

# 第1回 日本毒科学会サテライトシンポジウム プログラム・要旨集

第1回 日本毒科学会サテライトシンポジウム

平成4年7月22日(水)

昭 和 大 学

1992 東京

第1回 日本毒科学会  
サテライトシンポジウム  
プログラム・要旨集

第1回 日本毒科学会サテライトシンポジウム

平成4年7月22日(水)

昭和大学

1992 東京

## 目 次

御挨拶	1
お知らせとお願い	2
会場案内	4
日程および座長一覧	6
プログラム	
開幕講演	7
特別講演	7
ワークショップ	7
一般演題	8
要旨	
開幕講演	13
特別講演	16
ワークショップ	21
一般演題	43

第1回サテライトシンポジウム実行委員会

宇高奎二（日本ロシュ研究所）  
遠藤 仁（東京大学医学部）  
大沢基保（帝京大学薬学部）  
黒岩幸雄（昭和大学薬学部）  
佐藤哲男（千葉大学薬学部）  
沢田純一（国立衛生試験所）  
島村忠勝（昭和大学医学部）  
吉田武美（昭和大学薬学部）

事務局 〒142 東京都品川区旗の台1-5-8  
昭和大学薬学部毒物学教室  
TEL 03-3784-8205~7  
FAX 03-3784-8246

## 御 挨拶

ここ 20 年の間に医薬品の進歩はめざましく、それと平行して薬によって起こる有害な反応に関する認識も高まり、その結果薬物の安全性試験法が現在のような形式に確立されたと言える。しかし、安全性試験が一応確立されたとは言え、生化学や免疫学における細胞生物学的な研究の進展はめざましく、この方法の確立は更により良き方法へと研究が継続されなければならないことは論をまたない。

平成 2 年 11 月に第 12 回日本学術会議毒科学研連シンポジウムをお世話するにあたり、「標的臓器—免疫毒性に関連して—」を主題にしましたところ、多くの方々のご参加を頂き、この分野の関心の深さが伺われました。そのような背景もあり、日本毒学会として初めての試みである第 1 回サテライトシンポジウムでは、再度「免疫毒性」を主題に取り上げることに致しました。免疫系は、私たちの体をめぐる膨大かつ繊細なネットワークであり、医薬品などの開発にあたって、市販後においてもその系への薬理的毒性学的影響は注意を払う必要があると思います。本サテライトシンポジウムで取り上げました「免疫毒性」の課題は多方面からのアプローチが必要であり、今回を機に第 2 回、第 3 回へと発展していくことを期待致しております。

本サテライトシンポジウムを通して、毒性学に携わる方々に免疫学の分野がより身近に感じられ、かつ役立っていきますことを願っております。

第 1 回日本毒学会サテライトシンポジウム

世話人 黒岩 幸雄

# お知らせとお願い

## 1. サテライトシンポジウム参加の皆様へ

受付・学会受付は午前8時30分より行います。

(会場の扉は午前8時30分に開きます)

ネームプレート(参加章)

- ・ネームプレートには必要事項を記入し、会場内では必ずご着用下さい。
  - ・事前登録された方は同封のネームプレートをご持参下さい。  
再発行は致しません。
  - ・当日参加の方は参加申込書をご記入の上、受付にて参加費を納入し、ネームプレートと「プログラム・要旨集」をお受け取り下さい。
- \*参加費は6,000円ですが、学術年会も引続き参加される方は3,000円になります。

会場内の進行については、座長または司会の指示に従って下さい。

口演中の写真撮影はご遠慮下さい。

会場内での飲食・喫煙は所定の場所でお願ひします。

## 2. 演者の皆様へ

一般演題(口演)

- スライド
- ・口演の30分前までに各会場のスライド受付で、ご自身で試写・確認の上お渡し下さい。
  - ・口演後はすみやかにお引き取り下さい。
  - ・スライドは35mmフィルム(枠50mm x 50mm)を使用して下さい。
  - ・一般演題のスライドは10枚以内でお願いします。
  - ・スライドには演題番号・演者名を明記して下さい。
  - ・プロジェクターは1会場1台です。同一スライドを繰り返して使用される場合は映写回数分の枚数をご用意下さい。

一般演題の口演時間は12分、討論3分です。時間厳守を願ひます。

J. Toxicol. Sci. に掲載する英文抄録は、スライドをお渡しの際に受付にご提出願ひます。

次演者の方は発表の10分前までに最前列の次演者席にお着き下さい。

## ワークショップ

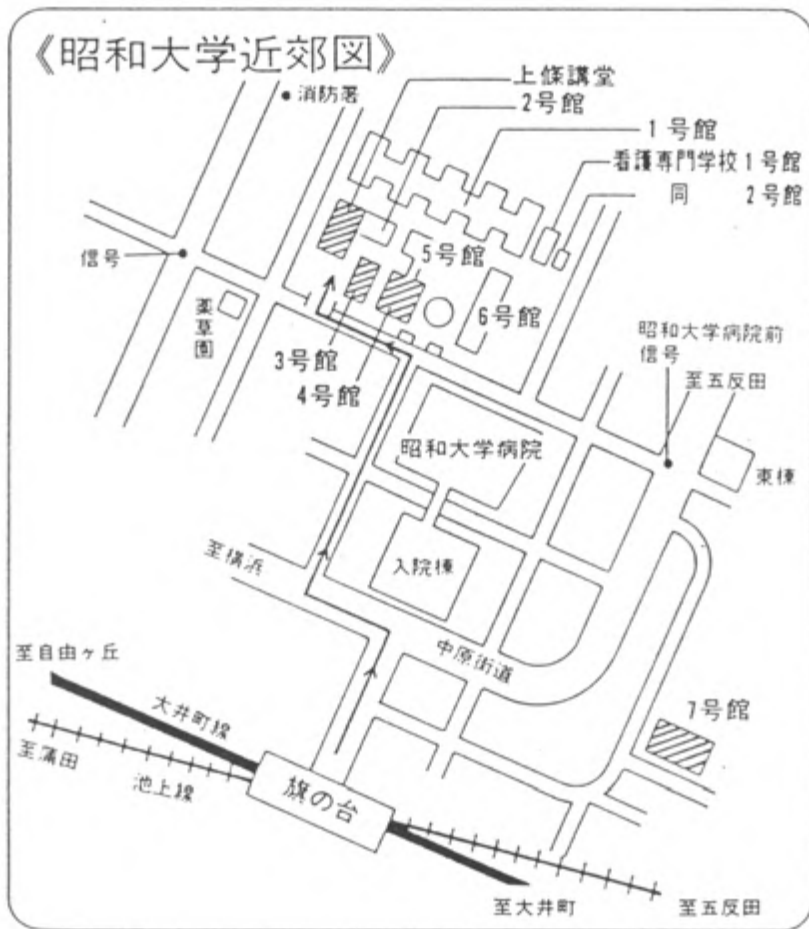
- スライド
- ・口演の30分前までに各会場のスライド受付で、ご自身で試写・確認の上お渡し下さい。
  - ・口演後はすみやかにお引き取り下さい。
  - ・スライドは35mmフィルム(枠50mm x 50mm)を使用して下さい。
  - ・ワークショップのスライドの枚数は特に制限はありませんが、多すぎないようにお願いします。
  - ・スライドには演題番号・演者名を明記して下さい。
  - ・プロジェクターは1会場1台です。同一スライドを繰り返して使用される場合は映写回数分の枚数をご用意下さい。

口演時間は座長の指示に従って、時間厳守を願います。

J. Toxicol. Sci. に掲載する英文抄録は、スライドをお渡しの際に受付にご提出願います。







講演会場：上條講堂

休憩所：3号館 1F 会議室

# 第1回日本毒科学会サテライト シンポジウム日程および座長一覧

7月22日

- 9:15 はじめに サテライトシンポジウムのコンセプト  
黒岩幸雄 (昭和大学薬学部)
- 9:30 **開幕講演「免疫毒性とアレルギー」**  
林 秀男 (熊本大学名誉教授)  
座長 黒岩幸雄 (昭和大学薬学部)
- 10:30 **ワークショップ**  
免疫毒性/アレルギー性評価法のバリデーション  
座長 安田峯生 (広島大学医学部)  
宇高奎二 (日本ロシュ研究所)
- 1.医薬品を対象とした抗原性試験法  
2.免疫毒性
- 12:30 昼食・休憩
- 13:30 **特別講演 1 免疫毒性 -基礎の立場から-**  
大沢基保 (帝京大学薬学部)  
座長 沢田純一 (国立衛生試験所)
- 14:20 休憩
- 14:30 一般演題  
座長 名倉 宏 (東北大学医学部)  
加藤 忍 (資生堂研究所)  
佐藤哲男 (千葉大学薬学部)
- 16:30 休憩
- 16:50 **特別講演 2 免疫毒性 -臨床の立場から-**  
高橋昭三 (昭和大学医学部)  
座長 吉田武美 (昭和大学薬学部)
- 17:40 今後の展望  
黒岩幸雄 (昭和大学薬学部)
- 18:00

○開幕講演

9:30~10:30

座長 黒岩 幸雄 (昭和大薬学部)

▼免疫毒性とアレルギー

林 秀男 (熊本大学名誉教授)

○特別講演 1

13:30~14:20

座長 沢田 純一 (国立衛生試験所)

▼免疫毒性 -基礎の立場から-

大沢 基保 (帝京大薬学部)

○特別講演 2

16:50~17:40

座長 吉田 武美 (昭和大薬学部)

▼免疫毒性 -臨床の立場から-

高橋 昭三 (昭和大医学部)

○ワークショップ

10:30~12:30

~免疫毒性/アレルギー性試験評価法のバリテーション~

座長:安田 峯生 (広島大医学部)

宇高 奎二 (日本ロシュ研究所)

医薬品を対象とした抗原性試験法

▼実施例とヒトへの予見性

宇高 奎二 (日本ロシュ研究所)

▼試験実施上の問題点とその対応

牧 英二 (萬有製薬(株)開発研究所)

日本製薬工業会 医薬品評価委員会

基礎研究部会 抗原性試験研究班

免疫毒性

▼免疫毒性試験法の現状とその問題点

-IPCS/CES の国際共同研究をめぐって-

落合 敏秋 (国立衛生試験所毒性部)

松本 清司 (信州大医学部)

▼実施例:ダイオキシンの免疫毒性

-胸腺萎縮を中心として-

平峯 千春 (香川医科大学免疫病理学)

北条 憲二 (香川医科大学免疫病理学)

一般演題

7月22日(水) 14:20~16:35

14:20~15:05

座長 名倉 宏 (東北大学医学部)

14:20 NTP試験法による市販医薬品の免疫毒性の検索  
筒井 尚久、栃折 幸子、小林 潔  
(三菱化成・総合研・安全研)

14:35 トリフェニール錫の免疫毒性について  
永井 博式<sup>1)</sup>、江田 昭英<sup>1)</sup>、西田 弘之<sup>2)</sup>、松井 寿夫<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup> 岐阜薬大・薬理, <sup>2)</sup> 獨協医大・衛生学)

14:50 Cephem系抗生剤のマウス免疫系に及ぼす影響  
古濱 和久、高山 敏  
(第一製薬・開発研・安全研)

15:05~15:50

座長 加藤 忍 (資生堂研究所)

15:05 臨床予測性を有する抗原性試験法の確立について  
塩野谷 博  
(エーザイ・安全研)

15:20 医薬品の抗原性試験におけるモルモットPCA反応の至適条件  
桑原 孝、朝波 省吾、下野 和之、植島 基雄  
(大塚製薬工場・鳴門研)

15:35 抗原性試験方法の改善の試み  
(ハプテン単独でのアナフィラキシー)  
中井 洋一、井上 眞、田上 雅永  
(武田薬品工業・研究開発)

15:50~16:35

座長 佐藤哲男 (千葉大学薬学部)

15:50 LECラット(肝炎自然発症ラット)血清中に見いだされた自己免疫性抗体は薬物性肝  
障害時にも認められる  
永山 績夫<sup>1)</sup>、横井 毅<sup>1)</sup>、梶原 理恵子<sup>1)</sup>、川口 安郎<sup>2)</sup>、  
鎌滝 哲也<sup>1)</sup>  
(<sup>1)</sup> 北大・薬, <sup>2)</sup> 大鵬薬品・開発研)

- 16:05 T-2 toxin のマウスにおける接触性過敏反応抑制作用  
河内 泰英<sup>1)</sup>、B. L. Blaylock<sup>2)</sup>、C.E. Comment<sup>2)</sup>、  
M.I. Luster<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup> 大鵬薬品・安全研, <sup>2)</sup> Immunotoxicology Group, NIEHS USA)
- 16:20 アセトアミノフェン肝毒性における免疫系の関与  
築館 一男<sup>1)</sup>、○園田 二郎<sup>1)</sup>、飯島 恵美<sup>1)</sup>、見上 孝<sup>1)</sup>、  
山津 清実<sup>1)</sup>、名倉 宏<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup> エーザイ・安全研, <sup>2)</sup> 東北大・医・病理学)

## 免疫毒性とアレルギー

林 秀 男

熊本大学名誉教授

免疫毒性はxenobiotics,すなわち外因性のあるいは多種の生物活性物質（医薬品や環境汚染物質を含む）が生体に与えられるとき、あるいは入ったときに、生体の免疫系に直接あるいは間接的に相互作用を及ぼす結果、生体にとって好ましくない効果（副作用）が引き起こされるような現象であり、その目標は如何にそれをチェックするかである(1984)。この分野におけるin vitro実験、また動物実験については、データが集積しつつあるが、ヒトについては偶発的な例から出発していることが多い。

従って、現在必要とされる問題は、1.実験動物やヒトにおける免疫系のin vivoの実態はどうか。2.このin vivo系に及ぼす医薬品などの毒性（傷害）効果の実態はどうか。3.それらの毒性効果を臨床的、実験的にいかに評価できるか。4.得られたデータを将来の研究にいかに役立てられるか、また誘起される病変をいかに防ぎうるかであろう。

外部環境には、抗原（たとえば低分子の化学物質から複雑な微生物の産物など）は無数にあるし、内部環境因子（例えば非自己移植細胞や化学的あるいはウィルスの的にtransformedした細胞も含めて）も、すべて抗原として認識される。また、アレルゲン（抗原の特異的クラス）は、アレルギー反応を引き起こす。また、ハプテンは生体内でタンパク質、細胞と結合して抗原性を発揮する。

免疫毒性が注目されるようになった理由は、いろいろであろうが、免疫系に作用する医薬品が多くなったことが重要である。種々の抗癌剤やステロイド剤のほかに、免疫抑制薬の開発による免疫機能の抑制、免疫調節薬の医薬品としての利用、さらに免疫系の調節因子と言われる各種のサイトカインの治療への利用などである。周知のように、免疫系は非常に複雑な、しかも微妙に調節されたネットワークを介して機能を発揮していると考えられるので、例えばある

サイトカインの投与は、いかにも合理的にみえるが、免疫系がネットワーク的に機能するシステムであるだけに、*in vitro*のデータがそのまま利用できるかどうか疑問である。サイトカインの*in vivo*実態をよく知っておく必要がある。また、サイトカインの機能（情報伝達）は、その多くがautocrine、paracrineとして局所的に発揮されるし、その活性は極めて急速に消失することが多い点を考えると、投与方法に問題が起こる。

免疫の研究は急速に、しかも高度に組み立てられたシステムの樹立を目標として進展してきたので、どこまでが*in vitro*の成果で、どこまでが*in vivo*の成果であるか、よく検討する必要がある。免疫毒性の研究対象は、*in vivo*の場合（特にヒトの）であることを考えると、*in vivo*での確認がより重要となる。

与えられた課題に付いては、既に多くの優れた総説等がある。従って演者は、抗体の産生に始まる免疫反応（アレルギー性組織傷害を含めて）について、そのプロセスをできるだけ*in vivo*における形態学と生化学を平行させた観点から、いくつかの例を示して基本的に考えてみたい。このような違った立場は、免疫毒性研究の一つの出発点になるかも知れない。

1.免疫に関与する細胞群の局在と接触、その破綻について。たとえば、抗原提示細胞とリンパ球、T細胞とB細胞の相互関係など。2.リンホカインの生物学的役割について。例えば、反応局所に実在するか。生体内で確かに機能しているか。もし、機能するとすれば、どのような形（遊離か、複合体か）を必要とするか。作用を受ける細胞の成熟段階によって、その影響は違うかどうか。その多機能は目的に応じて、局所でどのように分離、調節されるのか、など多くの問題が残されている。また、欠損動物（例えば、1L-2, 1L-4）における欠損の影響は、どのように出現するかは、リンホカインの*in vivo*実態を考えるのに重要である。3.アレルギー性組織傷害は、これまでI, II, III, IV型に分類して、その機序を説明してきたが、それで十分かどうか。特にヒトの病変では、それぞれの型の複雑な組み合わせ、あるいは新しい機序の参加を考える必要があるかもしれない。組織傷害は常に、プロセス（連鎖反応の流れ）と理解されるので、病変を引き起こすべき化学因子は、確かに局所に存在し、それぞれの対応する病変を再現（特異性）できるかなど、病変因子としての条件を満足するかの疑問が残されている。4.癌（特に局所）における免疫反応と疑問について。

報告に引用した文献（単行本）：

J.J. Oppenheim, D.L. Rosenstreich, and M. Potter. "Cellular functions in immunity and inflammation, Edward Arnold, London, 1981.

I. Roitt, J. Brostoff and D. Male. "Immunology" , Gower Med. Publ., London, 1989.

菊地 浩吉（編）. "医科免疫学"（3版）, 南江堂, 1989.

W. E. Paul. "Fundamental Immunology", Raven press, New York, 1984.

H. Hayashi. in "International Review of Cytology" (G. H. Bourne and J. F. Danielli, eds.). vol.40, PP.101-151, Academic Press, New York, 1975.

H. Hayashi, M. Honda, Y. Shimokawa and M. Hirashima. *ibid*, vol.89, PP.179-250, 1984.



免疫毒性 - 基礎の立場から -  
毒性標的としての免疫系の特性

大 沢 基 保

帝京大学・薬学部

免疫系およびその構成細胞は、化学物質や薬物などの生体異物の毒性標的の一つとして定着しつつある。体内に取り込まれた物質が、標的として免疫系の傷害や機能異常を引き起こし、免疫能の不全や異常亢進が生じることを免疫毒性と称するが、生体防御能低下による感染や発癌のリスク増大や異常防御反応としてのアレルギーや自己免疫の発症など、健康への影響は多岐にわたる。最近では、免疫毒性の概念が拡大されつつあり、栄養物質の欠乏や過剰摂取による免疫異常、また、サイトカインや抗体などの生物製剤や免疫調節剤の投与による副作用なども包括されるようになってきた。

しかし、免疫系の標的としての特性は何か、また、ある物質の毒性がなぜ免疫系を標的として選択的に発現するのかと言う点についてはあいまいな部分が多い。この理由として、免疫系は systemic toxicityの発現に関与し、神経系と同じように従来 of 標的器官の概念では捉えがたいこと、また、複雑な細胞構成と機能のため研究指標を絞りにくいこと、などがあげられる<sup>1)</sup>。今回は、毒性標的としての免疫系の諸特性を取り上げ、毒性学に提起された新たな問題点について私見を提示したい。

### 1. 選択毒性と標的

選択毒性は種間における毒性物質の代謝能の差に主に着目し、標的部位における毒物の有効濃度の大小を重視している。この考え方は、種間のみならず、ヒト集団における個体間変動や個体内における臓器間の毒性発現の選択性にまでに応用しうる。しかし、慢性毒

性や遅発性の毒性の場合には物質の代謝特性だけでは説明しがたく、種々の物質に対する毒性感受性部位の有無や毒性の発現様式という標的の特性をさらに考慮する必要がある。

免疫系を標的とする免疫毒性の発現は、これらのことを考慮すべき典型とも言える。In vitro研究の進展により、免疫系を構成する免疫細胞の毒性標的としての特性が明らかにされつつあり、以下にリンパ球を中心にその特性を例示してみる。

## 2. 毒性標的としての免疫系の特性

### ① 一次標的と二次標的

細胞毒や免疫抑制物質による免疫細胞の傷害や機能障害は、食作用のような非特異的免疫や抗体産生や感作細胞による特異的免疫の各免疫能の低下をもたらす。この場合、免疫系は毒性物質の作用部位と毒性発現部位が一致した標的である。一方、ハプテンや免疫細胞の刺激因子となる物質は免疫細胞の機能亢進をもたらし、それにより免疫系以外の部位でアレルギー症状や自己免疫症状を引き起こす。この場合は、毒性物質の作用部位（一次標的）と毒性発現部位（二次標的）が異なる。この例では、二次標的の障害に結びつく免疫機能指標の選択と、免疫機能の亢進に宿主の遺伝的要因の影響が大きいことが、研究実施上の難点となっているが、感受性遺伝子の生産物が毒性発現機構のヒントを与え得る。さらに、免疫細胞の機能は体内の栄養、内分泌、炎症などの各因子に影響されやすい。免疫系以外の標的への毒作用によるこれら因子の変動は、免疫系を二次標的として機能障害を生じ得る。これら因子の関与の有無は、免疫細胞のin vitro実験系により確認し得る。

### ② 多種類の構成細胞による多様な機能

感染因子や異物に対する生体防御という機能からみると免疫系は一つの標的としての共通性を持つが、防御反応にはマクロファージ、顆粒球、NK細胞、T・Bリンパ球など多種類の細胞が関与する。これらは生体防御のためにおのおの分化した機能を果たす一方、細

胞の相互作用や液性因子を介した高度な免疫ネットワークを形成している。従って、細胞レベルでは免疫系は複数の毒性標的からなる標的系といえ、免疫毒性の検索には多項目の試験が要求される。

### ③ 他の体細胞と比べて活発な構成細胞の増殖・分化

免疫系は、さらに、分化段階の異なる各細胞から構成される。骨髄や胸腺などの中枢リンパ器官では未成熟な免疫系細胞の増殖・分化が恒常的に進行しており、末梢のリンパ器官では抗原刺激によるリンパ球の活発な増殖が起こる。このため、全ての毒性物質について当てはまるわけではないが、免疫系細胞は代謝拮抗や代謝阻害による増殖阻害物質への毒性感受性が高い。骨髄幹細胞の傷害は免疫系細胞の全般的な減少をもたらすが、Cyclophosphamideの実験では、その毒性感受性は骨髄幹細胞と脾リンパ球との間でほとんど差が認められない<sup>2)</sup>。

リンパ球では免疫分子が盛んに産生される一方、自己防御に関わる薬物代謝酵素活性やメタロチオネインの誘導能が低い。このことも毒性感受性を高める一因と考えられる。

### ④ 特異的な機能分子の産生・発現

免疫系細胞は各種のサイトカインや抗体を産生・分泌し、また、レセプターや表面抗原を発現する。その一部は他の細胞種でも産生あるいは発現されるが、それらは免疫系細胞に特異性の高い分子である。また、Tリンパ球の活性化に関与する転写因子 NF- $\kappa$ Bや、免疫抑制物質と結合する Ah-receptorやイムノフィリンなどの特徴的な分子の存在も明らかになってきた。これらの分子の生成や関連機能を修飾する物質は、免疫系あるいはその構成細胞に高い選択毒性を示し得る。Anthraquinone, Cyclosporin, Deoxycorformycin, TCDなど多くの物質が、*in vitro* の試験系において特定の免疫細胞に対し選択的に作用し、免疫ネットワークを介して他の細胞に二次的にその影響を及ぼす<sup>3)</sup>。Cyclosporin Aは、NF- $\kappa$ Bの細胞質から核への移行を阻害してIL-2などのサイトカイン遺伝子の発現を抑制し<sup>4)</sup>、Tリンパ球の活性化を選択的に阻害すると考えられている。われわ

れの研究でも、カドミウムによる選択的なTリンパ球の増殖反応の阻害は、亜鉛依存性の機構の阻害に基づく可能性が示された<sup>5)</sup>。

一方、薬剤としてのサイトカインなどのヒト免疫分子の使用では、遺伝子組換え製剤の抗原性のほかに、直接的な免疫調節能への影響が問題となる。臨床試験では、G-CSF 以外は免疫系に限らず何らかの影響が報告されている<sup>6)</sup>。

毒性標的としての免疫系の特徴に基づき、免疫毒性の研究は今後 Environmental Immunotoxicology, Clinical Immunotoxicology, Nutritional Immunotoxicology, Molecular Immunotoxicologyなどの分野に分化していくであろう。しかし、いずれの場合も免疫系細胞の標的としての細胞学的、生化学的特性をさらに明らかにすることが、免疫毒性の発現機構解明の基盤となる。

## 文献

1. 大沢基保: トキシコロジーフォーラム, 9:546-558 (1986)
2. Tucker, A.N., Sanders, V.M., Hallett, P., Kauffmann, B.M., Munson, A.E.: Environ. Health Perspect., 43:123-127(1982)
3. Wiedra, D., Greenlee, W.F.: In Principles and Practice of Immunotoxicology (Miller, K., Turk, J., Nicklin, S., eds.), pp.324-343, Blackwell Sci. Pub., Oxford, (1992)
4. Franagan, W.M., Corthesy, B., Bram, R.J., Crabtree, G.R.: Nature, 352:803-807 (1991)
5. Otsuka, F., Ohsawa, M.: Chem.-Biol. Interactions, 78:193-205 (1991)
6. Cohen, R.B., Siegel, J.P., Puri, R.K., Pluznik, D.H.: In Clinical Immunotoxicology (Newcombe, D.S., Rose, N.R., Bloom, J.C., eds.), pp.93-108, Raven Press, New York, (1992)

免疫毒性 —臨床の立場から—

高橋 昭三

昭和大学 医学部

## 免疫毒性／アレルギー性試験評価法の バリデーション

宇高 奎二 ・ 安田 峯生

日本ロシュ研究所 ・ 広島大学 医学部

近年、医薬品、農薬、化粧品、食品添加物などの化学物質、工業化学製品やその原料となる物質、あるいは環境汚染物質等、いわゆる“生体異物” [Xenobics] に、ヒトが短期・中期・長期にわたり暴露されたとき、その結果として誘発される毒性傷害の標的器官として、免疫系が注目されるようになってきた。というのも、これら“生体異物”と免疫系の相互作用は、時として、湿疹様の皮膚反応から致死的なアナフィラキシーショックにいたる種々雑多なアレルギー反応を、また時として免疫系細胞・組織・器官の器質傷害、機能障害、さらにはこれらに基づく個体の局所性あるいは全身性の有害作用をも誘発することが知られてきたからである。このような“生体異物”に起因する免疫系への毒性作用の発現、進展過程における病態ならびにその機序を研究する境界領域の学問分野として“免疫毒性” [immunotoxicology] が新しく台頭してきたが、現時点での急務は、ヒトで誘発される免疫毒性を予知するための動物実験及び、*in vitro* 系での安全性試験法の手立てを確立することである、と考える。

生体の免疫系は、血液系と同じく広く個体全体に分布する各種の免疫担当細胞によってその機能が担われている。そのため、他の標的器官のように、一定の器官に限局するような主変化はつかみにくい。全身に広く分布した免疫系器官・組織を介して制御される系統だった免疫反応の異常の場合は、【1】免疫担当細胞を産生する一次リンパ器官・組織、【2】免疫担当細胞間の相互作用を介した分化・増殖・抗体産生細胞／細胞免疫成立の場となる二次リンパ器官・組織と、【3】液性レベル・細胞レベルでのアレルギー反応の場（全器官・組織が対象となる）、の3つに大きく分けられる。免疫毒性反応の発現様式は、いずれの場合も対象となる物質の種類、化学的性状の違い、暴露形態（作用時間）、局所の解剖学的違い、などによって差異があるが、殊に【3】における免疫毒性反応局所の形態学的変化には本質的に共通した基本様式がある。すなわち、被験物質が刺激として作用すると、組織細胞の変性・血管拡張・毛細血管の透過性亢進・リンパ管閉塞・遊離細胞の遊出・浸潤・増殖などのよく知られた一連の局所反応が惹起される。従って症状などを主体とした肉眼的所見と、反復投与毒性試験の成績を基盤に免疫毒性が疑われたとき、対応する *in vitro* 系での免疫機能検査の実施が手始めと

なる試験系、と考える。

そこで、本日のワークショップでは、免疫毒性を【1】体内に導入された生体異物がなんらかの機縁で抗原性を帯び、生体の免疫応答系を介して生命現象に障害的に働く作用により発現する毒性と、【2】“生体異物”が免疫系細胞・組織・器官に直接的に、あるいは間接的に有害作用を与えることによって発現する毒性、という立場から、免疫毒性によって誘発された病像の実態と、それを検出するための手立て、更には得られた試験成績に基づく評価法のバリデーションについての御討論を願うものである。

まず、最初のセッションでは、“生体異物”の中から薬物を選定、薬物による治療の過程で誘発される薬物アレルギーを、実験動物を用いた *in vivo*、*in vitro* 系での試験系を駆使して如何に検出するかに焦点を絞る。現在、本邦では GLP に対処した薬物の安全性試験の一環として、抗原性試験は必須の検索項目となっている。しかし、薬物の免疫原性、アレルギー反応惹起能を予知するための試験系はまだ確立されていない。そこで、本報告では最初にヒトでの薬物アレルギー誘発例の実態を、次いで3年前、学際的立場から作成された“抗原性試験法案”を中心に、薬物の免疫原性、アレルギー反応誘発能～免疫反応性～を実験動物を用いた実験例で如何に検出するかを中心に、試験法の標準化を試みた経緯について報告がなされる。これに対して、製薬協、安全性評価委員会基礎部会の抗原性試験法検討委員会の各位によって、このような動物レベルでの試験法の問題点とその対策を中心に、果たしてヒトでのアレルギー発現の予知に役立つか否かについての検索結果、評価法についてのバリデーションについて討議する。最後に、国際的立場から抗原性試験の今後の在り方についても問題点を提起したい。

第二のセッションでは、1984年にルクセンブルグで開かれた国際ワークショップで定義された『“生体異物”が免疫系と反応する結果、望ましくない作用を起こすに至る現象を研究するもの』というコンセプトのもと、国際的に研究班を組織、免疫毒性検出法確立のための標準被験物質を選定、国際間で同一プロトコールのもとで試験を実施、その成績を基盤に“免疫毒性試験実施基準作成”にむけての系統的アプローチがなされている。この現状がまず国立衛生試験所の安全性生物試験研究センターの担当グループによって紹介される。

ついで、対象には医薬品にかわって環境汚染物質として脚光をあびている多ハロゲン化芳香性炭水素化合物の‘ダイオキシン’を選定、免疫系細胞・組織・器官の構造と機能の変化について、更に免疫系細胞の産生・成熟の場となる胸腺を標的とした毒性変化とその反応機構解明のための *in vitro* 試験法の紹介と、得られた試験成績について香川医大の免疫毒性担当グループに御披露いただく。免疫系をターゲットとして惹起される毒性変化を検索する手立てとともに、評価についての判断基準が示されるものと期待している。

なにぶんにも、誕生して日の浅い学問分野であり、しかも現実に密着した

免疫毒性の研究の遂行には多様な方向からのアプローチが不可欠である。この点、生物系・非生物系両領域にわたり、それぞれ専門を異にする分野の専門家同士の協力が如何に必要かを痛感するが、境界領域の学問分野での産官学の研究者の討論、情報交換の場として本ワークショップが何らかのお役にたてれば、と願ってやまない。



# 医薬品を対象とした抗原性試験法 —実施例とヒトへの予見性—

宇高 奎二

日本ロシュ研究所

## はじめに

新薬開発過程においてGLPに対処した薬物の安全性確認のため、毒性試験の一環として、実験動物を用いて行なわれる抗原性試験（薬物アレルギー性試験ともよばれる）は、生体の免疫応答という生物学的基質の上で成立する“アレルギー”と呼ばれる特異的な異常反応が、薬物によって誘発されるか否かを検索する試験系である。しかし、アレルギー学の進歩した今日といえども、薬物アレルギーの発現機序については不明な点が多く、薬物の免疫原性、アレルギー反応誘発能を予知するための実験動物を用いた *in vivo*、*in vitro* 試験系はいろいろ検討されているが<sup>1~6)</sup>、いまだ確立されたものはない。

そこで、本報告では、まず薬物アレルギーの基本概念とヒトでの薬物アレルギー誘発例の実態を報告、ついで、3年前の1989年に学際的立場から作製された“医薬品の抗原性試験法（案）”を中心に、薬物の免疫原性および免疫反応性を、実験動物を用いた *in vivo*、*in vitro* の試験系でいかに検出するか、その手立てについての解説を試みる。本試験法（案）では、原則的にすべての新医薬品を対象とした試験法の概要と、試験の実施要項が提示されているが、試験法の標準化への一つの手立てが示されていると解する。

そして、最後にこのような動物レベルでの試験系が果たしてヒトでのアレルギー発現の予知に役立つか否かを考察、国際的立場から抗原性試験の今後の在り方について問題点を提起したい。

## 薬物アレルギーの基礎概念

本来治療の目的で常用されている薬物は、通常臨床用量でヒトに単回投与しても有害反応は起こらないが、繰り返し投与を続けていくうちに、その薬物に対して生体が異常に過敏に反応するようになってくるのが、ごく小數例ではあるが見受けられることがある。これは、ヒトが当該薬物に対して特異的に“異常な反応性を獲得した状態”に陥ったためである。Pirquet<sup>7)</sup>はすでに今世紀はじめ、この様な現象は生体が同一物質に対して最初とは異なった反応を示す特質を獲得したものと推定し、このような異常反応を起こす準備状態に対して“アレルギー”と名付けた。

この Pirquet の理念に従えば、“薬物アレルギー”とは、生体に導入され

た薬物が何らかの機縁で抗原刺激として働いたときに、その薬物抗原に対して生体が“抗体”あるいは“感作リンパ球の産生”という形で対応し、当該薬物の再度導入に対していつでも“抗原抗体反応/抗原と感作リンパ球の相互反応”を誘発しうる状態として把握できる。したがって、薬物アレルギー反応(薬物過敏症)は“薬物アレルギー”状態にある個体が、再度導入された薬物と抗原抗体反応/薬物と感作リンパ球の相互反応を起こし、その結果、誘発された生体に傷害的に働く異常毒性反応と理解される。

Gell および Coombs<sup>8)</sup> は、これらアレルギー反応がいかに生体に傷害的に働くかを解析するために、この反応誘発時にみられる臨床的症状を分類し、反応に関与する抗体/感作リンパ球の性状、抗原との相互反応の形式を基盤に I 型から IV 型の反応型に示される 4 つの機序によって惹起される可能性を示した。一例として、1976 年～1981 年にかけて、本邦で誘発された薬物アレルギーを、症候別発現頻度と原因薬物グループ別にみた場合の全国集計が大久保らによって報告されたが<sup>9)</sup>、薬物によるアレルギー反応の症状は、皮膚を場にする場合と、皮膚以外の器官を場にする場合とに大別されるが、前者が 80% 以上を占め、比較的軽症例が多い。ただここで留意すべきことは、投薬過程で薬疹の発現をみたら、肝、胃の障害、血液障害などの有無を検査する必要性が強く示唆される。また、全身性のショック症状は、その発現頻度は低いが、しばしば生命に危険な重篤症状を伴うため、事前の予知が必要とされる。しかし薬物アレルギーで誘発された反応は、全く性質の異なった薬物でも、全く構造を異にする薬物でも似かよった反応様相を呈する。換言すれば、薬物の化学構造と薬物アレルギー反応の発現形式の間には何等関連性は認めがたい。この点、薬物の過剰投与あるいは蓄積作用によって発現する毒性反応とも趣を異にしている。

一方、同じ薬物でも薬物アレルギーを起こしやすい場合と起こしにくい場合とがある。これは、薬物の投与方法(体内に入るルート)、投与されたヒトの身体条件および遺伝的体質、薬物量および投与期間、年齢、性などによって影響される。また薬物アレルギーの特殊性として認識すべきことは、薬物の注射、塗布による投与だけでなく経口投与によっても誘発されるということである。さらに、薬物投与をうける患者が、極端にアトピー性体質の強い場合、SLE など自己免疫疾患に罹患している場合などは、通常あまり問題にならない薬物でも薬物アレルギーを誘発しやすいことがあるので留意する必要がある。

また、薬物アレルギーの症状を、上述 Coombs と Gell による免疫反応の型による分類を基盤に推察すると、これらいずれの型も単独で発現する場合もあれば、またいくつかの型が合併して起こることもある。これらアレルギー症状について、現在までに判明している主な原因薬について解析を試みたが、実際には誘発された症状、反応様相から、そのおのおのがどの型のアレルギー反応を基盤として発生しているか判明しがたいもの、あるいは免疫以外の機序が想定されるものが、皮膚に於ても、皮膚以外のほとんどの器官におい

ても、極めて多彩に認められる。とすれば、この薬物アレルギーを予知するための抗原性試験の対象は、最も重篤な急性アレルギー反応として知られるアナフィラキシーショックに焦点を絞り、他の異常変化は免疫毒性の立場から検討した方がよいと考える。

さらに、薬物によって誘発される免疫反応も薬物アレルギーだけとは限らないことに留意すべきである。例えば、薬物が生体の免疫機構に変調的に作用した結果誘発されると思われる自己免疫疾患などが発生する場合がある。同じように、免疫以外の機序によって発生する不耐性〈intorelable〉とかイディオジンクラジー〈idiosyncrasy〉にも類似症状がみられることに留意しなければならない。

ともあれ、もし実験動物を用いた試験系で、生体異物としての薬物が免疫応答を誘導し、その結果その薬物に対する抗体や感作リンパ球を産生、液性レベル、細胞レベルでのアレルギー性組織反応が誘発されたとき、“その薬物は抗原性を持つ”と判定しうる。こういった基本概念のもとに、薬物の

① 免疫原性〈immunogenicity〉：免疫応答を誘導する性質

② 免疫反応性〈immunoreactivity〉：抗体や感作リンパ球を反応できる性質を指標とした抗原性試験について、1989年に学際的立場から作製した試験方法を紹介する。

## 試験法の概要

### I. 被験医薬品

本試験の対象となる薬物は、各種の蛋白性およびペプチド性ホルモン、酵素製剤、抗生物質、ワクチンなどの高分子異種物質はもちろんのこと、低分子化合物も体内で適当な担体物質と結合すれば、抗原性〈免疫原性〉を発揮する<sup>10)</sup>ので、程度の差はあるが、すべての薬物は理論的に薬物アレルギーの原因〈抗原〉となりうるという立場をとって、すべての薬物とした。

ただし、非水溶性薬物の場合、溶解補助剤などを用いて水溶液を作製して検索を試みることをすすめてはいるが、評価に支障をきたすことが明白な場合、理由書を提示することによって除外できる。また、点眼剤、塗布剤など外用医薬品、バイオ製品については、本指針の適用から除外している。この除外項目によって、実施面で支障をきたすことはないと考える。

### II. 試験動物

各試験系において感受性の高い動物を自由に選択してよい形になっているから、科学的に acceptable な動物種、系統を選定すればよい。ただ、演者の経験として、感作実験には飽食動物より一定の制限食で飼育した動物の使用を推奨したい。

### III. 試験方法

—新しい“薬物過敏症動物モデル Drug Hypersensitivity Animal Model”  
の作製とその抗原性試験への導入—

本試験系の対象となる薬物は、化学構造の明らかな低分子の化学合成薬物と高分子の蛋白性薬物あるいは生物製剤にわけられるが、前者の場合、薬物はハブテンと考える。従って、キャリアとの結合が抗原刺激として働くための必須不可欠の条件となる。そのため、本試験実施に先立ち、あらかじめ被験対象となる薬物をハブテンとし、第一次〈感作〉抗原作製のためのキャリア蛋白質としてホモ血清アルブミン〈HSA〉を、第二次〈惹起〉抗原作製のためのキャリア蛋白質としては、HSAと交叉性のない卵白アルブミン〈OVA〉を選定した。

よく知られているように、ハブテン・キャリア複合体の免疫原性の発現は、B細胞に対する抗原決定基はハブテン基、ヘルパーT細胞に対する抗原決定基はキャリア分子上にある特定の部位にみられる<sup>11)</sup>。また、原則的に免疫原性をもたない物質はハブテン基に対する抗体産生においてキャリアとなり得ないといわれていた。ところが免疫原性を持たないと考えられる自己の成分をキャリアーとして、ハブテン・自己成分複合体で免疫すると、容易にハブテン基に対する抗体産生がおこってくる。たとえば、演者らの実験によると、マウス血清アルブミン〈MSA〉にDNP基を導入したDNP-MSAでマウスを免疫すると、DNP基に対する抗体が容易に産生される。この場合の抗ハブテン抗体産生の機序を細胞レベルで解析すると、ハブテン・自己成分複合体で免疫するとハブテン基またはハブテン基を含むキャリアーの一部に対するB細胞だけでなく、ヘルパーT細胞も活性化されることが明らかとなった。類似の成績はマウスIgG〈MGG〉にDNPを導入したDNP-MGGで免疫したマウスにおいても報告されている<sup>12)</sup>。一方、ハブテン・非自己成分複合体の場合には、ハブテン基に対してB細胞のみが活性化されT細胞は活性化されない。このような事実に基づいて、あらかじめ試験管内で、完全抗原としての第一次抗原には薬物・自己成分キャリアー複合体を、第二次抗原には薬物・非自己成分キャリアー複合体を作製した。

ついで、薬物感作抗原を用いて“薬物過敏症動物モデル”をつくる。このモデル動物を用いて、対応する惹起抗原にアレルギー反応誘発能があることを *in vivo*、*in vitro* の試験系を用いて確認する。

#### IV. 薬物感作抗原・惹起抗原の調整法<sup>13)</sup>

被験薬物アミノアンチピリン〈4AAP〉のように芳香族第一アミノ基を有する薬物は被験動物と同種の動物から調整した精製血清アルブミンならびにOVAと、それぞれジアゾカップリング反応を用いて化学的に結合させ、同種血清アルブミンをキャリアーとした薬物感作抗原と、OVAをキャリアーとした薬物惹起抗原とを調整する。ペニシリンGの場合は上述2種のアルブミンとアルカリ条件下で37℃、24時間加温して感作抗原および惹起抗原を作製する。

#### V. 薬物過敏症動物モデルの作製ならびに薬物蛋白結合 惹起抗原のアレルギー反応誘発能確認試験

試験動物としては、通常、マウス、ラット、モルモット、ウサギなどが

用いられるが、系統株については、特に指定しない限り、一般毒性、特殊毒性試験で用いた同じ動物株を選定する。

一次感作抗原による感作に際しては、可能な限りの免疫学的手段を用いて強制的に薬物過敏症動物モデルを作製する。アジュバントを使用した感作法については、Chase の成書<sup>14)</sup>を参照されたい。

次に、この薬物過敏症動物モデルを用いて、二次惹起抗原の抗体あるいは感作リンパ球検出能を確認する。検出にあたっては、二次抗原を用いて *in vivo* (アルサス型ならびに遅延型皮膚反応) ならびに *in vitro* (PCA反応、間接赤血球凝集反応、リンパ球幼若化反応など) の試験系を利用して検索する。これら試験系の成績の詳細については、既報を参照されたい<sup>13)</sup>。

## 試験実施要項

まず、問題になるのは原体-蛋白質結合抗原の調整法である。上述したように、化学構造の明らかな低分子の化学合成薬物の場合、薬物はハプテンと考えられる。従って、キャリア蛋白との結合が抗原刺激として働くための必須不可欠の条件となる。そのため、本試験実施に先立ち、あらかじめ被験対象となる薬物をハプテンとし、第一次(感作)抗原のキャリア蛋白としてホモ血清アルブミン(HSA)を、第二次(惹起)抗原作製のためのキャリア蛋白としては、HSAと交叉反応性のない卵白アルブミン(OVA)を選定、薬物・蛋白結合物を作製する。ここで留意すべきことは、血清アルブミンの場合、蛋白1分子あたり10~30分子程度結合させるとよいといわれているが、10以下では抗体ができにくく、また多くつき過ぎると不溶化し、かえって抗体産生が悪くなるということである。

ハプテン(薬物)と担体蛋白とを結合させる方法<sup>15~19)</sup>の主なものは以下のように要約される。

- (1) カルボキシル基を有する薬物と蛋白のアミノ基とをペプチド結合により(-CONH-)結合させる試薬には、種々のカルボジイミド試薬、N-ヒドロキシコハク酸イミドジシクロヘキシルカルボジイミド試薬やアルキルクロロホルメイト試薬が用いられる
- (2) アミノ基を有する薬物と蛋白のアミノ基を結合させるにはグルタルアルデヒドが用いられる
- (3) アミノ基を有する薬物と蛋白のチオール基を結合させるには、N-(meta-maleimidobenzoyloxy)succinimide ester がよく用いられる
- (4) 水酸基を有する薬物では、水酸基をオキシメチルカルボン酸に誘導した後、(1)(2)あるいは(3)の方法で蛋白と結合させる
- (5) ケトン基を有する薬物では、O-カルボキシメチルヒドロキシルアミンとの反応でSchiff baseを調整した後、(1)~(3)の方法で蛋白と結合させる
- (6) 多価アルコールは過ヨウ素酸酸化によりアルデヒドとし、アミノ基



と結合させる

〔7〕芳香族第一アミノ基を有する薬物とたんばくの結合には、ジアゾカップリング反応が用いられる

〔8〕芳香族化合物と蛋白を結合させるには、芳香族化合物とP-アミノ安息香酸のジアゾカップリング反応後、〔1〕～〔3〕の方法で蛋白と結合させる

なお、特異性の高い抗血清を得るためには、ハプテン分子の構造が保持され、かつ、その構造特異性の部分にできるだけ離れた位置で担体たんばくと結合させるとより有効であることを付記する。ともあれ、薬物・たんばく結合物についても各研究施設でデータを蓄積、相互にデータの交換をしながら、よりよい結合法を開発することが重要であると考えらる。

本試験実施に際しては、あらかじめ被験対象となる薬物とともに、陽性標準薬物として、アミノアンチピリン〈4AAP〉とペニシリン〈PCG〉を選定、一般低分子薬物の抗原性試験に供した。ついでそれぞれの薬物をハプテンとし、第一次〈感作〉抗原作製のためのキャリア蛋白としては、HSAと交叉反応性のない卵白アルブミン〈OVA〉を選定、被験薬物の構造上の特性から上述薬物・蛋白結合抗原調整法のいずれかを用いて作製した。4AAPの場合は、Diazo 化反応を、ペニシリンの場合はアルカリ条件下で加温、それぞれ化学的に結合させ、薬物感作抗原と薬物惹起抗原を調整する。

試験実施に際しては、可能なかぎりの免疫的手段を用いて、一次感作抗原で強制的に薬物感作動物モデル〈hypersensitive animal model〉を作製する。この感作動物モデルを用いて、二次薬物惹起抗原の抗体、あるいは感作リンパ球検出能を確認する。検出にあたっては、薬物惹起抗原を用いて *in vivo* 〈即時型ならびに遅延型免疫反応〉ならびに *in vitro* 〈リンパ球幼若化反応、PCA反応、赤血球凝集反応など〉の試験系を利用して検索する。

次いで、当該被験薬物を単独で上記の方法で作製した薬物感作用動物モデルの皮内に惹起抗原として注射、注射局所に即時型〈アルサス型〉あるいは遅延性皮内反応発現の有無を検索する。また薬物感作動物モデルから血液を採取、分離した血清については薬物・HSA結合物を惹起抗原として用い、薬物の免疫原性を全身性アナフィラキシー誘発能試験、PCA、受身赤血球凝集反応〈PHA〉などで検出する。また、当該動物のリンパ節、脾臓から分離培養したリンパ球は惹起抗原を添加、リンパ球幼若化反応により免疫原性の有無を検索する。これらの成績のうち、陽性対照物質4AAPならびにPCGによる全身性アナフィラキシーショック誘発例についての試験結果では、陽性対照として用いたペニシリンはアレルギー反応誘発能を示すが、免疫原性は検出できなかつた。一方、4AAPについては免疫原性、アレルギー反応誘発能ともに検出できなかつた。同時に実施したPCA反応、受身赤血球凝集反応、リンパ球幼若化反応による検索試験でも全く同じ成績が得られた<sup>5)</sup>。

このように、アレルギー反応誘発能の確認された薬物蛋白結合惹起抗原を用いると、通常実施されている毒性試験、生殖毒性試験の無影響量に相当

する低用量群動物に、当該薬物の抗原性を機縁づけるような“免疫原性”を、薬物単独抗原では“アレルギー反応誘発能”を検出する in vivo ならびに in vitro の試験系が適用できる。

これらの抗原性試験成績を総括すると、

- ① 抗原性試験に際しての動物種の感受性：モルモット>マウス、ラット
- ② 薬物を抗原とした免疫反応誘導に対するアジュバントの効果は、モルモット、ラットを用いたPCA、PHA反応に対しては、FCA〈フロインド完全アジュバント〉が、マウスを用いたPCA反応の誘発には Alum〈アルミニウムアジュバント〉が優れていた
- ③ 免疫反応誘導に際して、用いる感作抗原に対するキャリア蛋白の適合性に対してはモルモットの場合は同種蛋白、異種蛋白の間に差異はないが、ラット、マウスでは惹起抗原には同種蛋白が推奨できる
- ④ 薬物-蛋白結合物の結合分子比は、10以上が必要とされる
- ⑤ 現在まで実施してきた薬物過敏性評価のための試験系の中では、ASA、PCA、PHAが推奨されるが、感受性からみると、

ASA > PCA / PHA > SR / LTT である

最後に、本試験系は当該薬物の投与をうけている患者の血清、あるいは末梢血リンパ球を用いてヒトでのアレルギー反応誘発能の検索に適用できる、という利点があることを付記する。

## 参考文献

- 1) Samter M. and Parker C.W. : Hypersensitivity to drugs, 1, Pergamon Press, Oxford, 1972
- 2) Amos H.E. : Allergic drug reactions, 7, Edward Arnold Pub. Ltd., London, 1976
- 3) 日本製薬工業協会安全性委員会：薬物アレルギー～実験動物を中心として～、基礎研究部会資料16、1980
- 4) 宇高壺二、小田島寿子：トキシコロジーフォーラム、6、430～440、1983
- 5) 宇高壺二、井上智彰：トキシコロジーフォーラム、9、578～589、1986
- 6) 宇高壺二：免疫薬理、10、127～139、1992
- 7) Pirquet C. : Allergy, J. Springer, Berlin, 1910
- 8) Gell, P.G.H. and Coombs, R.A.A. : Clinical aspects of immunology, 2nd edn., Blackwell Scientific Pub., Oxford, 1968
- 9) 大久保滉、畑一也：免疫と疾患、4、203～210、1982
- 10) Parker C.W. : Arthritis and rheumatism, 24, 1024～1036, 1982
- 11) Like P. and Mitchison N.A. : Immunol. Commun. 5, 796, 1976
- 12) 北川正保：免疫原性について、20～31、岩波書店、1978
- 13) 宇高壺二：安全性評価の基礎と実際、91～145、地人書館、東京、1990
- 14) Chase M.W. : Immunization procedures, 1, 209～237, Academic Press, New York and London, 1967
- 15) 北川常広：蛋白質・核酸・酵素、31、27～33、1987
- 16) 北川常広：蛋白質・核酸・酵素、31、46～50、1987
- 17) 前田昌子：医薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法、3、106、ソフトサイエンス社、東京、1985
- 18) Nisonoff A. : Conjugated and synthetic antigens, 1, 120～187, 1967
- 19) Eutler V.P. Jr. and Beiser S.M. : Antibodies to small molecules, Academic Press, New York, 1973

## 試験実施上の問題点とその対応

牧 栄二

萬有製薬・開発/製薬協 医薬品評価委員会 基礎研究部会

薬物の副作用の中でショック、薬疹、発熱、肝障害、腎障害、血液障害など、極めて多彩な症状を示す薬物アレルギーの発生を前臨床試験の段階で予知し、排除することは安全性の高い医薬品を供給する上に必要なことである。医薬品開発時の安全性試験は厚生省より通知されている医薬品毒性試験法ガイドラインに従って実施されている。抗原性試験については、1977年の医薬品製造指針に初めて記述され、原則として全ての医薬品に対してその実施が要求されたが、試験内容については具体的に示されていない。1988年6月に医薬品毒性試験法ガイドラインの見直しが行われ、その際に抗原性試験ガイドライン(案)が当局より示された。しかし、翌年9月に通知された新しい医薬品毒性試験法ガイドラインには外用医薬品に関する皮膚感作性試験および皮膚光感作性試験のガイドラインは含まれていたが、抗原性試験ガイドラインは含まれておらず、現在なお保留にされたままである。

外国においては、1959年にFDAが医薬品の皮膚感作性についてその検討を通知しているが、抗原性の検討については現在に至っても通知されていない。しかし、諸外国においても本邦同様に医薬品の抗原性に関して、その検討の必要性は認めているものの、信頼すべき試験法が確立されていないため、その実施が公的機関による勧告として取り上げられないでいる。しかしながら、本邦では薬物の抗原性に関する成績は上述したごとく新規医薬品の承認申請に必須のものである。このような現況下に、製薬協においては抗原性試験の実情を調査し、現行の抗原性試験を科学的に分析し、その問題点の



検討を行った。その結果、本試験を実施する上で下記のような問題点が存在することを明らかにした。まず、現在使用されている試験法、特にモルモットとマウスの試験系、についてであるが、この試験法は薬物の物理化学的性質によりその対応が異なる。すなわち、被験薬物が低分子で、水に対する溶解性が低く、薬物-蛋白結合物を作製するのに必要な官能基がその化学構造上にない場合、このような薬物に画一的な試験法を適用することはできない。また、薬物-蛋白結合物を抗原性試験に使用することについても問題がある。臨床の場合において、低分子医薬品が抗原性を示す場合、薬物そのものが抗原となることはまずなく、通常薬物（または代謝物）が生体の蛋白と化学結合をすることにより抗原性を獲得し、抗体産生が誘導される。この生体に再度同じ薬物が投与されると、薬物（または代謝物）-蛋白結合物が形成され、アレルギー反応が誘発される。従って、抗原性試験を行う場合、薬物単独の他に可能な限り薬物-蛋白結合物を作製し、これらによる感作/惹起を試みる傾向にある。しかし、官能基を有する薬物を蛋白と *in vitro* で人工的に結合させたとしても、生体内で同様の結合反応が起きるとは限らない。また、化学構造に官能基を持たない薬物の場合、その構造に官能基を導入することが可能であるとしても、生体内で被験薬物がそのような誘導体に代謝されないならば、この誘導体-蛋白結合物による抗原性試験は生物学的意味を持たないことになる。更に、薬物-蛋白結合物を作製せず、薬物と蛋白を *incubation* し、その混合物を用いて試験を行う場合もあるが、その試験成績がいずれの場合であっても、

そのincubation操作により薬物-蛋白結合物の形成が生じているか否かが確認されていなければ、得られた成績を科学的に評価する上に問題を残す。結局は薬物-蛋白結合物の問題に戻ってしまう。このような状況下に、昨年9月製薬協医薬品評価委員会基礎研究部会では当加盟会社85社を対象に、1988年6月以降1991年10月迄に実施された開発医薬品の抗原性試験について調査を行った。この調査に関して71社から回答があり、この調査表の中で抗原性試験の結果と臨床試験におけるアレルギー性副作用の発現との関係を尋ねた項目があり、この回答をまとめてみると下記の表に示す結果が得られた。なお、この結果から高分子医薬品と外用剤は除かれている。

表 低分子医薬品の抗原性試験の成績と臨床試験におけるアレルギー性副作用の発現の関係

前臨床/臨床成績		開発医薬品の数	
抗原性試験	アレルギー性副作用	抗原性試験における薬物-蛋白結合物 <sup>1)</sup> の使用	
		無	有
—	—	88	78
—	+	23	8
+	—	3	7
+	+	1	12
		115	105

<sup>1)</sup> 薬物-蛋白結合物は惹起抗原として使用

この結果において、薬物-蛋白結合物を使用しないで行われた抗原性試験は115例あり、この中で抗原性試験の結果も陽性で臨床試験におけるアレルギー性副作用の発現も認められた薬物は1例で、抗原性試験の結果は陰性でアレルギー性副作用が認められた薬物は23

例であった。また、薬物-蛋白結合物を使用して行われた抗原性試験は105例あり、この中で抗原性試験の結果も陽性でアレルギー性副作用も認められた薬物は12例で、抗原性試験の結果は陰性でアレルギー性副作用が認められた薬物は8例であった。しかしながら、薬物-蛋白結合物の使用に関わりなく、抗原性試験の結果も陰性でアレルギー性副作用も認められない薬物が74%以上あることも低分子医薬品の抗原性試験の実施を考えると考慮に入れる必要がある。今回の調査において、本邦の抗原性試験について外資系の企業から、親会社の意見として、試験動物、薬物-蛋白結合物の使用、アジュバントの使用、PCA試験の実施等について否定的な意見が寄せられている。医薬品の安全性試験の実施についてそのharmonizationが世界的に叫ばれている昨今、本邦の抗原性試験についてもその内容について再度十分に吟味され、信頼性の高い試験法が確立されるまで本試験については法的規制を設けるべきではないと考える。

免疫毒性試験法の現状とその問題点  
——IPCS/CECの国際共同研究をめぐって——

落合敏秋<sup>1)</sup>、松本清司<sup>2)</sup>

国立衛生試験所・毒性部<sup>1)</sup>、信州大学・医学部<sup>2)</sup>

現在、我国では医薬品、農薬あるいは新規化学物質など物質毎に、急性、亜急性、慢性毒性などからなる毒性試験法ガイドラインが定められ実施に遷されている。しかし、免疫毒性試験法のガイドラインについては現在のところ確立されたものは我国をはじめ欧米においても見当たらない。

ところで近年バイオテクノロジーの発展に伴い、この技術を応用した医薬品の開発も進んでいる。これらの医薬品の安全性評価に当り、従来の毒性試験とは異なった観点からの検討も必要とされているが、米国FDAの組換えDNA医薬品に関する文書において所謂「ケース・バイ・ケース」を一般原則とすることが述べられているように、特に定められた試験法ガイドラインはない。しかしサイトカインなどバイオテクノロジー医薬品の一部では免疫毒性の検討が望まれるとの見解もあり、免疫毒性試験法の確立は現在急務となっている。

免疫毒性とは、「生体の免疫機能に対する薬物、化学物質の有害作用」<sup>1)</sup>と定義され、生体の免疫系器官・組織に直接あるいは間接的に作用して発現する場合（狭義の免疫毒性）と化学物質が生体の免疫応答を介して生命現象に障害的に作用して発現する場合（免疫原性）の二通りがある。今回の発表は、前者の場合に関するものである。

この免疫毒性を検出する方法として、米国NTPは1988年げっ歯類（マウス）を用いた、TIER I及びIIからなる免疫毒性試験法パネルを発表している<sup>2)</sup>。TIER Iでは血液学的検査、体重、臓器重量、脾臓及び骨髓細胞数、リンパ系臓器の病理組織学的検査ならびに免疫機能検査としてPFC反応、リンパ球幼若化反応（Mitogen response、混合リンパ球反応）、NK活性が調べられ、TIER IIでは脾臓のT及びB細胞数測定（表面マーカーによる分類）、細胞障害性T細胞機能、宿主抵抗性試験などを検索するというものである。NTPはこの試験法パネルに従って、51の化学物質について試験し、各検査項目における判定結

果と免疫毒性の有無についての相関性を統計学的に検討したところ、PFC assay及び細胞表面マーカーの検索が免疫毒性の検出に有効であったと報告している<sup>3)</sup>。

一方IPCS/CEC(International Programme on Chemical Safety/Commission of the European Communities)は、免疫毒性試験法の確立と調和を図るため、国際免疫毒性共同研究(ICICIS;IPCS/CEC International Collaborative Immunotoxicity Study)を計画し、日米欧約20研究所が参加して1988年より実施している<sup>4)、5)</sup>。この共同研究に国立衛生試験所(機能生化学部・毒性部)が参加しているので、以下に試験の概要と結果を述べる。

#### 1) ICICISの目的<sup>4)、5)</sup>

この国際共同研究の当初の目的は、ラットを用いた標準的な28日間毒性試験法に、強化された病理学的検査(Enhanced Histopathological Tests)と選抜された免疫機能検査を加えることにより、免疫毒性を検出することが可能か否か、ならびに各国の研究所間で検索法を標準化できるかどうかを検討することであり、更にもし免疫毒性を調べる上で機能検査が必要なら、どの項目を調べるべきかを明らかにすることである。

#### 2) ICICISの試験法

試験法のプロトコールは表に示した通りで、対象物質として免疫抑制作用が明らかなアザチオプリン(1989年)及びサイクロスポリンA

### ICICIS免疫毒性試験プロトコール

---

動物 F344またはWistarラット(5週齢、雄)

投与 28日間連続強制経口投与

検査・体重

- ・血液学的検査(RBC、Hb、Ht、MCV、Plt、WBC、百分比)
- ・病理学的検査(心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓\*、副腎、胸腺\*、  
気管気管支リンパ節\*、腸間膜リンパ節\*、膝窩リンパ節\*  
:重量測定、組織学的検査)
- ・骨髄検査(有核細胞数測定\*)
- ・免疫機能検査(PFC assay、NK細胞活性、Mitogen response)

---

\*:強化された病理学的検査(Enhanced Histopathological Tests)

(1991年)を選び、試験を実施した。本試験法は、途中で若干変更されたが、基本的にはOECD毒性試験法ガイドラインの28日間反復経口投与毒性試験法に強化された病理学的検査として胸腺、脾臓及びリンパ節の重量測定と組織学的検査及び骨髄の有核細胞数測定と、免疫機能検査を加えたものである。更に我々は骨髄に対する影響を明らかにするために骨髄像についても検査した。

### 3) アザチオプリン (AZP) の試験結果<sup>6)</sup>

1群20匹からなる4群の雄F344ラット(5週齢)に、1%メチルセルロースに懸濁したAZPの0、2.5(L)、12.5(M)及び25.0(H)mg/kg bwを28日間連続強制経口投与し、10匹について病理学的検査を、残りの10匹についてはPFC assay及びNK活性(各5匹)の測定を行った。AZP投与により、M及びH群で用量に相関した体重増加の抑制が見られ、血液学的検査において白血球数の減少が見られた。また骨髄検査ではリンパ球及び顆粒球系細胞の減少による有核細胞数(大腿骨1本当り)の減少が見られた。病理学的検査では胸腺及び脾臓重量の減少、リンパ節及びパイエル板を含むリンパ系臓器の萎縮またはリンパ球の減少が認められた。機能検査では、脾臓細胞当りのPFC数及びNK活性は変動しなかったが、H群で脾臓細胞数が減少したため脾臓全体としての反応は低下した。

### 4) サイクロスポリン A (CsA) の試験結果

1群21匹からなる4群の雄F344ラット(5週齢)にオリーブ油に溶解したCsAの0、2.5(L)、10(M)及び40(H)mg/kg bwを28日間連続強制経口投与し、検査した。

H群で体重増加の抑制が見られた。リンパ球の減少に起因する白血球数の減少がM及びH群で認められた。骨髄検査ではH群にリンパ球及び赤芽球系細胞の減少に起因する有核細胞数(骨髄1μl当り)の減少が見られた。組織学的検査により胸腺髄質の萎縮が見られた。機能試験では脾臓細胞当りのPFC数及びMitogen responseに明らかな低下が認められた。

以上、今回の免疫毒性試験において、2薬剤の持つ免疫抑制作用をリンパ系臓器の重量や組織学的変化、末梢白血球数、骨髄細胞数及びリンパ系組織の数的あるいは質的变化ならびに免疫機能障害として捉えることができた。このことから、ICICISが示した試験法は、免疫系器官・組織に対する化学物質の影響を調べるためのスクリーニング試

験として有効であると考えられた。

各研究所における試験結果については、現在AZPについてまとめられつつある。白血球、リンパ球及び血小板数の減少、脾臓及び胸腺重量の減少などについてはほとんどの研究所で一致する結果が得られたが、組織学的検査ではいくつかの臓器で判定結果に相違が見られている。機能検査では、PFC assayの判定結果に研究所間で大きな差があり、逆方向の変化として捉えた所も見られた。免疫機能検査法は従来よりマウスを中心に行われてきたが、今後ラットによる測定法の開発とバックグラウンドデータの蓄積が課題になると考えられる。

このように、免疫毒性試験の実施に際して解決されるべき点も多いが、多種多様なバイオテクノロジー医薬品が開発されている現実を踏まえると、現在実施可能な何らかの方法で免疫系への影響を調べておくことも必要と思われる。

#### 文献

- 1) 日本毒科学会教育委員会：J.Toxicol.Sci.、17、Suppl.I、19-20 (1992)
- 2) Luster,M.I.,et al.:Fund.Appl.Toxicol.,10,2-19(1988)
- 3) Luster,M.I.,et al.:Fund.Appl.Toxicol.,18,200-210(1992)
- 4) 澤田純一、他：トキシコロジーフォーラム、11、555-558 (1988)
- 5) 寺尾允男：衛生試験所報告、106、1-10 (1988)
- 6) 松本清司、他：衛生試験所報告、108、34-39 (1990)

## ダイオキシンの免疫毒性－胸腺萎縮を中心として－

平峯千春、北条憲二

香川医科大学免疫病理学

ダイオキシン類の中で最も毒性が強く、環境汚染要因として重要視されている2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)は、以前からその催奇形性、発癌性に加えて免疫系に対する抑制作用が指摘されてきた。齧歯類においては高度の胸腺萎縮、細胞性免疫機能の低下、体液性免疫応答の障害、骨髄毒性等が報告されている。このうち、胸腺萎縮はTCDDに暴露された全ての動物種に共通にみられる現象で、免疫毒性効果の代表的なパラメーターである。TCDDの免疫毒性は、免疫細胞の細胞質内aromatic hydrocarbon(Ah)レセプターへのTCDDの特異的結合を介するものと考えられており、胸腺萎縮とAh locusとの関連が指摘されているが、TCDDによる胸腺萎縮の発生機序に関しては明らかではない。そこで、TCDD投与若年成熟マウス(7週齢、♀)について、胸腺組織の形態学的変化および胸腺リンパ球サブセットの変動の検討とin vitro TCDD処理マウス胸腺リンパ球の形態学的、生化学的解析を行った。さらに、未熟な胸腺リンパ球の分化・成熟に関与する胸腺ストローマ細胞の主要な構成要素である上皮系細胞に対するTCDDの障害作用について、胸腺上皮細胞株を樹立して検索した。これらの検索にはTCDD高感受性のC57BL/6N(B6), BALB/cマウス(共にAh<sup>b</sup>/Ah<sup>b</sup>)および低感受性のDBA/2マウス(Ah<sup>d</sup>/Ah<sup>d</sup>)を用いた。TCDDの異性体1, 2, 3, 4-TCDDについても検討した。

### 1. TCDD投与B6マウスにおける胸腺萎縮の動態

corn oilに溶解したTCDD(5, 30または60 µg/kg)を腹腔内に1



回投与されたB6マウスでは、用量依存性の胸腺重量および胸腺リンパ球数の著明な減少と平行して、胸腺皮質面積比が投与後3日から有意の減少を示し、7日後に最低となった。胸腺萎縮は主に皮質域のリンパ球の脱落によるもので、35日後にはほぼ対照値にまで回復した。

## 2. TCDDの胸腺リンパ球サブセットに及ぼす影響 - フローサイトメトリー解析 -

TCDD投与B6マウスより採取した胸腺リンパ球についてのFITC標識抗Ly-2(CD8)モノクローナル抗体(mAb)とPE標識抗L3T4(CD4)mAbの二重染色によるtwo-color systemのフローサイトメトリー解析では、TCDD投与3日、7日後に皮質リンパ球の脱落の所見と一致して、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>サブセットとPNA陽性細胞の著明な減少(百分比・絶対数共に)がみられた。CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>およびCD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>サブセットも投与3日、7日後に絶対数では有意の減少を示した。これら3つのサブセットは14日後には回復がみられた。CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>サブセットのみは絶対数の減少は軽度で、TCDD投与後14日間にわたり明らかな変動を示さなかった。すなわち、TCDDは胸腺皮質に分布する未熟なCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>リンパ球を主に障害したが、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>リンパ球はTCDDに比較的抵抗性である可能性が示唆された。

## 3. TCDDによる胸腺リンパ球の細胞死の様式 - apoptotic death -

TCDD (60  $\mu$ g/kg)投与B6マウスの胸腺の電子顕微鏡による観察では、皮質面積比の有意の減少に先立つ投与後14時間から96時間にかけて、被膜直下から皮質の上皮細胞の細胞質内にapoptosis(プログラム細胞死)の特徴(クロマチン凝縮、核および細胞質濃縮、核の断片化)を示すリンパ球の細胞死が胸腺ナース細胞単位で認められた。apoptosis細胞は主に胸腺上皮細胞により、一部はマクロファージにより貪食・消化される像(ファゴリソソームの出現、酸性フォスファターゼ染色陽性所見)が観察された。

正常B6マウスの胸腺リンパ球をin vitroで10および100 nM濃度のTCDD(0.1%DMSO中)で処理すると、5時間後には約半数の細胞にapoptosisの像が認められた。この細胞浮遊液を可溶化後27,000xgで遠心した上清中には断片化したDNAが増加していた。精製した断片化DNAの電気泳動では約200bpの整数倍の数本のバンドが認められ、TCDD処理胸腺リンパ球のDNAにオリゴヌクレオソームの長さの断片化が生じていることが確認された。

#### 4. 培養マウス胸腺上皮細胞株に及ぼすTCDDの影響

TCDD投与B6マウスの胸腺組織にはMHCクラスII抗原、I-A染色性の低下とケラチン染色性の増強、Hassall小体の増加がみられた。このことはTCDDが胸腺リンパ球のみならず上皮系細胞に対しても影響を及ぼす可能性を示唆している。そこでB6マウス同様TCDD高感受性の正常BALB/cマウスから胸腺ナース細胞(上皮細胞とリンパ球の複合体)形成能を有する胸腺上皮細胞株(B/c. TEC-L1)を樹立し、上皮細胞に及ぼすTCDDの影響を検討した。B/c. TEC-L1細胞をTCDD(10, 100 nM)添加培養液中で培養すると、細胞数の減少、細胞質の狭小化、敷石状配列の解離、細胞質空胞化がみられた。oil red Oによる脂肪染色では、対照群にみられた核周囲の赤色微細脂質顆粒が、TCDD添加群では増加・集合し小滴状化していた。これらの所見はTCDDが上皮細胞に対し直接なんらかの障害作用を及ぼすことを示唆している。MTT法による細胞障害試験でも、TCDD濃度段階に応じてB/c. TEC-L1細胞の吸光度の低下をみた。

次に、TCDD前処理B/c. TEC-L1細胞と共培養した胸腺リンパ球ではPHA, Con Aに対する反応性が抑制されており、TCDDは上皮細胞の胸腺リンパ球生存維持および増殖能力を障害したものと思われる。

5. B6マウス胸腺組織およびBALB/c由来上皮細胞株についてみられた上記の所見は、TCDDに低感受性のDBA/2マウス胸腺やDBA/2由来の胸腺上皮細胞株には認められなかった。TCDD高感受性マウスは1, 2, 3, 4-TCDD投与によって有意の変化を起こさなかった。

結語：TCDDの免疫毒性の代表的パラメーターである胸腺萎縮について、胸腺の主要な構成要素である胸腺リンパ球と上皮系細胞に対するTCDDの障害作用を検討した。TCDDはAh<sup>b</sup>/Ah<sup>b</sup>のマウスの胸腺皮質に存在するCD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>の未熟なリンパ球に直接作用してapoptotic deathを促進するだけでなく、胸腺上皮細胞に対しても障害作用を示し、それによる間接的なリンパ球障害の可能性が示唆された。

#### 参考文献

1. 小瀬戸昌博、平峯千春、中嶋泰知、北条憲二. 環境科学会誌 3: 21-36, 1990.
2. Hiramane, C., Hojo, K., et al. Lab. Invest. 62: 41-54, 1990.
3. Holsapple, M.P. et al. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 31: 73-100, 1991.
4. 平峯千春、小瀬戸昌博、中川利孝、北条憲二. 環境科学会誌 5(3), 1992 (in press).

## N T P 試験法による市販医薬品の免疫毒性の検索

筒井尚久， 栃折幸子， 小林潔

三菱化成株式会社 総合研究所 安全性研究所

現在，免疫毒性の検索は各研究機関が様々な方法を用いて実施している。その中で，N T P が1988年に発表した免疫毒性試験法は最もポピュラーな方法である。すでにN T P は，この試験法の検出感度や予測性に関して，50を超える物質で評価を行っているが，その大半は環境化学物質であり，医薬品で実施した例は極めて少ない。そこで，今回我々は，医薬品開発における本試験法導入の有用性を検討する目的で，免疫系の関与する副作用が多数報告されている市販医薬品を用いて，N T P 試験法に従い実験を行ったのでその結果を報告する。

抗癌剤である5-フルオロウラシルとエトポシドを各々6週齢のB6C3F<sub>1</sub>雌マウスに14日間連続で経口投与し，最終投与後24時間目に尿殺し，N T P 試験法のTier I に含まれる免疫病理検査および免疫機能検査を実施した。

5-フルオロウラシルではブラック形成応答において，エトポシドではリンパ球幼若化反応，混合リンパ球培養およびブラック形成応答において抑制がみられた。一方，免疫病理検査では，両被験物質とも末梢血白血球数の減少と免疫系組織の病理変化が認められた。

これらのことから，病理検査において免疫系への影響が認められた場合には，免疫機能検査を実施することがヒトへの安全性を評価する上で有用な手段であると考えられた。尚，現在検索中の抗炎症剤であるプレドニゾロンとメフェナム酸についても併せて発表する予定である。

## トリフェニール錫の免疫毒性について

永井博弐<sup>\*</sup>、江田昭英<sup>\*</sup>、西田弘之<sup>\*\*</sup>、松井寿夫<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>岐阜薬大・薬理、<sup>\*\*</sup>獨協医大・衛生学

トリフェニール錫化合物は農業用殺菌剤や海洋船底抗菌剤として広く用いられている。これまでに、トリフェニール錫の皮膚への接触毒性、呼吸器への吸入毒性、吸収後の血球毒性および免疫毒性が報告されている。本研究ではトリフェニール錫化合物のうち、塩化トリフェニール錫(TPTC)に着目し、その免疫毒性をマウスおよびヒトリンパ球を用いて検討し、ラットの肥満細胞に対する作用も併せて検討した。成績は以下の通りである。① TPTC 10mg/kgの14日間のマウス腹腔内投与により胸腺および脾臓重量の有意な減少がみられた。② TPTC 10mg/kgの5日間腹腔内投与により、マウスにおけるヒツジ赤血球に対するIgM抗体産生細胞の産生は抑制された。また、DNP化したブタ回虫抗原に対するIgE抗体産生の一次反応は抑制された。③ TPTC 10mg/kgの4~8日間腹腔内投与により、マウスにおける結核死菌およびヒツジ赤血球に対するeffector T cellの産生は抑制された。また、同様の条件下で、graft-versus host reactionによるcytotoxic T cellの産生も抑制された。④ TPTCは同様の条件下で、T cell非依存性抗原であるpolyvinylpyrrolidone (PVP)に対する免疫反応には影響を及ぼさなかった。⑤ TPTC ( $10^{-7}$  ~  $5 \times 10^{-6}$  g/ml)はヒトリンパ球のPHAおよびCon Aによる幼若化反応を抑制した。⑥ TPTCはラット肥満細胞からのヒスタミン遊離を低用量で抑制し、高用量では促進する作用を示した。以上のことから、TPTCは主にT cellに作用し免疫毒性を示すことおよび肥満細胞からのヒスタミン遊離には抑制と促進の二面的な作用を示すものと思われた。

## Cephem 系抗生剤のマウス免疫系に及ぼす影響

○古濱和久、高山 敏

第一製薬（株）開発研究所 安全性研究センター

ある種の cephem 系抗生剤をゲッ歯類に連投すると、脾臓重量の増加とともに組織学的に白脾髄の腫大ないし細胞密度の増加がみられた。そこで、これら cephem 剤がマウス免疫系に如何なる影響を及ぼすか調べた。まず、8 週齢の雌  $B_6C_3F_1$  マウス（一部  $BDF_1$  マウス）に 6種の cephem 剤（800 mg/kg/day）を 5-7 日連投（iv）したところ、ceftezole で、脾臓の腫大、血清 IgM の増加、脾 Ig M 産生細胞の増加が見られたが、血清 IgG には、変化が認められなかった。これらの反応は、一見 lipopolysaccharide (LPS) の反応と類似していたが、血清 IgG の挙動から見ると、明らかに異なっていた。次に、specific T-independent immunogen である Type III pneumococcal polysaccharide (S3) response、specific T-dependent immunogen である sheep red blood cells (SRBC) response、delayed-type hypersensitivity (DTH) あるいは Plasmodium yoelii (malaria) を用いた host resistance の実験では、影響が少ないか negative であった。さらに、雌 BALB/c-nu/nu（ヌード）マウスに ceftezole を連投すると、 $B_6C_3F_1$  マウスと同様の変化がみられた。脾単核細胞を用いた in vitro 実験では、ceftezole は mitogenicity を有するものの B 細胞を取り去ると（B cell poor spleen cells）、これらの増殖作用は消失した。以上のことより、ceftezol による脾腫は T-cell independent に起こるが、生体への影響はそれ程ないと考察した。

## 臨床予測性を有する抗原性試験法の確立について

塩野谷 博

エーザイ・安全性研究部

抗原性試験の目的は、ヒトにおける薬物アレルギーの予測であるから、その試験系はヒトにおける薬物アレルギーの発現を、定性的に、出来れば定量的に評価できることが要求される。多くの合成医薬品は生体にとって異物ではあるが、低分子であり、ヒトはもとより、動物でも抗原性を示さないのが一般的である。実際、薬物アレルギーの頻度の高いとされるβラクタム系抗生物質でも、アレルギーの発症は3%を越えることは稀である。従って、必要とされる抗原性試験法は、ヒトに於ける3%の発現率を、動物では100%の発現率で再現できる条件がみだされ、発現に要する投与量、あるいは、免疫の程度の強さにより、抗原性の強弱が評価ができ、臨床との相関性をもつ試験系であることが要求される。そうしてみると、発現率に限ってみても、抗原性試験の投与経路を、臨床使用投与経路にこだわってはいは、試験系が成立しえないことは、免疫学的には自明の事である。この点は、ヒトと同様に、動物においても用量依存性をもって、毒性発現を考えることが出来る一般毒性試験とは、基本的に異なる特性が求められることが理解されるべきであろう。すなわち、薬物アレルギーのようなRare toxicityの評価系の構築には、それなりの免疫学的な工夫が必要と考える。

この様な立場で、アレルギー性副作用の発生頻度が高いとされるペニシリンG、プロカインアミド、イソニアジッド、ヒドララジンについて高率に薬剤特異的免疫応答が発現する系の確立を検討し、昨年の本学会で、容易に免疫が成立する試験系を報告した。今回は、その後の知見も含めて報告したい。

## 医薬品の抗原性試験におけるモルモットPCA反応 の至適条件

桑原 孝，朝波 省吾，下野 和之，植島 基雄

(株)大塚製薬工場 鳴門研究所

(目的) 医薬品の抗原性試験の多くは，蛋白抗原について検討，設定された実験条件で行われている。しかし，医薬品には低分子のものも多く，それぞれに適した条件を設定する必要がある。今回我々は蛋白抗原とハプテンの場合に分けて，モルモットPCA反応の実験条件について検討した。

(材料及び方法) モルモットに卵白アルブミン(OA)5 $\mu$ g/body，またはアンピシリン(ABPC)5mg/bodyをFreund's Complete Adjuvantとともに2週間隔で3回皮下投与し，最終感作の2週間後に採取した抗OA血清及び抗ABPC血清を受身感作用抗血清として使用した。また，惹起抗原としては抗OA血清にはOAを，抗ABPC血清にはABPCとモルモット血清アルブミンの結合物(ABPO-GpSA)を使用した。受身感作時間については4時間と24時間，惹起抗原量については1000，200及び50 $\mu$ g/bodyを比較した。

(結果及び考察) 受身感作時間については，蛋白抗原では4時間の方が，ハプテンでは逆に24時間の方が検出力が高かった。したがって，低分子の医薬品を検討する場合には受身感作時間は24時間が適当であると考えられた。惹起抗原量については，蛋白抗原及びハプテンともに，抗原量を下げると若干検出力が落ちるものの，50 $\mu$ g/bodyでも陽性反応が得られた。よって，惹起抗原量としては1mg/body以上が望ましいが，十分な量を使用できない場合には，50 $\mu$ g/body程度の微量での惹起も有用であると考えられた。



## 抗原性試験方法の改善の試み

(ハプテン単独でのアナフィラキシー)

中井 洋一、井上 眞、田上 雅永

武田薬品工業株式会社・研究開発本部

〔目的〕薬剤の抗原性試験の重点は、アジュバントの併用投与やハプテン・たん白結合体の使用など、非生理的な方法に置かれている。そこで、薬剤の臨床投与方法を念頭に、アジュバントを併用しない免疫及びハプテンによるアナフィラキシーの誘発について、nitrobenzene系化合物をモデルとして検討した。

〔方法〕動物は Hartleyモルモット及び A/Jマウスを用いた。免疫原には Dinitrochlorobenzene (DNCB), dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) あるいは trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)を用いた。能動全身アナフィラキシー及び PCA反応はDNBSあるいはTNBS、ないしはそれらとヒト血清アルブミンとの結合体を静脈内投与することにより誘発した。

〔成績〕① DNCB の100mg/kgをモルモットに4週間経口投与すると、アナフィラキシーを起こす特異抗体が産生された。

② DNBS を4週間皮下投与すると、モルモットでは1mg/kg, マウスでは10mg/kg以上で特異抗体が産生された。

③ DNBS 免疫ではアジュバントの効果はみられなかった。

④ DNBS の投与量、投与間隔、投与期間の影響について検討したところ、高用量、連続投与及び長期投与の方が抗体産生は高かった。

⑤ TNBS をモルモットに4週間皮下投与すると、0.01mg/kg以上の投与量で特異抗体が産生され、しかもTNBS誘発のアナフィラキシーが陽性となった。

〔結論〕薬剤の抗原性試験を生理的な実験条件に近づけるためのモデルとして、nitrobenzene系化合物は有用であると考えられる。

LECラット(肝炎自然発症ラット)血清中に見いだされた  
自己免疫性抗体は薬物性肝障害時にも認められる

永山績夫、横井 毅、梶原理恵子、川口安郎\*、鎌滝哲也

北大・薬、大鷗薬品・開発研\*

〔目的〕 最近演者らは肝炎や肝癌を自然発症するLECラットの血清中に肝ミクロゾーム蛋白に対する自己抗体が存在することを報告している。今回この自己抗体が認識する抗原蛋白を同定した。さらに薬物性肝障害を起こしたラット血清中における自己抗体の生成について検討を行なった。

〔方法と結果〕 LECラット血清中には肝ミクロゾームの56KDと55KDの2種の蛋白、またはその何れか一方の蛋白に対する自己抗体の存在することがimmunoblot分析で明かになった。2次元電気泳動法で分析した結果、等電点は56KD蛋白で4.2、55KD蛋白は4.0であった。これら蛋白のN末端アミノ酸配列を決定した結果、56KD蛋白はPDI(protein disulfide isomerase)、55KD蛋白はcalreticulinであると考えられた。さらに精製蛋白や特異抗体を用い、免疫化学的に両蛋白を同定した。ヒトにおける薬物性肝炎においてもPDIやcalreticulinなどの小胞体内腔に存在する酸性蛋白が自己免疫性抗体の抗原蛋白として報告されている。そこで雄性SD系ラットにD-ガラクトサミン(400mg/kg)およびDL-エチオニン(1g/kg)を腹腔内投与し、PDIに対する自己抗体の生成を検討した。その結果、D-ガラクトサミン投与群では6例中5例に、DL-エチオニン投与群では6例中1例にPDIに対する自己抗体の生成が認められた。四塩化炭素およびアセトアミノフェン投与の結果も併せて報告する。

## T-2 toxin のマウスにおける接触性過敏反応抑制作用

河内 泰英<sup>1)</sup>, B.L. Blaylock<sup>2)</sup>, C.E. Comment<sup>2)</sup>, M.I. Luster<sup>2)</sup>

1) 大鵬薬品工業(株), 安全性研究所

2) Immunotoxicology Group, NIEHS USA

T-2 toxin は *Fusarium*属のカビによって産生されるマイコトキシンであり、動物において免疫系に障害を起こすことが知られている。我々は、マウスを用いて細胞性免疫の一種である接触性過敏反応に対するT-2 toxinの影響を、またin vitro の系で皮膚の抗原提示細胞である Langerhans細胞の機能に対する影響を調べた。

(結果)

BALB/cマウスを用いた ear swelling test において、T-2 toxin(0.3-30ng/ear) の塗布で oxazolone(OX) に対する接触性過敏反応の有意な抑制がみられ、用量相関性も認められた。この抑制は T-2 toxinを OXの誘発後一時間以内に適用した時のみに認められた。Langerhans細胞の表皮からリンパ節への抗原輸送能に T-2 toxinは影響しなかった。一方、培養表皮細胞を用いた in vitro の試験系において T-2 toxinは Langerhans細胞上の MHC classII(Ia)抗原の発現を抑制し、さらに T細胞への抗原提示能も有意に抑制した。T-2 toxin は蛋白合成阻害作用を持つことが知られているが、蛋白合成阻害作用を持つ代表的な化合物である cycloheximideと同様、表皮細胞培養系においても蛋白合成阻害作用を示した。また、cycloheximideは OXによる ear swellingと Langerhans細胞の抗原提示能を T-2 toxinと同様に抑制することが明らかとなった。

以上の結果から、Langerhans細胞において、Ia抗原発現の過程に必要な蛋白合成の阻害とそれに引き続く抗原提示能の抑制が、接触性過敏反応を抑制する T-2 toxinの作用メカニズムの一つであると考えられた。

## アセトアミノフェン肝毒性における免疫系の関与

築館一男、園田二郎、飯島恵美、見上 孝、山津清実、名倉 宏\*

エーザイ・安研、 東北大・医・病理\*

従来、細胞内の代謝系を介し、細胞障害性に動くとされている毒物の作用にも、生体の免疫系の関与が示唆されている。

演者らは、paraquat 中毒の際に肺胞上皮に class II major histocompatibility complex (MHC) 抗原 (Ia 抗原) がもっとも初期に出現することを観察しており、またアセトアミノフェン肝毒性には壊死巣に集簇する class II MHC 陽性のマクロファージの積極的役割も報告されている。これらのことから毒物による細胞障害ならびにその修復過程に免疫系の関与が示唆される。我々はアセトアミノフェン肝毒性における免疫毒性学的機序を明らかにする目的で、肝細胞およびクッパー星細胞の主要組織適合抗原の発現ならびに浸潤細胞の phenotype について免疫組織化学的に検索した。

〔材料と方法〕7 週令の Slc-SD 雄ラットを用い、0.5% メチルセルロース水溶性に懸濁したアセトアミノフェン 1000mg/kg/day を経口的に投与した。単回投与、連続投与群にわけ、血液生化学的に GOT, GPT を測定、肝機能変化を観察しながら、経時的に屠殺した。肝チトクローム p-450 を測定するとともに、肝組織を固定、HE 染色、免疫染色を施行した。

〔観察結果ならびに考察〕血清 GOT, GPT は単回投与群では 24~48 時間で最高値を示し、72 時間で回復傾向を示した。肝チトクローム p-450 は著減していた。形態的には、投与 6 時間後に肝細胞の変性、壊死が少数散在性に認められたが、クッパー星細胞は軽度腫大し、Ia 抗原の増強が観察された。24 時間後には肝細胞に class I MHC 抗原の発現があり小葉中心性の肝細胞変性、壊死が小葉全体に広範に

観察された。壊死巣に接近し、好中球と Ia, CD8陽性の単核球が出現していた。48時間では壊死巣は縮小傾向にあり、Ia, CD8陽性の単核球が多数集簇していた。72時間後には壊死巣は肉芽組織様を呈し、集簇した細胞群は Ia, あるいは CD8 陽性細胞群からなっていた。CD 4 T細胞、B細胞の出現はほとんど認められなかった。連続投与群においては単回投与24時間後のそれと類似した組織像ならびに免疫組織像を呈していた(表1)。

アセトアミノフェンによる肝細胞障害は、アセトアミノフェンが肝チトクローム p-450 より代謝活性化を受け、肝臓細胞を障害する可能性が知られているが、我々の観察結果から、さらに肝細胞障害には Ia陽性の活性化マクロファージおよび CD8 陽性リンパ球の関与が強く示唆され、さらにそれらが障害肝細胞の除去と肝組織の修復に機能していることが想像された(表2)。

#### 参考文献

- 1) Nakayama, A., Nagura, H., Yokoi, T., et al.: Immunocytochemical observation of paraquat-included alveolitis with special reference to class II MHC antigens. *Virchows Archiv B* 61:389-396, 1992.
- 2) Nagura, H., Sumi, Y.: Immunologic function of the gut—Role of the mucosal immune system. *Toxicol Pathol.* 16:154-164, 1989.
- 3) Naukkarinen, A., Syrjänen, K.: Immuneresponse in the gastrointestinal tract. in *Gastrointestinal Toxicology*, Rozman, K. and Hänninen, O. eds, Elsevier, Amsterdam, p.213-245, 1986.

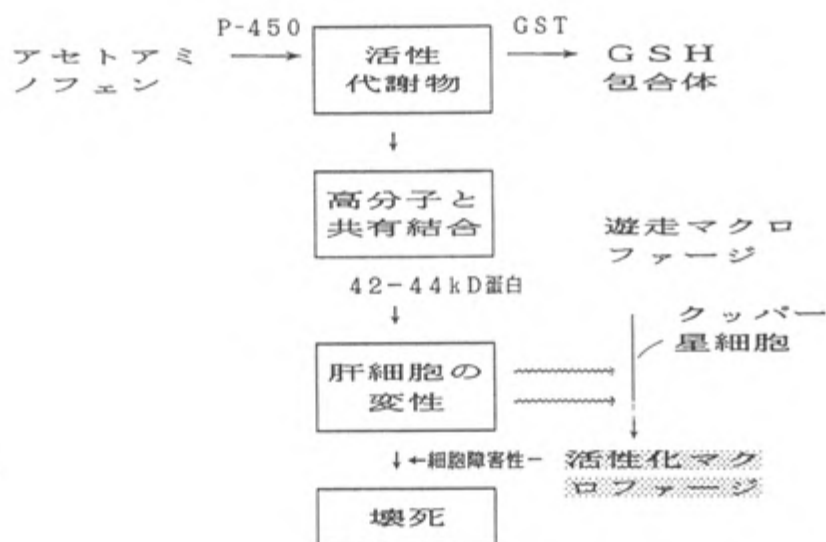
表 1

## 肝組織の免疫組織化学的所見

	対 照 群	単回投与*				連投*	
		6H	24H	48H	72H	3D	4D
浸潤細胞							
CD3	-	-	+	+	+	+	+
CD4	-	-	-	-	-	-	-
CD8	-	-	+	+	+	+	+
OX-33	-	-	-	-	-	-	-
class II MHC (Ia)	-	+	+	+	+	+	+
肝細胞							
class I MHC	-	-	+	+	+	+	+

\* アセトアミノフェン 1000mg/Kg/day

表 2 アセトアミノフェン肝毒性の免疫毒性学的検討



---

第1回日本毒科学会サテライトシンポジウム  
プログラム・要旨集

---

発行日 平成4年6月30日  
発行人 黒岩 幸雄  
発行所 昭和大学薬学部毒物学教室  
〒142 品川区旗の台 1-5-8  
TEL 03-3784-8205~7  
FAX 03-3784-8246