

ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会 : The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 8 No. 2 (通巻16号) 2003

目次

第10回日本免疫毒性学会学術大会報告	1
第11回日本免疫毒性学会学術大会(予告1) ... 1	
免疫毒性研究10周年記念シンポジウム	
特別講演	
“微量元素の測定からの炎症発生メカニズム及び細胞内調整機構の探索”	3
京都大学大学院医学研究科 中島加珠子、白川太郎	
基調講演	
“免疫毒性研究の進展と課題 - Analytical stageからMechanism-based stageへ”	6
日本免疫毒性学会理事長 帝京大学薬学部 大沢基保	
食物アレルギーの実験モデルとアレルゲン性評価	
国立医薬品食品衛生研究所 手島玲子	9
動物実験モデルを用いた環境化学物質の毒性評価	
独立行政法人国立環境研究所 藤巻秀和	10
年会賞	12
ヒ素の免疫毒性発現におけるグルタチオンの役割	
東京薬科大学生命科学部 櫻井照明、藤原祺多夫	
奨励賞	14
経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル	
食品薬品安全センター 新藤智子、金澤由基子他	

第10回日本免疫毒性学会学術大会報告

学術大会会長 北條 博史

本年度の学術大会は平成15年9月25日(木)、9月26日(金)の両日、神奈川県相模原市のグリーンホール相模大野(相模原市文化会館)で開催された。

今回は、本学会の前身である免疫毒性研究会が1994年に昭和大学で開催されてから10回目の節目に当たったため、過去を振り返り学会の新たな発展を展望する機会として、サブテーマ「免疫毒性研究10年 - 免疫毒性研究の新たな展開 -」の下に、記念シンポジウム「免疫毒性研究の進展と課題」が開催された。その他、特別講演、2つのシンポジウム、ワークショップ、一般講演と盛りだ

第11回日本免疫毒性学会学術大会(予告1)

第11回日本免疫毒性学会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。尚、第35回日本職業・環境アレルギー学会と第44回日本産業衛生学会アレルギー免疫毒性研究会との三者協賛大会です。

日時：平成16年9月10日(金)～11日(土)

会場：福井県国際交流会館
福井市宝永3丁目1番1号(〒910-0004)
TEL: 0776-28-8800, FAX: 0776-28-8818

協賛：日本トキシコロジー学会、日本薬理学会(予定)
メインテーマ：アレルギー性化学物質に抗する国際的予防体系を構築する

プログラム：

招待講演「呼吸器免疫毒性学の最前線」

ケネス・ドナルドソン

英国エジンバラ大学教授

特別講演「環境と鼻アレルギー」

藤枝重治 福井大学医学部耳鼻咽喉科教授

ワークショップ

「化学物質の感作性評価 その国際標準化システムを構築する」

「医薬品の免疫毒性評価手順を検討するための共同研究」

シンポジウム

「呼吸器免疫毒性学のアセスメントとサーベイランス」

市民公開シンポジウム「地産地消の長寿免疫学」

ランチョン・セミナー(9月10日(金) 予定)

一般演題：口頭またはポスター発表、口頭発表は一演題当たり発表時間10分、討論時間 5分

演題講演要旨申込締切：6月30日(水)

申込先：http://www.tokyukanko.com/conv/3404/ita_2004/
(不具合が生じた時は、roentgen@fmsrsa.fukui-med.ac.jpまでご連絡下さい)

第11回日本免疫毒性学会学術大会事務局

福井県吉田郡松岡町下合月23-3(〒910-1193)

福井大学医学部環境保健学内 大会会長 日下幸則

Tel: 0776-61-8338, Fax: 0776-61-8107

E-mail: roentgen@fmsrsa.fukui-med.ac.jp

今回、シンポジウムを公募でも募集いたします。企画案をお持ちの方は、日本免疫毒性学会事務局へ1月31日までにご連絡ください。

〒329-0498 栃木県河内郡河内町薬師寺3311-1

自治医科大学保健科学講座環境免疫学・毒性学部門

TEL: 0285-58-7336

FAX: 0285-44-8465

くさんに企画され、2日間熱心な質疑が行われた。参加者数は前回をやや上回り、会員105名、非会員53名であった。一般講演は5題増の28題でこれまでの大会で最も多かった。このように活発な大会になったのは皆様の多大なるご協力の賜物であり、学会運営を担当させていただいた事務局として、心から感謝する次第である。

総会では、日本免疫毒性学会会則および学会諸規定の大幅な変更が審議され、組織面からもこれからの学会を支える基盤が確立された。また、本学会の初めての名誉会員として黒岩幸雄先生に対する表彰も行われた。

1. 特別講演

京都大学大学院医学研究科健康増進・行動学分野教授白川太郎講師から、「遺伝要因と環境要因の相互作用：アレルギー疾患をモデルに」の講演を賜った。アトピー遺伝子に関するご自身の最先端の研究を紹介され、アトピー遺伝子の詳細な解析結果及び金属や活性酸素などのアトピー要因との関連など、非常に興味深い刺激的な内容であった。

2. 記念シンポジウム

「免疫毒性研究の進展と課題」

日本免疫毒性学会理事長の帝京大学薬学部教授大沢基保講師により基調講演が行われた。講演では免疫毒性研究の始まり、免疫毒性研究の進展、さらに今後の研究課題となる毒性概念、試験法・毒性機序、リスク評価について、茫漠とした免疫毒性に関する研究は巧みに整理され解りやすく提示された。これを受けて3人の演者が引き続いて免疫毒性の新たな課題について話された。ファイザー株式会社中央研究所安全研究統括部の堀井郁夫講師は、「医薬品開発における免疫毒性評価の分子毒性的アプローチ - トキシコパノミックス(トキシコプロテオミクス、メタボノミクス)の免疫領域への展開 -」について、国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部の手島玲子講師は「食物アレルギーの実験モデルとアレルギー性評価」について、国立環境研究所環境健康研究領域の藤巻秀和講師が、「動物実験モデルを用いた環境化学物質の毒性評価」について、それぞれ医薬品開発、遺伝子組換え食品、環境化学物質研究の3分野からの最先端の発表であった。

3. シンポジウム I

「化学物質過敏症」

微量化学物質の慢性暴露により発症する化学物質過敏症が増加しているが、自覚症状が主で客観的に観察可能

な症状が極めて少なく、発症機序も不明である。2名の演者は、化学物質過敏症やシックハウス症候群の典型的な原因物質と考えられているホルムアルデヒドによる動物実験について発表した。旭川医科大学健康科学講座の吉田貴彦講師は「ホルムアルデヒドの免疫系への影響 - マウスを用いた実験系による検討 -」の発表において、ホルムアルデヒド暴露による体液性免疫亢進や他の免疫パラメーターの変動の化学物質過敏症患者との類似性等を示唆し、東海大学医学部基盤診療学系の相川浩幸講師は「ホルムアルデヒド周産期暴露学習行動への影響」において、シドマン型電撃回避学習試験による回避率95%以上のラットを用いた実験で、約0.09ppmというきわめて低濃度ホルムアルデヒドが自発行動の抑制や平衡感覚の乱れ、学習行動の低下など中枢神経機能に影響をきたすことを示唆した。北里研究所臨床環境、北里大学大学院医療系研究所の坂部貢講師は、ご自身の研究を含めて、環境化学物質の生体影響を“恒常性維持に必要な生理機能の破綻”という広い視野から捉え、「神経内分泌免疫学」からみた化学物質過敏症の最新動向」と題して最近の知見を紹介した。

シンポジウム II

「バイオ医薬品の毒性評価と副作用」

さまざまなバイオ医薬品が臨床の場に登場しつつあり、これらの毒性評価と副作用問題は重要である。昨年の本学会でもバイオ医薬品の免疫毒性試験はワークショップにおいてとりあげられたが、今回は臨床治療上の問題点を明らかにすることを意図した。

まず、医薬品機構・治験指導部の西村多美子講師により、「生物医薬品の治験に望むもの - 抗体医薬・受容体医薬を中心に -」の課題で、治験に関する指導及び助言の立場から非臨床から臨床への移行の判断や治験概要書等について講演があった。千葉大学大学院医学研究院の横須賀収講師は、「肝炎に対するインターフェロン治療時の副作用とその対策」として、約300名のC型肝炎患者に対し行ったインターフェロン治療の経験を基に、治療経過時期と副作用の発生状況、副作用の多彩性や重症度、及びそれらの対応策について講演した。千葉大学大学院薬学研究院の上田志朗講師は、「モノクローナル抗体によるリウマチ治療における問題点」として、現在使用されている6モノクローナル抗体製剤を紹介し、特に抗TNF抗体であるインフリマキシブを中心に、タンパク製剤としての抗原性の問題とそれらの薬剤の免疫反応に及ぼす免疫毒性の問題、またこの抗体製剤の適応拡大の可能性等を話された。

4. ワークショップ

本学会の伝統的なワークショップは、今回は2つのセッションに分けて行った。

(1)「医薬品に関する免疫毒性評価法の国際調和」

国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部の澤田純一講師は、「医薬品に関する免疫毒性試験ガイドンス(案)とICH」という演題で、日本における医薬安全総合研究「国際動向を踏まえた医薬品の新たな有効性及び安全性の評価に関する研究」の1つの「免疫毒性試験法の標準化に関する調査研究」班を代表して、免疫毒性試験法ガイドンス案の紹介並びにICHに関する進行状況を報告された。帝国臓器製薬株式会社安全性・代謝研究部の久田茂講師は、「医薬品の免疫毒性試験国際調和ガイドライン作成のためのICH免疫毒性データ調査」として、EUと日本・米国間の不一致点を解決するために行ってきたICH免疫毒性データ調査結果を報告した。

(2)「抗原性試験の課題」

ヤンセンファーマ株式会社研究開発本部の牧栄二講師は、「医薬品開発における抗原性試験の問題点」の演題で、低分子医薬品の抗原性試験の必要性和実験方法の問題点を論じた後、被験医薬品投与モルモットでのリンパ球幼若化試験やマウス膝下リンパ節試験による抗原性試験を行うことを提案した。三共株式会社安全性研究所の木村努講師は、「マウス膝窩リンパ節試験(PLNA)の抗原性試験における実用性」の演題で、モデル薬物で誘起されたPLNA反応におけるPLNインデックス、リンパ球サブセット、Th1/Th2サイトカイン産生の変化等を紹介し、PLNA評価における留意点を明らかにした。

5. 一般講演

口頭発表とポスター発表の両方法での募集を行ったが、予想に反してポスター発表希望者が多かったため、一部の発表者に変更依頼を行い、最終的には口頭発表14題、ポスター発表14題となった。

昨年度から行っている優秀発表に対する年会賞、奨励賞の表彰は今大会は次のように決定された。年会賞は、東京薬科大学生命科学部環境衛生化学研究室の櫻井照明氏の「ヒ素の免疫毒性発現におけるグルタチオンの役割」に、奨励賞は、同点であたため、食品安全センター秦野研究所の金澤由基子氏と同所の新藤智子氏に決まった。両氏は共同実験者でもあり、前者は「経口感作および経口惹起によるマウスのアレルギーモデル(1)」、後者は、「経口感作および経口惹起によるマウスのアレルギーモデル(2) - 消化管変化を特異的指標として - 」の発表者であった。

免疫毒性研究10周年記念シンポジウム

特別講演

微量元素の測定からの炎症発生メカニズム 及び細胞内調整機構の探索

Trial study of intracellular trace elements by using X-ray
fluorescence analysis

中島加珠子、白川太郎

京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻

健康要因学講座健康増進・行動学分野

理化学研究所 横浜研究所 遺伝子多型研究センター

アレルギー体質関連遺伝子研究チーム

はじめに

金属は各種酵素の活性中心として、身体機能の維持に重要な役割を担っている。近年、生体内外の微量元素が、免疫反応の賦活化に役立っていることや、皮膚炎の病態に影響を与えていることが示唆されている。人体の中で最も含有量の高い鉄は古くからその必要性が知られていたが、Feだけでなく亜鉛やセレン等の金属製剤が昨今栄養補助食品として店頭で販売される事が増えてきており、微量元素の重要性が注目されつつある。

皮膚構造と含有元素

表皮は厚さおよそ120 μmで様々な種類の細胞からなる複雑な層を形成している。従来皮膚の分析では容積や含有成分は様々な側面から解析されていたが、多層構造は混同して分析されていた。過去にも皮膚含有元素の分析は行われていたが、どの層を解析しているかは研究によって異なっていた。古い研究では層は区別されておらず、層の違いによる情報はほとんど得られていなかった。近年、種々の微量元素がセカンドメッセンジャーあるいは調節因子として働く事が示され、微量元素の解析も注目されつつある。例えばカルシウム(Ca²⁺)は、種々の細胞のシステムで非常に重要なシグナルを伝達する物質である。Ca²⁺は顆粒層と角皮層の分化のレベルで、アポトーシスの機構に重要な役割を果たしている事が示唆されている。アポトーシスにおけるCaとZnのバランスの重要性は、様々な細胞の機構の中で明白に実証されている。乾癬の病巣におけるFeの喪失は20年以上前に示されているが、臨床的に一見正常な乾癬患者の皮膚にもFeの消失が

生じている事が明らかになってから、新たな意味を持ったと言える。皮膚障壁機能の変化は、分化した表皮細胞の生理学的状態と相互に関連すると考えられる。これまでは皮膚における生理学上重要な元素及び微量元素の量的勾配、そして高度に分化した組織を同時に分析する手法がなかった。Particle probeやelectron microprobe及びscanning proton microprobeを利用して、病態生理学の手法と同様に正常な皮膚の異なる生理学側面を分析することが可能になり、金属アレルギーの原因となる金属の浸潤も微量元素の解析で実証可能となった。正常状態と病理状態の皮膚における生理学的研究のアプローチは、細胞の免疫学的、生化学的な様々な技術に基づいていたデータの広い解釈を含めなければならない[1]。

微量元素と皮膚状態

乾癬患者やアトピー性皮膚炎患者の皮膚は、正常な皮膚と比較してCaの分布が高いという結果が得られている。特にCa:Znの比は正常皮膚との間に大きな違いが見られ、乾癬ではCaの割合が減少し、アトピー性皮膚炎ではZnの割合が減少しており、動態は明らかに異なる。また、Ca²⁺は細胞死(apoptosis)を制御している可能性も示され[2]、皮膚の異常には細胞死のプログラム異常も関わっている事が示唆される。Ca²⁺は細胞表面のCl⁻ channelをactivateさせることも知られており、金属のイオン化及び取込みにも関わっている可能性がある。角質細胞が正常にバリアを形成するためには、Ca²⁺の分布が重要であることが示され[3]、皮膚のバリア機能の障害と同時に上皮組織におけるCa²⁺勾配の減少が観察されている[4]。

我々の試み

SPring-8 (Super Photon Ring 8GeV)は、日本が誇る世界最高性能のおよそ50億電子ボルト(5GeV)以上の加速エネルギーを有する第3世代の大型放射光施設である。放射光とは1947年に初めて電子シンクロトロンで観測された、ほぼ光速で直進する電子が、進行方向を磁石などによって変えられた際に発生する電磁波である。現在、SPring-8は国内外の研究者に広く開かれた共同利用施設として、物質科学、生命科学、環境科学だけでなく産業利用分野の研究にも利用されている。1997年の設立以来、タンパク質巨大分子の3次元構造解析、非結晶生体材料の小角散乱、薬剤設計、新薬開発などの生命科学へ利用に留まらず、生体試料中の環境汚染微量元素の分析、高性能電池材料の局所構造解析、環境浄化用触媒の分析などといった環境科学への利用にも応用されている。そればかりではなく微小血管造影法による腫瘍血管の観察、

トモグラフィ、屈折コントラスト・映像法による呼吸器系疾患の観察など臨床に即した利用といった様々な分野に利用されている。

我々はSPring8の分光分析ライン(BL37XU)を利用して、単一細胞において様々な元素を同時に測定する試みをはじめた[機器略図 Fig 1 参照]。SPring8を利用した生細胞の分析は過去に試みがない。現在我々はその測定システムを確立する為に様々な試行錯誤を行っている。生体内の様々な微量元素は互いに影響を与えているとも考えられ、その動きを同時に測定できる事は価値ある事と考えられる。個々の元素を染色等で同定する事は可能であるが、試料を調整する事なく同時に複数の元素の分布及び化学状態を測定できる手法は他にないであろう。しかしながら、これまで単一細胞レベルでの測定はほとんど行われていない。何故ならば機器の構造上、様々な問題が存在するからである。まずは含有量の問題である。組織では無く、単一の細胞では各種元素は非常に微量な量しか含まれておらず、培地や固定液の影響を完全に取り除く事は難しい。次にビームの精度である。浮遊細胞だと、生かしたまま固定しなければならない。実験を進めて行く中で明らかとなった問題も多く、システムの確立までの道は困難である。

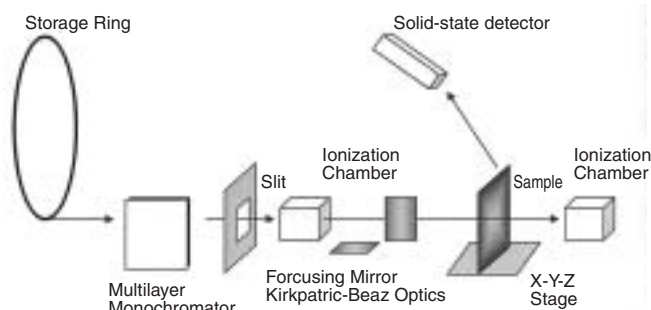


Fig1. Experimental principle. The schematic drawing of the set-up of BL37XU, Spring8 (Sayo, Japan).

細胞の中に含まれる様々な微量元素がどのような機構で生命活動の制御に関わっているかは未だ明確ではない。各種タンパクの中に含まれ、活性中心として重要な働きを成しているものも数多くある。これら様々な様々な炎症の発生機構の中で我々がまず注目したのは活性酸素による細胞障害である。外的刺激に対する反応としての活性酸素発生により、サイトカインの分泌や細胞障害が誘導され、炎症の増悪に関係していると考えられる。活性酸素の発生に関わっていると考えられている遷移金属の中でも特に生体内での含有量の高いFeに着目した。免疫反応に関わる細胞群及び病態を呈している患部の組織モデルを解析することによって、より簡便な診断方法

を構築するための試みとして、体内に微量含まれ、しかしながら大きな働きを果たしている金属に注目し、その動態と疾患に同調性が見られないかどうかを検討する必要があると考えられた。

分光分析は試料を障害しない為元素解析のみならず、免疫染色などの生化学的な解析を同一の試料で行うことが可能である。そこでまず我々はヒト前骨髄芽白血病細胞HL60を用いたトライアルを行った。HL60は薬物誘導及び刺激によって容易に活性酸素種の一つであるスーパーオキシドアニオン(O_2^-)を発生させる事が知られている[5]。このHL60を用いた活性酸素の産生系においては、8-hydroxydeoxyguanosine (8OHdG)を指標とするDNAダメージについての研究が鹿児島大学の竹内らによってなされ[6]、 O_2^- とDNAダメージ量は相関する事が明らかになっている。この O_2^- の発生経路にはFeからの電子の供与が関係するfenton反応が考えられているが、実際に目で見える形では確認できていない。これまでは各種試薬の反応の結果から類推するのみであった。Feの重要性は既に知られるところであるが[7]、この細胞系を用いて O_2^- 発生時の細胞内での金属の動態を調べることで、 O_2^- の発生に本当にfenton反応が関わっているのか、それとも別の体内の遷移元素が関わっているのか、又は全く別のメカニズムが働いているのかを目に見える形で証明できると考えた。次に、現在までに得られた結果を述べる。 O_2^- を発生させると、測定したHL60の細胞内元素の中ではCa、Fe、Cuに増加が見られ、Cl、K、で減少が見られた。 O_2^- の発生をSODの添加で抑えるとCl、Cu、Feのレベルは元に戻った。特にFeやZnは酸化ストレスを与えると細胞内に流入することが考えられる。 O_2^- の消去のためにはSODが必要であり、SODを活性化するにはZnが消費される。 O_2^- を不均化した後、Znは細胞内に取り込まれるようである。これらの結果から分かることは、 O_2^- の発生にはFeだけでなく、他の遷移元素(特にZn)が関わっているということであろう[8]。また、価数の動態の変化をX線吸収端構造解析(XAFS)で行った[Fig 2]。PMAにて刺激を与えると若干2価へシフトする事がわかる。しかしながらこれらのサンプルは細胞をmassとして見ている為、価数の片寄りが懸念される。

我々はまたアレルギーの発症機構解明の為、SNP (Single Nucleotide Polymorphisms: 一塩基多型)による個体差を加味した遺伝子解析を行っている。Human Genome Projectにおいてドラフトシーケンスが発表されて以来、様々な疾患関係遺伝子が発表されてきている。経験的な知識に加え、遺伝子解析の観点からもアレルギーは一つの原因によって発生する単一原因疾患ではな

く、多因子疾患であることは周知の事実である。環境要因、遺伝要因が様々に交絡し合って各々の疾患を生じていると考えられている。アレルギー疾患がもしも完全に個体差によってばらばらな原因によって生じるのであれば、治療の方策の立てようはない。しかしながら家系調査で家族集積性が見られることや、双生児研究で一卵性双生児に高い一致率が見られることから、遺伝子解析もまた必要である。様々なツールを用いてより早く適切な診断をくだし、患者のQOLをいかにあげるかが今後の課題であろう。

1. Forslind B: The skin barrier: analysis of physiologically important elements and trace elements. *Acta Derm Venereol Supp* 208: 46-52, 2000.
2. Forslind B, Werner-Linde Y, Lindberg M, Pallon J: Elemental analysis mirrors epidermal differentiation. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 79(5): 12-17, 1999.
3. Vicanova J, Boelsma E, Mommaas AM, Kempenaar JA, Forslind B, Pallon J, Egelrud T, Koerten HK, Ponc M: Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. *J Invest Dermatol* 111(5): 97-106, 1998.
4. Ahn SK, Hwang SM, Jiang SJ, Choi EH, Lee SH: The changes of epidermal calcium gradient and transitional cells after prolonged occlusion following tape stripping in the murine epidermis. *J Invest Dermatol* 113(6): 189-195, 1999.
5. Takeuchi T, Morimoto K, Kosaka H, Shiga T: Spin trapping of superoxide released by opsonized asbestos from human promyelocytic leukemia cell line, HL60. *Biochem Biophys Res Commun* 194(1): 57-64, 1993.
6. Takeuchi T, Nakajima M, Morimoto K: Relationship between the intracellular reactive oxygen species and the induction of oxidative DNA damage in human neutrophil-like cells. *Carcinogenesis* 17(8): 1543-1548, 1996.
7. Goswami T, Rolfs A, Hediger MA: Iron transport: emerging roles in health and disease. *Biochem Cell Biol* 80(5): 679-89, 2002.
8. Nakashima K, Shirakawa T, Ide-Ektessabi AM: Investigation of the relation of allergy and oxidative damage by metallic elements using SR micro beam. CAARI 2002 proceedings

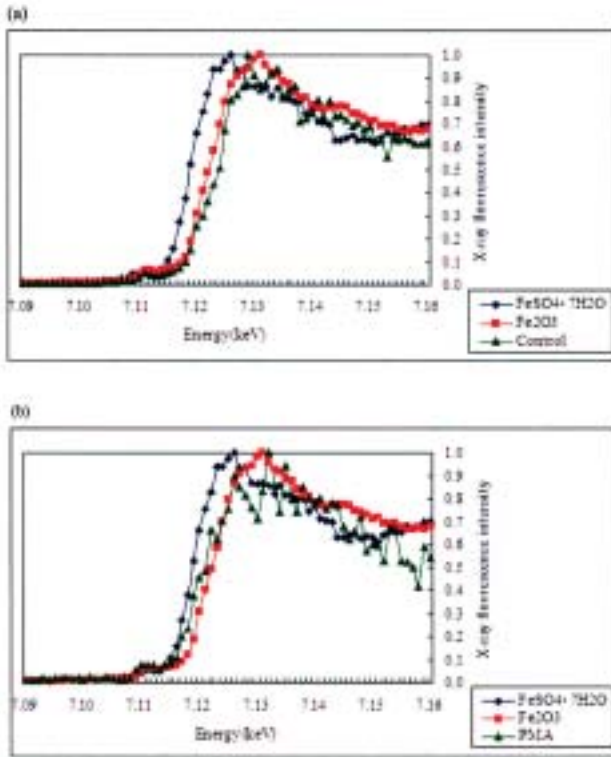


Fig 2. Blue and red lines show the XANES spectra of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and Fe_2O_3 powder, respectively, as reference materials. These are the comparison of Fe K-edge XANES spectra between the sample and the reference materials ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Fe^{2+}], and Fe_2O_3 [Fe^{3+}]). (a)Control, (b)PMA stimulation. The beam size was $0.25 \mu\text{m}^2$, and the incident beam energy was changed from 7.10 to 7.16 keV. The XANES spectrum of the samples showed a substantial difference from those of the reference materials $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and Fe_2O_3 .

基調講演

免疫毒性研究の進展と課題

- Analytical stageからMechanism-based stageへ

大沢 基保

帝京大学薬学部・衛生薬学講座・環境衛生学教室

本学会の前身であった免疫毒性研究会が1994年6月に発足し、10月の第1回の研究会（於：東京・昭和大学薬学部）の開催により免疫毒性研究の集約の場ができてから今回で10回目の年會（於：相模原）となりました。そこで、今回は10年を一区切りとして、免疫毒性研究と学会の歩みおよび今後の課題を展望する記念シンポジウムが企画されました。本稿は私に宿題として課されたその

時の基調講演の内容を要約したものです。研究会発足時の課題提起をもとに免疫毒性研究と学会の歩みを振り返り、これから重要度を増すであろう研究課題を中心にして、私見を述べてみました。

ある学問分野の発展過程は、特異な現象・事象の発見・整理とその分析の段階（Analytical stage）から、それらの機構の解析・理論化とそれに基づく特異的現象の理論的予測の段階（Mechanism-based stage）とに分けることができる。この2つの段階は、かつて用いられた romantic era, academic eraに対応するよう思えます。免疫毒性の研究は、このAnalytical stageからMechanism-based stageへの発展過程にあると思われる。

1. 免疫毒性研究の始まり

免疫系を標的とする毒性研究は、図1に示すように1970年代末に体系化され始め、immunotoxicologyと呼ばれるようになった。免疫毒性は1984年のWHO/IPCSの国際会議で、化学物質と免疫系との相互作用の結果として有害影響（生体防御能の低下、過敏症や自己免疫疾患）を生じるような事象として定義され、90年代にかけて化学物質の過敏症も含め各種の免疫毒性の記載と、免疫毒性の試験法の整備とその評価の試みがなされてきた。その主たる研究対象は、感染や発癌に対する宿主の生体防御能に影響する免疫抑制であり、化学物質の免疫系に対する直接的な影響と作用機構であった。

このような背景の中で、免疫毒性研究会は1994年に、化学アレルギーも包含する免疫毒性の概念についてのコンセンサスを確立することと、免疫毒性試験法（とくに医薬品の前臨床試験法）の開発と普及を当面の目的として発足し、研究の進展に伴い2001年には学会へと改組された。

免疫毒性学の勃興

[免疫学上の関連事項]	職業アレルギー、各種のアレルギー
・IgE	70
・MHC拘束性	家畜の感染症、免疫抑制剤の開発 重金類暴露と鼻感染 (Gainer)・免疫能低下 (Koller)
・免疫グロブリン遺伝子	1977 免疫反応のtoxicology機説 (Vos)
・CD分類	1982 NATO Advanced Study Institute on Immunotoxicology開催 (カナダ) 1st Int.Symposium on Immunotoxicology開催 (英)
・フローサイトメトリー	1984 WHO/IPCS Int.Seminar on Immunotoxicology開催 (ルクセンブルク) —免疫毒性学の定義
・IL-5, IL-6, サイトカインネットワーク	90 Target organとしての免疫系研究 (Dean, Luster, Munson, Amos他) 免疫毒性スクリーニング案提案され始める (NTP, RIVM)
・PCR法	1994 免疫毒性研究会発足
・Th1/Th2説	WHO/IPCS 免疫毒性研究法 (Direct immunotoxicity)発刊
・ケモカイン	WHO/IPCS 免疫毒性研究法 (Hypersensitivity)発刊
	2000
	2001 日本免疫毒性学会発足 医薬品の免疫毒性試験法ガイドライン発表 — ICHとの協議へ WHO/IPCS 免疫毒性研究法 (Autoimmunity)作成中

図1

2. 免疫毒性研究の進展

国内外ともにこの10年の間に免疫毒性学は固有の研究分野として確立され、その研究対象も多様になっている。化学物質や医薬品の免疫毒性について、WHOのTask groupにより直接的な免疫毒性 (Direct immunotoxicity) とその評価法 (Ref.1) と、アレルギー性過敏症と物質の感作能の評価法 (Ref.2) のまとめが公表されている。自己免疫の誘発能についても作業が進行中で、免疫毒性の情報と試験法については著しく研究が進展している。私は免疫毒性研究会の発足時に、当面する研究方法上の課題として、1) 免疫毒性試験項目の整理と標準化、2) 薬物や化学物質による自己免疫やアレルギーの実験モデル系の開発と指標の選択、3) ヒトタンパク製剤の安全性評価のためのヒト細胞モデル系の確立、などの点をあげた (Ref.3)。このうち、目標達成の目途がついているのは1) の課題であり、他のものについては未だ実用的な試験法が確立されていない。欧米では免疫毒性試験法のガイドラインが、化学物質についてはNTP (米国) やRIVM (オランダ) などにより、食品添加物についてはFDA (米国) などにより早くから提示されていた。医薬品の免疫毒性試験法については、日本でも学会のワークショップでの共同研究を基にガイダンス案 (Ref.4) が作成され、ICH会議の場に提出されたことは、学会活動の大きな成果の一つである。さらに、これまでの学会活動からは、アナフィラキシー誘発物質を始めとするアレルギー試験法の開発、ストレスと免疫能の関係 (内分泌 - 免疫系の相関) の解析と評価、化学物質過敏症の原因と機序 (神経 - 免疫系相関) の解明、遺伝子組換え (GM)食品や医薬品の免疫学的安全性の評価など新たな研究課題が発掘されてきている。

免疫毒性研究は、対象物質により臨床 (医薬品)、環境 (環境化学物質)、栄養 (食品) などの免疫毒性学、およびそれらの基盤としての分子免疫毒性学とに分化していくと予想されたが、正にその方向に進展している。臨床分野では生物製剤や高分子薬剤の比重が増してそれによるアレルギーや免疫不調が、環境や栄養分野でも大気や室内空気の汚染や食物環境の変化によるアレルギーやアトピー症状の増加や易感染状況が、各分野の免疫毒性研究の主要な関心事項になってきた。

3. 免疫毒性研究の今後の課題

免疫毒性研究の課題は、毒性概念、試験法、毒性機序、リスク評価などについて、多数の課題が存在する。これらの課題において、これからは現象の分析段階からその機構を考慮して解析することが必要な段階になってき

た。これらに関する課題は相互に関連しているが、次に課題例となるものを列挙すると、

- 1) 毒性概念： 免疫毒性は免疫系細胞を標的とする細胞レベルで特異的な毒性と考えられてきたが、その特異性をさらに標的分子のレベルで捕らえるべき段階に入ってきた。化学物質の発がん性における標的分子であるDNAに対し、免疫毒性では免疫反応関連分子やその受容体、さらにそれらの遺伝情報を担うDNA構成物などが候補となりうるが、多種であることから、免疫毒性の種類や機序によってそれらを分類整理することが必要であろう。また、生物学的影響としての免疫毒性は標的臓器の毒性概念でとらえにくいことがある。個々の免疫系細胞や組織への毒性のみならずシステム全体への影響としてとらえる視点も必要である。すなわち、個々の免疫系細胞の機能障害とともに、免疫系細胞の機能バランス (例えば、Th1/Th2機能バランス) のかく乱が毒性発現の律速因子であれば、免疫毒性は神経毒性や内分泌かく乱作用などに共通して、生理的毒性あるいはシステム毒性と言えるであろうか。この点に関連しては、局所の免疫毒性がどの程度全身の免疫毒性指標に反映されるか、検証する必要がある。
- 2) 試験法・毒性機序： 免疫毒性物質のスクリーニング系としての試験系は、一応確立されている。しかし、多数の動物を用いねばならない煩雑さのため、より簡便で感度と特異性が高くかつ毒性機序のメカニズムに基づく信頼度の高い免疫毒性の検出系の開発が求められる。特異性の点からみると、免疫反応に特異的なサイトカイン、抗体、表面受容体などの分子マーカーの活用が重要である。タンパク化学的な方法ではサイトカインや受容体の測定は測定感度面から難しいこともあり、遺伝子発現量の測定などの分子生物学的方法が必要である。さらに、これらマーカーがヒト免疫能を対象とする種々の試験系に適用できることも望まれる。

化学物質の暴露から健康障害の発症までの過程におけるバイオマーカーは、Exposure-Effect-Susceptibilityの3段階のバイオマーカーに分けられる。免疫毒性のバイオマーカーの問題をあげると、これらの段階のうち、暴露と感受性のマーカーが今後重要になってこよう。暴露は通常暴露量に関するマーカーとして考えられるが、免疫毒性特にアレルギー反応の誘発については、物質構造の質的な解析がクローズアップされよう。吸入接触アレルギーと食物アレルギーの交差反応研究 (例えば、シラカバ花粉とリンゴ・西洋ナシ・キウイなどの間の交差アレルギー) などか

ら、交差抗原の解析により抗原エピトープ部の類似性が示唆されている。このことは合成ペプチド医薬品やGM食品・医薬品の安全性評価においても考慮すべき事項であろう。実際に、一部の遺伝子組換え大豆とブラジルナッツの間にアレルゲンである2S-methionine-rich albuminが共通に検出されている。医薬品や化学物質によるアレルギーの場合は、それら物質の感作能の予測が求められている。その予測を動物実験などから求めるのではなく、アレルゲンの既知データから理論的に構造活性相関 (QSAR) を求める試みがなされ、接触性アレルゲンに関してはCase-Multicase system, DEREK skin sensitization rulebase、吸入アレルゲンに関してはSARなどのデータベースが提案されている。このようなデータベースからのメカニズム解析も有力な手段となつてこよう。

一方、感受性のマーカー解析のためには、genomics, metabonomics, proteomicsなどのToxicogenomicsの手法が、感受性の遺伝的因子の検索や感受性機構の解析に有望視されている。化学物質の中には、免疫疾患の感受性要因を有するHigh risk populationに対して免疫毒性を生じやすい場合がある。発がんのプロモーターに似て、必ずしも特異的な免疫毒性反応を引き起こさないが、自己免疫やアレルギーなどの免疫異常の遺伝的素因の発現を促進し、免疫障害を発症させる場合がある。水銀やカドミウムなどの重金属がこのような免疫毒性を示す。このような免疫毒性を誘発する因子を検索することの意義は大きく、そのため種々の感受性動物モデル (MRLマウス、NC/Ngaマウスなど) が用いられつつある (図2)。

Immunotoxicity on Lupus-Prone Mice

agents	prone animals	promoted autoimmune responses (reporters)
Cd	MRL/l mice	serum anti-dsDNA (at an early age) (Ohsawa et al. 1990)
Hg	NZB/W, MRL/l & MRL/++ and AKR/J mice	serum ANA, anti-chromatin renal immunopathology (Pollard et al. 1999)
Toxic oil (denatured rape seed oil)	MRL/l mice	serum ANA, anti-dsDNA, -collagen (at an early age) (Koller et al. 2002)

図2

3) リスク評価： 種々の毒性の意義は、実際のヒトにおけるリスクの有無、大きさによって評価される。そのリスクは暴露量や健康影響の程度から評価される場合と、暴露を受ける集団側の感受性の大きさから評価される場合がある。後者の場合には、遺伝的素因の他に、加齢段階やホルモンバランスあるいはストレス状態などの生理的状态による免疫能の差も感受性に影響すると考えられ、免疫毒性においては感受性にかかわるリスク要因を無視できない。近年アトピー体質者の急増が指摘されている。これは、同一地域、同年齢期の中学生集団のアトピー素因者率が経年的に増加することから、生活環境因子の影響によると推測されている。現在では、出生後の免疫機能の成熟過程では、複合的な生活環境因子は免疫学的ホメオスタシスに影響しうるものとして注目されている。内分泌かく乱と同じく、免疫毒性物質についても胎児期～幼児期はCritical Windowと見なされており、この観点からの免疫毒性研究が待望されている。さらに、内分泌かく乱とは異なり免疫毒性の場合は、免疫能の低下やバランスの変化が生じてくる老齢期もまた感受性が高い時期と言え、老齢期集団の免疫毒性リスク評価は高齢化社会を迎えるに当たって重要な課題である。

また、世界的にも環境リスク評価において、化学物質のヒトへの健康影響だけでなく生態系への影響の検討が必須となり、それに対応して化審法も改正された。このため、ヒト以外の生物における免疫毒性の試験系の確立やそのメカニズム研究へのニーズが高くなる。これが、比較免疫毒性の研究として展開すれば、生体防御における免疫分子の意義の解明や、毒性検索法における代替法の開発などへの応用も期待できる。

これら多数の課題について、視点を絞るためにあえて共通する点を挙げるとすれば、特異的な分子マーカーの開発と免疫毒性感受性の解析の問題の重要性が高いことを指摘できる。今後しばらくは、免疫毒性研究は産業衛生 (Ref.5) や小児保健 (Ref.6)などを始め応用分野に展開していく一方、これらの問題を中心として機構研究の面でも深化していくものと予想される。

[文献]

- 1 . IPCS Task group (1996) Environmental Health Criteria 180, p.1 - 390, WHO, Geneva.
- 2 . IPCS Task group (1999) Environmental Health Criteria 212, p.1 - 399, WHO, Geneva.
- 3 . 大沢基保 (1994) 第1回免疫毒性研究会要旨集, p.1-

- 3., 免疫毒性研究会
4. 澤田純一他 (2003) ImmunoTox Letter, 8(1): 3-8.
5. M.I.Luster, M.H.Karol, eds (2002) Int. Immunopharmacol., 2: 161-325.
6. D.B.Peden (2000) Environ. Health Perspect., 108 (Suppl): 475-482.

第10回免疫毒性学会記念シンポジウム報告

食物アレルギーの実験モデルとアレルギー性評価

手島 玲子 (国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部)

食物アレルギーの実験モデルの開発は、粘膜免疫の機能解析等を目的として、多くのグループで行われており、また、近年の遺伝子組換え食品の開発・実用化の国際的広がりに対応し、新規産生タンパク質のアレルギー性の評価法としての動物モデルの必要性からも進められている。本シンポジウムでは、(1)遺伝子組換え食品のアレルギー性評価における動物実験の位置付け、(2)現在進められている動物モデルについて、(3)卵白アルブミン(OVA)のマウスを用いる経口感作実験についての報告を行った。

(1) 遺伝子組換え食品のアレルギー性評価の概要

遺伝子組換え食品の安全性審査は、国内において、平成13年4月からは、「組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査基準(<http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/anzen/tuuchi2.html>)に基づき、義務化されている¹⁾。この中で、遺伝子産物のアレルギー誘発性に関しては、遺伝子産物(通常はタンパク質)がアレルギー(アレルギーを引き起こす原因物質)として知られているか、既知のアレルギータンパク質と構造上類似しているか、人工胃腸液や加熱処理に対する安定性があるか等が調べられるが、動物実験は義務づけられていない。また、国際的ガイドラインとして、1999年から2003年にかけて、コーデックス食品規格委員会(国連食糧農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO)合同設立国際政府間組織)のバイオ食品特別部会で議論され、2003年7月にイタリアで開催されたコーデックス委員会で採択された「組換えDNA植物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン」がある(ftp://ftp.fao.org/codex/alnorm03/al03_34e.pdf)。この安全性評価の中のアレルギー誘発性の部分(表1)には、主な評価項目として、(1)新規産生タンパク質と、既知の

アレルギーとの一次配列の相同性の比較、(2)新規産生タンパク質の消化性並びに物理化学的処理に対する安定性の検討、(3)特異的アレルギー患者血清中IgE抗体と新規産生タンパク質の反応性が必須項目としてあげられ、動物モデルの使用は、標的血清スクリーニング、国際的血清バンクの構築、新規産生タンパク質のT細胞エピトープの解析とともに検討項目としてあげられている。

表1 組換えDNA植物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドラインのアレルギー誘発性評価に関する添付資料

2003年7月 Codex総会(ローマ)採択

- (1)既知のアレルギーとの一次配列の相同性の比較(全アミノ酸配列並びに連続した部分アミノ酸配列の相同性も含む)
- (2)新規産生蛋白質の消化性並びに物理化学的処理に対する安定性の検討
- (3)特異的血清中IgE抗体と新規産生蛋白質の反応性
- (4)上記1)-3)以外で、考慮すべき項目; 標的血清スクリーニング、国際的血清バンクの構築、動物モデルの使用、新規産生蛋白質のT細胞エピトープの解析
- (5)アレルギー誘発性は、様々なデータ等に基づき総合的に判断すること
- (6)上記draftの適用除外: 小麦等の穀物由来遺伝子産物で、グルテン感受性消化管炎を促進する可能性のあるもの

(2) 食物アレルギー実験モデルの概要

食物アレルギーの動物モデルとしては、Helm博士²⁾らの総説に詳しく述べられているが、現在、動物モデルでは、被験タンパク質が、IgE抗体を産生しうるかどうかが、また、複数回の投与で、アレルギー反応が引き起こされるかどうか調べられている。感作のされやすさは、投与される抗原の濃度、投与方法、動物の年齢、遺伝的背景、アジュバントを用いるかどうかによって左右されることが報告されており、IgE抗体産生能の高い動物としてはBALB/cマウス、BNラットが報告されている。また、イヌ(Buchananら³⁾)や子豚を用いる食物アレルギーによる感作方法も報告されている。イヌや子豚のような非げっ歯類を用いることは、人の食物アレルギーと似た症状を呈するという観点で、有用であるが、投与期間が長いこと、及び被験物質の量を多く必要とするという欠点があり、げっ歯類を用いる方法の方が、投与期間を短くできるなど、汎用性のある方法と思われる。食物アレルギーモデルの具体例として、Dearmannら⁴⁾は、BALB/cマウスへの感作が、ウシアルブミンより卵白アルブミン

(OVA)の方が高いこと、また、ピーナッツアレルゲンのIgE抗体産生能が、対照として用いた非アレルゲン potato acid phosphataseより高いことを報告している。また、BNラットモデルに関しては、Knipperら⁴⁾の報告があり、OVA, hen's egg, cow's milkタンパクによる感作が報告されている。その他、イヌ(Buchananら⁵⁾)や子豚を用いる食物アレルゲンによる感作方法も報告されている。現在、共通のアレルゲン及び非アレルゲン物質を用いて動物の感作を行うという国際パリテーション試験が推し進められている。

(3) 卵白アルブミン(OVA)に対するマウスを用いる経口感作実験

食物のアレルゲン性を動物を用いて評価するためには、経口投与でしかもアジュバントを用いることなく感作を行うことが望ましい。しかし、一般に経口的に投与された食物抗原は様々なメカニズムによって寛容を誘導するので、食物アレルギーモデルとしては、寛容の誘導されにくい条件下で、経口感作を成立させることが必要で、抗原の投与量や免疫継続期間、動物種を選択などの検討が必要となる。私共は、マウスの種として、BALB/cマウス、B10Aマウス、INF- γ ノックアウト(INF- γ -KO)マウス、アトピー性皮膚炎モデルマウスであるNc/Ngaマウス、マスト細胞欠損W/W^vマウスを用いて、OVAの経口感作の条件を検討した。各種マウスに、9週間、OVAを0.1ないし1mg連日経口投与し、OVAに対する血液中抗体価の上昇を検討した。IgG1抗体価の上昇で比較すると、BALB/cマウスでは、0.1mgOVA/day、9週投与で600程度であるが、B10A、INF- γ -KO、Nc/Ngaマウスで、それぞれ、4,400程度、600程度、2,200程度で、W/W^vマウスでは29,000程度と、顕著であった。OVA特異的IgE抗体価は、各マウスとも、62から220程度であった。W/W^vマウスにおいて、経口感作後の抗原の腹腔内惹起により、急激な体温低下が認められ、また血漿中PAF濃度の上昇が引き起こされ、ASA(active systemic analysis)の誘導が認められた。W/W^vマウスの粘膜免疫に関する細胞の解析結果から、W/W^vマウスでは、wild type (+/+)マウスに比べ、腸管リンパ球(IEL)の中で、TCR

-T細胞の割合が顕著に減少していることが観察され、このリンパ球の群の減少が、W/W^vマウスでの経口感作のされやすさを反映している可能性が示唆された⁶⁾。以上、私達の行っている食物アレルギー動物モデルについて、結果を述べてきたが、W/W^vマウスが経口感作モデルマウスとして有用かどうかについては、OVA以外の他の抗原の感作も行い汎用性について確認する必要があると考えている。

[文献]

- 1) Teshima R. (2001) Bull.Natl.Inst.Health Sci. 119, 27-39,
- 2) Helm R.M. (2002) Ann.N.Y. Acad.Sci., 964, 139-150,
- 3) Dearman R.J. et al. (2000) Food Chem.Toxicol. 38, 351-360,
- 4) Knippels L.M.J. et al. (2002) Ann.N.Y. Acad.Sci., 964, 151-161,
- 5) Buchanan B.B. et al. (2002) Ann.N.Y. Acad.Sci., 964, 173-183,
- 6) Okunuki H. et al. (2003) Biol. Phar.Bull.26, 1260-1265

動物実験モデルを用いた環境化学物質の毒性評価

藤巻 秀和 (独立行政法人国立環境研究所)

1. はじめに

われわれの生活の質の向上とともに、身の回りに人工的な化学物質が増加しつつある。利便性の追求と共に正の相関を持って化学物質が増えていると考えられる。人体に害のない化学物質のみであれば一向に構わないが、塩や砂糖でもそうであるようにどんな化学物質も濃度が適度でないとき毒性がみられる。環境化学物質の種類が増える速度にその毒性評価、あるいは化学物質同士の相互作用などについての情報が追いつけず不足している状態である。環境化学物質の免疫毒性評価と実験モデルの今を考えたい。

2. 環境化学物質の毒性評価

一時の公害の時代から比較すると、大気はかなりきれいになっていると思われるし、実際の環境白書の中でも大気汚染物質に関して少なくとも顕著に増加がみられるものはない。しかしながら、大気中の化学物質の種類は確実に増えており、とくに生活時間の長い室内における化学物質の生体への影響が懸念されている。大気汚染物質の免疫毒性については、これまでに喘息や花粉症などの発症との関連から、アレルギー反応にかかわる炎症性細胞の局所への浸潤、炎症誘導や炎症時に働くサイトカイン・ケモカイン産生の増加、IgE抗体産生の亢進、好酸球の活性化などが解析の対象とされた。とくに、大気中の粒子状物質に含まれる化学物質の影響評価は、アジュバント効果の機構についての解析が多く報告されている。しかしながら、最近では粒子でもなく従来のNO₂やSO₂などのガス状物質でもない揮発性の有機化合物の影響が危惧されている。

3. 低濃度域における刺激作用と毒性

化学物質のリスクを評価するときには量 反応関係を見ることは重要な研究の項目である。それぞれの化学物質の使用に適した量を判定するのに、無影響量の値を見つけることが必要だからである。しかしながら、従来より低濃度域には毒性としての抑制作用のみでなく刺激作用が見られることがいくつかの報告で示唆されていた。いわゆる、U字型、あるいは逆U字型を示す反応曲線である。Calabrese & Baldwin (1)が毒性学におけるHormesis 抑制的濃度以下の毒物の生体に対する刺激効果(医学英和大辞典、加藤勝治編、南山堂)の再考を提案したのが今年の春であるが、免疫毒性評価においてもこの刺激作用について討論するのが適当な時期かもしれない。環境中の化学物質の曝露濃度は、急性毒性がみられるような高濃度ではなく低濃度で推移しているものが多くみられているので、刺激作用についてはその解析は重要な課題であろう。

最近のアレルギー疾患の増加には、環境化学物質による免疫応答の亢進作用が関連するという報告は多い。その一方で、揮発性をもち低濃度で室内に存在する化学物質の生体影響についてはよく解析されていないのが現状である。近頃のシックハウス症候群や化学物質過敏症(MCS)などの原因不明の疾患とのかかわりが推測されているので、動物実験により揮発性有機化合物の生体影響を明らかにすることは正しい化学的な知見の集積、あるいは予防法の作成の意味でも大変重要である。MCSの患者の中にはアレルギー性疾患の罹患率が高いことやシックスクール症候群の症状には皮膚のかゆみがみられるなどアレルギー反応の亢進が関与している可能性が考えられている。

MCSの患者が実際にどのような化学物質に対して過敏な反応を示し、発症の誘導を示すのがどのような濃度レベルかは現在不明である。WHOのガイドライン値や厚生労働省の指針値以下でも過敏な人は反応するともいわれている。種々の関連が疑われる揮発性有機化合物に対してヒトと動物でどのくらい感受性に差がみられるのかわからない。動物実験では、あくまでも曝露した低濃度の化学物質でどのような行動異常、反応がみられるのか解析するとともに、ヒトでの過敏な状態への誘導に関わるような要因説明の手がかりを提案することも可能である。

5. 神経毒性と免疫毒性の相互作用

MCSやシックハウス症候群を考えるとときに化学物質による免疫毒性のみを解析しても全体への影響はわからず、とくにストレスとの関連も無視できないことから脳

神経系への影響、神経毒性の研究も同時に必要と考えられている。最近の基礎的な研究で、免疫担当細胞からの神経ペプチドや神経成長因子の産生、また、神経細胞からのサイトカイン類の産生など神経系と免疫系とのクロストークが報告されており、生体内での恒常性の維持に大きな役割を果たしていると考えられている。

われわれは、室内での揮発性有機化合物の神経免疫軸への毒性をみるために、代表的な揮発性物質であるホルムアルデヒドを選んで低濃度長期曝露をマウスを用いて行い、その毒性評価を行った。その結果、WHOのガイドライン値に近い値で、脳内でのいくつかの指標に過敏な反応が誘導されることを見出した。また、ホルムアルデヒド、あるいはアレルゲン単独のマウスでは顕著な変化が見られないのに、アレルギーモデルマウスをホルムアルデヒドで曝露すると海馬における神経成長因子NGFの蛋白レベルでの増加、mRNAレベルでの発現増強が認められた。ところが、同じマウスの血漿中では、NGF量が顕著に抑制された。このような低濃度での変化が、どのような行動変化や症状に結びつくのか現時点では不明であるが、環境濃度に近い低濃度で刺激作用を示す可能性は示唆された。

6. これからの課題

細菌やウイルスなどの異物に対してのみ反応すると考えられてきた免疫機構が、化学物質に対しても応答することは金属アレルギーや職業アレルギーでは既知の事実であるが、その機構解析は不十分である。ホルムアルデヒドについても、欧州のアレルギー専門家会議EAACIの報告(2)ではアレルゲンとして扱っているが、IgEの誘導についての議論はわかれている。化学物質に対する免疫毒性をより深く掘り下げることが残されている課題の一つであろう。そのためには、Hormesisを適切に評価できる免疫毒性モデルの開発も重要と考える。

7. おわりに

日本免疫毒性学会が10年目を迎えたが、さらに10年後にはどのように扱う物質、実験方法、動物モデルが推移しているのに興味がある。免疫学において生物由来の異物のみならず化学物質に対する意義が増すにつれ、新たな視点が必要なかもしれない。

文献

- (1) Calabrese E. J. & Baldwin L. A. (2003) Nature, 421,691-692.
- (2) Johansson S. G. O. et al., (2001) Allergy, 56,813-824.

年会賞

ヒ素の免疫毒性発現におけるグルタチオンの役割

櫻井照明、藤原祺多夫

東京薬科大学,生命科学部,環境衛生化学研究室

【目的】

アジア地域を中心に大規模に発生している慢性ヒ素中毒では、患者に肝臓肥大や脾臓肥大などの炎症症状が高い頻度で観察され、ヒ素が免疫反応を惹起していることを推測させる。我々は既に、無機ヒ素が肝細胞やマクロファージに対して強い毒性を示し、炎症性サイトカインの放出を伴うnecrosisを誘導するのに対し、その最終代謝産物であるdimethylarsinic acid (DMAs^v)は専らapoptosisを誘導し、炎症性サイトカインの放出を抑制する事を報告した。また、ヒ素による細胞毒性の発現は細胞内還元型グルタチオン (GSH) により制御されており、GSHは無機ヒ素によるnecrosisには防御的に働くが、DMAs^vによるapoptosisには逆に誘導因子として働いている事も明らかにしてきた。今回我々はラットの肝細胞を用い、無機ヒ素によるnecrosis誘導とDMAs^vによるapoptosis誘導の分子機構をGSHを中心に詳細に検討し、慢性ヒ素中毒時の免疫毒性発現における細胞内GSHの役割を考察したので報告する。¹⁻⁷⁾

【方法】

ラット正常培養肝細胞TRL 1215は米国国立癌研究所のMichael P. Waalkes博士より供与された。無機ヒ素 (亜ヒ酸; arsenite) 及びDMAs^vは市販されているものを2回再結晶処理をしてから用いた。細胞毒性はAlamarBlue法により測定した。細胞内caspase 3の活性化は市販のキットを用いて解析した。細胞内ラジカル反応はelectronic spin resonance (ESR) により解析した。

【結果】

TRL1215細胞におけるarseniteの48時間培養におけるLC₅₀値は35 μMで、誘導された細胞死の大部分がnecrosisであった。それに対しDMAs^vの細胞毒性は弱く、LC₅₀値は4.5 mMであり、誘導された細胞死は100% apoptosisであった。Arseniteは濃度依存的にTRL1215細胞からの炎症性サイトカインであるinterleukin 1 (IL-1) の産生放出を増大させたが、DMAs^vは逆に抑制した。この結

果は、無機ヒ素が肝細胞に対し μMレベルで強い細胞毒性を示し、necrosisを引き起こして生体を炎症に導くのに対し、無機ヒ素が哺乳動物の体内でメチル化を受けた代謝産物であるDMAs^vは、これらの細胞に対する毒性が非常に弱く、mMレベルで細胞死を誘導するが、それは炎症を伴わないapoptosisであり、従ってヒ素のメチル化代謝は生体を無機ヒ素による炎症反応の誘起から護る正の代謝反応である事を推測させた。Arseniteの細胞毒性は各種細胞内GSH潤滑剤の添加で増大した。これに対しDMAs^vによるapoptosisは、細胞内GSH潤滑剤や、細胞内でGSHと基質を結合させる酵素であるglutathione S-transferase (GST) に対する阻害剤の添加で阻害された。低濃度のGSH潤滑剤処理で細胞内GSH濃度を維持しながらGSHの新合成だけを止めた状態の細胞にDMAs^vを添加したところ、apoptosisが誘導される前に細胞内GSHの消失が認められた。細胞にDMAs^vとGSHを同時に添加した場合、これらは細胞外で容易に結合する事が分析化学的及び生化学的手法により証明されたが、この結合体は分子量が大きすぎて細胞内には入る事ができなかった。また、DMAs^vによるapoptosisはGSH-DMA複合体代謝酵素阻害剤やラジカル消去剤の添加により部分的に阻害され、GSH-DMA複合体代謝酵素阻害剤とラジカル消去剤の同時添加でほぼ完全に阻害された。ESRによりDMAs^vがTRL1215細胞にapoptosisを起こし始める時にthiyl radical (RS[•]) が細胞内で発生する事が確認された。さらに、DMAs^vによるapoptosisは、apoptosisを直接起こす酵素であるcaspase 3に対する阻害剤の添加で完全に抑制され、caspase 3の上流に位置するcaspase 8、及びcaspase 9に対する阻害剤の添加で部分的に抑制された。また、細胞内caspase 3活性は、DMAs^vの添加後18時間

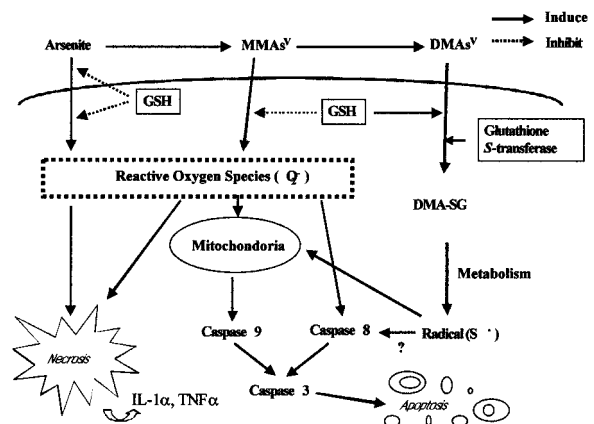


Fig. Molecular mechanisms of arsenicals-induced cytolethality

をピークに著しく上昇し、この上昇は細胞内GSH涸渇剤の添加により完全に抑制された。これらの実験結果より、DMAs^vによるapoptosisは、DMAs^vが細胞内に取り込まれて細胞内GSHと結合する事を起点とし、続いて生成したGSH-DMA複合体が細胞内で酵素的に代謝される過程で不安定なthiyl radical分子が生じ、それがcaspase cascadeを活性化して誘導されている事が推定された (Fig.)。この様なメカニズムでapoptosisを起す化学物質は、今のところDMAs^v以外には報告されていない。

【考 察】

無機ヒ素は免疫細胞や肝細胞に活性酸素の産生を介して主にnecrosisを誘導し、細胞内GSHはそれを防御している。一方で無機ヒ素のヒトでの最終代謝産物であるDMAs^vは、専らapoptosisのみを誘導し、それには細胞内に取り込まれた DMAs^vがGSHと結合する事が必須である。アジア地域の慢性ヒ素中毒患者に観られる炎症や癌の発症は、微量な無機ヒ素を長期間摂取した事により、生体の酸化還元反応などの恒常性のバランスが崩れて誘導されているものと推測される。そしてその鍵となるのが恐らく生体内のGSHである。実際に慢性ヒ素中毒患者の血液中GSH濃度は健康人に比べて低い事が報告されている。⁸⁾ 慢性ヒ素中毒により何らかの理由で生体内のGSH濃度が低下すると、猛毒である無機ヒ素の毒性や発癌性が高まり、さらに無機ヒ素の最終代謝産物であるDMAs^vによるapoptosis誘導も正常に働かなくなり、結果的にダメージを受けた異常な細胞が生き残ってしまうと考えられる。GSHは無機ヒ素のメチル化代謝における重要な補助因子でもあるので、GSHが不足すればヒ素のメチル化が上手く働かず、毒性の高い無機ヒ素が体内に貯留してしまう可能性もある。即ち、生体内GSHレベルが低下すると、それぞれのヒ素代謝産物がそれぞれ異なった毒性を示し、結果的に癌をはじめとする様々な慢性ヒ素中毒症状を発症させるのであろう。我々の最新の研究では、arseniteは細胞外濃度が μM レベルになると、リン酸transporterを通して細胞内に侵入し、細胞内濃度がnMに達すると活性酸素産生を介して細胞にnecrosisを誘導する事が明らかとなった。この時、細胞内GSH濃度が十分量 (mMレベル) 存在する場合は、GSTの働きでarseniteとGSHが結合すると共にarseniteは酵素的なメチル化代謝を受けDMAsに変換される。DMAsは細胞内に留まる事が出来ず、恐らくMRPファミリーやP-糖タンパク質などの薬物transporterを介して速やかに細胞外に排出される。一度細胞外に排出されたDMAsはもはや容易に細胞内へ入る事ができない。即ち、ヒ素のメチル化代

謝は猛毒な無機ヒ素を細胞外へ排出する為の解毒機構であるとも言える。しかし、何らかの理由でDMAs^vが細胞外に蓄積しその濃度がmMに達すると、DMAs^vは非能動的に細胞内にわずかに滲入し、nMの細胞内濃度でGSTを介してGSHと結合し、きれいなapoptosisを誘導する。この様に、ヒ素のメチル化代謝の真の意義と、それにおけるGSHの役割がようやく明らかになってきた。今後更に研究を進め、ヒ素の毒性発現機構と、それに対する生体側の防御機構をGSHを中心に解析し、例えばGSHを患者に投与するなどしてアジアの人々を慢性ヒ素中毒の脅威から救う事ができれば幸いである。更に、最近さかんに行われつつある、無機ヒ素の急性白血病治療への応用にも、我々の研究が、例えば抗白血病細胞作用の機序の解明や副作用の緩和などの面で役立つ事ができれば甚大である。

【謝 辞】

本研究をすすめるにあたり実験の補助に尽力頂きました稲沢浩子女史、落合将之氏、小島力氏、太田宇海氏をはじめとする本研究室の学生諸氏に心より感謝致します。また、毎年参加させて頂く免疫毒性学会において、企業の方々などの発表を聞く事により、私の研究も具体的にヒトの為に役立たなければならないという思いを強くしており、いろいろな意味で免疫毒性学会には感謝致しております。

文 献

- 1) Sakurai, T., Kaise, T., Matsubara, C.,
Chem. Res. Toxicol., 11, 73 - 283 (1998).
- 2) Sakurai, T.,
Biomed. Res. Trace Elements, 13, 167 - 176 (2002).
- 3) Sakurai, T., Qu, W., Sakurai, M.H., Waalkes, M.P.,
Chem. Res. Toxicol., 15, 629 - 637 (2002).
- 4) Qu, W., Bortner, C.D., Sakurai, T., Hobson, M.J., Waalkes, M.P.,
Carcinogenesis, 23, 151 - 159 (2002).
- 5) Sakurai, T.,
J. Health Sci., 49, 171 - 178 (2003).
- 6) Sakurai, T., Ochiai, M., Kojima, C., Ohta, T., Sakurai, M.H.,
Takada, N., Qu, W., Waalkes, M.P., Fujiwara, K.,
Toxicol. Appl. Pharmacol., in press.
- 7) Sakurai, T., Kojima, C., Ochiai, M., Ohta, T., Sakurai, M.H.,
Waalkes, M.P., Fujiwara, K.,

Toxicol. Appl. Pharmacol., in press.

- 8) Pi, J., Kumagai, Y., Sun, G., Yamauchi, H., Yoshida, T., Iso, H.,
Endo, A., Yu, L., Yuki, K., Miyauchi, T., Shimojo, N.,
Free Radic.Biol.Med., 28, 1137 - 1142 (2000).

奨励賞

経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル

新藤智子¹、金澤由基子¹、斎藤義明¹、
臼見憲司¹、小島幸一¹、手島玲子²

¹食品薬品安全センター 秦野研究所、
²国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部

【はじめに】

遺伝子組換え食品の安全性の評価においては、導入された組換え蛋白質のアレルギー惹起性の有無を調べる事が重要である。我々は、動物を用いたアレルギー性の評価試験系を確立することを目的として、経口投与による感作の成立および経口惹起によるアレルギー症状の発現を満たす食物アレルギーモデルの開発を試みた。はじめに、ヒトの食物アレルギーにおける即時型のアレルギー症状を増悪させる可能性のある因子を、臨床報告の中から検索した。ついで、オブアルブミン(OVA)を抗原とした経口投与の系に候補となる因子を併用投与し、抗体価を指標としてアレルギー発症への影響をスクリーニングした。その結果、食餌成分のリノール酸や鎮痛剤に使用されるサリチル酸化合物の併用が抗体価の上昇に影響していることが推察された。そこで、OVAを抗原としてリノール酸やサリチル酸化合物の併用による経口感作および経口惹起の成立条件の検討を行った。さらに、経口および静脈内惹起時の消化管を中心とした反応性の比較を行い、作製したモデルマウスの性質を調べた。

【方法】

7週齢の雌性BALB/cマウスにOVAを1mg/匹の割合で5回/週、3週間経口投与して感作した。感作には、生理食塩液溶媒対照群(S)、生理食塩液を溶媒としたOVA群(OVA/S)、リノール酸/レシチン(4:1)混合液溶媒対照群(LL)、リノール酸/レシチン混合液を溶媒とした

OVA群(OVA/LL)を設定した。また、OVA/LL群の一部には2回/週の頻度でサリチル酸ナトリウム(2mg/匹)を腹腔内投与した群(SA/OVA/LL)を設定した。

感作投与開始の3週間後に各群6匹について血清中の抗OVA抗体価を測定した。また、各群17~20匹について、それぞれの群の感作時と同様の溶媒を用いて調製したOVAを100mg/匹の割合で経口投与して惹起し、全身性アナフィラキシー症状の観察を、さらに各群6匹について血漿中ヒスタミン濃度の測定を行った。全身性アナフィラキシー症状は、無症状を0、立毛や鼻こすりを1、吐き気を2、努力呼吸やチアノーゼを3、死亡(24時間以内)を4としてスコアをつけて、発症の頻度と強度を評価した。

前日にOVAの経口投与によって感作の成立を確認した動物を用いて、以下の実験を行った。LL群、OVA/LL群、SA/OVA/LL群の各群(n=6)の1組は経口、もう1組は静脈内投与により再惹起して全身性アナフィラキシー症状の観察および血漿中ヒスタミン濃度の測定を行った。また、再惹起を行わないLL群、OVA/LL群、SA/OVA/LL群を対照として、再惹起後の各群の消化管について、肉眼的観察および組織学的検索を行って変化を調べた。

【結果】

3週間の感作投与後にS群、OVA/S群、LL群では全く抗OVA IgG 1抗体価が認められなかったのに対して、OVA/LL群(12 ± 49)およびSA/OVA/LL群(47 ± 39, p<0.05 vs LL群)においては抗OVA IgG 1抗体価の上昇が認められた。経口惹起を行った結果(図1)、OVA/S群やOVA/LL群に弱い全身性アナフィラキシー症状である鼻こすりや立毛が認められ、OVA/LL群では2つの症状を併発する個体数が増加した。一方、

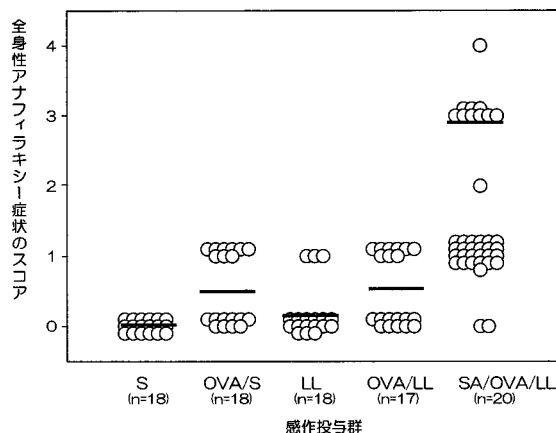


図1 経口感作および経口惹起によって発現した全身性アナフィラキシー症状

SA/OVA/LL群には明らかに強い全身性アナフィラキシー症状であるチアノーゼや努力呼吸が認められ、そのうち1例は死亡した。また、半数の個体が2～4つの症状を併発し、症状の認められなかった個体は20例中2例であった。経口惹起30分後においてS群、OVA/S群、LL群では血漿中へのヒスタミンの放出は認められなかったのに対して(0.5～11.4 ng/mL)、OVA/LL群(0.5～449 ng/mL)およびSA/OVA/LL群(3.3～953 ng/mL)に放出量の多い個体が認められた。

感作の成立を確認した動物を用いて異なる2経路で再惹起した結果(図2)、OVA/LL群およびSA/OVA/LL群において、静脈内惹起に比べて経口惹起で全身性アナフィラキシー症状の頻度および強度とも高かった。また、血漿中へのヒスタミンの放出量も静脈内惹起に比べて経口惹起で高い傾向にあった(表)。

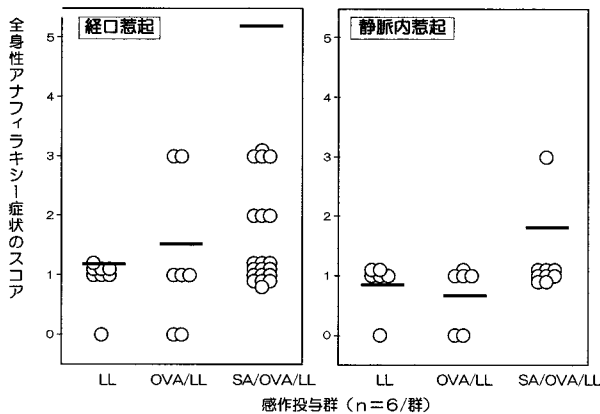


図2 全身性アナフィラキシー症状の発現における経口惹起と静脈内惹起の比較

表 惹起経路が血漿中へのヒスタミン放出へ与える影響

惹起経路	血漿中ヒスタミン濃度 (ng/mL)		
	LL	OVA/LL	SA/OVA/LL
経口惹起	3.2～14.0	3.9～1092	4.0～326
静脈内惹起	1.9～29.2	6.0～30.0	4.0～244

再惹起後の消化管の変化を調べたところ、肉眼的観察では血管の明瞭化、腔の拡張といった所見が認められた。また、小腸の病理学的観察では絨毛の短縮、粘膜固有層における形質細胞やリンパ球の増加、粘膜固有層の毛細血管の拡張といった所見が認められたが、いずれも軽度の所見であった。これらの所見は惹起を行わない対照の組ではいずれの群にも認められなかった。肉眼的観察においては、経口惹起後の所見数がLL群2件、OVA/LL群5件、SA/OVA/LL群4件であったのに対して、静脈内惹起後の所見数はLL群0件、OVA/LL群0件、SA/OVA/LL群3件であった。

【考察】

食物アレルギーの動物モデルにおいて経口投与によって感作を成立させること、経口惹起によってアレルギー反応を誘導することは、モデルでの反応をヒトへ外挿する上で重要である。蛋白質抗原の通常の溶媒である生理食塩液に対して、リノール酸とレシチンの混合液を媒体として抗原を経口投与することによって、OVA/LL群に示されたように特異抗体価の上昇、血漿中へのヒスタミン放出および消化管の変化を伴う全身性アナフィラキシー症状を発現させることが可能となった。さらに、経口感作時にサリチル酸を併用したSA/OVA/LL群では反応が増強され、特に全身性アナフィラキシー症状においてはチアノーゼや努力呼吸、そして死亡といった重篤な症状を示した。これらのことから、SA/OVA/LL群は食物アレルギーモデルとなり得ると考えられた。

しかし、即時型アレルギー反応において重要な働きをする抗OVA IgE抗体価はELISAにおいてもPCA反応においても認められなかった。全身性アナフィラキシー反応はIgEノックアウトマウスにおいても認められることから、本モデルはIgEの関与しない反応である可能性が考えられた。一方、感作期間が3週間であることからIgE産生量自体が少ない可能性、感作投与後半に数例の動物の死亡が認められたことから感作期間中にIgEが消費されている可能性等も考えられた。また、LL群において若干の全身性アナフィラキシー症状が認められたが、これは使用した卵黄由来レシチンに混入しているOVAを含めた蛋白質に起因しているものと考えられた。

一般的な動物試験における全身症状の発症は、静脈内に原因物質を投与した場合、最も強い反応が現れる。ASA試験の陽性反応を得るためのプロトコールでも、惹起時には抗原を静脈内投与し、全身性アナフィラキシー症状を観察する。これに反して、本モデル系では静脈内惹起に比べて、経口惹起での血清中へのヒスタミンの放出を伴う全身性アナフィラキシー症状の頻度および強度が明らかに高かった。また、惹起によって発現する消化管の所見も静脈内惹起に比べて、経口惹起で増加した。これらのことから、本モデル系では惹起による全身性アナフィラキシー症状の発現への消化管の関与が考えられた。

【まとめ】

動物を用いたアレルギー性の評価試験系を確立することを目的として、経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデルを検討した。サリチル酸の併用下、リノール酸とレシチンの混合液を溶媒として経口感

作および経口惹起を行う本試験系では全身性アナフィラキシー症状の発現とそれに伴う消化管の変化が認められたことから、即時型の反応を示す食物アレルギーモデルとして利用できることが示唆された。

国際学会情報

10th International Congress of Toxicology

11-15 July, 2004; Tampere, Finland

Abstract deadline: February 15, 2004

<http://www.ictx.org/>

12th International Congress of Immunology

18-23 July, 2004; Montréal, Canada

Abstract deadline: January 23, 2004

<http://www.immuno2004.org>

ポスドク募集

独立行政法人国立環境研究所環境健康研究領域分子細胞毒性研究室（室長 野原恵子）では免疫毒性に興味があり分子生物学的手法の技術を持っているポスドク1名を募集しております。詳しくは、野原（keikon@nies.go.jp）までお問い合わせください。

編集後記

本号は免疫毒性研究10年の記念号として第10回日本免疫毒性学会学術大会の特別講演、記念シンポジウムでご講演いただいた先生方に講演では話さなかったこと、その後の新たな情報などを含めてご投稿いただいたものを掲載しました。ImmunoTox Letterもより有益な情報を発信するため会員の皆様からの積極的なご提案を歓迎したいと考えております。良いお年をお迎えください

(HF記)

編集・発行：日本免疫毒性学会

発行日：平成15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

