

ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会：The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 11 No. 2 (通巻22号) 2006

目次

第13回日本免疫毒性学会学術大会 報告書 … 1	川崎医科大学衛生学 大槻剛巳
第14回日本免疫毒性学会学術大会 (予告1) … 1	神戸薬科大学 吉野 伸
年会賞—神経ペプチドCGRPのRAMP1/CL受容体を介した樹状細胞機能制御…………… 5	大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野 辻川和丈ら
奨励賞—薬剤によるアナフィラキシー様反応のインビトロ予測系…………… 7	三菱ウェルファーマ株式会社 浜野宝子ら
ICH免疫毒性試験ガイドラインと病理組織検査… 8	あすか製薬(株) 開発研究センター 安全性研究部 久田 茂
日本免疫毒性学会との研究交流…………… 15	University of Minnesota Medical School Jean F. Regal
お知らせ	

第13回日本免疫毒性学会学術大会 (JSIT2006) 報告書

大槻剛巳 (年会長、川崎医科大学 衛生学)

2006年の夏は、長雨・豪雨の7月、一転猛暑の8月を経て、異常気象の「異常」が「通常」かとも想われるような日々で過ぎて行き、また9月に入ってから、停滞する秋雨前線の影響で、山陽路も降り続く雨でした。今年度の学会を仰せ付かった身と致しましては、遠路お越しいただく会員の皆様へのご不便を鑑み、非常に心配しておりました。しかし、会員諸氏のなんと日頃の行いの素晴らしいことか、大会当日は、爽やかな晴れ間と青い空が覗き、地域も天候も皆様への歓迎の気持ちを表しているかのようでした。

平成18年9月14日(木)と15日(金)の2日間に亘りまして、第13回日本免疫毒性学会学術大会は倉敷市芸文館ホールにて開催させていただき、滞りなく終了することが出来ました。偏に会員の皆様の多大なご協力の賜物と

感謝しております。加えて、協賛していただきました日本衛生学会・日本薬学会・日本毒性病理学会・日本トキシコロジー学会、学術集会開催に助成をいただきました八雲環境科学振興財団・川崎医学医療福祉学振興会・岡山医学振興会、さらに講演要旨集に記載させていただきました賛助企業の諸団体には、多大なご支援を頂戴いたしました。ここに改めて深甚なる感謝の意を表させていただきます。

さて、今回は第13回目、昨年度大沢年会長の下に東京で行われました際には第12回ということで一巡という意味合いから、これまでの免疫毒性研究を確認し新たな研究展開へのステップアップを期する会という設定をされてらっしゃいました。今回は、その潮流を踏まえながら、学会自体の運営委員会あるいは学術大会の実行委員会にて企画を検討する中で「テーマ」の揭示を申し付かり、

第14回日本免疫毒性学会学術大会 (JSIT 2007) (予告1)

第14回日本免疫毒性学会学術大会を下記の要領で開催しますのでご案内申し上げます。

- 会 期：平成19年9月20日(木)、21日(金)
会 場：兵庫県民会館県民ホール
神戸市中央区下山手通 4-16-3
TEL：(078) 321-2131 FAX：(078) 321-2138
新幹線「新神戸駅」下車、
地下鉄乗換「県庁前」下車1分
JR・阪神「元町」下車徒歩7分
サブテーマ：トキシコゲノミクスと免疫毒性
内 容：招聘講演、特別講演、
シンポジウム「生殖免疫毒性」、
ワークショップ、一般演題を予定
発表形式：一般演題は口演発表
演題申込締切日：平成19年7月7日(金)
年 会 長：吉野 伸 (神戸薬科大学)
問 合 先：第14回日本免疫毒性学会学術大会・
年会事務局
TEL & FAX：(078) 441-7577
(近日中にホームページ開設予定)

「病態形成と免疫毒性」とさせていただきます。これは、私自身が元来内科医で、種々の疾病に苦しめる方々を診てきたこと、その中で、血液領域を選び専門として診療研究をしてきていたのですが、その際に、いろいろな偶然が重なって多発性骨髄腫という形質細胞の腫瘍化と考えられる疾患とその腫瘍細胞の細胞生物学的研究に従事していたこと、B細胞系とはいえ、免疫病態にも深くかかわる細胞の疾病であったので、免疫というキーワードが日々の研鑽の中で重さをましていたのでした。その後、これも紆余曲折はありましたが、現在の川崎医科大学衛生学に所属させていただき、本学会の理事もお勤めになられていらした植木絢子教授の下で、珪酸やアスベストの免疫影響を観察するにつけ、内科医時代に想定もしていなかったような病態の影に多くの免疫異常～あるいはそれが生活や職場の環境中の物質であるならば、謂わば「免疫毒性」と捉えても構わないような影響が、多く認められることに、驚愕もし、また、興味を惹かれて現在に至っている次第であることに拠ります。

日本免疫毒性学会は、私たちのように環境からの免疫毒性研究を主体に係っている領域の方々と、新規薬剤を中心に化学物質等の免疫毒性を検討されていらっしゃる方々、あるいは、病態の中に潜む免疫異常の解明に邁進されていらっしゃる方々が一同に介してその理解を深め、それぞれの知見を検討する会となっているように感じております。ある意味で裾野の広い領域をカバーしておりますので、今回も昨年度を踏襲し、基調講演という形でその年度の学術大会の色合いを紹介できる企画をすることも一つのナビゲーションになって良いのではと考え企画もさせていただきました。その中では、植木教授の頃から教室をあげて取り組んできました珪酸・アスベストのヒト免疫系に対する影響の概略を紹介することで、「病態形成と免疫毒性」の検討に関する一つのアプローチを提示させていただきました。

学術大会全体の企画としましては、今回は第48回日本産業衛生学会「アレルギー・免疫毒性研究会」との同時開催も行うことになっておりましたので、第1日目の午後特別講演2題、招聘講演2題を集めて、この同時開催プログラムとさせていただきます。それ以外に、特別講演3を第2日目の午後に、そして、シンポジウム、ワークショップを其々第2日目の午前、午後に設けさせていただきました。加えて、両日ともにランチオンセミナーの御協賛を得ることが出来、開かせていただきました。また、一般演題も口演とポスターでの御発表とさせていただきます。第1日目には総会も催しました。

参加者は、全体で約160名、加えてスタッフよりの参

加が約10名、更に同時開催プログラムにも30名弱の方の参加を頂きました。また、非会員の参加者も54名でした。昨年度のご報告にもありましたが、非会員の方が今回も50余名参加して下さったことは、嬉しいことであり、このようなご参加の方々が今後会員として活動くだされば、本学会の将来構想のためにも良い兆候ではないかと感じました。

特別講演1は、米国コロラド大学のNewman教授にベリリウム肺の免疫毒性と題してご講演いただきました。ベリリウム肺は昨今ではハイテク工場や宇宙工学のような現場でも使用されている金属であります。肺に肉芽腫様病変を形成することが知られております。Newman教授のご講演では、免疫担当細胞とベリリウムの接点を分子免疫学的視点から解説され、非常に示唆に富む内容を紹介していただきました。特別講演2は、米国ミネソタ大学のRegal教授によります化学物質起因性肺アレルギーのモデルとその発症機序ということで、実験的なモデルと網羅的な遺伝子解析を取り混ぜて、種々のアレルゲン其々の検討の重要性と、また、おそらくいくつかのキーとなる遺伝子が存在することを説明されました。更に特別講演3では、カナダのチャールスリバー社研究所のKhalil博士による治療薬と免疫系の相互作用についてのご講演で、薬理作用、免疫毒性、そして免疫遺伝学的解析をサルの実験モデルの紹介も加えて、ご報告いただきました。

招聘講演1は、国立環境研の高野博士（環境研究領域・領域長）によります炎症と環境因子の総説であり、これも昨今問題となっています肺や気道を中心としたアレルギー疾患とアレルギー性炎症とディーゼル排ガスなどの環境因子の相互作用、あるいはナノ粒子の影響までも言及して下さり、肺における免疫病態の重要性を改めて認識させられる内容でした。そして、招聘講演2では、北里大学坂部教授によりますシックハウス症候群の最新動向のご講演で臨床から心理面、脳科学や遺伝子解析まで含めた広汎な内容を分かりやすくご説明いただきました。

シンポジウムでは、繊維状・粒子状物質研究と免疫毒性と題して4名の演者の先生に、繊維状物質の有害性評価について、アスベストのNK細胞への影響について、ナノ粒子の肺組織透過性について、そして、もう一方は、ナノ粒子の医療応用面からの話題提供ということでDrug Delivery Systemとしてのナノ粒子について、それぞれ精度の高い実験研究の結果をご提示いただくことで内容の濃厚なご発表いただき、活発な討論がなされました。また、ワークショップでは、医薬品の免疫毒性試験に関する

るガイドラインが今年制定されたことによるその進め方と試験法について専門の先生方からの実践的なご発表と、ここでもオランダからPenninks博士に来ていただいて、欧州の動向のご紹介もしていただきました。非常に現実に向き合った内容で日々の研究でこのテーマに携わる研究者には、有用な内容であったばかりでなく、環境中物質の健康影響を検討するにも、基盤は同じものと考えられるため、すべての参加者に感銘を与える企画となりました。

更に、ランチョンセミナーも2日間、海外からの演者を招いて1日目はチャールスリバー社のJacob博士に免疫毒性の評価について、2日目はハンティンドン社のWing博士にサイトカインやモノクローナル抗体に関連する講演を頂戴しました。

一般演題については口演16題、ポスター13題の応募を頂きました。会員の皆様の熱意が伝わってくる演題数もあり、そのためにポスターセッションは、2セッションに分けて、同時進行とさせていただかざるを得ず、ご参加の皆様にはご迷惑をお掛けしたと存じます。深謝いたします。それぞれの演題は、その発想も内容も素晴らしいもので、また、発表後の質疑応答も全く活発なものがああり、本学会の伝統である個々の演題についてお互いが真摯に向き合って納得が行くまで討議を深めるという姿勢を今回も十分に継承できたのではないかと考えております。今回、スタッフとして参加いただきました上、発表にも応募して下さった川崎医科大学の私共とは別の教室の先生が、「なんとこの学会は真面目な学会か！進行セッション以外の場所には参加者は全く居ないし、質疑応答もゼミのように熱を帯びて活発である！」と感心されていらっしゃいました。

また、今年度も年会賞・奨励賞ともに演題投稿時に演者より応募の意志を確認させていただいて13題の応募を頂きました。厳正なる一次審査、二次審査を経て、今年度は以下のように決定いたしました。

年会賞：辻川和丈先生

(大阪大学大学院薬学研究科細胞生理分野)

演題名：神経ペプチドCGRPのRAMP1/CL受容体を介した樹状細胞機能制御

奨励賞：浜野宝子先生 (三菱ウェルファーマ株式会社創薬研究本部安全性研究所)

演題名：薬剤によるアナフィラキシー様反応のインビトロ予測系

おめでとうございます。学術大会最後のプログラムと

して授与式を行わせていただきました。両受賞の先生には、その活力を本学会の発展のためにも如何なく奮っていただきたく思いますし、本ImmunoTox Letterへの受賞内容紹介や、次年度の御発表もお願いして行くことになると思いますが、宜しく願いいたします。

総会は第1日目の午後最初に行いました。事務報告もあるとは思いますが、各種委員会からの報告、会計等に関する審議が行われました。会計に関する変更点に関する討議、そして、ホームページやメーリングリストの利用などの含めた将来構想については、多くの時間を割いて活発な議論がなされたこと、ここに記載しておきたいです。

昨年度は、編集委員会から、その年度の学術大会及び学会全体についてのアンケートが設置され、多いとは云えないまでも回答が得られ、本ImmunoTox Letterでも紹介されました。今回も同様のアンケートを記名台に置かせていただき、ご参加の皆様にご回答いただきました。2年目となったためか、多くの回答も寄せられ、これはまた編集委員会や運営委員会での検討の上で、会員の皆様へのご報告がなされるかと存じます。勿論、このようなアンケートに寄せられた意見を、即時に、次の学術大会へ反映させるということは、大会の準備期間を考えるとなかなか難しい面もあるかと想われますが、それでも、学会の運営や学術大会の企画などについても、大いに参考とさせていただけるご意見もあったかと思われまます。オープンな形での学会運営という意味合いも含めまして、アンケートにご回答くださいました参加者の皆様には深謝いたします。尚、今回の学術大会については、概ね温かいご意見を頂戴いたしましたように（欲目でしょうが）読ませていただきました。「産業衛生的な内容が多すぎた」というご意見につきましては、本報告の冒頭でも記させていただきましたように「病態形成と免疫毒性」というテーマ設定の中で、どうしても環境や作業現場に在る物質からの免疫毒性という観点がクローズアップされたのかも知れません。それは、年度毎にそれでも主催する年会長の研究に携わる姿勢という色合いが出てしまうものでもあろうかと存じますので、ご容赦いただければと思います。それぞれの学術大会の色合いが3年分、5年分積み重ねられることで、学会全体の方向性や潮流が、改めてそこで見えてくるものではないかとも思っております。それと「スケジュールが少々タイトすぎた」「2日目は17時過ぎには終了してほしい」というご意見は、本当に済みませんでした。今回、企画を欲張った訳でもなかったのですが、準備の経緯の中で、企画自体が自発的な印象でそれぞれが膨れ上がる様相を呈するようになっ

ImmunoTox Letter

てしまいました。一般口演の間の休憩も5分とか、確かに、最終も18時を過ぎるということになってしまいました。特に関東を初め遠方にお帰りの参加者の方々には交通機関の面で、最後まで残れなかったとお話も聞かせていただきました。これも企画運営の不手際でしかありません。深くお詫び申し上げます。

さて、会場でありました倉敷市芸文館は、倉敷の観光名所であり大原美術館などもあります「美観地区」に隣接した位置にありました。タイトなスケジュールと真面目な学術大会へのご参加で、宿泊先から会場へ来られる際くらいにしか美観地区を堪能していただけなかったかも知れません。済みませんでした。その替わりと申しますと少しおかしなニュアンスですが、懇親会はもう一つの倉敷観光名所であり「チボリ公園」内のアンデルセン・ホールで行うことにさせていただきました。1日目最後のプログラムから、それでも十分な移動時間を設けたつもりだったのですが、エントランスから公園の一番奥にありますアンデルセン・ホールまでの道行きのみをお楽しみいただくくらいの時間しかなかったかも知れません。これも、もう少し配慮できればよかったのにと、反省しております。しかし、懇親会には非常に多くの方が参加して下さいました。部屋の規模とかお食事の量の面でも、ご迷惑をお掛けしたかも知れませんでした。重ねてお詫びいたします。

尚、今回は学術大会をお引き受けするにあたって、少し「手作り感」を出したいと思いました。そこでポスターや要旨集の表紙、会場内のセッション外の時間のプログラム案内スライドなどに、結構、我儘なデザインや写真を使わせていただいたりしました。そして、この我儘放題のとどめとして、懇親会では自作自演による主題歌披露という暴挙をさせていただきます。偶々、外国からのお客様も6名来られることにもなっておりまして、英語の歌詞として、昔の杵柄を埃を叩いて持ち出してきて作詞作曲、今回、発表もして下さった川崎医科大学生化学教室の岡本先生ご夫妻がViolinの名手であるお話を聞いていましたので、初めてViolin譜を書いて・・・実際には、8月下旬に1回、9月初旬に1回、そして当日というタイトなスケジュールだったのですが、名手のご夫妻のお力でなんとか拍手をいただけるような主題歌披露になりました。お恥ずかしい限りでしたが、これも余興、少しでも記憶に残る学術大会になればという年会長としての想いとお感じになっていただいて、それでも聴いて頂けたらと思っています。まことにありがとうございました。歌詞のみ此処に再掲させていただきます。それでも免疫毒性研究に対する私の想いとお感じになら

れてお読みいただければ幸いです。

SONG FOR THE 13TH JSIT

This is a song for the 13th JSIT
We meet together to explore
The mechanisms underlying the occurrence
of immunotoxicity

This is a song for the 13th JSIT
We talk together to develop
The strategies to overcome the impairments
from immunotoxicity

All of us have the scientific minds
And with these forces we can open door
Let's join and listen to the sounds of truth
We'll see a novel world

With sincerity, with respect
And with honesty we believe in forever

ちなみに、川崎医科大学衛生学教室のホームページ(URL: <http://www.kawasaki-m.ac.jp/hygiene/>、もしくは検索エンジンで「川崎医科大学衛生学」と入れていただくとヒットするはずです)にアクセスしていただきますと、トップページの写真の上に「2006 JSIT」という箇所をクリックできるようになっております。クリックしていただきますと、今回の学術大会の様子を紹介するサイトが開きます。スクロールして下の方に辿っていただけましたら、いくつかの写真があり、其々の写真をクリックしていただきますと、会場の様子やポスター発表の様子、あるいは懇親会のスナップにも辿り着ける(恥の上塗りですが主題歌も見えて聴けるようにしております)様になっておりますので、是非、アクセスしていただけたら幸いです。

最後になりますが、本当に会員の皆様、参加してくださいました皆様には、不慣れなスタッフであったため、何かとご不便やご迷惑をお掛けいたしました。改めてここに陳謝いたします。その上で、滞りなく会を終えることが出来たのも、本当に皆様の日頃の免疫毒性研究に対する熱情の賜物と深く感謝いたします。本当にありがとうございました。

以上、感謝を込めて、学術大会の報告とさせていただきます。ありがとうございました。

年 会 賞

神経ペプチドCGRPのRAMP1/CL受容体を介した樹状細胞機能制御

辻川和丈、滋野ともみ、扇谷祐輔
平山恵実、深田宗一朗、山元 弘
(大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野)

免疫系は、神経系や内分泌系とともに独立した統御系として考えられていた。しかし最近、これらが共通のリガンドや受容体を介してクロストークしていることが分子、個体レベルで解明されつつある。化学物質による免疫毒性発現機序の解明においても、免疫系に対する直接的作用とともに、知覚神経系を介した間接的作用の研究が必要であると考えられる。その理由として、(1) 化学物質は炎症やアレルギーの発現の場となる皮膚、鼻粘膜、腸管粘膜上皮や気管支上皮を介して生体へ取り込まれるが、これらの組織下においては知覚神経がネットワークを張り巡らしている。(2) 知覚神経は、外界からの刺激を中枢に伝達する求心性神経であり、サブスタンスP (SP) やカルシトニン遺伝子関連ペプチドCGRP (calcitonin gene-related peptide) が神経伝達物質として機能している。それら神経ペプチドは軸索反射により化学物質侵入局所でも放出される。(3) SPに関してはその受容体であるニューロキニン1 (NK-1) 遺伝子が同定されており、免疫細胞においても発現が認められている、などが挙げられる。またNK-1に関しては既に遺伝子欠損マウスも作製されており¹⁾、個体レベルでの機能解析結果が多数報告されている。一方、CGRPは2つのアイソフォーム (α CGRP、 β CGRP) が存在し、ヒトでは7回膜貫通型蛋白質であるカルシトニン様受容体 (calcitonin-like receptor, CL) を介してシグナル伝達されると考えられていたが、免疫系における生理的機能解析は十分に進んでいなかった。私たちはCGRPの免疫系に対する作用を分子、細胞さらには個体レベルで解明することが、化学物質の免疫毒性発現機序に新知見を与えるものと考え研究を進めた。まず同定されていなかったマウスCL遺伝子のクローニングに着手した。その結果、463アミノ酸から構成されるマウスCL遺伝子のクローニングに成功した。ちょうどその頃、ヒトにおいてCGRP受容体は、CLと1回膜貫通型蛋白質のRAMP1 (receptor activity modifying protein 1) のヘテロダイマーで構成されると報告された²⁾。そこで直ちにマウスRAMP1のクローニングを行い、それらCLとRAMP1がマウスCGRP受容体を構成することを確認した³⁾。CLはCGRP受容体とともに、アドレノメデュリン(AM)

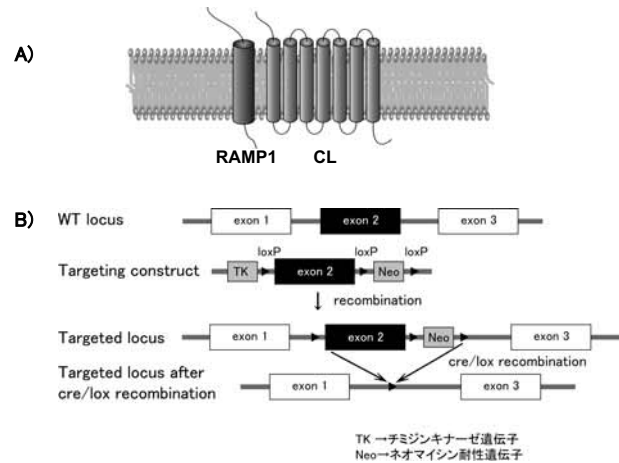


図1 CL/RAMP1で構成されるCGRP受容体とRAMP1 KOマウス作成
A) CGRP受容体構成サブユニットの模式図、B) Cre/loxPシステムによるRAMP1遺伝子コンディショナルノックアウトマウス作成コンストラクト

受容体のサブユニットでもあり、CGRP受容体特異性はRAMP1によって決定される¹⁾。そこでクローニングしたマウスRAMP1遺伝子塩基配列情報を基にRAMP1欠損マウスを作成した(図1)。薬理的にはCGRPは強い血管拡張作用を有することが知られている⁴⁾。RAMP1欠損マウスではCGRP投与による血管拡張作用がまったく認められなかったことより、機能的CGRP受容体の欠損を確認した。そこでこのRAMP1欠損マウスを用いてCGRPの炎症・免疫系に対する機能解析を進めた。

まず、野生型ならびにRAMP1欠損マウスにリポ多糖(LPS)を投与し、経時的に血液を採取し、血中CGRPならびにサイトカインレベルを定量した。その結果、LPS投与6時間目において、野生型マウスの血中CGRPの一過性上昇が認められた。またTNF α 、IL-12、IL-6、IFN γ といった炎症性サイトカインレベルも一過性に上昇した。一方、LPS投与RAMP1欠損マウスでは、野生型マウスに比べさらに顕著な血清中CGRPの一過性上昇が認められた。炎症性サイトカインのピークレベルは野生型とほぼ同様であったが、明らかなそれらサイトカインの血中レベル低下抑制が認められた。次にIV型アレルギーモデルである2, 4, 6-trinitrochlorobenzene (TNCB) 誘発接触性過敏反応(CHS)を用いて検討を進めた。その結果、RAMP1欠損マウスは野生型マウスに比べ顕著な耳の腫れを認めた。一方、野生型マウスにCGRPを投与すると、対照動物に比較し明らかなTNCB誘発CHS抑制作用が認められた。これらの結果は、CGRPがCL/RAMP1受容体を介して炎症やアレルギー反応を調節していることを示した。

皮膚や粘膜上皮細胞下の知覚神経終末付近には、抗原

提示細胞であるランゲルハンス細胞や樹状細胞が認められる⁵⁾。樹状細胞はLPS等のToll-like receptor (TLR) リガンドを認識することにより自然免疫系において、また強い抗原提示能を有し獲得免疫系においても重要な機能を演じている。そこで、この樹状細胞の機能に対するCGRPの作用を検討した。マウス骨髄細胞を顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 添加培養液中で培養し樹状細胞 (BMDC) を誘導した。このBMDCにLPS、ペプチドグリカン、CpG等のTLRリガンド刺激ならびに卵白アルブミン添加を行い、IL-12、TNF α 産生に対するCGRPの作用を検討した。その結果、CGRPはTLRリガンドや抗原処理によるIL-12、TNF α 産生を顕著に抑制した。RAMP1欠損マウス由来BMDCを用いた実験では、CGRPのTLRリガンドや抗原刺激によるサイトカイン産生抑制作用は認められなかった。また、CGRPによるBMDCからのIL-12、TNF α 産生抑制作用は、CL/RAMP1受容体を介したcAMP/PKA経路の活性化が関与していることも明らかとした。一方SPやAMでは、このようなBMDCからのIL-12、TNF α 産生抑制作用は認められなかった。これらCGRP作用は、脾臓から抗CD11c抗体を用いて精製した樹状細胞においても認められた。一方、CGRPはBMDCの貪食能や活性化によるMHCクラスIIならびに共刺激分子 (CD80、CD86、CD40) の発現には影響しなかった。

次にCGRPのT細胞機能に対する作用を解析するために、まずCGRP受容体の発現をRT-PCRで検討した。その結果、胸腺細胞ならびに精製CD4⁺T (Th) 細胞においてCLとRAMP1のmRNA発現を認めた。そこでTh細胞を抗CD3/CD28抗体で刺激し、トリチウムチミジンの取り込みにより細胞増殖を、またIFN γ 、IL-4産生を検討した。その結果、CGRPはTh細胞の増殖ならびにIFN γ 産生を抑制し、IL-4産生を促進した。またCGRPのIL-4産生促進作用は、cAMP/PKA経路の活性化を介したNF-ATの転写活性上昇によりもたらされることも明らかになった。

以上の結果より、CGRPは炎症性サイトカイン産生制御を介して炎症反応の調節に関与していることが推測された。一方、化学物質は直接的に知覚神経を刺激するとともに、皮膚や粘膜傷害をもたらす結果、知覚過敏が惹起され間接的に知覚神経終末からCGRPの持続的な放出をもたらすことが推測される。放出されたCGRPは、樹状細胞やTh細胞のCL/RAMP1受容体を介したシグナル伝達によりIL-12産生抑制やIL-4産生促進をもたらす、免疫系を相対的にTh2へ偏らせることが明らかになりつつある (図2)。現在、RAMP1欠損マウスを用いて生理的なCGRPの炎症、免疫機構調節分子機構を解析中であり、

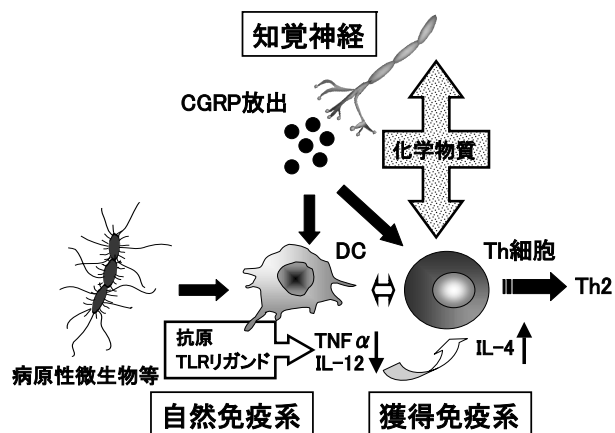


図2 CGRPによる免疫系制御
知覚神経終末から放出されるCGRPは、樹状細胞やTh細胞に作用し、自然免疫系や獲得免疫系の機能を調節する。化学物質は免疫系に対する直接作用とともに、知覚神経を介したCGRP放出による間接作用により炎症・アレルギー反応の悪化をもたらすと推測される。

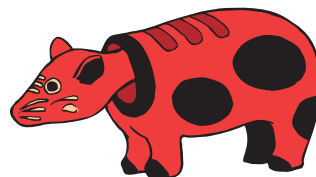
本研究成果が化学物質による免疫毒性発現機序の解明につながることを期待する。

謝辞

本研究発表が第13回免疫毒性学会年会賞に選ばれたことをたいへん名誉に思います。今後も免疫毒性学分野や免疫毒性学会の発展に貢献できるようさらに研究を展開して行きたいと思えます。これらの研究は、大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野の大学院生により進められたものであり、心より感謝致します。

参考文献

- (1) Science. 1996; 273 (5282): 1722-5
- (2) Nature, 1998; 393 (6683): 333-9
- (3) Neuropeptides. 2002; 36 (1): 22-33
- (4) Endocr Rev. 1996; 17 (5): 533-85. Review
- (5) Nature. 1993; 363 (6425): 159-63



Regulation of dendritic cell functions by neuropeptide CGRP via RAMP1/CL receptors

Kazutake Tsujikawa, Tomomi Sigeno,
Yusuke Ogitani, Megumi Hirayama,
So-ichiro Fukada, Hiroshi Yamamoto

(Department of Immunology,
Graduate School Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

Several lines of evidence indicate crosstalk between the immune and nervous systems through the common molecules and their receptors. It is assumed that the nerve system is involved in the expression of immunotoxicity of chemicals. We focused on the immunoregulatory functions of neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP), which is released from sensory nerve terminals. The results obtained in this study using the CGRP receptor knockout mice indicated that CGRP regulates innate immunity, and transduces the activation signal to Th2 polarization in acquired immunity.

奨励賞

薬剤によるアナフィラキシー様反応の インビトロ予測系

浜野宝子、泊泰三、岡田朱織、筒井尚久
(三菱ウェルファーマ株式会社 創薬研究本部 安全性研究所)

即時型のアレルギー (I型アレルギー) には、IgE抗体が関与する反応およびIgEを介さない反応があり、それぞれ、アナフィラキシー反応およびアナフィラキシー様反応と呼ばれている。後者のアナフィラキシー様反応が薬剤によって誘発される場合、薬剤が肥満細胞や好塩基球へ直接作用するか、もしくは薬剤が補体受容体を介して肥満細胞等を活性化し種々のケミカルメディエーターの遊離が惹起されることが原因として考えられる。アナフィラキシー様反応を引き起こす薬剤としては、抗癌剤、造影剤およびリポソーム製剤が広く知られており、さらに、一部の医薬品添加物でも報告がある。本反応によって惹起されるアレルギー症状が重篤な場合には、アナフィラキシーショックにより死に至ることもあり、新薬開発において本毒性の評価は重要である。本毒性は、通常、安全性試験において、薬物投与後の動物で観察される一般

症状や外表の変化、あるいは血圧・心拍数の変動などで調べられている。しかしながら、探索早期の合成化合物で本毒性が認められ、類似の化学構造を有する化合物群の中で本毒性を有しない化合物を見出そうとする場合、動物を用いる評価系は必ずしもスループットは良くない。そこで、我々は細胞を用いて簡便に本毒性を予測する系の確立を試みた。

細胞はヒト肥満細胞株HMC-1細胞を用いた。この細胞は、肥満細胞性の白血病患者より樹立された細胞株で、IgE抗体の受容体であるFcεレセプターを発現していない未分化の肥満細胞ではあるが、細胞内に多量のヒスタミンを含有し、さらに細胞表面には補体受容体が発現していることから、アナフィラキシー様反応の予測には適している細胞と考えられる。HMC-1細胞を48穴の平底プレートに 1×10^4 /ウエルで播き、化合物を細胞毒性が認められない濃度範囲で加え、CO₂インキュベーター内 (37℃、5%CO₂) で6時間培養した後に、細胞上清中に放出されたヒスタミン量をELISAキット (SPI-BIO社) 測定した。細胞培養からヒスタミン定量まで1日で実施することができ、少量の化合物を用いて多検体の評価が可能ことから、探索早期の毒性スクリーニングには適した系と言える。

最初に、典型的なヒスタミン遊離物質であるcompound 48/80を用いて、本実験系の感度をヒト、イヌおよびラットの新鮮皮膚組織と比較した。新鮮皮膚組織のcompound 48/80に対する反応性は、ヒトとイヌの組織がほぼ同等で、これらよりもラット組織は感受性が低かったのに対し、HMC-1細胞ではヒトやイヌの皮膚組織と同じ濃度からヒスタミン遊離を認めた。次に、ヒトへの投与でヒスタミン遊離による皮膚症状やショックなどが報告されている抗癌剤を用いて、本実験系の特異性を調べた。薬剤が肥満細胞に直接作用しヒスタミン遊離を引き起こすことが知られている、つまりアナフィラキシー様反応を誘発するdoxorubicin、etoposideおよび5-fluorouracilではヒスタミン遊離が確認された。一方、ヒスタミン遊離に抗体が関与すると考えられているmethotrexateとcisplatinの曝露に対しては、細胞上清中のヒスタミン量に変動はみられなかった。さらに、ヒトでアナフィラキシー様反応の報告がある様々な薬効分野の薬剤についても検討を加えた。その結果、造影剤 (amidortizoateおよびioxaglate)、神経-筋遮断剤 (suxamethoniumおよびbenzylisoquinolinium)、抗菌剤 (ofloxacin) および医薬品添加物 (cremophor Elおよびpolysorbate 80) のいずれの化合物の曝露においてもHMC-1細胞からのヒスタミン遊離が認められた。

このように、我々が今回検討したHMC-1細胞からのヒスタミン遊離を指標にしたインビトロ実験系は、薬剤によるアナフィラキシー様反応を予測する方法として有用であることが示唆された。本検討結果を踏まえて、弊社では種々の理由によるアナフィラキシー様反応を誘発する懸念のある探索早期の化合物に対し本実験系を適用し、効率的に本毒性のポテンシャルを持たない化合物をスクリーニングすることに成功している。

(奨励賞受賞に対するコメント)

この度の受賞につきまして、私共の研究を評価して頂きましたことに感謝申し上げます。医薬品の免疫毒性試験については、本年4月に厚生労働省からガイドラインが通知され、すべての新医薬品を対象に免疫毒性の評価が求められるようになり、免疫毒性のリスクを評価する手段は整備されました。一方、医薬品開発の探索早期における免疫毒性スクリーニングの現状は、製薬企業各社がそれぞれ工夫こらして独自の方法で対応しているように思います。各社が免疫毒性のスクリーニング方法を考える上で、今回の私共の報告が何らかお役に立ちますと幸いです。

In vitro screening test of drug-induced anaphylactoid reaction

Takako Hamano, Taizou Tomari,
Saori Okada, Naohisa Tsutsui

(Toxicology Laboratory, Pharmaceuticals Research Division,
Mitsubishi Pharma Corporation)

Anaphylactoid reaction, which has caused by anti-cancer drugs, contrast agents and so on, is one of toxicological concerns in the development of new drugs. We examined whether histamine release from HMC-1, human mast cell line, after the exposure of test compounds would be available for the prediction of anaphylactoid reaction observed in human and experimental animals. The results showed that the in vitro assay using HMC-1 could detect the potential to anaphylactoid reaction with good sensitivity and specificity.

**ICH免疫毒性試験ガイドラインと
病理組織検査**

久田 茂

(あすか製薬(株) 開発研究センター 安全性研究部)

1. はじめに

2006年10月に国内でも施行されたICH免疫毒性試験ガイドライン¹⁾では、標準的毒性試験において免疫毒性のスクリーニングも行われる。新規医薬品等の免疫毒性の有無及び予想される免疫毒性標的細胞については、血液学的検査、血液化学的検査、免疫系器官の重量、肉眼所見及び病理組織検査により、総合的に検討される。免疫毒性評価のための病理組織検査の方法については、STP Immunotoxicity Working GroupからPosition Paperが公表され²⁾、これに基づいて、ICH免疫毒性試験ガイドラインにおいてリンパ系器官の病理組織検査に関する基本的姿勢が示された。また、最近、Toxicologic Pathology (Vol 34, Number 5, 2006年) にリンパ系器官の組織形態学的評価に関するモノグラフ (A Monograph on Histopathologic Evaluation of Lymphoid Organs) が公表され、前述のPosition Paperに基づいたリンパ系器官に対する病理組織検査 (enhanced histopathology) の詳細について示された。

2. 標準的毒性試験における病理組織検査

剖検では全身のリンパ系器官・組織を観察し、胸腺及び脾臓の重量を測定する。リンパ節重量測定の必要性は申請者の経験に基づいて判断する。

病理組織検査では、胸腺、脾臓、骨髄、投与部位に最も近い所属リンパ系器官、及び投与経路/部位と関連しないリンパ節(1カ所以上)を検査対象とする。投与部位に近い所属リンパ系器官(高濃度の投与薬物に暴露されると考えられる)としては、経口投与では腸間膜リンパ節及びパイエル板、吸入及び経鼻投与ではBALT(吸入)及びNALT(吸入・経鼻投与、可能ならば実施、実際にはげっ歯類が対象)、また、経皮、筋肉内、皮内、髄腔内及び皮下投与では投与部位に近いリンパ節を選択する。静脈内投与の場合の所属リンパ系器官は脾臓である。

3. STP Immunotoxicity Working Groupの
Position Paper²⁾と病理組織検査

リンパ系器官には、骨髄を除いて、免疫担当細胞が特徴的な分布を示す領域構造が認められる。免疫機能が変化し、全身あるいは局所的に免疫担当細胞の数が変化

する、あるいは間質細胞によるサイトカイン産生の変化等によりいわゆる微小環境が変化した場合には、領域の面積やリンパ球密度の変化などのリンパ系器官の組織変化が発生すると考えられる。免疫毒性の評価に適用される病理組織検査では、検査対象のリンパ系器官について、それぞれに特徴的な領域構造とそれらの変化の意味、並びに動物種による組織像の相違をよく理解して、領域毎に面積の変化、リンパ球密度の変化、及びその他の細胞の数の変化等を半定量的に記録することが求められている。免疫系は極めて動的な系であることから、リンパ系器官の組織像には個体差や施設間差が大きく、半定量的評価のための絶対的な基準（グレードの判定基準）を設定することは困難である。このために、リンパ系器官の病理組織検査では、試験毎に対照群を観察して正常範囲を決め、この基準に従って対照群を含めて客観的に領域毎の変化を記録することが必要である。領域の変化が認められた場合、あるいは判断が困難な場合等には、必要に応じて画像解析、免疫組織化学的検査、フローサイトメトリー等を実施することになる。

リンパ系器官に変化が認められた場合には、末梢及び中枢リンパ系器官に観察された所見、器官重量の変化、血液学的検査値の変化、及びその他の毒性学的所見を総合的に評価することにより、認められた変化が当該化合物による直接的な免疫毒性か、あるいは二次的な変化であるかを判断し、免疫毒性標的細胞を推定する。病理検査担当者は、他の毒性学的指標の変化も考慮して、得られた所見の意義について病理学的な見地から考察し、病理検査報告書に記載すべきであろう。

3. リンパ系器官の特徴

免疫系器官では、器官毎に免疫担当細胞が特徴的な分布を示す。以下にその特徴を示す。

(1) リンパ節

輸出／輸入リンパ管、皮質（リンパ濾胞及び濾胞間領域：B領域）、傍皮質領域（T領域）、髄質（髄索と髄腔、B細胞、形質細胞、マクロファージ等が分布）から成る。表皮（ランゲルハンス細胞）、真皮（真皮樹状細胞）や粘膜下組織（粘膜系樹状細胞）で抗原を捕捉した樹状細胞が成熟・活性化しつつ所属リンパ節に移動し、T・B細胞に抗原提示する。これらのリンパ球は活性化して全身を循環してエフェクター細胞として機能し、一部はメモリー細胞として長期間個体中に存在する。

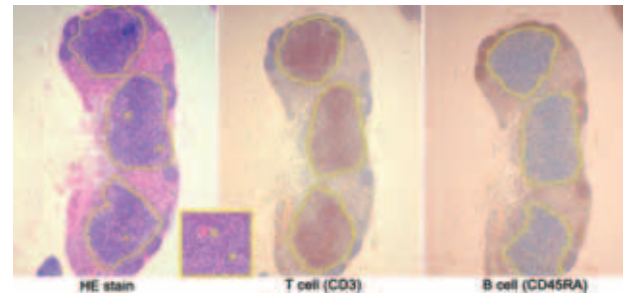


写真1 リンパ節の領域構造（ラット）
黄色線内：傍皮質領域（T領域）、矢印：高内皮細静脈（HEV）

(2) 脾臓

胚中心を含むリンパ濾胞（B領域）、（細）動脈周囲鞘（periarteriolar lymphoid sheath、以下PALS：T領域）、及び辺縁帯（胸腺非依存性抗体産生に関わるB細胞や特殊なマクロファージを含む）からなる白脾髄、Bリンパ球、形質細胞、マクロファージ及び細網細胞等を含む脾索と毛細血管腔である脾洞並びに皮膜と連続する脾柱からなる赤脾髄に分けられる。コンベンショナル動物（イヌ、サル）では胚中心が発達しB領域の面積が大きい。これらの動物に比して、SPF動物ではリンパ濾胞・胚中心の発達は軽度である。ラットではマウスに比して白脾髄の割合が低く辺縁帯が発達している。一方、マウスでは辺縁帯は狭く、ラットに比して白脾髄が占める割合が高い。それぞれの領域に特有の樹状細胞（リンパ濾胞では濾胞樹状細胞、PALSでは指状嵌合細胞等）が抗原提示細胞として分布し、血液中の異物を捕捉してT、B細胞に抗原提示する。

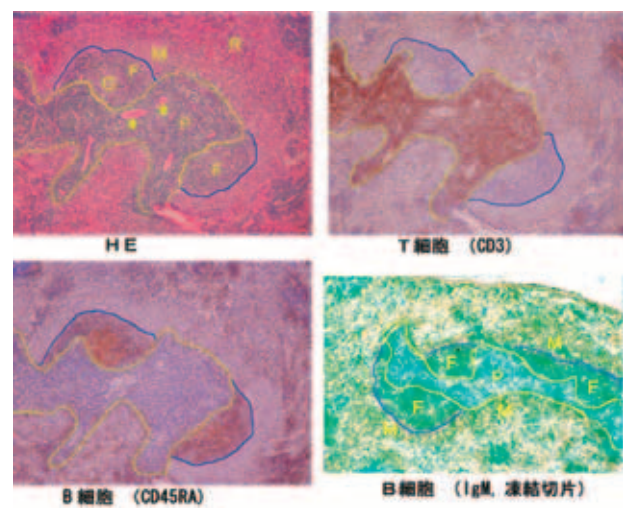


写真2 脾臓の領域構造（ラット）
G：胚中心、F及び青線内：リンパ濾胞（B領域）、M：辺縁帯、P及び黄色線内：PALS（T領域）、R：赤脾髄、矢印：中心動脈

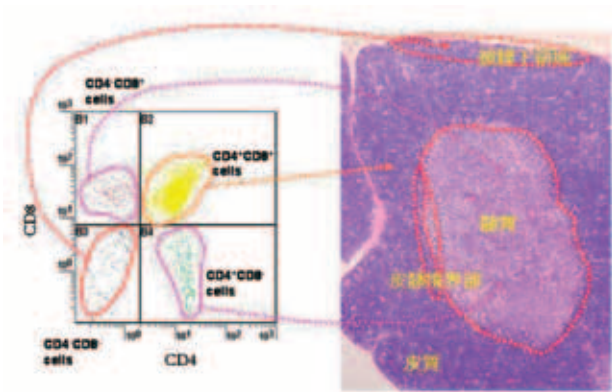


写真3 胸腺細胞のフローサイトメトリーと胸腺の領域構造 (HE染色)

(3) 胸腺

胸腺では、T細胞受容体 (以下、TCR) 遺伝子のランダムな再構築を経て生成されるT前駆細胞から自己抗原 (組織適合性抗原上に結合した自己ペプチド) に反応するT細胞がアポトーシスにより除去され (negative selection)、自己抗原との弱い親和性を示す (すなわち、外来抗原ペプチドが結合した組織適合性抗原と反応する可能性がある) T前駆細胞が選択される (positive selection)。被膜下領域 (epithelium-free areaとして認められる場合もある) には皮髄境界部から胸腺内に入った最も未熟なT前駆細胞 (double negative T細胞) が存在しTCR遺伝子が再構築され、double positive T細胞に分化する。Double positive T細胞は皮質に分布し、positive selectionを経て髄質に移動する。髄質ではnegative selectionにより自己反応性T細胞が除去され、成熟したsingle positive T細胞 (CD4⁺CD8⁻ T細胞及びCD4⁺CD8⁺ T細胞、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞も含まれる) が末梢に供給される。

(4) 骨髄

他のリンパ組織と異なり領域構造は認められない。適

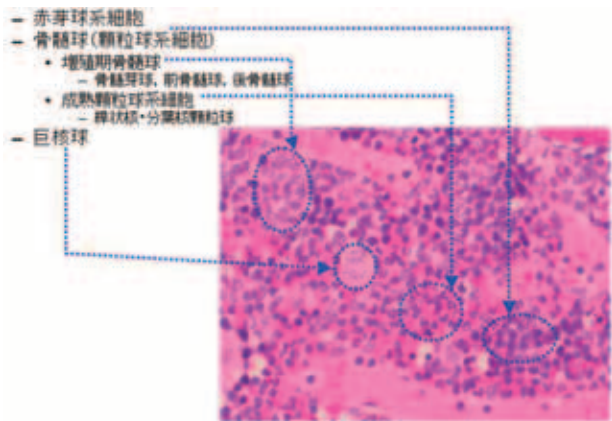


写真4 正常骨髄、HE染色 (ラット)

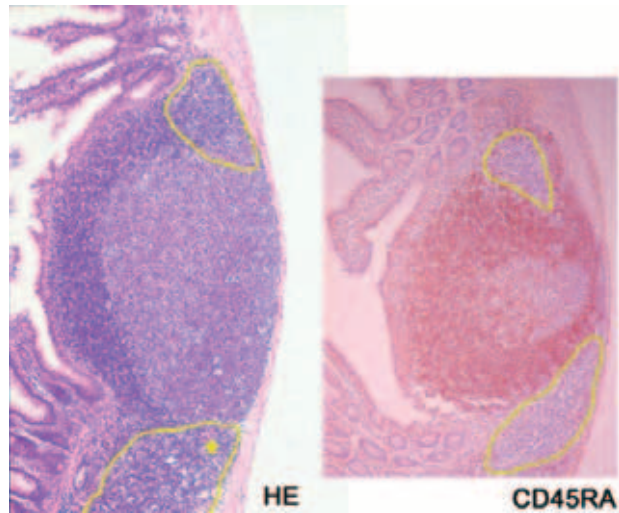


写真5 パイエル板の領域構造 (ラット)
黄色線内：傍濾胞領域 (T領域)、矢印：高内皮細静脈

切に染色されたHE染色標本では、赤芽球系細胞、骨髄球 (顆粒球系骨髄細胞)、巨核球が区別される。骨髄球は、分裂期骨髄球 (骨髄芽球、前骨髄球、骨髄球、後骨髄球) 及び成熟顆粒球 (桿状核及び分葉核顆粒球) が区別される。また、骨髄はT、B前駆細胞の分化、及び抗原刺激されたB細胞の形質細胞への分化・増殖の場であるが、HE染色標本ではリンパ球の動態の把握は困難である。

(5) MALT (パイエル板、NALT及びBALT)

パイエル板は腸管関連リンパ組織 (GALT) の一部であり、特殊な上皮 (濾胞関連上皮: follicle-associated epithelium、FAE、基底側にリンパ球、マクロファージ等を包含するポケットを有する)、上皮下のドーム領域、発達した胚中心を含むリンパ濾胞、及びその周囲にT領域である傍濾胞領域 (濾胞間領域) が存在する。

FAEが捕獲した抗原がドーム領域に存在する樹状細胞やマクロファージに伝達され抗原処理 (プロセッシング) された後に、リンパ濾胞においてリンパ球に抗原提示される。抗原提示され活性化したリンパ球はT領域の高内皮細静脈を経て血流に乗り、やがて粘膜固有層や粘膜下組織に定着してIgA抗体産生を行う (粘膜免疫循環帰巢経路)。

ラットのパイエル板は漿膜面から、イヌのパイエル板は粘膜面から肉眼的に認められる。サルのパイエル板は肉眼的に見出すことがやや難しいが、小腸内腔に固定液を注入して結索して短時間固定することにより、比較的容易に見出せるようになる。

その他の粘膜関連リンパ装置 (MALT) として、BALT (気管支)、NALT (鼻腔) 等が存在する。

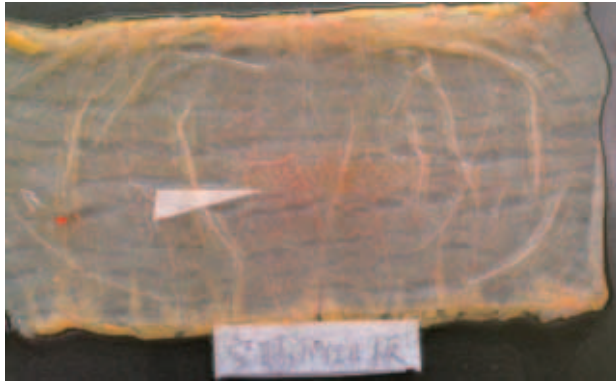


写真6 サルのパイエル板 (株式会社新日本科学 前田博先生提供)

NALTはげっ歯類では、頭骨の第2臼歯を含む横断切片 (Level III切片) において、鼻咽頭管粘膜に接して左右に1対認められる⁴⁾。一方、BALTは肺の通常の病理組織標本において気管支に沿って、動脈との間に分布する。いずれにもパイエル板と同様の領域構造が認められる。

(6) 非リンパ性器官における免疫担当細胞の分布

全身の器官・組織に抗原捕捉あるいは提示能を有する細胞が分布し、異物の侵入を監視する。重要な抗原提示細胞は樹状細胞であり、皮膚表皮細胞間にはランゲルハンス細胞が網眼状に分布し、真皮や粘膜下組織にもそれぞれ固有の樹状細胞が分布する。樹状細胞は体表・粘膜から侵入する異物を取り込み (抗原捕捉)、リンパ管を経由して所属リンパ節に移動してリンパ球に抗原提示し活性化させる。その他の抗原捕捉あるいは提示細胞として、血管内皮細胞、肝臓Kupffer細胞、腎糸球体メザンギウム細胞、中枢神経組織グリア細胞等も重要である。

(7) 自然免疫

抗原受容体 (T細胞/B細胞受容体) を介する獲得免疫には上述の器官・組織が関与し、免疫応答の成立にやや時間がかかる。異物の侵入に対して迅速に応答する自然免疫は少数の受容体により作動する。代表的な例は、病原微生物蛋白等の共通パターンを認識するToll様受容体を介したマクロファージ、顆粒球、血管内皮などが関与する炎症反応である。補体系も炎症反応の惹起や貪食性細胞の機能亢進に作用しており、NK細胞 (免疫複合体の認識による細胞障害、NK細胞受容体を介する腫瘍細胞やウイルス感染細胞の除去) 及びNKT細胞 (腫瘍細胞やウイルス感染細胞の除去) も自然免疫を構成する細胞である。正常組織の観察により自然免疫能の変化を判断することは困難であるが、感染性病変が増加した場合には、炎症像の特徴などから自然免疫の変調を類推できる場合

がある。さらに、自然免疫は樹状細胞の活性化を介して獲得免疫の成立にも関与する。

4. 免疫毒性評価における病理組織検査のポイント

(1) 脾臓及びリンパ節^{5,6)}

上述のように、脾臓及びリンパ節では、B及びT領域が区別される。赤脾髄やリンパ節髄質にもBリンパ球及びマクロファージ等が分布する。これらの領域毎に領域面積の変化、リンパ球密度・数の変化、及び構成細胞の変化等を記録する。確認すべき脾臓及びリンパ節の組織所見の例を以下に示す。

リンパ節	
皮質	増加/減少: 面積 濾胞数 胚中心 リンパ球密度 数増加: アポトーシス細胞 染色性マクロファージ* 形質細胞 色素沈着マクロファージ 顆粒球 (種類) 壊死 肉芽腫/マクロファージ集簇
傍皮質領域	増加/減少: 面積 リンパ球密度 高内皮細静脈発達 数増加: アポトーシス細胞 染色性マクロファージ 形質細胞 色素沈着マクロファージ 顆粒球 (種類) 壊死 肉芽腫/マクロファージ集簇
髄質 (髄索、髄腔)	増加/減少: 面積 リンパ球数 マクロファージ数 形質細胞数 数増加: アポトーシス細胞 染色性マクロファージ 色素沈着マクロファージ 顆粒球 (種類) 壊死 肉芽腫/マクロファージ集簇
皮膜下腔	数増加: リンパ球 マクロファージ 形質細胞 色素沈着マクロファージ 顆粒球 (種類)
その他	
脾臓	
リンパ濾胞	増加/減少: 数 リンパ球密度

ImmunoTox Letter

胚中心	
動脈周囲リンパ鞘 (PALS)	増加/減少: 面積 数 リンパ球密度
辺縁帯	増加/減少: 面積 リンパ球密度
赤脾髄	増加/減少: 面積 リンパ球数 増加: 造血細胞 (赤芽球、骨髓球、巨核球)
数増加 (部位を記録)	形質細胞 アポトーシス細胞 染色性マクロファージ 色素沈着マクロファージ 樹状細胞 (細網細胞、間質細胞) 顆粒球/肥満細胞 肉芽腫/マクロファージ集簇
線維化	
壊死	
その他	
*tingible body macrophage (リンパ球由来アポトーシス小体を貪食したマクロファージ)	

脾臓及びリンパ節の組織所見の評価においては、認められた変化がこれらに共通しているかどうかの一つのポイントになろう。例えばT領域の面積減少が脾臓及びリンパ節に共通して認められれば、毒性標的がTリンパ球である可能性が高く、脾臓のみに認められたならば、脾臓特異的な微小環境 (間質細胞によるサイトカイン産生の変化等) の変化による可能性を考慮する必要がある。また、胚中心の萎縮 (消失) のみが認められるケースと周囲のリンパ濾胞や濾胞間領域の萎縮も併せて認められるケースがある。前者の場合には分裂活性の高い細胞が標的であり、後者の場合には静止期の (成熟) リンパ球に対しても細胞毒性を示すと推測できる (写真7)。

以下の写真は、脾臓のT及びB領域の軽度萎縮例を示す。

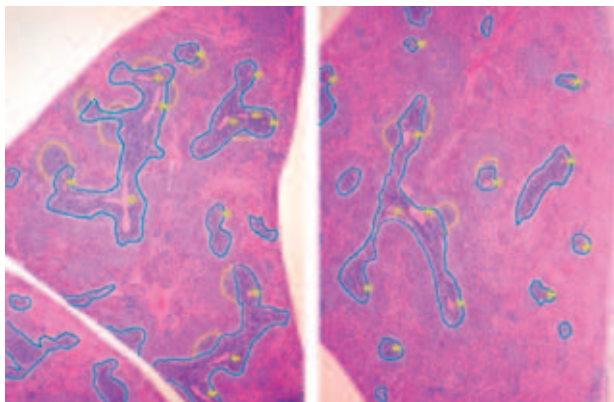


写真7 白脾髄 (PALS及びリンパ濾胞) の軽度萎縮の例 (ラット)。青色線内: PALS、黄色線内: リンパ濾胞、黄色矢印: 中心動脈。

左が正常な (基準とする) 脾臓、右がPALS及びリンパ濾胞の軽度萎縮 (面積減少) を示す脾臓である。青線で囲んだ領域がPALS (T領域)、PALSに隣接する黄色で囲んだ領域がリンパ濾胞 (B領域) を示す。中心動脈 (矢印) に注目すると、薬物投与群では面積の小さいPALSが増加しており、PALSに隣接するリンパ濾胞の数も明らかに減少している。さらに、右の薬物投与群では赤脾髄の面積が増加しており、細網細胞あるいはマクロファージの増加が認められる。この例では脾重量が増加しており、赤脾髄の間質細胞増加が脾重量増加の要因であり、T、B細胞を標的とする免疫抑制状態にあったことが推定される。

なお、リンパ節の病理組織標本作製においては、横断切片では皮質、傍皮質及び髓質の各領域を含む標本が確実に作製できるが、標本作製部位による傍皮質領域の面積の変動が大きいため、縦断切片によりリンパ節の全域を検査するほうが推奨されている。

(2) 胸腺⁷⁾

確認すべき組織所見の例を以下に示す。

皮質	増加/減少: 面積 リンパ球密度 増加: アポトーシス細胞 染色性マクロファージ (星空像) 壊死
髓質	増加/減少: 面積 リンパ球密度 増加: アポトーシス細胞 染色性マクロファージ 壊死 上皮細胞発達 (索状、管状)
皮質/髓質面積比: 増加/減少	
被膜下領域 (epithelium-free areas: EFA) 評価せず/存在せず 増加/減少: サイズ リンパ球数 数増加: アポトーシス細胞 染色性マクロファージ 壊死	
その他	炎症 嚢胞 色素沈着 髓外造

分裂活性の高い細胞にアポトーシスを誘導する化合物では、胸腺細胞のアポトーシスが増加し (染色性マクロファージ/星空像の増加)、皮質が萎縮する。細胞毒性が強い場合には急性のリンパ球壊死が慢性に発生し、壊死細胞が髓質に移行してマクロファージにより処理されるが、皮質にマクロファージが浸潤する場合もある。皮

質の萎縮に伴って髄質の肥大が認められた場合には増加したリンパ球のフェノタイプを明らかにすることが有用であろう（本来除去されるべきT細胞の残存、成熟T細胞の末梢への放出の阻害、末梢リンパ球の蓄積等の可能性が考えられる）。また、皮質萎縮からの回復過程では被膜下領域を中心に大型リンパ球が一過性に増加する。

(3) 骨髓⁸⁾

以下に確認すべき所見の例を示す。

数の増加/減少:

骨髓球: 増殖期細胞 (前骨髓球~後骨髓球)
成熟顆粒球 (桿状核、分葉核顆粒球)
赤芽球
巨核球
脂肪細胞
細網細胞 (間質細胞)
マクロファージ
ヘモジデリン沈着

壊死

出血/血管拡張

線維化

肉芽腫

腫瘍

その他

骨髓球: 赤芽球比 (M:E比)

対照群の標本とよく比較して、各造血細胞の増減及びその他の変化を観察する。必要ならば、M:E比を求める。

HE染色標本上で骨髓におけるリンパ球の動態を把握することは困難であるから、M:E比に変化がみられた場合に、リンパ球比も変化する可能性を考慮して、骨髓塗抹標本あるいはフローサイトメトリーにより骨髓細胞構成比を求めるとよい。

一方、HE染色標本上で顆粒球系細胞の変化を把握することは比較的容易である。血液学的検査の結果と併せて顆粒球系細胞への影響を評価する。血液中及び組織中での顆粒球の寿命が短いことから末梢血中の顆粒球数と骨髓組織像は関連して変化する。骨髓球(顆粒球系骨髓細胞)の増加(過形成)に関しては発生要因を見極めることが重要である。例えば、骨髓球過形成は重篤な細菌感染に対する適応性の反応としてしばしば認められ、骨髓障害からの回復過程における一過性的変化としても認められる。

(4) MALT (パイエル板、NALT、BALT) ⁸⁾

パイエル板の組織標本は横断切片、縦断切片、あるいは“Swiss roll”法のいずれによっても作製が可能なので、施設毎に標準的な作製法を定めておく。通常は横断あるいは縦断切片でパイエル板の組織標本を作製し、慎重な

検討が必要と判断される場合にはSwiss roll法で作製する、といった使い分けも可能であろう。

いずれも、領域毎に面積やリンパ球密度の変化などを観察する。以下に所見の例を示す。

リンパ濾胞

増加/減少: 濾胞数
面積
リンパ球密度
胚中心数
胚中心面積

傍濾胞 (濾胞間) 領域

増加/減少: 面積
リンパ球密度

数増加:

アポトーシス細胞
染色性マクロファージ
形質細胞
色素沈着マクロファージ
顆粒球 (種類)

高内皮細静脈発達

肉芽腫/マクロファージ集簇

濾胞関連上皮 (FAE) 潰瘍

壊死 (部位)

その他

(5) 自然免疫の変調

皮下組織や粘膜下組織の炎症性変化は自然免疫が関与する変化である。感染性の病変(好中球浸潤等)の増加は免疫抑制の可能性を示唆する。浸潤細胞の構成から毒性標的細胞が推測される場合がある。例えば、末梢リンパ系器官のリンパ球領域には抑制性的変化がみられず、好中球浸潤が異常に多ければ好中球機能抑制の可能性が考えられる。炎症の拡大にもかかわらず炎症巣への好中球浸潤が軽度で、末梢血好中球の増加が顕著であれば、好中球浸潤(ホーミング)の抑制が推定される。抗体産生の抑制、NK細胞活性の低下によっても炎症像は増悪しうる。

5. ストレスによる免疫抑制と鑑別

ICH免疫毒性試験ガイドラインのAppendix 1.4にストレス性変化についての記載がある。最大耐量(MTD)に近い用量で、ストレス(摂餌抑制、一般状態の悪化、過度の薬理作用の発現等)に関連した免疫抑制所見がみられることがある。これは、ACTH及びグルココルチコイドの分泌亢進に伴う変化であり、通常は体重増加抑制や一般状態の悪化等がみられる高用量のみで胸腺萎縮、副腎皮質肥大、好中球数の増加及びリンパ球数の低下等が認められる。しかし、これらの所見が認められた場合には、ストレスに関連した非特異的な免疫抑制と判断する場合には、明確な根拠が求められる。

動物が瀕死の状態、常在菌による感染が発生した場

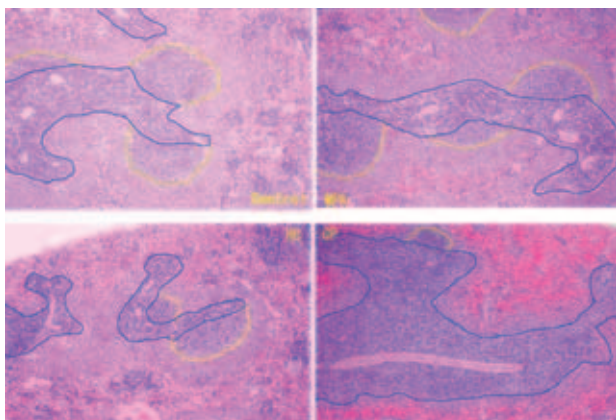


写真8 Medroxyprogesterone acetate (MPA、10mg/kg)、hydrocortisone (HC、10mg/kg)、及びcyclophosphamide (CP、3mg/kg)をそれぞれ4週間反復投与したラット脾臓のHE染色像。青色線内：PALS、黄色線内：リンパ濾胞。

合には、通常は免疫系器官が高度に萎縮する。このような場合には、Toll様受容体を介したリンパ球アポトーシスの発生、あるいはdexamethasone高用量投与時に類似した高度のストレスを介した変化の可能性が考えられる。一方、最大耐量付近の用量で体重増加及び摂餌の抑制、副腎皮質肥大及び胸腺皮質の萎縮が認められた場合には、一般的にストレス性の非特異的な免疫抑制の可能性を考える。この場合には、胚中心の発達を含めてB領域の変化は軽微であり、むしろT領域に萎縮傾向が認められる。

写真7には、グルココルチコイド様作用を示し副腎皮質束状帯の萎縮を誘発するmedroxyprogesterone acetate (MPA、10mg/kg)、hydrocortisone (HC、10mg/kg)、ならびにcyclophosphamide (CP、3mg/kg)をそれぞれ4週間反復投与したラット脾臓HE染色像を示す。いずれの投与群にも胸腺皮質の萎縮が認められたが、グルココルチコイド作用のあるMPA及びHC投与群ではB領域の変化は明らかではなく、T領域の面積減少が低頻度で認められた。一方、CPはB細胞に対する毒性が強く、リンパ濾胞及び辺縁帯面積の明らかな減少、及び赤脾髄リンパ球の明らかな減少が認められる。

6. 終わりに

免疫毒性試験ガイドラインにおける病理組織検査について、STP Immunotoxicity Working GroupのPosition Paperにおいて述べられた病理組織検査の項目を中心に述べ、自然免疫の変調及びストレスに関連した免疫抑制の特徴にも言及した。4週間反復投与毒性試験において、リンパ系器官の領域毎の組織所見、及び免疫担当細胞が分布する器官・組織の組織所見から、免疫毒性の機序及び標的細胞が推定できるケースが少なくない。このよう

な知見に基づいてさらに実施すべき免疫毒性試験を選択する。また、自然免疫及び獲得免疫の仕組みについてよく理解し、それらをベースにして臨床病理データの変化や組織所見を総合的に評価することが重要である。

7. 参考文献

- 1) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals S8
URL: http://www.ich.org/MediaServer.jsr?@_ID=1706&@_MODE=GLB
- 2) Haley P, et al.; STP Immunotoxicity Working Group. STP position paper: best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system. *Toxicol Pathol.* 33 (2005): 404-407
- 3) Enhanced histopathology of lymphoid tissues. *Toxicol Pathol*, 34(2006): 631-633.
- 4) Boorman GA and Morgan KT. (1990) Nose, larynx, and trachea. In *Pathology of the Fischer Rat* (Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA and MacKenzie WF, eds), pp315-323. Academic Press, San Diego, CA.
- 5) Elmore SA (2006) Enhanced histopathology of the lymph nodes. *Toxicol Pathol*, 34: 634-647.
- 6) Elmore SA (2006) Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol*, 34: 648-655.
- 7) Elmore SA (2006) Enhanced histopathology of the thymus. *Toxicol Pathol*, 34:656-665.
- 8) Elmore SA (2006) Enhanced histopathology of the bone marrow. *Toxicol Pathol*, 34:666-686.
- 9) Elmore SA (2006) Enhanced histopathology of mucous-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol*, 34:687-696.
- 10) Kuper CF, et al. Histopathologic approaches to detect changes indicative of immunotoxicity. *Toxicol Pathol.* 28 (2000): 454-466
- 11) Shoham J.(1992) The effect of nutrition on the immune system. In *Principles and Practice of Immunotoxicology*, Miller K, Turk J and Nicklin S (Eds.) pp161-201, Blackwell Scientific Publications, London.

Histopathological examination for immune systems based on ICH S8 guideline

Shigeru Hisada

(Safety Research Department, ASKA Pharmaceutical Co., Ltd.)

The ICH guideline for immunotoxicity studies has recommended that data from standard toxicity studies should be evaluated for signs of immunotoxic potential. Regarding histopathological examination, the guideline has commented that the methods for evaluating tissue sections are described in more detail in documents from professional toxicological pathology societies. In this review, therefore, I describe the methods of histopathology for immune systems in Japanese, making reference to the article reported in the Toxicology Pathology (Volume 34, Number 5, 2006).

日本免疫毒性学会との研究交流

Jean F. Regal (University of Minnesota Medical School)

昨年度のDr. Cohenに続いて、米国毒性学会(SOT)免疫毒性分科会のメンバーであり、Journal of Immunotoxicologyの編集にも関わっているDr. Regalが、今年度倉敷で開催された第13回日本免疫毒性学会学術大会で特別講演をされました。その講演の内容を含めた研究交流記を寄稿していただきました。Dr. Regalの記事からは、本学会とSOT免疫毒性分科会メンバーの交流がscienceとnon-scienceの両面から大いに促進されたことがわかりますが、特に「Hospitality and Sightseeing」はA+と評価されています。

Scientific Exchange with the Japanese Society of Immunotoxicology

Contributed by Jean F. Regal, Ph.D.

(Professor of Pharmacology

University of Minnesota Medical School

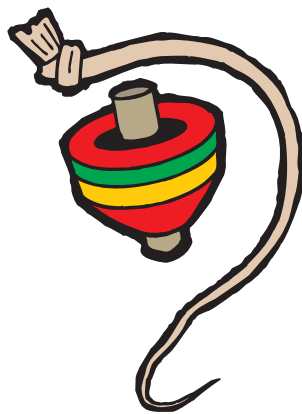
Duluth, Minnesota)

The Science:

It was my honor and pleasure in September of 2006 to travel to Kurashiki, Japan to present my Immunotoxicology research at the 13th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunotoxicology. As a researcher in occupational asthma, I was eager to share my findings and profit from a wide variety of backgrounds and viewpoints in Immunotoxicology. As a member of the Immunotoxicology Specialty Section of the Society of Toxicology I had met Drs Harada, Nakamura, and Nohara in San Diego at a meeting earlier in the year, and I was looking forward to meeting many other immunotoxicologists in Kurashiki.

My first stop was Osaka with Dr. Kazuichi Nakamura where I presented a lecture at Shionogi & Co., Ltd. discussing the role of the complement system in occupational asthma in a guinea pig model. The questions and feedback from that session were invaluable. On to Kurashiki!

In Kurashiki, my lecture was entitled “Models and Mechanisms of Chemical Respiratory Allergy.” Numerous allergens cause occupational asthma including trimellitic



anhydride (TMA), a small molecular weight chemical, and ovalbumin (OVA), a reference protein allergen. Heterogeneity in asthma has long been recognized and many clinical variations have been described relating to occupational exposure, age of onset, gender, association with atopy, type of airway inflammation, etc. Different allergens may also contribute to the heterogeneity in asthma by setting into motion unique effector pathways leading to asthma symptoms. We hypothesized that different effector mechanisms are responsible for the symptoms of asthma, depending on the allergen. A mouse model of asthma was used and groups of mice were sensitized and challenged with either TMA or OVA and the allergic response monitored by eosinophil infiltration into the lung. Both allergens caused a similar increase in eosinophils in the lung. RNA was isolated from whole lung lobes of animals and the change in gene expression from control assessed for each allergen. Using Affymetrix gene arrays, a subset of genes expressed in common for both allergens reflect a common effector pathway for asthma, regardless of the allergen. However, distinct transcriptional signatures were also noted in lungs of mice challenged with OVA versus mice challenged with TMA, with the same eosinophil infiltration. Further studies focused on a subset of the 565 genes that were up-regulated in the effector phase with OVA but not with TMA, suggesting mechanistic differences leading to the asthma phenotype. Quantitative RT-PCR confirmed selected microarray results. Our initial array analysis focusing on increased arginase has been published in *Toxicological Sciences*. Our continued studies have more closely investigated the role of arginase and eotaxin 1 in the effector phase of the asthmatic response with the two

allergens OVA and TMA. To date, our unpublished data indicates that airway hyperresponsiveness is not evident in TMA sensitized and challenged animals as compared to OVA sensitized and challenged animals. Thus, increased arginase 1 may reduce arginine availability for production of the bronchodilator nitric oxide in OVA, but not in TMA induced asthma. The data suggest that pathways of arginine metabolism and the importance of nitric oxide in asthma may differ with the allergen. In addition, ELISA using lung homogenates confirmed that eotaxin 1 protein was increased significantly in OVA but not TMA-induced asthma. However, the concentrations of eotaxin 2 in bronchoalveolar lavage cells and lung tissue were the same for both allergens. Thus the critical chemokines resulting in eosinophil infiltration may differ with OVA and TMA. Our data overall indicate that different allergens evoke unique effector pathways, and therapeutic strategies in asthma may need to preferentially target different mediators or different symptoms depending on the inciting allergen.

The questions and comments from the audience at JSIT were outstanding and I would like to thank Dr. Morimoto for chairing the session and for his insightful comments. My discussions with attendees for the rest of the afternoon and into the evening were very stimulating and useful for my future research.

The Non-Science Hospitality and Sightseeing: A+

I must thank many people for making the scientific exchange possible, and my Japanese hosts for making it so pleasant and memorable, beyond the science. Thanks



photo 1



photo 2

to Dr. Takema Otsuki for the privilege of speaking at the JSIT meeting and many thanks to Dr. Kazuichi Nakamura for providing an opportunity for me to also present a lecture at Shionogi & Co., Ltd. Certainly, without Dr. Nakamura's assistance, I would still be lost in the Osaka train stations. The dinner reception at Tivoli Park was wonderful. The premiere of Dr. Otsuki's "Song for the 13th JSIT" calling for us to "talk together to develop the strategies to overcome the impairments from immunotoxicity" is never to be forgotten. The food and discussion were wonderful and the reception provided a great opportunity for informal scientific exchange. While in Kurashiki, Dr. Katsuyama very kindly arranged a tour of the Okayama area. Dr. Katsuyama's wife and daughter showed us many sites including Crow Castle and the Okayama Gardens where we experienced a traditional Japanese tea with Okayama dumplings in a gorgeous setting. I learned so much about Japan in our conversations over lunch and tea. Thank you, Kumi and Midori, for a very relaxing and informative day.

After Kurashiki, Dr. Nakamura took time from his busy schedule to show me many wonderful Japanese sites. His thoughtful and detailed travel arrangements for my travel to Kurashiki, Osaka, Himeji, and Kyoto were so appreciated. (photos 1 & 2) I saw so many new and different sites including the impressive Himeji castle, Nijo castle with the squeaky floors, and the Golden Palace. The 'all tofu lunch' was wonderful and certainly something I could not find in Minnesota. Discussions with Dr. Nakamura and his students, Ryou and Misa, again taught me so much about Japan. Wonderful meals and wonderful conversation!

I boarded the airplane in Osaka, eager to return to my laboratory with new ideas and scientific perspectives, and not so eager to leave the wonderful people I had met and the beautiful sights of Japan.

Thank you all!



櫻井照明先生の急逝のお知らせ

事務局 香山不二雄

櫻井照明先生が9月15日早朝、脳卒中のため急逝されました。倉敷市での学会の懇親会の後、倉敷駅前のホテル前で将来の研究のことなどを語り合いましたが、それが最後となりました。その時はいつも通りで、飲み過ぎているわけではなかったのですが、早朝に急逝されました。当学会にとっても大変大きな人材を失いました。ノースカロライナ州のNIH/NIEHSに留学中の彼に初めて会い、その後、当学会以外でもChalk Talk、SOTなどでもよく一緒になり、楽しい時間を過ごしましたが、大変残念でなりません。謹んでご冥福をお祈りいたします。合掌。

編集後記

今回から、免疫毒性の分野の国際化をめざし、外国からの学会への参加をアピールするために、英語の要旨を掲載することといたしました。免疫毒性研究の国際化と発展に寄与できればと思っております。

9月に倉敷で開催されました免疫毒性学会の学会大会も第13回を数えました。病態の形成と免疫毒性のテーマのもと、内容の充実の図られた、また会員の積極的な意見交流のなされた印象深い学会でした。

今回は、編集委員を務めてくださっていた櫻井照明先生の急逝という悲しいお知らせもしなければなりません。昨年からは、編集委員の若手のホープとして、若手の会員の原稿を積極的に集めていただいております。独自の哲学を持ち、真摯に研究にとりくんでおられた姿が印象に残っています。これからの免疫毒性学会を担っていかれる若手の先生の死は、とても悲しいものがあります。櫻井先生の意志を引き次いで、免疫毒性学会の上昇気流の感じられる若手の意見もどんどんとり入れたImmunoTox Letterとしてゆきたいと思います。皆様のご協力をよろしくお願いいたしますとともに、櫻井先生のご冥福をお祈り致します。

(R.T.記)

編集・発行：日本免疫毒性学会

発行日：平成18年12月

編集発行責任者：大沢 基保

編集委員会：櫻井 照明、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