

ImmunoTox Letter

目次

おしらせ-----	1
バルセロナの青い空とマドリードの王宮 — [医学生物学における金属イオン] 国際シンポジウムに 参加して—	
日下幸則-----	2
福井医科大学環境保健学講座	
医薬品の免疫毒性評価法について - 一般毒性との関連 -	
土井孝良-----	3
武田薬品工業(株) 薬剤安全性研究所	
免疫学と病理学	
中村和市-----	5
塩野義製薬(株) 新薬研究所	
温故知新一海外の目から教えられたもの	
山口文恵-----	6
第一製薬(株) 安全性研究所	
免疫毒性との付き合い方の1例	
河内泰英-----	7
大鵬薬品工業(株) 安全性研究所	
大腸菌O-157感染によるHUS発症に腫瘍 壊死因子が介在する？	
高野文英、北條博史-----	8
東北大学・薬	
DIA主催「医薬品の免疫毒性試験に関す るワークショップ」に参加して	
牧 栄二-----	9
ヤンセン協和(株) 研究開発本部	
アメリカ合衆国 Society of Toxicology について	
吉田 貴彦-----	11
東海大学 医学部環境保健学部門	
会計報告・予算-----	12

おしらせ

第4回免疫毒性研究会予告(1報)

日時：1997年9月30日(火)～10月1日(水)

場所：東京(東邦生命ホール)

組織委員長(会長) 名倉 宏 (東北大・医)

実行委員長 高橋 道人 (国立衛試)

詳細は次回予告等でお知らせ致しますが、日時・
場所についてご予約下さい。

第3回免疫毒性研究会報告

平成8年9月25、26日両日に第3回免疫毒性研究会が、昭和大学、上篠講堂にて、179名の会員が集い、開催された。今回は、海外からの招待講演者として、オランダ国立公衆衛生・環境研究所のJ. G. Vos博士と、米国FDAのJ. A. Cavagnaro博士をお呼びして講演をお願いした。Vos博士からは、病理学を基礎においた免疫毒性評価の方法論の発展と最近の動向について講演があり、Cavagnaro博士からは遺伝子工学を用いて開発されている近年の医薬品の安全性試験に関する講演があった。「気道免疫における免疫毒性」に関するミニシンポジウムや、2回目となった「免疫毒性試験法ワークショップ」などの企画は大変興味深いものであった。本研究会の代表幹事の名倉教授から「粘膜免疫と免疫毒性」の特別講演があり、粘膜免疫の重要性と奥深さがよく理解出来た。一般演題が19題と少なめであった。来年は会員からたくさん演題を発表されること、期待したい。

総会報告

第3回免疫毒性研究会において、開催された総会で、以下のことが報告・承認された。

1. 新幹事の委嘱：次の方々が幹事として新たに委嘱され、就任された。

上田 志朗(千葉大・医) 堀井 郁夫(日本ロシュ研)

2. 会計報告(12頁をご参照下さい)

3. 次回総会について

バルセロナの青い空とマドリードの王宮

－「医学生物学における金属イオン」

国際シンポジウムに参加して－

日下幸則

福井医科大学・環境保健学講座

1. 微量元素と金属、その免疫、そして健康との関わり

我が国では、このテーマを扱う学会は幾つかある。日本衛生学会、日本微量元素学会、日本毒科学会、日本臨床免疫学会などである。私の専門もこれである。従って、私にとって、この免疫毒性研究会がこれら関連学会の境界を埋める学問領域として発展することを望んでいる。

2. 「医学生物学における金属イオン」国際シンポジウムの第四回目

国際的にも、このような関連学会、境界領域を橋渡しする学会、国際シンポジウムが幾つかある。その一つが「医学生物学における金属イオン」国際シンポジウムである。その第四回目が、スペイン、バルセロナで本年五月に開催された。私は、「疫学、産業保健と環境保健における金属イオン」分科会の基調講演を依頼され、初めてスペインに渡った。

3. コバルト、ニッケル、クロム、バナジウムなどの呼吸器免疫毒性

これら感作性金属は、同時に発ガン性も有していて、呼吸器免疫毒性学上、極めて興味の持たれる金属である。依然として、これら金属による環境汚染は後を絶たないし、地球レベルで見ても、拡散を続けている。

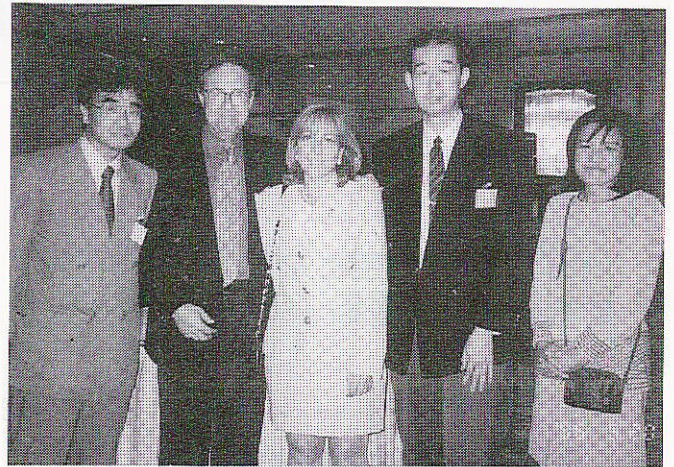
最新の分子生物学的技法を用いて、この発ガンのメカニズム研究成果が特別講演で披露された。と同時に、リスクアセスメント、環境濃度設定の資料という方向でも学問の進歩が語られた。

4. スポーツ医学、健康増進

亜鉛、鉄などの必須微量元素・金属についても、その免疫系における役割が、一層明らかにされた。食物、栄養という形で、これら学問の知見がフィードバックされつつある。本国際シンポジウムが、栄養食品産業、薬品産業などによる生産活動を介して、疾病の治療、健康増進に貢献しているのも特徴であろう。

5. バンケット

これら勉強の話はこれ位にする。いつもながら羨まし



左から筆者、学会長ドミンゴ教授、その奥様、斉藤博士(北海道大学助手)、西条博士(金沢医科大学講師)

かったのは、バンケットのホスト、ホステスとしてバルセロナ大学教授ドミンゴ博士が、奥様、お嬢さんを伴っておられたことである。高い航空運賃を払ってやって来る私達日本人には、なかなか出来ることではない。愛嬌を振りまいての会話も、学会の楽しみの一つである。スペインが、言語学的、文化的にも異なる五つの國からなるという、ドミンゴ教授の話も大変おもしろかった。なんと20年前に、憲法で以て、元々はマドリードを中心とするバレンシアの地方語であった言葉、いわゆるスペイン語を国語に定めたと云う。スコットランドで二年暮らし、ケルト語の洗礼を受けた私は、人類の多様性を再び感ずるお話であった。

6. バルセロナの青い空とマドリードの王宮

このバルセロナは、地中海に面した國の首都であるが、一方マドリードは内陸の首都である。マドリードにあるハプスブルク王朝の栄華を極めた王宮は、小振りながら、やはり贅嘆に値するものであった。折しも、ゴヤ生誕250年祭の美術展が催されていた。着衣のラマ、裸のラマが、広間の対局に向かい合って陳列されていて、双方を代わる代わる見比べるのに、首が疲れたが、やはり裸のラマに見入る時間が多かっただろう。ゴヤの作品に、人間の暗黒面を扱ったものがあることを知ったのも、収穫であった。深夜に及ぶフラメンコの、熱く、しかし時には暗い全身全霊の踊りに見入り、再び訪れたい國と思わされた。

医薬品の免疫毒性評価法について

- 一般毒性との関連 -

土井孝良

武田薬品工業(株) 薬剤安全性研究所

医薬品による免疫関与の毒性への評価は大きく二種に分けることが出来る。一つは医薬品が胸腺、脾臓などの免疫器官に直接作用して発現する毒性（免疫毒性）への評価であり、他の一つは医薬品が生体の免疫系を介して間接的に発現する毒性（薬剤アレルギーなど）への評価である。後者の薬剤アレルギーへの評価に関しては、わが国ではすでに外用剤について皮膚感作性試験および皮膚光感作性試験のガイドラインが公表されており、抗原性試験についてもそのガイドラインが検討されてきた。一方、免疫毒性に関してはまだガイドラインは提示されていない。しかし、医薬品の開発を進めていく過程で実験動物あるいは臨床で免疫毒性が疑われた場合、当社においても免疫毒性の評価を実施してきた。

実験動物を用いて行う医薬品の安全性研究が、その医薬品を人に用いた場合の安全性をどこまで保証しうるのか、という外挿性の問題は免疫毒性の研究においても例外ではない。しかし、医薬品の免疫系への安全性評価を実験動物を用いて行わざるえない以上、そこに何らかの解決策を求めて試行錯誤していく必要がある。感染や腫瘍細胞移植に対する宿主の抵抗性試験が人の安全性評価への外挿試験として最も適するとも考えられるが、これらの実験のためには専用の試験施設が必要であり、これら実験より生じる動物の生存率は必ずしも感度の良い評価系ではないなどの問題をかかえている。そこで、他の免疫毒性の評価系が必要になってくるが、*in vitro*の試験より生じたデータを生体での免疫毒性発現に外挿することの難しさを考えると、薬物の吸収や代謝過程を含む *in vivo*の免疫機能評価系に重点を置かざるえない。

医薬品の一般毒性試験の目的は、その医薬品の有する毒性プロファイルを明らかにすることとともに、実験動物における無毒性量を明らかにして臨床試験での用量設定の根拠を得ることにあり、げっ歯類では主にラットが用いられる。毒性評価しようとする医薬品がラットでは極めて低い薬理作用しか示さない、などの例外を除いてマウスを使うことはまれである。ラットで免疫毒性の評

価を行う場合、一般毒性試験で生じる血液検査や免疫器官の重量および病理組織学的変化などのデータを活用することが可能である。また、免疫毒性試験の用量設定に際し、一般毒性試験での無毒性量を基準とすることができ（無毒性量において免疫毒性が発現するか否かが、免疫毒性評価一つの判定基準になると考えられる）。一方、免疫毒性の評価に用いる動物としてはラット以上にマウスが取り上げられてきた。マウスは免疫学の分野で長年用いられてきた関係上、その免疫学的、遺伝学的特性はよく研究されている。しかし、マウスを用いた免疫毒性試験を実施するためには根拠のある用量設定が必要であり、そのためにはマウスを用いた予備的な一般毒性試験の実施が必要と考えられる。さらに、マウスを用いた一般毒性試験には、得られる血液あるいは尿の量が少ないため検査項目が限定される、各器官が小さいため重量測定や病理組織学的検査が難しい、などの制約がある。

第2回免疫毒性研究会では日本製薬工業協会の共同研究として、「ラットを用いる免疫毒性試験法」と題してワークショップが行われた。F344ラットにサイクロホスファミドを7日間経口投与後の一般毒性試験の検査項目あるいは免疫機能試験の成績を出し、既存の試験法の免疫毒性評価における感度あるいは検出力の施設間格差を検討する、という企画であった。一方、私自身も1990年頃より当社の免疫毒性部門（当時は主に抗原性試験を実施）で免疫毒性の研究を開始し、ラットにおけるPlaque-forming cell (PFC)法の最適条件を検討した¹⁾。さらに、一般毒性部門に移ったのを契機に免疫毒性と一般毒性をつなぐ目的で、アルキル化剤を投与後のラット脾臓における細胞毒性、PFC反応および病理組織学的変化の用量反応相関²⁾ならびに代謝拮抗薬を投与後の同様の検討³⁾を行った。ここでは医薬品の免疫毒性の方向性への考察を含め、その内容について紹介する。

PFC法は羊赤血球 (SRBC) を投与後、脾臓中の抗SRBC抗体産生細胞数を測定することで体液性免疫能を評価する方法で、生体の抗原認識から抗体産生能までの評価が可能である。Lusterらはリンパ球細胞の表面抗原の分析とともに、PFC法を免疫毒性と最も相関する方法と報告⁴⁾している。先に述べた免疫毒性研究会のワークショップの中でも紹介されているように、PFC法による測定値、 10^6

脾臓細胞当たりのPFC数には施設間で変動のあることが報告⁵⁾されていた。また、同様の変動を私自身も経験していた。そこでまず、SRBCのF344ラットへの投与条件とSRBC投与後の脾臓の摘出時期について検討を行った。投与するSRBC量の設定は、SRBC数の測定よりもヘマトクリット値で出した方が容易と考えパーセントで表した。その結果、1% SRBCを0.5ml静脈内投与し、4日後に脾臓を摘出してアッセイを行った時、PFC反応は最も高値を示すことが明らかになった。この条件でサイクロホスファミドをラットに単回経口投与後の体液性免疫抑制作用について検討した結果、3mg/kgの投与量でPFC反応の抑制が認められた。この3 mg/kgという投与量は、マウスのPFC反応でサイクロホスファミドの体液性免疫抑制作用が検出される用量の約1/10であった。また、PFC反応は用いたSRBCのロットやラットの週齢に影響を受けた。一方、上記ワークショップのPFC法の検討では、SRBCおよびサイクロホスファミドの投与条件は一定で行われている。従って、その他の変動因子として、溶血斑（プラーク）を抗体産生細胞として認め計測する際の基準に差がある可能性が考えられる。同一試験内で同じ基準でプラークを計測すれば評価には影響を与えないと考えられるが、やはり施設間で一定の基準は必要であろう。

免疫毒性の評価の方向性として、最初から免疫機能試験を含めて行っていくとする考え方と、通常の一般毒性試験を先行させて免疫器官に毒性が予想された場合に免疫機能試験を行っていくとする考え方がある。ここで問題になるのは、ラットを用いた一般毒性試験で実施可能な検査項目の、免疫器官の毒性発現に対する感度である。そこで、免疫反応の場であり免疫器官の中では摘出が容易な脾臓の重量、cellularityおよび病理組織学的変化と、免疫機能試験の代表として前述のラットにおける最適条件でのPFC法について、用量反応相関を調べた。検討した薬剤は臨床で免疫毒性が知られる制がん剤、その中でもサイクロホスファミドを含む4種のナイトロジェンマスタード系のアルキル化剤および3種の代謝拮抗薬であり、これらの制がん剤をラットに単回大量投与あるいは7日間連続投与した。まず、アルキル化剤（サイクロホスファミド、ナイトロミン、メルファラン、クロラムブシル）であるが、サイクロホスファミドによるPFC反応

の抑制は脾臓の重量あるいはcellularityの低値（細胞毒性）が検出される用量よりも低用量でみられる傾向にあった。しかしながら、他の3種のアルキル化剤では脾臓の細胞毒性はPFC反応の抑制が認められる用量よりも低用量あるいは少なくとも同じ用量で検出された。脾臓の病理組織学的検討では、PFC反応の抑制がみられる用量で、サイクロホスファミドでは動脈周囲リンパ組織鞘（PALS、T細胞領域）に変化を伴わない縁帯（B細胞領域）の萎縮あるいは消失、ナイトロミンでは白脾髄の組織構築に変化を伴わない単純性の萎縮と赤脾髄の髄外造血の消失、メルファランではPALSの萎縮と縁帯の萎縮あるいは消失および髄外造血の消失、と各アルキル化剤に特徴的な所見がみられた。3種の代謝拮抗薬（アザチオプリン、6-メルカプトプリン、5-フルオロウラシル）でもPFC反応の抑制がみられる用量で細胞毒性が検出され、病理組織学的には白脾髄の組織構築に変化を伴わない単純性の萎縮と赤脾髄の髄外造血の消失がみられた。この様に、制がん剤により生じる脾臓の変化は、PFC反応の抑制がみられる用量で一般毒性で実施可能な検査項目により検出された。以上の結果は、医薬品の免疫毒性評価の方向性として通常の一般毒性を先行させる考え方を支持していると考えられる。本研究は脾臓への2種類の制がん剤の作用についてのみの検討であり、他の薬剤あるいは免疫機能試験を用いた検討結果に興味もたれる。

血液検査あるいは有核細胞数の計測を含む骨髄の病理組織学的検査は本研究では行わなかった。しかし、制がん剤がリンパ球あるいは骨髄細胞に影響を及ぼしやすいことより、PFC反応の抑制がみられる用量でこれらの検査項目のパラメーターが動いた可能性も考えられる。

以上、免疫毒性評価に関する一つの研究について紹介したが、免疫系は複雑であり、上記研究では制がん剤の低あるいは中間用量でPFC反応の亢進も観察された。人への外挿を目的とした医薬品の免疫毒性評価の方向性を確定するには、さらにデータの蓄積が必要と考えられる。

- 1) Doi, T., et al., *J. Toxicol. Sci.*, 17, 225 (1992),
- 2) Doi, T., et al., *Toxicology*, 107, 47 (1996),
- 3) Doi, T., et al., in press,
- 4) Luster, M.I., et al., *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 200 (1992),
- 5) Luster, M.I., et al., *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10, 2 (1988)

免疫学と病理学

中村和市

塩野義製薬（株）新薬研究所

医薬品の一般毒性試験においては、化合物投与後の動物の一般状態、病理学および血液/血液化学的変化などから普く毒性を把握することが目的である。一般毒性試験と免疫毒性試験の境界は不明瞭であるが、リンパ系組織の病理学的検査、血液/血液化学的検査さらに免疫機能検査を包括したものが医薬品の免疫毒性試験と言えるのではないだろうか。

私が免疫毒性学という領域をはじめて認識したのは、10年程前に大沢先生の書かれた「化学物質の免疫毒性」〔トキシコロジーフォーラム、8(6)、684-692、1985〕の別刷を手にしたときである。非常に新鮮な思いで、何度も読み返した記憶がある。私は、これによって免疫毒性学が医薬品の安全性評価においても重要だと強く感じた。以来、小さい声ながらも、免疫毒性試験が今後医薬品についても必要になってくるかもしれないと会社の中で言い続けてきた。

もう5年程前になるが、会社から免疫毒性学の基礎習得のための海外留学の機会が与えられた。そこで、まず私はオランダ国立公衆衛生・環境研究所の Vos 博士のところへ留学を希望した。しかし、政府の機関で中立を守る必要があり、企業から人を受け入れていないということで、留学を断われた。そのとき、当時の上司（原田稔博士）からは「基礎学問（特に組織学）を学んでこい」と言われていたので、胸腺の組織学が専門の Marion D. Kendall 教授（The Babraham Institute, Cambridge, U. K.）のところへ留学した。彼女は免疫毒性学とは関係ないが、IPCS がまとめている ‘Principles and Methods for Assessing Direct Immunotoxicity Associated with Exposure to Chemicals’ の「胸腺」の項では彼女の論文が多数引用されている。そこで、胸腺の血管周囲腔内に分布する胸腺細胞の種類や胸腺の生理的（妊娠、老齢）退縮機構についての免疫組織化学的研究を行った。私は、それまで組織学的にはリンパ節しか見てこなかったもので、以後胸腺に対する見方は明らかに変わった。上司が言ったように全くの基礎学問（組織学）を学んで良かったと思う。今の私の仕事は機能検査が主体であるが、病理所見と機能

検査の結果とのつながりを考察するためには、非常に役立っている。

1年間の留学もあっという間に終わろうとしている頃、上司から「日本に帰るときに他の研究所を訪問したらどうか」というファックスを受け取った。Vos 博士のかつての同僚であった Schuurman 博士（現、Sandoz Pharma A. G.）が Kendall 教授を訪ねてきたこともあり、Kendall 教授が Vos 博士を知っていることはわかっていた。そこで、Kendall 教授に Vos 博士の研究所訪問のお膳立てをしていただいた。1993年の秋のことであった。Vos 博士の研究所に留学を希望したときに、日本の地図で Bilthoven の地を探したが見つけることはできなかった。しかし、今度は違った。留学からの帰途であったので、まず Cambridge に近い Stansted 空港から Amsterdam 空港に飛び、列車で Utrecht に向かった。翌朝、Vos 博士が Utrecht の小さなホテルに自分の通勤用の車で私を迎えに来てくれた。彼は、交通渋滞で約束の時間に少し遅れ、恐縮していた。留学を断われた人（彼自身は、研究所と粘り強く私を学ばせるための交渉をしてくれたようであるが）にこのようなかたちで初対面を果たすとは思ってもみなかった。Bilthoven は、そこから車で約30分のところにあった。

彼の研究室では、スタッフが総出で次から次と光学顕微鏡、電子顕微鏡さらに SCID マウスへ移植したヒト胎児胸腺を用いた方法による免疫毒性評価について私に講義をした。私は、そのとき Vos 博士に免疫毒性の段階的評価方法に関して、「どのような経緯で NTP によるものとの違いができたのか」と聞いてみたのを覚えている。すると、彼は穏やかな表情で「我々は病理学が専門だが、彼らは免疫学が専門だ」と答えた。確かに、私が Vos 博士のところへ受けた講義はすべて病理/組織学が基礎にあった。免疫学では分子生物学が主流だが、免疫毒性学ではどうしても病理学が必要になる。免疫毒性試験では病理学的検討と機能的検討が相補いあっているいろいろなものが言えるのではないだろうか。通常の病理学的検討だけでは、免疫毒性がつかめない場合もある。しかし、一方機能的検討にはどうしても病理学的裏付けが必要な場合がある。免疫毒性試験は、そういった側面が強いのではないだろうか。Vos 博士によって考案された免疫毒性の段階

的評価方法は、このような免疫毒性評価の特徴を巧みに取り込んだものと言える。それが、今、特に医薬品の免疫毒性の評価方法として注目を集め、彼が今年の免疫毒性研究会に招かれるのもうなずける。

私は製薬企業に所属しているものとして、免疫毒性試験が将来製薬企業の中でどのように行われてゆくべきなのかを考えている。免疫毒性が最初から疑われる化合物ならば、いろいろな機能検査を行えばよい。では、通常の化合物の場合はどうか。まずは、一般毒性試験がある。しかし、どの程度疑わしい化合物がつかまってくるのだろうか。高用量では、当然何らかの所見がでてくるかもしれない。しかし、低用量ではどうだろうか。私は、一般毒性試験を行ったことがない。そのための取り越し苦労であればよいのだが、一般毒性試験と免疫毒性試験の連携については少なからず不安を抱いている。さらに、GLP環境下で宿主抵抗性試験における感染実験をどのように行ってゆけばよいかなども考えなくてはならない。あるいは、製薬企業における免疫毒性評価の進め方として、もっと斬新なものがあるかもしれない。その答えは、次の10年間ででてくると思う。そのために、今、我々が行わなくてはならないことは、免疫毒性学の総論から各論に立ち入り基礎データを地味にこつこつ集めてゆくことだと思う。そして、その成果を皆が出しあって、この研究会で共有できればよいと考えている。

<温故知新>

—海外の目から教えられたもの—

山口文恵

第一製薬(株)安全性研究所

薬を世に出すには幾つもの評価を行う必要がある。生体での恒常性を保つためには神経、免疫、内分泌、代謝系の各機能が働いているが、毒性分野においても免疫系への影響を確認するための動きがあり、欧米では免疫毒性試験法への提案が出されていることは周知のことである。一方、日本では従来から毒性評価のひとつに抗原性試験を挙げ、薬物アレルギーを予測する方向で実施されてきている。この試験については、承認申請での評価項目であるにもかかわらず、ガイドライン化が遅れている

実態にある。

さて、海外の企業と薬の共同開発を行う場合、日本での承認申請に向け、抗原性試験を実施する必要があることを示さなくてはいけないのだが……。無論、「必要とされているのだから、必要なんだ！」ではあるが、特に低分子の化学物質が生体内で異物として認識され、抗体あるいは感作リンパ球が産生される可能性をアジュバント併用で評価するとの話は、彼等には理解し難く、???ばかりが浮かぶようである。説明すればするほど、免疫、アレルギーの基礎的な事項を実施すればいいではないかとの発言も飛び出すのであった。ところが、ある企業との開発候補品で抗原性試験陽性の結果が出て、その後、臨床試験でもアレルギーを疑わせる症状が見られたことがあった。これを契機にそれ以降の開発候補品では構造や作用機序を考慮した上で抗原性試験を積極的に評価しようとする動きとなり、「百聞は一見にしかず」で彼等のある程度の理解が得られたのであった。私自身もそれまでの経験から抗原性試験はヒトへの外挿性を考慮した時にはかなり乖離があるものと認識していた。しかし、臨床でアレルギー様副作用(皮膚に限らず)が報告されている化学物質、医薬品について皮膚感作性試験を行うと陽性になる確率が高いことがわかってきた。こうしてレトロスペクティブに検討してみると、このような試験でもアレルギー様副作用を誘起するポテンシーをある程度把握できる可能性が見い出されたと思うのである。古くから行われている試験ではあるが、方法のバリデーションを取るなど基礎的なことが十分に行われることで評価法として再認識出来るのではと思うこの頃である。

今後、世界的には免疫毒性評価のガイドライン調和が図られていくものとされている。免疫系への影響はヒトへの外挿性を考慮した時にはかなり難しいものではあるが、臨床での副作用発現への糸口が得られる可能性がある評価ならば、日本独自の抗原性試験も広義の免疫毒性評価と捉え、レギュレーションのラインアップだからだけではなく、きちんとその意義を示すべきと改めて教えられたのであった。

免疫毒性との付き合い方の1例

河内泰英

大鵬薬品工業(株)安全性研究所

私が免疫毒性と付き合い初めて早いもので7年になります。1984年に入社した私は最初、生殖毒性を担当していましたが、2年後から諸般の事情により抗原性試験を行うようになりました。私にとってはアレルギーや免疫学は未知の分野で、不安に感じつつも新鮮な気持ちになりました。しかし、試験を何かか実施していくうちに、本来の飽きっぽい性格も加わってか、何か物足りなさを感じるようになりました。そんなとき、Dr. LusterのPCBの免疫毒性の論文だったかを読んで、まさに目から鱗でした。しかもその当時はいわゆるバブルが沸き上がってきた頃で、その追い風に乗ってかアメリカ留学の話が出てきました。そして私は躊躇なく免疫毒性学を勉強したいと言ったのです。会社の理解と食品薬品安全センターの故橋本理事長や小野所長のご尽力により、1989年の10月から2年間、あのDr. LusterのいるNIEHSに席を置く幸運に恵まれました。行ってまず驚いたことは南部訛の英語はもちろん、研究者の顔ぶれです。イタリア、ドイツ、中国そして日本と国際色豊かなことと、研究者のバックグラウンドも毒性、免疫、微生物学等幅広いことです。さらに驚いたことにNIEHSではルーチンの免疫毒性試験は大学等に委託し、研究所では基礎研究に注力していました。生殖や神経系と免疫系との関係に注目した研究、ランゲルハンス細胞やケラチノサイトを中心とした皮膚の免疫系への影響、さらにはアポトーシスと幅広いものでした。羨ましく思ったことは、免疫毒性学に従事している研究者や研究機関が多いことと、Society of Toxicologyをはじめ州単位あるいは西、東海岸単位の研究会、セミナー等討論の機会の多いことです。私といえば、接触過敏反応の研究を行うことになり、日々マウスの耳を切り落として表皮細胞の培養を行い、そうこうしているうちにあっという間に2年間が過ぎてしまいました。私の送別会では片耳の無いマウスのぬいぐるみ(耳はシャーレに入っていた)と除毛クリームをプレゼントにもらい、アメリカ人のジョークには最後までお上手げでした。

日本に帰国してからはなぜか変異原性試験をすることになり、しばらくは片手間で免疫毒性試験をする日々が

続きました。突然ですが、私の属しています免疫遺伝毒性グループを簡単に紹介いたします。主に変異原性、抗原性と免疫毒性試験を行っていますが、ボスの大内田リーガーを含め男性6、女性1名です。最近新人が入ってきませんので、人間は古いままですが、実験室が新しくなり気分爽快で実験をしております。

話を免疫毒性に戻しますが、日本でも帝京大学の沢教授らの御努力で免疫毒性研究会が2年前に発足し、私も本当にうれしく思っております。異なった分野の研究者が免疫毒性の元に一同に会して討論し、違った観点から意見を出し合うことは非常に有意義なことと思います。研究会が日本国内にとどまらず世界に目を向けて発展することを願っております。

今年の3月に2年ぶりに米国毒科学会に参加してきました。免疫毒性関連の発表も毎日のように行われていました。免疫毒性のメカニズムに関連しては細胞のシグナル伝達に関するものやPCRなど分子生物学的手法を用いた解析が目を引きました。一方、免疫毒性変化を環境のバイオマーカーとして利用する動きもみられました。例えば、海洋汚染をアザラシなどの免疫系への異常をバイオマーカーとして利用するものです。感作性に関しては化学物質を経皮あるいは皮下投与した後付属リンパ節でのサイトカイン産生のパターンや抗体のクラスあるいはサブクラスを調べる報告がありました。結果としては接触アレルゲンではT helper 1(Th1)タイプの免疫応答、すなわちINF- γ 産生とIgG2a抗体産生が、吸入抗原物質ではTh2タイプの免疫応答、すなわちIL-4, IL-10産生とIgG1抗体の増加がみられるというものです。最近、自己免疫疾患やアレルギーの発症メカニズムの一つにTh1とTh2タイプの反応のアンバランスが関与しているという報告がみられることから、興味ある結果でした。

昨日、環境保護団体のグリーンピースがダイオキシンの人体への影響を説明するため日本へ立ち寄るというニュース報道がありました。欧米では環境に対する意識が高く、ダイオキシンや鉛などによる環境汚染への関心も高く、またAIDS患者も多いことから免疫毒性学が進歩したとも考えられます。日本でも今後、環境問題への関心の高まりとともに免疫毒性学の重要性が益々増してくるものと期待しております。

大腸菌O-157感染によるHUS発症に腫瘍壊死因子が介在する？

高野文英、北條博史

東北大学・薬

さて、今年の夏の話は何といっても、病原性大腸菌による食中毒の恐怖の一言に尽きるのではないかと思われる。腸管出血性大腸菌O-157に関する記事が、新聞の一面を数段抜きで報じられることがしばしばで、一般に馴染みの薄かったO-157により産生されるベロ毒素(Verotoxin, VT)の名前も世間の隅々にまで浸透した。厚生省はこの食中毒の拡大を防ぐため今年の8月にO-157を法定伝染病に指定する措置をとった。先進国の中でもキレイ好きを自負している日本人にとって、O-157食中毒は極めてショッキングな事件であるとともに、多くの人が公衆衛生の盲点をみせつけられて戸惑いを覚えたのではないかと思う。

O-157により引き起こされる特徴的な症状には、初期に発現する出血性大腸炎(enterohemorrhagic colitis)と、その後発症する溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome, HUS)がある。HUSが幼年者や高齢者に発症すると、しばしば重篤な状態に陥り死亡例がでる。この食中毒に対する治療方法には、早期にあっては血漿交換やγ-グロブリン投与を行うなどの方法があるが、抗生物質の投与は症状の進展によっては却って症状を増悪させることがあり有効な治療法をとることができない。

ベロ毒素には赤痢菌により産生される志賀毒素とはほぼ同じ構造のVT1、および生物学的性状はVT1とよく似ているが構造が異なるVT2とその変異種が知られている¹⁾。これらはいずれも、1分子のAサブユニットと5分子のBサブユニットからなり、前者が毒素活性を、後者がレセプターへの結合を担う分子である。

ベロ毒素レセプターはグリコスフィンゴ糖脂質の1種であるglobotriaosylceramide (GbOse₃cer)であり、これまでヒト腎臓と培養内皮細胞にその存在が見いだされている。ベロ毒素は細胞表面上のこの特異的レセプターと結合したのち、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、ゴルジ装置を経由して60Sリボソームに到達する。そこで毒素は60Sリボソームの構成因子である28Sリボソーム

RNAに働き、その5'末端から4324番目のアデニンのN-グリコシド結合を加水分解してアデニン1分子を遊離させる。即ちベロ毒素はRNA N-グリコシダーゼ活性がその本体であり、結果的に60Sリボソームを変質させて蛋白合成を阻害し細胞障害を引き起こすと解釈されている。

O-157によるHUSの発症の機構はほとんど解明されていないが、最近、HUSの発症にはベロ毒素の他に、炎症性サイトカインが重要な意味をもつのではないかと指摘されている。HUSでは、腎糸球体の内皮細胞に著しい障害が誘起されるが、ベロ毒素に腫瘍壊死因子(TNF-α)を加えてヒト臍帯内皮細胞を培養すると、ベロ毒素単独に比べて細胞障害の程度が著しく増大し、一方で、TNF-αで処理された内皮細胞は、ベロ毒素レセプターであるGbOse₃cerの合成が促進され、ベロ毒素との結合能が通常の10~100倍高くなる^{2,3)}。このレセプターの増加は、インターロイキン-1(IL-1)やリポ多糖体(LPS)処理でも起こるが、これはサイトカインによって内皮細胞のgalactosyltransferaseが誘導されるためである⁴⁾。

しかしながら、臨床におけるHUSとサイトカインとの関係については、はっきりした結論が出されていない。TNF-αやIL-1は患者の血液中では認められないとされているが、患者の尿中ではTNF-αの増加が認められると報告されている。一方、ベロ毒素をマウスに投与すると、TNF-αのmRNAが腎臓特異的に誘導され⁵⁾、またベロ毒素でヒトマクロファージを刺激すると、TNF-α、IL-1β、IL-6の産生増強が起こることが知られている。ある仮説によるとO-157感染により出血性腸炎が起こる時、患者消化管の出血箇所からLPSが体内に取り込まれ、ベロ毒素と同様に、これがTNF-α等を誘導するとされる。このような腎局所でのサイトカイン産生があるとすると、これに関わる細胞は糸球体マクロファージとメサンギウム細胞であろう。HUSが幼児で重症化する理由は菌に対する抵抗性が弱いためと一般にいわれるが、幼児の内皮細胞ではベロ毒素レセプターが多いか、あるいはTNF-α等によりベロ毒素レセプターが容易に誘導されるためなのかもしれない。このようにHUSの発症にTNF-αが中心的役割を担っているなら、ある研究グループが示唆するように、TNF-αやTNF-αレセプターに対する抗体の投与は、HUSを改善させるかもしれない^{5,6)}。

食中毒とは縁のうすい晩秋になっても、O-157 感染は依然として散発的に発生がみられ、終息する見通しが無い。出血性大腸菌の感染源を徹底コントロールする予防が最も重要であるが、同時に、ペロ毒素の免疫毒性学的機序に基づく新しい治療法の確立が望まれる。

引用文献

- 1) A.D. O'Brien and R.K. Holmes, *Microbiol. Rev.*, 51, 1206-1220 (1987).
- 2) V.L. Tesh, J.E. Samuel, L.P. Perera, J.B. Sharefkin, and A.D. O'Brien, *J. Infect. Dis.* 164, 344-352 (1991).
- 3) N.C.A.J. van der Kar, L.A.H. Monnens, M.A. Karmali, and V.W.M. van Hinsbergh, *Blood*, 80, 2755-2764 (1992).
- 4) N.C.A.J. van der Kar, T. Kooistra, M. Vermeer, W. Leslauer, L.A.H. Monnens, and V.W.M. van Hinsbergh, *Blood*, 85, 734-743 (1995).
- 5) Y. Harel, M. Silva, B. Giroir, A. Weinberg, T.B. Cleary, and B. Beutler, *J. Clin. Invest.*, 92, 2110-2116 (1993).
- 6) B. Beutler, I.W. Milsark, and A. Cerami, *Science*, 229, 869-871 (1985).

DIA主催「医薬品の免疫毒性試験に関するワークショップ」に参加して

牧 栄二

ヤンセン協和(株)研究開発本部

10月2-4日、スイスの避暑地、レマン湖の辺のモントルーでThe Drug Information Association (DIA)主催の"A Workshop on Immunotoxicity of Pharmaceuticals"が諸外国より著明な研究者を集めて開催された。小生の本ワークショップへの参加は、全くの偶然で、DIAのプログラム委員であるDr. J. W. van der Laan (Medicines Evaluation Board, The Netherlands)をICHの専門家会議で知り合っていたことおよび日本製薬工業協会医薬品評価委員会(JPMA)基礎研究部会で「抗原性試験の検討」を担当していることから、本邦における医薬品の免疫毒性試験の現状を報告するに至った。ワークショップでは免疫毒性試験の中でも、特に免疫亢進(過敏性)に基づく免疫毒性試験、即ち抗原性試験について話題が集中し、本邦の

モルモットを用いる試験とヨーロッパならびに米国で行われているマウスあるいはラットを用いる局所リンパ節試験が比較され、本邦におけるモルモットの抗原性試験のヒトへの予知性の低さが指摘された。本ワークショップから得るものが多くあったが、ここでは本ワークショップで報告した本邦における医薬品の免疫毒性試験の現況を簡単にまとめた後、諸外国で実施されている局所リンパ節試験を紹介し、本邦における抗原性試験の今後の検討課題としたい。

先ず、新医薬品の製造承認申請において、全身投与を目的とする医薬品の場合は免疫原性(抗原性)試験を実施し、外用医薬品の場合は皮膚感作性試験ならびに皮膚光感作性試験を実施することになっている。抗原性試験については1988年にガイドライン案が呈示されたが、通知されるには至らなかった。一方、皮膚感作性試験および皮膚光感作性試験については1989年にガイドラインが通知されているが、その実施については特に問題はない。抗原性試験については、1994年7月新医薬品承認審査業務説明会および同年9月医薬品製造管理者講習会において、当局より抗原性試験は次のようにcase-by-caseで対応できることが報告されている。即ち、抗原性試験は、反復投与毒性試験、化学構造からみた抗原性の可能性など、科学的見地からみて特に試験を実施する必要がないと考えられる場合には、試験を実施せずに申請することが可能である。ただしこの場合には、試験を実施しない妥当性について概要書中に記述する必要がある。この試験法については、経験的にモルモットの能動的全身性アナフィラキシー(ASA)試験ならびに受動的皮膚アナフィラキシー(PCA)試験が実施されている。

次に、医薬品の免疫機能の抑制に基づく免疫毒性に関しては、現在のところその試験法に関するガイドラインは準備されていない。そこで1992年にJPMAで医薬品の免疫毒性試験の実施現状について調査した結果を分析してみると、JPMA加盟企業(当時85社)の約1/4の企業が免疫毒性試験を企業独自の判断で実施していることが判明した。実施されている試験の中で既に評価系として確立されている試験があり、それらの試験を列挙すると、細胞性免疫の試験系としてはマイトゲンに対するリンパ球幼若化試験、DTH試験、混合リンパ球培養試験、液性

免疫の試験系としては抗SRBC抗体産生によるPFC試験、特異抗体産生試験、非特異的免疫の試験系としてはマクロファージおよび好中球の機能試験が確立されていた。ところで、本邦においても食品添加物については本年3月に通知された「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」の中で、28日間、90日間および1年間反復投与毒性試験に免疫関連臓器の病理組織学的検査が追加され、28および90日間反復投与毒性試験では必要に応じ胸腺、脾臓、リンパ節/リンパ様組織の免疫組織化学検査を実施し、免疫毒性が疑われるときは、骨髄構成細胞比、脾リンパ球組成およびNK細胞活性を調べることが要求されている。

DIAのRound-table DiscussionにおいてDr. J. Dean (Sanofi Winthrop, Inc., USA)よりモルモットを用いた抗原性試験はヒトにおける予知性が、特に低分子薬物において低く、PCA試験はその使用目的が今一つ明確でないとの発言があり、このコメントに関しては我々も理解しているところから、同意する旨の返事に止まった。しかし、Dr. V. Stejskal (Astra, Sweden)より感作モルモットのBリンパ球細胞の幼若化をin vitroで検討することにより、低分子の薬物の抗原性も検討可能であるとの発言があり、モルモットの抗原性試験も手法を変えれば予知性の高い試験法に成りうる可能性が窺えた。また、EUで医薬品の抗原性の検討に広く使用されているMouse Local Lymph Node Assayの一つであるMouse Popliteal Lymph Node Assay (PLNA)の使用について考えを求められたが、文献的には見ているが使用経験がないことから、この件については本邦における今後の検討課題であると返答した。しかしながら、このMouse PLNAについてはEUにおいて既に動物とヒトにおけるアレルギー発現の相関性が調べられ、高い相関性を得ていることから、本邦においても早急に検討する必要がある。そこで、このMouse PLNAについてDr. R. Albers (State University of Utrecht, The Netherlands)の発表を基にその特徴と問題点を簡単に纏めてみることにする。Mouse PLNAは化学物質に対する免疫系の局所反応を検討するために使用されている。PLNAのパラメータとしては、膝下リンパ節の重量(PLN Weight Index)、膝下リンパ節の細胞数(PLN Cellularity Index)、リンパ球のサブセット(PNL Cytometry)が挙げられる。PLNAはBrown-Norway

Figure 1 Popliteal Lymph Node Assay

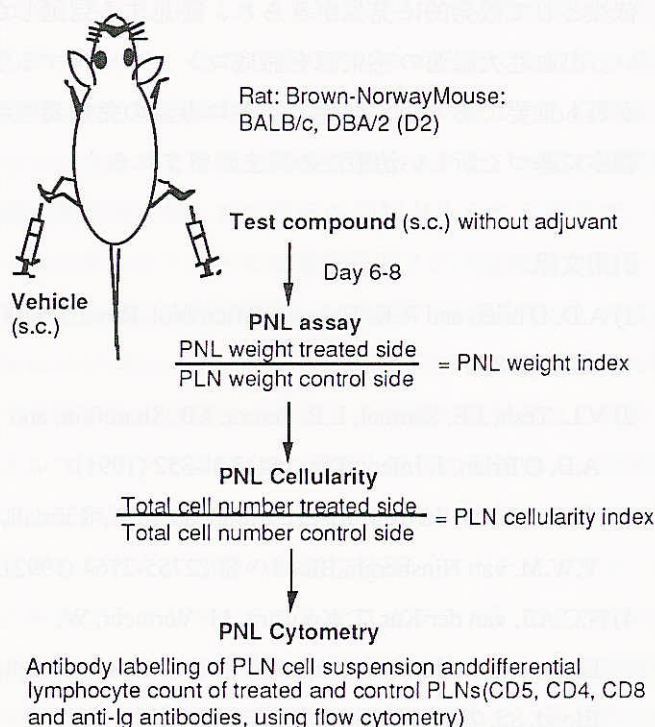
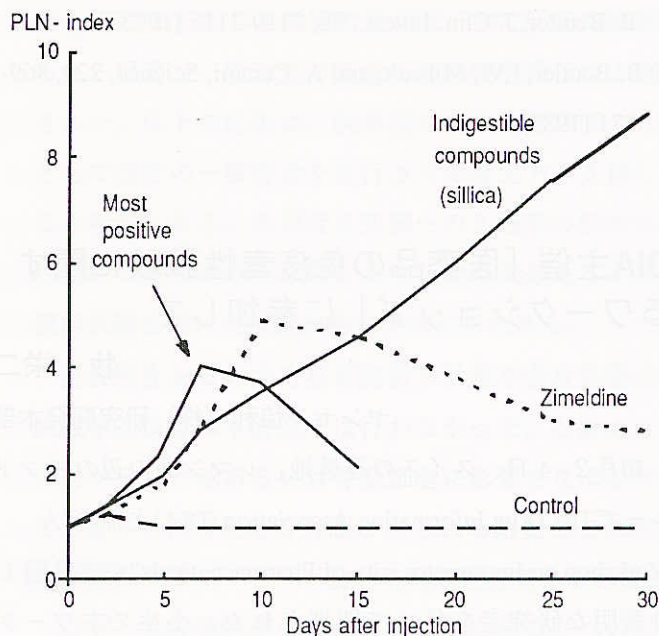


Figure 2 PLNA: kinetics - some examples -



Adapted from: Kammuller, M. A., et al., *Int. J. Immunopharmacol.* 11, 293 (1989). Thomas, C., et al., *Int. J. Immunopharmacol.* 11, 698 (1989).

ラットあるいはBALB/cまたはDBA/2マウスを使用して実施されており、被験物質はアジュバントを使用せず、後肢の一足の足蹠皮下に、他足には溶媒をそれぞれ1回注射し、6~8日後に膝下リンパ節を測定する(Figure 1, Popliteal Lymph Node Assay)。本試験の予知性について60種類以上の化合物を用い、ヒトで免疫学的副作用(allergyあるいはautoimmune)を誘発することが明らかな化合物と免疫系に作用を及ぼさない化合物について検討し、前者

については全て陽性の結果が示され、後者については陰性の結果が得られている。問題点は、procainamideやpropylthiouracilなどの代謝物が反応に関与する化合物では偽陰性となり、aceton, ethanol, silica, imipramineなど刺激作用を有する化合物では偽陽性を示すことにある (Figure 2, PLNA:kinetics)。最後にPLNAの特徴、落とし穴および限界をまとめたものをTable1(summary)に示す。

以上、医薬品の免疫毒性試験の現状について、諸外国の事例も交えその概略を述べた。会員の皆様の研究の一助になれば幸いである。

Table 1

Popliteal Lymph Node Assay (PLNA)

Direct PLNA - summary -

Merits:

- Cheap
- Simple
- Rapid
- Indicates immunostimulating capacity
- Can be used to grade immunostimulating potential of related compounds

Pitfalls:

- Immunoactive metabolites
- Primary irritants

Limitations:

- Does not prove T cell involvement
- Specificity of response unknown

↓
possibilities for mechanistic studies limited

Dr. Ruud Albers (Utrecht University)

アメリカ合衆国 Society of Toxicology について

吉田貴彦

東海大学医学部環境保健学部門

私は1992年から1年と少しアメリカ合衆国環境健康科学研究所(National Institute of Environmental Health Sciences, NIHの1組織)に研究留学しました。昨年の免疫毒性研究会の総会で招待講演を行ったM. I. Luster博士のもとに免疫毒性を研究したのですが、この研究室の研究成果の発

表の場がSociety of Toxicology (SOT)です。この学会は Toxicology and Applied PharmacologyとFundamental and Applied Toxicologyの2つの雑誌を学術機関誌として発行しており、また毎年3月にAnnual Meeting of SOTが開催されます。私もアメリカ合衆国滞在中に2回参加する機会があり、その後も出来るかぎり参加するように心がけています。このSOT meetingは、例年1,800題程の演題が5日間に渡り非常に大きなConvention Centerにて開催されます。私の所属していた研究室(Immunotoxicology Group)がなぜこのSOT Meetingに参加するかと言うと、ほぼ毎日途切れることなく会場のいづこかでImmunotoxicology Sessionが、Symposium, Platform (Oral Presentation), Platform-Poster, Posterの形式で行われているからです。アメリカ合衆国のSOT (日本毒科学会に相当する)の規模の大きさはけた違いなのですが、その中でもImmunotoxicology (免疫毒性)の占める規模も相当なものです。SOT meetingでは、アメリカ合衆国はもとより世界各国からの研究者が集まり非常に熱心な討議がなされます。免疫毒性学のsessionにおいても例外ではなく、我々免疫毒性学を志す者にとって最先端の情報の収集にはもってこいの場であると言っても過言ではないでしょう。そのような訳で、私もSOT会員となり極力参加し演題を発表しながら情報の収集に努めています。SOT Meetingには幾人かの日本の研究者も参加していますが未だ多いとは言えません。我々の免疫毒性学研究会の会員の過多にも積極的に参加して戴けたらと願ひ、ここに御紹介しました。因に来年のSOT MeetingはOhio州 Cincinnatiにて、3月9-13日に開かれます。演題の締切りは例年10月1日ですので、もう過ぎてしまいましたが、SOT会員でなくとも知り合いの会員にSponsorshipを頼めば演題を出すことが出来ます。Abstract FormとRegistration Formが綴じ込まれたPreliminary InformationはSOT事務局に連絡すると送ってもらえます。SOTへの連絡方法はE-mail: sothq@toxicology.org、Fax:+1-508-230-2015となっています。多くの皆様と共に参加したいと願っています。

会計報告

幹事会の議を経て、9月26日(木)の研究会総会に事務局より会計報告として下記の決算報告と予算提案が行われ、承認されました。

平成7年度(95年度)決算報告

収入の部

項目	予算	決算	差額	内訳
前年度繰越	218,408	209,006	9,402	
年会費収入	600,000	759,000	159,000	a
総会収入	240,000	568,000	328,000	b
寄付金	1,050,000	1,050,000	0	
預金利子	2,000	1,563	*437	
雑収入	0	1,000	1,000	
計	2,110,408	2,588,569	478,161	

a) @3,000 x 253人 (過納者を含む)

b) @2,000 x 140人、3,000 x 25人、5,000 x 8人、
6,000 x 20人

支出の部

項目	予算	決算	差額	内訳
総会費	720,000	752,877	*32,877	c
講師招請費	500,000	500,000	0	d
会議費	60,000	51,507	8,493	e
通信費	200,000	204,310	*4,310	f
印刷費	150,000	169,383	*19,383	g
事務費	80,000	48,113	31,887	h
予備費	400,408	0	400,408	
剰余金	-	862,379	*862,379	i
計	2,110,408	2,588,569	478,161	

c) 講演要旨集・ネームカード・ポスター作成費、会場要
員謝金、会場清掃謝礼等

d) 外国講師旅費・滞在費

h) 事務用品、雑費

e) 世話人会、小世話人会

i) 剰余金は次年度繰越

f) 郵送代

j) *マイナス差額

g) Newsletter、封筒、振替用紙

平成8年度(96年度)予算

収入の部

項目	予算	内訳
前年度繰越	862,379	
会費収入	920,000	@4,000 x 230人、 @20,000 x 1社
預金利息	1,000	郵便預金、普通預金
計	1,803,379	

支出の部

項目	予算	内訳
総会経費	500,000	講演要旨集・ネームカード・ ポスター作成費等補助
会議費	100,000	幹事会、運営幹事会他
通信費	300,000	郵送代
印刷費	250,000	Newsletter、振替用紙他
事務費	170,000	事務用品、アルバイト、雑費
予備費	483,379	
剰余金	-	剰余金は次年度繰越
計	1,803,379	

平成9年度(97年度)予算案

収入の部

項目	予算	内訳
前年度繰越	583,379	総会会計剰余金繰入を含む
会費収入	1,020,000	@4,000 x 250人、 @20,000 x 1社
預金利子	1,000	郵便預金、普通預金
雑収入	0	
計	1,604,379	

支出の部

項目	予算	内訳
総会経費	500,000	講演要旨集・ネームカード・ ポスター作成費等補助
会議費	100,000	幹事会、運営幹事会他
通信費	300,000	郵送代
印刷費	250,000	Newsletter、振替用紙他
事務費	170,000	事務用品、アルバイト、雑費
予備費	283,379	
剰余金	-	剰余金は次年度繰越
計	1,604,379	

編集・発行：免疫毒性研究会

発行日：1996年12月1日

〒199-01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、藤牧秀和、牧栄二

原稿送付先：E-mail： kayamaf@jichi.ac.jp