

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 問 哲生

本研究では、代表的な低分子アレルゲン性化合物を用いて、モルモットの体液性免疫反応または細胞性免疫反応の検出系について検討するとともに、新たなアレルゲン性スクリーニング法の可能性を見出すために、マウスの膝窩リンパ節反応について検討した。

強力な感作性が指摘される sodium 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate dihydrate (TNBS)および臨床でアナフィラキシーが報告される β -ラクタム系抗生物質の penicillin G (PcG) および cephalothin (CET)を被験物質として選択し、Hartley, Strain 2 および Strain 13 の3系統のモルモットに皮下免疫した。アレルギー反応を惹起するにあたり、体液性免疫応答に関連するアレルギーの検査系として、受身皮膚アナフィラキシー (PCA) 反応, Arthus 反応 (皮内注射法), 細胞性免疫応答に関連するアレルギーの検査として delayed-type hypersensitivity (DTH) 反応 (皮内注射法) を使用した。TNBS に対する体液性免疫応答および細胞性免疫応答は系統差があるものの、いずれの系統モルモットにおいても陽性反応として確認した。また、皮内注射法による Arthus 反応および DTH 反応では、前者は病理組織学的に顆粒球系細胞の浸潤を主体とするのに対し、後者ではそれに加え単核細胞の出現と組織破壊を伴い、それぞれ体液性および細胞性免疫の関与するアレルギーの典型的な所見と考えられた。一方、PcG および CET に対する免疫応答においても、全ての系統モルモットにおいて PCA 反応および能動的全身性アナフィラキシー (ASA) 反応の検査は陽性であった。以上のように、これらの低分子化合物のアレルゲン性評価において、モルモットの体液性または細胞性免疫応答の検出系は有用であると考えられた。

次に新たな指標によるアレルゲン性評価の試みとして、低分子アレルゲン性化合物に対するマウス膝窩リンパ節反応の応答性およびその免疫学的特性について検討した。モルモットでアレルギー誘発が確認されたTNBSまたはPcGをマウスの片側の足蹠皮下へ投与すると投与側の後肢の膝窩リンパ節は7日目を最大とする細胞増加が確認された。また、膝窩リンパ節においてTNBSあるいはPcG投与により主としてCD4⁺細胞およびB細胞の顕著な増加が確認された。なお、膝窩リンパ節細胞においては、TNBS投与によりIFN- γ の産生が、PcG投与ではIL-4の産生がそれぞれ観察された。さらにT細胞の関与を調べる目的でT細胞欠損マウス (BALB/c-nu/nu) にTNBSおよびPcGを投与したところ、いずれの化合物でも膝窩リンパ節の細胞増加は検出されなかった。また、TNBSに感作させたマウスの脾臓からT細胞を移入したレシピエントマウスにおいて、正常マウスよりもPLN応答が強く発現することを示した。これら得られた一連の結果から、TNBSやPcGのようなアレルゲン性化合物によって引き起こされるマウス膝窩リンパ節応答はT細胞依存性のB細胞の増殖が見られる免疫学的機序による反応であると考えられた。

マウス膝窩リンパ節反応をアレルゲン性評価に応用するにあたり、さらに多数の被験物質の背景データを集積した。32種類の化合物について、膝窩リンパ節反応を調べた結果、28化合物で免疫学的副作用の発現報告と相関が見られた。ヒトにおいてアレルゲン性または自己免疫誘発性が疑われる24化合物中21化合物でPLNA陽性反応を検出した(陽性率87.5%)。免疫学的副作用の発現と結果が一致しなかった化合物のうち、偽陽性となった刺激性物質 benzalkonium chloride については、膝窩リンパ節が全体に腫大するが病理組織学的には顕著な変化は認められなかった。対照的にアレルゲン性物質のTNBSまたはPcGを投与した場合、膝窩リンパ節の皮質領域に胚中心が出現し、免疫組織化学的手法により、この胚中心でB細胞の増殖が活発に起きていることを確認した。また、偽陰性となった自己免疫誘発性のprocainamideおよびisoniazidについては、ラット肝ホモジネート由来S9mixと混合し、一定時間37で反応させ、濾過した低分子のサンプルを用いて検査を実施したところ、30分以上のS9mixとの反応で膝窩リンパ節反応を誘発する傾向を示した。以上のように、刺激性に伴う偽陽性や代謝が不十分なために起こる偽陰性が生じる可能性があるが、病理組織学的検査あるいは、*in vitro*の代謝系と組み合わせるなどの工夫により、より精度の高いスクリーニングが期待できると考えられた。

上述した本研究の結果、モルモットのアレルギー反応の検出系およびマウスの膝窩リンパ節反応は低分子化合物のアレルゲン性評価に有用であると考えられた。低分子化合物のアレルギー誘発性の評価は、これまで実験動物を用いた方法では困難な場合が多いと考えられていたが、マウス膝窩リンパ節反応という新しい指標が加わることにより、今後さらに精度の高いアレルゲン性評価が期待できるものと考えられる。以上の内容は、低分子物質の免疫毒性について新たな検出手法を示すものである。したがって、審査委員一同は、博士(農学)を有するとの合意に達した。