

皮膚感作性を分離分析で評価する.

岡本昌彦*

1. はじめに

皮膚感作性とは、単一の物質または混合物が皮膚に接触した後に起こるアレルギー反応である。皮膚感作性を有する物質に繰り返し接触すると、皮膚に局所的な炎症（かぶれ）が生じる。従来は化学物質を取扱う工場など労働現場で問題となることが主であったが、近年、一般消費者が家庭などで使用する製品でも「かぶれ事故」が起こるなど、社会的関心の高い疾患の一つになってきている。化学物質の皮膚感作性評価の重要性は増してきている。

化学産業では製造中間体等で皮膚感作性の強いものが含まれる場合もあるが、これらについては、『化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律』（化審法）、『労働安全衛生法』（労安法）の対象ではない。社内作業者の安全性確保のためには、各企業が自己管理する必要がある。それらを取扱う前に、その感作性ポテンシャルを簡便に把握できれば理想的である。しかし、その評価は、これまでモルモットやマウスなどの実験動物を用いる必要がある。さらに試験結果が得られるまで1ヶ月程度必要であった。

また、評価すべき製造中間体の数は非常に多く、社内作業者の安全性を確保する上でタイムリーにデータを取得するのは容易でないことから、動物実験代替法となる、簡便な評価方法が強く求められている。

本稿では、このような背景のもと、筆者らが主として社内作業者の安全性確保のために検討した、皮膚感作性物質のペプチドをプローブ分子とした分離分析による簡易評価法（ペプチドプローブ法とその改良法）について概説するとともに、今後の展望について述べる。



図1 皮膚アレルギーの例
化学物質が接触した部位に、紅斑が生じているのが観察される

2. 皮膚感作性とは？

皮膚感作性とは、アレルギー性接触性皮膚炎、あるいは皮膚アレルギーと言われ、化学物質に対する免疫学的機序を介した皮膚反応である。ヒトにおける反応では掻痒症、紅斑、浮腫、丘疹、小水疱、水疱またはこれらの組合せなどがみられる（図1）。皮膚感作性は化学物質に繰り返し曝露することで引き起こされる。皮膚感作性の発症には「感作」と「誘発」という2つの免疫学的な段階を経ることが知られている。

「感作」の段階では化学用品が皮膚に接触し生体内に浸透した後、生体内のタンパク質と反応し、抗原となり、抗原提示細胞（Langerhans細胞）上に提示されることで、この抗原を認識したTリンパ球が増殖する。

「誘発」の段階では、「感作」と同様、化学用品が皮膚内に浸透し、抗原となるが、既に増殖したTリンパ球が皮膚内に存在するため、これが皮膚で反応することで、様々なサイトカインが放出され、紅斑および浮腫などを発症するとされている¹⁾（図2）。

*京都大学学術研究支援室

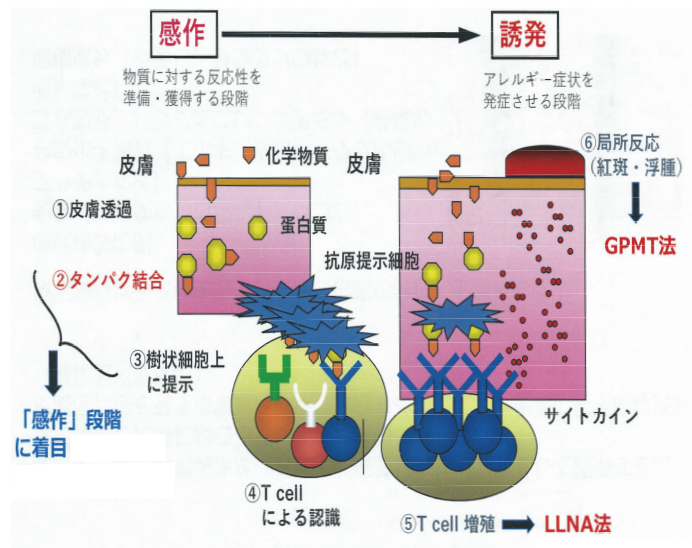


図2 皮膚感作性の発症機序と評価試験方法

皮膚感作性の発症は、①～⑥の事象を経て成立する。GPMTやLLNA法は、図中に示した事象を検出している。本論文で紹介しているペプチドをプローブとする方法は、②の化学物質が皮膚を透過して表皮内のタンパク質と結合する部分に着目したものである。

表1 代表的な皮膚感作性評価手法の概要ならびに特徴

	GPMT法	Buehler法	LLNA法
開発者（開発年）	Magnusson & Kligman (1969)	Buehler (1965)	Kimberら (1986)
試験期間	1ヵ月	1ヵ月	1週間
サンプル量	約20g	←	約1g
感度	高い	中程度	低い
投与経路	皮内注射	経皮投与	マウスの耳介に塗布
試験コスト (動物に係るコストなど)	高価	←	比較的安価
交差反応の有無	有	←	無
登録試験への適用性	有	←	←
その他	FCAの使用により感度向上。	FCAを用いないため、実際のヒトの曝露条件に近い。	・弱い感作性物質の検出には難あり。 ・RI標識化合物を用いるため操作が煩雑。 ・陽性となる濃度が比較できる。

3. 皮膚感作性の評価方法

化学物質の皮膚感作性を評価する試験法は古くから研究されており、ヒトおよび動物を用いる試験法が知られている。OECDテストガイドライン(TG)には代表的な動物を用いた皮膚感作性試験としては、モルモットを用いたGuinea Pig Maximisation Test (GPMT) およびBuehler Test (TG406)²⁾、Tリンパ球の増殖を指標とするマウスを用いた局所リンパ節試験(Local Lymph Node Assay, LLNA) (TG429)³⁾などの試験法が記載されている。それらの概略を表1に示す。

これらは皮膚感作性の機序に基づいて設定され

た試験系であり、現在、様々な化学品の皮膚感作性の評価に広く認められている。GPMTは「感作」と「誘発」という2つの段階を試験系の中に組み込んで、「感作」の段階で免疫増強剤であるフロイント完全アジュバント(Freund's Complete Adjuvant, FCA)の投与を併用することで検出感度も良くしている。

いっぽう、LLNAは動物愛護の観点から代替法として開発された試験系であり⁴⁾、「感作」の段階の評価法である。さらに試験結果も約1週間程度とGPMTと比べて短時間で得られるというメリットもある。各種の評価方法の特徴を表1に示す。

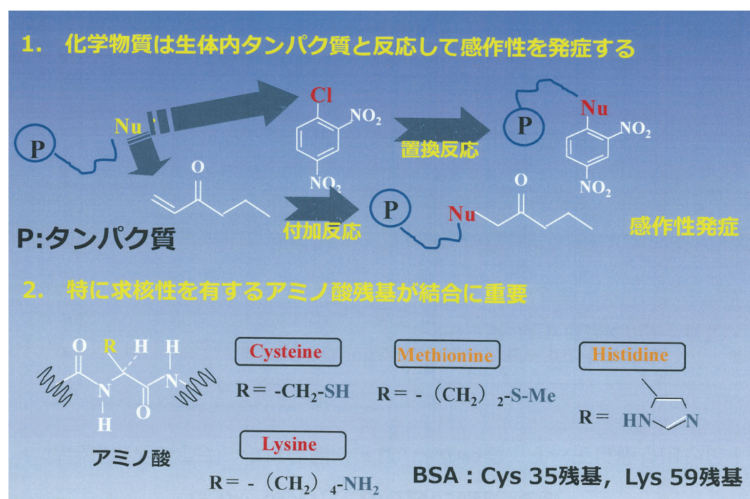


図3 化学物質とタンパク質の結合と皮膚感作性

4. ペプチドをプローブ分子とした簡易評価方法（ペプチドプローブ法）の開発

皮膚感作性は、上述の通り「感作」の段階で、化学物質がまず皮膚を透過し、続いて生体内タンパク質と反応（共有結合）することによって引き起こされる。先行研究では、この点に着目し、官能基の反応性や皮膚透過性の指標である logP あるいは logK_{ow} によって皮膚感作性を評価する試みも報告されている⁵⁻⁷⁾。

これに対して、筆者らは、特に化学物質とタンパク質との反応性に着目した。もし化学物質とタンパク質との結合物を検出できれば、化学物質の皮膚感作性を評価できるはずと考え、LC-MS を用いた方法を開発した（ペプチドプローブ法）⁸⁾。

一般に、感作性物質はタンパク質を構成するアミノ酸残基のうち、特にシステイン (Cys) やリジン (Lys) などと反応すると考えられている (図3)。化学物質とタンパク質との反応性に着目し、化学物質とグルタチオン (グルタミン酸 (Glu), Cys, グリシン (Gly) から成るトリペプチド, Glutathione : GSH) を一定条件で混合し、混合後の反応液を LC-MS により解析することで、結合物の有無とその化学構造の妥当性という2つの結果を併せて、感作性の評価をする試験系である (図4)。

ただし、最初から GSH をプローブとして想定していた訳ではない。当初は、タンパク質との結合、ということから、Cys や Lys 残基を多数含

み (それぞれ 35, 59 残基)、タンパク質としても入手しやすい、ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA) をプローブ分子とすることを検討した。化学物質と BSA を反応させ、得られた反応生成物を、高分子化合物の質量分析手法である、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization : MALDI) で分析すれば、結合物が簡便に検出できると予想した。

そこで、強い感作性を示す化学物質として知られている 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) と BSA を反応させ、その生成物を分析すると、BSA に DNCB が結合した分子量に相当するイオンが検出され、反応生成物の分析が可能であると思われた (図5)。ただ、念のため BSA と BSA/DNCB 結合物の等量混合物を調製し、MALDI 分析に供したところ、結合物と BSA のピークは分離せず、両者は MALDI 分析では区別できていないことが判明した (図6)。BSA の分子量は、66,430 であり、DNCB の分子量の 202 に比べて 300 倍以上と隔絶しており、質量分析装置 (MALDI-TOFMS) では、微小な質量差を正しく評価できなかったためと考えられた。

そこで、低分子のペプチドをプローブ分子とすることを考えた。具体的には、反応性の高い Cys 残基を含むトリペプチドである GSH (分子量 307) と Lys 残基を含有するテトラペプチドであ

るタフトシン（分子量 500, Tuftsin）の 2 つをモデル化合物の候補とした。これにより、通常の低分子化合物の分析に汎用される LC-MS を用いることができるようになり、同時に化学物質との結合体の構造解析もできると期待された。GSH とタフトシンの反応結果を比較検討したところ、前者の方が、反応性が高く、より多く種類の化学物質と結合すること、後者だけに特異的に反応する化学物質は認められないことがわかった（未発表データ）。そこで、以後の実験では GSH をプローブ分子として用いることにした。

GSH を用いた反応例を図 4 に示す。GSH と DNCB を混合し、その反応液を LC-MS で分析すると、DNCB と GSH が結合したと考えられるピークが検出されている。また、MS スペクトルの解析から、結合物の化学構造も有機化学的に妥当と確認できた。

本法を用いて、既に皮膚感作性陽性あるいは陰性であることが判明している化学物質（陽性 77, 陰性 33）110 検体についてグルタチオンとの反応性を評価した。結果を図 7 に示した。

GPMT あるいは LLNA などの *in vivo* 試験で陽性となった 77 検体の内、ペプチドプローブ法で陽性となった化学物質は 49 検体（感度：64%）、陰性となった化学物質は 28 検体（36%：偽陰性判定率）、*in vivo* 試験で陰性となった 33 検体の内、ペプチドプローブ法で陽性となった化学品は 3 検体（9%）、陰性となった化学品は 30 検体（特異度：91%）であった。このため一致率は 72%（=（49 + 30）/110）であったが、ペプチドプローブ法で陽性となった化合物の皮膚感作性の陽性予測性は 94%（49/52）と極めて高率であった。

従って、本法で陽性となった場合、動物試験等は省略し、陽性物質として取扱うことができると考えられた（図 7）。また、その一方で、偽陰性判定率が 36% もあった。偽陰性の原因として、感作性が弱い化合物は、ペプチドとの反応収率が低く、そのため結合物の生成が微量のため、検出できていないのではないかと考えた。

		ペプチドプローブ法		偽陰性判定
		+	−	
動物実験 (国際標準)	+	49	28	
	−	3	30	

図 7 ペプチドプローブ法の予測性の検証

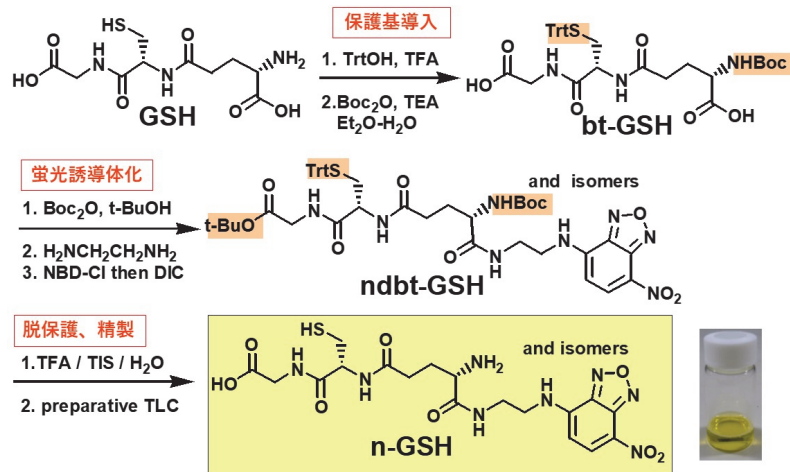
合計 110 化合物を用いて、動物実験とのデータ比較を実施した。

本法での陽性予測率は 94%（49/52）と極めて高率であるため、本法で陽性を示したなら、（陽性物質としての取扱い）動物試験は省略できると考えられた。

そこで、この点を改善するためペプチドプローブ法の高感度化を検討した。プローブ分子をどのようにデザインするかについては、色々な可能性が考えられたが、プローブ分子のペプチドを蛍光誘導体化し、蛍光検出法を併用する LC-MS 法とすることにした⁹⁾。

ペプチド中の -SH 基は、化学物質との結合部位であるため、無修飾のまま残しておく必要がある。そこで、誘導体としてはアミノ末端を 4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl) で修飾することを考えた。最初、Van Hoof らの報告¹⁰⁾に従って誘導体化を試みたが、反応は進行しなかった。そこで、蛍光誘導体化ペプチドプローブを合成することとした。GSH の Cys 残基の -SH 基や Glu 残基の -CO₂H 基などを保護した後、選択的にアミノ末端のみを NBD 化することで、GSH の蛍光誘導体を得ることができた。図 8 に合成スキームを示す。この蛍光誘導体化プローブを用いると、未修飾ペプチドをプローブとした場合に比べ、LC における検出感度の向上が認められ、従来のペプチドプローブ法では結合物のピークが検出されなかった、感作性の弱い HCA に関しても結合物のピークが観察された（蛍光ペプチドプローブ法：図 9）。別途行った実験から、従来法に比べて約 100 倍の感度向上が達成されていることがわかった。

この蛍光ペプチドプローブ法により、図 7 と同一試料について検討した結果を図 10 に示す。予想通り、偽陰性判定率は 23%（18/77）とペプチドプローブ法に比べて 13% 改善し、蛍光誘導体化に伴う検出感度向上の効果が確認できた。蛍光



LC-ESI(+)-MS m/z 513.12 ($M+H^+$), λ_{ex} 470nm, λ_{em} 530nm

図8 蛍光誘導体化グルタチオンの合成ルート

ペプチドプローブ法では、GSHの蛍光誘導体が特異的に皮膚感作性成分に結合することから、極微量の皮膚感作性成分の検出・同定にも適用できると思われる。今後、製造プロセスの開発途上などで副生する微量感作性成分の解析などへの応用も期待できる。

5. 今後の課題

以上述べた通り、今回紹介したペプチドプローブ法とその改良法は感作性発現機序の一部の毒性指標のみに因る検出法であり、特定の反応が起こるかどうかを指標としている。このため、当然のことながら、本法だけで感作性を正確に把握できるわけではない。

ただし、本法は動物愛護に寄与することに加えて、試験法も簡便であり、迅速に結果が判明する、化合物の使用量が少なく済む、多量の検体を処理できる、低コストである等の長所を持つ。これらの特性を正確に把握し、それらを踏まえた上での使い方を考えることが重要であろう。

たとえば、感作性を把握するためのTier法(段階的に試験を実施するステップ法)の一つとして用いることがあげられる。多数の検体からペプチドプローブ法で陽性となる化合物を簡便に選び出す(後に行う動物試験で陽性となる確率が高い)、あるいは動物実験を行う余裕の無い時には、結合物を生成する化学物質は感作性物質として取扱う等である。これによって、製品の重要度や規制に応じてLLNAあるいはGPMTを用いた試験を効率よく行うことができるようになることが期待される。

いっぽう、感作性の定量的評価やその予測性には依然課題が残る。化学物質の皮膚感作性ポテンシャルを発症濃度などで定量的に表すことができ

被験物質			
感作性 (動物試験)	強	弱	なし
LC 分析結果			
判定	+	+	-
現行法 (ペプチド・プローブ法)	+	-	-

図9 蛍光ペプチドプローブ法の適用例
感作性の弱いHCAに関して、結合物のピークが検出されている。

		蛍光ペプチドプローブ法		偽陰性判定
		+(62)	-(48)	
動物実験	+(77)	59	18	
(国際標準)	-(33)	3	30	

図10 蛍光ペプチドプローブ法の予測性の検証
図7に示したのと同様の110化合物を用いて、動物実験とのデータ比較を実施した。
蛍光プローブを導入することで、偽陰性判定数は有意に減少した(36→23%)。また、感度も77%(59/77)と向上したが、陰性予測率は満足できる状態までには改善しないことが明らかになった。

れば、作業者が取扱う化学物質がどの程度のポテンシャルを有するかを比較でき、それに応じた適切な保護具が選択できるようになる。

化学物質の反応性に着目した研究はP & G社のグループも報告している⁴⁾。彼らは、化学物質の反応性を、残存-SH基を定量し、これを結合物の生成速度や濃度などを指標とすることで皮膚感作性ポテンシャルの比較を行っている。ただ、この方法は、操作が煩雑で習熟も必要であり、測定値のバラツキも大きいと予想され、実用面では課題が多いと思われる。

やや定量性に欠けるという面は否めないものの、今回の蛍光ペプチドプローブ法は、結合物の蛍光強度は相手の化学物質が変わっても殆ど変化しないことから、ピーク面積で凡その反応性は評価できる。従って、スクリーニング的に使用するのであれば、図9で示したような「強い、弱い、無」の3段階判定が実用的だと考える。

また、予測性の面では偽陰性の検体数が多いことが課題である。偽陰性となる化学物質の多くは生体内で代謝を受けて感作性を示す可能性が高いものが多く、代謝を加味した試験系の改良も必要である。なお、僅かではあるが、偽陽性も認められている。この原因としては皮膚透過性の問題や、反応を起こしても何らかの原因で認識されず、皮膚感作性が生じない可能性など、今後、さらなる検討が必要である。

このような改良を更に加えることで、より精度の高い皮膚感作性の評価法を確立し、早期に化学物質の皮膚感作性ポテンシャルを見極め、作業者の更なる安全確保に貢献できると考える。

6. おわりに

皮膚感作性の評価については、近年、動物福祉の観点から新しい動物実験代替法（動物を用いない評価法）の開発が精力的に進められており、一般化学品、農薬、防疫薬などの安全管理にも活用されつつある¹¹⁾。

現時点では、完全に動物実験代替法に置き換え

ることはできないが、新しく開発される評価方法の動向も注視しつつ、それぞれの方法の特徴や適用範囲を見極めて、使い方の工夫も必要であると考える。

なお、今回紹介した研究は、1999年から2020年にわたり、住友化学株式会社で実施されたものである。ここで示された動向や今後の展望に関しては、筆者の個人的な考察に基づいたものであり、同社の見解を示すものではない。

謝辞

今回紹介した研究は、筆者が住友化学株式会社生物環境科学研究所、および有機合成研究所在職時に実施した内容であり、本研究に献身的に御協力をいただいた、加藤日路士 博士（元 住友化学）、高橋晃樹 博士（住友化学）、徳永隆司 博士（住友化学）、山下和子 氏（元 住友化学）の各氏に深く感謝致します。

また、第372回京都化学者クラブ例会での講演の機会を与えていただきました、京都大学化学研究所 宗林由樹 教授（水圏環境解析化学研究領域）に心より感謝申し上げます。

文献

- 1) F. M. Marzulli and H. I. Maibach, *Dermatotoxicology*, 1996, 143.
- 2) OECD, "OECD Guidelines for testing of chemicals No. 406. Skin sensitisation" (1992).
- 3) OECD, "OECD Guidelines for testing of chemicals No. 429. Skin sensitisation: Local lymph node assay" (2010).
- 4) I. Kimber, J. Hilton, R. J. Dearman, G. F. Gerberick, C. A. Ryan, D. A. Basketter, L. Lea, R. V. House, G. S. Ladies, S. E. Loveless and K. L. Hastings, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 53, 563 (1998).
- 5) M. D. Barratt, D. A. Basketter, M. Chamberlain, G. D. Admans and J. J. Langowski, *Toxicol. In Vitro*, 8, 1053 (1994).

- 6) C. Graham, R. Gealy, O. T. Macina, M. H. Karol and H. S. Rosenkrantz, *Quant. Struct. Act. Relat.*, 15, 224 (1996).
- 7) T. Ashikaga, A. Motoyaman, H. Ichikawa, H. Itagaki and Y. Sato, *Altern. Animal Test Experiment*, 7, 30 (2000).
- 8) H. Kato, M.Okamoto, K.Yamashita, Y. Nakamura, Y. Fukumori, K. Nakai, H. Kaneko, *The Journal of Toxicological Science*, 28(1), 19–24 (2003).
- 9) T. Tokunaga, G. Yamamoto, T. Takahashi, M. Mukumoto, M.Sato, M.Okamoto, *Chem. Res.Toxicol.*, 33 3001–3009 (2020).
- 10) F. Van Hoof, and A. Heyndrickx, *Anal. Chem.*, 46, 286 (1974).
- 11) 須藤 英典, 檜垣 環, 北野 紗季, 奥田 優, 堀江 宣行, 山口 尊史, *住友化学* 2019 24–36.