

甲南大学 博士学位論文

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

甲南大学大学院

フロンティアサイエンス研究科 生命化学専攻

宮崎 洋

2021年2月

目次

第一章 序論

- 1.1. アレルギー疾患の現状とアレルゲン
- 1.2. 皮膚感作のメカニズム
- 1.3. 動物を用いた皮膚感作性試験法
- 1.4. OECD テストガイドラインに記載された *in vitro* 皮膚感作性試験法
- 1.5. 動物を用いた皮膚感作性試験法と *in vitro* 皮膚感作性試験法の課題
- 1.6. 本研究の目的と論文の構成
- 1.7. 参考文献

第二章 LLNA:DAE を用いた天然化合物の皮膚感作性評価

- 2.1. 緒言
- 2.2. 材料および方法
 - 2.2.1. 試験物質
 - 2.2.2. 使用動物
 - 2.2.3. LLNA:DAE の概要
 - 2.2.4. LLNA:DAE による天然化合物の皮膚感作性の評価
- 2.3. 結果および考察
 - 2.3.1. 濃度設定試験
 - 2.3.2. 天然化合物の皮膚感作性
- 2.4. 小括
- 2.5. 参考文献

第三章 コラーゲンビトリゲル膜を利用した細胞ベースの皮膚感作性試験法の構築

- 3.1. 緒言
- 3.2. 材料および方法
 - 3.2.1. 細胞および培養方法

- 3.2.2. 試験物質と試験材料
- 3.2.3. 細胞生存率と ELISA 測定
- 3.2.4. CVM およびミリセルチャンバー内の培溶液の透過性
- 3.2.5. CVM を用いた下面暴露法による試験条件の検討
- 3.3. 結果および考察
 - 3.3.1. CVM およびミリセルチャンバーの培養液量の保持
 - 3.3.2. DMSO 含有培養液が細胞生存率に及ぼす影響
 - 3.3.3. CVM を介した試験物質の透過性
 - 3.3.4. 暴露時間と濃度範囲
 - 3.3.5. Vitrigel-SST の再現性
 - 3.3.6. Vitrigel-SST を使用した感作性物質のスクリーニング
- 3.4. 小括
- 3.5. 参考文献

第四章 外的因子に応答して構造変化を誘起する人工金属タンパク質の構築 —KE2 を模倣した皮膚感作性試験法の構築に向けて—

- 4.1. 緒言
- 4.2. 材料および方法
 - 4.2.1. 合成試薬
 - 4.2.2. 測定機器
 - 4.2.3. サルコシン含有ペプチドおよび蛍光標識ペプチドの合成
 - 4.2.4. ペプチド-DTC およびペプチド-DTC 鉄錯体の合成
 - 4.2.5. ペプチド-DTC 鉄錯体と NO の反応
- 4.3. 結果および考察
 - 4.3.1. Fe(peptide-DTC)₃ の設計および合成
 - 4.3.2. Fe(peptide-DTC)₃ を用いた NO による構造変化の確認
- 4.4. 小括
- 4.5. 参考文献

第五章 固相担持ペプチドと官能基指示薬を利用した皮膚感作性試験法の構築

5.1. 緒言

5.2. 材料および方法

5.2.1. 試験物質と合成試薬

5.2.2. 測定機器

5.2.3. 樹脂固定化ペプチドの合成

5.2.4. Fmoc-Lys(Mtt)-npp Beads と Ac-Lys(Flu)-npp Beads の合成

5.2.5. Ac-Lys Beads と Ac-Cys Beads の合成

5.2.6. C-SPRA の試験手順

5.2.7. C-SPRA-MB の試験手順

5.2.8. 試験物質とペプチドとの反応性の計算

5.3. 結果および考察

5.3.1. ペプチド樹脂の設計および合成

5.3.2. C-SPRA の定量試薬の選択

5.3.3. C-SPRA の反応条件の最適化

5.3.4. C-SPRA を用いた感作性物質の評価

5.3.5. 磁性ビーズ担持 Lys と Cys の設計および合成

5.3.6. C-SPRA-MB での色素の選定および反応条件の最適化

5.3.7. C-SPRA-MB を用いた感作性物質の評価

5.4. 小括

5.5. 参考文献

第六章 光切断リンカーを有する固相担持ペプチドを用いた質量分析によるペプチド結合性試験の構築

6.1. 緒言

6.2. 材料および方法

6.2.1. 試験物質と合成試薬

6.2.2. 測定機器

6.2.3. 光切断リンカーを有する樹脂固定化ペプチドの合成

6.2.4. M-SPRA の試験手順

6.3. 結果および考察

6.3.1. 光切断リンカーを有するペプチド樹脂の設計および合成

6.3.2. M-SPRA における反応条件の最適化

6.3.3. 感作性物質修飾ペプチドの質量分析

6.3.4. 付加物分析による反応性の確認

6.3.5. 混合物とペプチド-npp 樹脂との反応

6.4. 小括

6.5. 参考文献

第七章 結論

7.1. 総括

7.2. 展望

謝辞

第一章

序論

1.1. アレルギー疾患の現状とアレルゲン

日本において、近年では乳幼児から高齢者まで国民の約 5 割が何らかのアレルギー疾患を有しており¹、アレルギー疾患の急激な増加は大きな社会問題になっている。アレルギー疾患は急な症状の悪化を繰り返すこともあり、激しい掻痒感を伴うなど生活の質 (Quality of Life: QOL) が著しく損なわれ、罹患者の生活に多大な影響を及ぼす。そうした中、平成 26 年に「アレルギー疾患対策基本法」(平成 26 年法律第 98 号) が公布され、この法に基づき、平成 29 年には「アレルギー疾患対策の推進に関する基本的な指針」(平成 29 年厚生労働省告示第 76 号) が公布された。この指針には医療提供体制の整備に加え、アレルギー疾患に関する調査および研究に関する事項が記載されており、治療法開発のみならず基礎研究についても推進が強く望まれている。

アレルギー疾患は、アレルゲンに起因する免疫反応による、ヒトの生体に有害な局所的または全身的反応に係る疾患であると、アレルギー疾患対策基本法に定義されている。アレルギー反応は、免疫反応による組織傷害の機序から大きく I から IV 型に分類されているが、その原因物質であるアレルゲンは多岐に渡っている (表 1-1)²。中でも細胞性免疫に起因する遅延型アレルギーの IV 型には、代表例としてアレルギー性接触皮膚炎が知られており、その治療には様々なアレルゲンの中からアレルギー反応を誘発する原因化学物質を特定することが最も重要と言われている。現在、多くの物質についてアレルゲン検査が可能となっているが、それでもなお未知のアレルゲンは無数に存在している。そのうえ、科学技術や産業の進歩により、今後さらに新規化学物質の開発は進み、医薬品、化粧品、農薬、食品添加物、ならびに工業化学物質などで幅広く使用されていくと考えられる。これらの化学物質は生活を豊かにしてくれる反面、アレルゲンとなり害を及ぼす可能性も持ち合わせている。そのため、化学物質の安全性を評価することは、我々が安心して日常生活を送る上で非常に重要であ

り、正確かつ迅速に評価可能な技術の構築が求められている。

表 1-1 アレルギー反応の分類

反応型	アレルゲン
I型反応	外来性抗原：ハウスダスト、ダニ、花粉、真菌、TDI、TMA (ハプテン)、薬剤 (ハプテン) など
II型反応	外来性抗原：ペニシリンなどの薬剤など 自己抗原：細胞膜・基底膜抗原など
III型反応	外来性抗原：細菌、薬剤、異種タンパクなど 自己抗原：変性 IgG、DNA など
IV型反応	外来性抗原：細菌、真菌など

1.2. 皮膚感作のメカニズム

ヒトは体表面のほぼ全てが皮膚で覆われており、日常生活において常に皮膚には化学物質などが暴露されている。皮膚を介した化学物質の有害作用には皮膚感作がある。皮膚感作とは、化学製品などに含まれる化学物質が皮膚に暴露されることで引き起こされるアレルギー性接触皮膚炎を誘発するIV型アレルギー反応のことであり、皮膚感作を引き起こす化学物質を皮膚感作性物質と呼ぶ。皮膚感作は、感作誘導段階と惹起段階の2つの段階で発症する(図1-1)。感作誘導段階では、1) まず化学物質が皮膚内への浸透し、皮膚中のタンパク質と結合することで複合体(抗原)を形成する。2) 形成された複合体は、表皮樹状細胞(ランゲルハンス細胞)や真皮樹状細胞によって捕捉される。3) 複合体を捕捉した樹状細胞は表皮角化細胞によって放出されたメディエーターにより活性化され、所属リンパ節に遊走する^{3,4}。4) リンパ節では複合体を含んだ主要組織適合遺伝子複合体分子(MHC)が樹状細胞からT細胞に提示され⁵、抗原特異的メモリーT細胞が活性化し、増殖する⁶。このように感作誘導段階は複雑な多因子の一連のイベントによって生じている。

惹起段階では、感作誘導段階を経た化学物質が再度皮膚に浸透し、樹状細胞やマクロファージによって捕捉される。そして、複合体が抗原特異的T細胞に提示され、炎症性サイトカインや細胞障害性T細胞などを誘導するサイトカインが放出されることで局所的な皮膚反応が誘起される^{7,8}。

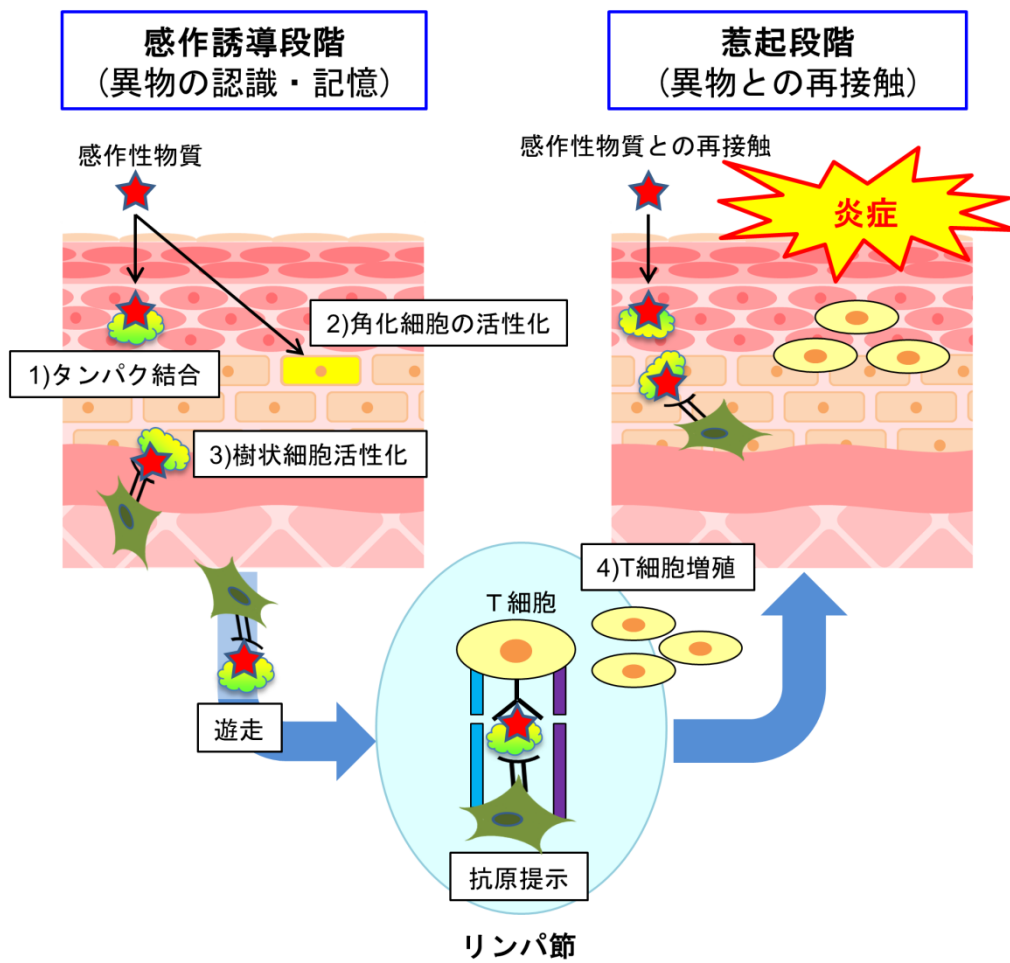


図 1-1 皮膚感作性のメカニズム

1.3. 動物を用いた皮膚感作性試験法

化学物質が皮膚感作性を有するか否かを評価する試験を皮膚感作性試験法という。動物を用いた皮膚感作性試験法はヒトにおける感作性を予測するために開発されてきた。古くはモルモットを用いた Buehler Test⁹ および Guinea Pig Maximisation Test (GPMT)¹⁰ が皮膚感作性試験法として主流であった。1.1. で述べたように様々な化学物質の安全性を評価することは非常に重要であるが、一方で評価するために必要な動物実験については古くから動物福祉の観点で批判があることも事実である。このため、動物使用数と動物に与える苦痛を最小限にするという理念が世界的に求められ、動物実験代替法についての 3R の原則が提言された¹¹。3R は使用動物を用いる方法を他の方法に置き換える (Replacement)、使用動物を必要最小限にする (Reduction)、避けられない動物実験にあつては痛みや苦痛、および不快感を最低限にする (Refinement) を意味している。

3R の提言を受け、皮膚感作性試験では動物の苦痛が少ないマウスを用いた皮膚感作性試験法 (Local Lymph Node Assay: LLNA) が開発された¹²。LLNA は GPMT に比べて、試験期間が短い、試験結果の定量性が高い、アジュバントを用いないことから動物に対する負担が少ないなどの利点があり、2002 年には経済協力開発機構 (Organization for Economic Co-operation and Development: OECD) により国際的な試験法として採択され¹³、広く用いられるようになった。LLNA による感作性物質の評価結果と、ヒトにおける感作性物質のデータベースを比較すると、感度 [真陽性物質数 / (真陽性物質数 + 偽陰性物質数)] が 91% と非常に高い検出力があることがわかっている。一方で LLNA では放射性物質の使用が必要であるため、実施施設に限られるという欠点がある。そのため近年では、放射性物質を使わない LLNA の改良法 (LLNA modified by Daicel on based on ATP content: LLNA:DA¹⁴、LLNA-BrdU-ELISA¹⁵) が開発され、これらの改良法も OECD テストガイドラインに収載されている^{16,17}。また、LLNA には皮膚刺激性を有する化学物質を評価する際に、刺激に起因するリンパ節の非特異的増殖が生じ、偽陽性判定が生じるという問題点や惹起段階まで確認していないため、感作さ

れた化学物質と類似構造の化学物質にも反応する交差感作性が検出できないという問題点もある。これらの問題を解決するために、近年、惹起段階も含めた評価手法である LLNA that includes the elicitation phase (LLNA:DAE)¹⁸ が開発された。このように動物実験は 3R の原則に則りながら、より有用な実験法へと開発されてきている。

1.4. OECD テストガイドラインに収載された *in vitro* 皮膚感作性試験法

皮膚感作性試験が動物に配慮しながら改良されているものの、近年では動物福祉への観点から、動物を用いた試験法に対する規制が一層厳しくなっている。EU においては化粧品の安全性評価のための動物実験を禁止し、さらに動物を用いて安全性評価を行った化粧品の輸入も禁止している¹⁹。そのため、3R の原則に則った感作性試験の開発のなかでも、動物実験を他の方法に置き換える Replacement に重点を置いた *in vitro* 皮膚感作試験法の開発が世界的に進められており、OECD によるテストガイドライン化が行われている。

これまでに開発された *in vitro* 皮膚感作性試験法は全て、有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway: AOP) として示された皮膚感作の生物学的プロセスの鍵となる反応 (Key event: KE) に基づいて開発されている²⁰。1.2. で述べたように皮膚感作誘導段階の KE には、KE1) 感作性物質と皮膚中タンパク質との共有結合、KE2) 表皮角化細胞の活性化と炎症性メディエーターの産生、KE3) 樹状細胞の活性化、KE4) 抗原特異的 T 細胞の活性化と増殖の 4 つのイベントが存在する (図 1-2)。KE1 を模倣した試験法として Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) および Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)、KE2 を模倣した試験法として ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSensTM test method (KeratinoSensTM) および ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method (LuSens)、そして KE3 を模倣した試験法として Human cell line activation test (h-CLAT)、U937 cell line activation test (U-SENSTM) および Interleukin-8 reporter gene assay (IL-8 Luc assay) が開発され、各試験法は OECD テストガイドラインに収載されている²¹⁻²³。なお、KE4 を模倣した試験法としては LLNA があるが、*in vitro* 皮膚感作試験法はまだ開発されていない。

KE1 を模倣した DPRA と ADRA は、感作性の予測に感作性物質の基本的な性質を利用している。一般的に感作性物質は親電子性を有しており²⁴、タンパク質中の求核性残基であるシステインやリシンと結合するという性質がある。DPRA^{25,26} と ADRA²⁷ は、システインおよびリシンを含むペプチドや検出試薬と化学物質を反応させた後、反応液を HPLC で分析することで感作性を予測して

いる (図 1-3)。

KE2 を模倣した KeratinoSensTM と LuSens は皮膚感作性物質により活性化される Nrf2-Keap1-ARE pathway を利用している。皮膚に浸透した感作性物質は表皮角化細胞において、Antioxidant response element (ARE) を介した生体防御遺伝子群の発現を活性化することが知られている。通常、転写因子として様々な生体防御に関わる遺伝子群を活性化する Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は二量体の Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) によって捕捉され、制御されている^{28,29}。活性酸素種や親電子物質が Keap1 のシステイン残基に結合することで、Keap1 に構造変化が生じ、Nrf2 の捕捉が解除される。これにより、Nrf2 が核内に移行し、ARE に結合することで生体防御遺伝子群の発現を誘導する。このことから、Keap1 のシステイン残基は活性酸素種や親電子分子を認識するセンサーとして機能していると考えられている³⁰。その多くが親電子性物質である感作性物質は、Nrf2-Keap1-ARE pathway を誘導することが報告されている³¹。KeratinoSensTM と LuSens は Nrf2-Keap1-ARE pathway を利用し、感作性物質によって発現誘導される遺伝子の ARE 制御下でルシフェラーゼ遺伝子が発現するベクターを導入した細胞を用いた試験法である (図 1-3)。

KE3 を模倣した h-CLAT、U-SENSTM および IL-8 Luc assay は樹状細胞の活性化によって発現するマーカーや炎症性サイトカインの産生を利用している。抗原を樹状細胞が捕捉することで、樹状細胞の細胞表面上にある共刺激分子 (CD86、CD54、CD40、CD83 など) の発現が亢進され、また炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-8、IL-1b、IL-6 など) の発現が誘導される³²⁻³⁵。h-CLAT³⁶ と U-SENS^{TM37} は樹状細胞における共刺激分子 (CD86 および CD54) の発現量をフローサイトメトリーで測定し、樹状細胞の活性化を評価することで感作性を予測する試験法である。IL-8 Luc assay³⁸ は感作性物質によって発現される IL-8 を指標とし、IL-8 プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞を用いた試験法である (図 1-3)。

これらの *in vitro* 皮膚感作性試験法は LLNA の評価結果と比較して、感度が約 70~80% であり、若干低い感度を示すものの高い再現性があることがバリーデー

ション研究などで報告されている。一方で、反応溶媒中に溶解しない疎水性物質はこれらの試験法では正確に評価できず試験適用外となる可能性があり、使用には留意が必要である。

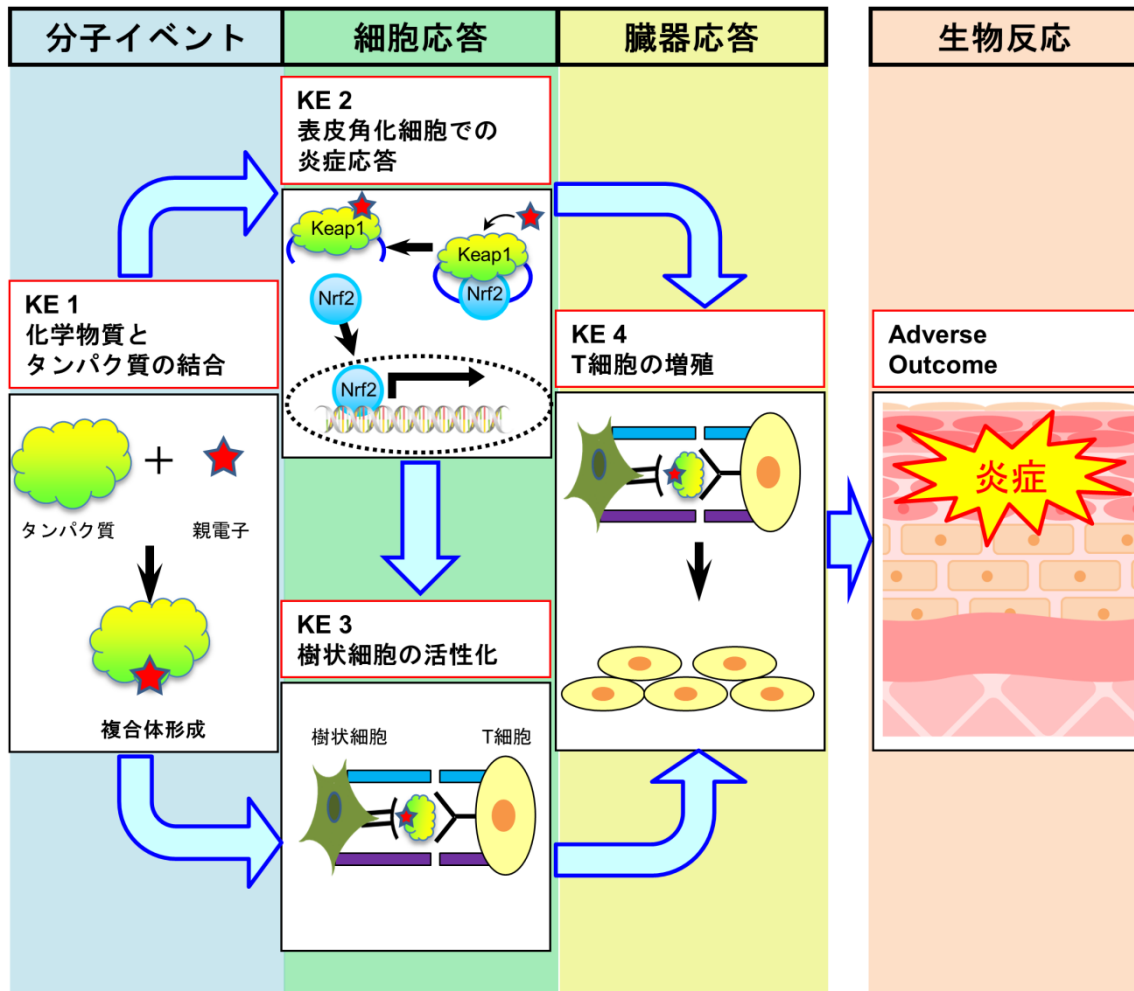


図 1-2 皮膚感作誘導段階の 4 つのイベント

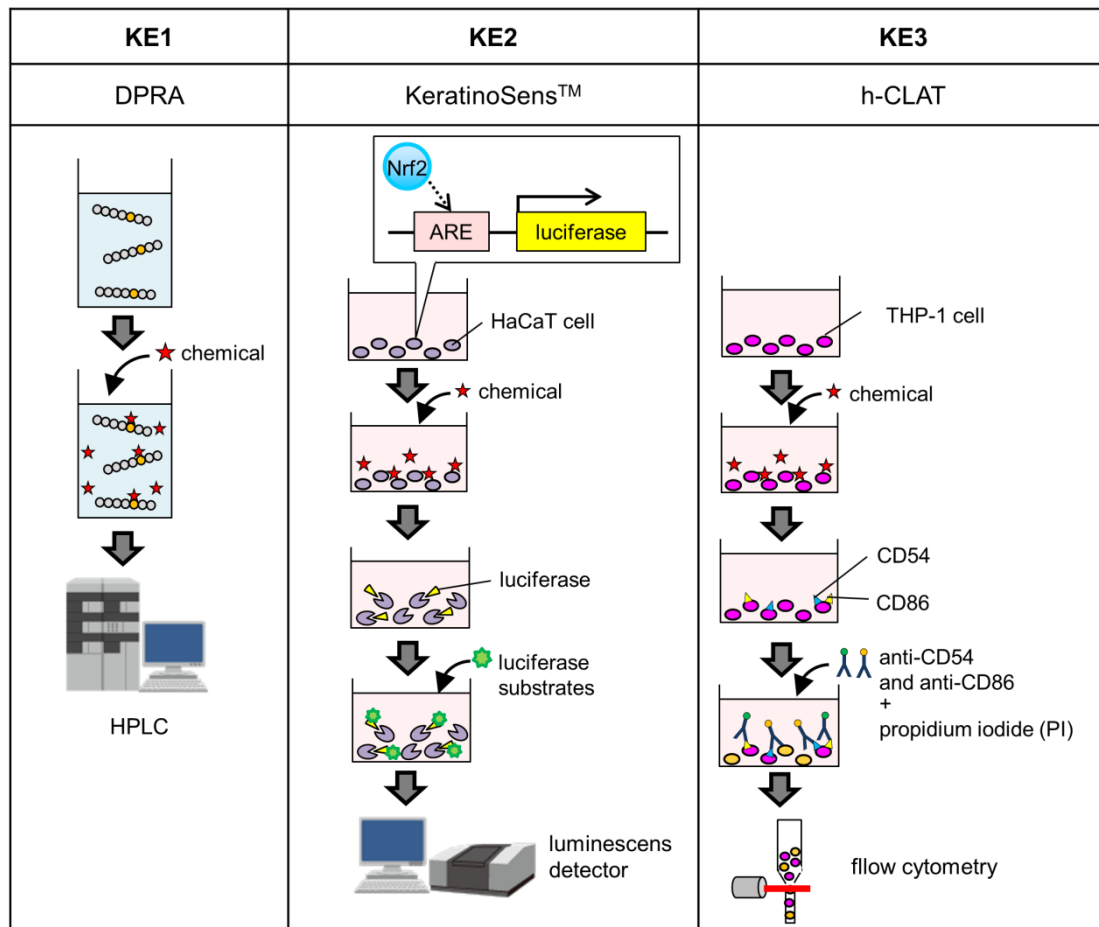


図 1-3 各 KE の代表的な *in vitro* 皮膚感作試験法

1.5. 動物を用いた皮膚感作性試験法と *in vitro* 皮膚感作性試験法の課題

これまで述べたとおり、3Rの原則を考慮した皮膚感作性試験の開発が進められている。マウスを用いた皮膚感作性試験法（LLNA、LLNA:DA、LLNA-BrdU-ELISA）は、古くから皮膚感作性評価に使用されてきたGPMTに比べて、動物数の低減（Reduction）や苦痛の低減（Refinement）という点で3Rを考慮した試験法である。動物を用いた皮膚感作性評価はヒトの感作性をよく予測できることが知られており、そのため、安全性の情報が少ない物質を評価する際には動物を用いた試験法が選択される。これらの試験法については厚生労働省から化粧品・医薬部外品の安全性評価への活用が促されており、現時点において動物を用いた試験法は製品の安全性を評価する上で非常に重要なツールであると考えられている³⁹。一方で、動物飼育施設などを有する専用施設での実験が必須、試験期間の長さ、高いランニングコスト、さらに動物福祉の観点から、動物実験を置き換えた*in vitro*試験法の開発（Replacement）も望まれている。

一般的な*in vitro*試験法の利点としては、試験期間が短く簡便に試験可能であり、再現性が高いことから製品の研究開発を迅速に進める上では有用な知見が得られるといった点がある。しかしながら、疎水性物質は適用できないなど試験適用範囲が狭く、単一の*in vitro*試験法だけでは動物を用いる試験法を完全に代替することは困難である。現状において、*in vitro*試験法でより高い予測性を達成するには、各イベントに注目した複数の試験法を組み合わせる手法（Integrated Approaches to Testing and Assessment: IATA）が必要ではあるが³⁹、複数の試験法を実施するためには多大な時間、コスト、労力がかかってしまう。

また、感作性の有無のみならず分子レベルでの詳細なメカニズム（結合様式や反応速度など）を評価することが必要だと考えるが、従来の*in vitro*皮膚感作性試験法は簡便に感作性の有無を判断することに重点をおいており、詳細なメカニズム解析を行う測定系が存在しない。安全性試験は最終的にヒトに適用することが目的であり、*in vitro*試験法を用いる限り、得られた結果をヒトへ外挿するプロセスが必ず必要になるが、生物反応は複雑であり、ブラックボックスのようであるため、種差などで補正する手法を取らざるを得ない。これは化学物

質の作用機序が明確ではないためである。詳細なメカニズムがわかれば、化学物質の作用機序を体系的に集約することが可能となり、化学物質の構造的な観点から事前にある程度の感作性の有無を予測することが可能になると考える。また、感作リスクは暴露量と感作性強度で決まるため、感作性の有無だけではなく、その量と強度も重要な情報となってくる。一方で、安全性を評価する上では、簡便に誰でも評価できる測定法が必須である。以上から、簡便かつ詳細にメカニズムを評価する手法の構築が重要であると考えられる。このような手法を構築し、詳細なメカニズム解析で得られた知見を蓄積していくことは、ヒトへの安全性評価を促進する基盤となり、製品開発を推進していく上で非常に役立つと考える。

表 1-2 動物を用いた皮膚感作性試験法と *in vitro* 皮膚感作性試験法の利点と課題点

利点と課題点		
動物	利点	ヒトに対して予測性が高い
	課題点	試験期間が長い、専用施設が必要、ランニングコストが高い
<i>in vitro</i>	利点	試験期間が短い、簡便に試験可能、再現性が高い
	課題点	試験適用範囲が狭い、高い予測性を担保するために複数の試験法が必要

1.6. 本研究の目的と論文の構成

動物を用いた皮膚感作性試験法は長らく安全性評価に非常に重要なツールとして用いられてきたが、一方で、世界的に動物福祉への関心が高まったことや法規制の観点から、可能な限り *in vitro* 試験法への移行も期待されている。しかしながら、既存の *in vitro* 皮膚感作性試験法は、試験適用の狭さや、複数の試験法を組み合わせた評価系が必要などの課題点も存在する。さらに既存の *in vitro* 皮膚感作性試験法は、詳細なメカニズムを解析する手法が取り入れられておらず、感作の有無のみに焦点を当てているため、感作リスクの指標となる量や強度が不明である。各試験法の技術的な課題を克服し、並行して簡便かつ詳細にメカニズム解析が可能となれば、単一の試験法のみで、動物実験を代替でき、*in vitro* 皮膚感作性試験法はより普及するのではないかと期待する。

そこで本研究ではこのような背景を踏まえて、長らく非常に重要なツールとして評価されてきた動物を用いた安全性評価から始まり、近年の情勢を考慮した *in vitro* 試験法を活用したより精度の高い感作性評価を行うことを目指し、複数の KE における *in vitro* 皮膚感作性試験法の課題点を克服した試験法の開発、さらに並行して分子レベルで簡便かつ詳細に感作性のメカニズムを測定する方法の構築を行った。

以上を踏まえて第二章では、安全性の情報が少ない天然化合物について、LLNA:DAE を用いて評価し、天然化合物に関する感作性の知見を得た。次に、可能な限り動物実験を減らすため、有害性発現経路の各イベントに対応する既存の *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の広い試験法の開発を試みた。第三章では、コラーゲンビトリゲル膜を利用して *in vitro* 試験法の大きな課題である難水溶性物質に対して試験可能な KE3 を模倣した *in vitro* 皮膚感作性試験法 (Vitrigel Skin Sensitization Test: Vitrigel-SST) の開発を行った。第四章では、さらに詳細なメカニズム解析を視野に入れ、KE2 模倣した分子レベルでの測定手法を構築するために、Keap1 と同様に外的因子に応答して構造を変化させる人工金属タンパク質 [Fe(peptide-DTC)₃] の合成を行った。第五章では、*in vitro* 試験法の適用範囲や応用用途を従来よりもさらに広げるため

に、固相担持ペプチドと官能基指示薬を利用して、KE1 を模倣した *in vitro* 皮膚感作性試験法 (Chromophore-Solid phase Peptide Reaction Assay: C-SPRA および C-SPRA methods using magnetic microbeads: C-SPRA-MB) の開発を試みた。さらに第六章では、感作性を分子レベルで簡便かつ詳細に測定するために、第五章で開発した C-SPRA をさらに改良した手法 (Mass spectrometry-based SPRA: M-SPRA) を構築し、感作性物質とペプチドの反応メカニズムを明らかにした。第七章は本研究の結論であり、本研究により得られた知見を総括すると共に、安全性評価のみならず分析化学や生体工学分野などへの応用展開も含めた将来展望を述べている (図 1-4)。

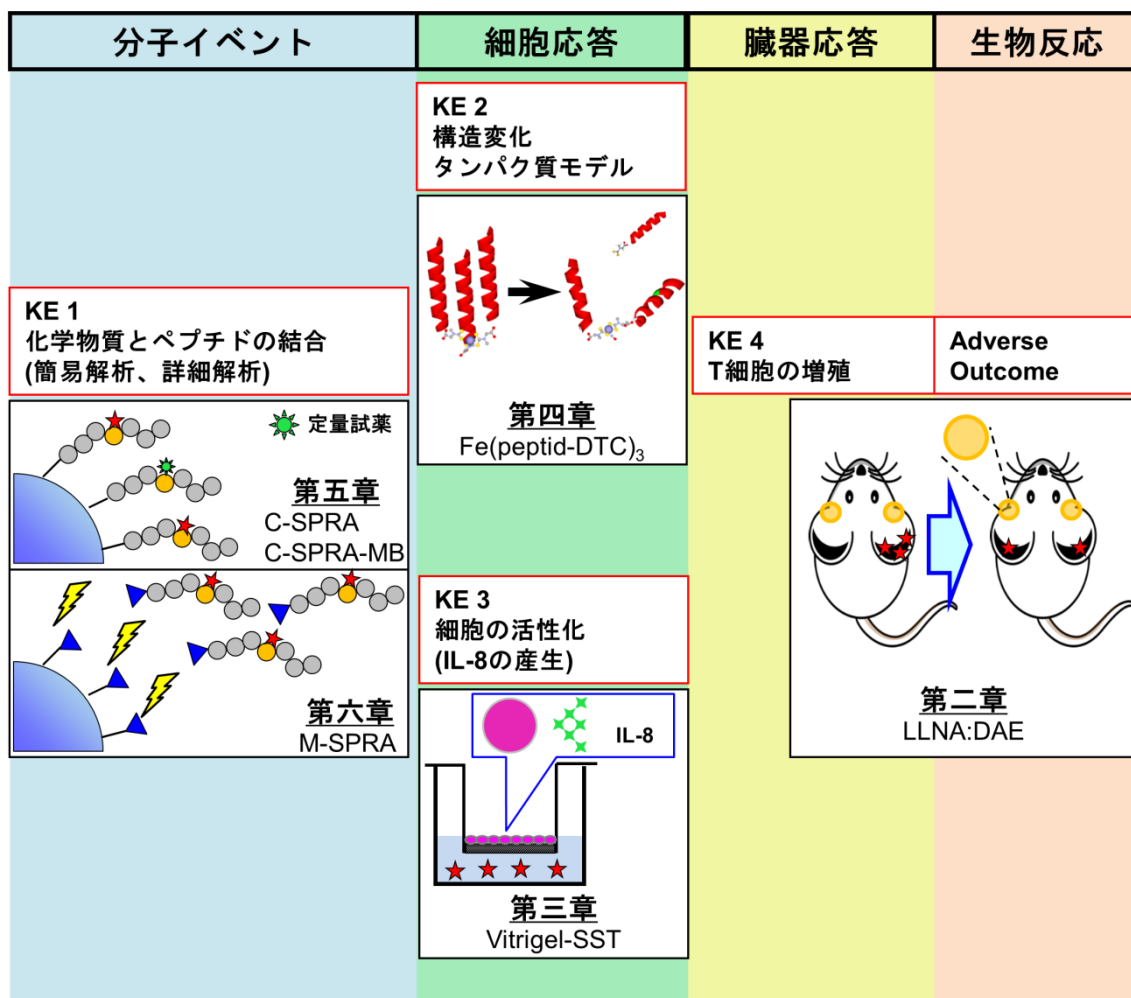


図 1-4 本論文の概要

1.7. 参考文献

1. 厚生科学審議会疾病対策本部会 リウマチ・アレルギー対策委員会, 平成 23 年 8 月リウマチ・アレルギー対策委員会報告書. (2011)
2. P. G. H. Gell, R. R. A. Coombs, The classification of allergic reactions underlying disease. In: R. R. A. Coombs, P. G. H. Gell (Eds), *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell, Oxford, 317–337 (1963).
3. M. Cumberbatch, R. J. Dearman, I. Kimber, Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology*, **92**, 388–395 (1997).
4. C. Antonopoulos, M. Cumberbatch, J. B. Mee, R. J. Dearman, X. Q. Wei, F. Y. Liew, I. Kimber, R. W. Groves, IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis. *J. Leukoc. Biol.*, **83**, 361–367 (2008).
5. M. J. Toebak, S. Gibbs, D. P. Bruynzeel, R. J. Scheper, T. Rustemeyer, Dendritic cells: biology of the skin. *Contact dermatitis*, **60**, 2–20 (2009).
6. I. Kimber, D. A. Basketter, G. F. Gerberick, C. A. Ryan, R. J. Dearman, Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicol. Sci.*, **120**, Suppl 1, S238–268 (2011).
7. T. Honda, Y. Miyachi, K. Kabashima, Regulatory T cells in cutaneous immune responses. *J. Dermatol. Sci.*, **63**, 75–82 (2011).
8. Y. Natsuaki, G. Egawa, S. Nakamizo, S. Ono, S. Hanakawa, T. Okada, N. Kusuba, A. Otsuka, A. Kithoh, T. Honda, S. Nakajima, S. Tsuchiya, Y. Sugimoto, K. J. Ishii, H. Tsutsui, H. Yagita, Y. Iwakura, M. Kubo, Lg. Ng, T. Hashimoto, J. Fuentes, E. Guttman-Yassky, Y. Miyachi, K. Kabashima, Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol.*, **15**, 1064–1069 (2014).
9. E. V. Buehler, Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch. Dermatol.*, **91**, 171–177 (1965).
10. B. Magnusson, A. M. Kligman, The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.*, **52**, 268–276 (1969).
11. W. M. S. Russell, R. L. Burch, The principles of humane experimental technique.

- London. Methuen (1959).
12. I. Kimber, J. Mitchell, A. C. Griffin, Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 585–586 (1986).
 13. OECD, OECD Guideline for the testing of chemicals No. 429. Skin sensitization: Local lymph node assay, *OECD publishing*, Paris (2010).
 14. K. Yamashita, K. Idehara, N. Fukuda, G. Yamagishi, N. Kawada, Development of a modified local lymph node assay using ATP measurement as an endpoint. *AATE.*, **11**, 136–144 (2005).
 15. M. Takeyoshi, K. Yamasaki, Y. Yakabe, M. Takatsuki, I. Kimber, Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol. Lett.*, **119**, 203–208 (2001).
 16. OECD, OECD Guideline for the testing of chemicals No.442A, Skin sensitization: Local Lymph Node Assay: DA, *OECD publishing*, Paris (2010).
 17. OECD, OECD Guideline for the testing of chemicals No.442B, Skin sensitization: Local Lymph Node Assay BrdU-ELISA, *OECD publishing*, Paris (2010).
 18. K. Yamashita, S. Shinoda, S. Hagiwara, H. Itagaki, Development of LLNA:DAE: a new local lymph node assay that includes the elicitation phase, discriminates borderline-positive chemicals, and is useful for cross-sensitization testing. *J. Toxicol. Sci.*, **39**, 147–161 (2014).
 19. EU, Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (7th Amendment to the European Cosmetics Directive). *Off. J. Eur. Communities Legis.*, **66**, 26–35 (2003).
 20. OECD, The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, *OECD publishing*, Paris (2012).
 21. OECD, OECD Guidelines for testing of chemicals No. 442C. Key-event-based test guideline for in chemico skin sensitisation assays addressing the adverse outcome pathway key event on covalent binding to proteins. *OECD Publishing*, Paris (2019).
 22. OECD, Key event based test guideline 442D. In vitro skin sensitization assays the AOP event of keratinocyte activation. *OECD Publishing*, Paris (2018).

23. OECD. Key event-based test guideline No. 442E. *In vitro* skin sensitization assays addressing the key event of activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation. *OECD Publishing*, Paris (2018).
24. I. Chipinda, J. M. Hettick, P. D. Siegel, Haptenation: chemical reactivity and protein binding. *J. Allergy (Cairo)*, **2011**, 839682 (2011).
25. G. F. Gerberick, J. D. Vassallo, R. E. Bailey, J. G. Chaney, S. W. Morrall, J. P. Lepoittevin, Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.*, **81**, 332–343 (2004).
26. G. F. Gerberick, J. D. Vassallo, L. M. Foertsch, B. B. Price, J. G. Chaney, J. P. Lepoittevin, Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicol. Sci.*, **97**, 417–427 (2007).
27. M. Fujita, Y. Yamamoto, H. Tahara, T. Kasahara, Y. Jimbo, T. Hioki, Development of a prediction method for skin sensitization using novel cysteine and lysine derivatives. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **70**, 94–105 (2014).
28. K. I. Tong, A. Kobayashi, F. Katsuoka, M. Yamamoto, Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol. Chem.*, **387**, 1311–1320 (2006).
29. K. I. Tong, Y. Katoh, H. Kusunoki, K. Itoh, T. Tanaka, M. Yamamoto, Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 2887–2900 (2006).
30. A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto, P. Talalay, Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 11908–11913 (2002).
31. A. Natsch, The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicol. Sci.*, **113**, 284–292 (2010).
32. A. H. Enk, S. I. Katz, Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **89**, 1398–1402 (1992).
33. M. Cumberbatch, R. J. Dearman, I. Kimber, Constitutive and inducible expression of interleukin-6 by Langerhans cells and lymph node dendritic cells. *Immunology*, **87**, 513–518 (1996).

34. H. Ozawa, S. Nakagawa, H. Tagami, S. Aiba, Interleukin-1 β and granulocyte macrophage colony-simulating factor mediate Langerhans cell maturation differently. *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 441–445 (1996).
35. A. C. Verrier, D. Schmit, M. J. Staquet, Fragrance and contact allergens *in vitro* modulate the HLA-DR and E-cadherin expression on human epidermal Langerhans cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **120**, 56–62 (1999).
36. T. Ashikaga, Y. Yoshida, M. Hirota, K. Yoneyama, H. Itagaki, H. Sakaguchi, M. Miyazawa, Y. Ito, H. Suzuki, H. Toyoda, Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 767–773 (2006).
37. C. Piroird, J. M. Ovigne, F. Rousset, S. Martinozzi-Teissier, C. Gomes, J. Cotovio, N. Alépée, The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro*, **29**, 901–916 (2015).
38. T. Takahashi, Y. Kimura, R. Saito, Y. Nakajima, Y. Ohmiya, K. Yamasaki, S. Aiba, An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol. Sci.*, **124**, 359–369 (2011).
39. 厚生労働省医薬食品局審査管理課, 平成 25 年 5 月 30 日皮膚感作性試験代替法 (LLNA:DA、LLNA:BrdU-ELISA) を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンスについて. (2013)
40. OECD, OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing & Assessment No. 256. Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation. *OECD Publishing*, Paris (2016).

第二章

LLNA:DAE を用いた天然化合物の皮膚感作性評価

2.1. 緒言

動物を用いた皮膚感作性試験法はヒトに対する感作性を精度よく予測できることから、安全性を評価する上で非常に重要なツールである。生活を営む上で誰もが常に摂取または暴露されているもの代表として天然化合物が挙げられる。天然化合物は様々な生理活性を有しており、栄養補助食品、香料、化粧品など多岐に渡って使用されている。コーヒー豆中に含まれている **Chlorogenic acid** は抗酸化作用、玉ねぎなどの多くの植物に含まれる **Quercetin** は抗酸化作用や抗炎症作用、紫根に含まれる **Shikonin** は抗炎症作用など、天然化合物は様々な効能効果を有している^{1,2}。天然化合物は安全なイメージと薬理効果への期待から様々な製品中に利用されている。しかし、中にはシナモンから得られる **Cinnamic aldehyde** のように、食品や香水などの香料として一般的によく用いられているものの、アレルギー性接触皮膚炎や口腔内アレルギー性皮膚炎の発症が報告されている天然化合物もある³⁻⁵。天然物なので安全であるというイメージが先行しており、いまだ天然化合物の安全性については十分に検討されているとは言い難い。しかし、実際には先に挙げたような有害性事象が発生している事例もあるため、天然化合物の皮膚感作性を評価することは非常に重要である。現状では安全性の情報が少ない天然化合物のような物質に対して皮膚感作性を評価する場合、適用限界が存在する *in vitro* 試験法ではなく動物を用いた試験法で評価していく必要があると考えられる。

動物を用いた皮膚感作性試験法をする場合、3R を考慮し、皮膚感作の有害性発現経路の 4 段階目である **Key Event 4 (KE4)** に注目した **Local Lymph Node Assay (LLNA)**^{6,7} が一般的に選択される。しかし、LLNA は皮膚刺激性を有する物質を評価した場合、非特異的なリンパ節増殖効果を介して偽陽性の結果をもたらす可能性がある。さらに、LLNA は感作反応の惹起段階が含まれていないため、化学物質の交差感作の可能性の評価が困難であること、検査に放射性同位

体物質を使用する必要があるなどの問題点もある。これらの問題を解決するために、LLNA that includes the elicitation phase (LLNA:DAE)⁸が開発された。

LLNA は感作誘導段階のみを評価しているのに対し、LLNA:DAE は惹起段階を評価することが可能であり、その利点として、1) 使用動物数の低減、2) 放射性同位体物質を使用しない、3) 評価に特別な実験装置を必要としない、4) 皮膚刺激性と皮膚感作性を区別して評価が可能、5) 化学物質間の交差感作性を評価することが可能、などがある。刺激性と感作性を区別しつつ、惹起段階まで評価できる LLNA:DAE を用いることで、安全性の情報が少ない天然化合物でも、ヒトに対する感作性の知見と一致しやすくなると期待される。

そこで第二章では、従来の動物を用いた試験法より 3R を考慮しつつ、KE4 と生体反応に着目した LLNA:DAE を用いて、新たに評価対象とする成分を含む 10 成分天然化合物について、皮膚感作性強度を調査した結果について述べる。

2.2. 材料および方法

2.2.1. 試験物質

Carminic acid、Esculetin および 4-Methylesculetin は東京化成工業株式会社から購入した。Coumarin、Quercetin、Curcumin、Naringenin、Chlorogenic acid、Acetone および Dimethylsulfoxide (DMSO) は和光純薬株式会社から購入した。Isoscopletin はフナコシ株式会社から購入した。Shikonin はキシダ化学株式会社から購入した。オリーブオイルは吉田製薬株式会社から購入した。各物質は購入したものをそのまま使用した。

2.2.2. 使用動物

日本チャールス・リバー株式会社から購入した CBA/J マウスを実験に使用した。なお、試験使用時の週齢は 9 週齢であった。動物の飼育環境は一定の温度 ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) と湿度 ($50 \pm 15\%$) に維持され、換気回数は 12 回/時間に設定した。本実験は、株式会社薬物安全性試験センターの動物実験倫理規定に従って実施した。

2.2.3. LLNA:DAE の概要

LLNA:DAE の試験方法を図 2-1 に示す。試験物質投与群のマウス右耳に、1、2 および 3 日目に試験物質を塗布し、10 日目に両耳に試験物質を塗布する。コントロール群のマウスには 10 日目のみに左耳に試験物質を塗布する。いずれの群も 12 日目に各耳のリンパ節を摘出し、リンパ節重量を秤量する。

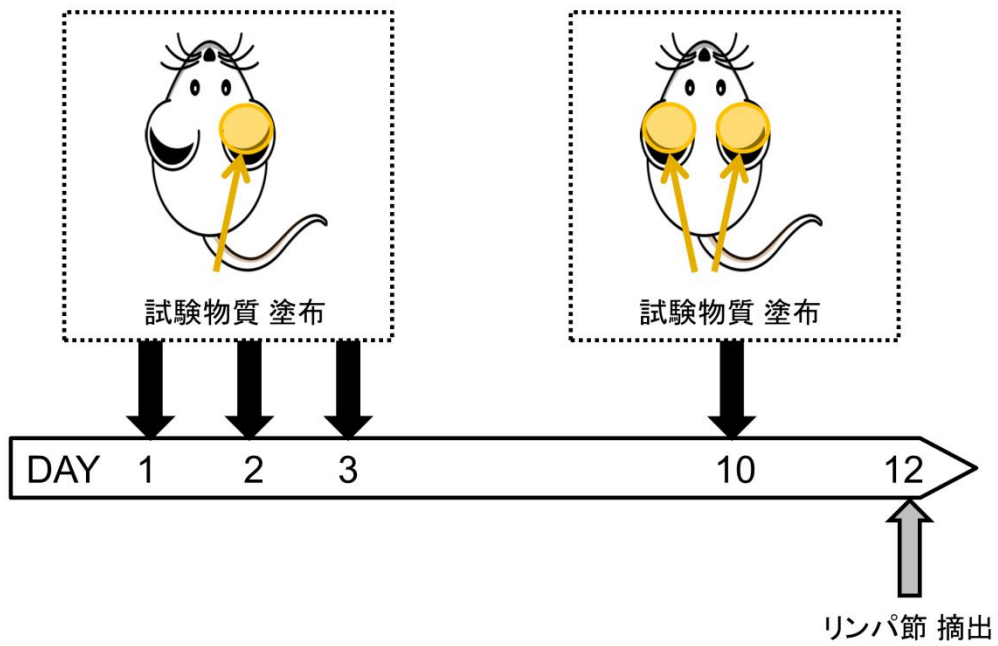
LLNA:DAE は 10 日目に試験物質を塗布し、その 2 日後にリンパ節を摘出するため、コントロール群においては、刺激性に起因するリンパ節重量の増加が生じると考えられる。一方、試験群では試験物質が感作性物質の場合、感作性と刺激性の両者に起因するリンパ節重量の増加が期待されるため、コントロール群と試験群の差を比較することで、感作性を判断することが可能となる。皮膚感作性の判定方法は、コントロール群と試験群左耳リンパ節重量の平均の差が統計的に有意であり、かつ 95%信頼性区間の下限が 0 より大きい場合に陽性と判定する。

また感作性強度の判断には下記式の化学物質 1%当たりのリンパ節重量差 (1% increase value) を使用する。

1% increase value

$$= \frac{\text{試験群の左耳リンパ節重量 (mg)} - \text{コントロール群の左耳リンパ節重量 (mg)}}{\text{試験濃度 (\%)}}$$

【試験群スケジュール】



【コントロール群スケジュール】

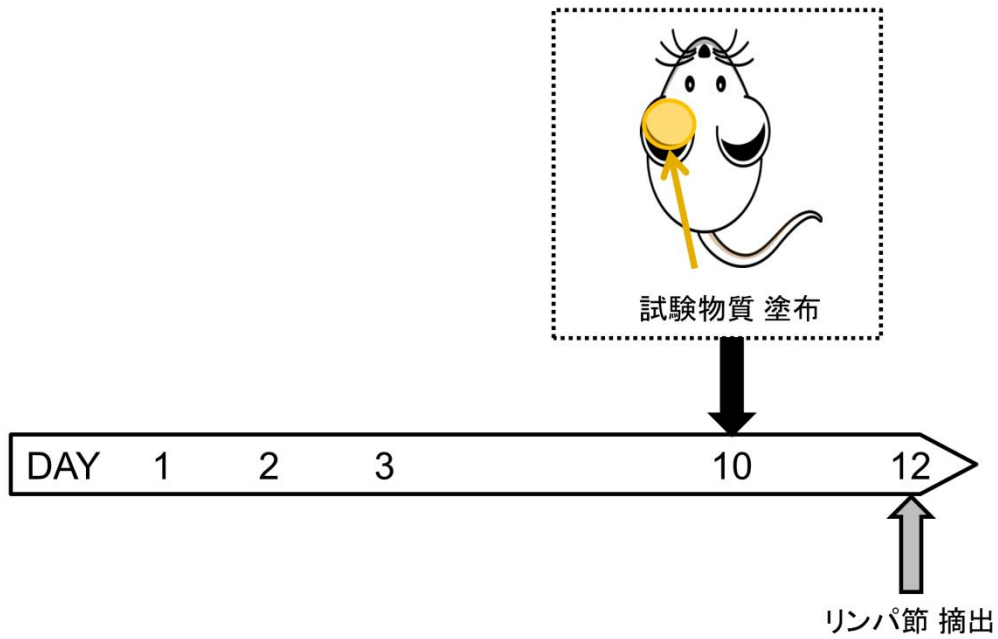


図 2-1 LLNA:DAE の試験方法の概要

2.2.4. LLNA:DAE による天然化合物の皮膚感作性の評価

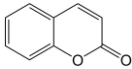
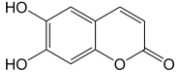
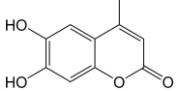
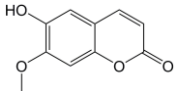
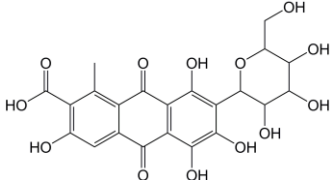
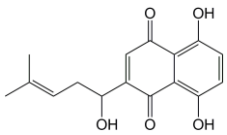
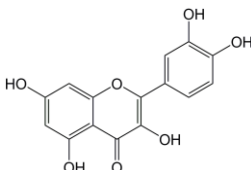
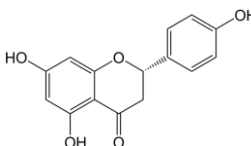
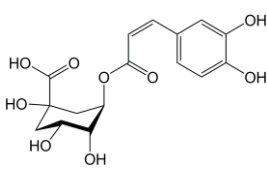
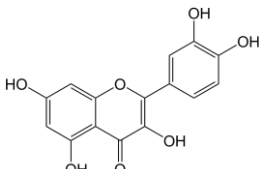
濃度設定試験

Curcumin、Naringenin および Chlorogenic acid は [acetone:olive oil (4:1, v/v)] (AOO) で 25.0%、12.5%、6.25% および 3.13% になるように希釈した。Carminic acid および Quercetin は DMSO で 25.0%、12.5%、6.25% および 3.13% になるように希釈した。Shikonin は AOO で 5%、2.5%、1.3% および 0.63% になるように希釈した。Coumarin、Esculetin、4-Methylesculetin および Isoscopoletin は DMSO で 5%、2.5%、1.3% および 0.63% になるように希釈した。最高濃度は、溶解度試験に基づいて決定した⁹。各試験物質は 2.2.1. に記載した方法で試験した。各試験物質に対し 1 匹のマウスを使用した。耳の紅斑スコアは 1~12 日目まで測定を行った。

本試験

各試験物質は図 2-1 に記載した方法に従って試験した。各試験物質は 5 匹のマウスで試験した。試験物質の情報および各試験物質濃度を表 2-1 に示す。

表 2-1 試験物質の構造、純度および試験溶媒

Chemical name	Structure	Purity	Test conc.	vehicle
Coumarin		>98%	5%	DMSO
Esculetin		>95%	5%	DMSO
4-Methylesculetin		>98%	5%	DMSO
Isoscopoletin		98%	10%	DMSO
Carminic acid		>85%	25%	DMSO
Shikonin*		>98%	0.05%	DMSO
Quercetin		≧ 95%	25%	DMSO
Naringenin		≧ 98%	25%	AOO
Chlorogenic acid		>99%	25%	AOO
Curcumin		Special Grade	25%	AOO

略語; DMSO: Dimethylsulfoxide, AOO:axetone: olive oil (4:1, v/v), Shikonin*: Shikonin/Alkannin = 6:1

2.3. 結果および考察

2.3.1. 濃度設定試験

Shikonin を除く全ての試験条件において、4 mg を超える左耳リンパ節重量の増加は見られなかった。Coumarin、Esculetin、4-Methylesculetin、Carminic acid、Isoscapoletin および Shikonin は少なくとも 1 つの試験濃度で、4 mg を超える右耳リンパ節重量の増加が見られた。これらの結果は、免疫学的および炎症性リンパ節増殖を示している。対照的に、Quercetin、Curcumin、Naringenin および Chlorogenic acid は両耳のリンパ節重量の顕著な増加を示さなかった。濃度設定試験では、試験した全ての濃度で重度の紅斑を生じた Shikonin を除いて、過剰な皮膚紅斑および全身毒性は見られなかった。

2.3.2. 天然化合物の皮膚感作性

LLNA:DAE で試験した 10 種類の天然化合物の結果を図 2-2 に示す。4 物質 (Esculetin、4-Methylesculetin、Isoscapoletin および Shikonin) で陽性判定が得られた。既知の感作性物質の 1% increase value との比較により、感作性強度を調べた結果、Shikonin は極度感作性物質、Esculetin と 4-Methylesculetin は強度感作性物質、Isoscapoletin は弱感作性物質であった (表 2-2)^{10,11}。この結果では、香料に使用され、口腔内アレルギー性皮膚炎を引き起こすとされている Cinnamic aldehyde よりも Shikonin、Esculetin、4-Methylesculetin は皮膚感作性強度が強いことを示す。本試験で最も強い感作性を示した Shikonin は紫草の有効成分であり、化粧品への Shikonin の使用は日本化粧品工業会によって承認されている。また、Shikonin は抗腫瘍、抗炎症効果、抗アレルギー活性を含むいくつかの薬理的効果を提供することが報告されている¹²⁻¹⁵。

他の 6 つの試験物質 (Coumarin、Carminic acid、Quercetin、Naringenin、Chlorogenic acid および Curcumin) は陰性判定であった。Carminic acid は右耳リンパ節重量の増加が観察されたが、左耳のリンパ節重量の増加は見られなかった。このことより、リンパ節の重量増加は皮膚刺激による非特異的増殖であると判断した。Carminic acid は popliteal lymph node assay (PLNA) 陰性であると報

告されており¹⁶、LLNA modified by Daicel on based on ATP content (LLNA:DA) で試験した際に、リンパ節増殖を誘発したが、この反応は皮膚感作の陽性閾値基準に到達しなかった¹⁷。Coumarinはわずかに左耳リンパ節増殖を誘発したため、非アレルギー性リンパ節増殖を誘発する可能性があると考えられる。CoumarinをLLNAで試験した結果も陰性であると報告されている^{18, 19}。さらに、Chlorogenic acidもPLNAで陰性を示しており²⁰、皮膚感作はないと考えられている。LLNA:DAEと他試験との結果を表2-3にまとめた。これまで調査されていなかった7種類の天然化合物 (Esculetin、4-Methylesculetin、Isoscopoletin、Shikonin、Quercetin、Naringenin および Curcumin) の内、4種類の天然化合物に感作性があることが明らかとなった。

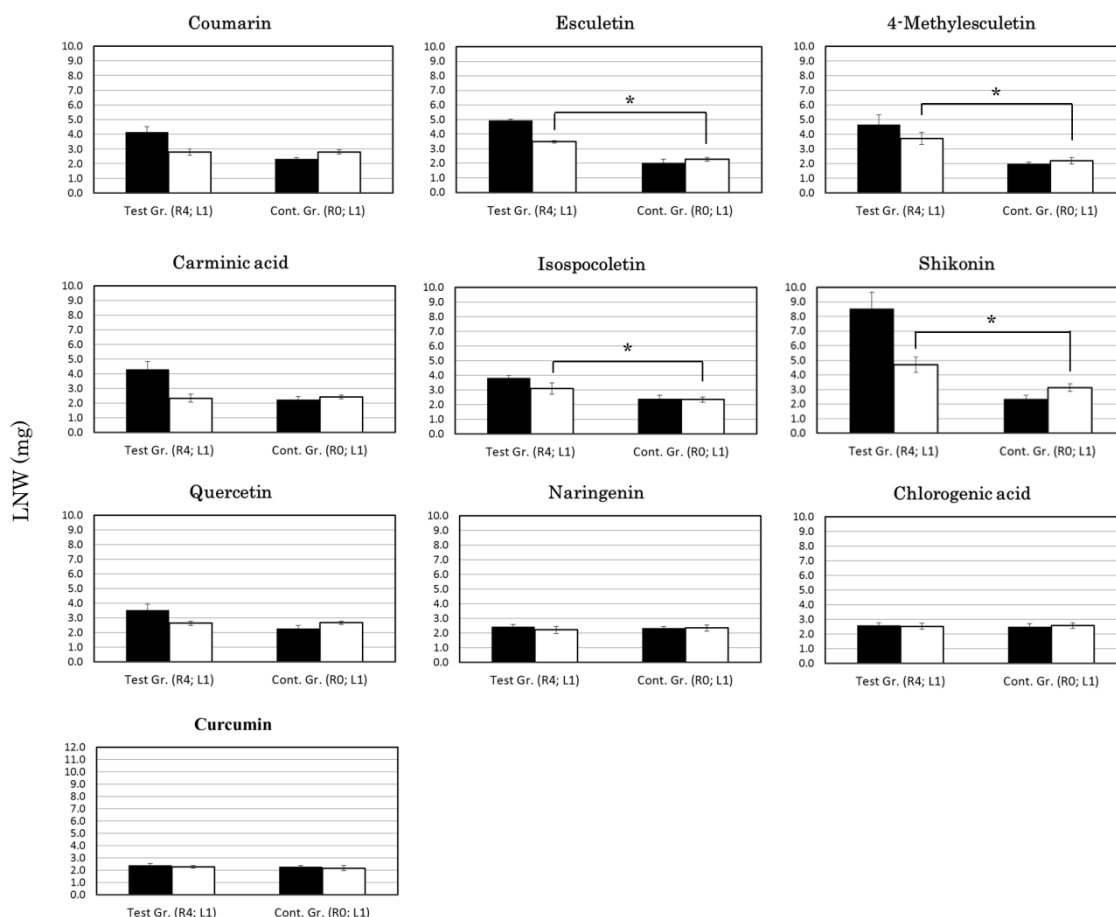


図 2-2 10 種類の天然化合物に対する LLNA:DAE の結果。各棒グラフの黒色は右耳、白色が左耳のリンパ節重量 (Lymph Node Weight : LNW) を示す。各数値は平均 ± 標準偏差 (SD、n = 5) として表示した。

表 2-2 40 種類の化学物質の感作性強度

Chemical	^a 1% increase value	^b Potency Category
Shikonin	31.60	
2,4-Dinitrofluorobenzene	12.56	Extreme
2,4-Dinitrochlorobenzene	9.44	Extreme
p-Benzoquinone	2.00	Extreme
Glutaraldehyde	1.09	Strong
Hydroquinone	1.04	Strong
Cobalt chloride	0.49	Strong
p-Phenylenediamine	0.37	Strong
4-Methylesculetin	0.30	
Propyl gallate	0.27	Strong
Esculetin	0.24	
Cinnamic aldehyde	0.19	Moderate
Isoeugenol	0.12	Modelate
Citral	0.10	Weak
Abietic acid	0.08	Weak
2-Mercaptobenzothiazole	0.07	Modelate
Isospopoletin	0.07	
Cinnamic alcohol	0.06	Weak
Nickel sulphate	0.05	Moderate
Resorcinol	0.04	Moderate
Hexylcinnamic aldehyde	0.04	Weak
Eugenol	0.04	Weak
Phenyl benzoate	0.08	Weak
Hydroxycitronellal	0.03	Weak
Imidazolidinyl urea	0.03	Weak
Methyl methacrylate	0.02	Weak
Ethylene glycol dimethacrylate	0.02	Weak
Curcumin	0.00	
Coumarin	-0.04	
Carminic acid	0.00	
Quercetin	0.00	
Naringenin	-0.01	
Chlorogenic acid	0.00	
Sulfanilamide	0.00	N.C.
Glycerol	0.00	N.C.
Isopropanol	0.00	N.C.
Lactic acid	-0.01	N.C.
Methyl salicylate	0.00	N.C.
Salicylic acid	0.00	N.C.
n-Hexane	0.00	N.C.

略語 ; N.C. : 未分類。本研究で試験した化合物は太字で表記した。

^a データは Yamashita *et al.*, (2015)¹¹ から引用。^b データは Nukada *et al.*, (2013)¹² から引用。

表 2-3 天然化合物の結果まとめ

Name	LLNA:DAE		LLNAs/PLNA
	P or N	Potency	P or N
Coumarin	N	Non	N (L) ^a
Esculetin	P	Strong	n.d.
4-Methylesculetin	P	Strong	n.d.
Isoscapoletin	P	Weak/Moderate	n.d.
Carminic acid	N	Non	N (L,P) ^{b,c}
Shikonin*	P	Extreme	n.d.
Quercetin	N	Non	n.d.
Naringenin	N	Non	n.d.
Chlorogenic acid	N	Non	N (P) ^d
Curcumin	N	Non	n.d.

略語; P:陽性, N: 陰性, Extreme: 極度感作性物質, Strong: 強度感作性物質, Moderate: 中程度感作性物質, Weak: 弱感作性物質, Non: 非感作性物質, GPT: guinea pig test, n.d.: データなし。

^a データは Vocanson *et al.*, (2016)¹⁷ から引用。 ^b データは Ikarashi *et al.*, (2014)¹⁶ から引用。 ^c データは Nagaoka Hamano *et al.*, (2007)¹⁵ から引用。

2.4. 小括

10種類の天然化合物の感作性について、3Rの原則に則りつつ、KE4と生体反応に着目したLLNA:DAEを用いて評価した結果、Esculetin、4-Methylesculetin、Isoscopoletin および Shikonin で皮膚感作性を示すことが新たに明らかになった。特に、化粧品に使用されている Shikonin は非常に低濃度で惹起反応を誘発し、極度感作性物質に分類された。天然化合物は安全なイメージから化粧品や医薬品など、我々の身の回りで多く使用されているが、本研究で明らかとなったように、天然化合物の中にも多くの感作性物質がある。天然化合物は様々な身近な製品に利用されており、生活に溶け込んでいるため、安全性と有効性を正確かつ迅速に評価していくことが非常に重要であると考えられる。一方で、未知の物質の安全性を評価する上では動物を用いた試験法は非常に有益なツールであるが、動物福祉の観点から可能な限り動物を用いずに安全性を評価していくことが重要であることも事実である。安全性評価に皮膚感作性試験代替法の活用を推し進めるための通知が厚生労働省から出されており²¹、今後は *in vitro* 試験法の活用も望まれている。しかし、現状では単独の *in vitro* 試験法だけでは不十分とされており、有害性発現経路に基づいた複数の試験法の組み合わせによって感作性を予測する手法が推奨されている。以上のことから、有害性発現経路の各イベントに対応する従来の *in vitro* 試験法より精度を上げつつ適用範囲の広い試験法の開発が必要になってくると考えられる。そこで、第三章以降では KE1 から KE3 までの各イベントを模倣しつつ、従来の試験法の課題点を克服した *in vitro* 試験法の開発について述べる。

2.5. 参考文献

1. S. J. Hwang, Y. -W. Kim, Y. Park, H. -J. Lee, K. -W. Kim, Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflamm. Res.*, **63**, 81–90 (2014).
2. Y. Li, J. Yao, C. Han, J. Yang, M. T. Chaudhry, S. Wang, H. Liu, Y. Yin, Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*, **8**, 167 (2016).
3. R. R. Torgerson, M. D. Davis, A. J. Bruce, S. A. Farmer, R. S. Rogers 3rd, R. Minnesota, Contact allergy in oral disease. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **57**, 315–321 (2007).
4. P. L. Minciullo, G. Paolino, M. Vacca, S. Gangemi, E. Nettis, Unmet diagnostic needs in contact oral mucosal allergies. *Clin. Mol. Allergy*, **14**, 10 (2016).
5. L. Feller, N. H. Wood, R. A. Khammissa, J. Lemmer, Review: allergic contact stomatitis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, **123**, 559–565 (2017).
6. I. Kimber, J. A. Mitchell, A. C. Grin, Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 585–586 (1986).
7. OECD, OECD guideline for the testing of chemicals No. 429. Skin sensitisation: Local Lymph Node Assay, *OECD Publishing*, Paris, France, (2010).
8. K. Yamashita, S. Shinoda, S. Hagiwara, H. Itagaki, Development of LLNA:DAE: a new local lymph node assay that includes the elicitation phase, discriminates borderline-positive chemicals, and is useful for cross-sensitization testing. *J. Toxicol. Sci.*, **39**, 147–161 (2014).
9. Y. Masamoto, Sensitization and crossreaction of simple coumarins. *Yakugaku Zasshi*, **121**, 97–103 (2001).
10. K. Yamashita, S. Shinoda, S. Hagiwara, H. Itagaki, Further development of LLNA:DAE method as stand-alone skin-sensitization testing method and applied for evaluation of relative skin-sensitizing potency between chemicals. *J. Toxicol. Sci.*, **40**, 137–150 (2015).
11. Y. Nukada, M. Miyazawa, K. Saitou, H. Sakaguchi, N. Nishiyama, Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicol. In Vitro*, **27**, 609–619

- (2013).
12. C. C. Lee, C. N. Wang, Y. T. Lai, J. J. Kang, J. W. Liao, B. L. Chiang, H. C. Chen, Y. W. Cheng, Shikonin inhibits maturation of bone marrow-derived dendritic cells and suppresses allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Br. J. Pharmacol.*, **161**, 1496–1511 (2010).
 13. Z. Fu, B. Deng, Y. Liao, L. Shan, F. Yin, Z. Wang, H. Zeng, D. Zuo, Y. Hua, Z. Cai, The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis. *BMC Cancer*, **13**, 580 (2013).
 14. X. Wang, S. Hayashi, M. Umezaki, T. Yamamoto, N. Kageyama-Yahara, T. Kondo, M. Kadowaki, Shikonin, a constituent of *Lithospermum erythrorhizon* exhibits anti-allergic effects by suppressing orphan nuclear receptor Nr4a family gene expression as a new prototype of calcineurin inhibitors in mast cells. *Chem. Biol. Interact.*, **224**, 117–127 (2014).
 15. P. L. Liao, C. H. Lin, C. H. Li, C. H. Tsai, J. D. Ho, G. C. Chiou, J. J. Kang, Y. W. Cheng, Anti-inflammatory properties of shikonin contribute to improved early-stage diabetic retinopathy. *Sci. Rep.*, **7**, 44985 (2017).
 16. M. Nagaoka Hamano, T. Yamazaki, T. Nishimura, T. Maitani, Antigenic evaluation of natural food colors (cochineal extract, lac color, and their coloring compounds) using popliteal lymph node assay. *Jap. J. Food Chem.*, **14**, 51–55 (2007).
 17. Y. Ikarashi, T. Obana, K. Shimizu, T. Katayama, T. Akiyama, M. Fujii, Evaluation of sensitization potential of carminic acid and carmine by various test methods. *The 41st Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology*, (2014).
 18. M. Vocanson, C. Goujon, G. Chabeau, M. Castelain, M. Valeyrie, F. Floc'h, C. Maliverney, A. Gard, J. F. Nicolas, The skin allergenic properties of chemicals may depend on contaminants--evidence from studies on coumarin. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **140**, 231–238 (2006).
 19. M. Vocanson, M. Valeyrie, A. Rozières, A. Hennino, F. Floc'h, A. Gard, J. F. Nicolas, Lack of evidence for allergenic properties of coumarin in a fragrance allergy mouse model. *Contact Dermat.*, **57**, 361–364 (2007).
 20. Z. Liu, Z. Liu, Y. Shi, G. Zhou, Evaluation of the immunosensitizing potential of chlorogenic acid using a popliteal lymph node assay in BALB/c mice. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 1059–1065 (2010).

21. 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長, 平成 30 年 1 月 11 日 医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組み合わせた評価体系に関するガイダンスについて. (2018)

第三章

コラーゲンビトリゲル膜を利用した細胞ベースの 皮膚感作試験法の構築

3.1. 緒言

動物を用いた皮膚感作性試験法 (Local Lymph Node Assay: LLNA¹ など) は正確性が高く、天然化合物など安全性の情報が少ない物質を評価する上で非常に重要なツールであるが、動物福祉や法規制の観点から *in vitro* 試験法および *in silico* モデルの開発も望まれている²。 *in vitro* 皮膚感作試験法の指標として、感作誘導段階の3段階目 (Key Event 3: KE3) にあたる樹状細胞の活性化を応用する試みがされてきた。KE3 を模倣した試験法の開発には、ヒト単球由来の THP-1 細胞やヒト組織球性リンパ腫由来の U937 細胞が感作性物質に暴露されると、樹状細胞の活性化を示すマーカーの発現や炎症性サイトカインの産生を誘導することが明らかにされて以来、細胞ベースの試験法開発に大きな進歩が見られている³⁻¹¹。これにより、3種類の皮膚感作性試験 (Human cell line activation test: h-CLAT、U937 cell line activation test: U-SENSTM、Interleukin-8 reporter gene assay: IL-8 Luc assay) が OECD テストガイドラインに収載された¹²。これらの試験法は KE3 を模倣して開発されており、感作性物質の暴露によって発現する CD54、CD86 や IL-8 を指標とした試験法である。

これらの試験法は優れた予測性を有しており、動物実験の代替法として推奨されている一方で、次のような欠点が残っており、完全には代替できないと考えられている。

欠点 1) 培養液に溶解しない難水溶性物質は、試験濃度で沈殿または油滴を形成し、適切に細胞に暴露されず誤判定となる可能性がある。h-CLAT ではオクタノール/水分配比率 ($\log K_{ow}$) が 3.5 以上の試験物質に対しては予測性が落ちることが明らかとなっている¹³。欠点 2) 試験物質を溶解させるために使用する Dimethyl sulfoxide (DMSO) は細胞毒性を有するため 1%未満しか使用できない。欠点 3) 感作性物質に暴露された細胞は亜毒性濃度 (60%から 90%の生存率) で

指標とするマーカーを発現亢進するため、細かな暴露濃度の設定が必要とされる。欠点4) フローサイトメーターや試験に対応したフィルターを装備したルミノメーター等の高価な機器が必要とされる。

細胞ベースの試験法における難水溶性物質に対する適用限界は、直接細胞に難水溶性物質を暴露することに起因している。このことから、直接細胞に試験物質を暴露するのではなく、膜を介して間接的に暴露することができれば、難水溶性物質への適用拡大が可能になると考えられる。間接的に様々な化学物質を暴露する手法として細胞培養用インサートで膜を介する方法があり、細胞培養、組織工学や毒性試験など幅広い用途で使用されている。使用する膜はポリカーボネート (PC) 膜、ポリエステル (PE) 膜、ポリエチレンテレフタレート (PET) 膜やポリテトラフルオトエチレン (PTFE) 膜など、様々な種類のものが存在するが、近年では生体内の結合組織に似た高密度のコラーゲン線維で形成されたコラーゲンビトリゲル膜 (collagen vitrigel membrane: CVM) を用いた細胞培養用インサートが注目を集めている。CVM は高強度性や高透明性のみならず培養細胞の成長や分化に優れた影響を与えるため、細胞の足場への利用や毒性試験など、様々な分野で活用されている¹⁴⁻²¹。

そこで、第三章では KE3 を模倣した細胞ベースの試験法の上述欠点を克服して *in vitro* 皮膚感作性試験法の精度を上げることを目的とした。CVM を用いた細胞培養用インサートを使用することで感作性物質を間接的に暴露する *in vitro* 皮膚感作性試験 (Vitrigel Skin Sensitization Test: Vitrigel-SST) の開発を試みた (図 3-1)。各欠点への具体的なアプローチは次の通りである。

化粧品や医薬品など、多くの原料に難水溶性物質が含まれており、欠点 1 が大きな課題となっている。CVM を用いた細胞培養用インサートを利用することで、細胞と試験物質を区切ることが可能となり、間接的に暴露させるため細胞への DMSO の毒性が低減し、より高濃度の DMSO の使用が可能となる (欠点 1 と 2 への対処)。さらに膜を透過して緩やかに試験物質を暴露させることにより、1 濃度で幅広い濃度の暴露が可能となる (欠点 3 への対処)。THP-1 細胞は感作性物質の暴露により IL-8 を放出するため、培養液中の IL-8 産生量を ELISA により

測定することで、フローサイトメーターやルミノメーターといった高価な機器を必要とすることなく感作性の判定が可能となる (欠点 4 への対処)。

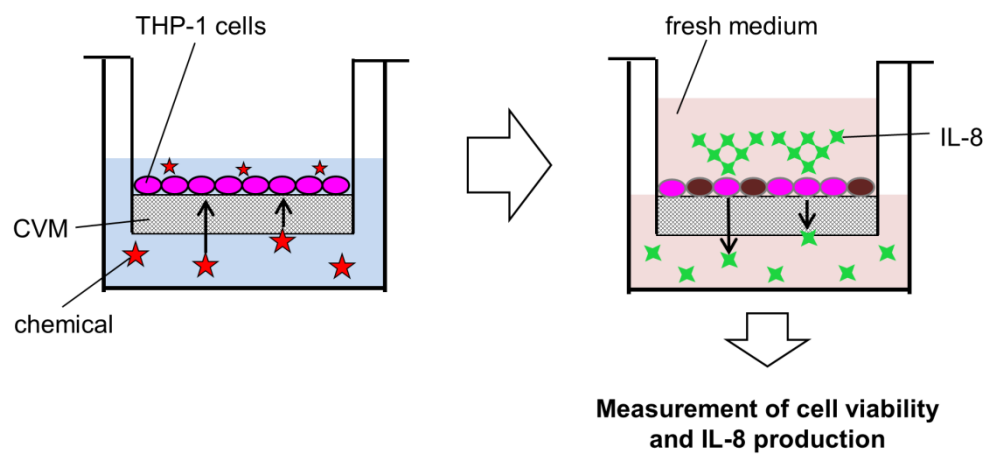


図 3-1 Vitrigel-SST の概要

3.2. 材料および方法

3.2.1. 細胞および培養方法

THP-1 細胞、胎児ウシ血清および RPMI1640 培地は ATCC 社 (American Type Culture Collection) から購入し、2-mercaptoethanol と Antibiotic-Antimycotic は Gibco 社から購入したものを使用した。THP-1 細胞は 10%胎児ウシ血清、0.05 mM の 2-mercaptoethanol および 1%Antibiotic-Antimycotic を含む RPMI1640 培地を培養液として、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。細胞密度が $1-5 \times 10^5$ cells/mL になるように、新鮮な培養液を週に 2 回添加して細胞を継代した。

3.2.2. 試験物質と試験材料

1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) 、 Cobalt chloride (CoCl₂) 、 2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT)、 Cinnamaldehyde (CA)、 Resorcinol (RC)、 10-Undecenal (10-UD)、 1-Bromohexane (BH)、 Citral (CT)、 Benzyl benzoate (BB)、 Hydroxycitronellal (HCTN)、 Aniline (AN)、 Methyl salicylate (MS)、 Isopropanol (IPA) および DMSO は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。 1,4-Phenylenediamine (PPD) 、 Hexyl salicylate (HS) 、 Bisphenol A-diglycidyl ether (BADGE) 、 Nickel sulfate (NiSO₄) および Lactic acid (LA) はシグマアルドリッチ社から購入した。 5-Methyl-2-phenyl-2-hexanal (MPH)、 DL- α -Tocopherol (TP)、 2-Ethylhexyl acylate (EHA) および Cyclamen aldehyde (CyA) は東京化成工業株式会社から購入した。 Benzalkonium chloride (BKC) は ICN Biomedicals 社から購入した。 Sodium dodecyl sulfate (SDS) はナカライテスク株式会社から購入した。各物質は購入したものをそのまま使用した。各試験物質の情報を表 3-1 に示す。

CVM チャンバーは関東化学株式会社から購入したものを使用した。ミリセルチャンバーは孔径 0.4 μ m の PET 膜のものをミリポア社から購入し、使用した。

表 3-1 試験物質の情報

Chemicals	log Kow ^a	LLNA	
		Potency category ^a	EC3 (%) ^a
2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)	2.27	Extreme	0.05
1,4-Phenyldiamine (PPD)	-0.39	Strong	0.16
Hexyl salicylate (HS)	5.06	Strong	0.18
Cobalt chloride (CoCl ₂)	0.85	Strong	0.6
Bisphenol A-diglycidyl ether (BADGE)	3.84	Moderate	1.5
2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT)	2.86	Moderate	1.7
Cinnamic aldehyde (CA)	1.82	Moderate	3.0
5-Methyl-2-phenyl-2-hexanal (MPH)	3.77	Moderate	4.4
Nickel sulfate (NiSO ₄)	NC	Moderate	4.8
Resorcinol (RC)	1.03	Moderate	5.5
10-Undecenal (10-UD)	4.12	Moderate	6.8
DL- α -Tocopherol (TP)	12.18	Moderate	7.4
2-Ethylhexyl acrylate (EHA)	4.09	Weak	10
1-Bromohexane (BH)	3.63	Weak	10
Citral (CT)	3.45	Weak	13
Benzyl benzoate (BB)	3.54	Weak	17
Cyclamen aldehyde (CyA)	3.91	Weak	22
Hydroxycitronellal (TCTN)	2.11	Weak	33
Aniline (AN)	1.08	Weak	89
Benzalkonium chloride (BKC)	2.93	NS	NC
Isopropanol (IPA)	0.28	NS	NC
Lactic acid (LA)	-0.65	NS	NC
Methyl salicylate (MS)	2.6	NS	NC
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	1.69	NS	NC

略語; Extreme: 極度感作性物質、Strong: 強度感作性物質, Moderate: 中程度感作性物質, Weak: 弱感作性物質, NS: 非感作性物質, NC: not calculated。

a データは Takenouchi (2013)¹⁴ から引用。

3.2.3. 細胞生存率と ELISA 測定

細胞生存率は同仁化学研究所から購入した Cell Counting Kit-8 (WST-8)を用いて測定した。WST-8 溶液 (10 mL) を 100 mL の細胞懸濁液を含む 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに添加し、プレートを 37°C で 3 時間インキュベートした。マイクロプレートリーダーを使用して 450 nm で吸光度を測定することで細胞生存率を測定した²²。THP-1 細胞での IL-8 産生量は R&D Systems 社から購入した IL-8 ELISA kit を用いて測定した。IL-8 ELISA kit は製造元のマニュアルに従って使用した。

3.2.4. CVM およびミリセルチャンバー内の培溶液の透過性

CVM とミリセルチャンバーを 12 ウェルプレートにセットし、各チャンバーの内側と外側に培溶液 (1 mL) を加えた後、各チャンバーを CO₂ インキュベーター内で 2 週間、静置した。

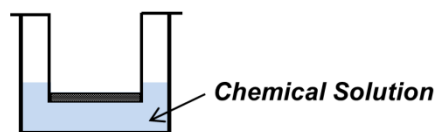
3.2.5. CVM を用いた下面暴露法による試験条件の検討

Vitrigel-SST の試験手順

Vitrigel-SST の試験方法を図 3-2 に示す。1) CVM チャンバーを空の 12 ウェルプレートにセットし、試験物質を溶解または分散させた DMSO 含有培養液を 12 ウェルプレートに 1 mL 添加し、CO₂ インキュベーター内で 10 分以上静置した。2) THP-1 細胞を各 CVM チャンバー当たり 5×10^5 cells になるように 100 μ L の細胞懸濁液を播種した。THP-1 細胞は、CVM 膜を介して試験物質に暴露した。3) THP-1 細胞を試験物質に暴露した後、CVM チャンバーを新鮮な培養液が入った 12 ウェルプレートで洗浄した。4) 洗浄後、CVM チャンバーを 1 mL の新鮮な培養液が入った 12 ウェルプレートに移した後、各 CVM チャンバー内の細胞懸濁液を 900 μ L の新鮮な培溶液で希釈し、CVM チャンバーを CO₂ インキュベーター内で 48 時間静置した。5) インキュベーション後、THP-1 細胞の生存率と、IL-8 産生量を測定した。Vitrigel-SST の最適な試験条件を決定するために、以下の実験を行った。

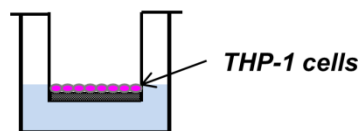
1. Preparation for test plate

- The CVM chambers are set in 12-well plates. After 1 mL test chemical solutions are added to each well, CVMs were wetted by incubating them in a CO₂ incubator for more than 10 min.



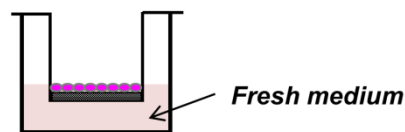
2. Chemical exposure through CVM from down side

- THP-1 cells were seeded in the CVM chambers (5.0 x 10⁵ cells/chamber in 100 μL).



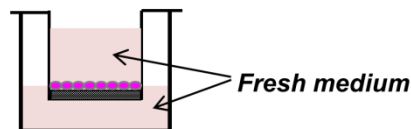
3. Wash of the chemical

- The CVM chambers were washed by transferring them to new plates, to which 1 mL fresh medium was added.



4. Post incubation

- The CVM chambers transferred to new wells containing 1 mL fresh medium.
- The cell suspension was diluted with 900 μL fresh medium.
- The CVM chambers were incubated for 48 h.



5. Measurement of cell viability and IL-8 production

- Cell viability was measured by assessing WST-8.
- IL-8 production in THP-1 cells was measured using ELISA kit.

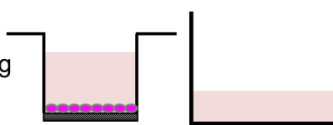


図 3-2 Vitrigel-SST による感作性物質の評価方法。Vitrigel-SST は、1) テストプレートの準備、2) 化学物質への暴露、3) 化学物質の洗浄、4) インキュベーション、5) 測定の 5 つの主要なステップで構成されている。

DMSO 含有培養液の細胞毒性

DMSO 含有培養液の細胞毒性を調査した。THP-1 細胞を 10%、25%、50% DMSO 含有培養液に 10、30 および 60 分間暴露した。次に、THP-1 細胞を 10% DMSO 含有培養液に 0.5、1、2、3、4、および 5 時間曝露した。各実験は、図 3-2 に示す手順に従って実施した。

CVM を介した試験物質溶液の透過性

CVM を介した試験物質溶液の透過性を測定した。透過性検討用の試験物質には DNCB、CA および MS を使用した。各試験物質を 10%DMSO 含有培養液に溶解し、CVM チャンバーの外側に 1 mL 添加した後、100 μ L の水を各 CVM チャンバー内に加え、10、30、60 および 120 分間暴露した。各サンプルは、CVM チャンバーの内部と外部から採取し、HPLC を用いて濃度を定量した。HPLC は Waters 社製の Waters Alliance 2487 system を使用した。カラムは逆相クロマトグラフィー用であるアジレントテクノロジー株式会社の Zorbax SB-C18 カラム ($\phi 3.5 \times 2.1$ mm) を用いた。

暴露時間と化学線量範囲の決定

代表的な感作性物質である DNCB と NiSO_4 を用いて濃度範囲と暴露時間を決定した。THP-1 細胞中の DNCB と NiSO_4 の 75%細胞生存率 (CV75) が報告されており²³、CV75 に基づいて 20 – 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で、DNCB と NiSO_4 を THP-1 細胞に 30 分および 120 分間暴露した。次に、DNCB のみ 2.3 – 84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で 30 分および 120 分間暴露した。各実験は、図 3-2 に示す手順に従って実施した。

3.3. 結果および考察

3.3.1. CVM およびミリセルチャンバーの培養液量の保持

ミリセルチャンバーはチャンバー内の培養液は 30 分で全て 12 ウェルプレート側に移動した (図 3-3)。一方、CVM チャンバーはチャンバー内の培養液量はほとんど変化なく、2 週間後でもチャンバー内の培養液は 12 ウェルプレート側に完全に移動していなかった。CVM は高密度のコラーゲン線維で構成されており、優れた透明性、高強度性および優れた高分子タンパク質の透過性を有している²⁴。このことから CVM はチャンバー内の培養液の量を維持しながら、溶質が膜を透過するため、CVM はミリセルチャンバーの PET 膜の透過特性とは異なっていることが示される。チャンバー内の培養液量が変わらず、チャンバー内での細胞培養条件を変えずに済むため、下面からの間接暴露実験に適していると考えられる。

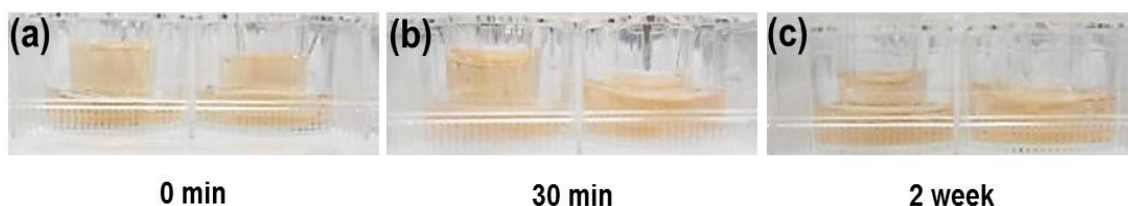


図 3-3 細胞培養用インサートにおける培養液の保持性。左：CVM チャンバー、右：ミリセルチャンバー。培養液をチャンバーの内側と外側に 1 mL 加え、CO₂ インキュベーターで 2 週間インキュベート静置した。

3.3.2. DMSO 含有培養液が細胞生存率に及ぼす影響

CVM を介して THP-1 細胞に DMSO 含有量培養液が暴露された時の DMSO 含有量に対する細胞毒性を調査した。50%DMSO 含有培養液では 10 分以内に細胞生存率が 20%以下になり、25%DMSO 含有培養液では経時的に細胞生存率を低下させた (図 3-4a)。一方で、10%DMSO 含有培養液では、3 時間まで細胞生存率が低下しなかった (図 3-4b)。0.5%DMSO 含有培養液では THP-1 細胞に対して細胞毒性がないことが報告されている²⁵。培養液中の DMSO の許容濃度は、実験条件によって異なる。本研究では 10%では 3 時間まで細胞毒性を示さなかったことから、Vitrigel-SST の試験物質の溶媒には 10%DMSO 含有培養液を選択した。

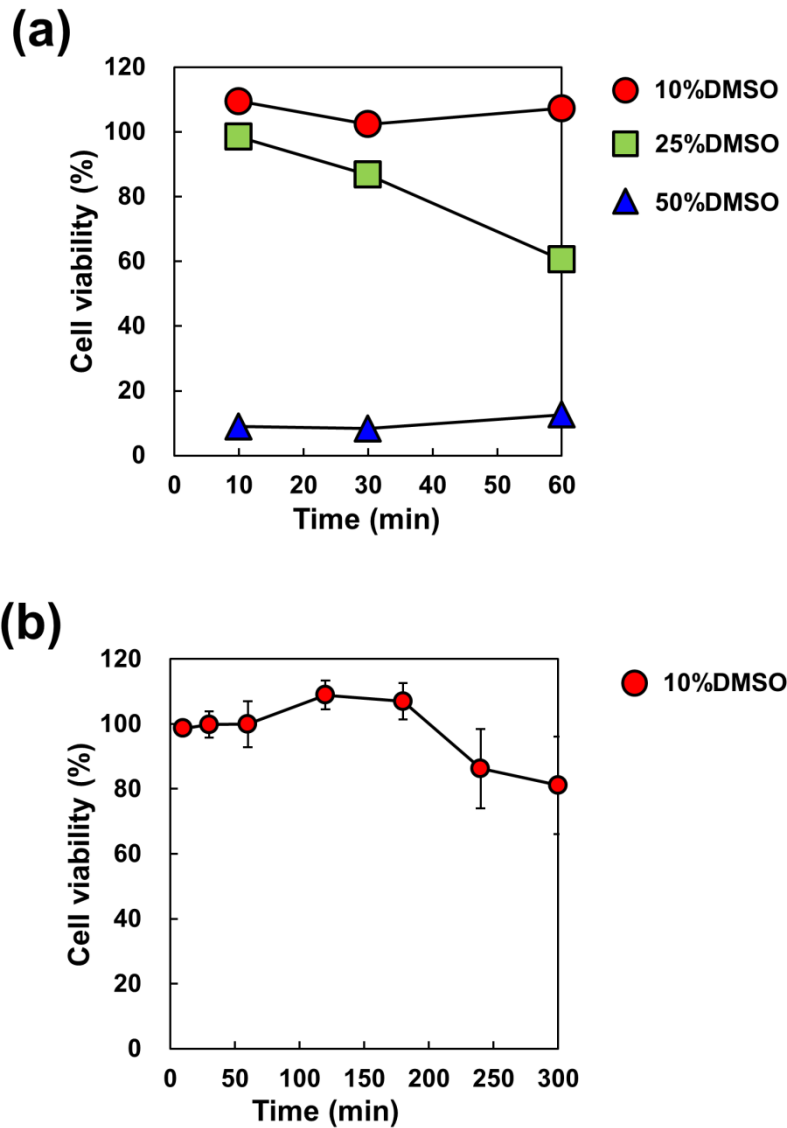


図 3-4 (a) 細胞生存率に対する DMSO の影響。THP-1 細胞を DMSO (10%、25% および 50%) 含有培養液 10、30 および 60 分間暴露した。(b) THP-1 細胞に対する 10%DMSO 含有培養液の経時的な細胞毒性。THP-1 細胞を 10%DMSO 含有培養液に 0.5、1、2、3、4 および 5 時間暴露した。

3.3.3. CVM を介した試験物質の透過性

3 種類の化学物質 (DNCB、CA および MS) を用いて、CVM の透過性を評価した。3 種類とも同様の透過性を示し、10 分間では透過率は 50% 以下であった (図 3-5)。CVM はタンパク質などの高分子量分子に対して高い透過性を示すため、一般的な感作性物質は小分子であるため、CVM を介した感作性物質の透過性は物質に依存しないと考えられる。

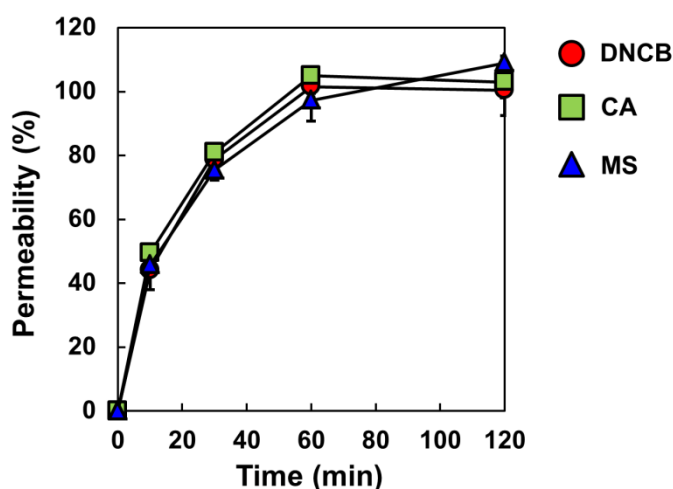


図 3-5 DNCB、CA、および MS の CVM 透過性。各化学物質の濃度は、10、30、60 および 120 分間後に CVM チャンバーの内外で測定した

3.3.4. 暴露時間と濃度範囲

実験条件を最適化するために、暴露時間と濃度範囲を評価した。DNCB と NiSO₄ は、20 – 10000 µg/mL の濃度範囲で 30 分と 120 分で試験した。NiSO₄ は、30 分と 120 分で幅広い濃度範囲で IL-8 産生量を増加させた (図 3-6a)。一方、DNCB は毒性が非常に強いため、20 µg/mL でも THP-1 細胞が死滅し、IL-8 産生が誘導されなかった (図 3-6b)。CVM を介した試験物質の透過性を評価した結果から、60 分でチャンバー内部とチャンバー外部で化学物質濃度が平衡化されており、DNCB と同程度の細胞毒性を有する化学物質では 60 分以上暴露すると、THP-1 細胞が死滅し、IL-8 産生が観察されない可能性があることを示している。そこで、DNCB のみ濃度範囲を 2.3 – 84 µg/mL に下げて再試験した結果、暴露量が 7.6 µg/mL と 26 µg/mL で IL-8 産生量が 10 倍以上増加した (図 3-7)。これらの

結果は、30 分の短時間暴露が Vitrigel-SST に適していることを示唆している。

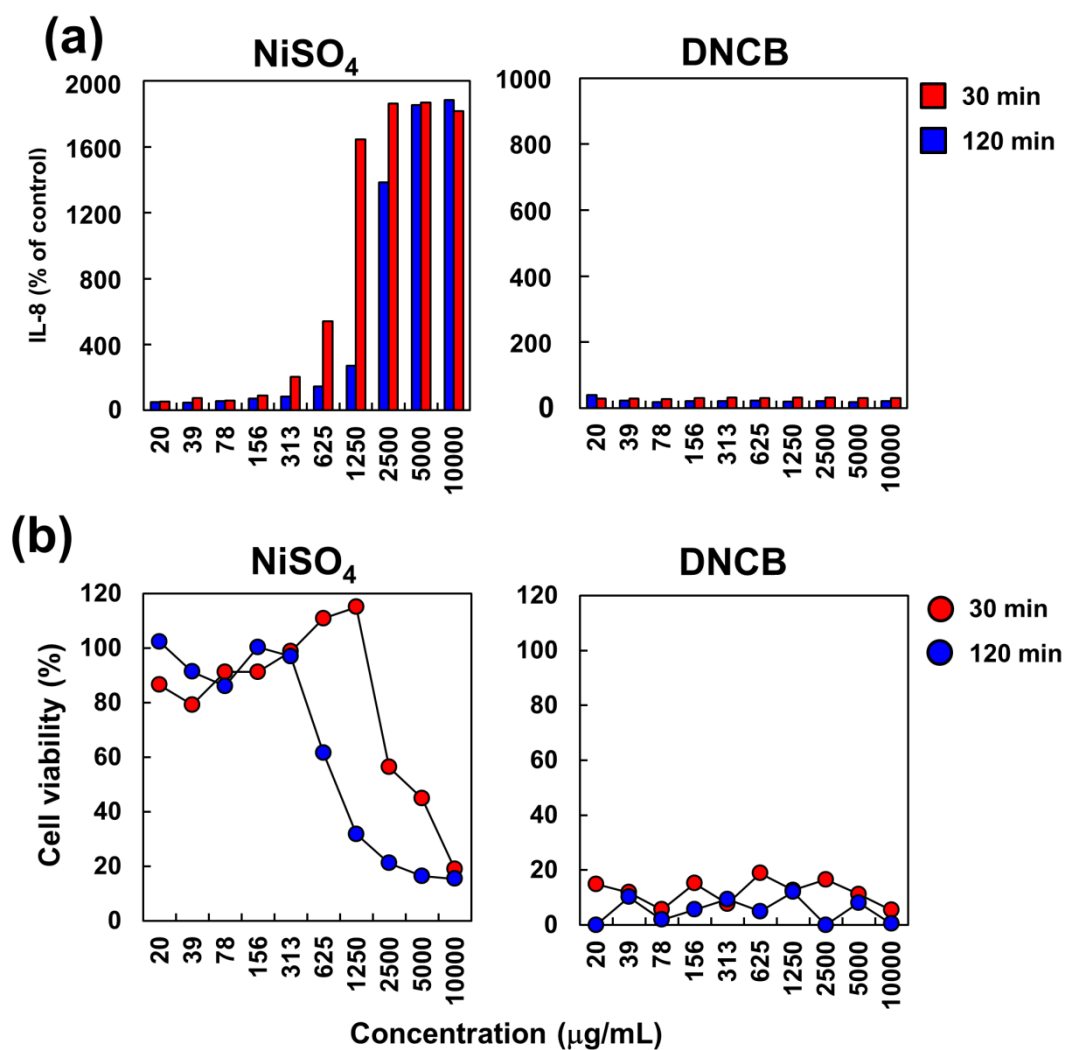


図 3-6 (a) NiSO₄ および DNCB によって誘導される THP-1 細胞における IL-8 産生量。(b) THP-1 細胞を NiSO₄ および DNCB で暴露した際の細胞生存率。

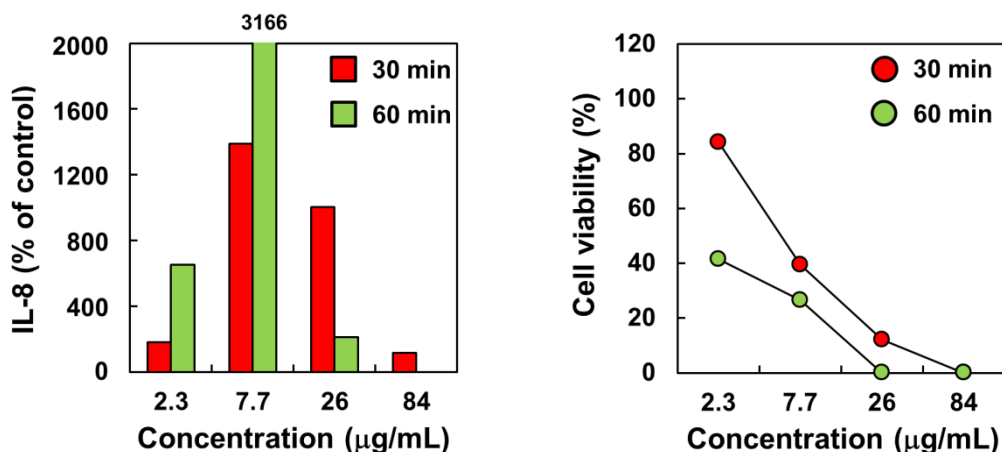


図 3-7 DNCB によって誘導される THP-1 細胞における IL-8 産生量と細胞生存率。棒グラフは IL-8 産生量、ドットグラフは細胞生存率を表している。

3.3.5. Vitrigel-SST の再現性

Vitrigel-SST の再現性を検討するために、4 種類の化学物質 (DNCB、NiSO₄、CT および MS) を用いて、3 回繰り返し実験を実施した。各試験物質で暴露した後の IL-8 産生量と細胞生存率は、各濃度での 3 つのチャンバーの平均値とした (図 3-8)。各試験物質の IL-8 産生量の変動係数は 35% 未満であった。この結果は Vitrigel-SST での測定誤差は非常に小さいため、1 チャンバーで感作性物質の評価が可能であることを示している。

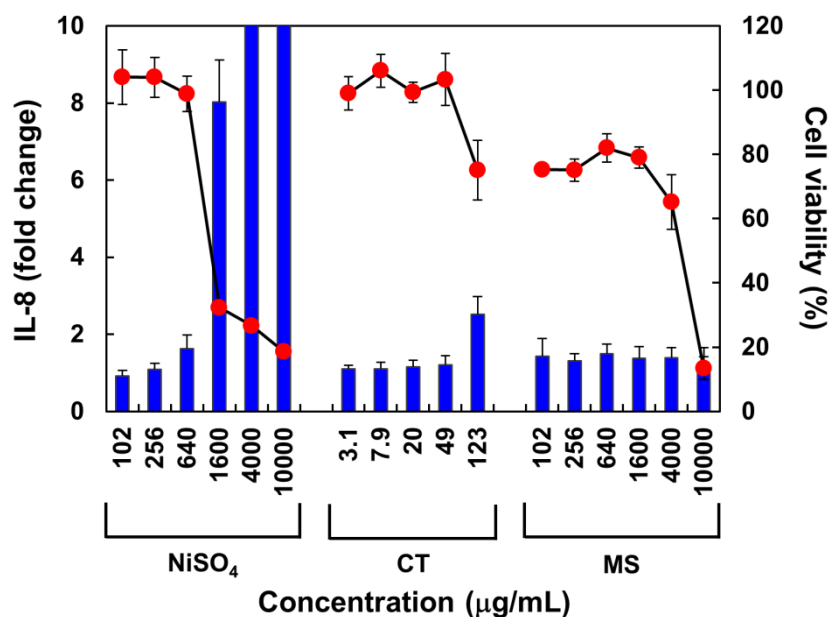


図 3-8 Vitrigel-SST の測定誤差の確認。4 種類の化学物質 (3 種類の感作性物質: DNCB、NiSO₄ および CT と 1 種類の非感作性物質: MS) によって誘導される THP-1 細胞における IL-8 産生量。THP-1 細胞を各化学物質で 30 分間暴露した。棒グラフは IL-8 産生量を示し、ドットグラフは細胞生存率を表している。

3.3.6. Vitrigel-SST を使用した感作性物質のスクリーニング

Vitrigel-SST を用いて log Kow 値が 3.5 以上の難水溶性物質を含む 24 種類の化学物質 (19 種類の感作性物質と 5 種類の非感作性物質) を試験した結果、14 種類の感作性物質が最大 IL-8 産生量 (IL-8_{MAX}) を 2 倍以上増加させた (図 3-9)。特に水溶性化学物質 (DNCB、PPD、2-MBT、CA、NiSO₄、RC および HCTN) は、IL-8 産生量を 5 倍以上増加させ、用量依存的に IL-8 産生を誘導した。難水溶性物質 (BADGE、MPH、10-UD、TP および CyA) では IL-8 産生量を 2 倍以上増加させた。h-CLAT では 10-UD、TP、BB、BH および CyA は陰性と判定されているが、Vitrigel-SST では 10-UD、TP、および CyA で IL-8 産生が誘導された。このことから Vitrigel-SST は、従来の細胞ベースの試験法で適用困難だった難水溶性物質も正確に予測できると考えられる。一方で 4 種類の感作性物質 (EHA、HS、BB および BH) では IL-8 産生量が増大しなかった。HS と BB は接触アレルギーを誘発することがほとんど見られないため、LLNA における結果は偽陽性である可能性が高いとされている²⁶。

5種類の非感作性物質のうち4種類はIL-8産生量を増大させなかったが、BKCのみIL-8産生量を1.9倍増加させた。KE3を模倣し、同じIL-8産生を指標としているIL-8 Luc assayとVitrigel-SSTの結果を比較した結果、DNCB、PPD、2-MBT、NiSO₄およびCTの結果は一致していた¹¹。対照的にBKCはIL-8 Luc assayでは非感作性物質と判定されているが、Vitrigel-SSTではIL-8産生を著しく誘導した。BKCは、多くの皮膚感作試験で非感作物質として報告されているが²⁷、再構築ヒト表皮モデルではIL-8産生を増加させている^{28,29}。また、BKCがヒトに対して非常に弱い皮膚感作を有すると報告されていることから²⁶、BKCはLLNAにより非感作性物質に分類されているが、実際は感作性物質であると考えられる。以上のことから、Vitrigel-SSTにおいてBKCがIL-8産生を誘導したことは、本試験法がBKCの感作性を正確に評価できていると示唆している。

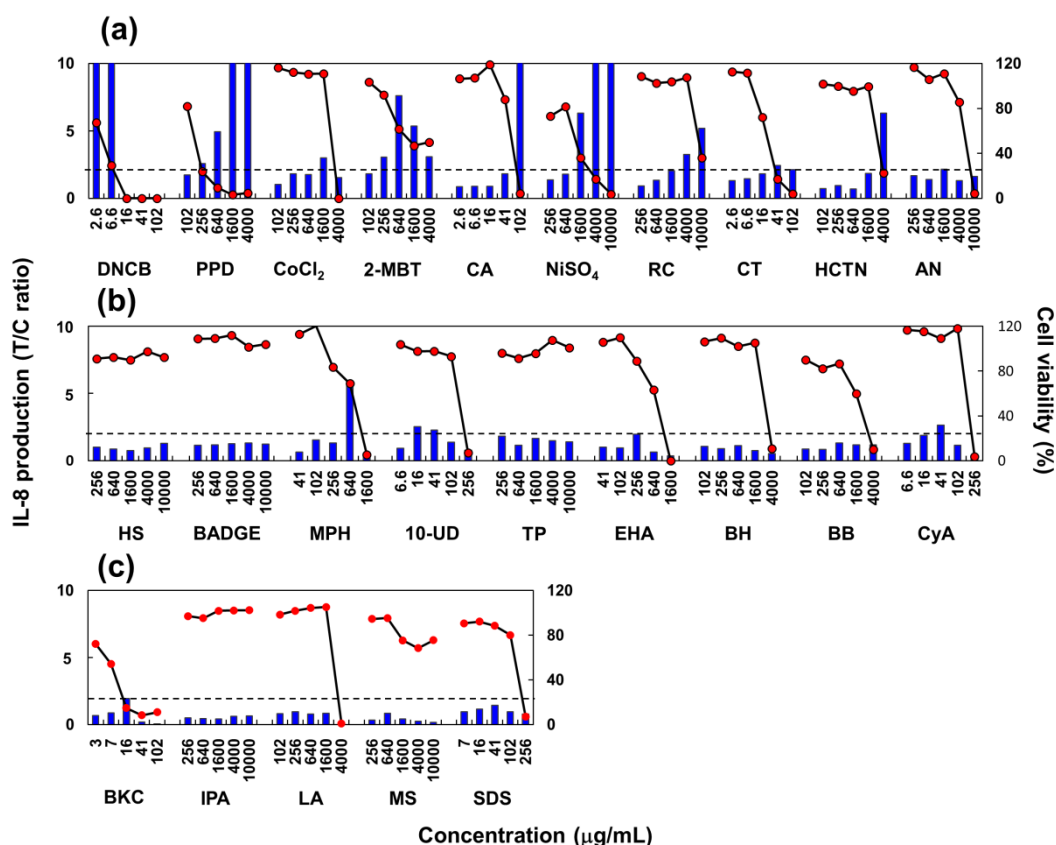


図 3-9 (a) 水溶性の感作性物質、(b) 難水溶性の感作性物質および (c) 非感作性物質に暴露された THP-1 細胞における IL-8 産生量。棒グラフは IL-8 産生量、ドットグラフは細胞生存率を表している。

3.4. 小括

第三章では、KE3 を模倣した従来の細胞ベースの皮膚感作性試験の課題点であった難水溶性物質を評価するために、CVM を使用した *in vitro* 皮膚感作性試験法 (Vitrigel-SST) を開発した。Vitrigel-SST を用いて、難水溶性物質を含む 24 種類の化学物質を評価することにより、このアプローチの有用性を実証した。Vitrigel-SST は難水溶性物質でも正確に評価することができるため、従来の細胞ベースの試験法より適用範囲が広く、様々な化合物の感作性を迅速に評価することが可能となった。さらに ELISA により感作性を判定しているため、高価な機器を必要とせず、より簡便かつ迅速に大量のデータを取得することが可能である。

以上のことから、従来の KE3 を模倣した試験法の適用範囲を拡大しつつ、高価な機器設備を必要とせず簡便かつハイスループットな試験法を開発することができた。CVM を利用した下面暴露を利用すれば、難水溶性物質のみならずローションやクリームなども評価が可能であると考えられ、非常に汎用性の高い手法になると期待できる。一方で新たな課題も見つかった。細胞ベースの試験法では、感作性物質に暴露されてから指標となるマーカーの発現誘導までに様々なプロセスが発生し、その間はブラックボックスであるため、結果の考察が困難になる可能性がある。このことからブラックボックスを小さくするために、より分子レベルで感作性を評価していくことで、より感作の要因の理解をもたらし、普遍的な予測が可能になると考える。

3.5. 参考文献

1. I. Kimber, J. A. Mitchell, A. C. Grin, Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 585–586 (1986).
2. P. Aeby, T. Ashikaga, S. Bessou-Touya, A. Schepky, F. Gerberick, P. Kern, M. Marrec-Fairley, G. Maxwell, J. –M. Ovigne, H. Sakaguchi, K. Reisinger, M. Tailhardat, S. Martinozzi-Teissier, P. Winkler, Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa’s research and method development program. *Toxicol. In Vitro*, **24**, 1465–1473 (2010).
3. T. Ashikaga, Y. Yoshida, M. Hirota, K. Yoneyama, H. Itagaki, H. Sakaguchi, M. Miyazawa, Y. Ito, H. Suzuki, H. Toyoda, Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 763–773 (2006).
4. N. Ade, S. Martinozzi-Teissier, M. Pallardy, F. Rousset, Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of apoptosis. *J. Immunotoxicol.*, **3**, 189–197 (2006).
5. F. Python, C. Goebel, P. Aeby, Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **220**, 113–124 (2007).
6. M. Miyazawa, Y. Ito, Y. Yoshida. H. Sakaguchi, H. Suzuki, Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro*, **21**, 428–437 (2007).
7. M. Mitjans, B. Viviani, L. Lucchi, C. L. Galli, M. Marinovich, E. Corsini, Role of p38 MAPK in the selective release of IL-8 induced by chemical allergen in naïve THP-1 cells. *Toxicol. In Vitro*, **22**, 386–395 (2008).
8. M. Miyazawa, Y. Ito, N. Kosaka. Y. Nukada. H. Sakaguchi, H. Suzuki. N. Nishiyama, Role of TNF- α and extracellular ATP in THP-1 cell activation following allergen exposure. *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 71–83 (2008).
9. Y. Nukada, M. Miyazawa, N. Kosaka, Y. Ito, H. Sakaguchi, N. Nishiyama, Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor- α production. *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 175–185 (2008).

10. G. G. dos Santos, J. Reinders, K. Ouwehand, T. Rustemeyer, R. J. Scheper, S. Gibbs, Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **236**, 372–382 (2009).
11. T. Takahashi, Y. Kimura, R. Saito, Y. Nakajima, Y. Ohmiya, K. Yamasaki, S. Aiba, An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol. Sci.*, **124**, 359–369 (2011).
12. OECD. Key event-based test guideline No. 442E. *In vitro* skin sensitization assays addressing the key event of activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation. *OECD Publishing*, Paris (2018).
13. O. Takenouchi, M. Miyazawa, K. Saito, T. Ashikaga, H. Sakaguchi, Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic chemicals with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.*, **38**, 599–609 (2013).
14. K. H. Stenzel, A. L. Rubin, W. Yamayoshi, T. Miyata, T. Suzuki, T. Sohde, M. Nishizawa, Optimization of collagen dialysis membranes. *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Org.*, **17**, 293–298 (1971).
15. J. Yang, S. Nandi, Growth of cultured cells using collagen as substrate. *Int. Rev. Cytol.*, **81**, 249–286 (1983).
16. T. Takezawa, K. Ozaki, A. Nitani, C. Takabayashi, T. Shimo-Oka, Collagen vitrigel: A novel scaffold that can facilitate a three-dimensional culture for reconstructing organoids. *Cell Transplant.*, **13**, 463–473 (2004).
17. T. Uchino, T. Takezawa, Y. Ikarashi, Reconstruction of three-dimensional human skin model composed dendritic cells, keratinocytes and fibroblasts utilizing a handy scaffold of collagen vitrigel membrane. *Toxicol. In Vitro*, **23**, 333–337 (2009).
18. T. Takezawa, K. Nishikawa, P. C. Wang, Development of a human corneal epithelium model utilizing a collagen vitrigel membrane and the changes of its barrier function induced by exposing eye irritant chemicals. *Toxicol. In Vitro*, **25**, 1237–1241 (2011).
19. T. Uchino, T. Takezawa, Y. Ikarashi, T. Nishimura, Development of an alternative test for skin sensitization using a three-dimensional human skin model consisting of dendritic cells, keratinocytes and fibroblasts. *AATEX*, **16**, 1–8 (2011).

20. H. Yamaguchi, H. Kojima, T. Takezawa, Vitrigel-Eye Irritancy Test Method Using HCE-T Cells. *Toxicol. Sci.*, **135**, 347–355 (2013).
21. H. Yamaguchi, T. Takezawa, Fabrication of a Corneal Model Composed of Corneal Epithelial and Endothelial Cells via a Collagen Vitrigel Membrane Functioned as an Acellular Stroma and Its Application to the Corneal Permeability Test of Chemicals. *Drug Metab. Dispos.*, **46**, 1684–1691 (2018).
22. H. Tominaga, M. Ishiyama, F. Ohseto. K. Sasamoto, T. Hamamoto, K. Suzuki, M. Watanabe, A water-soluble tetrazolium salt for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.*, **36**, 47–50 (1999).
23. Y. Nukada, T. Ashikaga, M. Miyazawa, M. Hirota, H. Sakaguchi, H. Sasa, N. Nishiyama, Prediction of skin sensitization potency of chemical by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro*, **26**, 1150–1160 (2012).
24. T. Takezawa, A. Nitani, T. Shimo-Oka, Y. Takayama, A protein-permeable scaffold of a collagen vitrigel membrane useful for reconstructing crosstalk models between two different cell types. *Cells Tissues Organs*, **185**, 237–241 (2007).
25. Y. M. Lim, S. J. Moon, S. S. An, S. J. Lee, S. Y. Kim, I. S. Chang, K. L. Park, H. A. Kim, Y. Heo, Suitability of macrophage inflammatory protein-1beta production by THP-1 cells in differentiating skin sensitizers from irritant chemicals. *Contact Dermatitis*, **58**, 193–198 (2008).
26. D. A. Basketter, N. Alépée, T. Ashikaga, J. Barroso, N. Gilmour, C. Goebel, J. Hibatallah, S. Hoffmann, P. Kern, S. Martinozzi-Teissier, G. Maxwell, K. Reisinger, H. Sakaguchi, A. Schepky, M. Tailhardat, M. Templier, Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis*, **25**, 11–21 (2014).
27. Y. Nukada, M. Miyazawa, S. Kazutoshi, H. Sakaguchi, N. Nishiyama, Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicol. In Vitro*, **27**, 609–618 (2013).
28. D. Urbisch, A. Mehling, K. Guth, T. Ramirez, N. Honarvar, S. Kolle, R. Landsiedel, J. Jaworska, P. S. Kern, F. Gerberick, A. Natsch, R. Emter, T. Ashikaga, M. Miyazawa, H. Sakaguchi, Assessing skin sensitization hazard in mice and men

using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharm.*, **71**, 337–351 (2015).

29. A. Coquette, N. Berna, A. Vandebosch, M. Rosdy, B. De Wever, Y. Poumay, Analysis of interleukin-1a (IL-1a) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. *Toxicol. In Vitro*, **17**, 311–321 (2003).

第四章

外的因子に応答して構造変化を誘起する

人工金属タンパク質の構築

—KE2 を模倣した皮膚感作性試験法の構築に向けて—

4.1. 緒言

感作の有害性発現経路の 2 段階目の Key Event (KE2) に関与している Kelch-like ECH-associated protein (Keap1) は感作性物質のような親電子分子をセンシングするタンパク質として知られている。Keap1 中のシステイン残基に親電子分子が結合すると、Keap1 に構造変化が生じ、転写活性因子の Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の捕捉を解除することで、Antioxidant response element (ARE) を介した生体防御遺伝子を発現させる¹⁻³。KE2 を模倣した試験法としては、ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ test method (KeratinoSens™) と ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method (LuSens) が OECD テストガイドラインに収載されている。これらの試験法は ARE 制御下でルシフェラーゼを発現するベクターを導入した細胞を用いることで、Nrf2-Keap1-ARE pathway の活性化をレポーター遺伝子で測定する試験法である。

これらの試験法は国際的に標準化された *in vitro* 試験法として認知されているが、第三章で述べたように指標となるマーカーの発現誘導までに様々なプロセスを経由し、ブラックボックスが発生してしまう。KE2 における表皮角化細胞の活性化は Keap1 の構造変化を起点に始まることから、タンパク質の構造変化をとらえる測定系が構築できれば、細胞系を脱却しつつ KE2 を模倣できるため、より普遍的な予測が可能になると考える。そのためには、外的因子により構造変化を生じる人工タンパク質モデルの構築が必要となる。

人工タンパク質を構築する手法として、金属錯体と短いペプチド鎖を用いた、Metal-Assisted Modular Proteins (MAMP) が古くから利用されている。これは金属イオンを中心にペプチド鎖を非常に近接して集積させることによってランダムコイル構造からのフォールディングに存在する実質的なエネルギー障壁を減少

させることが可能となり、短いペプチド鎖でもタンパク質のような立体構造をとることが可能となる。そこで、MAMP に基づいて外的因子によって構造変化を生じる人工金属タンパク質モデルを構築するためには次のようなキレート化合物が必要と考えられる。1) ペプチド鎖に容易に修飾が可能。2) 金属イオンと高い反応性を持つ。3) 外的因子により大きな構造変化を生じる。

Dithiocarbamate (DTC) はキレート試薬として金属イオンの溶媒抽出などの分析操作に用いられてきた。DTC はアミノ酸に容易に修飾でき、金属イオンと高い反応性を有することから、近年ではナノ集合体を形成させる鋳型としても利用されている。また、DTC 鉄錯体は一酸化窒素 (NO) と反応して八面体である鉄 3 価錯体から正方錐型である鉄 2 価錯体へ大きく構造を変化させることが知られている。これらの背景を踏まえて 1) から 3) を満たすキレート化合物として DTC を選択した。

第四章では、Keap1 のような特定の外的因子に応答して、自身の構造変化を誘起するスイッチ機能を有した人工金属タンパク質モデルの構築を目的に、ペプチド-DTC 鉄錯体 [Fe-peptide(DTC)₃] の構築を試みた。Fe-peptide(DTC)₃ の構造としては、多くの天然タンパク質に見られる helix bundle 構造をモチーフとし、錯形成とともに構造内部に疎水性空間が生じる three helix bundle 構造を形成する構造体の設計を行った。

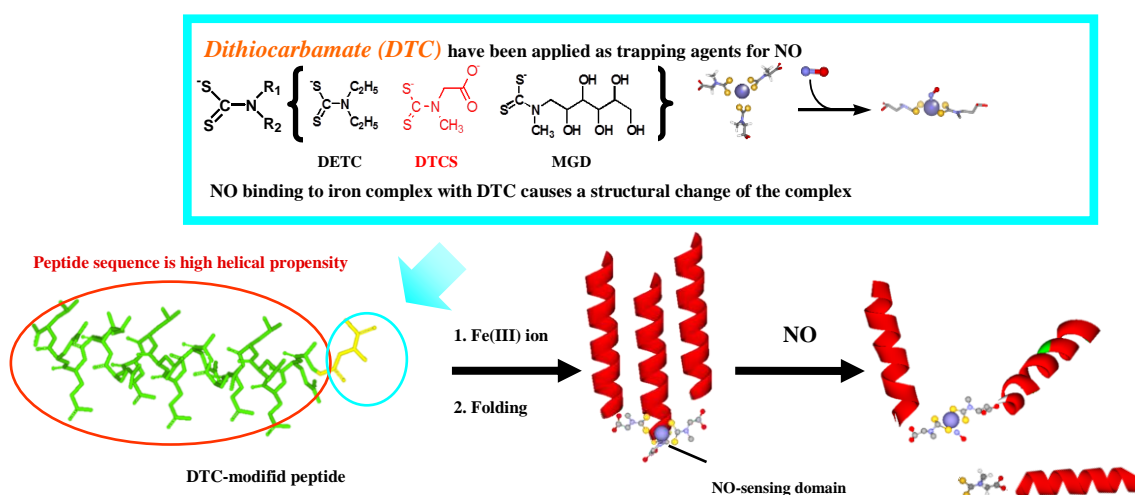


図 4-1 ペプチド-DTC 鉄錯体を用いた人工金属タンパク質モデル

4.2. 材料および方法

4.2.1. 合成試薬

固定化樹脂は渡辺化学工業株式会社から購入した Fmoc-NH-SAL-PEG resin を使用した。ペプチド合成には渡辺化学工業株式会社から購入した *N*- α -Fmoc-alanine (Fmoc-Ala-OH)、*N*- α -Fmoc-leucine (Fmoc-Leu-OH)、*N*- α -Fmoc-sarcosine (Fmoc-Sar-OH)、*N*- α -Fmoc-glutamic acid γ -*t*-butyl ester (Fmoc-Glu(OtBu)-OH)、*N*- α -Fmoc-*N*- ω -trityl-glutamine (Fmoc-Gln(Trt)-OH) および *N*- α -Fmoc- β -(1-pyrenyl)-alanine (Fmoc-Ala(1-Pyn)-OH) を使用した。縮合剤には渡辺化学工業株式会社から購入した 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU)、[2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate] (HBTU) と 1-hydroxy benzotriazole monohydrate (HOBt) を使用した。Cytochrome *c*、Aprotinin、Insulin chain A、Oxidized、Insulin chain B、Oxidized および Vitamin B12 は sigma 社から購入したものを使用した。Iron (III) chloride、6-hydrate (FeCl₃·6H₂O) と Guanidine hydrochloride はキシダ化学株式会社から購入したものを使用した。1-hydroxy-2-oxo-(3-aminopropyl)-3-isopropyl-1-triazene (NOC5) は株式会社同仁化学研究所から購入したものを使用した。

4.2.2. 測定機器

HPLC は Waters 社製の Alliance HPLC Waters600 と 2487 紫外可視光 (UV/Vis) 検出器を使用した。MALDI-TOF MS はブルカー社製の Autoflex III を使用した。紫外可視分光光度計は JASCO 社製の V-670 を使用した。円二色性 (CD) 分散計は JASCO 社製の J-820 とペルチェ式温度制御装置 PTC-423 を使用した。蛍光光度計は JASCO 社製の FP-6500 spectrofluorometer とペルチェ式温度制御装置 ETC-273T を使用した。電子常磁性共鳴 (EPR) は JEOL 社製の JES-FA100 を使用した。

4.2.3. サルコシン含有ペプチドおよび蛍光標識ペプチドの合成

Sar-peptide の合成 (H-Sar-AEQLLQEAEQLLQEA-NH₂)

サルコシン含有ペプチド (Sar-peptide) は、Fmoc-NH-SAL-PEG resin に Fmoc 法を用いて固相合成を行った(図 4-3)⁸。resin に導入可能なペプチドの量に対して 3 当量の Fmoc-amino acid (AA)-OH と HATU、HBTU および HOBt を加え、アミノ酸を順番にカップリングさせた。切断溶液 [*m*-cresol/thioanisole/TFA] を加え、室温で 1 時間インキュベートすることで、樹脂からペプチドを切り出し、アミノ酸側鎖保護基の脱保護を行い、エーテル沈殿法により粗ペプチドを得た。得られた粗ペプチドは、Sephadex G-25 を使い、0.05%NH₄OH を移動相としてオープンカラムにより粗精製した。粗精製したペプチドを HPLC により精製した。カラムは逆相クロマトグラフィー用カラムである X-bridge Shield RP18 (φ4.6 × 150 mm) を用いた。移動相には 0.03%NH₄H 含有 Acetonitrile (ACN) と 0.03%NH₄H 含有 H₂O を用いた。グラジエント条件は 0.03%NH₄H 含有 ACN ; 0% (0 min) → 60% (5 min) → 100% (30 min) で行った。流速は 1.0 mL/min で送液し、220 nm に設定した検出器でモニターした。精製したペプチドの同定は MALDI-TOF MS により行った。

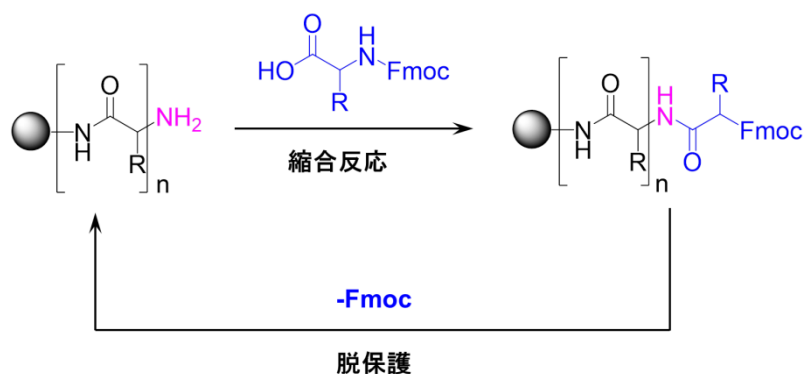


図 4-3 Fmoc 固相合成法の合成スキーム

Pyn 修飾 peptide の合成 (H-Sar-AEQLLOEAEQLLOEA(pyn)-NH₂)

サルコシン含有 Pyn 修飾ペプチド [Sar-peptide(Pyn)] は Fmoc 法を用いて固相合成を行い、Sar-peptide と同様の合成法、精製法を行った。精製したペプチドの同定は MALDI-TOF MS により行った。

4.2.4. ペプチド-DTC およびペプチド-DTC 鉄錯体の合成

合成した各ペプチドに 25%NH₄OH を加えて pH を 9-11 に調整した後、0~10 °C で反応溶液 [Carbon disulfide (CS₂) /Ethanol (EtOH) (20:80, v/v)] を加え 3 時間反応させることでペプチドの N 末端を DTC 化した (peptide-DTC)。その後、Diethylether を加えて攪拌した後、水相のみを取り出し、凍結乾燥することで peptide-DTC を得た。peptide-DTC を 20 mM の 30%EtOH 含有 Tris-HCl buffer (pH 7.6) に溶解し、1 mM の FeCl₃·6H₂O (EtOH 溶媒) を peptide-DTC:Fe = 3:1 のモル比の割合で加え、ペプチド-DTC 鉄錯体 [Fe(peptide-DTC)₃] を形成させた。錯形成及び構造は UV-Vis 測定、CD 測定、ゲル濾過クロマトグラフィーにより確認した。

4.2.5. ペプチド-DTC 鉄錯体と NO の反応

Fe(peptide-DTC)₃ を 20 mM の 60%EtOH 含有 Tris-HCl buffer (pH 7.6) に溶解し、1 mM に調製した。調製した Fe(peptide-DTC)₃ に 1 mM の NOC5 (0.1 mM NaOH 溶媒) を加え、室温で反応させることで NO-Fe(peptide-DTC)₂ を得た。Fe(peptide-DTC)₃ と NO の反応は EPR、および Fe(peptide-DTC)₃ と NO の反応後の構造変化は蛍光光度測定により確認した。

4.3. 結果および考察

4.3.1. $\text{Fe}(\text{peptide-DTC})_3$ の設計および合成

DTC 配位子の合成および錯形成の確認

ペプチド配列は α -helix 性の高い配列を参考に設計した⁹。この配列は α -helix 構造を形成しやすく、アミノ基が N 末端にしか存在しないため、二級アミンと CS_2 から合成する DTC が選択的に N 末端に形成される。ペプチド配位子の合成および錯形成確認は UV-Vis により行った。peptide-DTC のスペクトルでは 250 と 280 nm 付近にかけてペプチドには見られない特徴的なダブルマキシマムが観測された (図 4-4a)。これは C-S 結合由来の吸収であり、ペプチドの N 末端にある二級アミンに CS_2 が反応することで、DTC 化したためと考えられる。また $\text{Fe}(\text{peptide-DTC})_3$ では 500 と 600 nm に Sar-peptide および peptide-DTC のスペクトルには見られない吸収が観測された (図 4-4b)。このスペクトルは DTCS 鉄錯体由来のスペクトルであり、 Fe^{3+} に peptide-DTC が結合することによって $\text{Fe}(\text{peptide-DTC})_3$ が形成されたことを示す。

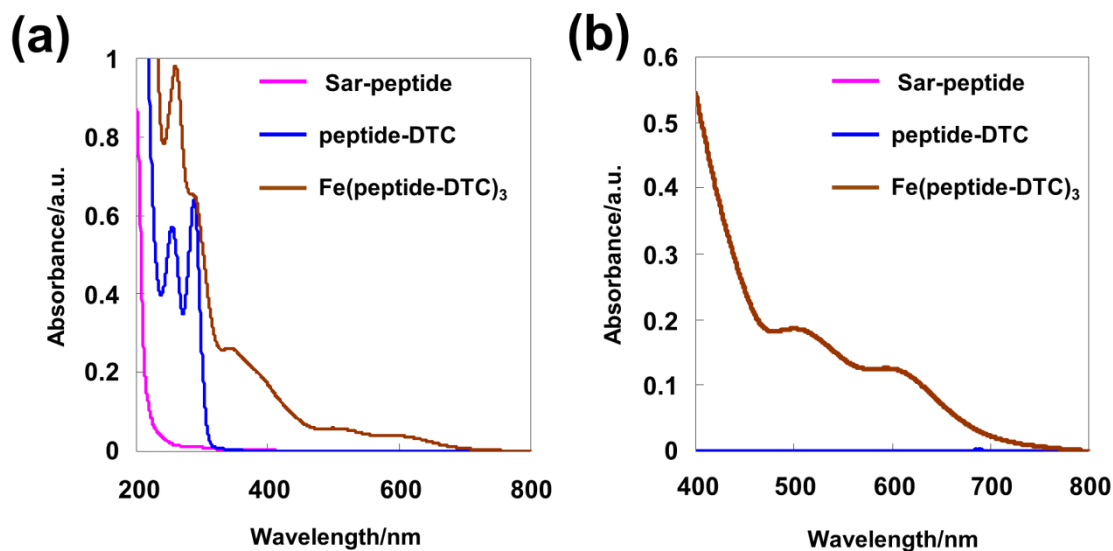


図 4-4 (a) Sar-peptide、peptide-DTC および $\text{Fe}(\text{peptide-DTC})_3$ の UV スペクトル。(b) 400 nm~800 nm の拡大図

peptide-DTC および Fe(peptide-DTC)₃ の二次構造の確認

peptide-DTC と Fe(peptide-DTC)₃ 錯体の二次構造を CD 測定により確認した結果、peptide-DTC と Fe(peptide-DTC)₃ の両方とも α -helix 構造に特有のスペクトルが観測された (図 4-5a)。測定した CD スペクトルを元に、ヘリックス含有率を算出したところ、peptide-DTC では 33%、Fe(peptide-DTC)₃ では 65%であった。

$$[\theta] = \frac{\theta}{10CL} \quad (1)$$

$$f_{\alpha} = -\frac{[\theta]_{222} + 2340}{30300} \quad (2)$$

ここで、 θ はモル楕円率 (mdeg)、C はモル濃度 (mol/l)、L はセルの光路長 (cm)、 $[\theta]$ は分子楕円率 (deg cm² dmol⁻¹)、 f_{α} はヘリックス含有率 (%) である。

図 4-5b に peptide-DTC および Fe(peptide-DTC)₃ のグアニジン変性曲線を示す。フィッティングは以下の式により算出した。

$$f_u = \frac{\exp\left[-\frac{\Delta G(\text{H}_2\text{O})}{RT} - \frac{m[\text{D}]}{RT}\right]}{1 + \exp\left[-\frac{\Delta G(\text{H}_2\text{O})}{RT} - \frac{m[\text{D}]}{RT}\right]} \quad (3)$$

(3) 式より p-DTC と Fe(p-DTC)₃ の $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ を算出したところ、peptide-DTC は $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 7.65 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、Fe(p-DTC)₃ は $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 9.25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ となった。錯形成による $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ 値の増大は、錯形成によってペプチド鎖が集合し、ペプチド鎖の疎水性残基が溶媒を排除して内側に折りたたまれることで、より安定な α -helix が形成されたためと考えられる。

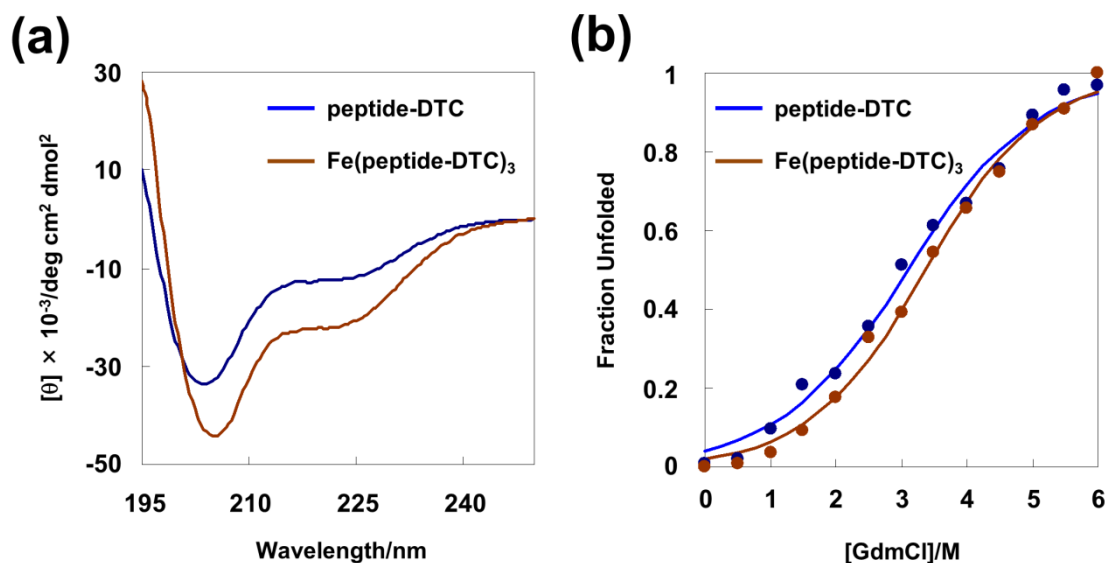


図 4-5 (a) 30%EtOH 含有 20 mM Tris-HCl buffer 溶媒中の peptide-DTC および Fe(peptide-DTC)₃ の CD スペクトル。(b) 30%EtOH 含有 20 mM Tris-HCl buffer 溶媒中の peptide-DTC および Fe(peptide-DTC)₃ の塩酸グアニジン変性曲線。

peptide-DTC および Fe(peptide-DTC)₃ の分子量の確認

peptide-DTC および Fe(peptide-DTC)₃ はゲル濾過クロマトフィーにより得られた。SuperdexTM Peptide 10/300 GL カラムを用い、移動相には 20 mM Tris-HCl buffer を用いた。検出波長は 220 nm と 280 nm、流速は 0.4 mL/min で測定を行った。peptide-DTC は 29 分、Fe(peptide-DTC)₃ は 25 分に溶出された。標準タンパク質を用いた検量線から分子量を推定した結果 (図 4-6)、peptide-DTC と Fe(peptide-DTC)₃ は理論値との差は peptide-DTC は 81Da、Fe(peptide-DTC)₃ は 235Da と大きな差はなかった。このことから、peptide-DTC に鉄を加えることで錯形成し、1 本鎖ペプチドが 3 本鎖ペプチドになったことが示唆される。

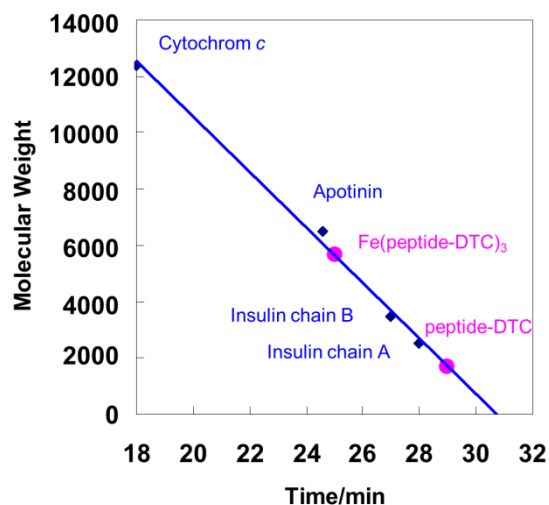


図 4-6 peptide-DTC および $\text{Fe}(\text{peptide-DTC})_3$ の検量線。全てサンプルは SuperdexTM Peptide 10/300 GL カラムを用い、移動相の 20 mM Tris-HCl buffer を流速 0.4 mL/min で注入し、220 nm および 280 nm で検出した。

$\text{Fe}(\text{peptide-DTC})_3$ による NO センシング

$\text{Fe}(\text{peptide-DTC})_3$ と NO を反応させた後、EPR 測定を行った結果、EPR スペクトルに特徴的な 3 本線のシグナルが得られた (図 4-7)。これは、NO 中の窒素の核スピン $I=1$ による超微細構造であり、 $\text{Fe}(\text{peptide-DTC})_3$ に NO が結合したことが示された。 $\text{NO-Fe}(\text{peptide-DTC})_2$ の EPR パラメーターは既知の $\text{NO-Fe}(\text{DTCS})_2$ と同様であった (表 4-1)。このことより、 $\text{Fe}(\text{peptide-DTC})_3$ に NO が反応して $\text{NO-Fe}(\text{peptide-DTC})_2$ が形成されたことが明らかとなった。

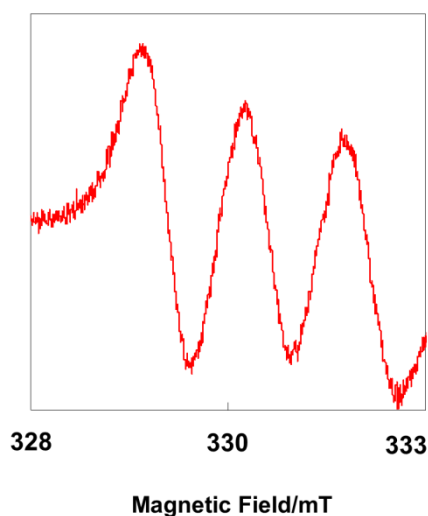


図 4-7 NO と Fe(peptide-DTC)₃ を反応させた後の EPR スペクトル。

表 4-1 NO-Fe(peptide-DTC)₂ と NO-Fe(DTCS)₂ の EPR パラメーター

	<i>g</i> value			<i>A_N</i> value	
	<i>g</i> ₁	<i>g</i> ₂	<i>g</i> ₃	<i>A</i> ₁	<i>A</i> ₂
NO-Fe(peptide-DTC) ₂	2.05	2.04	2.03	1.28	1.23
NO-Fe(DTCS) ₂	2.05	2.04	2.03	1.27	1.24

4.3.2. Fe(peptide-DTC)₃ を用いた NO による構造変化の確認

Fe(peptide-DTC)₃ が NO と反応することで、構造変化が生じるかを蛍光測定により確認した。ピレン修飾ペプチドを用いて、Fe(peptide(Pyn)-DTC)₃ を形成させ、その後、NO と反応させ NO-Fe(peptide(Pyn)-DTC)₂ の形成させた。NO-Fe(peptide(Pyn)-DTC)₂ では 470 nm 付近に pyrene 分子同士が近接に存在することで生じるエキシマー発光が観測された (図 4-8)。このことから、Fe(peptide(Pyn)-DTC)₃ に NO が反応することで、ペプチド鎖に何らかの構造変化が生じたと示唆される。次に NO-Fe(peptide(Pyn)-DTC)₂ に Glutathione を添加することで、鉄錯体を還元せずにジスルフィドのみ還元させた。Glutathione を添加し、NO-Fe(peptide(Pyn)-DTC)₂ のペプチドを還元させることでエキシマー発光が

消光した (図 4-9a)。次にチオールを酸化させ、ジスルフィドを形成させるヨウ素を peptide(Pyn)-DTC に添加した。peptide(Pyn)-DTC を酸化させることでエキシマー発光が観測された (図 4-9b)。以上の結果をまとめると、 $\text{Fe}(\text{peptide}(\text{Pyn})\text{-DTC})_3$ へ NO が結合することで、錯体間での電子移動が生じ、 $\text{NO-Fe}(\text{peptide}(\text{Pyn})\text{-DTC})_2$ から脱離した peptide(Pyn)-DTC 同士が結合し、チウラムが生成されることによって Pyrene が近接し、エキシマー発光が生じたと考えられる。 $\text{Fe}(\text{peptide}\text{-DTC})_3$ でエキシマー発光が生じない理由としては、1) DTC 鉄錯体の立体的構造により、ペプチド鎖に段差が生じ Pyrene 同士の位置がずれる、2) 錯形成することによりペプチド鎖の構造が固定化されてしまい、Pyrene の立体的な配向が制御される、などによりエキシマーが生じないと考えられる (図 4-10)。

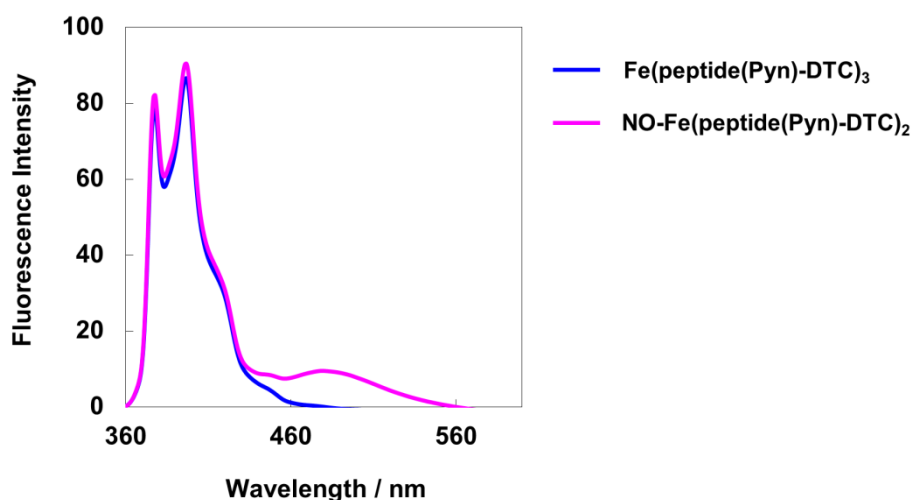


図 4-8 30%EtOH 含有 20 mM Tris-HCl buffer 溶媒中の $\text{Fe}(\text{peptide}(\text{Pyn})\text{-DTC})_3$ および $\text{NO-Fe}(\text{peptide}(\text{Pyn})\text{-DTC})_2$ の蛍光スペクトル。

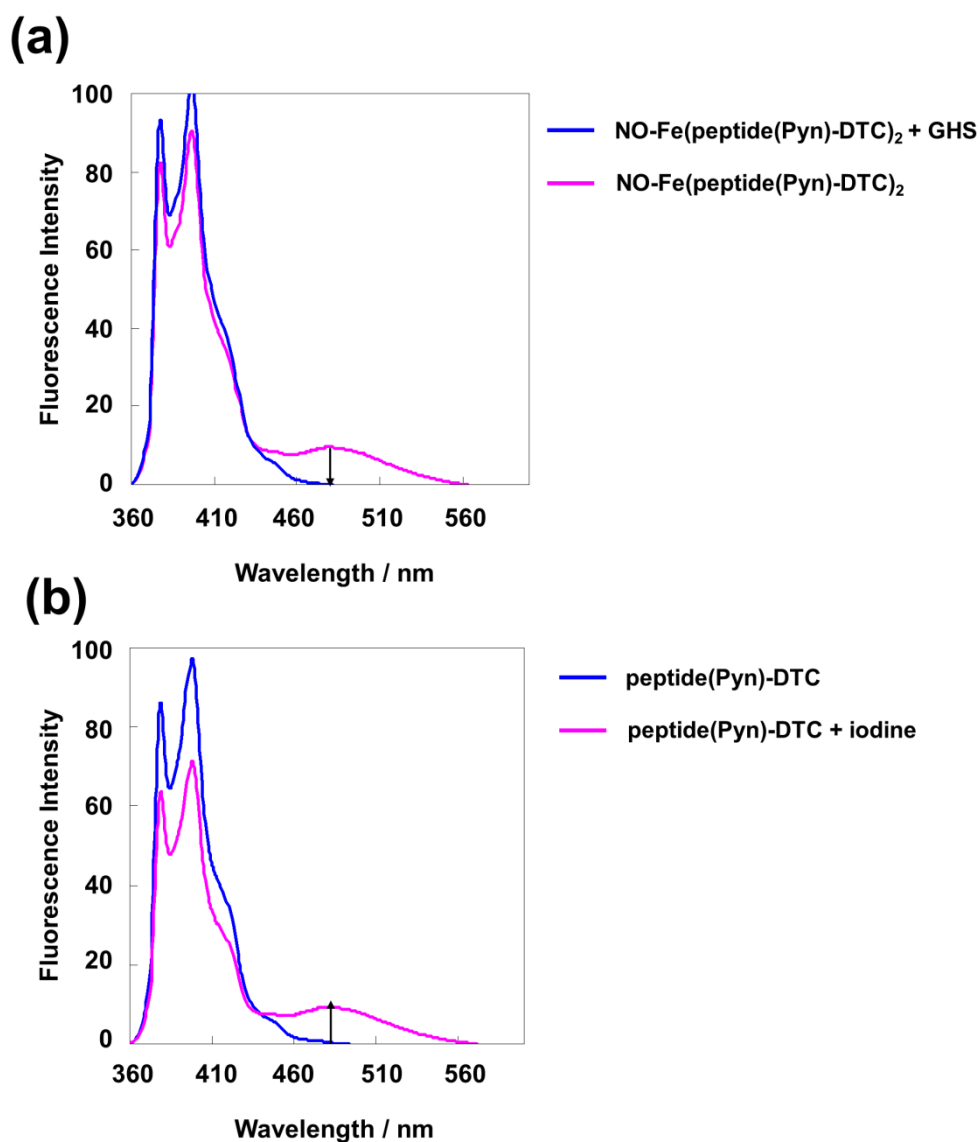


図 4-9 (a) GHS 添加前後の NO-Fe(peptide(Pyn)-DTC)₂ の蛍光スペクトル。(b) iodine 添加前後の peptide(Pyn)-DTC の蛍光スペクトル。

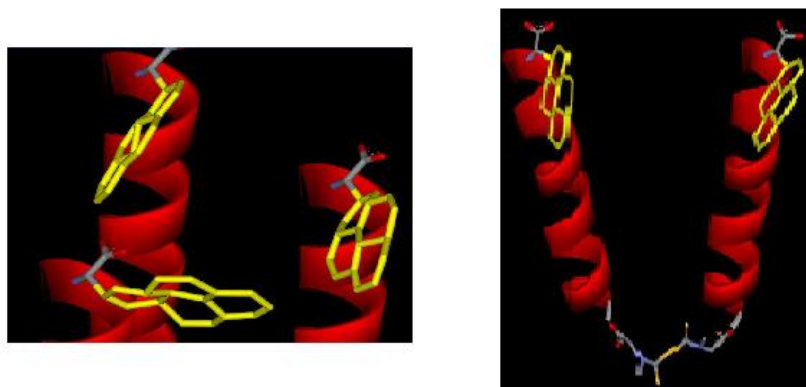


図 4-10 Fe(peptide(Pyn)-DTC)₃ とチウラム peptide(Pyn)-DTC のモデル

4.4. 小括

第四章では KE2 を模倣しつつ、より分子レベルでの感作性を評価する測定系を構築するために、DTC 鉄錯体を利用した NO センサーを有する人工金属タンパク質モデル [Fe(peptide-DTC)₃] の構築を行った。Fe(peptide-DTC)₃ は NO と結合することで peptide-DTC が脱離し、立体構造に変化が生じることを明らかにした。また、脱離した peptide-DTC 同士が結合したチウラムが生成されることを明らかにした。このような構造変化を蛍光応答に変換する測定手法を構築した。

本研究で使用した Fe-peptide(DTC)₃ は、多くの天然タンパク質に見られる helix bundle 構造をモチーフとしており、錯形成とともに構造内部に疎水性空間が生じる three helix bundle 構造を形成するように設計している。three helix bundle 構造は一酸化窒素の結合により、鉄錯体部の構造変化で崩壊させることが可能である。この構造変化を利用すれば、three helix bundle 構造の際に生じる疎水性空間に蛍光分子を捕捉させ、一酸化窒素の結合による疎水性空間の崩壊に伴い、蛍光分子を放出させることが可能になると期待される。これは Keap1 のように定常状態で Nrf2 を捕捉し、外的因子に応答して Nrf2 を放出するシステムと同様であるため、細胞を用いない KE2 を模倣した新しい測定手法になりえると期待される。

以上のことから、細胞系を脱却するために KE2 における表皮角化細胞の活性化を分子レベルで評価することが可能な人工金属タンパク質モデルの構築に成功した。しかしながら、タンパク質モデルの構造変化だけでは、化学物質の反応性や反応メカニズムなどのより詳細な解析は困難であると考えられる。そこで、さらに分子レベルでの評価を行うために KE1 を模倣した既存 *in vitro* 皮膚感作性試験法の課題を克服した試験法の開発が必要であると考えられる。そこで第五章では、樹脂固定化ペプチドと官能基指示薬を利用した *in vitro* 皮膚感作性試験法の開発について述べる。

4.5. 参考文献

1. K. I. Tong, A. Kobayashi, F. Katsuoka, M. Yamamoto, Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol. Chem.*, **387**, 1311–1320 (2006).
2. K. I. Tong, Y. Katoh, H. Kusunoki, K. Itoh, T. Tanaka, M. Yamamoto, Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 2887–2900 (2006).
3. A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto, P. Talalay, Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **99**, 11908–11913 (2002).
4. M. K. Chan, Recent advances in heme-protein sensors. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 216–222 (2001).
5. P. Mordvintcev, A. Mulsch, R. Busse, A. Vanin, On-line detection of nitric oxide formation in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Anal. Biochem.*, **199**, 142–146 (1991).
6. A. Komarov, D. Mattson, M. M. Jones, P. K. Singh, C. -S. Lai, in vivo trapping of nitric oxide in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 1191–1198 (1993).
7. S. Fujii, K. Kobayashi, S. Tagawa, T. Yoshimura, Reaction of nitric oxide with the iron (III) complex of N-(dithiocarboxy)sarcosine: a new type of reductive nitrosylation involving iron (IV) as an intermediate. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **19**, 3310–3315 (2000).
8. W. C. Chan, P. D. White, Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach, Oxford University Press, New York, (2000).
9. M. Lieberman, T. Sasaki, Iron (II) organizes a synthetic peptide into three-helix bundles. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 1470–1471 (1991).

第五章

固相担持ペプチドと官能基指示薬を利用した

皮膚感作性試験法の構築

5.1. 緒言

Local Lymph Node Assay (LLNA)¹の代替法 (Replacement) として Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)^{2,3}と Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)⁴が開発され、経済協力開発機構 (Organization for Economic Co-operation and Development: OECD) のテストガイドラインに採択された⁵。DPRA と ADRA は皮膚感作の有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway: AOP)⁶の最初の鍵となる反応 (Key Event 1: KE1) を模倣して開発され、分子レベルの反応を観測した試験法である。感作性物質は一般的に親電子性を有しており、タンパク質の求核性残基と結合することが知られており、この感作性物質とタンパク質との共有結合が KE1 とされている。DPRA は HPLC を使用して、システイン (Cys) またはリシン (Lys) のいずれかを含む 2 つのペプチドと化学物質の反応性を評価する。DPRA の試験方法を図 5-1 に示す。DPRA は、OECD テストガイドラインに採択された、国際的に認められた *in vitro* 皮膚感作性試験であるが、次のような欠点がある。欠点 1) 水溶性の低い化学物質は試験溶媒で溶解させることができない、欠点 2) 未反応のペプチド量を HPLC で測定し、反応率を算出するが、試験化学物質とペプチドの保持時間が重なる可能性がある、欠点 3) 試験に用いる Cys 含有ペプチドは、容易に酸化反応を生じ、二量体化するため、見かけ上ペプチドが反応したかのように観測される(偽陽性)、欠点 4) HPLC は取り扱いが複雑で、測定に時間がかかる、欠点 5) DPRA は過度に単純化されているため、感作性物質の反応メカニズムや反応速度など詳細な情報が得られない。このように、DPRA は評価が困難な物質が多々存在すること、さらに HPLC を用いて評価するため、簡便性と迅速性に欠けることなどの問題点も多い。これらの問題点を解決するために、ADRA など様々なペプチドを用いた皮膚感作性試験法が提案されているが、どの試験法も一部分の解決にしか至っていない。

DPRA の問題点の多くは、ペプチドと感作性物質を液相反応系で測定を行うことに起因している。このことからペプチドを樹脂などの固相担体に固定化し、固相反応系で測定を行うことができれば、多くの問題点が解決できると考えられる。ペプチド固定化技術は工業レベルで技術開発が進んでおり、固相担持ペプチドを利用した分析方法やスクリーニング方法などが開発され、様々な分析に利用されてきている⁷⁻¹⁰。このような固定化技術を用いて、樹脂固定化ペプチドを作製し、皮膚感作試験に利用することを試みた。さらに、HPLC の代わりに吸光度測定法を取り入れることで、より簡便かつ迅速に感作性の判定を行うことが可能になる。これらの観点から樹脂固定化ペプチドを用いて上記の全ての欠点を克服するために、*in vitro* 皮膚感作性試験である Chromophore-Solid phase Peptide Reaction Assay (C-SPRA) の開発を試みた (図 5-2)。

具体的には、固相担体に両親媒性樹脂を利用することで、親水性溶媒と疎水性溶媒の両方を反応溶媒に使用することができ、難水溶性物質も疎水性溶媒を用いて反応させることが可能となる (欠点 1 への対処)。さらに、樹脂固定化ペプチドは単純なフィルターを用いた樹脂洗浄により、未反応の化学物質を容易に除去することが可能となる (欠点 2 への対処)。試験に用いる Cys 含有ペプチドの二量体化は、固定化によるペプチド分子の物理的分離によって防止することが可能となる (欠点 3 への対処)。簡便、かつ迅速に試験するために、HPLC の代わりにチオール基またはアミノ基の発色指示薬を利用した吸光度測定によって反応性を観測する (欠点 4 への対処)。これらの改良により、Cys および Lys 含有する様々なペプチド配列を合成することが可能になり、様々な反応条件で反応性を観測することで、反応メカニズムや反応速度などの詳細な反応性の分析が可能になる (欠点 5 への対処)。

しかしながら、C-SPRA では固相担体にペプチド合成用樹脂を使用しているため、研究実験用のカラムが必要になり、樹脂洗浄操作などを複数のサンプルに対して、同時に手動操作することが困難であるといった課題点も考えられる。そこで、固相担体を磁性ビーズにした C-SPRA の改良法である C-SPRA-MB (C-SPRA methods using magnetic microbeads) の開発も試みた (図 5-3)。磁性ビー

ズを用いることで、一般的なチューブで試験することが可能となり、磁性ビーズはチューブの壁面に引き寄せられるため、効率よく溶媒の除去や洗浄操作を行うことが可能となり、操作性の向上が期待される。

第二章で述べたように、様々な化学物質を迅速に試験していく必要があるため、低コストかつ簡便で試験期間の短い試験法の開発が望まれている。さらに今後新たに評価される新規な化学物質に対しても、可能な限り動物を用いずに感作性を評価していくために、従来の *in vitro* 試験法より適用範囲や応用用途が広い試験法の開発が必要になると考えられる。そこで第五章では、従来の KE1 を模倣した試験法 (DPRA と ADRA) の問題点を解決しつつ、さらなる応用展開を図ることを目的に、C-SPRA と C-SPRA-MB の開発と、両試験法を用いた感作性物質の評価について述べる。

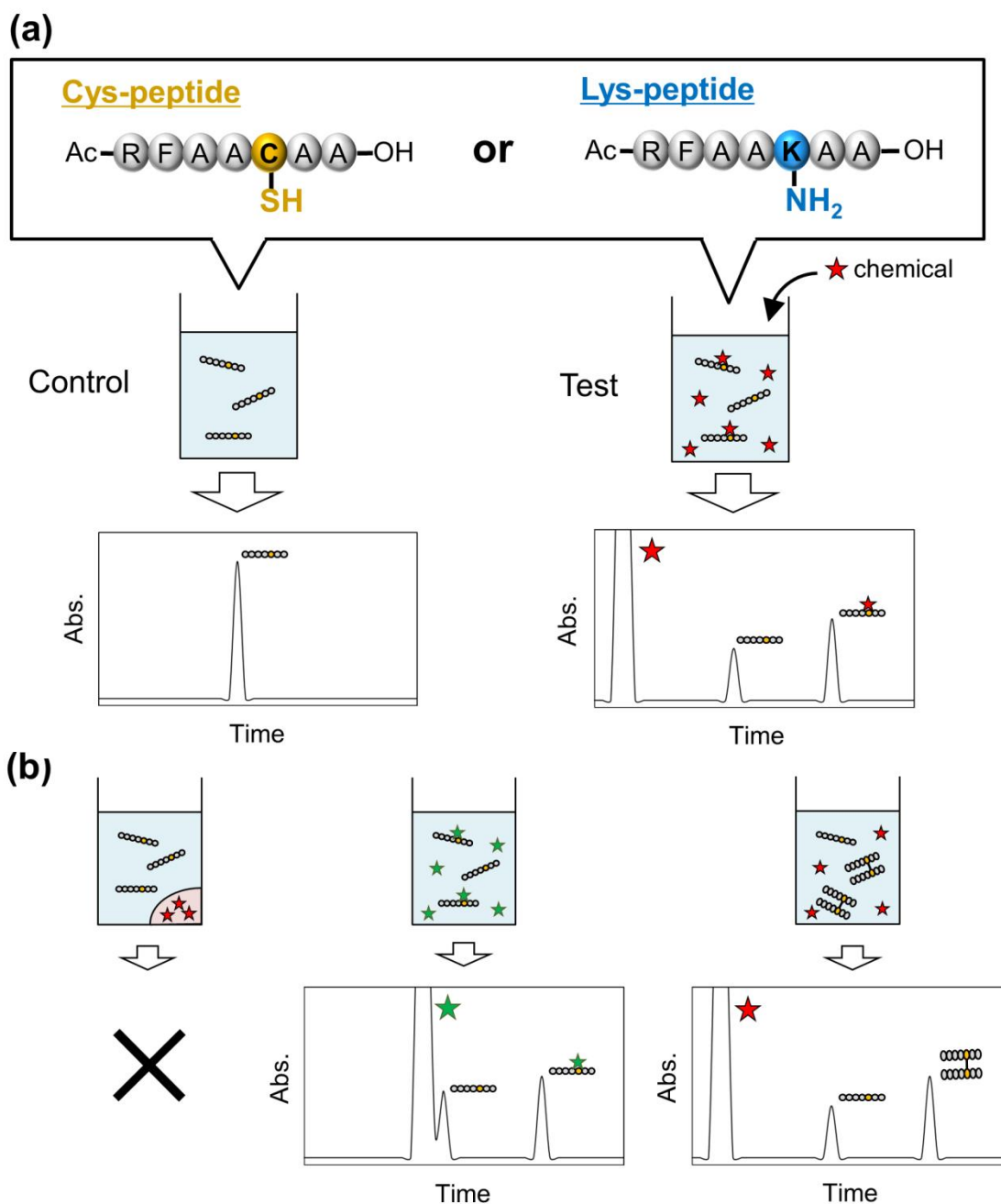


図 5-1 DPRA の概要。(a) Cys および Lys 含有ペプチドに対する化学物質の反応性は、HPLC を用いてペプチドの減少率から測定される。試験物質を適切な溶媒に 100 mM に溶解させて調製する。Cys および Lys 含有ペプチドは、それぞれ 1:10 および 1:50 の比率で試験化学物質と 24 時間反応させ、未反応ペプチド量を 220 nm での UV で検出し、コントロールと比較する。(b) DPRA の代表的な欠点。未反応の試験物質とペプチドの保持時間が重複する可能性がある (共溶出)。Cys 含有ペプチドの遊離チオールは、酸化時に容易に二量体化し、偽陽性を引き起こす可能性がある。

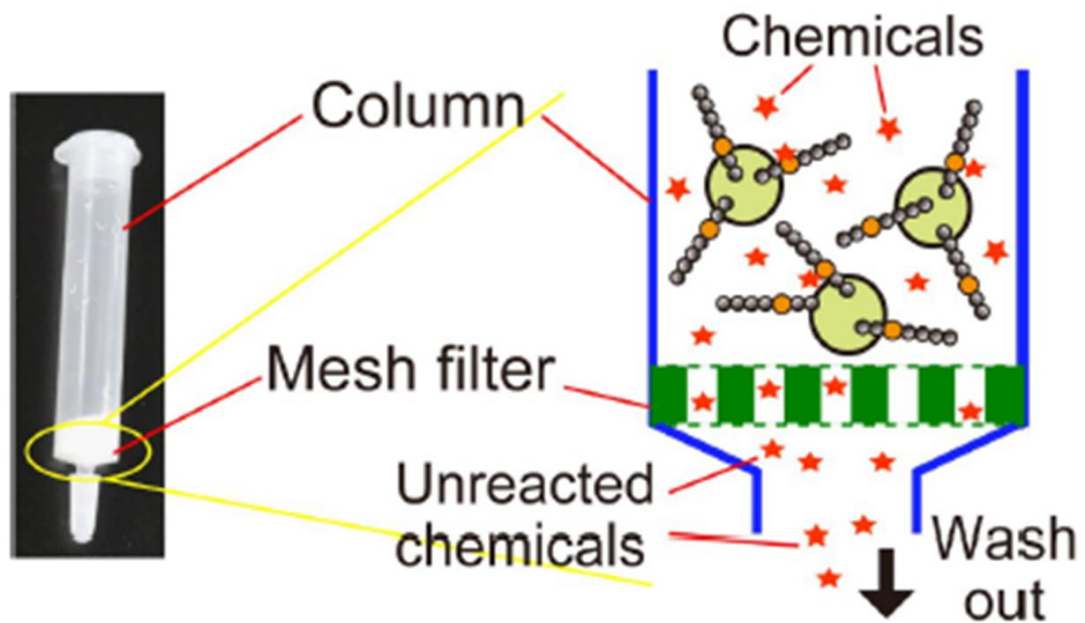


図 5-2 C-SPRA の概要。

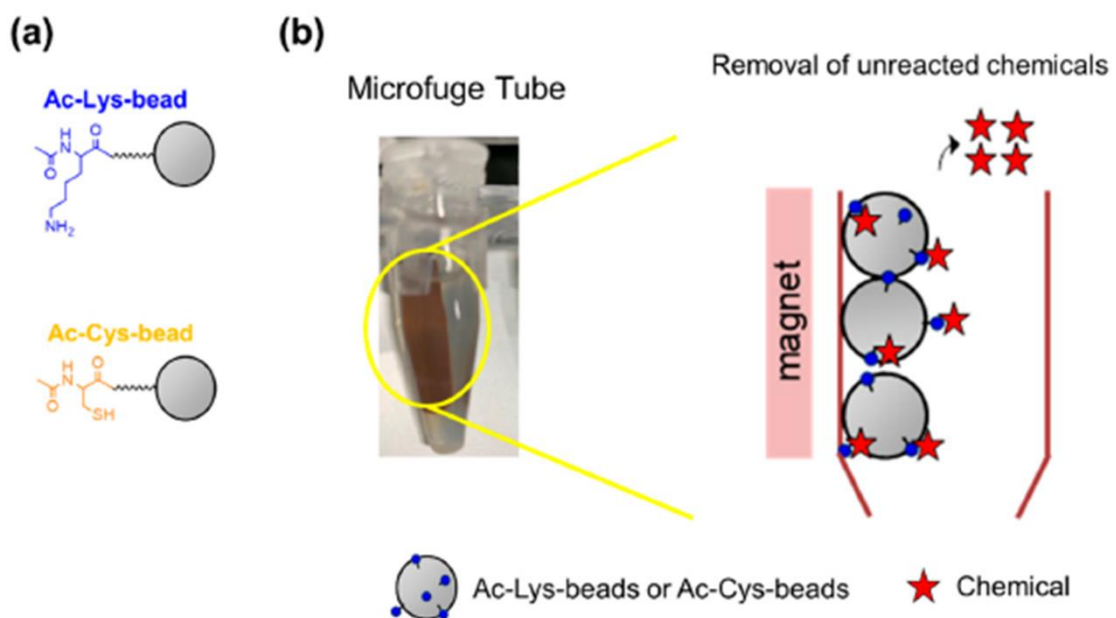


図 5-3 C-SPRA-MB の概要。(a) Ac-Lys-beads と Ac-Cys-beads の構造。(b) C-SPRA-MB で使用されるカラムの図。

5.2. 材料および方法

5.2.1. 試験物質と合成試薬

p-Benzoquinone (BQ)、Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)、2-Mercaptobenzotiazole (MBT)、Benzylidene acetone (BA)、5-Methyl-2-phenyl-2-hexanal (MPH)、Undec-10-enal (UE)、 α -Hexyl cinnamic aldehyde (HCA)、 α -Amyl cinnamic aldehyde (ACA)、Benzyl benzoate (BB)、Benzyl cinnamate (BC)、R(+)-Limonene、Benzylbutylphthalate (BBP)、Dibutyl phthalate (DP) および Isopropanol (IPA) は富士フイルム和光純薬株式会社から購入し、特級試薬を使用した。試験物質は HPLC グレードの *N,N*-Dimethyl formamide (DMF) に溶解したものを精製することなく使用した。

固定化樹脂は株式会社ハイペップ研究所から購入した TentaGel S NH₂ resin と TentaGel SRAM resin を使用した。磁性ビーズは micromod 社から購入した micromer-M PEG-NH₂ を使用した。チューブホルダーは Thermo Fisher 社から購入した DynaMag-2 を使用した。ペプチド合成には株式会社ハイペップ研究所から購入した *N*- α -Fmoc-alanine (Fmoc-Ala-OH)、*N*- β -Fmoc-alanine (Fmoc- β Ala-OH)、*N*- α -Fmoc-N- ϵ -Boc-lysine (Fmoc-Lys(Boc)-OH)、*N*- α -Fmoc-S-trityl-cysteine (Fmoc-Cys(Trt)-OH)、*N*- α -Fmoc-phenylalanine (Fmoc-Phe-OH)、*N*- α -Fmoc-NG-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-arginine (Fmoc-Arg(Pbf)-OH)、*N*- α -Fmoc-N- ϵ -4-methyltrityl-lysine (Fmoc-Lys(Mtt)-OH)、Fmoc-4-methyltrityl-cysteine (Fmoc-Cys(Mtt)-OH) および Fmoc-3-amino-3-(2'-nitrophenyl) propionic acid (Fmoc-npp-OH) を使用した。縮合剤には渡辺化学工業株式会社から購入した [2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) と 1-hydroxy benzotriazole monohydrate (HOBt) を使用した。Trifluoroacetic acid (TFA) は渡辺化学工業株式会社から購入したものを使用した。Triisopropylsilane (TIPS) は富士フイルム和光純薬株式会社から購入したものを使用した。Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) と同仁化学研究所から購入したものを使用した。Dithiothreitol (DTT) と Picric acid (PA) は富士フイルム和光純薬株式会社か

ら購入したものを使用した。5(6)-Carboxylfluorescein は富士フイルム和光純薬株式会社から購入したものを使用した。

5.2.2. 測定機器

HPLC はジーエルサイエンス株式会社製の GL-7400 を使用した。MALDI-TOF MS はブルカー社製の Autoflex III を使用した。紫外可視分光光度計は株式会社島津製作所株式会社製の UV-1800 を使用した。

5.2.3. 樹脂固定化ペプチドの合成

Cys および Lys 含有ペプチド固定化樹脂は、TentaGel S NH₂ resin に Fmoc 法を用いて固相合成を行った (図 5-3)¹¹。TentaGel S NH₂ resin を合成カラムに充填し、膨潤させた後、resin に導入可能なペプチドの量に対して 20 当量の Fmoc-amino acid (AA)-OH、HBTU および HOBt を加え、カップリングを行った。まず初めに、Fmoc-βAla-OH を resin に結合させた後、DPRA に使用されているペプチド配列に従って、アミノ酸を順番にカップリングさせ、2 種類の樹脂固定化ペプチドを合成した (Ac-RFAAKAA-βA-PEG resin と Ac-RFAAKAA-βA-PEG)。樹脂固定化ペプチドの側鎖保護基は、ペプチド樹脂を脱保護溶液 [TFA/H₂O/TIPS (20:1:1, v/v)] 中で 2 時間インキュベートすることによって除去した。ペプチド樹脂は脱保護溶液と chloroform で 5 回洗浄した後、デシケーターで完全に乾燥させた。ペプチド樹脂中のペプチド純度およびアミノ酸含有量はアミノ酸分析によって評価した。アミノ酸分析は、サンプルを密閉チューブ内で 6M の HCl で 110°C、96 時間で加水分解した後、phenyl isothiocyanate で標識し、ジーエルサイエンス株式会社製の Inertsil ODS-2 カラム (φ4.6 × 200 mm) を用いて行った。並行して、切断可能な resin (TentaGel SRAM resin) 上で同じ条件で、同じペプチド配列を合成した。

次に、ペプチド樹脂を脱保護溶液中で 2 時間インキュベートした後、HPLC を用いてそれぞれのペプチド純度を確認した。カラムは逆相クロマトグラフィー用カラムであるジーエルサイエンス株式会社製の Inertsil ODS-3 カラム (φ4.6 ×

150 mm) を用いた。移動相は 0.08%TFA 含有 acetonitrile (ACN)と 0.1%TFA 含有 H₂O を用い、30 分間で 0.08%TFA 含有 ACN を 5%から ACN95%へと組成を直線的に変化させ、流速は 1.0 mL/min で送液した。ペプチドは MALDI-TOF MS を使用し、マトリックスに 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid を用いて質量分析を行った。

5.2.4. Fmoc-Lys(Mtt)-npp Beads と Ac-Lys(Flu)-npp Beads の合成

Fmoc-Lys(Mtt)-npp Beads および Ac-Lys(Flu)-npp Beads は micromer-M PEG-NH₂ に Fmoc 法を用いて固相合成を行った¹¹。合成スキームを図 5-4 に示す。磁性ビーズに導入可能なペプチドの量に対して 20 当量の Fmoc-amino acid (AA)-OH、HBTU および HOBt を加え、カップリングを行った。まず初めに、Fmoc-npp-OH を磁性ビーズに結合させ、その後、Fmoc-Lys(Mtt)-OH をカップリングさせ、Fmoc-Lys(Mtt)-npp Beads を合成した。合成純度を確認するために、Fmoc-Lys(Mtt)-npp Beads に UV ライトで (365 nm, 25W) で 10 分間照射した後、ジューエルサイエンス株式会社製の Inertsil ODS-3 カラム (φ4.5 × 150 mm) を用いて、Fmoc 基の吸収波長の 301 nm を HPLC でモニターした。

次に Fmoc-Lys(Mtt)-npp Beads の Fmoc 基を除去した後、無水酢酸で N 末端の遊離アミンをアセチル化して Ac-Lys(Mtt)-npp Beads を得た。Ac-Lys(Mtt)-npp Beads を Mtt 脱保護溶液 [DMSO/dichloromethane (DCM) /TFA/TIPS (47:47:1:5, v/v)] 中で 2 時間インキュベートして Mtt 基を脱保護し、Mtt 脱保護溶液と DMSO で 10 回洗浄することで Ac-Lys-npp Beads を得た。さらに Ac-Lys-npp Beads に 5(6)-carboxyfluorescein をカップリングさせることで、Ac-Lys(Flu)-npp Beads を得た。Mtt 脱保護を確認するために、Ac-Lys(Flu)-npp Beads に UV ライトで 10 分間照射した後、fluorescein の吸収波長の 490 nm を HPLC でモニターした。カラムは逆相クロマトグラフィー用カラムであるジューエルサイエンス株式会社製の Inertsil ODS-3 カラム (φ4.5 × 150 mm) を用いた。移動相には良溶媒 [ACN/H₂O/TFA (90/10/0.08, v/v)] を用い、良溶媒を 0%から 30 分間で 100%へと組成を直線的に変化させ、流速は 1.0 mL/min で送液した。

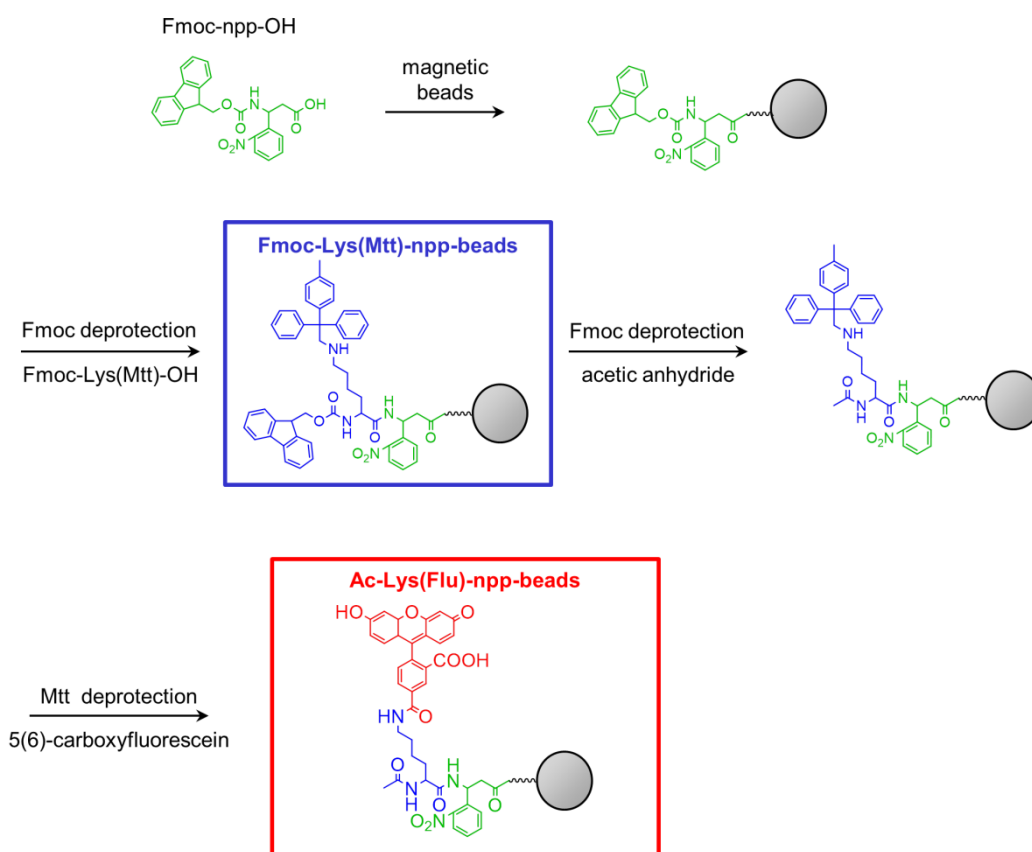


図 5-4 Fmoc-Lys(Mtt)-npp-beads と Ac-Lys(Flu)-npp-beads の合成スキーム。

5.2.5. Ac-Lys Beads と Ac-Cys Beads の合成

Fmoc-Lys(Mtt)-OH および Fmoc-Cys(Mtt)-OH は、磁性ビーズに直接結合された。Fmoc-Lys(Mtt) Beads および Fmoc-Cys(Mtt) Beads から Fmoc を除去した後、無水酢酸で N 末端の遊離アミンをアセチル化し、Ac-Lys(Mtt) Beads および Ac-Cys(Mtt) Beads を得た。Lys および Cys の側鎖保護基の Mtt 基は、Mtt 脱保護溶液中で 2 時間インキュベートした後、Mtt 脱保護溶液と DMSO で 10 回洗浄することで、Ac-Lys Beads と Ac-Cys Beads を得た。

5.2.6. C-SPRA の試験手順

Cys 含有ペプチド樹脂

Cys 含有ペプチド樹脂をチューブに 0.5 mg 秤量し、DMF で 6 回洗浄した。1) 膨潤したペプチド樹脂に 10 mM の DTNB 溶液 [20 mM phosphate buffer (pH 7.5) /DMF (2:1, v/v)] を 1 mL 加え、30 分間室温でインキュベートし、その後 DMF で 6 回洗浄することで、5-mercapto-2-nitrobenzoic acid (TNB) と未反応の DTNB を除去した。2) ペプチド樹脂に 10 mM の DTT 溶液 [20 mM phosphate buffer (pH 7.5) /DMF (2:1, v/v)] を 1 mL 加え、室温で 5 分間インキュベートした。その後、紫外可視分光光度計を用いて 412 nm の O.D.値(OD_{control}) を測定した。3) ペプチド樹脂を DMF で 6 回洗浄した後、ペプチド樹脂に DMF で 100 mM に溶解した試験物質溶液を加え、室温で 24 時間インキュベートした。4) ペプチド樹脂を DMF で 6 回洗浄した後、ペプチド樹脂に 10 mM の DTNB 溶液を 1 mL 加え、30 分間室温でインキュベートし、その後 DMF で 6 回洗浄することで、TNBs と未反応の DTNB を除去した。5) ペプチド樹脂を 10 mM の DTT 溶液を 1 mL 加え室温で 5 分間インキュベートした。その後、紫外可視分光光度計を用いて 412 nm の O.D.値 (OD_{test}) を測定した (図 5-5)。

Lys 含有ペプチド樹脂

Lys 含有ペプチド樹脂をチューブに 0.5 mg 秤量し、DMF で 6 回洗浄した。1) 膨潤したペプチド樹脂に 10 mM の PA 溶液 [H₂O/DMF (1:1, v/v)] を 1 mL 加え、30 分間室温でインキュベートし、その後 DMF で 6 回洗浄することで、未反応の PA を除去した。2) ペプチド樹脂に 2%NaOH 溶液を 1 mL 加え、室温で 5 分間インキュベートした。その後、紫外可視分光光度計を用いて 380 nm の O.D.値 (OD_{control}) を測定した。3) ペプチド樹脂を DMF で 6 回洗浄した後、ペプチド樹脂に DMF で 100 mM に溶解した試験物質溶液を加え、室温で 24 時間インキュベートした。4) ペプチド樹脂を DMF で 6 回洗浄した後、10 mM の PA 溶液を 1 mL 加え、30 分間室温でインキュベートし、その後 DMF で 6 回洗浄することで、未反応の PA を除去した。5) ペプチド樹脂に 2%NaOH を 1 mL 加え室温で 5 分間インキュベートした。その後、紫外可視分光光度計を用いて 380 nm の O.D.値 (OD_{test}) を測定した (図 5-5)。

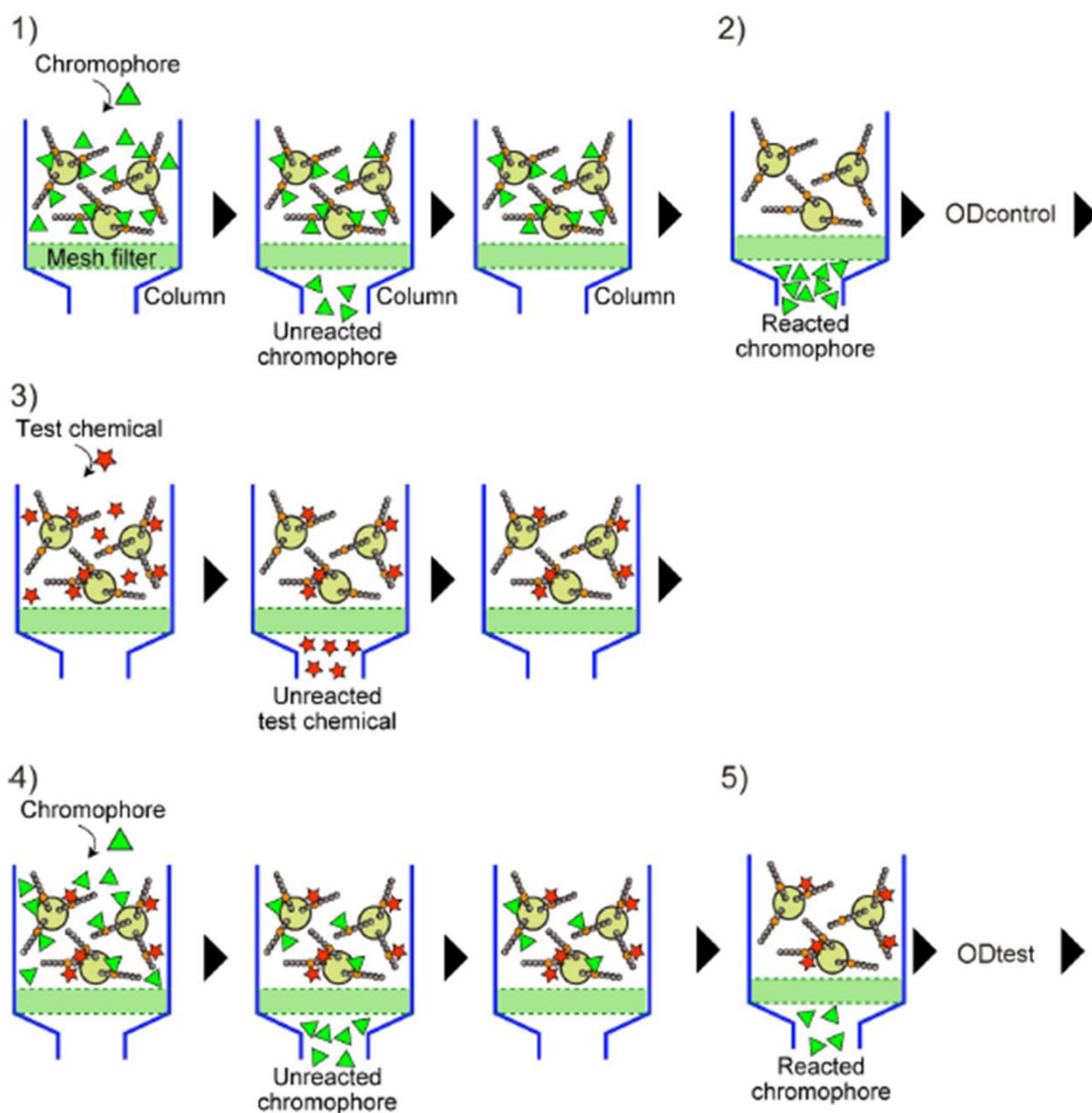


図 5-5 C-SPRA による皮膚感作性物質の評価方法。1) チオール基およびアミノ基定量試薬 (Cys 含有ペプチド樹脂では DTNB、Lys 含有ペプチド樹脂では PA) をペプチド樹脂に添加し、未反応の定量試薬を洗浄することで除去した。2) 放出溶液 (Cys 含有ペプチド樹脂では DTT、Lys 含有ペプチド樹脂では 2%NaOH 溶液) を添加し、ペプチド樹脂に反応した定量試薬を除去および収集し、UV 測定により $OD_{control}$ を得た。3) 試験物質と 24 時間反応後、樹脂を洗浄した。4) 定量試薬をペプチド樹脂に添加し、次に洗浄により未反応の定量試薬を除去した。5) ペプチド樹脂に反応した定量試薬の除去および収集するため、放出溶液を添加し、UV 測定に OD_{test} を得た。

5.2.7. C-SPRA-MB の試験手順

C-SPRA-MB の試験方法を図 5-6 に示す。Ac-Lys Beads を 2 本のテストチューブにそれぞれ 5 mg 秤量し、1 本のチューブに試験物質溶液 (0.1% *N*-methylnmorpholine 含有 DMSO 溶媒) を加え、室温で 24 時間インキュベートした (test チューブ)。もう一方のチューブには 0.1% *N*-methylnmorpholine 含有 DMSO を加え、室温で 24 時間インキュベートした (control チューブ)。インキュベート後、各 Beads を DMSO で 5 回、次に Methanol (MeOH) で 5 回洗浄した。その後、2 本のチューブに 1 mM の bromophenol blue (BB) 溶液 (MeOH 溶媒) を 1 mL 加え、室温で 30 分間インキュベートした後、各 Beads を MeOH で 10 回洗浄し、未反応の BB を除去した。各 Beads に飽和 Lys 溶液を 200 μ L 加え、室温で 5 分間反応させ、Lys に結合した BB を放出させた。2 本のチューブから溶液を集め、紫外可視分光光度計を用いて 591 nm の O.D. 値 (OD_{control} および OD_{test}) を測定した。

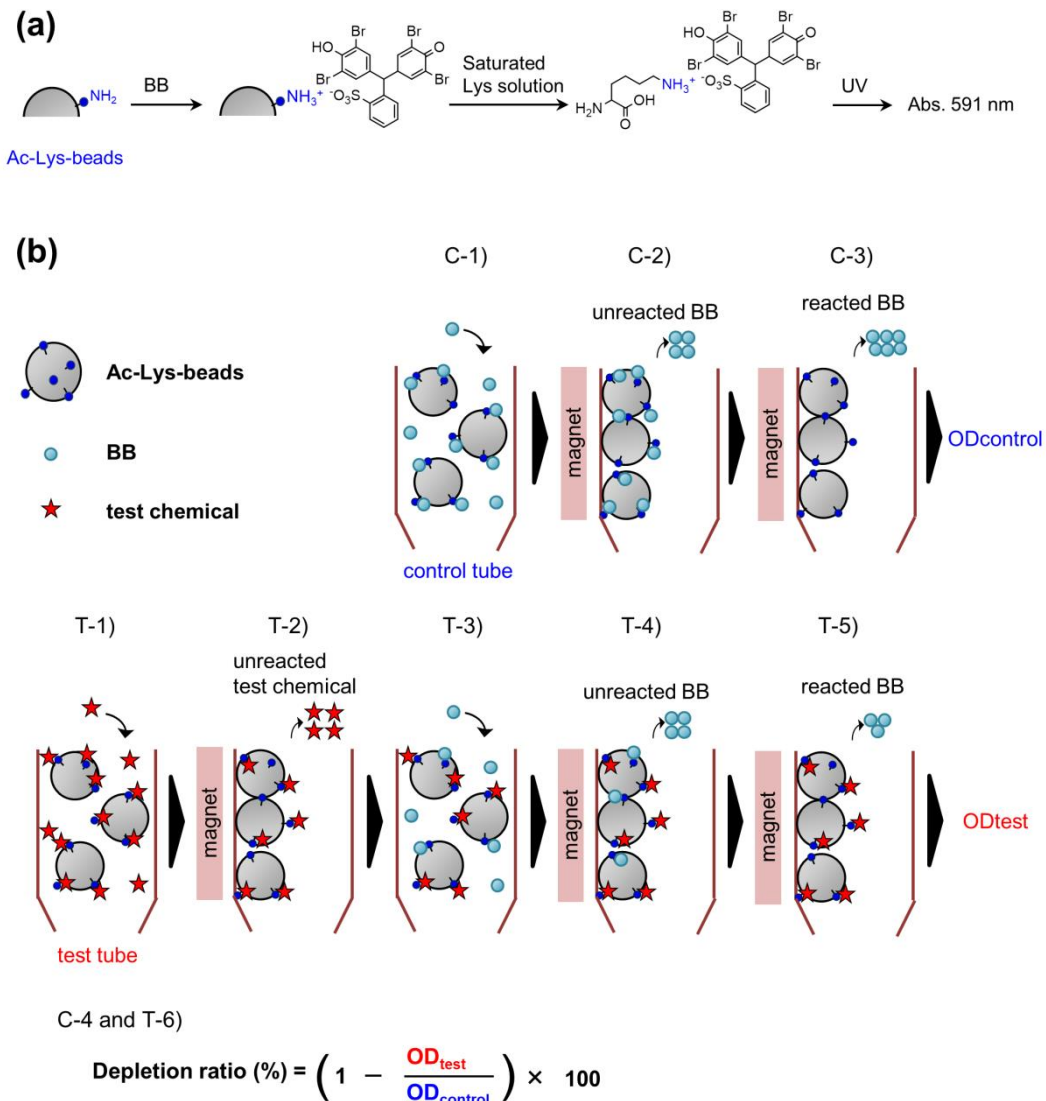


図 5-6 (a) C-SPRA-MB における BB を用いた UV 検出法。(b) C-SPRA-MB による皮膚感作性物質の評価方法。手順は次のとおり。(T-1) 試験物質と Ac-Lys Beads を 24 時間反応させた。(T-2) 反応後、Ac-Lys Beads を洗浄した。(C-1 および T-3) BB と Ac-Lys Beads を反応させた。(C-2 および T-4) 未反応の BB を洗浄することで除去した。(C-3 および T-5) Ac-Lys Beads に反応した BB の除去および収集のため、放出溶液 (飽和 Lys 溶液) を添加し、UV 測定により $\text{OD}_{\text{control}}$ および OD_{test} を取得した。(C-4 および T-6) 反応率は $\text{OD}_{\text{control}}$ および OD_{test} から算出した。

5.2.8. 試験物質とペプチドとの反応性の計算

ペプチド反応性は下記式のように、最初に測定されたペプチド量に対する化学物質との反応後の未反応のペプチド量との減少率として表した。

$$\text{ペプチド反応率 (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{OD}_{\text{test}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \right) \right] \times 100$$

ここで、 $\text{OD}_{\text{control}}$ は最初に測定されたペプチド樹脂から得られた O.D.値であり、 OD_{test} は化学物質とペプチド樹脂を反応させた後に得られた O.D.値である。

5.3. 結果および考察

5.3.1. ペプチド樹脂の設計および合成

2種類の樹脂固定化ペプチド (Cys 含有ペプチド樹脂と Lys 含有ペプチド樹脂) を設計し、合成した。Fmoc 固相合成法を最適化した後、DPRA に使用されたペプチド配列 (RFAACAA と RFAAKAA) は β -Ala リンカーを介して、ペプチドの C 末端カルボキシル基と両親媒性 NH_2 -PEG-ポリスチレン樹脂の N 末端を結合させて、ペプチドと樹脂を固定化した。並行して、切断可能な樹脂上に同じ条件で同じ配列のペプチド樹脂を合成した。ペプチドを樹脂から切断後に、HPLC で分析した結果、ペプチド純度は実験に十分使用できるものであることが確認できた (図 5-7)。さらに、アミノ酸分析によって合成したペプチド樹脂のペプチド量を初期値と比較した結果、合成された各ペプチド樹脂のアミノ酸含有量は理論値 (0.25 mmol/g) と同様であった (Cys ペプチドは 0.22 mmol/g、Lys ペプチドは 0.23 mmol/g)。以上の結果より、合成したペプチド樹脂は、精製過程を必要とせずに高純度ペプチドを提供できることが示された。

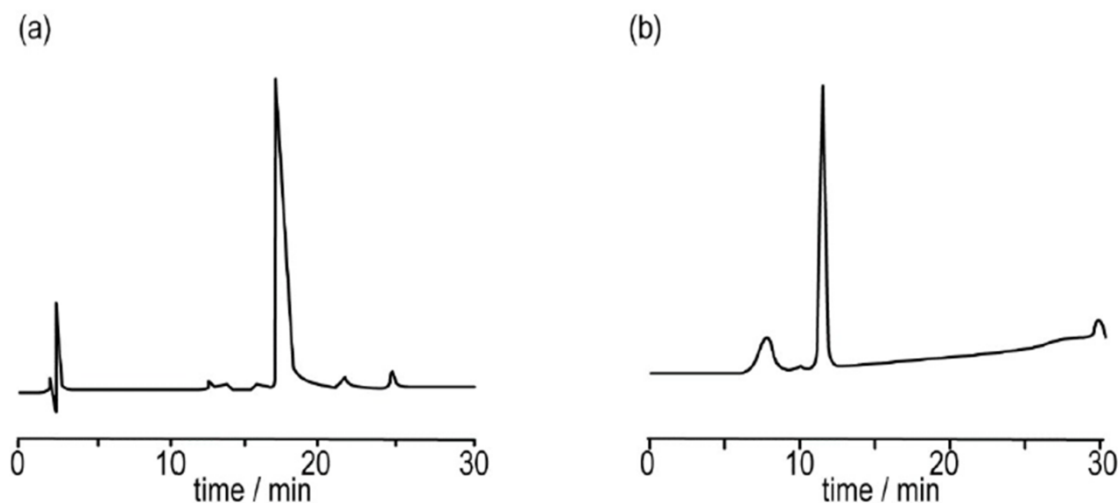


図 5-7 (a) Cys 含有ペプチドおよび (b) Lys 含有ペプチドのクロマトグラム。Cys 含有ペプチドで $m/z = 821.6$ (理論値: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 822.0$)、Lys 含有ペプチドで $m/z = 846.7$ (理論値: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 847.1$) を示した。

5.3.2. C-SPRA の定量試薬の選択

ペプチド樹脂と試験物質との反応性を評価するために、Cys 含有および Lys 含有ペプチド樹脂の遊離チオール基および遊離アミノ基の検出に DTNB および PA を選択した。遊離チオールおよび遊離アミノ基の検出方法の概要を図 5-8 に示す。DTNB は、ペプチドおよびタンパク質のチオール基の数または濃度を定量化するために広く使用されている¹²。遊離チオール基は DTNB と反応し、DTNB のジスルフィド結合を切断して TNB を生成する。この反応は迅速で化学量論的であり、1 mol のチオールを添加すると 2 mol の TNB が生成される。一方の TNB は溶液中に放出され、もう一方の TNB は樹脂上のペプチドのチオールに結合する^{13,14}。通常、DTNB を用いた遊離チオール基の定量は溶液中に放出された TNB の吸収波長である 412 nm の吸光度を測定することにより定量化する。本研究では、DTNB と反応後、溶液中に放出された TNB と未反応 DTNB を洗浄により除去した。次に、ペプチド樹脂上に結合した TNB を DTT により還元し、ペプチドから放出された TNB を定量した。

Lys 含有ペプチド樹脂の遊離アミノ基は、樹脂上のアミノ基と塩を形成する PA を使用して検出した。樹脂上のアミンと塩を形成した PA は、塩基性物質を加えることでイオン結合を解離させ、樹脂から放出することが可能となる^{15,16}。樹脂上のアミンの量は、ペプチドから放出された PA の吸収波長である 380 nm の吸光度を測定することにより定量化できる。本研究では、PA と反応後、未反応の PA を除去した後、ペプチド樹脂上に結合した PA を 2%NaOH により解離させ、ペプチドから放出された PA を定量した。

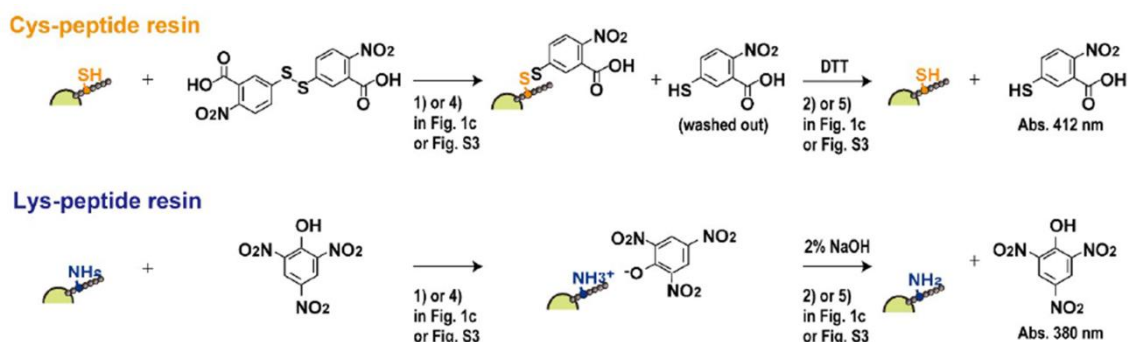


図 5-8 C-SPRA における DTNB と PA を用いた UV 検出法。

5.3.3. C-SPRA の反応条件の最適化

Cys 含有および Lys 含有ペプチド樹脂の反応性は図 5-5 に示した方法に従って測定した。まず、C-SPRA の実験条件を最適化するために、反応時間と試験物質濃度を評価した。BQ、BA、および DP を用いて、用量反応曲線を測定し、最適な化学物質濃度を決定した。BQ と BA は、ペプチド反応率を用量依存的に増加させ、100 mM でペプチド反応率は最大となった (図 5-9a)。1 mM の BQ は、Cys 含有および Lys 含有ペプチド樹脂で、それぞれ $18.8 \pm 3.1\%$ 、 $59.4 \pm 15.7\%$ のペプチド反応率を示した。一方、DP は BQ よりもはるかに低い反応率 (Cys 含有および Lys 含有ペプチド樹脂でそれぞれ $5.5 \pm 5.0\%$ 、 $4.0 \pm 0.8\%$) を示した。この結果は、C-SPRA が 1 mM でも感作性物質を評価できること、また低濃度で反応性を評価した場合に非常に高い反応性を有する化合物でも反応性を区別できる可能性が示唆される。従来の DPRA のプロトコルでは、100 mM の試験物質と反応させることが定められている。そのため、本研究では比較のために標準条件として試験物質濃度は 100 mM を選択した。

次に、100 mM の BQ、BA、および DP を使用して反応速度を評価した。3、6、16 および 24 時間での各ペプチド樹脂のペプチド反応率は、全ての試験物質で類似していた (図 5-9b)。BQ は 24 時間で最大ペプチド反応率を示した。感作性物質 (BQ および BA) と非感作性物質 (DP) のペプチド反応率は 24 時間で大きく差があった。したがって、操作性を容易にするために、従来の DPRA プロトコルと同じ 24 時間の反応時間を選択したが、C-SPRA は 3 時間で DP と BA に反応性に差が見られた。このことから、C-SPRA は、3 時間よりもはるかに短い反応での速度論的実験に有効な可能性がある。3 種類の試験物質を使用した分析では、C-SPRA の反応条件と時間を最適化することで最大の反応性を達成できることが示された。以上の結果より、C-SPRA の試験条件は、ペプチド樹脂を 100 mM の試験物質を室温で反応させ、24 時間インキュベートした後、反応率を定量することとした。

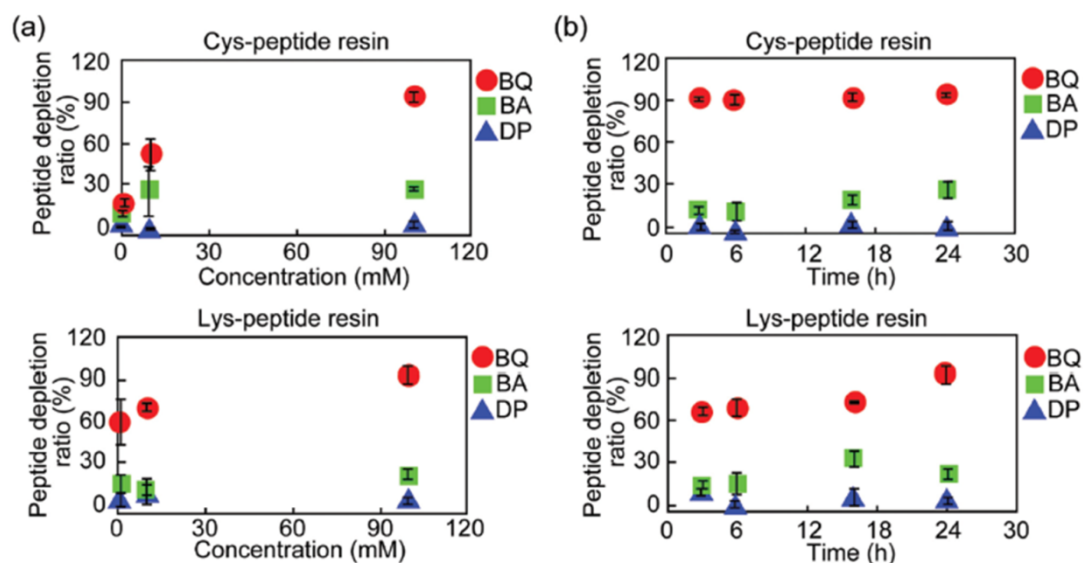


図 5-9 (a) 化学物質とペプチド樹脂の反応濃度検討。各化学物質は 1 mM、10 mM および 100 mM でペプチド樹脂と 24 時間反応させた。(b) 化学物質とペプチド樹脂との経時的な反応性の確認。各化学物質は 100 mM で 3、6、16 および 24 時間反応させた。結果は平均 ± 標準偏差として表した。

5.3.4. C-SPRA を用いた感作性物質の評価

C-SPRA の有用性と有効性を評価するために、代表的な 14 種類の感作および非感作物質 (極度感作性物質の BQ、強度感作性物質の FITC、中程度感作性物質の MBT、BA、MPH および UE、弱感作性物質の HCA、ACA、BB、BC、R(+)-Limonene、非感作性物質の BBP、DP および IPA) を用いて Cys 含有および Lys 含有ペプチド樹脂と反応性を評価した。これらの試験物質のうち 10 種類は log Kow 値が 3.5 以上であり、難水溶性と定義されている¹⁷。その中で、UA、HCA、ACA、BB および BC は、従来の DPRA では偽陰性とされていた代表的な感作性物質である。全ての試験物質は、図 5-5 に示した方法に従って測定した。

14 種類の試験物質の LLNA、log Kow 値、C-SPRA 結果、および DPRA 結果をまとめたものを表 5-1 に示す^{18, 19}。試験した 11 種類の全ての感作性物質 (BQ、FITC、MBT、BA、MPH、UE、ACA、HCA) で、平均ペプチド反応率 (Cys 含有ペプチド樹脂での反応率と Lys 含有ペプチド樹脂での反応率の平均) が 8.61% を超えた。全ての感作性物質で、Cys 含有ペプチド樹脂の反応率と Lys 含有ペプチド

ド樹脂の反応率のいずれかで 14%以上を示した。一方、DPRA では、UA、HCA、ACA、BB および BC などの難水溶性物質は偽陰性と判定されている。純粋な R(+)-Limonene は理論的にはペプチドと反応しないが、自動酸化に由来する不純物が含まれていることが HPLC 分析により明らかになった (図 5-10)。R(+)-Limonene は DPRA と C-SPRA の両方でペプチドと反応性を示したが^{20, 21}、この反応性は両試験法の過度な単純化に起因している。

試験した 3 種類の非感作性物質 (BBP、DP および IPA) は、6%未満の平均ペプチド反応率を示し、DPRA は同様の結果を示した。全ての非感作性物質は、Cys 含有ペプチド樹脂と Lys 含有ペプチド樹脂のいずれかで 7.1%未満の平均ペプチド反応率を示した。PA はペプチド配列中の Arg と相互作用する可能性があるが、FITC で 80%を超える反応率を示したことから、C-SPRA の試験条件では、Arg への PA の副反応は無視できると考えられる。

以上の結果より、C-SPRA は、8%の平均ペプチド反応率を閾値とすることで感作性物質と非感作性物質を判別できることが示された。表 5-1 には平均ペプチド反応率が 8%を超える化学物質を P、平均ペプチド反応率が 8%未満の化学物質は N と記載した。C-SPRA は、DPRA と比較して感作性を評価するための、より有望なスクリーニング方法を提供するが、R(+)-Limonene の例もあるように過度な単純化により誤判定を生む可能性もあり、より詳細に反応を解析する手法を構築していく必要があると考えられる。

in silico 解析などを用いた化合物の構造的な観点で反応性を解析すると、UE、ACA および BC は反応性官能基を有するため、メカニズム的には UE、ACA および BC は DPRA でも陽性を示すはずである^{22,23}。特に、ACA と HCA には求核攻撃を受けやすい二重結合があり、マイケル受容体と見なされている^{21,24}。C-SPRA においては、HCA は 10%以上の平均ペプチド反応率が観察されなかったが、Lys 含有ペプチド樹脂のペプチド反応率は 14%以上増加した。以前の報告では HCA とペプチドの反応を LC-MS を用いて観察した際に、Lys 含有ペプチドでのみシッフ塩基形成とマイケル付加体が観測されており²⁵、これは C-SPRA の結果と一致している。また、BC は LC-MS を用いて Cys および Lys 含有ペプチ

ドに結合することが報告されており²⁶、BC がペプチドとの反応性を有することが報告されている。UE はシッフ塩基を形成する求電子試薬と見なされるため²²、Lys のアミンに反応すると考えられており、C-SPRA でも同様に Lys 含有ペプチド樹脂と反応することが明らかとなった。このことから、C-SPRA は、DPRA によって偽陰性と判断された感作性物質を、正確に区別することができることを示した。

The European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing でのバリデーション試験で DPRA によって偽陰性を示す化学物質は、水溶性が低く、中程度または弱感作性物質であった²⁶。これらの結果は、C-SPRA が難水溶性を有する試験物質も完全に溶解して反応させているため、水溶性の低い様々な皮膚感作物質を予測できることを示している。以上のことから C-SPRA が様々な化学物質の皮膚感作性を正確に予測することができ、かつ化合物のスクリーニングに役立つ可能性があることを示唆している。

表 5-1 Cys 含有ペプチド樹脂および Lys 含有ペプチド樹脂に対する化学物質の反応性。

Test Chemicals	log Kow	LLNA Potency category	Mechanism	DPRA ^{a,b}		C-SPRA		
				Results	Cys depletion ratio (%)	Lys depletion ratio (%)	Mean depletion ratio (%)	Results ^c
<i>p</i> -Benzoquinone (BQ)	0.25	Extreme	Michael acceptor	P ^a	94.2 ± 0.6	92.9 ± 1.1	93.6	P
Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)	4.69	Strong	Acyl-transfer	P ^a	74.6 ± 10.1	98.4 ± 0.3	86.5	P
2-Mercaptobenzothiazole (MBT)	2.86	Moderate	Acyl-transfer	P ^a	24.8 ± 1.0	7.3 ± 3.8	16.1	P
Benzylidene acetone (BA)	2.04	Moderate	Michael acceptor	P ^a	28.1 ± 1.6	22.1 ± 4.2	25.1	P
5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal (MPH)	3.77	Moderate	Michael acceptor / Schiff base	-	57.3 ± 12.1	42.0 ± 9.9	49.6	P
Undec-10-enal (UE)	4.12	Moderate	Schiff base	N ^b	18.3 ± 3.8	19.1 ± 1.7	18.7	P
α-Hexyl cinnamic aldehyde (HCA)	4.82	Weak	Michael acceptor / Schiff base	N ^a	2.3 ± 1.6	14.9 ± 0.3	8.61	P
α-Amyl cinnamic aldehyde (ACA)	4.33	Weak	Michael acceptor / Schiff base	N ^a	4.8 ± 1.1	17.3 ± 2.7	11.1	P
Benzyl benzoate (BB)	3.54	Weak	SN2	N ^a	4.2 ± 3.6	14.1 ± 2.5	9.15	P
Benzyl cinnamate (BC)	4.06	Weak	Michael acceptor / SN2	N ^b	3.4 ± 1.2	17.3 ± 3.9	10.4	P
R(+)-Limonene	4.83	Weak	Non-binding ^e	P ^b	14.7 ± 3.5	8.3 ± 1.5	11.5	P
Butylbenzylphthalate (BBP)	4.84	Non-sensitizer	Non-binding	N ^b	4.6 ± 1.6	7.1 ± 1.9	5.83	N
Dibutyl phthalate (DP)	4.61	Non-sensitizer	Non-binding	N ^b	3.0 ± 1.3	2.8 ± 0.7	2.89	N
Isopropanol (IPA)	0.28	Non-sensitizer	Non-binding	N ^a	6.5 ± 5.3	3.4 ± 1.4	4.94	N
None	-	-	-	-	0.0 ± 0.0	0.9 ± 0.6	0.45	-

^a データは Natsch *et al.*, (2013)¹⁸ から引用。 ^b データは Otsubo *et al.*, (2017)¹⁹ から引用。 ^c 8%以上の反応率の場合は P、8%未満の反応率の場合は N と記載した。

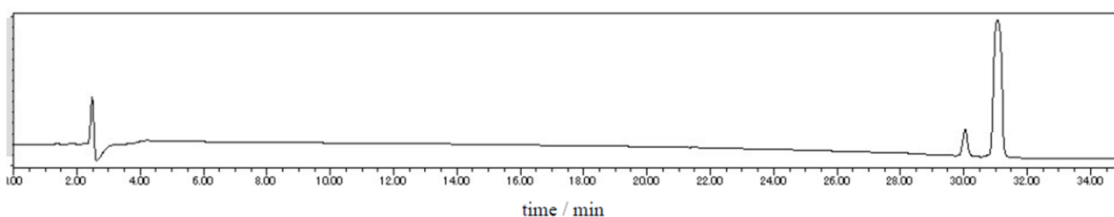


図 5-10 R(+)-Limonene のクロマトグラム。カラムは逆相クロマトグラフィー用の Inertsil ODS-3 カラム ($\phi 4.6 \times 150$ mm)を用いた。移動相は 0.08%含有 ACN と 0.1% TFA 含有 H₂O を用い、H₂O 5%から 30 分間で 95%ACN へと組成を直線的に変化させた後、95%ACN で 5 分間送液した。流速は 1.0 mL/min で送液した。

5.3.5. 磁性ビーズ担持 Lys と Cys の設計および合成

磁性ビーズ担持 Lys と Cys を設計および合成した (図 5-3)。固相担体としては両親媒性の性質を有する磁性ビーズである Micromer-M PEG-NH₂ Beads を選択した。磁性ビーズは強酸の影響を受けやすいため、弱酸で脱保護可能な Mtt 基を保護基として選択し、カップリング用モノマーとして Fmoc-Lys(Mtt)-OH および Fmoc-Cys(Mtt)-OH を選択した。DMSO は磁性ビーズの分散安定化溶媒であるため、Fmoc 合成に一般的に使用される溶媒である DMF や *N*-methylpyrrolidone (NMP) の代わりに合成溶媒には DMSO を使用した。合成プロトコルを最適化した後、合成純度を評価した。

まず初めに Fmoc-Lys(Mtt)-npp を磁性マイクロビーズ上に合成した。光切断リンカーである npp^{10, 27} を Beads と Fmoc-Lys(Mtt) の間に結合させることで、UV 照射時に Beads から Fmoc-Lys(Mtt) を放出させることが可能になる (図 5-11a)。UV 照射による Fmoc-Lys(Mtt) の放出後、Fmoc 基の吸収波長である 301 nm の吸光度を HPLC でモニターすることにより、ペプチド純度を評価した。HPLC クロマトグラムは、生成物 Fmoc-Lys(Mtt)-NH₂ に対応する 15.5 分にピークを示した (図 5-11b)。同様に、DMSO 溶媒中での Mtt 脱保護条件も確認した。Fmoc-Lys(Mtt)-npp Beads の Fmoc 基の脱保護とアセチル化に続いて、側鎖の Mtt 基を除去し、5(6)-carboxylfluorescein を Lys 側鎖の遊離アミンに結合させて Ac-Lys(Flu)-npp Beads を得た。UV 照射による Ac-Lys(Flu)の放出後、fluorescein の吸収波長である 490 nm の吸光度を HPLC でモニターすることにより、合成物

を評価した。14.5 分に目的生成物の明確なピークが得られ、DMSO 溶媒中での Mtt 脱保護が成功したことを示している (図 5-11c)。上記のアプローチを使用し、Ac-Lys Beads と Ac-Cys Beads を合成した。しかし、Ac-Cys Beads は、SH 酸化 (磁性ビーズの還元) により、磁性ビーズの段階的な分解が生じた。したがって、以下の実験では Ac-Lys Beads のみを使用することとした。

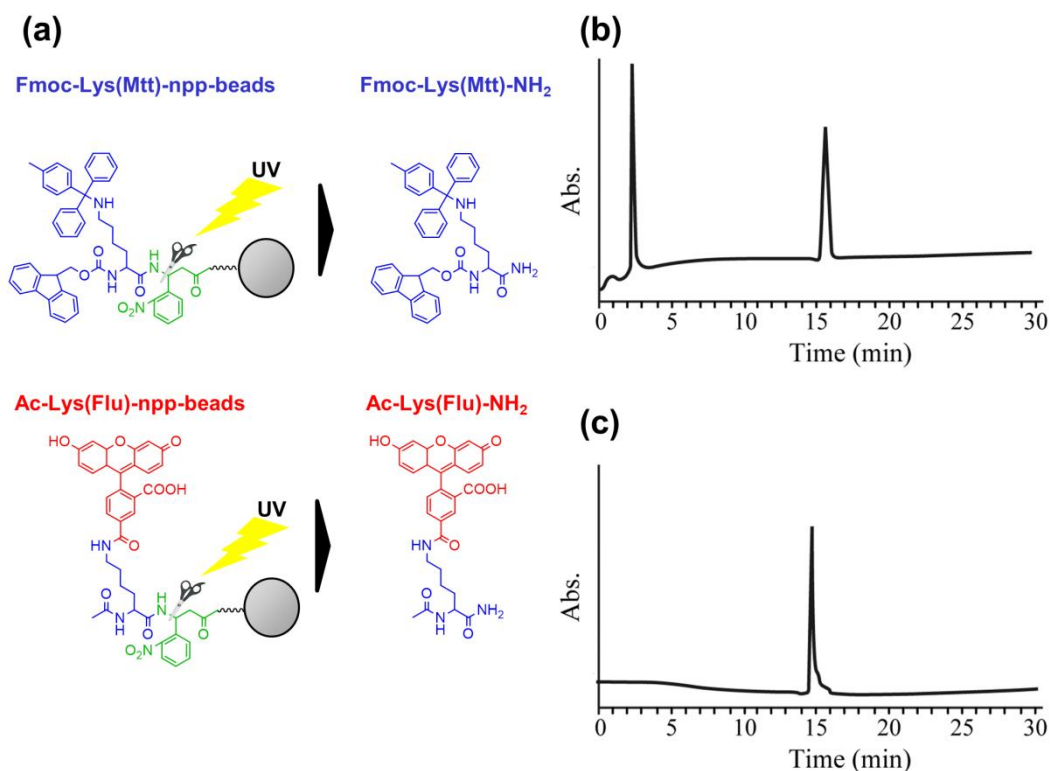


図 5-11 (a) 磁気ビーズからの Fmoc-Lys(Mtt)-NH₂ および Ac-Lys(Flu)-NH₂ の放出。(b) Fmoc-Lys(Mtt)-NH₂ および (c) Ac-Lys(Flu)-NH₂ の HPLC クロマトグラム。

5.3.6. C-SPRA-MB での色素の選定および反応条件の最適化

Ac-Lys Beads の遊離アミノ基は BB を用いて定量し、Ac-Lys Beads と試験物質の反応性を評価した。BB は固相上の一級アミンとの検出方法として広く用いられている^{28,29}。BB を Ac-Lys Beads と反応させることで、Lys 側鎖の一級アミンと塩を形成し、その後アルカリ性溶液で処理することでイオン結合が解離してビーズから BB が放出される。さらに、BB の反応性は C-SPRA で使用されているピクリン酸よりも穏やかに反応させることが可能であり、磁性ビーズでの反応に適していると考えられる。以上より、BB の吸光度を検出することで、磁性

ビーズ上のアミン量も定量化が可能になる。Ac-Lys Beads の反応性は図 5-6 に示した方法に従って測定した。本研究で使用する反応溶媒は溶解性が高く、磁性ビーズの分散安定化溶媒である DMSO を選択した。C-SPRA-MB 実験条件を最適化するために、代表的な強度感作性物質である FITC を用いて反応時間と試験物質濃度を評価した。

最初に、FITC の用量反応曲線を測定して、適切な試験物質濃度を決定した。FITC との反応率は用量依存的に増加し、100 mM で最大の反応率を示した。1 mM および 10 mM では、それぞれ 44% および 46% の反応率を示した (図 5-12a)。これらの結果は、C-SPRA-MB が 100 mM の濃度で感作性を十分に判断でき、1 mM および 10 mM でも極度および強度感作性を評価できる可能性があることを示唆する。従来の DPRA のプロトコルでは、100 mM の試験物質と反応させることが定められているため、本研究では比較のために標準条件として試験物質濃度は 100 mM を選択した。

さらに、100 mM の FITC を使用して反応速度を評価した。C-SPRA-MB は経時的に反応率を示し、C-SPRA-MB は 1 時間または 3 時間よりもはるかに短い反応で速度論的実験を行うことができる可能性が示唆される (図 5-12b)。最大反応率は 24 時間であり、これは、従来の DPRA プロトコルと同じであった。したがって、C-SPRA-MB の最終プロトコルは、Ac-Lys Beads を 100 mM の試験物質と反応させ、室温で 24 時間インキュベートすることとした。

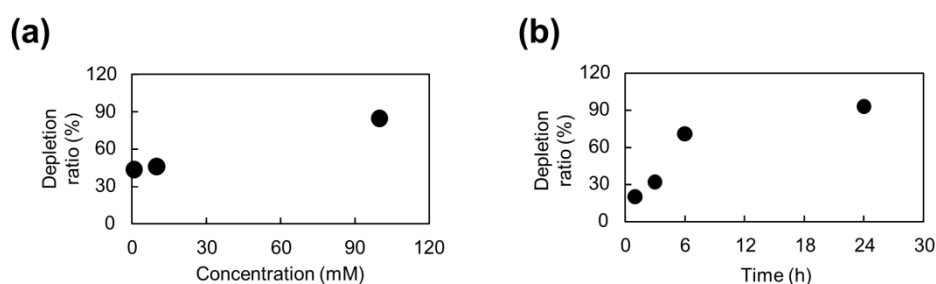


図 5-12 (a) FITC と Ac-Lys Beads の反応濃度検討。FITC は 1 mM、10 mM および 100 mM で Ac-Lys Beads と 24 時間反応させた。(b) FITC と Ac-Lys Beads との経時的な反応性の確認。FITC は 100 mM で 1、3、6 および 24 時間反応させた。

5.3.7. C-SPRA-MB を用いた感作性物質の評価

C-SPRA-MB の有効性と有用性を評価するために、Ac-Lys ビーズと代表的な 8 種類の感作および非感作性物質 (極度感作性物質の BQ、強度感作性物質の FITC、中程度感作性物質の BA、UE および MPH、弱感作性物質の ACA、非感作性物質の DP) との反応性を評価した。これらの試験物質のうち 5 種類は、log Kow 値が 3.5 以上であった¹⁷。中でも、ACA は従来の DPRA および ADRA で偽陰性として検出された代表的な感作性物質である (表 5-2)^{5,19,20}。全ての試験物質は、図 5-6 に示した方法で測定した。試験した 6 種類の感作性物質 (BQ、FITC、BA、UE、MPH および ACA) で 30%以上の反応率が見られた。従来の DPRA および ADRA では、ACA などの難水溶性化合物は陰性として判断されているが、ACA は反応性官能基を有するため^{22,25}、本来は反応するはずである。DPRA では弱～中程度の感作性で水溶性が低い物質は偽陰性になりやすいとされており、ACA は弱感作性かつ難水溶性物質である²⁶。C-SPRA-MB では弱～中程度の感作性物質で難水溶性物質の UE と ACA でも 30%以上の反応率が見られており、C-SPRA-MB が DPRA と ADRA によって誤って判定された水溶性の低い化合物も評価できることを示している。非感作性物質 (DP) は、DPRA および ADRA の結果と同様に 10%未満の反応率であった。C-SPRA-MB ではペプチド反応率 20%を閾値 (DP の反応率 8.9%の 2 倍) とすることで、感作性物質と非感作性物質を区別することが可能であった。表 5-2 には 20%以上の反応率の場合は P、20%未満の反応率の場合は N と記載した。

さらに、弱～中程度の感作物質は樹脂固定化ペプチドを利用した C-SPRA よりも高い反応率を示した。高い反応率を示した理由としては、ペプチド配列が短いことと、樹脂とは異なりビーズの表面にのみペプチドが固定されるため、ペプチドに対する化学物質の接触性が高いことに起因すると考えられる。このことから、磁性ビーズを固相担体とする C-SPRA-MB は、ペプチドとの化学物質との接触性が高く、さらに反応溶媒に高溶解性を持つ DMSO を使用できるため、反応性の低い難水溶性物質も評価できる可能性がある。

表 5-2 Ac-Lys-beads に対する化学物質の反応性。

Test Chemicals	log Kow	LLNA Potency category	Mechanism	DPRA ^{a,b} Results	ADRA ^c Results	C-SPRA Mean depletion ratio (%)	C-SPRA Results ^d	C-SPRA-MB Depletion ratio (%)	Results ^e
<i>p</i> -Benzoquinone (BQ)	0.25	Extreme	Michael acceptor	P ^a	P ^c	93.6	P	92.5	P
Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)	4.69	Strong	Acyl-transfer	P ^a	P ^c	86.5	P	84.6	P
Benzylidene acetone (BA)	2.04	Moderate	Michael acceptor	P ^a	P ^c	25.1	P	75.0	P
5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal (MPH)	3.77	Moderate	Michael acceptor / Schiff base	-	-	42.9	P	46.2	P
Undec-10-enal (UE)	4.12	Moderate	Schiff base	N ^b	N ^c	18.7	P	67.5	P
α -Amyl cinnamic aldehyde (ACA)	4.33	Weak	Michael acceptor / Schiff base	N ^a	N ^c	11.1	P	40.0	P
Dibutyl phthalate (DP)	4.61	Non-sensitizer	Non-binding	N ^b	N ^c	2.89	N	9.7	N

^a データは Natsch *et al.*, (2013)¹⁹ から引用。 ^b データは Otsubo *et al.*, (2017)²⁰ から引用。 ^c データは Fujita *et al.*, (2014)⁴ から引用。 ^d 8%以上の反応率の場合は P、8%未満の反応率の場合は N と記載した。 ^e 20%以上の反応率の場合は P、20%未満の反応率の場合は N と記載した。(Processes, 8, 1257 (2020)より転載)。

5.4. 小括

第五章では KE1 を模倣した DPRA の課題を克服するために樹脂固定化ペプチドを利用した *in vitro* 試験法である C-SPRA を開発した。C-SPRA で多種多様な性質の皮膚感作性物質を評価した結果、DPRA では評価が困難であった難水溶性の弱～中程度の感作性物質も正確に評価することが可能であることを明らかにした。このことから C-SPRA は DPRA の欠点に対処できる次世代の *in vitro* 皮膚感作試験として有望であることを実証できた。さらに、固定化ペプチドを用いることで、洗浄により未反応物質の除去や反応停止が可能となるため、反応性を速度論的に評価することが可能になってくる。DPRA や ADRA では、高い反応性を持つ物質は全て反応率が 100% 付近になってしまうため、物質間の反応性を区別することが困難である。C-SPRA で速度論を評価することができれば、高い反応性を持つ物質間での反応性の区別も可能となり、感作性物質のリスク評価への利用が期待できる。

また、大量のデータを迅速に取得することを目的に、固相担体を樹脂から磁性ビーズにした C-SPRA-MB も開発した。DMSO を用いた磁性ビーズへのアミノ酸カップリングを最適化することで、磁性ビーズへのペプチドの合成法を確立した。また、C-SPRA-MB は C-SPRA と同様に、難水溶性の弱～中程度の感作性物質も正確に評価することが可能であることを明らかにした。C-SPRA-MB は固相担体の性質から、ペプチドに対する化学物質の接触性が高く C-SPRA より感度良く感作性物質を検出できることが明らかになった。さらに、磁性ビーズを使用しているため、より簡便に洗浄操作が可能となり、大量のデータを迅速に取得できる。また、非常に速い反応を伴う速度論実験への適用も期待できる。

以上のことから、KE1 を模倣した従来の試験法より幅広い化学物質に適用でき、簡便かつハイスループットな試験法を開発することができた。しかしながら、試験法の過度な単純化のために、結合メカニズムなどの詳細な解析が不可能となっている。また、混合物を評価した場合、どの物質が結合したかが不明のため、混合物中のどの物質が感作性を有しているかは判断できない。このような問題を解決するには、MS や NMR などを用いてペプチドと結合した感作性

物質を詳細に解析する必要がある。そこで本研究で開発した **C-SPRA** を基盤として、感作性の有無のみならず、詳細に分子レベルでのメカニズムの評価ができる測定法を構築していく必要があると考えた。第六章では光切断リンカーを利用した樹脂固定化ペプチドと感作性物質の反応メカニズム解析について述べる。

5.5. 参考文献

1. I. Kimber, J. A. Mitchell, A. C. Grin, Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 585–586 (1986).
2. G. F. Gerberick, J. D. Vassallo, R. E. Bailey, J. G. Chaney, S. W. Morrall, J. P. Lepoittevin, Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.*, **81**, 332–343 (2004).
3. G. F. Gerberick, J. D. Vassallo, L. M. Foertsch, B. B. Price, J. G. Chaney, J. P. Lepoittevin, Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicol. Sci.*, **97**, 417–427 (2007).
4. M. Fujita, Y. Yamamoto, H. Tahara, T. Kasahara, Y. Jimbo, T. Hioki, Development of a prediction method for skin sensitization using novel cysteine and lysine derivatives. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **70**, 94–105 (2014).
5. OECD. OECD Guidelines for testing of chemicals No. 442C. Key-event-based test guideline for in chemico skin sensitisation assays addressing the adverse outcome pathway key event on covalent binding to proteins. *OECD Publishing*, Paris (2019).
6. OECD, The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, *OECD publishing*, Paris (2012).
7. J. K. Scott, G. P. Smith, Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, **249**, 386–390 (1990).
8. K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature*, **354**, 82–84 (1991).
9. R. Frank, H. Overwin, SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol. Biol.*, **66**, 149–169 (1996).
10. K. Usui, T. Kikuchi, K. -Y. Tomizaki, T. Kakiyama H. Mihara, A Novel Array Format for Monitoring Cellular Uptake Using a Photo-Cleavable Linker for Peptide Release. *Chem. Commun.*, **49**, 6394–6396 (2013).
11. W. C. Chan, P. D. White, Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach,

Oxford University Press, New York, (2000).

12. G. L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70–77 (1958).
13. A. Virgilio, J. A. Ellman, Simultaneous Solid-Phase Synthesis of beta-Turn Mimetics Incorporating Side-Chain Functionality. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 11580–11581 (1994).
14. J. P. Badyal, A. M. Cameron, N. R. Cameron, D. M. Coe, R. Cox, B. G. Davis, L. J. Oates, G. Oye and P. G. Steel, A simple method for the quantitative analysis of resin bound thiol groups. *Tetrahedron Lett.*, **42**, 8531–8533 (2001).
15. B. F. Gisin, The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric acid. *Anal. Chim. Acta*, **58**, 248 (1972).
16. W. S. Hancock, J. E. Battersby and D. R. Harding, The use of picric acid as a simple monitoring procedure for automated peptide synthesis. *Anal. Biochem.*, **69**, 497–503 (1975).
17. O. Takenouchi, M. Miyazawa, K. Saito, T. Ashikaga, H. Sakaguchi, Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic chemicals with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.*, **38**, 599–609 (2013).
18. A. Natsch, C. A. Ryan, L. Foertsch, R. Emter, J. Jaworska, F. Gerberick and P. Kern, A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *J. Appl. Toxicol.*, **33**, 1337–1352 (2013).
19. Y. Otsubo, T. Nishijo, M. Miyazawa, K. Saito, H. Mizumachi, H. Sakaguchi, Binary test battery with KeratinoSens™ and h-CLAT as part of a bottom-up approach for skin sensitization hazard prediction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **88**, 118–124 (2017).
20. D. W. Roberts, G. Patlewicz, P. S. Kern, F. Gerberick, I. Kimber, R. J. Dearman, C. A. Ryan, D. A. Basketter, A. O. Aptula, Mechanistic applicability domain classification of a local lymph node assay dataset for skin sensitization. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 1019–1030 (2007).
21. D. Urbisch, A. Mehling, K. Guth, T. Ramirez, N. Honarvar, S. Kolle, R. Landsiedel, J. Jaworska, P. S. Kern, F. Gerberick, A. Natsch, R. Emter, T. Ashikaga, M. Miyazawa, H. Sakaguchi, Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **71**, 337–351 (2015).

22. O. Takenouchi, S. Fukui, K. Okamoto, S. Kurotani, N. Imai, M. Fujishiro, D. Kyotani, Y. Kato, T. Kasahara, M. Fujita, A. Toyoda, D. Sekiya, S. Watanabe, H. Seto, M. Hirota, T. Ashikaga, M. Miyazawa, Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J. Appl. Toxicol.*, **35**, 1318–1332 (2015).
23. D. W. Roberts, A. O. Aptula, G. Patlewicz, Electrophilic chemistry related to skin sensitization. Reaction mechanistic applicability domain classification for a published data set of 106 chemicals tested in the mouse local lymph node assay. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 44–60 (2007).
24. M. Aleksic, E. Thain, D. Roger, O. Saib, M. Davies, J. Li, A. Aptula, R. Zazzeroni, Reactivity profiling: Covalent modification of single nucleophile peptides for skin sensitization risk assessment. *Toxicol. Sci.*, **108**, 401–411 (2009).
25. A. Natsch, H. Gfeller, LC-MS–based characterization of the peptide reactivity of chemicals to improve the in vitro prediction of the skin sensitization potential. *Toxicol. Sci.*, **106**, 464–478 (2008).
26. EURL-ECVAM. EURL ECVAM Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitisation Test, *Publications Office of European Union*, Luxembourg, (2013).

第六章

光切断リンカーを有する固相担持ペプチドを用いた 質量分析によるペプチド結合性試験の構築

6.1. 緒言

Direct Peptide Reactivity Assay (DPR)^{1,2}や第五章で開発した Chromophore-Solid phase Peptide Reaction Assay (C-SPRA) はペプチドと試験物質を反応させた後、HPLC や分光光度測定により未反応のペプチド量を定量することで感作性の有無を評価する試験法である。DPR や C-SPRA はスクリーニング目的には十分かもしれないが、過度に単純化した試験法であるために、次のような課題も残されている。

課題 1) ペプチドと感作性物質のモル比で反応条件を決めているため、分子量不明のサンプルの評価が困難である。課題 2) 混合物中のどの物質が感作性を有しているかは判断できない。さらに、DPR は大過剰での反応条件を必須としているため、混合物中に微量に感作性物質が含まれていたとしても、評価できない恐れがある。課題 3) 結合を直接観測していないため、試験物質の反応メカニズムなどの詳細な解析をすることができない。製品開発や毒性学の発展において、感作性物質の反応メカニズムの理解は非常に重要である。

これらの問題の多くは感作性物質とペプチドの反応を間接的に観測していることに起因していると考えられる。このことから、感作性物質が樹脂固定化ペプチドに反応した後に、感作性物質がペプチドに結合した状態で樹脂から切り離すことができれば、質量分析などにより、直接結合を観測できると考えられる。そこで、第五章で報告した樹脂固定化ペプチドに光切断官能基をリンカーとして組み合わせることで、上記の問題を解決することを試みた。

光切断官能基と固相担体の組み合わせは、標的物質の捕捉や溶出に非常に効果的であり、タンパク質の精製など様々な分野で応用されている。光切断官能基は有機合成化学分野において、光照射という非常に緩和条件で脱保護を可能とし、脱保護処理による分解や副反応の進行を防ぐことができるため、盛んに

研究されてきた³。これまで様々な光切断官能基が開発されてきたが、中でも最も広く利用されているものとして *o*-Nitrobenzyl 基がある。*o*-Nitrobenzyl amine 誘導体は、365 nm の光を照射すると急速に切断され、カルボン酸などに効率的に導入できることからペプチド合成などに利用されている⁴⁻¹⁰。

以上のことから、第六章では上記課題点を改善するために、光切断リンカーと樹脂固定化ペプチドを組み合わせ、解析手法には質量分析を利用した *in vitro* 感作性試験法 (Mass spectrometry-based Solid-phase Peptide Reaction Assay : M-SPRA) の開発と、M-SPRA を用いた感作性物質の結合メカニズムの詳細解析を試みた (図 6-1)。光切断リンカーを有する樹脂固定化ペプチドを利用することで、C-SPRA 同様に、洗浄により未反応物質の除去が可能となる。さらに光照射によりペプチドが樹脂から切り出されるため、ペプチドと結合した感作性物質のみが溶出されることとなり、混合物でも評価が可能になる。また、ペプチドと感作性物質の付加物のみが溶出されるため、不純物がなく容易に質量分析が可能となり、直接結合を観測できるため、反応メカニズムなどの詳細な解析が可能となる。

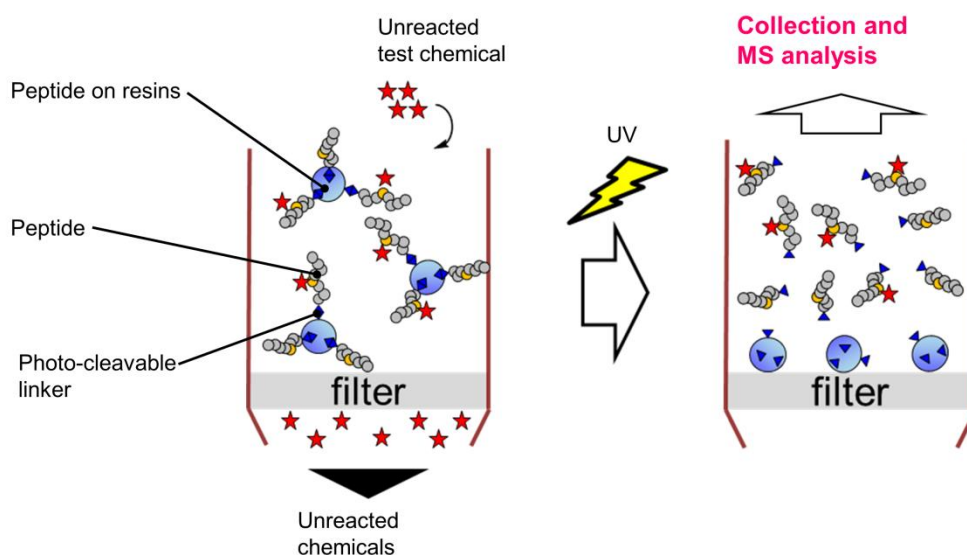


図 6-1 光切断リンカーを介した樹脂固定化ペプチドを利用した皮膚感作性試験法の概略図。

6.2. 材料および方法

6.2.1. 試験物質と合成試薬

p-Benzoquinone (BQ)、Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)、Benzylidene acetone (BA)、5-Methyl-2-phenyl-2-hexanal (MPH)、Undec-10-enal (UE)、 α -Hexyl cinnamic aldehyde (HCA)、 α -Amyl cinnamic aldehyde (ACA)、Benzyl cinnamate (BC)、Dibutyl phthalate (DP) および Isopropanol (IPA) は富士フイルム和光純薬株式会社から購入し、特級試薬を使用した。FITC は AdipoGen 社から購入したものを使用した。MPH と ACA は東京化成工業株式会社から購入したものを使用した。DP はシグマアルドリッチ社から購入したものを使用した。試験物質は全て特級のものを使用し、ペプチド合成用の *N,N*-Dimethyl formamide (DMF) と *N*-Methylmorpholine に溶解したものを精製することなく使用した。固定化樹脂は株式会社ハイペップ研究所から購入した TentaGel S NH₂ resin を使用した。ペプチド合成には株式会社ハイペップ研究所から購入した *N*- α -Fmoc-alanine (Fmoc-Ala-OH)、*N*- β -Fmoc-alanine (Fmoc- β Ala-OH)、*N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Boc-lysine (Fmoc-Lys(Boc)-OH)、*N*- α -Fmoc-S-trityl-cysteine (Fmoc-Cys(Trt)-OH)、*N*- α -Fmoc-phenylalanine (Fmoc-Phe-OH)、*N*- α -Fmoc-NG-(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-arginine (Fmoc-Arg(Pbf)-OH)、*N*- α -Fmoc-aspartic acid β -t-butyl ester (Fmoc-Asp(OtBu)-OH) および Fmoc-3-amino-3-(2'-nitrophenyl) propionic acid (Fmoc-npp-OH) が使用された。縮合剤には渡辺化学工業株式会社から購入した 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU)、[2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) と 1-hydroxy benzotriazole monohydrate (HOBt) を使用した。Trifluoroacetic acid (TFA) は渡辺化学工業株式会社から購入したものを使用した。Triisopropylsilane (TIPS) は富士フイルム和光純薬株式会社から購入したものを使用した。Dithiothreitol (DTT) は富士フイルム和光純薬株式会社から購入したものを使用した。

6.2.2. 測定機器

HPLC は Waters 社製の Alliance HPLC、e2695 カラムヒーターおよび 2489 紫外可視光 (UV/Vis) 検出器を使用した。MALDI-TOF MS はブルカー社製の Autoflex III を使用した。

6.2.3. 光切断リンカーを有する樹脂固定化ペプチドの合成

光切断リンカーを有する Cys および Lys 含有ペプチド固定化樹脂 (Cys-peptide-npp resin と Lys-peptide-npp resin) は、TentaGel S NH₂ resin に Fmoc 法を用いて固相合成を行った¹³。Fmoc-npp-OH と Fmoc-Asp(OtBu)-OH は resin に導入可能なペプチドの量に対して 4 当量の Fmoc-amino acid(AA)-OH と HATU を加え、カップリングを行った。Fmoc-Ala-OH、Fmoc-βAla-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Phe-OH および Fmoc-Arg(Pbf)-OH は resin に導入可能なペプチドの量に対して 10 当量の Fmoc-AA-OH と HBTU と HOBt を加え、カップリングを行った。まず初めに、Fmoc-npp-OH を resin に結合させ、その後 DPRA に使用されているペプチド配列に従って、アミノ酸を順番にカップリングさせ、2 種類の樹脂固定化ペプチドを合成した (Ac-RFAAKCAD-βA-npp resin と Ac-RFAACAD-βA-npp resin)。ペプチドの側鎖保護基は、ペプチド樹脂を脱保護溶液 [TFA/H₂O/TIPS (50:1:1, v/v)] 中で 2 時間インキュベートすることによって除去した。ペプチド樹脂は洗浄溶液 [TFA/H₂O (50:50, v/v)] と *N*-Methylpyrrolidone および Chloroform で 5 回洗浄した後、デシケーターで完全に乾燥させた。

6.2.4. M-SPRA の試験手順

Cys-peptide-npp resin

Cys-peptide-npp resin を 2 本のチューブにそれぞれ 1 mg 秤量し、各チューブに 0.1 mM の DTT 溶液 (DMF 溶媒) を 0.3 mL 加え、24 時間静置させることでペプチド樹脂を膨潤させた。1 本のチューブに 100 mM の試験物質溶液 (DMF 溶媒) を加え、室温で 24 時間インキュベートした (test チューブ)。もう一方のチューブには DMF を加え、室温で 24 時間インキュベートした (control チューブ)。インキュベート後、ペプチド樹脂は DMF と切断溶液 [H₂O/acetonitrile (ACN) /TFA (95:5:0.01, v/v)] で 5 回洗浄した。Cys-peptide-npp resin に 300 μL の切断溶液を加え、UV ライトで 20 分間照射することで、樹脂からペプチドを切断し、その後、樹脂に吸着したペプチドを 300 μL の洗浄溶液で洗浄した。切断溶液と洗浄溶液の両方を、MALDI-TOF MS または HPLC を用いて分析した。

Lys-peptide-npp resin

Lys-peptide-npp resin を 2 本のチューブにそれぞれ 1 mg 秤量し、各チューブに DMF を 0.3 mL 加え、24 時間静置させることでペプチド樹脂を膨潤させた。1 本のチューブに 100 mM の試験物質溶液 (1%*N*-methylnmorphiline 含有 DMF 溶媒) を加え、室温で 24 時間インキュベートした (test チューブ)。もう一方のチューブには DMF を加え、室温で 24 時間インキュベートした (control チューブ)。インキュベート後、ペプチド樹脂は DMF と切断溶液で 5 回洗浄した。Lys-peptide-npp resin に 300 μL の切断溶液を加え、UV ライトで 20 分間照射することで、樹脂からペプチドを切断し、その後、樹脂に吸着したペプチドを 300 μL の洗浄溶液で洗浄した。切断溶液と洗浄溶液の両方を、MALDI-TOF MS または HPLC を用いた分析した。

HPLC 分析

逆相クロマトグラフィー用カラムであるジーエルサイエンス社製の Inertsil C4 カラム ($\phi 10.0 \times 250$ mm) を用いて、HPLC 分析を行った。移動相には良溶媒 [ACN/H₂O/TFA (95:10:0.08, v/v)] と貧溶媒 [ACN/H₂O/TFA (5:95:0.1, v/v)] を用い、良溶媒を 30 分間で 0% から 100% へと組成を直線的に変化させた。流速は 3.0 mL/min で送液した。

また、逆相クロマトグラフィー用カラムであるジーエルサイエンス社製の Inertsil ODS-3 カラム ($\phi 4.5 \times 150$ mm) を用いて、HPLC 分析を行った。移動相には 0.1% TFA 含有 ACN を用い、0.1% TFA 含有 ACN を 30 分間で 0% から 100% へと組成を直線的に変化させた。流速は 1.0 mL/min で送液した。検出器を 220 nm と 254 nm に設定してモニターした。

MALDI-TOF MS 分析

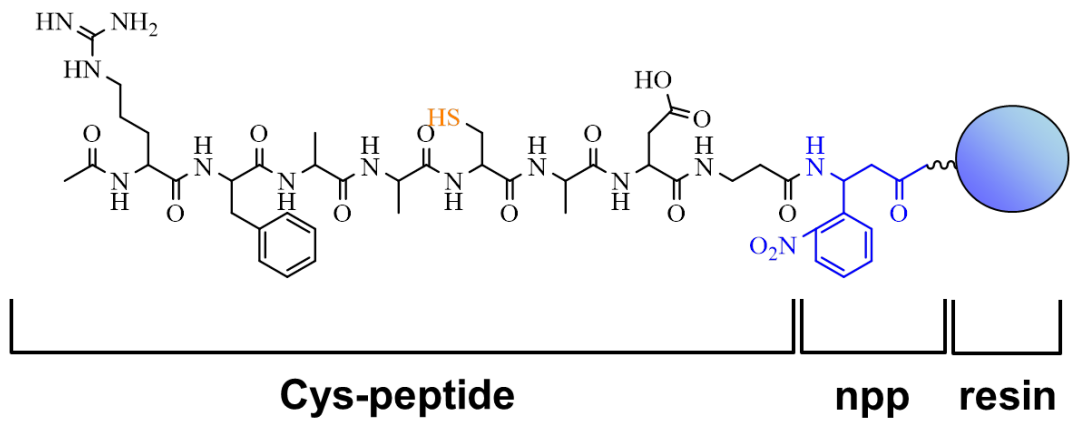
樹脂から切断されたペプチド溶液は、3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid をマトリックスとして MALDI-TOF MS を用いて分析した。TOF データは、angiotensin II と insulin を標準品として用いることで外部校正を行った。

6.3. 結果および考察

6.3.1. 光切断リンカーを有するペプチド樹脂の設計および合成

2種類の光切断リンカーを有する樹脂固定化ペプチド (Cys-peptide-npp resin および Lys-peptide-npp resin) を設計し、合成した (図 6-2)。DPRA に使用されたペプチドは、光切断官能基の npp リンカーを介して合成され、ペプチドの C 末端カルボキシル基と両親媒性の TentaGel S NH₂ resin の N 末端を結合させて、ペプチドと樹脂を固定化した。光切断官能基である npp リンカーは 365 nm の光照射により、穏やかな条件下で切断することが可能であり、固相ペプチド合成に広く使用されている (図 6-3)^{7,8,10}。光切断とペプチド純度を確認するため、Cys-peptide-npp resin と Lys-peptide-npp resin に UV 照射した後、HPLC および MALDI-TOF MS を用いて分析した。結果、光照射により樹脂からペプチドを切断することが可能であり、さらに高純度のペプチドの合成が可能であった (図 6-4)。これらのペプチド樹脂は難水溶性物質とも反応させることが可能であり、さらに樹脂洗浄による反応停止後に光照射により樹脂からペプチド切断した後にすることで、MS 分析を行うことで詳細なペプチド反応性を評価することが可能である。

Cys-peptide-npp resin



Lys-peptide-npp resin

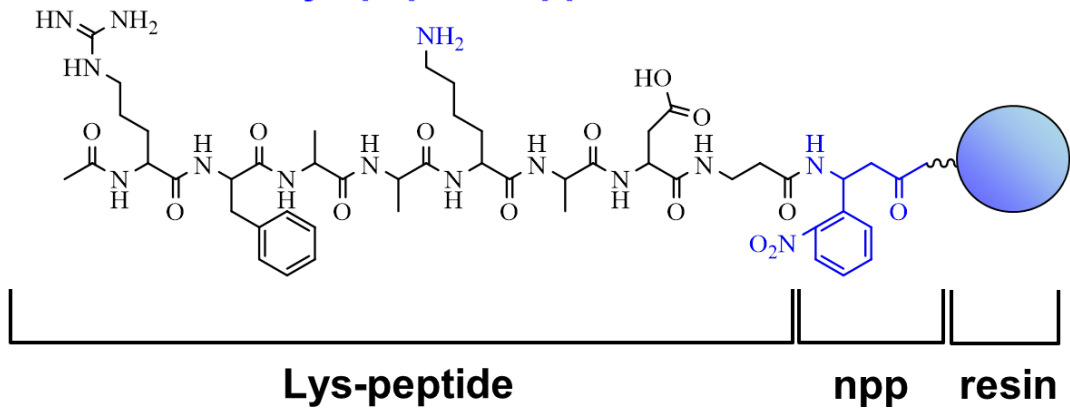


図 6-2 Cys-peptide-npp resin と Lys-peptide-npp resin の構造

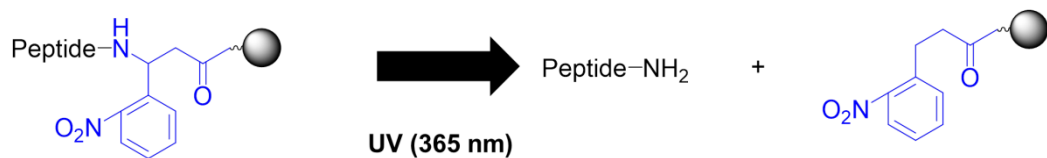


図 6-3 npp リンカーの光切断機構

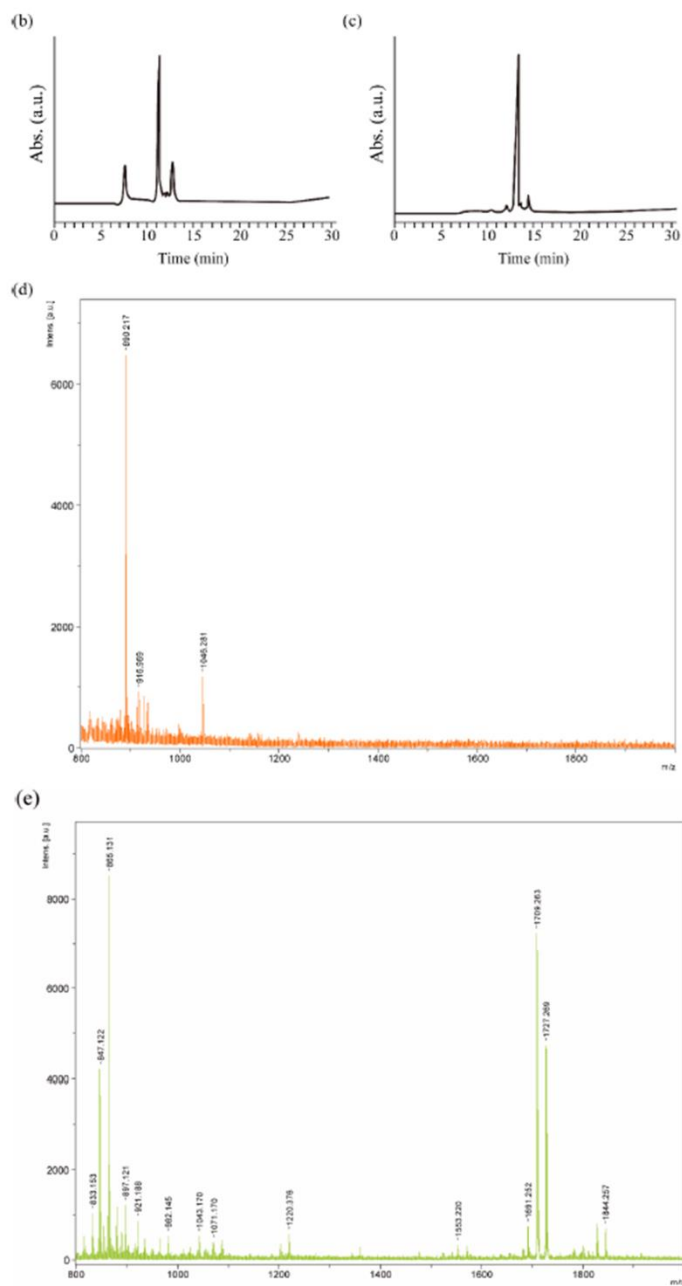


図 6-4 Cys-peptide-npp resin と Lys-peptide-npp resin から切断されたペプチドの HPLC クロマトグラム

6.3.2. M-SPRA における反応条件の最適化

代表的な強度感作性物質である FITC を用いて Lys-peptide-npp resin との反応性を HPLC で確認することで、反応条件を最適化した。Lys-peptide-npp resin と 100

mM の FITC とを反応させた後、UV 照射で樹脂からペプチドを切断し、HPLC を用いて Lys-peptide 付加物を確認した。HPLC クロマトグラムは 19 分に Lys-peptide 付加物に対応するピークを示した (図 6-5a)。図 6-5b には 50 μ M の FITC 単体のクロマトグラムを示し、24 分に FITC に対応するピークが観測された。この結果から、peptide-npp resin の洗浄後の FITC の濃度は 50 μ M 未満であり、反応仕込み量の 1/2000 の濃度以下であった。このことから未反応の化学物質が洗浄によって peptide-npp resin から容易に除去できること、およびペプチド付加物のみが樹脂から放出されることが明らかになった。

Lys-peptide-npp resin と 100 mM の FITC を反応させ、光照射によって樹脂からペプチドを切断した後、切断溶液の質量分析を行った。 $m/z = 1279$ に FITC 修飾 Lys-peptide 由来の $[M+H]^+$ が検出された (図 6-6)。さらに、切断された FITC 修飾ペプチド溶液を希釈し、MS の検出限界を確認した (図 6-7)。結果は、50 μ M でも目的の付加物ピークを観察することが可能であった。次に、微量の感作性物質を評価することが可能かを確認するために、Lys-peptide-npp resin に 25 μ M の FITC を 50 mL 加えて、反応させたところ FITC 修飾 Lys-peptide が観測された。これは、低濃度の増感剤でも M-SPRA を補充できることを示している (図 6-8)。このアプローチを利用して、Cys-peptide-npp resin および Lys-peptide-npp resin と感作性物質との反応性に関するデータを取得した。

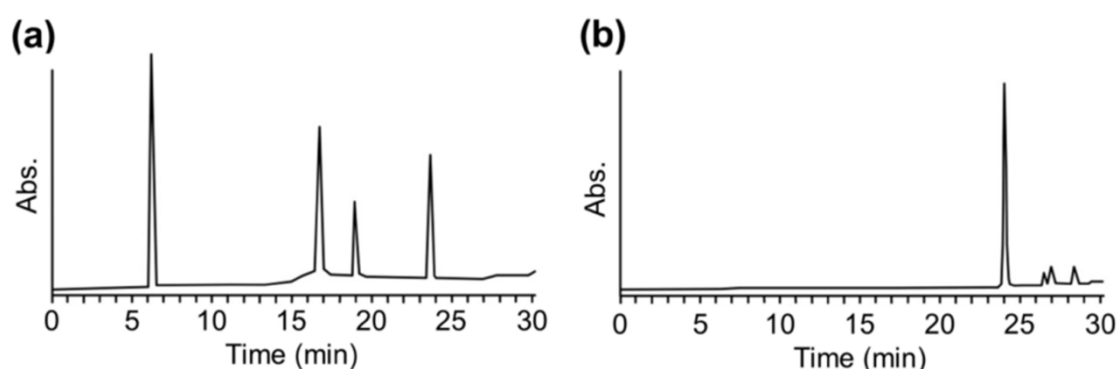


図 6-5 (a) FITC 修飾 Lys-peptide 由来の HPLC クロマトグラム。(b) 50 μ M の FITC 単体の HPLC クロマトグラム。

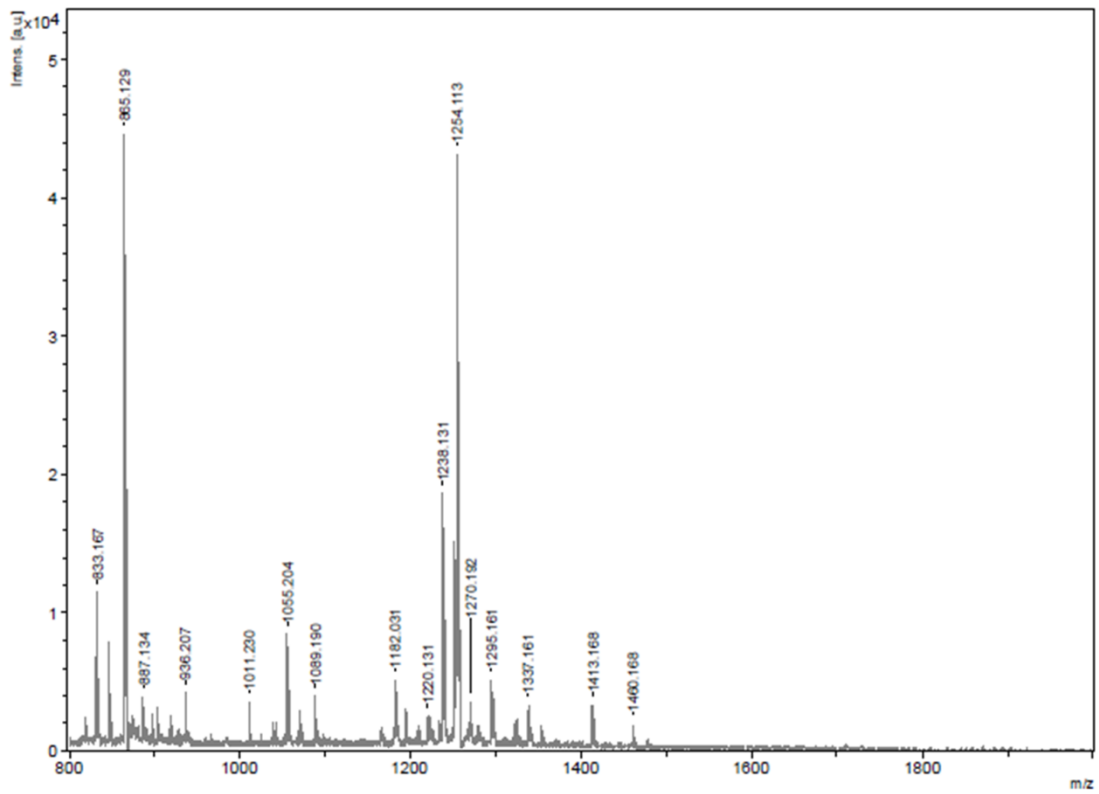


図 6-6 FITC 修飾 Lys-peptide 由来の MS スペクトル。

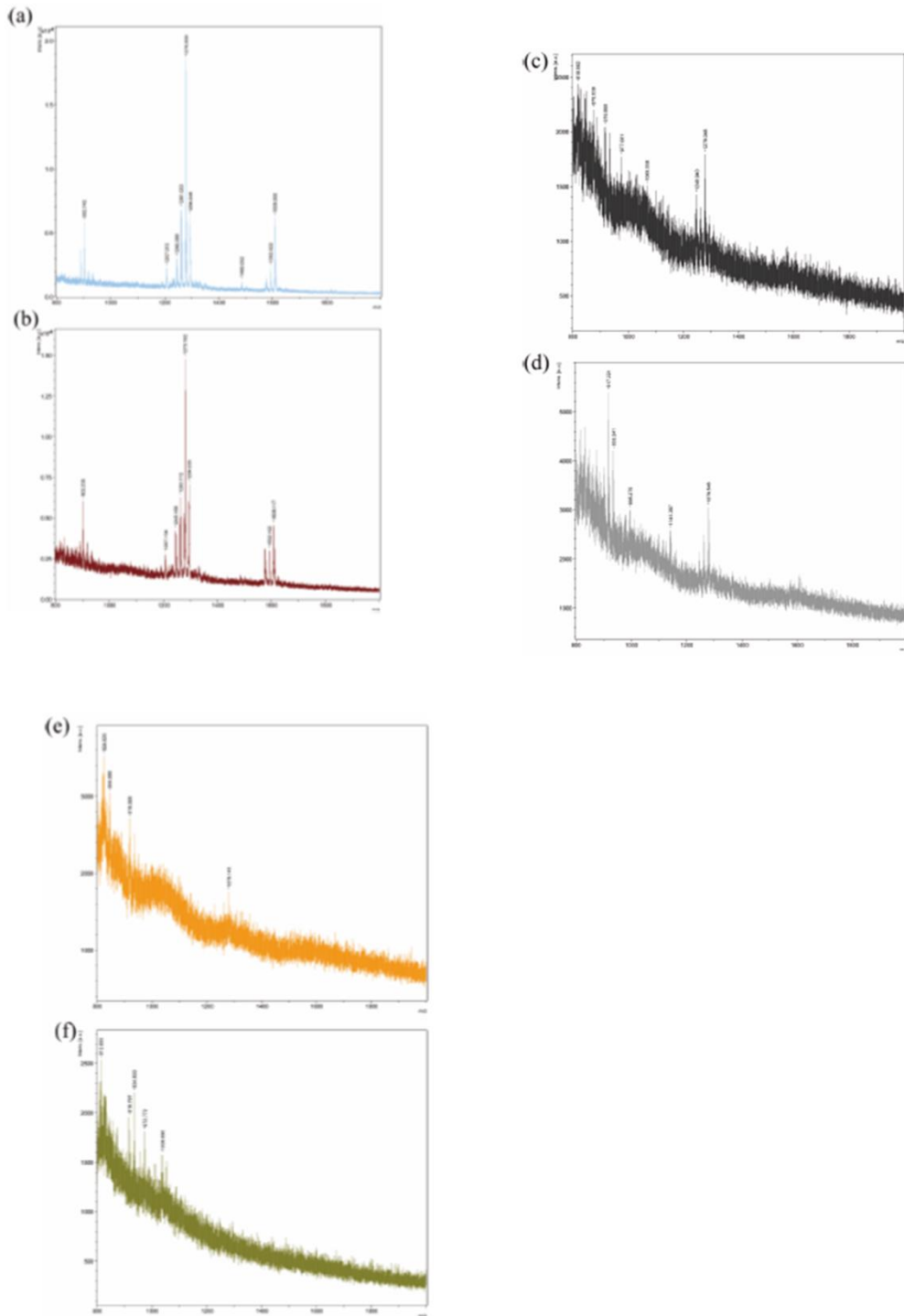


図 6-7 Lys-peptide-npp resin と 100m M FITC と反応後の希釈溶液での MS スペクトル。(a) 10 mM (b) 1 mM (c) 100 mM (d) 75 mM (e) 50 mM (f) 25 mM。

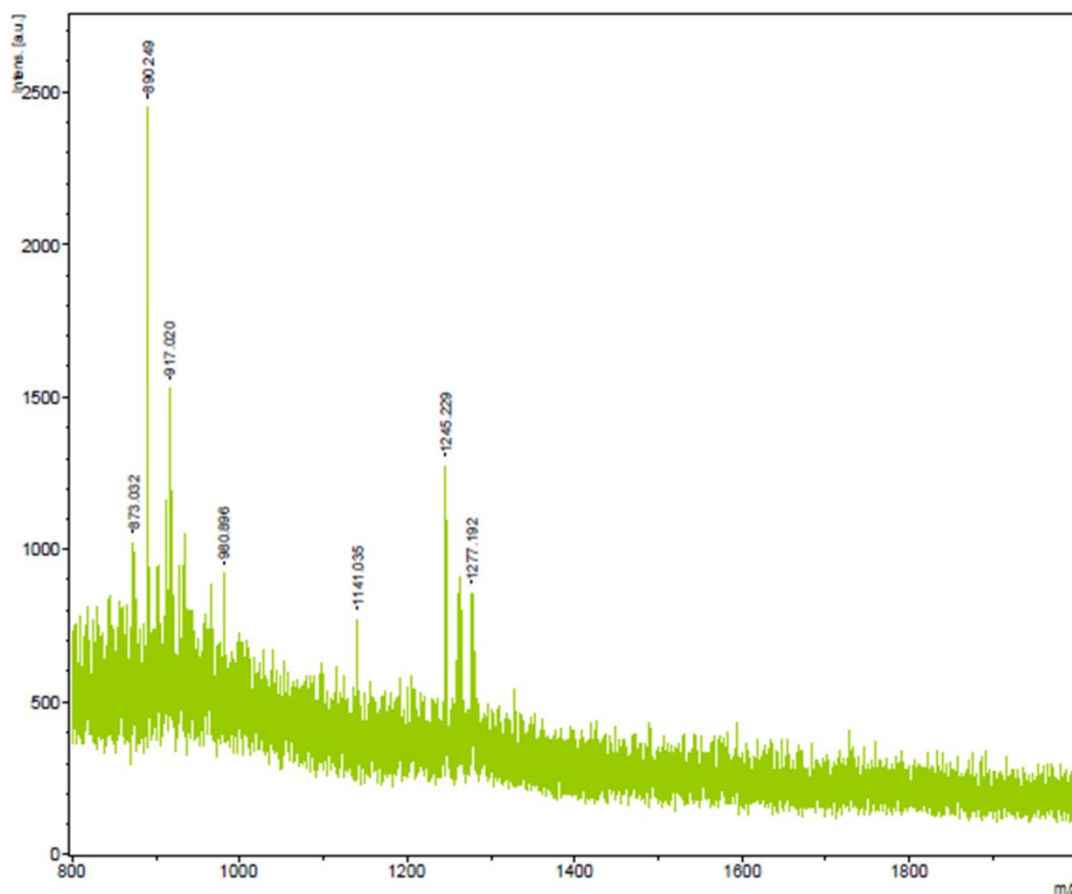


図 6-8 Lys-peptide-npp resin と 50 mM、25 mM FITC と反応後のマススペクトル。

6.3.3. 感作性物質修飾ペプチドの質量分析

感作性物質と反応した Cys-peptide および Lys-peptide を MALDI-TOF MS を用いて分析し、ペプチド付加物の形成を確認した (表 6-1)。ペプチド付加物の形成は、各ペプチド由来のシグナル ($m/z = 865$ に Cys-peptide 由来の $[M + H]^+$ および $m/z = 890$ に Lys-peptide 由来の $[M + H]^+$) から決定した。Cys-peptide では、peptide の酸化以外のシグナル ($m/z = 1727$ にペプチドダイマー由来の $[M + H]^+$) を付加物と見なした。試験した全ての感作性物質で Cys-peptide または Lys-peptide との付加物の形成が観測された。試験した非感作性物質 (DP と IPA) ではペプチド付加物は観察されなかった。UE、HCA、ACA および BC は DPRA では陰性と評価されているが、M-SPRA ではペプチド付加物が観測されたため、M-SPRA が DPRA よりも高い感度を有していることが示された。さらに、M-SPRA は DPRA

よりも高い再現性と精度だけでなく、取り扱いが簡単で高い汎用性を有している。BA は、Human maximization test や Human repeated insult patch test などのヒトのデータによって感作性として報告されている。ACA と HCA は、LLNA では弱感作性に分類されているが、ヒトのデータでは確実に感作性を有しているとは見なされていない。さらに、IPA はヒトのデータでは非感作性として報告されている。これらの結果は、M-SPRA の結果と相関しており、M-SPRA が、DPRA およびヒトのデータによって偽陰性または判断が難しい感作性物質を正確に予測できると期待される。

表 6-1 ペプチド付加物の MS シグナルの有無

Test Chemicals	LLNA	DPRA	Adduct forming ^b	
	Potency	Results ^a	Cys-peptide	Lys-peptide
<i>p</i> -Benzoquinone	Extreme	P	+	+
Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)	Strong	P	+	+
Benzylidene acetone (BA)	Moderate	P	+	+
5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal (MPH)	Moderate	-	-	-
Undec-10-enal (UE)	Moderate	N	-	+
α -Hexyl cinnamic aldehyde (HCA)	Weak	N	-	+
α -Amyl cinnamic aldehyde (ACA)	Weak	N	+	+
Benzyl benzoate (BB)	Weak	N	-	+
Benzyl cinnamate (BC)	Weak	N	+	-
Dibutyl phthalate (DP)	Non-sensitizer	N	-	-
Isopropanol (IP)	Non-sensitizer	N	-	-

^a Data from Ref. 5. ^b Changes in mass signal after reaction of peptides with chemicals were used to discriminate between '+' (adduct formation) and '-' (no adduct formation).

6.3.4. 付加物分析による反応性の確認

質量分析によるペプチド付加物の解析は、従来の反応率だけではなく反応性メカニズムに関する情報も取得することが可能となる。各試験物質に対する付加物のシグナルおよび各付加物に対する反応メカニズムの仮説を表 6-2 に示す。本研究で観察されたペプチド付加物の大部分は、感作性物質の構造から容易に

予測される反応メカニズムであることが明らかになった。感作性物質の多くは Cys-peptide へのマイケル付加または Lys-peptide へのシッフ塩基の形成を示すシグナルが観察された。さらに、一つのペプチドに対して複数の付加物の生成など、複雑な反応性を示す感作性物質も認められた。BQ はペプチド内の Lys 側鎖や N 末端の第一級アミンへの反応が認められ¹²、M-SPRA でも同様に 2 分子の反応が見られた。ペプチドに対する複雑な反応が感作性にどのような影響を与えるかは現在のところ明らかになっていない。本研究ではペプチド付加物のシグナルから仮説的な解釈のみを提示しており、一部不明な反応メカニズムを有するシグナルも観測されている。しかしながら、正確な構造が不明な場合でも、ペプチド付加物が観測されるということは、化学物質に反応性があったということであり、感作性を特定するための十分な指標になると考えられる。

以上のことから、質量分析は化学物質の反応性を検出するために非常に便利なツールであり、KEI の結合性を確認する上では付加物形成が最も直接的な指標になると考えられる。DPRA や ADRA での HPLC を用いた分析は、誰にでもわかりやすい単純な測定値を提供するが、M-SPRA は HPLC で得られたデータよりも詳細な分析を提供することを可能にし、かつ大量のデータを迅速に生成することができる。特に、マイケルアクセプターまたはシッフ塩基反応性ドメインに属する化学物質の場合、予測された分子量の付加物が検出されたことから、質量分析は *in silico* モデルでの構造からの感作性予測結果を裏付けることができた¹⁵⁻¹⁷。付加物の構造の解明は、反応メカニズムを理解するために重要なステップであり、製品開発に非常に役立ち、さらに、化学反応性を完全に理解することは、毒物学においても有用な知見になってくると考えられる。

表 6-2 ペプチド付加物に関する結果のまとめ

Test chemicals	MS signal (<i>m/z</i>)		Adduct interpretation
	Cys-peptide	Lys-peptide	
BQ	Cys1: 973 [M+H] ⁺ Cys2: 1113 [M+H] ⁺	Lys1: 1101 [M+H] ⁺	Cys1: Michael adduct, Cys2: bimolecular addition by Michael adduct and oxidation to sulfone, Lys1: bimolecular addition by Michael adduct
FITC	Cys1: 1254 [M+H] ⁺	Lys1: 1279 [M+H] ⁺	Cys1: Acylation, Lys1: Acylation
BA	Cys1: 1011 [M+H] ⁺	Lys1: 1164 [M+H] ⁺	Cys1: Michael adduct, Lys1: bimolecular addition by Michael adduct and Schiff base formation
MPH	Cys1: 1053 [M+H] ⁺	Lys1: 1074 [M+H] ⁺	Cys1: Michael adduct, Lys1: unknown
UE	No signal	Lys1: 1042 [M+H] ⁺	Lys1: Schiff base formation
HCA	Cys1: 1081 [M+H] ⁺	Lys1: 1120 [M+H] ⁺	Cys1: Michael adduct, Lys1: Michael adduct
ACA	Cys1: 1067 [M+H] ⁺	Lys1: 1074 [M+H] ⁺	Cys1: Michael adduct, Lys1: Schiff base formation
BC	Cys1: 1085 [M+H] ⁺ Cys2: 1131 [M+H] ⁺	No signal	Cys1: unknown, Cys2: unknown,
DP	No signal	No signal	Not adduct
IP	No signal	No signal	Not adduct

6.3.5. 混合物とペプチド-npp 樹脂との反応

2 種類の化学物質を組み合わせた混合物 (FITC-IPA、BA-IPA、および ACA-IPA) を用いて、M-SPRA の混合物への適用性を評価した。それぞれの混合物を試験した結果、ペプチド付加物は、それぞれを別々に試験した時に認められたシグナルと一致した。FITC-IPA と反応させた後に観察されたペプチド付加物の HPLC のクロマトグラムと MS シグナルを示す (図 6-10)。FITC-IPA 混合物をペプチドと反応させると、FITC 修飾ペプチドのみが認められ、IPA との付加物は認められなかった。このことから、混合物中の感作性物質のみがペプチドに捕捉されるため、M-SPRA は、混合物中の化学物質の反応性の評価にも適用できることが実証できた。一部の感作性物質は直接反応性を有するのでは

なく、自発的酸化や代謝によって反応性物質へと変換され、反応性を有する場合がある^{16,17}。同様に混合物中の成分間の相互作用も、全体的な化学反応性に影響を与える可能性があるため、**M-SPRA** を用いた混合物中の反応性の評価は今後さらなる毒性学の発展に寄与できると考えられる。

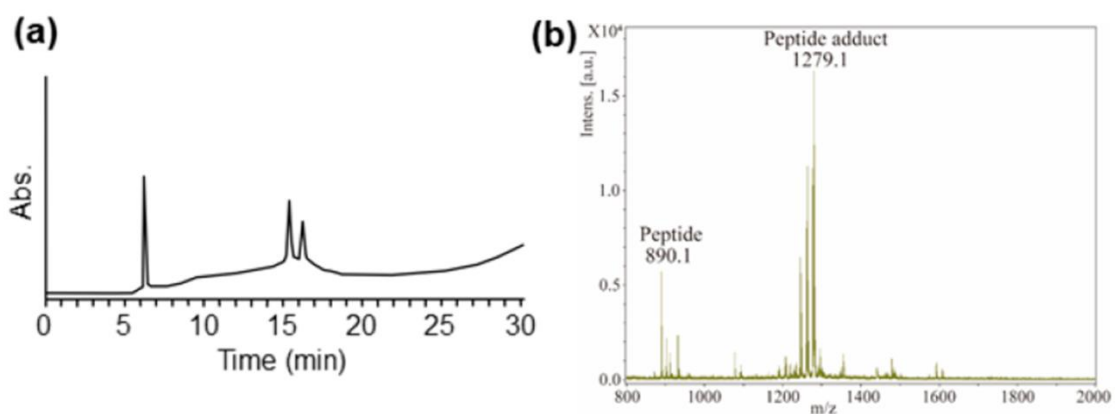


図 6-10 (a) FITC-IPA と Lys-peptide-npp resin との反応後のペプチド付加物の HPLC クロマトグラム。(b) HPLC での保持時間 15~16 分のマススペクトル。

6.4. 小括

光切断リンカーを介した樹脂固定化ペプチドを利用することで、ペプチド付加物を高感度に同定することが可能となり、混合物中の感作性物質の評価にも適用できることを示した。従来の HPLC によるペプチド反応率の算出では陽性判定の閾値付近では、感作性か否かを判断するのが困難であったが、M-SPRA では感作性物質とペプチドの結合を直接観測できるため、明確な反応性の有無を判断することが可能となり、より正確な感作性を予測することが可能となる。さらに、M-SPRA は C-SPRA や C-SPRA-MB と組み合わせることが可能であるため、評価する項目に応じて定量分析と定性分析を使い分けることが可能である。M-SPRA を用いて様々な化学物質の反応性メカニズムに関する詳細な情報を取得することで、皮膚感作のプロセスを分子レベルでより理解することができ、生化学分野の発展にも貢献できると期待される。

6.5. 参考文献

1. G. F. Gerberick, J. D. Vassallo, R. E. Bailey, J. G. Chaney, S. W. Morrall, J. P. Lepoittevin, Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.*, **81**, 332–343 (2004).
2. G. F. Gerberick, J. D. Vassallo, L. M. Foertsch, B. B. Price, J. G. Chaney, J. P. Lepoittevin, Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicol. Sci.*, **97**, 417–427 (2007).
3. P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, Photoremovable protecting groups in chemistry and biology: reaction mechanisms and efficacy. *Chem. Rev.*, **113**, 119–191 (2013).
4. D. J. Yoo, M. M. Greenberg, Synthesis of oligonucleotides containing 3'-alkyl carboxylic acids using universal, photolabile solid phase synthesis supports. *J. Org. Chem.*, **60**, 3358–3364 (1995).
5. C. P. Holmes, Model studies for new o-nitrobenzyl photolabile linkers: Substituent effects on the rates of photochemical cleavage. *J. Org. Chem.*, **62**, 2370–2380 (1997).
6. S. Ariyasu, K. Hanaya, E. Watanabe, T. Suzuki, K. Horie, M. Hayase, R. Abe, S. Aoki, Selective capture and collection of live target cells using a photoreactive silicon wafer device modified with antibodies via a photocleavable linker. *Langmuir*, **28**, 13118–13126 (2012).
7. T. Kakiyama, K. Usui, K. -Y. Tomizaki, M. Mie, E. Kobatake, H. Mihara, A peptide release system using a photo-cleavable linker in a cell array format for cell-toxicity analysis. *Polym. J.*, **45**, 535–539 (2013).
8. K. Usui, T. Kikuchi, K. -Y. Tomizaki, T. Kakiyama, H. Mihara, A novel array format for monitoring cellular uptake using a photo-cleavable linker for peptide release. *Chem. Commun.*, **49**, 6394–6396 (2013).
9. M. Mabuchi, T. Shimizu, M. Haramura, A. Tanaka, Identification and purification of target protein using affinity resin bearing a photo-labile linker. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 3373–3377 (2015).
10. K. Usui, K. -Y. Tomizaki, H. Mihara, A cell microarray format: A peptide release system using a photo-cleavable linker for cell toxicity and cell uptake analysis.

Methods. Mol. Biol., **1352**, 199–210 (2016).

11. W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach*, Oxford University Press, New York, (2000).
12. M. Aleksic, E. Thain, D. Roger, O. Saib, M. Davies, J. Li, A. Aptula, R. Zazzeroni, Reactivity profiling: Covalent modification of single nucleophile peptides for skin sensitization risk assessment. *Toxicol. Sci.*, **108**, 401–411 (2009).
13. D. W. Roberts, G. Patlewicz, P. S. Kern, F. Gerberick, I. Kimber, R. J. Dearman, C. A. Ryan, D. A. Basketter, A. O. Aptula, Mechanistic applicability domain classification of a local lymph node assay dataset for skin sensitization. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 1019–1030 (2007).
14. D. W. Roberts, A. O. Aptula, G. Patlewicz, Electrophilic chemistry related to skin sensitization. Reaction mechanistic applicability domain classification for a published data set of 106 chemicals tested in the mouse local lymph node assay. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 44–60 (2007).
15. D. Urbisch, A. Mehling, K. Guth, T. Ramirez, N. Honarvar, S. Kolle, R. Landsiedel, J. Jaworska, P. S. Kern, F. Gerberick, A. Natsch, R. Emter, T. Ashikaga, M. Miyazawa, H. Sakaguchi, Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **71**, 337–351 (2015).
16. C. K. Smith, S. A. M. Hotchkiss, *Allergic Contact Dermatitis—Chemical and Metabolic Mechanisms*, Taylor & Francis, London, UK, (2001).
17. J. P. Lepoittevin, Metabolism versus chemical transformation or pro versus prehapten? , *Contact Derm.*, **54**, 73–74 (2006).

第七章

結論

7.1. 総括

第一章で述べたように感作性試験法の開発は、3R (Replacement、Reduction、Refinement) の原則に則りつつ時代の流れを汲み、動物を用いた試験法から、*in vitro* 試験法へと移行しつつある。既存の *in vitro* 試験法は再現性良く感作の有無を判断することができる一方で、難水溶性物質を評価困難とする試験適用範囲の狭さや、予測精度が低いため、有害性発現経路の各段階 (Key Event: KE) を模倣した試験法を複数組み合わせる必要がある、といった課題が存在する。さらに感作性を有無のみで評価しており、分子レベルでの詳細なメカニズムを解析する手法は構築されていなかった。これはアレルギーの発症をおさえつつ、化学物質の恩恵を受ける社会実現の大きな障壁となっている。そこで、本論文では *in vitro* 試験法を活用したより精度の高い感作性評価を行うことを目的とし、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開発し、さらに並行して分子レベルで簡便かつ詳細に感作性のメカニズムを測定する手法を構築した。

第二章では、まず現在主流とされている Local Lymph Node Assay (LLNA) の課題を克服しつつ、KE4 と生体反応を評価指標としている LLNA that includes the elicitation phase (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。次に第三章では、KE3 に注目して細胞を用いた *in vitro* 皮膚感作試験法にコラーゲンビトリゲル膜を組み合わせた試験法 (Vitrigel Skin Sensitization Test: Vitrigel-SST) を構築し、既存の *in vitro* 皮膚感作試験法での課題であった難水溶性物質にも適用できることを示した。第四章では、外的因子に応答して構造変化を伴う人工金属タンパク質モデル [Fe(peptide-DTC)₃] を構築し、KE2 を模倣しつつ、細胞を用いずに分子レベルで感作性を評価するために、構造変化を蛍光応答に変換する測定法を考案した。第五と六章では、KE1 のタンパク質と感作性物質の最初期の結合を模倣して、

ペプチドを固相担体に担持させた 3 種類の試験法 (Chromophore-Solid phase Peptide Reaction Assay: C-SPRA、C-SPRA methods using magnetic microbeads: C-SPRA-MB、Mass spectrometry-based SPRA: M-SPRA) を確立し、その有用性を実証した。樹脂と磁性ビーズの 2 種類の固相担体を利用し、さらに分光光度法による定量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、各種評価項目に応じて適した試験法を選択できるようなシステムを構築した。

以上を通して本博士論文では、各 KE における *in vitro* 皮膚感作性試験法の課題を克服した試験法を開発し、試験適用の範囲を広げること成功した。また、固相担持ペプチドを利用することで、スクリーニングと詳細解析の 2 種類の評価手法を選択できるシステムを構築し、感作性の有無のみならず、感作性物質とペプチドの結合様式などの詳細な分子レベルでの反応まで評価可能な測定法の構築に成功した。これにより、各 KE における試験法の技術的な課題を克服しつつ、さらに感作の有無のみならず並行して詳細なメカニズム解析が可能となり、従来の *in vitro* 皮膚感作試験法では実現できなかった単一の *in vitro* 試験法のみでの Replacement の実現や、詳細なメカニズム解析によるヒトへの安全性評価への応用展開も期待できる。

7.2. 展望

本論文では、従来の *in vitro* 試験法の課題を克服した皮膚感作試験法の開発と分子レベルでの詳細なメカニズムを評価する測定法の構築について述べた。今後は、より実用的な評価法として確立するために、さらなる技術の改善に向けたアプローチが必要であり、以下のような展望が期待される。

細胞を用いた皮膚感作性試験 (Vitrigel-SST)

第三章で取り上げた Vitrigel-SST は免疫応答に非常に重要なイベントである樹状細胞の活性化を THP-1 細胞から産生される IL-8 を指標に評価する手法であり、感作性を予測するのに非常に強力なツールとなる。Vitrigel-SST ではコラーゲンビトリゲル膜の持つ特徴的な性質を活かして、細胞を用いた皮膚感作性試験法における課題であった、難水溶性物質の評価を可能にした。さらに、Vitrigel-SST は難水溶性物質に適用できることから、ローションやクリームなど性状や固形材料などの評価にも適用範囲を広げることが期待できる。また、細胞足場としても利用されているコラーゲンビトリゲル膜は、3次元的な細胞培養も可能であるため、より正確に皮膚を模倣した組織構造を構築できる。これを用いることで、より一層高い精度で感作性予測が可能となるのではないかと考える。

一方で IL-8 の産生のみを指標としているので、感作性物質に暴露されてから IL-8 の発現誘導までに様々なプロセスが発生し、結果の考察が困難になる可能性がある。これは評価指標となるマーカーの知見が乏しいことに起因していると考えため、マイクロアレイなどを活用した網羅的な遺伝子解析により感作誘導の指標となるマーカー遺伝子を明らかにしていき、より感作の要因の理解深める必要があると考える。

外的因子に応答する人工金属タンパク質モデル [Fe(peptide-DTC)₃]

第四章では、DTC 鉄錯体を鋳型とした NO 応答性の Fe(peptide-DTC)₃ の構築を行った。Fe(peptide-DTC)₃ は NO を捕捉することにより、ペプチド鎖に構造変化が生じることから、外的因子によって立体構造の制御が可能な人工金属タンパク質モデルの合成に成功したと言える。KE2 はタンパク質の構造変化によって生じる転写活性が指標となっているが、既存の *in vitro* 皮膚感作性試験法においては、ブラックボックスの多い、転写活性の有無を指標とした細胞を用いる試験法しかなく、タンパク質の構造変化に着目した十分な知見が蓄積されていない。そこで、よりブラックボックスの小さい普遍的な予測を目指して、KE2 が転写の前にタンパク質の構造変化を起点として始まっていることに着目した測定技術の構築が、今後必要になってくると考えられる。Fe(peptide-DTC)₃ は安全性分野のみならず、構造変化モデルの測定技術における有益なツールとなり、分析化学分野でも NO センサーとして大いに期待できる。また、一本鎖ペプチド構造がタンパク質間相互作用を阻害するように設計できれば、NO によって脱離した peptide-DTC がタンパク質と作用するため、NO 応答性の阻害薬に活用でき、局所的な阻害剤として生体工学分野での発展が期待される。

一方で、Fe(peptide-DTC)₃ はペプチド配列を変えることにより、人工タンパク質の構造自体の安定性や構造内部の疎水性空間のサイズを変化させることができ、ドラッグデリバリーキャリアの可能性も考えられるが、基礎的な知見がまだ得られていない。基礎的な知見を得ることで、bundle 構造内部に包埋できる分子サイズや任意の NO の濃度で包埋した分子を放出できると考える。

固相担持ペプチドを用いた皮膚感作性試験 (C-SPRA、C-SPRA-MB、M-SPRA)

第六章では様々な固相担体にペプチドを合成する手法を確立し、さらに光切断リンカーを利用することで、異なる分析手法 (分光光度測定や質量分析) を併せて評価することができ、簡便かつ詳細に感作性を予測できることを実証した。また、固相担体の洗浄により反応を停止できるため、分光光度測定を利用して簡便に速度論評価が可能となり、感作性の有無だけでなく、感作リスクの指標となる強度評価に利用できると期待される。さらに、光切断リンカーと NMR など組み合わせることで、詳細に感作性物質中の反応性官能基や反応メカニズムを解析することが可能となる。つまり、開発段階で物質のスクリーニングや感作性の強度評価をする際には簡便な分光光度を用い、より分子レベルでの反応性を調査する際には、質量分析や NMR を用いるなど、評価項目に応じた組み合わせの選択が可能となる。

本研究では固相担持ペプチドを用いることで、従来のペプチド反応性試験の欠点の多くを改善できることを実証したが、まだいくつかの課題が残されている。現状では、化学物質自体には感作性はないが、自動酸化や酵素による代謝を受けることで感作性を示すプレハプテンやプロハプテンは正しく評価することができないと考えられる。これらの課題については、酸化や酵素による代謝を考慮するために、酸化剤や、シトクロム P450 などの皮膚に存在する異物代謝酵素を用いて酵素処理を行った後に、感作性評価を行うことで解決できる可能性がある。特に本手法は反応後に洗浄工程を行うため、酵素処理を行っても評価対象物のみを検出でき、従来の化学物質の評価と同様に代謝産物についても評価であると期待できる。

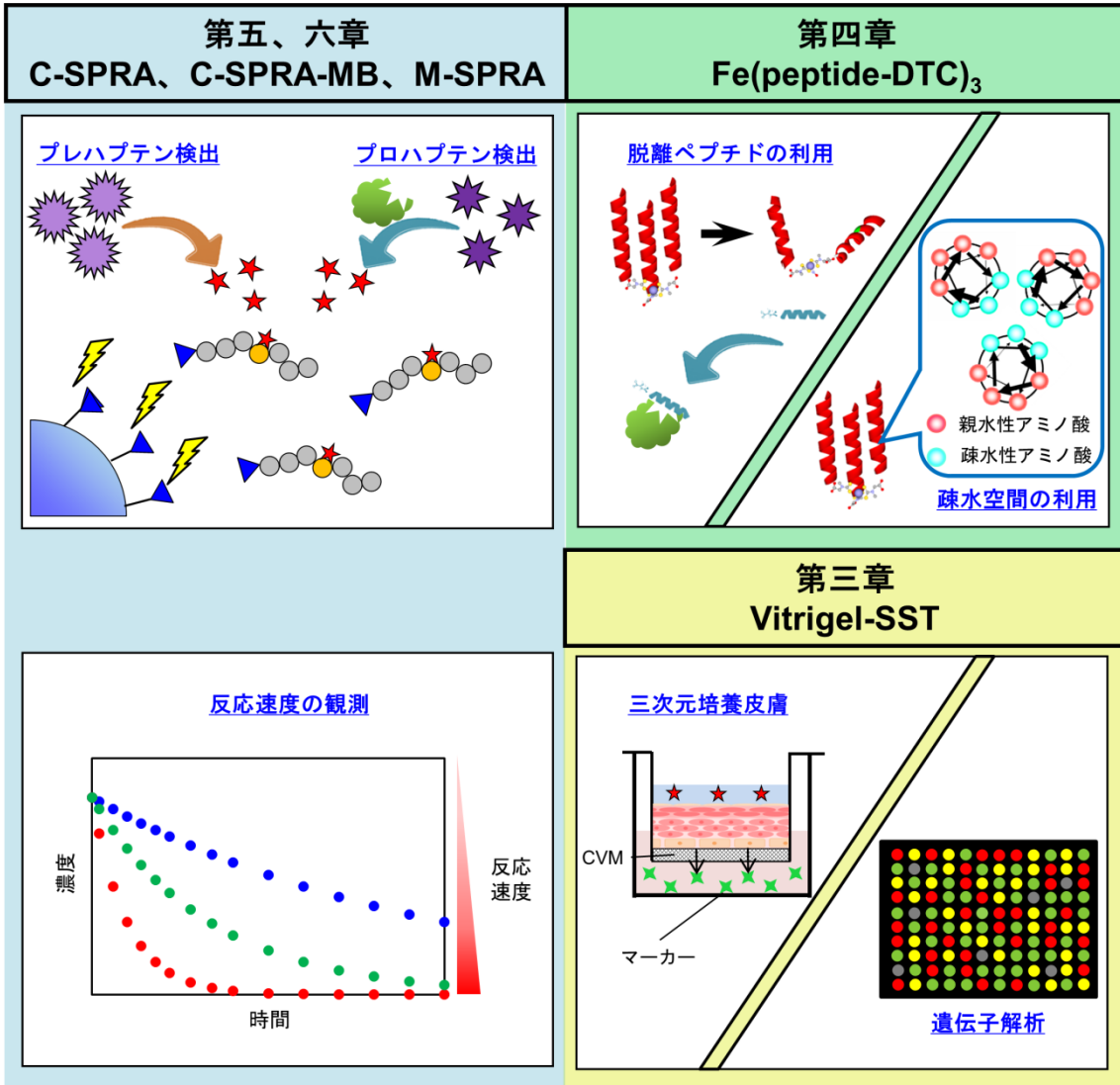


図 7-1 各評価方法の課題と展望

全体展望

本研究で開発した試験法は、感作のプロセスを分子レベルで理解することにも役立ち、製品設計へ貢献することも期待できる。開発した試験法を新たな代替試験法として取り入れるには、適正に行われたバリデーションに基づいて、精度と適用限界を明らかにしていくことが求められる。そのための礎として、まずは試験物質数を増やすことでデータベースを構築し、さらに施設内や施設間バリデーション試験を完了する必要がある。

従来の *in vitro* 試験法は AOP に基づいて、KE1 がペプチドやアミノ酸誘導体を用い、KE2 と KE3 では細胞を用いて感作性を評価してきた。現状の表皮角化細胞の活性化 (KE2) は細胞を用いて評価していたが、外的因子により構造変化を誘起する人工タンパク質モデルを用いることで、KE2 においてもペプチドを用いて感作性を評価できる可能性がある。また既存の KE1 における *in vitro* 試験法は、単一のペプチド配列しか使用しておらず、生体での様々なタンパク質中の求核性残基に対する反応の特異性、多様性および複雑さを反映していない。このため、単一のペプチド配列と多種多様な化学物質との反応性に関するデータを蓄積したとしても動物を用いた試験法を代替するには不十分であると考えられる。そこで、生体の複雑な環境を想定して、様々な配列のペプチドと化学物質の反応性に関するデータを蓄積することで、将来の安全性評価に付加価値を提供できると期待される。以上のことから、ペプチドを用いた試験法を改良していくことで、ペプチドのみで KE を網羅することが可能になると期待できる。

また、アレルギー反応は個人差があり、それを反映させたテーラーメイドな製品開発が今後は検討すべき事項になってくると予想される。そのため上述したように、単一のペプチド配列だけではなく、多種多様なペプチド配列を配置したペプチドアレイなどを用いて測定を行うことにより、ペプチドと化学物質の反応機序に関するデータを蓄積する必要があると考える。このようにして蓄積したデータは個人にあった感作の作用機序の解明に大いに役立つと考えられる。さらに解明した様々な作用機序を体系的に集約していくことで、最終的には、*in silico* モデルによる構造的な観点からヒトに対する感作性の予測が可能

になると期待される。

さらに、人体に毒性を及ぼすリスクは暴露量と有害性の度合いで決まるため、感作性の有無だけではなく、強度も重要な情報であることを述べてきた。たとえば強度が弱く低毒性であったとしても、大容量で使用すれば有害性事象を発生する恐れがある。そのため、化学物質とペプチドの反応速度定数を求め、速度定数を考慮した感作性の強度を算出することにより、毒性が現れない閾値を導き使用可能な量を判断できると考えられる。現状最も精度よく安全性を評価できるのは動物を用いた試験法であるが、作用機序のデータや反応速度を考慮した感作性の強度に関する知見を集めていくことで動物を用いずに感作性の予測やリスク評価が可能となり、製品開発を推進していく上で非常に役立つと考える。

本論文では、従来の各 KE における *in vitro* 皮膚感作性試験法の課題点を克服した試験法を構築し、これまでになかった反応メカニズムを簡便かつ詳細に測定する技術を確立した。今後、上記展望内容の研究が進むことで、安全性評価手法として用いるだけでなく、毒性学、分析化学や生体工学分野などへの応用展開も期待される。さらに、本技術が国際的に認可されるようになれば、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、応用範囲の拡大は一層加速されるであろう。

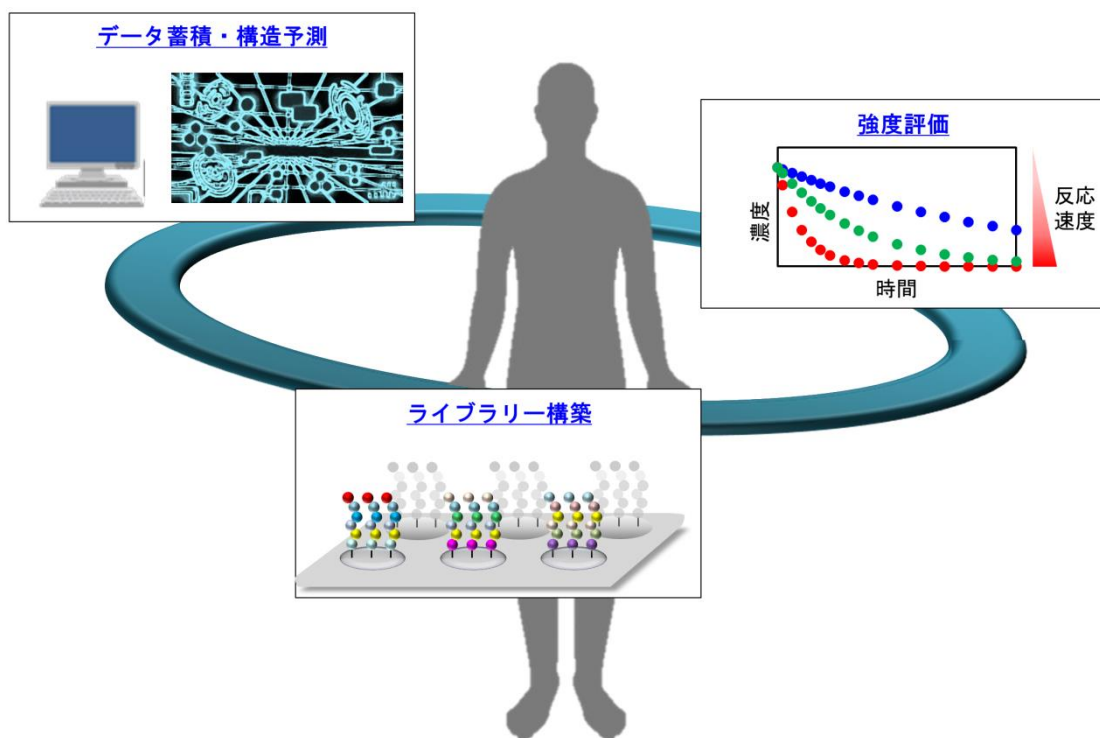


図 7-2 全体展望

謝辞

本研究をまとめる機会をくださり、また研究の遂行に当たって、ご指導およびご助言をいただきました、甲南大学 フロンティアサイエンス学部 准教授 臼井健二先生に深く感謝いたします。本論文をご校閲いただき、終始親身にご指導およびご助言をいただきました甲南大学 フロンティアサイエンス学部 教授 藤井敏司先生に厚くお礼申し上げます。また、本論文の審査過程において、ご助言とご指導を賜りました甲南大学 フロンティアサイエンス学部 教授 松井淳先生、東京大学 大学院工学系研究科 教授 酒井康行先生に心より厚くお礼申し上げます。

研究を遂行する上で、温かいご理解とご援助をいただきました株式会社ダイセル 未来医療研究センター センター所長 寺居和宏博士、未来医療研究センター 首席技師 山下邦彦博士に心よりお礼申し上げます。また、本論文をまとめるに際して、温かい助言を下さり、多大なるご協力を頂きました株式会社ダイセル 未来医療研究センター 小倉麻梨子博士および未来医療研究センターの皆様心よりお礼申し上げます。

最後に、論文の作成に当たって、陰ながらサポートし、多大な協力をしてくれた宮崎淑恵氏に、この場を借りて心より感謝申し上げます。