

博士論文

皮膚感作性物質の混合影響

平成 26 年 9 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

森本 隆史

目次

第 1 章：緒論

1. 化学物質の分類と管理 1
2. 化学物質の混合影響 1
3. 皮膚感作性反応 3
4. 皮膚感作性物質の分類 5
5. 本研究の目的 5

第 2 章：皮膚感作性における混合影響

第 1 節；モルモットを用いた皮膚感作性反応の混合影響

1. 緒言 9
2. 材料と方法 11
3. 結果 14
4. 考察 17

第 2 節；マウスを用いた皮膚感作性反応の混合影響

1. 緒言 34
2. 材料と方法 35
3. 結果 37
4. 考察 39

第3章：皮膚感作性物質の抗原形成とその分類

| | |
|----------|----|
| 1. 緒言 | 53 |
| 2. 材料と方法 | 55 |
| 3. 結果 | 57 |
| 4. 考察 | 59 |

第4章：皮膚感作性物質による皮膚樹状細胞の応答とその分類

第1節；マウス耳介における皮膚樹状細胞サブタイプマーカーの発現と皮膚感作性物質の投与回数との関係

| | |
|----------|----|
| 1. 緒言 | 67 |
| 2. 材料と方法 | 68 |
| 3. 結果 | 70 |
| 4. 考察 | 70 |

第2節；Langerin をマーカーとした皮膚感作性物質に対する皮膚樹状細胞の応答の比較

| | |
|----------|----|
| 1. 緒言 | 72 |
| 2. 材料と方法 | 73 |
| 3. 結果 | 76 |
| 4. 考察 | 77 |

第5章：総合考察

| | |
|------|----|
| 要約 | 90 |
| 謝辞 | 93 |
| 引用文献 | 94 |

第1章：緒論

1. 化学物質の分類と管理

化学物質は、農薬、医薬品、食品添加物だけでなく、日用品やハイテク機器等にも利用されており、我々の生活および社会に大きく貢献している。

化学物質を安全に使用するには、事前にその安全性を評価し、必要に応じた対策を講じることが重要であり、化学物質の審査および製造等の規制に関する法律（厚生労働省・経済産業省・環境省、2004）、欧州 REACH（化学物質の登録、評価、許可および制限に関する規則, European Chemicals Agency, 2008）、米国 TSCA（U.S. Environmental Protection Agency, 1991）など、国ごとに、危険な化学物質の管理および規制がなされている。最近では、貿易等によって危険化学物質が国境を越えて移動するため、国際的な基準あるいは規制が求められている。「GHS: Globaly Harmonized System」（United Nations, 2013）は、そのような国際基準の一つであり、化学物質は、健康、環境および物理化学的危険有害性に応じて分類されている。GHS の健康に対する有害性の項目の一つに、“皮膚感作性”がある。

2. 化学物質の混合影響

混合影響とは、複数の化学物質に曝露した場合に現れる毒性・効力のことである。化学工場では、複数の化学物質を同時に使用したり、化学物質同士を混合させて使用する場合があります。化学物質を安全に使用するには、混合影響の理解が極めて重要である。すなわち、混合操作後に現れる毒性を予測し、事前に対策することが望ましい。このような背景から、混合影響に関する注目度は高く、これまでも欧米を中心に活発に議論が行われてきた（EU Science Commitees,

2011; U.S. EPA, 2003)。

毒性における混合影響には、次のような報告がある。トルエンと m-キシレンの混合吸入では、肝細胞の小胞体増殖にて相乗効果が認められたが、m-キシレンと 2-ブタノールの混合では何ら混合影響は認められなかった (Rydzynski et al., 1992; Koesak et al., 1994)。硫酸とオゾンの混合吸入では、マクロファージ数では拮抗効果を、壊死細胞数では相加効果を認め、硫化ナトリウムと二酸化窒素を混合吸入した場合、化学物質の吸入濃度に依存して変化することが知られている肺のコラーゲン合成率や気管支洗浄液中のタンパク量で相乗効果を認めた (Schlesinger et al., 1992; Last and Warren, 1987)。

これら報告を基に、欧州委員会 (European Commission) は "Toxicity and Assessment of chemical mixture" という報告書を発表し、そのなかで混合影響に関して以下のような考察がなされている (EU Science Committees, 2011)。

- ・ 共通の作用機序 (mechanism of action または mode of action) をもった化学物質同士では共同に作用して、個々の要素が単独で及ぼす影響から予想外の影響が現れる可能性がある。また、その影響は用量/濃度加算によって予測することができるかもしれない。
- ・ 異なる作用機序をもつ化学物質同士では、それぞれの化学物質の影響が独立して発現する。
- ・ 混合影響は、作用機序が重要であるものの、それが十分把握されている化学物質は非常に限定的で少ない。
- ・ 混合影響の相互作用には、相加、相乗、および拮抗効果があり、通常、それらは曝露量に比例して中または高用量で発現しやすい。

現在、毒性における混合影響に関しては、公的機関により既知の情報調査（EU Science Committees, 2011; U.S. EPA, 2003）が行われた状況であり、これら調査結果を受けて、欧州化学物質生体毒性および毒性センター（ECETOC）では混合影響の評価方法の確立に向けた取り組みが始められている。

3. 皮膚感作性反応

毒性とは、化学物質が生物に悪影響を与える性質のことで、「一般毒性」と「特殊毒性」の2つに分けられる（食品安全委員会, 2008）。一般毒性は、化学物質を経口や吸入などの経路で単回もしくは複数回曝露した後、血液検査、尿検査、病理組織学的検査などの一般的な方法で観察できる毒性である。一方、特殊毒性は、特殊な投与方法もしくは評価方法を用いることで評価ができる毒性であり、その中に皮膚で起こるT細胞を介した遅延型過敏反応の皮膚感作性反応（アレルギー性接触皮膚炎）がある（野村ら、2008）。アレルギー性接触皮膚炎を引き起こす化学物質を皮膚感作性物質と呼び、化学物質が皮膚感作能を有するかどうかを調べる試験が皮膚感作性試験である（技術情報協会, 1999）。皮膚感作性物質の例として、毛髪染色液中のpara-phenylenediamine (CAS No. 16245-77-5)、ピアスや金属製ボタンなどに含まれるニッケル、うるしの主成分であるウルシノール (CAS No. 53237-59-5) などがよく知られており (Rycroft et al., 1992)、一般成人の20%以上が何らかの皮膚感作性物質に対して反応するとの報告もある (Nielsen et al., 2002)。

皮膚感作性反応の特徴として、化学物質に特異的な反応であること、個人差が大きいこと、一度感作（免疫）が成立すると非常に低濃度（数 ppm）でも発症すること、類似構造の化学物質にも応答する交差反応がみられることなどが挙げられる（技術情報協会, 1999; Johansen et al., 2011）。化学工場では、作業

者は皮膚を介して化学物質に曝露される機会が多く、アレルギー性接触皮膚炎が最も高頻度で発症する職業病となっている。EUでは、このような皮膚感作性反応に関係する労働損失日数が年間 300 万日にもものぼり、6 億ユーロもの損失になると見積られ、多くの労働者は職を変えざるを得ない状況になっている (European Agency for Safety and Health at work, 2003)。そのため、化学物質を取り扱う場合には、その化学物質が皮膚感作性物質であるかどうか、皮膚感作性物質であればどの程度の皮膚感作能を有しているかを事前に確認して、皮膚感作性反応の発症を避けるために、低濃度での取扱いや保護具着用による曝露の低減を心懸けることが極めて重要である (Rycroft et al., 1992; European Agency for Safety and Health at work, 2003)。

皮膚感作性反応が発症するまでの過程は、感作相と誘発相の 2 つに大きく分けられる (図 1)。感作相の反応は、まず化学物質が皮膚内へと浸透し、皮膚内に局在するタンパク質と安定的な結合物である抗原 (化学物質-タンパク質複合体) を形成して、表皮樹状細胞 (ランゲルハンス細胞) や真皮樹状細胞によって処理される。その後、両樹状細胞は活性化され、皮膚からリンパ節へと移動する。なお、化学物質-タンパク質複合体は、ケラチノサイトを活性化させることでも樹状細胞に作用することが報告されている (OECD, 2012)。次に、樹状細胞が移動したリンパ節では、化学物質-タンパク質複合体を含んだ主要組織適合遺伝子複合体分子 (MHC) が、樹状細胞から naïve T 細胞に提示されることで、化学物質特異的なメモリー T 細胞の分化・増殖が誘導される。

誘発相の反応は、感作相を経た化学物質と同じ物質に曝されることで、化学物質-タンパク質複合体が再度形成されて、それが表皮樹状細胞もしくは他の抗原提示細胞に取り込まれていく。活性化メモリー T 細胞は、皮膚樹状細胞を介して炎症性サイトカインや細胞障害性 T 細胞などを誘導するサイトカインを放出

する。その後、皮膚へと誘導された細胞傷害性 T 細胞などにより、発赤、腫れ、痒みあるいは痛みなど局所性の炎症反応を呈することとなる (OECD, 2012)。

このように皮膚感作性物質に曝露すると、皮膚感作性物質に特異的な反応が進み、化学物質に対して特異的に応答する免疫反応 (皮膚感作性反応) の獲得に至る。

4. 皮膚感作性物質の分類

皮膚感作性物質は、誘発相に誘導されるサイトカイン種により、T-helper 1 (Th1) 型と T-helper 2 (Th2) 型の 2 種類に分けられる。例えば、マウスに皮膚感作性物質を塗布した後、リンパ節で産出されるサイトカイン種を比較すると、2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) では INF- γ や IL-12 といった Th1 型のサイトカインが、toluene diisocyanate (TDI) では、IL-10 や IL-4 といった Th2 型のサイトカインが産生される (Dearmen et al., 1996, 1999, 2002; Hayashi et al., 2001)。これら実験結果から、DNCB は Th1 型皮膚感作性物質、TDI は Th2 型皮膚感作性物質に分類される。また、これら型の異なる皮膚感作性物質間では、生じる皮膚感作性反応も異なることが考えられる。例えば、ジフテリア・破傷風・百日咳三種混合ワクチンは、Th2 型皮膚感作性物質に対する応答を減少させるが、Th1 型皮膚感作性物質に対しては応答を増悪させること (Vandebriel et al., 2007)、皮膚感作性物質ではない化学物質 Di butyl phthalate と di-n-propyl phthalate は、Th2 型皮膚感作性物質に対する感作性応答を増強するが、Th1 型皮膚感作性物質に対しては影響しない (Matuda et al., 2010) と報告されている。

5. 本研究の目的

化学物質の毒性における混合影響を把握することは重要と考えられているが、

その情報は、一般毒性である吸入毒性試験（Rydzynski et al., 1992; Koesak et al., 1994; Schlesinger et al., 1992; Last and Warren, 1987）が中心で、皮膚感作性において、その情報は極めて少ない。皮膚感作性反応は化学物質に特異的な反応であり、吸入毒性とは「特異性」の点で大きく異なるため、吸入試験と同様の混合影響が起こりうるかどうかでさえ予想できない。

混合影響は、化学工場などの特殊な場合だけでなく、我々の日常生活においても存在する。すなわち、農薬・動物用医薬品および医薬品等の製剤は、有効成分、防腐剤、界面活性剤、増粘剤あるいは消泡剤など多くの組成成分からなる混合物である。したがって、農薬・動物用医薬品および医薬品等を開発・販売するためには、その有効成分に加え、混合影響を考慮した混合物の安全性を評価することが必須である（農林水産省, 2001; 厚生労働省, 1989）。多種多様な組成や濃度の混合物が日々開発されていることを考えると、その膨大な数の混合物それぞれに対して検討を加えるのではなく、「混合される化学物質それぞれの毒性情報から、混合影響を正確かつ科学的に予測して、安全な混合物を効率的に生み出すこと」が得策である。

このような背景から、本研究の目的は、まず皮膚感作性物質による混合影響の有無を明らかにし、続いてその結果から、化学物質単一の皮膚感作性情報から混合影響の発現を科学的に予測する方法を構築することである。

混合影響を左右する要因には、混合のタイミング、混合する化学物質の組み合わせや濃度など、様々な条件が考えられる。皮膚感作性における混合影響を考えるにあたっては、その発症に大きく影響する感作相で化学物質を混合することによる影響（本論文における皮膚感作性における混合影響）を理解することが重要である。

Th1 および Th2 型皮膚感作性物質を用いて、皮膚感作性物質の組み合わせを

対象とした感作相での混合影響を調査し、混合影響の動物種差について検討も加えることとした（第2章）。次に、混合影響の発現の予測に重要と考えられる感作相での作用機序について、皮膚感作性物質ごとの検討を加えた。すなわち、感作相における作用機序の1つである皮膚感作性物質の抗原形成について調査を行なった（第3章）。さらに、皮膚樹状細胞の活性化および皮膚からリンパ節への移動について調査した（第4章）。得られた結果をもとに、「化学物質の単一の皮膚感作性情報から、混合影響の発現を予測する方法」について総合的に考察した（第5章）。

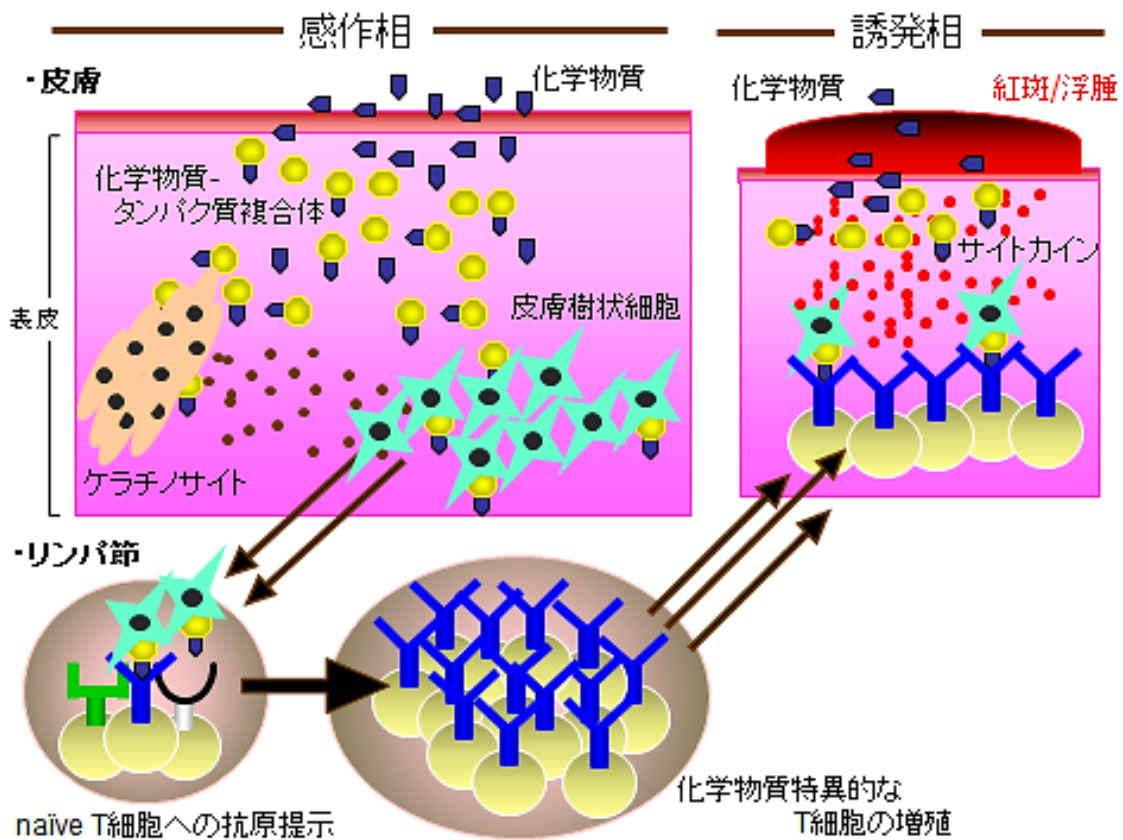


図1. 皮膚感作性反応発症の過程

化学物質は皮膚内へと浸透し、皮膚中のタンパク質と反応して、化学物質-タンパク質複合体を形成する。タンパク質複合体は、皮膚樹状細胞および角化細胞（ケラチノサイト）により、処理される。タンパク質複合体は、皮膚樹状細胞により、皮膚からリンパ節に運ばれ、リンパ節内で化学物質に特異的に応答するT細胞の選択および増殖が起こる。化学物質に対して特異的に反応するT細胞の増殖が起こった状況で、再び同じ化学物質が曝露すると、化学物質に対して特異的なT細胞が反応し、サイトカインなどを放出し、炎症細胞が誘導されることで、皮膚表面に紅斑・浮腫の反応（皮膚感作性反応）を呈する。

第2章 皮膚感作性における混合影響

第1節 モルモットを用いた皮膚感作性反応の混合影響

1. 緒言

化学物質の皮膚感作能の評価は、古くから動物実験により行なわれてきた。その試験方法は、モルモットを用いた試験が最も一般的であり、Draize test (FDA, 1959), Maximization test (Magnusson et al., 1969), Buehler test (Buehler, 1965), Adjuvant and Patch test (Sato et al., 1981) など様々な方法がある。これらの試験方法から、化学物質の用途やその物質の溶媒への溶解度などを基に適切な方法を選択し、化学物質の皮膚感作能を評価することが重要である。なかでも Guinea Pig Maximization Test (以下、マキシマイゼーション試験) は、免疫増強剤を使用する試験であることから、医薬品、農薬などを対象とした試験において、最も感度が高く、信頼性の高いものと考えられている (高瀬ら, 1983)。これまで、皮膚感作性の混合影響について、混合物質の組み合わせを対象とした詳細な調査はなされておらず、本節では Th1 および Th2 型皮膚感作性物質の同時混合曝露の影響について、その組み合わせを中心に、各皮膚感作性物質に対する誘発反応の変化を調査することにした。

第1章で皮膚感作性反応について述べたとおり、通常、皮膚感作性反応は化学物質特異的に起こる反応であるが、類似構造の化学物質に対しては、特異性を超えて応答する交差反応と呼ばれる現象がみられる場合がある (Johansen et al., 2011)。例えば、para-phenylenediamine (CAS No.106-50-3) は、Hydroquinone (CAS No.123-31-9) と交差反応を示すことが良く知られている (Basketter and Liden, 1992b)。混合する皮膚感作性物質間に交差反応が存在すると、誘発反応に交差反応の影響が含まれることから、本章の目的である誘発反応の変化によ

り、混合影響を確認することが不可能になる。つまり、混合する皮膚感作性物質間に交差反応がないことを確認することが必要であり、マキシマイゼーション法は、化学物質間の交差反応性を適切に評価できる試験法である（To-o et al., 2010）。本節では、混合影響については、4つの皮膚感作性物質（DNCB、Oxa、PA および TDI）を用いることとしているが、これら化学物質間の交差反応についてこれまで報告はない。

以上の背景から、マキシマイゼーション法にて、まず混合する皮膚感作性物質間の交差反応の有無を確認した上で、誘発反応の変化によって混合影響の有無を確認することとした。

2. 材料と方法

(1) 皮膚感作性物質

本章では、Th1 型の代表的な皮膚感作性物質として 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB ; 和光純薬工業株式会社、大阪、日本) および oxazolone (Oxa ; Sigma-Aldrich、St Louis、Mo、USA) を、Th2 型皮膚感作性物質として phthalic anhydride (PA; ナカライテスク株式会社、京都、日本) および toluene diisocyanate (TDI ; 和光純薬工業株式会社、大阪、日本) を用いた。なお、使用した皮膚感作性物質について、既知の感作性情報および化学物質構造は、それぞれ表 1 および図 2 に示した。

(2) 供試動物

供試動物には、モルモット [Hartley (SPF) ; 日本 SLC、大原、日本] を用いた。なお、試験時の週齢は、5~7 週齢であった。動物は、前・床面ステンレス網で壁面アルミ製の懸垂式ケージ (W450×D550×H350 mm) に 5 匹以内で収容した。給餌については、モルモット用固型飼料 (ラボ G スタANDARD、日本農産工業株式会社) を自由摂取とするとともに、給水については濾過した水道水を自動給水装置を介して自由に飲水させた。飼育は、気温 20~24℃、湿度 30~70%とし、照明時間 12L12D (8:00~20:00)、換気回数 10 回以上/時間に設定した動物室内で行った。

(3) マキシマイゼーション試験

試験は Control 群、各皮膚感作性物質単一群および混合群 (例 : DNCB と Oxa の混合の場合、Control 群、DNCB 群、Oxa 群、DNCB+Oxa 群) の 4 群を設け、各群 5 匹とした。また、試験方法については、OECD テストガイドライン 406

(OECD, 1992) に準じて実施した。すなわち、動物に一次感作および二次感作の順で化学物質の投与を行い、感作を成立させた後、誘発操作を行い、誘発部位の皮膚感作性反応を評価した (図 3)。なお、投与濃度設定のための予備試験を事前に実施した。それぞれの皮膚感作性物質ごとに 4 匹以上の動物を用いて、数濃度の化学物質液を皮内投与もしくは経皮投与し、投与部位の反応を観察した。その結果から、感作濃度は軽度～中等度の刺激性を示す濃度もしくは調製可能な最大濃度、誘発濃度は無刺激の濃度を使用した (表 2)。

一次感作は、注射用水と Freund's complete adjuvant (FCA) の 1:1 乳化液、化学物質コーンオイル液、化学物質 FCA 液と注射用水の 1:1 乳化液の順で 0.1 mL/site を各 2 箇所皮内投与した。なお、投与部位は、動物の背部肩甲骨上 (約 4cm×6cm) を刈毛し、正中線を挟んだ刈毛部位の両側の上部・中部・下部とした (図 3)。二次感作は、一次感作の 1 週間後に行った。化学物質のアセトン溶液 0.4mL を含ませたリント布 (2×4 cm) を一次感作投与部位に貼付し、サージカルテープ (Micropore および Blenderm, 3M Co., Saint Paul, U.S.A) にて 48 時間覆った。誘発は、二次感作の 2 週間後、化学物質のアセトン溶液を 0.1 mL/site の割合で塗布した。誘発部位の皮膚反応は、紅斑と浮腫に分けて、塗布 24、48 および 72 時間後に表 3 の判定基準に従って採点した。陽性率は、以下の式により算出した。また、各観察時間における紅斑および浮腫の評点を合計し、観察回数で除した平均評点を動物ごとに算出した後、群ごとの平均値を求めた (Nakamura et al., 1998)。

$$\text{陽性率} = \frac{\text{観察期間に陽性反応を認めた感作動物数}}{\text{感作動物数}} \times 100$$

(4) 統計処理

統計解析は、StatLight#05 version 2 (Yukms Co., Ltd., 東京, 日本)を用いた。平均評点における混合影響については、F 検定による等分散検定を行ない、等分散の場合は皮膚感作性物質単一群と混合群との間で student's t-test を、不当分散の場合にはウェルチ (Welch) の 2 群検定を行なった。なお、検定はいずれの場合も両側検定を行い、有意水準は 5%および 1%で評価した。

(5) 動物福祉

本実験は、住友化学株式会社 生物環境科学研究所の「生物環境科学研究所における実験動物に関する規定」に従い、実施した。

3. 結果

(1) Th1 型 (DNCB と Oxa) の混合影響

DNCB で感作（一次感作：0.025%、二次感作：0.25%）した DNCB 群では、0.001%～0.1%の DNCB に対して皮膚感作性陽性反応を示したものの、Oxa に対してはいずれの濃度においても反応は認められなかった（表 4）。また、Oxa で感作（一次感作：0.05%、二次感作：12.5%）した Oxa 群では、0.00001%～0.1%の Oxa に対して皮膚感作性陽性反応が示されたが、DNCB に対してはいずれの濃度においても反応は認められなかった（表 4）。DNCB と Oxa の混合液で感作した DNCB+Oxa 群では、0.01%～0.1%の DNCB および 0.0001%～0.1%の Oxa に対して皮膚感作性陽性の反応が認められた（表 4）。

DNCB に対する感作性反応を DNCB 群と DNCB+Oxa 群で比較した。図 4 では縦軸に陽性率、横軸に誘発濃度として、各群における DNCB の誘発濃度と陽性率の関係を纏め、混合による陽性率の変化を示した。0.01% DNCB に対し、DNCB 群ですべての動物において陽性反応（陽性率 100%）が認められたが、DNCB+Oxa 群では 5 例中 2 例においてのみ反応（陽性率 40%）が認められた（表 4 および図 4）。また、0.001%DNCB に対しては、DNCB 群で 5 例全例に陽性反応（陽性率 100%）が認められたが、DNCB+Oxa 群では何ら反応は認められなかった（表 4 および図 4）。DNCB の各誘発濃度における平均評点について、DNCB 群と DNCB+Oxa 群間で比較した結果、DNCB+Oxa 群の反応は、0.01%および 0.001%濃度において有意に低減（ $p < 0.01$ ）していることが示された（表 4）。

Oxa に対する感作性反応を Oxa 群と DNCB+Oxa 群で比較したところ、0.0001%Oxa に対して、Oxa 群および DNCB+Oxa 群ともにすべての動物で陽性反応（陽性率 100%）を示した（表 4 および図 5）。しかし、0.00001%Oxa に対しては、Oxa 群で 5 例中 3 例に陽性反応（陽性率 60%）を示したが、DNCB+Oxa

群では何ら反応は認められなかった（表 4 および図 5）。Oxa の各誘発濃度における平均評点について、Oxa 群と DNCB+Oxa 群間で比較した。その結果、DNCB+Oxa 群の反応は、0.1%、0.001%、0.0001%および 0.00001%濃度において、有意に低減（ $p<0.05$ および $p<0.01$ ）していることが示された（表 4）。

(2) Th1 および Th2 型（DNCB と PA）の混合影響

DNCB で感作（一次感作：0.025%、二次感作：0.25%）した DNCB 群では、0.001%～0.1%の DNCB に対して皮膚感作性反応を認めたが、PA に対してはいずれの濃度においても反応は認められなかった（表 5）。また、PA で感作（一次感作：0.1%、二次感作：5%）した PA 群では、0.01%～10%の PA に対して皮膚感作性反応を認めたが、DNCB に対してはいずれの濃度においても反応は認められなかった（表 5）。DNCB と PA の混合液で感作した DNCB+PA 群では、0.001%～0.1%の DNCB および 0.1%～10%の PA に対して皮膚感作性陽性の反応が認められた（表 5）。

DNCB に対する感作性反応を DNCB 群と DNCB+PA 群で比較した。陽性反応を示した 0.1～0.001%のいずれの誘発濃度においても、陽性反応を示した動物数は両群で同じであった（表 5 および図 6）。両群の間における平均評点を比較したところ、いずれの濃度においても有意な変化は認められなかった（表 5）。

PA に対する感作性反応を PA 群と DNCB+PA 群で比較した場合、0.1%PA に対しては、PA 群および DNCB+PA 群ともに 5 例全例に陽性反応（陽性率 100%）を認め、0.01%に対して、PA 群で 5 例中 1 例に陽性反応（陽性率 20%）を認めたが、PA 群では 5 例全例に反応は認められなかった（表 5 および図 7）。平均評点に関して、いずれの誘発濃度においても両群間で有意な変化は認められなかった（表 5）。

(3) Th2 型 (PA と TDI) の混合影響

PA で感作 (一次感作 : 0.1%、二次感作 : 5%) した PA 群では、0.01%~10% の PA に対して皮膚感作性反応を認めしたが、TDI に対してはいずれの濃度においても反応は認められなかった (表 6)。また、TDI で感作 (一次感作 : 0.005%、二次感作 : 5%) した TDI 群では、0.001%~0.1% の TDI に対して皮膚感作性反応が認められたが、PA に対してはいずれの濃度においても反応は認められなかった (表 6)。PA と TDI の混合液で感作した PA+TDI 群では、0.1%~10% の PA と 0.001%~0.1% の TDI に対して皮膚感作性反応が認められた (表 6)。

PA に対する感作性反応を PA 群と PA+TDI 群で比較した。0.1%PA に対して、PA 群で 5 例全例 (陽性率 100%)、PA+TDI 群で 5 例中 2 例 (陽性率 40%) に陽性反応を認め、0.01%PA では、PA 群で 5 例中 2 例に陽性反応 (陽性率 40%) を認めしたが、PA+TDI 群では何ら皮膚反応は認められなかった (表 6 および図 8)。PA の各誘発濃度における平均評点を PA 群と PA+TDI 群で比較した。その結果、PA+TDI 群の反応は、10% で有意な低減 ($p < 0.05$) を認め、1%、0.1% および 0.01% 濃度においても減少傾向を認めた (表 6)。

TDI に対する感作性反応を TDI 群と PA+TDI 群とで比較した場合、0.01%TDI に対して、TDI 群、PA+TDI 群ともに 5 例全例に陽性反応 (陽性率 100%) を認め、0.001%TDI に対して、PA+TDI 群で 5 例中 3 例 (陽性率 60%) に、TDI 群では 5 例中 1 例 (陽性率 20%) に陽性反応が認められた (表 6 および図 9)。両群の間において、平均評点を比較したところ、いずれの濃度においても有意な変化は認められなかった (表 6)。

4. 考察

本節の目的は、皮膚感作性物質を混合して感作した後、各皮膚感作性物質に対する誘発反応の変化によって、混合影響の有無を評価することである。しかしながら、皮膚感作性反応では構造が類似した化学物質にも反応を示す交差反応と呼ばれる現象があり、まず本節で使用した化学物質間において、交差反応がないことを確認する必要がある。本節の結果から、DNCBで感作した動物ではOxaおよびPAに対して、PAで感作した動物ではDNCBおよびTDIに対して、Oxa群ではDNCBに対して、TDI群ではPAに対して反応を認めなかった（表4, 5, 6）。以上の結果から、DNCBとOxa、DNCBとPA、TDIとPAにおいては、交差反応がないことが明らかとなった。

混合影響に関しては、Th1型同士（DNCBとOxa）およびTh2型同士（PAとTDI）の組み合わせで混合した場合、混合影響が示された（表4, 6, 図4, 5, 8, 9）。また、混合により皮膚感作性反応が低減していたことから、その混合効果は拮抗効果であった。本節では、それぞれの単一群で明らかな皮膚感作性反応が起こる高濃度での混合影響を評価した。同型の皮膚感作性物質であれば、類似の反応が進むと考えられ、皮膚感作性物質を混合することによる拮抗効果は、抗原形成に関わる皮膚中のタンパク質や皮膚樹状細胞の取り合い（競合）のように、皮膚感作性発症過程において拮抗により引き起こされることが想定される。

一方、Th1型（DNCB）とTh2型（PA）の組み合わせでは、皮膚感作性反応の変化は示されなかった（表5, 図6および7）。PAとDNCBでは誘導されるサイトカインが異なることが判明している（Hayashi et. al., 2001; De Jong et al., 2009）。また、Meekら（2011）は、混合する化学物質の作用機序が異なっている場合などでは、それぞれの毒性が独立して発現すると述べている。

本節の試験は、感作相でのみ混合操作を行なったもので、DNCBとPAは皮膚

感作性発症における感作相の作用機序、つまり標的細胞・組織がそれぞれ異なり、独立していることが示唆された。

以上のことから、マキシマイゼーション試験において同型の皮膚感作性物質を混合することで皮膚感作性においても混合影響が生じることが明らかとなった。

表 1. 試験に使用した皮膚感作性物質

| 化学物質名 | 略語 | CAS No. | 皮膚感作性情報 ^{a)} | |
|--------------------------|------|-------------|-----------------------|-----------------|
| | | | モルモット | マウス |
| 2,4-dinitrochlorobenzene | DNCB | 97-00-7 | + | + ^{b)} |
| oxazolone | Oxa | 15646-46-65 | + | + ^{b)} |
| phthalic anhydride | PA | 85-44-9 | + | + ^{c)} |
| toluene diisocyanate | TDI | 584-84-9 | NA | + ^{c)} |

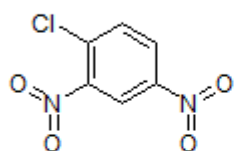
+ : 陽性、NA:Not applicable

a) van Och FM et al. (2000)

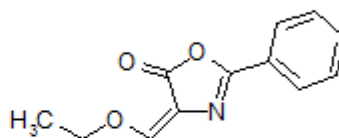
b) Th1 型サイトカインを誘導

c) Th2 型サイトカインを誘導

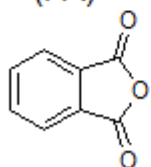
2,4-dinitrochlorobenzene
(DNCB)



oxazolone
(Oxa)



phthalic anhydride
(PA)



toluene diisocyanate
(TDI)

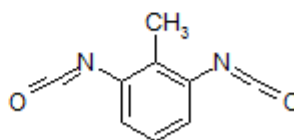


図 2. 本研究に使用した皮膚感作性物質の構造

DNCB および Oxa は Th1 型皮膚感作性物質、PA および TDI は Th2 型皮膚感作性物質である。

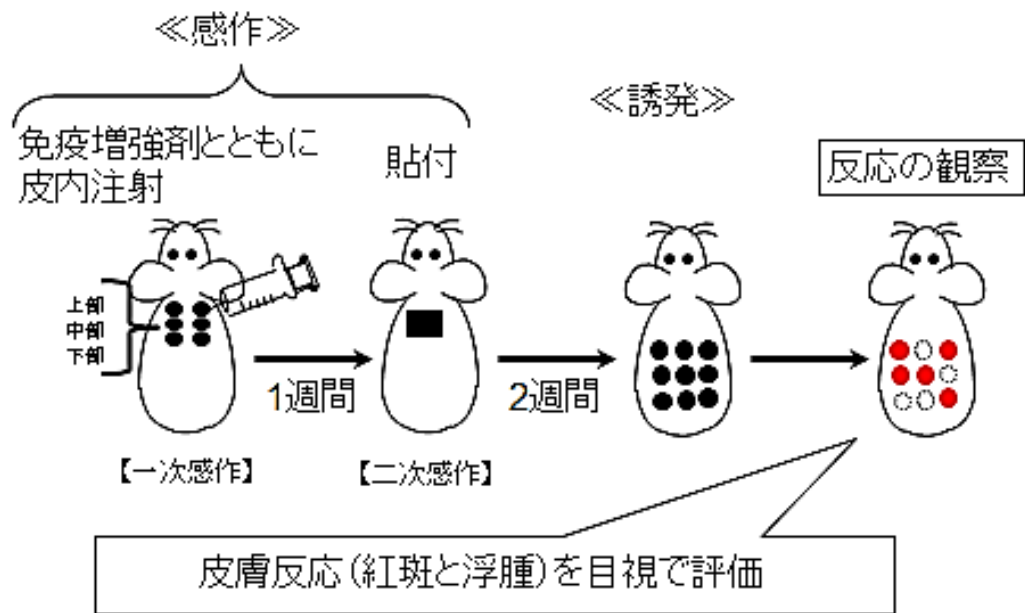


図3. モルモットを用いたマキシマイゼーション試験の概要

一次感作では、化学物質を免疫増強剤（FCA）とともに皮内に投与し、二次感作では化学物質を48時間、経皮的に閉塞貼付することで動物を免疫（感作）する。誘発は、二次感作の2週間後に化学物質を塗布する。観察は、塗布後24、48および72時間を実施する。

表 2. マキシマイゼーション試験における感作および誘発濃度

(1) Th1 型同士 (DNCB と Oxa) の混合影響

| 群 | 投与液中の最終濃度 | | |
|----------|---------------------------|----------------------|------------------------------------------|
| | 一次感作 ^{a)} | 二次感作 ^{b)} | 誘発 ^{b)} |
| Control | 溶媒 | 溶媒 | DNCB:0.00001%~0.1% Oxa:0.000001%~0.1% |
| DNCB | DNCB: 0.025% | DNCB:0.25% | DNCB:0.00001%~0.1% Oxa:0.000001%~0.1% |
| Oxa | Oxa: 0.05% | Oxa:12.5% | DNCB:0.00001%~0.1% Oxa:0.000001%~0.1% |
| DNCB+Oxa | DNCB: 0.025%+Oxa:0.05% | DNCB:0.25%+Oxa:12.5% | DNCB:0.00001%~0.1% Oxa:0.000001%~0.1% |

a) コーンオイルを溶媒に使用した。

b) アセトンを溶媒に使用した。

(2) Th1 および Th2 型 (DNCB と PA) の混合影響

| 群 | 投与液中の最終濃度 | | |
|---------|-------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| | 一次感作 ^{a)} | 二次感作 ^{b)} | 誘発 ^{b)} |
| Control | 溶媒 | 溶媒 | DNCB:0.00001%~0.1% PA:0.0001%~10% |
| DNCB | DNCB: 0.025% | DNCB:0.25% | DNCB:0.00001%~0.1% PA:0.0001%~10% |
| PA | PA: 0.1% | PA:5% | DNCB:0.00001%~0.1% PA:0.0001%~10% |
| DNCB+PA | DNCB: 0.025%+PA:0.1% | DNCB:0.25%+Oxa:5% | DNCB:0.00001%~0.1% PA:0.0001%~10% |

a) コーンオイルを溶媒に使用した。

b) アセトンを溶媒に使用した。

表 2 (続き). マキシマイゼーション試験における感作および誘発濃度

(3) Th2 型同士 (PA と TDI) の混合影響

| 群 | 投与液中の最終濃度 | | |
|---------|------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| | 一次感作 ^{a)} | 二次感作 ^{b)} | 誘発 ^{b)} |
| Control | 溶媒 | 溶媒 | PA:0.0001%~10% TDI:0.00001%~0.1% |
| PA | PA: 0.1% | PA:5% | PA:0.0001%~10% TDI:0.00001%~0.1% |
| TDI | TDI: 0.005% | TDI:5% | PA:0.0001%~10% TDI:0.00001%~0.1% |
| PA+TDI | PA:0.1% +TDI:0.005% | PA:5%+TDI:5% | PA:0.0001%~10% TDI:0.00001%~0.1% |

a) コーンオイルを溶媒に使用した。

b) アセトンを溶媒に使用した。

表 3： 皮膚反応判定基準

| 評点 | 判定基準 |
|----|-----------------|
| 0 | 変化なし |
| 1 | 境界不明瞭（軽度）な反応を示す |
| 2 | 境界明瞭（中等度）な反応を示す |
| 3 | 強度な反応を示す |

表 4. Th1 型 (DNCB と Oxa) を用いたマキシマイゼーション試験の結果

| 誘発物質 | 濃度 (%) | 群 | | |
|------|----------|--------------------------------------|----------|-----------------------|
| | | DNCB | Oxa | DNCB+Oxa |
| DNCB | 0.1 | 5/5 [*] (4.3) ^{**} | 0/5(0) | 5/5(3.9) ^b |
| | 0.01 | 5/5(2.9) | 0/5(0) | 2/5(0.3) ^a |
| | 0.001 | 5/5(0.9) | 0/5(0) | 0/5(0) ^a |
| | 0.0001 | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) |
| | 0.00001 | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) |
| | 0.1 | 0/5(0) | 5/5(4.0) | 5/5(4.5) ^c |
| Oxa | 0.01 | 0/5(0) | 5/5(3.1) | 5/5(3.0) ^e |
| | 0.001 | 0/5(0) | 5/5(2.9) | 5/5(2.3) ^c |
| | 0.0001 | 0/5(0) | 5/5(1.1) | 5/5(0.6) ^d |
| | 0.00001 | 0/5(0) | 3/5(0.3) | 0/5(0) ^c |
| | 0.000001 | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) |
| | 0.1 | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) |

DNCB 群は DNCB、Oxa 群は Oxa、DNCB+Oxa 群は DNCB と Oxa の混合液、Control 群は溶媒で感作し、各群とも DNCB (0.00001～0.1%) および Oxa (0.000001～0.1%) で誘発した。

*陽性を示した動物数/感作を行った動物数、**平均評点の平均値

^a DNCB 群と有意差 (p<0.01) がある。 ^b DNCB 群と有意差がない。

^c Oxa 群と有意差 (p<0.05) がある。 ^d Oxa 群と有意差 (p<0.01) がある。 ^e Oxa 群と有意差がない。

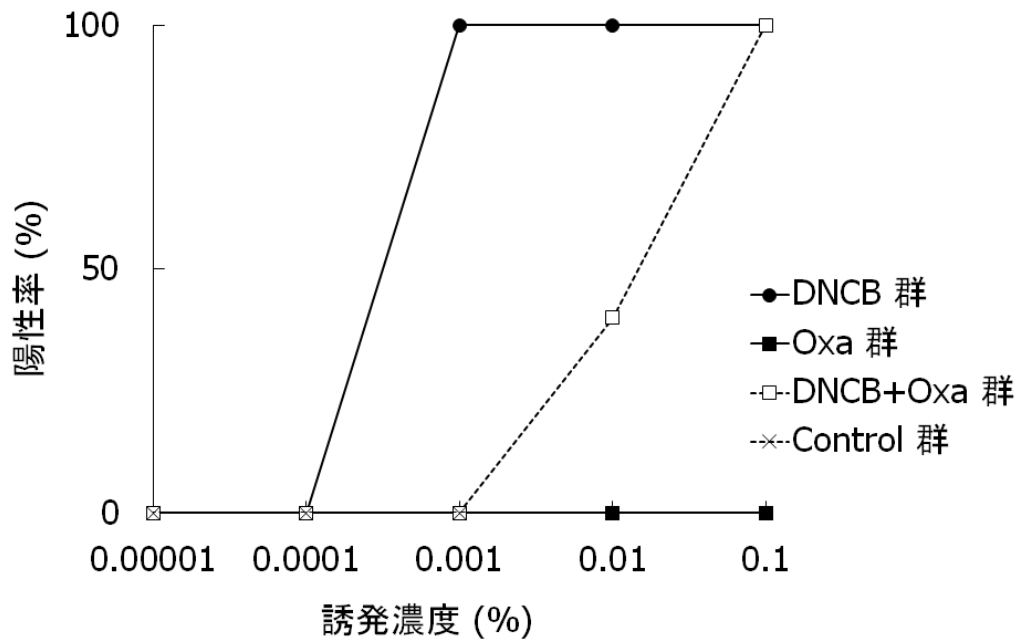


図 4. Th1 型同士 (DNCB と Oxa) の混合による DNCB の誘発濃度と陽性率の関係
 DNCB 群、Oxa 群、DNCB+Oxa 群、Control 群の 4 群を DNCB (0.00001~0.1%) で誘発した。縦軸に陽性反応を示した動物数の割合を表す陽性率 (%) を、横軸に誘発濃度を示した。

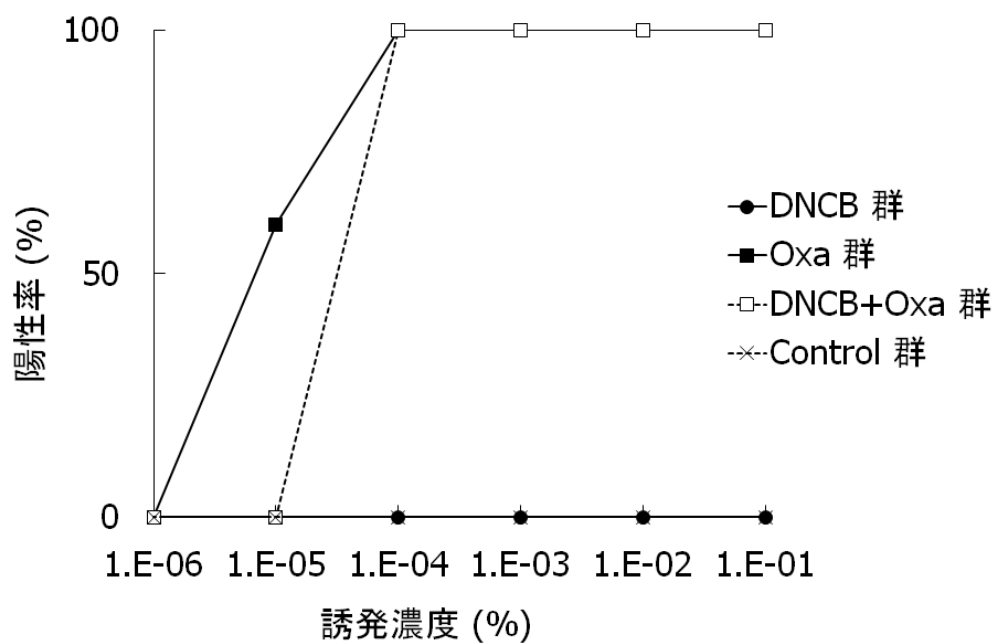


図5. Th1型同士 (DNCB と Oxa) の混合による Oxa の誘発濃度と陽性率の関係
 DNCB 群、Oxa 群、DNCB+Oxa 群、Control 群の4群を Oxa (0.000001~0.1%) で誘発した。縦軸に陽性反応を示した動物数の割合を表す陽性率 (%) を、横軸に誘発濃度を示した。

表 5. Th1 型 (DNCB) と Th2 型 (PA) を用いたマキシマイゼーション試験の結果

| 誘発物質 濃度(%) | 群 | | | |
|---------------|--------------------------------------|----------|------------------------|---------|
| | DNCB | PA | DNCB+PA | Control |
| DNCB 0.1 | 5/5 [*] (4.7) ^{**} | 0/5(0) | 5/5(4.9 ^a) | 0/5(0) |
| 0.01 | 5/5(3.3) | 0/5(0) | 5/5(2.9 ^a) | 0/5(0) |
| 0.001 | 3/5(0.5) | 0/5(0) | 3/5(0.5 ^a) | 0/5(0) |
| 0.0001 | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) |
| 0.00001 | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) |
| PA 10 | 0/5(0) | 5/5(3.7) | 5/5(3.5 ^b) | 0/5(0) |
| 1 | 0/5(0) | 5/5(2.5) | 5/5(2.5 ^b) | 0/5(0) |
| 0.1 | 0/5(0) | 5/5(1.1) | 5/5(0.8 ^b) | 0/5(0) |
| 0.01 | 0/5(0) | 1/5(0.2) | 0/5(0 ^b) | 0/5(0) |
| 0.001 | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) |
| 0.0001 | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) | 0/5(0) |

DNCB 群は DNCB、PA 群は PA、DNCB+PA 群は DNCB と PA の混合液、Control 群は溶媒で感作し、各群とも DNCB (0.00001~0.1%) および PA (0.0001%~10%) で誘発した。

*陽性を示した動物数/感作を行った動物数、**平均評点の平均値

^a DNCB 群と有意差がない。

^b Oxa 群と有意差がない。

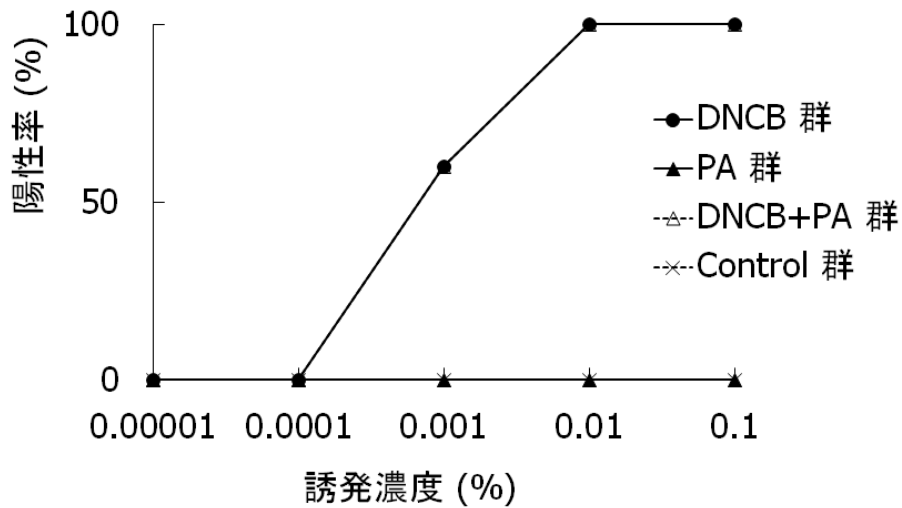


図 6. Th1 および Th2 型 (DNCB+PA) の混合による DNCB の誘発濃度と陽性率の関係
 DNCB 群、PA 群、DNCB+PA 群、Control 群の 4 群を DNCB (0.00001~0.1%) で誘発した。縦軸に陽性反応を示した動物数の割合を表す陽性率 (%) を、横軸に誘発濃度を示した。

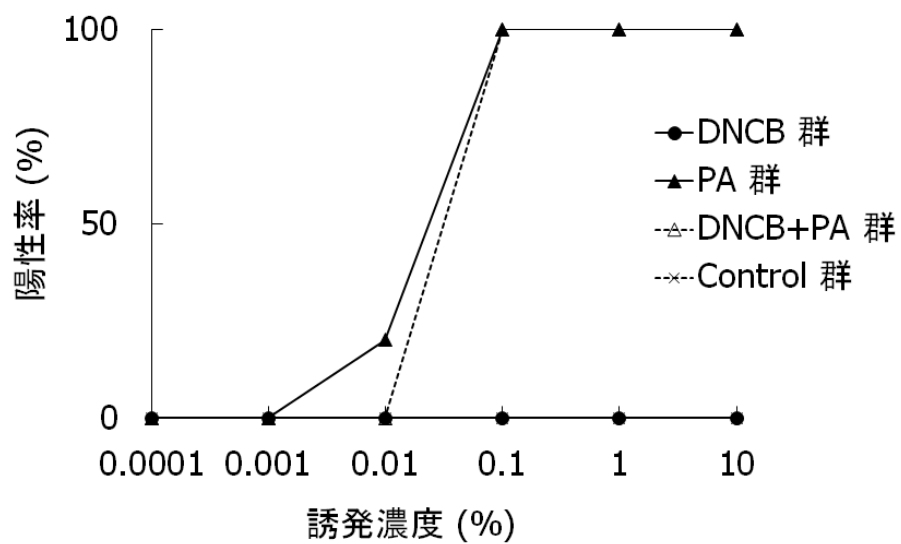


図7. Th1 および Th2 型 (DNCB と PA) の混合による PA の誘発濃度と陽性率の関係
 DNCB 群、PA 群、DNCB+PA 群、Control 群の 4 群を PA (0.0001~10%) で誘発した。
 縦軸に陽性反応を示した動物数の割合を表す陽性率 (%) を、横軸に誘発濃度を示した。

表 6. Th2 型 (PA と TDI) を用いたマキシマイゼーション試験の結果

| 誘発物質 濃度(%) | 群 | | | |
|---------------|---------------------------|------------------------|-----------|---------|
| | PA | PA+TDI | TDI | Control |
| PA 10 | 5/5 [*] (4.7) ** | 5/5 (3.4) ^a | 0/5 (0) | 0/5 (0) |
| 1 | 5/5 (2.2) | 5/5 (1.7) ^b | 0/5 (0) | 0/5 (0) |
| 0.1 | 5/5 (1.1) | 2/5 (0.6) ^b | 0/5 (0) | 0/5 (0) |
| 0.01 | 2/5 (0.2) | 0/5 (0) ^c | 0/5 (0) | 0/5 (0) |
| 0.001 | 0/5 (0) | 0/5 (0) | 0/5 (0) | 0/5 (0) |
| 0.0001 | 0/5 (0) | 0/5 (0) | 0/5 (0) | 0/5 (0) |
| TDI 0.1 | 0/5 (0) | 5/5 (4.5) ^c | 5/5 (5.1) | 0/5 (0) |
| 0.01 | 0/5 (0) | 5/5 (2.0) ^c | 5/5 (2.3) | 0/5 (0) |
| 0.001 | 0/5 (0) | 3/5 (0.5) ^c | 1/5 (0.4) | 0/5 (0) |
| 0.0001 | 0/5 (0) | 0/5 (0) | 0/5 (0) | 0/5 (0) |
| 0.00001 | 0/5 (0) | 0/5 (0) | 0/5 (0) | 0/5 (0) |

TDI 群は TDI、PA 群は PA、TDI+PA 群は TDI と PA の混合液、Control 群は溶媒で感作し、各群とも PA (0.0001~10%) および TDI (0.00001~0.1%) で誘発した。

*陽性を示した動物数/感作を行った動物数、**平均評点の平均値

^aPA 群と有意差 (p<0.05) がある。 ^bPA 群と有意差がない。

^cOxa 群と有意差がない。

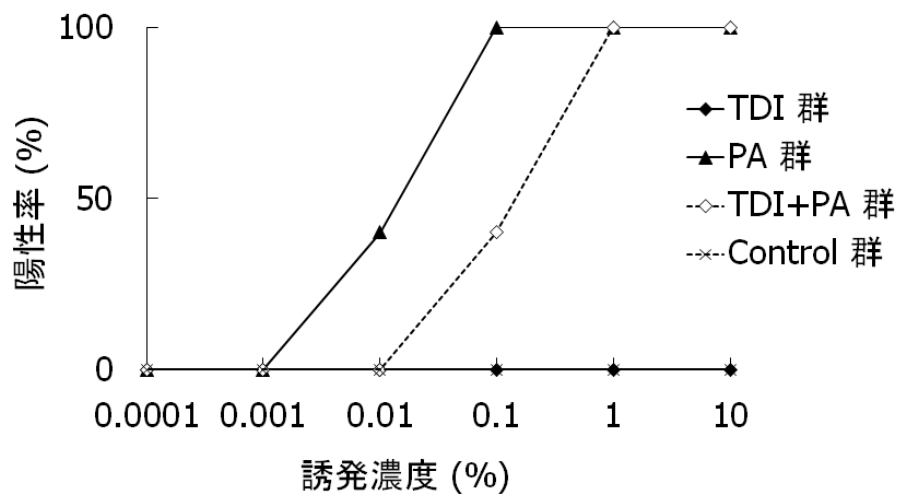


図 8. Th2 型同士 (PA と TDI) の混合による PA の誘発濃度と陽性率の関係

TDI 群、PA 群、TDI+PA 群、Control 群の 4 群を PA (0.0001~10%) で誘発した。縦軸に陽性反応を示した動物数の割合を表す陽性率 (%) を、横軸に誘発濃度を示した。

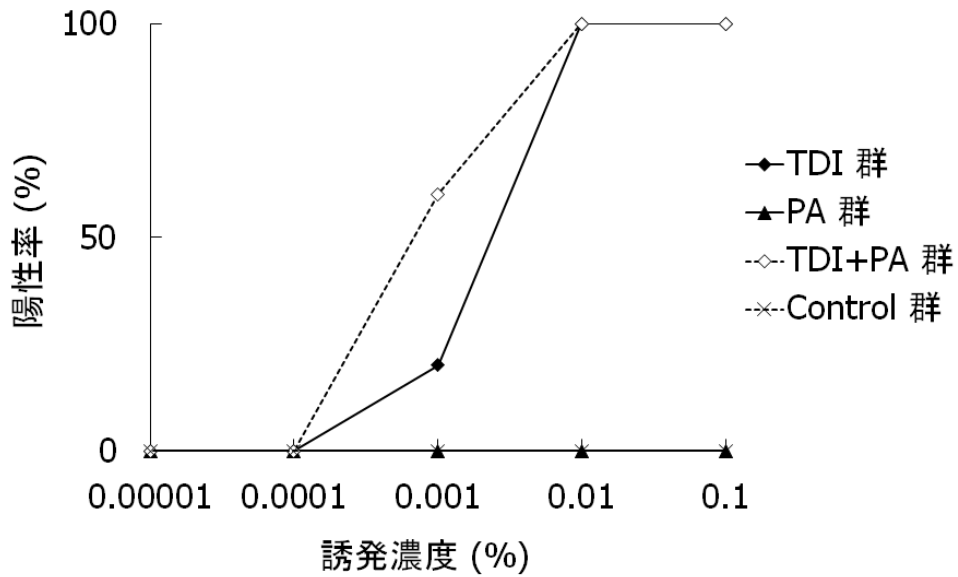


図9. Th2型同士 (PAとTDI) の混合によるTDIの誘発濃度と陽性率の関係
 TDI群、PA群、TDI+PA群、Control群の4群をTDI (0.00001~0.1%) で誘発した。
 縦軸に陽性反応を示した動物数の割合を表す陽性率 (%) を、横軸に誘発濃度を示した。

第 2 節 マウスを用いた皮膚感作性反応の混合影響

1. 緒言

化学物質の皮膚感作能の評価には、前節で述べたように実験動物としてモルモットが長年利用されてきた。しかしながら、1990 年代になってマウスを用いた評価方法が新たに開発され、その後、広く適用されるようになってきた (Kimber et al., 1994; OECD, 2010; Thrne et al., 1991; Garrigue et al., 1994)。マウスの利用が増えた理由としては、近交系が入手し易く、個体差が少ないことから使用する動物数を抑えられることや、生理反応等を含めて報告事例が多いことなどが挙げられる。単一の化学物質の皮膚感作能評価において、モルモットとマウスは、同じような応答を示すが (Kimber et al., 1994; Durand et al., 2003)、マウスを用いた試験の 1 つである Local Lymph Node Assay では、弱い皮膚感作性物質に対して偽陰性、強い皮膚刺激性物質はリンパ細胞の増殖を誘導することから、偽陽性の結果を示すことが指摘されている (Dean et al., 2001)。動物を用いた毒性評価試験では、ヒトで起こる毒性を予測することが目的であり、多角的に試験することはもちろんのこと、最適な動物種および試験方法の選択が重要であり、そのための検討は必須といえる。

そこで、本節では、皮膚感作性の混合影響の有無について、マウス耳介腫脹試験を用いて、前節と同様に皮膚感作性物質の組み合わせを中心に調査した。混合影響の有無に関しては、前節と同じく誘発反応の変化によって評価し、マウスとモルモットにおける種差についても調査することとした。

2. 材料と方法 :

(1) 皮膚感作性物質

皮膚感作性物質は前章と同様のものを用いた (Th1 型 ; DNCB および Oxa、Th2 型 ; PA および TDI)。

(2) 供試動物

供試動物は、CBA/J マウス (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN、厚木、日本) を用いた。なお、試験使用時の週齢は、9~10 週齢であった。動物は、前・床面ステンレス網で壁面アルミ製の懸垂式ケージ (W176×D302×H130 mm) に 3 匹で収容した。飼料はマウス用固型飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取とし、給水は自動給水装置を介して濾過した水道水を自由飲水させた。また、飼育環境は、気温 21~25°C、湿度 40~70%、照明時間 12L12D (8:00~20:00) とし、換気回数 10 回以上/時間に設定した。

(3) マウス耳介腫脹試験

試験は、1 群あたり 6 匹とし、Garrigue らの方法 (Garrigue et al., 1994) を用いた (図 10)。すなわち、感作は、マウスの背部を 1 cm × 2 cm (2cm²) 毛刈し、その部位に AOO (Acetone/olive oil 4:1) を溶媒に用いた化学物質液 50 μL を塗布した (Day 0)。感作 7 日後 (Day 6)、マウスの両耳の厚みを DIGIMATIC MICROMETER (Mitutoyo, Japan) で測定し、さらに AOO で希釈した化学物質液を、両耳の背部に 25 μL/ear の割合で塗布した。塗布 48 時間後 (Day 8) に、再び両耳の厚みを測定し、Day 6 と Day 8 の測定値からそれぞれの動物において次式により浮腫の増加を算出した。

耳介浮腫増加 = Day8における耳介厚(mm) - Day6における耳介厚(mm)

なお、事前に濃度設定のための予備試験を実施した。それぞれの皮膚感作性物質ごとに3匹以上の動物を用い、数濃度の化学物質液を背部塗布もしくは耳介塗布した。感作濃度は背部塗布において全身毒性のない軽度の刺激性を示す濃度もしくは調製可能な最大濃度を、誘発濃度は耳介塗布後に紅斑を認めず、耳介浮腫の増加が10%を超えない最大濃度を設定した(表7)。

(4) 統計処理

統計解析には、StatLight#05 version 2 (Yukms Co., Ltd., 東京、日本)を用いた。耳介浮腫の増加量については、Bartlettの等分散検定を行い、等分散の場合は、Control群と各皮膚感作性物質投与群との間でDunnettの多重比較検討を、不等分散の場合には同様にSteelの多重比較検定を行なった。

混合影響については、F検定による等分散検定を行い、等分散の場合は皮膚感作性物質単一群と混合群との間でstudent's t-testを、不等分散の場合には同様にウェルチ(Welch)の2群検定を行なった。

なお、検定はいずれの場合も両側検定を行い、有意水準は5%および1%で評価した。

(5) 動物福祉

本実験は、住友化学株式会社 生物環境科学研究所の「生物環境科学研究所における実験動物に関する規定」に従い、実施した。

3. 結果

(1) Th1 型 (DNCB と Oxa) の混合影響

表 8 に Control 群、DNCB 群、Oxa 群および DNCB+Oxa 群の耳介浮腫増加量の平均値を示した。また、図 11 には、各群における DNCB に対する反応の個別値を、図 12 には、Oxa に対する反応の個別値を示した。

DNCB に対して、DNCB 群では Control 群に比べて有意な浮腫の増加 ($p < 0.05$) が示され、DNCB+Oxa 群でも同様に有意な浮腫の増加 ($p < 0.05$) が認められた (表 8)。一方、Oxa 群では DNCB に対して有意な変化は認められなかった (表 8)。DNCB 群と DNCB+Oxa 群で認めた DNCB に対する反応を比較したところ、DNCB+Oxa 群の反応は、DNCB 群に比べ、有意に低いこと ($p < 0.01$) が示された (表 8 および図 11)。

Oxa に対して、Oxa 群では Control 群に比べて有意な浮腫の増加 ($p < 0.05$) が示され、DNCB+Oxa 群でも同様に有意な浮腫の増加 ($p < 0.05$) が認められた (表 8)。一方、DNCB 群では Oxa に対して有意な変化は認められなかった (表 8)。また、Oxa 群と DNCB+Oxa 群で認めた Oxa に対する反応を比較したところ、両群間の反応に有意な差は認められなかった (表 8 および図 12)。

(2) Th1 および Th2 型 (DNCB と PA) の混合影響

表 9 に Control 群、DNCB 群、PA 群および DNCB+PA 群の耳介浮腫増加量の平均値を示した。また、図 13 には、各群における DNCB に対する反応の個別値を、図 14 には、PA に対する反応の個別値を示した。

DNCB に対して、DNCB 群では Control 群に比べて有意な浮腫の増加 ($p < 0.01$) が示され、DNCB+PA 群でも同様に有意な浮腫の増加 ($p < 0.01$) が認められた (表 9)。一方、PA 群では DNCB に対して有意な変化は認められなかった (表 9)。

DNCB 群と DNCB+PA 群で認められた DNCB に対する反応を比較したところ、両群間の反応に有意な差は認められなかった (表 9 および図 13)。

PA に対して、PA 群では Control 群に比べて有意な浮腫の増加 ($p < 0.01$) が示され、DNCB+PA 群でも同様に有意な浮腫の増加 ($p < 0.01$) が認められた (表 9)。一方、DNCB 群では PA に対して有意な変化は認められなかった (表 9)。PA 群と DNCB+PA 群で認められた PA に対する反応を比較したところ、両群間の反応に有意な差は認められなかった (表 9 および図 14)。

(3) Th2 型 (PA と TDI) の混合影響

表 10 に Control 群、PA 群、TDI 群および PA+TDI 群の耳介浮腫増加量の平均値を示した。また、図 15 には、各群における PA に対する反応の個別値を、図 16 には、TDI に対する反応の個別値を示した。

PA に対して、PA 群では Control 群に比べて有意な浮腫の増加 ($p < 0.05$) が示された (表 10)。一方、TDI 群および PA+TDI 群では PA に対して有意な変化は認められなかった (表 10)。PA 群と PA+TDI 群における PA に対する反応を比較したところ、PA+TDI 群の反応は、PA 群に比べ、有意に低いこと ($p < 0.01$) が示された (表 10 および図 15)。

TDI に対して、TDI 群では Control 群に比べて有意な浮腫の増加 ($p < 0.05$) が示され、PA+TDI 群および PA 群においても同様に有意な増加 ($p < 0.05$) が認められた (表 10)。PA 群で認められた TDI に対する浮腫は、TDI 群および PA+TDI 群よりも小さな反応であった (図 16)。また、TDI 群と PA+TDI 群で認められた TDI に対する反応を比較したところ、両群間の反応に有意な差は認められなかった (表 10 および図 16)。

4. 考察

単一の皮膚感作性物質を対象とした皮膚感作性試験において、マウス耳介腫脹試験と前章のマキシマイゼーション試験で得られる結果は、比較的高い一致率を示すことが報告されている (Thrne et al., 1991)。混合影響の有無についても、本章のモルモットとマウスの両試験結果から、同様であることが示された。すなわち、同型同士の組み合わせ (Th1 型同士あるいは Th2 型同士) で混合した場合、皮膚感作性反応はそれぞれの皮膚感作性物質単独に対する反応よりも低減するものの (表 8, 10, 図 11, 12, 15, 16)、異型の組み合わせでは、各型単独の感作性反応の場合と変化はなかった (表 9, 図 13, 14)。これらの結果から、皮膚感作性物質による混合影響の発現は、皮膚感作性物質の組み合わせにより決定されることがより確実なものであると考えられた。

本節のマウスの結果と前節のモルモットの結果を詳細に比較した場合、異なる混合効果が Th1 型同士の混合において認められた。Th 1 型同士の混合の場合 (DNCB および Oxa)、マキシマイゼーション試験では DNCB と Oxa の両反応が低減されていたが、本章試験では DNCB の反応のみが低減していた (表 4 および表 8)。しかしながら、モルモットの試験でも DNCB に対する反応が Oxa に対する反応に比べ、混合操作により著しく変化しており、その他の組み合わせではマウスとモルモットは同じ効果であった。したがって、両試験の Oxa に対する混合影響の違い (表 4 および表 8、図 5 および図 12) は、動物の種差による違いではなく、実験で使用した Th 1 型感作性物質 (DNCB および Oxa) の混合濃度の違いによるものであると推察された。

Th2 型同士 (PA および TDI) の混合影響において、本節では PA 群で TDI に対する浮腫が確認されたが、その反応は TDI 群および PA+TDI 群と比べ、弱いものであった (表 10 および図 15)。このような反応は、前節において認められ

ておらず、PA と TDI とで交差反応を示す報告もないことから、これが交差反応である可能性は低いものと考えられた。この現象は、PA で感作することで Th2 型サイトカインが誘導され、TDI に対する皮膚刺激性反応の感度が上昇したために生じたものと考えられた。同様の現象として、DaSilva ら（2012）は、Th2 型サイトカインの産生を上げたトランスジェニックマウス（STAT-6）の実験において、刺激物に対する感度が野生型マウスのそれよりも上昇することを報告している。

本節においても、混合操作により皮膚感作性の誘発反応は低減しており、その混合効果は拮抗効果であった。前節と同様に本節の結果は、単一群で明らかな皮膚感作性反応を認める高濃度条件下での混合影響であり、発症過程において拮抗が生じたものと考えられた。European Commission による報告書では、混合影響には化学物質の組み合わせとその混合濃度が重要であると結論されており（EU Science Committees, 2011）、吸入毒性試験の混合影響では、同じ混合影響の組み合わせでも濃度が異なれば、混合効果も変化することが示されている（Schlesinger et al., 1992）。前節および本節でも、濃度に関しての詳細な検討は行っていないが、皮膚感作性反応は吸入毒性同様に閾値のある用量反応性のある毒性であり（Kimber et al., 2008）、混合濃度により、混合効果も変化することも十分考えられる。本研究結果を基準として、より低濃度での検討を行うことで、混合効果と混合濃度の関係が明らかになるものと期待される。

以上の結果から、マウスにおいてもモルモットと同様に皮膚感作性において混合影響が生じることと、その発現には皮膚感作性物質の組み合わせが重要であることが確認された。今後、使用した皮膚感作性物質とその組み合わせをもとに、感作相での作用機序を調査することで、混合影響の発現にとって重要な作用機序が明らかになるものと考えられた。

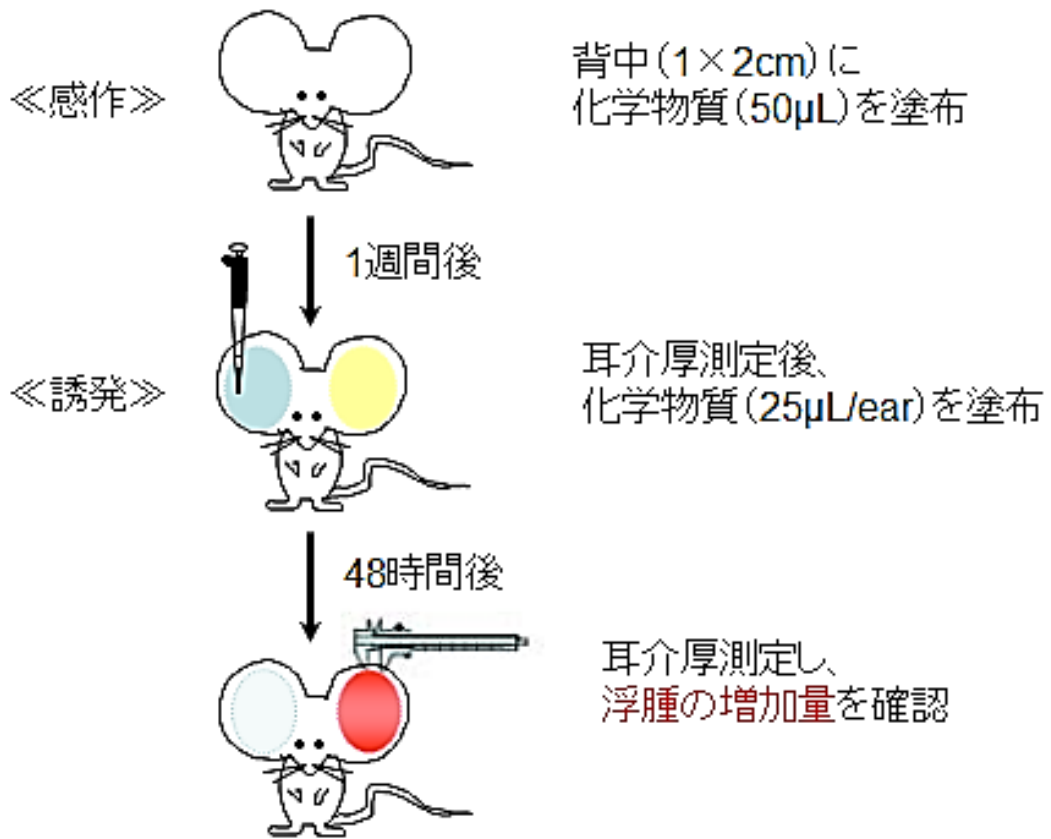


図 10. マウス耳介腫脹試験の試験概要

化学物質を背中に塗布することで免疫（感作）し、1週間後に両耳介に化学物質を塗布することで誘発操作を行った。耳介浮腫の増加は、誘発操作前後の耳介厚から算出した。

表 7. マウス耳介腫脹試験の感作および誘発濃度

(1) Th1 型同士 (DNCB と Oxa) の混合影響

| 群 | 投与液中の最終濃度 | | |
|----------|-------------------|------------------|----------|
| | 感作 ^{a)} | 誘発 ^{a)} | |
| | 背部 | 左耳 | 右耳 |
| Control | 溶媒 | DNCB:1% | Oxa;0.2% |
| DNCB | DNCB:1% | DNCB:1% | Oxa;0.2% |
| Oxa | Oxa:5% | DNCB:1% | Oxa;0.2% |
| DNCB+Oxa | DNCB:1% Oxa:5% | DNCB:1% | Oxa;0.2% |

a) AOO (Acetone/Olive oil 4:1) を溶媒に使用した。

(2) Th1 および Th2 型 (DNCB と PA) の混合影響

| 群 | 投与液中の最終濃度 | | |
|---------|-------------------|------------------|--------|
| | 感作 ^{a)} | 誘発 ^{a)} | |
| | 背部 | 左耳 | 右耳 |
| Control | 溶媒 | DNCB:1% | PA:10% |
| DNCB | DNCB:1% | DNCB:1% | PA;10% |
| PA | PA:10% | DNCB:1% | PA:10% |
| DNCB+PA | DNCB:1% PA:10% | DNCB:1% | PA:10% |

a) AOO を溶媒に使用した。

表 7 (続き). マウス耳介腫脹試験の感作および誘発濃度

(3) Th2 型同士 (PA と TDI) の混合影響

| Group | 投与液中の最終濃度 | | |
|--------|------------------|------------------|--------|
| | 感作 ^{a)} | 誘発 ^{a)} | |
| | | 背部 | 左耳 |
| AOO | 溶媒 | TDI:0.5% | PA:10% |
| PA | PA:10% | TDI:0.5% | PA:10% |
| TDI | TDI:10% | TDI:0.5% | PA;10% |
| TDI+PA | TDI:10% | TDI:0.5% | PA:10% |
| | PA:10% | | |

a) AOO を溶媒に使用した。

表 8. Th1 型 (DNCB と Oxa) を用いたマウス耳介腫脹試験の結果

| 群 | 動物数 | 誘発物質 | 耳介浮腫増加 (mm) | | | 統計解析 | |
|---------|-----|------|-------------|------|-----------------------|-----------------------|-------|
| | | | 平均 | SD | P value ^{a)} | P value ^{b)} | |
| Control | 6 | DNCB | 0.04 | 0.00 | Ref | Ref | |
| | | Oxa | 0.00 | 0.01 | | | |
| DNCB | 6 | DNCB | 0.11 | 0.01 | <0.05 | <0.01 | |
| | | Oxa | 0.00 | 0.00 | | | 0.86 |
| Oxa | 6 | DNCB | 0.04 | 0.02 | 0.97 | <0.05 | 0.25 |
| | | Oxa | 0.06 | 0.01 | | | |
| DNCB+ | 6 | DNCB | 0.08 | 0.02 | <0.05 | Ref | |
| | | Oxa | 0.08 | 0.03 | | | <0.05 |

a) Control 群と各群を比較した。

b) DNCB 群もしくは Oxa 群と DNCB+Oxa 群を比較した。

Ref: Reference

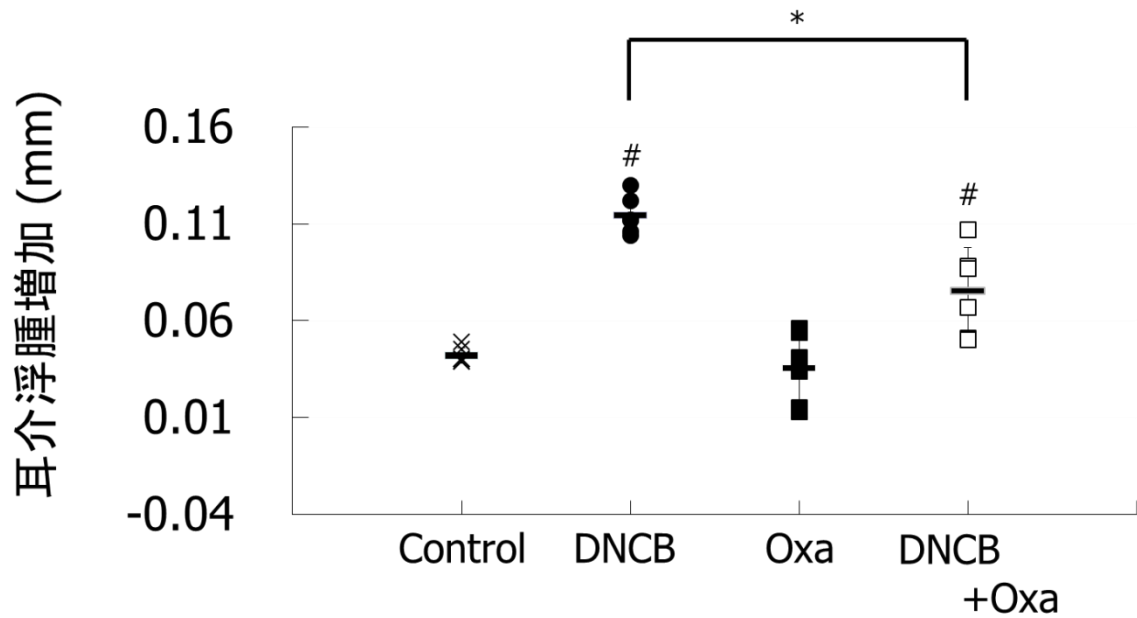


図 11. DNCB に対する Th1 型同士 (DNCB と Oxa) の混合影響

DNCB 群 (●) は DNCB、Oxa 群 (■) は Oxa、DNCB+Oxa 群 (□) は DNCB と Oxa の混合液、Control 群 (x) は媒体で感作し、各群とも 1%DNCB を左耳に塗布することで誘発した。縦軸に耳介における浮腫の増加量 (mm) を、横軸に各群を示した。

#:Control 群と有意差 (p<0.05) がある。

*:有意差 (p<0.01) がある。

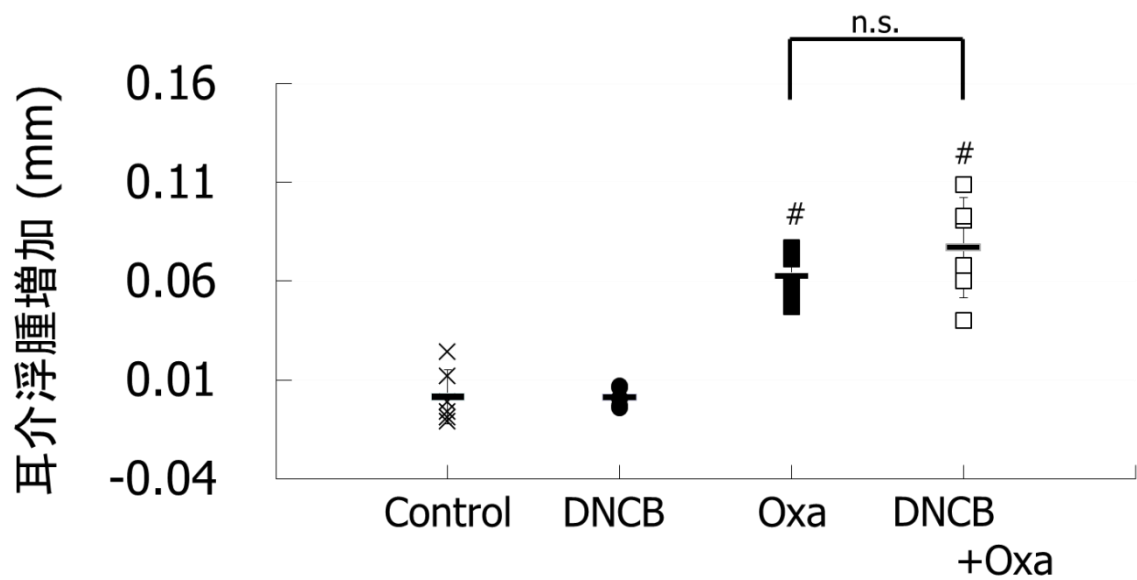


図 12. Oxa に対する Th1 型同士の (DNCB と Oxa) の混合影響

DNCB 群 (●) は DNCB、Oxa 群 (■) は Oxa、DNCB+Oxa 群 (□) は DNCB と Oxa の混合液、Control 群 (x) は媒体で感作し、各群とも 0.2%Oxa を右耳に塗布することで誘発した。縦軸に耳介における浮腫の増加量 (mm) を、横軸に各群を示した。

#:Control 群と有意差 ($p < 0.05$) がある。

n.s.:有意差がない。

表 9. Th1 および Th2 型 (DNCB と PA) を用いたマウス耳介腫脹試験の結果

| 群 | 動物数 | 誘発物質 | 耳介浮腫増加 (mm) | | 統計解析 | |
|---------|-----|------|-------------|------|-----------------------|-----------------------|
| | | | 平均 | SD | P value ^{a)} | P value ^{b)} |
| Control | 6 | DNCB | 0.02 | 0.01 | Ref | |
| | | PA | 0.01 | 0.01 | | Ref |
| DNCB | 6 | DNCB | 0.09 | 0.01 | <0.01 | 0.05 |
| | | PA | 0.00 | 0.01 | | 0.18 |
| PA | 6 | DNCB | 0.03 | 0.01 | 0.44 | |
| | | PA | 0.05 | 0.01 | <0.01 | 1.0 |
| DNCB+ | 6 | DNCB | 0.08 | 0.01 | <0.01 | Ref |
| PA | | PA | 0.05 | 0.01 | <0.01 | Ref |

a) Control 群と各群を比較した。

b) DNCB 群もしくは PA 群と DNCB+PA 群を比較した。

Ref: Reference

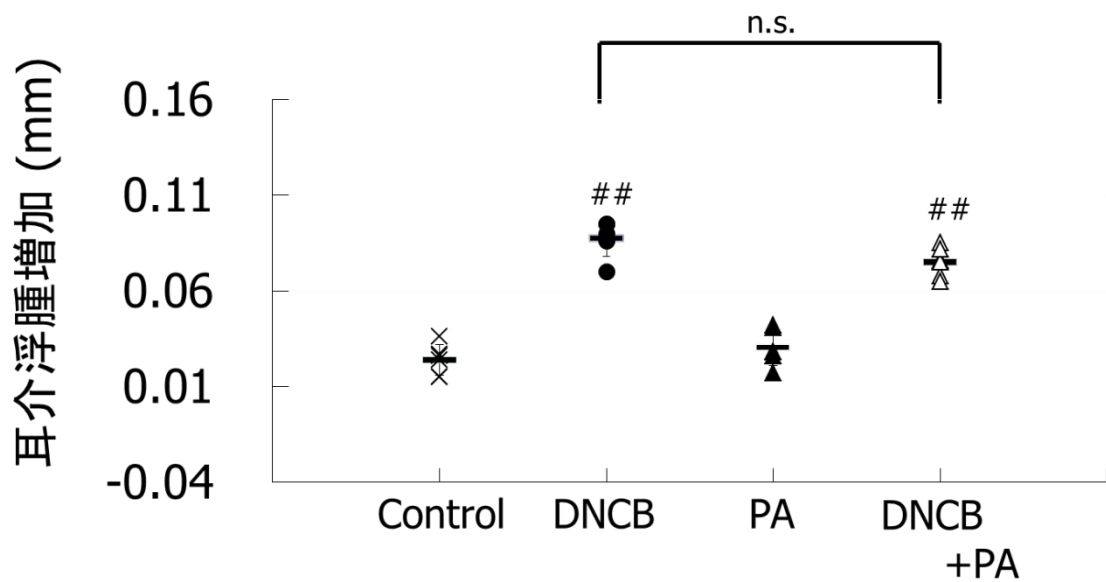


図 13. DNCB に対する Th1 および Th2 型 (DNCB と PA) の混合影響

DNCB 群 (●) は DNCB、PA 群 (▲) は PA、DNCB+PA 群 (△) は DNCB と PA の混合液、Control 群 (x) は媒体で感作し、各群とも 1%DNCB を左耳に塗布することで誘発した。縦軸に耳介における浮腫の増加量 (mm) を、横軸に各群を示した。

: Control 群と有意差 ($p < 0.01$) がある。

n.s.: 有意差がない。

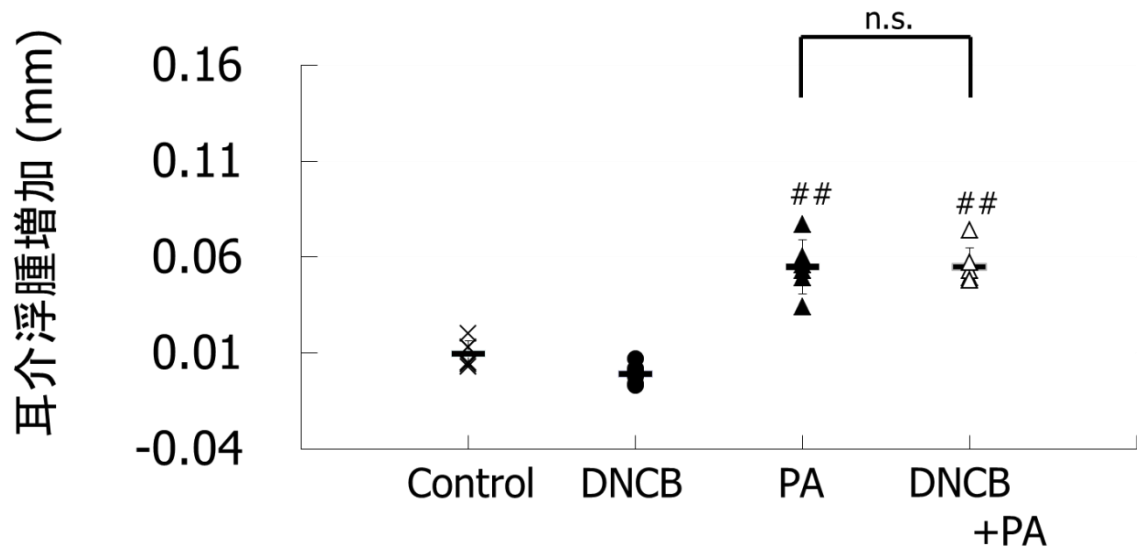


図 14. PA に対する Th1 および Th2 型 (DNCB と PA) の混合影響

DNCB 群 (●) は DNCB、PA 群 (▲) は PA、DNCB+PA 群 (△) は DNCB と PA の混合液、Control 群 (×) は媒体で感作し、各群とも 10%PA を右耳に塗布することで誘発した。縦軸に耳介における浮腫の増加量 (mm) を、横軸に各群を示した。

: Control 群と有意差 ($p < 0.01$) がある。

n.s.: 有意差がない。

表 10. Th2 型 (TDI と PA) を用いたマウス耳介腫脹試験の結果

| 群 | 動物数 | 誘発物質 | 耳介浮腫増加 (mm) | | 統計解析 | | |
|---------|-----|------|-------------|------|-----------------------|-----------------------|-----|
| | | | 平均 | SD | P value ^{a)} | P value ^{b)} | |
| Control | 6 | PA | 0.00 | 0.00 | Ref | | |
| | | TDI | 0.00 | 0.00 | | Ref | |
| PA | 6 | PA | 0.06 | 0.03 | <0.05 | <0.01 | |
| | | TDI | 0.02 | 0.00 | | <0.05 | |
| TDI | 6 | PA | 0.00 | 0.00 | 0.38 | | |
| | | TDI | 0.07 | 0.04 | | <0.05 | 1.0 |
| PA+ | 6 | PA | 0.01 | 0.01 | 0.70 | Ref | |
| TDI | | TDI | 0.07 | 0.03 | | <0.05 | Ref |

a)Control 群と各群を比較した。

b)PA 群もしくは TDI 群と PA+TDI 群を比較した。

Ref: Reference

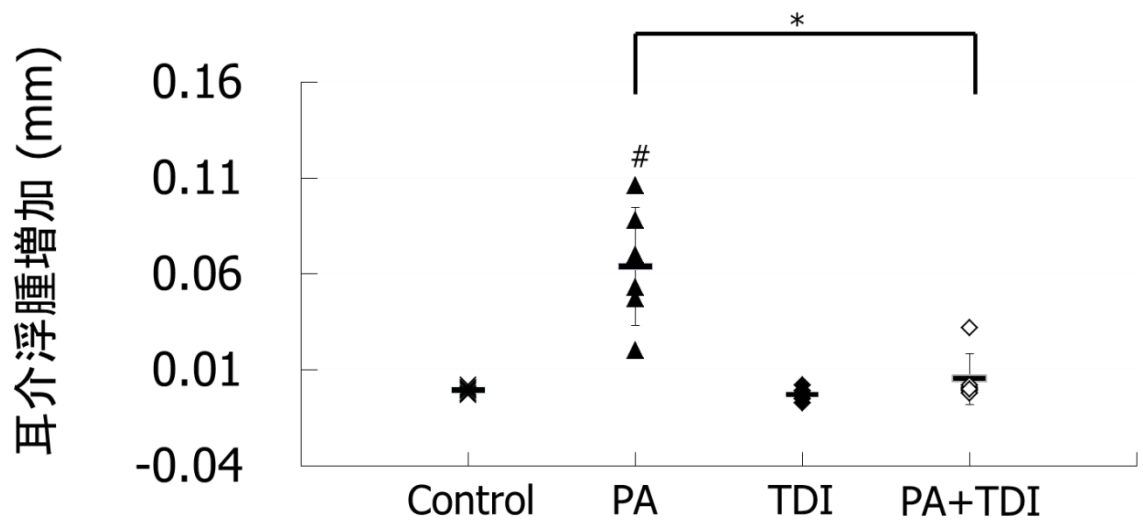


図 15. PA に対する Th2 型同士 (PA と TDI) の混合影響

PA 群 (▲) は PA、TDI 群 (◆) は TDI、PA+TDI 群 (◇) は PA と TDI の混合液、Control 群 (×) は媒体で感作し、各群とも 10%PA を右耳に塗布することで誘発した。縦軸に耳介における浮腫の増加量 (mm) を、横軸に各群を示した。

: Control 群と有意差 ($p < 0.05$) がある。

*:有意差 ($p < 0.01$) がある。

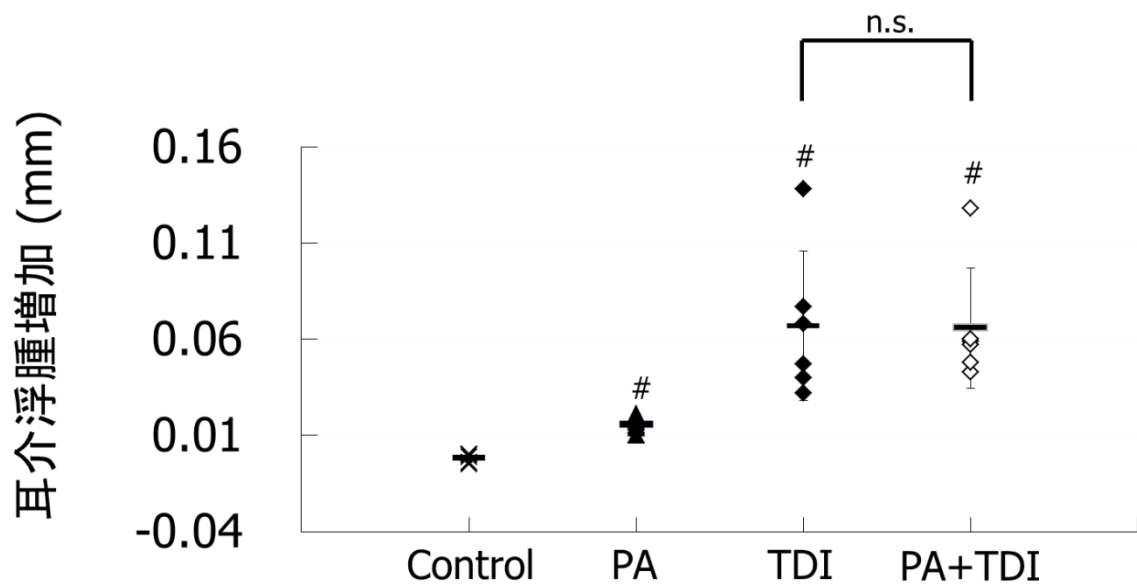


図 16. TDI に対する Th2 型同士 (PA と TDI) の混合影響

PA 群 (▲) は PA、TDI 群 (◆) は TDI、PA+TDI 群 (◇) は PA と TDI の混合液、Control 群 (×) は媒体で感作し、各群とも 0.2%TDI を左耳に塗布することで誘発した。縦軸に耳介における浮腫の増加量 (mm) を、横軸に各群を示した。

: Control 群と有意差 ($p < 0.05$) がある。

n.s.: 有意差がない。

第3章 皮膚感作性物質の抗原形成とその分類

1. 緒言

前章までの結果において、皮膚感作性において混合影響が存在し、その混合影響は、混合される化学物質の組み合わせにより決定されることが明らかとなった。混合影響を予測するためには、まず、混合影響が発現するか否かを予測することが重要で、そのためには、どのような特徴を有する化学物質同士の組み合わせの場合、混合影響が発現するのかを理解する必要がある。そこで、皮膚感作性物質ごとの感作相の作用機序を比較し、混合影響の発現を決定する作用機序を解明することが重要であると考えられた。皮膚感作性が発症に至る過程のうち、感作相における反応には、①皮膚への浸透、②皮膚中のタンパク質との反応による抗原形成、③皮膚樹状細胞細胞の活性化および皮膚からリンパ節への移動、④ケラチノサイトの活性化、⑤皮膚所属リンパ節における抗原特異的なメモリー T 細胞の増加、がある（図 1）。第 2 章 第 2 節のように経皮投与による試験では、使用する溶媒により皮膚透過性が変わることによって試験結果に影響することが報告されている（Basketter et al., 2001）。しかしながら、第 2 章第 2 節の経皮投与のみによる混合影響の結果と第 2 章第 1 節の皮内投与を含んだ実験の結果が同様であったことから、本研究で認めた混合影響において「①皮膚への浸透」の重要性は低いものと考えられた。

そこで、本章では、「②皮膚中のタンパク質との反応による抗原形成」について、グルタチオン結合性試験（Kato et al., 2003）を用いて検討を加えることとした。本試験法は、皮膚感作性物質がタンパク質（特にチオール基）と結合すること（Rycroft et al., 2011）に着目して開発された in chemico の皮膚感作性クリーニング法である（Kato et al., 2003）。本章では、既報の化学物質-グルタチ

オン結合物形成の有無を確認することで皮膚感作性物質を同定する同定法に加え、化学物質とグルタチオンの反応性から化学物質の皮膚感作能の強度を予測する分類法を用いて、結合物の有無および反応性から、化学物質ごとの抗原形成を比較した。

2. 材料と方法

(1) 化学物質

グルタチオン (GSH ; Merck, Darmstadt, Germany) およびマレイミド (和光純薬工業株式会社、大阪、日本) を用いた。同定法に使用した化学物質は、表 11 に、分類法に使用した化学物質は、表 14 に、それぞれまとめた。

(2) 同定法

化学物質と GSH をアセトニトリル、PBS (pH 7.4) にそれぞれ 10 mM の濃度になるように溶解した後、これら 2 つの溶液を等量で混合した。その混合液を 12 時間以上 37 °C で加温した後、LC-MS (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) で分析した。なお、分析条件は、以下のとおりである。

Column: L-column

(5 µm, 2.1X150mm Chemicals Evaluation and research institute)

Mobile Phase: (A) 0.05% formic acid in water

(B) 0.05% formic acid in Acetonitril

Gradient(%B): 5%(0 min)-50%(20 min)-95%(30 min)-95%(40 min)

Flow rate: 0.2 mL/min

UV detection: 254 nm

MS: LTQ (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

Ionization Mode: ESI (Positive)

分析結果から、GSH と化学物質の結合物を認めた場合、化学物質は本試験法において陽性と判断した。

(3) 分類法

前述の同定法にて陽性と判定された化学物質のみを対象として、分類法に供試した。同定法と同じ条件の下、化学物質と GSH の混合液を調製し、その混合液を 37 °C で 2 時間加温した。また、混合液とは別に、化学物質を含まない GSH のみの control 液を設け、同様に 2 時間加温した。加温後、反応液および control 液にマレイミド (20 mM) を加えて、15 分間以上、室温で放置して、未反応の GSH をマレイミドと反応させた。その後、反応液および control 液は、同定法と同条件で LC/MS を用いて分析した。

分析結果から、GSH とマレイミドの結合物 ($m/z=405$) について、Peak 面積を求め、以下の式により、各化学物質の GSH 反応性 (GSH reactivity) を算出した。

$$\text{GSH reactivity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Peak area in test chemicals}}{\text{Peak area in control}} \right) \times 100$$

3. 結果

(1) 同定法

試験の検出例として、DNCB で試験を実施した結果を図 17 に示した。DNCB と GSH の混合液において、新規のピークが確認され、MS スペクトル ($m/z=474$) から GSH と DNCB の結合物であることが確認された。

調査した 53 の化学物質（皮膚感作性物質：41 化学物質、非感作性物質：12 化学物質）により、本試験法の皮膚感作性物質同定の能力を確認した（表 12）。皮膚感作性物質では、GSH との結合物が確認できる化学物質（表 12 において同定法陽性の化学物質）と eugenol、p-phenylene diamine および toluene diisocyanate などのように、GSH との結合物が確認できない化学物質（表 12 において同定法陰性の化学物質）があった。一方、非感作性物質では、GSH との結合物が確認できない化学物質が多かった。

同定法と動物実験（マキシマイゼーション試験および LLNA）の結果の比較を表 13 に示した。動物実験の結果は、学術論文（Gerberick et al., 2004; 2007）あるいは住友化学の社内資料を用いた。動物実験で陽性と判断される化学物質のうち、本試験法でも陽性と判断される化学物質の割合を示す感度は 57% (26/41) であった。また、動物実験で陰性と判断される化学物質のうち、本試験法でも陰性と判断される化学物質の割合を示す特異度は 83% (10/12)、動物実験で陽性の化学物質を陽性と判断し、陰性の化学物質を陰性と判断する能力を示す一致率は 68% (36/53) であった。本試験法で陽性と判断された化学物質のうち、動物実験でも陽性と判断される化学物質の割合を示す陽性予測性は 93% (26/28)、本試験法で陰性と判断された化学物質のうち、動物実験でも陰性と判断される化学物質の割合を示す陰性予測性は 40% (10/25) であった。

DNCB、Oxa、PA および TDI では、DNCB、Oxa および PA で GSH との結合物

が認められたが、TDIにおいて結合物は確認されなかった（表 12、No.32, 35, 39, 48）。

（2）分類法

皮膚感作性物質の同定法により、陽性と判断された 17 の化学物質を用いて、分類法の予測性を確認した。LLNA 試験（OECD, 2010）では、溶媒対照群の 3 倍のリンパ細胞の増殖を示す化学物質の塗布濃度（EC3）によって化学物質の皮膚感作能の強弱が推測できることが知られている（Kimber et al., 2001）。分類法の結果と動物実験の LLNA 試験結果（EC3 値）の比較を、表 14 および図 18 に示した。

同定法において、いずれも GSH との結合物を認めた化学物質であるが、phthalic anhydride のように残存 GSH のほとんどない化学物質（GSH 反応性：94.1%）と、cinnamaldehyde のように、ほとんどが未反応の GSH である化学物質（GSH 反応性：-26.8%）があった（表 14）。また、EC3 値との関係では、GSH 反応性が高いものは EC3 の値が低く、GSH 反応性の低いものは EC3 の値が高い傾向があった（図 18）。

同定法で GSH との結合物が認められた DNCB、Oxa および PA の GSH 反応性は、それぞれ 83.6%、94.1% および 99.1% であった（表 14、No.1, 4, 9）。

4. 考察

(1) 同定法

既報において、本試験法の有用性について示されているが (Kato et al., 2003)、今回用いた 53 の化学物質についても、高い陽性予測率 (95%) を示すことが判明した。したがって、本試験法が皮膚感作性物質を同定するための *in chemico* スクリーニング試験として、極めて有用であることが明らかとなった。しかしながら、感度および一致率については、それぞれ 57% および 68% と低く、偽陰性となる皮膚感作性物質も存在することから、本試験法の結果のみをもって化学物質の皮膚感作能を判断することは難しいものと考えられた。

偽陰性を示した化学物質については、皮膚で起こる代謝反応を介していないことが、その原因と考えられた。すなわち、eugenol、isoeugenol および *p*-phenylene diamine は酸化されることで代謝体となり、その代謝体がタンパク質と結合することで感作性能を示す (Jahn et al., 2012; Barratt et al., 1992)。したがって、酸化反応のない本試験法においては、偽陰性を示したものと推察された。styrene や benzopyrene などの化学物質も、その構造から同様に酸化されることで抗原を形成すると考えられる。また、同様に偽陰性を示した toluene diisocyanate では、チオール基を有する合成ペプチドや nitrobenzenthionin と反応することが報告されていることから (Gerberick et al., 2007; Lalko et al., 2012; Chipinda et al., 2010)、チオール基とは反応するものの、チオール基以外の分子構造の影響を受けることが考えられた。すなわち、本試験法が GSH との反応のみを対象とした試験であることから、偽陰性を示したものと考えられた。

(2) 分類法

同定法で陽性と判定された 17 化学物質を用いて、GSH 反応性と動物実験によ

る感作性能の強弱を比較したところ、GSH 反応性が低いものは、動物実験においてもその感作性能が低い傾向にあった（図 18）。一方、ethylhexyl acrylate および butyl acrylate では、動物実験から予測される感作性能に比べ、GSH 反応性が高かった（図 17）。両化学物質とも皮膚感作性を引き起こす acrylate の構造（Dearman et al., 2007）を有しており、本試験法は acrylate の構造を有する化学物質を強く評価する傾向があると推察された。しかしながら、acrylate を除いた化学物質において、本分類法は、強感作性物質あるいは弱感作性物質を選択するための方法として、極めて有効な試験法であると考えられた。

同定法で GSH との結合物が認められた DNCB、Oxa および PA では、いずれも GSH と 80%以上の高い反応性を示し、LLNA の試験から想定される結果（van Och et al., 2000）であった。この結果から、DNCB、Oxa および PA は、いずれも同じような構造のタンパク質と反応して抗原を形成し、形成される抗原の量においても 3 つの皮膚感作性物質間に差はないことが示唆された。つまり、本章の結果では、Th2 型の PA は Th1 型の DNCB および Oxa などと同じグループに分類され（表 12, 14）、Th1 型と Th2 型の分類はタンパク質との反応（抗原形成）のみで予測出来るものではないことが判明した。前章までの結果を踏まえると、混合影響の発現には混合する皮膚感作性物質の型（Th1 型もしくは Th2 型）が重要であり、その型は抗原形成以降の作用機序において明確に分類されることが考えられた。

表 11. 同定法で使用した化学物質

| | 化学物質名 | CAS No, | 分子量 |
|----|----------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| 1 | N,N'-dicyclohexylcarbodiimide | 538-75-0 | 206.3 |
| 2 | 1,2-epoxyoctane | 2984-50-1 | 128.2 |
| 3 | 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine | 70-25-7 | 147.1 |
| 4 | formaldehyde (37%) | 50-00-0 | 30.0 |
| 5 | glutaraldehyde (25%) | 111-30-8 | 100.1 |
| 6 | methyl salicylate | 119-36-8 | 152.1 |
| 7 | phenol | 108-95-2 | 94.1 |
| 8 | phenyl vinyl sulfone | 5535-48-8 | 168.2 |
| 9 | methyl methanesulfonate | 66-27-3 | 110.1 |
| 10 | fluorescein isothiocyanate | 27072-45-3 | 389.4 |
| 11 | 2-tert-butylphenol | 88-18-6 | 150.0 |
| 12 | 4-tert-butylphenol | 98-54-4 | 150.0 |
| 13 | 3-tert-butylphenol | 585-34-2 | 150.0 |
| 14 | 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid sodium salt dihydrate | 5400-70-4 | 351.0 |
| 15 | octanoic acid | 124-07-2 | 144.2 |
| 16 | p-chloroaniline | 106-47-8 | 127.6 |
| 17 | lactic acid | 79-33-4 | 90.1 |
| 18 | 2-chloroethanol | 107-07-3 | 80.5 |
| 19 | 1-bromobutane | 109-65-9 | 137.0 |
| 20 | 2-hydroxypropyl methacrylate | 27813-02-1 | 144.2 |
| 21 | propyl paraben | 94-13-3 | 180.2 |
| 22 | glycerol | 56-81-5 | 92.1 |
| 23 | 6-methylcoumarin | 92-48-8 | 160.2 |
| 24 | isopropanol | 67-63-0 | 60.1 |
| 25 | α -hexylcinnamic aldehyde | 101-86-0 | 216.3 |
| 26 | 1,4-hydroquinone | 123-31-9 | 110.1 |
| 27 | maleimide | 541-59-3 | 98.1 |
| 28 | styrene oxide | 96-09-3 | 120.2 |
| 29 | styrene | 100-42-5 | 104.2 |
| 30 | chlorobenzene | 108-90-7 | 112.6 |
| 31 | maleic acid | 110-16-7 | 116.1 |
| 32 | oxazolone | 15646-46-65 | 217.2 |
| 33 | biohope | 26172-55-4, 2682-20-4, 52-51-7 | 150, 115, 200 |
| 34 | isoeugenol | 97-54-1 | 164.2 |
| 35 | phthalic anhydride | 85-44-9 | 148.1 |
| 36 | eugenol | 97-53-0 | 164.2 |
| 37 | phenylacetaldehyde | 122-78-1 | 120.2 |
| 38 | penicillin G | 61-33-6 | 334.4 |
| 39 | dinitrochloro benzene | 97-00-7 | 202.6 |
| 40 | citral | 5392-40-5 | 152.2 |
| 41 | trimellitic anhydride | 552-30-7 | 192.1 |
| 42 | benzothiazolinone | 2634-33-5 | 151.2 |
| 43 | p-phenyrendiamine | 106-50-3 | 108.1 |
| 44 | 1,2-epoxyhexane | 1436-34-6 | 100.2 |
| 45 | 1,2-epoxydecane | 2404-44-6 | 156.3 |
| 46 | 1,2-epoxydodecane | 2855-19-8 | 184.3 |
| 47 | sodium lauryl sulfate | 151-21-3 | 288.4 |
| 48 | toluene diisocyanate | 584-84-9 | 174.2 |
| 49 | ethylene glycol dimethacrylate | 97-90-5 | 198.2 |
| 50 | butyl acrylate | 141-32-2 | 128.2 |
| 51 | ethylhexyl acrylate | 103-11-7 | 184.3 |
| 52 | 2-mercaptobenzothiazole | 149-30-4 | 167.2 |
| 53 | benzopyrene | 50-32-8 | 252.3 |

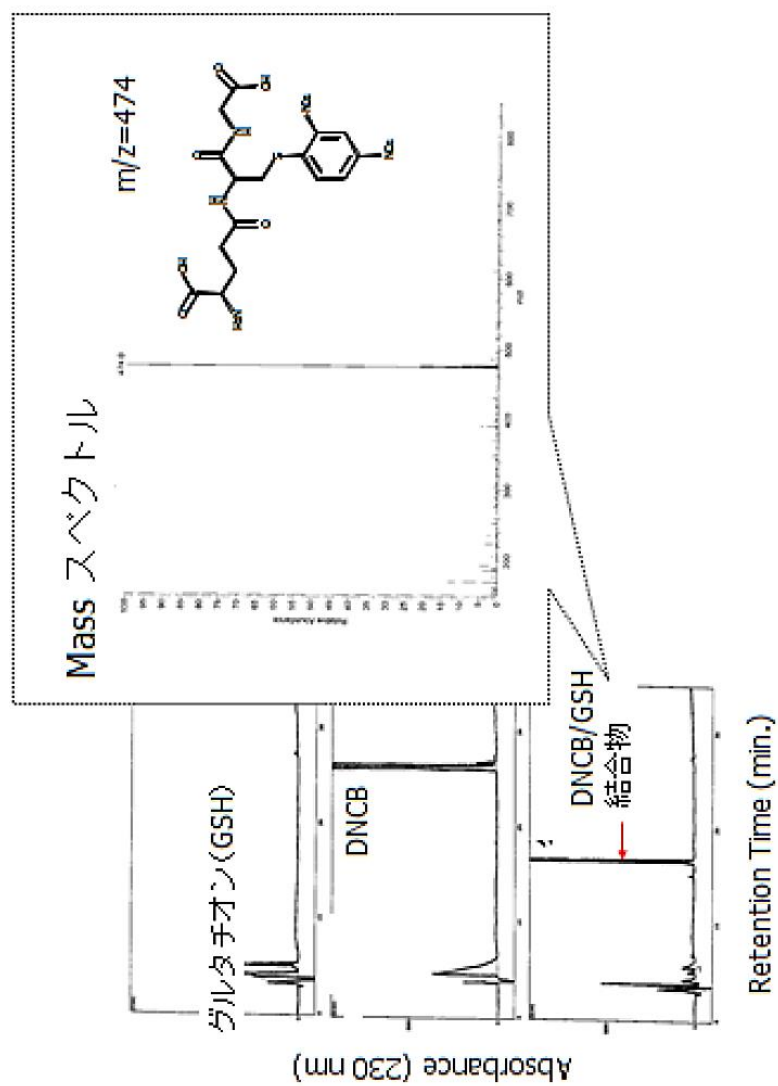


図 17. グルタチオン検出例 (DNCB)

表 12. 同定法の結果

| | 化学物質名 | 動物実験結果 | 同定法結果 |
|----|----------------------------------------------------------|-----------------|-------|
| 1 | N,N'-dicyclohexylcarbodiimide | + | + |
| 2 | 1,2-epoxyoctane | + | + |
| 3 | 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine | + | + |
| 4 | formaldehyde (37%) | + | + |
| 5 | glutaraldehyde (25%) | + | + |
| 6 | methyl salicylate | + | - |
| 7 | phenol | - ^{a)} | - |
| 8 | phenyl vinyl sulfone | + | + |
| 9 | methyl methanesulfonate | + ^{a)} | + |
| 10 | fluorescein isothiocyanate | + ^{a)} | + |
| 11 | 2-tert-butylphenol | + | - |
| 12 | 4-tert-butylphenol | + | - |
| 13 | 3-tert-butylphenol | + | - |
| 14 | 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid sodium salt dihydrate | + | + |
| 15 | octanoic acid | - ^{b)} | - |
| 16 | p-chloroaniline | + ^{b)} | - |
| 17 | lactic acid | - ^{b)} | - |
| 18 | 2-chloroethanol | - ^{c)} | - |
| 19 | 1-bromobutane | - ^{b)} | + |
| 20 | 2-hydroxypropyl methacrylate | - ^{b)} | + |
| 21 | propyl paraben | - ^{c)} | - |
| 22 | glycerol | - ^{b)} | - |
| 23 | 6-methylcoumarin | - ^{b)} | - |
| 24 | isopropanol | - ^{b)} | - |
| 25 | α -hexylcinnamic aldehyde | + | + |
| 26 | 1,4-hydroquinone | + ^{b)} | - |
| 27 | maleimide | + | + |
| 28 | styrene oxide | + | + |
| 29 | styrene | + | - |
| 30 | chlorobenzene | - ^{b)} | - |
| 31 | maleic acid | + | - |
| 32 | oxazolone | + | + |
| 33 | biohope | + | + |
| 34 | isoeugenol | + ^{c)} | - |
| 35 | phthalic anhydride | + | + |
| 36 | eugenol | + ^{c)} | - |
| 37 | phenylacetaldehyde | + ^{b)} | + |
| 38 | penicillin G | + ^{c)} | - |
| 39 | dinitrochloro benzene | + | + |
| 40 | citral | + ^{b)} | + |
| 41 | trimellitic anhydride | + ^{c)} | - |
| 42 | benzothiazolinone | + | + |
| 43 | p-phenyrendiamine | + ^{c)} | - |
| 44 | 1,2-epoxyhexane | + | + |
| 45 | 1,2-epoxydecane | + | + |
| 46 | 1,2-epoxydodecane | + | + |
| 47 | sodium lauryl sulfate | - ^{c)} | - |
| 48 | toluene diisocyanate | + | - |
| 49 | ethylene glycol dimethacrylate | + ^{b)} | + |
| 50 | butyl acrylate | + | + |
| 51 | ethylhexyl acrylate | + | + |
| 52 | 2-mercaptobenzothiazole | + ^{b)} | + |
| 53 | benzopyrene | + ^{a)} | - |

+ : 陽性, - : 陰性。a)NTP (1999)、b)Gerberick, *et al.* (2004)、c) Basketter, D.A. and Scholes, E. W. (1992a)

表 13. 同定法と動物実験の結果の比較

| | | 同定法 | | Total |
|------------------------|---|-----|----|-------|
| | | + | - | |
| in vivo (LLNA/GPMT) | + | 26 | 15 | 41 |
| | - | 2 | 10 | 12 |
| Total | | 28 | 25 | 53 |

化学物質数 : 53
 感度 : 57% (26/41)
 特異度 : 83% (10/12)
 一致率 : 68% (36/53)
 陽性予測性 : 93% (26/28)
 陰性予測性 : 40% (10/25)

表 14. グルタチオン結合物試験（分類法）で用いた化学物質群およびその結果

| 化学物質名 | CAS No. | 分子量 | 動物実験結果 | |
|-----------------------------------|------------|-------|---------------------|-------------|
| | | | EC3 value (%) | GSH 反応性 (%) |
| 1 dinitrochloro benzene | 97-00-7 | 202.6 | 0.04 ^{a)} | 83.6 |
| 2 diethyl maleate | 141-05-9 | 172.2 | 5.8 ^{a)} | 71.4 |
| 3 α-hexylcinnamic aldehyde | 101-86-0 | 216.3 | 11 ^{a)} | -1.2 |
| 4 oxazolone | 15646-46-5 | 217.2 | 0.003 ^{a)} | 94.1 |
| 5 formaldehyde | 50-00-0 | 30.0 | 0.61 ^{b)} | 47.7 |
| 6 citral | 5392-40-5 | 152.2 | 5.1 ^{a)} | -4.5 |
| 7 2-mercaptobenzothiazole | 149-30-4 | 167.3 | 1.7 | -3.9 |
| 8 cinnamaldehyde | 14371-10-9 | 132.2 | 3.1 ^{a)} | -26.8 |
| 9 phthalic anhydride | 85-44-9 | 148.1 | 0.16 ^{a)} | 99.1 |
| 10 ethylhexyl acrylate | 103-11-7 | 184.3 | 9.7 | 53.1 |
| 11 butyl acrylate | 141-32-2 | 128.2 | 11.2 | 74.7 |
| 12 phenylacetaldehyde | 122-78-1 | 120.2 | 4.7 ^{a)} | 9.1 |
| 13 ethylene glycol dimethacrylate | 97-90-5 | 198.2 | 28 ^{b)} | 10.4 |
| 14 1,2-epoxyheptane | 1436-34-6 | 100.2 | 60 | 1.5 |
| 15 1,2-epoxydecane | 2404-44-6 | 156.3 | 3 | -5 |
| 16 1,2-epoxydodecane | 2855-19-8 | 184.3 | 5 | -6.3 |
| 17 1,2- epoxyoctane | 286-62-4 | 128.2 | 20 | -4.3 |

a) Gerberick, G. F. et al. (2004)、 b) Gerberick, G. F. et al. (2007)

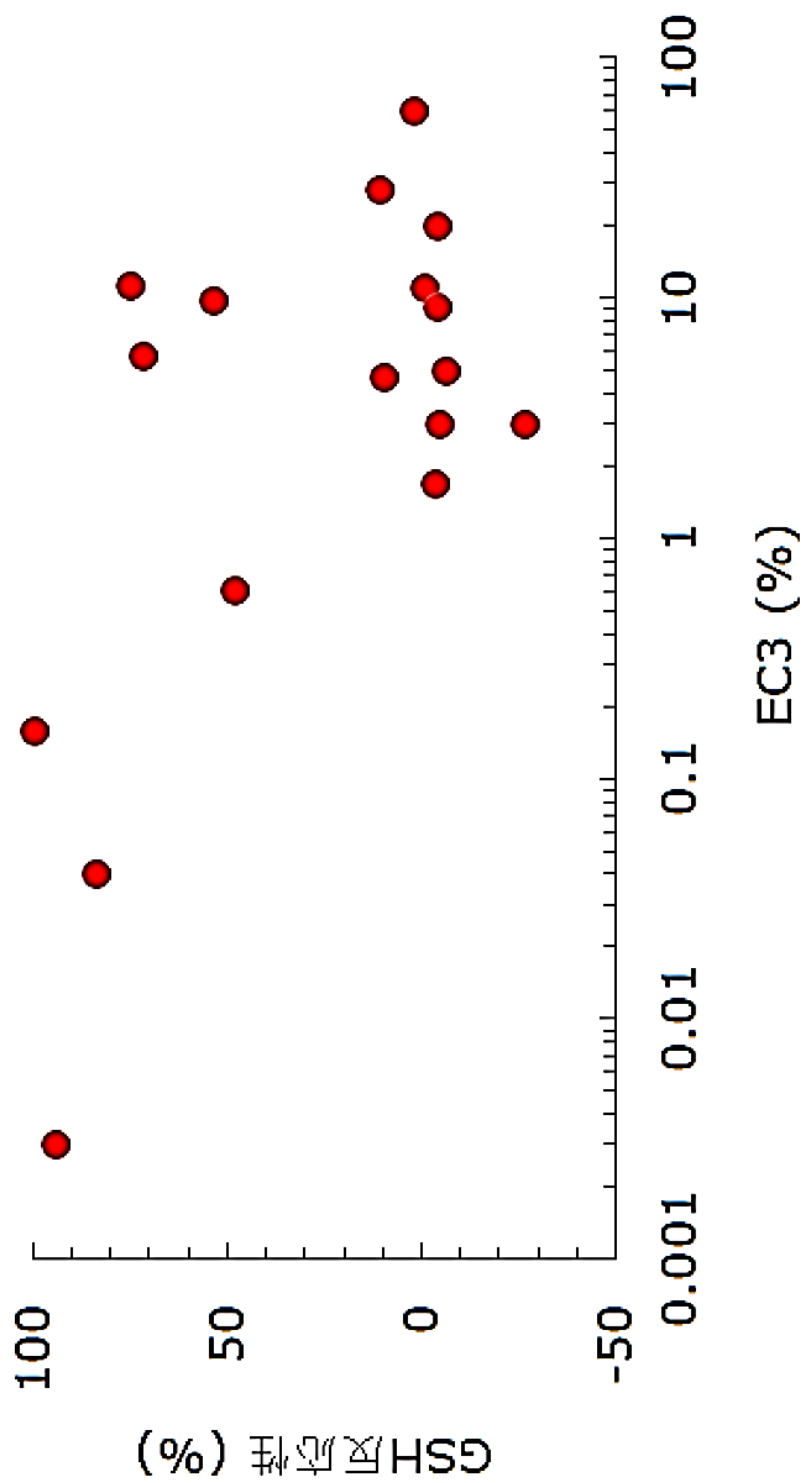


図 18. 化学物質物質のグルタチオン反応性と皮膚感作能の強弱（動物実験結果：EC3）の関係
 EC3:マウスを用いた LLNA 試験において、溶媒対照の 3 倍の細胞増殖を誘導する塗布濃度

第4章 皮膚感作性物質による皮膚樹状細胞の応答とその分類

第1節 マウス耳介における皮膚樹状細胞サブタイプのマーカーの発現と皮膚感作物質の投与回数との関係

1. 緒言

皮膚樹状細胞は、皮膚感作性物質と皮膚タンパク質の複合体を取り込み、皮膚からリンパ節へと移動し、MHC（主要組織適合遺伝子複合体）を naïve T 細胞に提示する役割を担っている（OECD, 2010）。最近の研究では、マウスの皮膚には、少なくとも3つの樹状細胞のサブタイプがあると考えられている（Guilliams et al., 2010; Kaplan, 2010）。これら3つのサブタイプは、Langerin 陽性 CD11c 陽性表皮樹状細胞（ランゲルハンス細胞）、Langerin 陽性 CD11c 陽性真皮樹状細胞および Langerin 陰性 CD11c 陽性真皮樹状細胞である（Nagao et al., 2009）。

前章の結果から、抗原形成に着目したタンパク質との反応によって、皮膚感作性物質を分類できることが明らかになったが、混合影響の発現に影響する作用機序を明らかにするためには「樹状細胞（抗原提示細胞）の活性化および皮膚からリンパ節への移動」について調査する必要がある。これまでマウスの皮膚において、Langerin および CD11c の発現を検出した報告はない。

そこで、本節では、Real Time PCR（RT-PCR）法を用いて、マウスの耳介皮膚における Langerin および CD11c の発現を確認するとともに、皮膚感作性物質の投与回数と発現の変化の関係について検討を行なった。なお、ランゲルハンス細胞が、2,4-dinitrochlorobenzene（DNCB）塗布後に反応すること（Schramlova et al., 2010）から、本節では DNCB を用いて検討することとした。

2. 材料と方法

(1) 化学物質

皮膚感作性物質として 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB ; 和光純薬工業株式会社、大阪、日本) を用いた。

(2) 供試動物

供試動物は、CBA/J マウス (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN、厚木、日本) を用いた。なお、試験使用時の週齢は、9~10 週齢であった。動物は、前・床面ステンレス網で壁面アルミ製の懸垂式ケージ (W176×D302×H130 mm) に 3 匹で收容した。飼料はマウス用固型飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取とし、給水は自動給水装置を介して濾過した水道水を自由飲水させた。また、飼育環境は、気温 21~25℃、湿度 40~70%、照明時間 12L12D (8:00~20:00) とし、換気回数 10 回以上/時間に設定した。

(3) 表皮および真皮の採取

試験は、4 群 (無処置群、DNCB 1 群、DNCB 2 群および DNCB 3 群)、1 群あたり 3 匹とした。DNCB 1 群では単回塗布、DNCB 2 群では 2 日間連続塗布、DNCB 3 群では 3 日間連続塗布を行なった。なお、塗布には AOO (Acetone/olive oil 4:1) を溶媒とする 1%DNCB を用いた。DNCB 1 および 2 群は、最終塗布の 6 時間後、DNCB 3 群では最終塗布 3 日後 (Day 5) に頸椎脱臼により安楽殺し、各個体から両耳介を採取した。採取した耳介は背部側と腹部側に分割した。背部側の耳介は、背部面が上になるようにして 0.25%トリプシンに浮かせ、37 °C で 2 時間加温後、表皮 (Epidermis) と真皮 (Dermis) に分割した (Hattori et al., 2011)。

(4) Real Time PCR

分割した耳介背部の表皮および真皮から、RNA purification kit (RNeasy mini kit: qiagen) を用いて、それぞれ RNA を抽出した。0.1 μ g の抽出した RNA を 65°C、5 分間で処理した後、oligo dT primer および逆転写酵素 (SuperScript III Reverse Transcription: Invitrogen) を加えて、50°C、1 時間、さらに 70°C、15 分間の条件で反応させて cDNA を合成した。さらに、Taqman[®] Fast advanced Master Mix (Applied Biosystems) と Langerin の Taqman probe (Mm00523545_m1 ; Applied Biosystems) あるいは CD11c の Taqman probe (Mm00498698_m1 ; Applied Biosystems) を添加して、反応液を調製し、7900HT Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems) にて 95°C、20 秒 1 サイクル、95°C、1 秒後、60°C、20 秒の反応を 40 サイクルとする条件で Real Time PCR を実施した。得られた結果は、mouse β -actin (製品番号 4352341E; Applied Biosystems) で補正し相対発現量を求めた。さらに、表皮および真皮における無処置群の補正相対発現量を 1.0 とした目的遺伝子の補正相対発現値を算出した。

(5) 動物福祉

本実験は、住友化学株式会社 生物環境科学研究所の「生物環境科学研究所における実験動物に関する規定」に従い、実施した。

3. 結果

耳介において、Langerin および CD11c の発現が確認されたが、CD11c の発現量は低く、RT-PCR 法での定量限界以下となった。一方、Langerin に関しては、定量可能な発現量であることが確認された。DNCB の投与回数と Langerin 発現の変化を確認した結果、表皮および真皮いずれも投与回数とともにその発現が減少する傾向が認められ、DNCB 3 群において最も減少した (図 19)。

4. 考察

マウスの皮膚では、少なくとも 3 つの皮膚樹状細胞サブタイプ ; Langerin 陽性 CD11c 陽性表皮樹状細胞 (ランゲルハンス細胞)、Langerin 陽性 CD11c 陽性真皮樹状細胞および Langerin 陰性 CD11c 陽性真皮樹状細胞、の存在が報告されている (Guillams et al., 2010; Kaplan, 2010; Nagao et al., 2009)。DNCB を用いて、サブタイプのマーカーである CD11c と Langerin について発現を確認した結果、Langerin は定量可能であり、CD11c は定量できないことが判明した。樹状細胞の存在比は、最も多く存在するランゲルハンス細胞であっても、表皮の 5% に過ぎない (清水, 2005)。RT-PCR 法で CD11c の定量ができなかった理由として、存在比が少ないことに加え、1 細胞あたりの発現量が低い可能性が推察された。

本章の目的である 3 つの皮膚樹状細胞サブタイプの応答は、Langerin のみをマーカーに、表皮・真皮の構造による分類を加えることで比較できると考えられた。そこで、次節では、Langerin をマーカーに皮膚感作性物質に対する皮膚樹状細胞の応答を比較することとした。

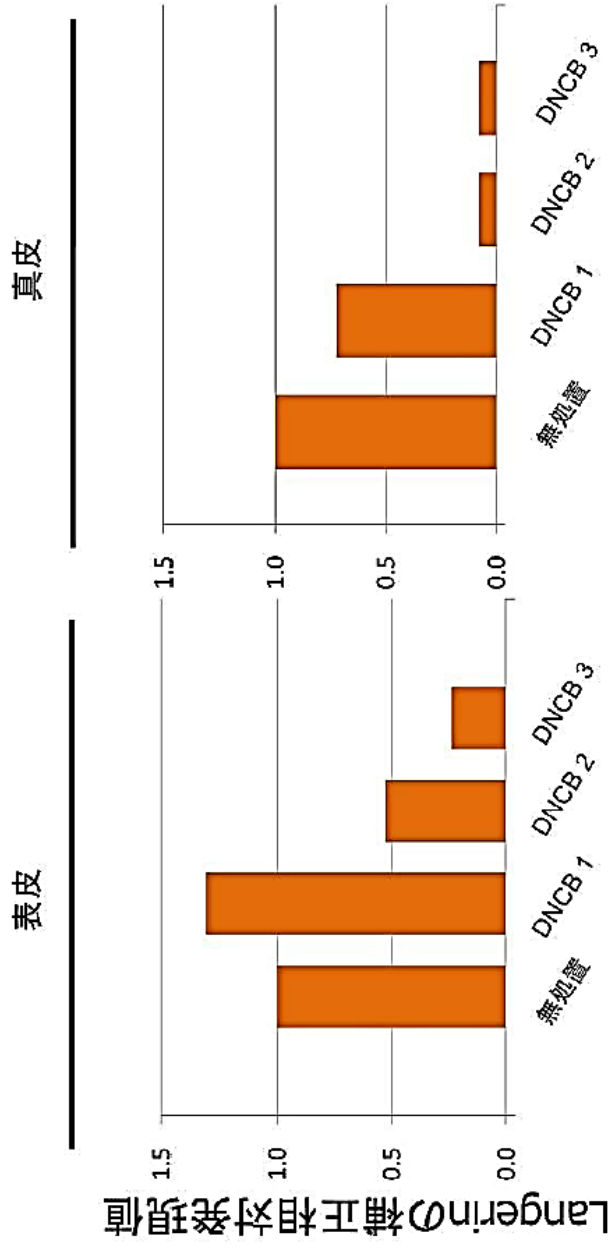


図 19. 表皮・真皮における Langerin の補正相対発現値

棒グラフは 3 匹の平均値

無処置；塗布なし

DNCB 1：DNCB (1%) を単回塗布

DNCB 2：DNCB (1%) を 2 日連続塗布

DNCB 3：DNCB (1%) を 3 日連続塗布

第 2 節 Langerin をマーカーとした皮膚感作性物質に対する皮膚樹状細胞の応答の比較

1. 緒言

皮膚は、最も表面に近い部分を表皮と呼び、角質層、顆粒層、有棘層、基底層に分けられ、その表皮の下に、真皮および皮下組織がある（清水, 2005）。皮膚感作性反応に重要な役割を担う樹状細胞は、表皮の基底層付近と真皮にそれぞれ存在していることが確認されており、そのマーカーの 1 つが Langerin である（Nagao et al., 2009）。

Langerin は、皮膚の表皮に存在するランゲルハンス細胞に強く発現している C 型レクチンである。Langerin の発現は、細胞内の抗原輸送を担っている Birbeck 顆粒の発現と相関すること（Valladeau et al., 2000）や、培養液中のランゲルハンス細胞では成熟とともに、その発現が低下することが知られており（Schuler et al., 1985）、Langerin は細胞の貪食に関わっていると考えられているが、Langerin の役割については、未だ明らかにされていない。

前節の結果から、Langerin は RT-PCR 法による定量が可能であり、Langerin をマーカーに 3 つの皮膚樹状細胞の応答が比較可能であることが示された。

本節では、皮膚感作性物質を 3 日間連続で塗布し、Langerin の遺伝子発現量およびタンパク質の局在を調査し、皮膚感作性物質による「皮膚樹状細胞の活性化および皮膚からリンパ節への移動」について検討を加えた。この結果より、皮膚感作性における混合影響の発現に関する皮膚樹状細胞の影響を考察することとした。

2. 材料と方法

(1) 化学物質

皮膚感作性物質として 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB ; 和光純薬工業株式会社、大阪、日本)、Oxazolone (Oxa ; Sigma-Aldrich、St Louis、Mo、USA)、Phthalic anhydride (PA ; ナカライテスク株式会社、京都、日本) および toluene diisocyanate (TDI ; 和光純薬工業株式会社、大阪、日本) を用いた。

(2) 供試動物

供試動物は、CBA/J マウス (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN、厚木、日本) を用いた。なお、試験使用時の週齢は、9~10 週齢であった。動物は、前・床面ステンレス網で壁面アルミ製の懸垂式ケージ (W176×D302×H130 mm) に3匹で収容した。飼料はマウス用固型飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取とし、給水は自動給水装置を介して濾過した水道水を自由飲水させた。また、飼育環境は、気温 21~25℃、湿度 40~70%、照明時間 12L12D (8:00~20:00) とし、換気回数 10 回以上/時間に設定した。

(3) Real Time PCR

試験は、全4群 (Control 群、DNCB 群、Oxa 群、PA 群)、1 群あたり 6 匹とした。それぞれの皮膚感作性物質は、AOO (Acetone/olive oil 4:1) を溶媒に調製 (DNCB : 1%、Oxa : 2%、PA : 10%、TDI : 0.5%) し、25 μ L/ear の割合でマウスの両耳介背部に塗布した。各皮膚感作性物質の濃度は、マウスを用いた LLNA 試験の結果 (van Och et al., 2000) からリンパ細胞の増殖が誘導され、マウスに顕著な毒性が現れない濃度とした。なお、Control 群は AOO のみを塗布した。耳介への塗布は、初日 (Day 0)、初回塗布翌日 (Day 1) および初回塗布 2

日目 (Day 2) の計 3 回行なった。供試動物は、最終塗布の 3 日後 (Day 5) に頸椎脱臼により安楽殺し、各個体から両耳介を採取した。なお、採取した耳介は、前節と同様に処理した。

耳介背部の表皮および真皮から、RNA purification kit (RNeasy mini kit: qiagen) を用いて、RNA を抽出した。0.1 μ g の RNA を 65°C 5 分で処理した後、oligo dT primer および逆転写酵素 (SuperScript III Reverse Transcription: invitrogen) を加えて、50°C 1 時間、70°C 15 分間反応させて cDNA を合成した。さらに、Taqman[®] Fast advanced Master Mix (Applied Biosystems) と Langerin の Taqman probe (Mm00523545_m1; Applied Biosystems) を添加して反応液を調製し、7900HT Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems) にて 95°C 20 秒 1 サイクル、95°C 1 秒後、60°C 20 秒の反応を 40 サイクルする条件にて Real Time PCR を実施した。得られた結果は、mouse β -actin (製品番号 4352341E; Applied Biosystems) で補正し相対発現量を求めるとともに、表皮および真皮における Control 群の補正相対発現量を 1.0 とした目的遺伝子の補正相対発現値を算出した。

(4) 免疫組織学的検査

試験は、全 4 群 (Control 群、DNCB 群、Oxa 群、PA 群、TDI 群)、1 群あたり 2 匹とした。それぞれの皮膚感作性物質は、AOO を溶媒に調製 (DNCB : 1%、Oxa : 2%、PA : 10%、TDI : 0.5%) し、25 μ L/ear の割合でマウスの両耳介背部に塗布した。塗布濃度は、RT-PCR と同様の濃度とした。なお、Control 群は AOO のみの塗布とした。耳介への塗布は、初日 (Day 0)、初回塗布翌日 (Day 1) および初回塗布 2 日目 (Day 2) と 3 日間連続で行なった。

各群のマウスは、最終塗布の 3 日後 (Day 5) に頸椎脱臼により安楽殺し、各

個体から両耳介を採取した。採取した耳介を背部側と腹部側に分割し、背部側のみを包埋剤（OCT コンパウンド）に包埋した。包埋ブロックは、クリオスタット（LEICA CM3050S）を用いて薄切（6 μ m）した。薄切した切片は、スライドガラスに貼り付け、cold acetone で固定し、Endogenous Biotin blocking kit（Invitrogen, E-21390）でブロッキングした。その後、Anti-Mouse CD207（Langerin）Biotin（eBioscience, Catalog Number: 13-2075）で反応させ、続いて Alexa Fluor 488 Streptavidine（Life technologies, Catalog Number: S32354）と反応させた。反応後、再び洗浄し、ProLong® Gold antifade reagent（Invitrogen, P36930）でカバーガラスに封函し、蛍光顕微鏡下で Alexa Fluor 488 の発光を観察した。

（5）統計解析

統計解析には、StatLight#05 version 2 (Yukms Co., Ltd., 東京, 日本)を用いた。RT-PCR 法による Langerin の変化については、Bartlett の等分散検定を行い、等分散の場合は、Control 群と各皮膚感作性物質投与群との間で Dunnett の多重比較検定を、不等分散の場合には同様に Steel の多重比較検定を行なった。

なお、検定はいずれの場合も両側検定を行い、有意水準は 5%および 1%で評価した。

（6）動物福祉

本実験は、住友化学株式会社 生物環境科学研究所の「生物環境科学研究所における実験動物に関する規定」に従い、実施した。

3. 結果

(1) Real Time PCR

各群における Langerin の補正相対発現値を、図 20 (表皮) および図 21 (真皮) に示した。表皮における Langerin の発現量は、Control 群と比較して Oxa 群では有意に低下することが確認された ($p < 0.05$)。一方、DNCB 群、PA 群および TDI 群では、Control 群に比べ、有意な変化は認められなかった。真皮における発現量は、DNCB、Oxa、PA および TDI、いずれの群においても、Control 群と比較して有意な変化は認められなかった。

(2) 免疫組織学的検査

各群における免疫組織学的検査による Langerin の局在を図 22 に示した。

その結果、Control 群では、表皮層を中心に Langerin タンパク質の局在が認められた。PA 群および TDI 群では、Control 群と同様に表皮層の Langerin タンパク質の局在が認められたが、DNCB 群と Oxa 群では、ほとんど確認することができなかった。一方、真皮中の Langerin タンパク質の局在は、Control 群を含め、DNCB、Oxa、PA および TDI のいずれの群でも確認することができなかった (図 22)。

4. 考察

本節では、マウスに4つの皮膚感作性物質 DNCB(1%)、Oxa(2%)、PA(10%)、TDI(0.5%)をそれぞれ塗布し、Langerin の発現および局在をもとに、皮膚樹状細胞の応答を皮膚感作性物質間で比較した。いずれの皮膚感作性物質とも塗布した濃度は1濃度でのみであるが、これら濃度は、マウスを用いた皮膚感作性試験(LLNA試験)で陽性と判断される、つまり、所属リンパ節にて十分なT細胞の増殖が認められる(van Och et al., 2000)濃度であり、感作相の応答は確実に進んでいると考えられる。

マウスの表皮において、Langerin 陽性となる細胞は、ランゲルハンス細胞であることが報告されていることから(Valladeau et al., 2002)、Control群の表皮において確認されたLangerinは、ランゲルハンス細胞を示すものと考えられた。

Th1型皮膚感作性物質(DNCBおよびOxa)塗布による表皮Langerinの発現低下(図20, 23および24)は、本操作によってランゲルハンス細胞の成熟およびリンパ節への移動が促されたことに起因すると考えられた。Schulerら(1985)は、培養ランゲルハンス細胞を用いた実験において、Langerinの発現がランゲルハンス細胞の活性化に伴って低下することを報告している。ランゲルハンス細胞の役割に関しては、抗原をリンパ節へ運搬すること(Henri et al., 2001)、IL-10を分泌することで過剰な免疫応答を抑制することが知られている(Kripke et al., 1990; Igyarto et al., 2009)。IL-10は、INF- γ の分泌を抑制すること(Xu et al., 1996)、そのINF- γ はリンパ節において、DNCBおよびOxaによって誘導されることが報告されている(Hayashi et al., 2001)。これらのことから、Th1型皮膚感作性物質を塗布することで、ランゲルハンス細胞の応答、つまりランゲルハンス細胞によるリンパ節への抗原の運搬、さらには、IL-10による皮膚感作性応答の調整が進むことが考えられた。

一方、Th2 型皮膚感作性物質（PA および TDI）に関しては、その塗布によって Th1 型で示された Langerin の変化が認められなかったことから（図 22）、皮膚感作性物質の型によって、ランゲルハンス細胞の応答が異なることが示唆された。また、Th2 型皮膚感作性物質では、Th1 型のランゲルハンス細胞に代わる細胞の存在が推測される。

先に述べたとおり、感作相における反応は、①皮膚への浸透、②皮膚中のタンパク質との反応による抗原形成（第 4 章）、③皮膚樹状細胞細胞の活性化および皮膚からリンパ節への移動（本章）、④ケラチノサイトの活性化、⑤皮膚所属リンパ節における抗原特異的なメモリー T 細胞の増加、である（図 1）。「④ケラチノサイトの活性化」については、“皮膚樹状細胞の皮膚からリンパ節への移動”において必須の現象であり、以下の機序によるものであることが示唆されている。TNF- α および IL-18 は、“皮膚樹状細胞の皮膚からリンパ節への移動”において必要なサイトカインであるが（Cumberbatch et al., 1997; Antonopoulos et al., 2008）、ケラチノサイトは、皮膚感作性物質に曝露されるとそれらサイトカインを分泌する（Luster et al., 1995; Naik et al., 1999）。このことから、応答する皮膚樹状細胞のサブタイプが異なれば、ケラチノサイトの応答も異なる可能性が考えられる。

「⑤リンパ節における抗原特異的なメモリー T 細胞の増加」に関しては、応答する皮膚樹状細胞のサブタイプが異なれば、その反応は独立して進行することが示唆される。T 細胞への抗原提示と T 細胞の分化・増殖は、樹状細胞上の接着分子（CD40, CD80/CD86）が、T 細胞上のそれぞれのリガンド（CD154, CD28/CD152）とそれぞれ作用することで、制御されている（Acuto et al., 2003; Quezada, et al., 2004）。Shklovskaya ら（2008）は、リンパ節への樹状細胞の到達時期や樹状細胞上の接着分子の発現動態が、樹状細胞のサブタイプごとに

異なることを報告している。つまり、応答する皮膚樹状細胞のサブタイプが異なれば、その後の感作相の反応は、独立して進むことが考えられた。

第2章 第1節および第2節の試験条件では、同型の皮膚感作性物質同士を混合した場合、皮膚感作性反応の発症過程の作用機序において、拮抗が起きていることが考えられた。本章の結果より、拮抗が起きている作用機序が皮膚樹状細胞の応答であることが示唆された。

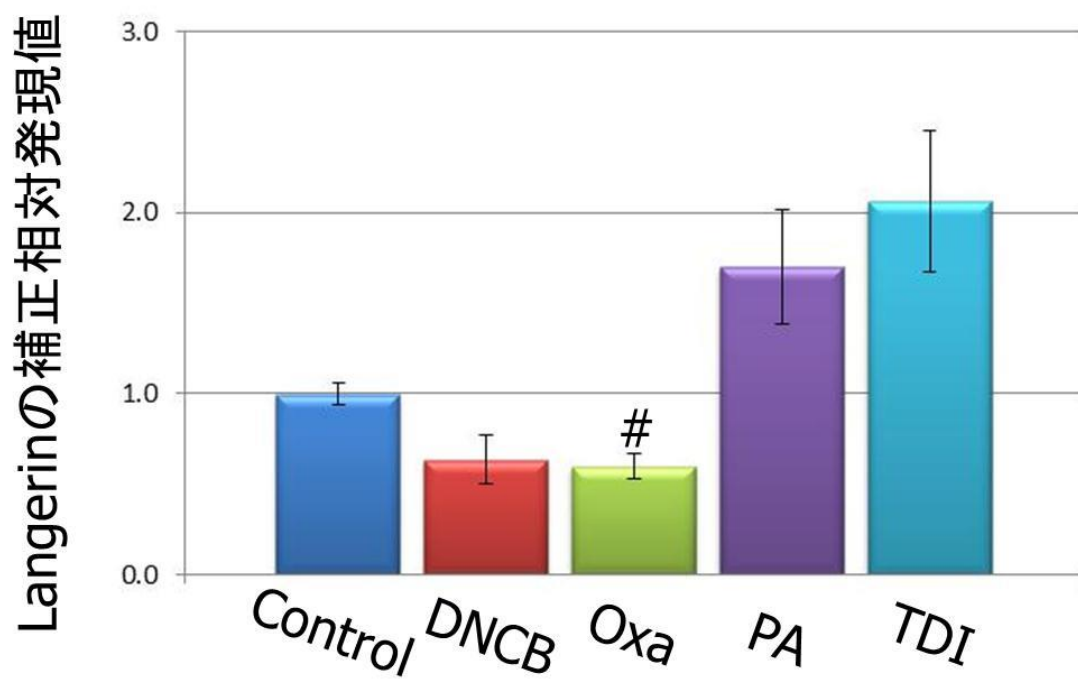


図 20. 表皮における Langerin の補正相対発現値

バーは平均値±標準誤差 (n=6)

#Control 群と有意差がある。

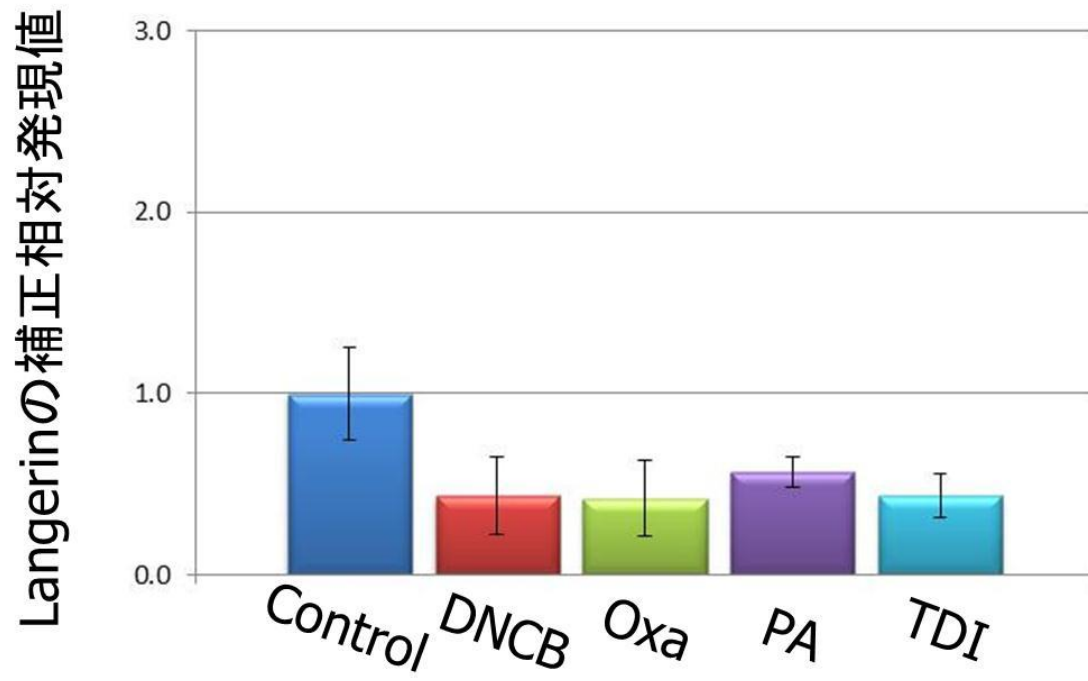


図 21. 真皮における Langerin の補正相対発現値
バーは平均値±標準誤差 (n=6)

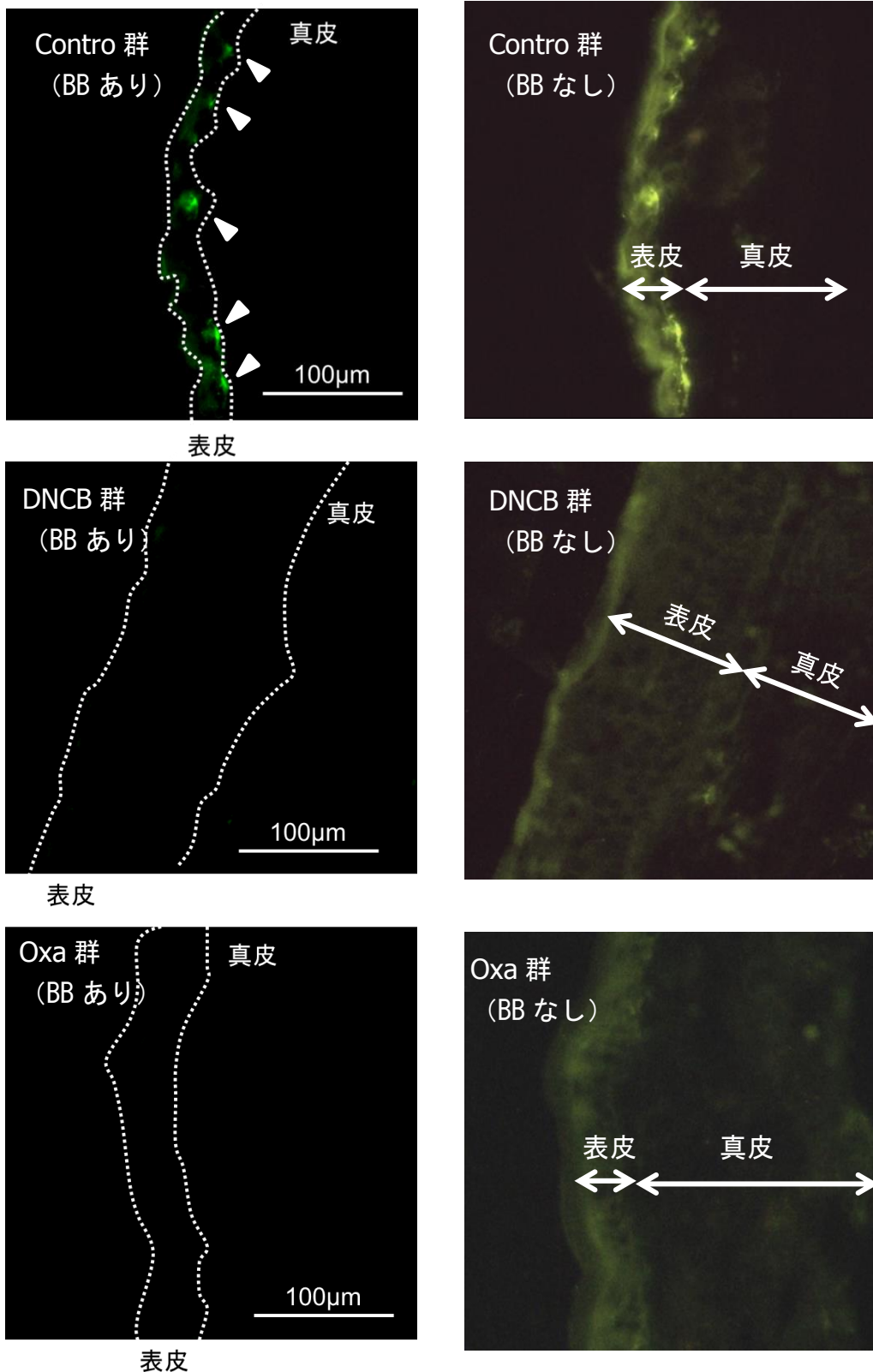


図 22. 耳介の免疫染色 (Control 群、DNCB 群、Oxa 群)

矢印 : Langerin タンパク質

BB あり: ブラックバランスあり、BB なし: ブラックバランスなし

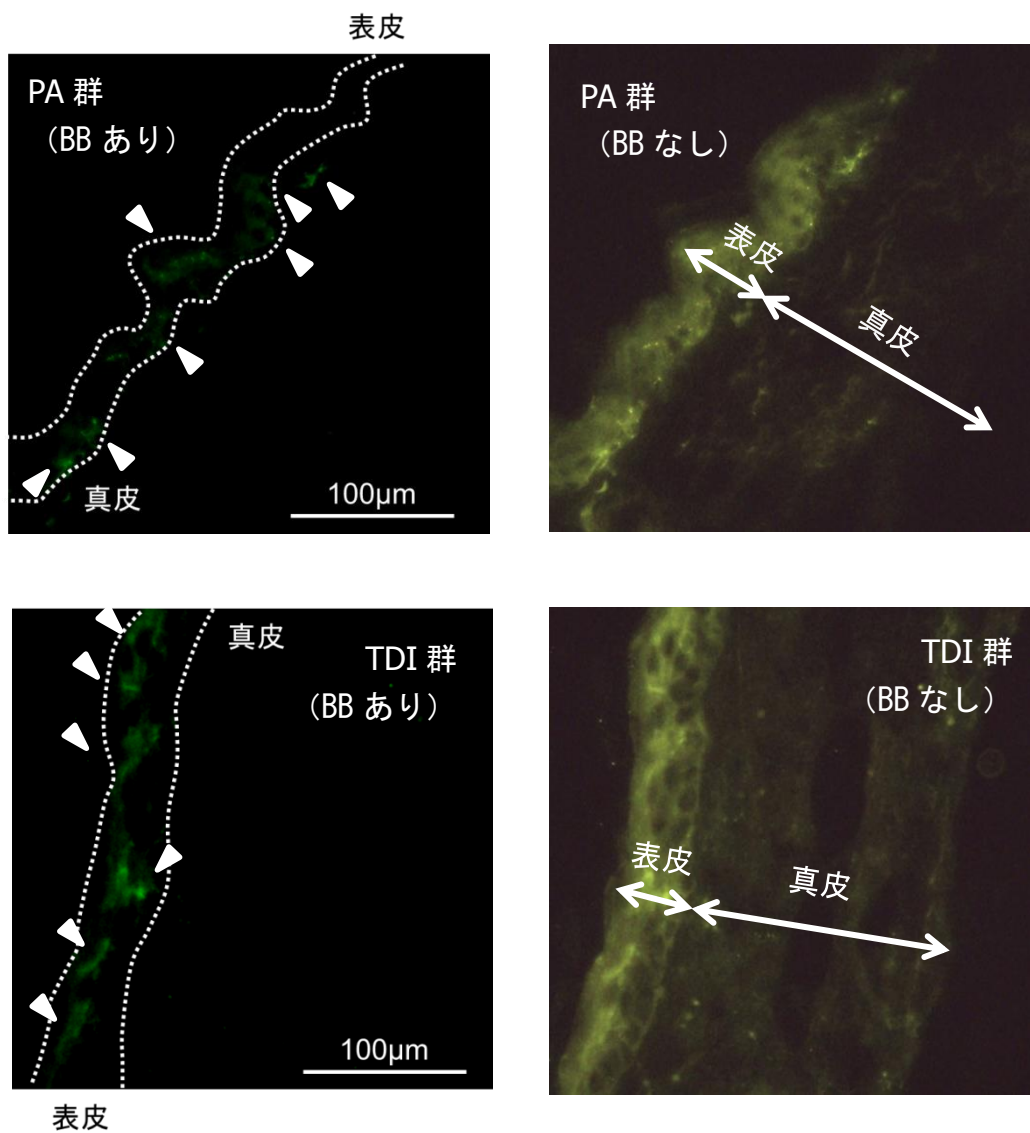


図 22 (続き). 耳介の免疫染色 (PA 群、TDI 群)

矢印 : Langerin タンパク質。

BB あり: ブラックバランスあり

BB なし: ブラックバランスなし

第5章 総合考察

本論文は、これまで報告のなかった皮膚感作性における混合影響を明らかにするとともに、その発現において重要となる作用機序を見いだした。すなわち、皮膚感作性において混合影響が存在すること、その影響は混合する皮膚感作性物質の組み合わせにより決定されることをモルモットおよびマウスで見出した（第2章）。加えて、感作相の作用機序において、皮膚樹状細胞の応答の違いが混合影響の発現に影響することを明らかにした（第3章および第4章）。図23に示すように、感作相の各作用機序では皮膚感作性物質ごとに異なる反応が進み、Th1型もしくはTh2型のどちらの感作性反応が進行するかの分岐点は、皮膚樹状細胞の活性化であることが示唆された。本研究の目的である「化学物質の単一の感作性情報から混合影響の発現を予測すること」に関しては、図24に混合影響を予測するためのモデル案を示す。まず、皮膚感作能の不明な新規化学物質は、単一の化学物質で皮膚感作性試験に供試し、「陽性」と「陰性」に分類する。「陽性（皮膚感作性物質である）」と判断された化学物質は、Langerinをマーカーに用いて、「Langerinの変化する皮膚感作性物質」と「Langerinの変化しない皮膚感作性物質」に分類する。混合影響の予測は、Langerinが変化する化学物質同士およびLangerinが変化しない化学物質同士であれば、混合影響が発現し、Langerinが変化する化学物質と変化しない化学物質では、混合影響は発現しないと予測することが可能になる。

本研究を遂行するにあたり、当初は“混合影響によって皮膚感作性反応の増強が生じる”ものと予想していたが、結果はいずれも拮抗効果であった。これは、“皮膚感作性物質は、その混合によって悪影響が緩和される”との曲解に繋がるものであったが、重要なのは、“皮膚感作性物質においても混合影響が存在

する”という点であり、その“存在”は“混合濃度によっては、反応の増強が生じうる”ことである。Schlesingerら（1992）は、硫酸とオゾンを用いた混合吸入毒性試験において、高濃度の混合では拮抗効果（低減）が現れるものの、反対に低濃度の混合では相乗効果によって、その毒性が高まることを報告している。このように、皮膚感作性物質においても、その混合濃度によっては相加効果あるいは相乗効果が現れる可能性は十分に考えられる。したがって、重要なことは、化学物質の混合影響の有無を正確に予測することであるといえる。

本論文で得られた結果は、『動物実験代替法の開発』にも寄与するものである。近年、動物愛護の観点から従来の動物実験による方法から、動物を用いない代替法（動物実験代替法）によって毒性を評価することが強く望まれている（環境省, 2013; European Commission, 2010）。欧州においては、動物実験によって安全性が評価された成分を含む化粧品は、その輸入販売が2013年より禁止されることとなった（European Commission, 2003；欧州化粧品指令の第7次改訂）。また、欧州 REACH（European Chemicals Agency, 2008）では、動物実験代替法としてシミュレーションによる定量的構造活性相関モデルや *in vitro* 試験などの利用が積極的に奨められている。このような背景のもと、皮膚感作性試験についても複数の動物実験代替法が開発されているが（Gerberick et al., 2007, Sakaguchi et al., 2007; Natsch and Emter, 2008）、1つの試験法のみによって化学物質の皮膚感作能を予測することは難しく、複数の試験方法を組み合わせて評価することが必須であることが指摘されている（Bauch et al., 2012; Nukada et al., 2013）。皮膚感作性試験の動物実験代替法を確立する上で重要となる試験方法の組み合わせ評価の検証については、公的機関によって進められていくことがすでに計画されているが（OECD, 2013）、本論文の感作相の作用機序における

皮膚感作性物質ごとの検討結果は、この代替法の確立に大きな貢献を果たすものと考えられる。

本論文の結果は、『ワクチンの開発』の一助となることも期待される。第4章で述べたように、樹状細胞は“抗原の処理およびT細胞への提示”という重要な役割を担っているが、樹状細胞を抗原処理することによって免疫反応を増強できることが報告されており (Stainmen, 2007)、またワクチンの化学修飾やワクチン粒子の表面処理によって、免疫反応を効果的に誘導させる研究も盛んにおこなわれている (Baleeiro et al., 2013; Kastenmüller et al., 2011)。ワクチン開発にて、皮膚樹状細胞を対象に効果的に免疫反応を誘導することは、針を必要としない簡易な方法 (経皮ワクチン) として利用できる。本論文では、皮膚感作性物質 Th1 型と Th2 型間において皮膚樹状細胞の応答が異なることが示された。isocyanate 基を有すれば、Th2 型皮膚感作性物質であるといった“分子構造”と“皮膚感作性物質の型”の関係が報告されている (Lalko et al., 2007)。したがって、皮膚感作性物質の分子構造と応答する皮膚樹状細胞との関係を調査することで、分子構造の修飾によって皮膚樹状細胞の制御が可能となり、その技術によって新たな高効率ワクチンを開発することも考えられる。

今回の研究によって、「化学物質の単一の感作性情報を基にした混合影響発現の有無の予測」について示されたが、実際の現場では、さまざまな因子が影響することは予想に難くない。とりわけ、経皮透過性が、混合効果の増強あるいは低減に影響することが報告されている。たとえば、使用溶媒や pH の違いなどが、皮膚感作性反応に影響することが知られている (Jowsey et al., 2008; Basketter, 2001)。また、使用者側の要因としては、角質層に損傷がある場合には皮膚感作性の反応が強くなることも挙げられる (Prinsen, 1997)。したがって、現場においては、混合される化学物質種類とその組み合わせに加え、これらの

点についても十分配慮して、混合影響による健康被害を未然に防ぐことが望まれる。

本研究は、皮膚感作性における混合影響について、世界で初めて報告するものであり、皮膚感作性における混合影響の存在と、その混合影響の発現は、混合する皮膚感作性物質の組み合わせにより決定されることが明らかとなった。また、混合影響の発現に影響する感作相の作用機序は、皮膚樹状細胞の応答であることが示唆された。

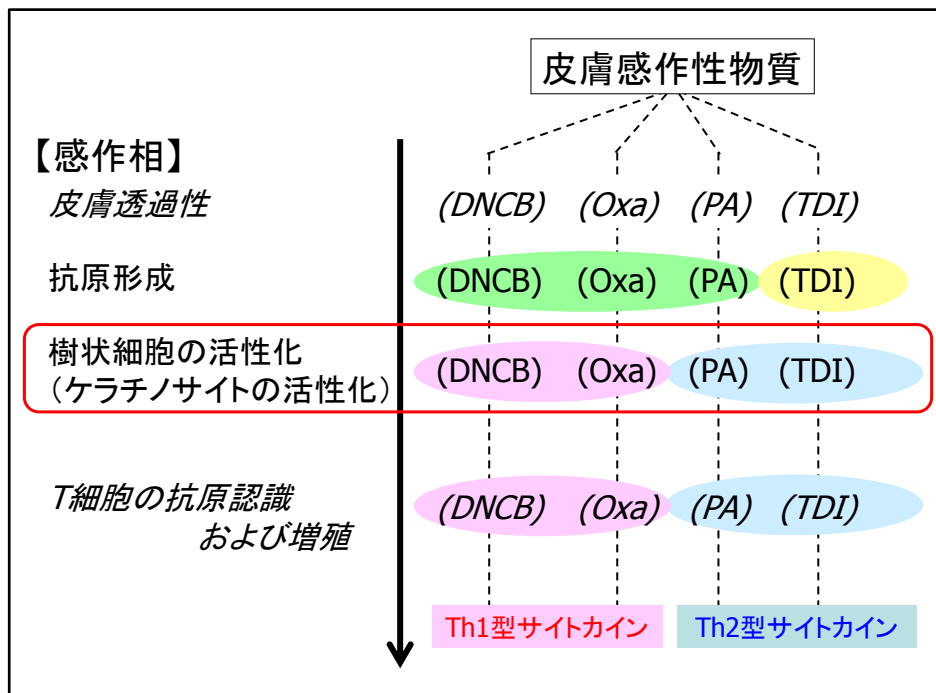


図 23 皮膚感作性物質の感作相での各作用機序による分類

本研究にて使用した皮膚感作性物質 (Th1 型 : DN CB, Oxa、Th2 型 : PA, TDI) について、それぞれの作用機序に基づいた試験方法の結果を基に分類すると Th1 型と Th2 型の皮膚感作性物質は『樹状細胞の活性化』以降の反応が独立しているものと考えられた。

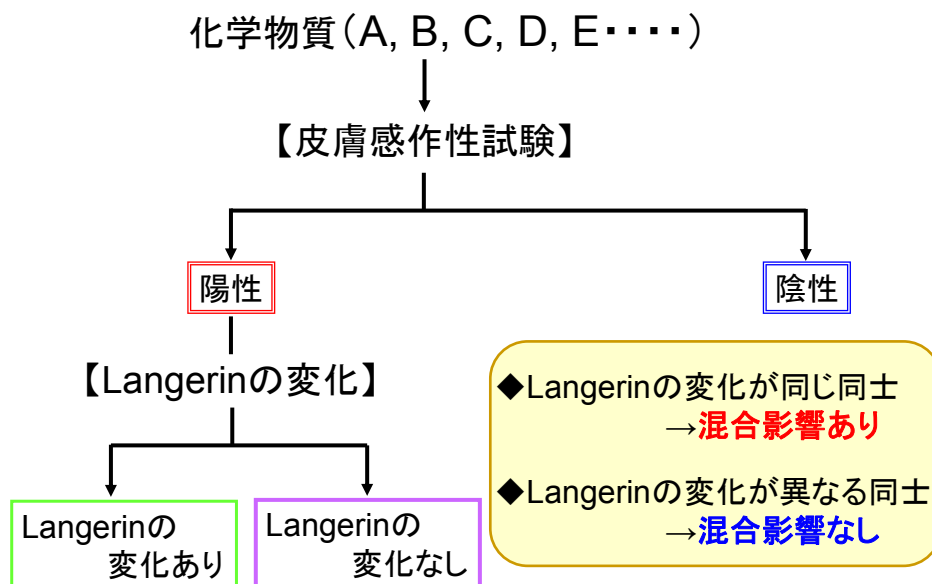


図 24 混合影響発現の有無の予測法

皮膚感作能が不明な新規化学物質 (A,B,C,D,E.....) は、それぞれ単一物質として皮膚感作性試験に供試する。皮膚感作性試験結果が陽性 (皮膚感作性物質) となれば、Langerin の変化を追加で確認する。混合影響の予測は、Langerin が変化する皮膚感作性物質同士および Langerin が変化しない皮膚感作性物質同士であれば、混合影響が発現し、Langerin が変化する皮膚感作性物質と変化しない皮膚感作性物質では、混合影響は発現しないと予測する。

要約

皮膚感作性物質により引き起こされるアレルギー性接触皮膚炎（皮膚感作性反応）は、発症頻度の高い職業病である。実際の化学工場では、同時に複数の化学物質を使用したり、複数の化学物質を混合して使用する。そのため、化学物質の毒性において混合影響を予測すること、すなわち、混合操作を行うことで現れる毒性を事前に理解することが極めて重要である。しかしながら、これまでの混合影響に関する研究報告は、吸入毒性に関するものが中心で、その報告数も非常に少ない。皮膚感作性反応は化学物質に特異的な反応であり、吸入毒性とは「特異性」の点で大きく異なることから、既知の研究報告から皮膚感作性における混合影響を予想することはできない。そこで、本研究では、皮膚感作性物質を感作相において混合することの影響（皮膚感作性における混合影響）に関する検討を行なった。

第2章第1節では、モルモットを用いて皮膚感作性における混合影響を検討した。化学物質の皮膚感作能の評価で良く利用されるマキシマイゼーション試験を用いて、皮膚感作性物質にはTh1型皮膚感作性物質としてDNCBおよびOxa、Th2型皮膚感作性物質としてPAおよびTDIを選択し、Th1型同士(DNCBとOxa)、Th1型(DNCB)とTh2型(PA)、Th2型同士(PAとTDI)を混合した。各混合液で動物を感作させた後、混合したそれぞれの皮膚感作性物質に対する皮膚感作性反応の変化にて、混合影響を評価した。Th1型同士、Th2型同士の混合では、混合操作による皮膚感作性反応の低減を認め、Th1型とTh2型の混合では、何ら変化は認めなかった。以上の結果より、皮膚感作性において混合影響の存在が明らかとなり、その影響の発現の有無は、混合する皮膚感作性物質の組み合わせにより、決定されることが明らかとなった。

第 2 章第 2 節では、マウスを用いて皮膚感作性の混合影響を検討した。前節と同じ混合の組み合わせで、マウス耳介腫脹試験を用いて、同様に混合影響を評価した。モルモットの結果と同様に、Th1 型同士、Th2 型同士の混合では、混合操作による皮膚感作性反応の低減を認め、Th1 型と Th2 型の混合では、何ら変化は認めなかった。以上の結果から、皮膚感作性における混合影響の存在と、その影響の発現が混合する皮膚感作性物質の組み合わせにより決定されることに加え、これらはモルモットとマウスで大きな違いがないことが明らかとなった。

これら動物実験の結果から、感作相での作用機序は Th1 型 (DNCB) と Th2 型 (PA) で異なることが考えられた。混合影響の発現を決定する作用機序を明らかにするため、皮膚感作性物質ごとの作用機序を比較することとした。まず、第 3 章では、皮膚感作性物質の抗原形成とその分類について検討を行なった。

皮膚感作性の抗原形成を模倣した *in chemico* 試験の 1 つであるグルタチオン結合性試験を用いて、DNCB、Oxa、PA および TDI の抗原形成について調査した。DNCB、Oxa および PA では、グルタチオンとの結合物が認められたが、TDI では結合物は認められなかった。また、グルタチオン結合物が認められた DNCB、Oxa および PA の反応性は、いずれも 80%以上と高い値を示した。以上の結果より、抗原形成において、使用した皮膚感作性物質は、「DNCB、Oxa および PA」と「TDI」に分類されることが判明した。

第 4 章では、皮膚感作性物質による皮膚樹状細胞の応答とその分類について検討を行なった。皮膚樹状細胞は活性化されると、抗原を皮膚からリンパ節へと運搬する役割を担っている。マウスの皮膚では、3 つの樹状細胞のサブタイプ (ランゲルハンス細胞、Langerin 陽性 CD11 陽性真皮樹状細胞、Langerin 陰性 CD11 陽性真皮樹状細胞) が存在する。そこで、樹状細胞の分類マーカーとして

Langerin を用いて、皮膚感作性物質塗布の部位における Langerin 変化を調査し、皮膚樹状細胞の応答を各皮膚感作性物質間で比較した。DNCB および Oxa では、表皮において Langerin の減少が認められたが、PA および TDI では減少は示されなかった。既知の研究報告から、表皮の Langerin はランゲルハンス細胞であり、その減少はランゲルハンス細胞の活性化もしくはリンパ節への移動を示していると考えられた。以上の結果から、皮膚樹状細胞の応答では、4 つの皮膚感作性物質は、「DNCB および Oxa」と「PA および TDI」に分類されることが判明した。

第 3 章および第 4 章の研究結果から、感作相における作用機序では、皮膚感作性物質ごとに異なる反応が進むことが示された。とりわけ、皮膚樹状細胞の応答における違いは、第 2 章の結果で示された作用機序の違いを示すものであり、混合影響の発現を決定する感作相の作用機序であるものと示唆された。

本研究により、皮膚感作性における混合影響の存在と、その混合影響の発現は、混合する皮膚感作性物質の組み合わせにより決定されることが明らかとなった。混合影響の発現に影響する感作相の作用機序として、応答する皮膚樹状細胞の役割が重要であり、皮膚樹状細胞の応答によって、皮膚感作性物質を分類することで、混合影響発現の有無を予測できることが示された。

化学物質の混合影響は、まず混合影響発現の有無を予測することが重要であり、混合影響が発現する組み合わせにおいては、その混合濃度によって相乗的に毒性が高まることが想定されるので、事前に対応策を講ずることで、より安全な使用に繋がると期待される。

謝辞

本研究に対して、ご指導・ご鞭撻を賜った広島大学大学院 生物圏科学研究科 家畜管理学研究室 豊後貴嗣教授に深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、数々のご助言と多大なる配慮を頂きました家畜生体機構学研究室 吉村幸則教授、免疫生物学研究室 古澤修一教授、堀内浩幸教授、水族病理学研究室 中井敏博教授に深く感謝の意を示します。

本研究を進めるうえで多大なるご理解とご配慮いただきました住友化学株式会社 磯部直彦博士、川村聡博士に深く感謝の意を表します。

また、研究を遂行するにあたり、ご指導・ご鞭撻を賜った住友化学株式会社 中村洋介博士、稲若邦文博士、内藤義一博士、鈴木紀之博士、太田美佳学士、小田原恭子学士に深く感謝の意を表します。

本研究にご協力頂いた檜垣環、正門孝臣、生田雄也、澤田遼司の各氏ならびに、グルタチオンを用いた抗原形成に関する検討においてご指導頂いた安部潤修士、皮膚樹状細胞に関する検討において、ご指導頂いた串田昌彦博士、服部信克氏、前田圭子氏に深く感謝の意を表します。

平成 26 年 9 月

森本 隆史

引用文献

- Acuto, O. and Michel, F. (2003); CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling., *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 939-51.
- Antonopoulos, C., Cumberbatch, M., Mee, J. B., Dearman, R. J., Wei, X. Q., Liew, F. Y., Kimber, I. and 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, 361-7.
- Baleeiro, R. B., Wiesmüller, K. H., Reiter, Y., Baude, B., Dähne, L., Patzelt, A., Lademann, J., Barbuto, J. A. and Walden, P. (2013); Topical vaccination with functionalized particles targeting dendritic cells., *J. Invest. Dermatol.*, 133, 1933-41.
- Barratt, M. D and Basketter, D. A. (1992); Possible origin of the skin sensitization potential of isoeugenol and related compounds. (I). Preliminary studies of potential reaction mechanisms., *Contact Dermatitis*, 27, 98-104.
- Basketter, D. A. and Scholes, E. W. (1992a); Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens., *Food. Chem. Toxicol.*, 1, 65-69.
- Basketter, D. A. and Lidén, C. (1992b); Further investigation of the prohaptens concept: reactions to benzene derivatives in man., *Contact Dermatitis*, 27, 90-7.
- Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (2001); Skin sensitisation, vehicle effects and the local lymph node assay., *Food Chem. Toxicol.*, 39, 621-7.

- Bauch, C., Kolle, S. N., Ramirez, T., Eltze, T., Fabian, E., Mehling, A., Teubner, W., van, Ravenzwaay, B. and Landsiedel, R. (2012); Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 63, 489-504.
- Buehler E.V. (1965); Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig., *Arch. Derm.*, 91, 171-6.
- Chipinda, I, Ajibola, R. O., Morakinyo, M. K., Ruwona, T. B., Simoyi, R. H. and Siegel, P. D. (2010); Rapid and simple kinetics screening assay for electrophilic dermal sensitizers using nitrobenzenethiol., *Chem. Res. Toxicol.*, 23, 918-25.
- Cumberbatch, M., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1997); Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration., *Immunology*, 92, 388–95.
- Da Silva, S. C., Sahu, R. P., Konger, R. L., Perkins, S. M., Kaplan, M. H. and Travers, J. B. (2012); Increased skin barrier disruption by sodium lauryl sulfate in mice expressing a constitutively active STAT6 in T cells., *Arch. Dermatol. Res.*, 304, 65-71.
- Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G. and Stokes, W. S. (2001); ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 258-73.
- Dearman, R. J., Basketter, D. A. and Kimber, I. (1996); Characterization of Chemical Allergens as a Function of Divergent Cytokine Secretion Profiles Induced in Mice., *Toxicol. Appl. Toxicol.*, 138, 308-16.

- Dearman, R. J., Basketter, D. A., Evans, P. and Kimber, I. (1999); Comparison of cytokine secretion profiles provoked in mice by glutaraldehyde and formaldehyde., *Clin. Exp. Allergy*, 29, 124-32.
- Dearman, R. J., Warbrick, E. V., Skinner, R. and Kimber, I. (2002); Cytokine fingerprinting of chemical allergens: species comparisons and statistical analyses., *Food Chem. Toxicol.*, 40, 1881-92.
- Dearman, R. J., Betts, C. J., Farr, C., McLaughlin, J., Berdasco, N., Wiench, K. and Kimber, I. (2007); Comparative analysis of skin sensitization potency of acrylates (methyl acrylate, ethyl acrylate, butyl acrylate, and ethylhexyl acrylate) using the local lymph node assay., *Contact Dermatitis*, 57, 242-7.
- De Jong, W. H., Arts, J. H., De, Klerk, A., Schijf, M. A., Ezendam, J., Kuper, C. F. and Van, Loveren, H. (2009); Contact and respiratory sensitizers can be identified by cytokine profiles following inhalation exposure., *Toxicology*, 10, 261, 103-11.
- Durand, G., Burlet, G. D., Virat, M. and Nauma, B. D. (2003); Use of the local lymph node assay in the evaluation of the sensitizing potential of pharmaceutical process intermediates., *Contact Dermatitis*, 49, 148-54.
- European Agency for Safety and Health at work (2003); Factsheets 40, skin sensitizer.
- European Chemicals Agency (2008); Guidance on information requirements and chemical safety assessment.
- European Commission (2003); DIRECTIVE 2003/15/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member

States relating to cosmetic products (7th Amendment to the European Cosmetics Directive), Official Journal of the European Union 2003, L66, 26-35.

European Commission (2010); DIRECTIVE 2010/63/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, Official Journal of the European Union 2010, L276/33

European Commission Science Committees (2011); Toxicology and assessment of chemical mixture.

F.D.A. officials (1959); Appraisal of the safety of chemicals in food drugs and cosmetics, by the staff of the division of pharmacology food drugs and drug administration, Department of Health Education and Welfare, U.S. Business office Topeka, Kansas, p50.

Garrigue, J. L., Nicolas, J. F., Fragnals, R., Benezra, C., Bour, H. and Schmitt, D. (1994); Optimization of the mouse ear swelling test for in vivo and in vitro studies of weak contact sensitizers., *Contact Dermatitis*, 30, 231-7.

Gerberick, G. F., Vassallo, J. D., Bailey, R. E., Chaney, J. G., Morrall, S. W. and Lepoittenvin, J-P. (2004); Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens., *Toxicol. Sci.*, 81,332-343.

Gerberick, G. F., Vassallo, J. D., Foertsch, L. M., Price, B. B., Chaney, J. G. and Lepoittenvin, J-P. (2007); Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach., *Toxicol. Sci.*, 97, 417-27.

技術情報協会 (1999); 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状の計測およ

び評価, 株式会社技術情報協会 (東京).

Guilliams, M., Henri, S., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Schwartz-Cornil, L., Dalod, M. and Malissen, B. (2010); From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets., *Eur. J. Immunol.*, 40, 2089-94.

Hattori, T., Chauban, S. K., Lee, H., Ueno, H., Dana, R., Kaplan, D. H. and Saban, R. (2011); Characterization of Langerin-Expressing Dendritic Cell Subsets in the Normal Cornea., *IOVS*, 52, 4598-604.

Hayashi, M., Higashi, K., Kato, H. and Kaneko, H. (2001); Assessment of Preferential Th1 or Th2 induction by Low-Molecular-weight compounds using a reverse transcription-polymerase chain reaction method; comparison of two mouse strains, C57BL/6 and Balb/c., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 177, 38-45.

Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E. and Shortman, K. (2001); The dendritic cell population of mouse lymph node., *J. Immunol.*, 167, 741-8.

Igyarto, B. Z., Jenison, M. C., Dudda, J. C., Roers, A., Muller W., Koni, P. A., Campbell, D. J., Shlomchik, M. J. and Kaplan, D. H. (2009); Langerhans cells suppress contact hypersensitivity response via cognate CD4 interaction and langerhans cell-derived IL-10., *J. Immunol.*, 183, 5085-93.

Jahn, S, Faber, H, Zazzeroni, R and Karst, U. (2012); Electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry to demonstrate irreversible binding of the skin allergen *p*-phenylenediamine to proteins., *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 26, 1415-25.

- Johansen, J. D., Frosch, P. J. and Lepoittevin, J-P. (2011); Contact Dermatitis, Fifth edition., Springer.
- Jowsey, I. R., Clapp, C. J., Safford B., Gibbons B. T. and Basketter D. A. (2008); The impact of vehicle on the relative potency of skin-sensitizing chemicals in the local lymph node assay., *Cutan. Ocul. Toxicol.*, 27, 67-75.
- Kaplan, D. H. (2010); In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Trends. Immunol.*, 31, 446-51.
- 環境省 (2013); 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準。環境省告示第 84 号。
http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2_data/laws/nt_h25_84.pdf
- Kato, H., Okamoto, M., Yamashita, K., Nakamura, Y., Fukumori, Y., Nakai, K. and Kaneko, H. (2003); Peptide Binding Assessment using Mass spectrometry as a new screening method for skin sensitization., *J. Toxicol. Sci.*, 28, 19-24.
- Kastenmüller, K., Wille-Reece, U., Lindsay, R. W., Trager, L. R., Darrah, P. A., Flynn, B. J., Becker, M. R., Udey, M. C., Clausen, B. E., Igyarto, B. Z., Kaplan, D. H., Kastenmüller, W., Germain, R. N. and Seder, R. A. (2011); Protective T cell immunity in mice following protein-TLR7/8 agonist-conjugate immunization requires aggregation, type I IFN, and multiple DC subsets., *J. Clin. Invest.*, 121, 1782-96.
- Kimber, I., Derman, R. J., Basketter, D. A., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., McNamee, P. M., Lalko, J. and Api, A. M. (2008); Dose metrics in the acquisition of skin sensitization: Thresholds and importance of dose per unit area., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 52, 39-45.
- Kimber, I., Derman, R. J., Scholes, E. W. and Basketter, D. A. (1994); The local

- lymph node assay: Developments and applications., *Toxicology*, 93, 13-31.
- Kimber, I., Basketter, D. A., Berthold, K., Butler, M., Garrigue, J. L., Lea, L., Newsome, C., Roggeband, R., Steiling, W., Stropp, G., Waterman, S. and Wiemann, C. (2001); Skin sensitization testing in potency and risk assessment., *Toxicol. Sci.*, 59, 198-208.
- Koesak, Z., Wisniewska, K., J. and Swiercz, R. (1994); Toxic effects of subchronic combined exposure to n-butyl alcohol and m-xylene in rats., *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.*, 7, 155-66.
- 厚生労働省・経済産業省・環境省 (2004); 化学物質の審査および製造等の規制に関する法律 (平成 16 年 3 月 18 日) .
<http://law.e-gov.go.jp/htldata/S48/S48HO117.html>
- 厚生省 (1989); 医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて. 厚生省薬務局審査第一課長・第二課長・生物製剤課長 薬審 1 第 24 号(平成元年 9 月 11 日).
- Kripke, M. L., Munn, C. G., Jeevan, A., Tang, J. M. and Bucana, C. (1990); Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization., *J. Immunol.*, 145, 2833-8.
- Lalko, J. F., Kimber, I., Gerberick, G. F., Foertsch, L. M., Api, A. M. and Dearman, R. J. (2012); The Direct Peptide Reactivity Assay: Selectivity of Chemical Respiratory Allergens., *Toxicol. Sci.*, 129, 421-31.
- Last, J. A. and Warren, D. L. (1987); Synergistic interaction between nitrogen dioxide and respirable aerosols of sulfuric acid or sodium chloride on rat lungs., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 90, 34-42.
- Luster, M. I., Wilmer, J. L., Germolec, D. R., Spalding, J., Yoshida, T., Gaido, K.,

- Simeonova, P. P., Burleson, F. G. and Bruccoleri, A. (1995); Role of keratinocyte-derived cytokines in chemical toxicity., *Toxicol. Lett.*, 82-83, 471-6.
- Magnusson, B. and Klingman, A. M. (1969); The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test., *J. Invest. Dermatol.*, 52, 268-76.
- Matsuda, T., Maruyama, T., Iizuka, H., Kondo, A., Tamai, T., Kurohane, K. and Imai, Y. (2010); Phthalate esters reveal skin-sensitizing activity of phenethyl isothiocyanate in mice., *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1704-8.
- Meek, M. E., Boobis, A. R., Crofton, K. M., Heinemeyer, G., Raaij, M. V. and Vickers, C. (2011); Risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: A WHO/IPCS framework., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 60, S1-14.
- Nagao, K, Ginhoux, F., Leitner, W. W., Motegi, S., Bennett, C. L., Clausen, B. E., Merad, M., Udey, M. C. (2009); Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 3312-7.
- Naik, S. M., Cannon, G., Burbach, G. J., Singh, S. R., Swerlick, R. A., Wilcox, J. N., Ansel, J. C. and 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, 766-72.
- Nakamura, Y., Higaki, T., Kato, H., Kishida, F. and Nakatuka, I. (1998); Comparison of sex differences in guinea-pig maximization test for detection of skin-sensitizing potential using OECD recommended positive control

- sensitizers., *J. Toxicol. Sci.*, 23, 105-11.
- Natsch, A. and Emter, R. (2008); Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals., *Toxicol. Sci.*, 102, 110-9.
- NTP (1999); The Murine Local Lymph Node Assay: A test method for Assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds., National Toxicology program, NIH publication No.99-4494.
- Nielsen, N. H., Linneberg, A., Menné, T., Madsen, F., Frølund, L., Dirksen, A., Jørgensen, T. (2002); Incidence of allergic contact sensitization in Danish adults between 1990 and 1998; the Copenhagen Allergy Study, Denmark., *Br. J. Dermatol.*, 147, 487-92.
- 野村護、堀井郁夫、吉田武美 (2008)；非臨床試験 ガイドラインへの対応と新しい試み，株式会社エル・アイ・シー（東京）
- 農林水産省 (2001)；「農薬の登録申請に係る試験成績について」の運用について，平成 11 年 10 月 1 日付け農産第 6283 号農林水産省生産局生産資材課長通知.
- Nukada, Y., Miyazawa, M., Kazutoshi, S., Sakaguchi, H., Nishiyama, N. (2013); Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals., *Toxicol. In Vitro*, 27, 609-18.
- OECD (1992); Guidelines for Testing of chemicals., 406
http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en;jsessionid=b17mniq8c4qbt.delta
- OECD (2010): OECD Guidelines for Testing of Chemicals., 429, 429-1, 429-2

http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en

OECD (2013); Guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways., No.184, EVN/JM/MONO(2013)6

OECD ENV/JM/MONO (2012) /Part1, The adverse Outcome Pathway for skin sensitization Initiated by covalent binding to proteins part 1: Scientific evidence.

Prinsen, M. K., Romijn, T. and Snoeij, N. J. (1997); Skin sensitization testing: the relevance of rechallenge and pretreatment with sodium lauryl sulfate in the guinea pig maximization test., *Food Chem. Toxicol.*, 35, 923-6.

Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F. and Noelle, R. J. (2004); CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity., *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 307-28.

Rydzynski, K., Koesak, Z., Jedlinska, U. and Sokal JA. (1992); The toxic effects of comined exposure to toluene and m-xylene in animals. IV. Liver ultrastucture after subchronic inhalatory exposure., *Pol. J. Occup. Med. Environ. Health.*, 5, 35-42.

Rycroft, R. J., Menne, T., Froch, P. J. and Benezra, C. (1992); *Textbook of Contact dermatitis.*, Springer-Verlag.

Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y. and Suzuki, H. (2007); Prediction of preservative sensitization potential using surface marker CD86 and/or CD54 expression on human cell line, THP-1., *Arch. Dermatol. Res.*, 298, 427-37.

Sato, Y., Katsumura, Y., Ichikawa, H., Kobayashi, T., Kozuka, T., Morikawa, F. and

- Ohta, S. (1981); A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens., *Contact Dermatitis*, 7, 225-37.
- Steinman, R. M. (2007); Dendritic cells: Understanding immunogenicity., *Eur. J. Immunol.*, 37, S53-60.
- Schlesinger, R. B., Zelikoff, J. T., Chen, L. C. and Kinney, P. L. (1992); Assessment of toxicologic interactions resulting from acute inhalation exposure to sulfuric acid and ozone mixture., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 115, 183-190.
- Schramlová, J., Mardešičová, L. and Barták, P. (2010); Reactivity of Langerhans cells after application of different chemicals an ultrastructural analysis., *Prague. Med. Rep.*, 111, 191-9.
- Schuler, G. and Steinmen, R. M. (1985); Murine epidermal langerhans mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161, 526-46.
- 食品安全委員会 (2008); 食品の安全に関する用語集(第4版), 内閣府
- Shklovskaya, E., Roediger, B. and Fazekas de St Groth B. (2008); Epidermal and dermal dendritic cells display differential activation and migratory behavior while sharing the ability to stimulate CD4+ T cell proliferation in vivo., *J. Immunol.*, 181, 418-30.
- 清水宏 (2005); あたらしい皮膚科学, 中山書店 (東京) .
- 高瀬吉雄、小林秀興、岡本暉公彦 (1983); 新しい皮膚の生理と安全性 接触化学物質の毒性評価, 清至書院 (東京) .
- Thrne, P. S., Hawk C., Kaliszewski S. D. and Guiney P. D., (1991); The noninvasive Mouse Ear Swelling Assay., *Fundam. Appl. Toxicol.*, 17, 790-806.
- To-o, K., Nomura, K., Sugimoto, K., Nishimura, T., Kuriki, T. and Itoh, M.

(2010); Experimental study on cross-reactivity of alpha-arbutin toward p-phenylenediamine and hydroquinone in guinea pigs., *J Dermatol.*, 37, 455-62.

UNITED NATIONS New York and Geneva (2013) GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELLING OF CHAMICALS (GHS), Third revised edition.

U.S. Environmental Protection Agency (1991); TSCA Section 8(e) Reporting Guide

U.S. Environmental Protection Agency (2003); Framework for Cumulative Risk Assessment. <http://www.epa.gov/raf/publications/framework-cra.htm>

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., Caux, C., Lebecque, S. and Saeland, S. (2000); Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules., *Immunity*, 12, 71-81.

Valladeau, J., Clair-Moninot, V., Dezutter-Dambuyant, C., Pin, J-J., Kissepfennig, A., Mattei, M-G., Ait-Yahia, S., Bates, E. E. M., Malissen, B., Koch, F., Fossiez, F., Romani, N., Lebecque, S. and Saeland S. (2002); Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues., *J. Immunol.*, 168, 782-92.

Vandebriel, R. J., Gremmer, E. R., Hartskamp, M. V., Dormans, J. A. M. A. and Mooi E, R. (2007); Effect of a Diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine on immune responses in murine local lymph node and lung allergy model., *Clin. Vaccine Immunol.*, 14, 211-9.

van Och, F. M. M., Slob, W., de Jong, W. H., Vandebriel R. J. and van Loveren, H. (2000); A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of the uncertainty margins., *Toxicology*, 146, 49-59.

Xu, H., DiIulio, N. A. and Fairchild, RL. (1996); T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (IL) 4/IL-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells., *J. Exp. Med.*, 183, 1001-12.