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

博士学位論文内容要旨 Abstract

専攻 Major	応用生命科学	氏名 Name	西川（宇梶）真帆
論文題目 Title	Real-time RT-PCR 法による化学物質の新規感作性評価法の開発		

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。化学物質は本来単体ではアレルゲン性は持たないが、生体内でタンパク質と結合あるいは複合体を形成することでアレルゲン性を獲得する場合がある。このような化学物質には、防腐剤や、化粧品原料、医薬品成分の他、食品含有物質によっても食物アレルギーを発症した例が報告されている。化学物質によるアレルギー症状には、かゆみやかぶれだけでなく、薬剤性肝障害、アナフィラキシーショックなど、命に関わる重篤な症状が引き起こされる場合もある。そのため、アレルギーの原因となる化学物質を事前に予測・評価することは、アレルギー予防や安全な生活環境を確保するために重要である。

化学物質のアレルギー感作性を評価する試験には、接触性皮膚炎の原因となり得る可能性を評価する皮膚感作性評価法が確立している。これまでの皮膚感作性評価法は、主に実験動物を使用した Guinea pig maximization test (GPMT) や murine local lymph node assay (murine LLNA) が実施されてきた。しかし現在、動物実験は欧州連合によって禁止されている。そのため、近年、皮膚感作性評価法代替法の開発が進められ、皮膚感作の生物学的反応メカニズム、「有害転帰経路」に基づくいくつかの動物試験代替法が確立されている。この代替法うち、ヒト単球性白血病由来細胞株 THP-1 を用いる human cell line activation test (h-CLAT) は、免疫関連分子 CD86 および CD54 を指標とし、化学物質に対する細胞表面発現の変化を定量化して感作性を評価する *in vitro* 試験法である。h-CLAT は、試験に定義された適用範囲内において murine LLNA と同じように機能する。しかしながら、試験操作が煩雑なうえ、検出機器フローサイトメーターは高額であり、初期費用を含めて試験コストが良いとは言えない。

そこで本研究は、フローサイトメトリーの代替として Real-time RT-PCR アッセイによる皮膚感作性試験を提案する。Real-time RT-PCR アッセイは、フローサイトメトリーに比べて簡便な操作性で、試験の全体コストも抑えた試験方法である。

第1章では、本試験法のために、皮膚感作性が既知の化学物質に曝露された THP-1 細胞から、発現誘導を示す遺伝子を探索し、マーカー候補の選定および評価方法の検討を行った。具体的には、標準的な皮膚感作性物質である硫酸ニッケル (NiSO₄) および 2, 4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) をそれぞれ THP-1 細胞へ 24 時間曝露し、DNA microarray および Gene Ontology 解析により発現変動を示す免疫関連遺伝子を探索した。その結果、発現誘導された遺伝子のうち 26 遺伝子が免疫機能に最も関連性が高い遺伝子群に分類された。この遺伝子群から、感作性物質と非感作性物質を区別する感作性評価のマーカー候補として、7 遺伝子 (*IL1B*, *CD86*, *HMOX1*, *TNFRSF12A*, *TREMI*, *CXCL14*, *CD54*) を任意に選出した。さらに、感作性が既知の化学物質 13 種を用いて、感作性物質および非感作性物質を分類するための陽性基準値を検討した。

第2章では、アレルギーを誘発する経口摂取する化学物質に対し、本試験法の感作性評価を検証した。現在、接触性皮膚炎の可能性を評価する感作性評価法はいくつか確立しているが、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、経口摂取によりアレルギーを誘発する化学物質の評価を考慮した感作性評価法の開発が必要である。そこで本章は、食物

アレルギーの発症報告があり防腐剤や抗酸化剤として利用される亜硫酸塩として、亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3) 及び亜硫酸カリウム (K_2SO_3) を感作性評価した。その結果、マーカー候補7遺伝子のうち *HMOX1*、*IL1B*、*TNFRSF12A* で感作陽性と評価された。今回の検証は一例のみであるが、食物アレルギーを誘発する食品含有の化学物質に対しても、本試験法による感作性評価が可能であることが期待できる。

第1章および第2章にて検証した本試験法は、h-CLAT の試験方法を参照して、化学物質への細胞曝露時間を24時間で行った。しかし、本試験法は細胞表面の発現よりも短い曝露時間で発現が観察可能な遺伝子発現を指標としている。そこで第3章では、化学物質への短い曝露時間による試験法を検討した。NiSO₄ および DNCB を用いて検証した結果、遺伝子によっては、曝露3時間または6時間から高い発現量を示し、短い曝露時間で感作性が評価できる可能性を見いだした。また、*HMOX1* をマーカーとした場合、曝露3時間および6時間の条件で、12種の化学物質の感作性評価が可能であることが示唆された。これらの結果は、THP-1細胞への化学物質の曝露時間を24時間ではなく3時間に短くした場合でも、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唆した。これにより、本試験法を用いれば最短1日で感作性を評価出来ると期待できる。

Real-time PCR は操作性が単純で、装置コストはフローサイトメーターの半額以下で済み、試験のランニングコストを含め、既存の試験法に比べてコスト効率が優れている。試験法としての確立のためには、さらに物質数を増やした十分な検証が必要であるが、Real-time RT-PCR を適用した本試験法は、多くの化合物を扱い製造販売する施設での、安全性試験に対する経済的負担を大幅に軽減できる有望な感作性評価法となる。