

各種化学物質の化学構造が皮膚感作性 アレルギー反応試験に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

新規薬剤の開発において皮膚感作性試験は必須であり、モルモットを用いて評価している。皮膚感作性試験には感作方法の異なる数種類の試験があり、その中から一つあるいは複数の試験を選択して新規薬剤の皮膚感作性を評価することになっている。各試験法では検出感度が異なっていることが報告されているものの、各種化学物質の試験系への影響については検討されておらず、この点を一般的な感作性物質を用いて明らかにすることは新規薬剤の開発のみならず、種々の化学物質の皮膚感作性を予測する上で基礎となる。本研究の第一部では、感作方法の異なる皮膚感作性試験における感作濃度および誘発濃度に対する感作性物質の物理化学的性質の影響を調べた。第二部では、薬剤の開発に重要な感作性物質の相互作用の有無について調べた。第三部では、第一部で用いた感作性物質である maleic anhydride の原因構造を交差反応を用いることにより調べ、酸無水物の皮膚感作性の構造活性相関を明らかにした。第四部では、原因構造の検討を更に行うべく皮膚感作性を誘導できるキャリアー蛋白質について調べた。第五部では、皮膚感作性試験を行う上で基礎となる性差の有無について皮膚感作性の強さの異なる化学物質を用いて皮膚感作性試験を実施した。また、抗原提示細胞として重要な Langerhans 細胞の ATPase 活性に着目して性差の有無を確認した。

第一部：皮膚感作性試験には感作方法の異なるいくつかの方法がある。各研究機関では Guinea pig maximization test (GPMT) あるいは Buehler test (BT) を用いているところが多いが、GPMT で陽性となった化学物質が必ずしも BT で陽性とはならない。これは、感作方法が異なることにより、化学物質の物理化学的性質が大きく影響を与えている可能性があると考えられる。従って、皮膚感作性の発症機序の上で、重要と考えられる蛋白質との反応性および皮膚透過性に着目し、これら蛋白質との反応性および皮膚透過性の異なる化学物質を用い、試験方法への影響を検討した。検出感度の指標として、感作濃度および誘発濃度を用い、感作方法の異なる試験系として GPMT、BT および Adjuvant and patch test を用いた。その結果、検出感度は感作濃度を指標とした場合、化学物質によって大きく異なり、BT/GPMT の Ratio

は蛋白質との反応性および皮膚透過性の高い 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) が 30 倍程度であったのに対して、蛋白質との反応性は高いものの皮膚透過性の低い maleic anhydride は 300,000 倍も異なることが判明した。このことは、化学物質の物理化学的性質は感作方法に対して、強く影響することを示している。また、誘発濃度を指標とした場合、各化学物質の感作率 50% を示す誘発濃度の BT/GPMT は 10 倍以内であり、化学物質の物理化学的性質は誘発には強く影響を与えないことが判明した。これらの結果から、化学物質の皮膚感作性を評価する場合、化学物質の物理化学的性質を考慮して試験系の選択および結果の解釈を実施することが重要であると考えられた。

第二部：農薬などの特殊な化学物質の中には混合して使用する場合があり、感作性物質を混合した場合の相互作用について検討することは重要である。このことを調べるため、強い感作性物質同士を混合した場合の相互作用および弱い感作性物質と強い感作性物質を混合した場合の相互作用を検討した。その結果、混合することにより、感作性を増強することはないことが示唆された。しかし、DNCB 感作動物を DNBCB で誘発する際に α -hexylcinnamic aldehyde を混合した場合に増強作用が認められたことから、混合した化学物質が他の化学物質の皮膚透過性に影響を与える可能性が示唆された。

第三部：第一部で用いた maleic anhydride は皮膚感作性の原因構造として酸無水物骨格の他に、 α , β -不飽和炭素骨格を有する。原因構造を同定することは化学物質の皮膚感作性を予測する上で役立つ。このため、複数の酸無水物を用いた皮膚感作性試験を実施、交差反応性を検討することにより maleic anhydride の原因構造を推定し、酸無水物の皮膚感作性について構造活性相関を明らかにした。その結果、酸無水物骨格のみを有し、親水性の高い酸無水物は皮膚感作性を示さず、疎水性が高くなると感作性を有するようになった。一方、親水性が高くても、 α , β -不飽和炭素骨格を有する化学物質は皮膚感作性が陽性であった。一方、maleic anhydride は maleic acid および maleimide 等と交差性を示し、2-cyclopenten-1,3-dione とは交差性を示さなかった点から、maleic anhydride は皮膚透過中に加水分解され、 α , β -不飽和炭素が感作性原因構造となっている可能性が示唆された。

第四部：皮膚感作性の原因構造を更に検討するためにキャリアー蛋白質の選定を行った。その結果、モルモットに対して異種蛋白質である Bovine serum albumin (BSA) をキャリアー蛋白質に用い、蛋白結合物として化学物質を感作した結果、皮膚感作性は誘導されなかった。一方で、モルモットと同種の蛋白質である Guinea pig serum albumin (GPSA) では皮膚感作性を誘導できた。これらの結果は、化学物質の皮膚感作性原因構造の詳細を検討する際には同種蛋白質である GPSA が有効であることを示している。

第五部：皮膚感作性試験の基礎となるモルモットの性差に関する検討を、GPMT および抗原提示細胞である Langerhans 細胞の ATPase 活性に着目して検討した。GPMT を用いた検討結果から、モルモットにおいて性差がないことが確認で

き、また、Langerhans 細胞の数、ATPase 活性にも性差がないことが判明した。この結果は、皮膚感作性試験を実施する際、モルモットでは性差がないことを示しており、本研究での非常に基礎的な情報である。

皮膚感作性試験に対する化学物質の影響を代表的な感作性物質で一般化することは、新規薬剤を開発するのみならず、種々の化学物質の皮膚感作性を予測する上で非常に重要である。本研究により、選択した皮膚感作性試験の特に感作に対して化学物質の物理化学的性質が大きく影響することが判明し、誘発にはあまり影響しないことが判明した。また、感作性物質を混合することにより感作性が増強することはないことが示されたが、混合する化学物質により他の化学物質の皮膚透過性が変化することが考えられた。また、モルモットではマウスと異なり、抗原提示細胞である Langerhans 細胞数に性差がないことが判明し、Langerhans 細胞特異的な ATPase 活性も雌雄差がないことが示唆された。このことは、モルモットを用いて種々の化学物質の皮膚感作性を評価する上で非常に基礎的な情報であるとともに、酸無水物の構造活性相関の結果などを考慮することは多くの化学物質の皮膚感作性を予測する上で重要でかつ、基礎的な情報となったと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 口 和 彌

副 査 教 授 矢 澤 道 生

副 査 教 授 菊 池 九二三

副 査 教 授 田 村 守

学 位 論 文 題 名

各種化学物質の化学構造が皮膚感作性

アレルギー反応試験に及ぼす影響

皮膚感作性試験は新規薬剤の開発に必須であるが、数種類の感作方法で得られる試験で、検出感度が異なることが認められている。しかしその詳細は全く不明であった。学位申請者はそこで、蛋白との反応性及び皮膚透過性の異なる代表的な感作性物質、2,4-dinitrochlorobenzene, maleic anhydride, α -hexylcinnamic aldehyde及び2-dodecen-1-yl succinic anhydrideを用いて試験方法への影響を調べた。その結果化学物質の物理化学的性質、蛋白との反応性、皮膚透過性が、感作方法に対して大きく影響するが、遅延型アレルギー誘発には大きく影響しないことが示された。また強い感作性物質同士及び強い感作性物質と弱い感作性物質を混合しても、感作性の増強は、皮膚透過性に影響を与えなければ、観察されないことを見出し、さらに皮膚感作性試験でよく用いられるmaleic anhydrideの感作性に及ぼす原因構造を明かにするため、succinic anhydride, citraconic anhydride, maleic acid 等6種類の酸無水物を用いた皮膚感作性と構造活性相関を検討した結果、酸無水物骨格よりも、むしろ $\alpha\beta$ 不飽和炭素が感作性原因構造であることが示唆された。又感作性原因構造の詳細を研究するさいには、実験動物と同種蛋白をキャリアーとすることが有効で有ることも見出した。さらに皮膚感作性試験の基礎となるモルモットの抗原提示細胞であるLangerhans細胞数と本細胞膜の外側に存在する細胞特異的なATPase, ADPaseとGTPase活性と皮膚感作性試験における性差の有無を検討した結果、いずれもマウスと異なり有意差のないことが示された。皮膚感作性試験に対する化学物質の影響を代表的な感作性物質で一般化することは、新規薬剤を開発する上で非常に重要である。本研究により、選択した皮膚感作性試験の特に感作に対して化学物質の物理化学的性質が大きく影響することが判明し、誘発にはあまり影響しないことが判明した。また、感作性物質を混合することにより感作性が増強することはないことが示されたが、又混合する化学物質により化学物質の浸透性が変化することも示された。以上の結果は、従来新規薬剤の開発において経験的に行われてきた皮膚感作性試験の生化学的機構を理解する上で重要かつ基本的な新知見である。よって申請者は北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。