

# ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会：The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 14 No. 2 (通巻28号) 2009

## 目次

第16回日本免疫毒性学会学術大会報告 ……	1
旭川医科大学 吉田 貴彦	
第17回日本免疫毒性学会学術大会 (予告1) …	1
独立行政法人国立環境研究所 藤巻 秀和	
第16回大会 年会賞 培養細胞を用いた新しいアレルギー検査法の開発 ……	2
国立医薬品食品衛生研究所 中村 亮介ほか	
第16回大会 奨励賞 石綿曝露後NK細胞上NKp46発現抑制機構の解析、 NKp46の抗腫瘍免疫機能予測分子指標としての 可能性……	5
川崎医科大学 西村 泰光ほか	
日本免疫毒性学会へ期待するもの……	7
岩手医科大学名誉教授 角田 文男	
WHO/IPCS 免疫毒性ガイダンス (Harmonized Guidance of Immunotoxicity Risk Assessment) 作成に向けた動きについて……	8
国立医薬品食品衛生研究所 手島 玲子	
SOT免疫毒性部会メンバーの 日本免疫毒性学会学術大会参加記……	8
English pages ……	10

## 第16回日本免疫毒性学会、 第55回日本産業衛生学会 アレルギー・免疫毒性研究会開催の報告 吉田 貴彦 (旭川医科大学健康科学講座)

2009年8月27・28日の2日間にわたって、旭川市の旭川市民文化会館小ホールおよびホワイエにおいて、第16回日本免疫毒性学会学術大会を、日本産業衛生学会アレルギー免疫毒性研究会第55回研究会と共催にて開催いたしました。

本学会が免疫毒性研究に特化した小規模な学術集会であることから、講演会場も一つとし全参加者が全ての発表に触れることで学会員の相互の情報共有を図るアット

## 第17回日本免疫毒性学会学術大会 (JSIT2010) (予告1)

日本免疫毒性学会の第17回学術大会を下記の要領で開催いたしますので、ご案内申し上げます。

期 日：平成22年9月9日(木)～10日(金)

会 場：独立行政法人国立環境研究所

大山記念ホール

茨城県つくば市小野川16-2

(TEL：029-850-3665)

(交通：つくばエクスプレス つくば駅下車、バス10分 常磐線 ひたち野うしく駅下車 バス13分)

大会テーマ：「感受性を考慮した免疫毒性研究の新展開—環境・遺伝・時間要因」

内 容：招待講演：「Mast cells: to the expression of innate and acquired immunity」

A Dean Befus, Ph.D. (Chair in Asthma Research, Division of Pulmonary Medicine, Department of Medicine, Faculty of Medicine & Dentistry, University of Alberta, CANADA)

特別講演：「自然免疫システムにおける病原体認識の分子基盤とその制御機構」

三宅 健介 東京大学医科学研究所教授

教育講演：「アレルギー性試験法の現状と課題 (仮題)」

澤田 純一 日本免疫毒性学会理事長

シンポジウム：「免疫毒性を修飾する感受性要因」 MaryJane Selgrade, Ph.D. (Chief, Cardiopulmonary and Immunotoxicology Branch Environmental Public Health Division, USEPA) ほか

ワークショップ、学生セッション、一般演題を予定

発表形式：口頭発表とポスター発表

演題申し込み締切日：7月5日(月)

年 会 長：藤巻 秀和 (独立行政法人国立環境研究所環境リスク研究センター)

事 務 局：野原 恵子 (独立行政法人国立環境研究所環境健康研究領域)

第17回日本免疫毒性学会学術大会・年会事務局

TEL: 029-850-2500 FAX: 029-850-2574

e-mail: jsit17@nies.go.jp

ホームな雰囲気を保つとの方針にのっとり、かつ10分間の口頭発表に加えて質疑応答を5分間とるなどに十分な時間を取ることで、互いの学問的な向上につなげることを目指しました。さらに、本学会が目指す国際化に合わせて、海外からの参加者にも理解していただきやすくすることを意識して講演集の英文スペースの拡大と、発表(スライド、ポスターともに)の際の図表などの英文表記を心がけることへの協力を得るなどの工夫を図るなど、新しい試みを取り入れました。特別講演、シンポジウム、ランチョンセミナーなどの発表に6名の海外からの参加が得られ、総数163名の参加者でした。しかし、折からの経済不況のために昨年に数演題の参加があったアジア諸国からの参加者が無かったことは残念でした。

今回の学術会議では、「免疫と子ども」というテーマを設定しました。少子高齢化が進む我が国にあって、次世代を担う子どもの健全な発育が望まれています。特別講演1として、米国国立環境健康科学研究所(NIEHS, NIH)のDori R. Germolec先生には、「Does immunomodulation early in life increase disease risk in children and beyond?」という演題にて、ヒトの発生段階から幼小児期に受ける免疫変容が子どもの現在から将来にかけての疾病発生に影響するかという内容で講演をしていただきました。動物実験を用いた基礎的研究から、ヒトでの疫学研究の結果を総合的にまとめ公衆衛生的な意義にまでふれる内容の濃い講演であり、当日午後の学会テーマと同じ名称のシンポジウムにつながる意義深いものでした。シンポジウム「免疫と子ども」は、自治医科大学の香山不二雄先生、塩野義製薬の中村和市先生の座長により進めました。東京大学大学院医学系研究科分子予防医学の石川昌先生に「ダイオキシンによる腸管免疫の破綻とアレルギー感作」、千葉大学予防医学センターの森千里先生に「胎児の複合汚染とアレルギー疾患との関連、そして次世代の健康を守るための化学物質の健康診断システム」、米国ニューヨーク大学のJudith T. Zelikoff先生に「Prenatal exposure to cigarette smoke increases tumor susceptibility of juvenile mice via changes in anti-tumor immune mechanisms.」の演題で講演をしていただき、活発な討論がなされた。なお、午後のプログラムの初めに総会を開催しました。初日のプログラムの後に、旭川グランドホテルにて懇親会を開催し、米国のSociety of Toxicology, Immunotoxicology specialty section (SOT ITSS) との交流事業について本学会担当理事の中村和市先生から両学会の交流についての説明をうけ、引き続きSOT ITSSより本学術大会に派遣されたZelikoff先生からコメントをいただきました。また、学会事務局の大槻先

生によるピアノの弾語りの余興があるなど、学会員の親睦が図られた。

大会2日目の特別講演2では、全国的な人気スポットとなった旭川市旭山動物園の小菅正夫名誉園長に「旭山動物園の役割」として講演を受け、世界の歴史の中で果たしてきた動物園の意義と旭山動物園が先駆的に取り組んでいる新しい動物園像について聞かせていただいた。同日午後には、免疫毒性試験法についてのワークショップ「免疫毒性試験法の標準化-KLMを用いる抗体産生応答試験(TDAR)-」を行ない、製薬企業の安全性試験を担当する部署に所属する先生により、「KLH-TDARの標準化を議論するにあたって」(筒井尚久先生)、「ラットを用いたkeyhole limpet hemocyaninを用いるT cell dependent」(河井良太先生)、「武田におけるKLH-TDAR試験法について」(森香奈子先生)、「市販のKLH抗体ELISA kitを用いたTDAR法-SRBC法との比較-」(小松弘幸先生)、「抗KLH IgMおよびIgG抗体産生量を指標としたTDAR試験系の検討」(原田英樹先生)の発表があり、本学会が社会的に果たすべき役割の一つが担われました。両日合わせて一般演題は、22題の口演と13題のポスターの発表があり、いずれも熱心かつ活発な討論がなされました。

全体を通して、世界的な経済不況と地方開催であるための参加者の減少があったものの、十分な発表数があり、発表内容も充実しており、好評のうちに閉会することが出来ました。ご参加いただきました方々を始め、学術大会の運営にご支援いただきました各団体、各位に心より御礼申し上げます。

## 年 会 賞

### 培養細胞を用いた 新しいアレルギー検査法の開発

中村 亮介、内田 好海  
樋口 雅一、手島 玲子  
(国立衛研 代謝生化学部)

#### 背景

食物アレルギーは、小児にとって最も多い疾患の一つである。患児の多くは加齢と共に寛解するが、一部はアトピー性皮膚炎や気管支喘息へと症状が進行することが知られている。治療の基本はアレルゲン除去療法となるため、実際に症状を引き起こすアレルゲンを早期に同定することが極めて重要である。

しかし、現在臨床的に広く用いられているCAP-RAST法は、比較的偽陽性が多いことが知られている。この場合、本来除去する必要のない食物を遠ざけてしまうことになるが、特に成長期にある小児にとって、不適切な食物除去は、健康な発育の阻害要因ともなりかねない。一方、信頼度の高い*in vivo*アレルギー試験法としては確定診断法である食物負荷試験 (OFC) や簡便なスキンプリックテストなどがあるが、患者への負担が問題となる。患者の全血から採取した好塩基球の活性化を調べる*ex vivo*法も知られているが、全血は保存ができないため後方視的研究には適用できず、また、再試験のためには再度患者に来院してもらう必要があった。このような背景から、長期保存可能な血清を用い、より信頼度の高い*in vitro*アレルギー試験法の開発が望まれていた。

ヒト高親和性IgE受容体 (FcεRI) を安定発現させたラット培養マスト細胞株を用いて脱顆粒を測定することにより同目的を達成しようという試みはいくつかなされたが、ヒトの血清はラットの培養細胞に対して細胞傷害性を有するため、安定した結果が得られないという問題があった。

そこで我々は、ヒトFcεRIを発現するラット培養マスト細胞株に、転写因子NF-ATの活性化依存的にルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を組み込んだ細胞株を作製し、これにより、IgEの架橋に基づくマスト細胞の活性化をルシフェラーゼアッセイによって検出するシステムを開発し、これをEXiLE (IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression) 法と命名した。

## 材料および方法

ラット培養マスト細胞株 (RBL-2H3) にヒト高親和性IgE受容体 (FcεRI) を安定的に発現させたRBL-SX38細胞に、NF-ATによって転写が誘導されるルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ細胞株、RS-ATL8細胞を樹立した (特願2009-168530)。この細胞を96ウェル白色クリアボトムプレートに播種し、培地で100倍あるいは様々な濃度に希釈したヒト血清により一晩感作した。滅菌PBSにより1回洗浄後、10% FCSを含む培地に溶解した様々な濃度の抗原または抗ヒトIgE抗体により37°Cで3時間刺激し、ルシフェラーゼの発現量をホモジニアス系基質液 (ONE-Glo; Promega社) およびルミノメータ (EnVision; PerkinElmer社) により測定した。活性化の判定は、バックグラウンド発現レベルの2倍をもって閾値とした。脱顆粒測定はβ-hexosaminidase活性による。OFCとの対比の実験については、藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院において負荷試験が実施された患者について、匿名化

の後、各種臨床情報と共に血清が提供された。

## 結果

健康人の血清を段階希釈してRS-ATL8細胞を感作し、翌日1 μg/mlの抗ヒトIgE抗体により受容体を架橋刺激したところ、15 pg/ml (0.006 IU/ml) の時点でバックグラウンドの2倍の閾値を超えることが確認された (not shown)。

EXiLE法の非常に高い感度が示されたため、次に、段階希釈した卵白アレルギー患者血清を用いてRS-ATL8細胞を感作し、1 μg/mlのオボアルブミンによってこれを刺激した。その結果、血清希釈率100倍以上においても閾値を超える応答が観察された (Fig. 1a)。一方、同様の条件で感作したRBL-SX38細胞を用いてその脱顆粒を測定したところ、抗原刺激による脱顆粒の誘導は観察されたものの、感作のみで刺激を行なわない条件下でも高いレ

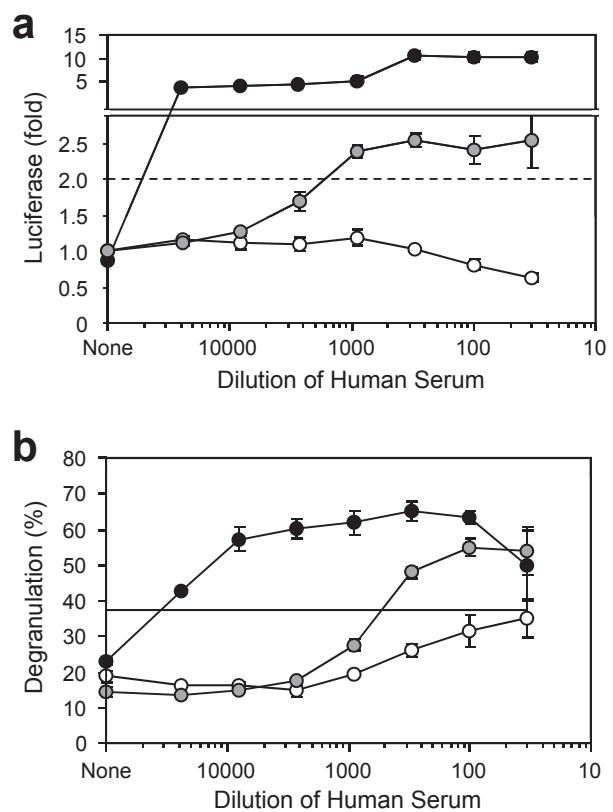


Fig. 1 Comparison of luciferase expression and degranulation RS-ATL8 cells (a) and RBL-SX38 cells (b) were sensitized with serial dilutions of egg white allergy patient's serum (total IgE, 12,700 IU/ml; egg white specific IgE, >100UA/ml) overnight. Cells were stimulated with 1 μg/ml ovalbumin (shaded circles), 1 μg/ml anti-human IgE (closed circles), or solvent alone (open circles). Luciferase expression after 3h-stimulation (a), and degranulation after 30min-stimulation (b) are shown. Dashed line in a, two-fold level of background (control without serum) luciferase expression. Data are means ± SEM (n = 3 in a, n = 4 in b).

ベルの自発的な放出が起き、バックグラウンドが非常に高いことが示された (Fig. 1b)。

次に、卵白に関するOFCを実施した19人の患者についてEXiLE法による解析を行なった。Table 1 に示す通り、19人の患者中、OFC陽性であったものは12名、陰性であったものは7名であった。CAP-RAST法による血清中卵白特異的IgE量は0~6の7段階のクラスに分類され、通常はクラス2以上 (0.70 U<sub>A</sub>/ml ~) を陽性と判定するが、この場合、OFC陽性患者はすべてCAP-RAST陽性となる一方で、OFC陰性患者についても7名中6名が陽性となった。OFCとの相関は、Fisher's exact testでP = 0.3684であった。一方、EXiLE法による判定は、1~1000 ng/mlの卵白抽出抗原 (EWP) により3時間刺激した際の発現量の最大値が刺激前に比して2倍以上に達したときに陽性と判定した。その結果、EXiLE法による判定結果はOFCの結果と非常に高い相関を示し、Fisher's exact testでP = 0.001687であった。

### 考察

我々が開発したRS-ATL8細胞は、希釈したヒト血清により効率的に感作され、抗ヒトIgE抗体および特異的ア

レルゲンによるFcεRIの架橋によって活性化され、発現したルシフェラーゼによりその活性化を容易かつ感度よく定量できることが示された。

Fig. 1bに示したように、従来法の脱顆粒法では、ヒト血清のラット培養細胞への細胞傷害性が問題となり、高い濃度の血清を用いることはできなかった。しかし、低い濃度の血清では十分な感作が成立せず、明確な応答も観察できない。ここでは述べなかったが、OFC陽性患者のうち、#83や#84などクラス3の卵白特異的IgEを持つ患者血清について脱顆粒法で検討すると、どちらも陰性の結果となった。マスト細胞の脱顆粒を誘導するには、やはりある程度の量の特異的IgEが必要なのであろう。

一方、EXiLE法は100倍希釈という低い血清濃度で細胞を感作できるため、細胞傷害性は問題にならない (Fig. 1a)。その結果はOFCの結果と非常に高い相関を示した (Table 1)。なお、EXiLE法の最大値はCAP-RAST法の数値と高い相関を示す (R = 0.9127, Spearman's rank test) ため、基本的にEXiLE法の結果は血清中のアレルギー特異的IgE濃度を反映しているものと考えられる。今回CAP-RASTとOFCとの相関が低かった理由は、CAP-RAST法におけるクラス2という閾値の設定は、少

Table 1 EXiLE in RS-ATL8 cells sensitized with egg-allergy patients' sera

Patient	OFC <sup>a</sup> test	totIgE (IU/ml)	CAP <sup>b</sup> (U <sub>A</sub> /ml)	CAP class	CAP <sup>a</sup> test*	EXiLE (fold) by EWP (ng/ml)				Max <sup>b</sup> EXiLE (fold)	EXiLE <sup>a</sup> test**
						1	10	100	1000		
#79	+	1922	<b>76.8</b>	5	+	<b>2.3</b>	<b>3.4</b>	<b>4.5</b>	<b>3.5</b>	<b>4.5</b>	+
#77	+	1273	<b>68.6</b>	5	+	<b>4.1</b>	<b>8.8</b>	<b>9.5</b>	<b>7.5</b>	<b>9.5</b>	+
#78	+	844	<b>48.3</b>	4	+	<b>4.8</b>	<b>8.3</b>	<b>8.4</b>	<b>8.6</b>	<b>8.6</b>	+
#80	+	381	<b>35.1</b>	4	+	1.5	<b>3.0</b>	<b>3.9</b>	<b>5.0</b>	<b>5.0</b>	+
#74	+	2663	<b>29.9</b>	4	+	<b>3.9</b>	<b>3.3</b>	<b>4.5</b>	<b>4.8</b>	<b>4.8</b>	+
#90	+	12323	<b>25.6</b>	4	+	1.5	<b>2.5</b>	<b>2.8</b>	<b>2.8</b>	<b>2.8</b>	+
#84	+	331	<b>13.2</b>	3	+	1.5	1.7	<b>2.3</b>	1.9	<b>2.3</b>	+
#83	+	772	<b>8.98</b>	3	+	1.3	1.7	<b>2.6</b>	<b>3.2</b>	<b>3.2</b>	+
#85	+	619	5.57	3	+	1.6	<b>2.5</b>	<b>3.5</b>	<b>3.1</b>	<b>3.5</b>	+
#81	+	795	<b>4.54</b>	3	+	1.5	<b>2.2</b>	1.8	<b>2.7</b>	<b>2.7</b>	+
#76	+	509	<b>3.91</b>	3	+	1.4	1.7	<b>2.0</b>	<b>2.2</b>	<b>2.2</b>	+
#94	+	653	<b>2.99</b>	2	+	0.8	1.3	1.3	1.5	1.5	-
#73	-	>5000	<b>33.4</b>	4	+	1.8	<b>2.2</b>	<b>2.2</b>	1.9	<b>2.2</b>	+
#67	-	22600	<b>4.46</b>	3	+	1.0	1.2	1.4	1.6	1.6	-
#82	-	1470	<b>3.45</b>	2	+	1.2	1.2	1.5	1.4	1.5	-
#95	-	578	<b>2.03</b>	2	+	1.1	1.2	1.3	1.5	1.5	-
#75	-	1006	<b>1.17</b>	2	+	0.8	0.9	0.9	1.0	1.0	-
#100	-	5356	<b>0.89</b>	2	+	0.9	1.3	1.5	1.4	1.5	-
#99	-	475	<0.34	0	-	1.1	1.1	1.3	1.5	1.5	-

RS-ATL8 cells were sensitized with 1:100-diluted egg-allergy patients' sera overnight, and stimulated with the indicated concentrations of EWP for 3 hrs. \* CAP test was considered positive if the class was  $\geq 2$  (i.e.  $\geq 0.70$  U<sub>A</sub>/ml). \*\* EXiLE test was judged to be positive if Max EXiLE was more than the cut-off level (2.0). Values greater than cut-off levels are represented in Bold. <sup>a</sup> Correlation between OFC and CAP tests was  $P = 0.3684$ , and that between OFC and EXiLE tests was  $P = 0.001687$  (Fisher's exact test). <sup>b</sup> Correlation between CAP and Max EXiLE values was  $R = 0.9127$  (Spearman's rank test).

なくとも卵白アレルギー患者については厳しすぎたためであろう。しかし、たとえば#67の患者のように、4.46 U<sub>A</sub>/ml (クラス3)の特異的IgEを持つにもかかわらずOFC陰性となる場合に、EXiLE法は正しく陰性の判定を出すことができおり、このような患者においてアレルゲンの除去を開始する前に本試験を行なうことは、臨床上有用であろうと思われる。今後は、例数を増やすと共に様々なアレルゲンについて解析を重ね、信頼性の向上に努めたい。

## 謝辞

このたびは本発表が第16回日本免疫毒性学会学術大会年会賞に選出され、誠に光栄に思います。皆様ご存じのように本大会は旭川医大の吉田先生のもと「子どもと免疫」というテーマで開催され、発達期にある子どもへの化学物質暴露が免疫系の発達に及ぼす影響などについて、精力的なご研究の数々が発表されました。その中で、私どもの研究は、「子どもにとって最もポピュラーな免疫疾患」としての食物アレルギーを対象にしたものであり、正直なところ「少々浮いているかな？」と危惧しておりましたが、予想もしていなかった年会賞という栄誉を受け、驚くと共に身が引き締まる思いでございます。今後とも皆様のご指導・ご鞭撻を頂戴できれば幸いです。

最後になりましたが、本研究は食品健康影響評価技術研究の支援を受けて遂行されました。また、貴重な患者血清をご提供くださった藤田保健衛生大学の宇理須厚雄教授に深く感謝いたします。

## 奨励賞

### 石綿曝露後NK細胞上NKp46発現抑制機構の解析、NKp46の抗腫瘍免疫機能予測分子指標としての可能性

西村 泰光<sup>1</sup>、熊谷 直子<sup>1</sup>、前田 恵<sup>1</sup>  
林 宏明<sup>1</sup>、岸本 卓巳<sup>2</sup>、大槻 剛巳<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>川崎医科大学衛生学、<sup>2</sup>岡山労災病院)

## 緒言

アスベスト(石綿)は肺癌や中皮腫などの腫瘍疾患を引き起こす。石綿は、ROS産生、組織傷害、DNA傷害を誘導し、これにより発癌作用を持つと考えられている<sup>1,2)</sup>。しかし、石綿曝露が必ずしも腫瘍疾患を引き起こすだけではなく、特に中皮腫の発症には30-40年の潜伏期間が

存在する。これらのことは、石綿曝露後の生体内で、抗腫瘍免疫が一定の働きを果たしていること、また石綿曝露の慢性的影響が抗腫瘍免疫減衰に作用している可能性を示唆する。

抗腫瘍免疫において、NK細胞と細胞傷害性T細胞は、形質転換細胞や腫瘍細胞を傷害し、その除去に働いている。T細胞による抗原特異的な標的細胞の認識とは異なり、NK細胞は細胞表面に発現する多様なNK細胞活性化受容体を用いて異常なリガンドを認識し、標的細胞を傷害する。NK細胞活性化受容体には、NKG2 family, signaling lymphocytic activating molecule (SLAM) family, natural cytotoxicity receptor (NCR) familyなどが知られる。最近我々は、NK細胞活性化受容体に注目した末梢血NK細胞の機能解析を行い、悪性中皮腫(MM)患者のNK細胞においてNCRの一つであるNKp46の発現低下を伴う細胞傷害性低下が見られること、同様な細胞表面NKp46発現量の抑制が石綿chrysotile B (CB)曝露下PBMC培養中のNK細胞において見られることを明らかにした<sup>3)</sup>。

そこで、石綿曝露を伴う幾つかの培養環境下におけるNK細胞の機能解析を行い、また、MM患者だけでなく石綿曝露指標である胸膜プラーク(PL)陽性者を含めた石綿被曝露者の末梢血NK細胞の機能解析を行った。これらの中で、石綿曝露によるNKp46発現量抑制の機構解明を試行し、またNKp46の“石綿被曝露者における抗腫瘍免疫機能を測る分子指標”としての可能性を考察した。

## 材料と方法

健常人(HV)由来PBMC又はflow cytometer (FCM) (Becton Dickinson)を用いて単離したCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞を石綿5μg/ml chrysotile B (CB)曝露下で5ng/ml IL-2を加え7日間培養した。細胞膜上・細胞内のNKp46発現量解析にはFCMを用い、発現量は平均蛍光強度(MFI)で表した。培養後PBMCよりFCMを用いてCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞を単離し、抗体を用いて細胞表面NKp46のブロックを行った後、3.7% formaldehydeと0.1% Triton 100で固定・浸透化し、PE標識抗体を用いて細胞内NKp46染色を行った。またNKp46 mRNA量の解析にはReal-time PCR (Stratagene)を用いた。HV、PL、MM各群のPBMCを調製し、%NK細胞、NKGD、2B4、NKp46発現量およびK562細胞への細胞傷害性(% specific lysis)をFCMで測定した。% specific lysisを%NK細胞で除しlysis/NK値を求め、NK細胞あたりの細胞傷害性を測る値とした。患者末梢血は、岡山労災病院副院長・岸本卓巳氏のご協力のもと、同意を得た各患者か

ら提供を受けた。

## 結果

### 1) 培養後NK細胞におけるNKp46の細胞内発現量とmRNAレベル

CB曝露培養後PBMCより回収したNK細胞における細胞内NKp46発現量は、対照培養由来NK細胞と同程度に低値であり、細胞内NKp46の異常な蓄積は見られなかった。対照的に、NK細胞中のNKp46 mRNAレベルはCB曝露条件下で有意に低く抑えられていた。また、NCRに属し、活性化に伴い発現増加を示すNKp44 mRNAレベルも有意に低値であった。

### 2) 液性因子を介したchrysotile曝露影響

NK細胞単独培養時にも、CB曝露によるNKp46発現量の有意な抑制が示された。しかし、PBMC培養時と比較し、NK細胞上NKp46発現量は全体的に低く、CB曝露影響も小さい傾向を示した。この結果は、CB曝露影響がPBMC培養時の液性因子産生を介した間接的影響を中心としていることを示唆する。そこで、0.2 $\mu$ m孔径透過膜を持つ培養インサートを用いて、膜を隔てたPBMCとNK細胞の共培養を行った。NK細胞は、PBMCとの共培養下でNKp46発現量の増加を示した。この培養条件下で、PBMCにCB曝露を行ったとき、共培養下のNK細胞におけるNKp46発現量が有意に低下した。

### 3) NKp46発現量とNK細胞傷害性の相関性、PL陽性者NK細胞の細胞傷害性

HV、PL陽性者、MM患者から成る全集団を解析したとき、末梢血NK細胞のNKp46発現量はlysis/NK値と正の相関性を示した (coefficient=0.608,  $p<0.0001$ )。MM患者のNK細胞が、HVと比べ有意に低いNKp46発現量とlysis/NK値を示したのに対し、PL患者ではNKp46発現量は低値から高値に幅広く分布し、lysis/NK値もHVと差を示さなかった。そこで、PL患者をNKp46<sup>high</sup>PL群とNKp46<sup>low</sup>PL群に分けて両群を比較したところ、NKp46<sup>low</sup>PL群のlysis/NK値はNKp46<sup>high</sup>PL群よりも有意に低いことが分かった。

### 4) NKp46発現量に基づくスコアとNK細胞の細胞傷害性との関係

これまでの結果は、NK細胞上のNKp46発現量が石綿曝露環境で抑制されること、PL患者の一部やMM患者のNK細胞においてNKp46発現量とlysis/NK値の低下が見られることを示している。そこで、これらの知見に基づき、

PL陽性者とMM患者をNKp46<sup>high</sup>PL群・NKp46<sup>low</sup>PL群・MM群に分け、各群にスコア=1、2、3を与えたところ、スコアはlysis/NK値と負の相関性を示し、スコアの上昇に伴いlysis/NK値が低下することが分かった ( $p=-0.646$ ,  $p<0.01$ )。

## 考察

CB曝露がPBMC培養時の液性因子産生への影響を介して、NKp46 mRNAレベル抑制に作用し、NK細胞上NKp46発現量の減少を引き起こすことが明らかとなった。CB曝露によるNK細胞活性化に関わるサイトカイン産生の抑制が示唆される。他方で、抑制性サイトカインの産生誘導も否定できない。間接的石綿曝露影響の存在は、直接会合せずとも石綿がNK細胞機能に影響する可能性があることを意味する。実際に、吸入された石綿の所属リンパ節への蓄積がヒトや実験動物モデルで示されており、石綿がリンパ節内環境への影響を介してNK細胞機能低下に作用している可能性を示唆する<sup>4-6)</sup>。MM患者だけでなく、PL陽性者の一部でもNKp46発現低下を伴うNK細胞における細胞傷害性低下が見られ、NKp46発現量に基づくスコアはlysis/NK値と負の相関性を示しており、NKp46発現量評価の抗腫瘍免疫評価指標としての有用性が示唆される。MM疾患の診断には、胸部X線やCTおよび病理組織が用いられているが、何れも習熟を必要とし難しい判断を伴う。我々は、今回報告したNKp46だけでなく、T細胞においても幾つかの分子指標候補を同定している<sup>7-9)</sup>。これらの指標群に関する末梢血の定期的な診断を行えば、既存の診断方法と組み合わせ、MM疾患の早期発見や予防が改善する可能性がある。今後、更に石綿曝露後NKp46発現抑制機構の解明を試み、関係する分子や遺伝子を同定し、末梢血を用いた石綿曝露後の抗腫瘍免疫抑制指標の確立を目指し、さらにはMM患者における免疫療法への道標を模索したい。

## 謝辞

第16回免疫毒性学会奨励賞を賜り、年会長の吉田貴彦先生はじめ選考委員の諸先生方に厚く御礼申し上げます。奨励賞の名に恥じぬよう、今後も益々免疫毒性研究に取り組みたく存じます。何卒皆様、今後ご指導ご鞭撻賜りますよう、宜しく願いいたします。

## 文献

- 1) Mossman, B. T., and A. Churg. 1998. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:1666-1680.

- 2) Mossman, B. T., D. W. Kamp, and S. A. Weitzman. 1996. Mechanisms of carcinogenesis and clinical features of asbestos-associated cancers. *Cancer Invest.* 14:466-480.
- 3) Nishimura, Y., Y. Miura, M. Maeda, N. Kumagai, S. Murakami, H. Hayashi, K. Fukuoka, T. Nakano, and T. Otsuki. 2009. Impairment in cytotoxicity and expression of NK cell-activating receptors on human NK cells following exposure to asbestos fibers. *Int J Immunopathol Pharmacol* 22:579-590.
- 4) Dodson, R. F., M. G. Williams, Jr., C. J. Corn, A. Brollo, and C. Bianchi. 1991. A comparison of asbestos burden in lung parenchyma, lymph nodes, and plaques. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 643:53-60.
- 5) Miserocchi, G., G. Sancini, F. Mantegazza, and G. Chiappino. 2008. Translocation pathways for inhaled asbestos fibers. *Environ Health* 7:4.
- 6) Trosic, I., M. Matausic-Pisl, and N. Hors. 2000. Pathways and quantification of insoluble particles in the lung compartments of the rat. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203:39-43.
- 7) Miura, Y., Y. Nishimura, H. Katsuyama, M. Maeda, H. Hayashi, M. Dong, F. Hyodoh, M. Tomita, Y. Matsuo, A. Uesaka, K. Kuribayashi, T. Nakano, T. Kishimoto, and T. Otsuki. 2006. Involvement of IL-10 and Bcl-2 in resistance against an asbestos-induced apoptosis of T cells. *Apoptosis* 11:1825-1835.
- 8) Murakami, S., Y. Nishimura, M. Maeda, N. Kumagai, H. Hayashi, Y. Chen, M. Kusaka, T. Kishimoto, and T. Otsuki. 2009. Cytokine alteration and speculated immunological pathophysiology in silicosis and asbestos-related diseases. *Environ Health Prev Med* 14:216-222.
- 9) Otsuki, T., M. Maeda, S. Murakami, H. Hayashi, Y. Miura, M. Kusaka, T. Nakano, K. Fukuoka, T. Kishimoto, F. Hyodoh, A. Ueki, and Y. Nishimura. 2007. Immunological effects of silica and asbestos. *Cell Mol Immunol* 4:261-268.

## 日本免疫毒性学会へ期待するもの

角田 文男

(第17～19期日本学術会議会員 岩手医科大学名誉教授)

日本免疫毒性学会は、医学、薬学、理学、農学等の諸分野の研究者から構成される学際的学会として2001年に設立され、国際的にユニークな学会と、その発展が大いに期待される。

学際的領域における研究は、自分がこれまで専攻してきた学術・技術と違う、時には全く異なる科学分野の学術・技術を学び習得して、自分のそれに上乗せし、初めて取り掛かれる。また異なる科学分野の習得が、研究課題によっては更に、2、3分野を広げざるを得ないこともある。医学部卒業の研究者は、他の学部卒業研究者よりも他分野を多く習得しないと、学際的領域の研究に従事し難いものがあるように思う。

筆者の場合、1958年に北海道大学大学院医学研究科へ進学し、畏敬の恩師 安倍三史教授（公衆衛生学）の薫陶を得て四年間の大学院生活を、「発がん性炭化水素による大気汚染に関する研究」に従事できた。

この研究は、学際的研究の走りとも言えるもので、院生一年次には、北海道大学に当時一台しか設置しなかった薬学部分析化学研究室の高性能蛍光分光光度計による環境中の超微量の各種発がん性炭化水素定量分析法を分析化学研究室の研究員らと共同で確立した。

院生二年次には、大学工学部機械工学科の研究員の協力で、自動車排気ガス捕集装置や極寒豪雪地帯における大気捕集装置の開発に成功した。これらの学際的研究によって得た分析法や大気捕集装置を駆使し、北海道の大気汚染現象の特徴を把握し、北海道中央部住民の肺がん死亡率との間に有意の関連を認めたとする論文を発表して学会から高い評価を得た。

爾後ほぼ50年、齢80歳間近な今も、大気汚染研究論文や学会誌を読んで楽しんでいる。

さて、日進月報の本学会の研究分野について、興味こそあれ、さすがに此の齢では到底追従しきれず、諦めざるを得ない。願わくば、現役から退いた老いた研究者を対象とした本学会の最近の歩みや興味深い研究内容を紹介してほしいものである。

## WHO/IPCS 免疫毒性ガイダンス (Harmonized Guidance of Immunotoxicity Risk Assessment) 作成に向けた 動きについて

手島 玲子

(国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部)

### 1. WHO/IPCS化学物質に対する免疫毒性リスク 評価に関するガイダンス作成の目的

WHO/IPCSは、オランダ国立公衆衛生環境研究所(RIVM)の免疫毒性アレルギー過敏症に関するWHO協力センターを中心に免疫毒性のリスク評価に関して、各国で用いることのできる国際的にハーモナイズされたガイダンスを作成することを目的としている。

具体的には、化学物質に対する免疫毒性を、国際的に同意された方法を用いて評価し、これらの評価が適切なリスク管理に用いられることをめざしている。そのため、免疫毒性専門家よりなるワーキンググループを設置し、リスク評価を行う際の範例を示す作業を行う。

### 2. ワーキンググループ活動経緯

・2008.2.28-29: WHO/IPCS Scoping meeting for the development of guidance

: RIVMセンター長であるHenk van Loveren教授を座長に、ヨーロッパ、米国EPAの免疫毒性専門家を中心に10名がオランダRIVMに集まりガイダンスのスコープにつき会合がもたれた。

・2008.12.1, 2009.2.26: Teleconference

・2009.4.27-29: WHO/IPCS Immunotoxicity drafting group meeting

: オランダRIVMにて、2回目の会合がもたれた。この会合から、日本から手島が会議に加わった。ガイダンスのドラフト案(1-7章)の議論と、それぞれの章に書かれているリスク評価を行うための範例となる個別事例研究としてのモデル化合物の選定が行われた。ドラフト案(1-7章)は、異なったタイプの免疫毒性が議論されていて、1章: 序論、2章: 背景、3章: 免疫毒性リスク評価のフレームワーク、4章: 免疫抑制、5章: 免疫促進、6章: 感受性とアレルギー反応、7章: 自己免疫誘発性、で構成された。また、事例研究のためのモデル化合物として、プラチナが6章のsensitizationの事例として、鉛が4章のimmunosuppressionの事例として、芳香剤が6章のsensitizationの事例として、HCBが5章のimmunostimulationの事例として、水銀が7章の

autoimmunityの事例として、トリクロロエチレンが6章のneoantigenの事例として選ばれた。

・2009.10.1: プラチナの事例研究が提出され、事例研究報告の作成に関する専門家を加えた事例研究ワーキングチームが結成された。

### 3. 今後の予定

当初は、2009年度中に、2009年4月の会議で作成されたガイダンス案に加え、個別事例研究の結果を加えて、一般の方からのコメント募集のために公表される予定であったが、個別事例研究のまとめが若干遅れているため、個別事例研究のまとめの期限を2010年2月まで延ばし、ワーキンググループでの議論を経て、来年5-6月に一般の方からのコメント募集のために公表される予定となった。その後、ピアレビュー等を受ける必要があるため、ガイダンスが最終化されるのは、2011年になると思われる。

免疫毒性学会の会員の先生方には、来年5-6月に一般の方からのコメント募集のために公開されましたら、是非、積極的なご意見をいただければと思っています。また、今後、日本としても身近な化合物を選択して、個別事例研究を行ってゆくことが重要と考えます。以上、WHO/IPCS 免疫毒性ガイダンス作成に向けた動きの経過報告とさせていただきます。

### SOT免疫毒性部会メンバーの日本免疫毒性 学会学術大会参加記:

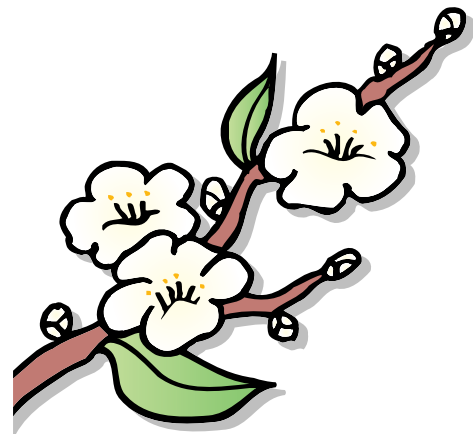
今年8月27日、28日に旭川で開催されました第16回学術大会では、米国毒性学会(SOT)免疫毒性部会メンバーのDr. GermolecとDr. Zelikoffを迎え、それぞれ特別講演とシンポジウムでの講演をしていただきました。ImmunoTox Letter第2号の恒例となりました寄稿文をお寄せいただきましたので、紹介させていただきます。



**編集後記**

本号は、恒例によって本年8月下旬に旭川で開催された第16回学術大会の総括を中心に構成されています。大会は、吉田貴彦大会長（旭川医科大学）のお計らいで旭川地方がまだ穏やかな気候の時期に開催されたこともあり、大会終了後の週末には、旭山動物園や富良野、美瑛、大雪山などの周辺景勝地に足を運ばれた大会参加者の方々もいらしたと聞いております。

大会が終了するとすぐに、学会運営委員会と大会実行委員会では、翌年の学術大会（9月、つくば）に向けての準備を始めています。現在は、大会会長の藤巻秀和先生（国立環境研究所）を中心に、「感受性を考慮した免疫毒性研究の新展開－環境・遺伝・時間要因－」というサブテーマに即した大会プログラムの構成を練りつつある段階です。免疫毒性学会は、約250名の学会員から構成される小規模な研究者の集まりですので、学会運営や学術大会の企画立案にあたっては、学会員の皆様方の要望に柔軟に応えることができます。何かございましたら、学会事務局（jsit-office@med.kawasaki-m.ac.jp）にご連絡頂きますと幸いです（NT記）。

**編集・発行：日本免疫毒性学会**

発行日：平成21年12月

編集発行責任者：澤田 純一

編集委員会：角田 正史、筒井 尚久、

手島 玲子、野原 恵子、

藤巻 秀和

原稿送付先：fujimaki@nies.go.jp