

環境物質と免疫毒性

手島玲子[#]

Immunotoxicity and environmental substances

Reiko Teshima

A well functioning immune system is essential in maintaining integrity of the organism, and malfunction may have severe health consequences. Environmental substances may pose direct toxicity to components of the immune system, often leading to immunosuppression and resulting reduced resistance to infections and tumors. Alternatively, such substances may be recognized by the immune system in a specific fashion, which may result in allergy and autoimmunity. A proper risk assessment of environmental substances in terms of immunotoxicity is necessary. In this manuscript, I reviewed recent three topics about immunotoxicity: (1) IPCS/WHO Guidance for immunotoxicity risk assessment for chemicals, (2) Intestinal immunotoxicity, and (3) Epicutaneous sensitization of food proteins.

Keywords: immunotoxicity, environmental substances, immunosuppression, allergy, autoimmunity

はじめに

免疫の異常は、異常亢進による自己免疫やアレルギーと抑制による免疫不全に大別される。免疫異常は先天的要因や感染因子によって生じるが、薬物や化学物質によっても生じる。この薬物や化学物質による免疫異常が、免疫毒性 (Immunotoxicity) と称され、その研究領域が免疫毒性学 (Immunotoxicology) と呼ばれる。1970年代には化学物質や医薬品などによる免疫抑制の毒性学研究が盛んになり、免疫系は化学物質毒性の標的となりうる事が示されてきた¹⁻²⁾。特に免疫毒性への主な関心は、獲得免疫能の抑制とその影響に向けられた。医薬品についても、抗がん剤による免疫抑制や輸液栄養の微量金属組成と易感染性の関係などが指摘されていたが、1980年代に入り、研究対象が医薬品全般の副作用にも及び、免疫系が化学物質毒性の一次標的となることやその作用機構の解析に研究が向けられ、一方、免疫毒性試験の体系化に向けた試験法の開発や評価などに集約されていった。以上、免疫毒性研究は、初期には環境化学物質、医薬品、食品、農薬等の化学物質による免疫抑制を主たる

対象としていたが、その後はアレルギーや自己免疫も対象に含めてきている。本総説では、免疫毒性研究に関する最近の動向の中で、(i)2012年にまとめられたIPCS/WHO化学物質の免疫毒性リスク評価ガイダンス (IPCS Harmonization Project Document No.10, Guidance for Immunotoxicity Risk Assessment for Chemicals) の概要を説明し、次いで、(ii)アレルギーにも関連する腸管免疫毒性試験、並びに(iii)経皮感作試験法に関しても記述してみたい。

(1) 免疫毒性に関する既存のドキュメント並びに IPCS/WHO化学物質の免疫毒性リスク評価ガイダンスについて

化学物質に関しては、1980年代に入り、免疫系が化学物質毒性の一次標的となることやその作用機構の解析に研究が向けられ、免疫毒性試験の体系化に向けた試験法の開発や評価などが行われた。その一環として、化学物質の免疫抑制を検出する試験法の国際的バリデーション試験が、国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety, IPCS) 主催で、1988年から日本をはじめ16ヶ国の参加で行われた (International Collaborative Immunotoxicity programme, ICIP)。私共の研究所も参加したが³⁻⁴⁾、詳しくは、既報の論文に書かれている。免疫機能試験としては、体液性免疫試験法で、ヒツジ赤血球を抗原として、特異抗体の産生をプラ

[#] To whom correspondence should be addressed:

Reiko Teshima; Division of Foods, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-2158; Fax: +81-3-3700-9348; E-mail: rteshima@nihs.go.jp

ーク形成細胞 (PFC) の数として測定する方法と、自然抵抗機能に対する化学物質の影響を調べるための脾臓細胞中のナチュラルキラー細胞 (NK細胞) の活性を、 ^{51}Cr で標識したYAC-1を標的細胞として測定する方法の2つのバリデーション試験がなされた。

1990年代に入り、免疫の細胞・分子的機構についての知識が深まるとともに、免疫毒性の機序と試験のためのバイオマーカーの研究が進展した。また、WHO/IPCSのTask groupによって免疫系を毒性の一次標的とするDirect Immunotoxicityの概念と研究法を体系的にまとめる作業が始まり、Environmental Health Criteria 180 (EHC180,1996), Principles and Methods for Assessing Direct Immunotoxicity Associated with Exposure to Chemicalsとして1996年に刊行された。表1に、免疫毒性に関する国際的ドキュメントを、まとめたものを示すが、このEHCのDirect Immunotoxicityは、WHO/IPCS関連のドキュメントとしては、最初に作られたものとして、最上段に記している。

次いで、このEHCシリーズでは、引き続きEnvironmental Health Criteria 212 (EHC 212, 1999), Principles and Methods for Assessing Allergic Hypersensitization Associated with Exposure to Chemicalsが1999年に、また、Environmental Health Criteria 236 (EHC236, 2006), Principles and Methods for Assessing Autoimmunity Associated with Exposure to Chemicals が2006年に刊行されている。

さらに、IPCS/WHOの活動として、環境中に存在する化学物質の既存の免疫毒性のデータに基づくリスク評価を行うことを主たる目的としたガイダンス作成のために、2008年2月より、ヨーロッパ、米国EPA等の免疫毒性専門家を中心にワーキンググループが結成された。オランダ国立公衆衛生環境研究所 (RIVM) でHenk van Loveren教授を座長として会議が開かれ、筆者も会議に加わった。2012年に、このガイダンスは、Guidance for immunotoxicity risk assessment for chemicals として公表された⁵⁾。このIPCS/WHO化学物質の免疫毒性のリスク評価ガイダンスは、表1にも示しているが、WHOのホームページからダウンロードすることができる。このガイダンスは、免疫毒性のリスク評価に関して世界各国で使用するこのできる国際的にハーモナイズされた指針であり、一般的な化学物質のリスク評価者向けに書かれており、これら評価者が免疫毒性専門家からのアドバイスの必要性を判断する際に有用と思われる。内容としては、免疫毒性リスク評価の枠組みを示した上で、免疫抑制、免疫亢進、感作性とアレルギー反応、自己免疫と自己免疫疾患の四つの異なるタイプの免疫毒性についてレビューとリスク評価方法を具体的に記載し、ヒトにお

ける疫学的なデータも重視している。Weight of evidenceアプローチに基づいてリスク評価を行うことが特徴である。

具体的には、ガイダンスは、7章からなり、それぞれの章では、1章：序論、2章：背景、3章：免疫毒性リスク評価のフレームワーク、4章：免疫抑制、5章：免疫促進、6章：感作性とアレルギー反応、7章：自己免疫誘発性、で構成されている。また、事例研究のためのモデル化合物として、鉛が4章の免疫抑制の事例として、ヘキサクロロベンゼン (HCB) が5章の免疫促進の事例として、ハロゲン化プラチナが6章の感作性の事例として、芳香剤シトラルが同じく6章の(皮膚)感作性の事例として、水銀とトリクロロエチレン (TCE) が7章の自己免疫の事例としてそれぞれ選ばれ、weight of evidenceアプローチに基づいたフローチャートに従ってリスク評価を行った結果が示されている。

1章の序論で、免疫毒性リスク評価 (Risk assessment) は、Codexで用いられている他の化学物質のリスク評価と同様、ハザードの同定 (Hazard identification)、ハザード特性付け (Hazard characterization)、曝露評価 (Exposure assessment)、リスク判定 (Risk characterization) の4つのステップで行われることが記されている。

第3章の免疫毒性リスク評価のフレームワークの中で、ハザードの同定及びハザード特性付けでは、臨床並びに疫学データの収集、動物データ (用量反応の相関と閾値、曝露時間、種及び系統、投与開始時の週齢、性別、曝露経路、局所または全身影響、効果の不可逆性、急性か慢性か等) の収集を行い、曝露評価では、症状の重篤性及び持続性、曝露の時期と期間、曝露部位と局所免疫、体内動態のデータを収集すると記されている。リスク判定では、定量的で用量依存的なデータに基づいて、定量的リスク評価を行えることが理想的であるが、定性的にしかリスク判定を行えない場合が多いということも記されている。

第4章の免疫抑制の項目では、ハザードの同定は、次の7つの項目の上から順番にweight of evidence方式で行われることが記されている。すなわち、①ヒトでの疫学データ (感染への抵抗性の低下等)、②宿主の抵抗性 (実験動物)、③特定の免疫機能の低下 (抗体産生、NK細胞機能、細胞障害性T細胞の機能等) (実験動物)、④免疫系全般のデータ (リンパ球の表面抗原解析、サイトカイン等) (実験動物)、⑤血液学検査データ (白血球数等) (実験動物)、⑥組織染色データ (実験動物)、⑦臓器重量データ (実験動物) の順番である。この章では、鉛の事例研究が行われているが、以下、各項目についてのYES or NOの判断結果を記す。

① ヒトでの疫学データの存在【YES】: Queiroらから、

鉛の毒性の標的の一つが好中球⁶⁾で、鉛の職業的曝露を受けた人で、カンジダ・アルビカンスの感染に対する抵抗性が減弱している場合があること、33人の労働者の血中の鉛濃度(BLL)の平均が43.2 $\mu\text{g}/\text{dl}$ であったことが報告されている。また、この疫学データから得られた数字を不確実係数300で割り算をすると、受け入れられる曝露レベル(AEL, acceptable exposure level)としてBLL 0.144 $\mu\text{g}/\text{dl}$ が計算された。

② 宿主の抵抗性低下(実験動物)【YES】: Fernandez-CabezudoらのC3H/HeN マウスに鉛を飲料で投与した研究から⁷⁾, サルモネラへの感染性の上昇が観察された。この実験のLOAELが1036mg/l, BLL 20.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ であり、不確実係数3000として計算すると、AELとしてBLL 0.0068 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の値が算出された。

③ 特定の免疫機能低下(実験動物)【YES】: McCabeらのBALB/cマウスに鉛を飲料水で投与した研究から⁸⁾, 遅延型過敏症反応(DTH)の抑制が512mg/l投与群で観察されていること、この数字はBLLに換算して87 $\mu\text{g}/\text{dl}$ となり、これがLOAELと考えられることが報告されている。この値を不確実係数3000で割り算をすると、AEL 0.029 $\mu\text{g}/\text{dl}$ が計算された。

④ 免疫系全般への影響を示すデータ(動物実験)【YES】: BurchielらのB6C3F1マウスを用いた研究⁹⁾で、鉛の曝露により、成熟した免疫系細胞の表面マーカーの、未成熟細胞表面マーカーへの移行が、観察されている。

⑤ 血液学検査への影響を示すデータ(実験動物)【YES】: 報告は多くないが、MillerらのF344ラットを用いた研究¹⁰⁾で、鉛投与された親ラットから生まれた子供で、白血球数の減少が観察されている。

⑥ 組織染色への影響を示すデータ(実験動物)【NO】: Faithらのラットへの鉛の生前投与¹¹⁾で、免疫組織の組織学的染色データに差はみられていない。

⑦ 臓器重量への影響を示すデータ(実験動物)【YES】: Faithらのラットへの鉛の生前投与¹¹⁾で、胸腺の重量減少が観察されている。以上、人での疫学データ及び動物データより、鉛は、生体の持つ感染防御の機構を抑制する等の免疫抑制作用を持つことが示された。

第5章の免疫促進の項目では、ハザード同定は6つの項目で、weight of evidenceの方式で行われることが記されている。すなわち、①ヒトでの疫学データ、②アレルギー、自己免疫または感染症(実験動物)、③特定の免疫機能(抗体産生、遅延型過敏症反応等)(実験動物)、④免疫系全般(リンパ球の表面抗原解析、サイトカイン等)(実験動物)、⑤組織学的及び血液学検査(白血球数等)(実験動物)、⑥臓器重量データ(実験動物)の順番である。この章では、HCBの事例報告がある。以下、各項目について、判断結果を示す。

① ヒトでの疫学データの存在【YES】: 限定されたデータであるが、HCBに曝露されたトルコの住民で特に4-14歳の子供で、リンパ節の肥大、関節炎の亢進が観察された¹²⁾等報告がある。

② アレルギー、自己免疫または感染症への影響を示すデータ(実験動物)【YES】: Lewisラットを用いた研究で、HCB(22.5mg/kg bw per day)経口投与で、アレルギー性脳脊髄炎(EAE)の上昇が観察された。

③ 特定の免疫機能への影響を示すデータ(実験動物)【YES】: HCBを生前投与されたウィスター仔ラットにおいて、破傷風毒に対する抗体価並びに遅延型過敏症反応の上昇が観察された¹³⁾。

④ 免疫系全般への影響を示すデータ(実験動物)【YES】: WisterラットへのHCB経口投与で、抗体産生の上昇¹⁴⁾等が観察されている。

⑤ 組織学的及び血液学検査への影響を示すデータ(実験動物)【YES】: HCBの経口投与で、胸腺、脾臓の組織学的変化が、ラット¹⁵⁾, サル¹⁶⁾, 犬¹⁷⁾で観察されている。

⑥ 臓器重量への影響を示すデータ(実験動物)【YES】: ラット¹⁴⁾において、HCBの経口投与で、脾臓及びリンパ節の重量の上昇が観察されている。以上、疫学及び動物実験の結果より、HCBは、免疫促進活性を持つことが示された。また、成熟ラットよりも幼若ラットで、より低濃度で作用することが示された。

第6章の感作性とアレルギー反応の項目では、ハザード同定は感作の後に誘発されるアレルギー反応の型に応じて3つのカテゴリーにわけ、それぞれの判断樹を用いて行うことが記されている。すなわち、(A)皮膚感作、(B)吸入感作、(C)全身性(経口)感作の3つである。3つの中で、解析手法の最も進んでいるのは(A)の皮膚感作で、続いて(B)の吸入感作、(C)経口感作の順である。化学物質によっては、3つのすべての経路での感作が考えられる場合には、3つの判断樹に従ったハザード同定が必要で、1つの経路に限定される場合は1つの系統樹に従ったハザード同定が行われる。ハザードの特性付けにおいて、用量相関性、閾値決定のための試験として適しているのは、感作性試験であるマウスを用いる局所リンパ節試験法(local lymph node assay (LLNA))であることが示されている。刺激指数(Stimulation Index, SI)3を越える濃度(EC3 value)が、ヒトのNOEL(無影響量)やBMD(ベンチマーク用量)に相当する値であり、このEC3 valueは閾値として1:1でヒトに概想できうる値であることが述べられている。なお、この章では、芳香剤シトラル(Citral)の事例報告がある。以下、各項目について、判断結果を示す。芳香剤シトラルは、皮膚感作性のあることが知られている化合物であるので(A)の判断樹を用いた。

① 皮膚感作性が知られているか (LLNA, GPMT (Guinea Pig maximization test), HRIPT (Human repeat insult patch test) (ヒトパッチ試験), QSAR, *in vitro*試験を行っているか)? 【YES】: シトラールは、モルモット、マウス、ヒトにおいて広く皮膚感作性が知られており、1%濃度でモルモットの感作を誘導することができる¹⁸⁾。

② LLNA EC3またはヒトNOELとして表される皮膚感作能に関する情報は、定量的なPOD (NOAEL) を導き出すことができるか? 【YES】: ヒトのHRIPT試験から得られたNOEL 1400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ は、LLNA EC3で得られた1609 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ とよく相関し、皮膚感作を誘導する最低濃度 (POD) (the point of departure) を設定することが可能である。LLNA EC3値5.6%¹⁸⁾ から類推して、シトラールは、weakからmoderateの皮膚感作物質に相当すると思われる。

③ 惹起 (elicitation) 能に関して定量的にPODを導き出すことができるか? 【NO】: シトラールの惹起能のPODを求めるための定量的データは与えられていない。以下に結論を記す。シトラールは、皮膚感作性物質としてよく知られている芳香剤として事例研究に選ばれたが、使用に際しては、例えば、化粧品への表示、使用説明、または、使用濃度の制限等が必要と思われると記されている。

第7章の自己免疫誘発性の項目では、ハザード同定は、5つの項目で、weight of evidenceの方式で行われる。すなわち、①ヒトでの疫学データ、②症状の発症または進行の調節 (実験動物)、③特定の免疫機能 (自己抗体産生、リンパ節増殖等) (実験動物)、④免疫系全般 (リンパ球の表面抗原解析、サイトカイン等) (実験動物)、⑤組織学的及び血液学検査 (免疫複合体沈着等) (実験動物) の順番である。この章では、トリクロロエチレン (TCE) の事例報告がある。以下、各項目について、判断結果を示す。

① ヒトでの疫学データの存在 【YES】: TCEは、ヒトに硬化症のような自己免疫病症状を引き起こすことが報告されている¹⁹⁾。

② 症状の発症または進行を促す効果を示すデータの存在 (実験動物) 【YES】: 自己免疫を引き起こしやすいマウス (MRL+/+マウス) を用いた研究の多くで、TCEが病状の進行を早めることが報告されている²⁰⁻²²⁾。

③ 特定の免疫機能への影響を示すデータ (実験動物) 【YES】: MRL+/+マウスを用いた研究で、TCEが自己免疫病を示す特異的なマーカーの上昇を促すことが多くの研究で報告されている²¹⁻²²⁾。

④ 免疫系全般への影響を示すデータ (実験動物) 【YES】: TCEは、MRL+/+マウスCD4+ T細胞の活性化

を促すことが報告されている²¹⁾。

⑤ 組織学的及び血液学検査への影響を示すデータ (実験動物) (YES): TCEが自己免疫病の進行に係わることが、組織学的にはリンパ球の浸潤が起きることで示されている²¹⁾。TCEの結論としては、ヒトの疫学データは、例数が限られているが、動物実験から、TCEが自己免疫病の発症を誘発または促進する活性を有することが示されたと記されている。

以上、2012年に出されたIPCS/WHO化学物質の免疫評価ガイダンスについて解説を行ってきたが、ここに示した評価の方法をもとに他の化学物質の免疫毒性の評価が行われ、また、免疫影響発現のメカニズム (Mode of action) に基づいた議論が可能になってゆくものと思われる。

IPCS/WHOのガイドラインに続いて、免疫毒性に関する既存の国際ドキュメントを2種紹介したいと思う。

まず、医薬品についてのガイドラインであるが、2005年にICH (日米EU医薬品規制調和国際会議) の免疫毒性試験ガイドライン (ICH S8) が作成されている。表1の中央部に、ガイドラインのリンク先も示しているが、S8ガイドラインは低分子医薬品の非意図的な免疫抑制と免疫亢進を主な対象とし、臨床試験に入るまでに必要に応じて行うべき非臨床免疫毒性試験の実験方法に関するものである。こちらでもweight of evidenceアプローチでフローチャートを用いて免疫毒性の判断を行うことに特徴がある。

次いで、化学物質の皮膚感作性に特化したOECDで出されているガイドラインについて述べてみたい。動物を用いる皮膚感作性試験は、ヒトにおける接触性の遅延型の皮膚過敏症を予測するための方法であるが、表1の下部に、1992年に出されたOECD毒性試験ガイドライン406、2002年に出されたTG429、2010年に出されたTG442A、TG442Bを記している。OECD毒性試験ガイドライン406に記載されている方法は、GPMT法と、Buehler法である。従来より遅延型薬物アレルギーの誘起活性の予測は、モルモットを用いて行われる場合が多く、ヒトで接触皮膚炎を誘起することが知られている化合物を、GPMTで検討するとかなりの高率で陽性物質を検出していることが知られていた²³⁻²⁴⁾。GPMTは現在でも、IV型のアレルギー性を予知する上で、信頼に足る方法の一つと考えられている。GPMTはアジュバント (Freund's complete adjuvant (FCA)) とともに化学物質を皮下投与することにより感作誘導を行い、3週間程度の期間を空けて感作を成立させる。その後閉塞パッチテストにより誘発し、その皮膚反応を観察する方法である。同じくOECD406に記載されている方法として、Buehler法²⁶⁾がある。Buehler法は、アジュバントを用いず、感作物質

Table 1 Immunotoxicity に関する既存の国際ドキュメント

- **WHO/ IPCS (International Programme on Chemical Safety)**
 : EHC (Environmental Health Criterium Documents)
 (1) principles and methods for assessing direct immunotoxicity
 associated with exposure to chemicals (#180):1996
 (2) principles and methods for assessing allergic hypersensitization
 associated with exposure to chemicals (#212): 1999
 (3) principles and methods for assessing autoimmunity
 associated with exposure to chemicals (#236):2006
 : Guidance for immunotoxicity risk assessment for chemicals (2012)
 (<http://www.inchem.org/documents/harmproj/harmproj/harmproj10.pdf>)
- **ICH (The International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use)**
 : Immunotoxicology studies for human pharmaceuticals S8, p1-11
 (2005) (http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S8/Step4/S8_Guideline.pdf) (医薬品免疫毒性)
- **OECD (化学物質の感作性試験に関するガイドライン)**
 (1) Skin Sensitisation (TG406) guinea pig maximization test (1992)
 (2) Skin Sensitisation: Local lymph node assay (TG429) (2002)
 (3) Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA (TG 442A) (2010)
 (4) Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA (TG 442B) (2010)

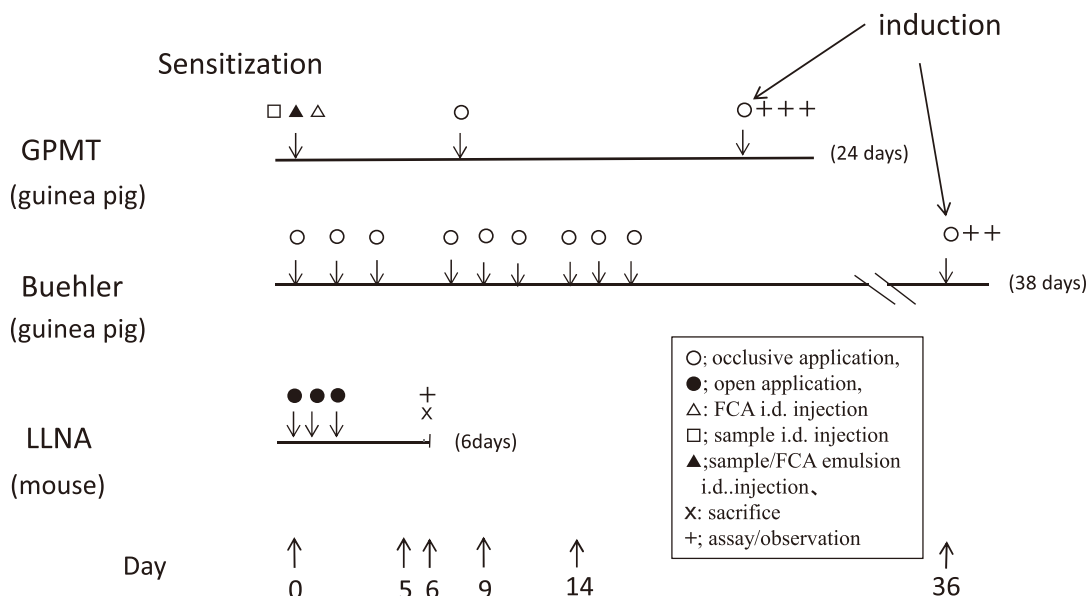


図1 OECDテストガイドラインのある感作性試験法

を皮膚塗布により適用するため、ヒトにおける接触過敏症の感作過程により近いが、皮膚感作性物質の検出力はGPMTに比べると感度が弱いとされている。2002年にだされたTG429は、マウスを用いる局所リンパ節試験法(LLNA)²⁶⁾であり、モルモットを用いた試験より、感作過程を評価しているため試験期間が短いという長所があり、モルモットを用いる方法と二者択一の方法として用いることができる²⁷⁾。具体的には、被験物質をマウス耳介に3日間連続で塗布し、6日目に³H-thymidineを尾静注し、5時間後にリンパ節を切除し、リンパ節組織中に

含有される放射活性を測定することにより、リンパ節細胞の増殖性を評価するものである。GPMT法、Buehler法、LLNA法の実験法をまとめたものを図1に示す。なお、2010年に、ラジオアイソトープを用いないLLNAの改変法として、LLNA:DA法(OECD TG442A)及びLLNA:BrdU-ELISA法(OECD TG442B)が採択されている。LLNA法は、感作の指標として、被験物質群と溶媒対照群の比較を刺激指数(Stimulation Index, SI)を用いて表わすことを特徴とし、陽性反応と判断するための条件を、刺激指数が3以上であること、用量反応性があ

Table 2 LLNA EC 3 と感作性のカテゴリーについて

EC3* value (%)	感作性のカテゴリー(Potency classification)
算出不可	negative
$\geq 10 - < 100$	weak
$\geq 1 - < 10$	moderate
$\geq 0.1 - < 1$	strong
< 0.1	extreme

*EC3: minimum sensitization concentration at which SI=3

SI=stimulation Index (dpm of the treated group/dpm of the concurrent vehicle control) (cf. Gerberick G.F. et al; Contact Dermatitis 50, 274, 2004)

ること、統計的な有意差があることとしている。さらに、この刺激指数3を超える被験物質の濃度 (EC3 value) は、表2に示すように、Gerberickらにより被験物質の感作性の強さを表わす指標としても用いることが提唱されている²⁷⁾。すなわち、化学物質の感作性の強さを4段階にわけ、EC3値の低い方からextreme, strong, moderate, weakに分類し、算出不可能なものをnegativeと分類している。なお、化学物質のヒトにおける即時型アレルギーを予測する非臨床試験法は、まだ確立されておらず、今後の研究が期待される分野となっている。

(11) 腸管免疫毒性

ここからの2つの項目は、まだ国際ガイドラインとして示されたものではないけれども、現在、盛んに研究されている分野であるので、現状等を記してみたいと考える。

まず、腸管免疫毒性であるが、腸管免疫毒性は、外来性物質 (微生物も含め) が腸管及び関連組織の免疫機能を変化させ、有害な影響をもたらすことで定義できる。腸管の主な免疫機能には、IgA抗体の分泌、病原体の侵入の阻止、食物アレルギーの抑制 (経口免疫寛容の維持)、過剰な炎症の抑制、適切な腸内細菌叢 (共生細菌) の維持等があり、これらの機能の抑制や過剰亢進を腸管免疫毒性と呼ぶことができると思われる。腸管免疫に影響を及ぼしうる経口暴露物質の例としては、マイコトキシンであり、vomitininとも呼ばれるデオキシニバレノールがあげられるが²⁸⁾、化学物質では毒性影響を示すものはむしろ少ない。食物等の経口摂取による免疫応答においては、腸管系に存在する粘膜免疫系 (GALT (gut-associated lymphoid tissue)) に、外来物質が捕えられ、ここで、感作の成立が決定する。一方、食物等の経口摂取による免疫応答においては、通常、腸内常在菌叢や食物抗原などの「無害」と考えられる抗原に対する全身性、局所性の過度の炎症反応を抑える経口免疫寛容が存在する。経口感作は、免疫寛容とのバランスにおいて成立するもので、免疫寛容が抑えられるとバランスがくずれ、

感作が進んでゆくものと考えられる。食物アレルギーは、食品中のアレルゲン (通常タンパク質²⁹⁾) が抗原となって引き起こされるものであるが、免疫寛容が解除されるメカニズムは、まだヒトではよくわかっていないが、マウスを用いた研究に絞って、アナフィラキシーの誘導された事例、腸炎の誘導された事例を述べ、最後にGALTに関する研究の最近の動向について概説したい。

(i) アナフィラキシーの誘導された事例について: (a) アジュバントを使用する方法: コレラトキシン (CT) は可溶性抗原とともに経口的に投与されると、腸管免疫系にIL-4を中心としたTh2型の応答を誘導し、血清中特異的IgE抗体価を上昇させ、腸管だけでなく全身的にアナフィラキシーを誘導することが報告されている。これらの基礎的情報をもとに、C3H/HeJマウスに、可溶性アレルゲンをCTとともに数回経口的に投与し、その後、誘導日に数回のインターバルで投与を続けアナフィラキシーを起こすモデルが作成された³⁰⁾。方法は、原因アレルゲン (ピーナッツ³⁰⁾, カゼイン³¹⁾, エビ³²⁻³³⁾) の種類により改良されている。CTの併用で、アナフィラキシーが起きる機構として、樹状細胞 (CD) に関して、腸間膜リンパ節 (MLN) のCD11c⁺DC細胞でOX40 (CD134)Lの発現上昇が解析されており、T細胞のTh2型への分化シフトに関係していることが示唆されている³⁴⁾。 (b) アジュバントを使用しない方法: SEB (staphylococcal enterotoxin B) とともに、卵アレルゲン (オボアルブミン, OVA) をC57BL/6Jマウスに1週間ごと8週間経口投与する。その結果、Th2型に免疫応答が傾き、アナフィラキシーが誘導されるとともに、腸管にマスト細胞の浸潤、さらに特に血中と腸管に好酸球浸潤が認められる。この好酸球浸潤がCTとは異なる点であり、アナフィラキシーの誘導は、TGF- β と制御性T細胞機能の抑制がかかわっていることが示唆されている³⁵⁾。なお、表3に、アジュバントを用いない感作の事例として、経皮感作の事例を示しているが、これらについては、後述したい。

(ii) 腸炎の誘導とともに感作の引き起こされた事例: (a) Cox-2阻害剤; 卵白リゾチーム (HEL) 特異的T細胞受容

体遺伝子導入 (3A9 HEL-TCR-TG) マウスにCox-2阻害剤 (インドメタシン) を全身的に投与し, さらにHELを飲水投与すると小腸炎を発症すること, Cox-2に依存したアラキドン酸代謝産物が, 腸管恒常性の維持に不可欠であることが示されている³⁶⁾. また, Cox-2阻害剤 (サリチル酸) をBALB/cマウスに全身的に投与し, さらにOVAをリノール酸/レシチンと共に経口投与すると, 大量のOVAの経口惹起により, 小腸炎を伴う全身症状の発症することも報告されている³⁷⁾. (b)トランスジェニックマウスを用いる方法: OVA特異的T細胞受容体遺伝子導入 (TCR-TG (OVA23-3)) マウスに卵白の混餌投与を長期間行くと, 血中の特異的IgE抗体価の上昇とともに軟便を伴う小腸炎を発症する. さらに投与を行うと寛容が誘導され, 炎症が軽快するが, 一部軽快しないマウスもあり, その場合にはTh2細胞の関与が示唆されている³⁸⁾. 同様に, 別のOVA特異的T細胞受容体遺伝子導入 (OVA-TCR-TG (DO11.10)) マウスにOVA特異的IgE抗体を遺伝子導入したダブルトランスジェニックマウスにOVAを頻回投与すると下痢を発症すること, 投与継続により下痢は認められなくなることで, その寛容獲得には, TGF- β の関与することが報告されている³⁹⁾. なお, 今までの事例をまとめたものを表3に示す.

(iii) GALTに関する研究の進展について: 腸間膜リンパ節 (MLN) のB7-H1およびB7-DC陽性樹状細胞が, 免疫寛容に関係する抗原特異的制御性T細胞 (Treg) の誘導に影響を与えること⁴⁰⁾, B細胞からのIgA抗体産生を促す濾胞性B細胞ヘルパーT細胞 (T Follicular Helper Cell, Tfh) が, 腸内リンパ組織であるパイエル板 (Peyer's patches) において, 制御性T細胞 (Treg) から分化すること等が報告されている⁴¹⁾. 腸管免疫に関する研究は, 今後とも進展が期待される領域であると思われる. なお,

次章では, 食物アレルギー等タンパク質による感作が, 経皮的に行われる事例について, 紹介したい. タンパク質による感作は, 第一章でのべた, 化学物質で引き起こされる経皮感作に比べると症例としては多くはないが, 化学物質による経皮感作が主に遅延型過敏症を引き起こすのとは対照的に, 全身性の即時型アレルギーを引き起こすことに特徴がある.

(III) 経皮感作について

(a) マウスを用いた事例: 食物アレルギーによる経皮感作では, 免疫寛容とのバランスにおいて成立する経口感作とは違い, アジュバントを必要としないで感作の引き起こされる例が数例報告されている. 以下, 表3にも示しているが, 具体的な例として2種のタンパク質を用いた事例を紹介する.

一例目は, ヘーゼルナッツより抽出したタンパク質の例であるが, BALB/cマウスの背中にタンパク質を3日塗布し, その4日後に再度塗布を開始し6週間続けて経皮感作を行い, その後アレルギーを経口的に投与し, アナフィラキシーが惹起された例である⁴²⁾. この例では, 経皮感作により, 抗原特異的IgE抗体産生が見られること, 感作動物の脾細胞のin vitroでの抗原再感作によりTh2型のサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13) の産生, 転写因子GATA3の発現の上昇がみられることより, Th2型のリンパ球の活性化の起きていることが示されている. 二例目は, ピーナッツより抽出したタンパク質の例であるが, ヘーゼルナッツタンパク質の場合と同様の経皮感作研究を行った結果⁴³⁻⁴⁴⁾, IL-4産生及び抗原特異的IgE抗体の上昇が観察されている. これら研究においては, マウスの背部の毛を剃った後に, テープストリッピングで角質のバリア傷害を起こさせた後, タンパク質の塗布を

Table 3 既報告の食物アレルギーモデルマウス

病態	系統	抗原	感作方法	アジュバント
アナフィラキシー	C3H/HeJ	ピーナッツ ³⁰⁾ 、カゼイン ³¹⁾ 、エヒ ^{32,33)}	経口	あり(コレラ毒素)
	C57BL/6J	オボアルブミン	経口	なし(但しSEB*を使用) ³⁵⁾
	BALB/c	ヘーゼルナッツ ⁴²⁾ ピーナッツ ^{43,44)}	経皮	なし
消化管炎症を伴う感作事例	HEL-TCR-TG (3A9)	リゾチーム(HEL)	経口	なし(但しインドメタシンを併用) ³⁶⁾
	BALB/c	OVA	経口	なし(但しサルチル酸を併用) ³⁷⁾
	OVA-TCR-TG (OVA23-3)	OVA	経口	なし ³⁸⁾
	OVA-TCR-TG (DO11.10)	OVA	経口	なし ³⁹⁾

*SEB (staphylococcal enterotoxin B)

行っているが、久保博士ら⁴⁵⁾の報告にあるように、角質バリア傷害により、真皮層表面のタイトジャンクション部で樹状突起を伸ばした抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞にとらえられるか、ケラチノサイトに情報が提供されることにより、Th2型のリンパ球の活性化が優位に行われているものと思われる。ヒトにおいても角層のバリア障害があり免疫応答が亢進している疾患では、比較的大きい分子量をもつタンパク質でも皮膚から取り込まれ、感作が成立する可能性が考えられると思われる。なお、中島博士らにより⁴⁶⁾、ランゲルハンス細胞のTSLP受容体欠損マウスにおいてオボアルブミンを経皮的に曝露させた場合に、オボアルブミン特異的IgE抗体産生の抑制がみられることより、表皮のランゲルハンス細胞がタンパク質による抗原提示に不可欠であること、及びサイトカインTSLP (Thymus stromal lymphopoietin) が深くかかわっていることが示されている。なお、すでに2002年の報告で、TSLPが、アトピー性皮膚炎 (AD) の皮膚病変部のケラチノサイトでの発現がみられ、Th2反応を誘導するマスタースイッチの役割を果たしていることが報告されている⁴⁷⁾。また、最近、マウスの皮膚に、T細胞のTh2方向への分化に関与するCタイプレクチンであるCD301 (MGL2) 陽性樹状細胞 (dermal DC) が存在することも報告されてきており、ランゲルハンス細胞以外の皮膚に特異的に存在する樹状細胞のタンパク性抗原の感作への関与についての今後の解析も興味深いと思われる⁴⁸⁾。なお、背部をテープストリッピングしたBALB/cマウスを用いた小麦グルテンの加水分解物の経皮感作の事例を私共も報告しているが、詳細については、別の総説をご覧いただきたい⁴⁹⁾。

(b) ヒトにおける食物タンパク質の経皮感作の事例について：2008年、イギリスのLack G.博士は食物アレルギーに関する新しい概念「Dual allergen exposure hypothesis」[二重抗原曝露仮説]を提唱した⁵⁰⁾。経口摂取は免疫寛容を促進し、経皮的接触はアレルゲンの感作を惹起促進するという概念であった。この論文では、海外の疫学調査でピーナッツオイルを含むスキンケア製品を使用するグループでピーナッツアレルギーの発症が多いことも報告されている。また、2012年に、Chan博士のグループにより、ピーナッツアレルギー患者の末梢血リンパ球を用いた興味深い報告がされている⁵¹⁾。すなわち、末梢血のメモリーTリンパ球を分離し、ピーナッツ抽出物を加えて培養した時に、ピーナッツアレルギー患者由来のリンパ球では、skin homing marker (皮膚移行性マーカー) であるCLA (cutaneous lymphocyte antigen) 陽性の記憶T細胞が主に幼若化を受けることが示され、このCLA陽性T細胞からはTh2サイトカインであるIL-13の産生が主であったこと、一方、ピーナッツに耐性を持つグループ

由来の記憶T細胞では、ピーナッツとの共存培養で、 $\alpha 4 \beta 7$ 陽性T細胞とCLA陽性T細胞の両方の幼若化が観察され、 $\alpha 4 \beta 7$ 陽性T細胞からは、Th1サイトカインであるINF- γ の産生が主であったことが報告されている。このことは、ピーナッツアレルギー患者では、経皮感作で誘導されたCLA陽性細胞によってTh2優位となり食物アレルギーを誘発する方向に免疫反応が働いている可能性が考えられている。

おわりに

最近の免疫学の進展に伴い、新たな免疫担当細胞の特性解析が進んでいる。マクロファージ、樹状細胞等の抗原提示細胞やTh1, Th2, Th17, Tfh, Treg, NKT細胞等のT細胞サブセットによる細胞性免疫、液性免疫、炎症、自己免疫の調節機構が明らかにされつつある。また、病原体等の防御にかかわる自然免疫を担う分子として、Tol様受容体、RIG-I様受容体、NOD様受容体も次々見いだされ、自然免疫と獲得免疫の関連も活発に研究されている。また、免疫担当細胞上にある薬理学的受容体の他、AhR, PPARs, PXR, RORs等の核内受容体による免疫応答の調節に関しても研究が進んでいる。化学物質の免疫応答への影響が、そのメカニズム (Mode of action) に基づいて議論されることが可能な情報が蓄積されてきていると思われる。

昨今のトキシコロジーの分野では、オミクス、エピジェネティクス、miRNA解析等による新たな毒性バイオマーカーの検索・同定手法の開発が進んでいる。また、幹細胞より分化した細胞やヒト型化免疫不全マウス⁵²⁾を利用した毒性評価系の構築も試みられている。さらに、対象物質としては、環境物質として位置付けられるものとして、腸管系を標的とする新開発食品、ナノ物質で代表される新開発素材を用いる食品、食品添加物など、新しいタイプの物質の開発も進んでいる。これら新しい物質の評価も今後、更に検討してゆく必要があると思われる。

引用文献

- 1) VOS JG: CRC Crit Rev Toxicol. 1997; 5: 67-101
- 2) 大沢基保: トキシコロジー・フォーラム, 1986; 9: 546-558
- 3) 寺尾允男: Bull. Natl. Inst. Health Sci., 1988; 106: 1-9
- 4) 松本清司, 関田清司, 落合敏秋, 高木篤也, 高田幸一, 降矢 強, 黒川雄二, 斎藤嘉朗, 手島玲子, 鈴木和博, 沢田純一, 寺尾允男, 戸部満寿夫: Bull. Natl. Inst. Health Sci., 1990; 108: 34-39
- 5) WHO (2012) IPCS Harmonization project document no.10: Guidance for immunotoxicity risk assessment for chemicals, WHO, Geneva, p.1-333

- 6) Queiroz MLS, Perlingeiro RCR, Bincoletto C, Almeida M, Cardoso MP, Dantas DCM: *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 1994;16: 115-128.
- 7) Fernandez-Cabezudo MJ, Ali SAE, Ullah A, Hasan MY, Kasanovic M, Fahim MA, Adem A, Al-Ramadi BK: *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;218:215-226.
- 8) McCabe MJ Jr, Singh KP, Reiner JJ Jr: *Toxicology*, 1999;139:255-264.
- 9) Burchiel SW, Hadley WM, Cameron CL, Fincher RH, Lim TW, Elias L, Stewart CC: *Internat. J Immunopharmacol.*, 1987;9:597-610.
- 10) Miller TE, Golemboski KA, Ha RS, Bunn TL, Sanders FS, Dietert RR: *Toxicol. Sci.*, 1988;42:129-135.
- 11) Faith RE, Luster MI, Kimmel CA: *Clin Exper Immunol*, 1979;35:413-420.
- 12) Peters HA, Gocmen A, Cripps DJ, Bryan GT, Dogramaci I: *Arch Neurology*, 1982;39:744-749.
- 13) Van Loveren H, Van Eden W, Kranjc-Franken MAM, De Kort W, Vos JG: *Toxicologist*, 1990;10:221 (abstract).
- 14) Vos JG, Van Logten MJ, Kreeftenberg JG, Steerenberg PA, Kruizinga W: *Drug Chem Toxicol*, 1979;2:61-76.
- 15) Vos JG, Van Logten MJ, Kreeftenberg JG, Kruizinga W: *Annals New York Academy Sci*, 1979;320:535-550.
- 16) Iatropoulos MJ, Hobson W, Knauf V, Adams HP: *Toxicol Applied Pharmacol*, 1976;37:433-444.
- 17) Gralla EJ, Fleischman RW, Luthra YK: *Toxicol Applied Pharmacol*, 1977;40:227-239
- 18) Lalko J, Api A: *Regul Toxicol Pharmacol*, 2008;52:62-73.
- 19) Cooper GS, Makris SL, Nietert PJ, Jinot J: *Environ Health Perspect*, 2009;117:696-702.
- 20) Khan MF, Kaphalia BS, Prabhakar BS, Kanz MF, Ansari GA: *Toxicol Applied Pharmacol*, 1995;134:155-160.
- 21) Griffin JM, Gilbert KM, Lamps LW, Pumford NR: *Toxicol Sci*, 2000;57:345-352.
- 22) Blossom SJ, Doss JC, Gilbert KM: *Toxicol Sci*, 2007;95:401-411.
- 23) Magnusson B, Klingman AM: *J. Invest. Dermatol.* 1969;52:268-276.
- 24) Magnusson B: *Contact Dermatitis* 1980;6:46-50.
- 25) Buehler EV: *Arch. Dermatol.* 1965;91:171-177.
- 26) Kimber I., Basketter DA: *Food Chem. Tox.* 1992;30:165-169.
- 27) Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA.: *Contact Dermatitis* 2004;50:274-288
- 28) Pestka J.J.: *Arch. Toxicol.* 2010;84:663-679
- 29) 手島玲子: *Bull.Natl.Inst.Health Sci.*, 2001;119:27-39
- 30) Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, Stanley JS, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA.: *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:150-158.
- 31) Li XM, Schofield BH, Huang CK, Kleiner GI, Sampson HA: *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:206-214.
- 32) Leung PS, Lee YS, Tang CY, Kung WY, Chuang YH, Chiang BL, Fung MC, Chu KH: *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2008;147:305-314.
- 33) Capobianco F, Butteroni C, Barletta B, Corinti S, Afferni C, Tinghino R, Boirivant M, Di Felice G.: *Int. Immunol.* 2008;20:1077-86.
- 34) Blazquez AB, Berin MC: *J. Immunol.* 2008; 180:4441-50.
- 35) Ganeshan K, Neilsen CV, Hadsaitong A, Schleimer RP, Luo X, Bryce PJ.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009;123:231-238.
- 36) Newberry RD, Stenson WF, Lorenz RG: *Nat. Med.* 1999;5:900-906.
- 37) Shindo T, Kanazawa Y, Saito Y, Kojima K, Ohsawa M, Teshima R: *J Toxicol Sci.*, 2012;37:307-15.
- 38) Nakajima-Adachi H, Ebihara A, Kikuchi A , Ishida T, Sasaki K, Hirano K, Watanabe H, Asai K, Takahashi Y, Kanamori Y, Shimojo N, Matsuda H, Kohno Y, Hachimura S, Kaminogawa S.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;117:1125-32.
- 39) Omata N, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Karasuyama H, Mayumi M: *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005;115: 822-827.
- 40) Fukaya T, Takagi H, Sato Y, Sato K, Eizumi K, Taya H, Shin T, Chen L, Dong C, Azuma M, Yagita H, Malissen B, Sato K.: *Blood* 2010;116:2266-76.
- 41) Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T, Hori S, Fagarasan S: *Science* 2009;323:1488-92.
- 42) Birmingham NP, Parvataneni S, Ahmed Hassan HM, Harkema J, Samineni S, Navuluri L, Kelly CJ, Gangur V: *Int. Arch. Allergy Immunol.*

- 2007;144:203-210.
- 43) Strid J, Hourihane J, Kimber I, Strid J, Hourihane J, Kimber I, Callard R, Strobel S: *Clin. Exp. Allergy* 2005;35:757-766.
- 44) Strid J, Callard R., Strobel S: *Immunology* 2006;119:27-35.
- 45) Kubo A., Nagao K., Amagai M.: *J Clin Invest*, 2012;122:440-447.
- 46) Nakajima S., Igyártó B.Z., Honda T., Egawa G, Otsuka A, Hara-Chikuma M, Watanabe N, Ziegler SF, Tomura M, Inaba K, Miyachi Y, Kaplan DH, Kabashima K.: *J Allergy Clin Immunol*, 2012;129:1048-1055
- 47) Soumelis V, Reche PA, Kanzler H., Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ.: *Nat Immunol*. 2002;3:673-80.
- 48) Murakami R, Denda-Nagai K, Hashimoto S, Nagai S, Hattori M, Irimura T.: *PLOS One*, 2013;8:1-13.
- 49) Teshima R.: *Yakugaku Zasshi* 2014;134:33-38.
- 50) Lack G.: *J Allergy Clin Immunol*. 2008;21:1331-1336.
- 51) Chan S.M., Turcanu V., Stephens A.C., Fox AT, Grieve AP, Lack G.: *Allergy*. 2012;67:336-342.
- 52) Ito R., Takahashi T., Katano I., Ito M.: *Cell. Mol. Immunol*. 2012;9:2008-2014.