

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

Real-time

RT-PCR法による化学物質の新規感作性評価法の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 西川, 真帆 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/2121

博士学位論文

Real-time RT-PCR 法による
化学物質の新規感作性評価法の開発

2020 年度

(2021 年 3 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
応用生命科学専攻

西川 (宇梶) 真帆

博士学位論文

Real-time RT-PCR 法による
化学物質の新規感作性評価法の開発

2020 年度

(2021 年 3 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
応用生命科学専攻

西川 (宇梶) 真帆

目次

序論	1
第1章 化学物質の皮膚感作評価のための細胞ベースおよび RT-PCR ベースの試験法に用いる遺伝子発現マーカーの同定および評価方法の開発	5
試料と方法	5
被験物質および溶媒	5
細胞および細胞培養	6
THP-1 細胞の被験物質処理	7
遺伝子発現マイクロアレイ解析	8
マイクロアレイデータ分析とフィルター基準	8
差次的発現遺伝子の機能的クラスター分析	9
Real-time RT-PCR アッセイ	9
結果	10
標準物質によって発現誘導された遺伝子のマイクロアレイ分析	10
遺伝子の機能的クラスター分析	10
マーカー候補の選択	11
マーカー候補遺伝子の DNA マイクロアレイの再現性	11
マーカー候補遺伝子発現の化学増感剤に対する反応	11
マーカー候補遺伝子を用いた感作性物質と非感作性物質の評価	12
考察	13
第2章 アレルギーを誘発する食品添加物に対する感作性評価	25
試料と方法	25
試料および試料の調製	25
濃度設定試験および評価試験	25
Real-time RT-PCR アッセイおよび感作性評価	26
結果	26
考察	27
第3章 短い曝露時間における感作性評価法の検討	30
試料と方法	30
試料	30

被験物質の調製および試験条件	30
Real-time RT-PCR アッセイおよび感作性評価	31
結果	32
遺伝子発現量の経時観察	32
曝露 3, 6, 24 時間で行った本試験結果について相対値の検討	33
曝露 3, 6, 24 時間での本試験法の感作性評価能の検討	34
考察	34
総括および結論	48
謝辞	50
参考文献	51

序論

我が国のアレルギー疾患の有症率は未だ増加傾向にあり、花粉症や気管支喘息、アレルギー性接触皮膚炎、食物アレルギーなど、国民の約2人に1人が何らかのアレルギー疾患を有し、社会問題化している(厚生科学審議会疾病対策部会リウマチ・アレルギー対策委員会.2011, 厚生労働科学研究 赤澤班. 2013, 松原ら. 2020, 足立. 2020)。アレルギー (Allergy) とは、免疫学的機序によって開始される過敏症 (Hypersensitivity) 反応である (Johansson ら. 2001)。アレルギーは、免疫反応に基づく生体に対する全身的または局所的な障害であり、生体に無害な物質に対する免疫系の異常あるいは過剰な応答により、発赤、発熱、腫脹などの炎症や、掻痒、紅斑、丘疹、浮腫、蕁麻疹などの組織障害、喘鳴、気管支炎などの呼吸困難が引き起こされる。また、アレルギー性過敏反応が同時あるいは続いて複数の臓器に現れる全身性アナフィラキシーや、血圧低下や意識障害を伴うアナフィラキシーショックのような症状では、重篤な場合には命に関わる危険性もある(厚生労働省重篤副作用総合対策検討会. 2008, 厚生労働省健康局疾病対策課. 2010)。そのため、アレルギーの原因物質を特定および検出することは、アレルギー予防や安全な環境を確保するために非常に重要である。

アレルギー反応を誘発する物質はアレルゲン (Allergen) と呼ばれる (Johansson ら. 2001)。アレルゲンは、花粉やハウスダスト、ダニ、ハチなど、また、食品では卵や乳製品、小麦、甲殻類、果実などに含まれるタンパク質がその主成分である。一方、化学物質は、本来単体ではアレルギー反応を引き起こす性質、アレルゲン性 (Allergenicity, 澤田純一. 2011) を持たないが、タンパク質と共有結合性複合体を形成するか、あるいはタンパク質との共有結合を介さずに抗原提示細胞-化学物質-T細胞受容体の複合体を形成することで、アレルゲン性を獲得してアレルギー症状を引き起こす場合がある (Posadas ら. 2007)。このような化学物質には、防腐剤や、化粧品原料、医薬品成分などが知られているが(日本皮膚科学会ガイドライン. 2009, 厚生労働省重篤副作用総合対策検討会. 2010)、着色料として食品にも利用されるコチニール色素や、甘味料に使用されるエリスリトールにより、アナフィラキシーを含む食物アレルギーを発症した例も報告されている (消費者庁 News Release. 2012, 穂山 浩ら. 2014)。そのため、タンパク質だけでなく、製品材料や製造過程

に使用される化学物質に対しても、事前にアレルゲン性を予測および評価する必要がある。

一般的なアレルギー検査方法は、アレルゲンを皮膚に接触もしくは注入処理し、観察するプリックテストや皮内テスト、血中の抗 IgE 抗体測定や食物傾向負荷試験など、臨床検査を必要とする試験方法が行われている（長瀬洋之．2016）。また、化学物質については皮膚感作性試験が行われており、モルモットを使った Guinea pig maximization test (GPMT) やマウスを使った murine local lymph node assay (LLNA) など、実験動物を使用したいくつかの試験ガイドラインが採用されている（OECD. 1992, OECD. 2010a, OECD. 2010b）。しかし現在、動物実験による安全性評価は欧州連合によって制限されており、特に、動物試験による安全性評価を実施した原料または原料の組み合わせを含む化粧品については、販売が禁止された。

（ Directive 2003/15/EC. 2003, Adler ら. 2011, Goebel ら. 2012), そのため、化学製品の皮膚感作性評価には、コンピューターを用いた *in silico* や、動物を用いない *in chemico*, *in vitro* 代替法が推奨されている。一方、化学物質を経口摂取した場合のアレルゲン性評価法は未だ確立されたものが無い。そのため、アレルギーを誘発する経口摂取物質の感作性を考慮した評価法が必要である。

皮膚感作の生物学的反応メカニズムは広く研究されてきた。経済協力開発機構（The organisation for economic co-operation and development: OECD）は、皮膚感作の有害転帰経路（The adverse outcome pathway: AOP）を要約した。これは、皮膚感作の分子開始イベントとそれに続く 3 つの中間イベントで構成されている（OECD. 2014）。まず、化学物質による皮膚感作の分子開始イベントとして、求電子化学物質は皮膚タンパク質の求核部位に共有結合を形成する（第 1 イベント）（Gerberick ら. 2008, Karlberg ら. 2008）。次に、ケラチノサイトにおいて、化学ハプテンとタンパク質の複合体が細胞表面タンパク質と反応し、炎症反応ならびに抗酸化剤／求電子剤応答要素依存性経路など特定の細胞シグナル伝達経路に関連する遺伝子発現の変化を誘発する（第 2 イベント）（Sutterwala ら. 2006, Watanabe ら. 2007, Martinon ら. 2009, Weltzien ら. 2009）。3 番目の重要なイベントは、共刺激および細胞間接着分子、ケモカイン、およびサイトカインの発現を伴う樹状細胞 (DC) の

活性化である（第3イベント）（Ryan ら. 2007, dos Santos ら. 2009, Ashikaga ら. 2010, Kimber ら. 2011）。そして最後に、T細胞の活性化および増殖が起こる。*in vivo* の murine LLNA は、抗原特異的なT細胞の増殖を放射性同位元素の取り込みを測定することにより、間接的に評価している（Gerberick ら. 2005, Kern ら. 2010）。現在までに OECD が感作性評価の動物試験代替法として採択した試験法は、この AOP の一部の事象に対処する試験法である。そのため、各イベントについて評価する感作性評価法では、単独試験での化学物質の皮膚感作性評価を結論とせず、他の AOP 事象を対象とした試験と組み合わせて検討すべきとされている。また、化学物質の皮膚感作性評価は、これらの重要事象に関連した試験法であることが求められている（Adler ら. 2011, OECD. 2014）。

第3の AOP イベントである、DCの活性化に対する *in vitro* 代替モデルの一つに、ヒト単球性白血病由来細胞株 THP-1 が使用されている。THP-1 細胞は、感作性物質により、MHC クラス II 分子の内在化に関連する共刺激分子の発現が誘導される（Ashikaga ら. 2002, Bocchietto ら. 2007, Miyazawa ら. 2007, Tietze ら. 2008）。THP-1 を使用した Human cell line activation test, h-CLAT は、*in vitro* で化学物質の感作性を評価する試験法であり、感作性物質と非感作性物質を識別する能力について、murine LLNA での評価結果と比較して 85%の正確度を示したため、*in vitro* 皮膚感作性試験のガイドラインとして採択された（OECD. 2018）。この試験法は、THP-1 細胞を感作性物質に曝露後、フローサイトメトリーを通じて、単球および DC の活性化プロセスに関連する CD86 および CD54 の細胞表面発現の変化を定量化することにより感作性を評価する（Ashikaga ら. 2010）。しかしながら、フローサイトメーターは高価であり、その試験工程の操作は複雑である。

多くの化合物を取り扱う業者にとって、毎回行う安全性試験は取り組みやすいものが望まれる。そのため、本研究は、フローサイトメトリーを用いた感作性評価法の代替法として Real-time RT-PCR アッセイによる感作性評価法を提案する。Real-time PCR アッセイは、検出機器および試験コストの面で既存の試験法よりも低コストの試験法であり、操作性も単純で扱い易くなる。これにより、安全性試験に対する経済面や作業負担の軽減が期待できる。また、この試験法を用いて、化学物質

の感作性に対する安全性を事前に確認することで、扱う化学物質に対する使用量の検討や防御策の対応などに活用できると考える。

第1章では、培養細胞 THP-1 を使い Real-time RT-PCR を用いた試験法とするために、感作性物質に対して発現誘導された THP-1 細胞上の遺伝子の探索およびマーカー候補としての検証と、感作性を評価するための判定基準値の検討を行った。本研究で検証した7遺伝子は、発現マイクロアレイおよび Gene ontology (GO) 分析を用いて、標準化学物質に対して発現変動を示す免疫関連遺伝子から選出した。そして、murine LLNA の結果と比較して、感作性物質と非感作性物質の分類を可能とする陽性基準値、および既知感作性物質を正しく分類するマーカー遺伝子の検討を行い、Real-time RT-PCR アッセイによる感作性評価が可能であることを示した。また、新規感作性マーカーとして *TREMI* および *TNFRSF12A* を見出した。

第2章では、経口摂取により食物アレルギーを誘発する化学物質に対する Real-time RT-PCR アッセイを使用した感作性評価の有用性を検討した。アナフィラキシーを含む食物アレルギー様症状の報告がある食品添加物、亜硫酸塩を被験物質として、第1章で確立した Real-time RT-PCR アッセイによる感作性評価を行った。その結果、*TNFRSF12A*, *TREMI*, *HMOX1*, *IL1B*, *CD54* の5遺伝子をマーカーとした場合、亜硫酸塩2物質は感作陽性物質と評価した。この結果から、本試験法により、接触性皮膚炎を誘発する化学物質だけでなく、食品含有化学物質の感作性評価が可能であることが示唆された。

第3章では、より手軽な試験法にするために、曝露時間を短くした感作性評価法を検討した。遺伝子発現変化は、24時間よりも短い曝露時間でも観察される (Hooyberghs ら. 2008, Arkusz ら. 2010)。そのため、第1章で構築した試験方法を基に、まず、本研究で選択したマーカー候補7遺伝子の遺伝子発現量を経時観察し、短い曝露時間でも発現誘導を示すことを確認した。そして、細胞暴露3, 6時間における Real-time RT-PCR アッセイによる感作性評価を検討した。

第 1 章 化学物質の皮膚感作評価のための細胞ベースおよび RT-PCR ベースの試験法に用いる遺伝子発現マーカーの同定および評価方法の開発

Hooyberghs ら (2008) および Arkusz ら (2010) は, Real-time RT-PCR を採用し, 化学物質に曝された培養細胞のマーカー遺伝子発現の相対的变化を測定する, 細胞ベースの感作性評価法を開発した。Hooyberghs らは, 化学物質に曝露したヒト臍帯血由来 CD34⁺前駆体由来樹状細胞 (CD34-DC) の, 13 遺伝子をマーカーとして, 遺伝子発現プロファイルに基づいて感作性物質と非感作性物質を区別した。だが, CD34-DC は簡単に入手できる細胞ソースではなく, また, 感作性試験に使用する場合は成熟化が必要である。さらに重要なことに, CD34-DC は, 細胞応答においてドナー間で有意なばらつきがある (Aiba ら, 1997, Ryan ら, 2005)。対照的に, Arkusz らはヒト培養細胞株 THP-1 細胞を使って, 遺伝子発現変化を利用することにより非感作性物質から感作性物質を区別できることを示した。ただし, 彼らがスクリーニングに使用した候補遺伝子は THP-1 ではなく, ヒト樹状細胞の発現変化に基づいており, その評価精度 78%は, h-CLAT の 85% (Sakaguchi ら, 2010) に及ばなかった。

本研究は, Real-time RT-PCR を使用した皮膚感作性試験のために, THP-1 細胞で発現する遺伝子からマーカーを選択することを目的とした。THP-1 は性質が均一な細胞株であるため, ドナー間の変動を考慮する必要はなく, American Type Culture Collection (ATCC, USA) から簡単に購入できる。代表的な感作性物質として, 硫酸ニッケル (NiSO₄) および 2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) に対する THP-1 細胞の特定の遺伝子発現を, 発現マイクロアレイを用いて解析した。さらに, GO 分析により, マーカー候補遺伝子の数を絞り込んだ。Real-time RT-PCR を使用したさらなる分析のために, 上方制御された 26 のマーカー候補遺伝子のうちの 7 つを選択し, 化学物質の感作性および非感作性を分類する遺伝子発現の誘導率を検証した。

試料と方法

被験物質および溶媒

本研究で使用した全ての被験物質を表 1 に示し, 化学物質の略称, Chemical

Abstracts Service Registry Number (CAS No.), 試験濃度 (細胞生存率 75%の濃度 : CV75。詳細は以降「THP-1 細胞の被験物質処理」にて説明。), 溶媒, OECD ガイドラインとして採用された *in vivo* 皮膚感作性試験 murine LLNA による皮膚感作性分類強度, および *in vitro* 皮膚感作性試験 h-CLAT による感作性評価をまとめた。使用した化学物質は, それぞれ murine LLNA および h-CLAT によって感作性が評価された物質である (Gerberick ら. 2005, Nukada ら. 2012, OECD. 2018)。なお, 表 1 に示した太字の 8 物質は, h-CLAT の『習熟度確認の立証に推奨される物質』である (OECD. 2018)。2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB), 1,4-Phenyldiamine (PPDA), Isoeugenol (IEGN), 2-Mercaptobenzothiazole (MBT), Nickel (II) sulfate hexahydrate (NiSO₄), Aniline (AN), R(+)-Limonene (LIM), 4-Aminobenzoic acid (ABA), Sodium dodecyl sulfate (SDS) は, Merck-Sigma-Aldrich Co (St. Louis, USA) から購入した。Eugenol (EGN) と Imidazolidinyl urea (IU) は東京化成工業株式会社 (TCI, 東京) から購入した。Isopropanol (IPN) は国産化学工業株式会社 (KOKUSAN, 東京) から購入した。Vanillin (VN) は富士フィルム和光純薬株式会社 (FUJIFILM-Wako, 大阪) から購入した。被験物質の溶媒は, Saline (0.9%生理食塩水) または培養培地 (Medium), Dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck-Sigma-Aldrich) を用いた。

細胞および細胞培養

ヒト急性単球性白血病由来単球様細胞 (THP-1) 細胞は, American Type Culture Collection (ATCC, USA) から購入した。細胞培養方法は, OECD テストガイドライン TG442E に示された標準手順に従った (OECD. 2018)。THP-1 細胞は, RPMI-1640 (Product number; R5886, Merck-Sigma-Aldrich) に, 非動化済みの 10%ウシ胎児血清 (GIBCO, USA, Biowest France, Merck-Sigma-Aldrich), ペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン溶液 (100 unit/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン, 2 mM L-グルタミン, FUJIFILM-Wako), 0.05 mM 2-メルカプトエタノール (Merck-Sigma-Aldrich) を添加した培地を用いて, 37°C の 5% CO₂ インキュベーターにて培養した。増殖した THP-1 細胞は, チューブに分けて -80°C で凍結保存した。細胞は, 0.2~0.9×10⁶ cells/mL の密度範囲で 2~3 日毎に継代培養し, 凍結細胞を融解して 2 週間から 2 ヶ月以内のものを使用した。試験には, 0.2~0.3×10⁶ cells/mL で 48~72 時間, 前培養した細胞を使用した。

THP-1 細胞の被験物質処理

被験物質は、原液として DMSO または Saline で最大溶解濃度に調製し、 -20°C に凍結保存して試験当日に解凍して使用した。

CV75 のための濃度設定の方法は、h-CLAT の OECD テストガイドライン TG442E に準拠した (OECD, 2018)。

被験物質原液を溶媒で 5 濃度に段階希釈し、溶媒希釈液とした後、脂溶性物質 (DMSO 溶媒物質) は 250 倍に、水溶性物質 (Saline 溶媒物質) は 50 倍に培地で希釈して、培地希釈液とした。前培養した THP-1 細胞 (2×10^6 cells/well) を新鮮な培地に再懸濁し、培地希釈溶液と等量混合した全量 1 mL (1×10^6 cells/well) を 37°C の 5% CO_2 条件下で 24 時間曝露した。溶媒の最終含有量は、DMSO は 0.2%、Saline は 1%以下とした。また、溶媒のみで試験した結果を溶媒コントロールとした。24 時間曝露後、細胞をすべて回収して細胞懸濁液の一部を採り、0.4w/v% Trypan blue solution (FUJIFILM-Wako) で染色し、血球計算盤または Countess II FL auto cell counter (Thermo Fisher Scientific, USA) を使って細胞数および細胞生存率を測定した。各試験濃度に対する細胞生存率から生存率曲線を作成し、細胞生存率が 75%となる濃度 (CV75) を算出した。CV75 の算出方法 (式 1) は、h-CLAT に従った (データ省略, OECD, 2018)。なお、本研究で示す CV75 は、測定した全細胞数のうち約 65~85%の細胞生存率をもたらす被験物質の濃度である。

式 1

$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$

a : 細胞生存率が 75%以上となる最小の生存率

b : a 点が示す濃度

c : 細胞生存率が 75%未満となる最大の生存率

d : c 点が示す濃度

評価試験では、算出した CV75 およびその前後の濃度を用いた 2~3 点で試験した。前培養した THP-1 細胞を、CV75 に設定した化学物質を含む新鮮な培地に再懸濁し、12 ウェルの平底プレートに全量 2 mL (1×10^6 cells/well) を 37°C の 5% CO_2 条件下で曝露した (n = 3)。24 時間曝露後、濃度あたり 3 曝露細胞のうち、2 つ以

上で細胞生存率が 65～85%以内を得られた曝露細胞を次の工程に使用した。また、24 時間曝露後の溶媒コントロールの細胞生存率は90%以上であることを確認した。

遺伝子発現マイクロアレイ解析

遺伝子発現マイクロアレイ解析は、九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門 田代康介准教授に依頼した。

代表的な増感剤としての NiSO₄ と DNCB を CV75 で、それぞれの溶媒 (Saline および DMSO) をコントロールとして、それぞれ THP-1 細胞に 24 時間曝露した (n = 3)。細胞生存率を確認後、それぞれをマイクロチューブに回収し 130 × g で 5 分間遠心分離した。上清を除き、TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) を使用して THP-1 細胞から全 RNA を分離し、SV Total RNA Isolation System (Promega Co., USA) を使用してメーカーのプロトコルに従って精製した。RNA は、ND-1000 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) で定量化した。cRNA は、Agilent Low-Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用して増幅および標識され、SurePrint G3 Human GE Microarray 8×60K ver.2.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) に、メーカーのプロトコルに従ってハイブリダイズした。ハイブリダイズした全てのマイクロアレイスライドを Agilent scanner (Agilent Technologies) で検出した。相対ハイブリダイゼーション強度およびバックグラウンドハイブリダイゼーション値は、Agilent Feature Extraction Software (9.5.1.1, Agilent Technologies) を使用して解析した。

マイクロアレイデータ分析とフィルター基準

各プローブの生シグナル強度とフラグは、ハイブリダイゼーション強度 (gProcessedSignal) とスポット情報 (gIsSaturated など) から、Agilent が推奨する手順に従って計算した。GeneSpring ソフトウェアのフラグ基準を表示のまま以下に示した：Absent (A) : 「Feature is not positive and significant」 および 「Feature is not above background」, Marginal (M) : 「Feature is not uniform」, 「Feature is saturated」, 「Feature is a population outlier」, Present (P) : others, 特徴が positive または significant を意味するもの。このうち、lincRNA プローブを除く、少なくとも 1 つのサンプルでフラグ 「P」 を示すプローブを選択した。溶媒コントロール細胞の平均遺伝子発

現と化学物質処理細胞の平均遺伝子発現の統計的差異を、Student's *t*-test によって有意水準 $p < 0.01$ で評価した。

差次的発現遺伝子の機能的クラスター分析

マイクロアレイ解析において有意性を示した発現遺伝子の GO および機能アノテーションクラスターリングは、バイオインフォマティクスリソースツール DAVID 6.8 (アノテーション, 可視化, および統合ディスカバリーのデータベース) を使用して分析した (Dennis ら, 2003)。機能遺伝子クラスターには、DAVID によってエンリッチメントスコア (Enrichment score) が割り当てられた。Enrichment score ($-\log_{10}(p\text{-value})$) は、クラスター内の各 GO 用語 (GO-term) に対し、修正されたフィッシャーの Exact p -value に基づく機能遺伝子クラスターごとに計算された。Enrichment score > 2 ($p\text{-value} < 0.01$) の機能遺伝子クラスターは、クラスター内の特定の GO-term に対して有意に濃縮されている (Huang ら, 2007)。

Real-time RT-PCR アッセイ

全 RNA は、ISOGENE II (NIPPON GENE 株式会社, 東京, 日本) を使用して、メーカーの指示に従って THP-1 細胞から単離した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡株式会社; TOYOBO, 大阪, 日本) を使用して、メーカーの指示に従って 500 ng の全 RNA から cDNA を調製し、使用するまで -20°C で保存した。シングルプレックスリアルタイム定量 PCR は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を使用して、 $1\ \mu\text{L}$ の cDNA を含む $10\ \mu\text{L}$ の反応容量をメーカーの指示に従って調製し、PikoReal 96 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific) で行った。qPCR 条件は、 95°C で 1 分間の初期変性後、 95°C で 15 秒間、 60°C で 30 秒間を 40 サイクルで実施した。増幅の最後に、増幅産物の特異性を検証するために $65\sim 95^{\circ}\text{C}$ で融解曲線分析を実施した PCR 増幅後、定量化サイクル (Quantification cycle: Cq) 値は PikoReal Software 2.2 (Thermo Fisher Scientific) によって測定した。qPCR で使用したプライマーの塩基配列を表 2 に示した。NCBI ゲノムデータベースに基づく Primer-BLAST (NCBI) を使用して設計した *CD54* を除いて、すべてのプライマーは Universal Probe Library Assay Design Center (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京) によって設計された。Cq 値は、human

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) の発現量で正規化し、被験物質曝露サンプルと溶媒コントロールサンプルの比率による遺伝子発現の相対値（または倍数変化, fold-changes) を、比較 Cq 法によって計算した (Livak and Schmittgen, 2001, Schmittgen and Livak, 2008)。この倍数変化は、化学物質への曝露により誘発された相対遺伝子発現量を意味する。

結果

標準物質によって発現誘導された遺伝子のマイクロアレイ分析

THP-1 細胞を化学増感剤に曝露すると遺伝子発現が変化する。感作性物質によって上方制御および下方制御した遺伝子を特定するために、THP-1 細胞を代表的な皮膚感作性物質である NiSO₄ および DNCB、それぞれの溶媒コントロールである Saline および DMSO に 24 時間曝露し、発現マイクロアレイ分析を実施した (n = 3)。マイクロアレイデータ処理を図 1 に示した。34183 プローブでシグナル強度が 30 未満の遺伝子は除き、残りの 6536 プローブの Low シグナル強度は、GeneSpring (Agilent Technologies) を使用した変位値アルゴリズムによって正規化した。シグナル強度の倍数変化は、溶媒コントロール処理細胞に対する感作性物質処理細胞から計算した。NiSO₄ と DNCB の両方により 107 の上方制御された遺伝子と 41 の下方制御された遺伝子のうち、シグナル強度が 4 倍を超える倍数変化を示した遺伝子を以降の分析のために選択した。

遺伝子の機能的クラスター分析

図 1 から、DAVID 6.8 を使用した機能アノテーションクラスタリング分析では、上方制御された遺伝子を 69 個のクラスターに分類し、下方制御された遺伝子を 12 個のクラスターに分類した。そのうち、それぞれ 8 個のクラスターと 3 個のクラスターが免疫機能に関連していた。これら 11 の免疫関連クラスターのうち、26 の上方制御された遺伝子を持つクラスター 9 のみが、Enrichment score 2.27 (p -value < 0.01) で有意であると見なされ、下方制御された遺伝子群からは、免疫機能の関連に対し有意性を示すクラスターは無かった。図 2 は、クラスター 9 の各遺伝子、および遺伝子に関連付けられた 19 の機能アノテーション GO-term を示している。白い領域は遺伝子と GO-term の関連が肯定的に報告されていることを示し、黒い領域は遺

伝子と GO-term との関連が未だ報告されていないことを示している。遺伝子は左から白い領域数の少ない順に並べた。

マーカー候補の選択

遺伝子と肯定的な関連性を持つ GO-term の数 (図 2 の白色領域) に従って、クラスター9 の 26 遺伝子を任意に 3 つのグループ (S, M, L) に分類した。さらに、検証のための遺伝子は各グループから任意に選択した。グループ L からは *IL1B*, *CD86*, および *HMOXI* を, グループ M からは *TNFRSF12A* および *TREMI* を, グループ S からは *CXCL14* を選出した。また, *CD54* は, *CD86* と共に h-CLAT の皮膚感作性マーカーの 1 つであるため選択した (Ashikaga ら. 2002, 2006)。

マーカー候補遺伝子の DNA マイクロアレイの再現性

DNA マイクロアレイ分析において選択した 7 遺伝子の発現レベルを, Real-time RT-PCR で分析した。その結果, DNA マイクロアレイ分析において上方制御を示した 7 遺伝子は, Real-time RT-PCR 分析においてもすべて上方制御を示し, Real-time RT-PCR 分析により DNA マイクロアレイ分析の再現性が確認された (図 3)。したがって, これらの遺伝子は, 皮膚感作性を持つ化学物質を評価するためのマーカー候補として Real-time RT-PCR アッセイで使用可能であると判断した。

マーカー候補遺伝子発現の化学増感剤に対する反応

THP-1 細胞を 9 つの感作性物質と 4 つの非感作性物質にそれぞれ 24 時間曝露し, マーカー候補 7 遺伝子の遺伝子発現レベルを Real-time RT-PCR (n=1) で分析した。表 3 は, 化学物質曝露細胞におけるマーカー候補の相対遺伝子発現量, および murine LLNA と h-CLAT の各化学物質に対する感作性カテゴリーを示している。すべてのマーカー候補遺伝子は感作性物質への曝露によって発現誘導され, 非感作性物質への曝露では発現誘導はほとんど観察されなかった。マーカー候補遺伝子のうち, *HMOXI* は他のマーカー候補遺伝子と比較してより高い発現変化を示した (例: PPDA での相対遺伝子発現量 1750.2)。

マーカー候補遺伝子を用いた感作性物質と非感作性物質の評価

感作性評価の基本的な考え方は、h-CLAT 法に基づいている。

本試験法における感作性の陽性基準値は、相対遺伝子発現量(倍率変化) 1.5, 1.7, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, および 5.0 と任意に設定した。

RT-PCR により分析した化学物質に対する相対遺伝子発現量(表 3) は、陽性基準値を用いて 3 段階で評価し、感作性物質または非感作性物質に分類した。まず、溶媒コントロールと比較した相対遺伝子発現量が陽性基準を超えた場合、その試験結果は陽性、陽性基準未満の場合は陰性を見なした。そして、細胞生存率の条件を満たした 2~3 曝露細胞を 1 セットとした Real-time RT-PCR アッセイで、少なくとも 3 曝露細胞のうち 2 曝露細胞の試験結果が陽性であれば、その Real-time RT-PCR アッセイは陽性と判定した。最後に、独立した 3 回の Real-time RT-PCR アッセイのうち少なくとも 2 回が陽性判定であれば、その被験物質は感作性物質として評価し、そうでない場合は非感作性物質と評価した。ただし、Real-time RT-PCR が不検出 (ND) のサンプルについては、感作性評価の検討から除外した。

感作性と非感作性を正しく分類するための陽性基準を検討するために、任意に設定した陽性基準値による感作性および非感作性の分類結果を、既存の感作性評価法 murine LLNA による感作性評価と比較した。murine LLNA における感作性評価は、感作性の強度により、極度 (extreme), 強い (strong), 中程度 (moderate), 弱い (weak), または非感作 (Non-sensitizer) に分類される (Gerberick ら, 2005, OECD, 2010b)。本研究では、前述の 4 強度 extreme~weak を感作性物質とし、Non-sensitizer および偽陽性 (False-positive) を非感作性物質とした。h-CLAT による感作性評価では、CD86 または CD54 のいずれかが陽性であった場合、被験物質を陽性と判定される (Nukada ら, 2012, OECD, 2018)。それ以外の場合は、陰性と判定される。表 4 は、13 物質に対する本研究の評価と murine LLNA による感作性評価との一致率である。括弧の値は、検出された遺伝子発現量のうち陽性基準値を超えた数を示す。感度 (Sensitivity) は、murine LLNA の感作性物質と本評価により陽性に評価された化学物質が一致した割合、特異度 (Specificity) は、murine LLNA の非感作性物質と本評価により陰性に評価された化学物質が一致した割合である。正確度 (Accuracy) は、murine LLNA の感作性物質と本評価による陽性評価の一致率、および murine LLNA の非感作性物質と本評価による陰性評価の一致率である。7 遺伝子のうち、

TREMI の陽性基準が 1.5～2.5 以上、*TNFRSF12A* の陽性基準が 1.5～1.7 以上において、13 物質すべての感作性が正しく分類された。*IL1B*, *CD86*, *HMOX1*, および *CD54* は、合計 13 種類の化学物質のうち 12 種類の感作性が正しく分類され、h-CLAT と同程度の評価精度 92%を示した。

考察

Hooyberghs ら (2008) は、ヒト初代培養細胞からの培養細胞と Real-time RT-PCR を使用して、皮膚感作性を予測する VITOSENS と呼ばれる分類モデルを構築した。彼らは、樹状細胞 CD34-DC における *CREM* と *CCR2* の遺伝子発現に基づき、29 種類の化学物質の皮膚感作性を評価した。ただし、CD34-DC は、ヒトの臍帯血から分離された単核球から得られたため、完全な *in vitro* 試験と比較して均一な細胞品質を得ることが困難である (Aiba ら. 1997, Ryan ら. 2005)。また、単核細胞が未成熟 CD34-DC に分化することは、フローサイトメトリーにより確認されている (Schoeters ら. 2007)。よって、VITOSENS には 2 つの高価な機器 (フローサイトメーターとリアルタイム PCR) が必要なため、関連するコストが高くなる。これらの問題に対処するために、本研究では一貫した品質の培養細胞株 THP-1 を使用した。THP-1 は、h-CLAT などの皮膚感作性スクリーニングに使用される有望な *in vitro* 細胞株であり、細胞分化を必要としない (Ashikaga ら. 2002, 2006, Bocchietto ら. 2007, Miyazawa ら. 2007, Tietze and Blomeke. 2008)。本研究では、化学物質に対する細胞の正常な遺伝子応答として、陽性基準に基づき、陽性 (NiSO₄ および DNCB) および陰性 (SDS) コントロールを確認することで、細胞品質の確認から化学物質の感作性評価までを Real-time PCR 機器のみで実施できるため、実験装置の初期費用を削減できる。Real-time PCR を使用する方法は、フローサイトメーターを使用する h-CLAT と比較しても約半分の装置コストで済むため、試薬、キット、消耗品、労働力などのランニングコストが h-CLAT よりも優れている。さらに、h-CLAT は、化学物質を細胞へ曝露後から検出までの工程で、主に以下の 6 つのプロセスを必要とする。2 回の細胞洗浄を行い、細胞表面 Fc 受容体をブロッキング、CD54, CD86, またはマウス IgG1 (アイソタイプ) それぞれに対する FITC 標識抗体による染色、その後、さらに細胞洗浄を 2 回を行い、細胞生存率を推定するためのヨウ化プロピジウム染色およびフローサイトメトリー分析を実施する (OECD. 2018)。一方、本研

究法における細胞への化学物質曝露後の主なプロセスは、細胞数カウントによる細胞生存率の測定、細胞からの RNA 抽出、逆転写反応 (cDNA 合成)、Real-time PCR 分析の 4 つである。したがって、本研究法は既存の h-CLAT 法よりも複雑ではない。そして、試験の消耗品の費用を比較すると、本研究と h-CLAT は、細胞培養の費用は同じである。細胞培養以外の感作性の評価については、マーカー特異的な抗原によって細胞表面マーカーを検出する方法の h-CLAT は、評価ごとの消耗品に化学物質あたり約 48,000 円を必要とする。それに比べて、マーカー遺伝子の発現を検出する本試験方法は、評価ごとの消耗品は化学物質あたり約 5,000 円で済む。本研究では、SYBR Green real time qPCR を採用したため、試験はシングルプレックスで行ったが、TaqMan プローブなどの加水分解プローブを使用してマルチプレックス PCR を導入すると、価格と労力のコストがさらに削減できる。

本章は、THP-1 細胞を使用して化学物質の皮膚感作性を評価するために、THP-1 細胞中の遺伝子からマーカー候補遺伝子を選んだ。DNA マイクロアレイを使用して、2 つの標準的な感作性物質に曝露された THP-1 細胞中の上方制御された遺伝子を分析し、Gene Ontology を用いた機能的クラスター分析によって免疫機能に関連する遺伝子を分類した。その結果、26 遺伝子が免疫機能に最も関連するクラスターに分類された。この 26 遺伝子のうち *HMOX1* と *IL1B* は、ヒト臍帯血由来 CD34-DC の研究でも、化学物質に対して遺伝子発現が誘発されたことが報告されている (Hirota ら. 2006, Ade ら. 2009)。彼らのテストには、本研究で用いた物質と同じ化学物質が含まれるが、彼らの研究で選択したマーカー候補遺伝子は、本研究のものとは多少異なっていた。これは、化学物質によって誘発された遺伝子発現が、DC と THP-1 細胞で異なる可能性があることを意味する。Arkusz ら (2010) は、感作性物質に誘導された DC の遺伝子発現データに基づいて、THP-1 細胞を使用した RT-PCR 法のためのマーカー遺伝子を選択した。彼らの研究では、78%の精度で感作性物質と非感作性物質を区別したが、h-CLAT の精度 85% (Sakaguchi ら. 2010) には及ばなかった。対照的に、本章で皮膚感作性物質の遺伝子発現マーカーとして同定された *TREMI* と *TNFRSF12A* を使用する感作評価では、検証した 13 種類の化学物質すべてにおいて、100%の感度と特異性で感作性物質と非感作性物質を区別した (表 4)。特に、h-CLAT で偽陰性である SDS と、murine LLNA で偽陽性である

IEUG を適切に評価した。*TREMI* と *TNFRSF12A* は、本研究の試験方法で感作性物質を評価するための最良のマーカーだが、今回試験した化学物質の数は限られている。したがって、感作性物質の識別能力を明確にするためには、さらに調査する必要がある。

本研究で得られたマーカー候補である *TREMI* の細胞表面における発現は、マウスモデルにおける敗血症性ショックの主要なメディエーターとして知られる (Bouchon ら. 2000, 2001, Gibot ら. 2005)。また、*TREM1* は、炎症反応に関与する好中球および単球の活性化を仲介し、細菌および真菌感染によって上方制御される (Bouchon ら. 2000, 2001)。本研究では、*TREMI* の遺伝子発現は感作性物質によって誘導されたが、非感作性物質への発現の増加はほとんど無かった (表 3)。この結果を考慮すると、*TREMI* は、微生物だけでなく化学増感剤にも免疫学的に反応する可能性があることを示唆している。

本研究におけるもう 1 つの有用なマーカー候補である *TNFRSF12A* は、線維芽細胞増殖因子誘導性即時初期応答タンパク質 14 (FN14) として知られている (Meighan-Mantha ら. 1999, Feng ら. 2000)。このタンパク質は、細胞増殖、血管新生、炎症、およびアポトーシスを調節する多機能サイトカインである、アポトーシスの TNF 様弱誘導物質 (TNF-like weak inducer of apoptosis, TWEAK) の受容体である (Chicheportiche ら. 1997, Wiley ら. 2001, Wiley and Winkles. 2003)。FN14 / TWEAK は、内皮細胞の増殖と遊走を誘導し、NF- κ B シグナル伝達経路の活性化 (Harada ら. 2002, Saitoh ら. 2003, Ogura ら. 2013) と、ICAM-1 や E-セ렉チンなどの接着分子の細胞表面発現の上方制御に関連している (Harada ら. 2002)。*CD54* 遺伝子の産物である ICAM-1 は皮膚感作性マーカーでもある (Yoshida ら. 2003, Sakaguchi ら. 2007)。さらに、FN14 はヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) とヒトケラチノサイトで構成的に発現しており、TWEAK との相互作用による炎症反応の誘導に関与している (Harada ら. 2002, Jin ら. 2004)。これらの報告は、*TNFRSF12A* (*FN-14*) 遺伝子の発現が、皮膚における免疫細胞の活性化および免疫応答に関与していることを示唆している。したがって、皮膚感作性マーカーとして *TNFRSF12A* を使用する本研究法は、皮膚感作のための

AOP の第 3 の重要なイベントである、「樹状細胞の活性化と共刺激，および細胞間接着分子，ケモカイン，そしてサイトカインの上方制御」に基づく方法と言える。*TREMI* と *TNFRSF12A* 両方のマーカーを使用する必要があるか，或いは，どちらか一方を使用するだけで十分かどうかは，今後の検討事項である。

表 1 第 1 章で使用した化学物質

Chemical*	Abbreviation	CAS No.	RT-PCR		LLNA	h-CLAT		
			Solvent	CV75 ($\mu\text{g/mL}$)		Potency category	Judgment	CD86
2,4-Dinitrochlorobenzene	DNCB	97-00-7	DMSO	3.8	Extreme	p	+	+
1,4-Phenylenediamine	PPDA	106-50-3	Saline	90	Strong	p	+	-
Isoeugenol	IEGN	97-54-1	DMSO	144	Moderate	n	-	-
2-Mercaptobenzothiazole	MBT	149-30-4	DMSO	290	Moderate	p	-	+
Nickel sulfate	NiSO₄	10101-97-0	Saline	150	Moderate	p	+	+
Aniline	ANL	62-53-3	DMSO	1020	Weak	p	+	+
Eugenol	EGN	97-53-0	DMSO	224-250	Weak	p	+	+
Imidazolidinyl urea	IU	39236-46-9	Saline	84	Weak	p	+	+
R(+)-Limonene	LIM	5989-27-5	DMSO	320-384	Weak	p	-	+
4-Aminobenzoic acid	ABA	150-13-0	DMSO	1000	non-sensitizer	n	-	-
Isopropanol	IPN	67-63-0	Saline	5000	non-sensitizer	n	-	-
Vanillin	VN	121-33-5	DMSO	936	non-sensitizer	n	-	-
Sodium dodecyl sulfate	SDS	151-21-3	Saline	35-40	false-positive	n	-	-

*Bold : h-CLAT における習熟度評価用物質

CV75 は、この研究において細胞生存率 65~85%を誘導する試験濃度である。murine LLNA における感作性評価は、感作性の強度により、極度 (extreme), 強い (strong), 中程度 (moderate), 弱い (weak), または非感作 (Non-sensitizer) に分類される (Gerberick ら. 2005, OECD. 2010b)。本研究では、murine LLNA による偽陽性 (False-positive) は非感作性物質と見なした。h-CLAT による感作性評価では、CD86 または CD54 のいずれかが陽性であった場合、被験物質を陽性、「+」または「p」と判定される (Nukada ら. 2012, OECD. 2018)。それ以外の場合は、「-」または「n」で示される。

表 2 Real-time RT-PCR に使用した遺伝子名とプライマーの塩基配列

Gene name	Gene symbol	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')
<i>Interleukin 1 beta</i>	<i>IL1B</i>	GCTGAGGAAGATGCTGGTTC	TCCCATGTGTCGAAGAAGATAG
<i>CD86 molecule</i>	<i>CD86</i>	CGCGGCTTTTATCTTCACC	CTGTAATCCAAAGGAATGTGGTCT
<i>Heme oxygenase 1</i>	<i>HMOX1</i>	TGAACTCCCTGGAGATGACTC	AGCTCCTGCAACTCCTCAAA
<i>TNF receptor superfamily member 12A</i>	<i>TNFRSF12A</i>	CGCTCTGAGCCCTGACCCTT	TCCGCCGGTCTCCTCTAT
<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i>	<i>TREM1</i>	TCCTGGACTGTATCAGTGTGTGATCT	CCAGGGGTCCCTGAAAAA
<i>C-X-C motif chemokine ligand 14</i>	<i>CXCL14</i>	ACGTGAAGAAGCTGGAAATGA	TGACCTCGGTACCTGGACAC
<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>	<i>CD54 (ICAM1)</i>	GCTTCTCTGCTCTGCAACC	GTCCAGTTTCCCGGACAATC
<i>Glyceralddehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>GAPDH</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCACAAATCC

表 3 THP-1 細胞を用いた Real-time RT-PCR アッセイによるマーカー候補遺伝子の相対遺伝子発現量

Chemical	LLNA Category	h-CLAT Judgment		<i>IL1B</i>	<i>CD86</i>	<i>HMOX1</i>	<i>TNFRSF12A</i>	<i>TREM1</i>	<i>CXCL14</i>	<i>CD54</i>			
DNCB	Extreme	P	Assay 1	18.6	15.5	16.0	0.3	0.1	2.3	45.4			
				7.5	17.7	1.0	0.4	0.0	3.9	52.5			
				79.3	18.3	30.6	0.5	0.0	4.2	8.5			
			Assay 2	289.3	21.0	112.7	25.3	13.4	48.7	218.3			
				271.8	24.6	87.8	23.0	9.0	34.0	296.1			
				34.7	0.9	86.6	6.0	3.7	35.2	5.9			
			Assay 3	73.7	9.0	127.1	17.3	19.0	47.5	131.0			
				90.7	11.9	182.3	22.5	53.3	58.1	76.8			
				80.1	29.2	147.0	11.9	30.4	49.5	66.4			
			PPDA	Strong	P	Assay 1	21.6	17.0	1750.2	49.7	33.4	11.1	18.9
							17.5	10.0	1421.6	73.3	26.4	14.8	10.8
							19.8	3.0	772.5	39.3	20.3	9.2	26.8
Assay 2	22.3	14.9				1621.7	27.1	43.2	1.8	39.2			
	6.5	8.5				242.8	6.5	12.2	0.8	7.4			
	17.7	12.1				1402.1	17.3	31.9	0.9	34.1			
Assay 3	11.0	11.3				407.3	7.7	10.9	ND	75.4			
	9.9	17.6				448.8	13.1	7.6	1.0	112.7			
	21.8	25.0				596.3	21.0	16.9	3.0	149.8			
IEGN	Moderate	N				Assay 1	0.7	2.8	38.3	2.0	1.8	0.8	5.6
							0.7	2.8	33.6	1.9	3.9	0.2	4.8
							0.7	2.6	43.7	1.9	6.5	1.0	6.3
			Assay 2	0.2	1.2	82.7	2.3	7.7	0.5	4.8			
				0.2	1.3	62.2	2.8	7.5	0.7	4.4			
				0.1	1.3	68.1	2.3	8.6	0.4	5.8			
			Assay 3	0.8	2.9	79.5	2.4	5.9	0.9	7.0			
				1.1	2.5	61.5	2.2	5.2	0.2	5.5			
				0.8	2.2	73.2	2.3	4.7	0.5	6.4			
			MBT	Moderate	P	Assay 1	0.9	3.9	1156.1	3.8	17.9	1.0	13.1
							2.1	4.1	456.7	2.3	5.9	1.2	7.6
							—	—	—	—	—	—	—
Assay 2	3.1	1.5				357.9	ND	20.4	0.5	1.3			
	2.5	2.1				394.4	0.9	18.0	0.4	1.3			
	1.9	1.5				187.8	0.3	15.1	0.2	2.2			
Assay 3	1.5	3.1				1328.0	1.6	15.8	2.2	9.6			
	3.9	0.6				687.4	2.6	25.2	1.3	7.8			
	7.1	2.6				677.9	8.9	15.7	1.3	5.5			
NiSO ₄	Moderate	P				Assay 1	16.9	1.2	17.4	24.7	17.5	4.3	41.9
							18.3	0.6	17.7	3.5	0.6	3.7	30.1
							77.2	1.3	21.2	11.1	0.0	5.2	51.6
			Assay 2	35.7	0.9	31.6	6.3	9.4	2.1	29.7			
				27.2	0.6	27.9	6.4	7.7	2.3	26.2			
				18.1	0.4	20.8	3.3	4.9	1.9	24.3			
			Assay 3	14.9	0.5	19.3	2.3	6.1	4.9	12.3			
				17.9	1.1	28.9	1.6	7.9	12.4	14.2			
				21.3	0.7	23.8	3.1	8.0	4.6	16.3			
			ANL	Weak	P	Assay 1	13.9	32.1	55.3	12.8	13.9	0.5	17.1
							11.1	40.0	80.4	20.4	22.5	1.3	19.6
							13.7	10.1	37.5	5.8	8.5	0.2	11.2
Assay 2	14.5	0.8				24.7	1.7	9.8	0.2	0.1			
	34.1	1.6				76.5	2.1	16.1	0.3	0.2			
	5.0	1.2				22.3	0.7	6.3	0.1	0.2			
Assay 3	3.3	3.6				13.0	5.8	146.0	0.1	12.7			
	9.1	1.1				33.1	6.4	199.5	0.1	15.0			
	11.9	2.5				21.1	7.0	68.6	0.1	9.2			
EGN	Weak	P				Assay 1	10.8	17.9	49.1	1.9	5.8	0.6	12.8
							6.2	13.0	53.0	1.7	4.9	0.3	9.0
							15.9	14.9	142.7	2.6	10.2	0.8	9.6
			Assay 2	5.2	7.8	24.5	1.5	2.0	0.3	11.3			
				4.3	12.2	36.9	2.5	2.7	0.2	10.6			
				18.9	14.2	78.6	1.5	6.5	0.8	12.1			
IU	Weak	P	Assay 1	1.9	2.7	8.5	1.6	2.4	0.4	1.1			
				5.1	4.9	23.2	3.9	3.2	2.0	2.3			
				9.1	5.5	18.8	4.8	2.9	5.3	2.3			
			Assay 2	10.4	5.6	13.4	4.0	3.3	2.4	19.2			
				10.1	10.7	11.5	3.0	4.2	3.3	13.5			
				6.2	8.7	12.7	1.9	1.7	3.9	14.8			
			Assay 3	1.9	2.5	3.1	1.9	2.3	0.7	3.1			
				2.8	3.9	4.8	2.2	2.8	2.6	3.5			
				1.4	2.5	3.0	2.1	1.3	1.5	1.6			

以下に続く

表 3 続き

Chemical	LLNA Category	h-CLAT Judgment		<i>IL1B</i>	<i>CD86</i>	<i>HMOX1</i>	<i>TNFRSF12A</i>	<i>TREM1</i>	<i>CXCL14</i>	<i>CD54</i>			
LIM	Weak	P	Assay 1	8.3	12.4	117.2	5.9	11.2	4.1	15.3			
				1.4	14.2	9.7	1.0	1.0	0.7	16.4			
				30.2	8.6	260.2	18.8	17.8	16.3	5.9			
			Assay 2	6.0	7.7	43.6	3.2	4.4	2.4	17.4			
				9.4	14.6	84.3	3.8	3.3	2.8	27.3			
				4.1	7.7	52.6	4.2	4.1	2.7	22.2			
			Assay 3	7.7	6.3	93.1	0.6	5.8	1.3	13.9			
				2.7	3.9	39.1	0.5	2.4	0.6	5.4			
				4.6	5.3	60.1	1.0	2.9	1.0	9.6			
ABA	non-sensitizer	N	Assay 1	1.8	1.2	1.8	0.8	1.6	1.9	1.1			
				2.2	1.6	1.9	1.7	1.6	1.3	2.1			
				1.4	0.9	1.5	1.1	0.9	0.7	1.7			
			Assay 2	1.2	1.4	1.3	0.9	0.7	1.1	1.2			
				0.5	1.3	1.3	1.3	1.4	1.0	1.2			
				ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
			IPN	non-sensitizer	N	Assay 1	1.0	2.0	1.6	1.2	1.2	2.1	0.6
							1.2	0.4	2.0	0.9	1.4	2.4	0.4
							0.9	1.4	1.3	0.8	1.5	0.9	0.6
Assay 2	ND	0.6				3.2	0.5	0.3	2.8	1.7			
	1.7	1.1				2.4	0.6	0.8	1.1	1.0			
	1.3	0.9				1.2	0.5	1.0	1.0	1.0			
Assay 3	1.2	1.1				1.4	1.0	1.9	1.6	0.8			
	1.9	1.1				1.5	1.0	1.6	0.2	0.5			
	3.6	1.3				1.2	0.7	1.0	1.9	1.3			
VN	non-sensitizer	N	Assay 1	0.4	0.3	12.6	2.2	1.3	0.8	4.2			
				0.3	0.7	6.9	0.7	1.5	0.6	1.8			
				0.4	0.6	6.3	0.6	1.4	0.3	2.3			
			Assay 2	1.0	1.1	6.8	1.1	1.0	0.8	4.7			
				0.6	0.6	7.1	1.1	1.1	0.7	5.1			
				1.1	1.4	9.2	1.4	1.1	0.6	6.0			
			Assay 3	1.3	5.1	25.1	0.7	0.8	1.2	7.9			
				1.2	4.2	21.3	0.8	1.0	1.2	8.6			
				1.5	4.1	24.1	1.3	1.4	1.2	8.9			
SDS	false positive	N	Assay 1	1.3	0.7	3.7	1.2	2.2	0.4	1.4			
				1.4	0.8	3.2	1.1	2.6	0.5	1.6			
				1.3	0.8	3.2	1.1	2.6	0.4	1.8			
			Assay 2	1.5	0.7	5.6	2.8	1.2	0.4	2.5			
				0.9	0.5	4.7	1.5	1.0	0.3	2.0			
				2.0	0.6	5.7	2.3	2.0	0.2	4.2			
			Assay 3	1.4	0.8	3.6	2.4	0.8	0.3	2.3			
				0.8	0.7	2.6	1.5	1.1	0.3	2.1			
				0.9	0.5	2.1	1.2	0.9	0.3	2.0			

ND : Non-detection (非検出)

— : 65~85%以外の細胞生存率のため、RT-PCR アッセイは実施せず。

マーカー候補の相対遺伝子発現量は、倍数変化として示した。化学物質およびその溶媒コントロールを用いて、THP-1 細胞を使用した Real-time RT-PCR アッセイをそれぞれ実施した (Assay, n=3)。遺伝子発現レベルは、ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* で正規化し、溶媒コントロールに対する曝露サンプルの倍数変化を算出して相対遺伝子発現量とした。表の初め 3 列には、化学物質の略語、murine LLNA のカテゴリー、および h-CLAT 評価をそれぞれ示した。

表 4 マーカー候補 7 遺伝子における皮膚感作性評価の正確度

Fold change	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
	<i>IL1B</i>			<i>CD86</i>		
≥1.5	89 (8/9)	100 (2/2)	91 (10/11)	89 (8/9)	100 (4/4)	92 (12/13)
≥1.7	89 (8/9)	100 (2/2)	91 (10/11)	89 (8/9)	100 (4/4)	92 (12/13)
≥2.0	89 (8/9)	100 (4/4)	92 (12/13)	89 (8/9)	100 (4/4)	92 (12/13)
≥2.5	78 (7/9)	100 (4/4)	85 (11/13)	78 (7/9)	100 (4/4)	85 (11/13)
≥3.0	78 (7/9)	100 (4/4)	85 (11/13)	56 (5/9)	100 (4/4)	69 (9/13)
≥4.0	78 (7/9)	100 (4/4)	85 (11/13)	56 (5/9)	100 (4/4)	69 (9/13)
≥5.0	78 (7/9)	100 (4/4)	85 (11/13)	44 (4/9)	100 (4/4)	62 (8/12)
	<i>HMOX1</i>			<i>TNFRSF12A</i>		
≥1.5	100 (9/9)	0 (0/3)	75 (9/12)	100 (8/8)	100 (4/4)	100 (12/12)
≥1.7	100 (9/9)	33 (1/3)	83 (10/12)	100 (8/8)	100 (4/4)	100 (12/12)
≥2.0	100 (9/9)	50 (2/4)	85 (11/13)	89 (8/9)	100 (4/4)	92 (12/13)
≥2.5	100 (9/9)	50 (2/4)	85 (11/13)	75 (6/8)	100 (4/4)	83 (10/12)
≥3.0	100 (9/9)	50 (2/4)	85 (11/13)	67 (6/9)	100 (4/4)	77 (10/13)
≥4.0	100 (9/9)	75 (3/4)	92 (12/13)	44 (4/9)	100 (4/4)	62 (8/13)
≥5.0	100 (9/9)	75 (3/4)	92 (12/13)	44 (4/9)	100 (4/4)	62 (8/13)
	<i>TREMI</i>			<i>CXCL14</i>		
≥1.5	100 (9/9)	100 (3/3)	100 (12/12)	50 (4/8)	75 (3/4)	58 (7/12)
≥1.7	100 (9/9)	100 (4/4)	100 (13/13)	50 (4/8)	100 (4/4)	67 (8/12)
≥2.0	100 (9/9)	100 (4/4)	100 (13/13)	50 (4/8)	100 (4/4)	67 (8/12)
≥2.5	100 (9/9)	100 (4/4)	100 (13/13)	38 (3/8)	100 (4/4)	58 (7/12)
≥3.0	88 (7/8)	100 (4/4)	92 (11/12)	25 (2/8)	100 (4/4)	50 (6/12)
≥4.0	75 (6/8)	100 (4/4)	83 (10/12)	22 (2/9)	100 (4/4)	46 (6/13)
≥5.0	63 (5/8)	100 (4/4)	75 (9/12)	11 (1/9)	100 (4/4)	38 (5/13)
	<i>CD54</i>					
≥1.5	100 (9/9)	33 (1/3)	83 (10/12)			
≥1.7	100 (9/9)	33 (1/3)	83 (10/12)			
≥2.0	100 (9/9)	50 (2/4)	85 (10/13)			
≥2.5	100 (9/9)	75 (3/4)	92 (12/13)			
≥3.0	100 (9/9)	75 (3/4)	92 (12/13)			
≥4.0	89 (8/9)	75 (3/4)	85 (11/13)			
≥5.0	89 (8/9)	75 (3/4)	85 (11/13)			

(陽性判定の数 / 評価数)

13 化学物質に対する本試験法による感作性の評価と murine LLNA 評価を比較した。感度 (Sensitivity)、特異度 (Specificity)、および正確度 (Accuracy) を示した。相対遺伝子発現量を任意の倍数変化 (陽性基準値) で感作性および非感作性に分類し、既存の感作性評価と比較して評価の一致率を示した。

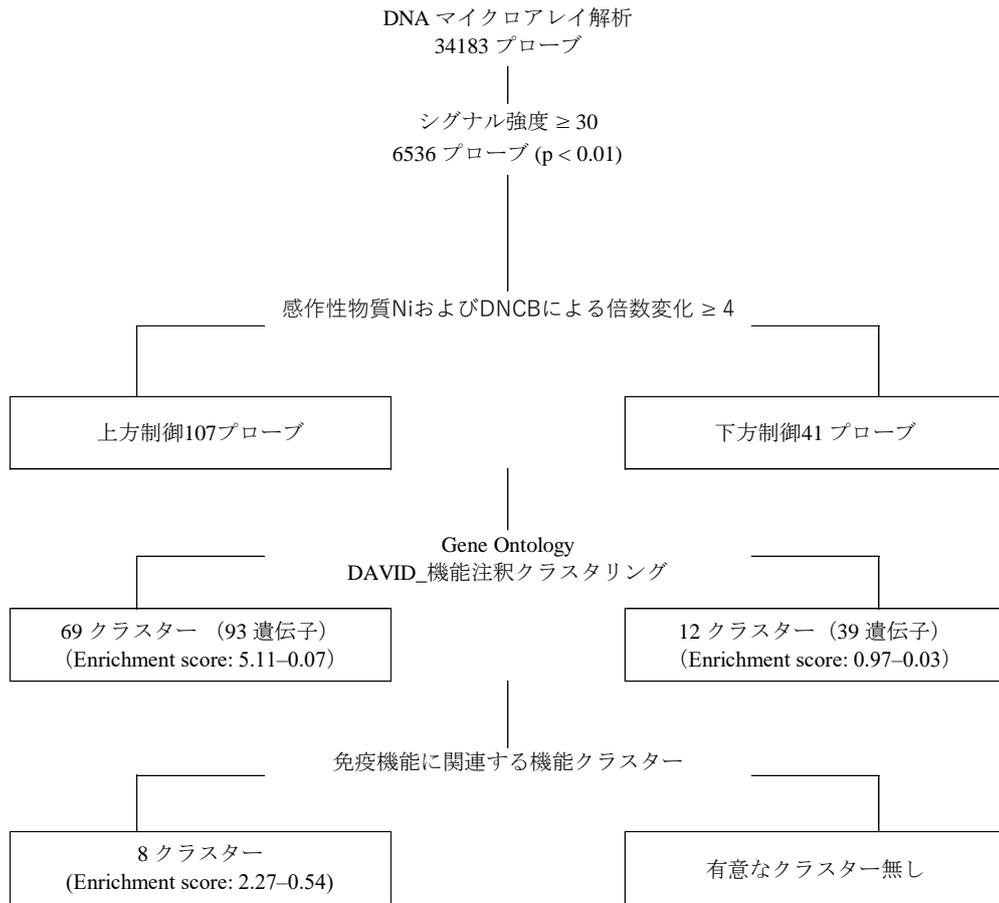


図 1 マイクロアレイの処理と遺伝子解析

代表的な増感剤 NiSO_4 または DNCB, およびそれぞれの溶媒コントロール, Saline, DMSO に, THP-1 細胞を 24 時間曝露した ($n=3$)。発現マイクロアレイ解析の後, DAVID を使用して GO 分析と機能注釈クラスタリングを行った。Enrichment score は, 各 GO-term の修正された片側フィッシャー検定 ($p\text{-value} < 0.01$) に基づいており, Enrichment score > 2 の機能遺伝子クラスタは, その GO-term に対して有意に濃縮されている (Huang ら, 2007)。

Cluster 9: Enrichment score 2.27

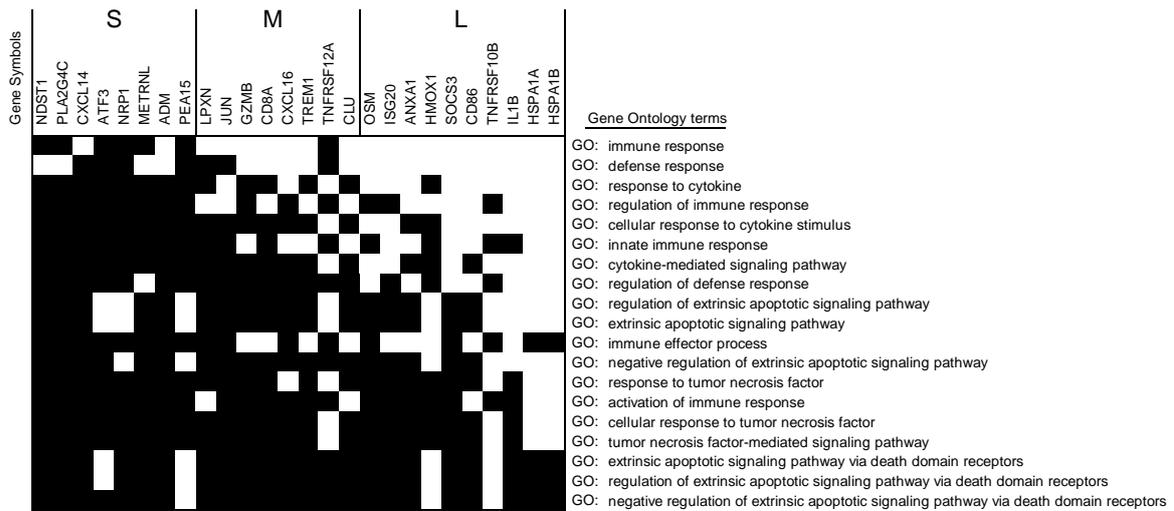


図 2 免疫機能に関連するマーカー候補遺伝子の機能的クラスター分析

DNA マイクロアレイ分析した遺伝子を Web ベースの機能アノテーションツール DAVID 6.8 で分析し， Enrichment score 2.27 (p -value < 0.01) で免疫機能への関連に有意性を示した上方制御された遺伝子群クラスター9 を示した。クラスター内の遺伝子メンバーと GO-term は，共有する類似の生物学的意味を表している。白い領域は GO-term の関連が肯定的に報告されていることを示し，黒い領域は GO-term の関連付けがまだ報告されていないことを示している。これらの遺伝子は，白い領域を持つ GO-term 数を基に，3 グループ (S, M, L) に任意に分類した。

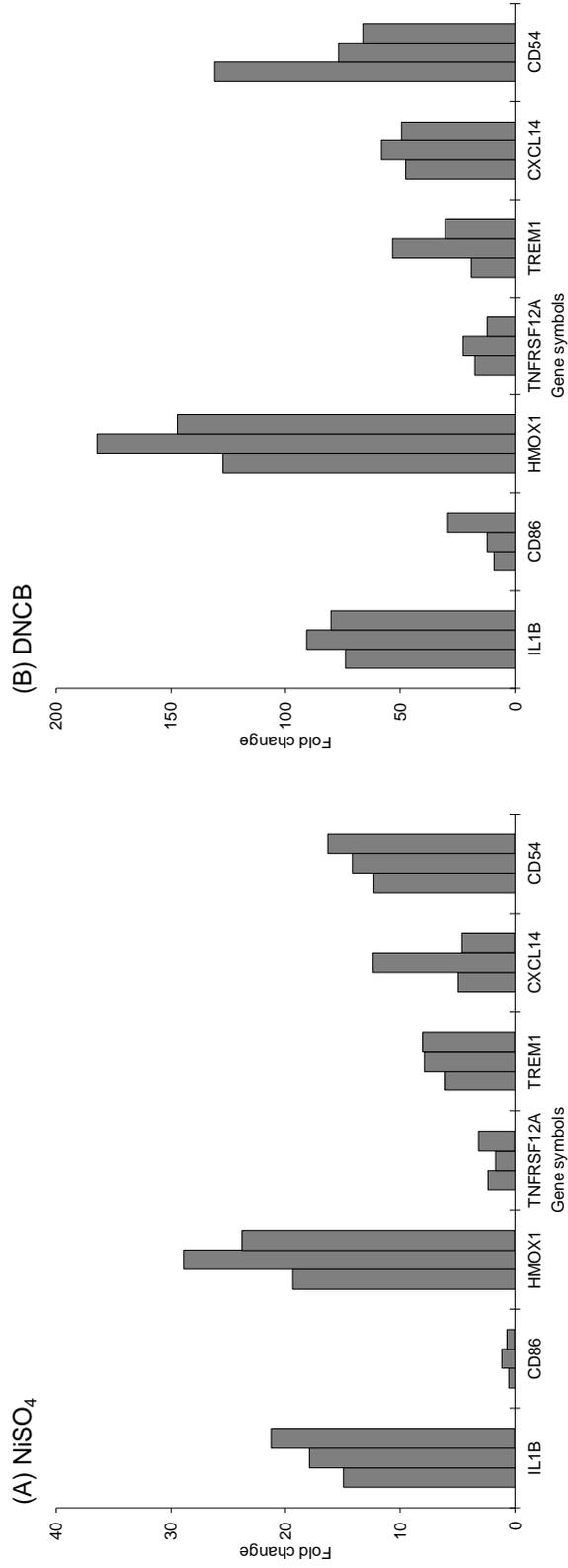


図 3 7つのマーカー候補遺伝子に対するDNAマイクロアレイの再現性

マイクロアレイ解析から選択した7遺伝子について、Real-time RT-PCRにより再現性の検証を行った。代表的な皮膚感作物質であるNiSO₄とDNCB、およびそれぞれの溶媒に24時間曝露したTHP-1細胞について、Real-time RT-PCRアッセイを行った相対遺伝子発現量を倍率変化 (n = 3) で示した。

第2章 アレルギーを誘発する食品添加物に対する感作性評価

現在、化学物質がアレルギーを誘発する可能性を評価する試験には、皮膚感作性試験が行われており、その対象は接触性皮膚炎を誘発する化学物質である。そのため、経口摂取により食物アレルギーを誘発する物質に対する *in vitro* の評価法は未だない。

第1章により、本研究にて選んだ遺伝子をマーカーとした Real-time RT-PCR アッセイによる感作性評価が有効であることが示された。そこで本章は、経口摂取する物質で接触性皮膚炎以外のアレルギー誘発性を持つ化学物質に対しても、本試験法による感作性評価が有用であるかを検討した。

アレルギーの原因物質は、工業用品や化粧品、医薬品だけでなく、食品に含まれる化合物の場合もある。そのうち、食品添加物として使用される亜硫酸塩は、防腐剤、抗酸化剤として化粧品や医薬品、写真製造、食料品などに広く使われており、ワインなど各種食品に含まれている。亜硫酸塩に対するアレルギーの発症はすでに認識されており、喘息、蕁麻疹、鼻結膜炎、およびアナフィラキシーショックをもたらす場合もある (Vally ら. 2009)。本章では、亜硫酸塩のうち亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3) と亜硫酸カリウム (K_2SO_3) を被験物質に用いて、本試験法により食品含有化学物質に対する感作性の評価が有用であるかを検討した。

試料と方法

試料および試料の調製

亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3 , CAS No.7757-83-7, 97.0%), および亜硫酸カリウム (K_2SO_3 , CAS No.10117-38-1, 95.0%) は、FUJIFILM-Wako から購入した。

被験物質の調製は、基本的には第1章の「THP-1細胞の被験物質処理」に記載した方法に準拠した。 Na_2SO_3 , および K_2SO_3 は、それぞれ溶媒に Saline を用いて溶解し、1 mL に定容した。 Na_2SO_3 は 115.1 mg/mL を、 K_2SO_3 は 331.9 mg/mL を原液として、試験を行うまで -20°C に保存した。

濃度設定試験および評価試験

Na_2SO_3 は、1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g/mL}$ を濃度設定に用い、1000, 833, 694 $\mu\text{g/mL}$ を評価試験の CV75 とした。 K_2SO_3 は、3320, 1660, 829.6, 414.8 $\mu\text{g/mL}$ を

濃度設定に用い、1051, 846 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を評価試験の CV75 とした。Saline は溶媒コントロールに用いた。

本章の濃度設定および評価試験は、基本的には第 1 章の「THP-1 細胞の被験物質処理」に記載した方法に準拠した。濃度設定試験では以下を行った。Na₂SO₃ および K₂SO₃ は、それぞれ Saline で原液から公差 2 で段階希釈し、溶媒希釈液とした。さらに、溶媒希釈液を培地で 50 倍希釈して培地希釈液を調製した。それを 2.0×10^6 cells/mL の細胞懸濁液に等量混合し、THP-1 細胞に 24 時間曝露した。曝露後、細胞をすべて回収して細胞数および細胞生存率を測定した。評価試験では、前培養した THP-1 細胞を、CV75 の Na₂SO₃ または K₂SO₃ を含む新鮮な培地に再懸濁し、 1×10^6 cells/well を曝露した (n = 3)。

Real-time RT-PCR アッセイおよび感作性評価

Real-time RT-PCR アッセイおよび感作性評価は、第 1 章の Real-time RT-PCR アッセイに準拠した。ただし、Na₂SO₃ は、各濃度で 1 試験とし、5 試験行った。THP-1 細胞から全 RNA を抽出後、cDNA を調製し、第 1 章にて選択したマーカー候補 7 遺伝子を用いて Real-time RT-PCR アッセイを行った。GAPDH および溶媒コントロールの遺伝子発現量から算出した相対遺伝子発現量に対し、第 1 章で求めた陽性基準値をもとに感作性を評価した。陽性基準値は倍数変化 1.5, 2.0, 2.5 を設定し、各陽性基準により感作性評価を行った。1 試験において陽性基準値以上が 2 つ以上で試験陽性とし、3 試験のうち、少なくとも 2 試験以上が陽性の場合、陽性基準において感作陽性 (P) と評価した。

結果

Na₂SO₃ および K₂SO₃ で THP-1 細胞をそれぞれ 24 時間曝露し、Real-time RT-PCR を行った結果と感作性評価を表 5 に示した。Na₂SO₃ の試験は 3 回行い、細胞生存率が 65~85%以内の細胞を Real-time RT-PCR アッセイに採用した。7 遺伝子それぞれによる感作性の判定方法は、第 1 章に従った。第 1 章における陽性基準値の検討では、TNFRSF12A または TREM1 によりそれぞれ感作性を正しく判定した陽性基準値は、倍数変化 1.5~2.5 の範囲にあった。この結果を踏まえ、本章では、各遺伝子において、倍数変化 1.5, 2.0, 2.5 を陽性基準値として感作性評価を行った。

本検討の結果、*TNFRSF12A* は、亜硫酸塩の両物質とも全ての陽性基準値で感作陽性と評価した。*TREMI* は、 K_2SO_3 では、2 試験で遺伝子発現量が検出されなかったため判定不可としたが、 Na_2SO_3 に対し陽性基準値 1.5 の場合で感作陽性と評価した。また、第 1 章において次に感作性の評価能力が高かった *HMOX1*, *IL1B*, *CD54* は、本感作性評価条件において、亜硫酸塩 2 物質とも感作陽性と評価した。以上により、本試験法によるマーカー候補 7 遺伝子のうち 4 または 5 遺伝子において、亜硫酸塩 Na_2SO_3 および K_2SO_3 は感作陽性物質と評価した。

考察

亜硫酸塩は、防腐剤および酸化防止剤として広く使用される食品添加物である。また、接触性皮膚炎の原因物質としても知られ、パッチテストにおいて、メタ重亜硫酸ナトリウムに陽性反応を示した患者が、 Na_2SO_3 に対しても陽性のアレルギー反応を示すことが報告されている (Oliphant ら. 2012)。さらに、亜硫酸塩への局所的、経口的、非経口的曝露によって、皮膚炎、蕁麻疹、紅潮、低血圧、腹痛および下痢だけでなく、アナフィラキシーのように食物アレルギー様の症状も引き起こされる。本章は、亜硫酸塩である Na_2SO_3 と K_2SO_3 を被験物質に用いて、経口摂取により食物アレルギー様症状を誘発する化学物質に対する本試験法による感作性評価の可能性を検証した。

第 1 章により選択したマーカー候補遺伝子を用いて、陽性基準値を 1.5, 2.0, 2.5 と設定して、Real-time RT-PCR アッセイおよび感作性評価を行った。その結果、 Na_2SO_3 は、陽性基準値 1.5 の場合に、*TNFRSF12A*, *TREMI*, *HMOX1*, *IL1B*, *CD54* の 5 遺伝子で、 K_2SO_3 は、全ての陽性基準値において、*TNFRSF12A*, *HMOX1*, *IL1B*, *CD54* の 4 遺伝子で感作陽性物質と評価した。この結果は、本試験法による感作性評価が、食物アレルギー様症状を誘発する食品含有化学物質に対しても有効である可能性を示した。本検討は、食品添加物 2 物質に対してのみであるため、より多くの経口摂取する食品含有化学物質に対して検証する必要があるが、Real-time RT-PCR アッセイによる本感作性評価法が、皮膚感作性物質以外の化学物質に対しても有効であることが期待できる。

表 5 亜硫酸化合物に対する Real-time RT-PCR アッセイ結果と感作性評価

(A) Na₂SO₃

test	conc. μg/mL	IL1B	CD86	HMOX1	TNFRSF12A	TREM1	CXCL14	CD54
1	1000	2.8	0.6	34.7	5.8	1.3	0.7	18.5
		2.1	0.5	24.4	4.3	1.1	0.5	13.5
		2.9	0.6	34.0	6.7	1.6	0.9	14.5
2	833	9.0	1.3	394.4	19.6	2.8	0.6	8.8
		6.8	0.7	214.3	13.2	1.5	0.3	5.8
		8.4	0.8	234.5	12.2	1.6	0.3	6.2
3	1000	4.2	1.4	348.1	12.8	5.1	2.0	2.3
		2.3	0.6	223.4	7.0	2.1	0.4	1.8
		2.5	0.7	185.3	6.6	2.3	0.4	1.7
	833	2.8	0.4	275.0	4.9	1.6	0.3	3.0
		4.6	1.7	495.7	12.4	3.9	1.1	1.8
		3.3	0.6	394.4	8.6	2.5	0.7	2.4
	694	3.4	0.5	265.6	4.9	1.2	0.3	3.9
		4.3	0.9	324.8	6.6	1.9	0.5	3.0
		4.4	0.9	373.1	9.2	3.0	0.8	4.6
感作性評価								
陽性 基準値	1.5	P	N	P	P	P	N	P
	2.0	P	N	P	P	N	N	P
	2.5	P	N	P	P	N	N	P

(B) K₂SO₃

test	conc. μg/mL	IL1B	CD86	HMOX1	TNFRSF12A	TREM1	CXCL14	CD54
1	1051	139.1	0.4	89.9	12.6	16.3	0.2	10.8
		146.0	0.5	190.0	24.2	1.8	0.3	9.6
		186.1	0.6	170.1	10.8	5.1	0.4	8.6
2	846	105.4	0.7	97.0	2.5	4.4	0.1	8.4
		63.6	0.5	97.7	7.6	ND	0.2	7.1
		ND	0.3	14.5	ND	ND	0.0	ND
3	1051	380.0	0.9	324.0	652.6	ND	1.0	14.4
		249.0	1.3	401.7	608.9	ND	0.8	19.6
感作性評価								
陽性 基準値	1.5	P	N	P	P	判定不可	N	P
	2.0	P	N	P	P	判定不可	N	P
	2.5	P	N	P	P	判定不可	N	P

test : Real-time RT-PCR アッセイ, conc. : 試験濃度

P : 感作陽性, N : 感作陰性, ND : non-detection, 不検出

食物アレルギー様症状を誘発する化学物質として、食品添加物の Na_2SO_3 (A) および K_2SO_3 (B) を用いた Real-time RT-PCR アッセイ ($n=3$)、および倍数変化 1.5, 2.0, 2.5 とした陽性基準値における感作性評価を示した。各濃度は、細胞生存率が 65~85%を得られた濃度である。1 試験において陽性基準値以上が 2 つ以上で試験陽性とし、3 試験のうち、少なくとも 2 試験以上が陽性の場合、陽性基準において感作陽性 (P) と評価した。

第3章 短い曝露時間における感作性評価法の検討

第1章の検討により、遺伝子発現をマーカーとした Real-time RT-PCR アッセイによる感作性評価の有用性が示された。Hooyberghs ら (2008) は、RT-PCR 法を用いて、DC の化学物質への曝露時間を 6 または 11 時間にした遺伝子の発現量を検討している。つまり、遺伝子発現は 24 時間より短い反応時間でも RT-PCR で検出可能な発現量が得られる。そこで本章は、より実施し易い試験法へと改良するために、曝露時間を短くした感作性評価法の構築を目的とした。第1章で構築した細胞暴露 24 時間で行った Real-time RT-PCR アッセイを基に、2つの項目について検討を行った。第1に、第1章により選んだ7遺伝子について曝露3~36時間における遺伝子発現量の経時観察を行い、本マーカー候補が化学物質への短い曝露時間でも検出可能な遺伝子発現量を示すかを検討した。第2に、短い曝露時間の検討として、化学物質への曝露時間を3または6時間とした場合における、本試験法による感作性評価の有用性を検討した。

試料と方法

試料

表6および表9に、各検証に用いた被験物質の略称、CAS No., murine LLNA による皮膚感作性分類、h-CLAT による感作性評価、試験濃度、溶媒をそれぞれ示した。なお、表中の太字で示した物質は、h-CLAT の『習熟度確認の立証に推奨される物質』である (OECD, 2018)。

化学物質曝露による遺伝子発現量の経時観察には、標準的な感作性物質 NiSO₄, DNCB, および非感作性物質 SDS を用いた (表6)。曝露3および6時間の検討に用いた被験物質 (表9) のうち、p-Benzoquinone (pBQ), Butyl glycidyl ether (BGE), Cinnamic alcohol (CAOH), Chlorobenzene (CB) は Merck-Sigma-Aldrich から購入した。Methyl pyruvate (MP), 1-Naphthol (NAP), は FUJIFILM-Wako から購入した。

被験物質の調製および試験条件

本章の使用細胞および試験方法は、基本的には第1章に記載した方法に準拠した。

各目的別の試験条件を箇条書きで以下に示す。

- ・細胞生存率の経時観察：NiSO₄のみで曝露試験（n = 1）を1回実施。曝露時間 3, 6, 9, 12, 24, 36 時間。
- ・遺伝子発現量の経時観察：NiSO₄, DNCB, および SDS で曝露試験（n = 3）をそれぞれ3回実施。曝露時間 3, 6, 24 時間。
- ・短い曝露時間の検討：被験物質 12 種で曝露試験（n = 3）をそれぞれ3回実施。曝露時間 3, 6, 24 時間。

以降に曝露試験の詳細を示す。

まず、被験物質をそれぞれ24時間で曝露し、CV75を算出して以降の検討のための試験濃度に用いた。なお、CV75の算出は、細胞の継代使用期間毎に行った。

細胞生存率の経時観察は、NiSO₄のみで曝露試験を行った。曝露24時間におけるCV75（250 µg/mL）を用いて、3, 6, 9, 12, 24, 36時間曝露後に細胞を回収し、細胞生存率を測定した（図4）。遺伝子発現量の経時観察では、NiSO₄, DNCB, および SDS それぞれの曝露24時間におけるCV75（NiSO₄は、129, 136, 120 µg/mL, DNCBは、3.4 µg/mL, SDSは、54, 40, 35 µg/mL）を、それぞれTHP-1細胞に暴露した。3, 6, 9, 12, 24, 36時間曝露後に細胞を回収し、細胞生存率の測定は行わずにReal-time RT-PCRに用いた。短い曝露時間の検討では、表9に示す12種の被験物質について、それぞれ曝露24時間におけるCV75を用いて、3, 6, 24時間で曝露を行った。曝露後の細胞を回収し、細胞生存率の測定は行わずにReal-time RT-PCRに用いた。

Real-time RT-PCR アッセイおよび感作性評価

Real-time RT-PCR アッセイおよび感作性評価は、基本的には第1章の『Real-time RT-PCR アッセイ』および『マーカー候補遺伝子を用いた感作性物質と非感作性物質の評価』に準拠した。また、第1章による曝露24時間条件における陽性基準値の検討では、*TNFRSF12A* と *TREMI* に適した陽性基準値は、倍数変化1.5~2.5の範囲にあった。この結果を踏まえ、本章では、相対値1.5, 2.0, および2.5の3点を感作性評価の陽性基準値とした。

遺伝子発現量の経時観察および短い曝露時間の検討では、各曝露時間による試験を行った細胞を用いてReal-time RT-PCR アッセイを行い、各相対遺伝子発現量を算出した。遺伝子発現量の経時観察は、マーカー候補遺伝子別に経時変化を観察し、

短い曝露時間の検討では、被験物質に対する評価結果を既存の感作性評価と比較し総合的に検討した。ただし、Real-time RT-PCR が不検出 (ND) のサンプルについては、感作性評価の検討から除外した。

結果

遺伝子発現量の経時観察

曝露 3・6・9・12・24・36 時間における細胞生存率および遺伝子発現量の経過観察を行い、曝露時間を短くした場合の感作性評価試験の有用性を検討した。

経時観察のために使用した化学物質と試験濃度を表 6 に示した。また、NiSO₄ について 3, 6, 9, 12, 24, 36 時間における細胞生存率を図 4 に示した。24 時間後の CV75 濃度で NiSO₄ を THP-1 細胞に曝露して、細胞生存率を経時測定した結果、24 時間より短い曝露時間では、細胞生存率はほぼ下がらないことが示された。また、細胞生存率に変化が生じたのは曝露 12 時間以降からで、36 時間後には生存率が 50% に下がった。この結果から、曝露 24 時間後における CV75 濃度を用いた場合、24 時間より短い曝露時間では、細胞生存率は化学物質に影響されないと判断した。そのため、本検証において、24 時間より短い曝露時間の検討では、細胞生存率を測定しないことに決めた。

次に、DNCB に対する 7 遺伝子の遺伝子発現量を経時観察した曝露時間の検討について、結果を図 5~図 6 に示した。各遺伝子の発現量が高くなった時間に着目すると、*TREMI*、および *TNFRSF12A* (図 5) は、3 回の試験で曝露 3, 6 および 9 時間における発現誘導が観察された。また、曝露 36 時間までの間、おおよそ 10 以上の発現量を示した。さらに、*HMOX1* および *CD86* では、曝露 3~6 時間条件から発現誘導が高くなった (図 6)。*CD54* および *IL1B*、*CXCL14* は、曝露 3~9 時間条件では高い発現が得られなかった (データは示さず)。NiSO₄ および SDS の遺伝子発現レベルの結果は、表 7 および表 8 に示した。NiSO₄ に対しては、*CD54*、*HMOX1*、*TREMI*、*IL1B* および *TNFRSF12A* が曝露 3~6 時間から発現量が上がった。非感作性物質 SDS に対しては、発現量の増加は曝露時間に依存していないと判断した。これらの結果から、感作性物質 DNCB および NiSO₄ に対して曝露 3~9 時間条件で、*TREMI*、*TNFRSF12A*、および *HMOX1* の 3 遺伝子の発現量が高くなることが示された。これらの結果を考慮して、本研究により選んだ遺伝子は、曝露時間を短く

しても高い発現量を検出できる可能性を有した。また、各遺伝子発現量は、NiSO₄ および DNCB に対して曝露時間に依存した発現量の増加を示した。

曝露 3, 6, 24 時間で行った本試験結果について相対値の検討

曝露 3 および 6 時間の検討では、第 1 章に使用した、h-CLAT における『習熟度評価用物質に含まれる物質』以外でも適用可能であるかを検証するために、6 物質 NiSO₄, DNCB, PPDA, ABA, IPN, SDS に加え、既に感作性評価の報告が有る 6 物質を検証した (表 9) (Nukada ら. 2013, Takenouchi ら. 2015)。

本検証での被験物質に対する相対遺伝子発現量の結果を表 10 に示した。太字で示した相対値は、陽性基準値 1.5 以上のものである。陽性基準値 1.5 以上を示す遺伝子発現量の割合を $RQ \geq 1.5$ (%) とし、感作性物質および非感作性物質別に算出した。

本検証の曝露 24 時間条件の結果では、*TREMI* および *TNFRSF12A* は、h-CLAT における『習熟度評価用物質に含まれる物質』である PPDA の相対値が陽性基準値 1.5 を下回り、SDS に対しては陽性基準値 1.5 以上を示すなど、第 1 章の相対値とは異なる傾向を示した。また、本検証における感作性物質 8 種に対し、陽性基準値 1.5 以上を示す相対値の割合は、*TREMI* は 67%、*TNFRSF12A* は 71%であった。一方、曝露 24 時間条件において、*HMOX1* は 92%、*CD54* は 82%、*IL1B* は 78%の相対値が陽性基準値 1.5 以上を示した。これらの結果は、曝露 24 時間条件におけるマーカー遺伝子の検討をさらに重ねる必要があることを示した。

曝露時間を短くした場合に、評価可能な相対遺伝子発現量が得られるかを検討した。曝露 3 および 6 時間条件で検証した結果、*HMOX1* の相対値が、既知感作性物質 8 種に対して 65%および 85%の割合で陽性基準値 1.5 以上を示した。また、非感作性物質 4 物質に対しては、陽性基準値 1.5 以上の相対値が曝露 3 時間条件で 35%に留まった。そして、第 1 章にて感作性評価能力の高かった *TREMI* および *TNFRSF12A* は、曝露 3 および 6 時間条件での陽性基準値 1.5 以上の相対値の割合は 45%以下であった。これらの結果は、曝露時間を 3 および 6 時間に短くしても、遺伝子発現を指標とした感作性評価が行える可能性を示唆しており、そのためには、条件に適したマーカー遺伝子を検討する必要があることも示唆している。

曝露 3, 6, 24 時間での本試験法の感作性評価能の検討

相対値 1.5, および 2.0, 2.5 の 3 点を感作性の陽性基準値として, 各マーカー候補遺伝子の感作性評価能力を曝露時間および陽性基準値別に検討した (表 11)。既知の感作性物質と非感作性物質に対し, 陽性基準により正しく判別した割合を正確度とした。

第 1 章にて高い感作性評価能力が示された *TREMI* および *TNFRSF12A* は, 本検証の 12 物質に対する感作性評価の結果, 曝露 24 時間条件では, 陽性基準値 1.5 の場合で正確度 50%および 73%, 陽性基準値 2.0 以上で正確度 64%となり, 第 1 章の結果よりも評価能力が下がった。一方, *IL1B* が陽性基準値 2.0 で正確度 82%, *HMOX1* が陽性基準値 2.5 で正確度 83%と高い評価能力を示した。曝露時間を短くした曝露 6 時間条件の場合, *HMOX1* がすべての陽性基準値で 75%の正確度を示し, 陽性基準値 1.5 の場合では, *TNFRSF12A* が 64%の正確度を示した。また, *HMOX1* は陽性基準値を 1.5 とした場合, 検討した曝露時間のうち最短の曝露 3 時間条件での正確度が 75%であった。一方, *TREMI* を含む他の遺伝子は, 曝露 3, 6 時間では正確度は 50%以下であった。これらの結果から, 曝露時間を 3 および 6 時間に短くした場合は, 曝露 24 時間の場合とは異なり, *HMOX1* が感作性評価のためのマーカー遺伝子となり得ることが示唆された。また, 曝露時間によって, 感作性評価に有用なマーカー遺伝子は異なることが示された。

考察

本感作性評価法の評価対象は, 遺伝子発現量である。遺伝子発現とタンパク質発現には関連性はあるが, それらが発現するタイミングは異なる。Hooyberghs ら (2008) の研究では, DC cell を用いた化学物質曝露 6, 11, 24 時間での遺伝子発現による感作性評価の研究において, 曝露時間に対する遺伝子発現は, 遺伝子依存的な反応を示すことを示唆した。この傾向は, 本検証における遺伝子発現量の経時観察 (図 5~図 6) からも認められ, 化学物質曝露により発現が促される時間は, 遺伝子に依り異なることが示された。そのため, 遺伝子発現を用いた試験法では, 曝露時間条件に適したマーカー遺伝子の検討を行う必要がある。

第 1 章における曝露 24 時間での検討で高い感作性評価能力を示した *TREMI* および *TNFRSF12A* は, 本章における曝露 24 時間条件での正確度は, *TREMI* で 64%

(陽性基準値 2.0) や *TNFRSF12A* で 73% (陽性基準値 1.5) となり、感作性評価能力が第 1 章よりも下がった。さらに、h-CLAT における『習熟度評価用物質に含まれる物質』の中の 6 物質 (NiSO_4 , DNCB, PPDA, ABA, IPN, SDS) のうち、PPDA および SDS の評価結果が第 1 章とは異なった。この原因が試験条件にあるのか、或いは被験物質に依るものなのかは現時点では不明であるが、再現性の検証も含めさらに十分な検討が必要である。

本検証の 3~6 時間の曝露条件では、*HMOXI* が感作性評価のマーカー遺伝子となることが期待できる結果が得られた。*HMOXI* は、非感作性物質に比べて感作性物質に対する応答性が高く、曝露 24 時間よりも曝露 3, 6 時間の方がその傾向が見られた (表 10)。そのため、*HMOXI* は感作性物質に応答しやすい遺伝子であり、且つ、短い曝露時間では非感作性物質に対する発現誘導が遅いことが考えられ、*HMOXI* は、曝露時間が短い条件での感作性評価マーカーに向いている可能性がある。本章の結果では、マーカー候補遺伝子のほとんどが曝露 3 時間での遺伝子発現量は低かったが、*HMOXI* のように、条件に適したマーカーを設定することにより、曝露時間を短くした本試験法による感作性評価が行える可能性がある。しかしながら、本検証は、非感作性物質には 4 物質のみを用いた結果であり、そのうち 2 物質に *HMOXI* が、1 物質に *TNFRSF12A* が陽性基準値以上の発現増加を示した。第 1 章と本検証による *TREMI* および *TNFRSF12A* の評価能力が変動したことも踏まえ、さらに物質数を増やし、マーカー遺伝子および試験条件を検討する必要がある。

表 6 化学物質曝露による遺伝子発現量の経時観察に使用した化学物質

Chemical	Abbreviation	CAS No.	LLNA	Solvent	Conc. (µg/mL)	
			Potency category		Assay	CV test
2,4-Dinitrochlorobenzene	DNCB	97-00-7	Extreme	DMSO	3.5-3.8	
Nickel sulfate	NiSO ₄	10101-97-0	Moderate	Saline	120-136	250
Sodium dodecyl sulfate	SDS	151-21-3	False positive	Saline	40-54	

CAS No : Chemical Abstracts Service Registry Number

Conc. : 試験濃度

Assay : 遺伝子発現量の経時観察試験

CV test : 細胞生存率の経時観察試験

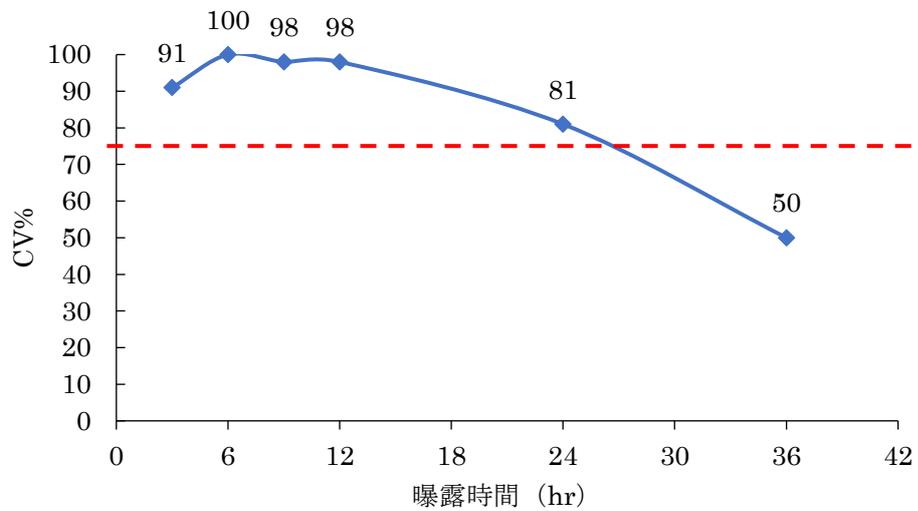


図 4 NiSO₄ 曝露における細胞生存率の経時変化

NiSO₄ (250 μg/mL) への細胞曝露時間における細胞生存率の経時観察結果を示した。THP-1 細胞に 250 μg/mL の NiSO₄ を曝露し、3、6、9、12、24、36 時間後に細胞を回収して細胞生存率の測定を行った (n=1)。X 軸は化学物質への曝露時間 (hr) を示し、Y 軸は細胞生存率 (CV%) を示す。生存率曲線上の数値は、各曝露時間における細胞生存率 (%) を示す。破線は、CV75%を示す。

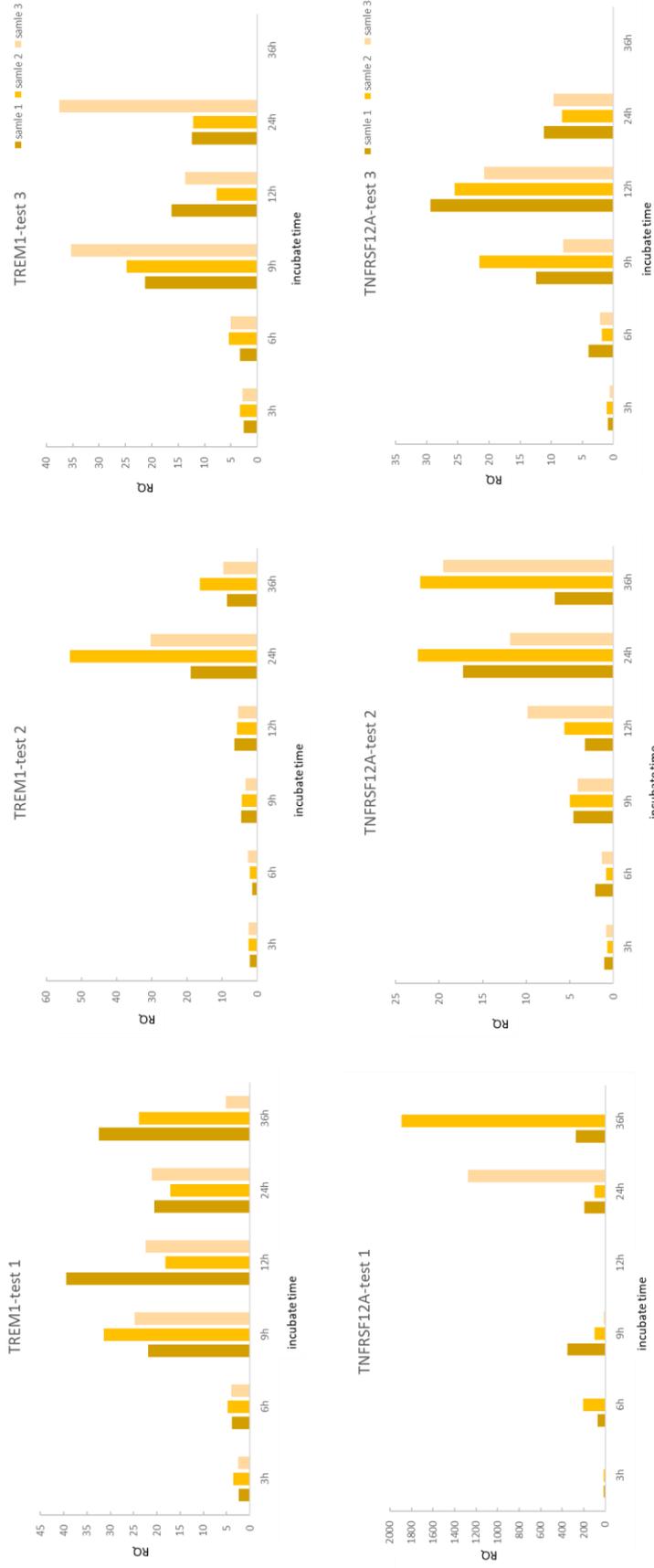


図 5 DNCB に対する *TREM1* および *TNFRSF12A* 遺伝子発現の経時観察

曝露 24 時間における CV75 を用いて、曝露時間を 3, 6, 9, 12, 24, 36 時間で本試験を行った。1 試験につき $n = 3$ で行い、本試験を 3 回実施した。X 軸は化学物質への曝露時間を示し、Y 軸は相対値 (RQ) を示す。



図 6 DNCB に対する *HMOX* および *CD86* 遺伝子発現の経時観察

曝露 24 時間における CV75 を用いて、曝露時間を 3, 6, 9, 12, 24, 36 時間で本試験を行った。1 試験につき $n = 3$ で行い、本試験を 3 回実施した。X 軸は化学物質への曝露時間を示し、Y 軸は相対値 (RQ) を示す。

表 7 NiSO₄ に対する各遺伝子発現の経時観察

Gene	Incubation time	Assay 1			Assay 2			Assay 3		
IL1B	3h	14.3	13.5	12.4	22.5	20.7	21.9	5.9	2.0	4.3
	6h	0.0	16.0	14.0	37.5	32.7	56.5	0.2	0.5	0.1
	9h	0.0	13.5	12.6	11.5	33.1	7.8	5.7	6.3	5.3
	12h	66.7	14.9	11.5	50.2	44.9	53.1	4.8	4.3	4.2
	24h	95.7	11.6	13.6	15.5	25.1	17.4	4.0	7.8	5.0
	36h	54.2	11.6	10.6	24.1	33.8	25.6	NT	NT	NT
CD86	3h	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	3.8	1.4	2.5
	6h	0.8	1.4	1.1	0.9	1.1	7.0	0.5	1.4	0.4
	9h	1.1	1.3	1.4	0.6	2.4	0.5	0.5	1.5	1.3
	12h	0.7	1.1	1.0	0.9	0.8	2.4	2.0	2.0	1.0
	24h	0.8	0.9	1.0	0.2	0.3	0.2	0.8	1.1	0.8
	36h	0.9	1.3	1.2	2.1	2.3	3.1	NT	NT	NT
HOMX1	3h	3.5	3.9	3.2	2.4	2.5	2.5	0.9	0.6	1.0
	6h	12.0	15.3	13.8	12.3	14.5	50.6	1.1	2.3	0.7
	9h	35.8	44.0	39.9	55.7	304.4	58.5	4.9	7.2	8.8
	12h	54.2	68.6	52.7	35.8	28.6	84.4	20.1	15.9	16.7
	24h	32.4	34.1	43.7	11.1	16.1	10.9	13.1	20.0	21.0
	36h	28.6	32.9	28.4	30.9	30.5	36.8	NT	NT	NT
TNFRSF12A	3h	7.3	6.7	6.2	8.1	5.6	9.8	1.7	0.7	1.0
	6h	3.3	5.2	5.1	7.2	6.5	22.3	0.4	0.9	0.2
	9h	6.1	5.3	5.5	1.7	8.7	2.1	1.8	2.7	1.6
	12h	5.0	5.9	4.5	4.6	3.5	9.8	1.8	1.7	3.2
	24h	5.2	5.2	5.7	2.4	4.7	1.8	3.6	1.8	4.2
	36h	4.4	4.5	4.5	3.3	3.2	3.5	NT	NT	NT
TREM1	3h	4.9	10.9	9.2	1.7	2.3	2.2	1.6	0.6	0.9
	6h	0.5	14.1	11.7	2.4	4.0	22.9	0.5	0.6	0.4
	9h	13.7	14.5	11.6	0.4	4.0	1.0	1.6	2.4	1.7
	12h	14.0	12.5	11.1	11.7	11.3	43.9	1.2	1.2	0.7
	24h	25.1	20.0	20.7	9.7	14.0	7.9	5.2	4.1	1.0
	36h	32.0	21.7	19.7	18.2	21.2	28.3	NT	NT	NT
CXCL14	3h	1.3	1.6	1.1	0.4	0.3	0.6	0.8	0.5	0.9
	6h	0.9	1.9	1.3	0.5	0.6	8.3	1.2	2.4	0.9
	9h	1.5	2.3	1.7	4.5	25.9	4.6	1.1	0.7	0.6
	12h	1.3	1.9	1.3	1.2	0.9	6.2	1.1	1.0	0.9
	24h	4.9	6.9	5.8	2.1	3.3	1.9	3.6	1.8	4.2
	36h	7.8	10.1	7.9	5.1	6.4	7.7	NT	NT	NT
CD54	3h	10.9	10.3	11.3	14.7	16.8	17.0	4.2	2.6	4.2
	6h	24.8	23.9	29.7	29.0	40.7	38.5	3.3	5.6	2.5
	9h	38.9	33.6	39.1	0.5	1.1	0.4	3.7	6.5	6.9
	12h	41.6	44.9	37.3	42.4	39.3	54.1	8.1	11.7	7.2
	24h	16.6	14.5	18.3	28.1	36.6	25.0	2.0	2.8	3.2
	36h	14.4	12.1	15.6	15.6	14.5	16.7	NT	NT	NT

Bold : 遺伝子発現量 \geq 1.5, NT : No test

表 8 SDS に対する各遺伝子発現の経時観察

Gene	Incubation time	Assay 1			Assay 2			Assay 3		
IL1B	3h	1.1	-	1.3	1.9	0.9	2.7	2.8	1.2	2.0
	6h	1.7	1.5	1.7	1.5	1.3	1.0	2.2	0.9	1.8
	9h	1.1	1.2	1.4	1.3	1.7	ND	0.8	1.1	1.9
	12h	1.0	0.9	1.1	14.6	4.1	3.8	2.5	1.3	1.3
	24h	1.3	1.4	1.3	1.4	0.8	0.9	1.5	0.9	2.0
	36h	1.7	1.9	1.4	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CD86	3h	0.7	0.7	0.7	0.9	0.4	1.7	0.9	0.5	0.6
	6h	1.0	0.8	1.0	0.6	0.4	0.5	0.4	0.3	0.9
	9h	1.0	1.0	1.3	0.9	1.0	ND	0.9	0.9	0.6
	12h	1.3	1.1	1.1	7.0	2.6	2.6	1.4	0.8	1.1
	24h	0.7	0.8	0.8	0.8	0.7	0.5	0.7	0.5	0.6
	36h	1.0	1.7	1.1	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HOMX1	3h	8.1	5.9	8.2	12.1	6.8	14.1	17.4	9.3	13.9
	6h	12.9	15.4	15.5	14.8	16.0	14.2	23.6	14.1	25.6
	9h	8.4	8.5	11.8	7.5	8.3	ND	18.0	16.9	11.0
	12h	5.7	6.3	6.2	413.0	237.2	270.6	5.2	4.5	4.8
	24h	3.7	3.2	3.2	3.6	2.6	2.1	5.6	4.7	5.7
	36h	4.8	5.3	4.4	-	-	-	-	-	-
TNFRSF12A	3h	17.4	-	17.3	17.1	11.0	12.6	10.5	17.8	8.8
	6h	6.6	6.8	6.8	5.4	5.0	4.7	10.4	3.0	10.3
	9h	3.4	1.7	3.6	3.9	2.7	ND	2.8	4.3	5.4
	12h	3.1	3.0	3.2	8.6	7.1	5.8	2.1	2.9	1.8
	24h	1.2	1.1	1.1	2.4	1.5	1.2	2.8	1.5	2.3
	36h	1.4	1.8	1.6	NT	NT	NT	NT	NT	NT
TREM1	3h	9.9	8.0	12.8	8.5	5.0	11.6	13.3	7.7	6.8
	6h	9.4	11.6	13.9	6.8	6.1	6.7	10.1	2.7	12.4
	9h	6.2	6.5	9.7	4.1	5.7	ND	3.4	8.0	7.8
	12h	6.0	5.4	6.8	49.5	38.1	30.7	8.9	6.4	1.1
	24h	2.2	2.6	2.6	0.8	1.1	0.9	1.2	1.0	2.0
	36h	3.3	3.5	4.0	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CXCL14	3h	0.9	-	1.0	0.9	0.2	1.5	1.5	0.4	0.4
	6h	1.5	1.6	1.6	0.6	0.5	0.5	0.7	0.2	1.2
	9h	1.3	1.5	1.7	0.6	0.9	ND	0.6	0.7	1.0
	12h	1.6	1.3	1.5	1.0	0.4	0.3	0.7	0.5	0.4
	24h	0.4	0.5	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.2
	36h	0.3	0.4	0.4	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CD54	3h	2.3	1.9	2.0	3.8	3.2	3.9	2.9	2.8	2.8
	6h	2.0	2.2	1.9	1.8	2.4	2.2	2.5	1.4	2.3
	9h	1.0	1.0	1.2	0.7	1.0	ND	1.6	1.5	1.2
	12h	0.8	0.9	0.9	24.1	21.6	22.2	1.3	1.7	2.0
	24h	1.4	1.6	1.8	2.3	2.1	2.0	2.5	2.0	4.2
	36h	2.4	2.6	2.6	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Bold : 遺伝子発現量 \geq 1.5, ND : non-detection, NT : No test

表 9 曝露 3, 6 時間の検討に用いた化学物質と試験濃度

Chemicals*	Abbreviations	CAS No.	RT-PCR		LLNA	h-CLAT
			Solvent	CV75 ($\mu\text{g/ml}$)	Potency category	Judgment
p-Benzoquinone	pBQ	106-51-4	DMSO	2.6	Extreme	P
2,4-Dinitrochlorobenzene	DNCB	97-00-7	DMSO	3.5-3.8	Extreme	P
1,4-Phenyldiamine	PPDA	106-50-3	Saline	230.0	Strong	P
Methyl pyruvate	MP	600-22-6	DMSO	1200.0	Moderate	N
1-Naphthol	NAP	90-15-3	DMSO	49	Moderate	P
Nickel sulfate	NiSO₄	10101-97-0	Saline	120-204	Moderate	P
Butyl glycidyl ether	BGE	2426-08-6	DMSO	135	Weak	N
Cinnamic alcohol	CAOH	104-54-1	DMSO	120	Weak	P
4-Aminobenzoic acid	ABA	150-13-0	DMSO	1250.0	non-sensitizer	N
Chlorobenzene	CB	108-90-7	medium	465.0	non-sensitizer	P
Isopropanol	IPN	67-63-0	Saline	5000	non-sensitizer	N
Sodium dodecyl sulfate	SDS	151-21-3	Saline	40-54	False positive	N

* Bold : h-CLAT における習熟度評価用物質

CAS No. : Chemical Abstracts Service Registry Number

conc. : test concentration

medium : medium for cell culture

表 10 曝露 3, 6, 24 時間における相対遺伝子発現量 (感作性物質)

Abbreviation of substance	category of LLNA	Assay	IL1B			CD86			HMOX1			TNFRSF12A			
			time	3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h
pBQ	Extreme	Assay 1	0.5	ND	1.2	0.7	ND	0.9	3.2	0.1	1.0	0.9	10.3	0.6	
			0.3	0.6	1.0	0.8	0.7	1.2	2.0	2.1	1.1	0.7	0.7	0.8	
			0.5	0.9	0.8	0.9	0.8	1.1	1.7	1.4	1.1	0.8	1.2	0.5	
		Assay 2	0.4	0.2	0.3	0.5	0.4	0.3	46.7	0.1	68.6	1.0	2.6	1.7	
			0.4	0.4	1.8	0.6	0.6	2.5	165.0	0.1	5.0	1.0	4.1	0.0	
			0.4	0.2	3.4	0.8	0.5	3.9	233.4	0.0	6.9	1.1	3.3	0.0	
	Assay 3	1.0	1.1	0.9	1.0	1.2	0.7	1.1	8.1	0.9	0.7	0.6	0.7		
		0.9	2.6	1.3	1.0	1.9	0.9	1.4	8.5	1.1	0.7	0.7	0.8		
		0.6	1.7	1.1	1.4	1.2	0.7	1.1	10.9	1.1	0.6	0.8	0.7		
	DNCB	Extreme	Assay 1	7.5	26.8	20834.2	1.0	1.7	2.9	439.6	2304.1	2778.3	14.2	69.4	193.6
				1.9	381.8	1173.6	2.7	2.0	4.0	288.0	2452.4	2402.0	18.5	206.0	100.9
				4.4	3.0	8060.6	1.3	1.0	3.6	302.3	2435.5	6608.0	2.1	0.6	1275.3
Assay 2			1.3	4.4	73.7	0.6	1.1	9.0	16.0	141.0	127.1	1.1	2.1	17.3	
			1.3	3.2	90.7	1.1	1.5	11.9	14.1	152.2	182.3	0.7	0.9	22.5	
			1.3	3.5	80.1	0.8	1.1	29.2	12.8	165.4	147.0	0.8	1.3	11.9	
Assay 3		0.6	2.6	42.9	0.3	0.5	0.8	12.0	86.0	118.3	1.0	4.0	11.2		
		0.5	2.8	69.7	0.5	0.9	0.9	9.1	57.9	283.4	1.1	1.8	8.3		
		0.7	5.2	35.6	0.4	0.9	4.7	9.6	64.3	297.5	0.6	2.2	9.6		
PPDA		Strong	Assay 1	0.5	1.1	2.2	0.9	2.8	1.1	0.9	3.3	5.5	0.3	0.6	0.8
				0.0	0.7	0.5	8.3	7.1	0.4	0.2	4.7	4.8	0.0	0.3	1.0
				ND	0.2	0.9	12.0	15.5	0.6	0.2	3.5	4.8	ND	ND	1.1
	Assay 2		0.3	0.8	1.5	0.8	0.4	0.1	0.5	7.9	142.4	0.8	0.9	1.1	
			0.7	0.2	1.0	0.7	0.4	0.1	1.6	6.0	221.8	1.0	0.9	1.1	
			1.0	0.6	1.7	1.0	0.4	0.2	2.2	7.4	15.0	1.0	0.9	0.5	
	Assay 3	1.3	1.1	1.1	1.8	1.3	1.5	1.4	4.9	7.3	0.4	0.2	0.5		
		0.7	0.8	0.2	0.9	1.1	0.9	1.0	4.5	5.3	0.6	0.4	0.3		
		1.1	0.2	0.1	1.4	0.5	1.2	1.3	3.2	4.8	0.4	0.1	0.2		
	MP	Moderate	Assay 1	0.9	0.6	5.0	2.1	0.7	3.2	1.2	2.6	14.1	1.1	1.3	1.9
				0.6	0.5	6.9	1.8	0.7	4.5	1.3	4.4	19.8	1.3	2.5	2.2
				0.9	0.9	4.8	1.7	0.8	2.3	1.5	6.3	18.5	1.4	3.1	2.7
Assay 2			0.1	0.5	1.6	1.0	0.6	0.8	0.5	4.2	20.6	0.6	2.4	1.8	
			0.2	0.2	2.5	0.5	0.2	1.5	0.2	0.8	24.2	0.4	1.0	1.9	
			0.1	0.3	2.3	0.5	0.4	1.1	0.3	4.2	21.2	0.2	2.3	2.2	
Assay 3		0.7	0.3	2.3	0.9	1.1	1.5	0.7	1.3	10.2	0.3	1.3	2.5		
		0.6	0.5	1.6	0.7	0.5	1.0	0.6	1.7	12.0	0.2	1.2	3.2		
		0.5	0.6	2.6	0.7	0.6	0.8	0.5	1.2	15.0	0.1	1.4	1.6		
NAP		Moderate	Assay 1	0.7	0.8	65.2	1.1	1.2	10.3	3.9	25.4	25.2	0.4	1.6	5.0
				0.7	1.0	101.6	0.7	2.3	15.9	2.4	23.9	32.6	0.3	2.4	11.2
				1.5	1.3	69.4	1.5	3.5	15.1	10.5	28.8	32.1	0.6	2.6	9.6
	Assay 2		2.6	0.8	65.2	7.1	1.2	10.3	5.6	25.4	25.2	1.5	1.6	5.0	
			3.6	1.0	101.6	11.1	2.3	15.9	5.1	23.9	32.6	2.2	2.4	11.2	
			2.3	1.3	69.4	5.6	3.5	15.1	6.1	28.8	32.1	1.3	2.6	9.6	
	Assay 3	1.4	1.9	39.8	0.3	1.3	19.1	2.8	1.7	45.8	0.3	0.4	4.4		
		0.9	0.8	30.3	0.5	0.4	16.1	2.1	0.9	34.0	0.6	0.3	4.8		
		0.7	3.9	18.0	0.3	2.8	6.7	0.9	3.4	39.3	0.4	0.4	5.0		
	NiSO ₄	Moderate	Assay 1	14.3	10.3	12.0	0.9	0.8	0.8	3.5	12.0	32.4	7.3	3.3	5.2
				13.5	16.0	11.6	0.9	1.4	0.9	3.9	15.3	34.1	6.7	5.2	5.2
				12.4	14.0	13.6	0.8	1.1	1.0	3.2	13.8	43.7	6.2	5.1	5.7
Assay 2			22.5	37.5	15.5	0.8	0.9	0.2	2.4	12.3	11.1	8.1	7.2	2.4	
			20.7	32.7	25.1	0.8	1.1	0.3	2.5	14.5	16.1	5.6	6.5	4.7	
			21.9	56.5	17.4	0.8	7.0	0.2	2.5	50.6	10.9	9.8	22.3	1.8	
Assay 3		5.9	0.2	4.0	3.8	0.5	0.8	0.9	1.1	13.1	1.7	0.4	3.6		
		2.0	0.5	7.8	1.4	1.4	1.1	0.6	2.3	20.0	0.7	0.9	1.8		
		4.3	0.1	5.0	2.5	0.4	0.8	1.0	0.7	21.0	1.0	0.2	4.2		
BGE		Weak	Assay 1	0.8	0.4	7.9	0.8	0.3	3.9	2.0	3.8	72.7	0.8	0.7	1.6
				2.6	1.1	7.5	1.9	1.1	1.4	3.7	3.1	123.9	1.2	0.5	4.5
				3.1	1.6	3.8	8.5	1.4	3.6	5.3	3.9	98.6	1.0	0.7	0.0
	Assay 2		0.7	0.4	17.4	0.5	0.1	8.9	2.9	9.3	767.1	1.5	1.2	1.9	
			1.9	0.5	16.3	1.7	0.3	3.2	4.2	8.7	1308.2	1.5	1.1	5.4	
			0.6	1.4	8.3	0.6	2.1	8.2	3.2	18.8	1040.7	2.0	1.6	0.0	
	Assay 3	0.4	0.0	1.1	1.0	3.8	4.7	1.3	2.4	222.3	0.5	0.0	1.0		
		1.0	0.1	3.2	1.3	1.0	3.7	1.0	3.5	217.8	0.3	0.4	3.5		
		0.8	0.5	1.4	1.3	1.5	5.6	1.1	5.8	323.3	0.4	0.1	0.5		
	CAOH	Weak	Assay 1	0.3	0.2	32.9	1.0	0.5	21.1	27.3	53.4	430.5	0.7	0.5	2.6
				0.5	0.3	24.8	1.3	0.6	15.8	55.3	73.0	335.5	2.9	0.6	3.8
				0.5	0.1	155.4	1.1	0.3	97.0	43.4	30.1	648.1	1.9	0.4	5.2
Assay 2			1.7	0.9	22.0	1.3	0.9	11.7	17.7	1293.1	298.9	0.3	2.7	6.2	
			1.0	0.6	20.9	0.4	0.9	10.6	2.3	615.9	288.7	0.1	1.5	5.7	
			2.1	0.4	19.7	0.9	0.7	8.9	20.7	423.6	242.8	0.6	2.0	8.8	
Assay 3		0.9	0.8	14.6	0.8	1.0	11.7	254.8	955.4	446.8	0.8	1.2	8.0		
		1.0	1.0	22.0	1.4	0.9	17.5	338.6	948.8	492.3	0.9	1.7	12.7		
		0.7	0.9	17.8	0.7	1.0	10.5	88.2	1052.8	710.8	0.5	2.4	11.1		
Sensitizer		RQ ≥ 1.5	21	20	56	16	16	40	47	61	66	17	31	51	
		Total assay	71	72	72	72	72	72	72	72	72	71	71	72	
		RQ ≥ 1.5 (%)	30	28	78	22	22	56	65	85	92	24	44	71	

RQ : 遺伝子発現量, ND : non-detection, Bold : 遺伝子発現量 ≥ 1.5

以下に続く

表 10 曝露 3, 6, 24 時間における相対遺伝子発現 続き (感作性物質)

Abbreviation of substance	category of LLNA		TREM1			CXCL14			CD54		
			3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h
pBQ	Extreme	Assay 1	0.5	ND	1.3	0.5	ND	1.7	0.8	122.8	0.7
			0.6	0.3	0.6	0.3	0.4	1.7	0.8	1.1	0.6
			0.5	0.9	0.4	0.6	0.7	2.1	0.8	2.1	0.7
		Assay 2	1.3	0.5	1.1	0.4	0.8	0.4	0.8	0.5	1.0
			1.4	0.4	6.0	1.2	1.3	0.6	0.8	0.6	1.3
			1.4	0.9	9.4	1.1	0.6	0.7	0.8	0.6	1.5
		Assay 3	0.9	1.0	1.0	0.7	1.0	0.8	0.8	0.6	1.0
			0.6	1.2	1.3	0.6	3.5	1.1	0.9	0.5	0.9
			0.6	1.1	1.1	1.1	2.3	1.2	0.6	0.5	0.8
DNCB	Extreme	Assay 1	2.4	3.9	20.6	1.7	20.4	81.6	3.3	1.0	88.0
			3.6	4.8	17.1	1.4	20.1	88.0	1.3	0.6	58.1
			2.5	4.0	21.0	1.3	16.2	101.8	0.4	0.5	81.0
		Assay 2	2.1	1.4	19.0	1.2	4.3	47.5	0.7	1.1	131.0
			2.5	2.1	53.3	0.9	10.5	58.1	0.9	0.7	76.8
			2.5	2.6	30.4	0.6	4.0	49.5	1.2	0.7	66.4
		Assay 3	2.6	3.3	12.4	0.3	2.3	11.6	1.0	0.5	17.4
			3.2	5.4	12.1	0.3	4.4	18.1	1.4	0.7	12.7
			2.8	5.0	37.5	0.3	5.0	90.5	1.0	1.4	19.8
PPDA	Strong	Assay 1	0.2	3.2	1.0	0.6	4.4	0.9	0.6	0.2	2.3
			ND	0.5	0.2	0.5	11.2	0.5	ND	0.7	3.1
			ND	0.2	0.5	1.6	17.9	0.5	ND	0.7	3.2
		Assay 2	0.3	2.1	3.4	0.3	0.4	0.1	0.5	0.8	0.8
			0.0	1.0	1.2	0.7	0.2	0.0	1.1	1.4	0.8
			0.0	0.4	2.5	0.9	0.3	0.1	1.2	0.8	0.4
		Assay 3	1.6	0.8	0.0	3.0	1.1	1.2	0.2	0.4	1.5
			0.0	0.8	0.0	1.1	2.2	0.6	0.8	0.5	1.3
			0.0	0.0	ND	1.4	0.7	1.0	0.6	0.5	0.8
MP	Moderate	Assay 1	0.4	0.4	1.6	1.3	0.6	2.7	0.4	0.5	3.2
			0.5	0.5	1.1	1.9	0.6	5.0	0.4	0.5	3.9
			1.2	1.5	5.3	1.0	0.7	1.9	0.6	1.1	5.1
		Assay 2	0.0	0.5	0.6	0.7	0.4	0.8	0.9	0.9	3.2
			0.0	0.1	0.6	0.4	0.1	1.9	0.5	0.5	2.9
			ND	0.2	0.5	0.5	0.3	1.3	0.5	0.8	3.0
		Assay 3	0.5	0.3	2.3	0.8	1.0	1.7	1.0	0.6	2.8
			0.1	0.5	2.2	0.8	0.6	1.0	0.7	1.0	3.6
			0.4	0.5	0.9	0.6	0.8	1.2	0.9	0.7	2.4
NAP	Moderate	Assay 1	3.6	21.0	7.8	1.3	0.5	0.4	1.7	2.9	66.3
			63.4	27.9	7.5	2.2	0.7	0.6	1.9	4.1	80.4
			11.2	13.0	16.1	3.0	0.9	0.6	1.9	4.7	66.7
		Assay 2	7.2	21.0	7.8	1.3	0.5	0.4	3.2	2.9	66.3
			16.0	27.9	7.5	2.0	0.7	0.6	1.8	4.1	80.4
			5.3	13.0	16.1	1.2	0.9	0.6	2.6	4.7	66.7
		Assay 3	1.1	0.7	15.4	0.1	1.0	0.7	0.5	0.6	38.2
			0.7	0.5	19.6	0.3	0.3	0.6	0.8	0.7	33.1
			0.2	1.9	14.8	0.1	3.1	0.2	0.5	1.2	37.4
NISO ₄	Moderate	Assay 1	4.9	0.5	25.1	1.3	0.9	4.9	10.9	24.8	16.6
			10.9	14.1	20.0	1.6	1.9	6.9	10.3	23.9	14.5
			9.2	11.7	20.7	1.1	1.3	5.8	11.3	29.7	18.3
		Assay 2	1.7	2.4	9.7	0.4	0.5	2.1	14.7	29.0	28.1
			2.3	4.0	14.0	0.3	0.6	3.3	16.8	40.7	36.6
			2.2	22.9	7.9	0.6	8.3	1.9	17.0	38.5	25.0
		Assay 3	1.6	0.5	5.2	0.8	1.2	3.6	4.2	3.3	2.0
			0.6	0.6	4.1	0.5	2.4	1.8	2.6	5.6	2.8
			0.9	0.4	1.0	0.9	0.9	4.2	4.2	2.5	3.2
BGE	Weak	Assay 1	0.6	0.7	1.1	0.6	0.1	0.3	1.0	2.1	4.8
			0.5	0.3	1.2	2.8	0.4	0.1	0.7	0.9	8.2
			2.4	3.8	2.5	9.4	1.0	0.0	1.7	2.1	11.6
		Assay 2	1.0	1.1	10.4	0.4	0.1	0.2	2.0	2.6	2.3
			0.9	1.0	11.4	1.5	0.1	0.0	1.5	2.0	3.9
			1.3	3.5	24.3	0.3	0.2	0.0	1.9	6.9	5.5
		Assay 3	1.2	ND	0.0	1.5	1.0	0.3	0.4	0.3	4.9
			3.2	0.0	0.2	2.1	0.4	0.3	0.5	2.5	10.8
			3.9	0.0	ND	1.1	0.7	0.3	0.6	0.4	16.1
CAOH	Weak	Assay 1	0.3	1.2	7.2	1.1	0.6	2.2	0.6	0.4	3.6
			3.2	1.7	9.6	2.2	1.2	2.5	1.1	1.0	3.7
			2.4	0.6	26.7	1.5	0.2	18.9	0.9	0.4	6.3
		Assay 2	1.1	5.0	19.1	0.9	1.4	2.5	4.2	0.2	2.4
			0.3	2.6	16.8	0.3	1.4	2.0	0.3	1.2	2.0
			ND	1.9	16.5	0.5	0.6	1.8	0.3	0.1	2.8
		Assay 3	4.7	53.2	27.7	1.6	2.2	2.1	0.9	0.8	8.3
			3.8	64.1	27.9	2.2	2.1	2.3	1.9	0.5	8.2
			1.5	93.9	25.1	0.8	1.7	2.1	0.3	0.5	12.0
Sensitizer	RQ ≥ 1.5	30	32	47	17	22	35	22	23	59	
	Total assay	68	71	70	72	72	72	70	72	72	
	RQ ≥ 1.5 (%)	44	45	67	24	31	49	31	32	82	

RQ : 遺伝子発現量, ND : non-detection, Bold : 遺伝子発現量 ≥ 1.5

以下に続く

表 10 曝露 3, 6, 24 時間における相対遺伝子発現続き (非感作性物質)

Abbreviation of substance	category of LLNA	time	IL1B			CD86			HMOX1			TNFRSF12A				
			3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h		
ABA	non-sensitizer	Assay 1	0.8	1.2	2.0	1.1	0.9	1.1	1.1	1.1	1.3	0.1	1.6	1.3		
			0.5	0.7	3.1	0.5	0.5	0.9	0.7	0.8	1.7	0.0	1.3	2.3		
			0.7	2.0	1.9	0.5	1.5	1.1	0.4	2.1	1.0	0.0	2.7	1.0		
		Assay 2	0.3	1.1	2.6	0.4	0.8	1.5	0.5	0.9	1.7	0.0	1.4	1.7		
			0.6	1.0	3.6	0.6	0.8	1.1	0.8	1.1	2.0	0.0	2.0	2.7		
			1.1	0.8	2.5	0.8	0.6	1.5	0.7	0.9	1.4	0.1	1.1	1.3		
		Assay 3	0.2	0.2	1.0	0.2	1.3	3.1	0.4	0.5	2.6	0.9	0.6	0.5		
			0.1	0.1	0.9	0.2	0.3	1.8	0.4	0.3	2.0	0.8	0.3	0.4		
			0.3	0.3	9.0	0.5	1.9	4.4	0.8	1.4	11.1	1.9	0.4	3.7		
		CB	non-sensitizer	Assay 1	1.2	0.9	1.0	1.1	1.6	1.6	1.5	2.0	2.4	1.4	0.8	0.6
					2.0	1.3	1.0	1.5	1.3	0.8	2.0	2.0	2.2	1.9	1.0	1.0
					0.6	0.5	0.7	1.1	0.7	1.2	1.4	1.3	1.5	1.4	0.6	0.5
Assay 2	0.4			0.5	1.6	0.7	0.8	0.6	0.9	1.5	1.5	1.4	1.2	1.0		
	0.4			0.6	0.6	0.7	0.5	0.7	1.3	1.4	1.8	1.1	1.0	1.0		
	1.5			0.5	0.8	0.9	0.4	1.4	1.3	1.4	2.0	1.7	1.0	1.0		
Assay 3	0.7			0.5	0.6	1.2	0.4	1.1	0.8	0.6	0.6	0.8	0.6	0.7		
	0.5			0.6	0.8	1.2	0.6	0.8	0.9	0.8	0.9	1.2	0.9	0.7		
	1.1			0.7	0.9	0.8	0.8	2.0	1.0	0.7	0.7	1.3	0.9	0.7		
IPN	non-sensitizer			Assay 1	ND	16.3	ND	0.4	0.4	0.1	0.2	8.0	ND	ND	ND	ND
					ND	1.2	ND	0.3	1.8	0.1	0.8	17.9	0.0	ND	ND	ND
					ND	ND	0.8	0.8	5.3	0.5	4.5	36.9	0.5	ND	ND	0.8
		Assay 2	0.7	0.9	9.5	0.3	1.0	0.4	69.7	3.6	9.2	16.8	0.8	3.1		
			0.9	2.0	0.0	0.5	1.7	0.6	44.7	6.3	9.7	9.2	1.5	4.1		
			1.7	2.4	7.7	0.9	0.5	0.2	64.6	79.6	10.1	13.7	2.4	3.2		
		Assay 3	0.0	0.1	ND	1.0	0.7	0.4	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0	ND		
			0.0	0.0	ND	0.8	1.2	0.2	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND		
			0.0	ND	0.0	1.2	1.1	0.5	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0		
		SDS	False positive	Assay 1	1.2	1.8	1.5	0.6	0.9	0.6	8.1	12.8	3.7	19.7	7.5	1.3
					ND	1.5	1.4	0.7	0.8	0.9	6.4	16.7	3.4	ND	6.6	1.1
					1.2	1.6	1.2	0.7	1.0	0.8	7.6	14.4	3.0	15.6	6.1	1.0
Assay 2	24.2			44.8	8.0	2.0	2.1	3.5	50.1	188.3	20.8	14.0	20.6	1.5		
	33.1			31.7	10.0	1.9	2.1	2.7	47.7	150.8	18.0	22.4	11.4	2.2		
	18.1			28.8	11.2	1.6	1.4	3.6	36.4	102.3	22.0	17.1	9.7	6.1		
Assay 3	2.4			1.4	1.5	1.8	1.1	0.7	2.1	2.7	5.6	0.6	2.2	2.8		
	1.0			0.6	0.9	0.9	0.8	0.5	1.1	1.6	4.7	1.1	0.6	1.5		
	1.7			1.1	2.0	1.1	2.6	0.6	1.6	3.0	5.7	0.5	2.2	2.3		
Non-sensitizer	RQ ≥ 1.5			8	10	14	5	9	9	13	19	22	11	13	11	
	Total assay			33	35	33	37	37	37	37	37	35	33	34	33	
	RQ ≥ 1.5 (%)			24	29	42	14	24	24	35	51	63	33	38	33	

RQ : 遺伝子発現量, ND : non-detection, Bold : 遺伝子発現量 ≥ 1.5

以下に続く

表 10 曝露 3, 6, 24 時間における相対遺伝子発現 続き (非感作性物質)

Abbreviation of substance	category of LLNA		TREM1			CXCL14			CD54			
			3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h	
ABA	non-sensitizer	Assay 1	6.9	3.1	1.3	27.1	0.7	1.0	3.7	2.2	2.1	
			3.0	2.2	1.6	11.2	0.5	0.7	1.4	1.0	2.3	
			40.7	11.1	0.6	14.2	1.0	0.7	1.7	3.8	2.1	
		Assay 2	2.9	2.8	1.7	11.3	0.6	1.2	1.5	1.9	2.7	
			3.5	3.4	1.8	13.0	0.8	0.8	1.6	1.6	2.7	
			67.2	4.7	0.9	23.5	0.4	0.9	2.7	1.6	2.8	
		Assay 3	4.3	6.8	ND	0.1	0.9	0.6	0.6	0.7	14.5	
			1.4	0.5	ND	0.1	0.1	0.5	0.5	0.3	1.4	
			71.0	0.0	42.8	0.2	1.3	0.7	0.9	2.7	10.4	
	CB	non-sensitizer	Assay 1	4.4	6.3	1.1	0.9	0.7	3.7	1.9	1.3	0.6
				6.8	6.8	3.4	1.7	0.8	1.1	2.3	1.3	0.9
				10.7	5.7	6.1	0.4	0.2	1.2	1.9	1.3	0.6
Assay 2			1.2	2.6	0.9	0.4	0.2	0.6	2.7	3.0	2.4	
			0.6	1.9	0.6	0.6	0.2	0.5	1.7	2.7	1.3	
			12.6	3.2	1.7	0.7	0.2	1.4	3.0	2.5	1.1	
Assay 3			1.1	1.2	0.1	0.9	0.6	0.8	0.8	1.4	0.9	
			3.7	0.9	2.9	0.6	0.5	0.9	0.9	1.0	1.0	
			1.1	2.3	1.6	0.8	0.6	1.1	0.8	1.2	1.2	
IPN		non-sensitizer	Assay 1	ND	ND	ND	ND	0.1	0.0	ND	ND	ND
				ND	ND	ND	0.0	1.7	ND	ND	1.7	0.0
				ND	ND	3.1	0.0	ND	0.6	0.2	2.3	1.4
	Assay 2		558.3	2.7	ND	2.0	0.9	0.4	4.9	1.4	5.7	
			459.8	1.1	ND	2.9	1.5	0.5	3.2	1.4	6.2	
			726.6	4.6	ND	4.9	0.3	0.2	3.2	5.1	4.2	
	Assay 3		ND	ND	ND	0.0	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0	
			ND	ND	ND	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.4	
			ND	ND	ND	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.3	
	SDS	False positive	Assay 1	30.7	29.2	6.7	0.8	1.4	0.4	2.5	2.2	1.4
				4.8	6.9	1.6	ND	1.9	0.6	1.9	2.1	1.5
				6.9	7.5	1.4	0.9	1.4	0.4	2.0	1.9	1.7
Assay 2			3.5	15.1	6.4	1.4	2.4	1.7	7.9	11.1	2.7	
			3.3	12.8	5.7	0.9	1.8	1.3	6.4	10.9	3.7	
			3.8	6.6	7.1	0.9	2.0	2.5	4.9	6.1	6.0	
Assay 3			1.0	2.0	1.2	1.6	1.2	0.4	1.2	1.3	2.5	
			0.6	0.5	1.0	0.5	0.4	0.3	1.1	0.7	2.0	
			0.5	2.4	2.0	0.5	2.1	0.2	1.1	1.2	4.2	
Non-sensitizer		RQ ≥ 1.5	22	24	16	11	7	3	20	18	20	
		Total assay	31	31	27	35	36	36	35	36	36	
		RQ ≥ 1.5 (%)	71	77	59	31	19	8	57	50	56	

RQ : 遺伝子発現量, ND : non-detection, Bold : 遺伝子発現量 ≥ 1.5

表 11 曝露 3, 6, 24 時間における感作性評価の検討

Category of LLNA	Judgement of h-CLAT	time	IL1B			CD86			HMOXI			TNFRSF12A			TREM1			CXCL14			CD54		
			3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h
pBQ	Extreme	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNCB	Extreme	P	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
PPDA	Strong	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MP	Moderate	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAP	Moderate	P	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
NISO ₄	Moderate	P	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
BGE	Weak	N	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
CAOH	Weak	P	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
ABA	Non-sensitizer	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB	Non-sensitizer	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IPN	Non-sensitizer	N	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS	False positive	N	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	Sensitizer	8	1	2	6	0	1	4	6	7	7	1	5	6	4	4	5	2	1	3	2	3	6
	Non-sensitizer	4	3	2	2	4	4	4	3	2	1	2	2	2	1	0	0	3	4	4	0	2	2
	Accuracy (%)		33	36	73	33	42	67	0	75	67	27	64	73	0	45	36	50	0	42	42	58	67
pBQ	Extreme	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNCB	Extreme	P	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
PPDA	Strong	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MP	Moderate	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAP	Moderate	P	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
NISO ₄	Moderate	P	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
BGE	Weak	N	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
CAOH	Weak	P	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
ABA	Non-sensitizer	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB	Non-sensitizer	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IPN	Non-sensitizer	N	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS	False positive	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sensitizer	8	1	2	6	0	1	4	5	7	7	1	4	5	4	4	4	4	4	0	1	3	6
	Non-sensitizer	4	4	3	3	4	4	4	2	2	2	2	2	2	1	0	3	3	4	4	3	2	1
	Accuracy (%)		42	45	82	33	42	67	0	58	75	27	50	64	0	45	36	64	0	25	42	58	67
pBQ	Extreme	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNCB	Extreme	P	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
PPDA	Strong	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MP	Moderate	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NAP	Moderate	P	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
NISO ₄	Moderate	P	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
BGE	Weak	N	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
CAOH	Weak	P	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
ABA	Non-sensitizer	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB	Non-sensitizer	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IPN	Non-sensitizer	N	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS	False positive	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sensitizer	8	1	2	5	0	0	4	4	7	7	1	1	4	2	4	4	4	0	1	2	1	6
	Non-sensitizer	4	4	4	3	4	4	4	3	2	3	2	3	3	1	0	3	3	4	4	3	4	2
	Accuracy (%)		42	50	73	33	33	67	0	58	75	27	33	64	0	27	36	64	0	25	42	50	67

総括および結論

本研究は、Real-time RT-PCR を用いて、遺伝子発現量を指標とした感作性評価法を構築することで、簡便で試験コストを抑えた感作性評価法の開発を目的とした。そして、皮膚感作性の化学物質だけでなく、アレルギーを誘発する食品含有の化学物質に対する感作性評価が可能な試験法とすることを目指した。

アレルギーの原因となる化学物質に対する安全性試験には、皮膚感作性試験が行われている。これまでの皮膚感作性試験には、モルモットやラットを用いた GPMT やマウスを用いた murine LLNA が行われてきた。しかし、現在では動物試験が制限されているため、*in vitro* の感作性評価法が採用されている。しかしながら、既存の *in vitro* の試験法にはフローサイトメーターなどの高価な機器が必要とされ、試験コストは決して安価とは言えない。序論では、化学物質によるアレルギーとこれら感作性評価法の背景について述べ、既存の試験法に対する本研究の狙いを述べた。

第 1 章では、培養細胞 THP-1 を使い Real-time RT-PCR を用いた試験法を構築するために、THP-1 細胞の遺伝子から感作性物質に発現誘導され、且つ免疫機能に関わる遺伝子を探索し、そのうち 7 遺伝子をマーカー候補として選出した。さらに、Real-time RT-PCR 感作性評価法として、感作性物質と非感作性物質を区別する陽性基準値を検討し、各遺伝子の感作性評価能力を検証した。その結果、本試験法に有用なマーカーとして、*TREMI* および *TNFRSF12A* が見出され、本章の検討により、Real-time RT-PCR アッセイによる感作性評価が可能であることが示された。*TREMI* および *TNFRSF12A* は新規の感作性マーカー候補である。また、本検討は 13 物質に対して検討した結果である。そのため、判定基準値やマーカーとしての有用性については、さらに物質数を増やして検討する必要がある。

第 2 章では、本研究で選択したマーカー候補遺伝子を用いた Real-time RT-PCR 法により、経口摂取によりアレルギーを誘発する物質に対する感作性評価の有用性を検討した。食物アレルギーの誘発報告がある Na_2SO_3 および K_2SO_3 を用いた感作性評価では、検討した陽性基準値 1.5, 2.0, 2.5 の全てで、*TNFRSF12A*, *HMOX1*, *IL1B*, *CD54* の 4 遺伝子がそれぞれ感作陽性を示した。この結果は、本試験法が、

皮膚感作性物質だけでなく食物アレルギー様症状を誘発する食品添加物に対する感作性評価が期待できることを意味した。

第3章では、より実施し易い試験法へと改良するために、短い曝露時間における感作性評価法を検討した。

遺伝子発現の変化は、24時間より短い曝露時間でも観察される。試験の工程時間が短ければ、作業負担を減らすことになり、より効率的な試験法となる。そのため、本研究では、化学物質への曝露時間を24時間より短くした感作性評価法の検討を行った。その結果、12物質に対する検討において、曝露時間を3、6時間条件にした場合、*HMOX1*が感作性評価のためのマーカー遺伝子となり得ることが示唆された。試験法の確立のためにはさらに被験物質を増やして検証する必要があるが、この結果により、本研究で選出したマーカー候補遺伝子を用いた **Real-time RT-PCR** による感作性評価は、24時間より短い曝露時間でも有用であることが期待できた。

これらの研究結果は、THP-1細胞ベースの **Real-time RT-PCR** アッセイによる感作性評価法の有用性を示した。この試験法は、化学物質単体における感作性を評価し、化学物質を原材料および含有物質として取扱う上での一次スクリーニング試験となり得る。また、本感作性評価法が確立されれば、操作性およびコスト面において既存の評価法よりも優れた試験法となる。ただし、評価法として確立するためには、化合物を増やしたさらなる検証が必要であり、シングルマーカーでの評価が可能か、あるいはマーカーを組み合わせる必要があるかについても、今後の検討事項である。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始真摯に御指導、御鞭撻を賜りました東京海洋大学 大学院 海洋科学技術研究科 食品衛生化学研究室 黒瀬 光一教授に心より感謝の意を表しここに厚く御礼申し上げます。

研究だけでなく、多岐にわたりご助言を賜り温かく見守って下さいました同研究室 嶋倉 邦嘉准教授に心より感謝申し上げます。

本研究においてのご指導およびご教授下さいました、食品加工学研究室 大迫一史教授、食品保全化学研究室 後藤 直宏教授および生体物質化学研究室 石崎 松一郎教授に深くお礼申し上げます。

実験の補佐だけでなく、澁刺とした研究生活を与えてくれた衛生化学研究室の卒業生および在学生の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、ずっと支えてくれた家族と、時に叱咤激励を頂いた友人たちに心から感謝いたします。

参照文献

- Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., et al., 2009. HMOX1 and NQO1 Genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicological Sciences*, 107, 451-460.
- Adler, S., Basketter, D., Creton, S., et al., 2011. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology*, 85, 367-485.
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H. & Tagami, H., 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *European Journal of Immunology*, 27, 3031-3038.
- Arkus, J., Stępnik, M., Sobala, W. & Dastyk, J., 2010. Prediction of the contact sensitizing potential of chemicals using analysis of gene expression changes in human THP-1 monocytes. *Toxicology Letters*, 199, 51-59.
- Ashikaga, T., Hoya, M., Itagaki, H., et al., 2002. Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicology in Vitro*, 16, 711-716.
- Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., et al., 2010. A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Alternatives to Laboratory Animals*, 38, 275-84.
- Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., et al., 2006. Development of an in vitro skin sensitisation test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicology In Vitro*, 20, 767-773.
- Bocchietto, E., Paolucci, C., Breda, D., et al., 2007. Human monocytoïd THP-1 cell line versus monocyte-derived human immature dendritic cells as in vitro models for predicting the sensitising potential of chemicals. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 20, 259-265.
- Bouchon, A., Dietrich, J., Colonna, M., 2000. Cutting edge: Inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *Journal of Immunology*, 164, 4991-4995.

- Bouchon, A., Facchetti, F., Weigand, M.A., Colonna, M., 2001. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature*, 410, 1103-1107.
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., et al., 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 32401-32410.
- Dennis, G., Sherman, B.T., Hosack, D.A., et al., 2003. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biology*, 4, P3.
- Directive 2003/15/EC. (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. *Official Journal of the European Union*, L66, 26–35.
- Dos Santos, G.G., Reinders, J., Ouwehand, K., et al., 2009. Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236, 372-382.
- Feng, S.L.Y., Guo, Y., Factor, V.M., et al., 2000. The Fn14 immediate-early response gene is induced during liver regeneration and highly expressed in both human and murine hepatocellular carcinomas. *American Journal of Pathology*, 156, 1253-1261.
- Gerberick, F., Aleksic, M., Basketter, D., et al., 2008. Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers. *Alternatives to Laboratory Animals*, 36, 215-242.
- Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., et al., 2005. Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis*, 16, 157-202.
- Gibot, S., Le Renard, P.E., Bollaert, P.E., et al., 2005. Surface triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression patterns in septic shock. *Intensive Care Medicine*, 31, 594-597.
- Goebel, C., Aeby, P., Ade, N., et al., 2012. Guiding principles for the implementation of non-animal safety assessment approaches for cosmetics: Skin sensitisation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63, 40-52.

- Harada, N., Nakayama, M., Nakano, H., et al., 2002. Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299, 488-493.
- Hirota, M., Moro, O., 2006. MIP-1 beta, a novel biomarker for in vitro sensitization test using human monocytic cell line. *Toxicology in Vitro*, 20, 736-742.
- Hooyberghs, J., Schoeters, E., Lambrechts, N., et al., 2008. A cell-based in vitro alternative to identify skin sensitizers by gene expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231, 103-111.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Tan, Q., et al., 2007. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 35, W169-175.
- Jin, L., Nakao, A., Nakayama, M., et al., 2004. Induction of RANTES by TWEAK/Fn14 interaction in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 122, 1175-1179.
- Johansson, S. G. O., Hourihane, J. O'B., Bousquet, J., et al., 2001. A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 56. p. 813-824.
- Karlberg, A.T., Bergstrom, M.A., Borje, A., et al., 2008. Allergic contact dermatitis-formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 53-69.
- Kern, P.S., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., et al., 2010. Local lymph node data for the evaluation of skin sensitization alternatives: a second compilation. *Dermatitis*, 21, 8-32.
- Kimber, I., Basketter, D.A., Gerberick, G.F., et al., 2011. Chemical Allergy: Translating Biology into Hazard Characterization. *Toxicological Sciences*, 120, S238-S268.
- 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.
- Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J., 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual Review of Immunology*, 27, 229-265.

- Meighan-Mantha, R.L., Hsu, D.K.W., Guo, Y., et al., 1999. The mitogen-inducible Fn14 gene encodes a type I transmembrane protein that modulates fibroblast adhesion and migration. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 33166-33176.
- Miyazawa, M., Ito, Y., Yoshida, Y., et al., 2007. Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicology in Vitro*, 21, 428-437.
- Nukada, Y., Ashikaga, T., Miyazawa, M., et al., 2012. Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicology In Vitro*, 26, 1150-1160.
- Nukada, Y., Miyazawa, M., Kazutoshi, S., et al., 2013. Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicology In Vitro*, 27, 609-618.
- OECD., 1992. Test No. 406: skin sensitisation. The organisation for economic cooperation and development (OECD) guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects, Paris, France. OECD Publishing.
- OECD., 2002. Test No. 429: skin sensitisation: the local lymph node assay, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4: health effects, OECD Publishing.
- OECD., 2010a. Test No. 429: skin sensitisation: the local lymph node assay, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4: health effects, OECD Publishing (updated).
- OECD., 2010b. Test No. 442A: skin sensitization: the local lymph node assay: DA, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects, OECD Publishing.
- OECD., 2014. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins. OECD series on testing and assessment, No. 168, OECD Publishing.
- OECD., 2018. Test No. 442E: in vitro skin sensitisation: in vitro skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4: health effects, OECD Publishing.
- Ogura, Y., Mishra, V., Hindi, S.M., et al., 2013. Proinflammatory cytokine tumor necrosis

- factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) suppresses satellite cell self-renewal through inversely modulating Notch and NF-kappa B signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 35159-35169.
- Oliphant, T., Mitra, A., Wilkinson, M., 2012. Contact allergy to sodium sulfite and its relationship to sodium metabisulfite. *Contact Dermatitis*, 66, 128-130.
- Posadas, S.J., Pichler, W.J., 2007. Delayed drug hypersensitivity reactions – new concepts. *Clinical and Experimental Allergy*. 37, p. 989-999.
- Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Gildea, L.A., et al., 2005. Interactions of contact allergens with dendritic cells: Opportunities and challenges for the development of novel approaches to hazard assessment. *Toxicological Sciences*, 88, 4-11.
- Ryan, C.A., Kimber, I., Basketter, D.A., et al., 2007. Dendritic cells and skin sensitization: Biological roles and uses in hazard identification. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221, 384-394.
- Saitoh, T., Nakayama, M., Nakano, H., et al., 2003. TWEAK induces NF- κ B2 p100 processing and long lasting NF- κ B2 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 36005-36012.
- Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Yoshida, Y., et al., 2007. Prediction of preservative sensitization potential using surface marker CD86 and/or CD54 expression on human cell line, THP-1. *Archives of Dermatological Research*, 298, 427–437.
- Sakaguchi, H., Ryan, C., Ovigne, J.M., et al., 2010. Predicting skin sensitization potential and inter-laboratory reproducibility of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) in the European Cosmetics Association (COLIPA) ring trials. *Toxicology in Vitro*. 24, 1810–1820.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nature Protocols*, 3, 1101-1108.
- Schoeters, E., Verheyen, G.R., Nelissen, I., et al., 2007. Microarray analyses in dendritic cells reveal potential biomarkers for chemical-induced skin sensitization. *Molecular Immunology*, 44, 3222-3233.

- Sutterwala, F.S., Ogura, Y., Szczepanik, M., et al., 2006. Critical Role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in Innate and Adaptive Immunity through Its Regulation of Caspase-1. *Immunity*, 24, 317-327
- Takenouchi, O., Fukui, S., Okamoto, K., et al., 2015. Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Journal of Applied Toxicology*, 35, 1318-32.
- Tietze, C., Blomeke, B., 2008. Sensitization assays: Monocyte-derived dendritic cells versus a monocytic cell line (THP-1). *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, 71, 965-968.
- Vally, H., Misso, N. L. A., Madan, V., 2009. Clinical effects of sulphite additives. *Clinical & Experimental Allergy*, 39, 1643-1651.
- Watanabe, H., Gaide, O., Petrilli, V., et al., 2007. Activation of the IL-1 β -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 1956-1963.
- Weltzien, H.U., Corsini, E., Gibbs, S., et al., 2009. Safe cosmetics without animal testing? Contributions of the EU Project Sens-it-iv. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 4, 41-48.
- Wiley, S.R., Cassiano, L., Lofton, T., et al., 2001. A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity*, 15, 837-846.
- Wiley, S.R., Winkles, J.A., 2003. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 14, 241-249.
- Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Ito, Y., et al., 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. *Toxicology in Vitro*. 17, 221-228.
- 穂山浩, 海老澤元宏., 2014. 低分子化合物の食物アレルギー. *日本小児アレルギー学会誌*. 28, 25-30.

- 足立雄一., 2020. 日本のアレルギー疾患はどう変わりつつあるのか. 富山大学学術研究部医学系小児科学講座.
- 厚生科学審議会疾病対策部会リウマチ・アレルギー対策委員会., 2011. リウマチ・アレルギー対策委員会報告書.
- 厚生労働省科学研究 赤澤班., 2013. 「厚生労働省科学研究 赤澤班 2010～2012 年度報告書アレルギー疾患の全国全年齢有症率および治療ガイドライン普及効果等疫学調査に基づく発症要因・医療体制評価に関する研究」 2010～2012 年度総合研究報告書. 研究代表者 赤澤 晃. 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 (免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業) .
- 厚生労働省健康局疾病対策課., 2010. リウマチ・アレルギー情報 第 1 章アレルギー総論. リウマチ・アレルギー相談員養成研修会. 5-14.
- 厚生労働省重篤副作用総合対策検討会., 2008. 重篤副作用疾患別対応マニュアル アナフィラキシー. 厚生労働省.
- 厚生労働省重篤副作用総合対策検討会., 2010. 重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬剤による接触皮膚炎. 厚生労働省.
- 澤田純一., 2011. 非臨床アレルギー性試験の現状と課題. *Immuno Tox Letter*. 31, No.1, p. 3-7.
- 消費者庁 News Release., 2012. コチニール色素に関する注意喚起. 消費者庁.
- 長瀬洋之., 2016. アレルギー疾患の検査法と治療総論. 第 50 回日本アレルギー学会 専門医教育セミナー.
- 日本皮膚科学会ガイドライン., 2009. 日本皮膚科学会ガイドライン 接触性皮膚炎ガイドライン. 日本皮膚科学会雑誌. 119, 1757-1793.
- 松原篤, 坂下雅文, 後藤穰ら., 2020. 鼻アレルギーの全国疫学調査 2019 (1998 年, 2008 年との比較) 速報. 日本耳鼻咽喉科学会会報. 123, 485-490.