

学 位 論 文 要 旨

氏名 前田 洋祐

題 目：皮膚感作性試験の適用性拡大に関する研究

論文要旨：化学物質の皮膚感作性の評価は公衆衛生及び労働衛生上非常に重要である。

近年、化学物質の皮膚感作性評価にはモルモットもしくはマウスを用いた試験法が用いられてきたが、動物愛護の観点から近年の皮膚感作性試験を取り巻く環境は動物を用いない試験法へ移行する流れになっている。

化学物質のヒトへの有害性影響の軽減のためには、試験法の整備と並行してリスクコミュニケーションが必要である。そのためのツールとして、**Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)** があり、広く利用されている。GHS では皮膚感作性を有する情報のある物質に関しては区分 1 と分類され、その中でも強い感作性物質は区分 1A、その他の感作性物質は区分 1B と細区分される。細区分は強い感作性物質を警告できるため、より正確なリスクアセスメントを可能にし、ヒトの健康を守るためにも非常に有益な情報となる。

動物を用いた試験法では **Local Lymph Node Assay(LLNA)** が主流となっているが、LLNA は放射性同位体 (RI) を用いるため、日本国内では実施が困難であった。これまでに我々は RI を用いない **LLNA:BrdU-ELISA** を開発、テストガイドライン化し、実用化している。しかしながら、本法は GHS 細区分の基準が存在しないため、強い感作性物質を警告するためには、本法を用いた新たな基準を設定する必要があった (課題①)。

また、皮膚感作性の 1 つの表現系である光アレルギー性は、化学物質の有害性作用として重要である。既存の光アレルギー性試験法は、惹起相の皮膚反応を評価するため、比較的多くの動物と長い実験期間を必要とし、動物愛護の面で問題を有していた。さらに、ICH ガイドライン S10 では、既存の光アレルギー性試験法は、ヒトに対して予測可能性が未知であり、推奨されないとされている。そのため、動物愛護に優れ、短い試験期間かつ高精度な試験法の開発が必要である (課題②)。

一方、動物を用いない皮膚感作性試験にも課題があった。これまでに開発され OECD TG 化されてきた代替法のうち、ケラチノサイトの活性化を評価する試験法として **KeratinoSens™** 及び **LuSens** が OECD TG442D となっている。しかしながら、これらの試験法は偽陰性及び偽陽性と判定される物質があり、測定精度上の問題を有する。さらに本試験で用いる用量を決定するためにあらかじめ細胞毒性を評価する必要があり、煩雑である。そこで、ヒトへの感作性リスク低減のために高精度かつ簡便な試験法の開発が必要となっている (課題③)。

以上のことから、本研究では、課題①から課題③に対して、LLNA : BrdU-ELISA を用いた GHS 細区分の基準の設定及び実用性の検証、LLNA を応用した高精度かつ簡便な新規光アレルギー性試験法の開発及びケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時評価可能な高精度かつ簡便な新規 in

(別紙様式第 3 号)

in vitro 皮膚感作性試験法の開発を行い、これらの課題の解決を試みた。

まず課題①に対して、新たな GHS 細区分基準 EC1.6 値、6%を見出し、LLNA の GHS 分類結果との一致率は、区分 1A 及び区分 1B はそれぞれ 92.3%及び 84.2%と算出された。さらに、汎用系統である CBA/J マウスを用いて得られた EC1.6 を用いて検証した結果、LLNA との GHS 分類の一致率は全て 100%となり、本法の新たな GHS 細区分基準は、GHS 細区分に適用でき、実用可能性があることが示された。

次に、課題②に対して LLNA を応用し、光安全性 LLNA を開発した。開発した試験法から得られた結果と既知の光アレルギー性情報は全物質一致した。さらに構造が類似しているものの光アレルギー性が異なる物質に関しても、正しく評価することができた。これらのことから、LLNA を応用し、動物愛護に優れ、短い試験期間かつ高精度な試験法を開発できたと考えられた。

最後に、課題③に対してケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時に試験可能な新規 in vitro 試験法である α -Sens を開発した。本法から得られた結果はヒトの感作性情報に対して全て一致し、既存の試験法よりも高精度であった。さらに細胞毒性を同時に試験可能であるため、予備試験が不要であり、簡便であった。したがって、 α -Sens は高精度かつ簡便な試験法であると考えられた。以上のことから、本研究成果は先に挙げた 3 つの課題の解決に貢献でき、化学物質のヒトに対する有害性評価及びリスクコミュニケーションの発展と、化学物質によるヒトへの有害影響の低減に貢献できるものと期待される。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	前 田 洋 祐
審 査 委 員	主 査：山口大学 教 授 岩田 祐之
	副 査：国立感染症研究所獣医科学部 獣医科学部長 前田 健
	副 査：鹿児島大学 教 授 中馬 猛久
	副 査：山口大学 教 授 木村 透
	副 査：山口大学 准教授 渋谷 周作
題 目	皮膚感作性試験の適用性拡大に関する研究

審査結果の要旨：

本論文では、化学物質のヒトに対する有害性評価及びリスクコミュニケーションの発展と、化学物質によるヒトへの有害影響の低減に寄与することを目的として、化学物質の皮膚感作性を評価する試験法の適用性拡大について検討した。すなわち、①Local Lymph Node Assay (LLNA): BrdU-ELISA の GHS 細区分の新たな基準の設定、②光アレルギー性試験法を代替する高精度の試験法の開発、③皮膚感作試験の代替法となるケラチノサイト活性化評価法の高精度かつ簡便な試験法の開発を実施した。

第 1 章では LLNA: BrdU-ELISA を用いた GHS 細区分の基準を設定し、その実用性について検証した。動物を用いた試験法では LLNA が主流となっているが、LLNA は放射性同位体 (RI) を用いるため、日本国内では実施が困難であった。そこで、申請者らは RI を用いない LLNA: BrdU-ELISA を開発して、テストガイドライン化し、実用化した。しかしながら、本法は GHS 細区分の基準が存在しないため、強い感作性物質を評価するためには、本法を用いた新たな基準を設定する必要がある。本章では、LLNA-RI において $SI \geq 3$ に相当する LLNA: BrdU-ELISA において $SI \geq 1.6$ の基準で陽性と判定される最少濃度である EC1.6 値について新たな GHS 細区分基準値として 6% を見出し、その LLNA の GHS 分類結果との一致率は、区分 1A 及び区分 1B はそれぞれ 92.3% 及び 84.2% と算出された。さらに、汎用系統である CBA/J マウスを用いて得られた EC1.6 を用いて検証した結果、LLNA との GHS 分類の一致率は全て 100% となり、本法の新たな GHS 細区分基準は、既存の細区分に適用でき、実用可能であることが示された。

第 2 章では、化学物質の光アレルギー性について、LLNA を応用し、光アレルギー安全性 LLNA を開発した。皮膚感作性の 1 つである光アレルギー性は、化学物質の有害性作用と

して重要であるが、既存の光アレルギー性試験法は、惹起相の皮膚反応を評価するため、比較的多くの動物と長い実験期間を必要とし、動物愛護の面で問題を有していた。さらに、ICH ガイドライン S10 では、既存の光アレルギー性試験法は、ヒトに対して予測可能性が未知であり、推奨されないとしている。そのため、動物愛護に優れ、短い試験期間かつ高精度な試験法の開発が必要であった。開発した試験法から得られた結果と既知の光アレルギー性情報は全物質一致した。さらに構造が類似しているものの光アレルギー性が異なる物質に関しても、正しく評価することができた。これらのことから、LLNA を応用し、動物愛護に優れ、短い試験期間かつ高精度な試験法を開発できたと考えられた。

第 3 章では、ケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時に試験可能な新規 *in vitro* 試験法である α -Sens を開発した。動物を用いない皮膚感作性試験については、これまでに開発され OECD TG 化されてきた代替法のうち、ケラチノサイトの活性化を評価する試験法として KeratinoSens™ 及び LuSens が OECD TG442D となっている。しかしながら、これらの試験法は偽陰性及び偽陽性と判定される物質があり、測定精度上の問題を有する。さらに本試験で用いる用量を決定するためにあらかじめ細胞毒性を評価する必要がある。そこで、ヒトへの感作性リスク低減のために高精度かつ簡便な試験法を開発した。 α -Sens は、①新たなパラメーターである normalized ARE Activity を評価する ARE 活性測定用レポーター遺伝子、ARE-AUG-Luc (ホタルルシフェラーゼ) と②細胞生存率測定用レポーター遺伝子、TK-Luc (ウミシイタケルシフェラーゼ) をヒトケラチノサイト PHK 16-0b に安定発現させて開発した試験法である。本法はヒトの感作性データに対して、正確度、感度及び特異度はすべて 100% となり、既存の KE-2 試験法よりも高精度であった。さらにケラチノサイトの活性化と細胞毒性を同時に試験可能であるため、既存の KE-2 試験法で必要であった予備試験が不要であり、既存の KE-2 試験法よりも簡便であった。本法から得られた結果はヒトの感作性情報に対して全て一致し、既存の試験法よりも高精度であり、さらに細胞毒性を同時に試験可能であるため、予備試験が不要であり、簡便である。したがって、 α -Sens は高精度かつ簡便な KE-2 試験法として極めて有用であると考えられた。

以上のように、本研究成果は先に挙げた 3 つの課題、①LLNA:BrdU-ELISA の GHS 細区分の新たな基準の設定、②光アレルギー性試験法を代替する高精度の試験法の開発、③皮膚感作試験の代替法となるケラチノサイト活性化評価法の高精度かつ簡便な試験法の開発について、その解決に貢献でき、化学物質のヒトに対する有害性評価及びリスクコミュニケーションの発展と、化学物質によるヒトへの有害影響の低減に貢献できるものと期待される。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の論文として、妥当なものであると判断された。