

博士論文

低分子による炎症誘導機構に基づいた  
*in vitro* 皮膚感作性試験法の開発に関する研究

齋藤和智

# 目次

略語一覧.....	1
序論.....	3
<b>第 1 章</b>	
ヒト樹状細胞様 THP-1 細胞の活性酸素種産生を指標とした新規試験法の開発.....	14
緒言	
材料および方法	
結果	
考察	
<b>第 2 章</b>	
再構成ヒト表皮モデルを用いた皮膚感作性バイオマーカーの探索および 新規試験法の開発.....	30
緒言	
2-1. 再構築ヒト表皮モデルにおける新規感作性マーカーの探索.....	30
緒言	
材料および方法	
結果	
2-2. 新規感作性マーカーと皮膚感作誘導との関連性検証.....	47
緒言	
材料および方法	
結果	
2-3. 新規感作マーカーを用いた新規試験法（Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA）の 開発.....	52
緒言	
材料および方法	
結果	
考察	
<b>第 3 章 総合討論.....</b>	<b>74</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>83</b>
<b>付録.....</b>	<b>94</b>
<b>謝辞.....</b>	<b>97</b>

## 略語一覧

ACD, allergic contact dermatitis

AOO, acetone: olive oil = 4: 1

AOP, Adverse Outcome Pathway (有害性発現経路)

ARE, antioxidant response element

ATF3, activating transcription factor 3

BH, 1-bromohexane

BKC, benzalkonium chloride

CA, cinnamic aldehyde

CB, chlorobenzene

CinA, cinnamic alcohol

CM-H2DCFDA, 5-(and 6-)-chloromethyl-20, 70-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester

DAVID, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery functional annotation tool

DCs, dendritic cells

DCV5, concentration showing 5% decrease of cell viability relative to vehicle control

DEP, diethyl phthalate

DMSO, dimethyl sulfoxide

DNAJB4, dnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4

DNCB, 2, 4-dinitrochlorobenzene

DNFB, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene;

DPRA, Direct Peptide Reactivity assay

DW; distilled water

EHA, 2-ethylhexyl acrylate

EpiSensA, Epidermal Sensitization Assay

FBS, fetal bovine serum (ウシ胎児血清)

FCA, Freund's complete adjuvant

GCLM, glutamate-cysteine ligase, modifier subunit

GO, Gene Ontology

HBSS, Hank's Balanced Salt Solution

HC, hydroxycitronellal

HCA, hexylcinnamaldehyde

h-CLAT, human-Cell Line Activation Test  
IEU, isoeugenol  
IL, interleukin  
IM, isopropyl myristate  
KCs, keratinocytes  
LA, lactic acid  
LLNA, local lymph node assay  
MBT, 2-mercaptbenzothiazole  
MDBGN, methyldibromo glutaronitrile  
MFI, mean fluorescence intensity  
MS, methyl salicylate  
MTT, methylthiazolydiphenyl-tetrazolium  
4-NBB, 4-nitrobenzyl bromide  
NHEK; normal human epidermal keratinocyte  
Nrf2, nuclear factor E2-related factor 2  
OA, octanoic acid  
OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development  
OXA, oxazolone  
PA, phthalic anhydride  
PG, propyl gallate  
PI, propidium iodide  
PPD, *p*-phenylenediamine  
RhE, Reconstructed human Epidermis  
ROS, reactive oxygen species  
ROS EC2, estimated concentration which showed 2-fold ROS production  
ROS I<sub>max</sub>, maximal ROS induction level  
SA, salicylic acid  
SLS, sodium lauryl sulfate  
TCSA, Tetrachlorosalicylanilide  
TMTD, tetramethylthiuram disulfide  
TrxR, thioredoxin reductase

## 序論

### ○化学物質の毒性リスク評価

我々の身のまわりには、膨大な数の化学物質が存在する。これらの中には、天然物質、ヒトへの作用を目的に開発された医薬品、ヒトの生活を豊かにするために開発された食品添加物や農薬など微量に摂取する可能性がある物質、ならびに本来ヒトが摂取することのない物質（工業化学物質、建築用剤、産業廃棄物等）がある。このように現代社会においては、直接的には人体に摂取されるはずがない化学物質にも暴露される可能性があり、ヒトが化学物質にさらされる機会は増え続けている。

毒性学の祖 Paracelsus が、“All substances are poisons: There is none which is not a poison. The right dose differentiates a poison and remedy”と述べているように、すべての化学物質は基本的に毒であり、用量により毒か薬かが決まる（Huge, 2004）。言い換えれば、化学物質が”毒“としてヒト健康に与えるリスクは、化学物質が有するヒトへの有害性の度合い（ハザード）、およびヒトに対する該物質の暴露量、の2点で決定される（Fig. 0-1）。そして、化学物質が安全か否かの判断、すなわちリスクアセスメントは、化学物質のハザードを定性的および定量的観点から統合的に評価し、該物質のヒトに対する実際の暴露量との兼ね合いから、最終的なリスクを判定することを意味する。しかしながら、医薬品以外の化学物質をヒトが摂取した場合の安全性は、ヒトに直接投与して確かめることができない。そこで、これら化学物質の安全性評価では、実験動物等を用いた毒性試験、疫学研究および毒性発現機構に関する研究等によりハザードを把握する必要がある。一方、暴露量に関しては、当該化学物質にヒトがどの程度暴露されるかを正確に見積もることは非常に難しいため、該物質の暴露条件（頻度、量など）やシミュレーションによる推定によらざるを得ない。すなわち、化学物質のハザードを把握するための毒性試験および毒性発現機構の解明は、化学物質のリスクを精緻に評価し、ヒトへの健康被害を未然に防ごうと極めて重要なプロセスとなる。

### ○皮膚感作性

我々の体表面を覆う皮膚は、ヒトが化学物質と最も接する機会の多い場の一つである。そして、皮膚を介した化学物質の有害作用の一つに、皮膚感作性がある。皮膚感作性とは、分子量 600 未満の比較的分子量の化学物質（皮膚感作性物質）により誘導される湿疹性の皮膚反応であり、該物質が複数回皮膚接触することで生じる遅延型の接触過敏反応である（Smith and Hotchkiss, 2001）。代表的な皮膚感作性物質としては、染毛成分として使われる *p*-phenylenediamine、香料成分である cinnamic aldehyde、エポキシ樹脂の構成成分であるグリシジルエーテル類、防腐剤としてシャンプー等に使用される 5-Chloro-2-methyl-3-isothiazolone など存在する（Fig. 0-2）。皮膚感作性物質の中

には、化粧品や装飾品を介して日常的にヒトに接する機会が多いものも含まれる。そのため近年では、ヨーロッパの全人口の約 20%が、少なくとも一つ以上の皮膚感作物質に対し感作を発症しているとの報告もある (Peiser et al., 2012)。皮膚感作性は本来、外来異物に対する生体の防御機構の一つである。しかしながらその臨床症状は、紅斑・丘疹を伴う皮膚炎が数週間続き、一度治癒したとしても該感作性物質の再接触により繰り返し発症・増悪することから、一度感作が成立してしまうと罹患者の QOL を著しく損ねる可能性がある。すなわち皮膚感作性は、その重篤度、影響度の観点から懸念すべき毒性の一つであり、特に化粧品などヒトの皮膚に直接適用される製品では、最重要毒性評価項目に位置づけられる。

### ○皮膚感作性のメカニズム

皮膚感作性は、感作誘導および惹起の 2 つの過程から成る (Fig. 0-3)。感作誘導過程では、皮膚に暴露された感作性物質が経皮吸収されると、一部の物質は代謝されたのち、皮膚中のタンパク質と共有結合を形成する。感作性物質の結合したタンパク質は、構造変化を生じることで生体異物となり、表皮の主要構成細胞である角化細胞、および外来異物を捕捉する免疫細胞である樹状細胞 (Dendritic cells: DC) の活性化を誘導する。異物を捕捉した DC は、活性化した角化細胞により放出される種々のメディエーター (例. IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ) によりさらに活性化され、成熟しながら所属リンパ節へと遊走する (Cumberbatch et al., 1997; Antonopoulos et al., 2008)。リンパ節へと遊走した DC は、MHC 分子上に提示した抗原を、種々の共刺激分子 (例. CD86、CD54) を伴いながら、ナイーブ T 細胞に提示する (Toebak et al., 2009)。抗原を認識した T 細胞は活性化して増殖・分化し、抗原特異的な T 細胞として体内に長く存在する (Kimber et al., 2011)。一方惹起過程では、皮膚に再度接触した感作性物質が、DC やマクロファージによって捕捉されたのち、抗原特異的な T 細胞に提示される。抗原特異的な T 細胞は活性化し、インターフェロン- $\gamma$  に代表されるサイトカインを放出することで炎症反応を惹起する (Honda et al., 2011; Natsuaki et al., 2014)。感作誘導過程に関してはこれまでに、鍵となる過程および生体反応 (キーイベント) が有害性発現経路 (Adverse outcome pathway: AOP) として、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) より示されている (OECD, 2012)。一方、惹起過程については、感作成立過程ほど研究が進んでおらず、不明な点が多いのが現状である。

### ○動物を用いた皮膚感作性のハザード評価

皮膚感作は免疫記憶を伴うため、一度感作が成立するとそれを取り除くことは現状難しい。そのため一度成立した皮膚感作性を制御するには、該物質の暴露を極力避ける、あるいは惹起された皮

膚炎を免疫抑制剤であるステロイド外用薬などで治療するといった手段を取らざるを得ない。したがって、皮膚感作性による健康被害を未然に防ぐためには、皮膚感作成立を如何にして防ぐか、言い換えれば毒性未知の化学物質の皮膚感作性の有無や強さといった「ハザード」をいかに正確に把握するかが重要となる。皮膚感作性のハザード把握に関してはこれまで、主としてモルモットやマウスなどの実験動物を用いた方法が開発・評価に用いられてきた (Fig. 0-4)。モルモットを用いた方法である Guinea Pig Maximization Test (OECD, 1992) では、被験物質を免疫増強剤 (Freund's complete adjuvant; FCA) と共に皮膚に暴露することで感作を誘導し、数週間後に該物質を再接触させた際の皮膚反応 (紅斑、浮腫) を見ることで皮膚感作性の有無を判定する。本法の評価指標は皮膚反応の目視評価であるため、正確な判定に熟練を要すること、および客観性に乏しいことが問題点としてある。一方、マウスを用いる方法である Local Lymph Node Assay (LLNA) (OECD, 2010) では、感作誘導過程で抗原特異的 T 細胞がリンパ節で増殖することに着目し、T 細胞の増殖率をトリチウム化したチミジンなどを用いて定量することで、皮膚感作性の有無や強さを評価する。本法の特長としては、モルモットを用いた方法に対して、(1) 試験期間が 1 週間強とモルモットの 1 か月強に比べ短いこと、(2) 客観的評価が可能であること、および (3) 被験物質が一定レベルの T 細胞増殖を誘導する濃度 (EC3) を指標に感作性の強さを予測できること、が挙げられる。上記動物試験法はいずれも、OECD による公定試験法としてガイドライン化され、これまで長らく皮膚感作性評価に用いられてきた。しかしながら、動物愛護への関心の高まり、あるいは動物実験を行った化粧品の欧州での販売禁止といった法規制の観点から、化粧品原料を筆頭に、動物を用いた皮膚感作性評価は現状極めて難しくなっている。これは、新機能を有する安全な原料を新たに開発し、製品として世の中に発信するうえで大きな足かせとなる。

### ○動物を用いない皮膚感作性評価 (代替法) の開発

以上の状況を打破すべく、動物を用いない評価法 (代替法) の開発が世界的に進められている。代替法の要件としては、①感作性のメカニズムに立脚し、②信頼度 (予測性、再現性) が高く、③簡便 (手順、時間) であること、が挙げられる。特に信頼度の観点では、“皮膚感作性物質を見逃さないこと (偽陰性をなくすこと)”が、ヒトでの感作性による健康被害を防ぐうえで強く求められる。これまでに、メカニズムに関する知見が豊富な感作誘導過程のキーイベントであるタンパク質との結合や樹状細胞活性化などに着目した、複数の代替法が開発されている (Reisinger et al., 2015)。このうちごく最近、3つの代替法が、OECD テストガイドラインとして承認された (Fig. 0-5)。Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) は The Procter & Gamble Company を中心に開発され、感作過程で生じる皮膚中タンパク質と感作性物質との結合を試験管内で再現した方法として 2015 年に

OECD テストガイドラインに記載された (OECD, 2015a)。また、皮膚に侵入した感作性物質は、角化細胞において、サイトカイン産生などの炎症反応、ならびに Anti-oxidant response element (ARE) を介した抗酸化遺伝子発現などの細胞防御応答を誘導することが知られている (OCED, 2012)。このうち、ARE 経路の活性化を模した試験法である、Nrf2-ARE-based KeratinoSens™ がスイスの Gevaudan 社によって開発され、同じく 2015 年に OECD テストガイドラインとなった (OECD, 2015b)。一方、DC の活性化を模した試験法として、抗原を捕捉して活性化した DC において共刺激分子の発現が亢進するという知見 (Sasaki et al., 2007) に基づき、THP-1 細胞における共刺激分子 (CD86 および CD54) の発現を評価指標とする、human Cell Line Activation Test (h-CLAT) が花王株式会社および株式会社資生堂により共同開発された。本法も 2016 年に OECD テストガイドラインとして承認されている (OECD, 2016)。

上記 3 法は、150 を超える物質の評価結果から、動物試験 LLNA に対する予測性が約 80% であることがわかっている (OECD, 2015a, 2015b および 2016)。しかしながら、感作誘導のメカニズムは複雑であり、単一の試験法では偽陰性が少なからず存在するため、動物試験を完全に代替することは現状困難となっている。そこで本問題点を克服すべく、感作誘導の異なるキーイベントに着目した複数の代替法の組み合わせによる評価 (Reisinger et al., 2015)、あるいは、皮膚組織を模したモデルの構築による生体に近い状態での評価 (Uchino et al., 2011) が現在検討されている。このうち、複数の試験法の組み合わせで感作誘導のキーイベントを網羅する、という前者の方法論は、動物を用いない感作性評価実現に向けた有効なアプローチして世界的に受け入れられつつある (Reisinger et al., 2015)。しかしながら、高い予測性の達成には多くの代替法 (最低 4 つ) の実施が必要であり、コスト・労力面でのハードルが存在する。一方、後者に関しては、樹状細胞を含めた皮膚組織の安定構築が極めて難しく、高い汎用性および信頼性の達成という課題が克服されていないのが現状である。

## ○本研究の目的

上記のような状況下で、現在化粧品原料を中心に、動物を用いない皮膚感作性評価は世界的に求められている。そこで本研究では、まず皮膚感作性に特異的な応答を見出したうえで、動物を用いない、簡便かつ高い予測性を有する皮膚感作性評価手法を開発すべく、以下の方針を立てた。

- ① 実現可能かつ汎用的な技術 (細胞等) を用い、出来る限り少ない試験法の組み合わせで皮膚感作誘導のキーイベントを網羅する
- ② 皮膚感作誘導メカニズムと関連性のある事象を明らかとしたうえで、*in vitro* 試験法の評価指



## 標に組むこむ

本研究では、試験法に活用するツールとして、(A) 再構築ヒト表皮モデル (Reconstructed human Epidermis: RhE モデル)、および (B) 樹状細胞様の活性化を示す培養細胞、の2つに着目した (Fig. 0-6)。RhE モデルは、ヒト正常表皮角化細胞をヒト表皮様に重層・分化させたものであり、感作誘導過程のキーイベントである、経皮吸収、タンパク質との結合および角化細胞の応答を一度に捉えることが期待できる。また、現在4つの RhE モデルが市販されていることから、汎用性・安定性の問題もクリアできる。一方、樹状細胞を含めた皮膚モデルの構築は、先述のように技術的ハードルが極めて高く実現性に乏しい。そこで樹状細胞の活性化に関しては別の試験法を新たに構築すべく、ヒト単球由来の培養細胞である THP-1 に着目した。本細胞は未分化状態であっても、ニッケルや 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) などの感作性物質の暴露により、ヒト樹状細胞同様、CD86 や CD54 などの共刺激分子の発現亢進、ならびにサイトカイン産生が起こることが示されている (Yoshida et al., 2003; Miyazawa et al., 2007)。このため、感作性物質に対する応答を捉えるという観点において、樹状細胞様細胞として、樹状細胞の活性化を指標とした代替法である h-CLAT でも用いられている (OECD, 2016)。

本研究ではまず、THP-1 を用いた樹状細胞活性化試験として、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) に着目し、ROS が特定の条件下で感作性物質特異的に産生されることを明らかとした。そのうえで、THP-1 での ROS 産生を指標に、短時間で簡便に皮膚感作性を評価する試験法を新たに開発した (Saito et al., 2013a)。一方 RhE モデルについては、皮膚感作誘導メカニズムと関連する評価指標の知見が乏しかったことから、網羅的遺伝子発現解析により、RhE モデルにおいて感作特異的に発現亢進する新規マーカー遺伝子を見出した (Saito et al., 2013b)。さらに、見出したマーカー遺伝子が、皮膚感作誘導を制御する分子を介して発現亢進することを明らかとし、RhE モデルを用いた新規試験法開発へと応用展開した (Saito et al., 2017)。

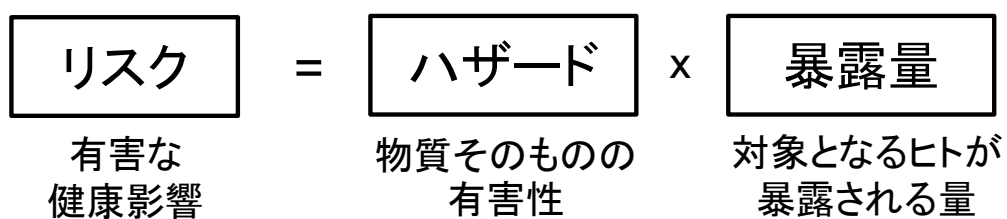
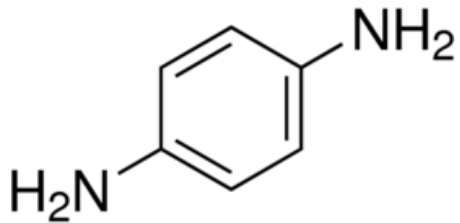


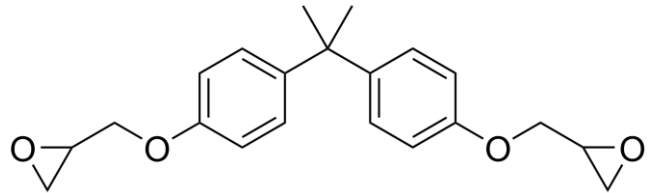
Fig. 0-1

### 化学物質のリスク

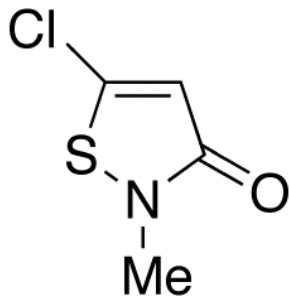
化学物質のヒトへの有害な健康影響(リスク)は、物質そのものの有害性(ハザード)と、該物質のヒトへの暴露量で決まる。ハザードは、各種安全性試験、物化性状、毒性メカニズム研究等を通じて予測する。暴露量は、使用形態(塗る、洗う等)、濃度、頻度、暴露されるヒトの状態(アトピー素因あり等)で決まる



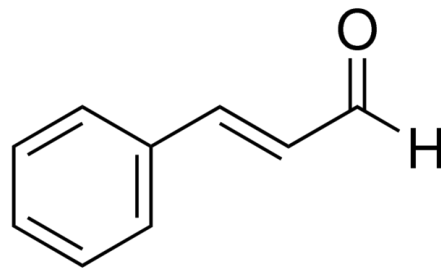
*p*-phenylenediamine  
(染毛剤)



Bisphenol A diglycidyl ether  
(エポキシ樹脂)



5-Chloro-2-methyl-3-isothiazolone  
(防腐剤)



Cinnamic aldehyde  
(香料)

Fig. 0-2

### 代表的な感作性物質の構造と用途

感作性物質は、一般的に分子内に電子的偏りを有する親電子性物質であり、タンパク質中の電子豊富なアミノ酸残基(例. システイン)と結合することで抗原性を獲得する。各々の物質は、我々の生活を豊かにするために使用される一方、有害作用も有する。*p*-phenylenediamineに関しては、アミノ基が酸化によりヒドロキシ基となり、キノンを形成することで強い感作性を有すると考えられている。

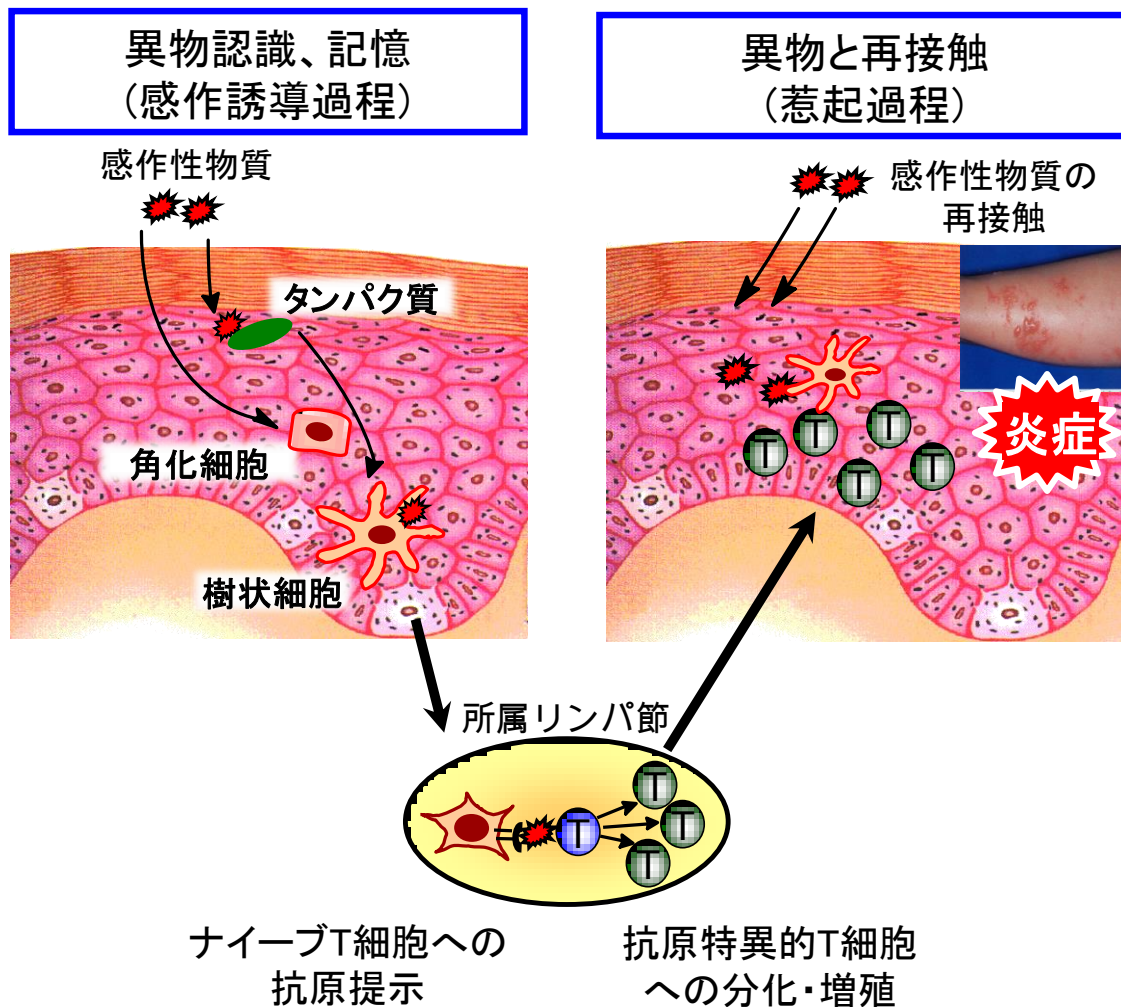
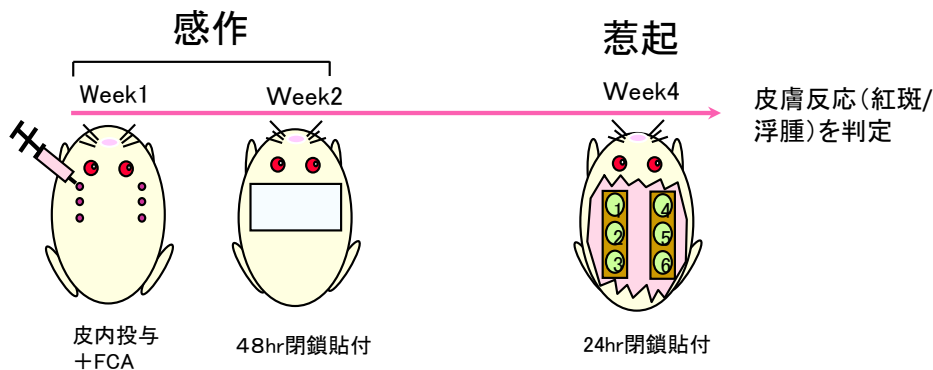


Fig. 0-3  
皮膚感作性のメカニズム

皮膚感作性は、感作誘導過程と惹起過程の二つから成り立つ。感作誘導過程では、経皮吸収された感作性物質が皮膚中タンパク質と結合する。その後、角化細胞応答を誘導しつつ、樹状細胞に捕捉される。抗原を捕捉した樹状細胞は活性化し、所属リンパ節に遊走、ナイーブT細胞へ抗原提示を行う。ナイーブT細胞は抗原特異的T細胞への分化・増殖する(感作成立)。その後、同じ物質が皮膚に暴露されると、浸潤した抗原特異的T細胞により炎症が惹起される。

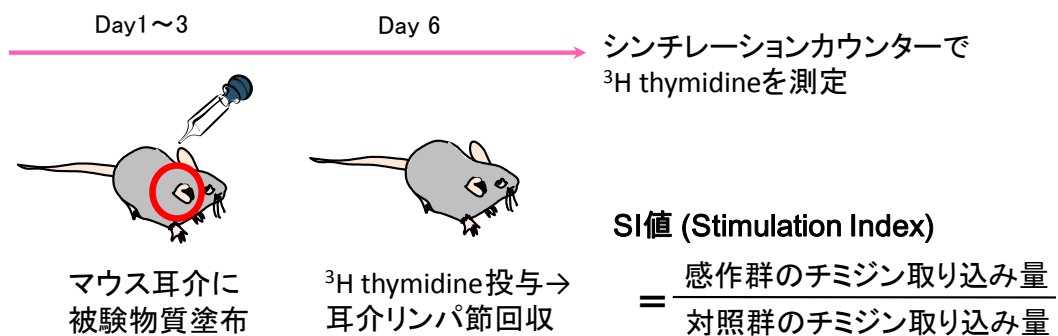
## A. Guinea Pig Maximization Test (GPMT)

OECD TG406



## B. Local Lymph Node Assay (LLNA)

OECD TG429



### ➤ 感作性の有無

SI 値  $\geq 3.0$  で陽性と判定

### ➤ 感作性の強さ

EC3値; SI値が3になる濃度で  
分類(強: Extreme ~ 弱: weak)

EC3値(%)	カテゴリー
< 0.1	Extreme
$\geq 0.1$ to < 1	Strong
$\geq 1$ to < 10	Moderate
$\geq 10$ to $\leq 100$	Weak

Fig. 0-4

### 動物を用いた皮膚感作性評価法

GPMT法では、モルモットに対し被験物質を皮内および経皮投与し、2週間後に閉塞条件下で惹起する。惹起後の皮膚反応から感作性の有無を判定する。一方、マウスを用いるLLNA法では、耳介に被験物質を3日間塗布後、所属リンパ節(耳介リンパ節)でのT細胞増殖量を指標に、感作性の有無および強さを判定する

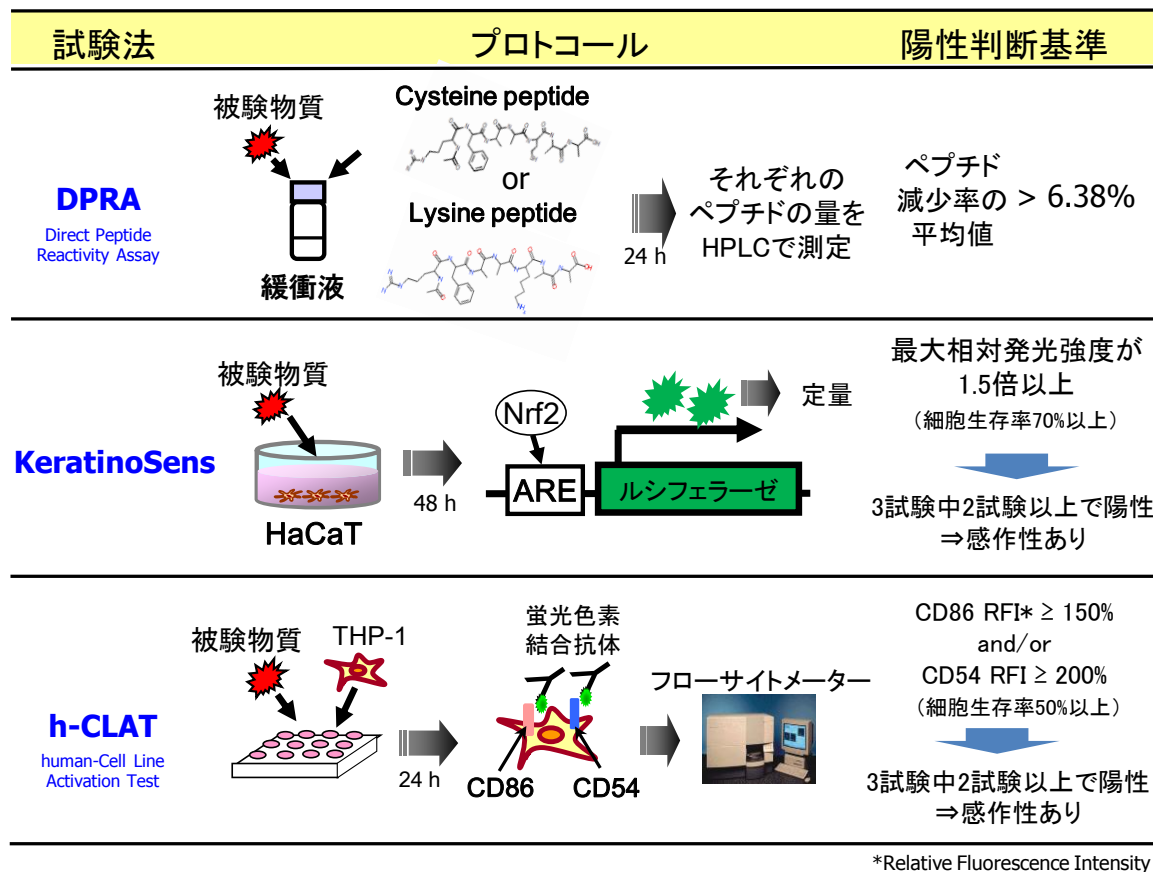


Fig. 0-5

### OECDテストガイドラインとして公的に認められた皮膚感作性代替法

現在までに、3つの代替法が皮膚感作性試験のOECDテストガイドラインとして認められている。各試験法では、感作誘導過程において重要となる事象:キーイベント(タンパク質との結合、角化細胞の応答、および樹状細胞の活性化)を反映した評価指標により、皮膚感作性の有無を評価する。なお、DPRA、KeratinoSensおよびh-CLATは、それぞれタンパク質との結合、角化細胞の応答、および樹状細胞の活性化を模した試験法として開発された。

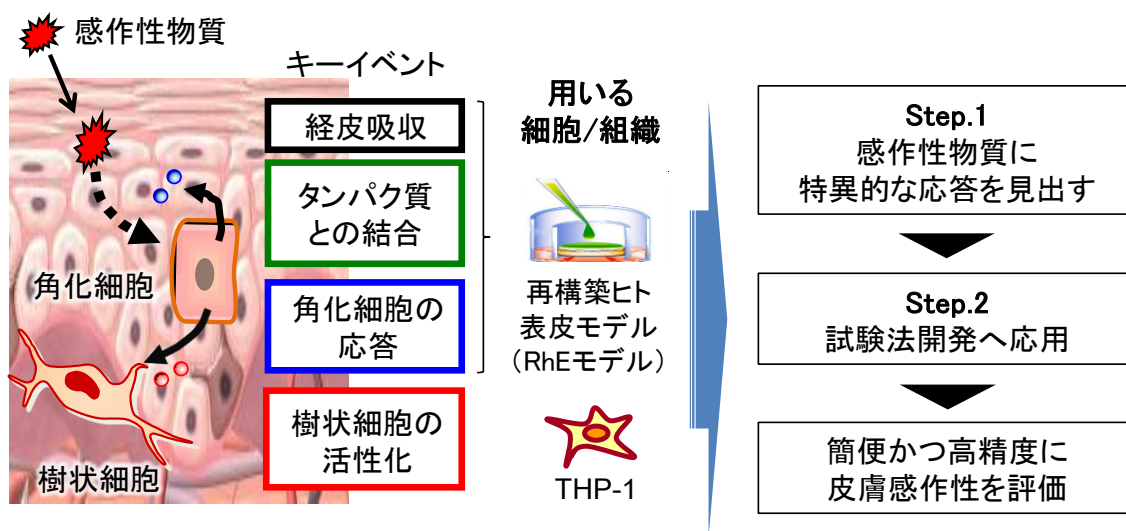


Fig. 0-6

## 本研究のアプローチ

複雑な皮膚感作性を評価するためのアプローチとして、キーイベントを模した複数の試験の組み合わせが現在最も有効な手段とされる。本研究では、4つのキーイベントのうち3つをカバーできる再構築ヒト表皮モデル(RhEモデル)を、樹状細胞の活性化に関してはヒト単球由来株価細胞であるTHP-1細胞を用いる。なお、THP-1については、感作性物質の暴露により、ヒト樹状細胞と同様、共刺激分子の発現亢進が認められることが知られている。そのため、感作性物質に対する応答を捉えるという観点では、樹状細胞様細胞として使われる。本研究ではまず、RhEモデルおよびTHP-1において、感作性物質に特異的な応答を見出す。そのうえで、見出した応答を評価指標に落とし込み、試験法開発へと応用する。最終的に両試験法を組み合わせることで、4つのキーイベントをすべてカバーした、簡便かつ高精度な皮膚感作性評価モデルの構築を目指す。

## 第1章

### ヒト樹状細胞様 THP-1 細胞の活性酸素種産生を指標とした新規試験法の開発

#### 1-1. 緒言

樹状細胞における表面抗原の発現亢進やサイトカインの産生は感作誘導の重要なイベントである。最近の研究から、これら樹状細胞の活性化に対し、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) による細胞内レドックスバランスの破たんが関与する可能性が提唱された (Sasaki et al., 2007)。実際、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼを強制発現させたマウスでは、感作性物質による樹状細胞の遊走ならびに接触過敏反応が抑制されるとの知見が存在する (Na et al., 2007)。さらに近年、ヒト単球由来の樹状細胞、および感作性物質暴露により樹状細胞様の表現型を呈することが知られるヒト単球由来株化細胞の THP-1 (Yoshida et al., 2003) や U937 (Lambrechts et al., 2009) において、感作性物質数品の暴露後に短時間 (~60 分) で ROS 産生が起こること、および CD86 などの表面分子の発現亢進に ROS が関与することが報告された (Byamba et al., 2010、Nukada et al., 2011 および Migdal et al., 2010)。上記の知見を総合すると、感作成立時の樹状細胞の活性化に対し ROS 産生が重要な役割を果たすと考えられ、樹状細胞における ROS 産生が、感作性の有無をより早期に検出できる評価指標となる可能性が示唆される。一方、ROS 産生を感作性評価に適用できることを示した報告は存在しない。そこで本検討では、OECD テストガイドラインにごく最近収載された *in vitro* 皮膚感作性試験法 h-CLAT (OECD, 2016) において、ヒト樹状細胞様の活性化を示す細胞として有用性が示されている THP-1 細胞を用い、ROS 産生が感作性の評価指標となりうるかを検討した。そのうえで、ROS 産生を指標とした新規皮膚感作性試験法の構築をめざした。

#### 1-2. 材料および方法

##### 1-2-1. 細胞

THP-1 細胞は American Type Culture Collection より入手した。THP-1 細胞は、RPMI-1640 培地 (以後 RPMI と略記) に対し、10% のウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS)、0.05 mM 2-mercaptoethanol、1% Penicillin-streptomycin (すべて Invitrogen) を添加したもの (complete RPMI) を用いて培養した。

##### 1-2-2. 被験物質および検体の調製

本検討では感作性物質31品および非感作性物質20品を評価した。このうち、強い感作性物質である2,4-dinitro-fluorobenzene (DNFB) を除く50物質の名称および略称をTable 1-1に示した。なお、各物質の化学構造は付録に示した。これらの物質は皮膚感作性強度 (Gerberick et al., 1992, 2005; Kimber et al., 1998) や、化学物質の構造、入手性を基に各物質を選択し、欧州代替法センターの推奨する参照化学物質も含まれる (Casati et al., 2009)。感作強度としては、Fig. 0-4に示した動物試験LLNAの結果に基づく5段階の強度分類 (Extreme、Strong、Moderate、WeakおよびNon sensitizer)、および感作性強度の指標として値が小さいほど感作性が強いことを示すEC3値、を示した。Lilialを除くすべての物質はSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より、またlilialは和光純薬 (Osaka, Japan) よりそれぞれ購入した。すべての物質は、溶媒である生理食塩水 (大塚製薬、Tokyo, Japan)、DMSOもし



くはacetone（いずれもSigma-aldrichより入手）に溶解後、Invitrogen社（Carlsbad, CA, USA）より購入したハンクス氏液（Hank's balanced salt solution; HBSS）に対し所定濃度で添加した。DMSOおよびacetoneの培養系に対する最高添加濃度は、ROS産生や細胞生存率に影響を与えない濃度である2.5%とした。

### 1-2-3. ROS 検出試薬とその暴露方法

ROS の検出には 5-(and 6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) (Invitrogen) を用いた。本物質は、それ自体では蛍光を発しないが、細胞膜を透過後、細胞内のエステラーゼによる加水分解を受け、酸化されることで緑色の蛍光を発する物質へと変換される。なお、本物質は光で励起されうることから、すべての工程は暗所もしくはアルミホイルによる遮光条件下で行った。CM-H<sub>2</sub>DCFDA を DMSO に希釈後、HBSS に対し終濃度が 2 μM となるように添加した。なお、添加容量は最終処理濃度で 0.2% とした。0.2 × 10<sup>6</sup> cells/mL の濃度で 48 時間、又は 72 時間前培養した THP-1 細胞を回収し、CM-H<sub>2</sub>DCFDA を含む HBSS 中に懸濁後、37°C ウォーターバス中で 15 分間培養した。なお、細胞濃度は 2.0 × 10<sup>6</sup> cells/mL とした。培養後、培地を新鮮な HBSS に置換し、細胞懸濁液を 5 mL チューブに 200 μL ずつ分取した。被験物質液 200 μL を細胞懸濁液の入った 5 mL チューブに 200 μL ずつ添加（2 倍希釈）し、37°C ウォーターバス中で培養した。

### 1-2-4. ROS assay のプロトコール策定に向けた予備検討

ROS産生を指標とする試験の標準プロトコールを策定すべく、以下の実験を予備的に実施した。まず、感作性物質によるROSの時間変化を把握すべく、無血清条件下（FBSが存在しない条件下）で、感作性物質DNFBの暴露時間を0、5、15、30、60および90分と変化させた際のROS産生量を確認した（Fig. 1-1）。また、血清の影響を把握すべく、HBSS中の血清濃度を0、5および10%とした場合のROS産生への影響を確認した（Fig. 1-2）。この際、代表的感作性物質としてDNFBもしくはOXAをそれぞれ2.5 μg/mLおよび150 μg/mLでそれぞれ細胞に30分間暴露した。続いて、感作性物質4品（OXA、MDBGN、TMTD、HC）および非感作性物質4品（BKC、CB、glycerolおよびMS）をそれぞれTHP-1に無血清下で30分間暴露した際のROS産生を検討し、細胞生存率などを指標に感作性物質特異的なROS産生を検出する基準を設けた。フローサイトメーターであるFACS Calibur（以後FACSと記載）、およびCellQuest Pro software（BD Biosciences; San Jose, CA, USA）を用いて、計5000個の細胞について、蛍光強度を測定した。細胞生存率に関しては、propidium iodide (PI; Sigma-aldrich) の取り込み量を指標に測定した。PIの最終濃度は0.625 μg/mLとした。

### 1-2-5. ROS assay 標準プロトコール

以下に示すプロトコールに従い、計 50 物質を ROS assay で評価した。

#### A. 用量設定試験

用量設定試験では、感作性物質特異的なROS産生を捉えるべく、溶媒対照に対し、細胞生存率が

5%低下する濃度（5% Decrease of Cell Viability; DCV5）の設定を目的とした。THP-1細胞を、CM-H<sub>2</sub>DCFDAを2 μM含むHBSS中に懸濁後、37°Cウォーターバス中で15分間培養した。なお、細胞濃度は $2.0 \times 10^6$  cells/mLとした。培養後、培地を新鮮なHBSSに置換し、細胞懸濁液をFACSチューブに200 μLずつ分取した。被験物質200 μLを細胞懸濁液の入ったFACSチューブに200 μLずつ添加（2倍希釈）し、37°Cウォーターバス中で30分間培養した。なお、被験物質濃度は、 $1/2^4$  x、 $1/2^3$  x、 $1/2^2$  x、 $1/2$  x および  $1 \times 12,500$  μg/mLの5濃度を設定した。被験物質暴露終了後、PIを0.625 μg/mLで添加し、細胞生存率をFACSで測定した。

## B. 本試験

THP-1細胞を、CM-H<sub>2</sub>DCFDAを2 μM含むHBSS中に懸濁後、37°Cウォーターバス中で15分間培養した。培養後、培地を新鮮なHBSSに置換し、細胞懸濁液をFACSチューブに200 μLずつ分取した。被験物質200μlを細胞懸濁液の入ったFACSチューブに200 μLずつ添加（2倍希釈）し、37°Cウォーターバス中で30分間培養した。なお、被験物質濃度は、用量設定試験の結果に基づき、 $1/2^3$  x、 $1/2^2$  x、 $1/2$  x、 $1 \times$  DCV5、および $2 \times$  DCV5 μg/mLの5濃度を設定した。被験物質暴露終了後、PIを0.625 μg/mLで添加し、細胞生存率をFACSで測定した。なお、細胞毒性が出ずDCV5が求まらない場合には、本試験では、 $1/2^4$  x、 $1/2^3$  x、 $1/2^2$  x、 $1/2$  x および $1 \times 2,5000$  μg/mLの5濃度で細胞に暴露した。溶媒対照に対する相対ROS産生量を3回の独立した試験で算出後、平均値を算出しROS産生量とした。細胞生存率が90%以上の用量域において、ROS産生量の最大値（ROS I<sub>max</sub>）が2倍を超えた場合に、ROS assayで陽性と判定した。また、ROS産生が2倍となる被験物質の推定濃度（ROS EC<sub>2</sub>）を、内挿もしくは外挿法で算出した。

### 1-2-6. 統計解析

Dunnnett 法を用いて無処理群に対する有意差を検定した。p 値が 0.05 もしくは 0.01 未満の際、有意差ありと判定した。

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. 感作性物質による THP-1 細胞での ROS 産生 (Fig. 1-1)

感作性物質を THP-1 細胞に暴露した際に ROS 産生が認められるかを、ROS による酸化で蛍光を発する CM-H<sub>2</sub>DCFDA を用いて調べた。代表的な感作性物質である DNFB を THP-1 細胞に 30 分暴露後の CM-H<sub>2</sub>DCFDA の蛍光強度をフローサイトメーターで測定した結果、DNFB 処理による平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity : MFI) の上昇が確認された (Fig. 1-1A)。また、MFI の時間変化を検証した結果、DNFB 暴露後 30 分、60 分および 90 分で暴露直後に比べ有意な MFI の上昇が確認された (Fig. 1-1B)。以上のことから、THP-1 に感作性物質を暴露すると、極めて短時間 (30 分) で ROS 産生が起こることがわかった。

#### 1-3-2. ROS 産生に血清が与える影響の解析 (Fig. 1-2)

続いて、ROS 産生測定条件を最適化すべく、血清の影響について検討を行った。その結果、代表的な感作性物質である DNFB および OXA を暴露した際の ROS 産生 (MFI) は、血清濃度依存的に減少した。なお、血清濃度による、細胞生存率への影響は確認されなかった (データ省略)。以上のことから、感作性物質による ROS 産生測定は、無血清条件での実施が好ましいと考えられた。以降の検討は、無血清条件下で実施した。

#### 1-3-3. 感作性物質および非感作性物質による ROS 産生 (Fig. 1-3)

続いて、感作性の強さが異なる感作性物質 4 品、および非感作性物質 4 品をそれぞれ THP-1 に暴露した際の ROS 産生を調べた。その結果、感作性物質 (OXA、MDBGN、TMTD、HC) 暴露により、細胞毒性がほとんど認められない用量域 (細胞生存率が 90%以上) において、溶媒対照群に比べ 2 倍以上の、濃度依存的な ROS 産生上昇が確認された (Fig. 1-3A)。一方、非感作性物質に関して、BKC の暴露では ROS 産生が認められず、CB や MS の暴露では、細胞毒性を生じる条件下 (細胞生存率がそれぞれ 43%および 80%) でのみ、溶媒対照群に比べ 2 倍以上の有意な ROS 産生が認められた (Fig. 1-3B)。また、glycerol の暴露では、25000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  という高濃度域で、1.5 倍の有意な ROS 産生が確認された (Fig. 1-3B)。なお、25000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  は、溶媒による ROS 産生への影響がない最高暴露濃度として設定している。以上のことから、感作性特異的な ROS 産生を捉えるには、細胞毒性がほとんど認められない用量域での評価が重要と考えられた。

#### 1-3-4. 50 物質を用いた、ROS assay の評価能力検証 (Table 1-2 および Fig. 1-4)

ここまでの知見に基づき、ROS 産生 (対 溶媒対照群) を指標とした皮膚感作性試験法 : ROS assay のプロトコルを構築し (方法 1-2-5 参照)、感作性物質 30 品および非感作性物質 20 品を評価した。Table 1-2 には、50 品の動物試験 LLNA で基づく強度分類および EC3 値、溶媒対照に対し細胞生存率が 5%低下する濃度である DCV5、細胞生存率が 90%を超える濃度域での最大 ROS 産生量である ROS  $I_{\text{max}}$ 、ROS 産生量が 2 倍となる濃度である ROS EC2、さらには ROS 産生 2 倍を陽性判定基準とした場合の判定結果 (陽性:P、陰性:N) を示した。ROS  $I_{\text{max}}$  は、被験物質によって異なる値を示

し、50 物質での最大値は benzoyl peroxide の 7.92 倍であった (Table 1-2)。続いて、ROS  $I_{max}$  の値を基に、動物試験 LLNA の結果 (陽性/陰性) に対する予測性を検討した (Fig. 1-4)。その結果、ROS  $I_{max}$  が 2 倍以上の場合に感作性ありとする予測モデルを組んだ結果、LLNA 陽性物質中、陽性と判定できた物質の割合である「感度」、LLNA 陰性物質中、陰性と判定できた物質の割合である「特異度」、および LLNA の結果との「一致率」は、それぞれ 83% (25/30 品)、80% (16/20 品) および 82% (41/50 品) と良好な値を示した (Fig. 1-4B)。一方、5 つの感作性物質 (PPD、PA、PG、HCA および BH) が偽陰性に、4 つの非感作性物質 (DEP、OA、saccharin および vanillin) が偽陽性とそれぞれ判定された。以上のことから、幾つかの偽判定物質は存在するものの、ROS assay を用いることで、皮膚感作性を高い精度で予測できることが示された。

#### 1-3-5. ROS EC2 を用いた、感作性の強度の予測性 (Table 1-2 および 1-3, Fig. 1-5)

ROS assay で陽性と判定された 29 物質を対象に、ROS 産生が 2 倍を示す濃度 : ROS EC2 による皮膚感作性の強度予測の可能性を検証した。まず、LLNA 陽性 (感作陽性) かつ ROS assay で陽性となった 25 物質について、ROS EC2 と LLNA EC3 との関係性をプロットした (Fig. 1-5)。その結果、ROS EC2 と LLNA EC3 とのピアソン相関係数は 25 物質全体で 0.65、OXA を除く 24 物質では 0.79 と良好な値を示した。このことから、ROS EC2 が、皮膚感作性の強度と比較的強い相関があることが示された。そこで次に、ROS EC2 を用いた、LLNA EC3 に基づく 5 段階の感作性強度分類 (Extreme, Strong, Moderate, Weak および non sensitizers) の予測性を検証した (Table 1-3)。その結果、LLNA で Extreme や Strong に分類される比較的強い感作性物質 9 品中 7 品で、ROS EC2 が 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  未満となった一方、Moderate や Weak に分類される比較的弱い感作性物質 16 品はすべて、ROS EC2 が 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上となることがわかった (Table 1-3)。また、比較的弱い感作性物質 16 品のうち 7 品で、ROS EC2 が 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上となった一方、偽陽性となった非感作性物質 4 品はすべて、ROS EC2 が 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上であった (Table 1-3)。以上の結果から、ROS EC2 を用いることで、比較的強い感作性物質 (LLNA で Extreme や Strong) とそうでない物質を高精度に分類できる可能性が示された。

Table 1-1 ROS assayで評価した50物質

被験物質名	本論文で用いた略称	CAS番号	LLNA 強度分類*	LLNA EC3(%)
Oxazolone	OXA	15646-46-5		0.003
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one solution		26172-55-4 & 2682-20-4	Extreme	0.005
2,4-Dinitrochlorobenzene	DNCB	97-00-7		0.05
4-Nitrobenzyl bromide		100-11-8		0.05
Glutaraldehyde		111-30-8		0.1
1,4-Dehydroquinone		123-31-9		0.11
<i>p</i> -Phenylenediamine	PPD	106-50-3	Strong	0.16
Phthalic anhydride	PA	85-44-9		0.16
Benzoyl peroxide		94-36-0		0.3
Propyl gallate	PG	121-79-9		0.32
Formaldehyde		50-00-0		0.61
Methyldibromoglutaronitrile	MDBGN	35691-65-7		0.9
Isoeugenol		97-54-1		1.2
2-Mercaptobenzothiasole		149-30-4		1.7
3-Dimethylaminopropylamine		109-55-7		2.2
Ethylenediamine		107-15-3	Moderate	2.2
Cinnamic aldehyde		104-55-2		3
Tetramethylthiuramdisulfide	TMTD	137-26-8		5.2
Diethylenetriamine		111-40-0		5.8
4-Chloroaniline		106-47-8		6.5
1-Bromohexane	BH	111-25-1		10
Hexylcinnamaldehyde	HCA	101-86-0		11
Citral		5392-40-5		13
Abietic acid		514-10-3		15
Lilial		80-54-6	Weak	19
Cyclamen aldehyde		103-95-7		22
Imidazolidinyl urea		39236-46-9		24
Ethyleneglycol dimethacrylate		97-90-5		28
Butyl glycidyl ether		2426-08-6		31
Hydroxycitronellal	HC	107-75-5		33
Acetoanisole		100-06-1		
Benzalkonium chloride	BKC	8001-54-5		
1-Bromobutane		109-65-9		
1-Butanol		71-36-3		
Chlorobenzene	CB	108-90-7		
Diethyl phthalate	DEP	84-66-2		
Dimethyl formamide		68-12-2		
Glycerol		56-81-5		
4-Hydroxybenzoic acid		99-96-7		
Hexane		110-54-3	Non sensitizer	Not calculated
Isopropanol		67-63-0		
Lactic acid	LA	50-21-5		
Methyl salicylate	MS	119-36-8		
Octanoic acid	OA	124-07-2		
Propylene glycol		57-55-6		
Saccharin		81-07-2		
Salicylic acid		69-72-7		
Vanillin		121-33-5		
Zinc sulfate		7733-02-0		
Sodium lauryl sulfate		151-21-3		False positive

\*動物試験LLNAのEC3値に基づき分類(Extremeが最も感作性が強い)

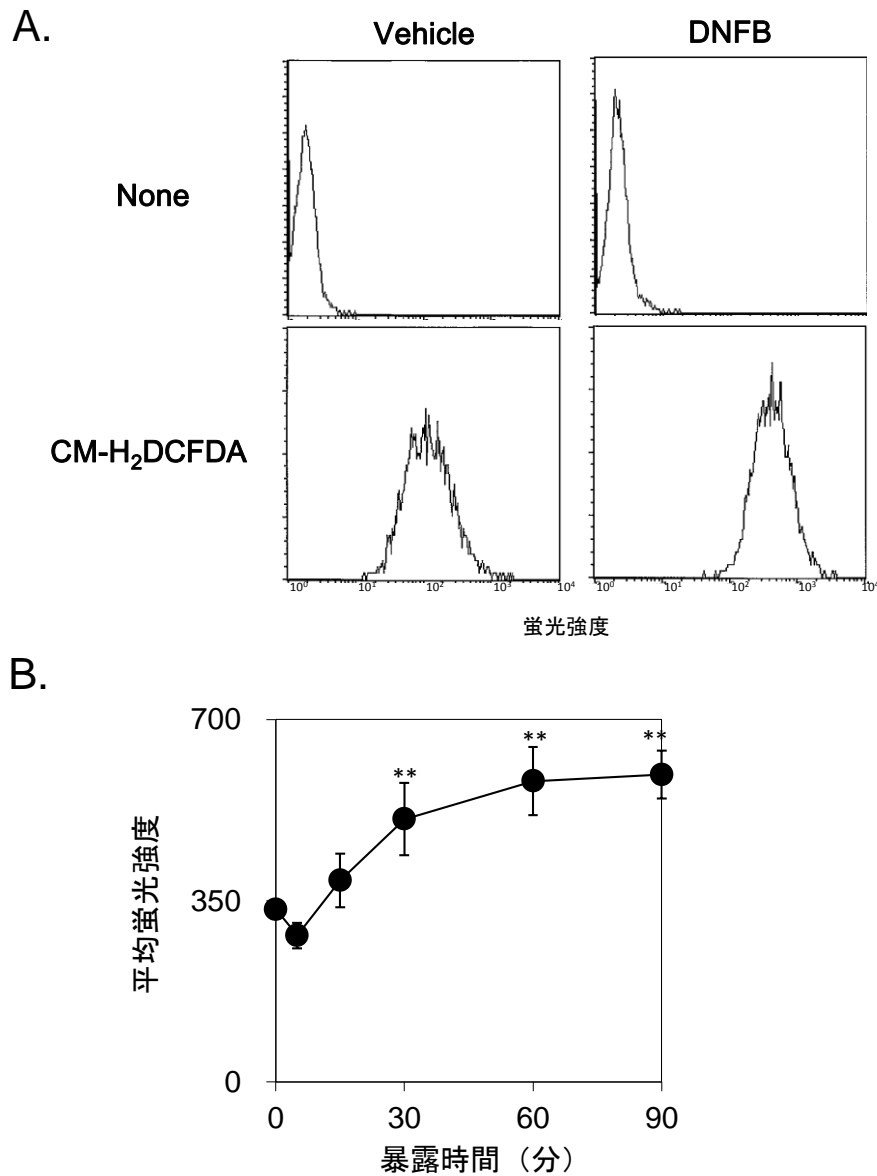


Fig. 1-1

### 感作性物質DNFB処理によるROS産生の検出

A. THP-1に対し、DMSO(図中None)もしくはCM-H<sub>2</sub>DCFDAを15分間前処理後、HBSS(図中vehicle)もしくはDNFBを2.5 μg/mLで含むHBSS(図中DNFB)に置換し、30分間培養した。蛍光強度をフローサイトメーター(FACS)で測定した。

B. THP-1に対し、CM-H<sub>2</sub>DCFDAを15分間前処理後、DNFBを2.5 μg/mLで含むHBSSに置換し、0、5、15、30、60および90分間培養した(N=3)。蛍光強度をFACSで測定し、平均蛍光強度を算出した。(\*\*p<0.01, vs 暴露0分後)

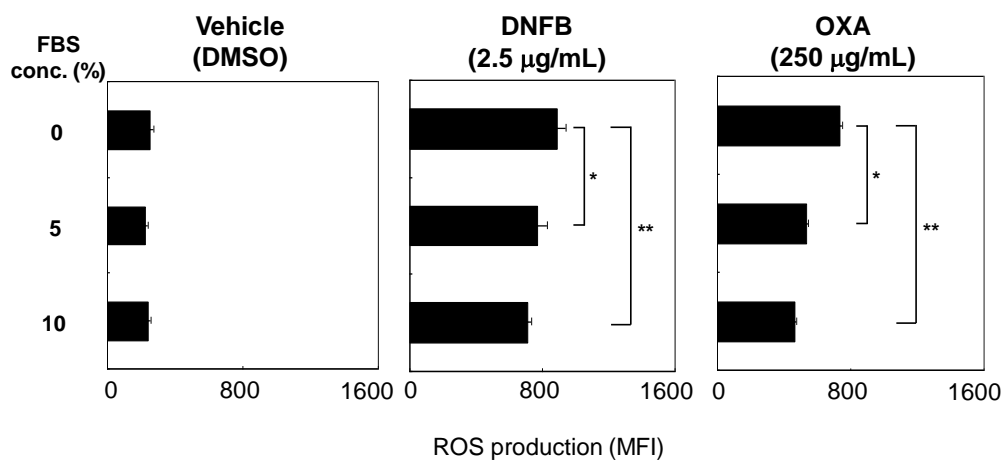
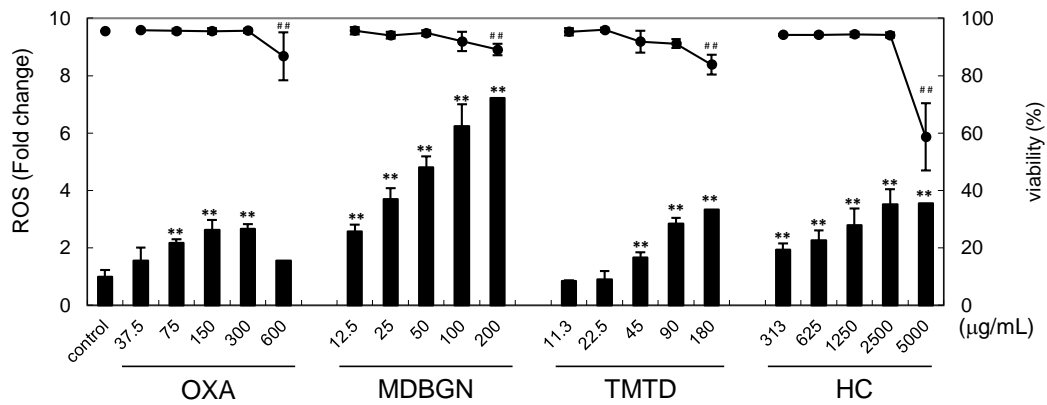


Fig. 1-2

### 感作性物質によるROS産生に血清が及ぼす影響

THP-1に対し、CM-H<sub>2</sub>DCFDAを無血清下で15分間前処理後、FBSを0、5および10%含むHBSSに、DNFBもしくはOXAを2.5 µg/mLもしくは250 µg/mLで添加し、30分間THP-1に暴露した。蛍光強度をFACSで測定した。(\*p<0.05、\*\*p<0.01)

A.



B.

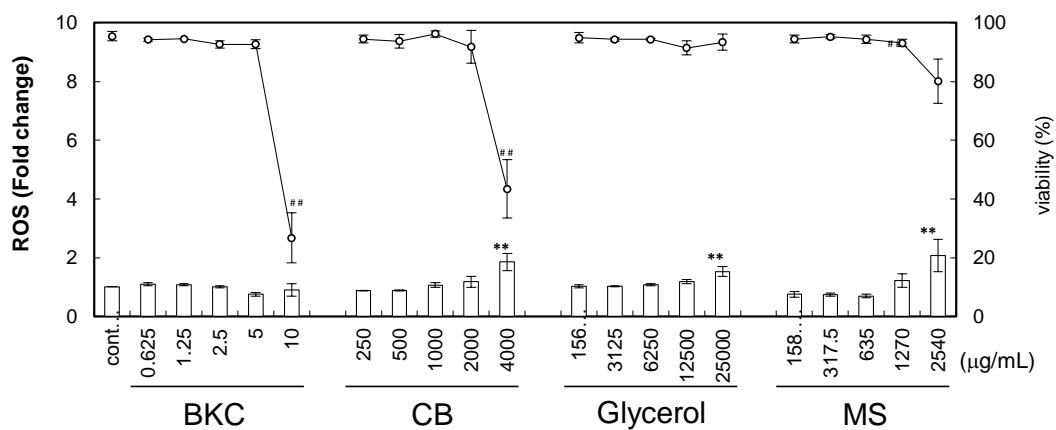


Fig. 1-3

### 様々な感作性および非感作性物質によるROS産生

THP-1に対し、CM-H<sub>2</sub>DCFDAを無血清下で15分間前処理後、感作性物質4品(OXA、MDBGN、TMTDおよびHC)、もしくは非感作性物質(BKC、CB、glycerolおよびMS)をそれぞれ、所定濃度で無血清条件下において30分間THP-1に暴露した。蛍光強度をFACSで測定し、媒体のみ時に対する相対蛍光強度をROS産生(棒グラフ)とした。また、細胞生存率(黒丸:A、もしくは白抜き丸:B)をpropidium iodideの取り込みを指標にFACSで測定した。A. 感作性物質4品、B. 非感作性物質4品のデータ



Table 1-2 ROS assayで評価した50物質の結果

被験物質名	LLNA 強度分類	LLNA EC3(%)	Vehicle	DCV5 ( $\mu\text{g/mL}$ )	ROS $I_{\text{max}}$ *	Judgment (2-fold) <sup>#</sup>	ROS EC2 ( $\mu\text{g/mL}$ )
Oxazolone (OXA)		0.003	DMSO	299	<b>2.66</b>	<b>P</b>	64.6
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one solution	Extreme	0.005	Saline	95.5	<b>4.31</b>	<b>P</b>	1.10
2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)		0.05	DMSO	292	<b>5.98</b>	<b>P</b>	7.20
4-Nitrobenzyl bromide		0.05	DMSO	743	<b>3.87</b>	<b>P</b>	0.20
Glutaraldehyde		0.1	Saline	506	<b>6.33</b>	<b>P</b>	1.40
1,4-Dehydroquinone		0.11	Saline	2.50	<b>2.40</b>	<b>P</b>	0.60
<i>p</i> -Phenylenediamine (PPD)	Strong	0.16	DMSO	6770	1.05	N	
Phthalic anhydride (PA)		0.16	DMSO	475	1.29	N	
Benzoyl peroxide		0.3	DMSO	15.5	<b>7.92</b>	<b>P</b>	3.5
Propyl gallate (PG)		0.32	DMSO	1320	1.77	N	
Formaldehyde		0.61	Saline	8220	<b>3.94</b>	<b>P</b>	63.0
Methylidibromoglutaronitrile (MDBGN)		0.9	DMSO	102	<b>6.24</b>	<b>P</b>	8.80
Isoeugenol		1.2	DMSO	223	<b>2.42</b>	<b>P</b>	181
2-Mercaptobenzothiasole		1.7	DMSO	552	<b>3.94</b>	<b>P</b>	113
3-Dimethylaminopropylamine	Moderate	2.2	Saline	67.6	<b>2.48</b>	<b>P</b>	53.6
Ethylenediamine		2.2	Saline	69.1	<b>2.31</b>	<b>P</b>	54.9
Cinnamic aldehyde		3	DMSO	389	<b>2.89</b>	<b>P</b>	23.0
Tetramethylthiuramdisulfide (TMTD)		5.2	DMSO	90.9	<b>2.84</b>	<b>P</b>	57.6
Diethylenetriamine		5.8	Saline	127	<b>2.14</b>	<b>P</b>	110
4-Chloroaniline		6.5	DMSO	604	<b>2.60</b>	<b>P</b>	381
1-Bromohexane (BH)		10	DMSO	971	1.36	N	
Hexylcinnamaldehyde (HCA)		11	DMSO	5.70	1.71	N	
Citral	Weak	13	DMSO	185	<b>2.49</b>	<b>P</b>	35.6
Abietic acid		15	DMSO	62.8	<b>3.47</b>	<b>P</b>	11.6
Lilial		19	DMSO	251	<b>3.94</b>	<b>P</b>	21.2
Cyclamen aldehyde		22	DMSO	523	<b>3.41</b>	<b>P</b>	93.8
Imidazolidinyl urea		24	Saline	4670	<b>2.89</b>	<b>P</b>	365
Ethyleneglycol dimethacrylate		28	DMSO	2960	<b>3.12</b>	<b>P</b>	61.5
Butyl glycidyl ether		31	DMSO	5500	<b>4.01</b>	<b>P</b>	776
Hydroxycitronellal (HC)		33	DMSO	2531	<b>3.52</b>	<b>P</b>	373
Acetoanisole			DMSO	1390	0.50	N	
Benzalkonium chloride (BKC)			Saline	5.00	1.10	N	
1-Bromobutane			DMSO	5080	1.41	N	
1-Butanol			Saline	6910	1.23	N	
Chlorobenzene (CB)			DMSO	1970	1.18	N	
Diethyl phthalate (DEP)			DMSO	13300	<b>2.32</b>	<b>P</b>	1420
Dimethyl formamide			Saline	25000<	1.73	N	
Glycerol			Saline	25000<	1.52	N	
4-Hydroxybenzoic acid			DMSO	840	1.50	N	
Hexane	Non sensitizer	Not calculated	Acetone	14300	1.10	N	
Isopropanol			Saline	25000<	1.22	N	
Lactic acid (LA)			Saline	454	1.26	N	
Methyl salicylate (MS)			DMSO	1270	1.22	N	
Octanoic acid (OA)			DMSO	658	<b>2.42</b>	<b>P</b>	168
Propylene glycol			Saline	25000<	1.44	N	
Saccharin			DMSO	1670	<b>2.92</b>	<b>P</b>	542
Salicylic acid			DMSO	552	1.50	N	
Vanillin			DMSO	2620	<b>3.32</b>	<b>P</b>	321
Zinc sulfate			Saline	160	1.24	N	
Sodium lauryl sulfate		False positive	Saline	15.4	1.91	N	

※ ROS  $I_{\text{max}}$  が2倍を超えた場合に、太字で表記した。

#ROS assay で陽性の場合“P(positive)”、陰性の場合“N(negative)”と示した。

A.

		ROS $I_{\max}$		
		$1.5 \leq$	$1.5 >$	
LLNA	陽性30品	<b>27</b>	3	感度:90%
	陰性20品	8	<b>12</b>	特異度:60%
				一致率:78%

B.

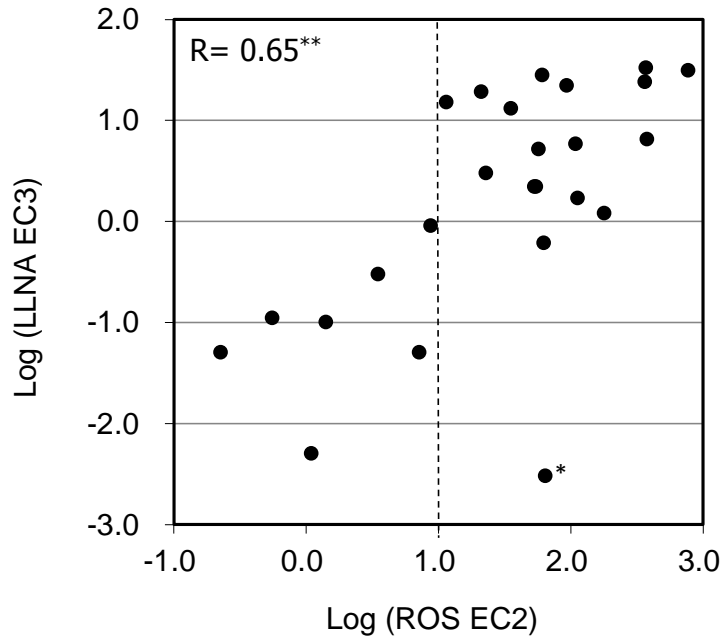
		ROS $I_{\max}$		
		$2.0 \leq$	$2.0 >$	
LLNA	陽性30品	<b>25</b>	5	感度:83%
	陰性20品	4	<b>16</b>	特異度:80%
				一致率:82%

C.

		ROS $I_{\max}$		
		$2.5 \leq$	$2.5 >$	
LLNA	陽性30品	<b>20</b>	10	感度:67%
	陰性20品	2	<b>18</b>	特異度:90%
				一致率:76%

Figure 1-4 ROS  $I_{\max}$  ごとの物質数および予測精度

ROS assayで得られた、相対ROS産生量の最大値(ROS  $I_{\max}$ )について、A. 1.5倍、B. 2倍、およびC. 2.5倍を基準とした場合、LLNA陽性および陰性物質それぞれで分類を行い予測性を算出した。感度:LLNA陽性物質中、陽性と判定できた物質の割合、特異度:LLNA陰性物質中、陰性と判定できた物質の割合、一致率:LLNAの結果との一致率、を表す。ROS  $I_{\max} \geq 2$ を基準とした場合(B)、LLNAに対し最も良好な一致率(82%)を示した。



**Fig. 1-5**  
 ROS assayで陽性と判定された感作性物質25品のEC2値と  
 LLNA EC3値との関係性

ROS assayプロトコールに基づき、各被験物質を評価した。陽性と判定された感作性物質について、ROS産生が2倍になる濃度 (ROS EC2) を算出した。ROS EC2とLLNA EC3 (感作強度の指標) の対数値を比較した。図中のRは、ピアソンの相関係数を示す。本解析から、oxazolone (図中\*で表示した点) を除いた場合、 $R=0.79$  ( $n=24$ ) となった (\*\* $p<0.01$ )

Table 1-3  
 ROS assayで陽性と判定された29物質のROS EC2値とLLNA  
 の強度分類との関係性

LLNA 強度分類	ROS EC2* (μg/mL)		
	<10	≥10 to ≤ 100	>100
Extreme or Strong	7	2	0
Moderate or Weak	0	9	7
Non sensitizers	0	0	4

\*ROS産生量が2倍となる被験物質の濃度

#### 1-4. 考察

本研究では、化学物質の皮膚感作性評価における ROS 産生の関与に着目し、樹状細胞の活性化を模した新規試験法として、ヒト単球由来株化細胞 THP-1 での ROS 産生を指標とした試験法 (ROS assay) の開発に取り組んだ。その結果、感作性物質の暴露による ROS 産生が、暴露後 30 分という極めて短時間、かつ細胞毒性を生じない濃度域で特異的に強く起こることが明らかとなった。また、ROS 産生を指標とした新規試験法は、動物試験における感作性の有無を 80%以上の精度で予測できることが見出された。さらに、感作強度の指標である LLNA EC3 と ROS EC2 との間に良好な相関性があることを見出した。以上の結果から ROS が感作性を評価するうえで有用な指標であること、および ROS assay が化学物質の皮膚感作性を評価する試験として有用であることが示された。

Fig. 1-1 の結果から、感作性物質 DNFB に暴露された THP-1 では、暴露後 30 分で顕著な ROS 産生が認められた。Byamba らは、ヒト末梢血単核球由来の樹状細胞 (Monocyte-derived dendritic cells : MoDCs) に DNCB などの感作性物質を暴露した結果、処理後 60 分で有意な ROS 産生が認められること、および ROS 産生の阻害により、樹状細胞上の CD86 などの活性化マーカーの発現増強が抑制されることを報告している (Byamba et al., 2010)。また、Migdal らも同様に、MoDCs に感作性物質の thimerosal などを暴露した結果、暴露後 30 分〜で濃度依存的かつ顕著な ROS 産生が認められたことを報告している (Migdal et al., 2010)。これらの報告は、ヒト樹状細胞における ROS 産生が感作性物質暴露後短時間で起こり、その後の樹状細胞活性化に寄与することを示唆している。一方、Nukada らは、感作性物質 DNCB に暴露された THP-1 において、暴露後 60 分で ROS が産生されること、および ROS 産生をスクャベンジャーにより抑制すると CD86 や CD54 といった活性化マーカーの発現が抑制されることを報告している (Nukada et al., 2011)。以上の報告から、本研究で認められた THP-1 による ROS 産生は樹状細胞での ROS 産生を反映した結果であり、樹状細胞活性化に先だって起こる細胞内のキーイベントと考えられる。

Fig. 1-2 の結果から、FBS は感作性物質による ROS 産生を有意に抑制した。多くの感作性物質は、タンパク質と高い結合能を有することが知られている (Divkovic et al., 2005)。これまでに、培養細胞系に適用された感作性物質は、細胞内のタンパク質だけでなく、FBS 中のタンパク質にも結合することが報告されている (Hopkins et al., 2005)。この場合、細胞に暴露される感作性物質の量が減少し、活性化等を阻害する可能性があることから、ROS 産生という極めて短時間での現象を捉える上では、細胞培養に必須な FBS を除くことで、感度を高められると考えられる。

感作性物質による ROS 産生は、比較的毒性がない、もしくはわずかに毒性が認められる用量域で生じた (Fig. 1-3A)。ROS は通常、ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系で定常的に産生される一方、カタラーゼ、グルタチオン、チオレドキシンなどの細胞内の解毒システムで中和されることが知られている (Feissner et al., 2009, Poyton et al., 2009)。加えて、NADPH oxidase のような ROS 誘導酵素が存在することも知られている (Dikalov, 2011)。Nordberg らは、感作性物質 DNCB が誘導する ROS 産生に、チオレドキシンレダクターゼ (thioredoxin reductase : TrxR) のシステイン残基への結合による活性阻害が関与することを報告している (Nordberg et al., 1998)。また、他の研究グループからも、感作性物質である cinnamic aldehyde が類似の機構で哺乳類の TrxR を阻害することが

報告されている (Chew et al., 2010)。皮膚感作性物質は、タンパク質のシステインやリジンなど、電子豊富なアミノ酸残基に求核的に結合すること (Divkovic et al., 2005) から、TrxR の活性化阻害は本検討で広く認められた感作性物質の ROS 産生メカニズムの一つである可能性が考えられる。一方、非感作性物質である CB、glycerin および MS においても、細胞毒性が認められる用量、ないしは極めて高い濃度で ROS 産生が認められた (Fig. 1-3B)。ROS 産生に関しては、低酸素や高浸透圧などの強いストレスが細胞にかかった場合でも非特異的に生じることが報告されている (Aquilano et al., 2007、Kim et al., 2010)。したがって、非感作性物質の結果については非特異的な ROS 産生を検出している可能性が考えられた。

FBS や適用濃度について最適化した ROS assay プロトコールを用いて、感作/非感作合わせて 50 物質を評価した結果、動物試験 LLNA に対する感度、特異度および一致率はそれぞれ 83%、80% および 82% となった (Table 1-2 および Fig. 1-4)。これらの値は、動物を用いない皮膚感作性試験として、ごく最近 OECD により承認された試験法である DPRA、KerarinoSens<sup>TM</sup> および h-CLAT と同等の値であった (OECD, 2015a および b、OECD, 2016)。3 つの試験法についてはいずれも、150 品を超える評価化合物の結果に基づいているため ROS assay との単純比較はできないが、本研究の結果は、ROS assay についても単独の試験法として良好な値を有する可能性を示唆する。一方、Table 1-2 より、幾つかの物質については、ROS assay で動物試験の結果を正しく予測できなかった。特に 5 つの偽陰性物質 (PPD、PA、PG、HCA および BH) については、今後 ROS assay を新規物質の皮膚感作性評価に適用する際には大きな懸念となる。以下に、偽陽性物質も含めた各偽判定物質に対する考察を加える。

PPD に関しては、LLNA で強い感作性 (EC<sub>3</sub> = 0.16) に分類される物質である。本物質は代謝により感作性を発現する物質、すなわち pre/pro-hapten といわれ、アミノ基の酸化で生じる反応性の高いハイドロキノンが感作原因と推定されている (Karlberg et al., 2008)。これまでに、PPD の酸化物に樹状細胞の活性化能があることが報告されている (Aeby et al., 2009) ことから、30 分暴露という ROS assay のプロトコールでは、PPD の十分な酸化が起きず、ROS 産生を誘導できなかったのかもしれない。また、PG に関しても、キノン前駆体として酸化により感作性を保持する pre/pro-hapten の可能性が報告されている (Urbisch et al., 2015)。以上のことから ROS assay では、代謝が必要な感作性物質の検出できない可能性が示唆される。一方、PA に関しては、h-CLAT や KeratinoSens<sup>TM</sup> といった他の *in vitro* 試験法でも陽性と検出されない (Natsch et al., 2013、Takenouchi et al., 2013)。PA などの酸無水物は培地中で加水分解を起こすため、培養細胞系などの水系の媒体を用いる系では正しく評価できない可能性が示唆されている。したがって、PA 暴露により本系で ROS 産生が起らなかった原因としては、加水分解による不活性化が考えられた。また、HCA や BH に関しては、水溶性の指標である Log Kow がそれぞれ 4.8 および 3.6 (EPI-SUITE の KOWWIN ver. 1.68 で計算) と比較的高い値を有する難水溶性物質である。これまでに、THP-1 を用いる代替法である h-CLAT において、Log Kow が 3.5 以上の物質は培地中で析出や油滴を生じ、細胞に十分暴露できず偽陰性を生じる可能性が報告されている (Takenouchi et al., 2013)。したがって、本検討で十分な ROS 産生が認められなかった原因として、難水溶性により十分暴露できなかった可能性が示唆された。以上の

ことから、代謝が必要な物質、加水分解を起こす物質および難水溶性物質を「ROS assay で正しく評価できない可能性がある物質」とし、陰性時には注意が必要と考えられる。

一方、ROS assay では、DEP、OA、saccharin および vanillin の4物質が偽陽性となった (Table 1-2)。このうち vanillin に関しては、モルモット (Watanabe et al., 2001)、およびヒト (Ferguson et al., 1995) で皮膚感作性を誘導することがそれぞれ報告されている。したがって、ROS assay では vanillin の皮膚感作性ポテンシャルを正しく評価できている可能性がある。一方、OA については中鎖脂肪酸であり、 $\beta$ -酸化による酸化を受けることが知られている (Guo et al., 2006)。 $\beta$ -酸化については、ROS 産生に関与するとの報告がある (Yamagishi et al., 2001) ことから、OA による ROS 産生メカニズムは感作性物質と異なる可能性が示唆される。また、DEP に関しては、DEP とアルキル鎖長が異なる dibutyl phthalate において、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼを直接阻害することが報告されている (Prasanth, et al, 2009)。したがって、DEP に関しても、dibutyl phthalate と同様、感作性物質とは異なる機構で ROS 産生を誘導する可能性が示唆される。Saccharin に関して、ROS 産生メカニズムについては現時点では不明である。

皮膚感作性の有無に加え、皮膚感作性の強度の予測も重要な要素である。これまでの研究から、LLNA EC3はヒト皮膚感作性との相関が報告されており (Basketter et al., 2000、Griem et al., 2003)、EC3を用いた感作性物質 (香料、防腐剤など) のリスクアセスメントも報告されている (Loveless et al., 2010)。この際、LLNA に基づく Extreme/Strong および Moderate/Weak の強度分類で後者に分類された場合、低濃度の暴露であれば感作は誘導されないという観点 (Keller et al., 2009、Safford et al., 2011) で極めて重要である。本研究結果から、ROS assay で陽性となった感作性物質25品のうち、OXAを除いたROS assay陽性の24物質で、ROS EC2とLLNA EC3値との間に強い相関性 (相関係数  $R = 0.79$ ) が確認された (Fig. 1-5)。さらに、ROS EC2が10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を下回る物質はすべてLLNAの強度分類がExtreme/Strongであり、ROS EC2が10以上100未満の11物質中9物質でLLNAの強度分類がModerate/Weakであった (Table 1-2および3)。本結果は、ROS EC2が感作性の強度の予測に有用であり、ROS assayが感作強度の予測にも適用できる可能性を示唆する。OXAについてはLLNAでExtreme (EC3=0.003) にランクされながら、ROS EC2は64.6と比較的大きかった (Table 1-2)。OXAについては本研究同様、陽性と検出されるための適用濃度が、ヒトCD34陽性前駆細胞由来樹状細胞を用いた *in vitro* 試験である VITOSENS (Lambrechts et al., 2010)、およびHaCaTを用いたKeratinoSens<sup>TM</sup> (Emter et al., 2010) でも比較的高いことが報告されている。したがって、OXAについては、ROS assay 特有の現象というより、*in vitro*系に共通して認められる現象と考えられる。Natschらは、システインおよびリジンモデルペプチドとOXAとの結合能を評価した結果、他の物質と異なり、OXAはリジンモデルペプチドと1時間以内に極めて速かつ完全に反応することを報告している (Natsch et al., 2010)。感作性物質のROS産生には、TrxRのシステイン残基への結合が関与する可能性があるとの知見 (Nordberg et al., 1998) を踏まえると、OXAの場合、細胞膜/内のタンパク質中のリジン残基と素早く結合するためにシステイン残基への結合が起こりにくく、結果としてROSを誘導する濃度が高くなるのかもしれない。以上のことから、ROS EC2による感作強度予測の際には、リジンへの高い結合性を示唆する感作性物質 (例、アシル基転移物質など) の評価には注意が必要かもしれない。

## 第2章

### 再構築ヒト表皮モデルを用いた皮膚感作性バイオマーカーの探索および新規試験法の開発

#### 緒言

第1章より、樹状細胞の活性化を指標に、皮膚感作性を簡便・かつ短時間で評価する新たな試験系として、ROS assay が有効である可能性を示した。本試験法では、一部の難水溶性物質や代謝が必要な物質 (pre/pro-haptens) を除いた、多くの物質の皮膚感作性の有無を判定する試験として有用と考えられる。一方、本論文の序論で述べたように、皮膚感作性を精度よく評価するためには、樹状細胞活性化以外のキーイベントを反映した試験法の開発が必要となる。そこで我々は、再構築ヒト表皮モデル (Reconstructed human Epidermis モデル: RhE モデル) に着目した。RhE モデルは、正常ヒト表皮由来角化細胞を重層化および分化させることで構築され (Netzlaff et al., 2005)、ヒト表皮と類似の構造・機能 (代謝能等) を有する (Luu-The et al., 2009, Gotz et al., 2012a, 2012b)。このため、皮膚感作誘導におけるキーイベントのうち、経皮吸収、タンパク質との結合、および角化細胞の応答を反映可能と考えられる。さらに RhE モデルは、気液界面で培養されるため (Fig. 2-0)、被験物質を上部から直接適用することができる。すなわち、水溶液を介して暴露する培養細胞系と異なり、難水溶性物質を動物試験同様に直接適用できるため、ROS assay では検出できなかった難水溶性物質を適切に評価できることも期待される。以上のことから、RhE モデルを用いた評価系の構築により、ROS assay との組み合わせによる、動物を用いない高精度な皮膚感作性評価を実現できると考えた。そこで本検討では、RhE を用いた汎用性の高い試験法開発を目的に、①皮膚感作性を評価する新規バイオマーカーを探索し、②見出したマーカーの皮膚感作性との関連性を把握することにより、③新規試験法の開発を行った。

#### 2-1. 再構築ヒト表皮モデルにおける、新規感作性マーカーの探索

##### 2-1-1. 緒言

RhE モデルを構成する角化細胞は、皮膚の最表面に位置し、外来異物に最初に晒される細胞である。角化細胞は、感作性物質の暴露により様々なサイトカイン (例. IL-18、TNF- $\alpha$ ) (Luster et al., 1995; Naik et al., 1999) を放出することで、樹状細胞の活性化や遊走に影響を与えることから (Cumberbatch et al., 1997, Antonopoulos et al., 2008)、感作誘導において極めて重要な細胞と考えられる。これまでに、角化細胞株における、①転写活性 (Emter et al., 2010)、②遺伝子発現 (Mckim et al., 2010)、③サイトカイン産生 (Corsini et al., 2009) を指標とした皮膚感作性試験法が幾つか報告されている。しなしながら、RhE モデルにおける有用な皮膚感作性マーカーに関しては知見が乏しいのが現状である。そこで本検討では、RhE モデルでの有用な皮膚感作性マーカーを新たに見出すべく、市販の RhE モデルに感作性物質もしくは非感作性物質を暴露した際の遺伝子発現を網羅的に解析し、マーカー候補の抽出ならびにスモールスケールでの有用性検証を行った。



## 2-1-2. 材料および方法

### 2-1-2-1. 試薬

感作性物質としてcinnamic alcohol (CinA), cinnamic aldehyde (CA), DNCB, eugenol, oxazolone (OXA), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB), glyoxal, isoeugenol (IEU), 2-mercaptobenzothiasole (MBT), methyl dibromo glutaronitrile (MDBGN), 4-nitrobenzyl bromide (4-NBB), *p*-phenylenediamine (PPD)および tetramethylthiuram disulfide (TMTD)を用いた。また非感作性物質として、benzalkonium chloride (BKC), glycerol, lactic acid (LA), salicylic acid (SA), およびsodium lauryl sulfate (SLS)を用いた。すべての試薬はSIGMA-ALDRICHより購入した。それぞれの物質はAOO溶媒 (Acetone (SIGMA-ALDRICH) : Olive oil (関東化学、Tokyo, Japan) = 3:1の混合溶液) もしくは蒸留水 (大塚製薬) を用いた。なお、蒸留水はglyoxal、glycerol、LAおよびSLSの溶媒として、AOOはそれ以外の物質の溶媒としてそれぞれ用いた。

### 2-1-2-2. RhE モデル

RhE モデルとして、表皮角化細胞から構成される表皮モデルであり、MatTek 社 (Ashland, MA, USA) より販売されている EpiDerm™ (以降 EpiDerm) を用いた。本研究では、EpiDerm として EPI-200 (24well モデル) および EPI-296 (96well モデル) を用いた。到着後、使用まで 4°Cにて保管し、到着当日～翌日に MatTek 社からの説明書に従い前培養を開始した。

### 2-1-2-3. マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

#### 1. 被験物質暴露

代表的皮膚感作性物質として、DNFB および OXA を、非感作性物質として BKC をそれぞれ用いた。各被験物質の濃度は、DNFB で 0.08%、OXA で 0.4%、BKC で 0.2%とした。これらの濃度は、事前に実施した細胞毒性試験で同等の毒性 (60%程度) を示す濃度として設定した。EPI-200 を冷蔵庫より取り出し、予め 37°Cに温めておいた EpiDerm 専用培地 (EPI-200 維持培地、MatTek 社より提供) が 0.9 mL の入った 24 well plate へ組織を移し、37°Cの CO<sub>2</sub> インキュベーターにて一晩培養した。翌朝、予め 37°Cに温めておいた EPI-200 維持培地 0.2 mL の入った 24 well plate (EpiDerm キットに含有) に組織を移した。AOO 溶媒に溶解させた被験物質を、10 μL/well で組織に暴露し、6 時間、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置した。6 時間は、マウスの耳において、hemeoxygenase-1 (HO-1) などの抗酸化遺伝子の発現が DNFB 特異的に上昇するという報告 (Miyazawa and Takashima, 2012) を参考に設定した。尚、対照群として、無処理群、溶媒対照群も同様に適用した。

#### 2. RNA 抽出

曝露後の組織を取り出し、PBS (-) (MatTek 社より提供) にて 3 回洗浄後、TRIzol® (Invitrogen) 1 mL に浸漬した。ホモジネーターにて破碎後、0.2 mL のクロロホルム (東京化成工業、Tokyo, Japan)

を添加し、激しく混和した。混和後、遠心操作（12000 rpm、15 分、4℃）にて水層と有機層に分離し、水槽を等量のエタノールと混合した。混合液を RNeasy Mini Kit（Qiagen、Valencia, CA, USA）のカラムにアプライし、所定のプロトコルに従って Total RNA を精製・抽出した。抽出した RNA は、Nanodrop1000 (NanoDrop technology, Wilmington, DE) にて濃度及び純度を測定し、使用まで-80℃で保存した。

### 3. マイクロアレイおよびデータの解析

DNAマイクロアレイ解析はクラボウ株式会社（クラボウ、Osaka, Japan）に委託して行った。マイクロアレイは、Affymetrix社（SantaClara, CA, USA）のGeneChip® 3'IVT Array(3'-Array)のうち、Human Genome Array U133 plus 2.0 arrayを用いた。RNAサンプルを定法にてマイクロアレイ解析し、蛍光強度をGeneChip Scanner 3000で測定、GeneChip Operating Software ver 1.4 により統計解析を行った。得られたデータは、ゲノム解析ソフトウェアであるGeneSpring™（Version 12.0、Agilent technologies, inc.）を用いて解析した。データの正規化をAgilent社推奨の手法（75 percentile）で行った後、ベースライン補正（median of all samples）を実施した。ANOVAによる分散分析を行い、有意差のある遺伝子（ $p < 0.05$ ）について、発現変化による抽出を行った。溶媒対照のAOOに対し、DNFBおよびOXAで1.5倍以上の有意な発現亢進を示し、かつBKCでは有意な変化が生じない、あるいは1.5倍未満の有意な発現亢進を示した遺伝子を抽出し、機能解析をFunctional annotation clusteringにて実施した。解析は、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery functional annotation tool (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) にて行い、Enrichment scoreが1.3以上を変動遺伝子との関連性が高いGene Ontology (GO) term (biological process) とし、本GO termに属する遺伝子を対象に更なる解析を実施した。

#### 2-1-2-4. Real-time PCR によるマイクロアレイデータの確認

##### 1. cDNA 合成

SuperScript™III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いて、最適化したプロトコルにて cDNA を合成した。10 mM dNTP (1  $\mu$ L)、oligo (dT) 20 (0.4  $\mu$ L) および Rnase free water (3.6  $\mu$ L) の混合液を調製し、100 ng/ $\mu$ L に調製した RNA 水溶液 (5  $\mu$ L) と、1:1 で混合した。その後、65℃で 5 分間反応させ氷冷後、10 $\times$  RT buffer (2  $\mu$ L)、25 mM MgCl<sub>2</sub> (4  $\mu$ L)、0.1M DTT (2  $\mu$ L) Rnase OUT (1  $\mu$ L) および SSIII (1  $\mu$ L) と混合し、50℃で 50 分間、85℃で 5 分間反応させた。終了後、Rnase H (1  $\mu$ L) を添加し、37℃で 20 分間反応させ RNA を分解した。調製した cDNA は、Real-time PCR に供するまで、-30℃で保存した。

##### 2. Real-time PCR 解析

Real-time RT-PCRは、Applied Biosystems社（Foster City, CA, USA）が合成した各遺伝子のプライマーおよびプローブがあらかじめ混合されたTaqman Gene Expression Assayを用いて実施した。解析し

た遺伝子は、activating transcription factor 3; ATF3、DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member4; DNAJB4、glutamate-cysteine ligase, modifier subunit; GCLM、Heat shock 70 kDa protein 6; HSPA6、heat shock 105 kDa/110 kDa protein 1; HSPH1および内在性コントロールであるGAPDHである。10  $\mu$ Lの Taq-Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)、1  $\mu$ L cDNA テンプレートおよび8  $\mu$ Lの蒸留水を混合し、optical reaction plate (96 wells; Applied Biosystems) に供した。Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCRシステム (Applied Biosystems) を用いて定量的RT-PCRを実施した。溶媒対照に対する相対発現量を、 $\Delta\Delta$ CT法 (Livak and Schmittgen, 2001)にて算出し、解析に用いた。

### 2-1-2-5. 感作マーカー候補遺伝子の有用性検証

#### 1. 被験物質処理と遺伝子の発現量解析

見出したマーカー候補遺伝子の有用性検証には、欧州代替法センターの推奨する、代替法開発の初期に評価すべき参照化学物質 16 品(感作性 12 品、非感作性 4 品; Casati et al., 2009)を用いた (Table 2-1-3)。また、RhE モデルとして、一度により多くの物質を適用可能な EPI-296 (EpiDerm<sup>TM</sup> の 96 well モデル) を用いた。すべての物質は AOO 溶媒もしくは蒸留水に最高溶解濃度 (最大 50%) で溶解させ、その後 2 倍希釈を実施した。最低濃度は 0.01% として、1 物質につき最大 14 濃度を暴露した。溶媒対照群、および被験物質群をそれぞれ 10  $\mu$ L ずつ EPI-296 に暴露し (3 wells/群)、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 6 時間培養した。6 時間後、3well 中 2well を遺伝子の発現量解析のため RNA 抽出 (材料&方法の 2-1-2-3 の 2 を参照) に、残り 1well を細胞生存率算出のために、後述する methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium (MTT) assay にそれぞれ供した。MTT assay を基に算出した細胞生存率が 50%以上の処理群の遺伝子発現結果を解析し、マーカー遺伝子の予測性検証を行った。

#### 2. MTT assay

細胞生存率は、MTT assay により測定した。MTT は生細胞中のミトコンドリアの酵素により還元され青色を呈することから、還元された MTT の吸光度を指標に細胞生存率を算出できる。なお、MTT は SIGMA-ALDRICH より入手した。6 時間培養終了後、MTT (0.5 mg/mL) を含む培地 150  $\mu$ L に置換し、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 3 時間培養した。各組織をウェルから剥離し、MTT 抽出液である isopropanol (関東化学) 200  $\mu$ L の入ったエッペンチューブにいれ、暗所で 2 時間静置した。抽出液 150  $\mu$ L を採取し、POLARSTAR Omega (BMG LABTECH, Durham, NC, USA) により吸光度を測定した。無処理群の吸光度を 100%とした時の各群の相対吸光度 (%) を細胞生存率とした。

### 2-1-3. 結果

#### 2-1-3-1. マイクロアレイによる遺伝子発現解析とマーカー候補の選定

RhE モデルでの皮膚感作性マーカー候補を見出すべく、溶媒である AOO、代表的な感作性物質である DNFB ならびに OXA、および非感作性物質 BKC を、RhE モデルである EpiDerm<sup>TM</sup> に 6 時間

暴露し、遺伝子発現をマイクロアレイで網羅的に解析した。その結果、545 遺伝子が、DNFB、OXA、および BKC いずれかの暴露により、AOO 溶媒に対し 1.5 倍以上有意に発現亢進した (Fig. 2-1-1)。このうち、DNFB、OXA および BKC すべてで発現亢進したのは、60 遺伝子であった。また、OXA および DNFB で 1.5 倍以上有意に発現亢進し、かつ BKC では 1.5 倍未満の発現亢進しか示さなかった遺伝子 (感作性特異的であることが推定) が 142 個見出された。

次に、本 142 遺伝子群に特徴的な機能を把握すべく、DAVID functional annotation tool を用いた GO 解析を実施した。その結果、計 34 の GO term が、enrichment score が 1.3 以上、すなわち変動遺伝子との関連度が比較的高い機能として見いだされた (Table 2-1-1)。このうち、positive regulation of anti-apoptosis (GO: 0045768) や response to unfolded protein (GO: 0006986) の enrichment score は、それぞれ 20.7 および 7.0 と高い値を示した (Table 2-1-1)。また、142 遺伝子のうち、34 の Go term のいずれか一つに分類されたのは 62 遺伝子となり、感作性物質に特異的な遺伝子である可能性が高いと考えられた。62 遺伝子の accession number、gene name、gene symbol、GO term、AOO (溶媒対照) 暴露時のシグナル強度、ならびに各被験物質を暴露した際の fold change を Table 2-1-2 に示した。複数の Go term と関連性がある遺伝子については、enrichment score が最も高かった Go term を示してある。62 遺伝子のうち、マーカー候補として以下の基準を満たす遺伝子を選抜した。

- 1) Fold change が感作性物質である DNFB および/もしくは OXA の暴露で 5 倍以上  
変化が大きい遺伝子を選ぶことでシグナル/ノイズ比が大きくなり、データの信頼性が増す
- 2) AOO 暴露時のシグナル強度が 100 以上  
定常状態の発現が小さい遺伝子の場合、発現亢進の相対値をとった際の意味づけが弱くなる

その結果、activating transcription factor 3 (ATF3)、DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member4 (DNAJB4)、glutamate-cysteine ligase, modifier subunit (GCLM) Qiagen、Heat shock 70 kDa protein 6 (HSPA6) および heat shock 105 kDa/110 kDa protein 1 (HSPH1) の 5 遺伝子が、上記基準を満たす遺伝子として見いだされた。

### 2-1-3-2. Real time PCR を用いたマイクロアレイデータの再現性確認 (Fig. 2-1-2)

次に、real-time PCR を用いて、見出した 5 遺伝子が DNFB や OXA の暴露で発現上昇するかを確認した。その結果、DNFB 暴露時の DNAJB4、GCLM、HSPA6 および HSPH1 の fold change は、それぞれ 5.1 倍、7.6 倍、80 倍および 5 倍となった。また、OXA 暴露時の ATF3 の fold change は 38 倍となった。このことから、fold change が 5 倍以上というマイクロアレイのデータは real-time PCR でも再現された。

### 2-1-3-3. 5 遺伝子の皮膚感作予測性能の把握 (Fig. 2-1-3~7、Table 2-1-3)

続いて、5 遺伝子の皮膚感作性予測能を把握すべく、欧州代替法センターより推奨される、代替法開発の初期に評価すべき参照化学物質 16 品 (感作性 12 品、非感作性 4 品) をそれぞれ暴露し、

5 遺伝子の溶媒対照に対する発現亢進量（相対発現量：Fold change）を調べた。

感作性物質 12 品および非感作性物質 4 品暴露時の、各遺伝子の相対発現量を Fig. 2-1-3~2-1-7 にそれぞれ示した。なお図中では、細胞生存率が 50%以上となる濃度の結果のみ示している。ATF3 に関しては、すべての感作性物質で 4 倍以上の、濃度依存的な発現亢進が確認された一方、非感作性物質 4 品では認められなかった。なお、感作性物質による ATF3 の発現亢進は、無毒性用量（細胞生存率 90%以上）から、やや細胞毒性が生じる用量域（細胞生存率 60~90%）で認められた（Fig. 2-1-3）。また、DNAJB4 に関して、すべての感作性物質で 2 倍以上の発現亢進が確認された一方、非感作性物質では SLS でのみ、2.2 倍の発現亢進が確認された（Fig. 2-1-4）。さらに、GCLM については、感作性物質 12 品中 10 品で 2 倍を超える発現亢進を認めた一方、非感作性物質 4 品では認められなかった（Fig. 2-1-5）。一方、HSPA6 については、すべての感作性物質で 2.5 倍以上の発現亢進を認められたが、非感作性物質でも Glycerol で 10.4 倍、LA で 39 倍、SLS で 9.3 倍の発現亢進が確認された（Fig. 2-1-6）。また、HSPH1 に関しては、感作性物質 12 品中 8 品で 2.0 倍以上の発現亢進を認めた一方、非感作性物質 2 品でも、LA で 5 倍（3.13 倍）、SLS で 2.5 倍（0.01%）の発現亢進が確認された（Fig. 2-1-7）。

16 物質による各遺伝子の発現変化の結果を基に陽性判定基準値（カットオフ値）を設定し、各遺伝子の感作性予測性能を検証した（Table 2-1-3）。ATF3 に関して、カットオフ値を 4 倍以上とした結果、16 物質すべてで動物試験 LLNA の判定と一致した。その他 4 遺伝子に関して、カットオフ値を 2 倍以上とした結果、LLNA との一致率は、DNAJB4 で 93.8%、GCLM で 87.5%および HSPA6 で 81.3%となった。HSPA6 に関しては、感度が 100%（12/12 品）であった一方、特異度が 25%（1/4 品）と低かった。HSPH1 に関しては、一致率が 68.8%と低い結果となった。Pre/pro-hapten に関しては、GCLM を除く 4 遺伝子すべてで陽性と判定された。以上の結果から、5 遺伝子のうち、一致率および特異度が比較的高い ATF3、DNAJB4 および GCLM が、感作性を区別するマーカー遺伝子として特に有用と考えられた。



Fig. 2-0

### 本研究で使用した再構築ヒト表皮 (RhE) モデル

本研究では、市販のヒト表皮角化細胞から構成されるRhEモデルを用いた。ヒト表皮に類似の3次元構造を有する。被験物質は、空気に接した培養表皮上部から、水系の媒体を介さずとも直接適用できる。

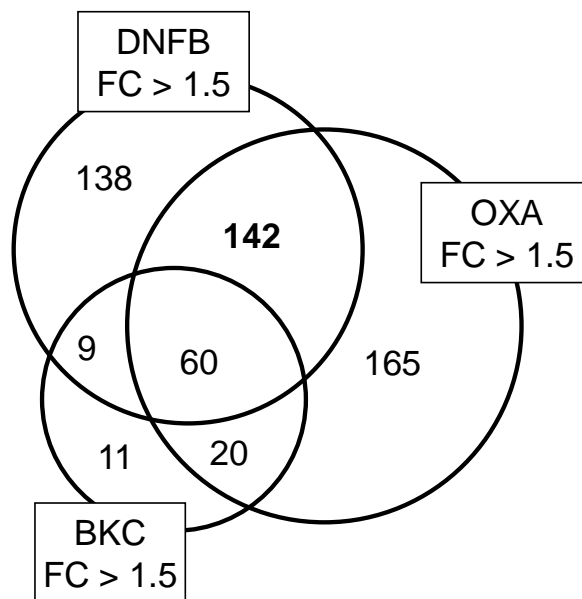


Fig. 2-1-1

**RhEモデルに、DNFB、OXAもしくはBKCを暴露した際に有意に亢進した遺伝子数**

RhEモデルであるEPI-200に、感作性物質DNFB(0.08%)、OXA(0.4%)、もしくは非感作性物質BKC(0.2%)を6時間暴露した(N=3)。暴露終了後、組織からtotalRNAを抽出し、マイクロアレイ解析に供した。溶媒対照であるAOOに対し、1.5倍以上有意に変動した遺伝子(Fold change; FC > 1.5)をベン図で示した。142遺伝子が感作性物質2品で特異的に発現亢進した。

Table 2-1-1

## 感作特異的に発現亢進した遺伝子群のGO termおよびenrichment score

GO term	Enrichment scores
GO:0045768~positive regulation of anti-apoptosis	20.7
GO:0006986~response to unfolded protein	7.0
GO:0051329~interphase of mitotic cell cycle	4.8
GO:0010629~negative regulation of gene expression	3.5
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	3.4
GO:0045934~negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	3.4
GO:0051172~negative regulation of nitrogen compound metabolic process	3.4
GO:0010558~negative regulation of macromolecule biosynthetic process	3.2
GO:0031327~negative regulation of cellular biosynthetic process	3.1
GO:0009890~negative regulation of biosynthetic process	3.0
GO:0043066~negative regulation of apoptosis	2.8
GO:0043069~negative regulation of programmed cell death	2.8
GO:0060548~negative regulation of cell death	2.8
GO:0031324~negative regulation of cellular metabolic process	2.6
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	2.5
GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	2.4
GO:0009892~negative regulation of metabolic process	2.4
GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	2.4
GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	2.3
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	2.2
GO:0009893~positive regulation of metabolic process	2.2
GO:0031325~positive regulation of cellular metabolic process	2.1
GO:0048523~negative regulation of cellular process	2.1
GO:0048522~positive regulation of cellular process	1.9
GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	1.7
GO:0051171~regulation of nitrogen compound metabolic process	1.7
GO:0019219~regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	1.6
GO:0031323~regulation of cellular metabolic process	1.6
GO:0031326~regulation of cellular biosynthetic process	1.5
GO:0080090~regulation of primary metabolic process	1.5
GO:0009889~regulation of biosynthetic process	1.5
GO:0060255~regulation of macromolecule metabolic process	1.5
GO:0010468~regulation of gene expression	1.5
GO:0010556~regulation of macromolecule biosynthetic process	1.4

※解析対象は、感作性物質で特異的に発現亢進した142遺伝子。  
enrichment score  $\geq$  1.3のGO termのみ示してある。



Table 2-1-2

## 高いenrichment scoreを認めたGO termに関連する62遺伝子

Accession No.	Gene name	Gene Symbol	GO term	Average signal of AOO <sup>a</sup>	Fold change <sup>b</sup>		
					DNFB	OXA	BKC
NM_199193	Brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)	BRE		67	1.8	<b>5.1</b>	0.7
NM_001124	Adrenomedullin	ADM	GO:0045768	<b>4133</b>	2.1	2.2	0.7
NM_002184	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	IL6ST	Positive regulation of anti-apoptosis	<b>318</b>	1.7	1.8	1.2
NM_000389	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	CDKN1A		<b>7659</b>	1.7	1.8	1.4
NM_002890	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	RASA1		<b>734</b>	1.7	1.5	1.2
<b>NM_002155</b>	<b>Heat shock 70kDa protein 6</b>	<b>HSPA6</b>		<b>555</b>	<b>48.0</b>	1.7	0.3
<b>NM_007034</b>	<b>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4</b>	<b>DNAJB4</b>	GO:0006986	<b>539</b>	<b>5.2</b>	3.3	0.9
<b>NM_006644</b>	<b>Heat shock 105kDa/110kDa protein 1</b>	<b>HSPH1</b>	Response to unfolded protein	<b>1117</b>	<b>5.8</b>	1.9	1.2
NM_005345	Heat shock 70kDa protein 1A	HSPA1A		<b>16006</b>	3.1	1.6	1.1
NM_000076	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	CDKN1C		<b>966</b>	1.6	1.6	0.9
NM_001105	Activin A receptor, type I	ACVR1	GO:0051329	<b>781</b>	1.5	1.6	1.0
NM_003620	Protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1D	PPM1D	Interphase of mitotic cell cycle	<b>853</b>	1.6	1.6	1.1
NM_001114171.1	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	FOSB		31	<b>15.5</b>	2.8	1.2
NM_025209	Enhancer of polycomb homolog 1 (Drosophila)	EPC1		96	4.2	1.9	1.3
NM_018064	Akirin 2	AKIRIN2		<b>708</b>	3.0	2.0	1.4
NM_005655	Kruppel-like factor 10	KLF10		<b>4058</b>	1.6	2.8	1.2
NM_012234	RING1 and YY1 binding protein	RYBP		<b>1913</b>	1.5	2.6	0.9
NM_006510	Tripartite motif containing 27	TRIM27		<b>332</b>	2.0	2.1	1.4
NM_001145157	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	NR2F2	GO:0010629	<b>507</b>	2.0	1.7	0.8
NM_183353	Ring finger protein, LIM domain interacting	RLIM	Negative regulation of gene expression	<b>441</b>	1.6	2.2	1.2
NM_006942	SRY (sex determining region Y)-box 15	SOX15		<b>1253</b>	1.8	1.8	1.3
NM_001197115.1	Glutamate—cysteine ligase catalytic subunit	GCLC		<b>4659</b>	2.0	1.5	1.2
NM_005642	TAF7 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 55kDa	TAF7		<b>2087</b>	2.0	1.6	1.1
NM_005189	Chromobox protein homolog 2	CBX2		<b>228</b>	1.6	1.6	1.0
NM_00113755	Leucine rich repeat (in FHL) interacting protein 1	LRRFIP1		<b>2967</b>	1.5	1.7	1.2
NM_005794	Dehydrogenase/reductase SDR family member 2	DHRS2		31	<b>15.5</b>	4.2	1.2
<b>NM_002061</b>	<b>Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit</b>	<b>GCLM</b>	GO:0043066	<b>948</b>	<b>6.8</b>	2.8	1.1
NM_003900	Sequestosome 1	SQSTM1	Negative regulation of apoptosis	<b>2530</b>	1.6	1.6	1.2
NM_002852	Pentraxin3	PTX3		52	<b>5.6</b>	1.6	0.9
NM_002105	H2A histone family, member X	H2AFX	GO:0051173	<b>1279</b>	3.5	1.8	1.3
NM_138394	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	HNRPLL	Positive regulation of nitrogen compound metabolic process	71	1.9	2.3	1.3
NM_001160125	Kruppel-like factor 6	KLF6		<b>1099</b>	1.8	2.1	1.3
NM_004229	Mediator complex subunit 14	MED14		66	1.7	1.8	0.9
NM_017555	Egl nine homolog 2	EGLN2	GO:0010604 Positive regulation of macromolecule metabolic process	<b>369</b>	1.9	1.7	1.3
NM_025195	Tribbles homolog 1 (Drosophila)	TRIB1		<b>902</b>	3.9	3.6	1.0
NM_002928	Regulator of G-protein signaling 16	RGS16	GO:0048523	80	4.7	1.9	0.7
NM_001184961	Paternally expressed 10	PEG10	Negative regulation of cellular process	93	2.6	2.6	0.9
NM_012406	PR domain containing 4	PRDM4		<b>543</b>	1.5	1.5	1.2
<b>NM_001674</b>	<b>Activating transcription factor 3</b>	<b>ATF3</b>		<b>129</b>	2.3	<b>7.3</b>	1.1
NM_021127	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	PMAI1		<b>959</b>	3.2	3.4	1.5
NM_003463	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	PTP4A1		<b>1750</b>	1.8	3.1	1.3
NM_001554	Cysteine-rich angiogenic inducer 61	CYR61	GO:0048522	<b>638</b>	1.8	3.1	0.9
NM_003844	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	TNFRSF10A	Positive regulation of cellular process	<b>812</b>	2.1	2.3	1.5
NM_021649	Toll-like receptor adaptor molecule 2	TICAM2		<b>203</b>	2.2	2.1	0.9
NM_001018065	Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2	NTRK2		83	2.4	1.6	1.0
NM_005242	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	F2RL1		<b>3249</b>	1.6	2.3	1.2
NM_001252226	Polo-like kinase 2	PLK2		<b>2922</b>	1.9	1.7	1.0
NM_033213	Zinc finger protein 670	ZNF670		80	2.1	4.1	1.3
NM_012323	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F	MAFF		<b>642</b>	2.9	3.1	1.3
NM_152603	Zinc finger protein 567	ZNF567	GO:0051252	<b>268</b>	1.7	2.6	1.2
NM_019591	Zinc finger protein 26	ZNF26	Regulation of RNA metabolic process	83	1.5	2.6	1.0
NM_001880	Activating transcription factor 2	ATF2		<b>100</b>	1.7	2.2	1.1
NM_005640	Transcription initiation factor TFIIID subunit 4B	TAF4B		<b>332</b>	1.6	2.2	1.1
NM_003440	Zinc finger protein 140	ZNF140		<b>536</b>	1.5	2.0	1.0
NM_007157	Zinc finger, X-linked, duplicated B	ZXDB		<b>118</b>	2.2	3.9	1.3
NM_001172	arginase, type II	ARG2	GO:0051171	<b>1277</b>	2.6	2.9	1.4
NM_145715	Tigger transposable element derived 2	TIGD2	Regulation of nitrogen compound metabolic process	<b>157</b>	1.9	3.6	1.3
NM_182972	Interferon regulatory factor 2 binding protein 2	IRF2BP2		<b>5494</b>	1.8	2.0	1.1
NM_024620	Zinc finger protein 329	ZNF329		<b>336</b>	1.8	1.7	1.0
NM_057749	Cyclin E2	CCNE2	GO:0031323	<b>366</b>	2.8	1.8	0.9
NM_005801	Eukaryotic translation initiation factor 1	EIF1	Regulation of cellular metabolic process	<b>8728</b>	2.0	1.9	1.2
NM_002577	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2	PAK2		<b>293</b>	1.5	2.0	1.3

※Table 2-1-1に示したGo term (Enrichment scoreが1.3以上)と関連がある62遺伝子を示している  
 ※※マーカー候補の5遺伝子について、Accession No.、Gene nameおよびGene symbolを太字で示した  
<sup>a</sup>AOO処理群(溶媒対照群)でのsignal強度が100以上の場合を太字で示した  
<sup>b</sup>AOO処理群に対するsignal強度が5倍以上の場合、太字で示した

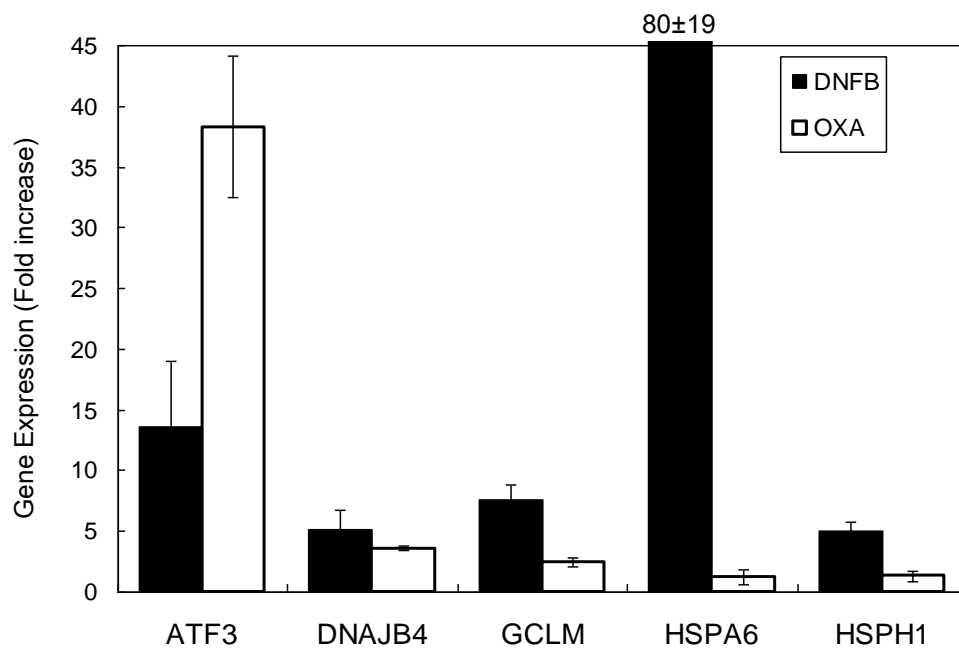


Fig. 2-1-2

### Real-time PCRによる、感作マーカー候補5遺伝子の発現変化

RhEモデルであるEPI-200に、感作性物質DNFB(0.08%)もしくはOXA(0.4%)を6時間暴露した(N=3)。暴露終了後、組織からtotalRNAを抽出し、cDNA合成を経て、Real-time PCRにより、5つの遺伝子の発現量を定量した。グラフは溶媒対照であるAOOに対する相対発現量の平均値±SDを示してある。

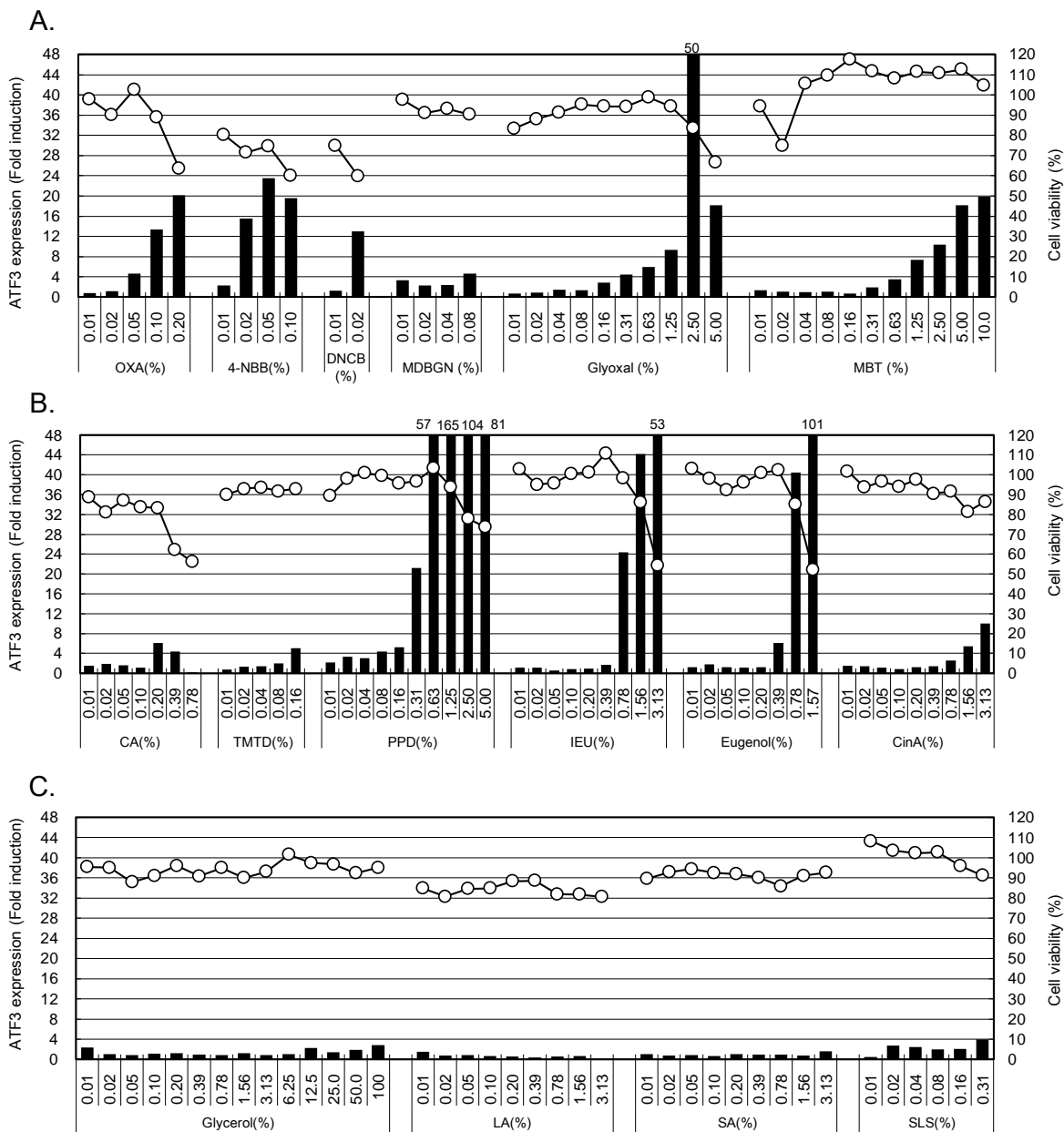


Fig. 2-1-3

参照化学物質16品暴露時のATF3の発現および細胞生存率の変化

RhEモデルであるEPI-296に、感作性物質12品(A、B)および非感作性物質4品(C)を所定濃度(％で表示)で6時間暴露し(N=2)、Real-time PCRにより、ATF3の発現量を定量した。また、MTT assayを用いて、細胞生存率を測定した(N=1)。ATF3の発現量は溶媒対照であるAOOに対する相対発現量を示してある(細胞生存率が50%以上であった濃度のみ表示)。

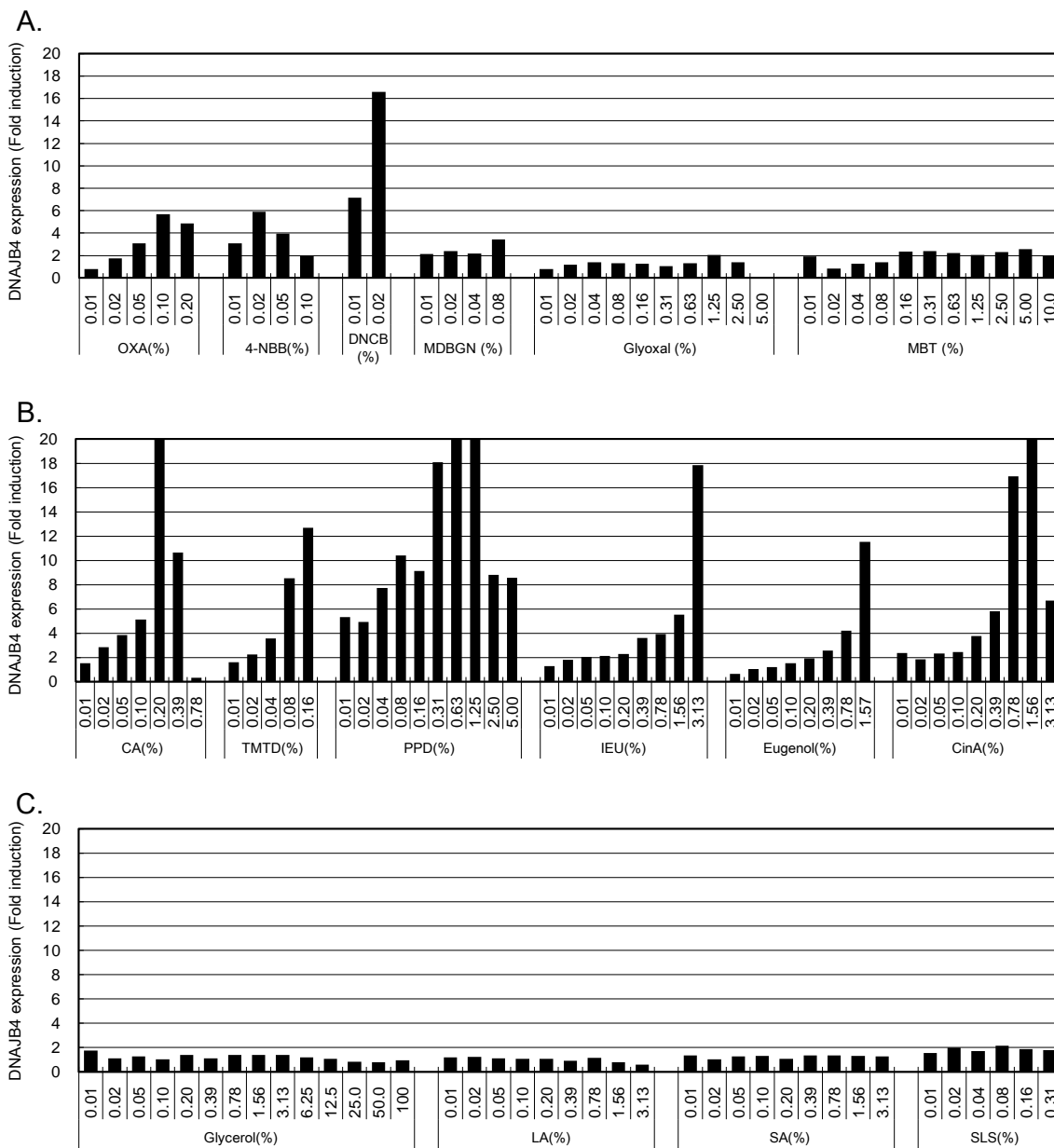


Fig. 2-1-4

### 参照化学物質16品暴露時のDNAJB4の発現変化

RhEモデルであるEPI-296に、感作性物質12品(A、B)および非感作性物質4品(C)を所定濃度(％で表示)で6時間暴露し(N=2)、Real-time PCRにより、DNAJB4の発現量を定量した。DNAJB4の発現量は溶媒対照であるAOOに対する相対発現量を示してある(細胞生存率が50%以上であった濃度のみ表示)。

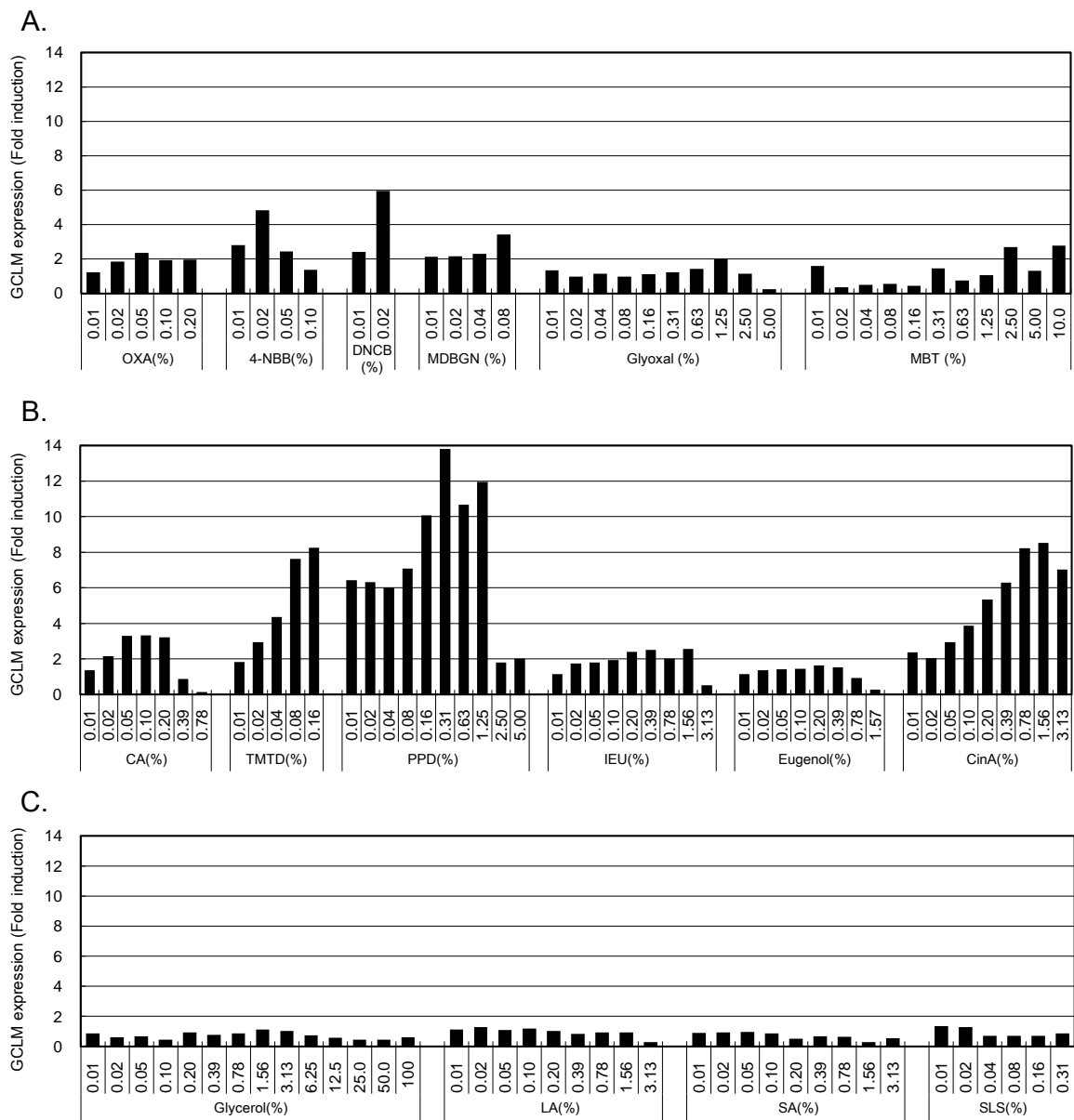


Fig. 2-1-5

### 参照化学物質16品暴露時のGCLMの発現変化

RhEモデルであるEPI-296に、感作性物質12品(A、B)および非感作性物質4品(C)を所定濃度(％で表示)で6時間暴露し(N=2)、Real-time PCRによりGCLMの発現量を定量した。GCLMの発現量は溶媒対照であるAOOに対する相対発現量を示してある(細胞生存率が50%以上であった濃度のみ表示)。

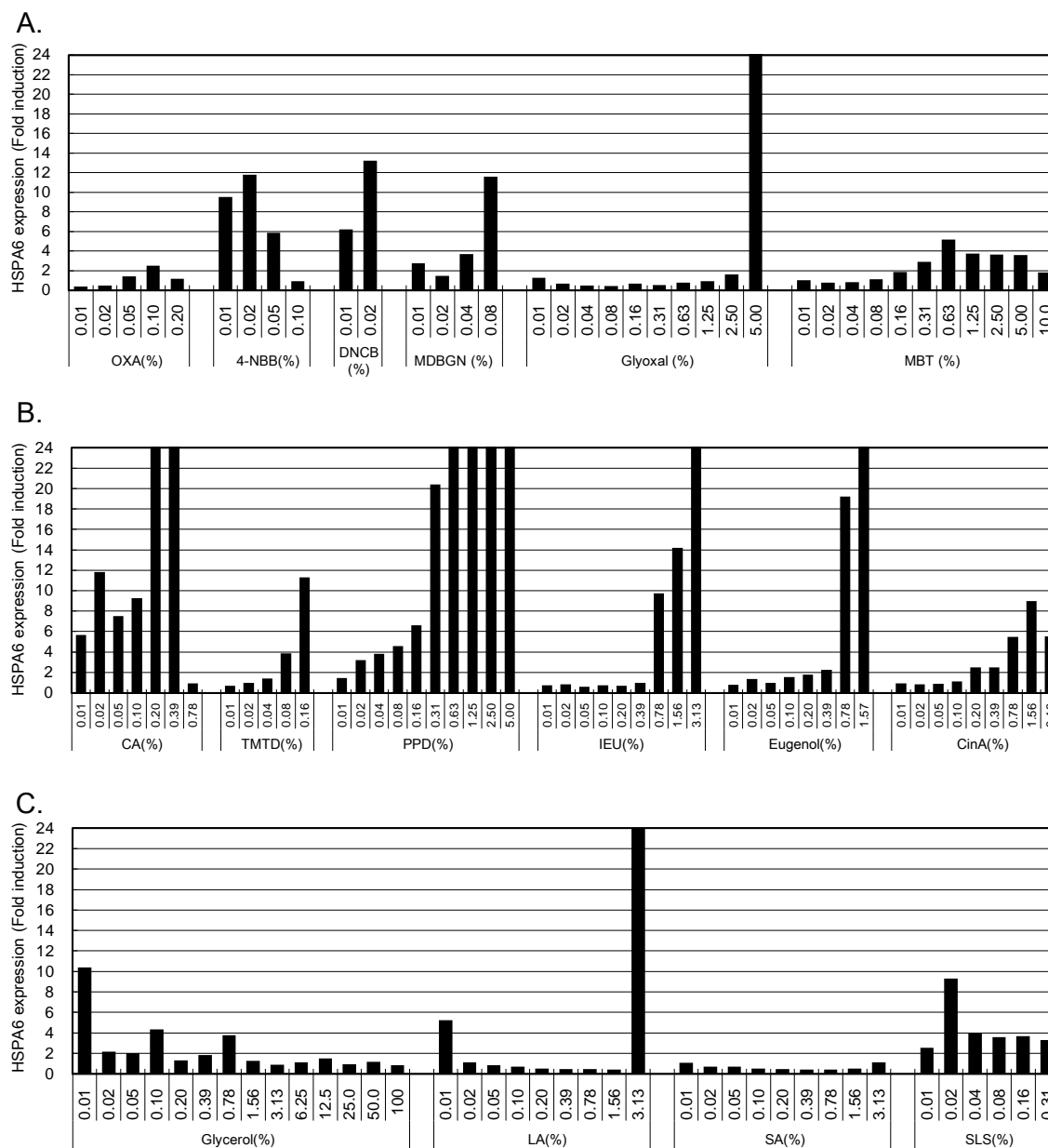


Fig. 2-1-6

### 参照化学物質16品暴露時のHSPA6の発現変化

RhEモデルであるEPI-296に、感作性物質12品(A、B)および非感作性物質4品(C)を所定濃度(％で表示)で6時間暴露し(N=2)、Real-time PCRにより、HSPA6の発現量を定量した。HSPA6の発現量は溶媒対照であるAOOに対する相対発現量を示してある(細胞生存率が50%以上であった濃度のみ表示)。

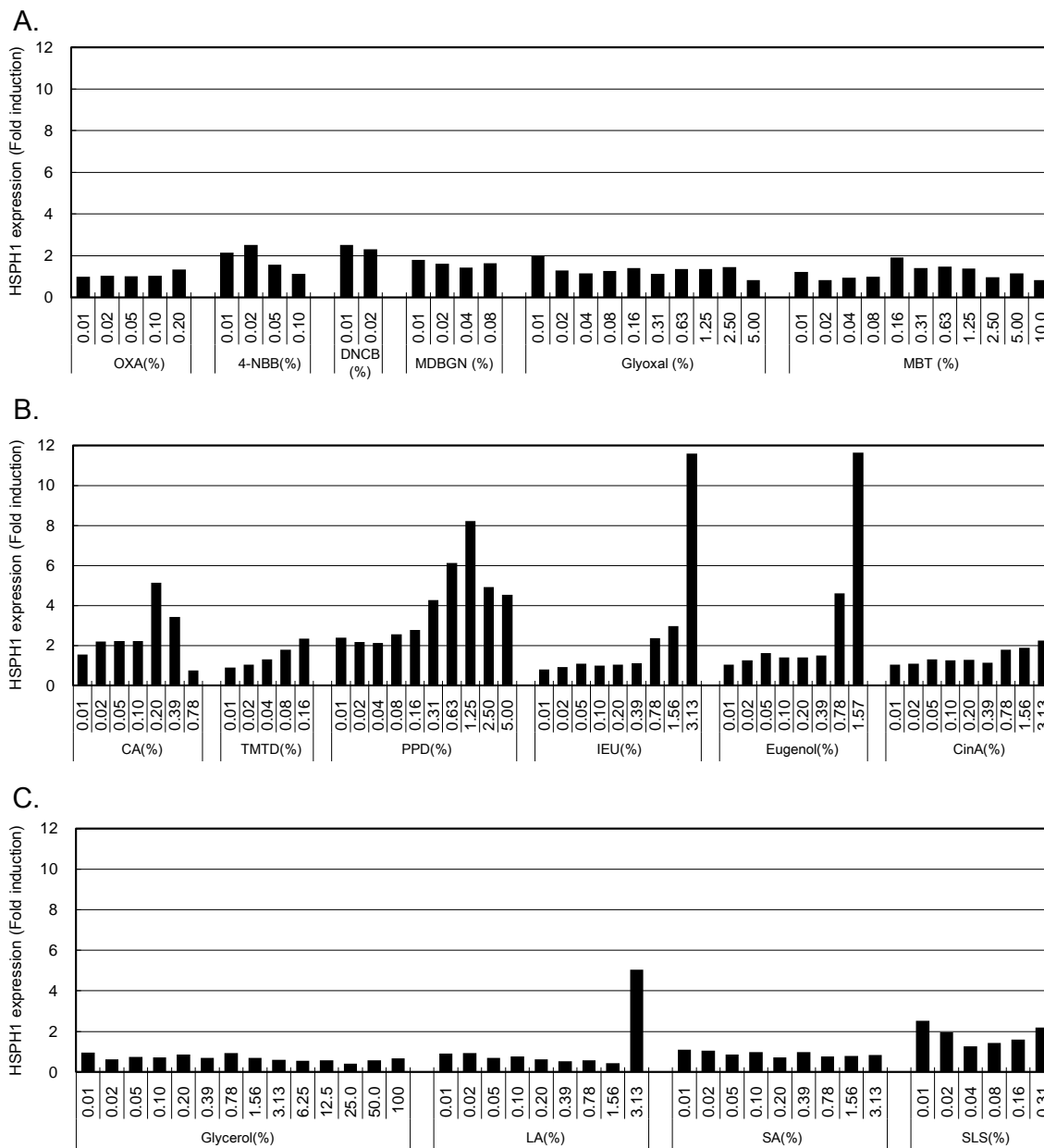


Fig. 2-1-7

### 参照化学物質16品暴露時のHSPH1の発現変化

RhEモデルであるEPI-296に、感作性物質12品(A、B)および非感作性物質4品(C)を所定濃度(％で表示)で6時間暴露し(N=2)、Real-time PCRにより、HSPH1の発現量を定量した。HSPH1の発現量は溶媒対照であるAOOに対する相対発現量を示してある(細胞生存率が50%以上であった濃度のみ表示)。

Table 2-1-3

## 参照化学物質16品の評価結果

物質名	略称	LLNA EC3 (%)	I <sub>max</sub> <sup>a</sup>				
			ATF3	DNAJB4	GCLM	HSPA6	HSPH1
Oxazolone	OXA	0.003	<b>20.2</b>	<b>5.7</b>	<b>2.4</b>	<b>2.5</b>	1.3
4-nitrobenzylbromide	4-NBB	0.05	<b>23.5</b>	<b>5.9</b>	<b>4.8</b>	<b>11.8</b>	<b>2.5</b>
2,4-dinitrochlorobenzene	DNCB	0.06	<b>13.1</b>	<b>16.6</b>	<b>6.0</b>	<b>13.2</b>	<b>2.5</b>
Methyldibromo glutaronitrile	MDBGN	0.9	<b>4.6</b>	<b>3.4</b>	<b>3.4</b>	<b>11.6</b>	1.8
Glyoxal	-	1.4	<b>49.5</b>	<b>2.1</b>	1.98	<b>31.0</b>	<b>2.0</b>
2-Mercaptobenzothiazole	MBT	1.7	<b>19.9</b>	<b>2.6</b>	<b>2.8</b>	<b>5.2</b>	1.9
Cinnamic aldehyde	CA	3	<b>6.1</b>	<b>29.4</b>	<b>3.3</b>	<b>120.0</b>	<b>5.1</b>
Tetramethylthiuram disulfide	TMTD	5.2	<b>5.0</b>	<b>12.7</b>	<b>8.3</b>	<b>11.3</b>	<b>2.3</b>
<i>p</i> -Phenylenediamine	PPD	0.16	<b>165.0</b>	<b>50.7</b>	<b>13.8</b>	<b>61.7</b>	<b>8.2</b>
Isoeugenol	IEU	1.2	<b>53.4</b>	<b>17.9</b>	<b>2.6</b>	<b>110.3</b>	<b>11.6</b>
Eugenol	-	13	<b>101.0</b>	<b>11.5</b>	1.7	<b>77.1</b>	<b>11.6</b>
Cinnamic alcohol	CinA	21	<b>10.0</b>	<b>20.9</b>	<b>8.5</b>	<b>9.0</b>	<b>2.3</b>
Glycerol	-	-	2.9	1.8	1.1	<b>10.4</b>	1.0
Lactic acid	LA	-	1.5	1.2	1.3	<b>39.0</b>	<b>5.0</b>
Salicylic acid	SA	-	1.6	1.4	1.0	1.1	1.1
Sodium lauryl sulfate	SLS	-	3.99	<b>2.2</b>	1.3	<b>9.3</b>	<b>2.5</b>
陽性判定基準値			<b>4-fold</b>	<b>2-fold</b>	<b>2-fold</b>	<b>2-fold</b>	<b>2-fold</b>
感度 (%)			100	100	83.3	100	75
特異度 (%)			100	75	100	25	50
一致率 (%)			100	93.8	87.5	81.3	68.8

<sup>a</sup>各遺伝子について、陽性判定基準値を超えた場合に太字で示した



## 2-2. 新規感作性マーカーと皮膚感作誘導との関連性検証

### 2-2-1. 緒言

感作性を評価するうえでは、感作誘導の初期に生体で起こる応答を反映した評価系構築が重要となる。感作性物質が暴露された角化細胞では、炎症反応 (inflammatory response) ならびに細胞防御応答 (cytoprotective response) の2つの反応が起こるとされる (OECD, 2012)。そして、2つの経路を司る分子として、プリン作動性受容体 P2X<sub>7</sub> および転写因子 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) がそれぞれ知られている (OECD, 2012)。P2X<sub>7</sub> は IL-1 $\beta$  や IL-18 といった炎症性サイトカイン産生を制御することが知られる一方 (Kaplan et al., 2012)、Nrf2 については Anti-oxidant response element (ARE) を介して、抗酸化・細胞防御遺伝子の発現を制御する (Uruno and Motohashi, 2011)。P2X<sub>7</sub> および Nrf2 は、各々の分子のノックアウトマウスを用いた解析から、皮膚感作性の応答を亢進 (P2X<sub>7</sub>) もしくは抑制 (Nrf2) することがわかっている (Weber et al., 2010; El Ali et al., 2013)。これまでの研究から、ATF3 は P2X<sub>7</sub> のリガンドである ATP により発現亢進することが知られている (Ohara et al., 2010)。ATP は、感作初期に炎症反応を制御する重要な分子の一つとして報告されていることから (Kaplan et al., 2012)、ATF3 に関しても P2X<sub>7</sub> を介して発現亢進し、感作初期に炎症反応を誘導する因子として働く可能性がある。一方、GCLM はヒト角化細胞株 HaCaT を用いた検討で、少なくとも定常状態では、Nrf2 依存的に発現制御を受ける可能性が報告されている (MacLeod et al., 2009)。また、DNAJB4 に関しては、分子シャペロンとしての機能 (Qiu et al., 2006) から、細胞防御応答、すなわち Nrf2 を介した制御の可能性が唆されるが、こと感作性物質による発現亢進について、両分子の関連性を示した報告はない。すなわち、感作性物質を暴露した際、ATF3 は P2X<sub>7</sub> を介して、また GCLM および DNAJB4 は Nrf2 を介して発現亢進する可能性が考えられる一方、本仮説を直接的に示した報告はない。新たに見出した遺伝子の皮膚感作性マーカーとしての妥当性を強めるためには、先述の仮説、すなわち「新たに見出した感作マーカーは、生体での感作誘導を制御する分子による発現制御を受ける」を示すことが重要である。そこで本検討では、P2X<sub>7</sub> もしくは Nrf2 阻害が、感作性物質による ATF3 (P2X<sub>7</sub>) もしくは DNAJB4 および GCLM (Nrf2) の発現亢進に与える影響を検討した。

### 2-2-2. 材料および方法

#### 2-2-2-1. 試薬および検体の調製

代表的感作性物質として、DNCB (Sigma-Aldrich) を用いた。DNCBはDMSO (Sigma-Aldrich) に溶解後、試験に供した。DNCBの暴露濃度は、各マーカー遺伝子の発現亢進が確認された2.2  $\mu\text{g/mL}$  とした。

#### 2-2-2-2. 細胞培養

クラボウより正常ヒト表皮角化細胞 (Normal human epidermal keratinocyte; NHEK) を入手した。到着後、付属の培地 (HuMedia-KG2) にて指定の操作にて細胞を解凍しフラスコに播種した。1週間継代・培養後、細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/well で 12 well plate に播種し、翌日実験に用いた。

### 2-2-2-3. siRNA による Nrf2 のノックダウン

培地940  $\mu$ LおよびHiperfect transfection reagent 60  $\mu$ Lの混合液に対し、10  $\mu$ MのコントロールsiRNA (sc-37007, Santa Cruz Biotech; Santa Cruz, CA, US) もしくはNrf2-siRNA (sc-37030, Santa Cruz Biotech) を0.2  $\mu$ L混合したものをトランスフェクションミックスとして準備した。トランスフェクションミックスを10分間室温で静置後、NHEKの培地 (1 mL) と置換した。24時間後、細胞をHEPES buffer (クラボウ) にて洗浄し、DMSO (終濃度0.2%) もしくはDNCB (2.2  $\mu$ g/mL) を含む培地1 mLで6時間培養した (各群3well)。

### 2-2-2-4. P2X<sub>7</sub>受容体の阻害実験

P2X<sub>7</sub>受容体を阻害するために、ヒトP2X<sub>7</sub>受容体特異的なアンタゴニストとして報告されているKN-62 (Anderson and Nedergaard, 2006) を用いた。なお、KN-62はSanta Cruz Biotechより購入した。KN-62はDMSOに溶解させたのち、終濃度30  $\mu$ M (培地1 mL中) でNHEKに暴露した。15分後、細胞を1 mLのHEPES bufferで洗ったのち、DMSO (終濃度0.2%) もしくはDNCB (2.2  $\mu$ g/mL) を含む培地1 mLで6時間培養した (各群3well)。また、LDHによる細胞生存率の測定の死細胞コントロールとして、0.1%のTritonX-100もNHEKに暴露した (各群3well)。

### 2-2-2-5. RNA 抽出、cDNA 合成および Real-time PCR

各被験物質物質の暴露終了後、細胞を2.5%のDL-dithiothreitol (SIGMA –ALDRICH) を含むRLTバッファー (Qiagen) で溶解した。その後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) のカラムにアプライし、所定プロトコールに従ってTotal RNAを精製・抽出した。抽出したRNAは、Nanodrop1000 (NanoDrop technology) にて濃度及び純度を測定し、使用まで-80度にて保存した。その後、2-1-2-4の1および2に示した方法に準じてcDNA合成およびReal-time PCRを実施し、ATF3、DNAJB4およびGCLMの相対発現量を算出した。

### 2-2-2-6. 統計解析

各群の平均値について、student's t-testを実施し、有意水準 $p < 0.01$ の場合に有意差ありと判定した。

## 2-2-3. 結果

### 2-2-3-1. Nrf2 阻害が DNAJB4 および GCLM の発現亢進に与える影響

Fig. 2-2-1 に、DNCB 暴露時の DNAJB4 および GCLM 発現に対する、Nrf2 阻害の影響を示した。Nrf2 の発現量が siRNA により 10%に抑制された条件下で実験を行った結果、DNCB 暴露により溶媒処理時に比べそれぞれ 10 倍および 4.3 倍に発現亢進した DNAJB4 および GCLM の発現は、3.3 倍 (阻害率 67%) および 1.6 倍 (阻害率 64%) に有意に抑制された。このことから、感作性物質による DNAJB4 および GCLM の発現亢進に Nrf2 が関与することが示された。

### 2-2-3-1. P2X<sub>7</sub>阻害が ATF3 の発現亢進に与える影響

Fig. 2-2-2 に、DNCB 暴露時の ATF3 発現に対する P2X<sub>7</sub>阻害の影響を示した。DNCB 暴露により溶媒処理時に比べ 35 倍に発現亢進した ATF3 の発現は、P2X<sub>7</sub>のアンタゴニストである KN-62 処理により、13 倍（阻害率 64%）に有意に抑制された。このことから、感作性物質による ATF3 の発現亢進に P2X<sub>7</sub>が関与することが示された。

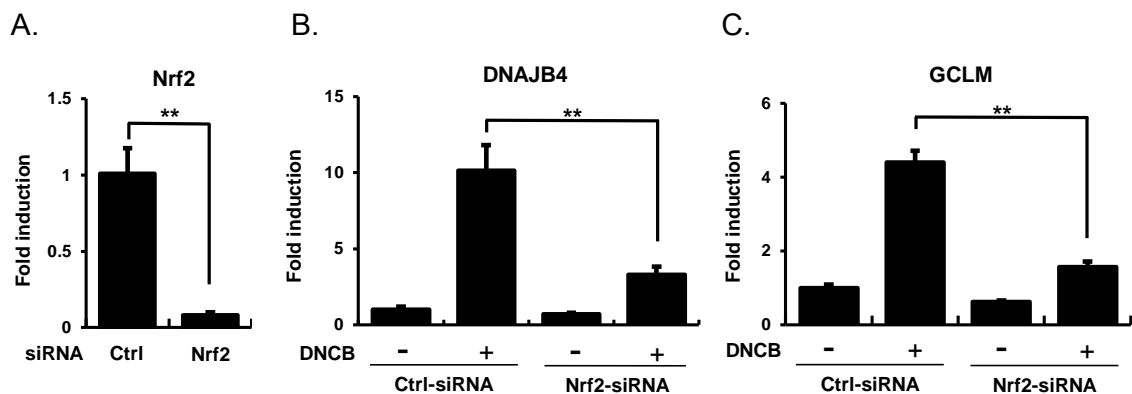


Fig. 2-2-1

### DNCB暴露時のDNAJB4およびGCLMの発現亢進にNrf2ノックダウンが与える影響

正常ヒト表皮角化細胞 (Normal human epidermal keratinocyte: NHEK) に対し、controlもしくはNrf2 siRNAを暴露し24時間培養することでNrf2をノックダウンした後、DNCB (2.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を6時間暴露した (N=3)。Real-time PCRにより、Nrf2 (A)、DNAJB4 (B) およびGCLM (C) の発現量を定量した。また、LDHを指標に細胞生存率を測定した。各遺伝子の発現量は溶媒対照であるDMSO処理群に対する相対発現量 (Fold induction) の平均値  $\pm$  SDで示してある。\*\* $p < 0.01$  (Student's t-test)

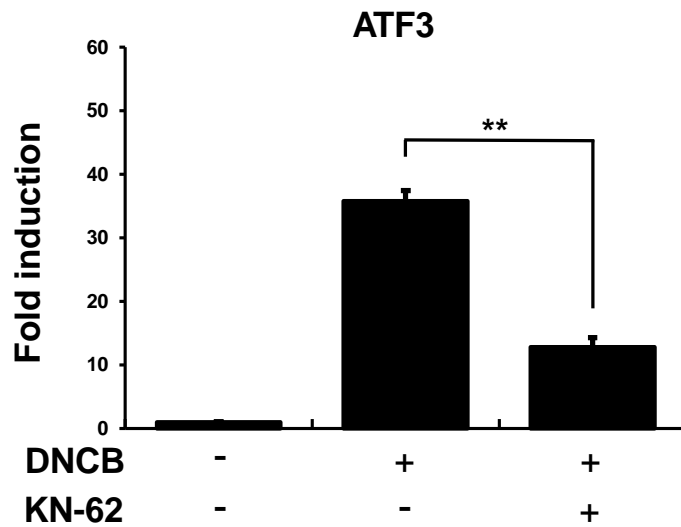


Fig. 2-2-2

### DNCB暴露時のATF3の発現亢進に P2X<sub>7</sub>のアンタゴニストが与える影響

NHEKに対し、P2X<sub>7</sub>のアンタゴニストであるKN-62(30 μM)を15分間前処理後、DNCB(2.2 μg/mL)を6時間暴露した(N=3)。Real-time PCRにより、ATF3の発現量を定量した。また、LDHを指標に細胞生存率を測定した。ATF3の発現量は溶媒対照であるDMSO処理群に対する相対発現量(Fold induction)の平均値±SDで示してある。\*\* $p < 0.01$  (Student's t-test)

## 2-3. 新規感作マーカーを用いた新規試験法 (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) の開発

### 2-3-1. 緒言

これまでの検討から、RhE モデルで皮膚感作性を評価する新たなマーカー遺伝子として、ATF3、DNAJB4 および GCLM が見出された。さらに上記 3 遺伝子は、感作初期の角化細胞応答 (炎症反応、細胞防御) を制御する分子である P2X<sub>7</sub> もしくは Nrf2 を介して発現制御を受けることが明らかとなり、皮膚感作性との関連がある遺伝子マーカーである可能性が示された。

一方、感作初期の角化細胞応答の一つである炎症反応として、炎症性サイトカインの産生も重要なイベントと考えられている (OECD, 2012)。このうち、皮膚炎症誘導時に産生されるケモカイン IL-8 は、幾つかの感作性物質、ならびに皮膚刺激性のある非感作性物質の暴露により、RhE で発現亢進することが過去報告されている (Coquette et al., 2003)。その後追加の報告がない一方、近年複数の研究グループから、単層のヒト角化細胞において、IL-8 が皮膚感作性マーカーとして有用である可能性が報告された (Mckim et al., 2010, Bae et al., 2015)。さらにごく最近、マウスを用いた研究で、ケモカインにより皮膚遊走を受ける好中球が、感作誘導に強く関与することが報告された (Weber et al., 2015)。以上のことから IL-8 についても、RhE モデルで皮膚感作マーカーとしての有用性を検証したうえで、新規試験法に組み込めないか考えた。そこで本検討では、RhE モデルを用いた新規皮膚感作性試験法 (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA, Fig. 2-3-1) の構築を目指し、新たに見出した 3 遺伝子に IL-8 を加えた計 4 遺伝子について、難水溶性物質や pre/pro-hapten を含む幅広い感作性/非感作性物質を暴露した際の発現変化を確認し、感作予測に関する有用性を検証した。

### 2-3-2. 材料および方法

#### 2-3-2-1. 用いた被験物質

Table 2-3-1に示した計72物質を評価した。各物質の化学構造は付録に示した。本72物質は、感作強度 (Gerberick et al., 1992 and 2005; Kimber et al., 1998 and Kern et al., 2010)、化学構造、入手性、物価性状を考慮して選択した。この中には、難水溶解性物質 (Log Kow  $\geq$  3.5) も29品含まれる。なお、LogKow  $\geq$  3.5の物質については、培養細胞を用いた代替法であるh-CLATにおいて感作性物質の偽陰性率が上昇することが報告されている (Takenouchi et al., 2013)。さらに、72物質のなかには、代謝が必要な感作性物質; pre/pro-haptens (Urbisch et al., 2015) も11品含まれる。後述する5物質を除き、すべての物質はSIGMA-ALDRICHより購入した。

- Tetrachlorosalicylanilide (TCSA; 関東化学)
- lilialおよびundecylenic acid (和光純薬)
- 2-ethylhexyl acrylate (EHA; ナカライテスク、Kyoto, Japan).

各々の物質は、AOO、蒸留水、もしくは50% ethanol in DW (50% EtOH; エタノールは関東化学より購入) に溶解後、RhEモデルに供した。それぞれの物質について、CAS番号、LLNA EC3値 (%), Log Kowの計算値 (KOWWIN ver.1.68 in EPI suite<sup>TM</sup> (Environmental Protection Agency)), および試験

溶媒をTable 2-3-1に示した。

### 2-3-2-2. RhE モデル

RhE モデルとしては、Japan Tissue Engineering 社より市販されている Labcyte EPI-MODEL (Labcyte) を用いた。本モデルは、ヒト新生児包皮由来の NHEK より作製されたヒト表皮モデルである。フィルター基板上に空気と接した形で播種された NHEK は、5%のウシ胎児血清を含む培地（組成は非開示）での 13 日間の培養を経て、ヒトの表皮と類似した多層の表皮構造を形成する (Kato et al., 2009)。なお、本 RhE モデルは、2013 年に皮膚刺激性試験で使用可能な皮膚モデルとして OECD テストガイドラインに記載された (OECD, 2013)。また、本モデルは日本の企業が作製したこともあり、EpiDerm™ に比べ、安価にかつタイムリーに入手可能である。以上の観点から、以後本研究では RhE として Labcyte を用いて検討を行った。Labcyte は到着後、J-TEC 社の指示書に従い、500  $\mu$ L の専用培地 (J-TEC より供与) に移したのち、37°C (5%CO<sub>2</sub>) で一晩前培養し試験に供した。

### 2-3-2-3. 被験物質の暴露および遺伝子発現量の解析

評価ではまず細胞毒性試験を実施し、本試験に供する濃度を決定した。各被験物質を、A) 固体の場合には、溶媒への最高溶解濃度 (最高 50%) から公比 4 で最低 0.02% まで、B) 液体の場合には、原体から公比 4 で最低 0.02% まで調製した。被験物質、溶媒対照および細胞生存率測定用の死細胞コントロールである 10% TritonX-100 を 5  $\mu$ L/well で Labcyte の表面に乗せるように暴露した (各群 1well)。37°C (5%CO<sub>2</sub>) で 6 時間培養後、2-3-2-4 に示した方法で lactose dehydrogenase (LDH) をもとに細胞生存率を測定した。なお、LDH での測定が困難な物質 (例. LA) については、回収した組織を MTT assay (2-1-2-5 の 2 を参照) に供すことで細胞生存率を算出した。

本試験では、細胞生存率が 80% を切った最低濃度を最高処理濃度とし、細胞生存率が 90% 以上になる濃度まで公比 2 で段階希釈した (通常 4~5 濃度)。なお、予備試験で処理したすべての濃度で細胞生存率が 80% を切らなかった場合には、最高適用可能濃度から公比 2 で最低 3 濃度を調製した。被験物質、溶媒対照および 10% TritonX-100 を 5  $\mu$ L/well で Labcyte の表面に乗せるように暴露した (各群 3well)。37°C (5%CO<sub>2</sub>) で 6 時間培養後、2-1-2-3 の 2、2-1-2-4 の 1 および 2 に示した方法で RNA 抽出、cDNA 合成および Real-time PCR を実施し、各遺伝子の相対発現量を算出した。なお、IL-8 に関しても、Applied Biosystems 社が合成したプライマーおよびプローブを用いた。

### 2-3-2-4. LDH の漏出を指標とした細胞生存率の測定

被験物質処理後の細胞生存率を LDH の漏出を指標に測定した。本法は培地中の LDH 放出量を基に細胞生存率を測定できることから、遺伝子発現と細胞生存率の測定を同一の細胞群を用いて行うことが可能である。被験物質曝露後の培地をマイクロチューブ或いは 96 well 丸底プレートに回収し、遠心して細胞残渣を除去した。上清について、LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ、Tokyo, Japan) のプロトコールに従い、LDH 放出量を解析した。なお、吸光度は POLARSTAR Omega (BMG LABTECH) により測定した。細胞生存率を以下の式で算出した。

$$\text{細胞毒性(\%)} = \frac{(\text{サンプルの吸光度}) - (\text{未処理群の吸光度})}{(\text{TritonX-100 処理時の吸光度}) - (\text{未処理群の吸光度})} \times 100$$

$$\text{細胞生存率(\%)} = 100 - \text{細胞毒性(\%)}$$

### 2-3-2-5. データの解析と感作性の予測

各遺伝子について、80%以上の生存率を示した濃度域における、相対発現量（対溶媒）の 3well での平均値（平均相対発現量）を算出した。各遺伝子について、陽性判定基準値（カットオフ値）を設定し、該物質における 4 遺伝子の平均相対発現量の最大値（ $I_{\max}$ ）が、1 遺伝子以上でカットオフ値を上回った場合に、該物質を“感作陽性”と最終判定した（EpiSensA prediction model）。なお、各遺伝子のカットオフ値は、結果の項:2-3-3 で後述するように、ATF3 で 15 倍以上、DNAJB4 および GCLM で 2 倍以上、および IL-8 で 4 倍以上とした。さらに、各遺伝子について、カットオフ値を示す濃度（例. ATF3 であれば相対発現量が 15 倍になる濃度）を EC 値として算出し、強度予測への適用性を検証した。EC 値は、内挿および外挿を用いて算出した。

### 2-3-3. 結果

#### 2-3-3-1. 難水溶性感作性物質暴露時の、ATF3、DNAJB4、GCLM および IL-8 の発現変化

Fig. 2-3-2 に、難水溶性物質 4 品（Bisphenol A diglycidyl ether; BADGE、undec-10-enal、EHA および abietic acid）をそれぞれ RhE モデルである Labcyte に暴露した際の、各遺伝子の相対発現量（対 AOO 溶媒）および細胞生存率を示した。それぞれの物質で、無毒性～やや細胞毒性を生じる用量域（生存率 80%以上）において、各遺伝子の濃度依存的な発現亢進が確認された。また、最大発現亢進量に関して、ATF3（BADGE での 40.4 倍～EHA での 174 倍）および IL-8（EHA での 25.3 倍～undec-10-enal での 115.7 倍）では、DNAJB4（abietic acid での 2.8 倍～EHA での 83.9 倍）および GCLM（undec-10-enal での 3 倍～EHA での 28.9 倍）に比べ大きい傾向を示した。以上のことから、IL-8 を含む 4 遺伝子は、難水溶性物質暴露により RhE モデルで発現亢進すること、ならびに ATF3 および IL-8 で特に強い発現亢進を示すことが見出された。

#### 2-3-3-2. Pre/pro-hapten 暴露時の、ATF3、DNAJB4、GCLM および IL-8 の発現変化

Fig. 2-3-3 に、pre/pro-hapten 4 品（PPD、metol、ethylenediamine および eugneol）をそれぞれ Labcyte に暴露した際の、各遺伝子の相対発現量（対 AOO 溶媒）および細胞生存率を示した。難水溶解性物質と同様、それぞれの物質で、無毒性～やや細胞毒性を生じる用量域において、各遺伝子の濃度依存的な発現亢進が確認された。4 物質処理時の、濃度に応じた発現亢進の増加傾向は、炎症反応に関与する遺伝子である ATF3 と IL-8 において、発現亢進量は異なるものの類似であった。一方、細胞防御に関連する DNAJB4 および GCLM に関しては、PPD、metol、eugneol では同様であった一



方、ethylenediamine では異なる傾向を示した。また、PPD、metol、eugenol に関して、DNAJB4 および GCLM の無毒性用量域（細胞生存率 90%以上）での相対発現量は、ATF3 および IL-8 に比べ大きい値を示した。以上のことから、IL-8 を含む 4 遺伝子は、pre/pro-hapten 暴露により、RhE モデルで発現亢進すること、ならびに DNAJB4 および GCLM では他の 2 遺伝子に比べ、無毒性領域で強い発現亢進を示すことが見出された。

### 2-3-3-3. 72 物質を暴露した際の各遺伝子の相対発現量

続いて、材料および方法の 2-3-2-3 に示した工程に基づき、計 72 物質を評価した。Table 2-3-2 に今回評価した 72 物質の、最大相対発現亢進量 ( $I_{max}$ )、各遺伝子において陽性判定基準値を超える濃度 (EC 値)、および試験での最終判定 (Positive: P もしくは Negative :N) を示した。また、参考として、本評価法が反映する AOP の一部をカバーする 2 試験; タンパク質結合を指標とした試験法である Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)、および単層角化細胞株 HaCaT の活性化を指標とした試験法である KeratinoSens™ の結果 (P : 陽性 or N : 陰性) も示した。各遺伝子の  $I_{max}$  は、ATF3 で 0.3 倍 (sulfanilamide) から 705 倍 (pentachlorophenol)、DNAJB4 で 0.8 倍 (glycerol) から 203 倍 (damascone)、GCLM で 0.7 倍 (glycerol) から 49.5 倍 (damascone) および IL-8 で 0.8 倍 (LA) から 147 倍 (farnesol) となり、評価物質および遺伝子によって異なる結果を示した。ATF3 に関して、感作性物質 54 品中 48 品 (89%) で  $I_{max}$  が 4 倍を超えた一方、非感作性物質 18 品中 9 品 (50%) でも 4 倍を超えた。非感作性物質の中には、glycerol ( $I_{max}=12.3$ ) や propylene glycol ( $I_{max}=13.7$ ) など非刺激性の非感作性物質が含まれていた。一方、DNAJB4 に関しては、感作性物質 54 品中 38 品 (70%) で  $I_{max}$  が 2 倍を超えた一方、非感作性物質で 2 倍を超えたのは OA のみであった。また、GCLM に関しては、感作性物質 54 品中 26 品 (48%) で  $I_{max}$  が 2 倍を超えた。今回新たに評価した IL-8 で  $I_{max}$  が 4 倍を超えたのは、感作性物質では 54 品中 41 品 (76%) であった一方、非感作性物質では 4 品であった。本 4 品は、活性剤などの刺激性を有する物質 3 品 (benzalkonium chloride (BKC)、methyl salicylate (MS)、sodium lauryl sulfate (SLS)) および OA であり、IL-8 の  $I_{max}$  値はすべて 10 倍未満と比較的小さい値を示した。

異なる RhE モデル間での結果を比較すべく、Labcyte における欧州代替法センター推奨の参照化学物質 16 品の結果 (Table 2-3-2) と、EpiDerm™ での結果 (第 1 節、Table 2-1-3) を比較した。その結果、GCLM の最大相対発現量 ( $I_{max}$ ) に関しては、Labcyte で 1.0-13.8 倍、EpiDerm™ で 1.0-15.2 倍と同等であった。一方、ATF3 および DNAJB4 の  $I_{max}$  に関しては、Labcyte で 1.0-77 倍 (ATF3) および 1.0-14.7 倍 (DNAJB4) であったのに対し、EpiDerm™ では 1.5-165 倍 (ATF3) および 1.2-51 倍 (DNAJB4) と Labcyte に比べ大きい値を示した。このうち ATF3 の非感作性物質による発現亢進に関しては、Labcyte で 1.0-12.3 倍であったのに対し、EpiDerm™ では 1.5-3.9 倍と Labcyte に比べ小さい値を示した。

### 2-3-3-4. EpiSensA の皮膚感作性の有無の予測性能 (Table 2-3-2 および 3)

上記結果を踏まえ、各遺伝子の陽性判定基準値 (カットオフ値) を以下のように決定した。

- 1) 少なくとも 2 倍以上 (Real-time PCR で得られる値の信頼性を考慮)
- 2) 4 遺伝子中、少なくとも 1 遺伝子で陽性判定基準値を超えた場合に感作性ありと判定した場合、最も評価精度 (感度、特異度および一致率) が良くなる。

Table 2-3-3 に、設定した各遺伝子のカットオフ値および設定したカットオフ値での予測性を、難水溶性物質、易水溶性物質、pre/pro-hapten および全 72 物質それぞれについて示した。この際、同じ角化細胞応答に関与する 2 遺伝子の redundancy を把握する目的で、角化細胞応答ごとの予測性 (炎症反応もしくは細胞防御) についても検証した。その結果、炎症反応に関わる 2 遺伝子 (ATF3 および IL-8) に関して、カットオフ値を ATF3 で  $I_{\max} \geq 15$  倍、IL-8 で  $I_{\max} \geq 4$  倍とし、1 遺伝子でも陽性の場合に感作性ありと判定した結果、全 72 物質での感度、特異度、一致率はそれぞれ 82%、78% および 81% となり、感度および一致率は 1 遺伝子のみの場合に比べ上昇した (Table 2-3-3)。細胞防御に関わる 2 遺伝子 (DNAJB4 および GCLM) に関して、DNAJB4 および GCLM で共に  $I_{\max} \geq 2$  倍を陽性判定基準値として解析を行った結果、感度、特異度および一致率はそれぞれ 72%、94% および 78% となり、1 遺伝子のみの場合に比べ感度および一致率は上昇した (Table 2-3-3)。難水溶性物質に対する予測性は、炎症反応に関する 2 遺伝子 (ATF3 および IL-8) の組み合わせで 86% と比較的高かった一方、pre/pro-hapten に関する予測性 (感度) は炎症反応に関する 2 遺伝子 (DNAJB4 および GCLM) の組み合わせで 91% と高い値を示した。最後に、炎症反応もしくは細胞防御に関連する 4 遺伝子中 1 遺伝子でも陽性となった場合、感作性ありと判定した結果 (本試験における“最終判定”)、感度、特異度、一致率はそれぞれ 94%、78% および 90% となり、感度および一致率は 90% 以上と極めて良好な値を示した。

#### 2-3-3-5. 他の代替法 (DPRA, KeratinoSens) との比較 (Table 2-3-2 および 4)

続いて、EpiSensA の有用性を相対的に把握すべく、2015 年に OECD テストガイドラインとして承認された 2 つの代替法 (DPRA あるいは KeratinoSens<sup>TM</sup>) と予測性を比較した。Table 2-3-2 に示した EpiSensA の最終判定、および DPRA あるいは KeratinoSens<sup>TM</sup> の最終判定 (P or N) をもとに予測性を比較した結果、EpiSensA の感度および一致率は、難水溶性、易水溶性、pre/pro-hapten および 72 物質すべてにおいて、2 試験を上回る値を示した。特に難水溶性物質での感度は、DPRA および KeratinoSens でそれぞれ 44% および 67% と低い一方、EpiSensA では 93% であった。

#### 2-3-3-6. EpiSensA の皮膚感作性強度予測能の検証 (Fig. 2-3-3、Table 2-3-2 および 5)

最後に EpiSensA の感作性強度に対する予測能を検証すべく、Table 2-3-1 に示した各遺伝子の EC 値 (ATF3 EC15、DNAJB4 EC2、GCLM EC2 および IL-8 EC4) と、ヒトにおける感作性強度との相関性が確認されている LLNA EC3 値を比較した。各物質での EC 値の対数を取り、LLNA EC3 との相関性を確認した結果、GCLM EC2 で最も良い相関性 ( $R=0.74$ 、26 物質) を示した (Fig. 2-3-4)。また、26 物質のうち、LLNA で Extreme (極めて強い) あるいは Strong (強い) に分類される感作性物質 6 品すべてにおいて、GCLM EC2 は 0.06 以下であった一方、LLNA で Moderate (中等度) および Weak (弱い) に分類される残り 20 品中に関しては、2 品のみであった (Table 2-3-2 および

Fig.2-3-4)。また、ATF3 EC15 および IL-8 EC4 の LLNA EC3 に関する相関性は、それぞれ  $R=0.59$  (41 物質) および  $R=0.50$  (35 物質) と、中等度の相関性であった。LLNA Extreme の 4 物質について、IL-8 EC4 および ATF3 EC15 は、それぞれ  $0.006\sim 0.0035\%$  および  $0.026\sim 0.05\%$  となり、LLNA Strong ~Weak の物質に比べ低い値を示した (Table 2-3-2 および Fig.2-3-4)。一方、DNAJB4 EC2 に関しては、LLNA EC3 との相関性は  $R=0.37$  (38 物質) と弱い相関性であった。しかしながら、DNAJB4 のみで陽性と判定され、かつヒト感作性試験の結果から感作性が極めて弱いと想定される hexyl salicylate および citronellol の 2 物質 (Basketter et al., 2014) を除いた場合、 $R$  値は  $0.44$  (36 物質) となり ATF3 や IL-8 と同等となった。上記結果から、各遺伝子の EC 値が下記 3 つのいずれかを満たした場合に該物質を Extreme もしくは Strong に、満たさなかった場合には Moderate もしくは Weak とする、という判定モデルを構築した。

- 1)  $GCLM\ EC2 \leq 0.06\%$
- 2)  $IL-8\ EC4 \leq 0.01\%$
- 3)  $ATF3\ EC15 \leq 0.04\%$

LLNA における強度カテゴリーを 3 分類 (1. Extreme もしくは Strong、2. Moderate もしくは Weak、3. 非感作性) した際の、EpiSensA の強度予測の結果を Table 2-3-5 に示した。LLNA で Extreme もしくは Strong に分類される 12 品中 8 品が EpiSensA で“Extreme もしくは Strong”と判定された。また、LLNA で Moderate もしくは Weak に分類される 42 物質のうち、37 品が EpiSensA で正しく強度分類された。以上の結果から、EpiSensA の LLNA 強度カテゴリー予測性は 82% となった。以上の結果から、各遺伝子の EC 値を指標に、LLNA における 3 段階の強度分類を予測できる可能性が見出された。

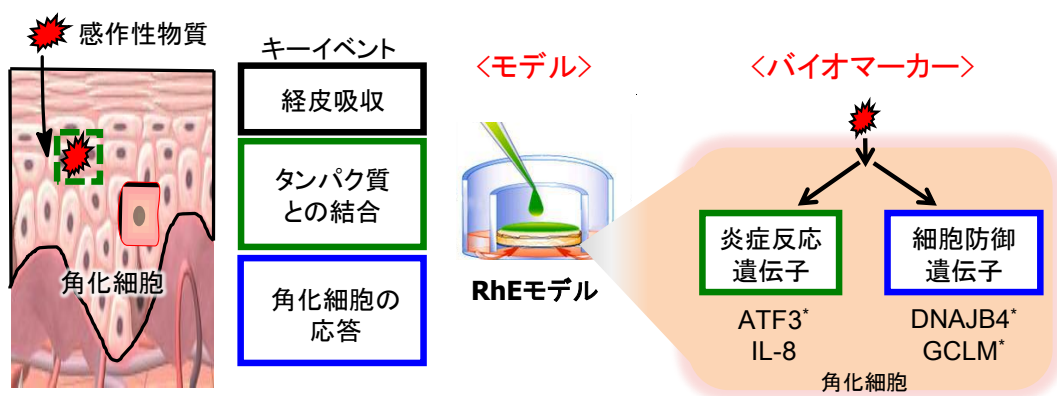


Fig. 2-3-1

### 新規試験法: Epidermal Sensitization assay (EpiSensA) の概要

EpiSensAでは、感作誘導時に起こる3つのキーイベント(経皮吸収、タンパク質との結合、角化細胞の応答)を反映可能な再構築ヒト表皮モデル(RhEモデル)を用いる。また、皮膚感作特異的なバイオマーカーとして、感作初期に誘導される2つの角化細胞応答(炎症反応および細胞防御)と関連した、4つの遺伝子(ATF3、IL-8、DNAJB4およびGCLM)を用いる。なお、図中\*で示したATF3、DNAJB4およびGCLMは、本研究で新たに見出したマーカー遺伝子である。

Table 2-3-1 新規試験法 EpiSensA で評価した 72 物質

被験物質名称	Cas番号	LLNAEC3 (%)	LLNA強度分類	LogKov**
Oxazolone*	15646-46-5	0.003		1.51
Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2	0.04		<b>5.87</b>
4-Nitrobenzylbromide*	100-11-8	0.05	Extreme	2.70
2,4-Dinitrochlorobenzene*	97-00-7	0.05		2.27
1,4-Dihydroquinone†	123-31-9	0.11		1.03
p-Phenylenediamine**†	106-50-3	0.16		-0.39
Hexyl salicylate	6259-76-3	0.18		<b>5.06</b>
Benzoyl peroxide	94-36-0	0.22		3.43
Lauryl gallate†	1166-52-5	0.3	Strong	<b>6.21</b>
Cobalt chloride	7646-79-9	0.6		0.85
4-(Methylamino)phenol sulfate†	55-55-0	0.78		2.34
Methyldibromoglutaronitrile*	35691-65-7	0.9		1.63
Isoeugenol*†	97-54-1	1.2		2.65
Glyoxal*	107-22-2	1.4		-1.66
Bisphenol A-diglycidyl ether	1675-54-3	1.5		<b>3.84</b>
2-Mercaptobenzothiazole*	149-30-4	1.7		2.86
Ethylene diamine†	107-15-3	2.2		-1.62
Benzyl salicylate	118-58-1	2.9		<b>4.31</b>
Cinnamic aldehyde*	104-55-2	3		1.82
3-Propylenephthalide	17369-59-4	3.7		2.03
Farnesol†	4602-84-0	4.1		<b>5.77</b>
Squaric acid	2892-51-5	4.3	Moderate	-0.44
Clotrimazole	23593-75-1	4.8		<b>6.26</b>
Tetramethylthiuram disulfide*	137-26-8	5.2		1.70
Resorcinol†	108-46-3	5.5		1.03
Diethylenetriamine†	111-40-0	5.8		-2.13
Damascone	23726-91-2	6.7		<b>4.42</b>
Undec-10-enal	112-45-8	6.8		<b>4.12</b>
12-Bromo-1-dodecanone	3344-77-2	6.9		<b>5.11</b>
Tocopherol	10191-41-0	7.4		<b>12.2</b>
1-Bromohexane	111-25-1	10		<b>3.63</b>
Ethylhexylacrylate	103-11-7	10		<b>4.09</b>
Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	11		<b>4.82</b>
Citral	5392-40-5	13		3.45
Eugenol*†	97-53-0	13		2.73
Abietic acid	514-10-3	15		<b>6.46</b>
Benzyl benzoate	120-51-4	17		<b>3.54</b>
Benzyl cinnamate	103-41-3	18		<b>4.06</b>
Lilial	80-54-6	19		<b>4.36</b>
Dibutyl aniline	613-29-6	20		<b>5.12</b>
Pentachlorophenol	87-86-5	20		<b>4.74</b>
Phenyl benzoate	93-99-2	20		3.04
Cinnamic alcohol*	104-54-1	21	Weak	1.84
Cyclamen aldehyde	103-95-7	22		<b>3.91</b>
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	24		-8.28
Undecylenic acid	112-38-9	25		<b>4.37</b>
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	28		2.21
Penicillin G	61-33-6	30		1.85
Butyl glycidyl ether	2426-08-6	31		1.08
Citronellole	106-22-9	43.5		<b>3.56</b>
Isopropyl myristate	110-27-0	44		<b>7.17</b>
Bis-GMA	1565-94-2	45		<b>4.94</b>
Tridecane	629-50-5	48.4		<b>6.73</b>
Limonene	5989-27-5	69		<b>4.83</b>
1-Butanol	71-36-3	-		0.84
4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	-		1.39
Acetanisol	100-06-1	-		1.75
Benzalkonium chloride	8001-54-5	-		2.93
Benzylbutylphthalate	85-68-7	-		<b>4.84</b>
Dibutyl phthalate	84-74-2	-		<b>4.61</b>
Glycerol*	56-81-5	-		-1.65
Hexadecyltrimethylammonium bromide	57-09-0	-		3.18
Hexane	110-54-3	-		3.29
Isopropanol	67-63-0	-	Non sensitizer	0.28
Lactic acid*	50-21-5	-		-0.65
Methyl salicylate	119-36-8	-		2.60
Octanoic acid	124-07-2	-		3.03
Propylene glycol	57-55-6	-		-0.78
Salicylic acid*	69-72-7	-		2.24
Sodium lauryl sulfate*	151-21-3	-		1.69
Sulfanilamide	63-74-1	-		-0.55
Vanillin	121-33-5	-		1.05

\*欧州代替法センター参照化学物質、†pre/pro-hapten、\*\*KOWWIN ver.1.68 in EPI suite™での計算値。3.5 以上の場合太字。

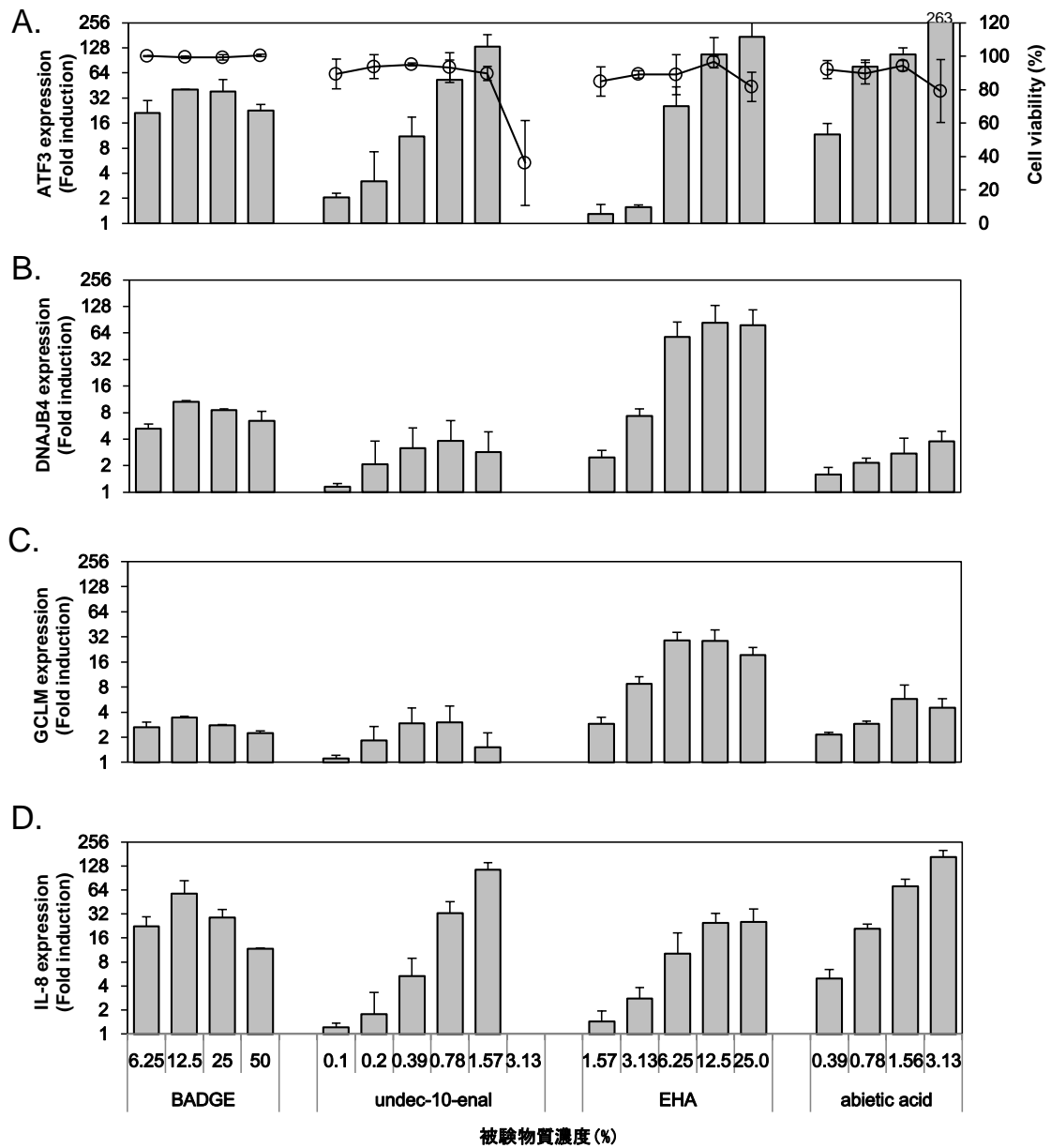


Fig. 2-3-2

### 難水溶性物質暴露時のマーカー遺伝子の発現量変化

RhEモデルであるLabcyte EPI-MODELに対し、各物質を所定濃度で6時間暴露した(N=3)。その後、Real-time PCRにより、ATF3(A)、DNAJB4(B)、GCLM(C)およびIL-8(D)の発現量を定量した(棒グラフ)。また、LDHを指標に細胞生存率を測定した(白抜き丸)。各遺伝子の発現量は溶媒対照群に対する相対発現量(Fold induction)の平均値±SDで示してある。

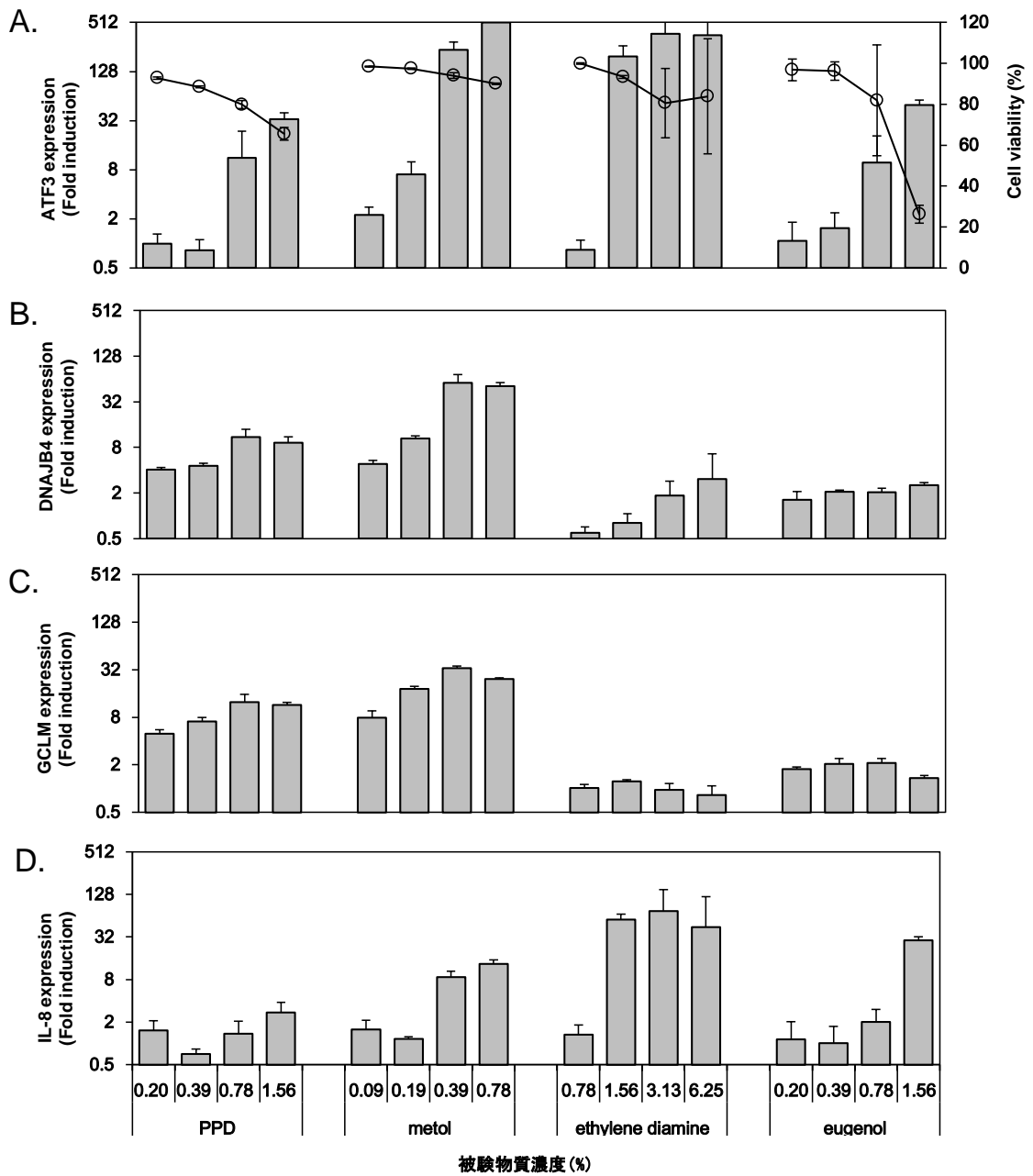


Fig. 2-3-3

Pre/pro-hapten暴露時のマーカー遺伝子の発現量変化

RhEモデルであるLabcyte EPI-MODELに対し、各物質を所定濃度で6時間暴露した(N=3)。その後、Real-time PCRにより、ATF3(A)、DNAJB4(B)、GCLM(C)およびIL-8(D)の発現量を定量した(棒グラフ)。また、LDHを指標に細胞生存率を測定した(白抜き丸)。各遺伝子の発現量は溶媒対照群に対する相対発現量(Fold induction)の平均値±SDで示してある。

Table 2-3-2 72 物質の EpiSensA による評価結果のまとめ

被験物質名称	LLNA EC3 (%)	Log Kow <sup>a</sup>	Vehicles	I <sub>max</sub> <sup>b</sup>				EC values (%)				EpiSensA prediction <sup>c</sup>	<i>in vitro</i> tests <sup>d</sup>			
				ATF3	DNAJB4	GCLM	IL-8	ATF3 EC15	DNAJB4 EC2	GCLM EC2	IL-8 EC4		DPRA <sup>1</sup>	KeratinoSens <sup>2</sup>		
Oxazolone*	0.003	1.51	AOO	7.4	1.2	1.4	4.9					0.006	P	P	P	
Tetrachlorosalicylanilide	0.04	5.87	AOO	397.3	3.2	0.7	28.2	0.027	0.24			0.035	P	P	P	
4-Nitrobenzylbromide*	0.05	2.70	AOO	64.6	14.7	15.2	6.9	0.050	0.017	0.011		0.034	P	P	P	
2,4-Dinitrochlorobenzene*	0.05	2.27	AOO	43.8	4.9	8.7	7.0	0.026	0.016	0.012		0.002	P	P	P	
1,4-Dihydroquinone†	0.11	1.03	50%EtOH	0.5	2.1	8.2	1.0		0.06	0.01			P	P	P	
p-Phenylenediamine*†	0.16	-0.39	AOO	2.5	4.5	7.1	3.5		0.035	0.046			P	P	P	
Hexyl salicylate	0.18	5.06	AOO	5.8	2.3	1.7	1.8		1.24				P	N	N <sup>3</sup>	
Benzoyl peroxide	0.22	3.43	AOO	6.6	1.1	1.4	4.2					4.72	P	P	N	
Lauryl gallate†	0.3	6.21	AOO	4.7	4.4	1.2	11.9		0.50				0.88	P	P	P
Cobalt chloride	0.6	0.85	dH2O	131.0	2.5	1.7	10.3	6.40	10.66				7.49	P	P	P <sup>3</sup>
4-(Methylamino)phenol sulfate†	0.78	2.34	50%EtOH	510.6	57.0	33.8	13.2	0.20	0.06	0.059			0.27	P	P <sup>2</sup>	P
Methyl dibromoglutaronitrile*	0.9	1.63	AOO	53.9	7.0	11.5	7.1	0.18	0.12	0.04			0.20	P	P	P
Isoeugenol*†	1.2	2.65	AOO	6.3	4.0	6.3	2.3		0.21	0.09				P	P	P
Glyoxal*	1.4	-1.66	dH2O	34.6	2.4	8.0	8.3	0.51	2.06	0.101			1.49	P	P	P
Bisphenol A-diglycidyl ether	1.5	3.84	AOO	40.4	10.6	3.5	58.0	2.39	0.37	0.48			0.66	P	P	P
2-Mercaptobenothiazole*	1.7	2.86	AOO	6.1	3.0	1.5	16.2		0.043				0.15	P	P	P
Ethylene diamine†	2.2	-1.62	dH2O	370.5	3.1	1.0	74.8	0.84	3.53				0.82	P	N	P
Benzyl salicylate	2.9	4.31	AOO	19.3	1.0	1.4	88.0	42.10					15.01	P	N	P <sup>3</sup>
Cinnamic aldehyde*	3	1.82	AOO	77.0	10.3	8.6	6.8	0.12	0.104	0.039			0.13	P	P	P
3-Propylenephthalide	3.7	2.03	AOO	33.4	2.3	1.8	4.1	0.99	0.98				1.50	P	N	N
Farnesol†	4.1	5.77	AOO	129.2	2.2	0.8	147.1	0.74	1.42				0.44	P	N <sup>3</sup>	P <sup>3</sup>
Squaric acid	4.3	-0.44	50%EtOH	5.7	1.8	1.95	1.7							N	P <sup>2</sup>	N
Clotrimazole	4.8	6.26	AOO	101.1	17.7	1.8	10.7	0.61	0.46				1.88	P	P <sup>3</sup>	N <sup>4</sup>
Tetramethylthiuram disulfide*	5.2	1.70	AOO	31.9	3.1	5.8	5.0	0.18	0.23	0.07			0.64	P	P	P
Resorcinol†	5.5	1.03	AOO	26.1	2.1	1.8	7.7	2.33	3.02				2.23	P	N <sup>2</sup>	N
Diethylenetriamine†	5.8	-2.13	dH2O	92.7	1.4	1.5	2.4	3.41						P	N <sup>2</sup>	N <sup>3</sup>
Damascone	6.7	4.42	AOO	205.7	202.7	49.5	19.9	0.34	0.16	0.030			0.24	P	N.D.	P <sup>3</sup>
Undec-10-enal	6.8	4.12	AOO	133.2	3.8	3.0	115.7	0.43	0.19	0.23			0.32	P	N	P <sup>3</sup>
12-Bromo-1-dodecanone	6.9	5.11	AOO	84.8	5.5	3.5	10.8	6.18	2.07	2.37			4.64	P	P	N.D.
Tocopherol	7.4	12.2	AOO	1.3	0.7	0.9	1.3							N	N	N.D.
1-Bromohexane	10	3.63	AOO	22.4	3.0	6.4	3.9	7.93	7.08	3.33				P	N	P
Ethylhexylacrylate	10	4.09	AOO	174.4	83.9	28.9	25.3	4.87	1.24	1.01			3.64	P	P	P
Hexyl cinnamic aldehyde	11	4.82	AOO	20.1	1.9	1.5	9.6	71.08	6.35				17.17	P	N	P
Citral	13	3.45	AOO	3.5	3.3	8.2	3.9		0.12	0.097				P	P	P
Eugenol*†	13	2.73	AOO	9.8	2.1	2.1	2.0		0.36	0.35				P	P	N
Abietic acid	15	6.46	AOO	106.4	2.8	5.8	71.2	0.41	0.68	0.35			0.34	P	P	P
Benzyl benzoate	17	3.54	AOO	25.2	1.3	1.4	32.0	19.60					14.12	P	N	P
Benzyl cinnamate	18	4.06	AOO	8.8	1.2	1.7	29.2						6.86	P	N	P <sup>3</sup>
Lillial	19	4.36	AOO	5.6	1.3	0.9	19.6						0.88	P	N	N
Dibutyl aniline	20	5.12	AOO	111.3	1.4	1.96	105.6	53.45					23.59	P	N	N <sup>3</sup>
Pentachlorophenol	20	4.74	AOO	704.8	5.0	0.8	77.0	0.048	0.11				0.02	P	P <sup>2</sup>	N
Phenyl benzoate	20	3.04	AOO	25.8	4.0	2.2	6.0	5.16	1.48	2.56			5.34	P	P	N <sup>3</sup>
Cinnamic alcohol*†	21	1.84	AOO	7.9	1.7	9.7	4.5			0.22			0.35	P	N	P
Cyclamen aldehyde	22	3.91	AOO	22.4	2.6	1.9	6.4	0.61	0.18				0.51	P	P	P
Imidazolidinyl urea	24	-8.28	dH2O	37.0	1.7	1.1	12.9	8.06					7.04	P	P	P
Undecylenic acid	25	4.37	AOO	122.2	2.9	2.7	30.7	0.20	0.27	0.27			0.20	P	N <sup>3</sup>	P <sup>3</sup>
Ethylenglycol dimethacrylate	28	2.21	AOO	42.6	10.4	16.9	2.0	2.05	0.11	0.19				P	P	P
Penicillin G	30	1.85	dH2O	91.1	1.7	1.1	7.6	8.20					12.18	P	P <sup>2</sup>	N
Butyl glycidyl ether	31	1.08	AOO	504.8	63.6	18.0	21.5	0.39	0.35	0.20			0.42	P	P	P
Citronellole	43.5	3.56	AOO	5.8	2.5	1.95	2.3		0.19					P	N	N <sup>3</sup>
Isopropyl myristate	44	7.17	AOO	1.7	1.9	1.8	1.1							N	N	N
Bis-GMA	45	4.94	AOO	7.4	4.3	3.8	7.2		3.54	3.40			4.35	P	P	P <sup>3</sup>
Tridecane	48.4	6.73	AOO	3.6	1.3	1.7	4.4						87.44	P	N.D.	N.D.
Limonene	69	4.83	AOO	98.7	2.4	2.8	12.0	1.20	1.51	0.92			1.75	P	P <sup>3</sup>	N <sup>3</sup>
1-Butanol	-	0.84	AOO	2.3	1.0	1.1	0.9							N	N	N
4-Hydroxybenzoic acid	-	1.39	AOO	6.5	1.5	1.3	2.6							N	N	N
Acetanisol	-	1.75	AOO	3.4	1.0	1.7	1.4							N	N	P
Benzalkonium chloride	-	2.93	AOO	1.8	1.2	1.0	6.2					0.10		P	N	N
Benzylbutylphthalate	-	4.84	AOO	1.0	1.3	1.2	1.3							N	N	P <sup>3</sup>
Dibutyl phthalate	-	4.61	AOO	3.5	1.98	1.2	2.6							N	N	P <sup>3</sup>
Glycerol*	-	-1.65	dH2O	12.3	0.8	0.7	3.1							N	N	N
Hexadecyltrimethylammonium bromide	-	3.18	50%EtOH	1.7	1.1	1.0	3.1							N	N <sup>3</sup>	N.D.
Hexane	-	3.29	AOO	9.9	1.1	1.9	1.9							N	N <sup>2</sup>	N
Isopropanol	-	0.28	AOO	4.3	1.0	1.1	1.6							N	N	N
Lactic acid*	-	-0.65	dH2O	1.0	1.0	1.1	0.8							N	N	N
Methyl salicylate	-	2.60	AOO	3.6	1.3	1.6	6.0						0.72	P	N	N
Octanoic acid	-	3.03	AOO	38.1	3.5	1.1	5.9	0.50	0.52				0.63	P	N	N
Propylene glycol	-	-0.78	dH2O	13.7	1.8	0.9	0.9							N	N	N
Salicylic acid*	-	2.24	AOO	11.0	1.9	1.6	2.1							N	P <sup>2</sup>	N
Sodium lauryl sulfate*	-	1.69	dH2O	5.2	1.1	0.9	8.6						0.37	P	P	N
Sulfanilamide	-	-0.55	50%EtOH	0.3	1.1	0.9	0.8							N	N	N
Vanillin	-	1.05	AOO	4.4	1.1	1.4	1.6							N	P	N

\*欧州代替法センター参照化学物質 † pre/pro-hapten <sup>a</sup> KOWWIN ver.1.68 in EPI suite<sup>TM</sup> での計算値。3.5 以上の場合、太字

<sup>b</sup> 陽性判定基準値 (ATF3:15 倍、DNAJB4 : 2 倍、GCLM:2 倍、IL-8 : 4 倍) 以上の場合、太字 <sup>c</sup> および <sup>d</sup> P : 陽性、N : 陰性

<sup>d</sup> 1. Natsch et al., 2013、2. Takenouchi et al., 2015、3. Urbisch et al., 2015、4. Jaworska et al., 2015。“N.D.” は“No Data”



Table 2-3-3

## 各マーカー遺伝子の組み合わせおよびEpiSensAの予測精度

	ATF3	IL-8	炎症反応遺伝子群	DNAJB4	GCLM	細胞防御遺伝子群	EpiSensA
陽性判定基準	15倍以上	4倍以上	ATF3もしくはIL-8で陽性	2倍以上	2倍以上	DNAJB4もしくはGCLMで陽性	炎症反応、細胞防御遺伝子群の少なくとも1つで陽性
A. 難水溶性物質 (29品)							
感度 (%)	67	81	85	67	37	67	93
特異度 (%)	100	100	100	100	100	100	100
一致率 (%)	69	83	86	69	41	69	93
B. 易水溶性物質 (43品)							
感度 (%)	63	70	74	74	59	78	96
特異度 (%)	94	75	75	94	100	94	75
一致率 (%)	74	72	74	81	74	84	88
C. pre/pro-haptens (11品)							
感度 (%)	45	55	64	82	55	91	100
特異度 (%)	-	-	-	-	-	-	-
一致率 (%)	45	55	64	82	55	91	100
D. 全72物質							
感度 (%)	65	76	81	70	48	72	94
特異度 (%)	94	78	78	94	100	94	78
一致率 (%)	72	76	81	76	61	78	90

Table 2-3-4  
 類似のエンドポイントを有する他の代替法との比較

反映している感作性の キーイベント	EpiSensA 経皮吸収 タンパク質との結合 角化細胞の応答	DPRA タンパク質との結合	KeratinoSens™ 角化細胞の応答
<b>A. 難水溶性物質</b>			
物質数	29	27	26
感度 (%)	93	44	67
特異度 (%)	100	100	0
一致率 (%)	93	48	62
<b>B. 易水溶性物質</b>			
物質数	43	43	42
感度 (%)	96	81	70
特異度 (%)	75	81	93
一致率 (%)	88	81	79
<b>C. pre/pro-haptens</b>			
物質数	11	11	11
感度 (%)	100	55	73
特異度 (%)	-	-	-
一致率 (%)	100	55	73
<b>D. 全物質</b>			
物質数	72	70	68
感度 (%)	94	63	69
特異度 (%)	78	83	82
一致率 (%)	90	69	72

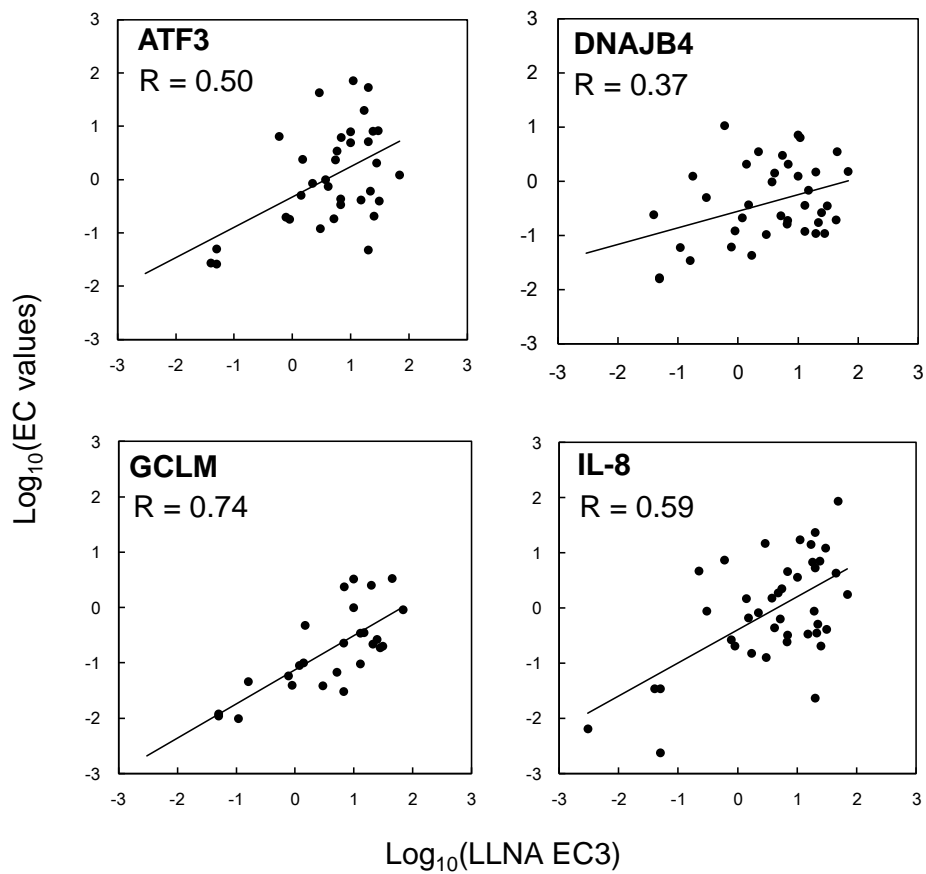


Fig. 2-3-4

### 各マーカー遺伝子のEC値とLLNA EC3との関係性

EpiSensAで評価した感作性物質のうち、陽性と判定された物質について解析した。  
Rは相関係数を示している。

Table 2-3-5

## EpiSensAのEC値によるLLNA強度分類の予測性

		LLNA		
		Extreme or Strong	Moderate or Weak	Non sensitizer
<b>EpiSensA</b>	Extreme or Strong	<b>8</b>	2	0
	Moderate or Weak	4	<b>37</b>	4
	Non sensitizer	0	3	<b>14</b>
LLNAの強度分類との一致率			82%	

※太字で示した数字は、LLNAの強度分類をEpiSensAで正しく予測できた物質数

## 考察

第2章では、RhEモデルを用いた新規皮膚感作性試験法を開発すべく、新規マーカー遺伝子の探索および皮膚感作誘導との関連性検証、ならびにマーカー遺伝子の皮膚感作性予測性能の把握を行った。その結果、新規マーカーとして、炎症反応に関わるATF3、細胞防御に関わるDNAJB4およびGCLMが見出された。さらに上記3遺伝子に、感作マーカーとしての有用性が近年示唆されたIL-8を加えた4遺伝子を組み合わせることで、RhEモデルを用いて、難水溶性物質およびpre/pro-haptenを含む、幅広い物質の感作性を精度よく評価できる可能性が見いだされた。以下、得られた結果に関して考察を加える。

### 1. 感作性物質が発現亢進する遺伝子の網羅的解析

RhEモデルに対し、代表的感作性物質であるDNFBおよびOXA、非感作性物質BKCを暴露した際の遺伝子発現の網羅的解析から、142遺伝子が感作性物質特異的に発現亢進した (Fig. 2-1-1)。また、これら遺伝子に関する機能解析の結果、抗アポトーシス (e.g., positive regulation of anti-apoptosis, negative regulation of apoptosis) および細胞ストレス応答 (response to unfolded protein response) との関連が強く示唆された (Table 2-1-1)。一般的にタンパク質のフォールディングは小胞体で行われるが、細胞が熱ショック等のストレスにさらされると、小胞体におけるタンパク質のフォールディングが障害され、結果として変性タンパク質が蓄積し、アポトーシスが誘導されることが知られている (Szegezdi et al., 2006; Ma et al., 2004)。感作性物質はタンパク質と結合し、構造変化したタンパク質複合体が抗原性を獲得することから、本検討で認められた細胞ストレス応答は、感作性物質によるタンパク質のフォールディング阻害の結果と想定される。実際、タンパク質の構造修復への関与が示唆されるDNAJB4、HSPA6、HSPH1などの遺伝子が本検討では強く発現亢進している (Table 2-1-2)。また本検討以外にも、ヒト単球由来細胞において、感作性物質diphenylcyclopropeneにより、小胞体ストレスが誘導されることが報告されている (Hirota et al., 2010)。つまり、感作性物質に暴露された細胞では、ストレス応答が誘導されることで、感作性物質に対する防御機構が働く想定される。

### 2. 各遺伝子の皮膚感作性との関連性

網羅的発現解析から、ATF3、DNAJB4、GCLM、HSPA6 および HSPH1 が、定常状態での発現量および発現変動量の観点から、有望な感作マーカー候補として見いだされた。

ATF3に関しては、ATF/cyclic AMP response element binding protein familyに属する転写因子であり、免疫応答、アポトーシスおよび発がんへの関与が報告されている (Thompson et al., 2009)。ATF3と皮膚炎症との関連については、多形紅斑や乾癬の患者での発現亢進 (Pollack et al., 2010) が報告されているが、皮膚感作性との直接的な関連を示す報告はない。一方、我々は本章2節の検討から、本遺伝子の感作性物質による発現亢進に、感作誘導に関与する受容体であるP2X<sub>7</sub>が関与することを初めて明らかとした (Fig. 2-2-2)。この結果は、ATF3が感作誘導に関与する転写因子である可能性を示唆する。実際、ATF3のノックアウトマウスでは、細菌感染したマクロファージにおける炎症性

サイトカインTNF- $\alpha$ の産生に異常をきたすことが報告されている (Nguyen et al., 2014)。TNF- $\alpha$ は感作誘導との関与が示唆されている (Kaplan et al, 2012) ことを考慮すると、ATF3は炎症性サイトカインの産生を制御することで、感作誘導に関与する遺伝子である可能性が考えられた。

DNAJB4は、DNAJ/Hsp40 (heat shock protein 40) superfamilyに属し、分子シャペロンとして働くことが知らされている (Qiu et al., 2006)。本分子と皮膚感作性との関連性を示す直接的な報告はない一方、本章2-2節の結果から、角化細胞における感作性物質によるDNAJB4の発現亢進は、感作誘導時の細胞防御に関与する転写因子Nrf2を介することが明らかとなった (Fig. 2-2-1)。これまでに、DNAJタンパク質の発現にNrf2が関与する可能性がマウスを用いた検討で報告されているが、皮膚感作性とDNAJB4との関与を示した知見は本研究が初めてとなる。Nrf2経路は角化細胞において、多くの皮膚感作性物質で活性化されることが報告されている (Emter et al., 2010) ことから、DNAJB4は皮膚感作誘導時にNrf2を介して発現亢進し、感作性物質によるタンパク質の構造変化を正常に戻すことで、皮膚感作抑制に関与する遺伝子であると想定される。

一方GCLMは、グルタチオン合成に関わる酵素である glutamate cysteine ligaseの構成要素である (Franklin et al., 2009)。グルタチオンはROSのスカベンジャーとして、細胞を酸化ストレスから防御する分子であること、および皮膚感作性物質により細胞内でROS産生が起こること (本論文第1章を参照) を考慮すると、GCLMは感作性物質によりNrf2を介して発現亢進し、感作性物質により崩れた細胞内のレドックスバランスを正常に保つことで、皮膚感作性を抑制する方向に働くと考えられる。

HSPA6およびHSPH1に関しても、分子シャペロンとして機能することが知られているが、皮膚感作性との直接的な関与を示す知見はない。一方、同じHSPファミリーに属するHSP27 (HSPB) タンパク質に関しては、パターン認識受容体のToll like receptor 4を介して、DNFBにより誘導される皮膚感作性を増強することが報告されている (Yusuf et al., 2009)。また、HSPAはヒトの樹状細胞において、TNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ の産生を増強することが報告されている (Asea et al., 2002)。以上のことから、HSPA6およびHSPH1に関しては、感作誘導の初期に誘導され、感作性を亢進する遺伝子である可能性が考えられる。

### 3. 代表的感作/非感作性物質 16 品を用いた、5 遺伝子の皮膚感作性予測能

欧州代替法センターの推奨する参照化学物質を用いて、RhE モデル (EpiDerm<sup>TM</sup>) における ATF3、DNAJB4、GCLM、HSPA6 および HSPH1 の皮膚感作性予測能を確認し、候補遺伝子の選別を行った。その結果、ATF3 はカットオフ値を 4 倍に設定することで、16 物質の皮膚感作性の有無を 100% 正確に予測できた (Table 2-1-3)。また、DNAJB4 および GCLM の予測性も、それぞれ 93.8% および 87.5% と良好であった一方、HSPA6 および HSPH1 では 81.3% および 68.8% と比較的低い値を示した。HSPA6 に関しては、LA や SLS など刺激性の非感作性物質でも強い発現亢進が認められ、HSPH1 に関しても LA や SLS 暴露時に、感作性物質暴露時と同等以上の発現亢進が認められた。本発現上昇の詳細な機構は不明であるが、これまでに、nonanoic acid や SLS といった刺激性物質を暴露されたヒト皮膚において、HSP ファミリーに属する HSP27 の発現が亢進することが報告されている

(Boxman et al., 2002)。また、RhE モデルにおける HSPA1 の発現が SLS 暴露により上昇することも報告されている (Niwa et al., 2009)。すなわち、HSPH1 や HSPA6 に関しても、感作誘導のみならず、皮膚炎症などで非特異的に誘導される遺伝子である可能性が示唆される。

#### 4. IL-8

本研究では感作マーカーとして、網羅的解析で新規に見出した ATF3、DNAJB4、GCLM の 3 遺伝子に加え、ケモカインである IL-8 にも着目し、RhE モデルにおいて難水溶性物質を含む多くの感作性物質により発現亢進することを明らかとした (Fig. 2-3-2 および 3、Table 2-3-1)。これまでに単層の角化細胞で IL-8 の感作マーカーとしての有用性を示した報告はあるが、難水溶性物質を含む幅広い物質について、RhE モデルでの IL-8 の有用性を示したのは本研究が初めてとなる。さらに本検討では、IL-8 のみで陽性と判定されている感作性物質が 5 品 (OXA、benzoyl peroxide、benzyl cinnamate、lilial および tridecane) 存在した。したがって、IL-8 を感作マーカーとして用いることは感作性物質の見逃し (偽陰性) をなくす上で有用と考えられる。一方 IL-8 は、刺激性 (非アレルギー性) 接触性皮膚炎のような他の皮膚炎でも誘導されることから (Lee et al., 2013)、感作性物質に対する特異性は低い可能性がある。実際、本研究でも、刺激性物質の BKC、methyl salicylate および SLS がいずれも、4 つのマーカー遺伝子のうち IL-8 のみで陽性 (偽陽性) と判定されている。Coquette らは、刺激性のある SLS や BKC、benzoic acid を RhE モデルに暴露した際に IL-8 が発現亢進するが、その発現レベルは感作性物質 DNCB を暴露した時に比べ弱いことを報告している (Coquette et al., 2003)。本研究でも、刺激性物質の BKC、methyl salicylate および SLS 暴露時の IL-8 の相対発現量の最大値 ( $I_{max}$ ) は、それぞれ 6.2 倍、6 倍および 8.6 倍と感作性物質に比べ小さい傾向を示した。本結果は、ヒトのアレルギー性接触皮膚炎では、刺激性物質による皮膚炎に比べ、IL-8 の量が 2 倍以上多いという報告 (Morhenn et al., 1999) と類似する。なぜ刺激性物質と感作性物質の間で IL-8 の産生量に差があるかについては今後検討が必要であるが、感作性が未知の物質を EpiSensA で評価する際、活性剤のように強い刺激性が疑われ、かつ IL-8 のみで比較的弱い発現上昇 (例. 10 倍未満) が認められた場合には、偽陽性を疑うことで予測精度を高める工夫が必要と考えられる。

#### 5. RhE モデル (EpiDerm™ および Labcyte EPI-MODEL) での比較

ある遺伝子が、感作性マーカーとして有用であることの指標の一つに、“複数の異なる細胞/系”で感作性評価能力を有することが挙げられる。本章ではまず、RhE モデルの一つである EpiDerm™ を用いて、感作性物質特異的に上昇する遺伝子の探索を実施した (本章 2-1 節)。EpiDerm™ は 1990 年代に米 MatTek 社で開発されたヒト表皮様モデルであり、皮膚炎や表皮機能解析等に世界中で広く用いられている。一方、新規試験法 EpiSensA の開発に向け、72 物質の評価に用いた RhE モデルは、日本の J-TEC 社で開発された Labcyte EPI-MODEL である。本モデルについては、EpiDerm™ ほどの使用実績はないものの、2013 年に皮膚刺激性の OECD テストガイドラインで採用されるなど (OECD, 2013)、世界的に認められた汎用性の高い RhE モデルである。本研究の結果から、ATF3、DNAJB4 および GCLM の 3 遺伝子に関しては、両モデル間で発現変動量が異なる場合があるものの、

いずれも感作性物質特異的に発現誘導されることが明らかとなった (Table 2-1-3、2-3-1)。このことは新たに見出した遺伝子が、RhE モデルの種類を問わず、マーカー遺伝子として汎用的に使える可能性を示している。一方、RhE モデル間で角層バリアの機能 (例. ラメラ層、代謝酵素の活性) が異なるという知見 (Kano et al., 2011) が示すように、各物質によるマーカー遺伝子の発現変動も RhE モデル間で異なる場合があるのも事実である (Table 2-1-3、2-3-1)。本事実、感作性物質による炎症性サイトカイン IL-18 の産生量が、RhE モデル (EpiDerm<sup>TM</sup>、epiCS<sup>®</sup>) によって異なるという他の研究グループの報告 (Gibbs et al., 2013) とも類似することから、見出したマーカー遺伝子を異なる RhE モデル間で使用する場合には注意が必要である。皮膚刺激性の OECD テストガイドラインでは、4 つの RhE モデルを使用可能としつつ、検体の適用量や時間などをモデルごとに調整することで高い予測性を担保している (OECD, 2013) ことから、RhE モデル毎にプロトコルを最適化することで、EpiSensA で使用する遺伝子の感作マーカーとしての有用性をさらに強められると考える。

## 6. 予測性と各マーカー遺伝子の redundancy

本章 2 節の結果や既存の知見から、ATF3 および IL-8 は角化細胞の炎症反応に、DNAJB4 および GCLM は角化細胞の細胞防御に関与することが示唆された。同じ角化細胞応答系に属する 2 つの遺伝子は、Fig. 2-3-2、3 および Table 2-3-2 の結果から類似の発現パターンを示す一方、ethylenediamine における DNAJB4 (発現亢進) および GCLM (発現亢進せず) のように異なる場合も存在した (Fig. 2-3-3)。また、Table 2-3-2 の結果から、炎症反応もしくは細胞防御に関連する 2 遺伝子同士の組み合わせ (ATF3 & IL-8、DNAJB4 & GCLM) により、皮膚感作予測性の向上が確認された。この原因として、同じ角化細胞応答系に属する 2 つの遺伝子であっても、部分的には異なる発現制御を受けることが考えられる。Fig. 2-2-1 の結果から、DNAJB4 および GCLM の発現亢進は Nrf2 のノックダウンにより 7 割弱抑制されたものの、完全には抑制されなかった。この結果は、Nrf2 以外の pathway や分子が、両遺伝子の発現に関与する可能性を示唆する。実際、熱ショックタンパク質群に属する DNAJB4 は、ヒトの肝細胞において Heat shock factor 1 (HSF1) による発現制御を受けることが報告されている (Kus-Liśkiewicz et al., 2013) 一方、GCLM については HSF1 による発現制御の報告はない。炎症反応に関与する ATF3 と IL-8 に関しても同様に、外部刺激によるヒト角化細胞での IL-8 の発現亢進に、転写因子の一つである Nuclear factor κB (NF-κB) の関与が報告されている (Kollisch et al, 2003) 一方、ATF3 に関してはそのような知見が存在しない。同じ角化細胞応答系に属する遺伝子間の発現制御機構の違いについては、HSF1 や NF-κB のノックダウン実験などを行うことで今後明らかにしていく必要がある。一方、他の研究グループでも、10 以上の Nrf2 関連遺伝子 (Hemeoxygenase-1 や NADPH dehydrogenase, quinone 1 等) を用いることで、感作性物質の検出能が向上することを報告している (McKim et al., 2010、Cottrez et al., 2016)。したがって、同じ角化細胞応答系に属する複数の遺伝子を用いることで高い予測性 (感度) を実現するというアプローチは妥当と考えられる。また、炎症反応および細胞防御について各 2 遺伝子、計 4 遺伝子という最低限の遺伝子セットで高い感度を実現できていることは、簡便性の観点で、他の試験に対する EpiSensA の advantage の一つと考えられる。



## 7. 他の試験法との比較

Table 2-3-2 および 4 の結果から、本研究で開発した EpiSensA は、先行して開発が進んでいる既存の代替法 (DPRA および KeratinoSens™) に比べ、難水溶性物質、易水溶性物質および代謝が必要な物質 pre/pro-hapten のすべてで高い感度および予測性を示した (Table 2-3-4)。既存の代替法では、培地中で培養した細胞 (KeratinoSens™) ないしは緩衝液中 (水溶液) のモデルペプチド (DPRA) に被験物質を暴露することから、難水溶性物質は油滴や析出を起こし、また一部の物質は加水分解 (例. benzoyl peroxide は、非感受性の benzoic acid に加水分解) を起こすため、正しく評価できない場合がある (Takenouchi et al., 2013、Natsch et al., 2013、Urbisch et al., 2015)。親油性媒体に溶かした被験物質を RhE モデルに直接暴露できる EpiSensA では、Log Kow が比較的高い (i.e. Log Kow  $\geq$  3.5) 物質や、benzoyl peroxide といった加水分解物質を正しく陽性と検出できたことから、試験系の違いによる物質適用性向上が予測性向上につながったと考えられる。また皮膚代謝に関しても、DPRA については試験管内での反応のため十分考慮されておらず、また KeratinoSens™ についても、試験で用いる細胞株 HaCaT での代謝能反映は限定的との報告がある (Fabian et al., 2013)。本研究では、RhE モデルで各 pre/pro-hapten の代謝物が確かに生成されることを確認できていないものの、ヒト表皮と類似の構造・機能 (代謝能等) を有するという知見 (Luu-The et al., 2009、Gotz et al., 2012a, 2012b) を考慮すれば、代謝能の有無が pre/pro-hapten に対する予測性の差につながったと考える。

さらに EpiSensA では、同じく角化細胞応答 (Nrf2 の活性化) を評価指標とする KeratinoSens で偽陰性の 3-propylideneophthalide および phenyl benzoate を正しく陽性と判定できた (Table 2-3-2)。この原因として、EpiSensA が細胞防御と炎症反応の 2 つの評価指標を反映した遺伝子を用いていることが挙げられる。3-propylideneophthalide および penicillin G については、いずれもタンパク質との反応機構がアシル基の転移による物質と考えられ (Aptula et al., 2005、Urbisch et al., 2015)、タンパク質のリジン残基との結合性が高く、Nrf2/keap-1 経路の活性化能が低いとされている (Urbisch et al., 2015)。実際本研究でも、penicillin G は炎症反応に関与する ATF3 および IL-8 のみで陽性と判定できており、3-propylideneophthalide についても ATF3、IL-8 および DNAJB4 で検出できている一方、DNAJB4 の I<sub>max</sub> は 2.3 倍と小さくカットオフ値近傍であった (Table 2-3-2)。すなわち、EpiSensA が高い感度を有する理由として、2 つの異なる角化細胞応答 (炎症反応、細胞防御) に関与する遺伝子マーカーを用いることが考えられる。以上をまとめると、EpiSensA は既存の代替法に対し、試験系 (RhE モデル) および評価指標 (2 つの異なる角化細胞応答を反映したマーカー遺伝子) の点で優位であることが強く示唆された。

## 8. 偽判定物質

72 物質を用いた評価の結果、3 物質 (tocopherol、squaric acid、isopropylmyristate; IM) が EpiSensA で偽陰性となった (Table 2-3-2)。また、4 物質 (BKC、methyl salicylate、octanoic acid ; OA、SLS) が偽陽性となった (Table 2-3-2)。現時点での結果から導かれる本試験の適用範囲を明確化すべく、以下に考察を加える。

偽陰性に関して、tocopherol と IM は、ヒトでの感作性の懸念はほとんどない極めて弱い感作性物質といわれている (Basketter et al., 2014)。その理由として、両物質の Log Kow が 12.2 (tocopherol) および 7.17 (IM) と極めて高く、経皮吸収性が乏しいことが考えられる。したがって、本 2 原料については、LLNA で過剰評価されている可能性が考えられるため、大きな懸念はないと考える。一方 squaric acid は、生理的 pH の水溶液中では dianion として安定的に存在するため、細胞内に透過する可能性が低いと報告されている (Aptula et al., 2005)。本検討において、squaric acid は AOO に溶解せず、50%EtOH 水溶液で試験を実施し、最高溶解濃度の 5% で細胞毒性を生じなかった。同様の知見 (無毒性で偽陰性) は、培養細胞を用いた試験系である h-CLAT や KeratinoSens™ でも確認されている (Urbisch et al., 2015)。したがって squaric acid に関しては、イオン化することで細胞への作用が不十分になることが偽陰性の原因と考えられるため、今後 EpiSensA で水系の媒体中でイオン安定化する物質を評価する場合には注意が必要と考える。

偽陽性の 4 物質に関して、3 物質 (BKC、methyl salicylate および SLS) に関しては、IL-8 の考察で述べたように刺激性に起因する偽陽性の可能性が想定されるため注意が必要である。一方、OA については、ATF3、DNAJB4 および IL-8 でカットオフ値を超える発現亢進を誘導した (Table 2-3-1)。本結果が得られた明確な理由は現状不明であるが、OA を含む中鎖～長鎖脂肪酸により、ラット心筋細胞で ATF3 や DNAJB4 の発現が亢進すること (Lockridge et al., 2008)、およびトリのマクロファージで IL-8 の発現が亢進すること (Sunkara et al., 2012) が報告されている。したがって、OA については、中鎖～長鎖脂肪酸として、ATF3、DNAJB4 および IL-8 の誘導能を有する可能性がある。今後は、脂肪酸について EpiSensA で評価したうえで、適用限界とすべきか否かの結論を出していく必要がある。

## 9. 皮膚感作性強度の予測性

皮膚感作性の有無の予測だけでなく、強度予測も化学物質に対するラベル規制や強度に応じた暴露量のリスクアセスメントを行う上で重要な要素である。強度予測に関しては、LLNA EC3 値がヒト感作性との相関性を有するという知見 (Basketter et al., 2000、Griem et al., 2003) から有用な指標と考えられている。第 1 章の考察でも述べたように、特に LLNA EC3 における Extreme/Strong および Moderate/Weak を分類することは、後者の場合には極めて低濃度 (例. 皮膚感作誘導の閾値) での暴露であれば感作は誘導されないという観点 (Keller et al., 2009、Safford et al., 2011) で、極めて重要である。本検討では、GCLM EC2 が LLNA EC3 と特に高い相関性を示した (Fig. 2-3-4)。また、ATF3 および IL-8 は同等の相関性を示し、DNAJB4 に関しても、ヒトでの感作性懸念が極めて低いと想定される 2 物質を除くことで、2 遺伝子と同等の相関性を示した (Fig. 2-3-4)。さらに、GCLM EC2、ATF3 EC15 および IL-8 EC4 を用いることで、LLNA EC3 に基づく強度の 3 ランク (Extreme/Strong、Moderate/Weak および Non sensitizers) を 82% と良好な精度で予測できた (Table 2-3-5)。本結果は、EpiSenA のマーカー遺伝子の誘導濃度が、感作性の強度と関連性を有し、かつ LLNA EC3 に基づく強度分類を予測可能である可能性を示している。近年開発された、RhE モデルの一つである EpiSkin を用いた新規感作性試験法;SENS-IS では、150 物質の評価結果から、LLNA EC3

の5ランク (Extreme、Strong、Moderate、Weak および Non-sensitizers) を90%以上の精度で予測できると報告されている (Cottrez et al., 2016)。つまり、今回開発した EpiSensA に比べより精度の高い予測ができる可能性を示しているが、SENS-IS では結論を得るために62もの遺伝子の発現量を評価する必要があり、解析の詳細な過程も明かされていない (Cottrez et al., 2016)。したがって、簡便性や汎用性の観点では、強度予測に関しても EpiSensA のほうが現状優位であると考えられる。一方、EpiSensA 単独では、LLNA EC3 値そのものの予測はできていない。本問題の解決には、近年報告された機械学習による予測システムである Bayesian network Integrated Testing Strategy (BN-ITS; Jaworska et al., 2015) が有用かもしれない。本モデルでは、様々な代替法の結果、評価物質の物化性状および予測代謝物の情報を統合することで、LLNA EC3 値の予測を可能としている (Jaworska et al., 2015)。本システムの問題点としては、予測に用いられる代替法が、培養細胞系などすべて水系の媒体を用いる方法であるため、難水溶性物質については十分な予測性を示せていない点である。したがって今後は、EpiSensA のデータを、難水溶性物質を中心にさらに拡充したうえで、BN-ITS などのシステムに組み込むことでより精度の高い強度予測が期待できると思われる。

## 第3章 総合討論

本研究では、感作性物質暴露後早期に ROS 産生が起こり、条件を最適化することで感作特異的な応答を捉えられることをはじめて明らかとした。また、RhE モデルにおける感作性マーカーとして、感作誘導期の角化細胞応答に関わる複数の遺伝子を新たに見出し、4 つの感作マーカーの発現を解析することで皮膚感作性を高精度に評価できることを示した。そして、動物を用いない簡便かつ高精度な評価を実現すべく、樹状細胞の活性化に着目した新規試験法 ROS assay、および RhE モデルを用いた新規試験法 EpiSensA を開発した。すなわち本研究では、感作性のメカニズム立脚した評価指標を活用ないしは新たに見出し、試験法開発に応用することに成功した。本章では、感作のキーイベント（経皮吸収⇒タンパク質との結合⇒角化細胞応答⇒樹状細胞の活性化）を反映した両試験の特徴を総括したうえで、2 試験の組み合わせによる、簡便かつ高精度な評価系構築の展望について述べたい。

### 3-1. 開発した 2 試験の特徴

本研究で開発した 2 つの試験法の優位性や問題点を把握すべく、ROS assay および EpiSensA、さらには OECD テストガイドラインに記載された試験法である DPRA、KeratinoSens<sup>TM</sup> および h-CLAT (OECD, 2015a, 2015b および 2016) の特徴を、試験法に重要な要素に関してまとめた (Table 3-1)。

#### ・材料、方法

ROS assay および EpiSensA では、THP-1 細胞や市販の RhE モデルなど入手性が良いものを用いている。また、用いる試薬や機器はいずれも汎用性が高く、OECD テストガイドライン記載済みの試験法と比較しても、試験を実施するうえで大きな障害にはならないと考えられる。作業工程に関して、ROS assay では、ROS 検出試薬の前処理 ⇒ 被験物質暴露 ⇒ 測定と、OECD テストガイドライン記載の試験法同様、極めてシンプルな工程である。一方、EpiSensA では暴露終了後に、RNA 抽出、cDNA 合成、Real-time PCR と 3 つの工程が必要であり、他の試験法に比べやや煩雑である。

#### ・時間

1 試験を終了するまでに必要な時間は、ROS assay で 1 時間、EpiSensA でも 12 時間であり、他の 3 試験に比べ短い。これは ROS assay および EpiSensA における被験物質の暴露時間が、それぞれ 30 分および 6 時間と、他の 3 試験に比べ短いことに起因する。加えて ROS assay については、暴露時間以外の工程も極めて短時間であることから、他の試験法に比べ圧倒的短時間で評価が可能になると考えられる。

#### ・評価にかかるコスト

ROS assay について、細胞の維持費用を差し引けば、1 サンプル当たりの評価コストは 500 円程度と、他の試験法に比べ安価である。一方、EpiSensA に関しては、1 サンプル当たりの評価コストは 75000 円と他の試験法に比べ高い。ただし、本コストの半分以上は RhE モデルに起因するため（約

60000 円/24well)、今後本モデルをより安価に生産する技術を開発することで、削減できる可能性は十分ある。加えて、動物試験が 1 検体 100 万円程度かかることを考慮すれば、EpiSensA に関してもコストは十分低いと考えられる。

#### ・予測精度

評価している物質数が少ない点を度外視すれば、試験法の最も重要な要素である精度に関しては EpiSensA が最も良い値を示した。EpiSensA では RhE モデルを用いることもあり、他の試験法では正しい評価が困難な物質（難水溶性物質、pre/pro-haptens など）を評価できるのが強みである（第 2 章 3 節）。一方、ROS assay に関しても、今のところ OECD テストガイドライン収載の 3 試験と同等の精度（感度、一致率）を有することから、正しい評価が困難な物質（偽陰性になりうる物質）に注意すれば、皮膚感作性物質の検出という観点では十分有用な試験法といえる。

以上のことから、本研究で開発した 2 つの試験法の特長は、以下のように集約できる。

- ・ ROS assay ; 簡便かつ低コストで、数多くの検体を評価可能
- ・ EpiSensA ; スループット性に難はあるが、偽陰性が少なく、幅広い物質の皮膚感作性を検出可能

### 3-2. ROS assay および EpiSensA の組み合わせによる、皮膚感作性評価フロー

上記特徴を踏まえ、2 試験の組み合わせによる、簡便かつ高精度な評価フロー（以後、提案法と略記）を構築した（Fig. 3-1）。提案法ではまず、ROS assay により、被験物質の感作性の有無を評価する。そして、ROS assay で陽性と判定された物質は感作性ありと判断する。一方、ROS assay で陰性と判定された場合、該物質が ROS assay では正しく評価できない可能性のある物質（難水溶性物質（Log Kow >3.5）、pre/pro-haptens および加水分解物質）であれば、EpiSensA で再度評価を実施する。そして、EpiSensA で陽性の場合に感作性あり、陰性の場合に感作性なしと判断する。また、上記の「ROS assay では正しく評価できない可能性のある物質」以外の物質の場合には、ROS assay 陰性の結果をもって、感作性なしと判定する。提案法の特長は、①安価でスループット性の高い ROS assay でまず篩をかけ、②正しく評価できない可能性のある物質を偽陰性が少ない EpiSensA で確実に検出することで、「簡便かつ高精度（高感度）を実現する」ことにある。なお、ROS assay で正しく評価可能か否かの指標となる、難水溶性の指標である Log Kow の算出、あるいは該物質が pre/pro-hapten である可能性があるか否かの予測は、EPI-SUITE（<https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/download-epi-suitetm-estimation-program-interface-v411>）や OECD QSAR toolbox (<http://toolbox.oasis-lmc.org/?section=download&version=latest>) などのフリーソフトを活用することで達成可能である。

次に、ROS assay、EpiSensA、さらには OECD テストガイドライン収載の 3 試験法のデータが存在する 37 物質を用いて、提案法の有効性（簡便性、動物試験 LLNA に対する予測精度）を検証した。Table 3-2 に、個々の試験（陽性:P、陰性:N）、ならびに提案法の結果（P1: ROS assay で陽性、P2: EpiSensA で陽性、N1: ROS assay で陰性）を示した。なお、比較対象として、OECD テストガイ

ドライン収載 3 試験のシンプルな組み合わせ評価法として有望視されている、2 out of 3 モデル (3 試験のうち、2 試験以上陽性の場合に感作性あり、それ以外の場合に感作性なしと判断) (Urbisch et al., 2015) および 1 out of 3 モデル (3 試験のうち、1 試験以上で陽性の場合に感作性ありと判断) の結果も示した。

Table 3-2 に示したように、提案法では LLNA 陽性物質 24 品すべてを感作性ありと判定できた。この際、ROS assay で陽性と判定されたのは 21 物質 (88%) であり、pre/pro-hapten の p-phenylenediamine、および難水溶性物質 (Log Kow  $\geq 3.5$ ) の 1-bromohexane および hexyl cinnamic aldehyde が EpiSensA で陽性と判定された。また、LLNA 陰性の 13 品中 11 品が、ROS assay の結果に基づき感作性なしと判定された。すなわち、今回のデータセットでは、34 物質 (全体の 92%) を ROS assay で判断し、残り 3 物質を EpiSensA で判断する形となった。本結果は、より簡便な ROS assay を始めに実施することで約 9 割の物質の感作性を迅速に判断できる可能性を示唆し、“簡便な評価”という提案法の狙いと合致する。難水溶性物質および pre/pro-hapten の占める割合は、それぞれ物質全体のおよそ 20% および 4% であり (Urbisch et al., 2015 に収載されている、LLNA データが存在する 213 物質から試算)、仮に ROS assay で半分が (偽) 陰性と判定されたとしても、EpiSensA で評価するのは物質全体の 12% 程度と試算される。したがって、検証物質数を 37 品からさらに拡大したとしても、ROS assay で 90% 程度の物質を評価・判断できるという試算は大きく変わらないと推察される。

ここで提案法の簡便性について考察を加えると、既存の組み合わせ法である 2 out of 3 モデルに関しては、感作性の有無を判断するためには最低 2 試験の結果が必要であり、提案法に比べ明らかに時間と労力がかかる。また、1 out of 3 モデルでは、“感作性があること”の判断は 1 試験でも可能である一方、感作性なしと判断するためには 3 試験の実施が必須であり、提案法に比べ時間・労力がかかる可能性が高いと考えられる。以上のことから提案法は、簡便性の面で、既存の組み合わせ法より優れていると考えられる。

また、提案法の LLNA に対する感度、特異度および一致率は、それぞれ 100%、85% および 95% となり、ROS assay および EpiSensA 単独時に比べ、高い予測性を有することがわかった (Table 3-2)。このことは、ROS assay で正しく評価できない物質 (偽陰性となりうる物質) を EpiSensA で検出する、という狙いを反映した結果といえる。また、2 out of 3 や 1 out of 3 といった、現在活用が検討されている評価モデルに比べても、提案法は高い感度および予測性を有することが明らかとなった (Table 3-2)。本結果については、OECD テストガイドライン収載法に共通で存在する評価困難物質 (難水溶性物質や pre/pro-haptens) を、提案法の EpiSensA では正しく評価できていることが寄与している。

以上の結果から提案法は、特徴の異なる 2 試験の組み合わせにより、動物を用いることなく、簡便かつ高精度に皮膚感作性を評価できる方法として有用であると考えられた。

### 3-3. 今後の展望

上記の考察から、ROS assay および EpiSensA を軸とした、組み合わせによる評価法を構築することで、皮膚感作性を簡便かつ高精度に評価できる可能性が示された。今後、評価法として、世界で

幅広く利用される方法とするためには、下記に示す3つの課題解決が必要と考える。

#### ①データセットの拡充、再現性の確認

今回、ROS assay では50品、EpiSensA では72品、そして本論文で示した提案法では37品について解析を行い、その有用性を示した。一方、OECD テストガイドライン収載の公定法として認められるには、該試験法が評価に有用であることを客観的かつ説得力を持って示すことが必要である。具体的には、多くの施設（3施設以上）で再現良く結果が得られること、および数多くの評価物質数（例、150物質以上）が必要と考えられる。今後は、少なくとも OECD テストガイドライン収載の試験法で共通して評価されている物質、加えて提案法の強みである難水溶性物質や pre/pro-haptens について、ROS assay および EpiSensA のデータを拡充し、各試験の特徴の明確化や組み合わせによる予測モデルの最適化を行っていく必要がある。

#### ②強度予測

序論でも示したように、皮膚感作性のリスクは、感作性のハザード（有無/強さ）と暴露量で決まる（Fig. 0-1）。このことは、感作性がある物質でも、その強さを見積もることができれば、暴露量のコントロールによりリスクを下げ、ヒトでの健康被害を防げる可能性を示している。すなわち、皮膚感作性の評価では、感作性の有無に加え、強度の評価も重要な要素となる。第1章、第2章で示したように、ROS assay および EpiSensA では、LLNA の EC3 に基づく強度分類の大まかな予測（強いか弱いか）は可能であるが、EC3 の予測はできていない。今後は、2章の考察で示した BN-ITS3（Jaworska et al., 2015）などの機械学習ツールの活用により、ROS assay および EpiSensA のデータを駆使した精緻な強度予測を実現していきたい。そのためには、課題①；データセット拡充にまず取り組み、高精度の予測モデル構築に必要なデータを取得する必要がある。

#### ③ EpiSensA の効率向上

先述のように EpiSensA には、工程が煩雑という難点が存在する。組み合わせによる評価法を採用した場合でも、EpiSensA での評価を要する原料は少なからず存在することから、本問題点については改善が必要と考える。具体的な方策として、RNA 抽出/cDNA 合成工程の1ステップ化などが挙げられるが、RNA 抽出～遺伝子発現定量という工程そのものは存在するため、煩雑であることには変わりはない。そこで評価法の効率化には、KeratinoSens<sup>TM</sup> のように、遺伝子発現をレポーターアッセイで評価する系が有効ではないかと考えられる。具体的には、EpiSensA で用いている各遺伝子のプロモーターを組み込んだレポーターベクターを RhE モデルに導入し、発光や蛍光を指標に皮膚感作性を評価することを想定している。本法が実現すれば、被験物質暴露 ⇒ 発光/蛍光物質（例、ルシフェラーゼ）の定量 ⇒ 遺伝子発現定量、という簡便な工程での評価が可能となる。ただし、本施策の実現には、RhE モデルにおいてレポーターベクターを安定的に発現させるという大きな課題が存在するため、必要遺伝子の絞り込みやベクターの選択等を慎重に行ったうえで、研究を進める必要があると考える。

上記の課題解決により、ROS assay および EpiSensA が簡便かつ高精度な皮膚感作性評価につながり、動物愛護や新規原料の開発推進に貢献することを祈念しつつ、本論文を締めくくりたい。



Table 3-1 各試験法の特徴

試験法	反映する キーイベント	用いる細胞	評価指標	工程	評価に用いる 主な装置	1試験 当たりの 所要時間 (時間)	1サンプル 当たりの 評価コスト (円)**	予測精度*** (評価物質数)	正しく評価 できない 可能性が ある物質
EpiSensA	・経皮吸収 ・タンパク質との 結合 ・角化細胞の 応答	RhRモデル (市販品)	角化細胞応答に 関連する4遺伝子 (ATF3、DNAJB4、 GCLMおよびIL-8) のmRNA発現	被験物質暴露 (~5濃度、6時間) ・組織回収 ⇒ RNA抽出/cDNA合成 ⇒ Real-timePCR ・培地回収 ⇒LDH測定	・サーマルサイクラー ・Real-time PCR機器 ・プレートリーダー (LDH測定用)	12	75000	感度:93% 一致率:90% (72物質)	
ROS Assay	樹状細胞の 活性化	THP-1	ROS産生	ROS検出試薬処理(15分) ⇒ 被験物質暴露 (5濃度、30分) ⇒ ROS産生(蛍光)測定	フローサイトメーター	1	500	感度:83% 一致率:82% (50物質)	難水溶性物質 pre/pro-haptens 蛍光物質 加水分解物質
DPRA	タンパク質との 結合	なし	モデルペプチド 2種との結合	被験物質とペプチドの反応 (1濃度、24時間) ⇒ ペプチド減少率測定 (HPLC)	HPLC	30	1200	感度:80% 一致率:80% (157物質)	難水溶性物質 pre/pro-haptens 分子量不明物質 金属
KeratinoSens™	角化細胞の 応答	HaCaT*	Nrf2-ARE経路の 活性化	被験物質暴露 (12濃度、48時間) ⇒ Luciferase測定 ⇒ MTT染色/細胞生存率測定	プレートリーダー	54	18000	感度:78% 一致率:77% (201物質)	難水溶性物質 pre/pro-haptens Luciferase阻害剤 加水分解物質
h-CLAT	樹状細胞の 活性化	THP-1	共刺激分子 (CD86、CD54)の 発現量	被験物質暴露(8濃度、24時間) ⇒ 細胞回収 ⇒ 蛍光抗体染色 ⇒ CD86、CD54発現量測定	フローサイトメーター	27	12000	感度:93%**** 一致率: 85%**** (142物質)	難水溶性物質 pre/pro-haptens 蛍光物質 加水分解物質

\*AREレポーターベクターを強制発現(使用にはライセンス契約必要)

\*\*細胞の維持費用(培地、血清等)は考慮していない。

\*\*\*動物試験LLNAに対する予測性。DPRA、KeratinoSens™およびh-CLATに関しては、OECDテストガイドラインの値(OECD, 2015a、2015bおよび2016)を参照した。

\*\*\*\*LogKow≥3.5で陰性となった物質を除いた値

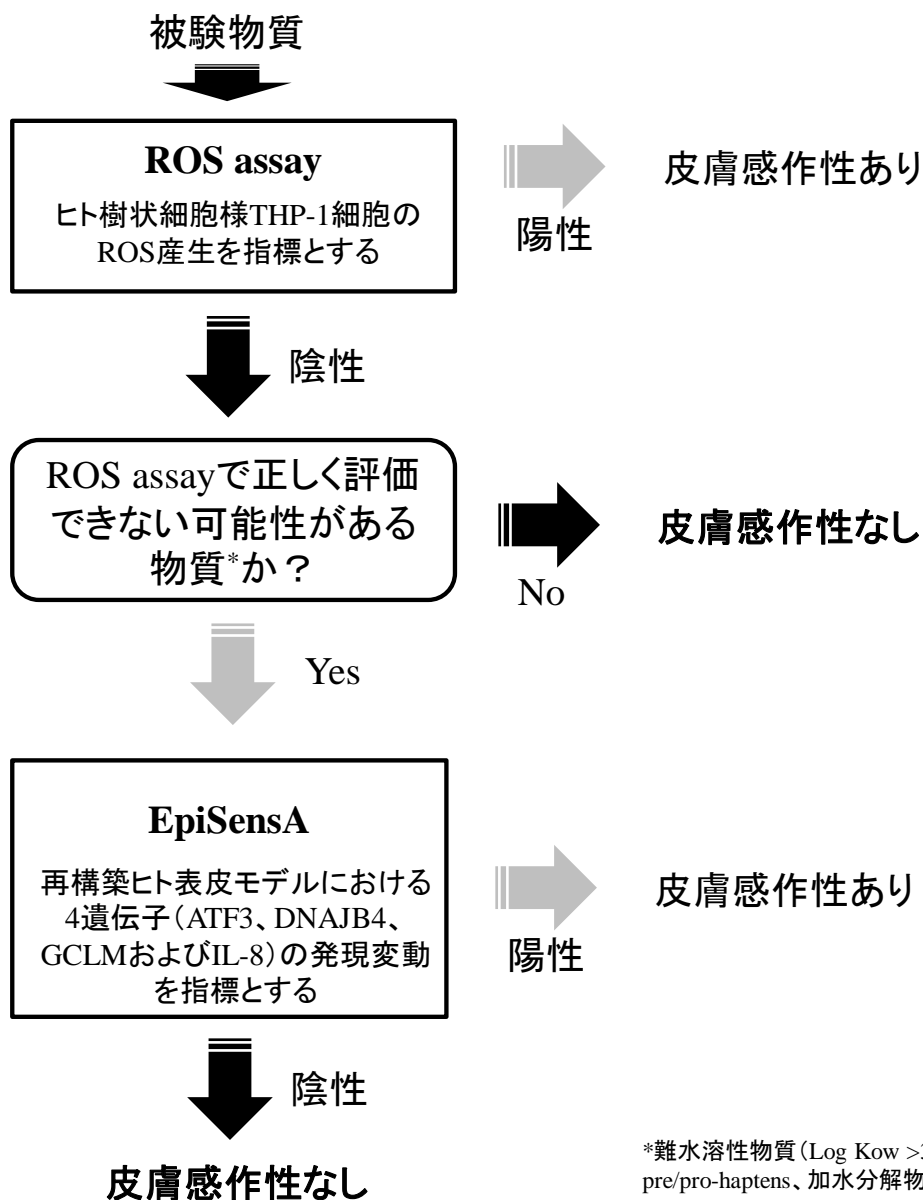


Fig. 3-1

### ROS assayおよびEpiSensAを組み合わせた 皮膚感作性評価法 (提案法)

被験物質をまずROS assayで評価し、陰性の場合には、ROS assayで正しく評価できているか否かを考慮する。正しく評価できていない可能性がある場合、EpiSensAを実施する。なお、被験物質のLog Kowやpre/pro-haptenかの予測は、EPI-SUITEやOECD QSAR toolboxなどのフリーソフトを活用する。

Table 3-2 提案法の性能解析に用いた37品の結果のまとめ

Name	LLNA	LogKow <sup>a</sup>	ROS assay	EpiSensA	提案法 <sup>b</sup>	OECD-accepted <i>in vitro</i> tests <sup>c</sup>			2 out 3	1 out 3
	EC3 (%)					DPAR	KeratinoSens <sup>TM</sup>	h-CLAT		
Oxazolone	0.003	1.51	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
4-Nitrobenzylbromide	0.05	2.70	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
2,4-Dinitrochlorobenzene	0.05	2.27	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
1,4-Dihydroquinone <sup>†</sup>	0.11	1.03	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
p-Phenylenediamine <sup>†</sup>	0.16	-0.39	N	P	P2	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
Benzoyl peroxide*	0.22	3.43	P	P	P1	P <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	P
Methyl dibromoglutaronitrile	0.9	1.63	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
Isoeugenol <sup>†</sup>	1.2	2.65	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	P	P
Glyoxal	1.4	-1.66	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
2-Mercaptobenzothiazole	1.7	2.86	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
Ethylene diamine <sup>†</sup>	2.2	-1.62	P	P	P1	N <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
Cinnamic aldehyde	3	1.82	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
Tetramethylthiuram disulfide	5.2	1.70	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
Diethylenetriamine <sup>†</sup>	5.8	-2.13	P	P	P1	N <sup>2</sup>	N <sup>3</sup>	N <sup>1</sup>	N	N
1-Bromohexane	10	<b>3.63</b>	N	P	P2	N <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	P
Hexyl cinnamic aldehyde	11	<b>4.82</b>	N	P	P2	N <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	P
Citral	13	3.45	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
Eugenol <sup>†</sup>	13	2.73	P	P	P1	P <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
Abietic acid	15	<b>6.46</b>	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	P	P
Lillial	19	<b>4.36</b>	P	P	P1	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	N	P
Cyclamen aldehyde	22	<b>3.91</b>	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	P	P
Imidazolidinyl urea	24	-8.28	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
Ethylene glycol dimethacrylate	28	2.21	P	P	P1	P	P <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	P	P
Butyl glycidyl ether	31	1.08	P	P	P1	P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	P	P
1-Butanol	-	0.84	N	N	N1	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	N
4-Hydroxybenzoic acid	-	1.39	N	N	N1	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	N
Acetanilole	-	1.75	N	N	N1	N <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	P
Benzalkonium chloride	-	2.93	N	P	N1	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	N
Glycerol	-	-1.65	N	N	N1	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	N
Isopropanol	-	0.28	N	N	N1	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	N
Lactic acid	-	-0.65	N	N	N1	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	N
Methyl salicylate	-	2.60	N	P	N1	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	N
Octanoic acid	-	3.03	P	P	P1	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>	N	P
Propylene glycol	-	-0.78	N	N	N1	N <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	N
Salicylic acid	-	2.24	N	N	N1	P <sup>2</sup>	N <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	P	P
Sodium lauryl sulfate	-	1.69	N	P	N1	P <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	P
Vanillin	-	1.05	P	N	P1	P <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	N <sup>1</sup>	N	P

<sup>†</sup>Putative pre/pro-haptens (Urbisch et al., 2015) \*加水分解物質 <sup>a</sup>3.5以上(難水溶性物質)の場合、太字で表示

<sup>b</sup>P1; ROS assayで陽性、N1; ROS assayで陰性、P2; EpiSensAで陽性

<sup>c</sup>Pは陽性、Nは陰性、上付き数字は、次の文献から引用: 1. Natsch et al., 2013, 2. Takenouchi et al., 2015, 3. Urbisch et al., 2015

Table 3-3 提案法を含む、様々な手法の動物試験LLNAに対する予測性

	ROS assay	EpiSensA	提案法	2 out of 3 <sup>a</sup>	1 out of 3 <sup>b</sup>
感度(%)	88	100	<b>100</b>	79	96
特異度(%)	85	69	85	92	62
一致率(%)	86	89	<b>95</b>	84	84

<sup>a</sup>および<sup>b</sup>OECD TG収載の3試験(DPRA、KeratinoSens<sup>TM</sup>およびh-CLAT)のうち、  
(a) 2試験以上陽性、もしくは (b) 1試験以上陽性、の場合に感作性ありと判定するモデル

## 参考文献

- Aeby, P., Sieber, T., Beck, H., Gerberick, G.F., Goebel, C., 2009. Skin sensitization to *p*-phenylenediamine: the diverging roles of oxidation and N-acetylation for dendritic cell activation and the immune response. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 99-109.
- Anderson CM, Nedergaard M., 2006. Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci.* **29**, 257-262.
- Antonopoulos C., Cumberbatch M., Mee J.B., Dearman R.J., Wei X.Q., Liew F.Y., Kimber I., Groves R.W., 2008. 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.
- Aptula AO, Patlewicz G, Roberts DW., 2005. Skin sensitization: reaction mechanistic applicability domains for structure-activity relationships. *Chem Res Toxicol.* **18**, 1420-1426.
- Aquilano, K., Filomeni, G., Di Renzo, L., Vito, M., Stefano, C., Salimei, P.S., Ciriolo, M.R., Marfè, G., 2007. Reactive oxygen and nitrogen species are involved in sorbitol-induced apoptosis of human erithroleukaemia cells K562. *Free Radic. Res.* **41**, 452-460.
- Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Bare, O., Auron, P.E., Stevenson, M.A., Calderwood, S.K., 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **277**, 15028–15034.
- Bae ON, Ahn S, Jin SH, Hong SH, Lee J, Kim ES, Jeong TC, Chun YJ, Lee AY, Noh M., 2015. Chemical allergens stimulate human epidermal keratinocytes to produce lymphangiogenic vascular endothelial growth factor. *Toxicol Appl Pharmacol.* **283**, 147-155.
- Basketter D.A., Balikie L., Dearman R.J., Kimber I., Ryan C.A., Gerberick G.F., Harvey P., Evans P., White I.R., Rycroft R.J., 2000. Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* **42**, 344-348.
- Basketter DA, Alépée N, Ashikaga T, Barroso J, Gilmour N, Goebel C, Hibatallah J, Hoffmann S, Kern P, Martinozzi-Teissier S, Maxwell G, Reisinger K, Sakaguchi H, Schepky A, Tailhardat M, Templier M., 2014. Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* **25**, 11-21.

- Boxman I.L., Hensbergen P.J., Van Der Schors R.C., Bruynzeel D.P., Tensen C.P., Ponc M., 2002. Proteomic analysis of skin irritation reveals the induction of HSP27 by sodium lauryl sulphate in human skin. *Br. J. Dermatol.* **146**, 777-785.
- Byamba D., Kim T.G., Kim D.H., Je J.H., Lee M.G., 2010. The roles of reactive oxygen species produced by contact allergens and irritants in monocyte-derived dendritic cells. *Ann. Dermatol.* **22**, 269-278.
- Casati S., Aeby P., Kimber I., Maxwell G., Ovigne J.M., Roggen E., Rovida C., Tosti L., Basketter D., 2009. Selection of chemicals for the development and evaluation of in vitro methods for skin sensitisation testing. *Altern. Lab. Anim.* **37**, 305-312.
- Chew E.H., Nagle A.A., Zhang Y., Scarmagnani S., Palaniappan P., Bradshaw T.D., Holmgren A., Westwell A.D., 2010. Cinnamaldehydes inhibit thioredoxin reductase and induce Nrf2: potential candidates for cancer therapy and chemoprevention. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 98-111.
- Coquette A, Berna N, Vandenbosch A, Rosdy M, De Wever B, Poumay Y., 2003. Analysis of interleukin-1alpha (IL-1alpha) 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.
- Corsini E., Mitjans M., Galbiati V., Lucchi L., Galli C.L., Marinovich M., 2009. Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. *Toxicol In Vitro* **23**, 789-796.
- Cottrez F, Boitel E, Ourlin JC, Peiffer JL, Fabre I, Henaoui IS, Mari B, Vallauri A, Paquet A, Barbry P, Auriault C, Aeby P, Groux H., 2016. SENS-IS, a 3D reconstituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: Reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. *Toxicol In Vitro* **32**, 248-260.
- Cumberbatch M., Dearman R.J., Kimber I., 1997. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology* **92**, 388-395.
- Dikalov S., 2011. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1289-1301.
- Divkovic M., Pease C.K., Gerberick G.F., Basketter D.A., 2005. Hapten-protein binding: from theory to

practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis* **53**, 189-200.

El Ali Z, Gerbeix C, Hemon P, Esser PR, Martin SF, Pallardy M, Kerdine-Römer S., 2013. Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2. *Toxicol Sci.* **134**, 39-48.

Emter R., Ellis G., Natsch A., 2010. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **245**, 281-290.

Fabian E, Vogel D, Blatz V, Ramirez T, Kolle S, Eltze T, van Ravenzwaay B, Oesch F, Landsiedel R. Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol.* **87**, 1683-96.

Feissner R.F., Skalska J., Gaum W.E., Sheu S.S., 2009. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and ROS. *Front Biosci.* **14**, 1197-218.

Ferguson, J. E., Beck, M. H., 1995. Contact sensitivity to vanilla in a lip salve. *Contact Dermatitis* **33**, 352.

Franklin C.C., Backos D.S., Mohar I., White C.C., Forman H.J., Kavanagh T.J., 2009. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol. Aspects Med.* **30**, 86-98.

Gerberick G.F., House R.V., Fletcher E.R., Ryan C.A., 1992. Examination of the local lymph node assay for use in contact sensitization risk assessment. *Fundamen. Appl. Toxicol.* **19**, 438-445.

Gerberick G.F., Ryan C.A., Kern P.S., Schlatter H., Dearman R.J., Kinber I., Patlewicz G.Y., Basketter D.A., 2005. Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis* **16**, 157-202.

Gibbs S, Corsini E, Spiekstra SW, Galbiati V, Fuchs HW, Degeorge G, Troese M, Hayden P, Deng W, Roggen E., 2013. An epidermal equivalent assay for identification and ranking potency of contact sensitizers. *Toxicol Appl Pharmacol.* **272**, 529-541

Götz C., Pfeiffer R., Tigges J., Blatz V., Jäckh C., Freytag E.M., Fabian E., Landsiedel R., Merk H.F., Krutmann J., Edwards R.J., Pease C., Goebel C., Hewitt N., Fritsche E., 2012a. Xenobiotic metabolism

capacities of human skin in comparison with a 3D epidermis model and keratinocyte-based cell culture as *in vitro* alternatives for chemical testing: activating enzymes (Phase I). *Exp Dermatol.* **21**, 358-363.

Götz C., Pfeiffer R., Tigges J., Ruwiedel K., Hübenthal U., Merk H.F., Krutmann J., Edwards R.J., Abel J., Pease C., Goebel C., Hewitt N., Fritsche E., 2012b. Xenobiotic metabolism capacities of human skin in comparison with a 3D-epidermis model and keratinocyte-based cell culture as *in vitro* alternatives for chemical testing: phase II enzymes. *Exp Dermatol.* **21**, 364-369.

Griem, P., Goebel, C., Scheffler, H., 2003. Proposal for a risk assessment methodology for skin sensitization based on sensitization potency data. *Regulatory Toxicol. Pharm.* **38**, 269–290.

Guo W., Xie W., Han J., 2006. modulation of adipocyte lipogenesis by octanoate: involvement of reactive oxygen species. *Nutr. Metab. (Lond)* **3**,30.

Hirota M., Motoyama A., Suzuki M., Yanagi M., Kitagaki M., Kouzuki H., Hagino S., Itagaki H., Sasa H., Kagatani S., Aiba S., 2010. Changes of cell-surface thiols and intracellular signaling in human monocytic cell line THP-1 treated with diphenylcyclopropanone. *J. Toxicol. Sci.* **35**, 871-879.

Honda T, Miyachi Y, Kabashima K, 2011. Regulatory T cells in cutaneous immune responses. *J Dermatol Sci* **63**, 75-82.

Hopkins J.E., Naisbitt D.J., Kitteringham N.R., Dearman R.J., Kimber I., Park B.K., 2005. Selective haptenation of cellular or extracellular protein by chemical allergens: association with cytokine polarization. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 375-381.

Hugh D. Crone. Paracelsus: The Man who Defined Medicine: His Real Contribution to Medicine and Science. *The Albarello Press Melbourne*, 2004.

Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M., 2015. Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *Arch Toxicol.* **89**, 2355-2383.

Kano S, Todo H, Furui K, Sugie K, Tokudome Y, Hashimoto F, Kojima H, Sugibayashi K` 2011. Comparison of Several Reconstructed Cultured Human Skin Models by Microscopic Observation: Their Usefulness as an Alternative Membrane for Skin in Drug Permeation Experiments. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* **16**, 51-58.



Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA., 2012. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol.* **12**, 114-24.

Karlberg A.T., Bergström M.A., Börje A., Luthman K., Nilsson J.L., 2008. Allergic contact dermatitis - formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 53-69.

Katoh M, Hamajima F, Ogasawara T, Hata K., 2009. Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validated protocol. *J Toxicol Sci.* **34**, 327-334.

Keller D, Krauledat M, Scheel J., 2009. Feasibility study to support a threshold of sensitization concern concept in risk assessment based on human data. *Arch Toxicol.* **83**, 1049-1060.

Kern, P.S., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kimber, I., Aptula, A., Basketter, D.A., 2010. Local lymph node data for the evaluation of skin sensitization alternatives: a second compilation. *Dermatitis* **21**, 8–32.

Kim D., Kim Y.J., Koh H.S., Jang T.Y., Park H.E., Kim J.Y., 2010. Reactive oxygen species enhance TLR10 expression in the human monocytic cell line THP-1. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 3769-3782.

Kimber I., Hilton J., Dearman R.J., Gerberick G.F., Ryan C.A., Basketter D.A., Lea L., House R.V., Ladics G.S., Loveless S.E., Hastings K.L., 1998. Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory evaluation. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **53**, 567-579.

Kimber I., Basketter D.A., Gerberick G.F., Ryan C.A., Dearman R.J., 2011. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicol. Sci.* **120**, Suppl 1, S238-268.

Köllisch G, Kalali BN, Voelcker V, Wallich R, Behrendt H, Ring J, Bauer S, Jakob T, Mempel M, Ollert M., 2003. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology.* **114**, 531-41.

Kus-Liśkiewicz M, Polańska J, Korfanty J, Olbryt M, Vydra N, Toma A, Widłak W., 2013. Impact of heat shock transcription factor 1 on global gene expression profiles in cells which induce either cytoprotective or pro-apoptotic response following hyperthermia. *BMC Genomics.* **14**:456.

Lambrechts N., Verstraelen S., Lodewyckx H., Felicio A., Hooyberghs J., Witters H., Tendeloo V.,

Cauwenberge P., Nelissen I., Heuvel R., Schoeters G., 2009. THP-1 monocytes but not macrophages as a potential alternative for CD34+ dendritic cells to identify chemical skin sensitizers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **236**, 221-230.

Lambrechts N., Vanheel H., Nelissen I., Witters H., Van Den Heuvel R., Van Tendeloo V., Schoeters G., Hooyberghs J., 2010. Assessment of chemical skin-sensitizing potency by an in vitro assay based on human dendritic cells. *Toxicol. Sci.* **116**, 122-129.

Lee HY, Stieger M, Yawalkar N, Kakeda M., 2013. Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis. *Mediators Inflamm.* 2013:916497.

Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.

Lockridge JB, Sailors ML, Durgan DJ, Egbejimi O, Jeong WJ, Bray MS, Stanley WC, Young ME., 2008. Bioinformatic profiling of the transcriptional response of adult rat cardiomyocytes to distinct fatty acids. *J Lipid Res.* **49**, 1395-1408.

Loveless S.E., Api A.M., Crevel R.W., Debruyne E., Gamer A., Jowsey I.R., Kern P., Kimber I., Lea L., Lloyd P., Mehmood Z., Steiling W., Veenstra G., Woolhiser M., Hennes C., 2010. Potency values from the local lymph node assay: application to classification, labelling and risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **56**, 54-66.

Luster M.I., Wilmer J.L., Germolec D.R., Spalding J., Yoshida T., Gaido K., Simeonova P.P., Burlison F.G., Bruccoleri A., 1995. Role of keratinocyte-derived cytokines in chemical toxicity. *Toxicol. Lett.* **82-83**, 471-476.

Luu-The V., Duche D., Ferraris C., Meunier J.R., Leclaire J., Labrie F., 2009. Expression profiles of phases 1 and 2 metabolizing enzymes in human skin and the reconstructed skin models Episkin and full thickness model from Episkin. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **116**, 178-186.

Ma Y., Hendershot L.M., 2004. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat. Rev. Cancer* **4**, 966-977.

MacLeod AK, McMahon M, Plummer SM, Higgins LG, Penning TM, Igarashi K, Hayes JD., 2009. Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes:

demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis* **30**, 1571-1580.

McKim J.M. Jr, Keller D.J. 3rd, Gorski J.R., 2010. A new *in vitro* method for identifying chemical sensitizers combining peptide binding with ARE/EpRE-mediated gene expression in human skin cells. *Cutan Ocul Toxicol.* **29**, 171-192.

Migdal C., Foggia L., Tailhardat M., Courtellemont P., Haftek M., Serres M., 2010. Sensitization effect of thimerosal is mediated *in vitro* via reactive oxygen species and calcium signaling. *Toxicology* **274**, 1-9.

Miyazawa M., Ito Y., Yoshida Y., Sakaguchi H., Suzuki H., 2007. Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* **21**, 428-437.

Miyazawa M., Takashima A., 2012 Development and validation of a new *in vitro* assay designed to measure contact allergen-triggered oxidative stress in dendritic cells. *J. Dermatol. Sci.* **68**, 73-81.

Morhenn VB, Chang EY, Rheins LA, 1999. A noninvasive method for quantifying and distinguishing inflammatory skin reactions. *J Am Acad Dermatol.* **41**, 687-92.

Na K., Kim K.E., Park S.T., Kim T.Y., 2007. EC-SOD suppresses contact hypersensitivity in mouse skin by impairing Langerhans cell migration. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1930-1937.

Naik S.M., Cannon G., Burbach G.J., Singh S.R., Swerlick R.A., Wilcox J.N., Ansel J.C., Caughman S.W., 1999. Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 and secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators and dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 766-772.

Natsch A., Gfeller H., Kuhn F., Granier T., Roberts D.W., 2010. Chemical basis for the Extreme skins sensitization potency of (E)-4-(ethoxymethylene)-2-phenyloxazol-5(4H)-one. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 1913-1920.

Natsch A, Ryan CA, Foertsch L, Emter R, Jaworska J, Gerberick F, Kern P., 2013. A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *J Appl Toxicol.* **33**, 1337-1352.

Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T,

Nakajima S, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Ishii KJ, Tsutsui H, Yagita H, Iwakura Y, Kubo M, Ng Lg, Hashimoto T, Fuentes J, Guttman-Yassky E, Miyachi Y, Kabashima K., 2014. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol.* **15**, 1064-9.

Netzlaff F., Lehr C.M., Wertz P.W., Schaefer U.F., 2005. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**, 167-178.

Nguyen CT, Kim EH, Luong TT, Pyo S, Rhee DK, 2014. ATF3 confers resistance to pneumococcal infection through positive regulation of cytokine production. *J Infect Dis.* **210**, 1745-1754.

Niwa M., Nagai K., Oike H., Kobori M., 2009. Evaluation of the skin irritation using a DNA microarray on a reconstructed human epidermal model. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 203-208.

Nordberg J., Zhong L., Holmgren A., Arnér E.S., 1998. Mammalian thioredoxin reductase is irreversibly inhibited by dinitrohalobenzenes by alkylation of both the redox active selenocysteine and its neighboring cysteine residue. *J. Biol. Chem.* **273**, 10835–10842.

Nukada Y., Ito Y., Miyazawa M., Sakaguchi H., Nishiyama N., 2011. The relationship between CD86 and CD54 protein expression and cytotoxicity following stimulation with contact allergen in THP-1 cells. *J. Toxicol. Sci.* **36**, 313-324.

OECD, 1992. Guideline for Testing of Chemicals No. 406: Skin Sensitization, adopted 17th July.

OECD, 2010. Guideline for Testing of Chemicals No. 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, adopted 22nd July.

OECD, 2012. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 2: Use of the AOP to Develop Chemical Categories and Integrated Assessment and Testing Approaches. Series on Testing and Assessment No. 168. ENV/JM/MONO(2012)/PART2.

OECD, 2013. Guideline for Testing of Chemicals No. 439: In Vitro Skin Irritation - Reconstructed Human Epidermis Test Method, adopted 26th July.

OECD, 2015a. Guideline for Testing of Chemicals No. 442C: *In Chemico* Skin Sensitisation: direct peptide

reactivity assay (DPRA), adopted 5th Feb.

OECD, 2015b. Guideline for Testing of Chemicals No. 442D: *In Vitro* Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, adopted 5th Feb.

OECD, 2016. Guideline for Testing of Chemicals No. 442E: *In Vitro* Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), adopted 29th Jul.

Ohara H, Saito R, Hirakawa S, Shimada M, Mano N, Okuyama R, Aiba S., 2010. Gene expression profiling defines the role of ATP-exposed keratinocytes in skin inflammation. *J Dermatol Sci.* **58**, 143-51.

Peiser M., Tralau T., Heidler J., Api A.M., Arts J.H., Basketter D.A., English J., Diepgen T.L., Fuhlbrigge R.C., Gaspari A.A., Johansen J.D., Karlberg A.T., Kimber I., Lepoittevin J.P., Liebsch M., Maibach H.I., Martin S.F., Merk H.F., Platzek T., Rustemeyer T., Schnuch A., Vandebriel R.J., White I.R., Luch A., 2012. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, *in vitro* methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol. Life Sci.* **69**, 763-781.

Pollack, B.P., Sapkota, B., Haun, P.L., 2012. Activating transcription factor 3 (ATF3) expression is increased in erythema multiforme and is regulated by IFN-gamma in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **19**, e310–313.

Poyton R.O., Ball K.A., Castello P.R., 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 332-340.

Prasanth GK, Divya LM, Sadasivan C. 2009. Effects of mono and di(n-butyl) phthalate on superoxide dismutase. *Toxicology* **262**, 38-42.

Qiu X.B., Shao Y.M., Miao S., Wang L., 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 2560-2570.

Reisinger K, Hoffmann S, Alépée N, Ashikaga T, Barroso J, Elcombe C, Gellatly N, Galbiati V, Gibbs S, Groux H, Hibatallah J, Keller D, Kern P, Klaric M, Kolle S, Kuehnl J, Lambrechts N, Lindstedt M, Millet M, Martinozzi-Teissier S, Natsch A, Petersohn D, Pike I, Sakaguchi H, Schepky A, Tailhardat M, Templier M, van Vliet E, Maxwell G, 2015. Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety

assessment. *Toxicol In Vitro* **29**, 259-70.

Safford RJ, Aptula AO, Gilmour N., 2011. Refinement of the Dermal Sensitisation Threshold (DST) approach using a larger dataset and incorporating mechanistic chemistry domains. *Regul Toxicol Pharmacol.* **60**, 218-24.

Saito K, Miyazawa M, Nukada Y, Sakaguchi H, Nishiyama N., 2013a. Development of an *in vitro* skin sensitization test based on ROS production in THP-1 cells. *Toxicol In Vitro* **27**, 857-863.

Saito K, Nukada Y, Takenouchi O, Miyazawa M, Sakaguchi H, Nishiyama N., 2013b. Development of a new *in vitro* skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. *Toxicol In Vitro* **27**, 2213-2224.

Saito K, Takenouchi O, Nukada Y, Miyazawa M, Sakaguchi H., 2017. An *in vitro* skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro-haptens. *Toxicol In Vitro* **40**, 11-25.

Sasaki Y., Aiba S., 2007. Dendritic cells and contact dermatitis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **33**, 27-34.

Smith CK, Hotchkiss SAM. Allergic Contact Dermatitis: Chemical and Metabolic Mechanisms. *Taylor and Francis; London*: 2001.

Sunkara LT, Jiang W, Zhang G., 2012. Modulation of antimicrobial host defense peptide gene expression by free fatty acids. *PLoS One.* **7**, e49558.

Szegezdi E., Logue S.E., Gorman A.M., Samali A., 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* **7**, 880-885.

Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H., 2013. 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.

Thompson M.R., Xu D., Williams B.R., 2009. ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *J. Mol. Med. (Berl.)* **87**, 1053-1060.

Toebak M.J., Gibbs S., Bruynzeel D.P., Scheper R.J., Rustemeyer T., 2009. Dendritic cells: biology of the

skin. *Contact dermatitis* **60**, 2-20.

Uchino T, Takezawa T, Ikarashi Y, Nishimura T. 2011. Development of an Alternative Test for Skin Sensitization Using a Three-dimensional Human Skin Model Consisting of Dendritic Cells, Keratinocytes and Fibroblasts. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation* **16**, 1-8.

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H., 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* **71**, 337-351.

Urano, A., Motohashi, H., 2011. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. *Nitric Oxide* **25**, 153–160.

Watanabe K., Matsuda M., Furuhashi S., Kimura T., Matsunaga T., Yamamoto I., 2001. Skin reaction induced by aldehydes for food flavoring agents. *J. Health. Sci.* **47**, 327-329.

Weber FC, Esser PR, Müller T, Ganesan J, Pellegatti P, Simon MM, Zeiser R, Idzko M, Jakob T, Martin SF., 2010. Lack of the purinergic receptor P2X<sub>7</sub> results in resistance to contact hypersensitivity. *J Exp Med.* **207**, 2609-2619.

Weber FC, Németh T, Csepregi JZ, Dudeck A, Roers A, Ozsvári B, Oswald E, Puskás LG, Jakob T, Mócsai A, Martin SF. , 2015. Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *J Exp Med.* **212**, 15-22.

Yamagishi S.I., Edelstein D., Du X.L., Kaneda Y., Guzmán M., Brownlee M., 2001. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **276**, 25096-25100.

Yoshida Y., Sakaguchi H., Ito Y., Okuda M., Suzuki H., 2003. Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line. *Toxicol. In Vitro* **17**, 221-228.

Yusuf N., Nasti T.H., Huang C.M., Huber B.S., Jaleel T., Lin H.Y., Xu H., Elmetts C.A., 2009. Heat shock proteins HSP27 and HSP70 are present in the skin and are important mediators of allergic contact hypersensitivity. *J Immunol.* **182**, 675-83.

## 付録 本論文で評価した化学物質の構造

物質名	構造	物質名	構造
Oxazolone (OXA)		Formaldehyde	
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one solution		4-(Methylamino)phenol sulfate	
Tetrachlorosalicylanilide (TCSA)		Methyldibromoglutaronitrile	
4-Nitrobenzylbromide (4-NBB)		Isoeugenol	
2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB)		Glyoxal	
2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)		Bisphenol A-diglycidyl ether	
Glutaraldehyde		2-Mercaptobenzothiazole (MBT)	
1,4-Dihydroquinone		3-Dimethylaminopropylamine	
p-Phenylenediamine (PPD)		Ethylene diamine	
Phthalic anhydride (PA)		Benzyl salicylate	
Hexyl salicylate		Cinnamic aldehyde	
Benzoyl peroxide		3-Propylenephthalide	
Lauryl gallate		Farnesol	
Propyl gallate (PG)		Squaric acid	
Cobalt chloride	$\text{CoCl}_2$	Clotrimazole	



物質名	構造	物質名	構造
Tetramethylthiuram disulfide		Benzyl cinnamate	
Resorcinol		Lilial	
Diethylenetriamine		Dibutyl aniline	
4-Chloroaniline		Pentachlorophenol	
Damascone		Phenyl benzoate	
Undec-10-enal		Cinnamic alcohol (CinA)	
12-Bromo-1-dodecanone		Cyclamen aldehyde	
Tocopherol		Imidazolidinyl urea	
1-Bromohexane (BH)		Undecylenic acid	
Ethylhexylacrylate (EHA)		Ethylene glycol dimethacrylate	
Hexyl cinnamic aldehyde (HCA)		Penicillin G	
Citral		Butyl glycidyl ether	
Eugenol		Hydroxycitronellal	
Abietic acid		Citronellole	
Benzyl benzoate		Isopropyl myristate	

物質名	構造	物質名	構造
Bis-GMA		Hexane	
Tridecane		Isopropanol	
Limonene		Lactic acid (LA)	
1-Bromobutane (BB)		Methyl salicylate (MS)	
1-Butanol		Octanoic acid (OA)	
4-Hydroxybenzoic acid		Propylene glycol	
Acetanisole		Saccharin	
Benzalkonium chloride (BKC)		Salicylic acid (SA)	
Benzylbutylphthlate		Sodium lauryl sulfate (SLS)	
Chlorobenzene (CB)		Sulfanilamide	
Dibutyl phthalate		Vanillin	
Diethyl phthalate (DEP)		Zinc sulfate	$ZnSO_4$
Dimethyl formamide			
Glycerol			
Hexadecyltrimethylammonium bromide			

## 謝辞

本論文の作成にあたり、多大なるご支援、ご助言を賜りました、東京大学大学院 農学生命科学研究科 食糧化学研究室准教授 戸塚 護 先生に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に当たり、多くのご指導・ご助言を賜りました、花王株式会社 西山直宏 博士、坂口 斉 博士、宮澤 正明 博士、山本 祐子 博士に厚く感謝申し上げます。

本研究の遂行に当たり、多くの技術的援助を賜りました、東京大学大学院 理学系研究科 竹之内 修 氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行ならびに論文の作成を陰ながらサポートしてくれた家族に、この場を借りて感謝申し上げます。