

# ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会: The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 23 No.1 (通巻 45 号) 2018. 6 月

— 目次 —

第 25 回日本免疫毒性学会学術年会(予告 2) ……1  
 国立研究開発法人国立環境研究所 野原恵子  
 第 6 回(2016 年度)日本免疫毒性学会学会賞……3  
 残留農薬研究所 小坂忠司  
 第 7 回(2017 年度)日本免疫毒性学会学会賞……7  
 元国立環境研究所 藤巻秀和  
 第 7 回(2017 年度)日本免疫毒性学会奨励賞 ……11  
 慶応義塾大学 山浦克典  
 シリーズ「免疫毒性研究の若い力」17 …………… 14  
 産業医科大学 辻 真弓  
 サンアントニオでの SOT 年次総会ならびに  
 ITSS への参加報告 …………… 16  
 東京慈恵会医科大学 木戸尊将  
 Short talks on the shoulders of giants……………18  
 医薬基盤・健康・栄養研究所 黒田悦史  
 ImmunoTox Letter Digest …………… 21

## 第 25 回日本免疫毒性学会学術年会 (JSIT2018)(予告 2)

日本免疫毒性学会の第 25 回学術年會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。今回は初の試みとして、非会員でも参加費のみで年會に参加し発表も可能という制度を試行し、広いテーマの演題を募集いたします。多数の皆様のご参加をお待ちしております。詳しくは学術年會ホームページ(<http://jsit2018.jp/>)をご覧ください。

会 期 : 2018 年 9 月 18 日(火)~19 日(水)  
 会 場 : つくば国際会議場  
 〒305-0032 茨城県つくば市竹園 2-20-3  
<https://www.epochal.or.jp/index.html>  
 つくばエクスプレス つくば駅より徒歩 10 分

テ ー マ:『徹底討論!免疫と環境』

年 会 長 :野原恵子

国立研究開発法人国立環境研究所  
環境リスク・健康研究センター

事 務 局 :第 25 回日本免疫毒性学会学術年會事務局  
〒305-8506

茨城県つくば市小野川 16-2

国立研究開発法人国立環境研究所  
環境リスク・健康研究センター内

担当 鈴木武博

TEL:029-850-2570/FAX:029-850-2237

Email: [jsit25-office@nies.go.jp](mailto:jsit25-office@nies.go.jp)

演題募集締め切り日:

2018 年 7 月 13 日(金)

参加申し込み締め切り日:

2018 年 7 月 20 日(金)

参 加 費: 一般会員:事前登録 7,000 円(当日 9,000 円)

学生会員 : 事前登録 3,000 円(当日 5,000 円)

非 会 員: 事前登録 9,000 円(当日 11,000 円)

その他、新会員、協賛・後援学会会員の割引があります。

懇 親 会: 学術年會1日目(9 月 18 日(火))

ホテルグランド東雲 [www.hg-shinonome.co.jp/](http://www.hg-shinonome.co.jp/)

懇親會費 : 一 般:事前登録 6000 円(当日 8,000 円)

学生会員 : 事前登録 4,000 円(当日 6,000 円)

プログラム(予定)

■9 月 18 日(第1日目)

9:20-12:05

・ 開會式 ・ 一般演題(口頭発表)・ 企業展示

12:15-18:00

・ ランチョンセミナー1

コーヴァンス

- ・ 総会
  - ・ 教育講演  
吉村 昭彦(慶応大学)  
「T細胞のエピジェネティック改変による免疫疾患制御」  
(仮題)
  - ・ シンポジウム  
腸内細菌と免疫疾患  
ー免疫毒性学研究における新たな視点ー  
柳澤 利枝(国立環境研究所)  
下条 直樹(千葉大学)  
渋谷 彰(筑波大学)  
竹田 潔(大阪大学)
  - ・ 一般演題(ポスター・ディスカッションセッション)  
18:30-20:30 懇親会 ホテルグランド東雲
- 9月19日(第2日目)  
9:00-11:50
- ・ 一般演題(口頭発表)・ 企業展示
  - ・ インターナショナルセッション  
Khaled Hossain (University of Rajshahi, Bangladesh),  
Myint Myint Nyein (University of Medicine (1), Myanmar)
  - ・ 特別講演  
B. Paige Lawrence  
(University of Rochester School of Medicine, USA)  
“Developmental exposure alters cellular processes critical for T cell functions, and affects some T cell properties across generations”

- ・ ランチョンセミナー2  
日本チャールス・リバー
  - ・ 日本免疫毒性学会学会賞・奨励賞 授賞式・受賞講演
  - ・ 試験法ワークショップ  
がん免疫療法の開発と免疫チェックポイント剤の安全性評価  
ー非臨床試験及び臨床試験の果たすべき役割  
について考えるー  
オーガナイザー:久田 茂(あすか製薬)  
珠玖 洋(三重大学)  
田口 和彦(プリストル・マイヤーズ スクイブ(株))  
佐藤 実(産業医科大学)  
パネルディスカッション  
免疫亢進に伴う副作用の予測やリスク管理における非臨床試験の果たすべき役割と可能性
  - ・ 一般演題(ポスター・ディスカッションセッション)・閉会式
- 年会において優秀な一般演題を発表した会員に対し、「年会賞」、並びに「学生・若手優秀発表賞」を贈呈します。



第 6 回(2016 年度)日本免疫毒性学会学会賞

農薬の免疫毒性作用

小坂忠司 (一般財団法人残留農薬研究所 試験事業部)

〔目的〕

農薬の有機塩素系殺虫剤 ( $\gamma$ -BHC、DDT、ペンタクロロフェノール等) および有機燐剤 (メチルパラチオン) ではマウスおよびラットの反復投与実験にて抗体価の抑制を主体とする免疫抑制作用を示唆する事例はよく知られているものの、免疫毒性作用を詳細に検証した報告は少ない。また、有機塩素系農薬の生殖毒性試験 (2 世代繁殖試験) においてしばしば農薬曝露後の児動物に胸腺委縮が認められ、児動物への免疫毒性影響が示唆されている。そこで、我々は主に児動物へ免疫毒性影響に着目して、農薬の免疫抑制影響の研究を始めた。

〔実験成績〕

1) 農薬のアポトーシス誘発反応

メトキシクロル、パラチオン、メタミドホス等の農薬による胸腺細胞アポトーシス誘発について検討した。インビトロ実験では、マウス胸腺細胞及び Jurkat 細胞を  $1 \times 10^{-8} \sim 10^{-5}$  M 濃度の被験物質曝露条件下で 4 ないし 8 時間 37°C で培養 (10%FCS 添加 RPMI 1640 培地) した結果、メトキシクロルおよびパラチオンともに胸腺細胞及び Jurkat 細胞のアポトーシス誘導が観察された。

一方、動物実験において妊娠ラットにメトキシクロルを 100、500、1000 ppm 濃度にて混餌投与して、フローサイトメータ解析及び病理組織検査にて出産児の胸腺アポトーシスを観察した結果、2 週齢時の児ラット胸腺に CD4CD8 陽性 T 細胞数の減少及び TUNEL 陽性細胞数の増加が見られた。次に、動物実験として未成熟マウスにメトキシクロル (150、300、400 mg/kg) を短期間投与した結果、高用量投与群に胸腺細胞のアポトーシス陽性細胞 (図 1) 並びに DNA ラダーが観察された。

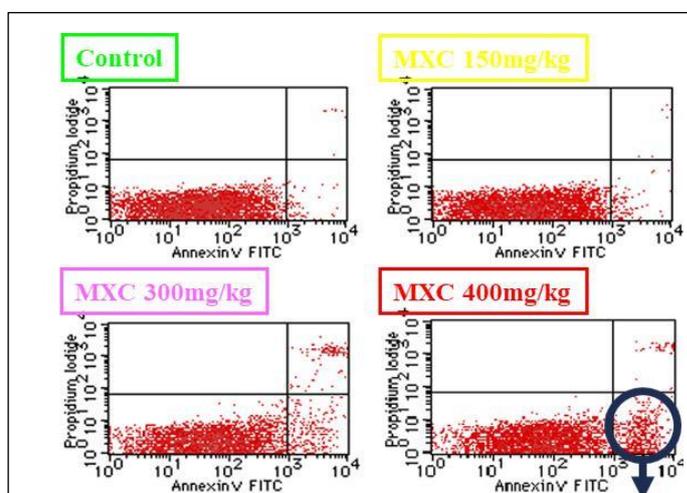


図 1 幼若マウスのメトキシクロル短期投与によるアポトーシス誘発

2) 農薬の免疫抑制作用

農薬の免疫抑制作用について、5日間反復経口投与の予備検討の結果、メトキシクロル、パラチオンで免疫抑制反応が認められた。そこで、ICR、Balb/c 及び C3H/He 系マウスを用いて、メトキシクロルを 150、500、1500 ppm 濃度で混餌投与して、検査 4 日前に羊赤血球 (SRBC : Sheep red blood cell) の静脈内感作投与 ( $6 \times 10^7$ /匹) を行い、血中抗 SRBC IgM 抗体価測定及び脾臓細胞中の IgM PFC (Plaque-forming cell) 反応検査を実施した。その結果、図 2 に示すように何れの系統のマウスにも IgM PFC 反応の有意な減少が認められ、特に Balb/c 及び C3H/He 系マウスには用量相関性の減少が観察された。また、抗 SRBC IgM 抗体価も同様の減少が観察された。

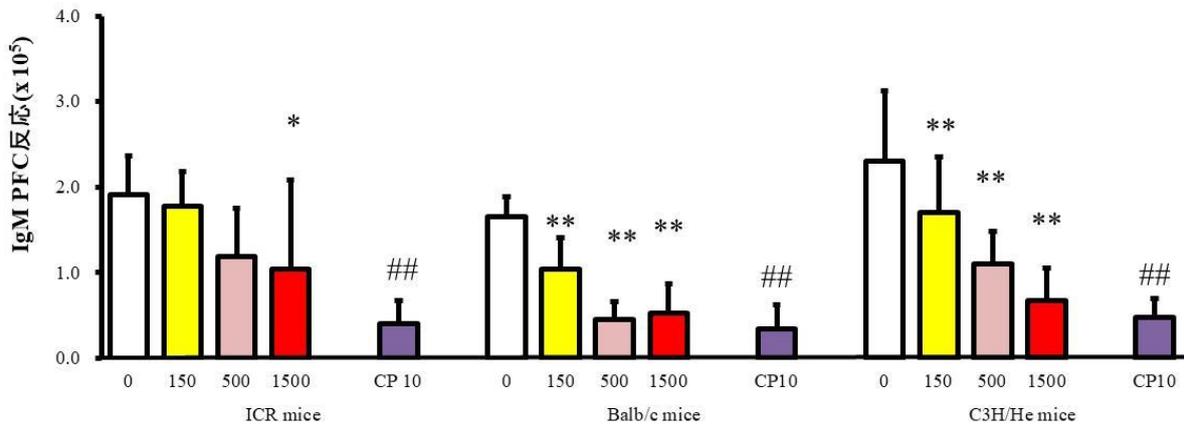


図 2 メトキシクロル 2 週間混餌投与による免疫抑制反応 (IgM PFC 反応)

これらの事より、農薬の免疫毒性作用において胸腺細胞のアポトーシス誘発作用と免疫抑制作用との間に強い関連性が伺えた。加えて、免疫毒性研究調査においてマウスの反復投与を用いた IgM PFC (Plaque-forming cell) 反応検査及び抗 SRBC IgM 抗体価測定検査が免疫毒性 (免疫抑制) の評価に有用である事が示された。

3) 農薬による皮膚アレルギー反応増悪作用

3-a) LLNA (Local lymph node assay) 法を用いた皮膚アレルギー反応

LLNA 試験前の前投与としてメトキシクロル (100 及び 300 mg/kg 用量) 及びパラチオン (0.4 及び 1.2 mg/kg 用量) を 3 週齢の CBA/J 系マウスに 5 日間反復経口投与した後、4 週間後に皮膚感作性物質のフェノキシ酢酸系農薬 (DB) の LLNA 実験を実施した。その結果、図 3 に示すようにメトキシクロル及びパラチオン投与によりリンパ球の増殖活性は高まり、アレルギー反応の増悪化が観察された。LLNA 反応の指標である EC3 (対照群に対して 3 倍の刺激性反応が認められる用量) で比較すると、何れも約 5 倍の増悪化 (約 5 倍の低濃度で反応) が認められた。本実験とは別に実施した感作陽性対照物質の TMA (トリメチル酢酸) の LLNA 実験でも EC3 で 10 倍以上の増悪化が観察された。

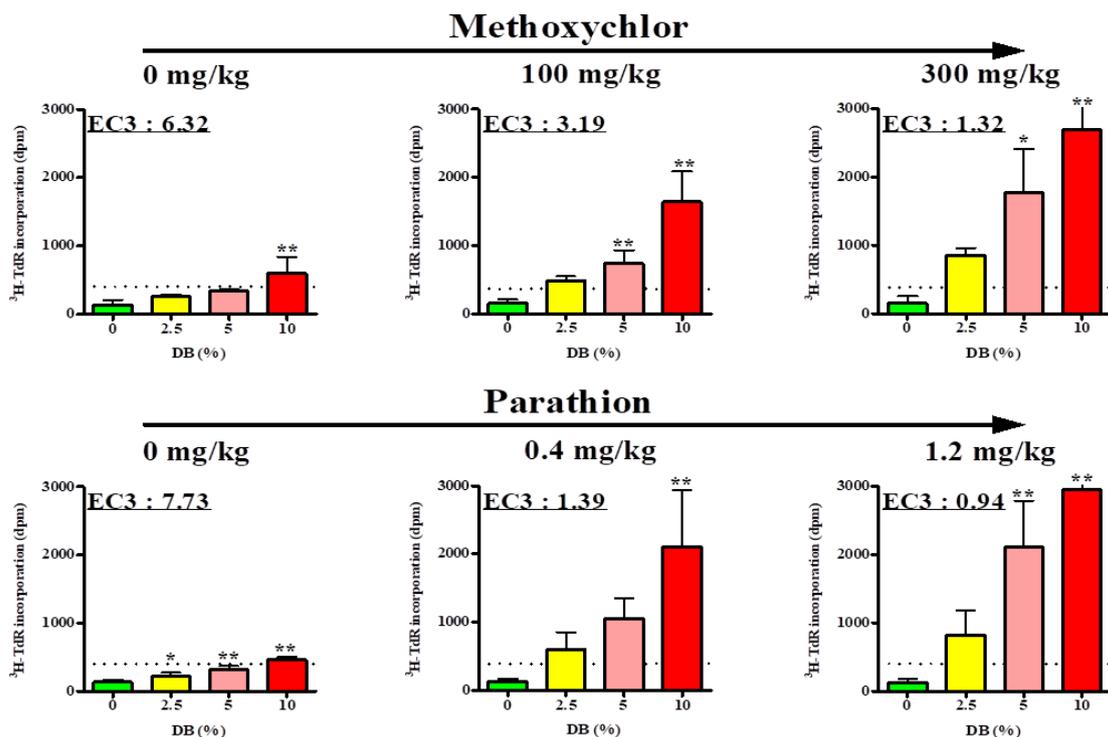


図3 メトキシクロル及びパラチオン前投与による皮膚アレルギー反応 (LLNA 実験)

### 3-b) アトピー性皮膚炎モデルを用いた皮膚アレルギー反応

アトピー性皮膚炎誘発前の前投与としてメトキシクロル (30 及び 100 mg/kg 用量) 及びパラチオン (0.15 及び 1.5 mg/kg 用量) を 4 週齢の NC/Nga 系マウスに 5 日間反復経口投与した後、4 週間後に感作性物質の TNCB (トリニトロクロロベンゼン) を感作 (腹部に経皮感作)・惹起 (耳介に 9 回経皮投与) を実施した。その結果、メトキシクロル及びパラチオン投与群では対照群と比べて有意な耳介皮膚肥厚及び皮膚症状スコアの増加が用量相関性に認められ、皮膚炎反応の増悪化が観察された。

以上のように、メトキシクロル、パラチオン等の免疫抑制作用を有する農薬はそれ自体の免疫抑制作用に加えて皮膚アレルギー増悪作用を有する事が明らかとなった。

### 4) メトキシクロルの次世代への影響

メトキシクロルを妊娠期間及び授乳期間母獣ラット (SD 系ラット) に 30、100、300、1000 ppm の濃度で混餌投与すると、高用量群の児動物に胸腺萎縮、脾臓重量低下、T 及び B 細胞数の減少等の免疫抑制がみられ、52 週齢では高用量群の雌動物で腎糸球体領域の増加や免疫複合体の沈着、血中 IgM の増加を主徴とする自己免疫性の腎糸球体病変が認められた。

〔まとめ〕

以上のように、農薬の免疫系への影響として免疫抑制作用だけではなく、アレルギー反応増悪の影響、さらに次世代にも影響を及ぼして自己免疫性病変誘発の可能性を強く示唆した。以上の実験では農薬の免疫影響を示したことに加えて、一般化合物のアレルゲン作用検出法、短期間投与での免疫抑制作用検出法、アレルギー増悪作用検出法などの免疫毒性評価方法の開発についても幅広く成果をあげられたと考えられる。

〔謝辞〕

この度は、第4回日本免疫毒性学会学術年会において年会賞をいただき大変光栄に感じております。今回の年会賞は弊所での農薬の免疫毒性作用解明研究を実施する中で免疫毒性学会での発表を中心にまとめたものであります。本発表での結果は、論文発表を介して広く世間に農薬の免疫毒性影響を提示したことで社会貢献を果たしたものと考えております。最後に、本研究を分担あるいは支えてくださった一般財団法人残留農薬研究所毒性部免疫・急性毒性研究室、神経毒性研究室、病理学研究室の各室員の皆様に深謝致します。

末筆ではございますが、日本免疫毒性学会の益々の発展をお祈りしつつ、我々も日本免疫毒性学会に貢献できるように努めていく所存でございます。



小坂忠司先生

## 第 7 回(2017 年度)日本免疫毒性学会学会賞

揮発性有機化合物に関する免疫毒性研究

藤巻秀和 (元国立環境研究所主席研究員)

### 1. はじめに

環境中には健康リスクが高いと考えられる多種類の化学物質が存在しており、中にはアレルギー疾患等の増加との因果関係について危惧されているものもある。また、いわゆる「シックハウス症候群」や「本態性多種化学物質過敏状態」などにみられる室内での低濃度の揮発性有機化合物 (VOC) の曝露によると考えられている体調不良なども報告されている。しかしながら、その解明に向けた取り組みは遅れており、実験動物を用いての研究も報告が少ない。そのような状況ゆえに、環境中の低濃度の VOC による健康影響、生体影響の解明は急務と考えられている。今回の研究では、1、環境中の濃度を考慮した低濃度の VOC 曝露が実験動物の免疫系に及ぼす影響、2、生体の恒常性維持機構において重要な免疫-神経間での情報伝達経路へのかく乱作用の有無、3、室内での滞在時間が多く、大人に比べ感受性が高いといわれている幼児、小児などの発達期の免疫系への影響について実験動物を用いて解明することを目的として、低濃度 VOC による免疫関連領域における健康影響を評価することとした。

### 2. 低濃度 VOC 曝露と免疫毒性

VOC としてホルムアルデヒド、あるいはトルエンを用いて曝露し影響評価を行った。マウスの系統は、これまでの研究で VOC 感受性が高いと考えられた C3H/HeN (6-8 週齢) 雄を用いた。曝露条件として、ホルムアルデヒドは、0、80、400、2000 ppb の濃度で、1 日 16 時間、週 5 日の曝露を 12 週間行った。ちなみに、室内空気濃度指針値は、0.08 ppm、作業環境許容濃度は 0.5 ppm である。トルエンは、0、5、50、500 ppm の濃度で、1 日 6 時間、週 5 日の曝露を 6 週間行った。室内空気濃度指針値は、0.07 ppm、労働安全衛生法：管理濃度は 50 ppm である。

ホルムアルデヒド曝露では、大きく 2 群にわけ、ホルムアルデヒドのみの影響を検討する群と卵白アルブミン (OVA) 感作を組み入れたホルムアルデヒド (アレルギーモデル) 群を設定した (1)。その結果、免疫臓器である胸腺の重量においては、いずれの曝露においても変動はみられず、脾臓の重量において、ホルムアルデヒドのみの 400、2000 ppb 曝露により対照群より有意な低下がみられた。アレルギーモデル群では、曝露による低下はみられなかった。脾臓リンパ球の垂集団分布の変化をフローサイトメトリーにて測定した結果でも、ホルムアルデヒド曝露による変動はみられていない。

肺胞洗浄液 (BALF) 中に回収された炎症性細胞の数の変化では、ホルムアルデヒド曝露群の総細胞数に変化はなかった。一方、アレルギーモデル群では、2000 ppb 曝露による総細胞数の有意な増加、肺胞マクロファージと好酸球の数の増加を認めたが、他の濃度では変化は認めなかった。

BALF 中の炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ 、IL-6、GM-CSF の産生には対照群と曝露群とで差はみられなかったが、アレルギーモデル群の 2000 ppb 曝露による IL-1 $\beta$  の低下がみられた。また、BALF 中の神経栄養因子の産生については、アレルギーモデル群の 80 と 400 ppb 曝露による神経成長因子(NGF)の低下が認められた。

血漿中の抗原特異的抗体価においては、アレルギーモデル群の 400 ppb の曝露により IgG1 と IgG3 の低下がみられたが、IgE 抗体価に有意差はみられていない。

血漿中の NGF 量についてもホルムアルデヒド群では変化しなかったが、アレルギーモデル群で 80 と 400 ppb 曝露での有意な低下を認めた。

以上をまとめると、低濃度ホルムアルデヒド曝露では、アレルギーモデル群での軽度な変化は認められたが、顕著な曝露による炎症や Th1/Th2 バランスの偏りを積極的に促進する結果は得られなかった。BALF と血漿では低濃度曝露による NGF の産生の抑制を認め、神経系への曝露による影響との関連を示唆しているのかもしれない。

低濃度トルエン曝露の影響を解析した結果では、トルエンのみの曝露群では、BALF の総炎症性細胞数に変化はみられなかった。トルエン曝露に OVA 抗原感作を組み入れたアレルギーモデル群では、6 週間曝露で BALF の総炎症性細胞数の増加が 50 ppm 曝露でみられた (2)。肺泡マクロファージ、リンパ球、好酸球数で増加傾向が認められた。BALF 中の炎症性サイトカイン、及び NGF の産生にはトルエン曝露による変動は見られていない。脾臓におけるサイトカインや転写因子の遺伝子発現では、アレルギーモデル群の中の 50 ppm トルエン曝露で、IL-4, IL-12, GATA3, Foxp3 mRNAs で有意な発現増加を認めた。トルエン曝露のみの群の脾臓では、曝露による変動は見られていない。血漿中の抗体価の検索では、アレルギーモデル群の抗原特異的抗体価にトルエン曝露による変化は見られていないが、50 ppm トルエン曝露で、総 IgG1 抗体価の増加がみられた。

以上、低濃度トルエン曝露では、アレルギーモデル群の肺における炎症性細胞の浸潤に差を認め、脾臓におけるサイトカインと転写因子の遺伝子発現に曝露による影響がみられた。しかしながら、低濃度トルエン曝露による特徴的な免疫機能へのかく乱作用はみられなかった。

### 3. 恒常性維持機構にかかる神経-免疫ネットワークのかく乱

低濃度ホルムアルデヒド曝露による BALF や血漿中の NGF 産生の低下をさらに探るため、脳内での神経幹細胞の存在が明らかにされた海馬における NGF 産生について検索した。NGF はすでに気道の炎症や過敏反応の誘導に関係することや NGF 産生そのものがサイトカインの制御を受けていることも明らかとなっており、神経組織における炎症の誘導についても関与が疑われている。

低濃度ホルムアルデヒド曝露したアレルギーモデルの海馬における NGF タンパク量を ELISA で測定したところ、400 ppb 曝露群で有意な上昇がみられ、NGF 免疫染色によりそれを裏づける結果が得られた。PCR 法による NGF mRNA 発現でも 80、400 ppb 曝露群での有意な増加がみら

れた。さらに、NGFの受容体である TrkA mRNA 発現の増加も認められた。

C3H/HeN への低濃度トルエン曝露では、500 ppm トルエンのみの曝露群において海馬における NGF と TrkA mRNAs の発現が有意に増加した (3)。この実験では、BALB/c と C57BL/10 のマウス系統を用いた低濃度トルエン曝露もあわせて行ったが、変化がみられず系統間での反応における差が明らかとなった。低濃度トルエンの C3H/HeN アレルギーモデル群への曝露では、50 ppm トルエン曝露により NGF mRNA の発現増加がみられ、NGF 免疫染色では海馬 CA3 部分において強い染色像がみられた。アレルギーモデル群の海馬の方が、トルエン曝露のみの群より反応性が高まっていることが示唆された。

次に、自然免疫において重要な TLR4 とトルエン曝露への反応とのかかわりを海馬において検索するために、C3H/HeN マウスと LPS 低応答で TLR4 に欠陥のある C3H/HeJ マウスを用いて低濃度トルエン曝露を行った。その結果、C3H/HeJ では TLR4 及び転写因子 NF- $\kappa$ B の mRNA 発現に差はみられなかったが、C3H/HeN マウスでは、50 ppm トルエン曝露で TLR4、NF- $\kappa$ B mRNAs 発現が有意に増加することを認めた (4)。また、C3H/HeN マウスでは、トルエン曝露後の海馬における Iba1 免疫染色によって、50 ppm トルエン濃度でのマクログリアの活性化がみられた。

以上の結果から、比較的低濃度 VOC 曝露は、単独で、あるいは抗原感作による過敏状態の誘導と合わせて、通常の生体内での海馬における NGF およびその受容体、TLR4 依存の情報伝達経路を介した炎症反応をかく乱する可能性が示唆された。

#### 4. 発達期トルエン曝露による免疫毒性

胎児期や小児期の免疫系は発達段階にあり、成人に比べて化学物質の影響を受けやすいことが報告されている。また、発達段階における化学物質の曝露がその後の Th1/Th2 バランスに関与する可能性も指摘されている。

発達期曝露の免疫系への影響を評価するために、C3H/HeN マウスの発達段階の異なる時期に 5 日間の曝露を行って、その後の影響を出生 21 日後に検討した。発達段階を胎仔期 (妊娠 14-18 日)、新生仔期 (出生 2-6 日)、乳仔期 (出生 8-12 日) の群として分類し、低濃度トルエン 5、50 ppm の 1 日 6 時間、5 日間曝露を行った。

その結果、血漿中の抗体価において、総 IgG1 は 5 ppm 曝露すべての群で低下がみられた (5)。総 IgG2a では、5 ppm 新生仔期曝露群で有意な低下を、5 ppm 乳仔期曝露群で増加を認めた。脾臓でのリンパ球サブタイプへの影響においては、50 ppm トルエン曝露により CD4 陽性細胞が新生仔期と乳仔期で有意な減少を、CD8 陽性細胞では乳仔期において減少を示した。脾臓におけるサイトカイン、転写因子の mRNA 発現では、新生仔期と乳仔期の IL-12、T-bet、Foxp3 で有意な抑制がみられた。なお、乳仔期曝露による CD4 陽性細胞の減少、T-bet mRNA の発現抑制は、出生 42 日後にも観察された。

発達期曝露による海馬での神経-免疫ネットワークへの影響では、5 ppm 乳仔期曝露群で TLR4 mRNA の発現の増強を認めた (5)。また、乳仔期のトルエン曝露では、5、50 ppm とともに NGF mRNA、NF- $\kappa$ B mRNA で発現増強を示した。新生児期においては、50 ppm トルエン曝露群

で NGF mRNA、NF- $\kappa$ B mRNA の発現が有意に増強した。

以上、低濃度トルエン曝露による免疫及び神経免疫パラメーターの変化では、発達段階の違い、トルエン濃度、測定パラメーターにより異なる変動を示した。発達段階においては低濃度トルエン曝露に対する反応性が非常に高いことが示唆された。

#### 5. まとめ

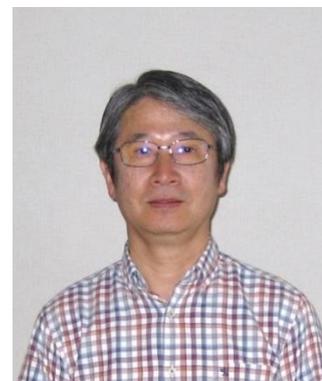
比較的濃度指針値に近い値で、しかも実験動物を用いて曝露できる限界値に迫る条件で、免疫領域での変動の有無に迫る研究ができたと考えている。その結果、ホルムアルデヒドとトルエン曝露においては、顕著な免疫反応のかく乱はみられなかったが、低濃度曝露におけるいくつかの免疫パラメーターでの変化は認められた。特に、これまでの報告がほとんどない海馬における炎症や神経栄養因子のレベルでの変動がみられたこと、抗原感作が反応性を高めたことは、低濃度 VOC による情報伝達の経路及び情報の蓄積にかかわる神経-免疫ネットワークをかく乱する作用を疑わせる結果が得られた。

#### 6. おわりに

本学会賞をいただくにあたり選考の労をとっていただきました諸先生方、本研究の遂行にあたり全面的にご協力いただきました研究仲間に厚く御礼申し上げます。

#### 7. 参考文献

- (1) Fujimaki, H et al., *Toxicology* (2004)197,1-13.
- (2) Fujimaki, H. et al., *Toxicology* (2011)286,28-35.
- (3) Win-Shwe, T.T. et al., *NeuroToxicology* (2010)31,85-93.
- (4) Win-Shwe, T.T. et al., *Neurotoxicology and Teratology* (2011)33,598-602.
- (5) Win-Shwe, T.T. et al., *Toxicology Letters*(2012) 208,133-141.
- (6) Win-Shwe, T.T. et al., *J. Appl. Toxicol.*(2012)32,126-134.



藤巻秀和先生

## 第 7 回(2017 年度)日本免疫毒性学会奨励賞

2017 年度日本免疫毒性学会奨励賞を受賞して

山浦克典 (慶應義塾大学薬学部)

この度は、2017 年度日本免疫毒性学会奨励賞 (2017 年 9 月) を頂戴し、ご推薦頂きました先生並びに選考委員の先生方に厚くお礼申し上げます。簡単ではございますが、私の受賞研究課題「慢性掻痒性皮膚疾患に関わる皮膚免疫の免疫毒性学的解析」について、以下に紹介申し上げます。

私は、大学卒業後、製薬会社で薬理研究員、保険薬局で管理薬剤師、CRO で治験モニターとして計 18 年間過ごした後、恩師である千葉大学の上野光一名誉教授の下、教員生活をスタートさせました。千葉大学の優秀で勤勉な学生に囲まれ、私が取り組んだ研究テーマは、慢性掻痒性皮膚疾患にみられる掻痒メカニズムの解明と有効な治療法の提案でした。

ステロイド外用薬はアトピー性皮膚炎をはじめとする慢性掻痒性皮膚疾患の第一選択薬として用いられ、その利点は局所に強力な抗炎症作用をもたらすことや全身性の副作用が少ないことです。ステロイド外用薬は強度により 5 つにランク分けされ、専門医は皮疹の重症度や部位によってこれを使い分けます。ところが、ステロイド外用薬の副作用を懸念し、その使用を極端に拒否する「ステロイド恐怖症」患者が世界中に存在し、我が国においても患者の 65% はステロイド外用薬を使用したくないとするなど、多くの患者がステロイド外用薬を怖がっているのが現状です。これは、ステロイド内服薬や注射薬にみられる「リバウンド」や「離脱症状」などの副作用が、外用薬でも同様に生じるという誤解が広く生じていることが背景にあります。

そこで我々は、ステロイド外用薬のリバウンドについて検討してみる事にしました。はじめにステロイド外用治療を中断すると皮膚症状が悪化するという動物モデルの作成に取り組みましたが、顕著なリバウンド現象は確認できませんでした。次に我々は、痒みに着目しました。痒みは itch-scratch cycle として知られる掻破行動の誘発により皮膚バリア機能の破壊を引き起こし、これによる炎症惹起が更なる痒みを誘発するという悪循環により皮膚症状を増悪させるからです。我々は、2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB) をハプテンとして週 3 回 BALB/c マウスの耳介に反復塗布し、ハプテン誘発性の慢性接触皮膚炎マウスモデルを作成しました (Yamaura et al., 2011, J Toxicol Sci)。当該マウスモデルの皮膚炎がプラトーに達した後、デキサメタゾンを連日塗布したステロイド治療群は、皮膚炎の指標である耳介腫脹が試験期間を通じて著しく改善しましたが、痒みの指標である掻破回数は塗布期間に従い悪化し、試験終了時においては対照群と比較して有意に亢進しました。この結果から、長期間のステロイド塗布が皮膚炎を抑制する一方、掻痒を悪化させることを見出しました。そこで、ステロイド外用誘発掻痒とステロイド外用薬の強さの関係を検討したところ、各ステロイドは強さに応じて皮膚炎抑制効果を示したものの、掻痒はステロイドの強さに関係なく増悪したことから、本掻痒は、デキサメタゾンに特異的な現象では無く、ステロイド外用薬に普遍的な現象であることが示唆されました。

さらに、ステロイド外用誘発掻痒は、TNCB 処置をしない正常皮膚マウスには生じないこと (Yamaura et al., 2012, J Toxicol Sci)、マウスの系統を BALB/c マウスから C57BL/6 マウスに変えても同様であることから、ステロイド外用誘発掻痒は慢性皮膚炎の皮膚環境にステロイド外用薬を適用する場合にのみ誘発され、ステロイド外用薬そのものが起痒剤とはないことを明らかにしました。

我々は、ステロイド外用誘発掻痒のメカニズムとして、ステロイド外用薬が“内因性抗掻痒因子”を抑制して掻痒を惹起する仮説をたてました。皮膚炎マウスでは正常マウスに比べ掻痒が高まっているため、これを抑制的に調節しようと患部で内因性抗掻痒因子の産生が高まっていると推測されます。この内因性抗掻痒因子の産生が抑制されると、掻痒の抑制性調節が解除され、掻痒が増悪すると考えられます。内因性抗掻痒因子としては、プロスタグランジン  $D_2$  が候補として挙げられます。プロスタグランジン  $D_2$  は細胞膜のリン脂質からホスホリパーゼ  $A_2$  により切り出されたアラキドン酸の代謝物の一つで抗掻痒作用を示します。アラキドン酸はアラキドン酸カスケードでシクロオキシゲナーゼ (COX) によりプロスタグランジンへと代謝されますが、ステロイドは COX を強力に抑制するため、プロスタグランジン  $D_2$  産生も抑制すると考えられます。

そこで我々は、ステロイドによる“内因性抗掻痒因子”の抑制仮説を検証すべく、マウス皮膚組織中のプロスタグランジン  $D_2$  量を定量しました。皮膚炎対照群では病変組織中のプロスタグランジン  $D_2$  量が正常皮膚マウスに比べ高値を示しましたが、ステロイド塗布群では正常皮膚マウスレベルまで低下していました (Yamaura et al., 2012, J Toxicol Sci)。プロスタグランジン  $D_2$  はアラキドン酸が COX で代謝された後、L 型プロスタグランジン  $D_2$  合成酵素 (L-PGDS) と H-PGDS の 2 種類の酵素により合成されます。L-PGDS は中枢神経や男性生殖器に、一方 H-PGDS はマスト細胞、膠原提示細胞、Th2 細胞などの免疫系細胞に発現しています。ステロイド外用誘発掻痒が正常皮膚マウスには起きず、皮膚炎マウスにおいてのみ発現することから、我々は炎症時に誘導される COX-2 と H-PGDS の mRNA 発現を、マウスの病変組織を用いて解析しました。皮膚炎対照群では正常皮膚マウスに比べて、いずれの産生酵素の発現も著しく亢進していましたが、ステロイド塗布群では両酵素発現が有意に低下していました。

さらに、RBL-2H3 細胞の脱顆粒試験系を用いて、特異抗原刺激に伴うプロスタグランジン  $D_2$  産生に対するステロイドの直接作用を検討したところ、デキサメタゾンは有意にプロスタグランジン  $D_2$  産生を抑制しましたが、RBL-2H3 細胞の脱顆粒反応には影響を与えませんでした。ベタメタゾン吉草酸エステルおよびプレドニゾロンにおいても同様でした。皮膚において、マスト細胞は主要なプロスタグランジン  $D_2$  産生細胞であり、皮膚炎対照群の病変組織でプロスタグランジン  $D_2$  産生が亢進し掻痒を抑制的に調節し得ることが示されたことから、ステロイドによる皮膚マスト細胞のプロスタグランジン  $D_2$  産生抑制がステロイド外用誘発掻痒の重要な要因と考えられました。

ステロイド外用誘発掻痒は、ステロイドによる皮膚マスト細胞のプロスタグランジン D<sub>2</sub> 産生抑制が一因と考えられたため、我々はプロスタグランジン D<sub>2</sub> 受容体 DP1 アゴニストをステロイド外用と併用することで、ステロイド外用に起因するプロスタグランジン D<sub>2</sub> 産生低下を補い、掻痒誘発を抑制できると考えました。プロスタグランジン D<sub>2</sub> 受容体 DP1 選択的アゴニストとして BW245C を選択し、ステロイド連日塗布により掻痒を誘発してから BW245C を 1 週間併用塗布したところ、掻痒が有意に抑制されました。本検討結果より、プロスタグランジン D<sub>2</sub> 受容体 DP1 アゴニストが、ステロイド外用誘発掻痒の予防および治療に有効な候補化合物となる可能性が示唆されました。

本研究は、マウスを用いた研究にとどまり、臨床応用にはさらなる検討が必要ですが、ステロイド外用恐怖症の患者が安心してステロイド外用療法を受けられることを目指し、研究を続けたいと考えます。



山浦克典先生

## シリーズ「免疫毒性研究の若い力」17

環境中化学物質が小児に与える影響の検討

辻 真弓 (産業医科大学 医学部 産業衛生学)

まずはじめに、この度、日本免疫毒性学会 ImmunoTox Letter での執筆の機会を与えて頂きましたことに、厚く御礼申し上げます。免疫毒性研究について浅学の身でございますが、私のこれまでの分子疫学研究内容に関してご紹介させて頂きたいと思っております。拙文ではございますが、何卒ご容赦下さい。

私は鹿児島大学医学部を平成 13 年に卒業し、平成 19 年に同大学大学院医歯学総合研究科疫学・予防医学博士の学位を取得しました。当時からアレルギー性疾患の罹患者数の増加が社会問題の一つとなっており、特に乳幼児のアレルギー疾患の罹患者数の増加には環境中の有害物に対する小児の脆弱性が大きく関与していると考えられていました。私自身実際に臨床の場でアレルギー児の保護者から「どうしてうちの子供がアレルギーになったのか。」という質問や、「どのような生活を送ってれば子供がアレルギーにならなかったのか。」という自責の言葉を聞いていました。アレルギー性疾患は、治療が長期にわたる慢性的な病気であるため、治療の見通しへの不安や生活の質の低下などから、児のみならず、保護者が大きなストレスを感じてしまう傾向があります。このような状況を受け、大学院生の時から「環境因子と小児のアレルギー性疾患」を自分自身のテーマとして分子疫学研究を開始しました。鹿児島大学、熊本大学、UC Davis、産業医科大学の優しくも厳しい先生方にご指導をいただきながら、現在は小児のみならず化学物質曝露が妊産婦に与える影響の検討や、産業現場をフィールドにした研究にもチャレンジしております。

### 【小児のアレルギー性疾患と環境因子の関係を示すバイオマーカーの探索】

環境中の化学物質がアレルギー児に与える影響を評価するためのバイオマーカーを探索する目的で、乳幼児 203 名をリクルートし、質問票調査並びに血液を採取した。採取した血液を用いて、食物・吸入抗原（卵・牛乳・小麦・ハウスダスト）特異的 IgE 抗体値及び COX-2、IL-8 の mRNA 発現量を測定した。さらに 203 名中、喘息児 15 名、健常児 15 名の計 30 名（平均月齢 22.7 ヶ月）を抽出し、血液中の PCB 異性体濃度(#61+74, #99, #118, #138+146, #153, #156, #163+164, #170, #177, #178, #180+193, #183, #182+187, #194, #198+199)を測定した。その結果、喘息児においてのみ IL-8 mRNA 発現量と一部の PCB 異性体(#163+164, #170, #177, #178, #180+193)の濃度との間に濃度依存的な関係が有意に認められた。続いて IL-6, IL-10, IL-17, IL-22, CYP1A1, Foxp3, SOCS3, RelB の mRNA 発現量を測定した。高 PCB 濃度群において、食物抗原、特に牛乳特異的 IgE 抗体陽性の方が陰性者と比較し、IL-22 mRNA 発現量が有意に高く認められた。また、幹線道路から 50m 以上離れた場所に住んでいる児と 50 m 以内に住む児を比較した場合、50 m 以内に住む児の IL-22 mRNA 発現量は有意に高い値を示し、特にこの傾向は食物抗原特異

的 IgE 抗体陽性群において強く認められた。これらの結果により **vulnerable population** では IL-22 が環境化学物質曝露の敏感なバイオマーカーになりうることを示した。これら一連の研究により、乳幼児と環境因子曝露を推測するバイオマーカーとして IL-8, 22 が有効で、特にアレルギー児において両者はより **sensitive** なバイオマーカーとなりうる可能性を示唆できたことは、環境因子とアレルギーの発症を検討する上で大きな一歩であると考えます。現在 UC Davis, Department of Environmental Toxicology との共同研究においてこれらの研究結果を *in vitro* 実験において確認し、メカニズムを明らかにするための研究を行っている。

#### 【化学物質曝露と胎盤機能の関係】

「子供の健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」のパイロット調査参加者を対象として研究を開始している。これまでに合胞体栄養膜細胞数、胎盤成長因子、可溶性 fms 様チロシンキナーゼ 1 と妊娠初期の母体血及び臍帯血 PCB 濃度との関係を検討し、PCB は濃度依存的に合胞体栄養膜細胞数を減らす、一方で胎盤成長因子を増加させていることを明らかにした。日常生活レベルの低濃度 PCB 曝露に対し胎盤内で代償機能が働き、子宮内胎児発育不全を予防するメカニズムが存在する可能性を示したものと考える。また産婦人科医師との共同研究により化学物質以外の因子（母体体重増加、胎盤の栄養膜細胞におけるアミノ酸輸送機能等）と胎盤機能の関係についての研究も開始している。今後は PCB のみならずその他の化学物質曝露と胎盤機能との関係も明らかにし、更に様々の化学物質曝露がその後の児の成長やアレルギーの発症・増悪にどのような影響を及ぼすのかを検討する予定である。

#### 【化学物質特異的 IgG のアレルギー診断と曝露モニタリングへの有用性に関する調査】

化学物質（樹脂）取扱い作業者を含む事業所を対象に、労働者の化学物質特異的 IgG 抗体値を測定している。化学物質の複合体である樹脂原料には職業性アレルギーの原因となる化学物質が複数含まれる場合がある。簡便な方法で複数の化学物質抗体を同時に測定するスクリーニングツールを開発中である。

今後も小児のみならず私共にとって身近な化学物質の曝露がアレルギー発症・増悪にどのような影響を与えるのか？ということをも分子疫学・毒性的観点から明らかにし、アレルギーの発症・増悪に対する有効な予防法の創出の一助を担っていきたいと思っております。

今後ともご指導、ご助言のほど、何卒よろしくお願い申し上げます。



辻 真弓先生

## サンアントニオでの SOT 年次総会ならびに ITSS への参加報告

第 57 回 Society of Toxicology 年次総会ならびに ITSS 参加報告

木戸尊將（東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座）

去る 3 月に米国テキサス州サンアントニオで開催されました Society of Toxicology(SOT)の年次総会ならびに Immunotoxicology specialty section に参加して参りました東京慈恵会医科大学の木戸尊將と申します。私自身、SOT への参加は 7 年前の San Francisco が初めての参加で、毎年、角田正史先生(現在; 防衛医科大学)と一緒に参加させて頂いております。サンアントニオ訪問は 2 回目ということもあり、行きフライトは予定通り現地入りできました。翌日、学会初日の Immunotoxicology session のポスター（演題数 53）で私は発表があり、早朝からポスター掲示を行い、同じセッションでポスター発表する川崎医科大学衛生学の西村先生を待ちました。しかし、西村先生は飛行機トラブルでご自身の旅行バックが届かずに発表するポスターもない状況でした。そして、一緒に FedEx にポスター印刷を行い、高額料金支払い後、リバーウォークで景色を見ながら昼食をとり午後のポスター発表を迎えました。今回の私のタイトルは「亜鉛欠乏症における脾臓 Th1/Th2 細胞を介した炎症反応と IL-4 投与の効果」についての研究を発表しました。研究内容としては、亜鉛欠乏症に起因する免疫機能の低下は炎症反応を増悪させることが報告されています。我々の先行研究において、Th2 リンパ球数と IL-4 発現が減少することで、抗炎症作用“M2 マクロファージ”への分化が抑制され、その結果、炎症を抑制できないことを明きからにしておりましたので、今回は、この亜鉛欠乏状態のラットに IL-4 を投与することで炎症を改善できることを発表しました。このポスターセッションの発表は多岐にわたり、勉強になると同時に、コアタイムには、国内外の研究者や企業の方から質問を頂き、今後の亜鉛と免疫毒性研究がより発展するアドバイスも頂きました。

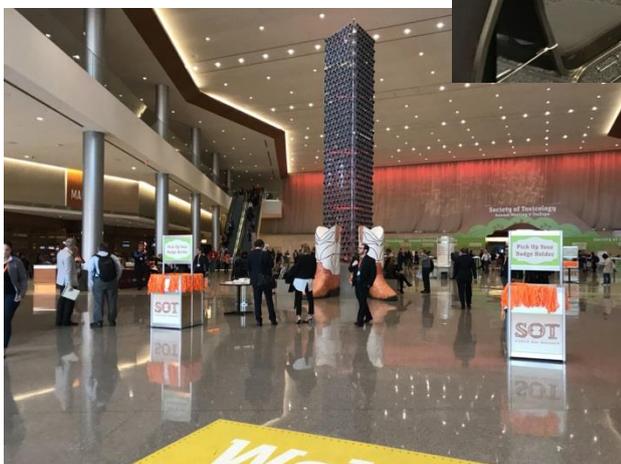
次の日、研究の都合により朝一に日本に戻る予定となっており、空港に向かいました。しかし、飛行機トラブルでダラス行きの飛行機が遅れており、日本に戻れなくなってしまいました。西村先生の次は我々か...っという気持ちでした。そして、サンアントニオにもう一泊滞在することが決定し、SOT の会場へ戻りました。しかし、幸運なことに人生万事塞翁が馬、当初は参加できない予定であった Immunotoxicity の口演 session（10 演題）にも参加でき、西村先生の口演も拝聴できました。西村先生の悪性中皮腫患者と胸膜肥厚患者の間の免疫的な特徴の相違の発表に加えて、発達神経毒性、神経免疫、蛋白に対する免疫反応への修飾、ヒ素のワクチンの免疫原性及び感染症への影響など、こちらも現在の免疫毒性研究の最先端をカバーする内容と思えました。そして夕方には ITSS へ参加することが叶いました。日本免疫毒性学会からは香山不二雄先生、中村和市先生、角田正史先生、西村泰光先生が参加され例年よりも少なく今年は少数精鋭というところでしょうか...。代表を務められている Dr. Victor J. Johnson の挨拶から始まり表彰式では私と同じくらいの研究者の方が受賞されており、私も免疫毒性学を頑張らねばっという気

持ちにもなりました。そして、次の日は問題なく飛行機が出発し日本へ戻りました。

この度の SOT はトラブルもありましたが、愉快でよい刺激になる旅となりました。なお学会全体では immunotoxicity をキーワードにした発表が 56 あり、現在の免疫毒性研究の隆盛を垣間見ることができる学会だと思えます。次回の開催地は Baltimore です。来年の 3 月に向けて研究に励み、会員の皆様の多くと学会場でお会いしたいと思います。



木戸尊将先生



## Short talks on the shoulders of giants

### Th2 細胞と IgE の意外な関係

黒田悦史 (医薬基盤・健康・栄養研究所 ワクチン・アジュバント研究センター)

アレルギー関連の研究に従事している方の中には「Th2 の応答は高いのに IgE が高くないな〜」とか、逆に「T 細胞からの抗原特異的な IL-4 はさほど高くないのに IgE が高いな〜」といった経験をお持ちの方も多いかと思います。出張中の飛行機の中でふとそういう経験を思い出し、このエッセイを書きはじめました。エッセイですので肩の力を抜いて気楽によんでいただければと思っています。浅い知識ではありますが、今回は濾胞ヘルパーT 細胞 (follicular helper T cell: Tfh cell) について思いのままに書いてみました。

Tfh はヘルパーT 細胞のサブセットの一つであり、細胞表面マーカーとしてマウスでは CXCR5 および PD-1 が陽性であることが知られています。Tfh は他のヘルパーT 細胞とは異なり、主にリンパ節の中の B 細胞濾胞に存在しますが、これは Tfh 上に発現している CXCR5 とケモカインである CXCL13 の相互作用により Tfh が B 細胞濾胞に引き寄せられるためだと考えられています。B 細胞濾胞において Tfh は胚中心 (germinal center: GC) の形成や B 細胞のクラススイッチなど、B 細胞の活性化を補助する役割を担っています。ここまで書くとお気づきだと思いますが、私たちが教科書などで読んでいた「ヘルパーT 細胞と B 細胞が相互作用することで B 細胞を活性化する」というのは実は Th1 や Th2 ではなく Tfh であることが明らかになっています。実際にマウスにおいて Tfh が B 細胞活性化や抗体産生に重要であることが示されています。ヘルパーT 細胞サブセットはそれぞれ特徴的な転写因子を発現しており、Th1 では T-bet、Th2 では GATA3 などが知られています。Tfh は転写因子として bcl-6 を高発現しており、この bcl-6 の作用で先に述べた CXCR5 が誘導されると考えられています。そのため CD4+T 細胞特異的に bcl-6 を欠損 (CD4-cre bcl-6flox/flox マウス) させることにより Tfh が存在しないマウスを作成することができ、このマウスは抗原で免疫してもリンパ節内で GC が形成されないため、抗原特異的な抗体がほとんど誘導されないことが報告されています。

さて、Tfh のもう一つの特徴として IL-4 と IL-21 を産生することが報告されています。そうでは、IL-4 を産生するんです。IL-4 やそのシグナル伝達体の STAT6 は Th2 の分化や IgE の誘導に必須のサイトカインとして知られています。そのため IgE の誘導には Th2 の活性化によって産生された IL-4 が重要であると考えられておりました。そうすると、B 細胞のクラススイッチ、特に IgE の誘導には Tfh 由来の IL-4 が関与するのか？はたまた、IL-4 はこれまでの理論通り Th2 細胞由来なのか？という疑問が湧いてくるわけです。この答えとなる (私にとって) 衝撃的な論文が 2012 年に 2 報同時に発表されました (参考文献 1, 2)。これらの論文では、Th2 由来の IL-4 は正常に誘導されるが Tfh では IL-4 が誘導されないマウスが作成され、そのマウスでは IgE 抗

体が低下することが示されました。すなわち、IgE のクラススイッチで重要なのは Tfh 由来の IL-4 であること示しているのです。更に非常に興味深いのは Tfh を欠損したマウスでも Th2 は正常なので、IL-5 依存性の好酸球性炎症は正常に起こることも示されています。私たちの実験でも Tfh 欠損マウスでは IgE や IgG1 の抗体価は低下しますが、リンパ節や脾臓の抗原特異的な T 細胞由来 IL-5 や IL-13 は正常であることを観察しており、Th2 応答と IgE 誘導とは全く別経路なんだな〜と改めて実感しています。

「いやいや、そもそも Tfh は IL-4 を誘導するわけだから、Th2 から分化誘導されてるんじゃないの？だったらある意味 Tfh=Th2 だよな？」と皆さんからの質問メールが送られてくるような気がします。当然の疑問です。これまでは Tfh はナイーブ T 細胞から誘導されてくると考えられていましたが、Th2 を T 細胞欠損マウスに移入することで IgE が誘導されるという報告も存在するため、一概に Th2 が Tfh のソースになっていることは否定できません。しかしながら一方で、Th2 分化に障害がある OX40 リガンド欠損マウスではアレルゲンによる Th2 応答は減弱するものの、IgE 誘導は正常であることが示されており、必ずしも Tfh が Th2 由来ではないことも示唆されています。このあたりは今後も詳細に調べられていくと思います。

研究をやっていると、自分の専門分野において衝撃的な研究報告がオリンピックのように 4 年に一回ぐらいの頻度（もっと高頻度？）で見受けられます。最近ではリンパ濾胞に存在する制御性 T 細胞である濾胞制御性 T 細胞（follicular regulatory T cell: Tfr）が IgE の誘導に深く関与することも示されて衝撃を受けました（参考文献 3）。リンパ濾胞に存在するマイナーポピュレーションの解析など細かいこともやっていかないとな〜。。。と老眼が入りかけた目で奮闘する毎日です。

- 1) Vijayanand et al. *Immunity* 2012, 36:175-87.
- 2) Harada et al. *Immunity* 2012, 36:188-200.
- 3) Wing et al. *Immunity* 2014, 41:1013-1025.



黒田悦史先生

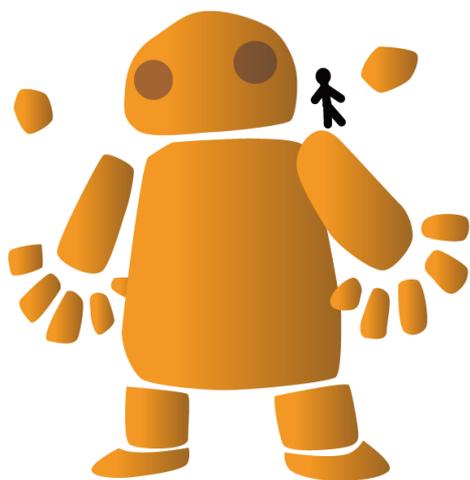
## 編集後記

今回の ImmunoTox Letter では第6回および7回日本免疫毒性学会学会賞受賞の小坂忠司先生、藤巻秀和先生からの投稿記事を紹介しております。両先生の長年培ってきた成果は非常に見応えがある内容となっております。また、若手の投稿として第7回日本免疫毒性学会奨励賞の山浦克典先生、「免疫毒性研究の若い力」として辻真弓先生、SOT/ITSS への参加報告として木戸尊将先生からの記事を掲載しております。このように今号では巨匠の力と若手の熱い力の両方を感じる興味深い構成になっているかと思えます。

また、9月開催の第25回日本免疫毒性学会学術年会の紹介がされています。今回から「初回に限り学会参加費免除」が行われます。是非この機会に皆さんの周りの方々に学会参加のお声をかけていただければと思います。

最後に、今号では「Short talks on the shoulders of giants」(和訳では、巨人の肩の上の小話、でしょうか)というお試し(?)企画を掲載しております。Google Scholar を開くと「Stand on the shoulders of giants (巨人の肩の上に立つ)」と書かれているのをご存知ですか?これはアイザック・ニュートンが「自分の業績は、巨人の肩の上(先人たちの偉大な業績の上)に立って遠くを見ていたからだ」という言葉から来ていると言われています。免疫毒性学会では、いろんなフィールドからの参加者がいらっしやいます。それぞれのフィールドの研究者が「おもしろい!」と思ったことが、ちょっと分野が外れると知らないことが多いと思います。そのような話を紹介し共有できるような場があればと思い、この企画を始めました。シリーズ化するかはわかりませんが、ほんのちょっとしたことでも、自分はこれを書きたい!紹介したい!というものがあればお気軽にご寄稿ください。

(E・K 記)



### 編集・発行: 日本免疫毒性学会

編集発行責任者: 吉田 貴彦

編集委員会: 黒田 悦史、小島 弘幸、  
坂入 鉄也、新藤 智子、  
角田 正史、手島 玲子、  
西村 泰光、野原 恵子、  
姫野誠一郎

原稿送付先: shindo.t@fdsc.co.jp