然で雌性発生によりクローナルな繁殖をしているギンブナ (*Carassius auratus langsdorffii*) を用いて、リンパ球によるアロ抗原特異的細胞障害活性により、細胞性免疫に及ぼす環境ホルモンの影響を中心に検討すると共に、羊赤血球 (SRBC) に対する抗体産生能や、好中球数及び好中球の活性酸素産生能により、液性免疫、非特異的免疫に及ぼす影響についても検討した。

【方法】

<細胞障害活性の測定>

奥尻島産クローンギンブナ (OB1; 50~80g) と諏訪湖産クローンギンブナ (S3N; 30~40g) を用いた。脾臓及び、硬骨魚類の造血器官である頭腎及び体腎から分離したOB1のリンパ球をエフェクター細胞、S3N鱈由来培養細胞株 (CFS) をターゲット細胞として、*in vitro*における細胞障害活性を測定した。より強い特異的細胞障害活性を誘導するため、事前にOB1に対してS3Nの鱗移植及びCFSの静脈注射による感作を行った。感作は初めに鱗移植、その1週間後及び2週間後にCFSを投与し、最終感作の1週間後に細胞障害活性を測定した。

Bisphenol - A ($1 \mu\text{g/g}$)、 β - Estradiol ($1 \mu\text{g/g}$)、2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo - *p* - dioxin (TCDD, 10, 1.0, $0.1 \mu\text{g/kg}$) をpeanut oilに溶解して各感作の前日に、1週間に1回投与した。コントロールにはpeanut oilのみを

同様の方法で投与した。

生細胞を染色する蛍光色素3, 3' - dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiOC_{18} (3)) と死細胞を染色する蛍光色素Propidium Iodide (PI) で細胞を染め分け、フローサイトメーターを用いて細胞障害活性を測定した。

<抗体産生能の測定>

OB1に20%SRBCを2日おきに3回腹腔内投与した。細胞性免疫で最も抑制の認められたTCDD ($10 \mu\text{g/kg}$) を細胞障害性試験と同様のスケジュールで腹腔内投与し、2週間後および3週間後に抗体価の測定を行った。

<好中球数、好中球活性酸素産生能の測定>

TCDD ($10 \mu\text{g/kg}$) をOB1に腹腔内投与し、1週間後に血液、及び頭腎と体腎から各々白血球を採取し、フローサイトメーターを用いて好中球数を測定した。また、採取した白血球をPhorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) により刺激した後、活性酸素の一種である過酸化水素と反応するDihydrorhodamine123 (DHR) により蛍光染色し、フローサイトメーターを用いて活性酸素産生能を測定した。

【結果】

*in vitro*細胞障害活性については、 β - Estradiol、Bisphenol - A、TCDD ($10 \mu\text{g/kg}$) の投与群において、いずれもコントロールに比べて有意な抑制が認められた ($p < 0.05$)。次に最も抑制の認められたTCDDにおいて投与量の影響について検討したところ、 $10 \mu\text{g/kg}$ と $1.0 \mu\text{g/kg}$ 投与群で有意な抑制が認められ、細胞障害活性は投与量依存的に抑制された。しかし、 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 投与群では有意な抑制は認められなかった。また、2週間後および3週間後の抗体価については、コントロールと比較して有意な抑制は認められなかった。

末梢血白血球において、TCDD投与により好中球数の有意な減少が認められたが、頭腎と体腎においては、コントロールと比較して好中球数に有意な変化はみられなかった。また、好中球の活性を測定する為に活性酸素産生能を測定したところ、末梢血、頭腎と体腎の好中球ともに、TCDD投与群とコントロールの間には平均蛍光強度に有意な差は認められなかった。

【考察】

これまでにTCDD投与により魚類血液中の好中球数が減少することは報告されていたが、今回の研究により細胞性免疫機能も魚類で抑制されることが明らかとなった。このことから、天然水域の環境ホルモン汚染について

て非特異的免疫機能だけでなく細胞性免疫機能も指標となると考えられる。

なお、哺乳類においては液性免疫応答も抑制されることが報告されているが、今回のギンブナにおける研究ではSRBCに対する抗体産生へのTCDD投与の影響は認められなかった。同様なことはニジマスにおいても報告されており、SRBCに対する抗体産生細胞数には影響が認められなかったとされている。この点は魚類と哺乳類の違いによるものか、TCDDの投与時期や投与方法の違いによるものかどうかは不明であり、今後詳細に検討していく必要があると考えられる。

また、今回TCDDを投与した魚において、鱭の辺縁部への黒色素沈着や肝臓の結節状壊死、脾臓の萎縮などの所見が認められた。同様な所見はヒトやマウス、ラットにおいても報告されており、TCDDの毒性について、魚類においても哺乳類と同様な作用メカニズムが働いていると考えられる。

魚類は哺乳類と相同な免疫システムを有し、環境ホルモンの脊椎動物の免疫機能への影響を検討する上で都合なモデルとなり得ると考えられるが、一般に魚類の免疫システムは哺乳類に比べて未分化、単純であり、TCDDの作用メカニズムについても多少異なると考えられることから、今後哺乳類と比較しつつ検討するべきであろう。

座長のまとめ

座長：小坂忠司（残留農薬研究所）

OP-1 ヒト骨髄腫細胞に対するATRAの効果とIL-10の役割

B細胞の最終分化段階にある形質細胞の腫瘍化細胞である骨髄腫細胞に対する治療薬（レチノイン酸、ATRA）の影響を分子生物学的手法などを用い精査した研究であった。通常、ATRA添加により骨髄腫細胞でアポトーシスが誘導される。しかし、演者らは骨髄腫細胞のうちATRA添加によりアポトーシスが誘導されず、増殖促進が認められる細胞株（2株）に注目し、ATRA添加による骨髄腫細胞のアポトーシス誘発を逃れる機構の解明のため、骨髄腫等関連遺伝子を解析した。解析の結果、ATRA添加により増殖促進が認められる細胞株ではIL-10、CD95/Fasの高発現とp53の低発現が観察された。本細胞株に抗IL-10抗体を投与したところ、増殖促進の消失が認められた。また、アポトーシスが誘導される骨髄腫細胞へのIL-10投与により増殖抑制の減少が観察された。以上のように本研究により、骨髄腫をはじめ白血病や悪

性腫瘍の治療薬としてのレチノイン酸の作用とIL-10との関連が示唆された。また、骨髄腫細胞のアポトーシス誘発作用の研究は医薬品や化学物質の免疫担当細胞（B細胞、T細胞等）に対する免疫毒性影響の機序を検討する手段として、一つの方向性を示していると考えられた。

OP-2 アレルギー性接触皮膚炎におけるTNF- α の役割

アレルギー性皮膚炎の感作成立時におけるTNF- α の役割について、TNF- α ノックアウト（KO）マウスを用いて検討した研究であった。アレルギー性皮膚炎のモデルとして、トリニトロクロロベンゼン（TNCB）のMouse Ear Swelling Testの試験系を用いて、耳厚差による感作性の程度および所属リンパ節リンパ球のマイトジェンによる細胞増殖能とサイトカイン産生能を測定した。その結果、TNF- α KOマウスにおいてTNCB感作によりIL-4の高値が観察され、Th2細胞の誘導が認められた。通常Th1タイプと分類されている遅延性過敏症のモデルにおいて、TNF- α の非存在下にてTh2細胞分化への影響が示された。このことは、TNF- α がTh2細胞分化を抑制している可能性、ないしTh1細胞分化の促進に働いている可能性などを示唆している。今後遅延性過敏症のモデルでのTNF- α とTh1/Th2分化について、さらなる展開が期待される。

座長：吉野 伸（神戸薬科大学）

OP-3 Plaque-forming cell assay 系における

Cyclophosphamide 投与ラットの系統比較

本研究では、ラット6系統 F344/DuCrj、LEW/Crj、BN/Crj、Crj:Wistar、Crj:CD(SD)、Crj:CD(SD)IGS 間における免疫抑制薬 cyclophosphamide の抗体産生（PFC assay系）抑制作用感受性について検討された。その結果、PFC assayにおいて、個体差が少なく、また低用量から免疫抑制作用感受性が最も優れ、ストレスの影響を受けることの少ない系統は F344/DuCrj ラットであり、一般免疫毒性試験においては本系統が適していることが示された。

OP-4 標的細胞質内のエステラーゼ活性を指標とした

NK細胞活性測定法

本研究では、蛍光色素（calcein acetoxymethyl ester）で標識した標的細胞としてYAC-1細胞を、エフェクター細胞としてCD(SD)IGS、F344およびBNラット脾臓細胞を用いた場合のNK細胞活性測定法について検討された。その結果、NK細胞活性は、F344、BN、CD(SD)IGSラットの順に強いことが判明し、また標的細胞からの蛍光色

素自然放出抑制法が示された。本蛍光色素を用いたNK活性測定法は医薬品の免疫毒性評価に有用であると考えられる。

座長：小島幸一（財食品薬品安全センター）

OP-5 環境リスク評価のための免疫指標の有効性に
関する検討 — 3歳幼児での検証 第2報 —

生活環境および大気汚染などの環境リスクを評価するために、3歳幼児の末梢血を用いた有効な免疫指標の探索が続けられており、昨年度に続いての報告である。対象者の生活環境の詳細なアンケート調査と数種の免疫指標の測定値についてそれぞれ関連性を解析した。総IgE抗体価や、抗麻疹抗体価等、関連性があると考えられる項目もある。今後の継続調査と例数の増加によって、さらに明確で適切な環境リスク評価のための免疫指標が浮かびあがってくるのが期待される。

OP-6 In Vitro抗体産生系を用いた化学物質の免疫毒性の
簡易評価

マウス脾細胞をボークウイドマイトジェンで活性化しIgMを産生させる系を免疫毒性の簡易評価系として検討確立した。モデル化学物質を用いてこの系の有効性を確認した。各種の毒性が判明している約300種の化学物質について検討し、42種の化学物質を抗体産生に影響する物質として検出している。また、S9mixとのプレインキュベーションを行い、確立した試験系で抗体産生への影響が検出できることも確認している。簡便に抗体産生系への影響を評価できる方法として興味深いものである。

座長：上野光一（千葉大学）

OP-7 p38MAPK阻害剤を4週間投与したアジュバント
関節炎ラットにおける局所及び全身のリンパ性器
官の病理学的変化

本発表は、ラットアジュバント関節炎モデルに、p38MAPK阻害剤 SB203580 (30 mg/kg x 2/day) を28日間連続投与し、リンパ性器官を中心に病理学的検査を行ったものである。アジュバント投与群では、局所及び全身性にリンパ球性領域の萎縮と細網内皮系細胞の活性化が見られたのに対し、阻害剤投与群では関節炎の発症と左局所リンパ節細網内皮系細胞の増生が抑制され、全身性にはリンパ球性領域の萎縮は観察されなかった。質疑応答では、コラーゲン増殖機構やサイトカインのシグナル伝達機構と絡めて活発な討議が行われた。今後、阻害剤の投与期間を考慮した検討が望まれる。

OP-8 大豆タンパク摂取ラットの肝臓における
LPS誘導性急性炎症の抑制効果

本発表は、イソフラボン含有食品である大豆のLPSによる急性炎症反応に対する効果を見たものである。対照群にミルクタンパク食を用い、20%大豆タンパク食を54日間自由摂取させた後、LPSを静注し、血中イソフラボン濃度並びに肝TNF産生量を検討した結果、大豆食群に急性炎症を抑制する傾向が見られた。また、大豆食群で、genisteinとequol濃度が有意に高値を示したことからこれらによる作用とも考えられた。本会も学会となったからには、発表に際しては正確な専門用語の使用や的確な質疑応答も今後求められるであろう。

座長：大槻剛巳（川崎医科大学）

OP-9 飲食品中に含まれるホルムアルデヒドの経口摂取
による生体影響

不正な養殖魚への寄生虫駆除目的での使用から鑑みたホルムアルデヒドの経口摂取の生体影響が、腸内細菌叢への影響として大腸菌や嫌気性菌の減少・肝でのTNF- α の産生低下・脾細胞のマイトゲン応答の抑制を起し、健康障害を惹起する可能性が報告された。質疑応答では、研究の端緒と実際の実験での当該物質の濃度の問題や、観察事項のばらつき等が討議され、今後の詳細な検討が期待されることとなった。

OP-10 授乳を介したダイオキシンの暴露がリステリア
感染に及ぼす影響

授乳を介したダイオキシン曝露の影響を、免疫担当臓器重量と免疫担当細胞分布・リステリア感染後の脾臓内細菌数と血中サイトカイン濃度から観察し、特に高濃度投与群雄での脾臓の重量減少・胸腺のCD4⁺細胞減少、同群雄雌での感染後の菌数の高値とそれによると考えられる血中TNF- α 、IFN- γ の高値等の所見を認め、仔の細菌感染における抵抗性を減弱させる可能性として報告された。重要な問題であり、測定サイトカインや免疫担当細胞分画の拡大を含めた更なる検討が期待された。

座長：久田 茂（帝国臓器製薬）

OP-13 トリブチル錫暴露マウスにおける免疫応答の変化

トリブチルスズをマウスに投与すると、Th1/Th2バランスがTh2優位になることが主にIgGサブクラスの濃度変化により示され、妊娠前の母胎への投与によってもF1世代に同様の変化が起こることが示された。さらに多くの化合物について評価され、アレルギー疾患の予測におけるTh1/Th2バランス評価の有用性が明らかになることが

期待される。

OP-14 塩化トリブチルスズ曝露によるマウスマクロファージ由来細胞のサイトカインmRNA発現に対する影響

マウスマクロファージ由来J774.1細胞に塩化トリブチルスズを曝露させると、濃度依存的に細胞死が増加し、TNF- α mRNAの発現も増加した。1) 細胞死はapoptosisか、2) apoptosisだとすると、TNF- α がautocrineの様式で自身のapoptosisを誘発するのか、3) 生体におけるTNF- α 産生を伴う細胞死発生の意味などに興味を持った。今後の研究の進展が期待される。

座長：柳沢裕之（埼玉医科大学）

PP-1 ジエチルスチルベステロール(DES)の幼若ラット胸腺に及ぼす影響

ジエチルスチルベステロール (DES) の幼若雌雄ラット (Wistar Hannover系) 胸腺に及ぼす影響を調べた研究である。出生後間もない幼若雌雄ラットにDES (50 μ g) を数日間皮下投与すると、7日齢のラットでは未成熟胸腺細胞であるCD4/CD8陽性Double Positive細胞の減少が観察され、離乳時期の21日齢のラットでは成熟胸腺細胞であるCD4陽性細胞及びCD8陽性細胞の減少が認められた。これらの結果から演者らは、DESは幼若雌雄ラットの胸腺細胞、特にT細胞系に影響を及ぼすと結論づけている。

PP-2 乳酸菌・ビフィズス菌生菌摂取の免疫毒性学的解析—新生児マウスの免疫機能発達への影響—

新生児マウス (BALB/c) の免疫機能発達に及ぼす乳酸菌とビフィズス菌生菌摂取の影響を調べた研究である。出生直後から離乳期まで週3回3週間*Lactobacillus Casei*シロタ株 (Lc) と*Bifidobacterium breve* YIT4064 (Bb) をゾンデを用いて経口投与を行い、離乳後3週目に免疫毒性パラメーター (免疫器官・臓器の重量、パイエル板数、抗CD3刺激とマイトージェン刺激による細胞増殖性・サイトカイン産生能・細胞表面マーカー) を調べると全く影響が認められなかった。これらの結果から、演者らは、LcやBbのようなプロバイオティクスは乳幼児の免疫機能の発達を損なわず安全に利用できるものと推察している。

座長：高木邦明（静岡県立大学）

PP-3 抗原刺激およびDTBHQ刺激によるRBL-2H3細胞の遺伝子発現変化

ラットマスト細胞株のRBL-2H3細胞を用いて、抗原およびDTBHQによる遺伝子発現パターンの変化をGeneChip技術により詳細に解析された結果が報告された。両刺激により発現が有意に上昇した遺伝子は200前後あり、各刺激でも特徴的に発現誘導されるもの、あるいは発現が抑制されるもの等が網羅的に解析されていた。演者らも報告していたが、マスト細胞が刺激を受けた時にストレス応答遺伝子GADD45を発現していることが興味深く、これをマスト細胞のストレス応答だけに留まらず、さらに派生的に発現する遺伝子の解析に期待したい。

PP-4 好酸球増多症を自然発症するラット(MES)の蛋白抗原に対するアレルギー反応性に関する検討

好酸球増多症ラット(MES)を用いて、全身性アナフィラキシー(ASA)反応と同種受動的皮膚アナフィラキシー(PCA)反応性についてSDラットと比較検討がなされていた。その結果、抗原特異的IgGやPCA反応では両者に有意な差が観られなかったものの、ASA反応ではMESラットのみ強く反応し、剖検所見から血中好塩基球の関与を推定しており、興味深い報告であった。今後、好酸球の関与も含め、より詳細な発症機構の解明が期待される。

座長：坂部 貢（北里研究所）

PP-5 惹起相を負荷したMouse IgE Test trimellitic anhydride (TMA) の気道感作能検出

Mouse IgE Test (MIGET)において総IgE値が最も上昇すると報告されているDay 14にTMAを吸入曝露することで、マウスに気道抵抗の上昇、呼吸回数低下、総IgE値の上昇、肺胞洗浄液および肺組織への好酸球浸潤を誘起できることを報告した。今回の結果は、MIGETが誘導相のみでの試験という問題点を、TMAを陽性対照物質として用いる事(惹起相を付加する事)により広い視野で評価できることを証明した興味ある知見であった。

PP-6 体液性免疫における長寿命抗体産生細胞に対する2,3,7,8-tetrachlorobenzo-p-dioxin(TCDD)の影響

TCDD曝露によってOVA免疫10日後から認められる抗原特異的IgG1量が抑制され、脾臓胚中心 (GC) における細胞増殖およびGCの形成が初期の段階から抑制されることが明らかにされた。この報告は、これまで不明の点の多かったTCDDの免疫毒性作用に新たな知見を提供し、高く評価の出来るものであった。

(一部演題は次号へ回させていただきます)

ワークショップ報告

バイオ医薬品の安全性評価実施上の免疫毒性に関連した問題点

小林 孝好 (アムジェン株式会社 前臨床開発部)

1. バイオ医薬品と免疫毒性および抗原性

化学合成医薬品の免疫系に対する作用を調べる試験として、免疫毒性試験、抗原性試験、皮膚感作性試験がある。これらの試験は化学合成医薬品の免疫系への影響を検索し、ヒトにおける副作用の予知を目的とし開発されてきた。即ち、免疫毒性試験は免疫系の異常（有害な変容）を予知する目的で、抗原性試験はヒトに投与された医薬品が抗原として認識されることから起こる薬物アレルギーの予知を目的として確立された試験法である。また、化学合成医薬品の場合、被験薬が未知の物質であるとの前提から、どのような生体反応が引き起こされるか不明のため、各種毒性試験を組み合わせて、試験の種類によっては2種の動物を用いて実施され、未知の異常反応を広く把握し、ヒトへの外挿が試みられている。しかし、バイオ医薬品の場合は、既にヒトに対して作用を有する生体物質を遺伝子工学技術を応用して大量生産したもので、多くの場合その作用機序、作用部位は明らかになっており、その開発のアプローチは化学合成医薬品のそれとは異なる。バイオ医薬品の安全性試験の実施の詳細については最近出版された「医薬品非臨床試験ガイドライン解説2002」を参照されたい。ここではバイオ医薬品の免疫毒性に関連した問題点についてのみ取扱う。

バイオ医薬品はヒトのペプチドあるいはタンパクであることから、これらは実験動物に対して異物として認識され、免疫応答として特異抗体が産生される。このことは動物を使用する抗原性試験の限界を示していると言える。

近年、バイオ医薬品の範疇に、従来のヒト生体内物質をベースにした医薬品以外にタンパク分子に種々の修飾を施したものや人工的に作られたものも扱われるようになって来た。また、生体における標的分子を特定し、その標的分子に反応する特異抗体の開発も盛んに行われている。これら新規バイオ医薬品についても、上述の通りに、その作用部位ならびに作用機序は明らかにされており、従来のバイオ医薬品と共通した性格を持っている。従って、毒性試験の実施はバイオ医薬品毒性試験法が適応される可能性がICH S6ガイドラインに記載されている。しかし、これらの物質はヒトにとっても新規物質で

あり、構造中に未知の部分が含まれていることは否定できない。従って、新規バイオ医薬品については、従来のバイオ医薬品と同じ評価基準で安全性試験を組み立てることはできず、一層のcase-by-case対応が必要になる。新規バイオ医薬品の安全性評価にはこれらのことを十分に考慮した上で、被験物質の免疫毒性ならびに抗原性の有無の検討を行う必要が有る。

2. バイオ医薬品の安全性評価と免疫応答

バイオ医薬品は一般にヒト由来のタンパクであることから、動物に投与した場合しばしば異物として認識され、特異抗体が産生される。従って、バイオ医薬品の安全性試験で観察される抗体産生のヒトへの外挿の意義は小さいと考えるが、安全性評価の上で重要な役割を持っており、もう一つの免疫応答として無視することはできない。被験物質の反復投与による一般毒性試験ならびに生殖毒性試験を実施する際、化学合成医薬品とバイオ医薬品の違いを十分に理解した上で試験を実施し、得られた成績を評価する必要がある。ここでは、試験系の被験物質に対する免疫応答（抗体産生）を分類し、安全性評価を行なう際の留意点に的を絞って述べることにする。

1) 安全性試験で産生された抗体の特性

(1) 中和抗体

Table 1 に示したケースはある種のサイトカインの例で、投与開始2週間より抗体価が上昇し、その時期まで被験物質の血中濃度はある一定濃度を維持していたが、特異抗体産生の上昇に伴い血中濃度は減少を示した。この現象はバイオ医薬品の安全性試験でしばしば観察されるもので、反復投与を続けて行くと被験物質の血中濃度が低下してくる。その原因は中和抗体に依るものである。この物質の場合、毒性学的所見とし

Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		0	10	30	100
Antibody formation (%)	2day	0	0	0	0
	14day	0	66	66	100
	28day	0	66	66	100
Plasma concentration of drug (ng/mL)	2day	BDL	BDL	0.74	2.85
	14day	BDL	2.08	4.77	16.90
	28day	BDL	1.70	1.45	6.25
Hematology					
Red blood cells ($10^6/\mu\text{L}$)	14day	5.54	5.25	5.38	4.91*
	28day	5.45	5.40	5.41	4.90*
Neutrophil ($10^3/\mu\text{L}$)	14day	7.9	1.38*	1.02*	1.58*
	28day	8.2	3.15	2.86	3.46
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	14day	364	242*	224*	184*
	28D	322	287	298	241
Serum chemistry					
Albumin (g/dL)	14day	5.3	4.5*	4.4*	4.2*
	28day	5.5	5.0*	4.7*	4.6*
Cholesterol (mg/dL)	14day	142.2	198.2*	212.2*	192.0*
	28day	146.3	168.7*	171.0	167.2

BDL: Below detection limit

Table 1 A 28 day subcutaneous repeated dose toxicity study with cytokine in rhesus monkeys

て投与初期に赤血球、白血球、血小板の減少が見られるが、中和抗体の産生と共に曝露量が減少し、実験終了時には血液の異常所見も回復を示した。同様に、アルブミン量、コレステロールの変動も2週目までは観察されるが4週目では正常化している。従って、被験物質の血中濃度ならびに特異抗体の産生を確認しておかないと、しばしば一過性の変化として扱われ、ケースによっては毒性所見を見逃す結果となり得る。この様に中和抗体が産生される場合は、これ以上投与を続けても真の曝露量は得られず、毒性評価上は意味が無い。最近開発されているバイオ医薬品の毒性試験では、しばしばこの抗体産生の有無を理由に長期反復投与試験が実施されていない場合がある。

この様な被験物質の反復投与により産生された中和抗体は被験物質に特異的に反応するばかりでなく、動物の内因性タンパクに対しても反応する場合がある。その結果、内因性タンパクも中和され正常域を下回り、内因性タンパクの欠乏状態が生じ、欠損症を引き起こすこともある。しかし、この変化は被験物質の毒性とは異なるものであり、毒性評価を見誤ることとなる。

ヒト由来タンパクと云えども、ヒトへ反復投与されることにより抗体産生が認められることが知られているが、この様に内因性タンパクと交差反応性を示す抗体の産生は、臨床上大きな問題となる。しかし、ヒトでの反応を動物試験の結果から推測することは非常に難しい。

(2) Clearing抗体

被験物質の血中濃度推移が初回投与時に比し、特異抗体産生後に被験物質の血中からの消失が早まり、絶対的な曝露量が減少することがある。この抗体の場合は被験物質の生物活性には影響を及ぼさず被験物質の生体に対する曝露時間が短縮する。この様な性格を有する特異抗体を中和抗体と区別し、Clearing抗体と称した。

(3) Sustaining抗体

Clearing抗体とは逆に抗体が産生されることにより被験物質の血中濃度消失半減期 $t_{1/2}$ が著しく延長することがある。反復投与後に被験物質の血中濃度と抗体価を測定すると、特異抗体を産生した個体では血中濃度推移は延長し、特異抗体を産生していない個体とは明らかな曝露時間の違いが見られる。この場合、当然ながら抗体を産生した動物では曝露量の増加に伴う強い生物反応が認められる。このような現象はヒトにインスリン製剤を長期間使用した場合に起こることが報告されている¹⁾。

2) 特異抗体産生による免疫複合体の毒性評価に及ぼす影響

産生されて特異抗体と被験物質の結合物が腎糸球体に沈着し、腎障害を引き起こすことが知られている。従って、安全性評価時の腎所見は直接的な腎障害か免疫複合体の腎糸球体への沈着によるものか調べる必要がある。

3) 特異抗体の産生が抑制される場合

被験物質を動物に反復投与した際に産生される特異抗体の種類について示したが、被験物質に免疫抑制作用がある場合は、特異抗体の産生が抑制されることがある。Agersøら²⁾はhGHを単独投与した動物に抗体が産生され、事前に免疫抑制剤のCyclosporine、AzathioprineおよびPrednisoloneを投与することにより抗体産生が抑制され、その抑制の程度はCyclosporineの投与量を増加させること、即ち、免疫抑制作用が増強されるに比し強く抑制されることを報告されている (Fig. 1)。Cyclosporine非投与下にhGHに対する特異抗体の産生が認められた場合は、初回投与時の血中濃度と比較して、投与22日目の $t_{1/2}$ は明らかな延長を示しており、Cyclosporine投与により特異抗体が産生されなかった場合は、初回投与時と投与22日目の血中濃度に差が認められないとしている (Fig. 2)。hGH投与により産生された特異抗体は、先に示したSustaining抗体の様相を呈していた。

Table 2は炎症に関わるサイトカインの活性を抑制する被験物質のケースで、低用量では特異抗体の産生を認めるが、高用量では特異抗体の産生は完全に抑制されている。このケースにおいて高用量ではIgG抗体の産生は抑さえられているが、IgM抗体の産生を示す個体の存在が認められた。この薬剤の場合、被験物質の血中濃度と抗体産生の関係は、特異抗体が産生されていない個体では血中濃度はいずれの投与期間でも同じ曝露量を示しているが、特異抗体を産生している個体では血中濃度の低下が認められ、中和抗体の特性を示していた (Fig. 3)。このケースのように被験物質の投与量に反比例して中和抗体が産生される場合、血中濃度だけを見れば一見用量相関のある曝露量であり、毒性所見も曝露量に相関して現れる。しかし、低用量群では真の曝露が示されていないので、この様なケースから無毒性量を評価することは困難である。従って、バイオ医薬品の場合、トキシコキネティックと特異抗体の産生状況を合わせ検討することが非常に重要になる。

ヒトにバイオ医薬品を長期間投与した場合、特異抗体が産生されることは良く知られているが、抗体産生に関与する抗原決定基がヒトと動物で同じとは限らない。

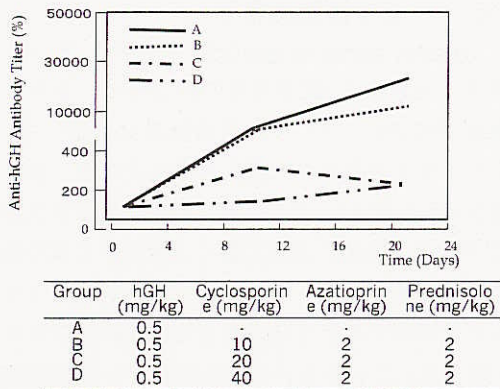


Fig. 1 Mean anti-hGH antibody titer in pigs after administering 0.5 mg hGH once daily for 22 days (H. Agersø et al, 1999)

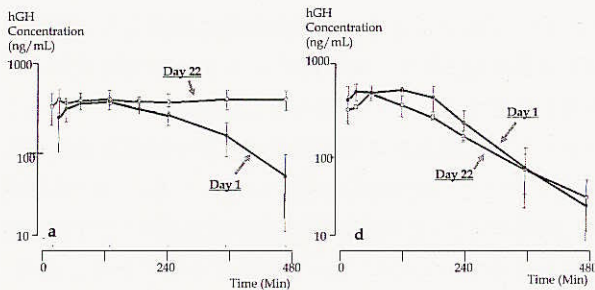


Fig. 2 Mean (±SD) hGH concentration in pigs on day 1 and 22
 a: 0 mg/kg Cyclosporine : Antibody Positive
 d: 40 mg/kg Cyclosporine : Antibody Negative
 H.Agersø et al. 1999

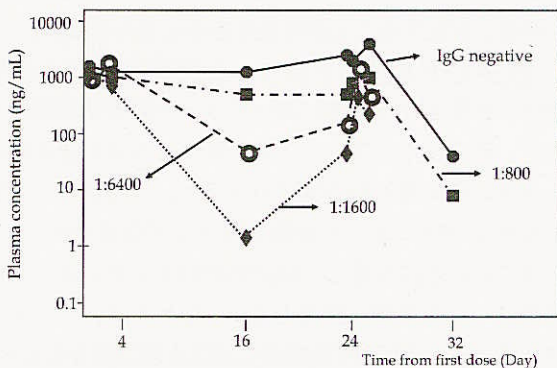


Fig. 3 Comparison plasma concentration of drug in antibody positive and negative rats following subcutaneous injection of immunosuppressant

Dose (mg/kg)	Day	IgG Antibody Titer		IgG Antibody Reactive Animals
		Mean	SD	
0.25	18	500	424	2/8
	25	1120	657	5/8
	33	13120	8500	5/8
	37	8670	9280	6/8
1	18	200	N/A	1/8
	25	920	657	5/8
	33	5370	9150	7/8
	37	2640	2580	5/8
5	18	N/A	N/A	0/8
	25	1700	2120	2/8
	33	6300	9710	6/8
	37	4840	5010	5/8
25	18	N/A	N/A	0/8
	25	N/A	N/A	0/8
	33	N/A	N/A	0/8
	37	N/A	N/A	0/8

N/A: Not applicable

Table 2 Inhibition of antibody formation with immunosuppressant

従って、ヒトにおける抗体産生並びにその生体反応を動物試験の結果から推測することは難しく、慎重に行う必要がある。

3. まとめ

- 1) バイオ医薬品では動物を用いた安全性試験において被験物質に対する特異抗体が一般に産生される。
- 2) 動物における抗体産生の有無からヒトにおける抗体産生の有無を推測することは難しい。
- 3) 産生された抗体は中和、Clearing、Sustain等の性質を有し、安全性評価の上で重要な役割を果している。
- 4) バイオ医薬品の安全性試験においては、被験物質の血中濃度推移の確認と平行して抗体価の確認が必要である。

文献

- 1) Timon W. Van Haeften et al: Effect of insulin antibodies and their kinetic characteristics on plasma free insulin dynamics in patients with diabetes mellitus. *Metabolism* 35(7): 649-656, 1986.
- 2) Henrik Agersø et al: Plasma concentration of hGH and anti-hGH antibodies after subcutaneous administration of hGH for 3 weeks to immunosuppressed pigs. *J. Pharma. Toxicolog. Methods* 41: 1-8, 1999.

Immunotoxicology最前線

経口トレランスとディーゼル排気微粒子

吉野 伸 (神戸薬科大学薬理学研究室)

(1) 経口トレランスとは？

抗原を経口的に摂取すると、腸管局所では摂取抗原に対するIgA抗体産生、全身的には免疫寛容が誘導されることはよく知られている。このうち、全身的免疫寛容の現象は経口トレランス (oral tolerance) と呼ばれている¹⁾。経口トレランスの現象は実験的に容易に観察できる。たとえば、無処理の健康なマウスにウシ血清アルブミンを注射し免疫すると、通常一定期間後に免疫抗原に対して特異的な抗体産生やリンパ球の増殖反応がみられるが、前もって同抗原を経口投与したマウスにおいては、免疫を試みても抗体産生やリンパ球増殖はみられない、あるいはみられても非常に弱い (トレランスの誘導)。とくに、ヘルパーT細胞のサブセットのうち、IFN- γ およびIgG2a産生、遅延型過敏症反応などに関与するTh1細胞が経口的にトレランスを受けやすい。一方、IL-4、IL-5、IL-6、IgE、IgG1抗体産生、即時型アレルギー誘導などに関与するTh2細胞のトレランス誘導はTh1細胞の場合よりも弱い。ヒトの場合も同様である。

経口的に摂取された抗原は腸管に達するまでに消化酵素によって大部分は低分子にまで分解されるが、一部は分解を免れ高分子のまま腸管から積極的に取り込まれることが知られている。腸管から取り込まれた抗原がどのような機序で免疫寛容原としてトレランスを誘導するかについては未だ不明な点が多いが、これまでの研究から、大量の抗原摂取によって抗原特異的T細胞のアポトーシスによる除去および同細胞の不活化 (アナジー) による免疫不応答、少量の抗原摂取によってTh2あるいはTh3細胞が活性化され、産生されるIL-10やTGF- β などの抑制的サイトカインによる免疫抑制などが示唆されている。このようなトレランス誘導は、何らかの原因によって、摂取抗原が寛容原ではなく免疫原として働くことによって引き起こされる食物アレルギーの誘導阻止に重要な役割を果たしていると考えられている²⁾。その原因としては、たとえば腸管における毒性環境因子による免疫担当細胞の障害などが考えられるが、著者らは、ディーゼル車から排出される微粒子が経口トレランスの誘導を阻止することをみいだした。

(2) ディーゼル排気微粒子

(diesel exhaust particle, DEP)とは？

DEPは、炭素粒子 (DEP重量の約18%)と、それに吸着した物質 (同82%)、主に多環芳香族炭化水素、キノン、アルデヒドなど多種類の有機化合物および鉄、銅などの重金属などから成り³⁾、その微粒子の平均直径は大部分が1 μ m以下であるため、非常に軽く、大気中に長時間にわたって浮遊可能である。たとえば、米国ロサンゼルスでは、人々は平均すると1日当たり0.3mgのDEPを呼吸によって取り込んでいるという報告がある⁴⁾。DEP構成成分の中には細胞毒性、発ガン作用を有するものも多いが⁵⁾、免疫系に対しても大きな影響を与える。たとえば、比較的少量のDEPの暴露によって、IL-4、IL-5、IL-8などのTh2サイトカイン産生は強く促進されるが、IFN- γ 、IL-2などのTh1サイトカイン産生はほとんど影響を受けない、あるいは逆に抑制される。しかし、大量のDEPに暴露されると、Th2のみならずTh1サイトカインの産生も増強される⁶⁾。Th2サイトカイン産生促進と関連して、DEPは抗原特異的IgE産生、実験的アレルギー性気道炎および鼻炎を促進する⁷⁾。Th1優位の自己免疫疾患モデルであるコラーゲン関節炎および本疾患に重要な役割を果たす抗II型コラーゲン抗体IgG2a産生に対しても、DEPは促進的に作用する⁸⁾。どのDEP構成成分がTh1およびTh2免疫応答を促進するのかについては現在不明である。最近、著者らは、ヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタン、メタノール、アンモニアの順序でDEPから極性の異なる化合物群の抽出をおこなった結果、アンモニアによって抽出されなかった残渣が比較的選択的にTh1反応を、アンモニア抽出物がTh2反応を、ジクロロメタンで抽出されたものがTh1およびTh2の両免疫反応を促進することを見出した⁹⁾。近い将来、シリカゲルクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどを用いることによって、Th1あるいはTh2反応を選択的に促進する物質を抽出、単離、同定することが可能であると思われる。

(3) DEPによる経口トレランス誘導阻止について

DEPに暴露された動物においては、呼吸器系組織のみならず、嚥下作用によって、胃、腸などの消化器系組織にも少なからぬ量のDEPが存在する¹⁰⁾。したがって、腸管免疫系はDEPによって影響を受ける可能性があるが、我々はこのことに注目し、DEPの経口トレランスに対する効果について詳細に検討した¹¹⁾。たとえば、マウスを卵白リゾチーム (HEL)で免疫前にHELを経口投与すると、同抗原に対する抗体IgG産生、リンパ球増殖反応、Th1免疫反応 (IL-2、IFN- γ 、IgG2a産生、遅延型過敏症反応)、Th2免疫反応 (IL-4、IL-10、IgG1産生)は抑制され、トレ

ランスが成立するが、DEPをHELと併用して投与することによって本トランス誘導はDEP用量依存的に阻止される。とくに、DEPは、Th2よりもTh1経口トランス誘導をより強く阻止する。また、HELに対するTh1経口トランス誘導は上記アンモニアによって抽出されなかった残渣 (Th1反応促進) およびジクロロメタン抽出物 (Th1およびTh2促進) によって阻止されるが、他のDEP抽出物によっては影響を受けない。一方、Th2経口トランス誘導はアンモニア(Th2促進) およびジクロロメタン抽出物によって阻止されるが、他の抽出物によっては影響を受けない¹²⁾。さらに、無処理マウスにDEPおよびHELを併用して繰り返し経口投与すると、抗原特異的抗体 IgG、IgG2a、IgG1が血中に出現する。DEPあるいはHEL単独の経口投与では、このような抗体産生はみられない。以上の結果は、DEPは経口トランスを破壊させ、摂取抗原に対する免疫応答(アレルギー)を誘導する可能性を示唆している。喘息やアトピーの発症は大気汚染物質と関連しており、また、喘息患者の6%、アトピー性皮膚炎患者の5-6%は食物アレルギーに起因しているのではないかとこの疫学調査¹³⁾は興味深い。

文献

- 1) Weiner HL, et al, *Annu Rev Immunol* 12:809, 1994.
- 2) Mowat AM, In *Handbook of Mucosal Immunology* (edited by Ogra PL et al), Academic Press, San Diego, 1994, p185.
- 3) Schuetzle D, *Environ Health Perspect* 47:65, 1983.
- 4) Peterson B et al, *Ann Allergy* 77:263, 1997.
- 5) Sagai M, et al, *Free Radic Biol Med* 14:37, 1993.
- 6) Yoshino S, et al, *Cell Immunol* 192:72, 1999.
- 7) Takano H, et al, *Am J Respir Crit Care Med* 156:36, 1997.
- 8) Yoshino S, et al, *J Pharmacol Exp Ther* 290:524, 1999.
- 9) Yoshino S, et al, *Int J Immunopathol Pharmacol* 15:13, 2002.
- 10) Takefujii S, et al, *J Allergy Clin Immunol* 79:639, 1987.
- 11) Yoshino S, et al, *J Pharmacol Exp Ther* 287:679, 1998.
- 12) Yoshino S, et al, *Toxicol Sci* 66:293, 2002.
- 13) Sabbah A, et al, *Allergy Immunol* 29:103, 1997.

免疫毒性とシグナル伝達

金崎佳世子、中村 和希

(塩野義製薬株式会社 新薬研究所)

免疫担当細胞が外から様々な刺激を受け増殖、分化あるいはアポトーシスなどに至る過程において、外界刺激が細胞内シグナル伝達機構を介して核に伝達されたのち種々の遺伝子が発現されることが必要である(図1)。したがって、免疫毒性物質によって細胞内シグナル伝達が影響を受けると、免疫担当細胞の正常な機能が損なわれることになる。近年、免疫担当細胞内のシグナル伝達機構が次々と明らかにされてきているが、本稿では免疫毒性の発現機序を考えるうえで細胞内のシグナル伝達経路について考えてみたい。

樹状細胞などの抗原提示細胞によって取り込まれた抗原タンパク質はペプチドにまで分解されたのち最終的には主要組織適合性抗原(major histocompatibility antigen; MHC抗原)上に提示されるようになるが、T細胞はこの抗原を外界刺激として受容・認識したのち最終的な表現形として種々のサイトカインを発現するようになる(図2)。この抗原刺激を最初に受容するのが言うまでもなくT細胞受容体(T cell receptor; TCR)である。また、B細胞においても細胞膜上にある免疫グロブリンがB細胞受容体(B cell receptor; BCR)として機能し、直接抗原分子の表面にある抗原決定基と特異的に結合し刺激を受容することになる。TCR、BCRはともにその細胞内領域にチロシンキナーゼ(protein tyrosine kinase; PTK)ドメインを持たず、そのみではリガンドを認識してもシグナルが伝達されない。そのためTCRやBCRは、細胞内領域にITAM(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)と呼ばれるシグナル伝達に必要なアミノ酸配列を有するサブユニットとの複合体として発現している。

T細胞(図2)ではTCRがMHC抗原上の抗原ペプチドを認識すると同時に、ヘルパーT細胞の場合CD4がMHCクラスII分子に、また細胞傷害性T細胞の場合はCD8がMHCクラスI分子にそれぞれ結合しTCRとMHC複合体の結合を安定化させる^{1,2)}。その後、細胞内では様々なタンパク質のリン酸化が起こることになる。まず、CD4/8の細胞内ドメインに会合するLck(SrcファミリーPTK)が活性化され、TCRと複合体を形成しているCD3のITAMがチロシンリン酸化を受ける。そのリン酸基にZAP-70(SykファミリーPTK)がその分子内に有するSH2ドメインを介して会合し、それによりZAP-70はLckからリン酸

化を受けキナーゼとして活性化し更に下流の基質をリン酸化し活性化シグナルを伝える。ZAP-70の基質となるのはLAT (linker for activation of T cell) やSLP-76などのアダプター分子である。SLP-76はSH2ドメインを介してVavと会合しRac/JNK (c-Jun N-terminal kinase) 経路を活性化して転写因子AP-1 (activator protein-1、FosとJunのヘテロダイマー) のリン酸化を誘導する。一方LATは多くのチロシン残基を有し、リン酸化によりPLC (phospholipase C) やGrb2などと結合しこれら分子を細胞膜に移行させる。LATとGrb2が会合すると、Grb2内のSH3ドメインを介してSosが会合し、Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路が活性化される。MAPKはFosの転写を誘導する。また、PLCの活性化により小胞体からのCa²⁺放出が引き起こされる。細胞内Ca²⁺濃度の上昇によりホスファターゼであるCN (calcineurin) が活性化され、細胞質内にリン酸化状態で存在する転写因子NF-AT (nuclear factor of activated T cell) を脱リン酸化し核内へ移行させる。核内へ移行したNF-ATは先述したAP-1と会合しIL-2などのサイトカイン遺伝子の転写を誘導する。

ところで、T細胞が活性化されるためにはTCRからの抗原認識シグナル (第1シグナル) のみでは不十分で、T細胞-抗原提示細胞間の補助刺激 (co-stimulation) シグナル (第2シグナル) が重要な役割を果たしている^{3,4)}。補助刺激分子のレセプターとしてはCD28分子などが存在し、抗原提示細胞上のCD80、CD86をリガンドとして結合する。活性化したCD28はPI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) やPKC θ (protein kinase C θ) と会合しNF- κ B (nuclear factor- κ B) 経路やMAPKファミリーであるJNK・p38経路を活性化すると考えられているが、そのシグナル伝達系は未だに不明な点が多い。

B細胞ではT細胞と全く異なる抗原認識様式をとるにもかかわらず、その複合体構造およびシグナル伝達系が類似しており、BCR/CD79複合体を介する第1シグナルと補助レセプターを介した第2シグナルが存在する。BCRが刺激されるとLyn (SrcファミリーPTK) が活性化され、CD79のITAMがチロシンリン酸化を受ける。B細胞ではT細胞のZAP-70の代わりにSykキナーゼがITAMのリン酸化チロシンと会合し活性化を受け、下流にシグナルを伝えていく。BCR刺激による主な経路はT細胞の時と同様、PLCの活性化によるCa²⁺経路およびMAPK経路、Rac/JNK経路及びPI3K経路が知られている。

以上、T細胞およびB細胞が抗原を認識し種々の遺伝子発現に至るまでの流れについてその概略を述べた。次に、免疫毒性作用を示す物質が免疫系のシグナル伝達因

子に作用し破綻を生じるまでの機構について、免疫毒性 (抑制) 物質または因子として知られているものをいくつか例にあげて説明したい。

活性酸素は、外界から細菌が侵入すると好中球やマクロファージなどの細胞から産生される。この活性酸素は殺菌作用を示し生体の免疫システムに関与しているが、過度に放出されると血管拡張や血管透過性が亢進し炎症が引き起こされ組織傷害的に働く。このように抗酸化防御システムがうまく働かずに起きる活性酸素による害は酸化ストレスと呼ばれる。酸化ストレスはリンパ球において、PLCの活性化を介して下流応答を誘導するZAP-70をレセプター非依存的に活性化することでPTK依存性シグナルの制御を破壊する⁵⁾。PLCの活性化により細胞内Ca²⁺濃度が上昇し、Ca²⁺調節不全を引き起こす。また第1シグナルを減弱させ、アポトーシスを誘導する。酸化ストレスと通常の第1シグナルはPLCの活性化に関連する共通のPTKを活性化するが、それらは異なるメカニズムを介した経路でシグナルを伝達する。多環芳香族炭化水素 (PAHs) もPTKの活性化をレセプター非依的に誘導する。さらに小胞体膜上のCa²⁺-ATPaseポンプ (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; SERCA) を阻害することでCa²⁺の小胞体への再取り込みを阻害し、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる。また酸化ストレスによってHO-1 (heme oxygenase-1) の産生も誘導される^{6,7)}。HO-1はヘムを分解する酵素であり、肝臓や脾臓で高レベルに発現している。HO-1はLPS刺激によっても誘導され、その際炎症性サイトカインであるIL-1 α/β や一酸化窒素、TNF- α が関与しているとの報告がある。HO-1遺伝子はJNKなどの経路を介してAP-1が活性化されることで発現される。

汚染物質として有名なTCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) などのハロゲン芳香族炭化水素 (HAH) は、未熟なCD4CD8 DP胸腺細胞の減少を伴う胸腺の萎縮を誘発する⁸⁾。また、B細胞の初期シグナルに作用し抗体産生応答を抑制することが知られている⁹⁾。TCDDは細胞質内に存在するAh (aryl hydrocarbon) レセプターと結合し、DRE (dioxin response element) と呼ばれる領域に結合してP450酵素等の産生を誘導する。c-fosやc-junなどの初期応答遺伝子のmRNA発現もTCDDにより促進され、AP-1の誘導が起こる。さらにTCDDは、PLC活性には影響を及ぼさないがPTKを活性化しMAPKの活性化を促進する。また、SERCAの阻害やIP3の産生による小胞体からのCa²⁺遊離とは異なるメカニズムで細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、B細胞の応答を抑制する。

ジブチルスズなどの有機スズ化合物は、胸腺の萎縮を誘発し、細胞性および液性免疫を抑制する⁹⁾。有機スズ化合物はゴルジ体や小胞体に特異的に蓄積しその膜や構造を破壊する。小胞体の破壊によってIP3からのCa²⁺遊離が起らず、最終的にDNA合成が阻害される。胸腺のリンパ球のような増殖細胞は有機スズ化合物に対する感受性が高く、上記のようにまず細胞増殖が阻害されその結果アポトーシスが誘導されていると考えられる。

また免疫抑制剤を例にとってみるとcyclosporin Aやtacrolimus (FK506) は細胞内のシクロフィリン、FKBP (FK結合タンパク質) とそれぞれ結合して複合体となる。複合体はCNに特異的に結合してその作用を抑え、エンハンサーに結合してIL-2遺伝子を発現させるNF-ATの脱リン酸化と核への移行を抑制する。この作用はIL-2遺伝子の転写を抑制できることから、臓器移植における拒絶反応の抑制に用いられている。また上述したようにTCRシグナルとCD28シグナルの共存によりJNK・p38経路が活性化されるが、cyclosporin Aやtacrolimusは共に両経路の活性化を阻害するとの報告がある¹⁰⁾。Cyclosporin Aやtacrolimusの作用点はこれらMAPKファミリーの上流に存在するMAPKKKそのもの、もしくはさらに上流の分子であり、この抑制作用は古典的MAPKおよびストレス応答に伴うJNK・p38の活性化には影響を及ぼさないことからT細胞の活性化経路に特異的なものであると考えられている¹⁰⁾。

その他、転写因子NF-κBも免疫応答に重要な役割を果たしている⁹⁾。NF-κBの各サブユニットの欠損マウスは、B細胞およびT細胞の発達に重大な異常は見られないが、増殖、活性化、サイトカイン産生およびB細胞における抗体のクラススイッチを完全に抑制することが知られている。したがって、このシグナル伝達部位に作用する免疫毒性物質も考えられる。

免疫毒性の発現機序解明において細胞内シグナル伝達に及ぼされる影響について考えることは重要と言える。また、トキシコゲノミクスあるいはプロテオミクスの領域においてもシグナル伝達物質の発現の変化をいち早く捉えていくことは有用と考えられる。今後さらに様々な免疫毒性化合物の細胞内シグナル伝達に及ぼす影響が調べられていくものと期待される。

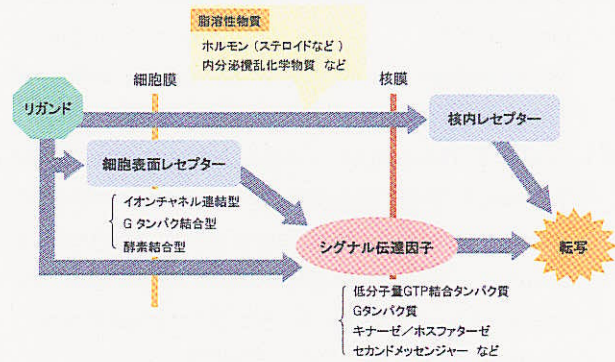


図1. 細胞内シグナル伝達の流れ

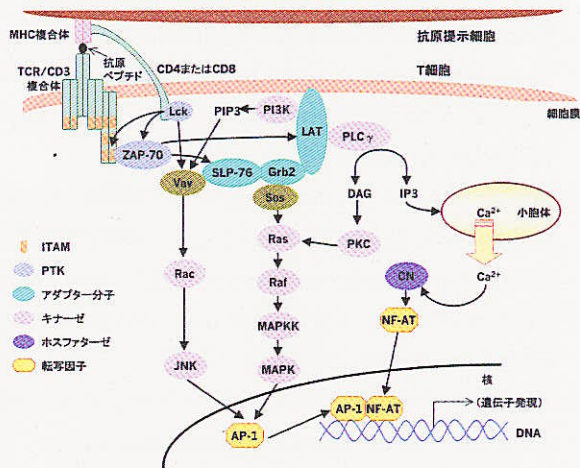


図2. T細胞受容体を介したシグナル伝達経路

参考文献

- 1) Nel, A. E. (2002) T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: Signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 109, 758-770
- 2) Kobata, T. and Morimoto C. (1999) T cell receptor and its related molecules in signal transduction. *Nippon Rinsho*, 57(2), 273-277
- 3) Kane, L. P., Lin, J. and Weiss, A. (2002) It's all Relative: NF-κB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends Immunol.*, 23(8), 413-420
- 4) Li, Q. and Verma, I. M. (2002) NF-κB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2(10), 725-734
- 5) Holsapple, M. P., Karras, J. G., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., Burchiel, S. W., Davila, D. R., Schatz,

- A. R. and Kaminski, N. E. (1996) Molecular mechanisms of toxicant-induced immunosuppression: role of second messengers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36, 131-159
- 6) Oguro, T., Hayashi, M., Nakajo, S., Numazawa, S. and Yoshida, T. (1998) The expression of heme oxygenase-1 gene responded to oxidative stress produced by phorone, a glutathione depletor, in the rat liver; the relevance to activation of c-Jun N-terminal kinase. *J Pharmacol Exp Ther.*, 287(2), 773-778
- 7) Oguro, T., Takahashi, Y., Ashino, T., Takaki, A., Shioda, S., Horai, R., Asano, M., Sekikawa, K., Iwakura, Y. and Yoshida, T. (2002) Involvement of tumor necrosis factor α , rather than interleukin-1 α / β or nitric oxides in the heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide in the mouse liver. *FEBS Letter*, 516, 63-66
- 8) McConkey, D. J., Hartzell, P., Duddy, S. K., Hakansson, H. and Orrenius, S. (1988) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin kills immature thymocytes by Ca^{2+} -mediated endonuclease activation. *Science*, 242(4876), 256-259
- 9) Arakawa, Y. (1997) Biological activity of tin and immunity. *Sangyo Eiseigaku Zasshi*, 39(1), 1-20
- 10) Matsuda, S. and Koyasu, S. (2000) A second target of cyclosporin A and FK506. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 45(11), 1823-1831

略語

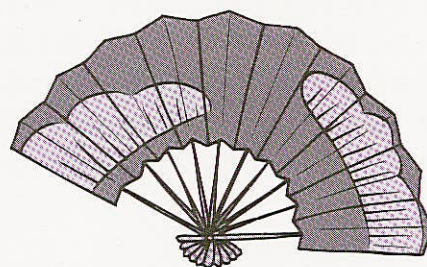
- AP-1: activator protein-1
CN: calcineurin
DAG: diacylglycerol
IP3: inositol 1,4,5-trisphosphate
ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JNK: c-Jun N-terminal kinase
LAT: linker for activation of T cell
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MHC: major histocompatibility complex
NF-AT: nuclear factor of activated T cell
PI3K: phosphatidyl inositol 3-kinase
PIP3: phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKC: protein kinase C
PLC: phospholipase C
PTK: protein tyrosine kinase

- SLP-76: SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kD
TCR: T cell receptor
ZAP-70: Zeta-associated protein-70

編集後記

今年の学会の新たな取り組みとして、第9回日本免疫毒性学会から複数の審査員の投票により決定される学会会長賞と奨励賞をもうけ、それぞれの受賞者の研究内容を掲載しました。また、学会での若手の育成と学会の更なる活性化にむけて評議員制度を導入するための準備も始めました。新たな年にはこれまでの学問領域が不鮮明になり益々新領域の開拓が進むと考えられます。日本免疫毒性学会でもその特徴を鮮明にして飛躍するための新たな施策が期待されます。皆様から学会への新たな取り組みのためのご提案や海外学術情報をお待ちしております。

(HF記)



編集・発行：日本免疫毒性学会
発行日：平成14年12月

編集発行責任者：大沢 基保
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