

皮膚感作性試験における有害性発現経路に基づいた動物実験代替法の構築

著者	宮? 洋
学位名	博士(理工学)
学位授与機関	甲南大学
学位授与年度	令和2年度(2020年度)
学位授与番号	34506乙第50号
URL	http://doi.org/10.14990/00003841

氏名・本籍	宮崎 洋 (奈良県)
学位の種類	博士 (理工学)
報告番号	乙第 50 号
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当者
論文題目	皮膚感作性試験における有害性発現経路に 基づいた動物実験代替法の構築
審査委員	(主査) 准教授 白井 健二 (副査) 教授 藤井 敏司 (副査) 教授 松井 淳 (副査) 教授 酒井 康行

(東京大学大学院工学系研究科)

論文内容の要旨

化学物質の皮膚感作性を正確かつ迅速に評価することが重要な課題となっている。従来、皮膚感作性は動物を用いて評価されてきたが、3R (Replacement、Reduction、Refinement) の原則が提言されて以降、有害性発現経路の各段階 (Key Event: KE) を模倣した *in vitro* 試験法での評価へと移行しつつある。しかし、既存の *in vitro* 試験法には、適用範囲が狭い点や予測精度が低い点などの課題が多数存在し、信頼性のある予測を行うためには複数の試験法を組み合わせることが必須となっている。さらに、既存の *in vitro* 試験法は、感作性の有無の予測のみに重点をおいており、詳細な強度やメカニズムといった情報が得られないため、研究・開発フェーズへの適用が難しい点も課題であった。このことは、アレルギーの発症を抑えつつ、化学物質の恩恵を享受できる未来社会の実現には大きな障壁となる。そこで、本論文では既存の皮膚感作性試験法の課題を克服した新規試験法を有害性発現経路の各イベントに対応する形で構築し、細胞レベルや分子レベルで簡便かつ詳細に感作性を測定できる分析法の確立を行った。

まず、動物を用いた皮膚感作性試験法 (LLNA:DAE) を用いて、10 種類の天然化合物の感作性を評価し、天然化合物に関する感作性の新たな知見を得た。次に、KE3 の樹状細胞の活性化に注目して、細胞を用いた *in vitro* 試験法にコラーゲンペトリゲル膜を組み合わせた試験法を構築し、従来の *in vitro* 試験法の課題であった難水溶性物質にも適用可能であることを示した。さらに、KE2 の表皮角化細胞での炎症応答への適用を目標に、外的因子に応答して構造を変化させ、それに伴って蛍

光応答も変化する人工金属タンパク質モデルを構築した。この知見により、細胞を用いずに分子レベルで感作性の評価を行うシステムが構築できる可能性を示した。最後に、タンパク質と感作性物質の最初期の結合（KE1）を模倣して、ペプチドをポリスチレン樹脂と磁性ビーズの2種類の固相担体に担持させた新規試験法を確立し、その有用性を実証した。さらに、分光光度法による簡便評価法と質量分析による詳細解析法の2種類の評価手法を確立することで、適用範囲の広い汎用性のある測定法の構築に成功した。

以上より、既存の *in vitro* 試験法の課題を克服した新規試験法の開発に成功した。また、ペプチドを利用することで、KE1 だけでなく KE2 まで模倣した試験法を構築できる可能性を見出し、これまで実現できなかったペプチドを用いた *in vitro* 試験法のみでの Replacement の実現が期待できることを示した。本論文で開発した試験法は、最終製品の評価から開発初期の研究段階での評価、また品質管理などのスクリーニングなど、化粧品分野のみならず医薬、化成品分野などへの適用が期待される。

審査結果の要旨

申請者は、既存の *in vitro* 皮膚感作性試験法の課題を克服した試験法を有害性発現経路の各イベント（KE1～3）に対応する形で考案し、細胞レベルや分子レベルで簡便かつ詳細に感作性を測定できる分析法を確立した。まず、動物を用いた皮膚感作性試験法（LLNA:DAE）を用いた天然化合物の感作性の評価を通して、現状の問題点の再確認を行った。次に、可能な限り動物実験を減らすため、KE1 から 3 に対応する既存の *in vitro* 試験法の課題点を克服し、より精度を上げつつ適用範囲を広げた試験法の開発を試みた。具体的には、KE3 に注目して細胞を用いた *in vitro* 試験法にコラーゲントリゲル膜を組み合わせた試験法を構築した。さらに、外的因子に応答する人工金属タンパク質モデルを構築し、分子レベルでの KE2 でのタンパク質の構造変化を蛍光応答に変換して測定する新規手法を提案した。最後に、タンパク質と感作性物質の最初期の結合（KE1）を模倣して、ペプチドを固相担体に担持させて利用する手法を確立し、既存の手法の様々な問題点が克服できることを実証した。さらに、分光光度法による簡便評価法と質量分析による詳細解析法の2種類の評価手法を確立することで、汎用性の高い評価システムの構築に成功している。以上は既存の *in vitro* 皮膚感作性試験法の問題点の多くを解決できる簡便かつ有効な手法であり、基礎科学的側面からも、感作性のない商品開発を指向した産業的側面からも多大なインパクトをもつ研究である。

これらの研究成果は、国際学術誌 7 編および総説 2 編として公表されている。また国際学会などでも数多く発表されており、国内外において高い評価を受けている。

令和 3 年 1 月 29 日、本学の学位規程に従い公開講演会を行い、本論文に関する説

明と質疑応答を行った。申請者の説明はきわめて明快であり、応答内容も十分満足できるものであった。

以上により、審査委員は本論文提出者（宮崎洋）の博士論文の審査、試験及び学力の認定を行った結果、本論文提出者が博士（理工学）の学位を授与せられるに充分なる資格をもつものであると認める。