

ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会：The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 9 No. 1 (通巻17号) 2004

目次

ICH トピックS8	1
塩野義製薬株式会社 中村和司	
第11回日本免疫毒性学会学術大会(予告2) ...	1
医薬品開発における抗原性試験実施の留意点 ...	3
ヤンセン ファーマ株式会社 研究開発本部 牧 栄二	
一般人集団に適応する免疫指標を用いた環境リスク検出の試み	5
旭川医科大学健康科学講座 吉田貴彦	
「Immunotoxicology」最前線	7
Asbestosによるリンパ球細胞死の検討	
川崎医科大学衛生学 大槻剛巳、三浦由恵 高田晶子、兵藤文則	
マクロファージの接着と異物認識機構	9
独立行政法人国立環境研究所環境健康研究領域 平野靖史郎	
「免疫毒性試験プロトコール」第7回	11
LLNA-DA	
ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター 山下邦彦、出原賢治	

ICHトピックS8

中村 和司 (塩野義製薬株式会社)

2003年11月のICH*運営委員会会議において免疫毒性試験が新規トピックS8として正式に承認され、医薬品の免疫毒性試験に関する日米欧の統一ガイドラインが作成されることになった。

今回、免疫毒性試験が新規トピックS8として承認された理由として、第1回医薬品の免疫毒性試験の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(以下、ICH免疫毒性調査)の結果をもとにICHガイドライン作成に目処がついたことがあげられる。第1回ICH免疫毒性調査の結果を解析するための専門家会議は2003年10月に開かれ、寄せられた化合物データについて一般毒

第11回日本免疫毒性学会学術大会(予告2)

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

共催：日本衛生学会、日本微量元素学会、
日本薬学会 福井産業保健推進センター

協賛：日本トキシコロジー学会、日本毒性病理学会

後援：福井市、福井県、福井県医師会

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

シンポジウム

「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」

ワークショップ

「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

「動物感作モデルの分子生物学」

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：口頭発表のみ、口頭発表は一演題当たり
発表時間10分、討論時間5分、
液晶プロジェクター1台準備します。

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/

事前登録参加申込締切：8月20日(金)

会員5,000円、非会員8,000円(当日各2,000円増)

懇親会：9月10日(金) 18:00~20:00

日本で唯一のハーブ産地である、福井県青山
ハーブの演奏がアトラクティブです。

事前会費 5,000円(当日8,000円)

会員に応募要綱を郵送しています。そこに同封している郵便振替用紙を用いて下さい。

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

(発表申し込みや事前登録申し込みなど、こちらでも扱っています。)

性試験と免疫機能検査の結果を比較し5つのカテゴリーに分類した (Table 1)。その際、細胞傷害性の抗がん剤とサイトカインを除き、また情報の不足している化合物はカテゴリーEとした。そして、全45化合物のうち残り28化合物をカテゴリーA～Dに分類した。最も重要と思われるカテゴリーCには3化合物が分類された。ただし、そのうち少なくとも2化合物については免疫機能検査の結果には疑問が持たれた。カテゴリーCに分類された化合物の数が少ないという結果をもとに、免疫毒性の懸念される開発化合物について免疫機能検査を行うという方向性が示された。なお、現在は第1回ICH免疫毒性調査の調査票の内容を充実したうえで、さらにデータ数を増やすことを目的とした第2回ICH免疫毒性調査を実施しており、調査票が2004年2月から3月にかけて各製薬企業に配布されている。2004年11月までには本調査の最終結論を出しICHガイドライン作成の基礎データとしたいと考えている。

免疫毒性試験が新規トピックS8として承認されたのを受け、ICH免疫毒性専門家部会が編成された。現在、同部会ではStandardization of AssaysとTriggers for Immune Function Testingのサブグループを設け、ICHガイドラインの作成に向けた議論を行っている。Standardization of Assaysのサブグループでは、何らかの形でICHガイド

ラインに盛り込まれると考えられるT細胞依存性抗原に対する特異抗体産生能の測定法、フローサイトメトリー、NK細胞活性の測定法などについて、時には外部からの専門家も交えながら検討を加えている。またTriggers for Immune Function Testingのサブグループでは、どのような場合に免疫機能検査が必要かについて議論が続いている。全ての化合物について免疫機能検査を行う場合には問題とならないが、一般毒性試験の結果などをもとに免疫機能検査を行う場合は申請段階で行政当局と免疫毒性試験実施の必要性に対する見解が異なってくることも考えられる。特に申請前に行政当局との相談を持つ機会の少ない欧州や日本では問題になってくる。このことを避けるためできるだけ詳しくTriggers for Immune Function Testingを規定しておく必要があるように思われる。これらサブグループでの議論をもとに、ワーキンググループとしての最終的な結論を出したいと考えている。

本ICHトピックにおいては、2004年11月にStep 2 (ガイドライン案作成) そして2005年11月にはStep 4 (最終ガイドライン作成) へと進む予定となっている。

*ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

Category	Finding		Compound	Total Number
	Std Tox	Imtx		
A	+	+	E2, E16 J4*, J13**, J18, J19, J23-24 U2-1&2, U3, U4, U5-1&2, U8-10	12
B	-	-	E3, E14 J3, J5, J8, J7, J11 U1-1&2, U7-9*	9
C	-	+	E6*, E15* J14	3
D	+	-	J1, J2, J12 U6	4
E	Inadequate Imtx data		E1, E4, E5, E7, E8, E9, E12-13 J10, J16, J25-26	10
-	Cytokines and Cytotoxic antineoplastic		E10***, E11*** J6, J9*, J15-22, J17, J20-21	7
Std Tox: Standard toxicology endpoints (organ weights, histopathology and hematology) Imtx: Immunotoxicology endpoints (T cell-dependent antibody response and immunophenotyping) *Incomplete evidence **Close call, slight changes in flow cytometry and hematology ***Cytokines				

Table 1 ICH Immunotoxicology Database:
Comparison of Standard Toxicity Study and Immunotoxicity Assay Endpoints

医薬品開発における抗原性試験実施の留意点

牧 栄二 (ヤンセン ファーマ株式会社 研究開発本部)

医薬品開発における安全性の検討項目の一つである抗原性は、1999年4月8日付医薬発第481号通知「医薬品の承認申請について」において、承認申請書に添付すべき資料から削除された。しかし、同日付の医薬審第666号通知「医薬品の承認申請に際し留意すべき事項について」においては、抗原性は「ニ-7 その他の毒性」に含まれることが明記されており、開発医薬品の抗原性の評価は従来通り必要とされている。

新薬承認申請に抗原性のデータが必須であるか否かの詮議はさておき、何故新薬の抗原性を検討しなければならないかを考えることにより、その必要性についての回答が得られると考える。即ち、一般合成医薬品はヒトにとっては異物であり、再投与されることにより薬物アレルギーを惹き起こす可能性を秘めている。一旦獲得された薬物アレルギーは生体に記憶され、生涯消されることはない。従って、全ての医薬品に対して抗原性を検討することが望まれる。因みに、海外において取下げられた上市品の原因の中で最も頻度の高い副作用は全身性過敏症で、その副作用の占める割合は全体の15%と高い頻度を示している^{1,2)}。現在使用されている抗原性の検出試験としては、外用剤については予知性の高いモルモットのMaximization試験ならびにマウス局所リンパ節試験(Local Lymph Node Assay)があるが、全身投与を目的とした医薬品については一般にモルモットのActive Systemic Anaphylaxis (ASA)およびPassive Cutaneous Anaphylaxis (PCA)試験が使用されている。しかしながら、全身投与を目的とした後者の試験は高分子医薬品の抗原性の検出には適しているが、低分子医薬品の抗原性の検出には次の理由により適していない。即ち、その低分子医薬品が感作能を有していたとしても、一般に低分子医薬品の場合その分子上に抗原決定基は複数存在しないため、感作動物に当該低分子医薬品を再投与しても特異抗体との結合は起きるが、それ以後の補体の活性化を含む一連の反応は発現せず、高分子医薬品で見られる特異的なアナフィラキシー反応は誘発されない。従って、低分子医薬品の場合、高分子医薬品と同じ操作を行ってもその抗原性(感作能および反応惹起能)を検出することは甚だ難しい。

諸外国でも、低分子医薬品に対しては適切な試験法がないということから、抗原性の検討は原則として要求していない。本邦においても、このような現況から、上述のごとく安全性の検討項目から抗原性が削除され、「そ

の他の毒性」に移され、必要に応じて実施する検討項目に位置付けられた。しかしながら、モルモットの試験も、低分子医薬品を投与した動物の感作リンパ球をin vitroにて同一薬物と共に培養し、³H-thymidineの取り込みを無処置リンパ球の取り込みと比較することにより、その医薬品が感作能を有しているか否かを予知することは出来る³⁾(Fig. 1参照)。

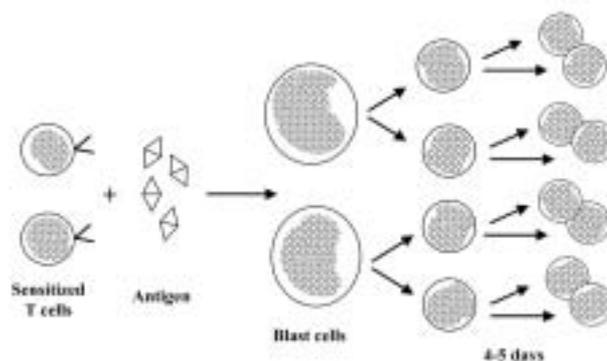


Fig. 1 Memory Lymphocyte Immuno-Stimulation Assay (MELISA) (Stejskal, 1997)

海外においては、全身的に投与された医薬品によるアレルギーあるいは自己免疫反応を検出する試験系としてマウス膝下リンパ節試験(PLNA)⁴⁻¹⁰⁾が報告されており、開発医薬品の抗原性試験に応用されている¹¹⁻¹⁴⁾(Table 1)。

Table 1 Local lymph node assay (LLNA)とPopliteal lymph node assay (PLNA)の違い

1. LLNA(皮膚感作性試験GPMTの代替法;細胞性免疫検出系):マウスの耳介に溶媒に溶解した薬剤を3日間連続塗布→24~72時間後に³H-thymidineを静注→5時間後局所リンパ節の³H-thymidineの取込みを測定
2. PLNA:薬剤を皮下投与し、膝下リンパ節のリンパ球増殖を測定
3. 薬剤投与経路による違い
 - 1) LLNA(塗布):Th1(細胞性免疫)優位の反応が発現(塗布薬剤はランゲルハンス細胞(Th1誘導サイトカインIL-12放出)に取り込まれやすい)
 - 2) PLNA(皮下):Th2(液性免疫)優位の反応が発現

本邦においても、日本製薬工業協会の共同研究により、臨床で薬物アレルギーの誘発が知られている医薬品を用い、PLNA反応との相関性が検討された。その結果、明確にPLNA反応との相関性が証明されたことから、PLNAは低分子医薬品の抗原性の予知に応用できることが確認され¹³⁻¹⁷⁾、低分子医薬品の抗原性の予知に利用可能と考えられた(Table 2-4)。しかし、PLNAと云えども万能な試験系ではなく、幾つかの留意点(皮膚刺激性を

有する濃度では擬陽性を示すが、刺激反応と免疫反応の区別は2次応答反応の有無で確認可能であること(Fig. 2参照)および代謝物が抗原性の本体である場合、代謝物を使用する必要があること)があるが、十分にその留意点を理解した上で用いれば利用価値のある試験と考えられる。PLNAは、モルモット試験のように症状観察で評価する試験ではないため、どの程度強い薬物アレルギー反応が誘発されるのかは予測できないが、その医薬品の抗

Table 2 マウス膝窩リンパ節試験(PLNA)について

- 1) PLNAの反応はCD4陽性T細胞に依存する反応
 - 2) 薬剤が自己蛋白あるいは抗原提示細胞の表面蛋白を修飾し、これがCD4陽性T細胞の活性化の引き金
 - T細胞欠損マウスによる実験
 - Adoptive transfer PLNAによる実験
 - 3) B細胞の活性化・増殖が複数の薬剤投与で確認
 - フローサイトメトリー解析: B細胞比率の増加
- 結論: PLNAは低分子化合物の抗原性ならびに自己免疫性を検討する試験として有用

Table 3 Relationship between PLN response and clinical adverse event (1)

Test substance	Dose (mg/site)	PLN cellularity index	Human data
Allergenic			
Cephalothin	5	2.9±0.45**	+
Penicillin G	5	3.9±0.45**	+
Antibiotic-Z	5	4.7±0.79**	+
Antibiotic-C	5	5.2±1.06**	+
Ampicillin	5	2.3±0.45**	+
Carbenicillin	5	3.0±1.05**	+
Cefazolin	5	1.8±0.34**	+
Cefotaxime	5	2.6±0.87**	+
Streptomycin	2	2.2±0.75**	+
Aminoantipyrine	2	2.2±0.13**	+
Chlorhexidine	0.2	3.8±1.44**	+
Sulfamethoxazole	2	3.1±1.15**	+

** : p<0.01 vs. Vehicle control (Mann-Whitney U-test), Mouse: AJJ (female) (JPMA collaboration study, 1999)

Table 4 Relationship between PLN response and clinical adverse event (2)

Test substance	Dose (mg/site)	PLN cellularity index	Human data
Autoimmunogenic			
Hydralazine	1	3.0±0.37**	+
Streptozotocin	1	2.8±0.57**	+
D-penicillamine	1	3.6±0.62**	+
Chlorpromazine	0.5	3.8±1.07**	+
Others			
Barbital	2	1.2±0.40	-
Levamisole	1	1.2±0.31	-
Vehicle			
Saline	0.05 ml/site	1.0±0.16	-
50% DMSO	0.05 ml/site	1.3±0.38	ND

** : p<0.01 vs. Vehicle control (Mann-Whitney U-test), Mouse: AJJ (female) (JPMA collaboration study, 1999)

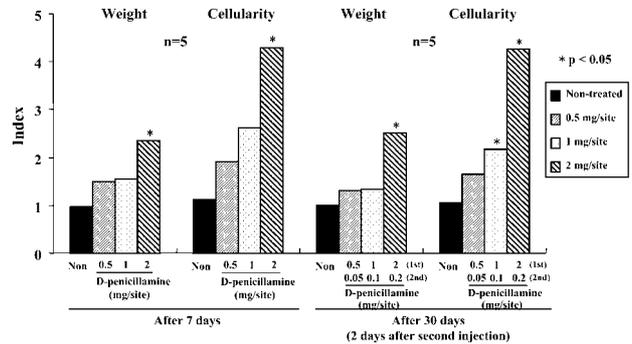


Fig. 2 Weight and Cellularity Indexes in the 1st and 2nd responses of PLN of BALB/c mice

原性(感作能)あるいは自己免疫性の有無の予知は可能である。

抗原性試験に関しては準拠すべきガイドラインがないことから、それぞれの企業が自主的に適切な試験方法を選択し、開発医薬品の抗原性を検討することが出来る。この点については、医薬品研究(2003)の「毒性Q&A」に同様の記載があり、更に、既に諸外国で十分な臨床経験のある医薬品の場合、その薬物アレルギーに関する情報は有用な抗原性の評価資料になり、PLNAといった新しい試験方法の成績、すべての安全性試験データや臨床試験データ、類薬情報から総合的に判断し、ヒトにおいて重篤な薬物アレルギーを未然に防止することを勧めている¹⁸⁾。

従って、高分子医薬品については、従来通りモルモットを使用した抗原性試験を実施すればよいが、低分子医薬品については、被験医薬品投与モルモットのリンパ球幼若化試験やPLNAを実施し、陽性反応を示す成績が得られた場合は、被験医薬品の他剤との交叉性ならびに薬剤起因性自己免疫疾患の発現の可能性を考慮して臨床試験を実施することが必要であると考えられる。

[文献]

- 1) deWeck AL: Immunopathological mechanisms and clinical aspects of allergic reactions to drugs, in deWeck AL, Bundgaard H (eds) (1983): Handbook of Experimental Pharmacology: Allergic Reactions to Drugs. New York: Springer-Verlag, pp 75-133
- 2) Guzzie PJ (1995): Immunotoxicology in pharmaceutical development. In Gad SC (ed): Safety Assessment for Pharmaceuticals. New York: Wiley, pp 325-385
- 3) Stejskal VDM (1997): Human hapten-specific lymphocytes: Biomarkers of allergy in man. Drug Information Journal, 31: 1379-1382
- 4) Albers R et al. (1997): Suitability of the popliteal lymph

- node assay as a predictive immunotoxicological test. Drug Information Journal 31: 1337-1340
- 5) Hurtenbach U et al. (1987): Immunity to D-penicillamine: genetic, cellular, and chemical requirements for induction of popliteal lymph node enlargement in the mouse. J Immunol 139(2): 411-416
- 6) Kammuller ME et al. (1989): The popliteal lymph node assay in mice to screen for the immune disregulating potential of chemicals--a preliminary study. Int J Immunopharmacol 11(3): 293-300
- 7) Patriarca C et al. (1994): Comparison of popliteal lymph node responses in various strains of rats. Hum Exp Toxicol 13(7): 455-460
- 8) Bloksma N et al. (1995): Predictive immunotoxicological test systems: Suitability of the popliteal lymph node assay in mice and rats. Crit Rev Toxicol 25(5): 369-396
- 9) Goebel C et al. (1996): The popliteal lymph node assay in mice: Screening of drugs and other chemicals for immunotoxic hazard. Inflamm Res 45 (Suppl 2): S85-S9
- 10) Pieters R et al. (2002): Predictive testing for autoimmunity. Toxicol Lett 127(1-3):83-91
- 11) Pieters R (2001) : The popliteal lymph node assay: A tool for predicting drug allergies. Toxicology 158(1-2):65-69
- 12) Gutting BW et al. (2002): Investigating the TNP-OVA and direct popliteal lymph node assays for the detection of immunostimulation by drugs associated with anaphylaxis in humans. J Appl Toxicol 22(3): 177-183
- 13) Gutting BW et al. (2002): Diclofenac activates T cells in the direct popliteal lymph node assay and selectively induces IgG₁ and IgE against co-injected TNP-OVA. Toxicol Lett 131(3): 167-180
- 14) Gutting BW et al. (2002) : BALB/c mice orally pretreated with diclofenac have augmented and accelerated PLNA responses to diclofenac. Toxicology 172(3): 217-230
- 15) Aida T et al. (1998): Evaluation of allergenic potential of low-molecular compounds by mouse popliteal lymph node assay. J Toxicol Sci 23(5): 425-432
- 16) Shinkai K et al. (1999): Mouse popliteal lymph node assay for assessment of allergic and autoimmunity-inducing potentials of low-molecular-weight drugs. J Toxicol Sci 24(2): 95-102
- 17) Suda A et al. (2000): Differentiation of responses to

allergenic and irritant compounds in mouse popliteal lymph node assay. J Toxicol Sci 25(2): 131-136

- 18) 医薬品医療機器審査センター (2003) : 毒性Q&A . 医薬品研究, 34(11): 753-755

一般人集団に適應する免疫指標を用いた環境リスク検出の試み

吉田 貴彦 (旭川医科大学健康科学講座)

1. はじめに

1960、70年代の高度成長期には、公害対策の法体系の未整備など環境保全対策が不十分であったために全国的な環境の高濃度汚染が社会問題化していた。しかし、その後の環境保全対策の進展と環境汚染物質排出の抑制技術の発展とによって、我が国の古典的な環境汚染物質は劇的に低減され、かつての典型的な公害の発生はほぼ見られなくなった。その一方で、科学技術の進歩にともなって膨大な数の化学物質が開発・合成され使用されるに至り、それらによる環境汚染が世界的な広がりを見せている。その汚染物質の種類は膨大であり、空気や飲食物を介して長期間にわたって我々の体内に複合的に負荷・蓄積された後に生体影響を発現し我々の健康を害している。1990年代から微量の環境汚染化学物質による内分泌攪乱の問題が特に注目され、2000年代には同じく微量の室内空気質汚染化学物質によるシックハウス症候群の問題が我が国でも社会問題化している事は、その良い例である。我が国では、従来行政的に環境汚染化学物質の動向調査がなされてきたが、測定対象化学物質の増加に対応することが困難になった事を受け、代表的かつ影響の大きい化学物質の環境測定を継続しつつ、住民の健康影響をスクリーニング的に調査することによって当該地域の環境リスクを総合的に検出しようとの試みがなされている。ヒト集団で起こる健康障害による症状等を疫学的に調査する意義は高いが、健康障害が現れるには長期間を経るために早期の対策立案にはつなげ難いうえに、後追的な感が拭えない。そこで、現時点でヒト集団に生じている症状発現に先立つ生体影響を検出することをもって環境リスクを検出することに主眼が置かれる。

2. 免疫指標の意義

神経 - 内分泌 - 免疫系は互いに影響しあいながら生体恒常性維持において重要な役割を担っている。このうち免疫系は多くの免疫担当細胞群と液性因子類が相互に関

連する複雑なネットワークを形成している事に加え、神経系および内分泌系の間接的な制御を受ける事により大きな枠組みの中で生体防御の主要な役割を担っている。こうした複雑系であるが故に免疫応答システムは環境有害因子の影響を受けやすく、免疫系の機能である免疫応答などの指標は感度の良いバイオマーカーとなりうると考えられている。ここに免疫系を標的臓器として捉えて有害因子による負の生体影響（毒性）を評価する免疫毒性学の意義があると言えよう。免疫系に対して環境有害因子が作用した場合に、その生体影響として免疫応答の抑制による易感染性や腫瘍発生の増加、逆に亢進による自己免疫疾患やアレルギー関連疾患の増加などがヒト集団に生ずる可能性があり、公衆衛生上大きな問題となる。そのため、ヒト集団における健康障害の発生が顕在化する前に、免疫指標をバイオマーカーとして集団の健康度を測定し環境リスクを検出することは、環境保全対策の策定につなげられ国民の健康の保持増進を図る上で有用である。

3. 小児集団での検討

筆者らは1998年に厚生省委託研究を受けて、環境リスクを検出する事が可能なバイオマーカーとして用いることの出来る免疫学的検索法の確立に取り組んだ。動物実験を中心に行った委託研究の検討の結果から選択した免疫指標をさらに絞り込み、健常なヒトから比較的容易に得られる検体で実施可能、かつ全国展開のために簡易で検体の運搬・保存が可能な検索法を選んだ。この過程で、環境リスク検出感度が良いながら培養を要する検索法は除外した。その結果、選択した免疫指標は、末梢血から分離・抽出される血清およびmRNAを検体として測定可能な項目である。また、均一集団が得られ、かつスクリーニング調査を容易ならしめるために集団健康診断が実施される3歳児健康診断を受診した小児を対象に設定した。すなわち、総IgE抗体、3歳児健診までにはほぼ全員が予防接種を受けて抗体産生応答が誘導されて生産された抗麻疹IgG抗体、抗風疹IgG抗体、さらにはアレルギー特異的IgE抗体、免疫バランス制御にかかわるサイトカインであるIL-4およびIFN- γ のmRNA発現量を免疫指標として採用した。また、主観的な指標として、アレルギー関連症状の有無、アレルギー関連疾患の診断既往の有無を補足的に用いた。以下に、4年間にわたって行った調査研究の成果を示しながら、今後の展開について考察する。

対象者の居住地などの大きな地域別の検討では、北海道A市で関東圏のH市、Y市、T市に比して総IgE抗体価

が有意に低く、IFN- γ /IL-4 mRNA発現比はA市とT市が他市に比べて有意に低くY市が最も高かった。食餌性アレルギー特異的IgE抗体陽性者の率はA市にて少なく、T市で多いなどの地域的な差が存在する事がわかった。4年間の調査対象者全て（合計681名）をプールして解析を行ったところ、屋外環境要因の検討では、大規模な工場に近接して居住する者にアレルギー特異的IgE抗体および吸入性アレルギー特異的IgE抗体の陽性の者の割合が低い傾向があった。屋内環境要因の検討では、コンクリート造の家屋に居住する者が木造に居住する者に比して総IgE抗体価が高く、かつアレルギー特異的IgE陽性者の割合も多かった。逆に同居する喫煙者が居る方が総IgE抗体価が低値であった。抗風疹IgG抗体価は喫煙者数が多いほど高値となる傾向があった。以上のように免疫指標と環境要因の相関について従来の常識的説明と符合する項目もあれば、必ずしも合わない項目もあった。理論的な説明が付けられ難い原因として次のような事が考えられた。アレルギー症状を有する者が、改善を願う家族の努力によって原因アレルギーや免疫応答変容物質への曝露を回避した（寝室・居間でのカーペット使用の中止、布団からベッドへの変更、ペット飼育の中止、タバコ煙曝露の回避など）例が幾つか見出され、こうした行動変容が結果を攪乱した可能性が考えられた。そこで、健診受診時点での生活状況の調査に加えて過去の生活状況の調査も行ったが、状況毎の例数が少なくなり明確な解析は出来なかった。また、純系の実験動物を用いて単一の因子の曝露影響を観察する動物実験や、典型的症状を呈する臨床患者に対する検査結果などは、教科書的な理論で説明のつけられる場合が多いものの、フィールド調査での一般ヒト集団は様々な素因や生活習慣を背景に持つ個体から構成されるために、環境リスクの影響を受けて変動する免疫指標を集団として把握する場に教科書的に説明出来ることはむしろ稀であるかも知れない。逆に教科書的な変化が集団中に観察された場合には、相当程度の環境要因の作用が存在していると考えられるべきであろう。次いで、地域毎に免疫指標に大きな差異が認められた理由について考察すると、気候（温湿度など）の影響、自然植生に起因する環境アレルギー（花粉など）の影響、地域特性に起因する家屋要因（建築様式、建築部材、気密性、暖房・換気方式などと、室内アレルギーの発生母地など）が影響する部分が大きいと推測された。特定の環境要因（新築家屋居住、幹線道路近接居住、大規模工場近接居住、同居喫煙者、ペット飼育など）と関連すると考えられる免疫指標の変動について、地域毎の対象者のみに限定して解析すると関連性ありとして検出

される場合がある一方で、全調査ないし複数地域をプールして解析すると関連性が検出され難くなる事実は、上記の地域に関連する要因などの交絡要因の影響の大きさが反映していることを示すものであろう。従って、免疫指標を用いて環境リスクを検出する試みは大まかな地域毎に行うべきであって、その中で例数を蓄積して地域標準データを作成し、それからの偏移をもって環境リスクを検索するべきであろう。我々が取り組んできた一連の調査研究は、現時点では地域毎に解析するには例数がまだ不十分であり環境リスクの検出力に限界があるが、今後調査が継続され例数が蓄積されるならば、十分に環境リスクの検出が可能であろうと思われる。

4. あとがき

ヒト集団において環境リスクによって免疫系に影響が見出される事は国民の健康の維持・増進にとって大きな脅威であることから、様々なバイオマーカーが検討されている中であって免疫指標はその重要性が高いものと考えられる。今後、各地においてモニタリング的に免疫指標をバイオマーカーとして用いた環境リスク検出の事業が展開され、環境改善・保全の対策策定に用いられん事を願っている。

参考文献

厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業「生活環境汚染物質による小児での毒性評価のための免疫指標の開発に関する研究」平成13 - 平成15年度総合研究報告書 主任研究者 吉田貴彦

「Immunotoxicology」最前線

Asbestosによるリンパ球細胞死の検討

大槻剛巳，三浦由恵，高田晶子，兵藤文則

(川崎医科大学衛生学)

繊維状物質の中の、天然鉱物繊維にはアスベスト、セピオライト、ウォラストナイトなどがある¹⁾。石綿肺に合併する肺癌や悪性中皮腫の例を挙げるまでもなく、発がん性が問題となるが、それには物理学的性状(長さや表面など)と化学的性状や、OHラジカルの産生などが問題になるようである^{2,7)}。

一方、鉱物学的にはsiliconはSi: 珪素元素であり、silicaとはSiO₂: 珪酸である。生体影響として問題になるのは、

crystalline silica でありスレート剤等で広く使用されている。また、医療的に汎用されている silicone は合成ポリマーであり $[-SiR_2-O-]_n$ の化学式で表される。加えて、元素としての珪素は、土中等に広く分布しており、その曝露としての塵肺症の形成が、産業衛生・環境医学的にも問題となっているが、これらは、Na, Mg, Al, K, Ca, Feなどと結合した Silicate: 珪酸塩として存在している。

繊維状物質ということで前記した asbestos も silicate である。asbestosの中には、chrysotile, crocidolite, amosite などが種類として挙げられるが、それぞれ $3MgO \cdot 2SiO_2 \cdot H_2O$, $NaFe(SiO_3)_2 \cdot Fe_2SiO_4 \cdot H_2O$, $1.5MgO \cdot 5.5FeO \cdot 2SiO_2 \cdot H_2O$ という結合塩となっている⁸⁾。

我々の教室では、前 植木教授の頃より珪酸化合物の免疫影響を検討してきているわけであるが、それは塵肺症、中でも珪肺症に合併する自己免疫疾患の報告が古くよりなされており⁹⁻¹²⁾、成書にも記載されていることによる。ちなみに現在の本邦での衛生・公衆衛生関連の教科書にもその記載のあるものもあるし、症例報告としては、産業医学領域のみならず、現在でも学会等での報告が多く見られる。

実際にその発症機転を検討するにあたって、我々は asbestos fiberの国際標準品を南アフリカ連邦共和国国立産業衛生研究所より配布を受けて主に chrysotile-A, 同-Bを用いて、検討を進めている。またいわゆるsilicaについては、産業医科大学呼吸病態学 森本泰夫教授より Min-U-Silicaの標準品を分与されて使用させていただいている。

これらの検討について予め述べておくべき事項としては、教科書的、臨床的には、合併症としての免疫異常が生じるのはいわゆる珪肺症、遊離珪酸によって肺病変の起こる病態であり、一方、石綿(アスベスト)吸入によって惹起される病態は、石綿肺となり合併症としては、前述のごとく、肺癌であり悪性中皮腫であるという現実である。但し、我々は鉱物学的にもasbestosがそのコアの部分に SiO₂ を含む珪酸塩であることより、特にin vitroの実験系においてはasbestos fiber による免疫担当細胞の変化を検討することにより、珪酸による免疫異常惹起¹³⁻¹⁵⁾のモデルとして考察しようという立脚点において検討を進めてきた。最近では、同じfiberであってもchrysotile-Aと同-Bの影響の差異や、これらとMin-U-Silica との違いの検討にも研究を進展させつつあるところであるが、まだまだその端緒についてという状況である。

これらの検討のうち、臍帯血由来でHTLV-1ウイルスによって不死化した多クローン性T細胞株であるMT-2細胞¹⁶⁻¹⁷⁾へ、chrysotile-Aをin vitro曝露した際のapoptosis

の出現について紹介する。

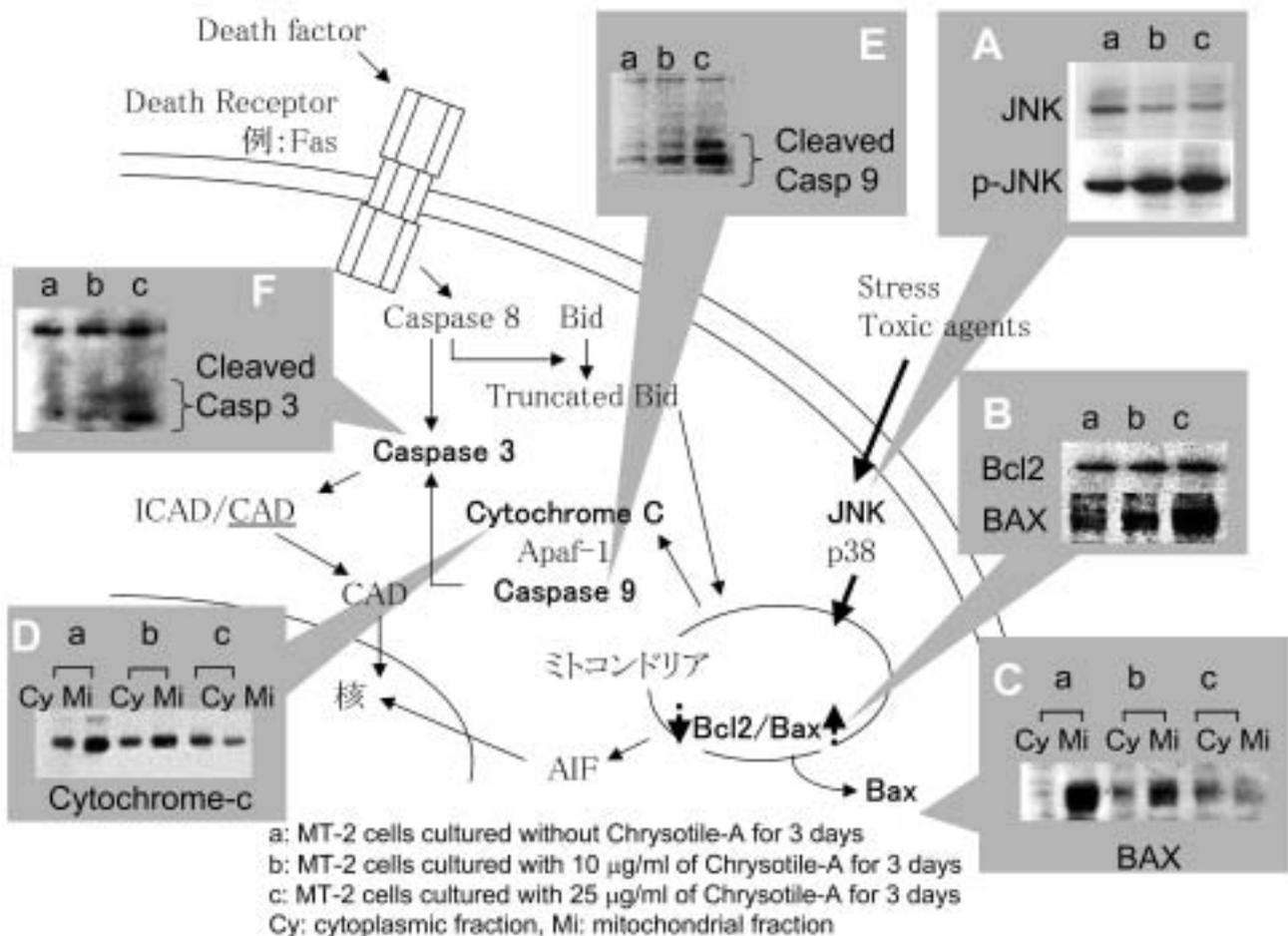
MT-2細胞を、0, 10 ならびに25 $\mu\text{g/ml}$ の Chrysotile-A と培養し、3日目に細胞を集め、whole cell lysate、もしくは細胞質とミトコンドリア画分から蛋白を抽出し、Western blotting法にて、apoptosisに関連する蛋白の変化を検討してみた。

図は、一般的なapoptosisの細胞内シグナル伝達機構を示し、Death factor (Fas ligand, Trail, TNF など)からのシグナルは、Death receptor (Fas, DR4, DR5, TNFR1 など)を介して、Caspase 8の活性化の後、Caspase 3の活性化を経て、DNA分断化を直接司るCADをICADから放つことにより、apoptosisを完成させる経路に繋がる。この経路からはBidのtruncation を介して、もう一方のミトコンドリア経路に繋がる副経路も存在している。また、ストレスや毒性物質による細胞障害では、MAPキナーゼ経路の中のJNKやp38のリン酸化による活性化がミトコンドリアへ伝わり、Bcl2/BAXで代表されるBcl2ファミリーのpro-とanti-apoptotic な分子のバランスをpro-

側優位に導き、例えばBaxなどはミトコンドリアから細胞質へのtranslocationが認められる。ミトコンドリアは、膜電位の低下により、膜表面のドアが開くことによってcytochrome cの細胞質への放出、Apaf-1のリクルートを介したCaspase 9の活性化を起こし、Caspase 3の活性化を惹起する。また、AIF分子により核へapoptosisのシグナルを伝える。

今回の検討で用いたMT-2に見られる変化としては、パネル(白抜き)Aでは、JNKの活性化、BではBAXの増加、CでのBAXのtranslocation、Dでのcytochrome cの細胞質への放出(C, Dのパネルでは、Cy: cytoplasmic ならびにMi: mitochondria画分でのバンドの濃さを対照されたい)、E, Fのパネルで見られるCaspase 9及び3の活性化が確認できた。なお、apoptosisの出現は同条件の細胞のTUNEL法による検出で確認した。

このようなapoptosisの経路が、実際の症例では長期慢性反復性曝露の結果、なんらかの破綻を来して、apoptosisが生じないようにとなると考えると、その



図の説明 アポトーシス・シグナルの伝達の略図とMT-2細胞をChrysotile-Aと培養した際に認められた変化の供覧。

Tリンパ球の中に、自己認識クローンが含まれていれば、将来的な自己免疫異常の惹起が見られる可能性がある。

但し、実際の症例ではFas経路の異常も生じており、一概にある分子の異常というだけでなく、複合的な破綻によって塵肺症での免疫異常が誘発されていると思われる、今後も精力的に解析を加えていかなければならないと考えているとともに、環境免疫学に携わる教室の一つとして、広範な視点にたった上で、今後も種々の検討を深めて行きたいと思う。

謝辞

平成15年度まで我々の教室の研究補助員であった坂口治子氏（現 本学組織培養免疫センター）のご協力に深甚なる謝意を表します。また現在の研究補助員である幡山圭代氏、畑田聡美氏に厚く御礼申し上げます。

文献

1. 神山宣彦．繊維状物質．労働衛生39: 695-697, 1998
2. Ohyama M, Otake T, Morinaga K. Effect of size of man-made and natural mineral fibers on chemiluminescent response in human monocyte-derived macrophages. *Environ Health Perspect* 109: 1033-8. 2001
3. Schneider T, Burdett G, Martinon L, Brochard P, Guillemin M, Teichert U, Draeger U. Ubiquitous fiber exposure in selected sampling sites in Europe. *Scand J Work Environ Health* 22: 274-84. 1996
4. Everitt JL. Mechanisms of fiber-induced diseases: implications for the safety evaluation of synthetic vitreous fibers. *Regul Toxicol Pharmacol* 20: S68-75. 1994
5. Maples KR, Johnson NF. Fiber-induced hydroxyl radical formation: correlation with mesothelioma induction in rats and humans. *Carcinogenesis* 13: 2035-9. 1992
6. Rom WN, Travis WD, Brody AR. Cellular and molecular basis of the asbestos-related diseases. *Am Rev Respir Dis* 143: 408-22. 1991
7. Talcott JA, Antman KH. Asbestos-related malignancy. *Curr Probl Cancer* 12: 135-78. 1988
8. 植木絢子．珪酸化合物のスーパー抗原活性．臨床免疫 29: 252-8. 1997
9. Iannello S, Camuto M, Cantarella S, Cavaleri A, Ferriero P, Leanza A, Milazzo P, Belfiore F. Rheumatoid syndrome associated with lung interstitial disorder in a dental technician exposed to ceramic

silica dust. A case report and critical literature review. *Clin Rheumatol* 21: 76-81. 2002

10. Stratta P, Canavese C, Messuerotti A, Fenoglio I, Fubini B. Silica and renal diseases: no longer a problem in the 21st century? *J Nephrol* 14: 228-47. 2001
11. Shanklin DR, Smalley DL. The immunopathology of silicosis. History, clinical presentation, and relation to silicosis and the chemistry of silicon and silicone. *Immunol Res* 18: 125-73. 1998
12. Uber CL, McReynolds RA. Immunotoxicology of silica. *Crit Rev Toxicol* 10: 303-19. 1982
13. Bartsch P, Salmon J, Mahieu P. Asbestosis and systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 61: 28-31. 1980
14. Toivanen A. Pulmonary asbestosis and autoimmunity. *Br Med J*. 1: 691-2. 1976
15. Greenberger PA. Immunologic aspects of lung diseases and cystic fibrosis. *JAMA* 278: 1924-30. 1997
16. Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K, Hinuma Y. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* 294: 770-1. 1981
17. Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Shiraishi Y. A T-cell line derived from normal human cord leukocytes by co-culturing with human leukemic T-cells. *Gann* 72: 978-81. 1981

マクロファージの接着と異物認識機構

平野 靖史郎

(独立行政法人国立環境研究所 環境健康研究領域)

マクロファージは単球由来の免疫細胞であり、分化する臓器の微少環境によりその機能と名称が異なる。脳ではグリア細胞、腎臓ではメサングウム細胞、肝臓ではクッパー細胞、骨では破骨細胞、皮膚ではランゲルハンス細胞といった具合である。国立環境研究所においては、粒子状物質を中心とする大気汚染の影響に関する研究が精力的に行われてきているが、肺に沈着した粒子状物質のクリアランスに重要な役割を果たしている肺胞マクロファージが研究の対象として取り上げられてきた。

では、肺胞マクロファージはどのようにして、肺胞領域に沈着した粒子状物質を認識するのであろうか。この問いに正しく答えるのは意外と難しい。なぜならば、オ

ブソニン化した粒子状物質、例えば抗体で処理した羊赤血球や補体で処理した粒子は、それぞれマクロファージの細胞膜表面に存在するFcレセプターやC3biレセプターにリガンドとして作用するため、貪食の最初の過程は蛋白間の相互作用 (Receptor-Ligand) による接着として理解される。一方、肺胞表面でマクロファージに貪食されるディーゼル排気粒子、タバコの粒子、シリカ/アスベストなどの無機物質、あるいは多環芳香族有機化合物で表面をコートされた炭素粒子などについては、マクロファージの細胞表面にこれらの粒子状物質のレセプターとなりうる分子があるとは考えにくい。

マクロファージが環境由来の粒子を認識する最初のステップは、粒子表面を異物として認識することである。肺胞マクロファージをディッシュに播種すると、非常に短時間の内にプラスチック表面に接着し、伸展することが観察される。この現象を、肺胞マクロファージが膨大な表面を持つプラスチックを細胞内に取り込もうとしている過程と捉えることも可能である。Oxford大学のSiamon Gordon教授らのグループは、マクロファージの非特異的接着を阻害する抗マクロファージ抗体をスクリーニングして、プラスチック表面を認識する2つのマクロファージのレセプターを同定した。一つはC3biレセプター(CR3)であり¹⁾、他方はスカベンジャーレセプター(Sc.R)である²⁾。その後、Harvard大学のLester Kobzik教授らによるノックアウトマウスを用いた研究により、環境粒子などに対する非特異的接着に参与するのは、Sc.R そのものではなく、そのホモログである

Macrophage Receptor with Collageneous Structure (MARCO)であることが証明された³⁾。

非特異的接着、あるいは環境粒子と接した後のマクロファージには、その後どのようなシグナルが伝達されるのであろうか。本研究室では、これまでの研究で次のようなことを明らかにしてきた。接着に伴い、SykキナーゼやPaxillinなどがリン酸化される。活性化したSykキナーゼは更に接着を増強する。その後、核転写因子であるkrox20/egr-2の発現が特異的に上昇する⁴⁻⁷⁾(図1)。

ところでマクロファージに貪食 (Phagocytosis) される粒子とは、一般に粒径が1ミクロン以上のもので、マクロファージと接触後、細胞膜の隆起により取り囲まれるものを指す。これより小さい粒子の細胞内への取込み作用は、エンドサイトーシス (Endocytosis) と呼ばれているが、取込まれる物質が液体である場合は特にピノサイトーシス (Pinocytosis) と呼んでいる。エンドサイトーシスには、クラスリン (Clathrin) やカベオリン (Caveolin) が関与するものや、それ以外の機構によるものなど様々である。これまでの大気中粒子状物質の生体影響に関しては、浮遊粒子状物質 (粒径が10ミクロンより小さいもの) やPM2.5 (粒径が2.5ミクロンより小さいもの) について研究が進められてきた。最近、直径が数十ナノメートル以下の極小粒子が、細胞層を速やかに通過し多臓器にわたり影響を及ぼす可能性が指摘されている⁸⁾。粒子状物質の細胞内への取込みに関する新たな研究領域が開拓されようとしている。

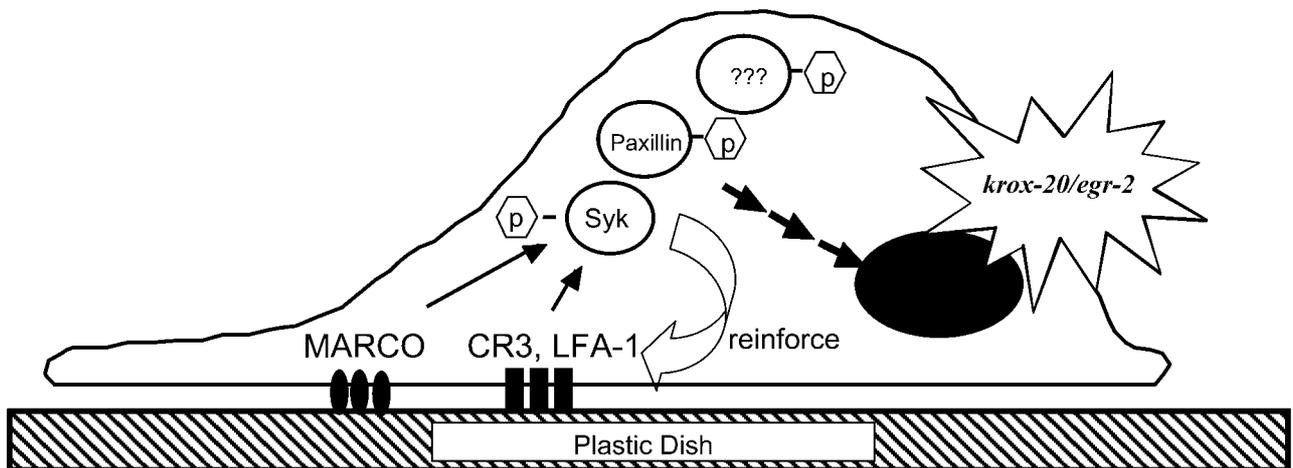


図1、マクロファージの非特異的接着と細胞内シグナル伝達

文献

1. Rosen H, Ordon GS. Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. *J. Exp. Med.* 166: 1685-1701, 1987.
2. Fraser I, Hughes D, Gordon S. Divalent Cation-Independent Macrophage Adhesion Inhibited by Monoclonal-Antibody to Murine Scavenger Receptor. *Nature* 364: 343-345, 1993.
3. Palecanda A, Paulauskis J, Al-Mutairi E, Imrich A, Qin GZ, Suzuki H, Kodama T, Tryggvason K, Koziel H, Kobzik L. Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. *J. Exp. Med.* 189: 1497-1506, 1999.
4. Hirano S. Nitric oxide-mediated cytotoxic effects of alveolar macrophages on transformed lung epithelial cells are independent of the α_2 integrin-mediated intercellular adhesion. *Immunology*, 93: 102-108, 1998.
5. Hirano S, Kanno S. Syk and paxillin are differentially phosphorylated following adhesion to the plastic substrate in rat alveolar macrophages. *Immunology*, 97: 414-419, 1999.
6. Hirano S, Anuradha CD, Kanno S. Transcription of *krox-20/egr-2* is upregulated following exposure to fibrous particles and adhesion in rat alveolar macrophages. *Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23: 313-319, 2000.
7. Hirano S, Anuradha CD, Kanno S. *Krox-20/egr-2* is up-regulated following non-specific and homophilic adhesion in rat alveolar macrophages. *Immunology*, 107: 86-92, 2002.
8. Hirano S, Nitta H, Moriguchi Y, Kobayashi S, Kondo Y, Tanabe K, Kobayashi T, Wakamatsu S, Morita M, Yamazaki S. Nanoparticles in Emissions and Atmospheric Environment - Now and Future -. *J. Nanoparticle Res.* 3: 311-321, 2003.

「免疫毒性試験プロトコール」第7回

LLNA-DA

山下 邦彦、出原 賢治

(ダイセル化学工業(株) 評価・解析センター)

A. 解説

Local Lymph Node Assay (以下LLNA)は、マウスを用いた皮膚感作性試験法として、Kimberら^{1,2)}によって発表され、2001年には欧州医薬品審査庁のガイダンス³⁾に、また2002年にはOECDテストガイドライン⁴⁾に、独立した試験法として正式に採択された。LLNAは、従来のモルモットを使用した皮膚感作性試験と比較し、試験期間が短い、定量的なデータが得られる、動物に対する負荷が少ないなどのメリットを有するが、感作性の検出に³H-thymidineを用いることから、日本においては実施出来る施設に制限があるのが実情であると思われる。一方ラジオアイソトープ(RI)を使用しない非RI-LLNAを開発することを目的に、国内でも優れた成果が報告された^{5,6)}。しかしながら、これらはいずれも、一般的な化学品会社において、日常的に行うには技術的に高度であった。そこで我々は、より簡便な非RI-LLNA法の開発を試み、皮膚感作性物質の検出法として実用上十分な感度と、従来にはない簡便性を有する手法(LLNA-DA: modified LLNA of Daicel based on ATP content)を開発したので紹介する。我々はこの手法を用い、論文などでLLNAを用いた評価結果が公開されている既知化合物約20種類と、自社開発等に関連した100種類以上の新規化合物を評価した。既知化合物に関してはLLNA法と同等の感度で検出できること、及び新規化合物に関しては、それらの構造から予測される感作性とLLNA-DAの結果が良く一致することなど、試験法としての有効性に関してはある程度の信頼性と実績はあると考えた。

B. 実験材料

1. 動物

CBA/JNマウス(雌, 8~12週齢)を使用する。他の系統のマウス、あるいは雄マウスについては、十分な使用実績がない。動物は個体識別が出来る様に飼育し、試験開始時及び終了時に体重を測定する。

2. 試薬及び器具

(1) 溶媒: アセトン/オリーブオイル4:1(v/v)、

ジメチルスルフォキシド、N,N-ジメチルホルムアミド等

(2) ATP測定試薬：ViaLight™ HS(三光純薬)

(3) その他：リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)
1% SDS溶液

(4) ATP測定装置：ルミテスター C-100 (キッコーマン(株))

C. 実験操作手順

1. 投与及びATP測定

第1, 2, 3及び7日：被験物質溶液を調製する。被験物質投与1時間前に、1% SDS溶液をマウス両耳介に、習字用細筆を用いて塗布する。SDS塗布後1時間目に、被験物質溶液 25 µlをピペットマンを用いて塗布する。

第8日：リンパ節を摘出し、重量、及びATPの測定を行う。

4回目の投与は、第6日に実施した場合でも統計上有意差のない結果が得られる。この場合リンパ節の摘出は第7日となる。

第1日～第3日の投与は、できれば同一時間帯が望ましい。

第7日目の投与は午前中に行い、摘出まで24時間以上の時間を空ける。我々の標準プロトコルでは、水曜日から金曜日に最初の3回の塗布を実施し、翌週の水曜日にリンパ節の摘出を実施している。

2. 使用する動物数

使用する動物数は、統計処理が可能となるよう各群3匹以上を使用する。我々は、通常1群3匹、1化合物3濃度 (計9匹)、陽性対照及び陰性対照各3匹の15匹を最小セットとして試験を実施している。複数の人数 (3人) で処理すれば、3時間程で50匹程度の動物の処置とATP測定がすべて終了するので、1回の実験で4ないし5化合物の評価が可能である。また、感作性強度の相対比較などを実施する場合には、同一濃度 (例えばEugenol、HCA等で十分な反応が見られる15%) で試験を実施すれば4ないし5化合物の比較が同時に比較できる。なお、実験最終日の処置は、処置数を増やす目的があれば、できれば複数の人数で行うことが望ましいが、第1日目から第7日目までの塗布に関しては、50匹程度であっても一人で作業は可能である。

3. 被験物質の調製と塗布

被験物質の溶解性によって適切な溶媒を選択し使

用する。試験濃度は、労働安全の為の感作性スクリーニングとしては、Basketterらの報告を参考に、35%、15%、0.1%の3濃度でスクリーニング試験を実施している⁷⁾。EC3値を求める場合には、OECDのガイドラインに従った濃度設定を行う^{4,7)}。被験物質の調製については、使用時に調製することが望ましいと考えられる。また同時に複数の検体を異なった溶媒に溶解して塗布する場合には、溶媒対照群は使用した溶媒ごとに設ける。試験感度を表す陽性対照には、10% Eugenol(AOO溶媒)、15% HCA(DMF溶媒)を用いている。これらを用いた場合、通常リンパ節重量で約2倍、ATP値で3倍以上の反応が得られる。

被験物質適用1時間前に行う1% SDS処理は、習字用細筆を用いて、軽く1回濡れる程度に行えば十分であり、この処置により感度が上昇する。SDS溶液は、サンプルの相互混入を防ぐために、15 ml容積のファルコンチューブなどに動物群数用意して行う。習字用細筆に関しては、動物群ごとに軽く水洗、ペーパータオルなどで水切りして使用する。

4. 浮遊液の調製

切除したリンパ節は、そのまま25 mm径程度の細胞培養用ディッシュに移し、精密化学天秤で重量を測定する。重量測定後、リンパ節を2枚のスライドグラスにはさんで軽く潰し (リンパ節が潰れて広がればよい)、500 µlのPBS溶液を用いて、スライドグラスに付着した細胞を、ディッシュ内に洗い流すように回収する。このとき、細胞剥離用のセルスクレイパー(Costar Corporation: Catalog No. 3010)を用いると効率良く細胞が回収できる。

5. ATPの測定

調製した細胞浮遊液の一部をPBSを用いて100倍に希釈しATP測定用のサンプルを作成する。通常は、15 ml容量のファルコンチューブなどに、予め1.98 mlのPBSを分注しておき、そこに20 µlの細胞浮遊液を添加する。次に、ViaLight™ HSのマニュアルに従い、90 µlのATP抽出試薬に、90 µlのサンプル (希釈した細胞浮遊液) を添加し、5分間放置後に20 µlの発光試薬を添加して、直ちにルミテスターC-100等を用いて、抽出されたATP量を反映するルシフェリンの発光量を測定する。

6. データ処理及び判定基準

マウス個体毎に測定したリンパ節重量とルシフェリン発光量データの統計処理を行い、有意差検定を行う。感作性の判定基準は、投与したいずれか

の被験物質濃度において、ルシフェリン発光量が、溶媒対照の3倍以上であれば明らかな陽性とするが、被験物質の濃度依存性やリンパ節重量の増加なども考慮に入れる。

D. 留意事項

1. 動物を安楽死させてからATP量測定までは個体毎に20分以内で行うようにする。
2. ATP測定試薬に関しては、ViaLight™ HSを使用している。他のキット試薬などに関しても、基本的には使用可能であると考えているが、現在検討中である。なお三光純薬よりViaLight™ HS plusという別製品が発売されているが現時点では使用の可否は不明である。
3. 判定に関しては、スクリーニング試験でわずかに陽性が疑われる場合（統計的な有意差のみが認められ、刺激指数が3を超えていないような場合）には、試験濃度を設定しなおして確認試験を実施し、再現性と濃度依存性を確認する。また物性情報、構造情報なども考慮に入れて慎重に判定を行う。我々の社内安全性の判定基準としては、より厳しく判定する目的でリンパ節重量、ルシフェリン発光量のいずれかで統計的有意差が出た場合には陽性と判定することになっている。
4. 溶媒との関係から皮膚への透過性の悪いことが考えられる物質についてはMaximization法を考慮する。

E. 参考文献

1. Kimber, I., Mitchell, J.A., and Griffin, A.C. (1986) Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food and Chemical Toxicology*, 24, 585-586.
2. Kimber, I., Hilton, J.A., and Weisenberger, C. (1989) The murine local lymph node assay for identification of contact allergens: a preliminary evaluation of in situ measurement of lymphocyte proliferation. *Contact Dermatitis*, 21, 215-220.
3. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2001) Note for Guidance on Non-Clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products.
4. OECD (2002) Guideline for Testing of Chemicals 429, Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay.
5. Hatao, M., Hariya, T., Katsumura, Y., and Kato, S.

(1995) A modification of the local lymph node assay for contact allergenicity screening: measurement of interleukin-2 as an alternative to radioisotopic-dependent proliferation assay. *Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286.

6. Suda, A., Yamashita, M., Tabei, M., Taguchi, K, Vohr H-W, Tsutsui, N., Suzuki, R., Kikuchi, K., Sakaguchi, K., Mochizuki, K., and Nakamura, K. (2002) Local lymph node assay with non-radioisotope alternative endpoints. *The Journal of Toxicological Sciences*, 27(3)205-218.
7. Basketter, D.A., Blaiker, L., Dearman, R.J., Kimber, I., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Harvey, P., Evans, P., White, I.R., and Rycroft, R.J.G. (2000) Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis*, 42, 344-348.

編集後記

ラットゲノム解読のニュースの中で、解毒に関わる遺伝子はヒトより多く存在するので、毒性試験の解釈にはより考慮が必要との記事があった。種差はもとより、遺伝子が均一な近交系マウスを用いた毒性実験でも指標によっては大きな個体差がみられることがある。実験に用いられるまで育てられた環境がその要因とも考えられているが、明らかでない。母胎内から出生後の免疫系が確立されるまでの幼児期における環境因子との関わりについては大きな不思議が隠れているのかもしれない。(HF記)

編集・発行：日本免疫毒性学会

発行日：平成16年6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

