

図1 体重推移

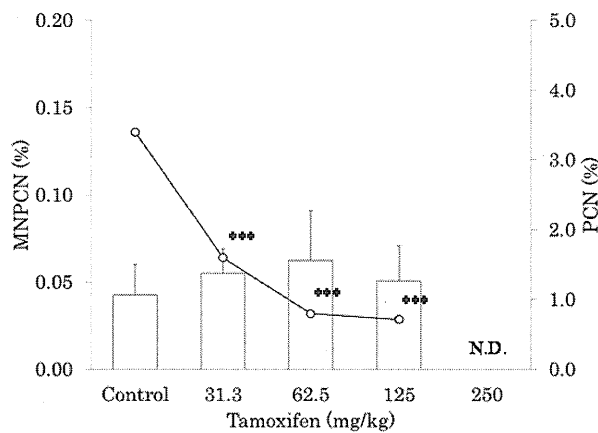


図2 造血への作用と末梢血小核試験

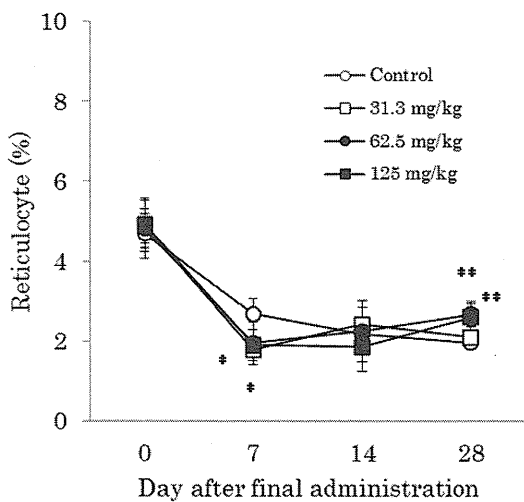


図3 多染性赤血球比率

表1 末梢血を用いたRBC pig-a法の測定結果

Treatment	Dose (mg/kg)	Mutation Frequencies of <i>pig-a</i> ( $\times 10^{-6}$ )			
		Pre.	7 day	14 day	28 day
Control		2.65 ± 2.99	2.65 ± 2.41	3.31 ± 1.61	4.65 ± 1.03
	31.3	2.98 ± 3.01	3.65 ± 3.65	3.97 ± 3.56	3.99 ± 2.51
Tamoxifen	62.5	4.24 ± 3.87	4.64 ± 2.05	8.26 ± 3.17	3.99 ± 2.82
	125	1.99 ± 1.26	4.30 ± 2.33	5.30 ± 2.42	5.18 ± 1.09
	250	4.65 ± 1.63	5.18 ± 3.02	5.70 ± 3.50	2.39 ± 1.67
ENU	40	5.96 ± 1.98	36.41 ± 15.3	72.85 ± 10.01	89.56 ± 16.35

表2 末梢血を用いたPIGRET法の測定結果

Treatment	Dose (mg/kg)	Mutation Frequencies of <i>pig-a</i> ( $\times 10^{-6}$ )			
		Pre.	7 day	14 day	28 day
Control		0.33 ± 0.82	0.66 ± 1.03	0.33 ± 0.81	0.67 ± 1.03
	31.3	0.33 ± 0.82	0.66 ± 1.03	0.66 ± 1.63	0.33 ± 0.81
Tamoxifen	62.5	1.00 ± 1.67	1.99 ± 2.18	0.67 ± 1.03	1.00 ± 1.67
	125	0.67 ± 1.03	0.00 ± 0.00	1.00 ± 1.67	0.40 ± 0.89
	250	0.33 ± 0.82	0.64 ± 1.42	0.4 ± 0.89	0.00 ± 0.00
ENU	40	0.00 ± 0.00	215.36 ± 3.54	236.58 ± 66.67	201.88 ± 35.38

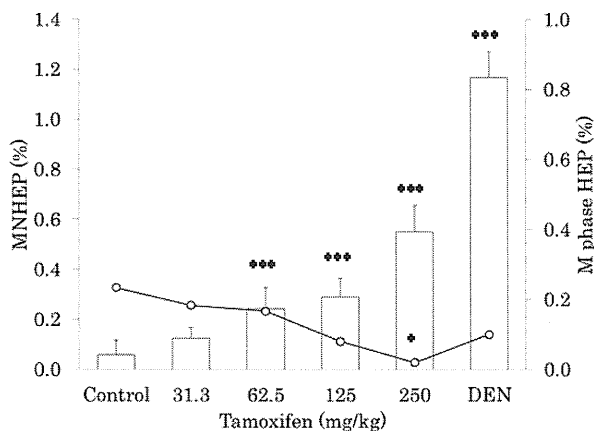


図4 肝臓の分裂中期細胞比率と小核試験

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 医薬品遺伝毒性評価に用いる効率的な *in vivo* 試験の組合せ研究

担当責任者 サントリービジネスエキスパート株式会社 安全性科学センター 堀 妃佐子

DMH を用いた F344 系統 *gpt delta* ラット突然変異試験と  
小核試験（末梢血、骨髄、肝臓、大腸）の統合法の検討

研究要旨 ラット結腸発がん物質である DMH を *gpt delta* 雄ラットに 5, 10 mg/kg/day で 28 日間強制経口投与し、最終投与翌日（day29）および 3 日後（day31）に採取した骨髄、肝臓、大腸において、*gpt* アッセイおよび小核試験を実施したところ、肝臓、大腸において点突然変異体頻度および小核誘発頻度の増加が確認できたが、骨髄では認められなかった。投与期間中および day29, 31 に採取した末梢血では小核の誘発は認められなかった。以上のことから、DMH による突然変異および小核の誘発は共通した臓器特異性を示すこと、標的臓器および肝臓での評価が有用であることが示唆された。

研究協力者

田中康浩 サントリービジネスエキスパート株式会社 安全性科学センター

堤絵梨 サントリービジネスエキスパート株式会社 安全性科学センター

百南綾華 サントリービジネスエキスパート株式会社 安全性科学センター

増村健一 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 室長

藤居亙 サントリービジネスエキスパート株式会社 安全性科学センター シニアスペシャリスト

北川義徳 サントリービジネスエキスパート株式会社 安全性科学センター 部長

H24 年に改訂された ICH S2(R1) 「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」において、遺伝毒性試験の標準的組み合わせとして、従来からの組み合わせ（オプション 1: 2 種の *in vitro* 試験 + *in vivo* 小核試験）に加え、細菌を用いる復帰突然変異試験と 2 種類の異なる組織における *in vivo* 遺伝毒性試験の組み合わせ（オプション 2）が追加された。*In vivo* 試験はこれまでに多数開発されてきているが、各試験のエンドポイント、選択する臓器や臓器のサンプリング時期等の試験条件によって結果が異なることより、被験物質の薬物動態、曝露経路等を考慮し、見逃しを極力抑えた最適な組み合わせを選択することが重要となる。

*In vivo* 遺伝毒性試験の一つであるトランスジェニック動物 (Tg) を用いた突然変異試験は、

A. 研究目的

H23年にOECDガイダンスとして採択された手法である。ICH S2(R1)のオプション2において2種類の *in vivo* 試験を実施することに対し、動物愛護の観点からは一般毒性試験への遺伝毒性試験の組み込みや、同一の動物を用いて2種類の *in vivo* 遺伝毒性試験を実施することも考慮していく必要があると考える。Tg動物を用いた突然変異評価系は多臓器で実施できること、エンドポイントが最も発がんとの関連があるとされる突然変異であることにその有用性があることから、本試験法に他のエンドポイントを組み合わせた統合型の毒性試験が可能となれば、オプション2における選択肢としての活用が期待される。但し、Tg動物の突然変異試験OECDガイドライン(TG488)において、組織のサンプリング時期は最終投与の3日後との記載があることから、TG488に従ったサンプリング時期が他の試験を統合した場合にも妥当であるかを考慮しておく必要がある。

我々はこれまでに、国内で樹立されたTg動物である *gpt delta* ラットを用いた突然変異評価系に小核試験(末梢血、骨髓、肝臓、大腸)を統合させた評価系において、benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P)の遺伝毒性が評価可能であること、更に統合の上で考慮すべき臓器サンプリング時期を検討し、28日間反復投与の最終投与翌日(day29)での評価が可能であることを確認している。今回は、ラット結腸発がん物質である1,2-dimethylhydrazine (DMH)を用いて統合法による評価を行うこととした。DMHは標準的菌株を用いたAmes試験では陰性結果が得られており、2種類の *in vivo* 試験で確実に捕捉可能な組み合わせを検討する上で興味深い物質である。更に標的臓器において小核試験が実施可

能であることから、標的臓器/非標的臓器における検出力の差異を確認しやすい物質として選択した。

## B. 研究方法

### 1) 試薬

被験物質である1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH) (CAS No. 306-37-6)は、東京化成工業より購入した。溶媒として用いた蒸留水は、株式会社大塚製薬工場より購入した。

### 2) 動物、被験物質投与および組織の採取

7週齢のF344系統 *gpt delta* 雄性ラットを日本エスエルシー株式会社より購入し実験に使用した。

被験物質は、ラット体重1kgあたり5mlの投与溶液を用時調製し、1群あたり5匹のラットに1日1回、28日間(day1-28)の強制経口投与を行った。DMHは蒸留水を溶媒とし、0(陰性対照)、5および10mg/kgの投与量となるように調製した。DMHの最高用量は、予備試験を行い28日間反復投与におけるMTDに相当すると考えられる10mg/kgとした。

突然変異試験および小核試験に使用する臓器(肝臓、大腸、骨髓)のサンプリングは、投与最終日の翌日(day29)および3日後(day31)の2条件を設定し、麻酔下で腹大動脈より採血した後に摘出し、-80℃で凍結保存した。

末梢血小核試験に使用する血液の採取は、投与前日(day0)、day4、15、29およびday31に実施した。day4以降の採血は、前日の投与から24時間後に実施した。

### 3) 末梢血小核試験

経時的に採取した末梢血中の小核を含む幼若赤血球 (MN-RET) は, *In vivo* Rat MicroFlow PLUS Kit (Litron Laboratories, Rochester, NY) を用い, キットの操作手順に従い測定した. フローサイトメーターは FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences) を使用した. MN-RET の出現頻度は, 1 検体あたり 2 万個の RET (幼若赤血球) を計測して算出した.

### 4) 点突然変異の検出

突然変異検出のための臓器は骨髄, 肝臓および大腸を選択した. 点突然変異体頻度は *gpt* アッセイ (6-チオグアニン (6-TG) セレクション) によって測定した. 各組織より抽出した DNA から *in vitro* パッケージングによって回収した  $\lambda$ EG10 ファージを, Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG6020 株に感染させ, 6-TG とクロラムフェニコールを含む M9 寒天培地で 37°C で培養した. 6-TG を含む寒天培地において生育したコロニーを, プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化した変異コロニーとして数を求めた. また, クロラムフェニコールのみを含む M9 寒天培地に生じたコロニー数から, 感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求めた. 変異コロニー数を形質転換コロニー数で除して点突然変異体頻度 (*gpt* mutant frequency (MF)) を算出した.

### 5) 骨髄小核試験

骨髄細胞は, 左右の大腿骨を摘出し両端を切断したものを先端に穴を空けた 1.5ml チューブに入れ, 15ml チューブにはめ込み遠心分離 (3,000×g, 3 分) することにより回収した.

ウシ胎児血清に懸濁した骨髄細胞懸濁液より塗末標本を作製し, アクリジンオレンジ (AO) 染色し, 蛍光顕微鏡にて観察し, 1 検体あたり 2,000 個の幼若赤血球中の小核を有する細胞の出現頻度 (% MN-RET) および 1 検体あたり 500 個の赤血球中の幼若赤血球の割合を求めた.

### 6) 肝臓小核試験

肝臓細胞は, 肝臓の外側左葉約 1g を剃刀にて 0.5~1 mm 幅程度にスライスし, コラゲナーゼ液 (100 U/mL, pH7.5) 中で 37°C, 1 時間インキュベート後, ピペッティングにより臓器片をほぐすことにより回収し, ホルマリンを加え固定した. 得られた肝細胞懸濁液を AO-DAPI 液で染色し, 蛍光顕微鏡にて観察し, 1 検体あたり 2,000 細胞中の小核を有する細胞の出現頻度および分裂期の細胞の出現頻度を求めた.

### 7) 大腸 (結腸) 小核試験

大腸 (結腸) の一部を内腔を表にしてガラス棒に通した状態で, 1 mM EDTA-HBSS 中で 35°C, 30 分インキュベートすることで上皮細胞を回収し, ホルマリンを加え固定した. 得られた細胞懸濁液を AO-DAPI 液で染色し, 蛍光顕微鏡にて観察し, 1 検体あたり 2,000 細胞中の小核を有する細胞の出現頻度を求めた.

### 8) 病理組織学的検査

肝臓, 大腸の一部はホルマリン固定後 H. E. 染色標本を作製し, 病理組織学的検査を行った.

### 9) 統計解析

骨髄, 肝臓および大腸の小核の出現数については Kastenbaum と Bowman の統計学的方法を用

いて、陰性対照群を対照とし、DMH 群との間の検定を行った。その他の評価項目については、陰性対照群を対照とし、DMH 群について Bartlett 検定により等分散性を評価（危険率  $p < 0.05$ ）し、等分散の場合は Dunnett 型多重比較検定、非等分散の場合は Steel の検定を行った。

骨髄、肝臓、大腸の点突然変異および小核の誘発頻度については、同じ処理用量の異なるサンプリング日の 2 群間において Student の  $t$  検定を実施した。

#### <倫理面への配慮>

本実験は所属機関における動物実験委員会および組換え DNA 実験委員会の承認に基づき、動物実験および組換え DNA 実験の適正な実施に関する規定等を遵守して行った。

### C. 研究結果

#### 1) 点突然変異

DMH 投与により、*gpt* 変異体頻度の用量依存的かつ顕著な増加が大腸および肝臓で認められ、特に大腸で高頻度に検出された。骨髄では DMH 投与による影響は認められなかった。day29 と day31 における差異は、大腸の 5 mg/kg 群において day31 の方が有意に高値であったが、それ以外はいずれの臓器においても認められなかった（図 1a-c）。対照群（1 群）の肝臓で 1 例、高頻度の変異体増加（MF： $82.25 \times 10^{-6}$ ）が認められ、ランダムに選んだ変異体 10 コロニーについてシーケンス解析を実施した。その結果、いずれの変異コロニーも同一の変異（*gpt* 遺伝子 300 番目の T→A および 341 番目の G→T）が認められたため、clonal 変異の可能性が高い

として解析対象より除外した。

#### 2) 小核試験

小核誘発は大腸および肝臓で用量依存的かつ顕著な増加が認められたが、骨髄および末梢血においては認められなかった（図 2a-c、図 3a）。大腸の小核誘発頻度においてサンプリング日の差異は明確でなかったが、肝臓では day29 より day31 の方が顕著に高く、また分裂期細胞の増加が確認された（図 2d）。骨髄の赤血球中の幼若赤血球の割合に DMH による影響は認められなかった（図 2e）。末梢血における赤血球中の幼若赤血球の割合は、DMH 5 mg/kg 群ではサンプリング日によらず対照群との明らかな差異は認められず、10 mg/kg 群において day4 で低値、day15 から day31 は高値傾向を示した（図 3b）。

#### 3) 病理組織学的検査

病理組織学的検査において、肝臓の day29 の 10 mg/kg 投与群で全例に中心静脈域を結ぶ肝細胞の好酸性変化、同領域に単細胞壊死が散在性に軽度～中程度に認められた。また小葉中心性壊死が 2 例で認められた。day31 の 10 mg/kg 投与群では、好酸性変化の程度は day29 と比較して軽度であり、単細胞壊死の出現頻度は減少し、中心性壊死も認められなかった。さらに全例に周囲への圧排を伴う再生性の過形成が認められ、2 例には軽微ながら有糸分裂像の増加が確認された。大腸ではサンプリング日によらず、DMH 投与による顕著な影響は認められなかった。

### D. 考察

DMH を投与した Tg 動物の大腸、肝臓および骨

髓の小核試験において、F344 系統の非 Tg 雄ラットを用いて同じ条件下で処理した場合と同様の結果が得られた。従って、Tg 動物の試験に小核試験を組み込んだ統合法において、適切に小核試験が実施可能であることが示された。

*gpt* 突然変異体および小核誘発頻度の増加は、大腸および肝臓では顕著に認められたが、骨髄（小核においては骨髄および末梢血）では認められなかった。DMH は肝臓で代謝を受け、活性代謝物（Methylazoxymethanol）が抱合化された状態で存在し、腸管内に排出された後に腸内細菌により脱抱合されることが報告されており、今回の結果は DMH の体内動態とも合致するものと考えられた。

サンプリング日による *gpt* 変異体頻度の差異は認められなかったことから、OECD テストガイドラインに記載されている最終投与 3 日後（day31）に加え、他の試験との統合を考慮した最終投与翌日（day29）の設定にも問題がないことが、過去に検討した B[a]P と同様に、DMH においても確認できた。

一方、小核は肝臓において day31 で day29 より明らかに増加していた。分裂期細胞頻度および病理組織学的検査結果と併せて考えると、DMH の投与期間終了後に認められた細胞分裂の亢進が小核誘発頻度に反映した可能性が考えられた。突然変異試験は、投与後長期間休薬期間を設けた場合も安定した結果が得られることが明らかとなっているが、小核の出現時期にはピークが存在し、各臓器の細胞のターンオーバーの違いにより適切な評価のタイミングが異なっていること、更に被験物質による細胞毒性（細胞増殖亢進の程度）によっても出現時期のピークや小核誘発頻度が影響を受けること

が知られている。そのため、Tg 動物を用いた突然変異試験に小核試験を統合する場合には、臓器のサンプリング時期に留意する必要がある。DMH の場合は、肝臓において休薬期間を置くことで小核誘発頻度が上昇したが、過去に実施した B[a]P では休薬後の骨髄および末梢血の小核誘発頻度が低下した事例もある。肝臓の分裂期細胞の頻度、造血系組織の幼若赤血球の頻度、更に各組織の病理組織学的検査等を同時に評価することにより細胞増殖の変化を確認しておくことは、特に小核試験を統合する場合のサンプリング時期の妥当性を判断する上でも重要であると考えられた。今後、統合法における適切なサンプリングの時期を検討するには、更に物質を増やしてデータを蓄積する必要がある。

今回の結果より、DMH を Ames 試験と 2 種類の *in vivo* 試験の組み合わせ（オプション 2）で評価する場合に、*in vivo* 試験における評価対象臓器は、発がん標的臓器である大腸に加え、肝臓でも DMH の遺伝毒性は捕捉可能であることが確認された。DMH の骨髄小核試験は短期（単回、2 回）投与において陽性および陰性の両方の結果が報告されており、陽性結果であっても小核の出現頻度は高いものではない。今回実施した 28 日間反復投与においても小核誘発は認められず、骨髄は大腸や肝臓と比較すると DMH の遺伝毒性を検出するのに適した組織ではないものと考えられた。遺伝毒性、発がん性が未知の化合物を評価する場合は、DMH のように標準的な骨髄小核試験における評価が難しい可能性を想定し、第 2 の *in vivo* 試験として複数のエンドポイントや臓器を選択しておくことが見逃しのない評価に繋がるのが考えられ

た. このような場合に, 同一の動物で複数の評価が実施可能な統合法を採用できれば動物愛護の観点からも望ましく, その有用性が期待される.

#### E. 結論

ラット結腸発がん物質である DMH を *gpt delta* 雄ラットに 5, 10 mg/kg/day で 28 日間強制経口投与し, 最終投与翌日 (day29) および 3 日後 (day31) に採取した骨髄, 肝臓, 大腸において, *gpt* アッセイおよび小核試験を実施したところ, 肝臓, 大腸において点突然変異体頻度および小核誘発頻度の増加が確認できたが, 骨髄では認められなかった. 投与期間中および day29, 31 に採取した末梢血では小核の誘発は認められなかった. 以上のことから, DMH による突然変異および小核の誘発は共通した臓器特異性を示し, 標的臓器および肝臓での評価が有用であることが示唆された.

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表等

論文発表等

なし

学会発表等

5) 堀妃佐子, 田中康浩, 堤絵梨, 百南綾華,

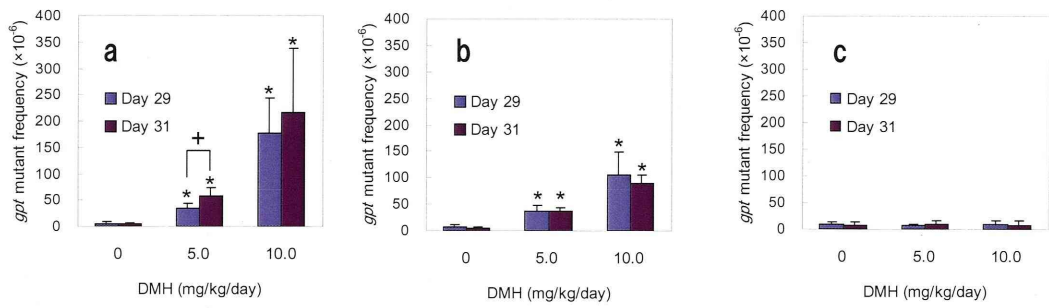
増村健一, 山田雅巳, 藤居亙, 北川義徳,  
DMH を用いた F344 系統 *gpt delta* ラット  
突然変異試験と小核試験 (末梢血, 骨髄,  
肝臓, 大腸) の統合法の検討, 日本環境変  
異原学会第 43 回大会, 東京 (2014. 12)

報道発表等

なし

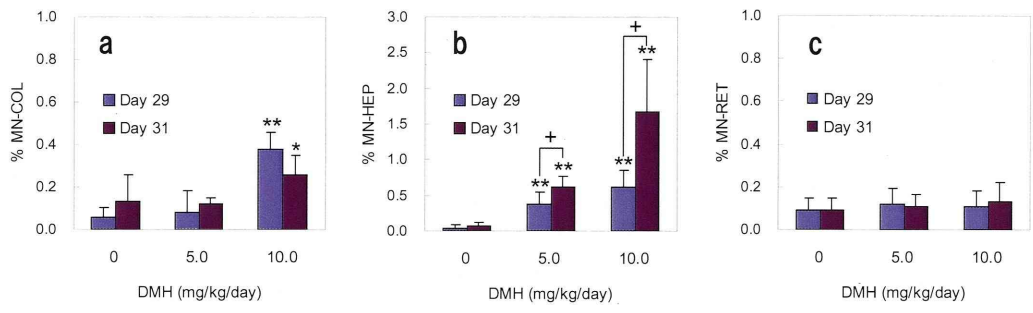
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

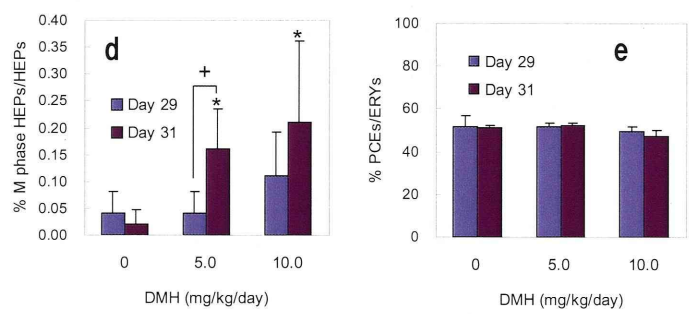


\*:  $p < 0.05$  vs control at the same sampling time (Dunnnett or Steel test)  
 +:  $p < 0.05$  day29 vs day31 at the same dose (Student t-test)

図1 *gpt* アッセイ a: 大腸, b: 肝臓, c: 骨髄



\*\*\*:  $p < 0.05, 0.01$  vs control at the same sampling time (Kastenbaum & Bowman Method)  
 +:  $p < 0.05$  day29 vs day31 at the same dose (Student t-test)



\*:  $p < 0.05$  vs control at the same sampling time (Dunnnett or Steel test)  
 +:  $p < 0.05$  day29 vs day31 at the same dose (Student t-test)

図2 小核誘発頻度 a: 大腸, b: 肝臓, c: 骨髄  
 d: 分裂細胞頻度(肝臓), e: 幼若赤血球頻度(骨髄)

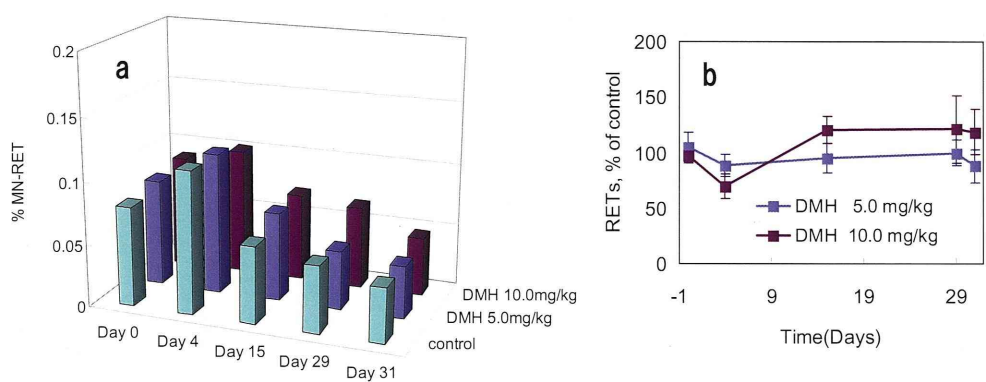


図3 末梢血小核試験 a: 小核誘発頻度, b: 幼若赤血球頻度(対照群比)



## II. 学会等発表実績

### 論文発表等

なし

### 学会発表等

- 1) 堀妃佐子, 田中康浩, 堤絵梨, 百南綾華, 増村健一, 山田雅巳, 藤居互, 北川義徳 : DMH を用いた F344 系統 *gpt delta* ラット突然変異試験と小核試験 (末梢血、骨髄、肝臓、大腸) の統合法の検討. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014. 12、東京) .
- 2) 山田雅巳, 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 千蔵さつき, 伊東悟, 武藤重治, 宇野芳文, 真田尚和, 高島理恵, 志賀野美幸, 高沢博修, 濱田修一, 山本美佳, 堀妃佐子, 堤絵梨, 和田邦生, 前田晃央, 小坂瑞樹, 木村葵, 菊月隆太, 荻原庸介, 京谷恭弘, 足立秀樹, 上松泰明, 吉田唯真, 成見香瑞範, 福田隆之, 鈴木裕太, 後藤玄, 森田健, 本間正充 : *Pig-a*/PIGRET アッセイに関する短期試験への有用性 : MMS 共同研究報告. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014. 12、東京) .
- 3) 須井哉, 川上久美子, 根岸沙記, 増渕恵美, 園原啓太, 山田雅巳 : ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討 9. 日本環境変異原学会第 43 回大会 (2014. 12、東京) .
- 4) Yamada M, Takamune M, Matsuda T. : Novel mutation assay with non-selective protocol using a next-generation DNA sequencer. 4th Asian Conference for Environmental Mutagen Society (2014. 12、Kolkata、India).



201433008A (4/7)

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）

医薬品・医療機器の実用化促進のための  
評価技術手法の戦略的開発  
(H26-創薬-一般-008)

平成26年度 委託業務成果報告書  
第4/7分冊 研究分担報告書

テーマ2-1 新規培養細胞株を用いたインフュージョン反応  
惹起性の評価法開発

担当責任者：中村亮介 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部  
担当責任者：森田栄伸 島根大学医学部皮膚科学教室

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）による委託業務として、国立医薬品食品衛生研究所（斎藤嘉朗）が実施した平成26年度「医薬品・医療機器の実用化促進のための評価技術手法の戦略的開発」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

### I. 委託業務成果報告（業務項目）

テーマ総括、新規細胞系等を用いた評価法の開発・・・・・・・・・・ 1  
中村 亮介（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）

アレルギー患者血清および臨床情報の収集・・・・・・・・・・ 15  
森田 栄神（島根大学医学部皮膚科学教室）

### II. 学会等発表実績

中村 亮介・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

森田 栄神・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21

III. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）  
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 新規培養細胞株を用いたインフュージョン反応惹起性の評価法開発

担当責任者 中村 亮介 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 第3室長

テーマ総括、新規細胞系等を用いた評価法の開発

研究要旨 インフュージョン（IF）反応は薬剤投与中または投与開始後 24 時間以内に現れる症状の総称であり、抗体医薬品等のバイオリジクス医薬品で多く発生することが知られている。IF 反応を医薬品開発段階で予測する適切な *in vitro* 試験系はまだ存在せず、医薬品開発を阻害する要因の一つとなっている。そのメカニズムの少なくとも一部は IgE 依存的であり、牛肉等のアレルゲン上の特殊な糖鎖構造（ $\alpha$ -Gal）に対する IgE がキメラ抗体であるセツキシマブ上の  $\alpha$ -Gal と交差反応していることが示された。本研究では、ヒト化培養マスト細胞株を用いる IgE の架橋活性を測定する試験法（EXiLE 法）を中心とする独自の技術により、牛肉アレルギー患者血清中 IgE とセツキシマブ等の結合性が実際に IgE の架橋を誘導できるかを調べ、IgE 依存的な IF 反応の *in vitro* 予測系を確立することを目的としている。本年度は、分担研究者による患者血清の収集を続けると共に、卵白アルブミン等のモデル抗原を用いて EXiLE 法の条件検討を行なうとともに、IgE の結合性と架橋活性とは必ずしも一致しないことを示した。次年度以降の解析に向けて、島根大学医学部の分担研究者より、インフォームド・コンセントのもと牛肉アレルギー患者血清をまず 5 検体入手した。また、ヒト単球様培養細胞株の樹状細胞様細胞への分化条件の検討を行ない、各種マーカー抗原の発現により分化を確認した。

研究協力者

土屋敏行 MeijiSeika ファルマ株式会社医薬  
研究所 安全性研究室 室長  
打田光宏 MeijiSeika ファルマ株式会社医薬  
研究所 安全性研究室 研究員  
若林 翼 MeijiSeika ファルマ株式会社医薬  
研究所 安全性研究室 研究員  
黒瀬光一 東京海洋大学 食品保全機能学講  
座 教授  
藤波宏治 鳥居薬品株式会社研究所 次長  
岡本好海 国立医薬品食品衛生研究所 医薬  
安全科学部 研究官

A. 研究目的

インフュージョン（IF）反応は薬剤投与中または投与開始後 24 時間以内に現れる症状の総称であり、抗体医薬品などで多いことが知られている。そのメカニズムには不明な点が多いが、少なくとも IgE 依存性のものと非依存性のものがあることが最近知られるようになってきた。

IgE 依存性の IF 反応のうち有名なものは、2008 年に Chung らが明らかにしたセツキシマブ（商品名アービタックス）によるものである<sup>1)</sup>。セツキシマブは、上皮細胞増殖因子受容体（epidermal growth factor receptor；

EGFR) 特異的なヒト・マウスのキメラ IgG1 抗体である (図 1)<sup>2-4)</sup>。Chung らは、米国東南部においてセツキシマブによる IF 反応が多発していること、セツキシマブの投与歴にかかわらず、同地域ではセツキシマブ特異的 IgE 抗体価が高いこと、および、これらの IgE の認識抗原はセツキシマブ上の糖鎖 (galactose- $\alpha$ 1,3-galactose ;  $\alpha$ -Gal) であることを報告した<sup>1)</sup>。その後、2009 年には、Commins らが、牛肉等の獣肉によるアレルギー発症者の分布がセツキシマブアレルギー患者の分布と一致し、これはさらにロッキー山紅斑熱を引き起こす吸血ダニ (Amblyomma) の分布とも一致すること、そして、これら牛肉アレルギー患者血清中 IgE の抗原はやはり  $\alpha$ -Gal であることを示した<sup>5,6)</sup>。

一方日本では、以前より島根県で牛肉アレルギーが多発することが知られていた<sup>7-9)</sup>。分担研究者の森田らは、島根県が日本紅斑熱の多発地帯でもあることに注目し、これら牛肉アレルギー患者血清中 IgE が  $\alpha$ -Gal を介してセツキシマブを認識する可能性について検討を開始していた。

しかし、これら先行研究において示されたのは、あくまでも獣肉アレルギー患者血清中の  $\alpha$ -Gal 特異的 IgE がセツキシマブと交差反応 (結合) することのみである。アレルギー反応のコンダクターといわれるマスト細胞の活性化を誘導するには、IgE が特異抗原と結合するのみでは不十分で、その細胞表面の高親和性 IgE 受容体 (Fc  $\epsilon$  RI) が多価抗原によって架橋されなくてはならない<sup>10)</sup>。

担当責任者の中村らは、以前より、ヒト化培養ラットマスト細胞株 (RS-ATL8 細胞) を用いた全く新しい細胞ベースの *in vitro* アレルギー試験法の開発に取り組んでいた<sup>11,12)</sup>。これは、ヒト Fc  $\epsilon$  RI を発現するラット培養マスト細胞株 (RBL-SX38 細胞) に、

転写因子 NF-AT 依存的にホタルルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を組み込んだ細胞株で、同細胞をアレルギー患者血清中の IgE で感作すると、特異抗原の添加に伴う Fc  $\epsilon$  RI の架橋に基づくマスト細胞の活性化をルシフェラーゼアッセイにより簡便かつ高感度に測定する手法である。中村らは、この手法を「IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression (EXiLE) 法」と名づけた (図 2)<sup>11)</sup>。同手法は、「I 型アレルギーの検査方法」として国立医薬品食品衛生研究所より特許登録されている (特許第 5386691 号)。

本研究では、IF 反応の原因となり得るアレルギー患者血清中 IgE の抗体医薬品等との交差反応性を評価するため、牛肉アレルギーを含む多種類のアレルギーの患者血清を用い、EXiLE 法等の培養細胞の活性化を指標とする独自の手法により抗原と血清中 IgE の反応性を評価する系を構築することを最大の目的としている。

今年度は、分担研究者の森田らによる牛肉アレルギー患者血清の収集を待つ間、MeijiSeika ファルマの協力研究者らとともに、RS-ATL8 細胞の営利企業への技術移転を行なうための種々の調整と、各種モデル抗原を用いた本手法の特徴と信頼性の評価を行なった。

その一方で、IF 反応には IgE 非依存性のものであることを考慮し、バイオロジクス医薬品のアレルギー性を検出するための培養細胞を用いた試験系の構築にも取り組んだ。アレルギーの発症の第一段階は T 細胞の感作である。その初期にはアレルギーによる樹状細胞の活性化のステップがあることから、本年度はヒト単球様培養細胞株から樹状細胞様細胞への分化技術の確立を目的とした。

## B. 研究方法

### B. 1. RS-ATL8 細胞の維持

RS-ATL8 細胞は、既報の通りに培養を行った<sup>12-14)</sup>。すなわち、10%の非働化ウシ胎児血清を含む MEM 培地に GlutaMAX-I、Penicillin-Streptomycin、500  $\mu$ g/ml Geneticin、200  $\mu$ g/ml Hygromycin B を添加した培地中で、37°Cの5% CO<sub>2</sub>インキュベータで培養した。継代は1週間毎にセルスクレイパーにより20倍希釈で行なった。

### B. 2. 試薬

2種の抗OVAマウスモノクローナルIgE抗体(E-C1, E-G5)はChondrex社より購入した。ONE-GloはPromega社より購入した。陰性対照として、抗trinitrophenylマウスモノクローナルIgE抗体をBD Pharmingen社より購入した。

### B. 3. OVA 抗原の調製

OVAはSigmaより購入した。これをPBSを用いて1 mg/mlに溶解し、ヒートブロックを用いて90°Cに3分間および15分間加熱し、氷中に急冷した。

### B. 4. ELISA

OVAを50 mMの炭酸バッファー(pH9.6)で100  $\mu$ g/mlに希釈し、ポリスチレン性マイクロプレート(Corning)に50  $\mu$ l/well加え、4°Cで一晩吸着させた翌日、Tween 20を0.05%加えたPBSで3回洗浄後、Casein(Calbiochem)によりブロッキングを行なった。その後、2種の抗OVAマウスモノクローナルIgE抗体(E-C1, E-G5)を室温で2時間加え、洗浄後、HRP標識抗マウスIgE抗体とTMB試薬により結合性を検出した。

### B. 5. EXiLE 法

RS-ATL8細胞を96ウェルプレートに $5 \times 10^4$  cells/50  $\mu$ lずつ播種し、100倍希釈した患者血清または10 ng/mlの抗OVAマウスモノクローナルIgE抗体(E-C1, E-G5)を添加し

て終夜培養した。滅菌PBSによりウェルを洗浄後、10%の非働化ウシ胎児血清を含むMEM培地に懸濁した抗原溶液で3時間細胞を刺激し、One-Gloを添加して発光量をEnVision(PerkinElmer)により測定した。細胞の活性化は、抗原未刺激時の発光量を1とする相対値で表し、2倍をカットオフとした。

### B. 6. EXiLE 法の技術移転

RS-ATL8細胞の営利企業における使用にあたっては、その親株であるRBL-SX38細胞の権利者である、Harvard大学Beth Israel Deaconess Medical Center(BIDMC)との調整が必要であった。今回、本研究のためのRS-ATL8細胞の使用についてBIDMCに問題がないことを確認した上で、RS-ATL8細胞の授受を行なった。また、EXiLE法の技術習得のため、国立医薬品食品衛生研究所において、MeijiSeikaファルマ株式会社および鳥居薬品株式会社の協力研究者への講習および実験見学を行なった。

### B. 7. 樹状細胞様細胞株の分化

ヒト単球様細胞株THP-1細胞(ATCC TIB202, American Type Culture Collectionより購入)の培養は、RPMI 1640培地に終濃度10% foetal bovine serum、50 mM 2-mercaptoethanol、50 U/mL Penicillin、50  $\mu$ g/mL Streptomycinをそれぞれ添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub>、飽和湿度で培養した。樹状細胞様細胞への分化誘導は、Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)およびInterleukin-4(IL-4)をそれぞれ終濃度20 ng/mLでTHP-1細胞に曝露し、72時間培養することにより行った<sup>15)</sup>。その後、total RNAを抽出した。THP-1細胞から樹状細胞様細胞への分化状態の評価は、形態観察および単球マーカーであるCD14、樹状細胞マーカーであるCD11c、CD209(DC-SIGN)の発現量の変動をreal time RT-PCR法による比較定量法



(薬剤処理の有無におけるターゲット遺伝子の発現量を相対的に比較する方法)を用いて解析することにより行った。リファレンス遺伝子として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。

#### <倫理面への配慮>

本研究では、島根大学医学部においてインフォームド・コンセントのもと採取・匿名化されたアレルギー患者血清を用いることから、研究内容は国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会によって審査され、承認されている(受付番号 246)。また、島根大学より供与される血清を用いて分担して研究を実施する MeijiSeika ファルマ株式会社医薬品研究所においても、同様の研究倫理審査を行い、承認を得た。EXiLE 法の技術移転にあたり、鳥居薬品株式会社においても研究倫理承認を得た。

### C. 研究結果

#### C.1. 加熱 OVA への特異的 IgE の結合性変化

OVA は加熱により凝固・変性することがよく知られている。ELISA により、2 種の抗 OVA モノクローナル IgE 抗体 (E-C1, E-G5) の OVA への結合性が、加熱時間によりどのように変化するかを調べた(図 3)。なお、本条件下では、加熱 OVA 溶液に白濁やゲル化などの目視可能な変化は認められなかった。

両 IgE には、E-C1 が OVA によるマスト細胞の脱顆粒反応を誘導でき、E-G5 ができないという違いがあるが、非加熱 OVA に対しては、やはり E-C1 抗体の方が結合量が多いという結果になった。また、E-C1 抗体の結合性は、OVA の加熱の有無にはほとんど影響を受けなかった。

一方、E-G5 抗体の結合性はもともと低いが、OVA の加熱後は、時間に応じてさらに結合性

が弱まっていくことが分かった。

#### C.2. 加熱 OVA による IgE 架橋活性

次に、EXiLE 法を用いて、両抗体の加熱 OVA による架橋活性を調べた(図 4)。すると、E-C1 は、既報の通り非加熱 OVA により顕著なルシフェラーゼ発現が誘導された。おどろくべきことに、IgE の結合性は加熱によってほとんど変化がなかったにもかかわらず、活性化誘導能は加熱に伴い著明に更新し、加熱 3 分ですでに活性化の目安となる無刺激時の 2 倍以上のルシフェラーゼ発現が認められた。加熱 15 分後には、用量応答曲線はさらに低濃度側へシフトし、より低濃度でより高い応答が観察された。

一方、E-G5 抗体は、既報の通り、OVA 添加によるマスト細胞の活性化を誘導しなかった。OVA への結合性自体は ELISA により認められているにもかかわらずである。

#### C.3. 樹状細胞への分化誘導(形態的变化)

バイオリジクス医薬品の感作性を培養樹状細胞を用いて *in vitro* で予測するため、ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞を樹状細胞様へと分化させることを試みた。THP-1 細胞を PMA・IL-4 によって 72 時間処理することにより、樹状突起を有する細胞へと分化させることができた。図 5 A に処理前、図 5 B に処理後の細胞を示した。

#### C.4. 樹状細胞マーカーの発現上昇

THP-1 細胞の PMA・IL-4 処理により、単球マーカーである CD14、樹状細胞マーカーである CD11c および CD209 (DC-SIGN) が、どのように発現変動するのかを RT-PCR 法により解析した。図 6 に示したように、PMA・IL-4 処理前と比較して、CD209 と CD11c はそれぞれ 82.1 倍、8.6 倍の発現上昇がみられた。CD14 には変化がなかった。

#### C.5. 牛肉アレルギー患者血清の受領

分担研究者の森田栄伸教授(島根大学医学

部皮膚科学教室)より、同科において牛肉アレルギーと診断された患者から、インフォームド・コンセントのもと採取した血清を、今年度はまず5検体(各 500  $\mu$ l)受領した。これを 100  $\mu$ l ずつ小分けして、-80°Cのディープフリーザーにて保管した。

## D. 考察

### D.1. 加熱 OVA への特異的 IgE の結合性変化

E-C1 の結合性が加熱時間に関係なく一定であったことは、この IgE 抗体のエピトープが耐熱性であることを示唆している。最近、Chondrex より E-C1 および E-G5 抗体のエピトープが公開された<sup>16,17)</sup>。これによると、E-C1 抗体のエピトープは OVA の 61-68 残基目に当たる DKLPFGFD、E-G5 のエピトープは 363-374 残基目に当たる HPFLFCIKHIAT であるとされている(図 7)。今回の結果は、OVA の 61-68 残基目にあたる領域は、少なくとも 90°C、15 分間の加熱ではほぼ未変性の状態が保たれるであろうことを示唆している。一方、363-374 残基目を含む OVA の C 末端に近い領域は、加熱とともに抗体の結合性が減弱したことから、化学的な変化あるいはコンフォメーション的な変化により、IgE がアクセスしづらくなったものと思われる。ただし、この領域は本来 OVA タンパク質の内側に存在すると考えられており(図 7)、E-G5 抗体がどのようにしてこの領域を認識しているかについては不明である。

なお、キメラ IgG1 抗体であるセツキシマブの場合、 $\alpha$ -Gal の修飾部位は Fab 領域にある 88 残基目のアスパラギンであることがわかっている<sup>18)</sup>。IgG の場合 Fab 領域は柔軟性に富むヒンジ領域を介して二量体を形成しているため、抗体のアクセシビリティが代謝等により変化する可能性は想定しにくいと思われる。しかし、体内に共存するであ

う  $\alpha$ -Gal 特異的 IgG 等の影響は考慮する必要があるかもしれない。

### D.2. 加熱 OVA による IgE 架橋活性

EXiLE 法を用いて両抗体の加熱 OVA による架橋活性を調べたところ、E-C1 抗体の応答性は、OVA の加熱時間に応じて増大した(図 4 A)。上述のように E-C1 のエピトープは加熱にともなって変化しないと考えると、この結果は、加熱により OVA 分子が凝固・高分子量化し、これにより一分子あたりのエピトープの価数が上昇し、これが IgE の架橋活性を増大させた可能性が考えられる。

なお、モノクローナル抗体である E-C1 抗体が IgE の架橋を誘導できるのは一見奇妙に思えるが、OVA の一部は溶液中でホモダイマーを形成しているという報告があり<sup>19)</sup>、このために OVA は見かけ上二価のエピトープを持つ抗原として機能したものと考えられる。図 6 に示す OVA の結晶構造からも、E-C1 のエピトープの位置は OVA の二量体の両端に突出しており、これは 2 つの IgE 分子が同時に結合することを可能にするものと思われる。むしろ、溶液中での OVA の構造が結晶構造と同一である保証はないが、上記結果との整合性は高い。このような、溶液中における抗原分子のエピトープの価数の変化は、今後  $\alpha$ -Gal の反応性を考慮する上でも非常に重要であると考えられる。

一方の E-G5 抗体は、OVA 分子と明らかに結合するにもかかわらず、EXiLE 法では陰性となった(図 4 B)。これは従来の見解と一致するが、そのメカニズムは不明である。いずれにせよ、IgE の抗原への結合性と架橋活性とは別の現象であるということが改めて強調されたといえるであろう。これまで、セツキシマブや牛肉抗原上の  $\alpha$ -Gal と患者血清中 IgE が結合することは、分担研究者らを含め多くのグループにより示されてきたが、こ

の結合性が果たして IgE を架橋するのに十分であるかどうかについて、今後牛肉アレルギー患者血清を用いた解析を進めていく。

#### D.3. 樹状細胞への分化誘導

PMA・IL-4 処理により、1) 樹状突起を有する樹状細胞様細胞に分化したこと、2) 樹状細胞マーカーの発現上昇がみられたことから、単球様細胞から樹状細胞様細胞への分化に成功したと考えられる。このことは、予備的実験であるためデータには示していないが、T 細胞への抗原提示における補助刺激分子である CD86 (樹状細胞で高発現している) の発現上昇がみられたことから支持される。一方、単球マーカーである CD14 の発現量には変化がなく、これは、樹状細胞の成熟化が進んでいない (抗原を取り込む前の状態である) ことを意味するものと考えられる。

#### E. 結論

セツキシマブによる IF 反応において問題とされる  $\alpha$ -Gal 特異的 IgE の臨床的意義を評価する上では、IgE の固相抗原への結合性を調べるのみでは不十分であり、ヒト化マスト細胞株などを用いた、IgE の架橋活性に基づく試験法の開発が有効であろうことが、モデル抗原を用いた試験により示唆された。

今後、分担研究者が遂行している牛肉アレルギー患者血清の収集を待ち、患者血清中 IgE の架橋活性を評価していく。

また、THP-1 細胞を PMA および IL-4 存在下で 72 時間培養することにより、単球様細胞から樹状細胞様細胞へ分化させることが可能となった。今後、この細胞系を用いたバイオリクス医薬品の感作性試験の開発に取り組む。

#### (参考文献)

1) Chung CH, et al. N Engl J Med. 358:

1109-1117 (2008).

2) Saltz LB, et al. J Clin Oncol. 22: 1201-1208 (2004).

3) Bonner JA, et al. N Engl J Med. 354: 567-578 (2006).

4) Chung KY, et al. J Clin Oncol. 23: 1803-1810 (2005).

5) Commins SP, et al. J Allergy Clin Immunol. 123: 426-433 (2009).

6) Commins SP, et al. J Allergy Clin Immunol. 124: 652-657 (2009).

7) 千貫祐子, 他. 日皮会誌. 123: 1807-1814 (2013).

8) 千貫祐子, 他. 静脈経腸栄養. 28: 615-618 (2013).

9) 千貫祐子, 他. 日皮会誌. 123: 2693-2695 (2013).

10) Kinet JP, Annu Rev Immunol. 17: 931-972 (1999).

11) Nakamura R, et al. Allergy, 65: 1266-1273 (2010).

12) Nakamura R, et al. Allergol Int. 61: 431-437 (2012).

13) Nakamura R, et al. J Allergy Clin Immunol. 132: 1436-1438 (2013).

14) Nakamura R, et al. Int Arch Allergy Immunol. 160: 259-64 (2013).

15) Katayama S, et al. Food Chem. 138: 757-761 (2013).

16) <http://www.chondrex.com/documents/7091.pdf>

17) <http://www.chondrex.com/documents/7092.pdf>

18) Qian J, et al. Anal Biochem. 364: 8-18 (2007).

19) Ianeselli L, et al. J Phys Chem B. 114: 3776-3783 (2010).

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表等

### 論文発表等

- 1) Iwamoto S, Yonekawa T, Azuma E, Fujisawa T, Nagao M, Shimada E, Nakamura R, Teshima R, Ohishi K, Toyoda H, Komada Y. Anaphylactic transfusion reaction in homozygous haptoglobin deficiency detected by CD203c expression on basophils. *Pediatr Blood Cancer*. 61: 1160-1161 (2014).
- 2) Wan D, Wang X, Nakamura R, Alcocer MJC, Falcone FH. Use of Humanized Rat Basophil Leukemia (RBL) Reporter Systems for Detection of Allergen-Specific IgE Sensitization in Human Serum. *Basophils and Mast Cells : Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 1192: 177-184 (2014).
- 3) Wan D, Ludolf F, Alanine DG, Stretton O, Ali Ali E, Al-Barwary N, Wang X, Doenhoff MJ, Mari A, Fitzsimmons CM, Dunne DW, Nakamura R, Oliveira GC, Alcocer MJ, Falcone FH. Use of Humanised Rat Basophilic Leukaemia Cell Line RS-ATL8 for the Assessment of Allergenicity of *Schistosoma mansoni* Proteins. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e3124. 1

### 学会発表等

- 1) Nakamura R, Kaniwa N, Ueta M, Sotozono C, Sugiyama E, Maekawa K, Yagami A, Matsukura S, Ikezawa Z, Matsunaga K, Tokunaga K, Aihara M, Kinoshita S,

Saito Y : HLA association with anti-pyretic analgesics-induced Stevens-Johnson syndrome / toxic epidermal necrolysis with severe ocular surface complications in Japanese patients. Drug Hypersensitivity Meeting (DHM) 2014 (2014. 4, Bern, Switzerland).

- 2) Nakamura R : Biomarkers for risk of SJS/TEN in Japanese compared to other populations. Drug - Induced Injury of Liver, Heart, Kidney, and Skin: Employing Recent Advanced to Improve Patient Safety and Speed Up the Pipeline. (2014. 5, North Bethesda, MD, USA).
- 3) 木戸 博, 亀村典生, 中村亮介, 手島玲子, 深尾敏幸 : 臍帯血の抗原特異的低親和性 IgE 検出と, 生後 6, 14 ヶ月の高親和性 IgE への変化. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2014. 5, 京都).
- 4) 中村亮介 : 培養細胞を用いるアレルギー試験「EXiLE 法」の開発. 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014. 7, 神戸).
- 5) Sakai S, Nakamura R, Adachi R, Fukutomi Y, Saito Y, Nishimaki-Mogami T, Teshima R. : Experimental assessments of the cross-reactivity of IgE from patients sensitized with acid-hydrolysed wheat protein in a cosmetic soap. Food Allergy and Anaphylaxis Meeting (FAAM) 2014 (2014. 10, Dublin, Ireland).
- 6) 亀村典生, 川本典生, 中村亮介, 手島玲子, 下条直樹, 深尾敏幸, 木戸 博 : 新規蛋白チップによる臍帯血特異的 IgE の検出と、離乳完了期までに見られる IgE 抗体の低親和性から高親和性への変化.